

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Contribución a las técnicas de cromatografía en capa fina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francisco Jimeno de Ossó

DIRECTOR:

Germán Domínguez Rodríguez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

T1
543
JIM



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326704170

CONTRIBUCION A LAS TECNICAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

POR

FRANCISCO JIMENO DE OSSÓ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
BIBLIOTECA

MEMORIA

presentada para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

616495895
638192263

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro3.3.1.2.5.....

MADRID, MARZO DE 1975

El trabajo expuesto en la presente memoria ha sido realizado en su totalidad en los laboratorios de la Junta de Energía Nuclear.

El autor agradece:

Al Dr. D. Germán Domínguez Rodríguez (Jefe de la Sección de Radioquímica) su dirección y ayuda para la realización del trabajo y revisión de la memoria, así como su estímulo constante durante estos años.

Al Prof. D. Luís Gutiérrez Jodra (Director del Departamento de Reactores y Combustibles Nucleares) la revisión, orientación y presentación del trabajo.

A D. Felipe de la Cruz Castillo (Jefe de la División de Química Nuclear) las facilidades prestadas para su realización.

A los diferentes Departamentos de la Junta de Energía Nuclear su asesoramiento y ayuda tanto científica como técnica.

I N D I C E

Página

CAPITULO I.- TECNICAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	1
1. Introducción.....	1
2. Adsorbentes.....	5
2.1 Poliamidas.....	5
2.2 Celulosa.....	6
2.3 Geles de dextrano.....	6
2.4 Resinas cambiadoras de ión.....	7
2.5 Polihidrocarburos porosos (Porapak)....	7
2.6 Borosilicatos con superficie modificada (Durapak).....	7
2.7 Polvo de vidrio.....	8
2.8 Otros adsorbentes.....	8
2.9 Mezcla de adsorbentes.....	9
3. Capas y soportes.....	10
3.1 Preparación de placas.....	10
3.2 Dimensiones de las capas y soportes....	12
3.3 Placas con diversos adsorbentes.....	13
3.4 Lavado de las capas.....	14
3.5 Impregnación de las capas.....	14
4. Aplicación de la muestra.....	15
5. Revelado o desarrollo.....	16
5.1 Factores que influyen en el revelado; Rf.....	16
5.2 Diversas técnicas de revelado.....	20
5.3 Separación por electroforesis.....	23
6. Visualización o detección cualitativa y cuantitativa.....	25
6.1 Visualización y valoración simple.....	25
6.2 Visualización y valoración por densitometría.....	26

	<u>Página</u>
6.3 Visualización y valoración por fluorimetría..	28
6.4 Visualización y valoración por espectrofotometría directa sobre la capa.....	29
6.5 Identificación y valoración mediante elución.	31
6.5.1 Condiciones para una elución satisfactoria.....	32
6.5.2 Valoración del producto eluido.....	35
6.6 Visualización y valoración de productos radiactivos.....	36
6.6.1 Autorradiografía.....	36
6.6.2 Separación del producto activo del cromatograma.....	37
6.6.3 Visualización y valoración directa.....	39
6.6.3.1 Exploración.....	40
6.6.3.2 Visualización sin movimiento.....	43
6.7 Otros procedimientos de visualización y valoración de productos.....	45
7. Eficacia y resolución de un proceso cromatográfico.....	47
7.1 Eficacia.....	47
7.2 Resolución (o selectividad) del proceso cromatográfico.....	48
8. Conservación de cromatogramas.....	49
9. Comentario final.....	51
 CAPITULO II.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ESPESOR Y ADSORBENTE HOMOGENEOS EN TRES DIRECCIONES SOBRE LA MISMA CAPA.....	 52
1. Introducción.....	52
1.1 Descripción del método.....	53
2. Parte experimental y resultados.....	56
2.1 Determinación de la eficacia.....	56
2.2 Separación de colorantes.....	58
2.3 Determinación de la resolución de la separación.....	62
2.4 Separación de aminoácidos.....	63
3. Discusión.....	67

CAPITULO III.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE GRAN LONGITUD EN FORMA DE "Z".....	69
1. Introducción.....	69
2. Parte experimental y resultados.....	71
2.1 Zona curva de la capa.....	71
2.2 Estrechamiento de la capa.....	72
2.3 Separación de colorantes.....	73
2.4 Eficacia del sistema cromatográfico.....	76
2.5 Resolución del sistema cromatográfico.....	77
2.6 Separación de aminoácidos.....	78
3. Discusión.....	81
CAPITULO IV.- CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN CAPA FINA CON FASE MOVIL GASEOSA.....	82
1. Introducción.....	82
2. Parte experimental.....	85
2.1 Aparatos y productos utilizados.....	85
3. Resultados.....	88
3.1 Distancias de retención obtenidas con diferentes gases, vapores, capas y productos..	88
3.2 Variación de la distancia de retención en función de la temperatura del saturador...	91
3.3 Reproducibilidad del método.....	92
3.4 Variación de la distancia de retención en función de la altura del disolvente en el saturador.....	93
3.5 Variación de la distancia de retención en función de la temperatura de la cámara cromatográfica.....	93
3.6 Variación de la distancia de retención en función del tiempo de revelado.....	94
3.7 Variación de la distancia de retención y de la longitud de las manchas en función del caudal del gas portador.....	94
3.8 Influencia de la cantidad aplicada sobre la distancia de retención.....	95
3.9 Influencia de las dimensiones de la cámara sobre la distancia de retención y el tamaño de las manchas.....	96

3.10 Variación de la distancia de retención en función del tiempo de presaturación de la capa con el gas portador.....	98
3.11 Obtención de manchas de pequeño tamaño...	98
3.12 Separación de diversos productos.....	102
4. Discusión.....	106

CAPITULO V.- DETECCION DE PRODUCTOS RADIATIVOS DURANTE SU REVELADO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA..... 108

1. Introducción.....	108
2. Parte experimental y resultados.....	109
2.1 Soluciones radiactivas utilizadas.....	109
2.2 Equipo de medida.....	110
2.3 Cámara de revelado.....	110
2.4 Capas finas.....	110
2.5 Estudio de los diferentes parámetros que intervienen en la construcción de la cámara de revelado.....	111
2.6 Revelado experimental.....	116
2.7 Desviación típica de la medida de la actividad.....	117
3. Discusión.....	119

CAPITULO VI.- OBTENCION DE PRODUCTOS REVELADOS EN FORMA DE MANCHAS DE POCA SUPERFICIE Y LONGITUD EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA..... 121

1. Introducción.....	121
2. Parte experimental.....	125
3. Resultados y discusión.....	126

CAPITULO VII.- CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN CAPA PREPARATIVA FORMADA POR COMPRIMIDOS.....	131
1. Introducción.....	131
2. Parte experimental y resultados.....	135
2.1 Preparación de los comprimidos.....	135
2.2 Soporte de la capa.....	137
2.3 Aplicación del producto.....	137
2.4 Revelado.....	149
2.5 Secado.....	150
2.6 Visualización.....	150
2.7 Elución.....	151
2.8 Cromatografía descendente y lavado de las capas.....	151
2.9 Cromatografía ascendente en flujo continuo	152
2.10 Aplicación de la técnica de Musgrave.....	152
2.11 Primera purificación experimental.....	153
2.12 Segunda purificación experimental.....	155
3. Discusión.....	156
 RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	 159
 BIBLIOGRAFIA.....	 172
 INDICE DE FIGURAS.....	 184

CAPITULO I

TECNICAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

1.- INTRODUCCION

La cromatografía en capa fina (C.C.F.) (T.L.C. en inglés) es una de las técnicas cromatográficas que más amplia difusión ha obtenido en los últimos años debido, por un lado, a la sencillez del método y excelentes resultados obtenidos y, por otro, a lo económico del sistema respecto a otros procedimientos utilizados.

Su utilización se ha extendido de forma masiva a todos los campos de la investigación, facilitando el estudio de nuevos productos o aumentando su pureza, siendo una técnica muy adecuada para el estudio de productos que se manipulan en pequeñas cantidades, como ocurre con gran frecuencia en biología y farmacología.

La C.C.F. consiste esencialmente en la separación entre sí de los productos de una mezcla aplicada sobre un adsorbente (fase estacionaria) distribuido de forma homogénea sobre un soporte, revelándose estos productos sobre la capa mediante el paso de un disolvente (fase móvil). La mezcla de productos a separar se aplica cerca de un extremo de

la capa formada por el adsorbente; introduciendo este extremo en un disolvente, asciende a lo largo de la capa por capilaridad. Al resultado de este revelado se le llama cromatograma. Actualmente a este tipo de cromatografía, y junto con la cromatografía en papel, se le denomina cromatografía "en lecho plano". Según el tipo de capa o disolvente utilizados se pueden efectuar cromatografías de adsorción, partición, cambio iónico o filtración por gel; pudiendo, asimismo, si se comunica a los extremos de la capa un campo eléctrico adecuado, efectuar separaciones por electroforesis.

La C.C.F. se inicia con los trabajos sobre la separación de productos farmacéuticos de Izmailov y Shraiber en 1938. Después de una utilización esporádica, Kirchner y Miller la emplean en 1951 de una forma extensa y completa en la separación de terpenoides, utilizando diversos adsorbentes y equipos para el revelado.

Sin embargo, su aplicación masiva es fruto de los trabajos de Stahl, el cual normaliza el tamaño y características de los adsorbentes, aglutinantes y soportes, antes difíciles de encontrar comercialmente y de preparar, dándole a esta técnica el nombre actualmente utilizado de C.C.F. Posteriormente han sido miles los trabajos de investigación publicados en los que se ha utilizado la C.C.F., resolviendo esta técnica innumerables problemas de separación, visualización y valoración.

Debido a su sencillez, la forma de utilización original de la C.C.F. no ha experimentado variaciones fundamentales, habiéndose desarrollado, no obstante, numerosos trabajos en los que se describen nuevos adsorbentes y aglutinantes, diversos procedimientos de aplicación y revelado y numerosos visualizadores y detectores que facilitan la separación y valoración de los productos estudiados. Muchas de las técnicas utilizadas son una adaptación de la cromatografía en papel, mientras que otras son completamente nuevas puesto que la C.C.F. posee características propias.

Vamos a proceder al examen de las características más importantes de la C.C.F.; estas características no son exclusivas de esta técnica, pero reunidas en un solo sistema, hacen de la C.C.F., en numerosas ocasiones, un procedimiento ideal de separación y estudio.

Estas características son las siguientes:

Versatilidad: Posibilidad de utilizar la cromatografía de adsorción, partición, cambio iónico, etc.

Facilidad de manipulación: Sencillez y reducidas dimensiones del equipo generalmente utilizado.

Gran eficacia y resolución: Debida al pequeño tamaño de las partículas utilizadas en los adsorbentes.

Realización a temperatura ambiente: El revelado a temperatura ambiente hace de la C.C.F. un sistema ideal para su utilización en biología y en bioquímica y, en gene-

ral, en aquellos estudios en los que se manipulen productos térmicamente inestables.

Rapidez de realización: En pocos minutos puede conseguirse la aplicación, revelado y visualización de los productos.

Facilidad de detección: Pueden detectarse con gran sensibilidad numerosos productos de forma cualitativa y cuantitativa.

Bajo costo del material utilizado: Hay diversos procedimientos cromatográficos, como la cromatografía en columna a presión, la cromatografía en fase gaseosa, etc., que aventajan a la C.C.F. en numerosas facetas, pero por utilizar equipos de gran precio de adquisición y mantenimiento no pueden ser ampliamente utilizados; sin embargo, la C.C.F. es asequible a todos los laboratorios y debido a las características mencionadas, hace que sea, en numerosas ocasiones, un procedimiento único de separación.

La técnica original, que aun se emplea ampliamente en su forma primitiva, ha sido objeto, sin embargo, de numerosas modificaciones para adaptarla a los distintos problemas que han ido surgiendo y para explotar más a fondo sus posibilidades.

2.- ADSORBENTES

Los adsorbentes más utilizados siguen siendo los primitivos, gel de sílice, alúmina, celulosa, tierra silícea, etc., destacando entre ellos, sobre todo en cromatografía de adsorción, la gel de sílice.

No obstante, se han preparado nuevos adsorbentes adaptados generalmente a temas concretos, en los que era necesaria una mayor especificidad.

2.1. Poliámidas

Debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo fenólicos y los grupos amida, es posible la separación de los fenoles y productos similares con capas de poliámidas. De esta forma pueden utilizarse productos comerciales como Perlón o Nylón en la separación de fenoles. Aparte de los trabajos de Hathway (1959)^{*} y Hörhammer (1962) sobre aplicaciones específicas, es digno de mención el estudio de Hesse (1968) sobre las diferencias existentes entre las poliámidas y los poliacrilonitrilos, poliacrilamidas y N-acetil-poliacrilamidas como adsorbentes para el revelado de sustancias solubles en agua.

^{*} Las referencias bibliográficas se encuentran al final de esta memoria por orden alfabético de autores y años de publicación.

2.2. Celulosa

La celulosa, ideal para la separación de productos solubles en agua debido a sus numerosos grupos hidroxilo y a su facilidad para formar puentes de hidrógeno, puede también utilizarse para la separación de otro tipo de sustancias cambiando su estructura. Así, por ejemplo, utilizando celulosa acetilada (Ac-celulosa), material hidrófobo, cabe separar sustancias lipofílicas tales como colorantes de antraquinona (Wollenweber, 1962), antioxidantes (Salo, 1964), etc.

Si la celulosa contiene grupos ácidos o básicos unidos mediante uniones éter o éster, puede actuar como cambiadora de ión, siendo muy adecuada, debido a su estructura fibrosa, para la separación de moléculas hidrofílicas de gran longitud como las proteínas, enzimas, etc. Así, ha separado Dyer (1963) diversos nucleótidos y Coffey (1963) nucleosidos, purinas y pirimidinas.

2.3. Geles de dextrano

Por medio de geles de dextrano pueden separarse entre sí diferentes macromoléculas en función de su tamaño; las moléculas más pequeñas quedan fijadas en los poros del gel y las más grandes pasan libremente, estableciéndose un orden de revelado por tamaños (filtración por gel). De esta forma pueden separarse proteínas, hormonas, enzimas, etc. (Determann, 1962). Los geles de

dextrano con diversos grupos químicos pueden utilizarse, de forma similar a la celulosa, como cambiadores de ión (Wieland, 1962).

2.4. Resinas cambiadoras de ión

Todas las resinas cambiadoras de ión pueden ser utilizadas, en principio, en C.C.F. De esta forma, con resina Dowex 50 W, ha separado Berger (1963) por C.C.F. diversos alcalinotérreos y Hüttenrauch (1963), con resina Wofatit C P 300, vitamina B de otros productos.

2.5. Polihidrocarburos porosos (Porapak)

Se presentan en forma de esferas de tamaño controlado, gran porosidad interna y gran área específica. Es una fase estacionaria no polar adecuada para la separación de productos polares de no polares (Janák, 1968).

2.6. Borosilicatos con superficie modificada (Durapak)

Son producidos a partir de esferas de vidrio poroso de tamaño controlado (Porasil) en las que se modifica su superficie por procesos químicos, adicionándolas grupos cianoetoxi muy polares (Janák, 1970).

2.7. Polvo de vidrio

Utilizando como adsorbente polvo de vidrio con una superficie específica del orden de $200 \text{ m}^2/\text{g}$ ha separado Kramer (1964) diversos tipos de ceras; Ackermann (1968) estudia el diferente comportamiento cromatográfico entre el polvo de gel de sílice y el de cuarzo; Taylor (1968) separa colorantes por medio de capas de vidrio sinterizado y Marino (1970), utilizando vidrio poroso como adsorbente, separa esteroides, barbitúricos, drogas y alcaloides.

2.8. Otros adsorbentes

Además de los adsorbentes antes mencionados, de uso más amplio, se han utilizado también otros productos preparados generalmente para casos específicos, pudiendo dividirse en adsorbentes inorgánicos y orgánicos.

Entre los primeros podemos mencionar: Talco, para separar ácidos grasos (Carreau, 1964), sulfato cálcico, para separar glicéridos (Kaufmann, 1962), silicato cálcico, para separar azúcares (Tore, 1963) y otros como carbonato de zinc (Badings, 1959), carbón (Prochazka, 1970), arcilla (Sheen, 1971), óxidos de cromo y hierro (Hesse, 1961), de indio y aluminio (Cremer, 1970) y de magnesio (Kartnig, 1970), etc. Entre los adsorbentes orgánicos podemos mencionar: Poli-

etileno (Mangold, 1961), teflón (Raaen, 1969), acetato de polivinilo (Dhont, 1970), etc.

2.9. Mezcla de adsorbentes

Mezclando diversos adsorbentes en la preparación de las capas pueden obtenerse resultados interesantes en la separación de productos. Winterstein (1960) ha utilizado una mezcla de hidróxido cálcico y gel de sílice para la separación de carotenoides, y Peifer (1962) ha descrito un procedimiento para la preparación de microplacas con una mezcla de magnesia y gel de sílice.

Para conocer en un solo cromatograma la mezcla de adsorbentes más adecuada para el problema considerado, se distribuyen los dos adsorbentes de forma heterogénea a lo largo de la capa (gradiente en la fase estacionaria) haciendo que en cada lado predomine uno de los adsorbentes (Stahl, 1964).

Todos los productos estudiados actúan como adsorbentes aunque, en algunos casos, (cromatografía de partición, cambio de ión, etc.) no se utilicen como tales por ser más importante otras propiedades.

3.- CAPAS Y SOPORTES

3.1. Preparación de placas

La preparación de placas en el laboratorio (capa más soporte) se hace, generalmente, de forma similar a la utilizada al principio de la C.C.F. (Stahl, 1969).

Antes de su utilización en cromatografía de adsorción, deben calentarse a una temperatura determinada y durante cierto tiempo para que se produzca la activación del adsorbente, de forma que se sitúe en condiciones idóneas de adsorción.

Este procedimiento de preparación produce capas de espesor no uniforme y con notorias diferencias entre lotes; por ello, los resultados son poco reproducibles.

La comercialización de placas con un amplio margen de adsorbentes y soportes, ha paliado los inconvenientes anteriormente citados produciéndose capas de espesor homogéneo y muy reproducibles y que, gracias a los aglutinantes generalmente empleados, alcoholes polivinílicos, son muy resistentes a los disolventes y a la manipulación.

La preparación de placas en el laboratorio ha quedado reducida a los casos en que se utilizan adsorbentes o mezclas de adsorbentes no suministrados en

las placas comerciales, pudiendo prepararse con aparatos convencionales adecuados, manuales o automáticos (Stahl, 1958a) (Marcucci, 1963) o por pulverización del adsorbente más el aglutinante sobre el soporte (Bekersky, 1963).

El material utilizado como soporte ha variado debido, principalmente, a la dificultad en el corte en tiras más estrechas de las placas de vidrio comerciales de 20 x 20 cm, utilizándose actualmente soportes de aluminio, plástico, fibra de vidrio, etc., continuando, no obstante, el uso amplio de las placas de vidrio que son manipuladas con facilidad y son recomendables en los casos en los que se utilice posteriormente un detector para su visualización, por conservarse completamente planas.

Las placas utilizadas son generalmente cuadradas o rectangulares; sin embargo, en ciertos casos, se han utilizado en forma de cuña con el vértice hacia abajo (Rink, 1965) o de formas diversas para estudiar su comportamiento (Griesener, 1968).

Aparte de la forma plana de los soportes, se han utilizado diversas variantes para modificar su uso o variar las condiciones de revelado, empleándose soportes en forma de varillas (Stupnicki, 1966), tubos con recubrimiento exterior o interior (Hirayama, 1967) (Jordan, 1971), conos (Grindlay, 1966), etc.,

e incluso sin soporte para cromatografía preparativa, adoptando el adsorbente la forma de tubos (Lenk, 1969) o placas (Kirchner, 1971).

3.2. Dimensiones de las capas y soportes

El espesor de las capas preparadas es muy variable. En C.C.F. analítica los espesores más utilizados son los de 250 micras en soportes rígidos y de 100 micras en soportes flexibles; menos utilizados son los espesores de 1 micra (Cremer, 1969) y 6 micras (Marian, 1969). En cromatografía en capa preparativa (C.C.P.) se utiliza generalmente un espesor de 2 mm, adecuado para la separación de unos 200 mg de producto, habiéndose utilizado, también, capas más gruesas de 3 a 12 mm (Kirchner, 1971), en las que es fundamental evitar la formación de grietas durante el secado y activado y efectuar una buena saturación antes del revelado para que este sea correcto.

Las dimensiones de las placas son también variables; generalmente se utilizan placas de 20 x 20 cm (que se cortan posteriormente, si es necesario, en tiras estrechas) y de 40 x 20 cm y 100 x 20 cm en ciertos casos para C.C.P. En microcromatografía se emplean placas de algunos cm de longitud y en un caso extremo Edgar (1969) ha utilizado capas preparadas sobre una muesca de 0'2 mm de anchura y 50 mm de longitud, practicada en un

vidrio portamuestras de microscopio. Ciertas casas comerciales venden rollos de soporte flexible de 5 m de longitud cubiertos de adsorbente, para la utilización de placas del tamaño deseado (Halpaap, 1970).

La anchura de la capa puede influir en el revelado. Generalmente es superior al tamaño de la mancha, pero se preparan también capas más estrechas para evitar la difusión lateral, obteniéndose manchas de menor superficie, con lo que se aumenta la facilidad de visualización. Fishbein (1965) emplea capas de 2 ó 3 mm de anchura con lo que se evita esta difusión lateral. El revelado en estas condiciones es perfectamente factible como ha demostrado Griesener (1968).

3.3. Placas con diversos adsorbentes

Aparte de la mezcla de adsorbentes señalada anteriormente, estos pueden situarse alternativamente a lo largo de la placa para obtener revelados especiales. De esta forma - y con capas de resina, gel de sílice y celulosa - obtiene Petit (1969) interesantes separaciones en una y dos dimensiones. Liebmann (1967) describe un aparato para la preparación de este tipo de capas.

Si se cubre el soporte, en la zona de aplicación, con un adsorbente poco activo y el resto con el adsorbente adecuado para el revelado, se produce una

concentración del producto aplicado en la zona de unión entre los dos adsorbentes, aumentando de esta forma la resolución (Musgrave, 1969).

3.4. Lavado de las capas

Después de preparadas las placas es necesario, en la mayoría de los casos, efectuar un lavado de las capas, ya que, pueden haberse contaminado durante su manipulación o con el polvo y los vapores del laboratorio, pudiendo tener el adsorbente en origen impurezas no deseables. Este lavado se efectúa por revelado (mejor descendente) de la capa con un disolvente muy polar, metanol, etanol, etc., o mezclas ácidas o básicas. Bevenue (1971) elimina los contaminantes orgánicos por calentamiento del gel de sílice durante 16 horas a 300°C.

3.5. Impregnación de las capas

Dentro del estudio de la preparación de capas, es muy interesante considerar las modificaciones que se introducen en los adsorbentes por la adición de diversos productos que hacen que varíen fundamentalmente sus propiedades. Tal es el caso de la impregnación de las capas con productos poco polares y de alto punto de ebullición como siliconas, hidrocarburos, polietilenglicoles, etc., que preparan las capas para la cromatografía en fase invertida, adecuada para la separación de pro-

ductos muy poco polares. En este tipo de cromatografía la fase móvil es más polar que la fase estacionaria.

Otras formas de impregnación muy utilizadas son la aplicación de nitrato de plata (lo que favorece la formación de complejos) (Morris, 1962) (Barrett, 1962) y de productos tales como ácido bórico, hidróxido potásico, soluciones tampón, etc., que cambian o conservan el carácter ácido o básico de la capa. Es muy frecuente la adición de productos fluorescentes que favorecen la visualización y detección de sustancias que absorben la luz U.V.

4.- APLICACION DE LA MUESTRA

En la C.C.F. analítica las variaciones en las técnicas de aplicación de las muestras han sido escasas, reduciéndose a la introducción de pipetas más o menos adecuadas y exactas, siendo interesantes los capilares calibrados de vidrio, que se utilizan una sola vez, para la aplicación de productos altamente contaminantes.

Un aparato muy completo de aplicación es el diseñado por Bridger (1967), el cual permite aplicar pequeñas cantidades en gotas o líneas con variaciones entre gotas de un $\pm 2.5\%$. En el equipo diseñado por Boag (1972), la muestra es medida en un pequeño recipiente de teflón y transferida en forma de gotas a una aguja de vidrio.

Las variaciones más importantes se han efectuado en los equipos utilizados para la aplicación de muestras en C.C.P., por ser los que presentan mayores dificultades, debido a la evaporación de los disolventes utilizados y a la conveniencia de efectuar la aplicación en líneas rectas y estrechas, y no en forma de puntos, para aumentar en lo posible la resolución de la separación.

Los aparatos más adecuados constan de dispositivos de vaivén los cuales, mediante una pipeta muy fina, depositan la solución a lo largo de la línea de aplicación, siendo necesario regular su velocidad para asegurar la evaporación del disolvente en cada pasada (Bacon, 1964).

Un factor importante a tener en cuenta en la aplicación de sustancias es su posible descomposición debida al secado con aire caliente, a los adsorbentes, etc., (Macek, 1968) (Fairbain, 1968).

5.- REVELADO O DESARROLLO

Este apartado es uno de los que presentan características más variadas, siendo el más importante desde el punto de vista cromatográfico.

5.1. Factores que influyen en el revelado; R_f

Es importante tener en cuenta en el revelado las condiciones experimentales para obtener valores re-

productibles del R_f y poder, de este modo, identificar las sustancias separadas y conseguir los mismos resultados en los diferentes laboratorios. El valor R_f se define como la relación entre las distancias punto de aplicación - mancha y punto de aplicación - frente del disolvente.

Sobre el R_f influyen: la mayor o menor saturación de la cámara de revelado, el espesor de la capa de adsorbente, el tamaño de las partículas del adsorbente, la variación durante el revelado de la composición de la mezcla de disolventes y vapores, las dimensiones de la cámara, su temperatura, etc., habiéndose celebrado congresos en los que se estudiaba exclusivamente este tema (Dallas, 1965, 1968) (Geiss, 1968).

Geiss, Schlitt, de Zeeuw, et al., han estudiado la influencia que tienen los vapores de los disolventes sobre el revelado. Variando estos vapores se modifican las propiedades de los adsorbentes, obteniéndose variaciones en el revelado que pueden influir en la eficacia de la separación. (Geiss, 1965) (Zeeuw, 1968) (Geiss, 1968a). Para controlar la humedad de la capa y evitar que pueda haber intercambio del agua de la capa con los vapores del disolvente, se utilizan cámaras "húmedas" (Geiss, 1965a).

El tamaño de las partículas que forman la capa de adsorbente influye grandemente en la resolución,

en la velocidad de revelado y en el Rf. Generalmente el tamaño de las partículas es del orden de 40 micras, pero se han empleado hasta de 1 micra, preparadas por formación de óxidos sobre placas de metal (Cremer, 1969).

Aunque la C.C.F. generalmente se desarrolla a temperatura ambiente, siendo esta una de sus principales ventajas, puede ser necesario efectuarla a temperatura diferente, o bien, mantener una temperatura determinada por influir esta sobre el Rf. Para ello, Stahl (1964) ha preparado una cámara termostataada adecuada para obtener valores más reproductibles del Rf y Kaufmann (1967) una cámara con temperatura programada, mientras que Turina (1972) calienta la placa durante el revelado.

Un factor importante en el revelado, que afecta también a la reproductibilidad del Rf, es la diferente composición del disolvente y sus vapores a lo largo del tiempo. Esta diferencia se produce por la desigual evaporación de los diversos componentes del disolvente (por ser generalmente más de uno), lo que hace que varíe la composición inicial de la mezcla. Para evitar este inconveniente, Roder (1971) ha estudiado una serie de 24 mezclas azeotrópicas, en las que, al permanecer constante su punto de ebullición, se evita la variación en su composición. Mediante esta amplia

serie de mezclas, es fácil encontrar una que se adapte a la constante dieléctrica requerida para el disolvente.

Dentro del estudio de los diferentes disolventes utilizados podemos incluir las series eluotrópicas - que nos indican el disolvente más adecuado dentro de una serie de ellos ordenados por su constante dieléctrica - incluyendo una aportación interesante debida a Bulenkov (1968), que ha preparado una serie eluotrópica de 32 disolventes. .

El gradiente de elución - variación de los componentes de la fase móvil durante el revelado - tan utilizado en cromatografía, ha sido aplicado a la C.C.F. por Rybicka (1962) en la separación de glicéridos.

Las dimensiones de las cámaras de revelado influyen en la reproductibilidad de los valores del Rf, por la dificultad de saturar debidamente las cámaras de grandes dimensiones con los vapores del disolvente. Las cámaras tipo "Sandwich", cámaras S (Stahl, 1962), están formadas por dos placas de vidrio muy próximas, una de las cuales contiene el adsorbente; estas cámaras, por su pequeño volumen, favorecen la saturación del aire con los vapores del disolvente y, por tanto, la reproductibilidad de los valores del Rf obtenidos.

El espesor de las capas puede influir en los va-

lores obtenidos de Rf. Jänchen (1968) atribuye la influencia del espesor a la deficiente saturación de las cámaras de revelado y efectúa experiencias con gradientes en el espesor y diferentes saturaciones; Dallas (1968a) indica que el espesor de la capa no influye sobre el Rf, si la actividad de la capa es constante y se utilizan cámaras S.

5.2. Diversas técnicas de revelado

Las primeras variaciones en las técnicas de revelado se refieren a la posibilidad de efectuar revelados ascendentes, descendentes y horizontales, habiéndose publicado posteriormente nuevas técnicas de revelado.

Una de las aportaciones más interesantes es el revelado en flujo continuo (Bobbitt, 1963), en el que parte de la placa asoma por una rendija existente en la parte superior de la cámara, evaporándose en esa zona el disolvente, con lo que el revelado puede continuar por tiempo indefinido. De esta forma, se aumenta el número de platos teóricos de la capa y se consigue la separación de productos muy polares que de otra forma que darían fijados en el origen, o la separación de productos de polaridad similar con disolventes poco polares (lo que favorece la separación al destacar sus diferencias). Una cámara más sofisticada para el revelado en

flujo continuo es la desarrollada por Brenner y Niederwieser (1961) - cámara BN - habiéndose diseñado posteriormente otra cámara similar por Hara (1969). Mediante revelado en flujo continuo ha separado Angoso (1972) el insecticida Lebaycid de otros productos de su síntesis.

En el procedimiento de revelado en dos dimensiones - revelando primero en una dirección y posteriormente en otra a 90° - se consigue separar cada mancha obtenida en el primer revelado en otras posibles manchas, con lo que aumenta la resolución de la capa, pudiendo efectuarse reacciones químicas con los productos entre cada revelado (Stahl, 1960) o cambiarse de adsorbente (Pumphrey, 1967). Una utilización interesante del revelado en dos direcciones es la efectuada por Hais (1970), el cual efectúa reacciones químicas entre los dos revelados que se llevan a cabo con el mismo disolvente; de esta forma, los productos que no han reaccionado quedan en una diagonal sobre la capa por tener el mismo Rf en los dos revelados.

Existen otros procedimientos de separación llamados de dos o más dimensiones en los que, después del revelado en una o dos dimensiones sobre la misma capa antes estudiados, los productos son transferidos a otro procedimiento de separación: cromatografía de gas

(Mangold, 1961a) (Markovetz, 1968), cromatografía en columna (Eisenbeiss, 1971), espectrometría de masas (Kaiser, 1969), etc.; o bien, a la inversa, después de cualquier procedimiento de separación: cromatografía de gas (Janák, 1963 y 1971) (Kaiser, 1964), cromatografía en columna (Dijk, 1969), microdestilación (Stahl, 1968), etc., los productos son aplicados a lo largo de una capa a la salida del cromatógrafo - o del aparato adecuado - siendo posteriormente revelada.

En la técnica de revelado múltiple se efectúan diferentes revelados en la misma dirección con el mismo o con diferentes disolventes, de esta forma, en el primer caso, se aumenta la separación entre las manchas y, en el segundo caso, pueden separarse sobre la misma capa productos muy polares y poco polares (Stahl, 1959 y 1965a).

En el procedimiento estudiado primero por Matthias (1954) en cromatografía en papel, y posteriormente por Stahl (1958) en C.C.F., la capa dispone de un estrechamiento en la zona de aplicación que favorece el que las manchas tengan la forma de líneas curvas estrechas, con lo que se consigue aumentar la resolución.

En el revelado circular el producto a estudiar se aplica en o cerca del centro de la capa (colocada en posición horizontal) por el que penetra el disolvenu

te revelador, obteniéndose manchas en forma de anillos estrechos (Stahl, 1958 y 1958a). La velocidad de este procedimiento de revelado se aumenta si el sistema se coloca en una centrífuga (Rosmus, 1964).

Otras técnicas y aparatos interesantes para el revelado que podemos mencionar son: la cámara de revelado de Taquitani (1965) provista de un dispositivo para la interrupción del revelado cuando el disolvente ha alcanzado la altura deseada; los procedimientos de revelado continuo para C.C.P. desarrollados por Turina (1964) y Visser (1967); la cámara de Schwartz (1967) para el revelado bajo atmósfera de nitrógeno de sustancias inestables; la cámara de Sandroni (1970) para el revelado simultáneo de una capa con disolventes diferentes; la cámara automática de Schneck (1970) para el revelado en una o dos dimensiones con diferentes disolventes y control del frente del disolvente en la capa; el revelado sin disolventes líquidos utilizando geles como disolventes, ideado por Tocci (1970); la cámara de nivel constante de Röder (1970) para evitar la diferencia de nivel durante el revelado; etc.

5.3. Separación por electroforesis

La separación por electroforesis es adecuada para aquellas sustancias que son solubles en soluciones tampón y que presentan carga eléctrica. En la separación

por electroforesis se pulveriza inicialmente la capa con una solución tampón conveniente, se colocan dos papeles de filtro a ambos lados, humedecidos igualmente con la misma solución y, después de situar el producto a estudiar sobre la capa, se aplica un campo eléctrico de unos centenares de voltios a través del papel y de la capa.

Debido al campo eléctrico migran las diferentes sustancias presentes a diferentes velocidades y sentidos, obteniéndose su separación. Finalizado el proceso, y secada la capa, los diferentes productos son visualizados de forma convencional.

La electroforesis en capa fina presenta la ventaja sobre la de papel de que, debido a ser productos adsorbentes e intervenir la adsorción, pueden obtenerse diferentes separaciones variando el adsorbente. A causa del pequeño tamaño de las partículas de los adsorbentes utilizados, las manchas obtenidas son más pequeñas y más nítidas.

Aprovechando este sistema se han separado diversos tipos de sustancias. Honegger (1961) ha separado aminas y aminoácidos, Stegemann (1964) productos de degradación de la hemoglobina, Keck (1964) nucleósidos y nucleótidos, Haluk (1970) ácidos fenólicos y Cooper (1972) ácidos hidroxibenzóicos metabolizados en plantas.

6.- VISUALIZACION O DETECCION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA

Mediante la visualización podemos ver y estudiar los productos separados y, con patrones adecuados, identificarlos y valorarlos.

Posiblemente sea la visualización la parte de la C.C.F. que más adelantos técnicos haya experimentado, ya que, aparte de los procedimientos sencillos de aplicar la luz U.V., los vapores de yodo o la pulverización de reactivos para la visualización de las manchas, se han puesto a punto numerosos aparatos detectores por fluorescencia, radiactividad, centelleo, etc., que facilitan la cuantificación e identificación sobre la misma placa de los productos separados. Por otra parte, el aspecto químico de la visualización se ha visto incrementado por centenares de reactivos diferentes muy selectivos que, aplicados a cada problema, nos dan información sobre el grupo químico a que pertenecen los productos separados. Estos productos se aplican pulverizando sus soluciones sobre la capa en una cámara adecuada provista de ventilación.

6.1. Visualización y valoración simple

Una vez visualizado el producto sobre la capa por alguno de los procedimientos sencillos antes indicados, podemos valorar la cantidad de producto por comparación "a simple vista", con manchas de cantidada

des conocidas del mismo producto revelado en las mismas condiciones. Este procedimiento puede ser interesante en numerosos casos en los que solo se deseen resultados semicuantitativos, cometiéndose un error del orden del 20 % (Johnson, 1968).

Si para la valoración medimos la superficie de las manchas del producto revelado y de referencia con un planímetro, calco sobre un papel y pesada de la zona recortada de las manchas, pesada de una copia fotográfica, etc., el error cometido será menor; este error, según Oswald (1964), será del orden del 3'5 % al 10 % (en la medida con un planímetro) según sea la superficie de la mancha. En este caso puede utilizarse la relación de Purdy y Truter, que indica que el logaritmo decimal de la cantidad de producto es proporcional a la raíz cuadrada del área de la mancha, la cual es válida para un ancho margen de concentraciones (Purdy, 1962).

6.2. Visualización y valoración por densitometría

En el procedimiento de valoración por densitometría se mide directamente sobre la capa la intensidad de color de la mancha producida por una sustancia después del revelado y visualizado de la misma. Es preciso, por lo tanto, que esta mancha sea visible, bien por ser coloreada, o por haberla coloreado o carbonizado por reacciones químicas posteriores.

El procedimiento de medida consiste en un rayo de luz visible que, después de ser reflejado en la mancha bajo un ángulo determinado - métodos de reflexión, reflexión o remisión - o atravesar la mancha y la placa - métodos de transmitancia, transmisión o densitometría propiamente dicha según algunos autores - es detectado por un fotomultiplicador y cuantificado en un registro.

El aparato mide la diferencia entre la luz incidente y la luz reflejada o transmitida (Ayers, 1956). La relación entre la densidad óptica y la concentración de color sobre un sólido medio es examinada por Kubelka (1948) modificando, para el caso de altas concentraciones de colorante, la ley de Beer. Graduando la abertura del aparato y colocando filtros adecuados pueden mejorarse las condiciones de trabajo.

Para determinar la relación entre la superficie de la curva registrada y la cantidad de producto revelado, es necesario registrar al mismo tiempo cantidades conocidas del producto estudiado reveladas en las mismas condiciones, obteniéndose una curva de calibrado y debiendo tener en cuenta para la determinación del peso de la sustancia la relación de Blunden (1967), que indica que el logaritmo decimal del peso de la sustancia, es proporcional a la raíz cuadrada de la lectura del integrador del registro.

Es necesario efectuar el proceso cromatográfico en las mejores condiciones posibles de homogeneidad, teniendo en cuenta la aplicación del producto, las fases móvil y estacionaria, el espesor del adsorbente, la aplicación de los reactivos químicos y la presencia de impurezas en la sustancia examinada.

