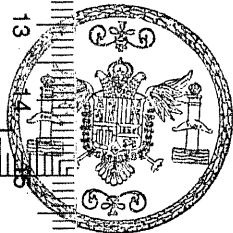


D DISCURSO
DE
A P E R T U R A

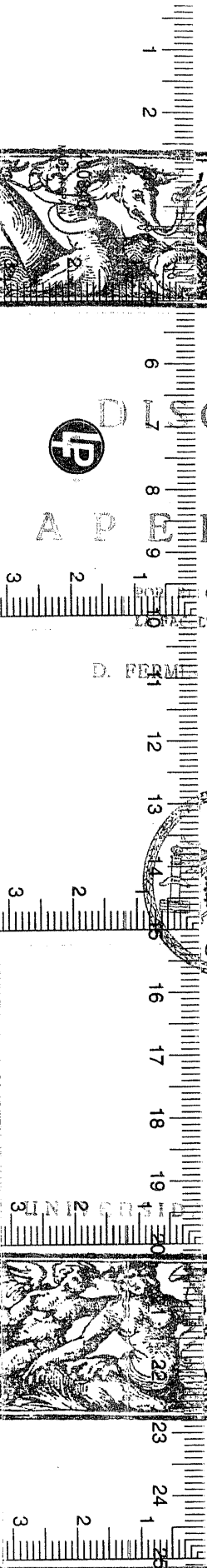
CATEDRÁTICO DE
LOCALIDAD DE CIENCIAS
D. FERMÍN CAPITAN GARCIA

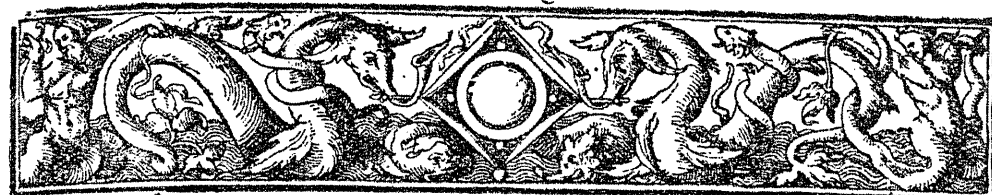


UNIVERSIDAD DE GRANADA

1956

1957

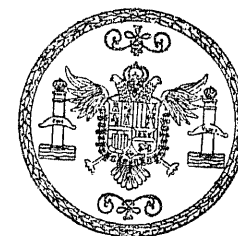




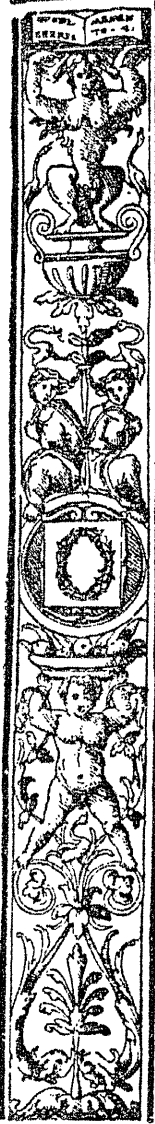
DISCURSO
DE
A P E R T U R A

POR EL CATEDRÁTICO DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS

D. FERMIN CAPITAN GARCIA



UNIVERSIDAD DE GRANADA



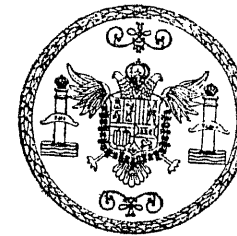
ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRFIA ACTUAL

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS	
LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA	
CROMATOGRAFÍA	
N.º	C
Fecha	8/8
Operario	24

DISCURSO
DE
A P E R T U R A

POR EL CATEDRÁTICO DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS

D. FERMÍN CAPITÁN GARCÍA



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>29544</u>
N.º Copia <u>243371</u>

EXCELENTÍSIMO SEÑOR RECTOR MAGNÍFICO:

ILUSTRÍSIMAS AUTORIDADES:

SEÑORES PROFESORES Y ALUMNOS:

SEÑORAS Y SEÑORES:

LA amplitud extraordinaria alcanzada en general por los conocimientos científicos y en particular por los que integran la Química, ha traído como consecuencia la necesidad —que alcanza a los que nos dedicamos al estudio de cualquiera de las múltiples ramas que la componen— de una especialización, merced a la cual nos es posible ir siguiendo, y no sin esfuerzo muchas veces, los avances ininterrumpidos de la parte específicamente concreta de la misma, que cultivamos.