Si el aparato detector utilizado es adecuado solo para cromatogramas de papel, es necesario fotografiar o fotocopiar el cromatograma, siendo esta reproducción la que se registra en el detector; es difícil elegir el contraste de la película o papel fotográfico para que la zona de la curva tiempo-densidad de color sea la adecuada.

Treiber (1971) ha preparado un equipo provisto de tres registros para la detección simultánea de las manchas por reflexión y transmisión.

6.3. Visualización y valoración por fluorimetría

El procedimiento es similar al anterior (solo reflexión) utilizando luz U.V. en vez de luz visible. Puede efectuarse por medida de la fluorescencia o por medida de la absorción o extinción (quenching) de la fluorescencia.

El primer método es directo ya que se mide la luz emitida por la sustancia fluorescente (provocada por

la luz incidente), lo que le independiza generalmente del "fondo" de la capa (Klaus, 1964), pudiendo medirse productos fluorescentes de por sí o que se han convertido en fluorescentes mediante una reacción adecuada antes o después del revelado.

El segundo método (así como los métodos densitométricos) es indirecto, puesto que se mide la absorción de la luz por el producto separado respecto a la luz emitida por la capa, preparada con agentes fluorescentes (Jänchen, 1968a). Las precauciones a tomar son similares a los del apartado anterior.

6.4. Visualización y valoración por espectrofotometría directa sobre la capa

Mediante este procedimiento de visualización y valoración podemos obtener el espectro de absorción y de fluorescencia (o emisión) de las sustancias separadas sobre la capa "in situ" pudiendo, de esta forma, identificar cualitativamente la sustancia estudiada, y trabajando en el máximo de absorción o fluorescencia y por comparación, la cantidad de sustancia separada.

Para la obtención del espectro es necesario utilizar un espectrofotómetro acoplado a un soporte móvil sobre el que descansa la placa. Una vez localizadas - por transmisión o reflexión, con luz visible o U.V. - las diferentes sustancias separadas por el paso de la

capa debajo del rayo de luz, se sitúa ésta en la posición adecuada en el espectrofotómetro obteniéndose fácilmente el espectro de la sustancia estudiada (Jork, 1964).

Este espectro no es idéntico al de la misma sustancia medida en una cubeta (aunque sí el número y posición de los picos) debido a la influencia del adsorbente, pero si obtenemos el espectro de cantidades conocidas de sustancias puras idénticas reveladas en las mismas condiciones, podremos fácilmente identificar por comparación esa sustancia.

Mediante la lectura de la absorción o fluorescencia en el máximo del espectro podremos conocer cuantitativamente la sustancia separada, siendo necesario construir previamente curvas de calibrado (generalmente no lineales en reflexión) con cantidades diferentes de sustancias reveladas en las mismas condiciones. El coeficiente de variación (desviación típica) en estas condiciones, es del orden del 3 % (Jork, 1968).

Los resultados pueden ser solo semicuantitativos (error aproximado 10 %) debido a la falta de uniformidad de las manchas (producción de "colas") siendo, en estos casos, más adecuado su medida por traslado del adsorbente con el producto a una cubeta adecuada que se mide con el espectrofotómetro antes mencionado (Frodyma, 1964).

La sensibilidad del método, según Jork (1968a), es del orden de 10 veces mayor a la obtenida a partir del espectro de la misma sustancia contenida en una cubeta, siendo, además, un método más rápido y exacto y evitándose pérdida de sustancia por transferencia de la capa a la cubeta.

Los instrumentos utilizados para este tipo de visualización sirven también, en la mayoría de los casos, para la visualización por transmisión y reflexión en luz visible y U.V., pudiendo ser utilizados para un amplio margen de productos. Del mismo modo que en los métodos anteriores, si una sustancia no es detectable por luz visible o U.V. puede hacerse reaccionar con algún producto que favorezca su visualización.

En "espectros de reflectancia" se engloban los espectros ya estudiados obtenidos por medio de la luz visible o U.V., por reflexión de la luz sobre la capa cromatográfica (Frei, 1971), siendo similares a los espectros de absorción y emisión aunque modificados por el adsorbente que forma la capa.

6.5. Identificación y valoración mediante elución

En los procedimientos estudiados hasta ahora para la identificación y valoración de las diversas sustancias separadas por C.C.F., el producto considerado permanecía en la placa evitándose el transvase del producto y la

pérdida de parte del mismo, siendo, al mismo tiempo, un sistema rápido de valoración.

Sin embargo, en ciertos casos, es necesario separar el producto con el adsorbente del soporte de la capa, para poder utilizar diferentes técnicas de identificación y valoración que no pueden actualmente efectuarse en la placa, separando, en otros casos, los productos del adsorbente para poder ser estudiados en mejores condiciones evitando las interferencias propias de los adsorbentes (Randerath, 1963).

6.5.1. Condiciones para una elución satisfactoria

Para una buena elución del producto en condiciones cuantitativas y libre de impurezas es necesario considerar diversos aspectos.

6.5.1.1. Los adsorbentes serán de gran pureza y de tamaño homogéneo. Es conveniente el lavado de las capas (Brown, 1964). En ciertos casos puede ser adecuado el cambio de disolvente, después de la elución y secado de la muestra, para eliminar las impurezas del adsorbente y del aglutinante (Bobbitt, 1963a).

6.5.1.2. Los disolventes deben ser de gran pureza, efectuando con ellos ensayos en blanco pa

ra estudiar posibles interferencias; de
ben ser lo más volátiles posible para
su fácil eliminación después del revela
do.

6.5.1.3. Las cámaras de revelado deben estar bien saturadas para evitar que el disolvente ascienda por la capa con el frente en forma de línea curva (y con él todos los productos revelados), facilitándose así, que al raspar la capa en una zona determinada de acuerdo con los patrones laterales, no se raspe todo el producto revelado sino parte de él (Braun, 1962).

6.5.1.4. Durante la aplicación y el revelado debe evitarse todo cambio químico de la sustancia a estudiar producido por fotolisis, oxidaciones, reacciones con el disolvente, etc., debiéndose tomar toda clase de precauciones para la aplicación de volúmenes exactos de las soluciones (Fairbairn, 1968) sin cargas excesivas de producto que facilitarían la formación de "colas".

6.5.1.5. La recogida de las muestras se hará lo más cuantitativamente posible, efectuándose, generalmente, por raspado del adsor

bente que contiene el producto estudiado. Utilizando el aparato preparado por Stutz (1968), puede eluirse directamente el producto sin separarlo de la placa.

6.5.1.6. El disolvente empleado para la elución debe tener una constante dieléctrica adecuada para que, en una cromatografía efectuada con ese adsorbente, disolvente y producto, el R_f sea cercano o igual a uno (Bobbitt, 1963a).

En el caso de tratarse de una cromatografía en capa preparativa, las precauciones a tomar son similares, debiéndose tener en cuenta la diferente cantidad de adsorbente, disolvente y producto a manipular (Jimeno, 1972).

A pesar de todas estas precauciones la obtención cuantitativa del producto sigue siendo el principal problema de los métodos de elución, siendo variable el porcentaje obtenido y del orden del 95 % (Gänshirt, 1960). Mediante curvas del rendimiento en relación con la cantidad de producto a separar, efectuadas con cantidades conocidas del producto, podemos disminuir apreciablemente estos errores (An

goso, 1973).

Para evitar la influencia de las im purezas que puedan acompañar al producto estudiado utiliza Harris (1968), como blanco de comparación para el estudio por espectrofotometría U.V., la solución resultante de raspar y eluir una zona de capa revelada en las mismas condiciones pero sin producto.

6.5.2. Valoración del producto eluido

Una vez efectuada la elución del producto en las mejores condiciones posibles, puede llevarse a cabo su estudio cualitativo y cuantitativo por cualquiera de las técnicas analíticas en uso, siendo utilizadas preferentemente, y por necesitar pequeñas cantidades de producto, los métodos espectrofotométricos con luz visible, U.V. e I.R.; el coeficiente de variación de los valores obtenidos por estos métodos de valoración es del orden del 3 % (Purdy, 1964). Se ha utilizado, también, para la valoración, la espectrometría de masas (Kaiser, 1967), la resonancia magnética nuclear (Szekely, 1970), la polarografía (mediante un polarógrafo de rayos catódicos) (Huber, 1968), la identificación por medio del punto de ebullición del producto estudiado (Martinek, 1971), etc.

6.6. Visualización y valoración de productos radiactivos

El gran incremento experimentado en el uso de ra disótopos en forma de radiofármacos y de compuestos mar cados en la investigación y control científico, ha hecho que sean también numerosos los trabajos realizados en los que interviene de una forma más o menos directa la C.C.F. como método analítico.

La visualización y valoración de los cromatogramas puede efectuarse por diferentes procedimientos:

6.6.1. Autorradiografía

El procedimiento, en su forma simple, es barato y sencillo pero adolece del inconveniente de ser muy lento por ser necesario efectuar expo siciones del orden de horas o días - dentro de las cantidades de actividad que se utilizan nor malmente - para obtener una autorradiografía que pueda valorarse directamente o por medio de un densitómetro. Sin embargo, pueden detectarse can tidades muy pequeñas de actividad lo que hace que, a pesar de su lentitud, sea un método muy útil para numerosas experiencias. Para aumentar la sensibilidad del método - sobre todo en el ca so del tritio emisor beta muy débil - se adicio nan al cromatograma productos centelleadores fluorescentes como el antraceno; los fotones pro

ducidos impresionan más rápidamente la película, siendo el método más eficaz a bajas temperaturas (fluorografía) (Lüthi, 1965). Debido al menor tamaño de las manchas producidas en C.C.F. respecto a la cromatografía en papel, los tiempos de exposición son del orden de 10 a 100 veces menores en esa técnica.

El procedimiento es imprescindible en el caso de cromatogramas complejos, tales como los obtenidos por el revelado en dos dimensiones de mezclas de numerosos productos.

La utilización de un densitómetro para la valoración de una autorradiografía, no es recomendable cuando se trata de determinar productos radiactivos con cantidades muy diferentes de actividad.

6.6.2. Separación del producto activo del cromatograma

Puede efectuarse la separación completa de la porción de capa conteniendo un producto visualizado por otros procedimientos, o bien, mediante un raspador, quitar pequeñas porciones de la capa a distancias predeterminadas que son medidas independientemente para efectuar la visualización y valoración del producto.

En el primer caso, se efectúa directamente la valoración total del producto mediante cualquiera de los procedimientos de medida de productos radiotivos existentes, que sean adecuados para el tipo de partículas o radiaciones que emitan y para la cantidad de actividad existente, siendo el más adecuado, como veremos más adelante, la medida por centelleo líquido con o sin elución del adsorbente.

En el segundo caso, es necesario efectuar una medida de actividad con cada una de las porciones raspadas de la capa, que al no poder ser muchas, resta resolución al procedimiento. El procedimiento manual es muy tedioso existiendo, afortunadamente, aparatos automáticos que efectúan el raspado por zonas (Snyder, 1964 y 1965a) e incluso equipos en los que el sistema es controlado por una calculadora electrónica (Fossien, 1971). Cada zona raspada es introducida en un vial provisto de una solución adecuada para la medida de la actividad por centelleo líquido, por ser éste el método generalmente utilizado de medida debido a que la mayor parte de los productos cromatografiados son emisores beta débiles, carbono-14, Hidrógeno-3 (tritio), azufre-35, etc. Este procedimiento de medida es muy sensible y exacto y el mejor para emisores beta débiles, siendo imprescindible en muchos estudios biológicos en los que se manipulan cantidades muy pequeñas de actividad y según Snyder

(1965 y 1966) y unido al procedimiento de raspado por zonas, mejor que la detección por autorradiografía o por exploración directa.

Otro de los diversos procedimientos de medida de actividad que se ha utilizado en C.C.F., es la combustión cuantitativa de la materia orgánica transformándola en dióxido de carbono y agua; el agua se retiene con un adsorbente, o si está marcada con tritio, se condensa y se mide por centelleo líquido; y el dióxido de carbono, si está marcado con carbono-14, se mide con un detector proporcional de flujo o se adsorbe en etanolamina midiéndose posteriormente (Kelly, 1961) (Davidson, 1968) (Haahti, 1970). Este procedimiento tiene el inconveniente de ser destructivo.

6.6.3. Visualización y valoración directa

El procedimiento consiste en la medida de la actividad de cada zona del cromatograma sin levantamiento de la capa, por medio de un sistema de detección adecuado. En la mayoría de los casos el cromatograma pasa por debajo del detector a una velocidad constante (exploración), mientras que en otros, es visualizado y valorado sin movimiento mediante múltiples detectores. Estos aparatos son llamados radiocromatógrafos.

6.6.3.1. Exploración

En el procedimiento de exploración, el de tector utilizado suele ser un tubo G-M o un con tador proporcional con o sin flujo de gas, pro visto o no de ventana, o un detector de cente- lleo. El detector sin ventana es adecuado para la medida de productos marcados con tritio, de bido a ser el tritio un emisor beta muy débil (0'018 MeV).

Las condiciones adecuadas para una buena exploración son: proximidad del cromatograma a la rendija del detector (para la medida correc ta de cada zona), velocidad de exploración len ta (para que el error de la medida sea mínimo) y una rendija estrecha (para obtener una buena resolución de los diferentes productos) (Wood, 1968).

La mayoría de los radiocromatógrafos comer ciales disponen de dispositivos para poder va riar la distancia entre la placa y el detector, la velocidad de exploración, las dimensiones de la rendija y las características de la ventana. Algunos de estos aparatos tienen la posibilidad de explorar la placa mediante el movimiento de su soporte en forma de "Z", que les hace váli dos para la detección de placas reveladas en dos

dimensiones. Otra posibilidad interesante es el registro gráfico de la actividad con dos sensibilidades diferentes al mismo tiempo, que permite la medida simultánea de productos con actividades muy diferentes.

El radiocromatógrafo ideado por Frank (1959) para la exploración de placas en dos dimensiones, consta de 16 detectores G-M de flujo unidos a un registro gráfico común o a un sistema de cálculo electrónico.

Schulze (1962) y Berthold (1967), utilizan un detector proporcional de flujo de gas sin ventana para la exploración de placas en una o dos dimensiones. El gas utilizado en estos detectores suelen ser una mezcla del 90 % de argón y el 10 % de metano. Otro procedimiento de medida es la impregnación de la capa con soluciones centelleadoras, utilizando como detector un fotomultiplicador (Roucaýrol, 1964).

Muzzarelli (1966) utiliza para la detección de los diversos productos activos, un espectrómetro de rayos gamma de 128 canales provisto de un detector de centelleo. Una vez localizados por exploración los diversos productos que interesen, puede efectuarse un espectro gamma de iden

tificación situando el detector sobre esa zona.

El equipo diseñado por Hariharan (1968) consta de 12 detectores G-M, acoplados a un sistema electrónico adecuado para transformar los impulsos generados en los detectores, en alta tensión del voltaje necesario para que, transmitida a unas puntas situadas sobre un papel electrosensible, se obtenga una gráfica similar a una autorradiografía.

Prydz (1971) utiliza como detector un multiplicador de electrones, por considerar que es mejor para la medida del tritio que los tubos G-M de flujo de gas. Todo el equipo explorador está situado en el interior de una cámara de vacío (de 75 l de capacidad), por lo que no es adecuado para productos volátiles.

Una vez obtenido el registro gráfico con sus diferentes picos (radiocromatograma), proporcionado por cualquiera de los sistemas de detección estudiados, puede efectuarse su cuantificación mediante un planímetro, integrador, pesada del papel, calculadora electrónica (Snyder, 1968), etc.

Un detalle importante a tener en cuenta, es el de la absorción de la radiación por los

adsorbentes utilizados en C.C.F., lo que hace que los rendimientos de detección varíen grandemente de unos radisótopos a otros, así por ejemplo, la eficacia de las medidas efectuadas con un detector provisto de ventana, de carbono-14 y azufre-35 es del orden del 5 % y sin ventana y de tritio, del orden del 0'5 % (Boucke, 1965).

6.6.3.2. Visualización sin movimiento

En la visualización de productos activos sin movimiento de la placa, la detección se efectúa mediante múltiples detectores G-M y proporcionales, con y sin flujo de gas, que cubren toda la zona de medida.

Uno de los procedimientos de visualización es la cámara de chispas de Pullan (1968) en sus dos versiones, con electrodos de alambre lineales paralelos, o en espiral con uno de los electrodos concéntrico. Entre los dos electrodos, ánodo y cátodo, se crea un campo eléctrico mediante alta tensión lo que hace que, al pasar una partícula beta (proveniente de la placa situada debajo de los electrodos) a través del campo eléctrico, origine una ionización visible en forma de chispa. Entre los dos electrodos hay un flujo de gas adecuado. Una serie de electrodos en forma de parrilla cubren toda la placa y las chispas son registradas median-

te una cámara fotográfica Polaroid. El procedimiento es cómodo y rápido, del orden de minutos, pero no es cuantitativo.

El equipo diseñado por Gilbert (1971) para C.C.F. en una sola dimensión, dispone de 30 detectores G-M separados uno del otro por una distancia de 1 cm; la resolución es pobre. El procedimiento es muy rápido.

Otro procedimiento de detección, desarrollado recientemente por "The Radiochemical Centre" (1975) consiste en un detector múltiple formado por 100 contadores proporcionales de flujo de gas, que se sitúan sobre la placa y acumulan los impulsos necesarios para que la estadística del contaje sea buena. Una calculadora electrónica analiza los datos y después de indicar los impulsos acumulados por cada detector, efectúa la cuantificación de los productos revelados. Es adecuado para placas estrechas reveladas en una sola dimensión.

El procedimiento más espectacular, aunque también el más caro, es el desarrollado por la Baird-Atomic, que consiste en la utilización simultánea de 1622 detectores G-M de flujo de gas con o sin ventana, que se sitúan sobre la placa enviando los impulsos a un tubo de rayos catódicos que permite la visualización de forma inmediata. Mediante una cámara

fotográfica Polaroid pueden registrarse los resultados obtenidos. El procedimiento es rápido y sensible pero tiene poca resolución y cuantitativamente se obtienen resultados deficientes (Snyder, 1970).

6.7. Otros procedimientos de visualización y valoración de productos

Para aprovechar la gran sensibilidad del detector de ionización de llama, Padley (1969) revela los productos sobre una varilla de vidrio cubierta de gel de sílice; esta varilla después de revelada y seca se introduce lentamente en un horno anular, pirolizándose los productos que son conducidos por nitrógeno y detectados por un detector de ionización de llama.

En el procedimiento desarrollado por Tsujino (1969) los productos, después de revelados y secos, son concentrados lateralmente por revelado a 90° (Milborrow, 1965) y separados de la placa junto con el adsorbente; en un aparato de microcombustión son pasados a anhídrido carbónico y valorados.

Otro procedimiento de valoración es el utilizado por Cremer (1969), el cual mide la conductividad eléctrica de los productos durante el revelado mediante electrodos situados sobre la capa.

Radonsqui (1970) utiliza un detector de captura electrónica para el análisis de insecticidas clorados, efectuándose o no, una depuración previa (clean-up) antes de la C.C.F.

Hahti (1970) determina diferentes lípidos mediante un detector de conductividad térmica; para ello, evapora los productos separados en una varilla cubierta de gel de sílice mediante un horno que calienta por zonas, y oxida estos productos a anhídrido carbónico y agua en un horno a 650°C mediante óxido de cobre; retiene el agua con pentóxido de fósforo y detecta el anhídrido carbónico.

Libby (1968) y Chapman (1972), utilizan la espectrometría de emisión de rayos X para la valoración "in situ" de los productos cromatografiados y Huber (1970) la fluorescencia de rayos X para la determinación semicuantitativa, también "in situ", de ciertos elementos como cloro, azufre, bromo, etc.

Kynast (1971) ha efectuado un estudio de la aplicación del proceso electrónico de datos a la C.C.F. cuantitativa directa.

7. EFICACIA Y RESOLUCION DE UN PROCESO CROMATOGRAFICO

7.1. Eficacia

La eficacia de una capa cromatográfica se mide por el número de platos teóricos.

El concepto de plato teórico se ha introducido en cromatografía por la semejanza entre las columnas de destilación fraccionada y las columnas y capas cromatográficas, siendo el plato teórico una unidad de la columna de destilación en la que existe un equilibrio entre el vapor ascendente y el líquido descendente.

En cromatografía en columna existen diversas fórmulas para medir el número de platos teóricos (Stahl, 1965) que pueden aplicarse a la C.C.F.:

$$A = \frac{W_d}{16 \cdot d_R} ; \quad n = \frac{L}{A}$$

siendo

A = altura equivalente a un plato teórico (cm).

W_d = longitud de la mancha del producto separado (medida en la dirección del movimiento del disolvente) (cm).

d_R = distancia desde el punto de aplicación al centro de la mancha (mayor intensidad de color) (cm).

n = número de platos teóricos.

L = distancia recorrida por el disolvente desde el punto de aplicación (cm).

Hay que observar que A no es constante durante el recorrido del disolvente por la capa, incrementándose con la longitud del mismo (Stahl, 1965), siendo independiente del Rf del producto separado (Snyder, 1967, 1967a).

El número de platos teóricos de una capa depende, en mayor o menor grado, de la capa adsorbente, del disolvente revelador y de la cantidad y características del producto aplicado, por lo que es un dato único para cada separación indicando, no obstante, la eficacia mayor o menor de una capa cromatográfica; en realidad debería decirse eficacia de un proceso cromatográfico.

7.2. Resolución (o selectividad) del proceso cromatográfico

La resolución puede definirse como la diferencia relativa entre las afinidades de los diferentes componentes de la muestra por la fase estacionaria; indica si dos productos se consideran suficientemente separados.

Para calcular la resolución de un proceso puede utilizarse la fórmula indicada por Snyder (1967a):

$$R_s = \frac{2(d_{R2} - d_{R1})}{W_{d1} + W_{d2}}$$

siendo

- R_s = resolución de dos manchas adyacentes.
- d_{R1} y d_{R2} = distancia desde el punto de aplicación al centro de la mancha del producto separado (mayor intensidad de color) (cm).
- W_{d1} y W_{d2} = longitud de las manchas (medida en la dirección del movimiento del disolvente) (cm).

si R_s es igual o mayor que 1 la resolución es aceptable.

8. CONSERVACION DE CROMATOGRAMAS

Una vez revelado y visualizado el cromatograma y efectuadas las oportunas medidas de R_f , tamaño de las manchas y valoración, por cualquiera de los procedimientos descritos, es interesante, en numerosas ocasiones, conservar el cromatograma o su reproducción para ulteriores estudios.

Para conservar el cromatograma y evitar el deterioro del adsorbente, puede recubrirse la capa con una banda de plástico autoadhesivo, conservándose con su soporte, o bien, puede desprenderse la parte superior de la capa por levantamiento de la banda de plástico, con lo que la conservación es menos voluminosa (Knight, 1963). También puede aplicarse una laca pulverizada que aumente la cohesión del adsorbente, separándose la mezcla de la-

ca y adsorbente de su soporte con la ayuda de agua; el conjunto puede reforzarse por medio de una banda de cinta autoadhesiva (Lichtenberger, 1962).

Debido a que a lo largo del tiempo el color de muchos productos desaparece o la mancha se ensancha considerablemente, es más práctico, si se desea conservar las características del cromatograma original, efectuar una copia del mismo.

El sistema más simple consiste en colocar sobre la capa un papel transparente o translúcido y copiar la forma y situación de las manchas.

Un sistema fotográfico sencillo de copia es el que utiliza el papel empleado en las copias de planos (o bien papel fotográfico normal) situando la placa sobre él e impresionándole con una luz adecuada (Eisenberg, 1962). Un sistema práctico y rápido es el uso de una máquina de oficina de hacer fotocopias (Hilton, 1962).

El procedimiento más adecuado de copia es la fotografía normal en blanco y negro o en color, pudiendo utilizarse un amplio margen de películas para obtener los tonos de color deseados. Las fotografías pueden efectuarse con luz visible o U.V., existiendo equipos comerciales adecuados.

9. COMENTARIO FINAL

En los siguientes capítulos de la presente memoria, se describirán algunas técnicas originales desarrolladas por nosotros, que pueden aportar algo al esfuerzo general de los diversos científicos que trabajan en este campo. En todos ellos se ha tratado de mejorar los procedimientos actuales o de abrir algún nuevo frente para posteriores trabajos. A pesar de la copiosa bibliografía existente, el campo no está agotado.

CAPITULO II

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ESPESOR Y ADSORBENTE HOMOGENEOS EN TRES DIRECCIONES SOBRE LA MISMA CAPA

1. INTRODUCCION

La más importante limitación de la cromatografía en capa fina (C.C.F.), es el escaso número de platos teóricos disponibles respecto a otros procedimientos cromatográficos, (Snyder, 1967, 1967a).

El procedimiento más interesante utilizado para aumentar este número de platos teóricos es el revelado en dos direcciones, llamado revelado bidimensional (Kirchner, 1951) (Stahl, 1960); consiste en revelar la capa con el producto aplicado, secarla y efectuar un segundo revelado en otra dirección diferente girando la capa 90° . Con este procedimiento, efectuado en capas cuadradas, generalmente de 20 x 20 cm, se aumenta considerablemente el número de platos teóricos y se consigue que, de cada mancha separada en el primer revelado, puedan separarse varios productos por utilizar en el nuevo revelado un disolvente diferente al anterior; estos nuevos productos quedan sobre la capa pudiendo ser visualizados y estudiados.

El paso siguiente - el revelado en tres direcciones o dimensiones - no está resuelto ya que, se considera multidimensional el utilizar diversas capas con el mismo pro-

ducto aplicado, que se revelan en dos dimensiones pero con disolventes y visualizadores diferentes (Arx, 1963), o bien la utilización de diferentes adsorbentes mezclados de forma diferente a lo largo de la capa (Stahl, 1964a). También se considera multidimensional el cambio en la técnica cromatográfica utilizada, tal como el paso de la cromatografía en fase gaseosa a la C.C.F. (Mangold, 1961a) (Janak, 1964) o de la C.C.F. a la electroforesis (Wachter, 1970).

1.1. Descripción del método

El método de revelado utilizado por nosotros se realiza según tres direcciones sobre la misma capa, de espesor y adsorbente homogéneos, efectuando tres revelados independientes con disolventes diferentes; la capa se gira 90° entre cada revelado. Este método es adecuado, sobre todo, para la separación de un producto de mezclas complejas de las que se dispone de poca cantidad o del que se efectúan estudios cuantitativos, siendo interesante poder efectuar las diversas separaciones sobre la misma capa para evitar la transferencia y pérdida del producto, pudiendo estudiarse, además, los restantes productos separados.

Las capas empleadas deben ser preferentemente prefabricadas, con soporte de vidrio, plástico o alu

minio; mediante zonas auxiliares trazadas sobre la misma capa pueden aplicarse patrones del producto a purificar que sirven de control para identificar lo después de cada revelado.

El método incluye las etapas que se indican a continuación:

Etapas 1.- Para efectuar la purificación de un producto mediante el revelado en tres dimensiones, se traza con un lápiz sobre la capa el dibujo de la Fig. 1, aplicándose la mezcla a estudiar en el punto a y la solución de control en b; se revela en la dirección de la flecha con una solución bastante polar en relación con el producto estudiado - para separar con ello las impurezas muy polares y aprovechar mejor la capa en los revelados posteriores - hasta que el frente quede entre las dos líneas de F-1; se seca con aire. Al mismo tiempo, con este revelado, se lava el resto de la capa para los revelados posteriores.

Etapas 2.- Se visualiza el producto de control tapando el resto de la capa y, de acuerdo con su R_f , se marcan dos trazos c y d (Fig. 2) más o menos juntos según la facilidad de visualización no destructiva, en la parte de adsorbente ocupada por el producto a separar y se raspa la zona de adsorbente rayada

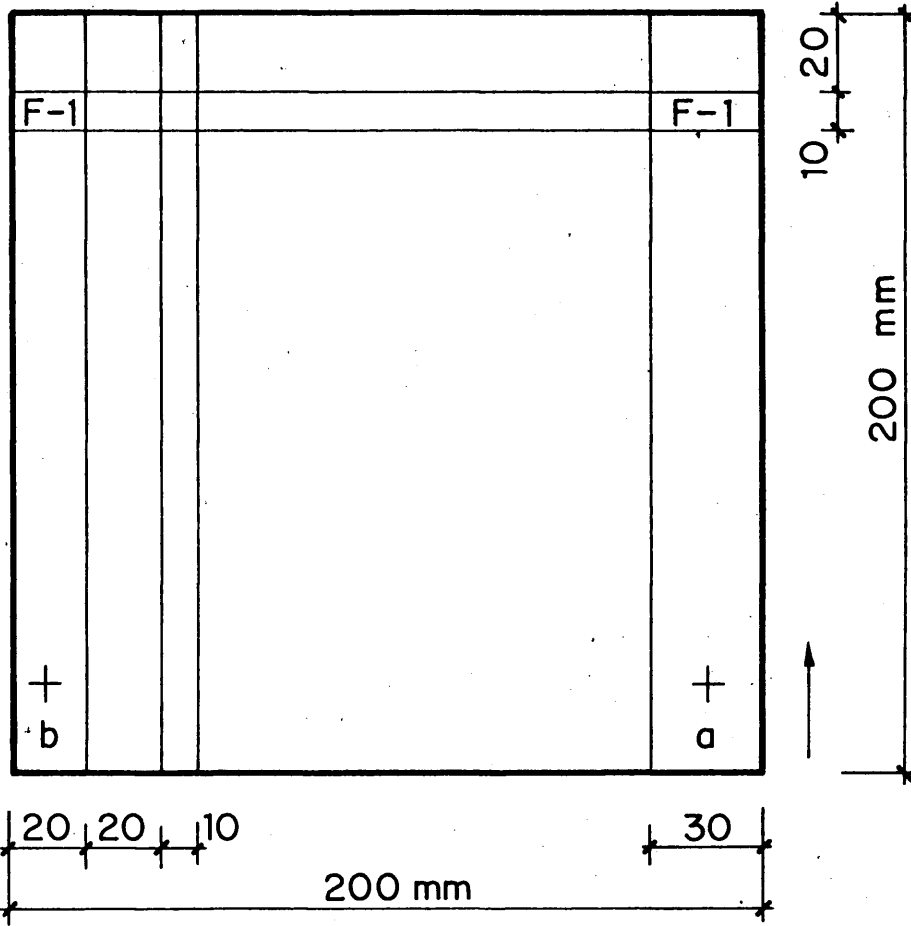


FIG.1. -TRAZADO SOBRE LA CAPA. PRIMER REVELADO.

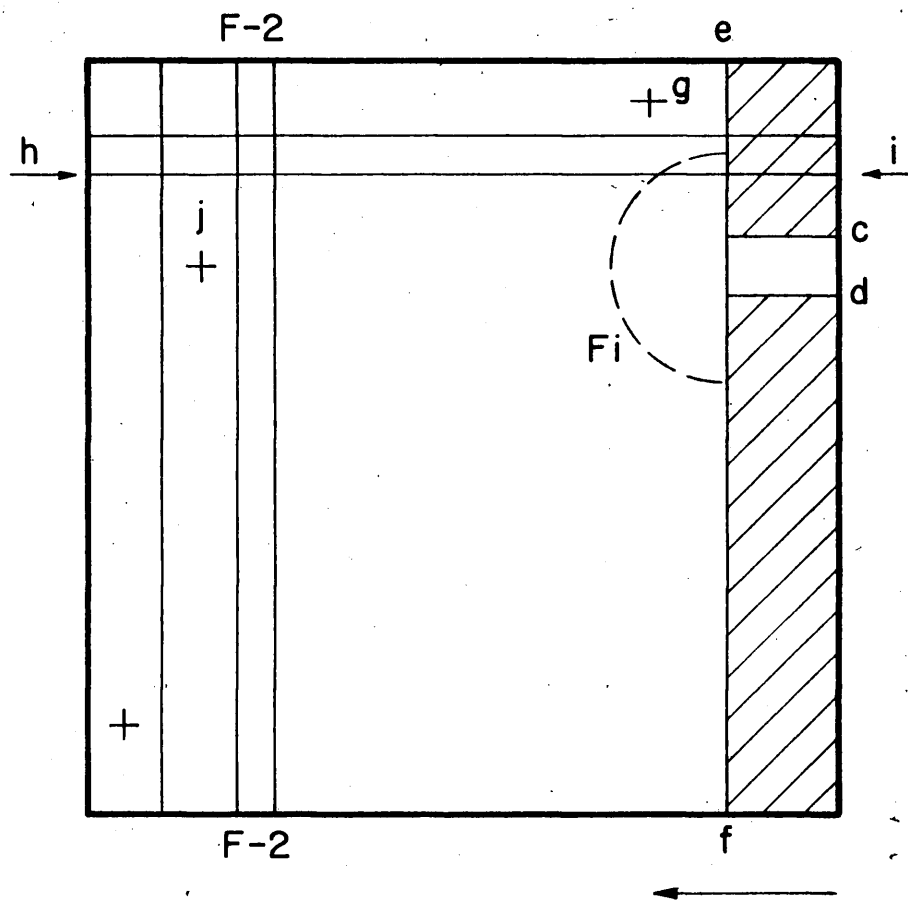


FIG. 2.— REVELADOS INTERMEDIO Y SEGUNDO.

en la figura (visualizándola antes, si es necesario, para separar algún producto que interese). Se revela con el disolvente anterior en la dirección de la flecha (revelado intermedio) hasta que el frente (Fi) al cance una altura adecuada para que el producto a pu-rificar quede a unos 2 cm sobre la línea e-f; se se-ca la capa y se corta la placa por la línea e-f ras-pándose la zona de adsorbente ocupada por el primer frente F-1; se aplica la solución de control en g y se revela con otro disolvente en la dirección de la flecha hasta F-2. Se seca la capa, se visualiza el producto de control, se corta la placa por h-i y se raspa la zona de adsorbente comprendida en F-2.

Etapa 3.- Se aplica el producto de control en j (Fig. 3) y se revela con un nuevo disolvente en la dirección de la flecha y se seca; por visualización de la zona j puede localizarse el producto buscado en la zona de revelado de la mezcla.

Para la separación del producto puede ser interesante el empleo de un disolvente poco polar en el primer revelado; la disposición de la capa para este revelado será igual a la de la Fig. 1.

La Fig. 2, para el revelado intermedio, será algo diferente, efectuándose el corte c-d cerca del punto de aplicación; este revelado se efectuará con un disolvente más polar que el anterior para facili-

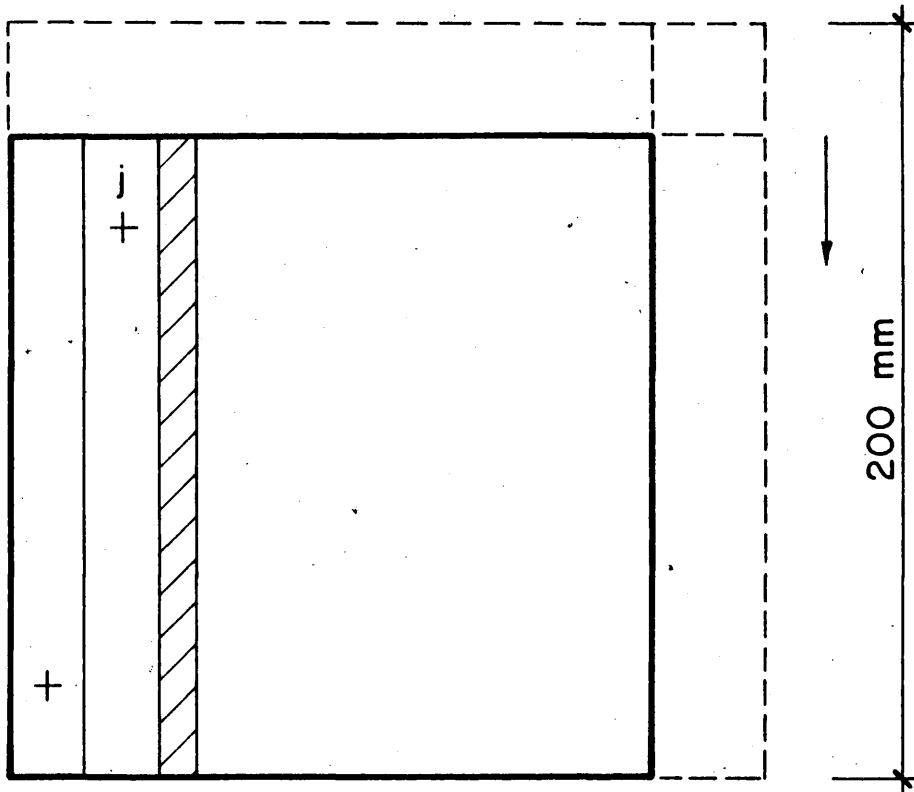


FIG. 3. - TERCER REVELADO.

tar la salida del producto de la zona cortada por c-d, debiendo conocerse el valor del Rf del producto en ese nuevo disolvente. El disolvente puede ser el mismo que el del revelado segundo si es adecuado. No es necesario cortar la placa por h-i.

La disposición de la capa para el tercer revelado será similar a la de la Fig. 3, con la diferencia de que este revelado se efectuará en la misma dirección del primero, situándose el punto de aplicación del producto de control j cerca del punto b.

2. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1. Determinación de la eficacia

Para conocer la eficacia del sistema cromatográfico con revelado en tres dimensiones, se efectúa el revelado de 5 µg del colorante amarillo dimetilo, de la forma indicada en el apartado 1.1, sobre una capa analítica prefabricada de gel de sílice de 20 x 20 cm (Merck, ref. 5715), utilizando como disolvente para los revelados primero e intermedio metanol, para el segundo revelado acetona, y para el tercer revelado una mezcla de acetona-etanol (3:1) v/v. Se han utilizado estos disolventes por ser adecuados para la separa-

ción de colorantes (c.f. 2.2), aplicándose 5 μ g por ser la misma cantidad utilizada en esa separación y ser fácilmente visualizable a lo largo de los diferentes revelados.

A partir de las fórmulas indicadas en el apartado 7.1 (c.f. cap. I) se obtienen unos valores de \underline{A} y de \underline{n} para el revelado en tres dimensiones de 0'0047 cm y de 9000 platos teóricos respectivamente. Los valores de \underline{A} y de \underline{n} para el primer revelado son de 0'0130 cm y de 1200 platos teóricos respectivamente, lo que coincide con la bibliografía (Snyder, 1967a).

La gran diferencia entre los dos valores es debida, no solo a que el recorrido sobre la capa es mayor sino, además, a que los cambios de sentido de los disolventes durante los diferentes revelados producen acortamiento de las manchas, con el consiguiente aumento en el número total de platos teóricos, haciendo que, en el revelado en tres direcciones, la longitud de la mancha correspondiente al amarillo dimetilo sea igual que después del primer revelado (1'4 cm). De todas formas, los valores de \underline{n} en uno y otro caso no son comparables de forma rigurosa, por haber cambiado el disolvente revelador y no ser el mismo proceso cromatográfico. Primer revelado:
 $d_R = 9'3$ cm, $L = 15'5$ cm; revelado en tres dimensio-

nes: $d_R = 25'9$ cm, $L = 42'5$ cm.

Para estudiar la relación entre el número de platos teóricos y la cantidad de producto aplicado, se aplican diversas cantidades del colorante amarillo dimetilo sobre una capa de gel de sílice de 20 x 20 cm y se revelan con metanol. El R_f obtenido para las diferentes aplicaciones es de 0'60 a pesar de la gran diferencia de masa existente entre ellas.

Las cantidades aplicadas y los valores obtenidos de \underline{A} y de \underline{n} se especifican en la Tabla II.I.

TABLA II.I

RELACION ENTRE LA CANTIDAD APLICADA, \underline{A} y \underline{n}

<u>Cantidad aplicada</u> <u>μg</u>	<u>$\frac{A}{\text{cm}}$</u>	<u>$\frac{n}{\text{número de platos}}$</u>
0'2	0'0030	5400
0'4	0'0045	3650
0'6	0'0056	2950
0'8	0'0069	2400
1'0	0'0074	2230
2'0	0'0090	1830
3'0	0'0105	1570
4'0	0'0122	1350
5'0	0'0140	1180
8'0	0'0160	1030
10'0	0'0180	920

2.2. Separación de colorantes

Como ejemplo del sistema de revelado en tres di-
mensiones, se estudia la separación del colorante ro-

jo congo de los colorantes siguientes: naranja de bencilo, verde diazina, verde brillante, rodamina B, amarillo dimetilo, azul de bromotimol, amarillo brillante, rojo cresol y amarillo alizarina (B.D.H.), todos ellos - igual que la solución de control - a la concentración de 1 mg/ml en solución de una mezcla etanol-agua (50:50) v/v.

Para estudiar las condiciones más adecuadas de separación del rojo congo de los otros nueve colorantes, se aplican los diez colorantes por separado en capas de gel de sílice de 20 x 20 cm y en diversos disolventes seleccionándose entre ellos: para el revelado primero e intermedio, metanol (Merck), para el segundo, acetona (C. Erba), y para el tercero, una mezcla de acetona-etanol (C. Erba) (3:1) v/v.

Para estudiar, al mismo tiempo, la influencia de los disolventes utilizados en revelados anteriores sobre el Rf de los colorantes en revelados sucesivos - por no ser posible activar las capas entre cada revelado por pirolizarse los productos - se revela, además, primero una placa con metanol, se seca con aire, se aplican los colorantes y se revela con acetona. Se revela, asimismo, otra placa con metanol, se se ca con aire, se revela con acetona, se seca con aire, se aplican los colorantes y se revela con la mezcla acetona-etanol (3:1) v/v.

Los diferentes valores del Rf de los colorantes con estos disolventes se especifican en la Tabla II.II.

Para efectuar el revelado en tres dimensiones se aplican 5 μ l de una solución en agua-etanol (50:50) v/v de los diez colorantes, con una concentración de cada uno de 1 mg/ml, en el punto a de la capa de gel de sílice preparada según se indica en la Fig. 1.

En el primer revelado se separan del rojo congo los siguientes colorantes: verde diazina, verde brillante, rodamina B, amarillo dimetilo y parte del amarillo alizarina, siendo los valores del Rf de las líneas c y d 0'70 y 0'93 respectivamente y el Rf del rojo congo de control igual a 0'82. En el segundo revelado se separan el azul de bromotimol y la parte restante del amarillo alizarina, siendo el Rf del rojo congo de control igual a 0'00. En el tercer revelado se separan: naranja de bencilo, amarillo brillante y rojo cresol, quedando el rojo congo (de color rojo pálido) perfectamente separado de los otros colorantes, siendo su Rf de 0'23. Las cámaras de vidrio utilizadas, provistas de papel saturador, tienen unas dimensiones interiores de 22 x 6 x 22 cm. Los valores del Rf obtenidos con los diversos colorantes son similares a los de la Tabla II.II.

TABLA II.II

VALORES DEL Rf DE LOS COLORANTES CON DIVERSOS DISOLVENTES

Colorantes	Disolventes				
	I	II	III	I+II	I+II+III
Rojo congo	0'82	0'00	0'12	0'00	0'22
Naranja de bencilo	0'74	0'04	0'42	0'06	0'46
Verde diazina	0'01	0'01	0'01	0'01	0'01
Verde brillante	0'06	0'01	0'01	0'01	0'01
Rodamina B	0'48	0'20	0'17	0'21	0'19
Amarillo dimetilo	0'64	0'66	0'60	0'67	0'61
Azul de bromotimol	0'76	0'34	0'67	0'39	0'74
Amarillo brillante	0'82	0'01	0'47	0'04	0'56
Rojo cresol	0'74	0'04	0'49	0'13	0'55
Amarillo alizarina	0'72	0'14	0'47	0'19	0'48

Disolventes: I.- Metanol. II.- Acetona. III.- Acetona-etanol (3:1) v/v.

Para identificar sobre la capa los diversos colorantes separados, puede hacerse uso de la exposición de la misma a los vapores de hidróxido amónico y de ácido clorhídrico con los cuales varía el color de algunos de ellos. En la Tabla II.III se especifican los diversos colores adquiridos por esta exposición.

TABLA II.III

VARIACION DEL COLOR POR EXPOSICION A DIVERSOS VAPORES

Colorante	Color normal	Vapores	
		Hidróxido amónico	Acido clorhídrico
Rojo congo	rojizo	rojizo	azul
Naranja de bencilo	amarillo	amarillo	rojo
Verde diazina	azul	azul	azul
Verde brillante	verde-azul	sin color	amarillo
Rodamina B	rojo	rojo	rojo-pardo
Amarillo dimetilo	amarillo	amarillo	rojo
Azul bromotimol	amarillento	azul	azul-pardo
Amarillo brillante	amarillo	rojizo	violeta
Rojo cresol	amarillento	violeta	rojo
Amarillo alizarina	amarillento	amarillento	amarillento

2.3. Determinación de la resolución de la separación

Utilizando la fórmula del apartado 7.2 del capítulo I, puede calcularse la resolución obtenida en la separación del colorante rojo congo ($R_f = 0'22$) del colorante más inmediato, naranja de bencilo ($R_f = 0'46$).

La resolución obtenida ha sido de 2'0 por lo que la separación es satisfactoria. Colorante rojo congo:

$$d_{R1} = 3'1 \text{ cm, } W_{d1} = 1'5 \text{ cm; colorante naranja de bencilo:}$$

$$d_{R2} = 6'4 \text{ cm, } W_{d2} = 1'7 \text{ cm.}$$

Se ha considerado solamente el tercer revelado ya que, en este caso, es independiente de los otros revelados por haber partido los dos colorantes de la misma línea.

2.4. Separación de aminoácidos

Como un nuevo ejemplo del sistema de revelado en tres dimensiones se efectúa la separación del ácido glutámico de otros 18 aminoácidos.

De la misma forma que en la experiencia anterior, se efectúa primero el revelado independiente de cada aminoácido en diversos disolventes (Stahl, 1969) para elegir los más adecuados. Posteriormente se efectúa el revelado de las capas con el primer disolvente sin aplicar los productos, se seca con aire, se aplican los productos y se revela con el segundo disolvente. De la misma forma, se revela otra capa con el primer disolvente, se seca con aire, se revela con el segundo, se seca, se aplican los productos y se revela con el tercer disolvente; de esta forma puede conocerse la influencia que ejercen sobre el revelado los disolventes anteriormente utilizados, ya que no es posible secar bien la capa entre cada revelado por producirse la pirólisis de los productos; de todas formas, esta influencia es menor, en este caso, por utilizarse agua como disolvente.

Los aminoácidos utilizados (Merck, ref. 8004 y 8003; Mann Research Lab., ref. 7039, 2957, 1051 y 831; Difco, ref. 0188) se preparan con una concentración de 1 mg/ml cada uno en solución agua-n-propanol (90:10) v/v, excepto la tiroxina y la cistina que se preparan en solución 0'1 N de ácido clorhídrico. Se aplica 1 μ l de cada solución sobre las capas de gel de sílice y se espera 15 minutos antes de revelar la capa para favorecer la eliminación del ácido clorhídrico.

Los disolventes utilizados han sido: revelados primero e intermedio, etanol 96 % - agua (70:30) v/v (I); revelado segundo, n-butanol-ácido acético-agua (80:20:20) v/v/v (II); revelado tercero, etanol 96%-amoníaco 34 % (70:30) v/v (III). Los valores del Rf en contrados se especifican en la Tabla II-IV.

Posteriormente se efectúa el revelado en tres di mensiones sobre una capa de gel de sílice preparada de acuerdo con la Fig. 1, de 1 μ g de cada uno de los aminoácidos.

En el primer revelado se separan: alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, hidroxiprolina, prolina, lisina, parte de la serina y parte de la treonina. En el segundo revelado se separan: fenilalanina, isoleucina, leucina y triptófano. En el tercer revelado se se paran completamente el ácido glutámico de los restantes aminoácidos: ácido aspártico, metionina, parte de la

serina, tiroxina, parte de la treonina y valina, determinándose, en cada caso, la posición del ácido glutámico por su Rf en las zonas de control. El corte de la capa después del primer revelado se realiza en los puntos c-d con valores del Rf de 0'50 y 0'80. Los valores del Rf del ácido glutámico son similares a los de la Tabla II.IV.

La visualización de los productos se efectúan con solución pulverizable de ninhidrina (Merck, ref. 6758).

TABLA II.IV

VALORES DEL Rf DE LOS AMINOACIDOS CON DIVERSOS DISOLVENTES

Aminoácidos	Disolventes				
	I	II	III	I+II	I+II+III
Acido glutámico	0'65	0'27	0'16	0'30	0'18
Acido aspártico	0'54	0'18	0'05	0'21	0'06
Alanina	0'45	0'23	0'42	0'23	0'40
Arginina	0'03	0'12	0'11	0'11	0'12
Cistina	0'40	0'10	0'24	0'13	0'26
Fenilalanina	0'63	0'42	0'61	0'45	0'60
Glicina	0'42	0'22	0'35	0'21	0'34
Histidina	0'30	0'06	0'42	0'06	0'40
Hidroxiprolina	0'42	0'15	0'31	0'15	0'33
Isoleucina	0'61	0'45	0'56	0'46	0'57
Leucina	0'60	0'43	0'58	0'45	0'60
Lisina	0'02	0'02	0'10	0'02	0'09
Metionina	0'60	0'35	0'60	0'35	0'61
Prolina	0'34	0'15	0'32	0'16	0'32
Serina	0'50	0'26	0'31	0'25	0'33
Tiroxina	0'64	0'40	0'50	0'40	0'51
Treonina	0'50	0'21	0'40	0'23	0'45
Triptófano	0'64	0'48	0'60	0'50	0'61
Valina	0'53	0'32	0'58	0'32	0'57

Para la composición de los disolventes, véase texto.

3. DISCUSION

La principal ventaja de la C.C.F. en tres dimensiones, respecto a la de dos dimensiones, es el aumento conseguido en el número de platos teóricos. En la parte experimental se observan las separaciones obtenidas en el último revelado, en el que se consigue aislar el colorante naranja de bencilo del resto de los colorantes y el aminoácido ácido glutámico de los restantes aminoácidos.

Frente a las técnicas multidimensionales en las que se emplean técnicas diferentes, presenta la ventaja de efectuarse los diferentes revelados sobre la misma capa sin transferencia de producto, lo cual puede ser importante cuando se estudian los productos cuantitativamente. Sin embargo, la utilización de técnicas multidimensionales en las que se empleen dos procedimientos cromatográficos, tiene la ventaja de aprovechar las cualidades más acentuadas de cada técnica para el caso estudiado.

Cuando se efectúan diferentes revelados sobre la misma capa, los valores del R_f se ven afectados, respecto a ensayos efectuados aisladamente, por el vapor de los disolventes empleados en revelados anteriores; esto no es un inconveniente ya que, mediante las zonas de control, puede conocerse el nuevo R_f en las mismas condiciones de revelado; además, en los procedimientos de revelado en los que se emplean presaturaciones con diferentes vapores de disolventes antes del revelado, se consiguen

interesantes separaciones (Geiss, 1968a) (de Zeeuw, 1968).

Si los productos son estables térmicamente, puede efectuarse la activación de la capa entre cada revelado, no siendo, en general, aconsejable, por anularse una de las principales ventajas de la C.C.F. que es el revelado a temperatura ambiente. Al desactivarse las capas por los vapores del disolvente anterior descenderá el número de platos teóricos, pero ya se ha visto por los resultados experimentales que no es un grave inconveniente.

CAPITULO III

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE GRAN LONGITUD EN FORMA DE "Z"

1. INTRODUCCION

La técnica de separación de sustancias por cromatografía en capa fina (C.C.F.) de dimensiones normales, permite separar un número limitado de sustancias debido a su escaso número de platos teóricos. Cuando se desea separar un mayor número de productos es necesario recurrir a técnicas especiales.

La técnica de C.C.F. con revelado en flujo continuo (con pérdida del disolvente por el extremo de la capa) permite separar sustancias de R_f bajo mediante el revelado en un tiempo superior al normal (aumentando teóricamente el número de platos) siendo su recorrido real aproximadamente igual al de la técnica normal de C.C.F. Ahora bien, si en la mezcla de sustancias a separar hay componentes de polaridad baja, estos se revelarán hasta el frente de la capa; en el caso de cromatografía ascendente, quedarán mezclados con las impurezas del disolvente y de la capa y unidos entre sí, y si la cromatografía realizada es descendente, se eluirán completamente perdiéndose en el exterior de la capa.

Para evitar estos inconvenientes se han utilizado capas de gran longitud (Freeman, 1966); pero tienen el

inconveniente de no poderse utilizar en los equipos con
vencionales y ser engorroso su manejo.

Mediante una disposición adecuada del adsorbente en la placa, dentro de los tamaños comerciales de capas y cámaras, puede alargarse considerablemente la longitud real de la zona de revelado. El sistema empleado por nosotros consiste en el raspado de parte del adsorbente de la placa para que la zona de revelado forme una "Z", consiguiendo alargar su recorrido hasta 1 ó 2 m, dentro de una placa de 20 x 20 cm y dependiendo de la anchura de la zona de revelado. En la Fig. 4 se observa la forma adoptada.

Durante el revelado de las capas en forma de "Z", la zona raspada de la placa debe limpiarse cuidadosa-mente para evitar que el disolvente pase de unas zonas del adsorbente a las otras a través de los restos del mismo. Si el dibujo y el raspado del adsorbente se efectúan mediante una plantilla puede prepararse una capa en pocos minutos.

El aumento de la longitud de la capa - y con ello el número de platos teóricos - permitirá la separación de un mayor número de sustancias que la C.C.F. normal.

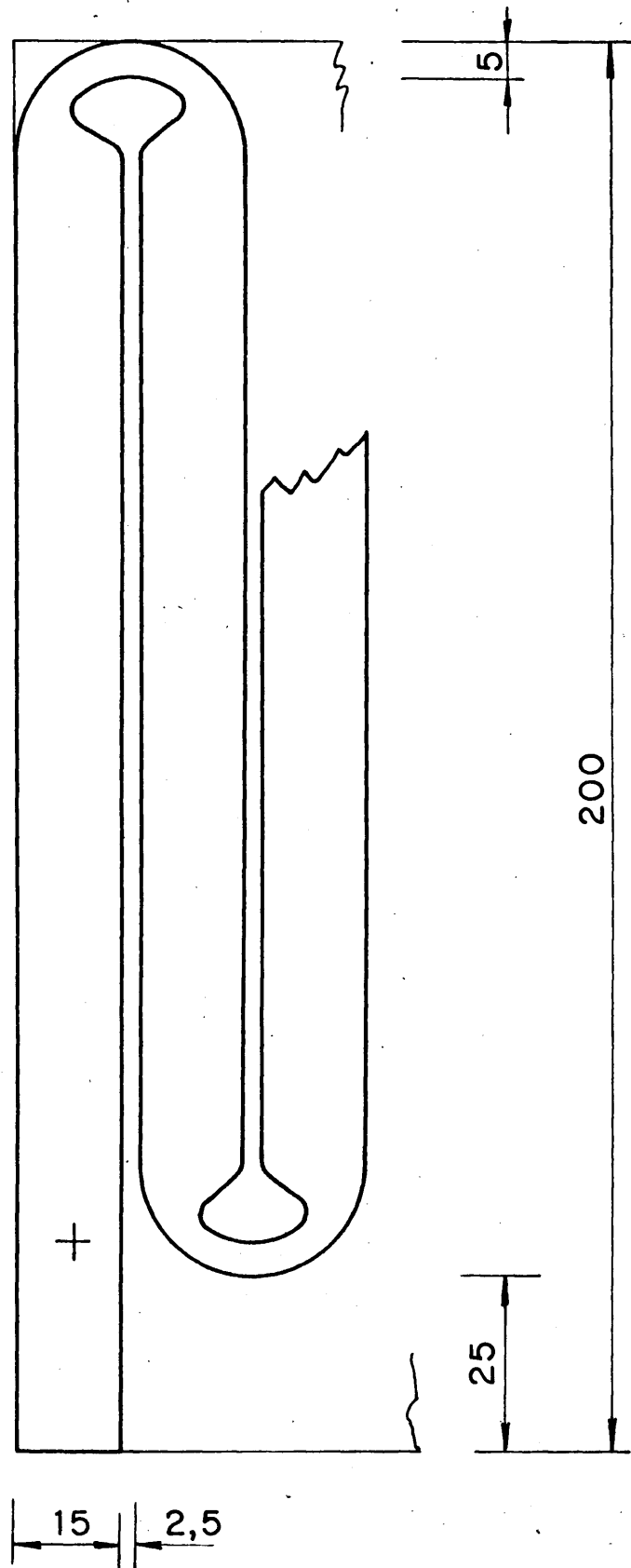


FIG. 4. — DISPOSICION DEL ADSORBENTE EN LA PLACA.

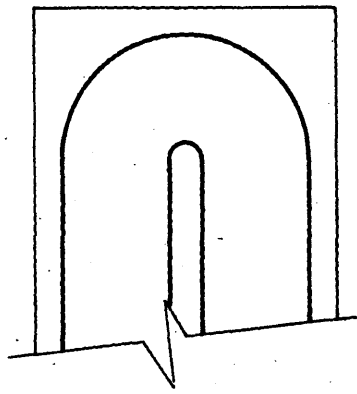
2. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1. Zona curva de la capa

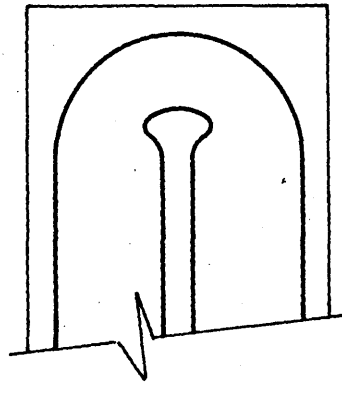
La parte más importante del sistema estudiado es la zona curva de la capa, por influir en el revelado la diferencia de camino entre ambos lados de la curva y su estrechamiento, si lo hubiera.

Se estudian primero diferentes tipos de curvas en prolongación de capas de 15 mm de anchura (que se considera adecuada) y de la forma indicada en la Fig. 5. Se trata de ver la influencia que sobre la longitud de las manchas después del revelado (\underline{W}_d) (medida en la dirección del movimiento del disolvente) y la distancia recorrida por ellas, medida desde el punto de aplicación hasta el centro de la mancha (o lugar de mayor coloración) (\underline{d}_R), tienen las diferentes formas de curva. Se pretende con ello que la diferencia de camino recorrido por el disolvente entre la parte exterior e interior de la curva sea mínimo, para evitar el alargamiento de las manchas. Para ello, se revelan en acetona durante 5 horas 50 μ g del colorante amarillo dimetilo, aplicados sobre cada una de las capas con la forma indicada en la Fig. 4, pero con la zona curva tal como se indica en las diversas variantes de la Fig. 5.

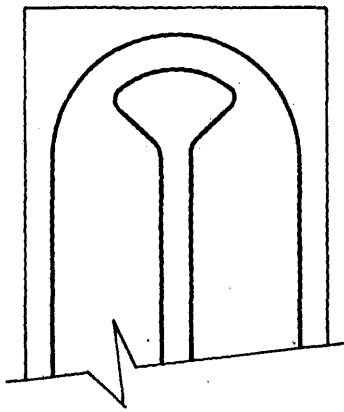
Los diferentes valores obtenidos de \underline{W}_d , \underline{d}_R y \underline{A} (altura equivalente a un plato teórico, se especi



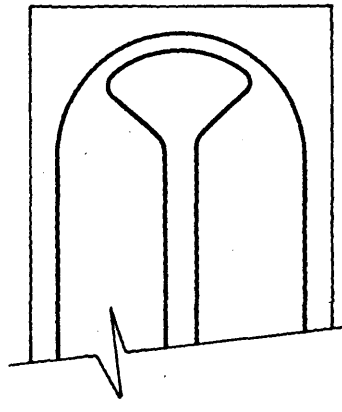
a



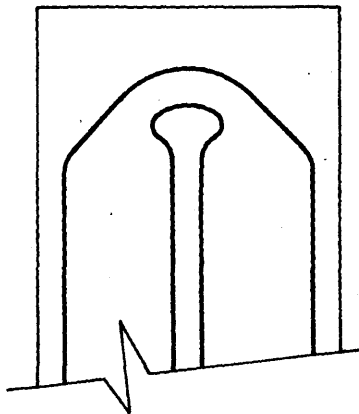
b



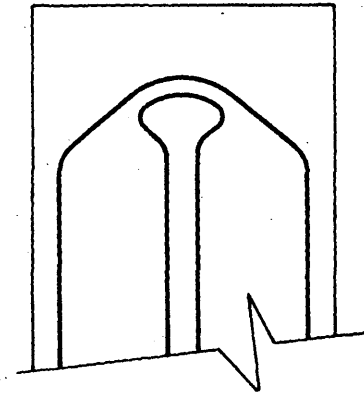
c



d



e



f

FIG. 5.—DIFERENTES TIPOS DE CURVAS ESTUDIADAS.

fican en la Tabla III.I.

TABLA III.I

ESTUDIO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CURVAS

	Tipos de curvas					
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>
W_d (cm)	11'0	7'0	2'5	2'3	2'6	2'8
d_R (cm)	26'5	25'4	23'6	21'9	22'3	22'0
A (cm)	0'026	0'017	0'007	0'007	0'007	0'008

Aunque los tipos c a f producen perturbaciones muy parecidas, se adopta el tipo c por ser más rápido durante el revelado y más adecuado para disolventes más viscosos que la acetona.

2.2. Estrechamiento de la capa

Se estudia, asimismo, la influencia que sobre el R_f , la distancia recorrida por el centro de las manchas, y su longitud, ejercen los diferentes estrechamientos preparados en las capas; para ello se practican en capas de 15 x 200 mm, y en cada una de ellas, estrechamientos de 28 mm de longitud y de anchura variable (Fig. 6), aplicando 100 μ g del colorante y revelando con acetona durante el mismo tiempo las cuatro placas (30 min.). Los resultados se especifican en la Tabla III.II.

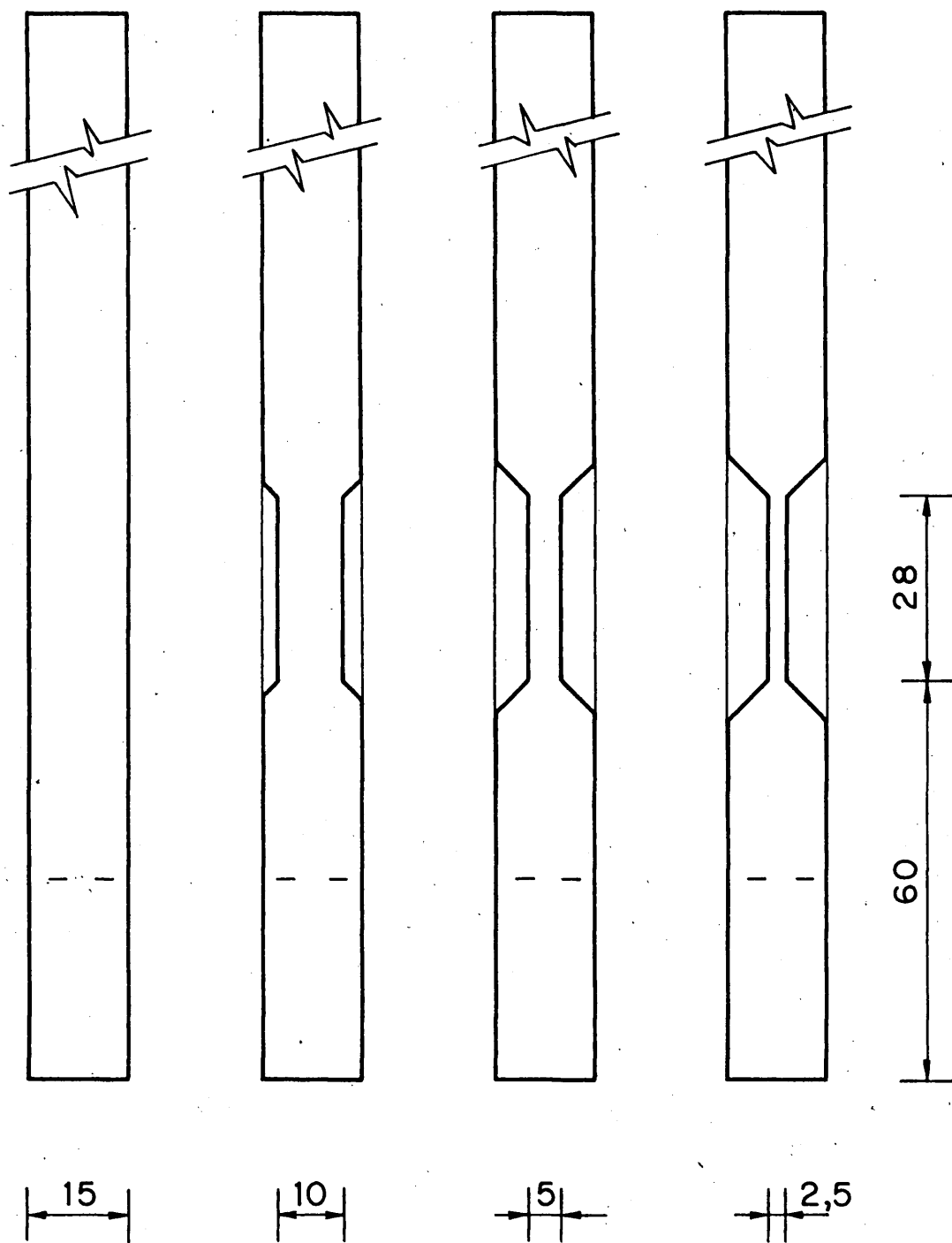


FIG. 6. — DIFERENTES ESTRECHAMIENTOS ESTUDIADOS.

TABLA III.II
INFLUENCIA DEL ESTRECHAMIENTO

	Estrechamiento (cm)			
	<u>1'5</u>	<u>1'0</u>	<u>0'5</u>	<u>0'25</u>
W_d (cm)	1'5	1'3	1'2	1'1
R_f	0'54	0'57	0'60	0'62
d_R (cm)	7'4	7'7	7'7	7'4
A (cm)	0'013	0'011	0'010	0'009

Se observa, como dato más interesante, que la longitud de la mancha varía considerablemente en sentido decreciente cuando la zona de adsorbente es más estrecha (Matthias, 1954), mientras que el R_f lo hace en sentido creciente, y que la distancia recorrida por el producto es casi la misma en todos los casos.

En cinco capas normales sin estrechamiento, pero de diferentes anchuras, se efectúa el mismo revelado anterior. Las anchuras de las capas varían desde 2 a 15 mm y los valores del R_f obtenidos desde 0'53 a 0'55, coincidiendo con Griesemer (1968), en la pequeña diferencia existente entre los valores del R_f obtenidos revelando con diferentes anchuras de placas.

2.3. Separación de colorantes

Como ejemplo de aplicación de este sistema, se ha efectuado el estudio de la separación cromato-

gráfica de los siguientes colorantes: amarillo dimetilo (a en la Fig. 7), rodamina B(b), rojo de metilo (c) y 2',7'-diclorofluoresceína (d). El disolvente revelador utilizado ha sido acetona en atmósfera saturada en todos los casos, las cámaras utilizadas tienen 55 mm de diámetro interior y 210 mm de altura y las capas empleadas son prefabricadas para C.C.F. de gel de sílice de 200 x 200 x 0,25 mm (Merck, Ref. 5715).

En la Fig. 7 se representa la diferente separación de los colorantes en los tres procedimientos cromatográficos estudiados.

a) Cromatografía normal ascendente, I: Tiempo de revelado 30 minutos. Se observa la separación del amarillo dimetilo y la no separación de los otros tres colorantes.

b) Cromatografía ascendente en flujo continuo, II: Se ha utilizado el procedimiento descrito por Bobbitt (1963), que consiste en dejar en el exterior de la cámara la parte superior de la capa, que pasa a través de la tapa por una rendija. Tiempo de revelado 4 horas 30 minutos. La separación de los cuatro colorantes es buena pero el amarillo dimetilo queda en el frente unido a las impurezas del disolvente y de la capa.

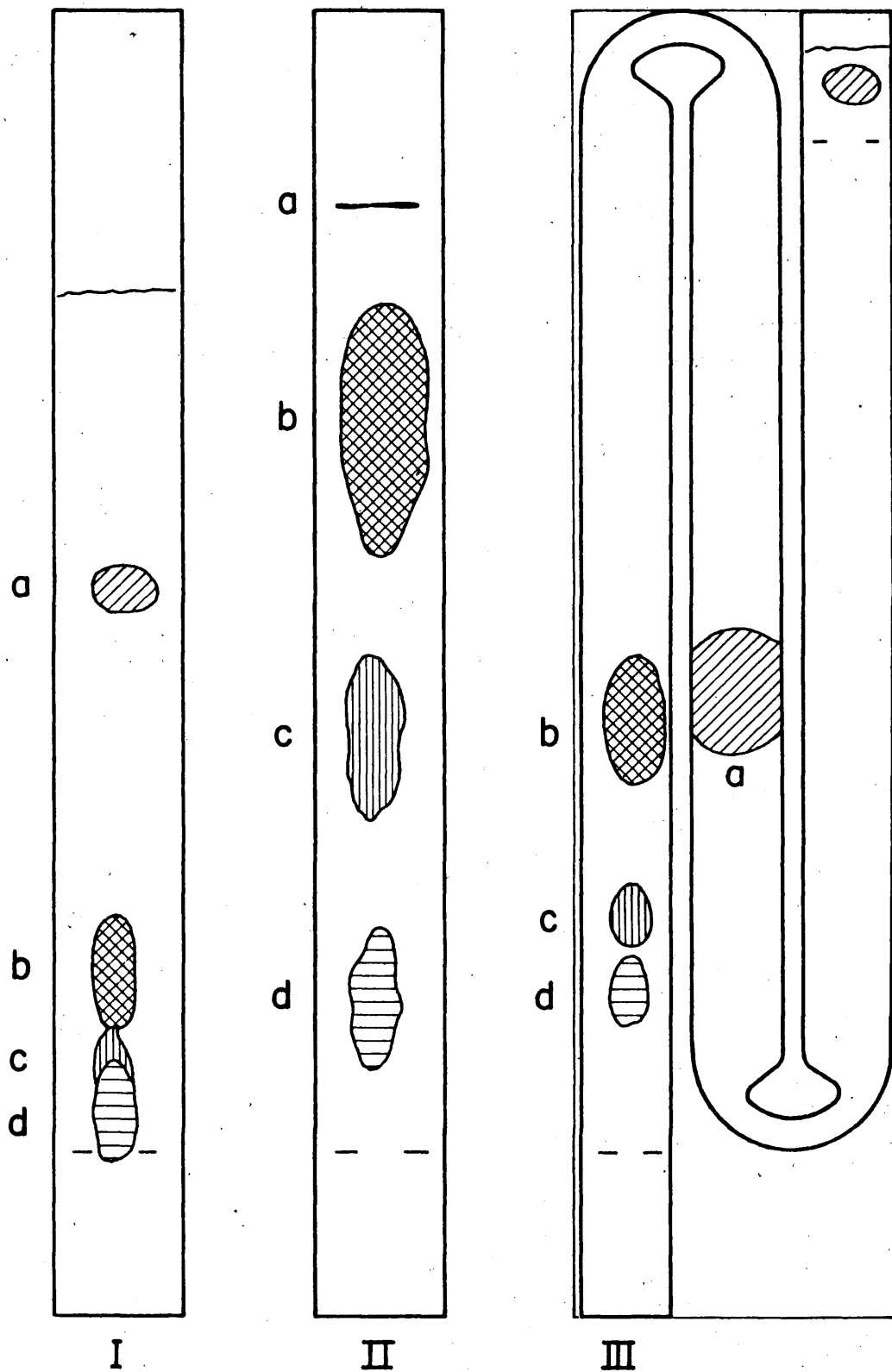


FIG.7.— COMPARACION CON OTROS METODOS CROMATO-
GRAFICOS (VEASE TEXTO).

c) Cromatografía de gran longitud en forma de "Z", III: Se utiliza solamente un ancho total de la placa de 50 mm y un ancho efectivo del adsorbente de 14 mm; la longitud real de la zona de revelado es de 560 mm. Para evitar el contacto del adsorbente con el papel saturador se raspa una zona de 1 mm a cada lado de la placa. Tiempo de revelado 5 horas 30 minutos. La separación de los cuatro colorantes, es buena con las ventajas anteriormente descritas de recuperar el amarillo dimetilo libre de impurezas.

Para asegurarse de que el frente del disolvente llega al final de la capa (o al lugar deseado), puede aplicarse en ese lugar una pequeña cantidad de un colorante poco polar, en este caso amarillo dimetilo, para que por su revelado podamos asegurar el final de la experiencia, ya que, al final de la capa se hace difícil la visualización del disolvente revelador.

Para la identificación de sustancias en el procedimiento cromatográfico empleado, puede utilizarse, en algunos casos, una cromatografía normal para estudiar la posición relativa de algunos de los productos y, en otros casos, será necesario realizar una cromatografía en "Z" independiente para ver el R_f de la sustancia de referencia. Utilizando el primer sistema, se ha diferenciado el amarillo dimetilo del ro-

jo de metilo; los otros dos colorantes son fluorescentes y se han identificado por luz U.V.

Los valores del R_f obtenidos en la cromatografía en "Z", son inferiores a los de una cromatografía normal (Tabla III.III), debido al exceso de exposición del adsorbente seco a los vapores del disolvente, siendo equivalente a una saturación previa con los vapores del disolvente (Geiss, 1968a).

TABLA III.III

VARIACION DEL R_f

<u>Colorante</u>	<u>Rf</u>	
	<u>C.C.F. normal</u>	<u>C.C.F. en "Z"</u>
<u>a</u>	0'65	0'52
<u>b</u>	0'23	0'12
<u>c</u>	0'10	0'07
<u>d</u>	0'06	0'05

2.4. Eficacia del sistema cromatográfico

Para estudiar la eficacia del nuevo sistema cromatográfico y poderla comparar con la obtenida en C.C.F. normal, se utilizan las fórmulas del apartado 7.1 (c.f. cap. I) aplicándolas a los datos obtenidos en la separación del colorante amarillo dimetilo indicada en el apartado anterior (Fig. 7).

C.C.F. normal : altura equivalente a un plato teórico: 0'0046 cm; número de platos teóricos: 2900, siendo: $\underline{W}_d = 0'8$ cm, $\underline{d}_R = 8'7$ cm, $\underline{L} = 13'3$ cm.

C.C.F. en forma de "Z": altura equivalente a un plato teórico: 0'0076 cm; número de platos teóricos: 7200, siendo: $\underline{W}_d = 1'9$ cm, $\underline{d}_R = 29'3$ cm, $\underline{L} = 54'4$ cm.

Se observa el considerable aumento experimentado en el número de platos teóricos; en el apartado 7.1 (c.f. cap. I) se indicaba que el cálculo del número de platos teóricos de una capa, dependía de una serie de factores que hacían poco comparables unos revelados con otros de diferentes capas, disolventes, etc., en cuanto a ese cálculo; en el caso actual, sí es comparable ya que se han conservado todos los parámetros excepto la forma y la longitud de la capa.

2.5. Resolución del sistema cromatográfico

Para estudiar las diferencias entre la resolución obtenida en la C.C.F. normal y en forma de "Z" - y para los colorantes rojo de metilo y 2',7'-diclorofluoresceína separados según se describe en el apartado 2.3 (Fig. 7) - se utiliza la fórmula indicada en

el apartado 7.2 (c.f. cap. I).

La resolución obtenida en C.C.F. normal ha sido de 0'6 considerándose, por lo tanto, inadecuada, siendo $d_{R1} = 1'3$ cm, $d_{R2} = 0'7$ cm, $W_{d1} = 0'9$ cm, $W_{d2} = 1'1$ cm.

La resolución obtenida en C.C.F. en forma de "Z" ha sido de 1'1 por lo que se considera satisfactoria, siendo $d_{R1} = 3'6$ cm, $d_{R2} = 2'4$ cm, $W_{d1} = 1'0$ cm, $W_{d2} = 1'2$ cm.

2.6. Separación de aminoácidos

Como un nuevo ejemplo de la separación de productos por C.C.F. en forma de "Z", se efectúa la separación de los siguientes aminoácidos: lisina, arginina, prolina, ácido aspártico, alanina, valina, metionina, isoleucina y triptófano.

La separación se estudia aplicando sobre capas prefabricadas de gel de sílice (Merck, ref. 5715) 1 μ l de cada uno de los aminoácidos, preparados en solución agua-n-propanol (90:10) v/v con una concentración de 1 mg/ml (aminoácidos: Merck, ref. 8004 y 8003; Mann Research Lab., ref. 7039; Difco, ref. 0188).

El disolvente revelador utilizado ha sido una mezcla de: n-butanol-ácido acético-agua (80:20:20) v/v (Stahl, 1969).

Para visualizar los diferentes aminoácidos se utiliza una solución pulverizable de ninhidrina (Merck, ref. 6758).

Se efectúan diferentes revelados para estudiar la separación, identificando los diferentes productos mediante revelados independientes efectuados en las mismas condiciones.