Esta obligada especialización impone una dedicación, de tal manera polarizada, que impide, de no poseer facultades excepcionales, el conocimiento preciso para el tratamiento no superficial de cualquier materia ajena a las propias del campo especializado a que nos dedicamos.

Es por ésto por lo que al tratar de elegir el tema que había de servirme para componer esta Lección Inaugural, hube de limitarme a seleccionarlo entre los que caen de lleno dentro del campo de la Química Analítica.

A la elección en concreto del tema que a continuación desarrollaremos, me movió por otra parte el convencimiento de que entre las distintas técnicas que estudia el Análisis Químico, acaso ninguna ha alcanzado en pocos años un tan exuberante crecimiento y ha prestado servicios tan relevantes, tanto al químico como al farmacéutico o médico, como la Cromatografía. Intentar sin embargo dar a conocer las variantes que de la misma se conocen o los servicios que presta al desarrollo científico actual hubiera traído como consecuencia, o una desmesurada extensión de esta Lección, o un estudio tan ligero y superficial que acaso hubiera sido impropio del Acto que nos congrega. Para evitar ambas consecuencias, en la medida de lo posible, y con la intención de prestar un modesto servicio a los que sientan algún interés por esta técnica, he limitado el Tema al estudio de una parte de la Cromatografía de la que no existen antecedentes en la bibliografía nacional, estudio que desarrollaremos bajo el título de «Antecedentes de la Cromatografía actual».

Antes de entrar, sin embargo, en el desarrollo de este tema, quisiera detenerme para cumplir gustoso con la amable tradición de despedir a los compañeros que cesaron en sus tareas universitarias y saludar, dándoles la bienvenida, a los recién incorporados a ellas.

Durante el curso 1955-1956, el Claustro de Catedráticos de esta Universidad ha perdido alguno de sus miembros, pero ninguno en forma irreparable. Dos de nuestros mejores Profesores, D. Emilio Langle Rubio y D. Miguel Guirao Gea, se han visto apartados de sus ocupaciones docentes por el forzoso imperativo de la jubilación. Creo representar el sentir unánime de cuantos tenemos el honor de ser sus compañeros, al testimoniar hoy públicamente nuestro sincero y respetuoso cariño por quienes, en una fecunda y dilatada labor universitaria, supieron ser Maestros ejemplares y excelentes amigos. Y pido a Dios conserve sus vidas largos años, para que, con su sabio consejo y aliento, nos ayuden a seguir el camino que ellos supieron trazarnos.

Debemos lamentar, así mismo, la ausencia de D. Vicente Villar Palasí, quien después de regentar la Cátedra de Bioquímica de la

Facultad de Farmacia ha sido trasladado por voluntad propia a la Universidad de Barcelona.

Con gran satisfacción debo consignar, por otra parte, la incorporación a esta Universidad de D. Sebastián Mariné Bigorra, que viene a ocupar la Cátedra de Lengua y Literatura latinas en la Facultad de Filosofía y Letras, y la de D. Ricardo Granados Jarque, trasladado, por concurso de la Universidad de Valladolid, en cuya Facultad de Ciencias ha sido titular de Química Orgánica y Decano de la misma, quien regentará la cátedra del que fué nuestro querido e inolvidable compañero D. Gonzalo Gallas Novás.

Al darles la bienvenida en nombre de esta Universidad, les deseo de corazón el éxito a que les hace acreedores su brillante historial universitario.

LA mayor parte de los libros y publicaciones dedicados a la técnica de trabajo que conocemos con el nombre de Cromatografía, publicados hasta hace muy pocos años, han venido citando como iniciador de la misma al botánico ruso Miguel Tswett.

A esta creencia general contribuyó en gran manera la opinión de L. Zechmeister quien en el año 1948 escribía (1): «Mientras que la

(1) L. Zechmeister, «History, Scope and Methods of Chromatography», *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 49, 145 (1948).

historia de la cristalización o de la destilación no pueden derivarse a partir de una fuente única, la Cromatografía se basa en un único principio y su inventor es un solo hombre: el principio se halla en el paso de una disolución a través de una columna adsorbente y el inventor es Miguel Tswett».

Si esta creencia fuera cierta, la Cromatografía sería actualmente una técnica de alcance muy limitado y su Historia habría de iniciarse relatando la vida y obras del mencionado investigador ruso. Mas no es así. Hoy, como iremos viendo en el transcurso de esta Lección, la Cromatografía constituye una amplísima técnica en la que se reúnen variantes muy diversas basadas en principios totalmente distintos y su origen se halla, no en la obra de un investigador, sino en la de diversos autores que vivieron muchos años antes de que Tswett iniciara su obra.

A esta variación de criterio han contribuido, por una parte, la labor investigadora de unos cuantos autores que bien pueden considerarse como los primeros Historiadores de esta técnica y entre los cuales debe destacarse, dada la calidad de su obra, los nombres de T. I. Williams, H. Weil y L. Zechmeister, y por otra, la variación que en el transcurso de estos últimos años ha experimentado el concepto de Cromatografía.

—=—

El «Universal English Dictionary» de Bayley editado en el año 1731 define «Chromatography» como «a treatise on colour», es decir, como «tratado acerca del color». En este mismo sentido la utiliza otro autor inglés G. Field en su libro titulado «Chromatography; or a Treatise on Colours and Pigments and of their Power in Painting etc.», publicado en Londres en 1835 (2), sentido que le asigna así mismo el «New Standard Dictionary of the English Language» publicado en 1849 por Funk y Wagnall, obra en la que se designa con el nombre de «Chromatograph» el instrumento empleado para producir diferentes colores por rotación de un disco parcialmente coloreado (3).

(2) Citado por H. Weil en «Farbenchromatographie», *Farbe u. Lack* 59, 128 (1953).

(3) H. Weil y T. I. Williams, «Definition of Chromatography», *Nature* 170, 503 (1952).

Holmes utiliza en 1860 la palabra «Chromatograph» como un verbo que significa «to represent in colour», es decir, «representar en color».

Sorby, uno de los primeros investigadores en el campo de los pigmentos vegetales introduce en 1873 la palabra «Chromatology» para designar su técnica de separación de pigmentos por partición diferencial y ulterior análisis espectroscópico de los componentes existentes en los extractos coloreados (4).

Acepciones todas ellas completamente distintas a la que actualmente tenemos como representativa de Cromatografía.

—=—

En los años 1906-1910, publicó M. Tswett una serie de trabajos en los que describió un nuevo procedimiento de análisis cuyo fundamento puede resumirse en la siguiente experiencia:

Si se toma un estrecho tubo de vidrio y una vez lleno de carbonato cálcico finamente pulverizado, se hace pasar a su través la disolución obtenida al extraer los pigmentos coloreados existentes en las hojas verdes mediante éter de petróleo o ligroína, puede observarse que, a medida que la disolución va percolando, se van formando en la columna de carbonato cálcico zonas o bandas diferentemente coloreadas, de tal forma, que en la parte superior de la misma aparece una banda amarilla seguida a corta distancia por dos zonas verdes, debajo de las cuales aparecen tres bandas amarillas.

Cuando, terminado el paso del extracto a través de la columna, se hace pasar por la misma el disolvente que se utilizó en su preparación—éter de petróleo en el ejemplo citado—, es de observar que las zonas se definen mejor, delimitándose sus contornos más claramente. Para separar las zonas observadas basta extraer la columna de su envoltura cilíndrica de vidrio y proceder a cortarla mecánicamente, pudiéndose recuperar los pigmentos que la constituyen por extracción mediante un disolvente adecuado.

Hemos de destacar aquí dos hechos importantes. En primer lugar el que Tswett atribuyera—acertadamente—el fundamento de su método a una adsorción selectiva del carbonato cálcico frente a los distintos pigmentos existentes en la disolución. Y en segundo, el que la

(4) H. C. Sorby. «On comparative vegetable Chromatology». *Proc. Roy. Soc. London* 21, 442 (1873).

experiencia le sirvió para separar los distintos pigmentos *coloreados* existentes en las hojas verdes.

Sin duda por esto último y acaso influido por la denominación con que Sorby había designado su propio método, propuso en 1906 (*) para la nueva técnica analítica la denominación de «cromatografía», basándose, al mismo tiempo, en el significado etimológico de esta última palabra o el de «análisis cromatográfico por adsorción», al tener en cuenta el fenómeno que fundamenta la experiencia (**).

El mismo Tswett propuso el nombre de «cromatograma» para designar la serie de bandas coloreadas que aparecen en la columna del adsorbente y el de «desarrollo» para el paso de disolvente puro a través de la misma.

Para una mejor comprensión de la variación experimentada por el concepto de Cromatografía, veamos a continuación las características que para Williams y Weil (5) posee el «Análisis Cromatográfico de Tswett»:

- 1.º Es un proceso discontinuo.
- 2.º Lo integran distintas etapas sucesivas.
- 3.º Requiere el uso de un tubo de vidrio de diámetro relativamente pequeño.
- 4.º Existen en el proceso dos fases, la fase sólida estacionaria y la líquida móvil.
- 5.º El tubo ha de llenarse con la fase sólida en forma finamente dividida.
- 6.º La fase líquida varía en composición, ya que es una disolución durante una parte del proceso y un líquido puro posteriormente.