- a) C.C.F. normal: Se separan diversos grupos de aminoácidos quedando unidos entre sí: lisina y arginina; prolina, ácido aspártico y alanina; isoleucina y triptófano.
- b) C.C.F. con flujo continuo ascendente: En este caso, y debido al bajo R_f de los aminoácidos, se revela durante un tiempo adecuado para que el aminoácido de mayor R_f (triptófano) se aproxime al frente. Se separan, respecto al revelado anterior, la alanina del ácido aspártico.
- c) C.C.F. con flujo continuo ascendente: Se revela un tiempo superior al anterior para separar los productos de R_f bajo. Se consigue con ello separar la lisina de la arginina y la prolina del ácido aspártico, pero quedan unidos en el frente entre sí, y con las impurezas de la capa y el disolvente, la isoleucina y el triptófano.
- d) C.C.F. en forma de "Z": Se separan entre sí los di-

ferentes aminoácidos. Los valores del R_f y las distancias de retención (d_R , cm) obtenidos en los diferentes revelados se especifican en la Tabla III.IV; la distancia recorrida por el frente del disolvente en los revelados a, b y c es de 10 cm.

TABLA III.IV

VALORES DEL R_f O DE LA DISTANCIA DE RETENCION OBTENIDOS
CON DIFERENTES AMINOACIDOS

	Revelado			
	<u>a</u> ; R_f	<u>b</u> ; d_R	<u>c</u> ; d_R	<u>d</u> ; R_f
Lisina	0'03	0'6	0'9	0'02
Arginina	0'05	1'1	1'6	0'04
Prolina	0'15	3'0	4'2	0'12
A. aspártico	0'17	3'5	5'1	0'15
Alanina	0'20	4'2	6'2	0'20
Valina	0'30	6'0	8'5	0'25
Metionina	0'37	7'4	9'4	0'34
Isoleucina	0'43	8'7	10'0	0'39
Triptófano	0'45	9'2	10'0	0'43

3. DISCUSION

La principal ventaja de la C.C.F. en forma de "Z" es el aumento conseguido en la eficacia y en la resolución cromatográfica. Aunque la longitud de la capa sigue siendo la misma en su aspecto exterior, es varias veces superior en cuanto a su longitud real, por lo que aumenta considerablemente el número de platos teóricos.

La zona curva de la "Z" no presenta grandes dificultades en cuanto al aumento de la longitud (W_d) de las manchas (produciendo incluso su disminución), incrementándose este valor a lo largo de la "Z" debido a la difusión del producto aplicado en el adsorbente (al aumentar el recorrido y el tiempo de permanencia en contacto); se consiguen, no obstante, separaciones mejores que en capas de 20 cm de longitud, como se ha observado en las separaciones estudiadas en la parte experimental.

Si la capa fuera más estrecha se limitaría, aún más, la difusión lateral, por lo que la superficie de la mancha disminuiría, aumentando por lo tanto la posibilidad de una más fácil visualización.

CAPITULO IV

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN CAPA FINA CON FASE MO- VIL GASEOSA

1. INTRODUCCION

La separación de productos volátiles con puntos de ebullición del orden de 100°C por cromatografía en capa fina (C.C.F.), tropieza con la dificultad de que, debido a tener que evaporar la fase líquida utilizada, estos productos volátiles son también evaporados impidiéndose su visualización. Por otra parte, la difusión de los productos entre las fases sólida y líquida es lenta, lo que impide su rápido revelado.

Si hacemos pasar un gas - o una mezcla de un gas y vapor de disolvente - por una cámara formada por la capa adsorbente y una cubierta provista de una cavidad longitudinal de poca profundidad, obtendremos un sistema cromatográfico gas-sólido en capa fina; aplicando la mezcla de productos a separar en un extremo, podremos revelar los diferentes productos (que permanecerán sobre la capa para ser visualizados posteriormente) resolviéndose, de esta forma, las dificultades antes mencionadas por la ausencia de fase líquida y la más rápida difusión de los productos entre las fases sólida y gaseosa.

El revelado de productos por cromatografía en fase gaseosa en columna - utilizando como fase gaseosa una mezcla de un gas portador y un vapor de disolvente (que actúa en general como desplazante para evitar la formación de "colas") - ha sido estudiado por diferentes autores: Claesson (1946), en la separación de hidrocarburos y otros productos utilizando acetato de etilo como desplazante, James (1953), en la separación de diversas mezclas de disolventes orgánicos con nitrógeno como gas portador y bromobenceno como desplazante, Ackman (1963), en el revelado con ácido fórmico como desplazante para la separación de ácidos grasos y Knight (1958), Davis (1964) y Phifer (1966), en el revelado con la mezcla de un gas portador y vapor de agua para la separación de diversos productos; en ciertos casos se utiliza el vapor del disolvente como gas portador (Tsuda, 1970).

La influencia de los vapores de los disolventes orgánicos sobre las propiedades de adsorción de la capa en C.C.F., ha sido estudiada por Brenner (1962), Geiss (1965 y 1965a) y Zeeuw (1968a) los cuales, antes de revelar los productos con los disolventes líquidos habituales, saturan la capa con los vapores de los mismos o de diferentes disolventes para modificar sus propiedades, obteniendo revelados interesantes que justifican el método.

Los gases y mezclas de gases y vapores de disolventes orgánicos utilizados para el revelado - nitrógeno, acetileno, cloruro de etilo, N₂-benceno, N₂-nitrobenceno, N₂-metanol, N₂-etanol, N₂-agua, N₂-acetona, y N₂-nitrometano - se han elegido de forma que sus constantes dieléctricas (The Chemical Rubber, 1963) (Weissberger, 1955), sus puntos de ebullición y sus propiedades químicas sean lo más diversas posibles, para experimentar el revelado de productos con una amplia gama de estos valores.

Los adsorbentes utilizados en las capas - gel de sílice, alúmina y celulosa - y los productos revelados en el estudio inicial - nitrobenceno y m-cresol - se han elegido en el mismo sentido de diversidad de características.

La cámara cromatográfica utilizada, puede calentarse con agua termostataada para mantener una temperatura determinada durante el revelado (o programada) o por si se desea una mayor velocidad de revelado. De todas formas, no es necesario que la temperatura sea tan elevada como la utilizada en cromatografía en fase gaseosa en columna, por no realizarse el revelado total de los productos con salida al exterior de la capa, lo que hace que el proceso cromatográfico pueda ser más lento. De esta forma se evita la pirolisis de los productos separados.

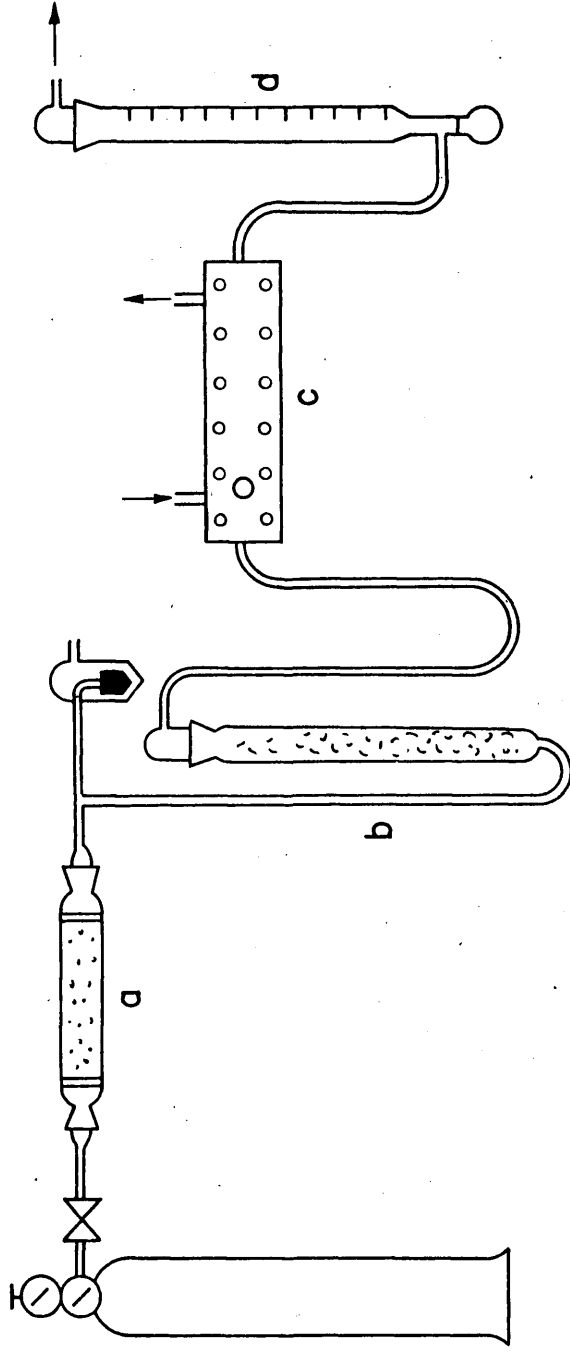
Revelando nitrobenzeno en capas de gel de sílice, se estudian las distancias de retención (d_R) obtenidas con diferentes flujos de gas, tiempos, gases y vapores, temperaturas, dimensiones de la cámara y diversas condiciones de trabajo del saturador de disolventes. Se revelan diversas mezclas de productos tales como: tolueno, benzaldehido, nitrobenzeno, anilina, n-propilbenzeno y bromobenzeno, a temperatura ambiente y a 50°C , y se estudia la obtención de manchas de la menor longitud posible, variando las condiciones del revelado.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Aparatos y productos utilizados

El montaje utilizado para el paso del gas por la capa fina es el indicado en la Fig. 8. El gas, desecado inicialmente con gel de sílice en a, pasa por el saturador relleno de anillos Raschig b (si se desea mezclar con los vapores de un disolvente), a continuación pasa por la cámara cromatográfica c que contiene la capa fina y finalmente es medido con un caudalímetro d.

El desecador, de 24 mm de diámetro y 180 mm de longitud útil, contiene gel de sílice provisto de indicador (Merck Ref. 1925). El saturador, de 30 mm



a. — Desecador
 b. — Saturador

c. — Cámara cromatográfica
 d. — Caudalímetro

FIG. 8.—MONTAJE PARA EL PASO DEL GAS POR LA CAMARA CROMATOGRAFICA.

de diámetro y 450 mm de altura útil, está relleno totalmente de anillos Raschig de vidrio de 5 x 5 mm y puede tener incluido un baño con agua termostatada.

La cámara cromatográfica utilizada es una prensa de la forma indicada en la Fig. 9 (vista lateral); está formada por dos placas de aluminio a (240 x 70 x 10 mm) entre las cuales se colocan, la placa cromatográfica b (200 x 20 mm) y una junta de teflón o cartulina c (240 x 40 x 0,2 mm) provista de un hueco en el centro (180 x 6 mm) para el paso del gas; la junta se coloca sobre la capa adsorbente. La placa dispone de un alojamiento para su colocación. El conjunto se sujeta con unos tornillos adecuados.

Adosadas a las placas de aluminio que forman la prensa y con una junta de goma entre ellas de 10 mm de espesor d, están situadas otras dos placas de aluminio e; entre las placas a y e circula agua termostatada que entra por f. El agua circula mediante una bomba peristáltica y proviene de un baño de agua provisto de termostato. Las placas g (de P.V.C.) evitan la pérdida de calor. El gas se introduce por h en uno de los extremos de la capa y sale por el otro, siempre entre el hueco existente en la junta de teflón. A la salida de la cámara se

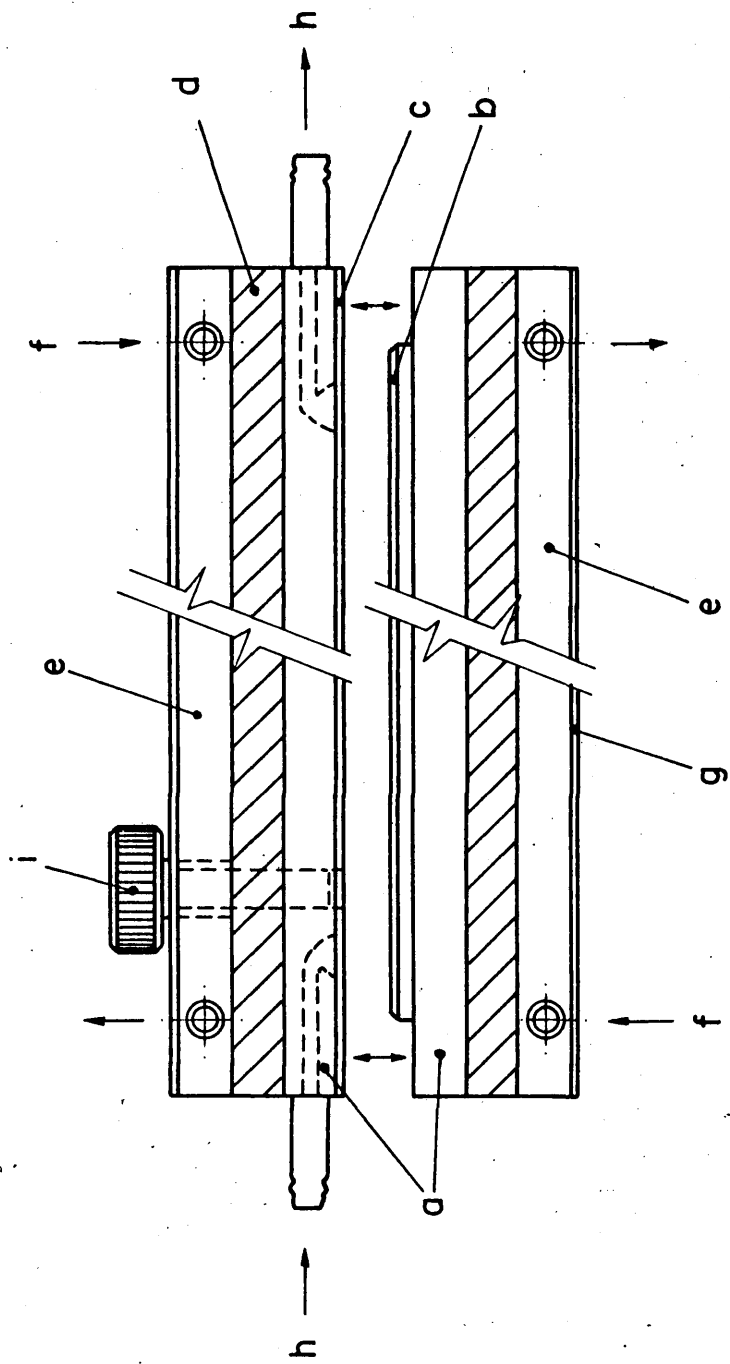


FIG.9. — CAMARA CROMATOGRAFICA. VEASE TEXTO

mide el caudal de gas mediante un caudalímetro de burbuja de 10 ml.

La mezcla de productos se aplica sobre la capa con una pipeta adecuada a través del tapón superior i (pudiendo utilizarse un tapón provisto de diafragma de goma para aplicar la mezcla con una jeringa y evitar su pérdida por evaporación) y mediante el paso del gas portador es arrastrada, en competencia con la capa adsorbente, a lo largo de ésta quedando los diferentes productos revelados sobre la capa.

Para evitar la difusión lateral de los productos durante el revelado en dimensiones superiores a los 6 mm del hueco existente en la junta superior (y la posible salida del gas a través de la capa porosa), se aplica una plantilla adecuada sobre la capa, para que cubra la zona correspondiente al hueco indicado, y se pulveriza con laca del tipo utilizado para la conservación de cromatogramas en C.C.F. (Camag Ref. 38101); posteriormente se activa a 115°C durante 60 min.

A pesar de las precauciones tomadas puede que exista algo de difusión lateral; al mismo tiempo, la aplicación de laca produce en las zonas de la placa en que no ha sido aplicada, un ligero oscurecimiento de la fluorescencia producida con luz U.V. Las placas utilizadas para la obtención de cada una de las curvas

de las gráficas, provienen todas de una misma placa (200 x 200 mm) cortada en tiras de 20 mm.

Los gases y disolventes utilizados han sido: nitrógeno (industrial), acetileno (industrial), cloruro de etilo (B.D.H.), nitrobenceno (Riedel, de Haén A.G.), etanol, metanol, benceno y acetona (Merck) nitrometano (Prolabo) y agua destilada. Los disolventes orgánicos han sido desecados con tamiz molecular de 4 Å (B.D.H.).

3. RESULTADOS

3.1. Distancias de retención obtenidas con diferentes gases, vapores, capas y productos

Para conocer el funcionamiento del procedimiento estudiado y los resultados que se obtendrían en diferentes condiciones, se estudian diversos gases, mezclas de gases y vapores, capas adsorbentes, y productos aplicados, procurando utilizar disolventes que tengan igual punto de ebullición y diferente constante dieléctrica o viceversa, para poder establecer relaciones entre ellos.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla IV.I. La constante dieléctrica indicada en la tabla es la del gas o la del vapor del disolvente utilizado (no de la mezcla); las capas de gel de sílice o de

TABLA IV. I

DISTANCIAS DE RETENCION OBTENIDAS CON DIFERENTES GASES, VAPORES, PRODUCTOS Y CAPAS ADSORBENTES

Gas portador	Const. dieléct.		P. eb. °C	Caudal cm ³ /min.	Capa adsorb.	T. revel. min.	Distancia retención (mm)	
	Vapor	Liq.					nitrobenceno	m-cresol
Nitrógeno	1,00058	-	-	10	sílice	60	6	1 aprox.
"				10	alúmina	60	3 aprox.	0
Acetileno	1,00134	-	-	10	sílice	60	13	2 aprox.
"				10	alúmina	60	5	1 aprox.
Clor. etilo	1,0132	-	-	10	sílice	60	28	2 aprox.
"				10	alúmina	60	8	0
N ₂ -benceno	1,0028	2,284	80,1	5	sílice	30	10	1 aprox.
"				5	alúmina	30	3 aprox.	0
N ₂ -nitrobenc.	-	34,82	210,9	5	sílice	30	5	1 aprox.
"				5	alúmina	30	2 aprox.	0
N ₂ -metanol	1,0057	32,63	64,6	5	sílice	15	32	3 aprox.
"				5	alúmina	15	31	0
N ₂ -etanol	1,0061	24,30	78,5	5	sílice	15	50	2 aprox.
"				5	alúmina	15	34	0
N ₂ -agua	1,0126	78,54	100	5	sílice	30	7	1 aprox.
"				5	alúmina	30	4	0
N ₂ -acetona	1,0159	20,70	56,5	5	sílice	30	34	3 aprox.
"				5	alúmina	30	9	0
N ₂ -nitromet.	1,0247	35,87	101	5	sílice	30	11	0
"				5	alúmina	30	3 aprox.	0

alúmina utilizadas (200 x 20 x 0,25 mm) son capas analíticas para cromatografía en capa fina con soporte de vidrio (Merck, Ref. 5715 y 5713 respectivamente); los productos aplicados han sido nitrobenceno o m-cresol (1 μ l de su solución en éter de petróleo, concentración 10 mg/ml) utilizados por tener un punto de ebullición similar (210,9 y 202,8°C respectivamente) y una constante dieléctrica diferente (34,82 y 11,8 respectivamente) (The Chemical Rubber, 1963) y por ser fácilmente visualizables por adsorción de luz U.V. de 254 nm. Excepto la cámara cromatográfica (50°C) todo el conjunto se ha mantenido a la temperatura ambiente. En el caso de utilizar vapores de disolvente mezclados con el gas portador, la altura del disolvente en el saturador ha sido de 300 mm. La distancia de retención medida sobre la capa o cromatograma (d_R), indica la distancia existente entre el punto de aplicación del producto y el centro de la mancha producida después del revelado.

En experiencias realizadas con capas de celulosa (Merck, Ref. 5718) el producto aplicado no se adsorbe debidamente sobre la capa, produciéndose (como era de esperar) manchas alargadas que la ocupan por completo.

Efectuando C.C.F. normal sobre gel de sílice y revelando con benceno se observa, que la relación entre los valores del R_f del nitrobenceno y del m-cresol (4/1) es del mismo orden que las relaciones obtenidas

entre las distancias de retención en el sistema estudiado.

3.2. Variación de la distancia de retención en función de la temperatura del saturador

Para estudiar la variación de la distancia de retención en función de la temperatura del saturador, se introduce éste en un baño de agua a diferentes temperaturas obteniéndose la gráfica de la Fig. 10.

Las condiciones experimentales han sido:

Capa adsorbente: gel de sílice; gas portador: nitrógeno; disolvente en el saturador: metanol (300 mm de altura); producto aplicado: 10 µg de nitrobenzeno (1 µl de su solución en éter de petróleo; concentración 10 mg/ml); temperatura de la cámara: 50°C; caudal del gas: 5 cm³/min; tiempo de revelado: 15 minutos.

En las restantes experiencias de este trabajo, excepto en los apartados 3.11.4 y 3.11.5, se utilizará como temperatura del saturador la ambiente (22-25°C) por su ligera influencia sobre la distancia de retención en este intervalo de temperatura. Puede ser interesante la utilización de un baño termostatado para conseguir distancias de retención más elevadas, sobre todo con disolventes menos volátiles, debiendo calentarse (o aislarse) también la conducción desde el saturador hasta la cámara para evitar condensaciones. Si la

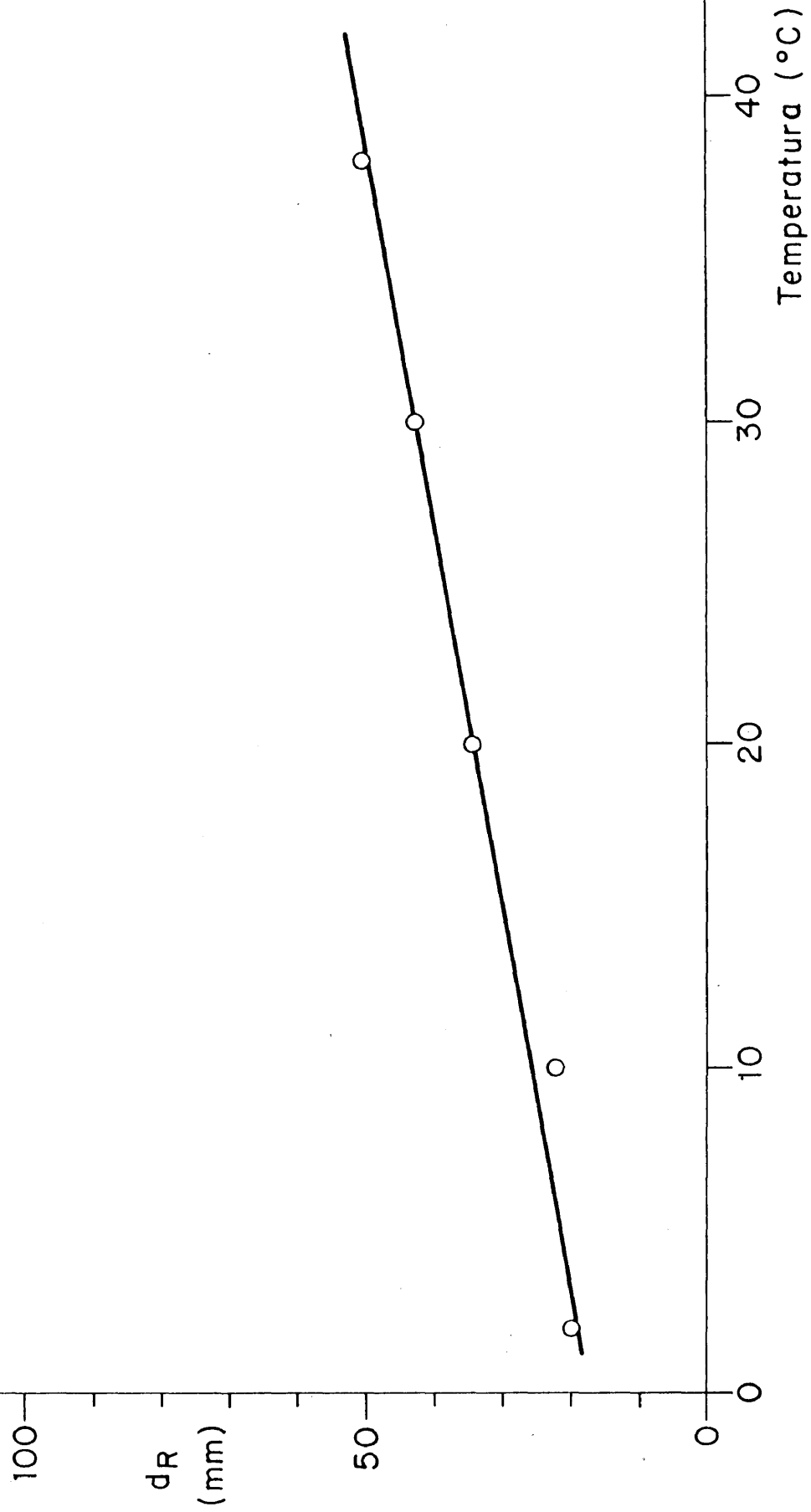


FIG. 10.— DISTANCIA DE RETENCION (d_R) EN FUNCION DE LA TEMPERATURA DEL SATURADOR (METANOL).

temperatura del saturador es igual que la de la cámara puede utilizarse el mismo termostato de ésta para calentar el baño del saturador.

3.3. Reproductibilidad del método

Para calcular la desviación típica de las medidas de distancia de retención obtenidas, se efectúan 8 cromatogramas en las mismas condiciones experimentales midiéndose la distancia recorrida por el producto aplicado y calculándose la desviación típica por la fórmula

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

siendo: = desviación típica
x = valor de cada medida
 \bar{x} = media aritmética de las 8 medidas
n = número de medidas

Las medidas de distancia de retención obtenidas han sido: 26, 30, 30, 33, 27, 29, 28, 29, obteniéndose un valor medio de

$$d_R = 29 \pm 2,6 \% \text{ (para 16).}$$

Las condiciones experimentales han sido idénticas a las del apartado 3.2. utilizando, como siempre, capas adsorbentes cortadas de la misma placa.

3.4. Variación de la distancia de retención en función de la altura del disolvente en el saturador

Mediante cromatogramas efectuados en idénticas condiciones experimentales, variando únicamente la altura del disolvente en el saturador, puede conocerse su influencia sobre la distancia de retención; los resultados se expresan en la gráfica de la Fig. 11.

Si se utiliza el valor máximo estudiado de 300 mm de altura del disolvente, queda en el saturador un espacio de 150 mm relleno de anillos Raschig sin disolvente que sirve para captar las gotitas que se produzcan durante el borboteo.

Las condiciones experimentales han sido: capa de adsorbente: gel de sílice; gas portador: nitrógeno; disolvente: metanol; producto aplicado: 30 µg de nitrobenzeno; temperatura de la cámara: 50°C; caudal de gas: 5 cm³/min; tiempo de revelado: 30 min.

3.5. Variación de la distancia de retención en función de la temperatura de la cámara cromatográfica

En la gráfica de la Fig. 12 se expresa la distancia de retención obtenida después del revelado en función de la temperatura de la cámara cromatográfica. La temperatura de trabajo no debe ser muy elevada ya que, por una parte, se eliminaría una de las principales ventajas de la C.C.F. que es el revelado a bajas temperaturas

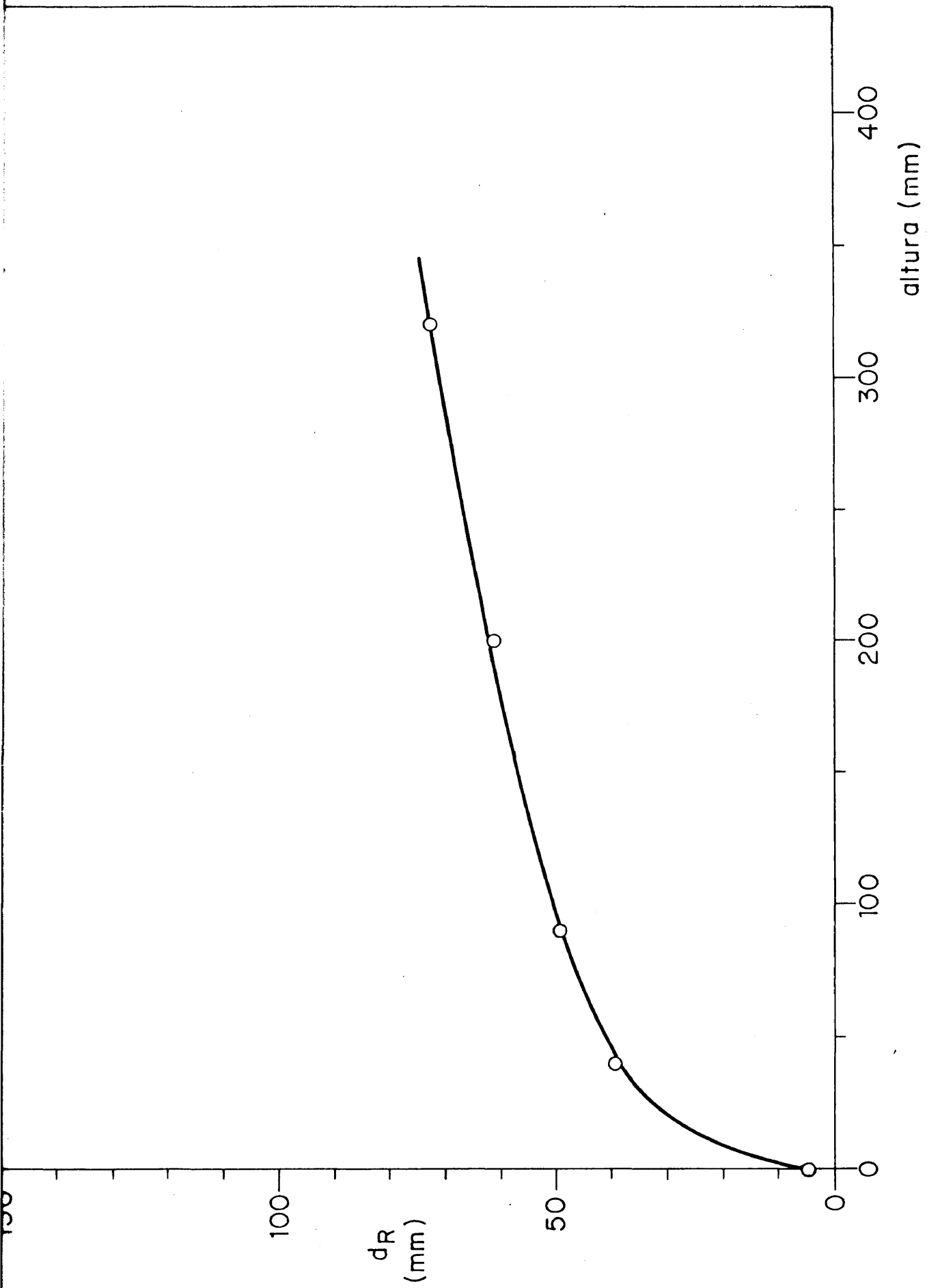


FIG.11.— DISTANCIA DE RETENCION (d_R) EN FUNCION DE LA ALTURA DEL DISOLVENTE EN EL SATURADOR (METANOL).

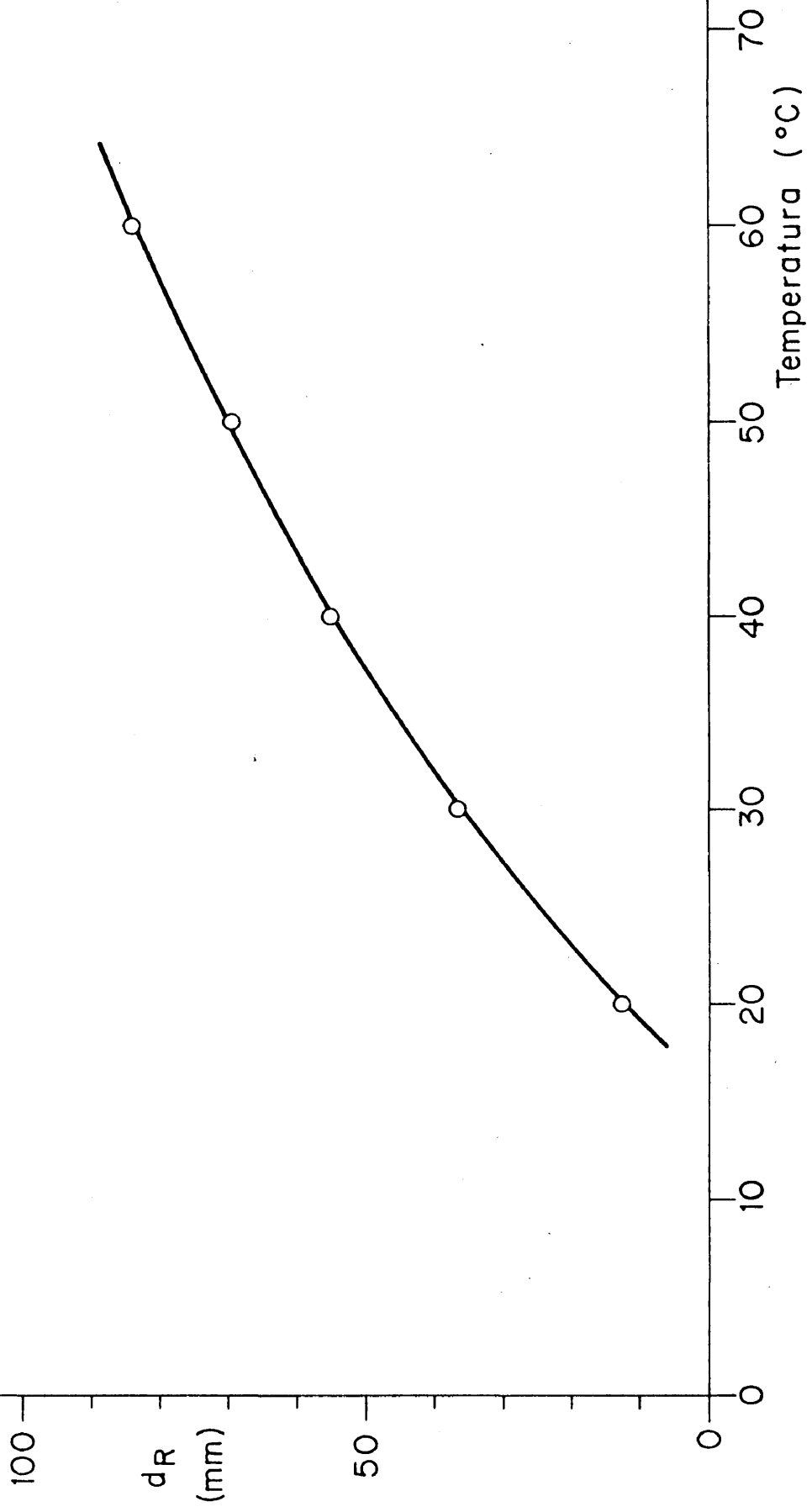


FIG.12.- DISTANCIA DE RETENCION (d_R) EN FUNCION DE LA TEMPERATURA DE LA CAMARA.

(lo que evita la pirolisis de los productos revelados) y, por otra parte, el montaje utilizado, en el que intervienen accesorios de plástico, no permite elevadas temperaturas (temperatura máxima de trabajo, 70°C).

Las condiciones experimentales son idénticas a las del apartado anterior 3.4., utilizando como altura del disolvente en el saturador la de 300 mm. La gráfica obtenida responde al hecho de que el aumento de la temperatura produce la disminución de la adsorción. El aumento de la temperatura de la cámara influye poco en el alargamiento de la longitud de las manchas.

3.6. Variación de la distancia de retención en función del tiempo de revelado

Utilizando las condiciones experimentales del apartado 3.4., variando el tiempo de revelado, puede conocerse la variación de la distancia de retención en función del tiempo en las condiciones estudiadas. La altura del disolvente en el saturador ha sido de 300 mm. Los resultados se expresan en la gráfica de la Fig. 13.

3.7. Variación de la distancia de retención y de la longitud de las manchas en función del caudal del gas portador

Mediante cromatogramas efectuados en las mis-

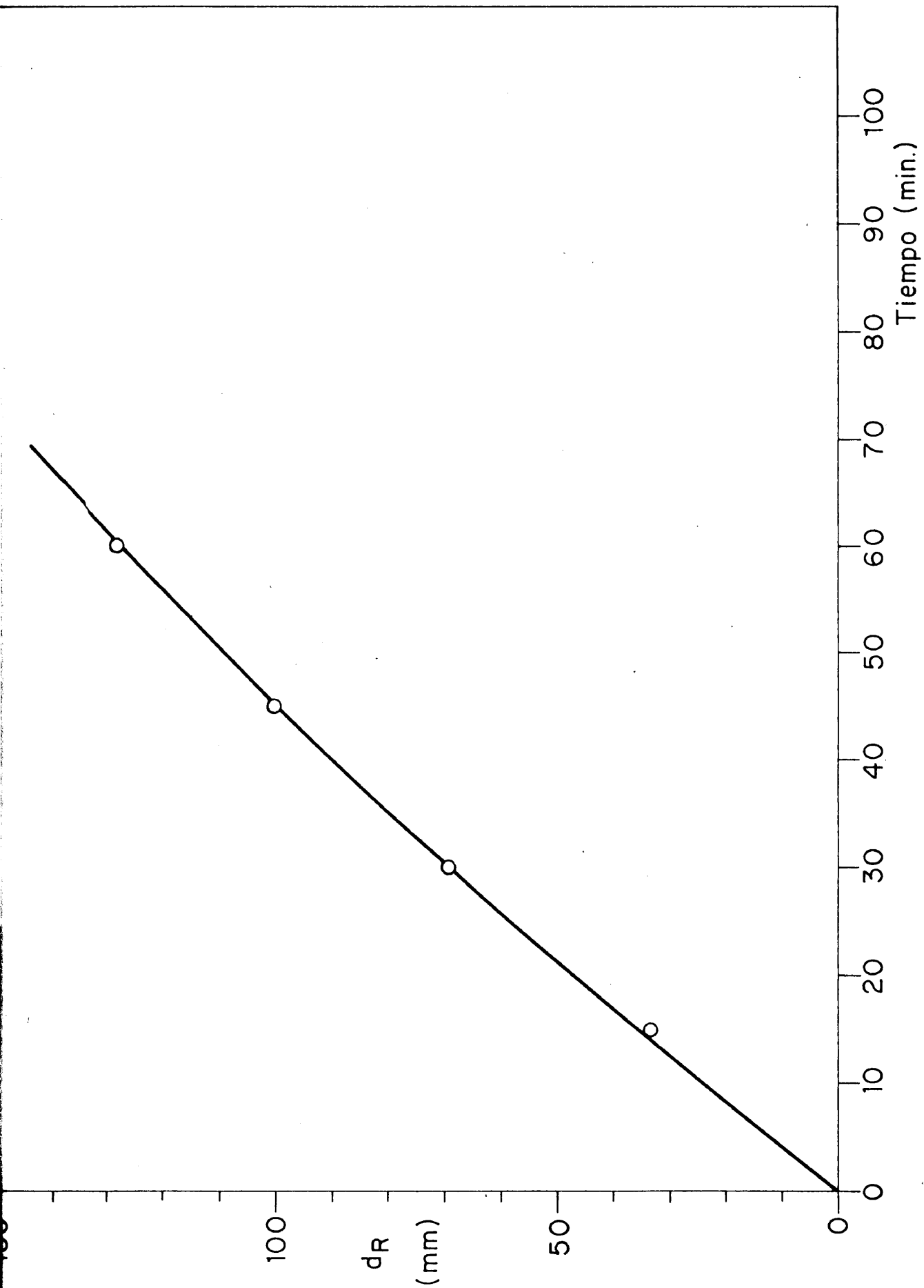


FIG.13.—DISTANCIA DE RETENCION (d_R) EN FUNCION DEL TIEMPO DE REVELADO.

mas condiciones, variando únicamente el caudal de gas portador, puede conocerse la influencia de la variación de este caudal sobre la distancia de retención y sobre la longitud de las manchas obtenidas. Los resultados se expresan en la gráfica de la Fig. 14. Se observa, que si se desea obtener cromatogramas selectivos, es necesario utilizar caudales de gas bajos, del orden de $5 \text{ cm}^3/\text{min}$ como máximo en las condiciones estudiadas ; con estos caudales de gas la velocidad del mismo en la cámara es del orden de la utilizada en la cromatografía en fase gaseosa (C.G.) (Gascó, 1970).