(*) M. Tswett. «Physikalisch - Chemische Studien über das Chlorophyll. Die adsorptionen» *Ber. Dtsch. bot. Ges.* 24, 316 (1906).

M. Tswett. «Adsorptionsanalyse und Chromatographische Methode Anwendung auf die chemie des chlorophylls» *ibid.* 24, 384 (1906).

(**) Algunos autores tales como Weil y Williams, han querido ver en esta denominación una posibilidad de que Tswett conociera otros métodos cromatográficos de distinto fundamento, por lo que para distinguirlos del que comentamos, agregaría a su primitiva denominación la expresión «por adsorción».

(5) T. I. Williams y H. Weil. «The phases of Chromatography» *Ark. för Kemi* 5, Nr. 27, 283 (1953).

- 7.º La fase sólida posee una adsorción diferencial sobre los sólidos existentes en la disolución que se cromatografía.
- 8.º La resolución de la mezcla se lleva a cabo en dos etapas sucesivas, siendo la primera de ellas la percolación de la disolución a través de la columna del adsorbente, operación que es evidentemente una filtración adsorptiva y constituyendo la segunda el proceso del «desarrollo».
- 9.º La extracción y corte de la columna seguida del proceso de elución de cada uno de los pigmentos existentes en las bandas formadas.

Este concepto de Cromatografía es el que se aceptaba como único hasta hace muy pocos años y era el que admitía así mismo Zechmeister cuando escribía en 1948 las palabras con que iniciamos esta exposición. Si este concepto fuera el actual, podría afirmarse sin duda alguna que Tswett fué el iniciador de la Cromatografía.

— — —

Más como anteriormente dijimos el actual concepto de Cromatografía, no es en modo alguno el que Tswett ideara. Hoy su método no es más que una parte, y no la más importante, de las que integran la técnica que, a falta de mejor nombre, continuamos llamando Cromatografía.

Para poder seguir adecuadamente esta variación de concepto nos bastará acudir a las definiciones propuestas para la Cromatografía por los investigadores más destacados en el campo de esta técnica.

En opinión de Feigl (6) «el término Cromatografía se debe reservar para aquellos casos en los que las zonas producidas en una columna de adsorción son directamente reconocibles, bien por sus propias coloraciones (en luz visible o ultravioleta) o haciendo actuar sobre ellas reactivos adecuados (por paso de éstos a través de la columna o utilizándolos previo aislamiento) y en el caso de que mediante esta operación se alcance un objetivo analítico». «Las zonas de adsorción que poseen coloraciones propias o las que se las deben al desarrollo mediante un tratamiento adecuado, son verdaderos cromatogramas y su evaluación con fines cuantitativos constituye la Cromatogrametría».

(6) F. Feigl, *Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions*, Academic Press. Inc., Pub. New York (1949) p. 610.

Esta opinión de Feigl, así como la anteriormente citada de Zechmeister, representarían una de las tendencias respecto al significado y alcance que puede tener la Cromatografía, la cual quedaría reducida única y exclusivamente a la Cromatografía de Tswett.

Este concepto es, sin embargo, en opinión de otros autores, excesivamente restringido. Y así, Gordon, Martín y Synge (7) la definen «como un procedimiento técnico de análisis, por percolación de un fluido a través de una materia finamente dividida o porosa, sin distinción de los procesos fisicoquímicos que conducen a la separación de sustancias en el aparato utilizado».

El campo de la Cromatografía se ha ampliado considerablemente. Ya pueden considerarse como procesos cromatográficos los basados en la utilización de procesos distintos de la adsorción y hablarse de Cromatografía de reparto, Cromatografía por cambio iónico, etc. Subsiste sin embargo la necesidad de que la operación se realice utilizando un lecho poroso.

Opinión que ratifica Martín (8) en 1950, al afirmar que «la esencia del método cromatográfico es la percolación uniforme de un fluido a través de una columna de sustancias más o menos divididas, columna que retiene de una manera selectiva, mediante mecanismos diversos, ciertos componentes del fluido».

Para Strain (9) el concepto es todavía más amplio al proponer la siguiente definición: «Cromatografía es la técnica analítica que permite la resolución de solutos y en la que la separación se realiza por migración diferencial en un medio poroso, siendo originada la migración por flujo de un disolvente». En otra ocasión (10) Strain, vuelve a proponer la misma definición con el aditamento: «siendo la migración producida por un *potencial eléctrico* o por flujo de un líquido o un gas».