Las condiciones experimentales son iguales a las del apartado 3.2, aplicándose $30 \mu\text{g}$ de nitrobenzeno.

3.8. Influencia de la cantidad aplicada sobre la distancia de retención

Se estudia la influencia de la cantidad de producto aplicado en la capa sobre la distancia de retención, obteniéndose unos valores de 41, 39, 40 y 39 mm, para 10, 30, 60 y $100 \mu\text{g}$ de nitrobenzeno aplicados; si calculamos el valor medio y su desviación típica se obtiene:

$$d_R = 40 \pm 0,25 \quad (\text{para } 16)$$

por lo que se considera que, debido probablemente a

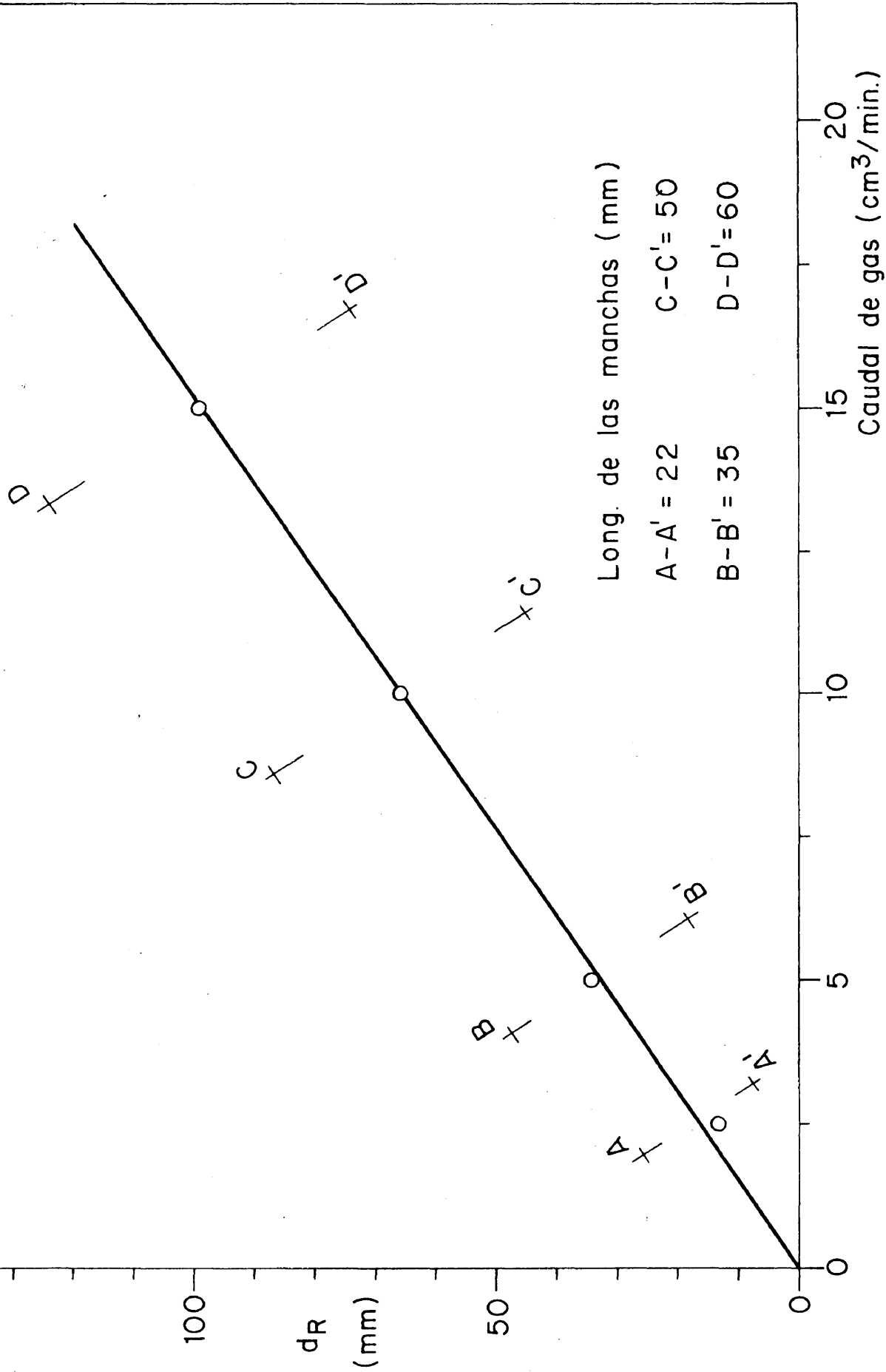


FIG.14. — DISTANCIA DE RETENCION (d_R) EN FUNCION DEL CAUDAL DEL GAS PORTADOR.

la escasa concentración de producto por unidad de superficie, la influencia de la cantidad aplicada en esos órdenes de magnitud es prácticamente despreciable.

Las condiciones experimentales utilizadas son las del apartado 3.2.

3.9. Influencia de las dimensiones de la cámara sobre la distancia de retención y el tamaño de las manchas

Se estudia la influencia de la variación de una de las dimensiones de la cámara, la distancia entre la capa adsorbente y la placa de aluminio que la cubre (A_c), sobre la distancia de retención y el tamaño de las manchas manteniendo las otras dimensiones iguales.

Se estudia bajo dos formas: manteniendo constante la velocidad del gas (7 cm/s, similar a la utilizada en C.G.) o el caudal del mismo (5 cm³/min) y variando A_c .

En el primer caso se observa (Fig. 15) el aumento lineal de la distancia de retención con el aumento de A_c (lo que favorecería la rapidez del revelado) pero en cambio, aumenta considerablemente la longitud de las manchas obtenidas, debido al aumento del recorrido libre de las moléculas de los productos a separar. Esto hace aconsejable la utilización de pequeñas dimensiones de A_c , aunque no excesivamente pequeñas

○ Velocidad del gas constante (7 cm /seg.)

● Caudal del gas constante (5 cm³/min.)

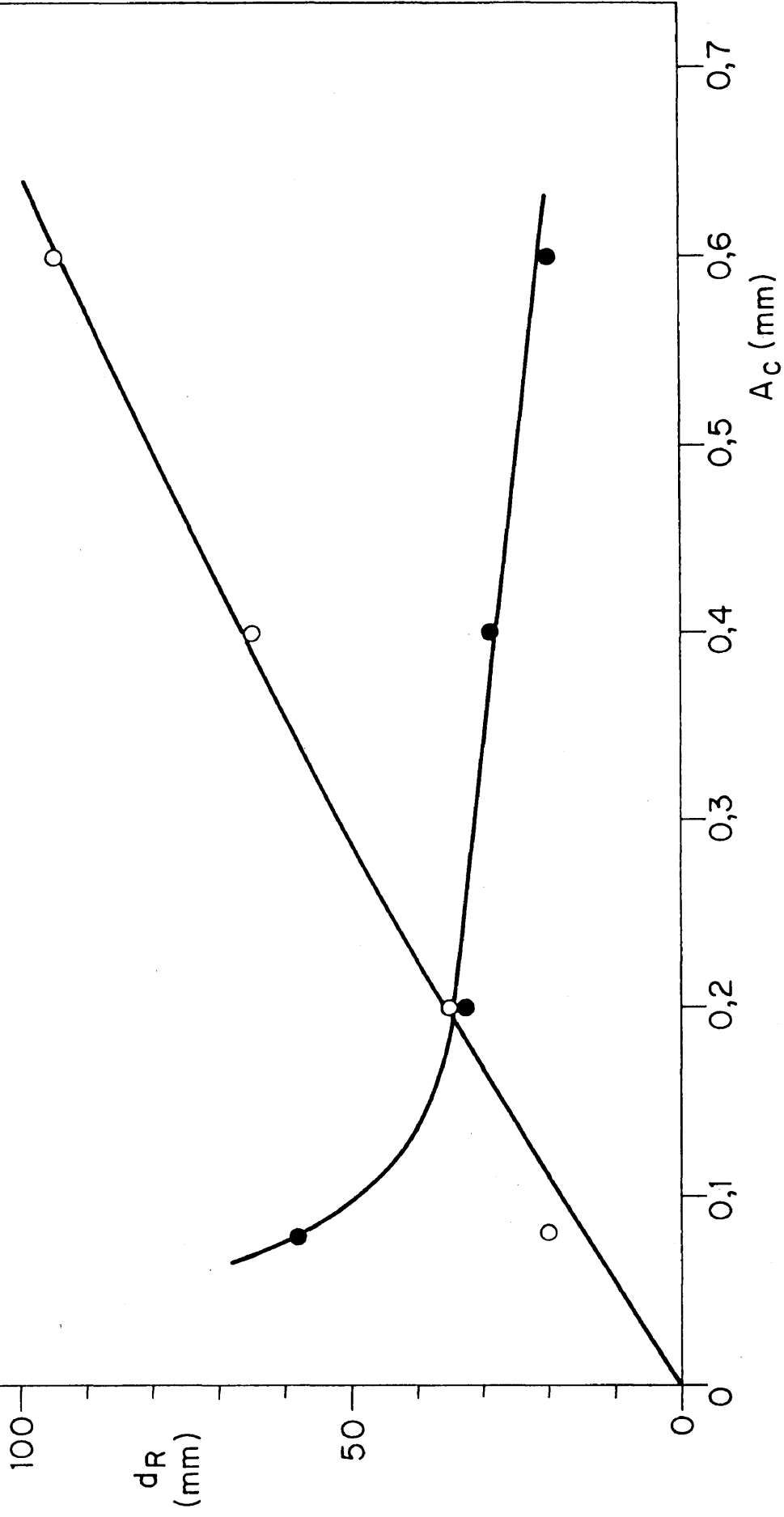


FIG. 15. — INFLUENCIA DE LAS DIMENSIONES DE LA ALTURA DE LA CAMARA (A_c) SOBRE LA DISTANCIA DE RETENCION (d_R).

para no alargar demasiado el tiempo de revelado necesario para obtener la misma distancia de retención, considerándose adecuado un valor de $\underline{A_c}$ de 0,1 a 0,2 mm.

En el segundo caso se mantiene constante el caudal del gas, observándose, que al variar $\underline{A_c}$ aumenta considerablemente la distancia de retención para un valor de 0,08 mm debido, probablemente, a fugas del gas a lo largo de la placa por exceso de presión, lo que hace que al principio de la placa sea el caudal más alto que al final (que es donde mide el caudalímetro) obteniéndose en la zona de revelado del producto un caudal superior al medido. Para dimensiones de $\underline{A_c}$ mayores, las diferencias entre las distancias de retención son menores, por compensarse, en parte, el aumento de $\underline{A_c}$ con la disminución de la velocidad. Esto hace aconsejable la utilización de cámaras con $\underline{A_c}$ no excesivamente pequeño, considerándose una dimensión adecuada la de 0,2 mm. La longitud de las manchas se mantiene constante con ligeras diferencias.

De los dos casos estudiados se deduce como valor más adecuado de $\underline{A_c}$ el de 0,2 mm, que es el que se ha utilizado a lo largo de todo el trabajo, adoptándose desde un principio por ser del mismo orden que los huecos existentes entre las partículas de los adsorbentes utilizados en C.G. sólido (Gascó, 1970).

Las condiciones experimentales utilizadas han sido las del apartado 3.2.

3.10. Variación de la distancia de retención en función del tiempo de presaturación de la capa con el gas portador

Se estudian las diferentes distancias de retención conseguidas, variando el tiempo de presaturación de la capa adsorbente con el gas portador (o mezcla de gas-vapor de disolvente) antes de la aplicación del producto.

En las restantes experiencias efectuadas este tiempo de presaturación era de cinco minutos estabilizándose, al mismo tiempo, la temperatura de la placa; en este caso se estudian diferentes tiempos: 5, 10, 20 y 40 minutos, observándose un ligero aumento de la distancia de retención: 51, 52, 55 y 55 mm respectivamente; la longitud de las manchas no varía apreciablemente. Las condiciones experimentales son idénticas a las del apartado 3.2, empleando como disolvente en el saturador etanol en vez de metanol.

3.11. Obtención de manchas de pequeño tamaño

Una vez estudiadas todas las variables que intervienen en el proceso cromatográfico es interesante el estudiar las condiciones más adecuadas para la producción

de manchas de pequeña longitud (mayor eficacia), haciendo intervenir a dos variables, de forma que la distancia de retención obtenida sea igual en cada medida, para fijar en lo posible las condiciones experimentales y evitar el que la difusión del producto sobre la capa sea diferente por ser diferente la distancia de retención. Las condiciones experimentales de este apartado 3.11, son iguales a los del apartado 3.2, variando en cada caso los factores oportunos.

Se efectúan las experiencias siguientes:

- 3.11.1. Difusión del producto aplicado sobre la capa sin el paso de gas portador: En los diferentes tiempos: 0, 7,5, 15, 30 y 60 minutos, la aplicación de 1 μ l de la solución preparada de nitrobenzeno, ocupa sobre la capa: 4, 16, 28, 35 y 42 mm^2 de superficie respectivamente, por lo que interesa efectuar los revelados en el menor tiempo posible.
- 3.11.2. Variación del caudal de gas portador y del tiempo de revelado: Los datos adecuados utilizados como variables se obtienen de las gráficas correspondientes. Utilizando caudales de gas de: 10, 5, 2,5, 1,25 cm^3/min y tiempos de: 7,5, 16, 34 y 73 min, se obtiene una distancia de retención media de 38 mm. Se observa que la longitud

de la mancha es menor para caudales de gas pequeños y tiempos grandes (a pesar de que el tiempo influye de forma adversa), considerándose en este caso como caudal más interesante, el de $2,5 \text{ cm}^3/\text{min}$.

Se efectúa la misma experiencia con caudales de gas de 5 y $2,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ y tiempos de revelado de 15 y 30 min, utilizando como disolvente en el saturador etanol. Se obtiene, en el segundo caso, una distancia de retención de 47 mm y una reducción del 10 % en la longitud de las manchas. En estas condiciones ($2,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ y 30 min) es en las que se han obtenido manchas de menor longitud, siendo esta de 22 mm.

Revelando con benceno los $10 \mu\text{g}$ de nitrobenzeno en C.C.F. normal sobre gel de sílice (recorriendo la mancha sobre la capa la misma distancia) se obtiene una longitud de la mancha de 9 mm. Se observa que en el sistema cromatográfico estudiado, y en estas condiciones, las manchas son netamente más largas, siendo del orden de 2,5 veces mayores.

3.11.3. Variación de la temperatura de la cámara cromatográfica y del tiempo de revelado: Las temperaturas utilizadas han sido: 22, 29, 49 y 62°C y los

tiempos correspondientes: 73, 34, 16 y 11 min (se utilizan los tiempos anteriores); se obtiene una distancia de retención media de 40 mm, obteniéndose manchas más cortas a temperaturas altas y tiempos pequeños, considerándose, en este caso, una temperatura adecuada la de 50°C, utilizada ya en otras experiencias.

Si la temperatura es demasiado alta, puede producirse la evaporación de una parte considerable del producto al sacar la placa caliente de la prensa, por lo que se tendrá en cuenta la temperatura más adecuada de revelado dentro de los puntos de ebullición de los productos estudiados. Los datos necesarios utilizados como variables se han obtenido de las gráficas correspondientes.

- 3.11.4. Variación de la temperatura del saturador y del tiempo de revelado: Se varía la temperatura del saturador de 20 a 50°C y el tiempo de 15 a 10 min de acuerdo con las gráficas correspondientes. No se observa una disminución apreciable en la longitud de las manchas, obteniéndose la ventaja de acortar el tiempo de revelado. Se apreciará más el efecto de calentar el saturador en disolventes menos volátiles.

3.11.5. Variación del disolvente y del tiempo de revelado: Para obtener la misma distancia de retención, ha sido necesario utilizar prácticamente el mismo tiempo de revelado en el caso de vapores de metanol (15 min) que en el de vapores de etanol (13 min), lo que no concuerda con la Tabla I, siendo debido, probablemente, a haber efectuado esta experiencia con el saturador a 50°C y notarse menos en el etanol el efecto de calentar el saturador, siendo este detalle poco importante para el estudio perseguido; de todas formas, no se observa el acortamiento de las manchas con el cambio de disolvente. En realidad se deberá utilizar diferentes disolventes de acuerdo con los productos a separar.

3.12. Separación de diversos productos

Después de considerar los resultados anteriores, se estudia la separación de diversos productos entre sí.

3.12.1. Revelado a temperatura ambiente: En una placa de gel de sílice como las utilizadas anteriormente, se aplica una disolución en éter de petróleo de la mezcla: 100 ug de tolueno (p.e. 110,6°C), 10 µg de benzaldehído (p.e. 179,5°C) y 5 µg de anilina (p.e. 184,4°C), revelando durante 15 min a la tem

peratura ambiente (21°C) con una mezcla de nitrógeno-etanol como gas portador con un caudal de $5\text{ cm}^3/\text{min}$; altura del etanol en el saturador, 300 mm.

Se separan los tres productos, obteniéndose unas distancias de retención de 74,25 y 2 mm para el tolueno, benzaldehído y anilina respectivamente, la mancha de tolueno desaparece a los pocos minutos. La visualización se efectúa con luz U.V. de 254 nm. Para la identificación de los diferentes productos, se revelan previamente diversas placas con los productos aislados para conocer en cada caso su distancia de retención.

Para comparar los productos obtenidos, se efectúa, en C.C.F. normal, el revelado con diclorometano (disolvente muy volátil p.e. 40°C) de los mismos productos y cantidades anteriores en placas de gel de sílice. Los Rfs obtenidos han sido: 0,55, 0,36 y 0,18, para el tolueno, benzaldehído y anilina respectivamente, visualizándose la mancha de tolueno con gran dificultad. Tiempo de revelado, 30 minutos. En otros disolventes menos volátiles no se visualiza el tolueno.

3.12.2. Revelado a temperatura superior a la ambiente: Se efectúa el revelado a una temperatura de la cámara

cromatográfica de 50°C. Sobre una placa de gel de sílice se aplica una disolución en éter de petróleo de 20 µg de anilina (p.e. 184,4°C), 5 µg de nitrobenceno (p.e. 210,9°C), 200 µg de n-propilbenceno (p.e. 159,2°C) y 200 µg de bromobenceno (p.e. 155°C). Se revelan con una mezcla de nitrógeno-etanol; caudal del gas portador 5 cm³/min; tiempo de revelado 10 min; altura del etanol en el saturador 300 mm.

Las distancias de retención obtenidas han sido de 6, 34, 92 y 110 mm, para la anilina, nitrobenceno, n-propilbenceno y bromobenceno respectivamente.

Se efectúa una C.C.F. normal en capa de gel de sílice, revelando durante 60 min con tetracloruro de carbono (disolvente volátil); se obtienen unos valores del Rf de 0,02, 0,13, 0,42 y 0,42, para la anilina, nitrobenceno, n-propilbenceno y bromobenceno respectivamente, no separándose, por tanto, los dos últimos productos entre sí. Se efectúa asimismo una C.C.F. normal sobre placas de alúmina (para evitar que la acidez de la gel de sílice influya en los Rfs de los productos aplicados) revelando con éter de petróleo. Se obtienen unos valores del Rf de 0,02, 0,17, 0,67 y 0,63 para la anilina, nitrobenceno, n-propilbenceno y bromobenceno respectivamente.

Se observa que en ninguno de los dos procedimientos cromatográficos, hay correspondencia entre los puntos de ebullición y las distancias recorridas sobre la placa y en el segundo caso (50°C) no se conserva ni el orden entre estas dos variables.

4. DISCUSION

A lo largo del trabajo se han expuesto los resultados obtenidos al hacer intervenir a las diversas variables que entran en juego en el sistema cromatográfico es tudiado, efectuando también separaciones de diversos pro ductos. Las gráficas obtenidas son lógicas y permitirán en nuevos casos prácticos el determinar las condiciones más adecuadas de revelado.

En la Tabla IV (apartado 3.1) y en el apartado 3.12 se observa que las distancias de retención obtenidas no están relacionadas con los puntos de ebullición de los productos aplicados, lo que excluye que el sistema estudiado se base en una simple destilación; observando, ade más, la diferencia de comportamiento durante el revelado de las placas de gel de sílice, alúmina y celulosa, puede hablarse de la existencia de una separación cromatográfica por adsorción, no siendo la placa un mero soporte.

No se han encontrado relaciones lógicas entre la constante dieléctrica de los disolventes en forma de vapor, de los mismos en forma líquida y del punto de ebullición de los mismos, respecto a las distancias de retención obtenidas. (La fase móvil es, en este caso, una mezcla de constante dieléctrica no estudiada).

El diferente comportamiento cromatográfico con diferentes gases y vapores de distintas características,

puede explicarse por la adsorción de estos por el adsorbente, lo que modifica su capacidad de adsorción o provoca un desplazamiento, entrando en competencia esta capa adaptada y el gas portador con o sin vapor de disolvente, para la separación de los productos.

Este sistema cromatográfico permite la separación de productos más volátiles que la C.C.F. clásica (p.e. 100 a 250°C aproximadamente) debido a no tener que evaporar el disolvente revelador, obteniéndose revelados más rápidos por la mejor difusión de los productos entre las fases sólida y gaseosa y efectuándose separaciones diferentes al poner en juego otros factores. Por otra parte la eficacia es menor, al menos en los casos estudiados, y su técnica es más compleja.

CAPITULO V

DETECCION DE PRODUCTOS RADIATIVOS DURANTE SU REVELADO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

1. INTRODUCCION

El revelado por cromatografía en capa fina en flujo continuo - con evaporación del disolvente en la parte superior de la placa (Bobbitt, 1963) - presenta las ventajas de un aumento en el número de platos teóricos de la capa (Snyder, 1967a) y de la continuidad de la experiencia durante un tiempo indefinido. Esto permite la separación de productos de polaridad similar con disolventes poco polares (lo que favorece la separación al destacar sus diferencias); no obstante, si junto con ellos hay productos de diferente polaridad, estos permanecerán unidos en el frente o en el origen después de revelar y secar la placa.

Si en una cámara cromatográfica preparada para el revelado en flujo continuo, se sitúa un detector adecuado para productos radiactivos por encima del punto de aplicación de la placa, al revelarse los diferentes productos serán detectados y registrados dinámicamente por separado, aunque posteriormente se unan en el frente del disolvente.

Este procedimiento de medida puede utilizarse también con productos radiactivos que no necesitan para su separación que el revelado sea en flujo continuo, siendo así

innecesario desplazar la placa debajo del detector, según es práctica común.

El procedimiento ha sido utilizado para la detección de productos mediante la medida de la conductividad eléctrica (Mori, 1965) (Cremer, 1969).

2. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1. Soluciones radiactivas utilizadas

Solución a: Solución acuosa de acetato sódico $^{14}\text{C}-1^*$; actividad específica 13'2 mCi/mM; concentración radiactiva 15 $\mu\text{Ci/ml}$.

Solución b: Solución acuosa de acetato sódico $^{14}\text{C}-1$; actividad específica 13'2 mCi/mM; concentración radiactiva 0'48 mCi/ml.

Se ha utilizado un producto marcado con carbono-14 por ser el radisótopo más utilizado en investigación biológica y bioquímica y emisor de partículas beta de baja energía (0'158 MeV), lo que hace más interesante el estudio de la absorción de estas partículas por el aire, capas adsorbentes y disolventes. Si el isótopo utilizado fuera emisor de partículas beta de mayor energía (o de radiación gamma) la absorción sería menor y menores las dificultades de su detección.

* Preparado por la Dra. C. Suárez

2.2. Equipo de medida

Consta de un tubo Geiger-Muller (Philips Mod. 18505) acoplado al preamplificador, integrador y registro de un radiocromatógrafo (Nuclear Chicago; Mod. Actigraph III). El tubo se recubre con una lámina de plástico (Terphane; densidad superficial, 1.8 mg/cm^2) para evitar el contacto de su ventana con los vapores de los disolventes empleados; el detector está, además, protegido con una funda metálica.

2.3. Cámara de revelado

Se utiliza una cámara de acero inoxidable como la representada en la Fig. 16. En la tapa de la parte superior tiene una rendija para que sobresalga la placa y pueda producirse la evaporación del frente del disolvente, si es necesario; en la parte lateral, provista de una rendija de $24 \times 3 \text{ mm}$, se aloja el tubo G-M. La sección de la cámara es rectangular y de unas dimensiones de $60 \times 20 \text{ mm}$. La distancia entre la capa cromatográfica y la ventana del tubo G-M es de 4 mm y la distancia entre el fondo de la cámara y la rendija del detector es de 10 cm .

2.4. Capas finas

Las capas finas utilizadas son capas prefabricadas con soporte de vidrio y de diferentes adsorben

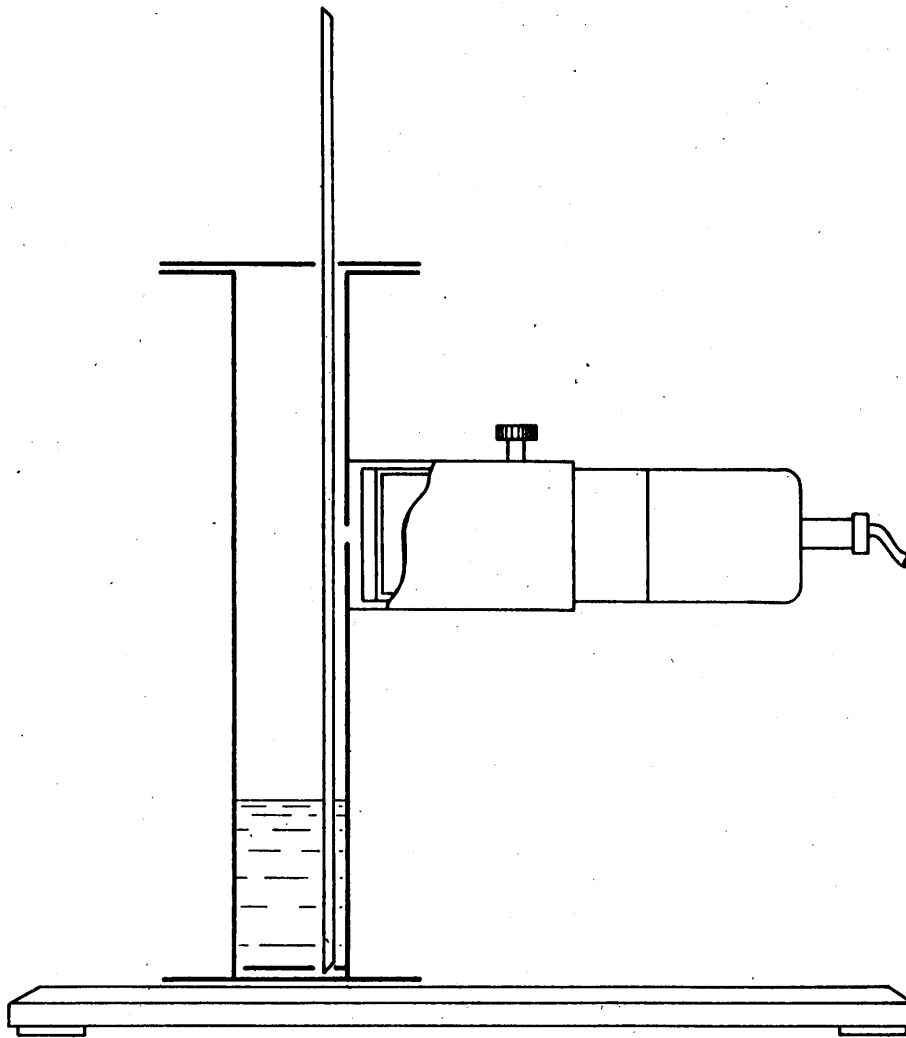


FIG. 16.— CAMARA CROMATOGRAFICA PROVISTA DE TUBO G-M.

tes: gel de sílice, alúmina, kieselgur y celulosa (Merck; ref. 5715, 5713, 5738 y 5718 respectivamente).

2.5. Estudio de los diferentes parámetros que intervienen en la construcción de la cámara de revelado

2.5.1. Distancia entre la capa fina y el tubo G-M.

Para estudiar la variación de la actividad medida en función de la distancia entre el producto activo y el tubo G-M, se aplican 5 μ l de la solución a de acetato sódico sobre una lámina de vidrio, ocupando un círculo de 7 mm de diámetro; se seca. Se efectúa la medida de la actividad colocando la lámina a diferentes distancias de la parte frontal de la cubierta metálica del tubo G-M colocado sobre un soporte. Los datos obtenidos se indican en la Tabla V.I.

TABLA V.I.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD EN FUNCION DE LA DISTANCIA

<u>Distancia, mm</u>	<u>Actividad, cpm</u>
1	6350
2	5900
3	5210
4	4380
6	3310
8	2410
10	1850

La distancia utilizada en la cámara de revelado entre el tubo y la capa fina será de 4 mm, por ser adecuada para su construcción y no reducir la medida de la actividad de forma considerable respecto a la distancia de 1 mm (31 %). Esta distancia se utilizará en medidas posteriores.

2.5.2. Diámetro de la fuente activa.

Para conocer, en estos estudios previos, la influencia del diámetro de las fuentes preparadas sobre la medida de la actividad, se aplican sobre capas de celulosa 5 μ l de la solución a en círculos de 5, 9 y 12 mm de diámetro; se secan. Las actividades medidas han sido 3210, 3090 y 2970 cpm respectivamente, por lo que es adecuado el diámetro utilizado de 7 mm dada la abertura del tubo G-M de 22 mm. Este diámetro se utilizará en medidas posteriores.

La disminución de la medida de la actividad en los círculos grandes es debida a que el producto se acumula en el exterior del círculo, no presentando una buena geometría para la medida. Si las aplicaciones se efectúan sobre una lámina de vidrio y con 5, 9 y 14 mm de diámetro, se obtiene una medida de la actividad de 4330, 4600 y 4450 cpm respectivamente, existiendo un máximo para diáme-

tros intermedios por intervenir la geometría de la medida y la absorción de las partículas beta por el propio producto activo.

2.5.3. Lámina de plástico protectora.

Para conocer la influencia de la lámina de plástico protectora del tubo G-M sobre la medida de la actividad, se aplican 5 μ l de solución a sobre una lámina de vidrio y se mide su actividad con y sin la adición de otra lámina de plástico. Las medidas de la actividad obtenidas han sido de 4400 y 3710 cpm respectivamente, por lo que la adición de esta lámina supone una absorción de partículas beta del 16 %, que se considera aceptable.

2.5.4. Absorción de las partículas beta por adsorbentes y disolventes.

Para estudiar la absorción de las partículas beta por los adsorbentes y disolventes utilizados en el revelado, se aplican 5 μ l de la solución a sobre láminas de vidrio, láminas prefabricadas cubiertas con diferentes adsorbentes y estas últimas impregnadas con un disolvente. Se obtienen las medidas de actividad indicadas en la Tabla V.II.

TABLA V.II

VARIACION DE LA MEDIDA DE ACTIVIDAD POR ADSORBENTES
Y DISOLVENTES

Capas	Actividad, cpm				Espesor capa, mm
	Sin disol vente	agua	n-buta nol	heptano	
sin capa	4500	-	-	-	-
sílice	1900	660	960	1350	0'30
alúmina	1010	430	540	560	0'35
kieselgur	1450	540	450	710	0'25
celulosa	3200	1500	2550	2680	0'10

Los disolventes utilizados se pulverizan sobre las capas hasta su impregnación máxima; se han elegido de forma que, sin ser volátiles, tengan diferente densidad para estudiar su influencia; la constante dieléctrica puede influir en el sentido de una mayor o menor fijación del disolvente sobre el adsorbente. Las constantes físicas de los disolventes se indican en la Tabla V.III.

Es difícil fijar las condiciones de impregnación del disolvente en la capa en estas condiciones por lo que los datos son sólo de orientación, observándose, no obstante, la gran influencia de adsorbentes y disolventes en la medida de la actividad.

2.5.5. Rendija del detector.

Para observar la influencia de la anchura de la rendija existente entre la capa y el detector, se aplican 5 μ l de la solución a sobre una lámina de vidrio y se mide su actividad interponiendo diferentes rendijas.

TABLA V.III
CONSTANTES FÍSICAS DE LOS DISOLVENTES

<u>Disolvente</u>	<u>P. de e.</u> <u>°C</u>	<u>Densidad</u> <u>g/cm³</u>	<u>Constante die</u> <u>léctrica</u>
Agua	100	1'000	80'37
n-Butanol	117'7	0'810	17'8
Heptano	98'4	0'684	1'924

Las medidas obtenidas se indican en la Tabla V.IV. Existe un compromiso entre la actividad a medir y la resolución necesaria de esta medida, para una buena separación de los picos de los diferentes productos activos separados en un revelado cromatográfico. En este caso se ha considerado adecuada una anchura de rendija de 3 mm.

TABLA V.IV

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD EN FUNCION DE LA ANCHURA
DE LA RENDIJA

<u>Anchura de rendija</u> <u>mm</u>	<u>Actividad</u> <u>cpm</u>
1	590
2	1040
3	1590
4	2050
5	2480

2.6. Revelado experimental

Como ejemplo del procedimiento de detección estudiado, se efectúa el estudio de la pureza radioquímica de una muestra de acetato sódico ^{14}C -1 desecado, inicialmente puro, que ha permanecido almacenado durante dos años a -25°C .

Se efectúa la cromatografía en la cámara de la Fig. 16, provista de papel saturador, y con capas analíticas prefabricadas de gel de sílice de 200 x 30 mm; se aplican en línea, y a 8 cm de la base de la capa, 5 μl de la solución acuosa del acetato sódico ^{14}C -1 (solución b, 15 μg en total) y se revelan con una mezcla de etanol-agua-amoniaco (146:14:32) (Baret, 1951); se obtiene la grá

fica de la Fig. 17, en la que se observa una impureza del 5 % que aparece a los 60 minutos del comienzo de la experiencia; el tiempo de revelado del acetato sódico es de 22 minutos. En el revelado normal con la mezcla indicada, el Rf del acetato sódico es de 0,60 y el de la impureza 0,29, necesitándose 125 minutos para un revelado de 110 mm desde el punto de aplicación y 40 minutos más para su detección con aparatos convencionales. La cantidad mínima de actividad a detectar en las condiciones de trabajo, es del orden de 0,05 μ Ci.

La identificación de los productos revelados se efectúa mediante cromatogramas realizados en las mismas condiciones con productos de control, comparando el tiempo de revelado; si el producto de control es inactivo se revela el mismo tiempo que el producto buscado y se visualiza; su situación deberá coincidir con el centro de la rendija del detector. Variando la situación de la zona de aplicación se conseguirán diferentes separaciones, según las características de los productos aplicados.

2.7. Desviación típica de la medida de la actividad

Para calcular la desviación típica del procedimiento de aplicación de la muestra, revelado y medida de la actividad utilizados, se efectúan diversos revelados con

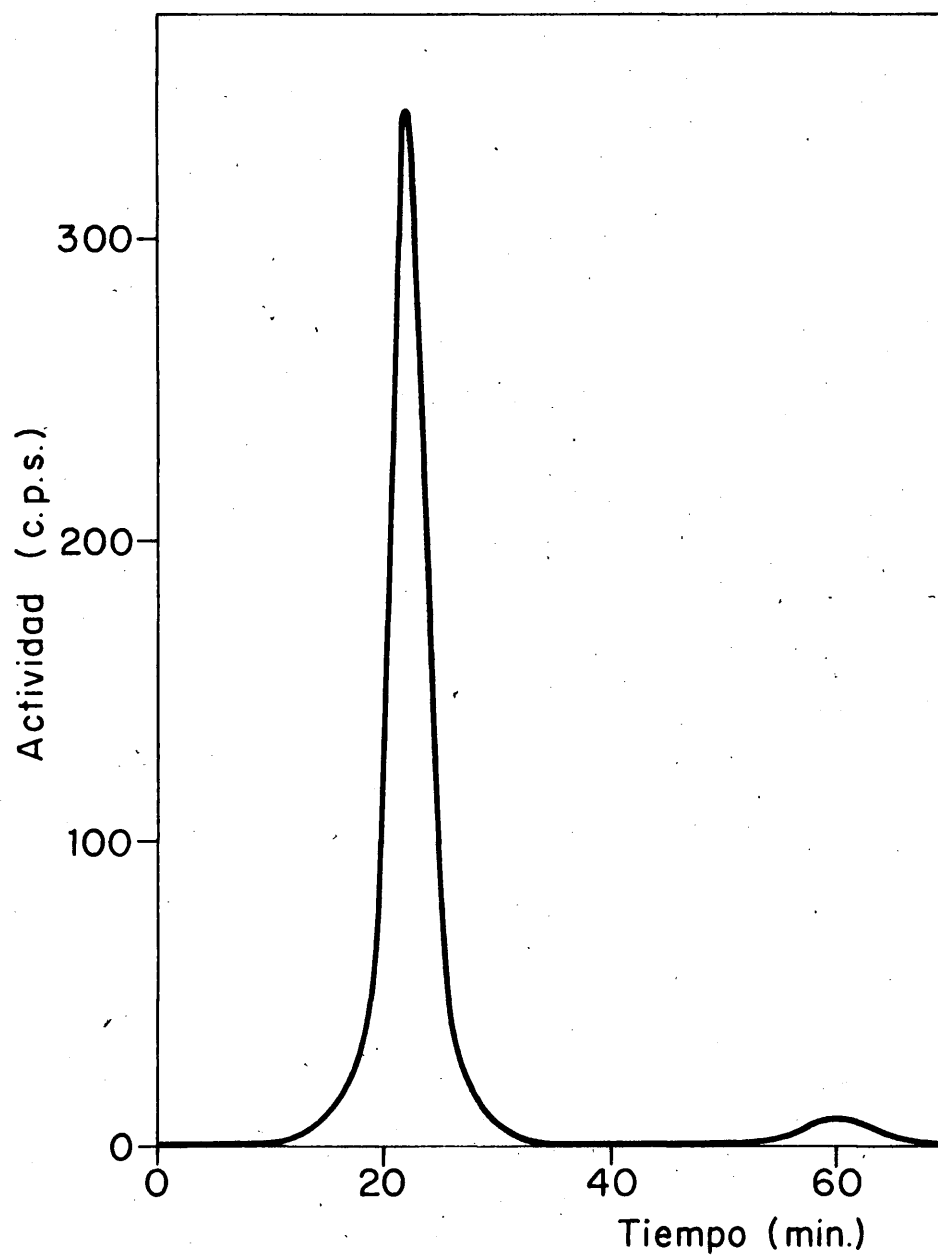


FIG.17.— PUREZA RADIOQUIMICA DEL ACETATO SODICO ^{14}C -1.

la solución b en las mismas condiciones del apartado anterior; se calcan sobre un papel los diversos picos obtenidos del acetato sódico puro y se pesan.