Tiselius (11) opina: «los principios en que se basan las separaciones cromatográficas, deben ser capaces de generalización en dife-

(7) Gordon A. J. P. Martín y R. L. M. Synge. *Biochem. J.* 38, 65 (1944).

(8) A. J. P. Martín *Ann. Rev. Biochem.* 19, 517 (1950).

(9) Strain «Inorganic chromatography little used, seen widely applicable in qualitative Analysis», *Chem. Eng. News*, 30, 1372 (1952).

(10) Strain «Chromatography and analogous differential Methods». *Anal. Chem.* 24, 50 (1952).

(11) A. W. R. Tiselius «Some recent advances in Chromatography» *Endeavour* 11, 5 (1952).

rentes direcciones, las cuales en algunos casos pueden conducir a la creación de nuevos métodos de separación. Cualquier proceso que pueda inducir a una zona de una sustancia a moverse a lo largo de una columna (o dispositivo similar) en una extensión que tenga alguna relación con sus propiedades específicas físicas o químicas, se puede utilizar a estos fines».

El concepto de Cromatografía así considerado es mucho más amplio. Comprende tanto la Cromatografía destinada a usos analíticos como la que persigue objetivos industriales. Desaparece la obligatoriedad de una percolación como etapa primera e incluso la necesidad de un flujo que motive la migración en un sentido definido. Desaparece también la necesidad de determinar cuál es la fase estacionaria y cuál la móvil. Se pueden incluso calificar como cromatográficos los procesos en los que se pretende separar son mezclas gaseosas o líquidas.

Incluso Zechmeister (12) modificando su primitivo criterio, amplía extraordinariamente su concepto de la cromatografía al establecer que «La cromatografía abarca aquellos procesos que permiten la resolución de mezclas de solutos por fijación selectiva y liberación ulterior sobre la superficie de un portador con ayuda de una corriente de disolvente que actúa en una dirección definida».

Esta definición de Zechmeister se halla en desacuerdo con los principios preconizados por Tiselius únicamente en dos puntos: en la necesidad de una fijación y liberación selectiva sobre una superficie sólida y en la necesidad de la ayuda de un fluido que actúe en una dirección definida.

Williams y Weill (3) proponen en cambio una modificación de la misma en que desaparecen estas discrepancias y en la que se cumplen por tanto los principios de Tiselius. Dice así su definición: «La cromatografía comprende aquellos procesos que permiten la resolución de mezclas, efectuando la separación de alguno o de todos sus componentes en zonas de concentración o en fases diferentes de aquellas en la cual estaban originalmente presentes, independientemente de la naturaleza de la fuerza, o fuerzas, causantes de que las sustancias se muevan de una fase a otra».

Esta definición de Williams y Weill es, sin duda alguna, la más amplia de las propuestas hasta la fecha, ya que no solamente cubre

(12) L. Zechmeister «Progress in Chromatography 1938-1947». Londres, 1950, pág. 30.

el campo hasta la fecha explorado en los dominios de la Cromatografía, sino que alcanza incluso a las modificaciones que se han citado hasta el momento como simples posibilidades teóricas.

Esta definición es la más comunmente admitida en la actualidad y es la que aceptamos así mismo nosotros, tomándola como base para el desarrollo del tema que nos ocupa.

La amplitud extraordinaria de la Cromatografía actual queda perfectamente de manifiesto, a nuestro entender, si se consideran los tipos que Meinhard (13) estableció como posibles para la misma en 1949, y que resume en la tabla siguiente:

TABLA DE MEINHARDT

MODO PRIMARIO DE ACCIÓN	CLASE	TIPO DE INTERACCIÓN		FENOMENO REPRESENTATIVO
		FASE MÓVIL	FASE SÓLIDA	
Iónico (Producto de solubilidad, cte. de inestabilidad, etc.)	1	Iones	Iones	Cambio iónico
	2	Complejos	Iones	Cambio iónico
	3	Iones	Complejos	Cromatografía inorgánica
	4	Complejos	Complejos	No conocido en la práctica
	5	Iones	Dispersión	Métodos de descomposición fraccionada
	6	Complejos	Dispersión	Métodos de descomposición fraccionada
	7	Dispersión	Dispersión	Difusión de coloides, macromoléculas
	8	Iones	Asociación	Electrocinética
	9	Dispersión	Iones	No conocido en la práctica
	10	Dispersión	Complejos	No conocido en la práctica
No iónico (Puente de Hidrógeno, dipolo o dipolo inducido, coeficiente de reparto)	11	Asociación	Asociación	Cromatografía orgánica (y de partición)
	12	Asociación	Dispersión	Polimización catalítica
	13	Asociación	Iones	Disociación catalítica
	14	Asociación	Complejos	No conocido en la práctica
	15	Complejos	Asociación	No conocido en la práctica
	16	Dispersión	Asociación	Adsorción «salting-out».

(13) J. E. Meinhard «Chromatography: A perspective». *Science* 110, 387 (1949).

Esta relación que fué considerada como revolucionaria en su tiempo es hoy, en opinión de Weil y Williams (5), mas bien insuficiente para cubrir el campo de las posibilidades teóricas de la actual Cromatografía.

El concepto de Cromatografía se ha ampliado hoy, por lo tanto, en forma tal, que la Cromatografía clásica, la de Tswett, solo constituye una minúscula parte, acaso la menos importante dentro de aquélla. De ello se ha derivado otra dificultad: la del nombre que debiera darse a esta técnica. Ya dijimos anteriormente que Tswett fué quien, acaso influido por la palabra Chromatology con que Sorby designó su propia técnica, propuso la denominación de Cromatografía. Tswett la empleó en principio para la separación de mezclas de sustancias coloreadas, por lo que atendiendo a su significado etimológico la denominación era correcta. Sin embargo el mismo Tswett y muchos otros investigadores posteriores la aplicaron, y sigue aplicándose, a la resolución de mezclas incoloras con lo que desaparece evidentemente la precisión de la denominación. Tampoco es hoy preciso el significado de la denominación «Análisis Cromatográfico por adsorción» con que designó así mismo Tswett a su técnica, ya que aparte de la razón apuntada, en el actual significado son muchos los procesos cromatográficos cuyo fundamento no se halla en la adsorción, sino en procesos tan completamente distintos como el cambio iónico o el reparto de un soluto entre fases distintas. Para remediar este defecto se han propuesto otras denominaciones.

Así por ejemplo Campbell-Gamble (14) propone, en carta publicada en la revista «Chemistry and Industry», la sustitución de «análisis cromatográfico por adsorción» por «tswettanalysis» o «tswetsorbanalysis», es decir, análisis de Tswett, «en honor de su descubridor».

Williams (15) se muestra partidario de conservar la denominación de «análisis cromatográfico» para recordar que el proceso (no siempre) es análogo a aquél para el que Tswett propuso el nombre, pero sustituyendo «adsorción» por «sorción» ya que, según su opi-

(14) D. J. Campbell-Gamble, *Chemistry and Industry*, 59, 598 (1940).

(15) T. I. Williams. «Recent Advances in Chromatographic Sorption Analysis». *Research*, 1, 400 (1947-1948).

nión, este término parece cubrir todos los procesos utilizados independientemente de la fuerza que actúa. El nombre de Cromatografía sería sustituido en consecuencia por el de «análisis cromatográfico por sorción».

Strain (16) recaba para esta técnica el nombre de «eografía» teniendo en cuenta que «dado el amplio uso de los métodos cromatográficos para la resolución de mezclas, sería menos ambiguo un nombre que indicara resolución en componentes más pequeños, que una denominación cuyo uso parece implicar la existencia de color».

Brimley y Barrett (17) han propuesto recientemente el nombre de «partición cinética» en atención a que «el proceso es un reparto entre dos sistemas, líquidos de ordinario, uno de los cuales se mueve con respecto al otro», aunque como ellos mismos indican «el término Cromatografía está tan firmemente establecido que es sumamente difícil desplazarlo».

De entre todos los nombres citados, únicamente los propuestos por Brimley y Barrett o por Strain, es decir, los de «análisis por partición cinética» o de «eografía» salvarían los inconvenientes apuntados.

Sin embargo ninguna de estas denominaciones ha prosperado, por lo que a pesar de que el uso del término Cromatografía conduce a expresiones tan impropias como la de «cromatograma incoloro», se sigue utilizando y es de suponer que definitivamente, para designar la técnica cuyos antecedentes vamos a estudiar.

(16) H. H. Strain. «Chromatography». *Anal. Chem.* 22, 41 (1950).

(17) R. C. Brimley y F. C. Barrett, *Practical Chromatography*, 2.^a Imp. Reinhold Pub. Corporation, New York, 1954, pág. 12.

En la Historia de la Cromatografía se pueden distinguir según Weil y Williams (18), tres períodos fundamentales: 1) Período empírico, en el que se utiliza la técnica con fines analíticos o técnicos bajo un punto de vista exclusivamente práctico. 2) Período científico, en el que se estudia sistemáticamente y se aplica con fines fundamentalmente científicos, y 3) Período tecnológico, en el que se halla actualmente, y en el que en posesión de los abundantes datos aportados por las investigaciones del período anterior, se intenta la aplicación de la técnica cromatográfica a los problemas técnicos, con un criterio científico.