Mediante la fórmula siguiente se obtiene la desviación típica de la medida de actividad en la que están incluidos los errores de la aplicación y revelado:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (v - \bar{v})^2}{N-1}}$$

siendo

s = desviación típica

v = valor medido

\bar{v} = media aritmética de los valores medidos

N = número de medidas.

Los pesos obtenidos de los 10 revelados efectuados han sido 85, 78, 81, 91, 84, 84, 75, 82, 78 y 74 mg y la desviación típica obtenida:

s = \pm 5'6 como valor absoluto y \pm 6'8 % como valor relativo.

Se efectúan 10 medidas de actividad consecutivas en el radiocromatógrafo (con movimiento de la placa), de una de las placas revelada y seca, obteniéndose una desviación típica de

s = \pm 2'6 como valor absoluto y \pm 5'5 % como valor relativo,

pudiendo observarse la diferencia entre los valores obtenidos anteriormente que corresponde al proceso cromatográfico de revelado.

3. DISCUSION

Se han tenido en cuenta los diversos factores experimentales para la construcción de la cámara cromatográfica y el estudio de la pureza radioquímica del acetato sódico marcado.

Se ha considerado la anchura de la rendija (3 mm), existente entre la cámara y el detector, para que sea la adecuada dentro del orden de las actividades específicas más utilizadas en los compuestos marcados. Si fuera más estrecha, sería necesario utilizar actividades totales más grandes - y por lo tanto mayor cantidad de producto - con las consiguientes perturbaciones cromatográficas, y si fuera más ancha, la resolución en el registro gráfico de los diferentes productos separados sería pequeña.

La distancia existente entre la capa adsorbente y la ventana del detector (4 mm), es adecuada por estar comprendida dentro del alcance de las partículas beta emitidas por el ^{14}C y el ^{35}S - que son los isótopos más utilizados en la preparación de moléculas marcadas (el ^3H no puede medirse con este detector) - pudiendo, no obstante, medirse otros productos marcados con isótopos radiactivos diferentes, aunque las condiciones experimentales no sean

las más adecuadas.

La distancia existente entre el punto de aplicación del producto sobre la capa y la rendija del detector (20 mm) se ha estudiado para que, en este caso, la separación entre los diversos productos y el tiempo de revelado sean adecuados, pudiendo utilizarse otras distancias si el caso lo requiere, por tratarse de mezclas más complejas o cuando el flujo de fase móvil a través de la capa sea diferente.

CAPITULO VI

OBTENCION DE PRODUCTOS REVELADOS EN FORMA DE MANCHAS DE POCA SUPERFICIE Y LONGITUD EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

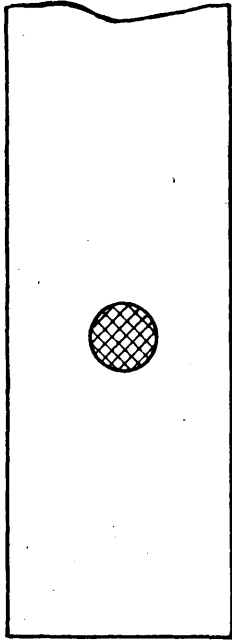
1. INTRODUCCION

En la técnica de separación de productos por cromatografía en capa fina (C.C.F.), es muy interesante estudiar las condiciones más adecuadas de aplicación y revelado para la obtención de productos revelados en forma de manchas de poca superficie y longitud (W_d) (c.f. 7, cap. I), consiguiéndose con ello la separación de los productos con mayor concentración por unidad de superficie (con el consiguiente aumento del umbral inferior de detección), mayor eficacia (pequeña W_d) y una mejor separación entre los productos revelados (mayor resolución).

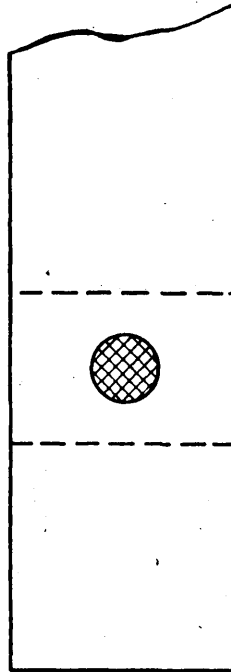
Las técnicas utilizadas de aplicación y revelado, unas originales y otras tomadas de la bibliografía, han sido:

a) Aplicación normal de la solución sin secar con aire durante la aplicación (Fig. 18a).

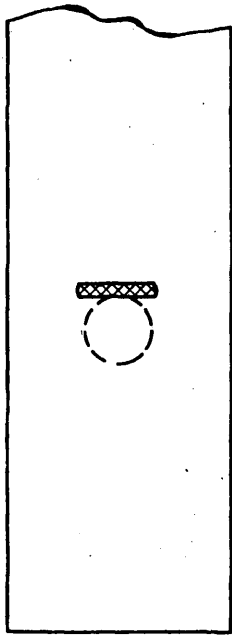
b) Desactivación de la capa en la zona de aplicación (Fig. 18b); se efectúa mediante la formación en la zona de aplicación de una banda horizontal con gotas de disolventes tales como, agua, metanol o benceno que se evaporan con una corriente de aire frío; posteriormente se aplica



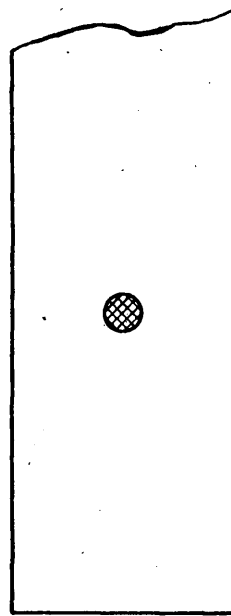
a



b



c



d

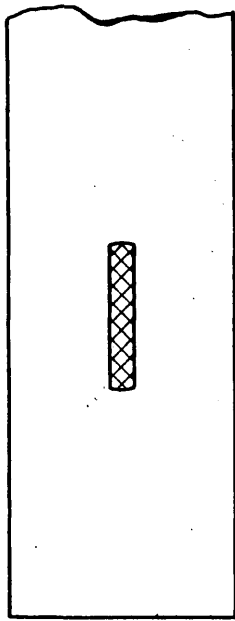
FIG. 18.— METODOS a, b, c y d.

la solución. De esta forma se favorece el que al pasar el disolvente revelador por el producto aplicado, produzca una reducción inicial en la longitud de la aplicación.

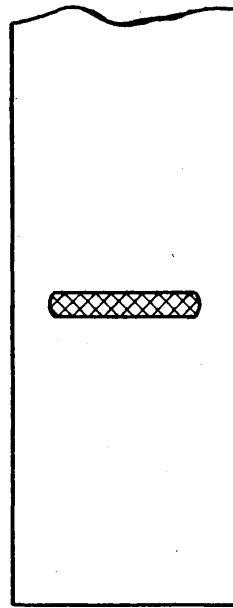
c) Concentración del producto en la parte superior de la aplicación en forma de línea horizontal (Fig. 18c); es una variación del método de Truter (1964). La capa es revelada en flujo continuo con metanol en una cámara de poca altura (40 mm) cuya tapa está provista de una rendija; la aplicación en este caso debe de quedar justamente debajo de la rendija; mediante una corriente de aire frío o templado se evapora el metanol que sobresale haciendo que la mancha circular quede convertida en una línea horizontal de 1 a 2 mm de (Wd). Esta operación dura de 5 a 10 min. Posteriormente se revela de forma normal.

d) Como dato de comparación, y por ser un método clásico de producción de manchas de poca superficie, se aplica la solución en la capa secando al mismo tiempo con aire, consiguiéndose con ello una aplicación de poco diámetro (Fig. 18d). Fairbairn (1968) ha estudiado las condiciones más adecuadas para la aplicación cuantitativa de productos.

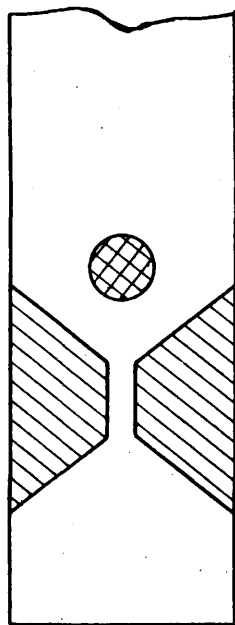
e) Para producir manchas de poca anchura y superficie, se aplica la solución en una línea vertical de 20 mm de longitud y 3 mm de anchura (Fig. 19e).



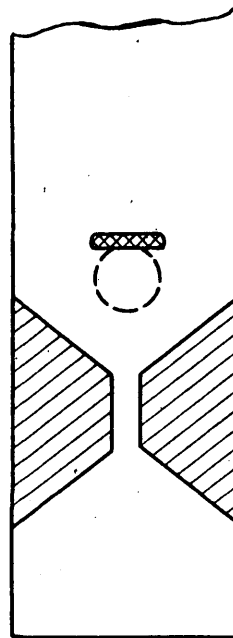
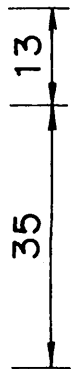
e



f



g



h

FIG. 19. — METODOS e, f, g y h.

f) Aplicación de la solución en forma de línea horizontal de poca W_d (20 x 3 mm) (Wagner, 1961) (Fig. 19f). Este método es muy adecuado para la exploración posterior de la capa por aparatos que disponen de una rendija en el detector.

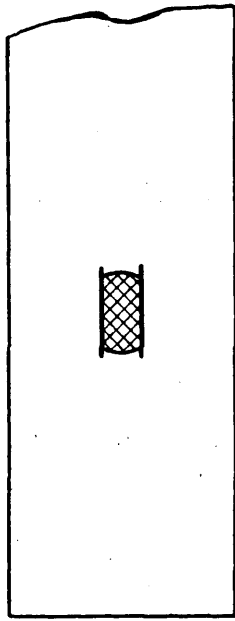
g) Es una variación del método de Matthias (1954); en este caso (Fig. 19g) la solución se aplica a 13 mm de la parte superior del estrechamiento (de 3 x 10 mm) en vez de en el centro, para evitar que las manchas tomen una forma curva, que si no es un inconveniente para los productos normales visualizados directamente, sí lo es para la detección cuantitativa de productos radiactivos, fluorescentes, etc., por explorar el detector el cromatograma a través de una rendija.

h) Igual que el método anterior pero concentrando el producto aplicado mediante el método c (Fig. 19h).

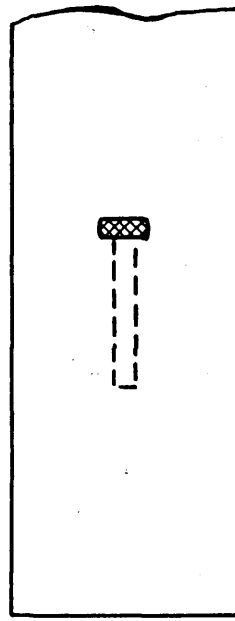
i) Para evitar durante la aplicación el ensanchamiento de los productos aplicados, y conseguir manchas de pequeña superficie, se practican en el adsorbente dos cortes verticales de 12 mm de longitud a ambos lados de la aplicación y a una distancia entre ellos de 5 mm (Fig. 20i).

j) Para producir una aplicación de la menor superficie posible, se aplica en línea vertical como en e y se concentra en la parte superior según el método c (Figura 20j).

k) Para evitar el ensanchamiento de las manchas



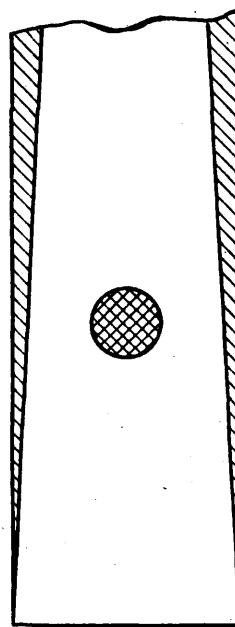
i



j



k



l

FIG. 20.—METODOS i, j, k y l.

se revela en placas de 5 mm de anchura aproximadamente (Fishbein, 1965) (Berthold, 1968) (Fig. 20k).

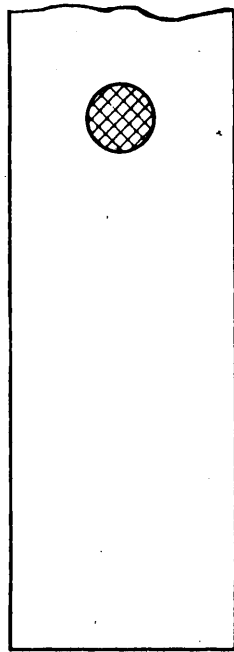
l) Para evitar el ensanchamiento de las manchas en la zona alta de la capa, se corta el adsorbente en forma de trapecio desde la parte inferior de la capa (30 mm) hasta la superior (10 mm) (Griesemer, 1968) (Fig. 20l).

m) Se estudia la diferencia en la eficacia y en la superficie de las manchas, entre aplicar la solución a 40 ó a 70 mm de la base de la capa (para favorecer el revelado con flujo lento de la fase móvil de los productos de R_f bajo) revelando 120 mm en cada caso desde la zona de aplicación. Se utiliza la aplicación normal y en línea horizontal (Figs. 21m-1 y m-2 respectivamente).

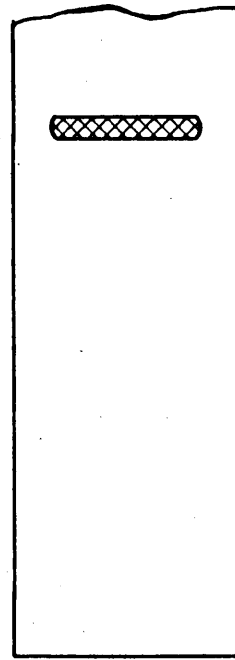
n) Igual que el método k pero concentrando el producto mediante el método c (Fig. 21n).

o) Se efectúa el revelado a diferentes temperaturas: -24°C , 2°C , 18°C y 42°C (Stahl, 1956) (Singh, 1970) (Fig. 22).

p) Se efectúan diversos cortes en el adsorbente cerca de la zona de aplicación y en las zonas laterales, para favorecer la producción de manchas de poca anchura a base de estrechamientos en la zona de circulación del disolvente (Fig. 21p).



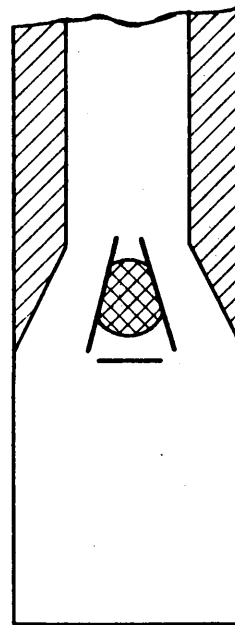
m-1



m-2



n



p

FIG.21.—METODOS m-1, m-2, n y p

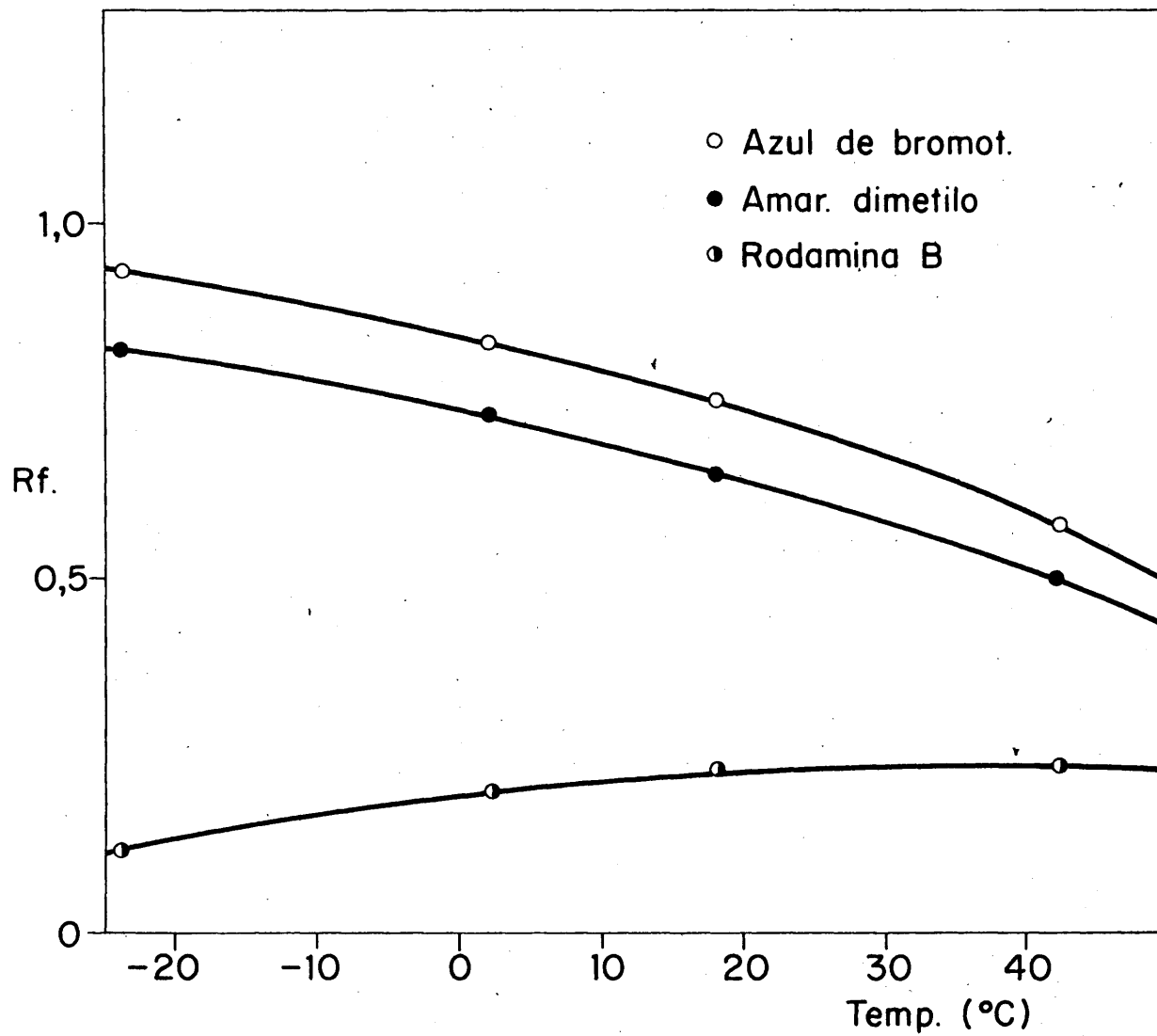


FIG. 22.- VARIACION DEL Rf CON LA TEMPERATURA.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Se aplican 10 μ l de una solución en etanol de la mezcla de los colorantes siguientes: azul de bromotimol (1 mg/ml), amarillo dimetilo (10 mg/ml) y rodamina B (3 mg/ml), revelando con la mezcla de disolventes: acetona-etanol (3:1), en cámaras cilíndricas de 22 x 5,5 cm de diámetro provistas de papel saturador, y con capas prefabricadas analíticas de gel de sílice de 20 x 3 cm (Merck, ref. 5715); se obtienen, en condiciones de aplicación normales, unos valores del Rf de 0,24, 0,65 y 0,75 para la rodamina B, el amarillo dimetilo y el azul de bromotimol respectivamente. Para la visualización del azul de bromotimol se emplean los vapores de hidróxido amónico. La altura del punto de aplicación sobre el borde inferior de la placa ha sido de 40 mm (excepto en los métodos g, h, y m), la distancia recorrida por el disolvente desde el punto de aplicación de 120 mm y la altura del disolvente en la cámara de 10 mm.

El producto se aplica sin secar durante la aplicación (excepto en el método d), obteniéndose un diámetro de 9 mm y secándose posteriormente con aire frío; estas condiciones se mantienen para observar mejor las variaciones obtenidas y para estudiar el caso más interesante en el que el volumen de solución a aplicar sea grande o de un disolvente poco volátil y se produzcan aplicaciones de diámetro grande, ya que, no es aconsejable el calentar excesivamente

la muestra aplicada (Bush, 1961). En el caso b - para evitar la desactivación de la capa por los disolventes utilizados en el revelado y en el producto a aplicar, y poder observar mejor la influencia del agua, del metanol y del benceno utilizados - se revela con benceno, aplicando 10 µl de una solución bencénica de amarillo dimetilo (2 mg/ml) ($R_f = 0,34$) concentrando ligeramente la solución aplicada para conservar el diámetro estudiado de 9 mm de diámetro. En el método c, y para evitar la sobresaturación de la capa al concentrar los productos en el origen, se aplican diferentes cantidades de amarillo dimetilo (10 µl de sus soluciones en etanol de 0,2, 1, 5 y 10 mg/ml de concentración) y se estudian las variaciones producidas en la longitud y superficie de las manchas reveladas respecto al método de control a.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

De todos los métodos estudiados el más eficaz es el m - 2, aplicación en línea horizontal a 70 mm de altura, con una reducción media de la longitud de las manchas del 30 % respecto al control (procedimiento normal a) (valor máximo de la reducción 40 %). La superficie de las manchas se incrementa hasta un valor medio del 27 % respecto al control (valor máximo del incremento 45 %). Las grandes diferencias observadas entre los valores medios y los máximos, son debidos a que en los valores medios se consideran los tres colorantes, mientras que, en

los valores máximos, se considera solamente el colorante que presenta mayores desviaciones. Hay que tener en cuenta que los tres colorantes no se difunden de igual forma en el adsorbente lo que hace que las desviaciones respecto a la media, sean considerables (Tabla VI.I).

A este procedimiento le sigue en eficacia el f, aplicación en línea horizontal a la altura normal de 40 mm, con una reducción media de la longitud de las manchas del 26 % (valor máximo 38 %). La superficie de las manchas se incrementa en un 38 % (valor máximo 69 %).

Le sigue en eficacia el método g, aplicación a 13 mm de un estrechamiento, con una reducción media de la longitud de las manchas del 21 % (valor máximo 39 %). La superficie de las manchas se incrementa en un 8 % (valor máximo 53 %). Este método es el más indicado si se debe tener en cuenta la superficie de las manchas.

TABLA VI.I

VARIACION DE LA LONGITUD Y LA SUPERFICIE DE LAS MANCHAS
CON LOS DIFERENTES METODOS

Método	Longitud		Superficie	
	Reducción %	Aumento %	Reducción %	Aumento %
a (control)	-	-	-	-
d	-	8	16	-
f	26	-	-	38
g	21	-	-	8
h	21	-	-	8
j	-	8	16	-
k	-	8	56	-
l	-	8	13	-
m-2	30	-	-	27
n	-	8	56	-

El método que produce manchas de menor superficie es el k, aplicación en capas de 5 mm de anchura, con una reducción media de la superficie del 56 %, (valor máximo 69 %). La longitud de las manchas se incrementa en un 8 % (valor máximo 28 %).

Le sigue en efectividad el método j, aplicación en línea vertical y concentración posterior, con una reducción media de la superficie del 16 % (valor máximo 45 %). La longitud de las manchas se incrementa en un 8 % (valor máximo 36 %).

Paralelo al método anterior es el d, aplicación en un círculo de pequeño diámetro (4 a 5 mm), con una reducción media de la superficie del 16 % (valor máximo 26 %). La longitud de las manchas se incrementa en un 8 % (valor máximo 17 %).

El método l, utilización de capas en forma de trapecio, le sigue al anterior, con una reducción media de la superficie del 13 % (valor máximo 25 %). La longitud de las manchas se incrementa en un 18 % (valor máximo 39 %).

En los métodos h y n las variaciones de longitud y superficie son similares a las de los métodos g y k respectivamente.

En los restantes métodos b, c, e, i, o, p y m-1, las variaciones en la longitud y en la superficie de las man-

chas son reducciones inferiores al 10 % o aumentos, por lo que no puede tenerse en consideración. En general el producto tiende a ocupar la misma superficie durante el revelado, sin que influya demasiado el método de aplicación. El número de determinaciones cuantitativas efectuadas, han sido como mínimo de tres en cada procedimiento, comparándolas con otras tantas capas de control reveladas en idénticas condiciones. Las 6 capas utilizadas en cada procedimiento proceden de una misma capa comercial de 20 x 20 cm.

En la Fig. 22 se observa la influencia de la temperatura (método o) sobre la separación de las manchas por variación del Rf en los colorantes estudiados. Esta gráfica es el resultado del estudio de la influencia de la temperatura en la eficacia de la separación.

Mediante la fórmula correspondiente del apartado 7.2 (c.f. cap. I) se calcula la resolución obtenida en los métodos m-2, f y g - en los que se ha obtenido una mejora - y entre las manchas correspondientes a los colorantes rodamina B y amarillo dimetilo, y amarillo dimetilo y azul de bromotimol, respecto a las capas de control. Los resultados se expresan en la Tabla VI.II.

TABLA VI.II

RESOLUCION OBTENIDA EN LOS METODOS m-2, f y g

	Método					
	<u>m-2</u>		<u>f</u>		<u>g</u>	
	<u>Rod.-Am</u>	<u>Am-Az</u>	<u>Rod.-Am</u>	<u>Am-Az</u>	<u>Rod.-Am</u>	<u>Am-Az</u>
Colorantes						
Resolución	4'90	1'38	4'80	1'38	3'57	1'08
Mejora	28 %	42 %	31 %	52 %	2 %	23 %
Media	35 %		41'5 %		12'5 %	

CAPITULO VII

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN CAPA PREPARATIVA FORMADA POR COMPRIMIDOS

1. INTRODUCCION

Las mayores dificultades que se presentan en la cromatografía de adsorción en capa preparativa, estriban en la aplicación del producto en una línea estrecha y en la separación, después del revelado, de los diferentes productos que interesa estudiar, sobre todo, si los productos son tóxicos como en el caso de productos radiactivos. Se utiliza, en el presente trabajo, una capa tubular formada por comprimidos taladrados de material adsorbente, que facilitan la aplicación de la muestra y la separación de los diferentes productos después del revelado (Fig. 23). Lenk (1969) y Lie (1962) han utilizado capas preparativas tubulares sin seccionar.

Para la aplicación del producto existen numerosos dispositivos manuales y automáticos (Morgan, 1962) (Mckibbings, 1961) (Ritter, 1962); en todos ellos es difícil controlar la anchura (W_d) de la banda formada al aplicar el producto, sobre todo, si los disolventes empleados son poco volátiles, mientras que, en el procedimiento estudiado, el producto aplicado queda siempre en el comprimido o comprimidos utilizados sin variar su anchura.

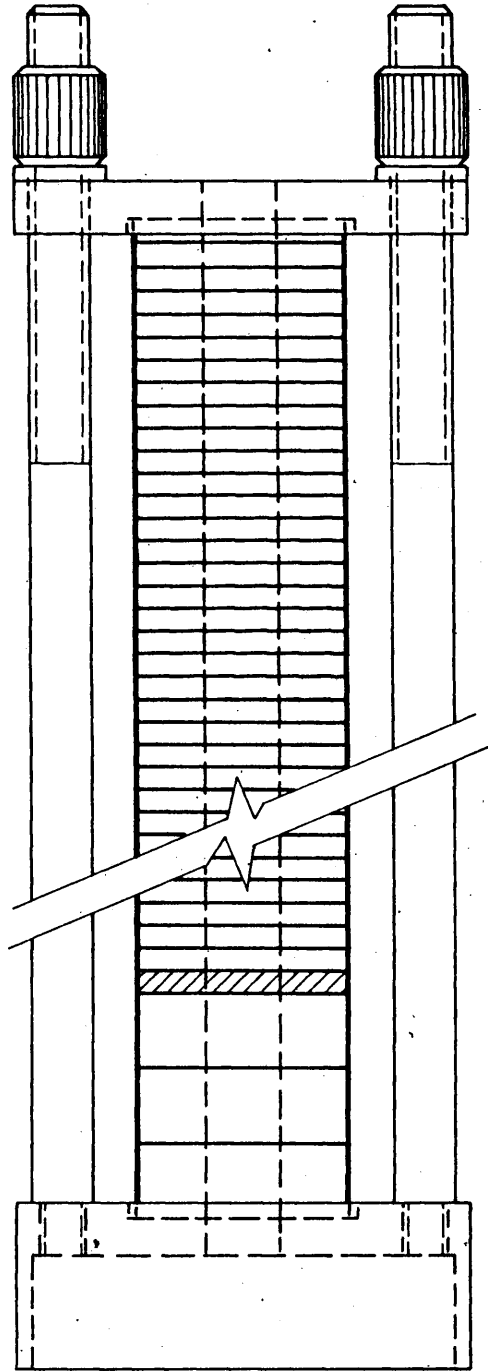


FIG. 23. - SOPORTE Y COLUMNA.

En cromatografía de adsorción preparativa se han pu
blicado numerosos trabajos sobre la separación de los pro
ductos de la capa después del revelado. La mayoría de
ellos consisten en el corte o raspado de la zona de adsor
bente conteniendo el producto separado (Mottier, 1955),
lo cual es engorroso y en el caso de productos tóxicos
tiene el inconveniente de contaminar la zona de trabajo.

En cromatografía en columna, aparte del procedimiento
de corte ya señalado, la separación puede efectuarse
mediante utilización de columnas formadas por varios tu
bos acoplados por uniones esmeriladas (Tiselius, 1947)
(Gault, 1950), los cuales, como es lógico, no pueden ser
muy numerosos; otros procedimientos emplean columnas rígi
das de adsorbente sin tubo protector que cortan después de
reveladas (Miller, 1951). En la cromatografía de partición
preparativa sobre papel se ha empleado la "cromatopila",
formada por discos de tela o papel (Lenoir, 1942) (Mitchell,
1949) y también tubos formados por papel enrollado que se
corta posteriormente (Danielsson, 1952). En el presente ca
so, esta separación es sumamente fácil ya que basta desmon
tar el soporte de la capa, y después del secado y de la vi
sualización, separar los comprimidos que interesen.

El dispositivo estudiado facilita otras técnicas uti
lizadas en cromatografía en capa fina y preparativa tales
como: a) el gradiente en la fase estacionaria (Petit, 1969)
(Stahl, 1964), utilizando columnas formadas por comprimidos

de diferentes adsorbentes o mezclas de adsorbentes; b) los revelados múltiples (Kirchner, 1951) con separación intermedia de los productos purificados que interesen y nuevo revelado de los restantes; c) los revelados múltiples con separación de los comprimidos que interesen e introducción en otras capas, pudiendo reunirse los productos mediante flujo continuo formando un nuevo origen (Truter, 1964) y cambiar, si interesa, el adsorbente (Anet, 1962); en estos revelados múltiples pueden activarse solamente los comprimidos que interesen sin calentar los productos a separar; d) la elución de los productos separados simplificada por el procedimiento empleado de eluir sin romper el comprimido; e) el revelado, ya que, al no estar el adsorbente en contacto con su soporte, (placas con soporte de vidrio, plástico, etc.) se evita la influencia de la zona de contacto entre ambos; f) la aplicación de la técnica de Musgrave (1969), de concentración del producto aplicado en la zona de aplicación mediante la utilización en esa zona de un adsorbente de menor capacidad de adsorción; g) la visualización de productos radiactivos sin equipo de desplazamiento de la capa, mediante la medida por ambas caras de los comprimidos aislados; h) la utilización de cámaras para el revelado de volumen inferior al utilizado con las placas preparativas convencionales. Servirá ventajosamente, en general, para cualquier tipo de técnica en la que se utilice el intercambio de productos o de adsorbentes y diferentes revelados.

Las restantes técnicas pueden utilizarse igualmente, aunque sin ventajas especiales, estudiándose su adaptación a la cromatografía descendente y lavado de las capas (Stanley, 1957) y a la cromatografía de flujo continuo por evaporación del disolvente en la parte superior de la capa (Bobbitt, 1963).

Una parte importante es la preparación de los comprimidos. Se efectúa su estudio con adsorbentes y aglutinantes tales como gel de sílice, alúmina, talco, sulfato cálcico, almidón, etc., sólo o mezclados - para favorecer la cohesión - por no formar algunos adsorbentes puros, en las condiciones estudiadas, comprimidos compactos. Los comprimidos se preparan mediante compresión del polvo del adsorbente - o de la mezcla preparada - en una prensa de laboratorio, efectuando posteriormente un taladro en el centro del comprimido para facilitar la saturación del adsorbente con los vapores del disolvente.

Se efectúan experiencias comparativas con capas analíticas y preparativas y con la capa de comprimidos, todas saturadas antes de revelar (debido al espesor de la capa de la columna es necesaria la presaturación), obteniéndose con ligeras diferencias el mismo R_f (Janchen, 1968); en las capas analíticas, estudiadas sin saturación de las mismas antes de revelar, los valores del R_f son superiores (Geiss, 1968a).

Para estudiar el comportamiento de la técnica anteriormente explicada, se efectúa la purificación del colorante amarillo dimetilo, al que se le han añadido como impurezas diversas cantidades de otros colorantes, estudiándose las mejores condiciones de aplicación, revelado, elución, etc., obteniéndose resultados similares a los de una purificación efectuada en las mismas condiciones con capas preparativas, las cuales no reúnen las ventajas de una aplicación sencilla y de una fácil separación de los productos revelados.

2. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1. Preparación de los comprimidos

Para la preparación de los comprimidos (de 25 mm de diámetro y diversas alturas) se utiliza una prensa de laboratorio (Applied Research Laboratories Glendale. California U.S.A.). Los adsorbentes empleados (de uso normal en cromatografía) y sus aglutinantes han sido: gel de sílice: Camag, DSF-0 (T.L.C.); Camag, DSF-5 (T.L.C.); Micronizada (sílice pour gels 41) Intertechnique, ref. 220630; M. Woelm, F (T.L.C.); Panreac, ref. 237111; Merck, 0'08 mm, ref. 7729; Merck, 0'05 mm, ref. 7734; Merck, 0'2 mm, ref. 7733. Alúmina: Camag, DSF-0 (T.L.C.); Camag, DSF-5 (T.L.C.). Celulosa: Macherey, Nagel Co.,

ref. MN 300 UV (T.L.C.); Whatman, en polvo (Standard Grade); Avicel, pH-101; Whatman, en polvo, ref. cc-31. Almidón: Analar, soluble, ref. S-8214. Talco: Rhône Poulenc, ref. DAB-7. Carbón activo: Merck, ref. 2186. Sulfato cálcico hidratado: Merck, ref. 2161. Carbonato cálcico precipitado: Merck, ref. 2067. Carboximetilcelulosa: Macherey, Nagel Co., ref. Mn 300 CM (T.L.C.). Kieselguhr: Johns-Manville, Celite, Standard Super-cel. Grafito para espectrografía: Ultra Carbon Products Co., ref. UCP-1. Oxido de magnesio: Carlo Erba, ref. 459614 (cromat.). Silicato magnésico: M. Woelm (T.L.C.). Carbonato sódico anhidro: Merck, ref. 6392. Silicato de aluminio: J.D. Riedel-E. de Haen A.G. ref. 4185. Hidróxido cálcico: Probus. Estearato de magnesio: Barcia, ref. 1059.

Los adsorbentes utilizados, la fuerza más adecuada, el tiempo empleado en la absorción de una gota de agua de 23 mg de peso medio y los resultados obtenidos, se reflejan en la Tabla VII.I. Posteriormente se efectúa un taladro de 10 mm de diámetro en el centro del comprimido con una broca, sujetando los comprimidos con un útil adecuado para taladrar varios al mismo tiempo.

2.2. Soporte de la capa

La capa tubular formada por los comprimidos se monta en el soporte de teflón de la Fig. 23. El soporte consta de dos placas circulares paralelas unidas por tres varillas situadas a 120° una de otra. Las dimensiones son las adecuadas para su introducción en una cámara cilíndrica de 22 x 5'5 cm, aunque es más indicado montarla en un soporte más amplio. Si se utilizan los comprimidos de celulosa, o de mezclas con celulosa, con disolventes muy polares pueden hincharse ligeramente por lo que, en este caso, deben colocarse tres muelles en la parte superior del soporte.

2.3. Aplicación del producto

Para estudiar la mejor forma de aplicar la solución con los productos a separar, se prepara una solución de rodamina B en etanol con una concentración de 12 mg/ml, utilizando para la aplicación comprimidos de: gel de sílice (Camag DSF-0) - celulosa (MN) (30:70), gel de sílice (Camag DSF-0) - óxido de magnesio - celulosa (MN) (30:30:40) y celite - celulosa (MN) (70:30) de 3 mm de espesor. La aplicación de la muestra debe efectuarse de forma adecuada para que el comprimido se recubra uniformemente por toda su superficie del producto aplicado, procurando que la mayor parte quede en el interior, ya que, al secar después de cada aplicación

tiende a salir a la superficie.

Se efectúan diversas experiencias variando la temperatura en la zona de aplicación, la velocidad y forma de aplicación y la forma de sujetar el comprimido. El sistema utilizado finalmente es el de la Fig. 24. El comprimido, activado a 115°C durante una hora, se sujeta con las pinzas y su soporte de la forma indicada en la figura, aplicándose la solución gota a gota con una pipeta por la parte superior hasta la cantidad adecuada para que no tenga líquido en exceso, ni salga por la parte inferior, calentando lentamente (40°C aprox.) con la placa calefactora (situada en la parte inferior) para favorecer la evaporación; se repite el proceso hasta la aplicación total de la solución (4 ml en este caso).