No puede afirmarse en modo alguno que estas tres épocas estén perfectamente delimitadas y que se inicie un período justamente donde acaba el anterior. Así por ejemplo, es difícil precisar donde termina el período empírico y cuando empieza el científico y forzoso es admitir que tanto en el período científico como en el tecnológico se utilizan procedimientos empíricos cuya base científica no se ha conseguido precisar.

A nuestro parecer, el punto de partida de lo que podríamos llamar la Cromatografía actual, —en la que en posesión de los datos aportados por las anteriores investigaciones se inicia verdaderamente el desarrollo de los métodos y variantes que le permiten una eficacia real— se halla para la Cromatografía en papel, en los trabajos de Consden, Gordon y Martin (19), publicados en el año 1944 y para la Cromatografía en columna, en los de Kuhn y Lederer (20) con los que en 1931 renace, y casi podríamos decir se inicia, el interés por esta técnica.

Por ello y teniendo en cuenta el tema elegido para esta Lección, únicamente haremos mención aquí de los trabajos que integran el período empírico y el científico, y dentro de este último, en lo que

(18) H. Weil y T. I. Williams. «Der Ursprung der Papierchromatographie», *Naturwiss.* 40, 1 (1953).

(19) R. Consden, A. H. Gordon y A. J. P. Martin «Qualitative Analysis of Proteins: A partition Chromatographic Method», *Biochem. J.* 38, 224 (1944).

(20) R. Kuhn y E. Lederer «Zerlegung des Carotins in seine Komponenten (Über das Vitamins des Wachstums. I. Mitteil, *B.* 64, 1349 (1931).

concierna a la cromatografía en papel, de los publicados con anterioridad a 1944, y en lo referente a la cromatografía en columna, a los anteriores a 1931, limitándonos después a una breve mención de los trabajos posteriores a esta fecha, cuyo estudio facilitan, por otra parte, los numerosos libros modernos consagrados al estudio de esta técnica (*).

PERIODO EMPIRICO

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La noticia más antigua acerca del uso del papel como soporte para una reacción de identificación, se debe a Plinio (21), el cual 23 a 79 años antes de Jesucristo describe un procedimiento para determinar la presencia de sulfato ferroso en el *verdigris* utilizando como reactivo un papel saturado con extracto de agallas, en los siguientes términos:

«El Verdigris de Rodas se halla a veces adulterado con mármol pulverizado pómez o goma. Sin embargo la adulteración que tiene mas éxito es el negro de zapatero» (sulfato ferroso) «ya que los demás adulterantes a diferencia de éste se pueden poner de manifiesto por la sensación sabulosa que producen cuando se muelen con los dientes. La presencia del negro de zapateros se puede demostrar colocando una porción del verdigris en un papiro previamente impregnado con extracto de agallas, el cual se ennegrece inmediatamente en presencia del adulterante».

En la práctica rutinaria realizada por los fabricantes de colorantes pueden encontrarse, así mismo, antecedentes de la cromatografía en papel. Schultz (22) menciona a este respecto tres ensayos distintos:

(*) Al final de este trabajo y a manera de Apéndice, damos una relación de los libros publicados en estos últimos años.

(21) K. C. Bayly. «The Elder Pliny's Chapters on Chemical Subjects». Vol. 2, pág. 41, Londres, Edward Arnold, 1929. Citado por H. Yagoda «Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry» *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 9, 79 (1937).

(22) G. Schultz, Die Chemie des Steinkohlenteeres Braunschweig 1882. Citado por Weil «The evolution of paper Chromatography. I-Radial Paper Chromatography». *Kolloid Z.* 132, 149 (1953).

En el primero de ellos se coloca la mezcla de colorantes sobre un pedazo de papel, y se hace gotear agua sobre aquélla, con lo que tiene lugar una tosca separación. Otro tipo de ensayo consiste en colocar la substancia objeto del análisis sobre un papel de filtro humedecido, con lo que se consigue la producción de zonas coloreadas.