Para evitar la formación de costra en las paredes laterales del comprimido, puede aplicarse un poco de grasa de silicona en esa zona (colocándole entre dos comprimidos) lo que reduce, al mismo tiempo, la difusión del producto durante la presaturación. La aplicación puede efectuarse también en varios comprimidos de 1 mm de altura.

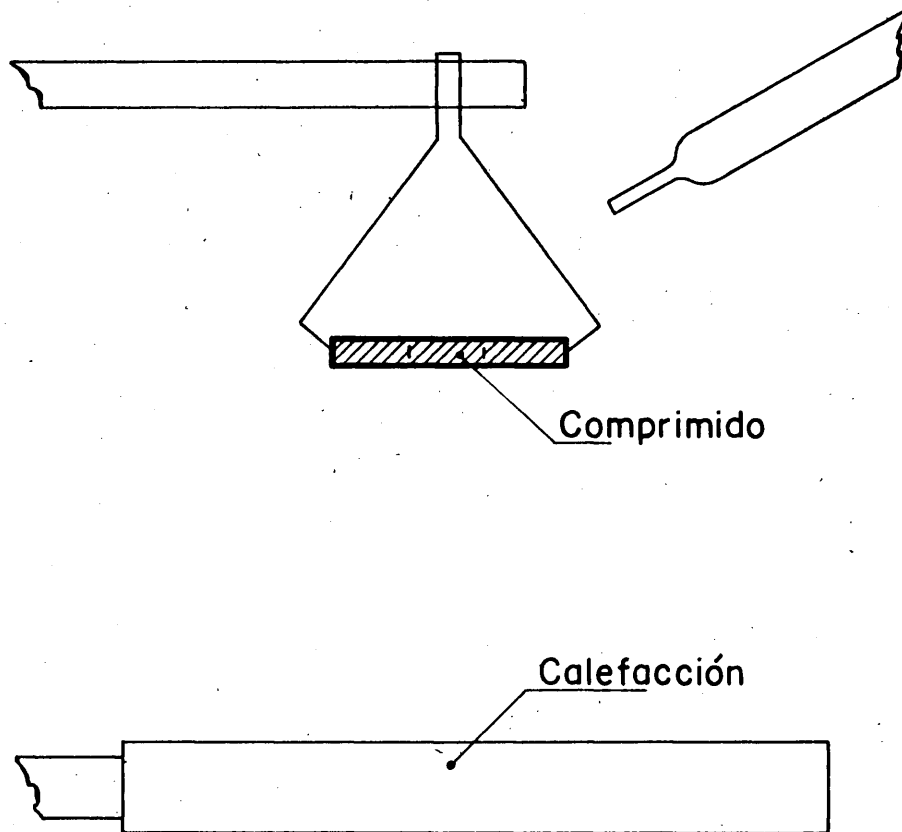


FIG. 24.— APLICACION DE LA SOLUCION SOBRE EL COMPRIMIDO.

TABLA VII.I

MEZCLAS DE ADSORBENTES UTILIZADAS EN LA PREPARACION DE LOS COMPRIMIDOS

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice (xx)			M
Gel de sílice (Camag, DSF-5)			M
Gel de sílice (0,08 mm)			M
Gel de sílice (micronizada)			M
Gel de sílice (Panreac)			M
Gel de sílice-celulosa (xx) (70:30)			M
Gel de sílice-celulosa (50:30)	70	>300	R
Gel de sílice-celulosa (40:60)	50	240	B
Gel de sílice-celulosa (30:70)	5	11	MB +
Gel de sílice (micronizada)-celulosa (85:15)			M
Gel de sílice (micronizada)-celulosa (70:30)	5	10	MB (xxx)
Gel de sílice (micronizada)-celulosa (50:50)	2	12	MB (xxx)
Gel de sílice (micronizada)-óxido de magnesio (50:50)			M

(x) - Mal (M), regular (R), bien (B), muy bien (MB).

(xx) - Gel de sílice y alúmina: Camag, DSF-0; celulosa: MN, 300 UV (salvo indicación de lo contrario)

(xxx) - El revelado en estas capas con acetona, de los tres colorantes utilizados en el tra bajo, no tiene resolución.

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (70:30)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (60:40)	5	1	R
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (50:50)	10	3	B +
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (40:60)	10	5	B
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (Avicel) (70:30)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (Avicel) (60:40)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (Whatman) (70:30)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa (Whatman) (60:40)			M
Gel de sílice (Panreac)-celulosa (Whatman) (70:30)			M
Gel de sílice (Panreac)-celulosa (Whatman) (60:40)	20	3	B +
Gel de sílice (Panreac)-celulosa (70:30)			M
Gel de sílice (Panreac)-celulosa (60:40)	10	4	B
Gel de sílice (Panreac)-celulosa (50:50)	10	5	B +
Gel de sílice (0,08 mm)-celulosa (Whatman) (60:40)			M
Gel de sílice (0,08 mm)-celulosa (60:40)	5	1	R
Gel de sílice (0,05 mm)-celulosa (Whatman) (60:40)			M
Gel de sílice (0,05 mm)-celulosa (60:40)			M

(+) - Es la mezcla más adecuada dentro del tipo de adsorbentes utilizados.

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice (0,2 mm)-celulosa (Whatman) (60:40)			R
Gel de sílice-carboximetilcelulosa (70:30)			M
Gel de sílice-carboximetilcelulosa (60:40)			M
Gel de sílice-carboximetilcelulosa (50:50)	7	1	R
Gel de sílice-carboximetilcelulosa (40:60)	5	1	B +
Gel de sílice-carboximetilcelulosa (30:70)	5	1	MB
Gel de sílice-alúmina (xx) (70:30)			M
Gel de sílice-alúmina (50:50)			M
Gel de sílice-alúmina (30:70)			M
Gel de sílice-grafito (80:20)			M
Gel de sílice-grafito (70:30)			M
Gel de sílice-talco (70:30)			M
Gel de sílice-talco (50:50)			M
Gel de sílice-talco (30:70)			M
Gel de sílice-almidón (70:30)			M
Gel de sílice-almidón (50:50)			M
Gel de sílice-almidón (30:70)			M
Gel de sílice-sulfato cálcico (70:30)			B +
Gel de sílice-sulfato cálcico (50:50)	40	2	M
Gel de sílice-sulfato cálcico (30:70)			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice-carbonato cálcico (70:30)			M
Gel de sílice-carbonato cálcico (50:50)			M
Gel de sílice-carbonato cálcico (30:70)			M
Gel de sílice-celite (70:30)			M
Gel de sílice-celite (50:50)			M
Gel de sílice-celite (30:70)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio (50:50)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio (30:70)			M
Gel de sílice-estearato de magnesio (95:5)			M
Gel de sílice-carbonato sódico (50:50)			M
Gel de sílice-hidróxido cálcico (50:50)			M
Gel de sílice-silicato de aluminio (50:50)			M
Gel de sílice-alúmina-celulosa (50:40:10)			M
Gel de sílice-alúmina-celulosa (50:30:20)			M
Gel de sílice-alúmina-celulosa (50:20:30)			M
Gel de sílice-alúmina-celulosa (40:20:40)			M
Gel de sílice-alúmina-celulosa (15:15:70)			R
Gel de sílice-celulosa-talco (70:20:10)	5	2	R
Gel de sílice-celulosa-talco (70:15:15)	5	10	MB +
			M
			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice-celulosa-talco (60:30:10)	30	52	R
Gel de sílice-celulosa-talco (60:20:20)			M
Gel de sílice-celulosa-talco (50:30:20)	10	4	R
Gel de sílice-celulosa-talco (50:20:30)	5	2	R
Gel de sílice-celulosa-talco (50:40:10)	20	15	R
Gel de sílice-celulosa-talco (50:10:40)			M
Gel de sílice-celulosa-talco (40:10:50)			M
Gel de sílice-celulosa-talco (40:20:40)	20	15	R
Gel de sílice-celulosa-talco (40:30:30)	5	1	R
Gel de sílice-celulosa-talco (40:40:20)	5	4	B +
Gel de sílice-celulosa-talco (40:50:10)	5	3	B
Gel de sílice-celulosa-talco (30:20:50)	7	7	MB
Gel de sílice-celulosa-talco (30:40:30)	5	8	MB
Gel de sílice-celulosa-talco (30:10:60)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa-talco (60:30:10)			M
Gel de sílice (Woelm)-celulosa-talco (55:40:5)			M
Gel de sílice-carboximetilcelulosa-talco (70:20:10)			M
Gel de sílice-carboximetilcelulosa-talco (60:30:10)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-celulosa (50:20:30)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-celulosa (40:40:20)			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Gel de sílice-óxido de magnesio-celulosa (40:30:30)	5	1	R
Gel de sílice-óxido de magnesio-celulosa (40:20:40)	5	2	B
Gel de sílice-óxido de magnesio-celulosa (30:30:40)	10	5	MB +
Gel de sílice-óxido de magnesio-talco (40:40:20)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-talco (40:30:30)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-silicato magnésico (40:40:20)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-silicato magnésico (40:20:40)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-estearato magnésico (50:45:5)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-alúmina (40:40:20)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-alúmina (40:20:40)			M
Gel de sílice (Woelm)-óxido de magnesio-celulosa (50:20:30)	5	1	R
Gel de sílice-celite-talco (40:40:20)			M
Gel de sílice-celite-talco (40:20:40)			M
Gel de sílice-celite-celulosa (40:20:40)			M
Gel de sílice-celite-celulosa (30:20:50)	5	3	B +
Gel de sílice-estearato magnésico-talco (65:5:30)			M
Gel de sílice-óxido de magnesio-talco-estearato magn. (50:35:10:5)			M
Gel de sílice-celulosa-estearato magn.-talco (80:10:3:7)			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Alúmina	10	< 1	R
Alúmina (Camag, DSF-5)	10	< 1	R
Alúmina-celulosa (85:15)	10	1	B
Alúmina-celulosa (70:30)	5	2	MB +
Alúmina-celulosa (60:40)	5	3	MB
Alúmina-celulosa (50:50)	5	5	MB
Alúmina-celulosa (40:60)	5	7	MB
Alúmina-celulosa (30:70)	5	13	MB
Alúmina-talco (50:50)	20	40	R
Alúmina-talco (40:60)	5	28	R
Alúmina-talco (30:70)	5	19	B (4x)
Alúmina-almidón (85:15)	10	< 1	R
Alúmina-almidón (70:30)	10	< 1	MB +
Alúmina-almidón (60:40)	10	< 1	MB
Alúmina-almidón (50:50)	10	< 1	MB
Alúmina-almidón (30:70)	5	< 1	MB
Alúmina-óxido de magnesio (85:15)			M
Alúmina-óxido de magnesio (70:30)	10	2	MB +
Alúmina-óxido de magnesio (50:50)	10	4	MB
Alúmina-celite (70:30)			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Alúmina-celite (50:50)			M
Alúmina-celite (30:70)			M
Alúmina-estearato de magnesio (95:5)			M
Celulosa	3	6	MB +
Almidón	20	60	B (4x)
Almidón-celulosa (85:15)	5	1	MB +
Almidón-celulosa (70:30)	10	3	MB
Talco			M
Talco-celulosa (85:15)	5	70	MB +
Talco-celulosa (70:30)	5	80	MB
Sulfato cálcico	10	3	R
Sulfato cálcico-celulosa (85:15)	5	2	MB +
Sulfato cálcico-celulosa (70:30)	5	5	MB
Sulfato cálcico-celulosa (50:50)	5	10	MB
Carboximetilcelulosa	2	13	MB +
Carbonato cálcico	20	1	R
Carbonato cálcico-celulosa (85:15)	10	9	B +

(4x) - Al oprimir se agarrota el útil de la prensa.

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Carbón activo			M
Carbón activo-celulosa (85:15)			M
Carbón activo-celulosa (70:30)			M
Carbón activo-celulosa (50:50)	10	2	B +
Celite.			M
Celite-celulosa (85:15)	10	1	R
Celite-celulosa (70:30)	20	3	B +
Celite-talco (85:15)			M
Celite-talco (70:30)			M
Celite-talco (50:50)	10	2	R
Celite-talco (30:70)	10	9	B +
Celite-sulfato cálcico (85:15)			M
Celite-sulfato cálcico (70:30)			M
Celite-sulfato cálcico (50:50)			M
Celite-carbonato cálcico (70:30)			M
Celite-carbonato cálcico (50:50)			M
Celite-óxido de magnesio (70:30)			M
Celite-óxido de magnesio (50:50)			M
Celite-carbonato sódico (70:30)			M

TABLA VII.I (continuación)

Adsorbentes	Fuerza (lbs x 1000)	Tiempo adsorción (segundos)	Resultado (x)
Celite-hidróxido cálcico (70:30)			M
Celite-estearato magnésico (95:5)			M
Oxido de magnesio	1	1	MB +
Silicato magnésico	2	1	B (4x)
Silicato magnésico-celulosa (85:15)	5	5	B
Silicato magnésico-celulosa (70:30)	5	7	MB +
Silicato magnésico-talco (85:15)	5	4	B
Silicato magnésico-talco (70:30)	5	7	MB +
Carbonato sódico	20	1	B +
Silicato de aluminio			M
Silicato de aluminio-celulosa (85:15)	5	2	B +
Hidróxido cálcico	5	2	B +

2.4. Revelado

En el soporte de la Fig.23, se monta la capa formada por comprimidos activados, de 1 cm de altura en la parte inferior, sobre estos, el comprimido con el producto aplicado, y en la parte superior, comprimidos iguales a éste (3 mm de espesor) hasta un total de 18 a 20 cm.

Se aprietan ligeramente las tuercas de la parte superior para favorecer la unión entre los comprimidos, se introduce el conjunto en la cámara (forrada de papel saturador Whatman-3 y conteniendo una pequeña cantidad del disolvente revelador) y se mantiene durante varias horas saturándose de los vapores del disolvente; por diversas experiencias se ha observado, que si el tiempo de saturación es inferior al adecuado en cada caso particular, los productos se revelan a mayor altura por la parte interior de la capa (Dallas, 1968a) y si es superior, se difunden fuera del comprimido de aplicación; pasado ese tiempo se añade más disolvente y se revela hasta la altura deseada. Para evitar la difusión del producto aplicado durante la presaturación, puede presaturarse la capa sin el comprimido de aplicación, colocándole posteriormente en su sitio. Debe aplicarse en el exterior de la capa, y a la altura adecuada, una gota de solución de un colorante poco polar tal como el amarillo dimetilo, para observar fácilmente el final del

revelado; el comienzo de su revelado indica la llegada del disolvente.

Para estudiar cual es el disolvente revelador más adecuado, o con qué mezcla de adsorbentes se obtienen mejores separaciones, se preparan capas analíticas con la misma mezcla de adsorbentes que los comprimidos, o bien, si es posible, se utiliza uno de los comprimidos sin taladro como microcapa, revelando en cromatografía circular o ascendente una pequeña cantidad del producto estudiado.

2.5. Secado

Se saca el soporte de la cámara, se desmonta, se introduce una varilla de vidrio por el taladro central de la capa tubular y se coloca horizontalmente con los comprimidos separados unos de otros en una vitrina de gases. La separación de los comprimidos durante el secado evita que los productos separados emigren solamente a la pared lateral de los comprimidos, obteniéndose un secado más rápido y homogéneo.

2.6. Visualización

Después de haber secado los comprimidos - y numerados con un lápiz - se procede a su visualización de la misma forma que en cromatografía en capa

preparativa normal; para la aplicación de líquidos puede ser interesante la utilización de un pincel, pintando un trazo fino a lo largo de la capa (Zechmeister, 1936).

2.7. Elución

La elución se efectúa de la forma indicada en la Fig. 25, eluyendo los comprimidos seleccionados con el disolvente adecuado, que desciende por una tira de papel (Whatman-17) provista de un taladro de 10 mm de diámetro en la parte inferior.

El disco de teflón situado encima de los comprimidos, y de dimensiones iguales a ellos, tiene un corte lateral, que penetra hasta el taladro central, para facilitar la salida de la solución por el orificio central del vidrio de reloj. La cámara está provista de disolvente y papel saturador.

2.8. Cromatografía descendente y lavado de las capas

Se estudia la adaptación a la cromatografía en capa preparativa formada por comprimidos, de la cromatografía por revelado descendente, pudiendo efectuarse de la forma indicada en la Fig. 26 utilizando el mismo soporte y accesorios anteriores. La tira de papel utilizada para el descenso del disolvente es el tipo W-3 o W-17 según

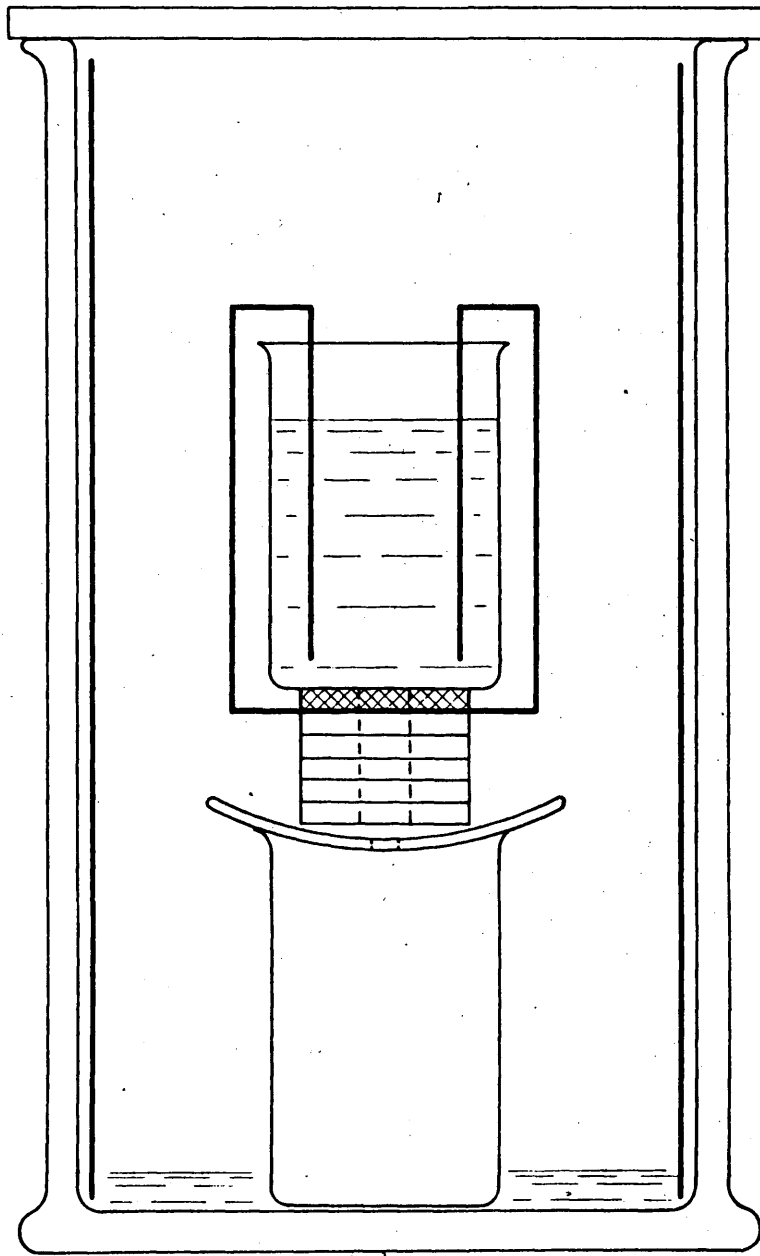


FIG. 25.— ELUCION DE LOS COMPRIMIDOS.

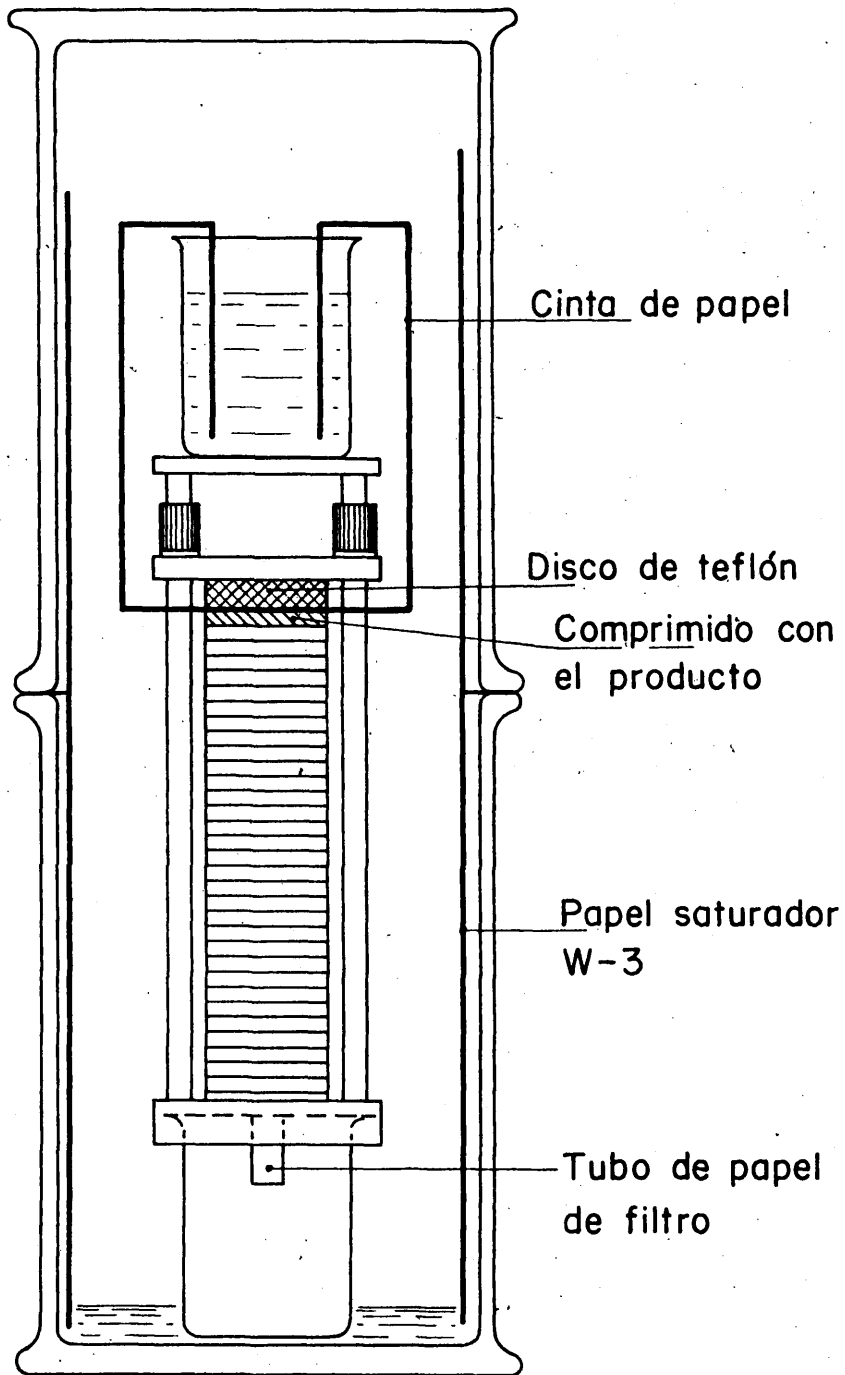


FIG. 26. — CROMATOGRAFIA DESCENDENTE.

la velocidad necesaria del paso del disolvente; dispondrá igual que el disco de teflón (y como en el apartado anterior) de un taladro de 10 mm en la parte inferior. Antes de proceder a la separación cromatográfica debe presaturarse la capa el tiempo necesario con los vapores del disolvente situados en la parte inferior. Si debajo del vidrio de reloj se coloca un embudo con una conducción adecuada, puede detectarse el líquido eluido y ser recogido en un colector de fracciones. Este procedimiento puede utilizarse para el lavado de las capas.

2.9. Cromatografía ascendente en flujo continuo

Otra técnica adaptada es la cromatografía ascendente en flujo continuo, que se efectúa según se indica en la Fig. 27, pudiendo utilizarse también para reunir los productos mal separados por una cromatografía no satisfactoria, para lo cual, se invierte la columna en su soporte para que los productos más polares queden más cerca del frente. Durante la presaturación de la capa puede taparse el orificio de la parte superior del soporte, que permanecerá cerrado durante el revelado si el disolvente utilizado fuera muy volátil.

2.10. Aplicación de la técnica de Musgrave

Es interesante aplicar la técnica de Musgrave (1969)

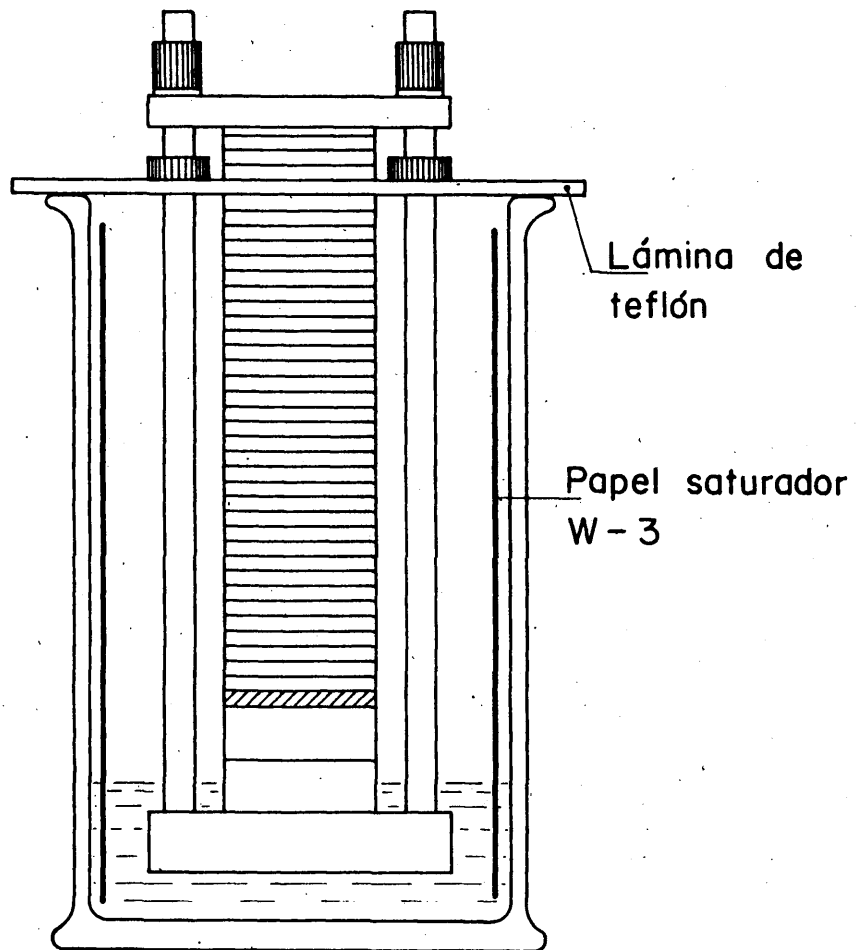


FIG. 27.— CROMATOGRAFIA EN FLUJO CONTINUO ASCENDENTE.

a la cromatografía en capa preparativa. Se efectúa su estudio analítico en comprimidos aislados utilizados como microcapas. Para ello se aplican en el comprimido adecuado (y a 4 mm del borde) 2 μ l de una solución en acetona de amarillo dimetilo (10 mg/ml), rodamina B (1 mg/ml) y azul de bromotimol (3 mg/ml). Se revela en acetona introduciendo la parte inferior del comprimido en el disolvente.

Los comprimidos estudiados corresponden a las mezclas de adsorbentes siguientes: celite-celulosa (MN) (70:30); carbonato sódico; hidróxido cálcico; talco-celulosa (MN) (85:15); almidón-celulosa (MN) (85:15); carbonato cálcico-celulosa (MN) (85:15); celulosa (MN); sílice (Camag DSF-0)-óxido de magnesio-celulosa (MN) (30:30:40); sílice (Panreac)-celulosa (MN) (60:40) y sulfato cálcico-celulosa (MN) (85:15). Los comprimidos formados por almidón-celulosa (85:15) y, posteriormente, celite-celulosa (70:30) son los que adsorben los colorantes aplicados en menor grado.

2.11. Primera purificación experimental

Para comprobar experimentalmente el procedimiento estudiado, se prepara una solución del colorante amarillo dimetilo en etanol (10 mg/ml), a la que se añaden como impurezas azul de bromotimol (1 mg/ml) y rodamina B (3 mg/ml).

Se preparan los comprimidos necesarios de la mezcla: gel de sílice (Camag DSF-0)-celulosa (MN) (30:70) de 3 mm de espesor, y sobre uno de ellos se aplican 4 ml de solución de la forma indicada en el apartado 2.3; duración de la aplicación: 65 minutos. Después de activar los restantes comprimidos a 110°C durante 6 horas, se forma con todos ellos la capa tubular, se introducen en su soporte y se presaturan con vapores de acetona en la cámara de revelado durante 5 horas; posteriormente se revela durante 5 horas con acetona (en revelados analíticos previos se ha observado la conveniencia de utilizar este disolvente como revelador).

Después de secar los comprimidos, se separan los correspondientes a la zona del amarillo dimetilo 43 mm; $R_f = 0.51$) y se eluyen con 50 ml de metanol; la solución se evapora a vacío, se disuelve nuevamente el producto en benceno para facilitar la separación de la posible gel de sílice arrastrada (Bobbitt, 1963a), se decanta y se seca nuevamente, obteniéndose un rendimiento superior al 100 % debido, seguramente, a no haber efectuado previamente el lavado de la capa.

En capas analíticas de gel de sílice (Merck, ref.: 5715) se revelan con metanol, acetona y benceno, aplicaciones de 1 µg de rodamina B, 1 µg de azul de bromotimol y 100 µg del amarillo dimetilo purificado; la pureza química del amarillo dimetilo, respecto a las impurezas in-

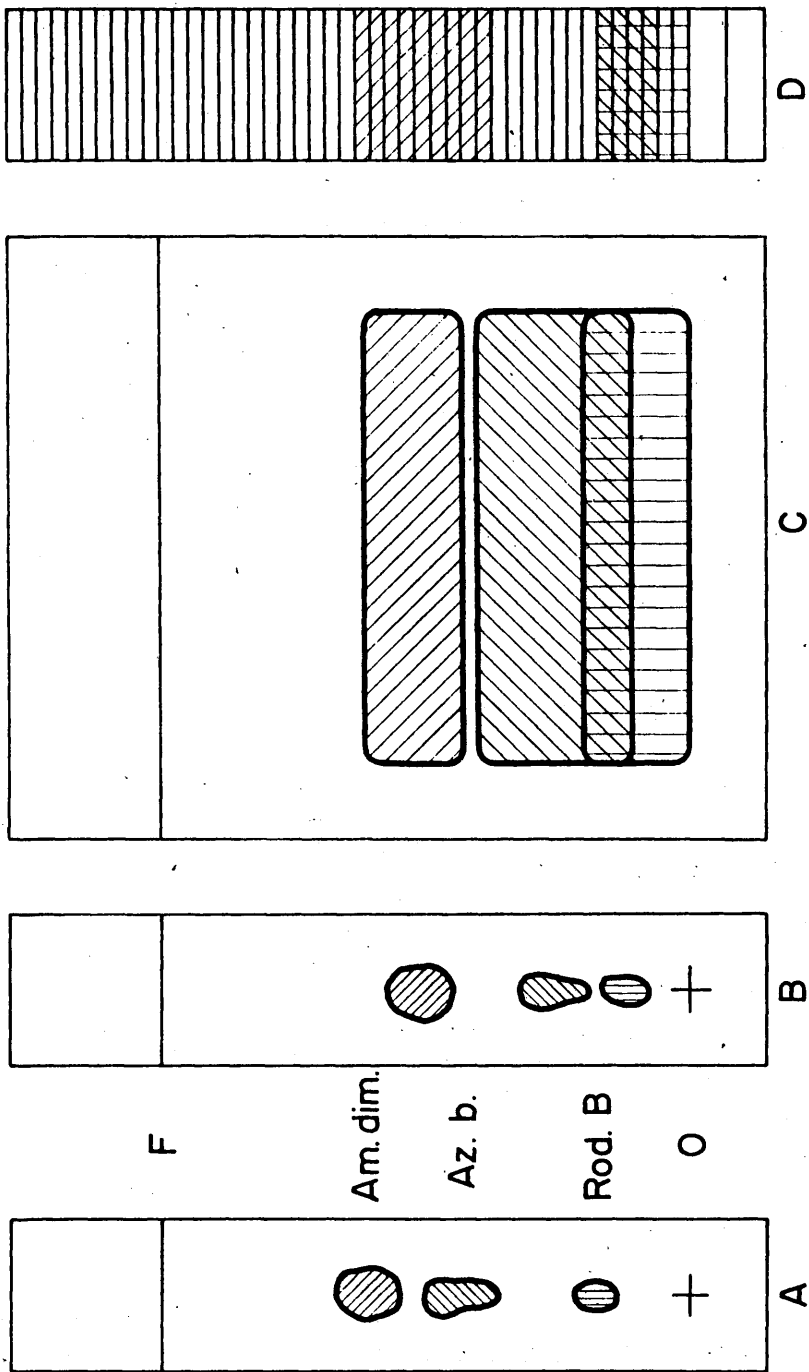
corporadas, es superior al 99 %.

Se efectúan diversas cromatografías (Fig. 28) para comparar la capa formada por comprimidos (D), con capas prefabricadas analíticas (A y B) y preparativas (C) de gel de sílice (Merck, ref. 5715 y 5717 respectivamente); la capa A se ha revelado sin presaturación. La cantidad de producto aplicado a la capa C, es proporcional a la cantidad de sílice presente respecto a la capa tubular; la altura de la zona ocupada en esta capa por el amarillo dimetilo es igual a 30 mm.

2.12. Segunda purificación experimental

Se realiza otra experiencia de purificación en una capa tubular formada por comprimidos preparados con la mezcla: gel de sílice (Camag DSF-0)-óxido de magnesio-celulosa (MN) (30:30:40). Se trata de separar de una solución de amarillo dimetilo, rodamina B y azul de bromotimol, en acetona, de concentraciones 10, 1 y 3 mg/ml respectivamente, el amarillo dimetilo de los otros dos colorantes considerados como impurezas.

Se lava la capa previamente según se indica en la Fig. 26 con 200 ml de metanol, se activa a 110°C durante varias horas y se aplican, en uno de los comprimidos de 3 mm de espesor sin capa lateral de grasa



A-C.C.F. sin presaturar B-C.C.F. presaturando 1/2 h.
 C-C.C.P. presatur. 1 h. D-C.C.P. comprim. presatur. 5 h.

FIG. 28.— COMPARACION ENTRE DIFERENTES TIPOS DE CAPAS.

de silicona, 4 ml de la solución preparada; duración de la aplicación, 21 minutos.

Se montan los comprimidos en su soporte - aplicando en la parte superior de la capa una pequeña cantidad de amarillo dimetilo como control del frente del disolvente - y se satura en la cámara de revelado durante 4 horas con vapores de acetona. La capa se revela durante 9 horas en acetona (15 cm desde el punto de aplicación), se seca separando los comprimidos y se eluye la zona que contiene el amarillo dimetilo (35 mm; $R_f = 0.41$) con 50 ml de metanol según se indica en la Fig. 25. La solución se evapora a vacío y se obtienen 34 mg de amarillo dimetilo. Rendimiento de la purificación 85 %. El control de pureza química del amarillo dimetilo respecto a las impurezas incorporadas se realiza de la forma indicada en el apartado 2.11, siendo superior al 99 %.

3. DISCUSION

La preparación de los comprimidos es la parte más importante de la técnica estudiada. La mayoría de los adsorbentes utilizados en cromatografía, no son fácilmente compresibles en forma de comprimidos compactos que resistan pequeños golpes y la manipulación, debido, probablemente, al pequeño tamaño de sus partículas. Como la fuerza de compresión no debe de ser muy grande (para facilitar el

flujo posterior del disolvente durante el revelado) se limitan las posibilidades de preparación de comprimidos acep-tables.

La celulosa es muy adecuada para la preparación de comprimidos debido a su naturaleza fibrosa, utilizándose también mezclada con otros adsorbentes para facilitar su cohesión. Se ha utilizado también el talco para facilitar la preparación de los comprimidos; aparte de ser adsorbente, actúa como lubricante. Un producto muy utilizado como lubricante en la preparación de comprimidos es el estearato de magnesio; en este caso no se ha utilizado por ser soluble en diversos disolventes. Los diámetros del comprimido y del taladro efectuado, se han calculado de forma que la superficie útil final de la sección de la capa formada, sea equivalente a la de una capa comercial de 20 x 20 x 0,2 cm.

Los comprimidos obtenidos en condiciones de utilización cubren una amplia gama de adsorbentes de diferente capacidad, permitiendo elegir la fórmula más adecuada dentro de cada problema particular. En la Tabla VII.I se in-dican las mezclas estudiadas con información de las más adecuadas para obtener comprimidos satisfactorios.

La aplicación del producto se ha estudiado para el caso en que sea necesario aplicar productos poco concentrados; en el caso ideal, bastará introducir el comprimido de

aplicación en la solución para retenerla de una sola vez, facilitándose entonces extraordinariamente la aplicación en bandas estrechas.

El revelado no presenta problemas especiales, excepto en la necesidad de presaturar la capa para facilitar el revelado homogéneo y a la misma altura de los diversos productos; el taladro inferior facilita esta presaturación. La falta de continuidad entre los comprimidos no ha dificultado el revelado, debiendo para ello preparar comprimidos de superficies, superior e inferior, planas y paralelas.

La elución del producto se ha realizado con gran facilidad y rendimiento, sin la pérdida de adsorbente que ocasiona el raspado convencional, ni la posible contaminación de la zona de trabajo si el producto es tóxico.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se han desarrollado nuevos métodos de cromatografía en capa fina que suponen diversas mejoras en cuanto al número de platos teóricos, revelado (o desarrollo) de productos volátiles, aplicación, separación y detección de productos radiactivos, así como en la aplicación y separación a escala preparativa.

Dentro del ámbito de mejorar la resolución de la separación, se ha estudiado un método que permite efectuar tres revelados sucesivos, sobre direcciones distintas en la misma placa, empleando diferentes disolventes (c.f. Cap. II). Para ello se distinguen sobre la placa varias zonas, según se aprecia en la Fig. 1, para los tres revelados del producto a separar y para los del producto de control. Con la eliminación de las partes ya utilizadas de la placa, después de cada revelado (Figuras 2 y 3), así como el cambio de dirección de éste, se logra aumentar las posibilidades de separación de los componentes de una mezcla, gracias al aumento correspondiente del número de platos teóricos; se consigue así un efecto análogo al de la cromatografía llamada "multidimensional", es decir, basada en el empleo de diferentes técnicas cromatográficas, mientras que se evitan las pérdidas de producto resultantes del traslado del dispositivo instrumental propio de una técnica al de otra.

La bondad del método se ha demostrado aplicándolo a tres casos: determinación cuantitativa del número de platos teóricos en el desplazamiento de un solo componente y comparación con los valores obtenidos en cromatografía convencional; separación de un colorante (rojo congo) a partir de su mezcla con otros nueve y, por último, separación de un aminoácido (ácido glutámico) en presencia de otros 18. En el primer caso se alcanzan 9000 platos teóricos frente a los 1200 y 4750 obtenidos en el revelado convencional en una y dos direcciones respectivamente, contribuyendo a este resultado el efecto de contracción de la superficie de la mancha propio de los cambios de dirección en el curso de la cromatografía; se demuestra, además, que este aumento puede ser utilizado ventajosamente para incrementar la cantidad de producto depositada en la capa, pues, si bien disminuye paralelamente el número de platos teóricos, (Tabla II.I), los dos efectos se compensan, lográndose eficacias aceptables de separación con cantidades comparativamente elevadas de producto. En el segundo caso se logra la separación progresiva del rojo congo de grupos de colorantes, a pesar de que los valores experimentales del R_f frente a los disolventes empleados (Tabla II.II), hacían imposible la separación por un procedimiento convencional; se alcanza, además, una excelente resolución respecto al colorante (naranja de bencilo) que sigue más de cerca al rojo congo a lo largo de la cromatografía realizada según el método

aquí descrito. Se obtienen resultados muy similares en el tercer caso, mezcla de aminoácidos, cuyos valores experimentales del R_f se recogen en la Tabla II.IV.

Para evitar la utilización de placas de grandes dimensiones - y las cámaras de revelado correspondientes - en el caso de necesitar capas con gran cantidad de platos teóricos, o la acumulación de productos no visualizados en el frente del disolvente, si se recurre al revelado en flujo continuo, puede rasparse parte del adsorbente de una placa convencional para que la capa adopte la forma indicada en la Fig. 4 (c.f. Cap. III). El recorrido efectuado por el disolvente y los productos durante el revelado aumentará considerablemente, facilitándose la separación. Sin embargo, la introducción de zonas curvas en el recorrido cromatográfico puede perturbar la eficacia de la separación, si no se presta atención a la forma de dichas zonas; ahora bien, el estudio de lo que ocurre en seis casos considerados como típicos ha permitido determinar cual es la forma que produce la perturbación mínima en la altura del plato teórico (Fig. 5 y Tabla III.I); como la forma en cuestión lleva consigo el estrechamiento de la capa, el estudio de este parámetro ha permitido determinar su influencia en la eficacia de la resolución y en el R_f (Fig. 6 y Tabla III.II). Se efectúa el revelado de diversos colorantes por cromatografía normal ascendente, normal en flujo continuo y por el

sistema estudiado (Fig. 7), observándose la total separación de los productos en este sistema. Asimismo, se efectúa el revelado de diversos aminoácidos consiguiendo su separación (Tabla III.IV). El número de platos teóricos obtenidos en el revelado de colorantes con un recorrido del frente del disolvente de 54,4 cm es de 7200, mientras que, en una cromatografía normal efectuada en las mismas condiciones experimentales pero con un recorrido del disolvente de 13,3 cm, se obtienen 2900.

La separación por C.C.F. de productos volátiles - con p. de e. del orden de 100°C - tropieza con la dificultad de que, debido a tener que evaporar la fase líquida utilizada, estos productos volátiles son también evaporados, impidiéndose su visualización. Por otra parte, la difusión de los productos entre las fases sólida y líquida es lenta, lo que impide su rápido revelado.

Si hacemos pasar un gas - o una mezcla de un gas y vapor de disolvente - por una cámara formada por la capa adsorbente y una cubierta provista de una cavidad longitudinal de poca profundidad, obtendremos un sistema cromatográfico gas-sólido en capa fina; aplicando la mezcla de productos a separar en un extremo, podremos revelar los diferentes productos (que permanecerán sobre la capa para ser visualizados posteriormente), resolviéndose de esta forma las dificultades antes mencionadas. El montaje utilizado para el paso del gas por la capa fina es el indicado en

la Fig. 8 (c.f. Cap. IV) y la cámara es una prensa de la forma indicada en la Fig. 9 (vista lateral).

Para conocer el funcionamiento del procedimiento estudiado y los resultados que se obtendrían en diferentes condiciones, se estudian diversos gases, mezclas de gases y vapores, capas adsorbentes y productos aplicados, según se indica en la Tabla IV.I.

Se efectúan, asimismo, diferentes revelados de nitrobenceno en capas de gel de sílice y bajo diferentes condiciones, para conocer la respuesta del sistema estudiado, utilizando como gas portador nitrógeno con vapores de metanol. De esta forma se obtienen las gráficas de las Figs. 10, 11, 12, 13, 14 y 15 en las que se estudia la variación de la distancia de retención (d_R) - o distancia recorrida por el producto desde su punto de aplicación - en función de la temperatura del saturador, la altura del disolvente en el saturador, la temperatura de la cámara, el tiempo de revelado, el caudal de gas portador y las dimensiones de la altura de la cámara respectivamente.

Se estudian, también, las condiciones más adecuadas para la obtención de manchas de poca longitud, siendo para ello necesario caudales bajos de gas, tiempos pequeños y temperaturas altas; de todas formas la eficacia es menor que en la C.C.F. clásica.

Finalmente se efectúa el revelado de diferentes mezclas de productos a temperatura ambiente y a 50°C , separando en 10 minutos mezclas de productos tales como el tolueno, que no es visualizable en C.C.F. normal por evaporarse con la fase móvil líquida.

Las experiencias realizadas indican que el procedimiento estudiado no se basa en una simple destilación - por no haber relación entre los valores obtenidos de d_R y los puntos de ebullición de los productos separados - sino en la adsorción, afirmación justificada por el hecho de obtenerse separaciones cromatográficas en capas de gel de sílice y alúmina, mientras que, en capas de celulosa, se produce una larga estela.

Si en una cámara cromatográfica preparada para el revelado en flujo continuo (Fig. 16, c.f. Cap. V) se sitúa un detector adecuado para productos radiactivos por encima del punto de aplicación de la capa, al revelarse los diferentes productos serán detectados y registrados dinámicamente por separado, aunque posteriormente se unan en el frente del disolvente. La cámara preparada tiene una rendija en la parte superior para que sobresalga la placa y pueda producirse la evaporación del frente del disolvente, mientras que en la parte lateral, provista de otra rendija, se aloja un tubo Geiger-Muller unido a un registro gráfico.

La velocidad de recuento obtenida con este dispo

sitivo depende de la distancia detector-capa cromatográfica, del diámetro de la fuente radiactiva (en este caso constituida por la mancha cromatográfica), de la interposición de una lámina de plástico protectora de la ventana del detector frente a los vapores de disolvente, así como del espesor de la capa y de la naturaleza de ésta y del disolvente. Estudiados todos estos efectos (Tablas V.I a V.IV) y obtenidas las condiciones óptimas de trabajo, se ha aplicado el procedimiento a la determinación de la pureza radioquímica de un compuesto marcado con carbono-14, obteniéndose una considerable mejora en el tiempo de ejecución. De esta forma se ha estudiado la pureza radioquímica de un acetato sódico marcado con carbono-14 (Fig. 17). El tiempo utilizado en su revelado y detección ha sido tres veces menor que en C.C.F. clásica.

En la realización de una cromatografía en capa fina es del mayor interés lograr la máxima eficacia en la separación de los componentes y la máxima sensibilidad en la detección de éstos; ambos parámetros se traducen en la necesidad de hacer mínimas la longitud y superficie de la mancha correspondiente a cada componente, lo cual depende de las condiciones de aplicación de la mezcla a separar y de su revelado, que deben realizarse de modo tal que sea mínima la difusión de los componentes en el material cromatográfico. Con es-

te fin se han estudiado (c.f. Cap. VI) 16 métodos diferentes de aplicación y revelado, unos originales y otros tomados de la bibliografía, aplicando diversas cantidades de tres colorantes; en todos ellos se ha procurado obtener aplicaciones de reducidas dimensiones o evitar la difusión de los productos durante el revelado (Figs. 18, 19, 20, 21 y 22). Los resultados obtenidos (Tablas VI.I y VI.II) demuestran que, para hacer mínima la longitud de la mancha o, lo que es lo mismo, la altura del plato teórico, la mezcla a separar debe aplicarse en forma de una banda estrecha, paralela a la base de la placa y situada a una distancia de la superficie del disolvente, mayor de lo habitual (situación representada por m-2 en la Fig.21) con lo que se consigue una reducción en la altura del plato teórico del 30 %. Por otro lado, se logra la superficie mínima utilizando para la cromatografía una capa estrecha (c.f. k en la Fig. 20), de esta forma la reducción obtenida en la superficie es del 56 %.

La cromatografía de adsorción en capa fina encuentra amplia aplicación también a escala preparativa, si bien entonces la capacidad de resolución del sistema resulta considerablemente perturbada por la dificultad de aplicar el producto a separar en forma de línea estrecha con una concentración, en la solución de partida, compatible con la capacidad de adsorción del soporte.

Constituye otra dificultad la recuperación de los compo nentes, una vez separados, sobre todo cuando su manejo entraña un peligro, como es el caso de los productos tó xicos o radiactivos. Ambas dificultades se pueden solventa r utilizando una capa no plana, sino tubular (c.f. Cap. VII), constituida por comprimidos taladrados de mater ial adsorbente que facilitan la aplicación de la muestra y la separación de los diferentes productos después del revelado; el conjunto de la capa y su soporte se indica en la Fig. 23.

Se ha estudiado la preparación de comprimidos, utilizando 30 tipos de adsorbentes, diversas presiones y 200 mezclas diferentes de los mismos para preparar una serie de comprimidos adecuados para los diversos problemas que puedan plantearse (c.f. Tabla VII.I). La aplicación de la solución con la mezcla de productos a separar se efectúa según se indica en la Fig. 24; de esta forma, las dimensiones de la zona de aplicación no serán superiores al espesor del comprimido. Una vez montada la capa, revelada, seca y visualizada, se separan los comprimidos que contengan el producto a estudiar y se eluyen con el dispositivo de la Fig. 25, pasando el líquido eluyente con el producto al vaso inferior.

Cabe utilizar la misma técnica básica para efectuar cromatografías descendentes con el montaje de la Fig. 26, pudiendo recogerse el líquido eluido con un co-

lector de fracciones. La cromatografía en flujo continuo puede realizarse según se indica en la Fig. 27, evaporándose el exceso de disolvente en la parte superior de la cámara. En la Fig. 28 se indica el estudio comparativo efectuado entre capas analíticas y preparativas planas, y preparativas formadas por comprimidos, para la separación del colorante amarillo dimetilo de otros dos colorantes considerados como impurezas.

De todo ello cabe establecer las CONCLUSIONES siguientes:

1ª.- La resolución de la separación y el rendimiento en la recuperación de los productos separados se puede mejorar considerablemente mediante revelados sucesivos sobre la misma capa bajo diferentes ángulos, sin acudir a la transferencia de productos propia de la llamada cromatografía "multidimensional". Esta mejora en la eficacia es debida, no solo a que el recorrido sobre la capa es mayor sino, además, a que los cambios de sentido de los disolventes durante los diferentes revelados, producen un acortamiento de las manchas con el consiguiente aumento en el número total de platos teóricos.

2ª.- Utilizando capas de gran longitud en forma de "Z" se consigue aumentar varias veces el número de platos teóricos, sin necesidad del empleo de placas de

grandes dimensiones, siendo mejor la resolución de la separación. La zona curva, y más estrecha, de la capa, no solo no produce una disminución en el número de platos teóricos de la capa, sino que en algunos casos los aumenta.

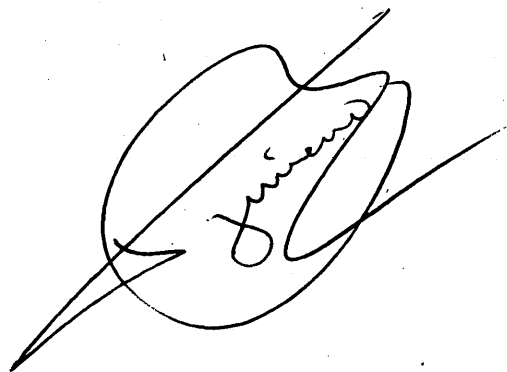
3ª.- El empleo de un gas o vapor como fase móvil hace innecesaria la evaporación del disolvente revelador, lo cual permite separar productos más volátiles que con el método usual de C.C.F.; además, aumenta así la rapidez del revelado como consecuencia de la mejor difusión de los productos entre las fases sólida y gaseosa. El proceso estudiado es de separación por adsorción ya que, cuando se utilizan capas de celulosa en vez de gel de sílice o alúmina, se obtienen manchas alargadas que ocupan por completo la capa; además, cuando se efectúan separaciones con diferentes productos, se observa que la relación entre los valores de las distancias de retención de los productos separados, es del mismo orden que la relación entre los valores del R_f cuando la separación se efectúa por C.C.F. normal de adsorción. El proceso no es una simple destilación, ya que, en las separaciones efectuadas con diferentes productos, no se ha observado ninguna relación entre los puntos de ebullición de los productos y las distancias de retención obtenidas. Deben utilizarse caudales bajos de gas portador, alturas pequeñas entre la capa

y la cavidad por la que pasa el gas, y tiempos de revelado medios para que la eficacia de la separación sea óptima.

4ª.- La detección de productos radiactivos durante su revelado puede hacerse situando un detector de características convenientes en la propia cámara cromatográfica, por encima del punto de aplicación de la mezcla a resolver; de esta forma pueden medirse los productos radiactivos en el revelado en flujo continuo. Cuando el revelado transcurre normalmente, la conexión del detector a un registro gráfico evita la habitual exploración de la placa después del revelado. Los adsorbentes y disolventes utilizados en el revelado producen una absorción importante de las partículas beta emitidas por el producto aplicado, pudiendo medirse, no obstante, el carbono-14 con una actividad del orden de 0'05 μ Ci.

5ª.- El empleo de capas de poca anchura evita la difusión lateral y permite obtener manchas de poca superficie y por consiguiente, de más fácil visualización. Para obtener cromatogramas eficientes es necesario disminuir la cantidad del producto aplicado por unidad de anchura de la aplicación. Aunque la aplicación se concentre en una línea horizontal, las manchas tienden a ocupar después del revelado los mismos platos teóricos que en el caso de una aplicación normal.

6ª.- La utilización de comprimidos de material adsorbente, con un orificio central, permite formar capas tubulares que ofrecen las siguientes ventajas respecto a las capas planas comunes y a los lechos cilíndricos propios de la cromatografía convencional en columna: a) facilidad y rapidez en la separación de la parte de la capa donde se ha acumulado un producto para su elución o para someterlo a un nuevo revelado; b) facilidad, en este último caso, para insertar los comprimidos en una nueva capa constituida de la misma forma con distinto adsorbente; c) facilidad de aplicar el producto en forma de banda muy estrecha.

A handwritten signature or set of initials, possibly 'J. J. J.', written in a cursive style. The signature is enclosed within a large, loopy circular stroke that also extends upwards and downwards, resembling a stylized flourish or a signature mark.

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, G., y Frey, H.P.; J. Chromatog. 33 (1968) 53.
- Ackman, R.G., y Burgher, R.D.; Anal. Chem. 35 (1963) 647.
- Anet, E.F.L.J.; J. Chromatog. 9 (1962) 291.
- Angoso, M., Martín, J., Jimeno, F., y Pérez, M.; Anal. R.S. Esp. Fis. Qui. 68 (1972) 159.
- Angoso, M., Jimeno, F., Grau, A., y Domínguez, G.; J. Radioanal. Chem. 13 (1973) 149.
- Arx, E.V., y Neher, R.; J. Chromatog. 12 (1963) 329.
- Ayers, C.W.; Mikrochim. Acta 9 (1956) 1333.
- Bacon, M.F.; J. Chromatog. 16 (1964) 552.
- Badings, H.T.; J. Chromatog. 14 (1964) 265.
- Baret, C., y Pichat, L.; Bull. Soc. Chim. Fr. 18 (1951) 581.
- Barrett, C.B., Dallas, M.S.J., y Padley, F.B.; Chem. Ind. (London) (1962) 1050.
- Bekersky, I.; J. Chromatog. 12 (1963) 412.
- Berger, J.A., Meyniel, G., et al.; Bull. Soc. Chim. France (1963) 2662.
- Berthold, I.; Z. Anal. Chem. 240 (1968) 320.
- Berthold, F., y Wenzel, M.; Instrum. in Nuclear Medicine, 1 (1967) 251.
- Bevenue, A., Kelley, T.W., y Hyglin, J.W.; J. Chromatog. 54 (1971) 21.
- Boag, J.W., Bond, P.S., et al.; J. Chromatog. 73 (1972) 265.

- Bobbitt, J.M.; "Thin-Layer Chromatography", Reinhold Pub. Co., New York (1963) 79.
- Bobbitt, J.M.; Ibid (1963a) 115.
- Boucke, G.; Atompraxis, 11 (1965) 263.
- Blunden, G., Hardman, R., y Morrison, J.C.; J. Pharm. Sci. 56 (1967) 948.
- Braun, D., y Geenen, H.; J. Chromatog. 7 (1962) 56.
- Brenner, M., y Niederwieser, A.; Experientia 17 (1961) 237.
- Brenner, M., Niederwieser, A., et al.; Experientia 18 (1962) 101.
- Bridger, V.E., y Relph, S.J.; Britisk Patent Appl. 54215/65 y 40136/66. Informac.: Burkard, Rickmansworth, Herts, V.K.
- Brown, T.I., y Benjamin, J.; Anal. Chem. 36 (1964) 446.
- Bulenkov, T.I.; Zurnal analiticeskoj chimii. 33 (1968) 348.
- Bush, I.E.; "Chromatog. of the Steroids", Pergamon Press, Londres (1961).
- Carreau, J.P., y Raulin, J.; H;J. Chromatog. 15, (1964) 186.
- Claesson, S.; Arkiv Kemi, Mineral. Geol.; 23 A, N^o 1 (1946).
- Coffey, R.G., y Newburgh, R.W.; J. Chromatog. 11 (1963) 376.
- Cooper, G., Corner, J.J., y Swain, T.; Z. Naturforsch, 27b (1972) 943.
- Cremer, E., Kraus, T., y Nau, H.; Z. Analyt. Chem. 245 (1969) 37.
- Cremer, E., Deutscher, F., et al.; J. Chromatog. 48 (1970) 132.

- Chapman, L.R.; J. Chromatog. 66 (1972) 303.
- Dallas, M.S.J.; J. Chromatog. 17 (1965) 267.
- Dallas, M.S.; J. Chromatog. 33 (1968) 58.
- Dallas, M.S.; J. Chromatog. 33 (1968a) 193.
- Danielsson, C.E.; Arkiv Kemi, 5 (1952) 173.
- Davis, A., Roaldi, A., y Tufts, L.E.; J. Gas Chromatog. 2 (1964) 306.
- Davidson, J.D., y Oliverio, V.T.; "Advances in Tracer Methodology"; Vol. 4, New York; Plenum Pub. Co., (1968) 67.
- Determann, H., Wieland, Th., y Lüben, G.; Experientia 18 (1962) 430.
- Dhont, J.H., Mulders - Dijkman, G.J., et al.; J. Chromatogr. 52 (1970) 429.
- Dijk, J.H. van; Z. analyt. Chem. 247 (1969) 262.
- Dyer, T.A.; J. Chromatog. 11 (1963) 414.
- Edgar, D.; J. Chromatog. 43 (1969) 271.
- Eisenbeiss, F.; Chemiker-Ztg. 95 (1971) 237.
- Eisenberg, F. Jr.; J. Chromatog. 9 (1962) 390.
- Fairbairn, J.W.; "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography", Editor: Shellard, E.J., Academic Press. London-New York, (1968) 1-15.
- Fishbein, L., y Fawkes, J.; J. Chromatog. 19 (1965) 364.
- Fosslien, E., Musil, F., et al.; J. Chromatog. 63 (1971) 131.
- Franc, J., y Hajkova, M.; J. Chromatog., 16 (1964) 345.
- Frank, M., Chain, E.B., et al.; Selected Scientific Papers, Instituto Superiore di Sanita, II, (i) (1959) 75.

- Freeman, C.P., y West, D.; J. Lipid Res., 7 (1966) 324.
- Frei, R.W.; En "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. II, Editores: Niederwiser y Pataki, Ann Arbor (1970) 1-61.
- Frodyma, M.M., Frei, R.W., y Williams, D.J.; J. Chromatog. 13 (1964) 61.
- Gänshirt, H., y Morianz, K.; Archs, Pharm. 293. (1960) 1065.
- Gascó, L.; "Teoría y Práctica de la Cromatografía en Fase Gaseosa", Ediciones J.E.N., Madrid (1970), págs. 127 y 147.
- Gault, H., y Ronez, C.; Bull. Soc. Chim. France, (1950) 597.
- Geiss, F., Schlitt, H., y Klose, A.; Z. Analyt. Chem. 213 (1965) 321.
- Geiss, F., Schlitt, H., y Klose, A.; Z. Analyt. Chem. 213 (1965a) 331.
- Geiss, F.; J. Chromatog. 33 (1968) 9.
- Geiss, F., y Schlitt, H.; Chromatographia 1 (1968a) 392.
- Gilbert, C.W., y Keene, J.P.; Editor: Exfermann, R.C., "Radioisotopes in Scientific Research", Proc. UNESCO Int. Conf. París (1957) Vol. I, Pergamon Press, London. (1957) pág. 698.
- Griesener, E.C.; J. Chromatog. 32 (1968) 278.
- Grindlay, J.W., y Wright, J.C.; Chem. and Ind. (1966) 1377.
- Haahnt, E., Vihko, R., et al.; J. Chromatog. Sci. 8 (1970) 370.
- Haahnti, E., Vihko, R., et al.; J. Chromatog. Sci. 8 (1970) 370.

- Hais, I.M.; J. Chromatog. 48 (1970) 200.
- Halpaap, H., y Bausch, H.; J. Chromatog. 48 (1970) 144.
- Haluk, J.P., Duval, C., y Metche, M.; Chrom. Symp. VI
Bruxelles (1970) 431.
- "Handbook of Chemistry and Physics", 44 th. Edition,
Ed.: The Chemical Rubber Pub. Co., Cleveland (1963),
págs. 2617 y 2623.
- Hara, S., Yamazaki, S., y Ichikawa, H.; Chem. and Ind.
(1969) 1657.
- Hariharan, P.V., Poole, G., y Johns, H.E.; J. Chromatog.
32 (1968) 356.
- Harris, M.J., Stewart, A.F., y Court, W.E.; Planta Med.
16 (1968) 217.
- Hathway, D.E., y Seakings, J.W.T.; Biochem. J. 72 (1959).
369.
- Hesse, G., y Alexander, M.; Journées Intern. Etude
Methodes Séparation Immediate Chromatog. Paris
(1961) 229 (Publi. 1962).
- Hesse, G., Engelhardt, H., y Kaltwasser, R.; Chromato-
graphia 1 (1968) 302.
- Hilton, J., y Hall, W.B.; J. Chromatog. 7 (1962) 266.
- Hirayama, K.; J. Chromatog. 26 (1967) 276.
- Honegger, C.G.; Helv. Chim. Acta 44 (1961) 173.
- Hörhammer, L., Wagner, H., y Bittner, G.; Deut.
Apotheker 14 (1962) 148.
- Huber, W.; Chromatographia, 1 (1968) 212.
- Huber, W., y Fricke, H.; Chromatographia 3 (1970) 121.
- Hüttenrauch, R., Klotz, R.L., y Müller, W.; Z. Chem. 3
(1963) 193.
- James, D.H., y Phillips, C.S.G.; J. Chem. Soc. (1953)
1600.

- Janák, J.; J. Gas Chromatog. 1 (10) (1963) 20.
- Janák, J.; J. Chromatog. 15 (1964) 15.
- Janák, J., y Kubecová, V.; J.Chromatog. 33 (1968) 132.
- Janák, J.; J.Chromaotg. 48 (1970) 279.
- Janák, J.; en "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. II, Editores: Niederwisser y Pataki, Ann Arbor (1971) 63-91.
- Jänchen, D.; J. Chromatog. 33 (1968) 195.
- Jänchen, D.E.; en "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography", Editor: Shellard, E.J., Academic Press. London-New-York (1968a) 71-78.
- Jimeno, F.; Informe int. JEN, Qr0703/I-14 (1972).
- Johnson, C.A.; en "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography", Editor: Shellard, E.J., Academic Press. London-New York (1968) 101-106.
- Jordan, D.M.; J.Chromatog. 57 (1971) 427.
- Jork, H.; III Intern. Symp. f. Chromatogr., Brüssel. Symp. Bericht (1964) 295.
- Jork, H.; Pharma. International 4 (1968) 12.
- Jork, H.; en "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, Editor: Shellard, E.J. Academic Press. London-New York (1968a) 79-89.
- Kaiser, R.; Z. Analyt. Chem. 205 (1964) 284.
- Kaiser, R.; Chimia 21 (1967) 235.
- Kaiser, R.; Chemistry in Britain 5 (1969) 54.
- Kartnig, T., y Mikuhe, G.; Mitt. Zbl. Pharm. Labordiagn. 109 (1970) 215.
- Kaufmann, H.P., y Makus, Z.; Fette, Seifen Anstrichmittel 62 (1960) 1014.

- Kaufmann, H.P., y Khoe, T.H.; Fette, Seifen, Anstrichmittel, 64 (1962) 81.
- Kaufmann, H.P., Mukherjee, K.O., y Khalid, Q.; Fette, Seifen, Anstrichm. 69 (1967) 820.
- Keck, K., y Hagen, V.; Biochim. et Biophys. Acta 87 (1964) 685.
- Kelly, R.G., Peets, E.A., et al.; Anal. Biochem. 2 (1961) 267.
- Kirchner, J.G., Miller, J.M., y Keller, G.J.; Anal. Chem., 23 (1951) 420.
- Kirchner, J.G.; J. Chromatog. 63 (1971) 45,
- Klaus, R.; J. Chromatograph. 16 (1964) 311.
- Knight, H.S.; Anal. Chem. 30 (1958) 2030.
- Knight, C.S.; Nature 199 (1963) 1288.
- Kramer, J.K.G., Schiller, E.O., et al.; Anal. Chem. 36 (1964) 2379.
- Kubelka, P.; J. Opt. Soc. Am. 38 (1948) 448.
- Kynast, G.; Analyt. Chem. 256 (1971) 20.
- Lenk, H.P. ; J. Chromatog. 43 (1969) 350.
- Lenoir, J.; Bull. Soc. Chim. France, 9 (1942) 475.
- Libby, R.A.; Analytic. Chem. 40 (1968) 1507.
- Lichtenberger, W.; Z. Anal. Chem. 185 (1962) 111.
- Lie, K.B., y Nye, J.F.; J. Chromatog. 8 (1962) 75.
- Liebmann, R., y Schuhmann, H.; Chem. Techn. 19 (1967) 693.
- Lüthi, U., y Waser, P.G.; Nature 205 (1965) 1190.
- Macek, K.; J. Chromatog. 33 (1968) 332.
- Mangold, H.K.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 38 (1961) 709.

- Mangold, H.K., y Kammerech, R.; Chem. Ind. (London) (1961a), 27, 1032.
- Marcucci, F., y Mussini, E.; J. Chromatog. 11 (1963) 270.
- Marian, M.; J. Chromatog. 42 (1969) 117.
- Marino, V.S.; J. Chromatog. 46 (1970) 125.
- Markovetz, A.J., y Klug, M.J.; J. Chromatog. 36 (1968) 341.
- Martinek, K.A.; Mikrochim. Acta (Wien) (1971) 877.
- Matthias, W.; Naturwissenschaften 41 (1954) 17.
- Mckibbins, S.W., Goyan, J.E., y Paul, A.G.; J. Chromatog. 5 (1961) 207.
- Milborrow, B.U.; J. Chromatog. 19 (1965) 194.
- Miller, J.M., y Kirchner, J.G.; Anal. Chem. 23 (1951) 428.
- Mitchell, H.K., Gordon, M., y Haskins, F.A.; J. Biol. Chem. 180 (1949) 1071.
- Morgan, M.E.; J. Chromatog. 9 (1962) 379.
- Mori, I., y Chikui, S.; J. Chromatog. 20 (1965) 627.
- Morris, L.J.; Chem. Ind. (London) (1962) 1238.
- Mottier, M., y Potterat, M.; Anal. Chim. Acta 13 (1955) 46.
- Musgrave, A.; J. Chromatog. 41 (1969) 470.
- Muzzarelli, R.A.A.; Talanta 13 (1966) 639.
- Oswald, N., y Flück, H.; Sci. Pharm. 32 (1964) 136.
- Padley, F.B.; J. Chromatog. 39 (1969) 37.
- Peifer, J.J.; Mikrochim. Acta (1962) 529.
- Petit, J., Berger, J.A., et al.; J. Chromatog. 39 (1969) 167.

- Phifer, L.H., y Plummer, H.K. Jr.; Anal. Chem. 38
(1966) 1652.
- Prochazka, Z.; J. Chromatog. 48 (1970) 113.
- Prydz, S., Melo, T.B., y Koren, J.F.; J. Chromatog.
59 (1971) 99.
- Pullan, B.R.; en "Quantitative Paper and Thin-Layer
Chromatography", Editor: Shellard E.J.,
Academic Press. London-New York (1968) 23-133.
- Pumphrey, A.M.; Biochem. J. 102 (1967) 30P.
- Purdy, S.J., y Truter, E.V.; Analyst 87 (1962) 802.
- Purdy, S.J., y Truter, E.V.; Lab. Pract. 13 (1964) 500.
- Raaen, H.P.; J. Chromatog. 44 (1969) 522.
- Radomski, J.L., y Rey, A.; J. Chromatog. Sci. 8 (1970)
108.
- Randerath, K.; "Thin-Layer Chromatography", Academic
Press, New York-London (1963).
- Rink, M., y Hermann, S.; en "Thin-Layer Chromatography"
1^a Ed. Editor: Stahl, E., Springer-Verlag,
Berlin. Academic Press, New York (1965) 468.
- Ritter, F.J., y Meyer, G.M.; Nature, 193 (1962) 941.
- Röder, E., y Mutschler, E.; Arch. Pharm. 303 (1970) 637.
- Röder, E.; en "Progress in Thin-Layer Chromatography
and Related Methods", Vol. II, Editores:
Niederwiser y Pataki, Ann. Arbor (1971) 93-104.
- Rosmus, J., Pavlicek, M. y, Deyl, Z.; en "Thin-Layer
Chromatography", Editor: Marini-Bettolo, Elsevier
Pub. Co., London (1964), 119.
- Roucayrol, J.C., Bergner, J.A., et al.; Intern. J. Appl.
Radiation Isotopes 15 (1964) 671.

- Rybicka, S.M.; Chem. Ind. (London) (1962) 308.
- Salo, T., y Salminen, M.; Suomen Kemistilehti, A 37 (1964) 161.
- Sandroni, S. y Schlitt, H.; J. Chromatog. 52 (1970) 169.
- Schneck, L., Pourfar, M., y Benjamin, A.; J. Lipid Res. 11 (1970) 66.
- Schulze, P.E. y Wenzel, M.; Angew Chem. Inter. Ed. Engl. 1 (1962) 580.
- Schwartz, J.H.; J. Chromatog. 30 (1967) 619.
- Sheen, B.; J. Chromatog. 60 (1971) 363.
- Singh, E.J. y Gershbein, L.L.; J. Chromatog. Science, 8 (1970) 162.
- Snyder, F.; Anal. Biochem. 9 (1964) 183.
- Snyder, F.; Radiois. Sample Meas. Tech. in Medicine and Biology, Sympos. Proceed. Vienna, May 24-28 (1965) (Vienna: IAEA, 1965) págs. 521-533.
- Snyder, F.; Anal. Biochem. 11 (1965a) 510.
- Snyder, F.; Separ, Sci. 1 (1966) 655.
- Snyder, L.R.; Anal. Chem. 39 (1967) 698.
- Snyder, L.R.; Anal. Chem. 39 (1967a) 705.
- Snyder, F., y Cress, E.A.; Clin. Chem. 14 (1968) 529.
- Snyder, F.; "Progress in Thin-Layer Chromatography" and Related Methods" Vol. I. pág. 53, Editores: Niederwieser, A. y Pataki, G., Ed. Ann. Arbor-Humphrey Science Pub., London (1970).
- Stahl, E.; Pharmazie, 11 (1956) 633.
- Stahl, E.; Parfümerie v. Kosm. 39 (1958) 564.
- Stahl, E.; Chemiker-Ztg 82 (1958a) 323.

- Stahl, E.; Arch. Pharm. 292 (1959) 411.
- Stahl, E.; Arch. Pharm. 293/65 (1960) 531.
- Stahl, E.; Angew. Chem. Intern. Ed. 3 (1964) 784.
- Stahl, E.; Chem. Ingr. Tech., 36 (9) (1964a) 941.
- Stahl, E.; "Thin-Layer Chromatography", 1^a Ed., Springer-Verlag, Berlin, Academic Press, New York (1965).
- Stahl, E., y Vollmann, H.; Talanta. 12 (1965a) 525.
- Stahl, E.; J. Chromatog. 37 (1968) 99.
- Stahl, E.; "Thin-Layer Chromatography", 2^a Ed., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969).
- Stanley, W.L., y Vannier, S.H.; J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.; 40 (1957) 582.
- Stegemann, H., y Lerch, B.; Anal. Biochem. 9 (1964) 417.
- Stupnicki, R., y Stupnicka, E.; J. Chromatog. 21 (1966) 150.
- Stutz, M.H., Ludemann, W.D., y Sass, S.; Analytic. Chem. 40 (1968) 258.
- Szekely, G.; J. Chromatog. 48 (1970) 313.
- Taquitani, S., y Matsuda, K.; Bunseki Kagaku, 14 (1965) 479, Ref. C.A. 63 (1965) 122956.
- Taylor, I.S.; J. Chromatog. 37 (1968) 120.
- The Radiochemical Centre; "Radiochemicals", Amersham (1975) 6.
- Tiselius, A., Drake, B., y Hagdahl, L.; Experientia, 3 (1947) 21.
- Tocci, P.; Chrom. Symp. Bruxelles (1970) 222.
- Tore, J.P.; J. Chromatog. 12 (1963) 413.

- Truter, E.; J. Chromatog. 14 (1964) 57.
- Tsujino, Y., Imai, Y., et al.; J. Chromatog. 42 (1969) 419.
- Treiber, L.R., Nordberg, R., y Lindstedt, S.; J. Chromatog. 63 (1971) 211.
- Tsuda, T., Tokoro, N., y Ishii, D.; J. Chromatog. 46 (1970) 241.
- Turina, S., Marjanovic, V., et al.; Anal. Chem. 36 (1964) 1905.
- Turina, S., y Jamnicki, V.; Anal. Chem. 44 (1972) 1892.
- Visser, R.; Analytica Chim. Acta 38 (1967) 157.
- Wachter, H., Gütter, W., et al.; Z. Analyt. Chem. 248 (1970) 331.
- Wagner, H., Hörhammer, L., y Wolff, P.; Biochem. Z., 334 (1961) 175.
- Weissberger, A., Proskaver, E.S., et al.; "Organic Solvents", Interscience Pub. Inc., New York (1955) 2ª edic., pág. 219.
- Wieland, Th., y Determann, H.; Experientia, 18 (1962) 431.
- Winterstein, A., Studer, A., y Rüegg. R.; Chem. Ber. 93 (1960) 2951.
- Wollenweber, P.; J. Chromatog. 7 (1962) 557.
- Wood, B.A.; en "Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography", Editor: Shellard, E.J. Academic Press. London-New York (1968) 107-118.
- Zechmeister, L., Von Cholnoky, L., y Ujhelyi, E.; Bull. Soc. Chim. Biol., 18 (1936) 1885.
- Zeeuw, R.A.; Analytic. Chem. 40 (1968) 2134.
- Zeeuw, R.A.; J. Chromatog. 32 (1968a) 43.

INDICE DE FIGURAS

	<u>SITUACION</u> <u>posterior a página</u>
Figura 1. Trazado sobre la capa. Primer revelado.....	54
Figura 2. Revelados intermedio y segundo.....	54
Figura 3. Tercer revelado.....	55
Figura 4. Disposición del adsorbente en la placa.....	70
Figura 5. Diferentes tipos de curvas estudiados.....	71
Figura 6. Diferentes estrechamientos estudiados.....	72
Figura 7. Comparación con otros métodos cromatográficos.....	74
Figura 8. Montaje para el paso del gas por la cámara cromatográfica.	85
Figura 9. Cámara cromatográfica.....	86
Figura 10. Distancia de retención (d_R) en función de la temperatura del saturador (metanol).....	91
Figura 11. Distancia de retención (d_R) en función de la altura del disolvente en el saturador (metanol).....	93
Figura 12. Distancia de retención (d_R) en función de la temperatura de la cámara.....	93
Figura 13. Distancia de retención (d_R) en función del tiempo de revelado.....	94
Figura 14. Distancia de retención (d_R) en función del caudal del gas portador.....	95
Figura 15. Influencia de las dimensiones de la altura de la cámara (A_0) sobre la distancia de retención (d_R).....	96
Figura 16. Cámara cromatográfica provista de tubo G-M.....	110

Figura 17. Pureza radioquímica del acetato sódico ^{14}C -1.....	117
Figura 18. Métodos <u>a</u> , <u>b</u> , <u>c</u> y <u>d</u>	121
Figura 19. Métodos <u>e</u> , <u>f</u> , <u>g</u> y <u>h</u>	122
Figura 20. Métodos <u>i</u> , <u>j</u> , <u>k</u> y <u>l</u>	123
Figura 21. Métodos <u>m-1</u> , <u>m-2</u> , <u>n</u> y <u>p</u>	124
Figura 22. Variación del R_f con la temperatura.....	124
Figura 23. Soporte y columna.....	131
Figura 24. Aplicación de la solución sobre el comprimido.....	138
Figura 25. Elución de los comprimidos....	151
Figura 26. Cromatografía descendente.....	151
Figura 27. Cromatografía en flujo continuo ascendente.....	152
Figura 28. Comparación entre diferentes tipos de capas.....	155