El tercer tipo de ensayo se practica colocando una pequeña cantidad de la substancia a investigar entre dos placas de vidrio. Al hacer circular agua entre las placas tiene lugar una cierta separación de los componentes de la mezcla.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Está establecido (23) (24) el hecho de que ya hacia el año 1850 se utilizaba en Alemania un procedimiento para la decoloración de aceites de origen tanto vegetal como animal, en el cual, acaso puede verse un antecedente de los métodos cromatográficos. Consistía este procedimiento, en esencia, en mezclar íntimamente el aceite con determinadas tierras de tipo básico como la llamada «Moosburger Tonerde» (Tonsil), procedimiento por mezcla que fué al parecer modificado en algunas ocasiones sustituyéndolo por una técnica de filtración a través de recipientes rellenos de tierra decolorante. No puede asegurarse sin embargo que la acción decolorante que así se conseguía fuera realmente debida a un proceso de adsorción, ya que cabe la posibilidad de que las substancias que quedaban retenidas en las tierras decolorantes lo hicieran por reacción química con las mismas.

En realidad, tales procedimientos deben calificarse, a nuestro entender, como de filtración por adsorción y no como verdaderos procesos cromatográficos, entre cuyos procesos existe una clara diferencia que ha sido expresada por Williams (25) en términos parecidos a los siguientes: En la filtración por adsorción se deja percolar un líquido a través de un adsorbente dispuesto en forma de columna, cilindro, disco u otra forma conveniente, con lo que se

(23) H. Weil, «Industrial Petroleum Chromatography. I. Principles and Origin» *Petroleum* 14, 5 (1951).

(24) H. Weil, «Die Anfänge der Chromatographie» *Chemiker Ztg.* 78, 419-423, 496-499 (1954).

(25) T. Williams, «Industrial Chromatography and adsorptive filtration» *Manuf. Chem.* 20, 16 (1949).

consigue la resolución de la mezcla (disolución) en dos fracciones únicamente: el filtrado que fluye una vez atravesado el adsorbente y el material que éste retiene. La Cromatografía, en cambio, es un proceso muy diferente, ya que en ella no solo puede variar la composición del filtrado a lo largo del proceso —lo que tiene lugar especialmente en el procedimiento que ha sido denominado del Cromatograma líquido—, sino que, además, las substancias retenidas por el adsorbente —o substancia que actúe en forma similar aunque lo haga con fundamento distinto— se encuentran, terminado el proceso, separados espacialmente en el mismo soporte.

En realidad es muy difícil precisar en ciertos casos hasta donde llega la filtración por adsorción y en donde empieza una verdadera Cromatografía.

Aun admitiendo sin embargo la distinción de Weil, es a nuestro entender evidente, que los procedimientos utilizados para la decoloración de aceites o petróleos no pueden considerarse como claros antecedentes de la Cromatografía, sino que deben calificarse como de simples filtraciones por adsorción y que únicamente admitiendo la Cromatografía en su más amplio sentido, pueden considerárseles como comprendidos en ella.

PERIODO CIENTIFICO

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Aun cuando como apuntamos anteriormente, es extraordinariamente difícil señalar el momento en que, terminado el período empírico, se inicia el científico, creemos, de acuerdo con Weil y Williams, que el límite histórico entre ambas épocas viene delimitado por la aparición de los trabajos debidos al químico alemán Friedlieb Ferdinand Runge, a quien debe considerársele sin ningún género de dudas como el creador, al menos, de la técnica conocida actualmente con el nombre de Cromatografía en papel radial.

Dado el interés que a nuestro juicio presenta la figura de este eminente químico alemán y creyendo que toda colaboración a un mayor conocimiento de su obra puede contribuir a paliar en cierto

modo el olvido casi absoluto (*) en que se le ha tenido, hasta hace muy poco tiempo, por los historiadores de la Química, hemos creído que acaso pueda ser interesante el intentar trazar aquí un breve esbozo de su vida y de sus obras (26).

Vida y obras de Friedlieb F. Runge

Friedlieb Ferdinand Runge nació el 8 de febrero de 1794 en Billwarder pueblecito cercano a Hamburgo. Pocos datos tenemos que hagan referencia a los primeros años de su vida.

Se sabe, sin embargo, que tras permanecer seis años como aprendiz de la Farmacia de Lübeck, inició en 1816, en Berlín sus estudios de Medicina, que prosiguió en Göttingen dos años más tarde donde fué discípulo de Stromeyer (27) y adquirió sus primeros conocimientos en las técnicas que habían de conducirle a sus brillantes investigaciones en el dominio de la Química. Transcurrido un semestre prosiguió sus estudios en Jena en donde terminó su doctorado en Medicina con una disertación sobre la belladona (1819) cuya acción midriática había observado en su estancia en Lübeck.

En Jena estudió química analítica con J. W. Döbereiner (28) el consejero químico de Goethe, prosiguiendo en esta ciudad sus inves-

(*) Debe mencionarse el hecho de que Karrer en su conocida obra «Tratado de Química Orgánica», Manuel Marín, Barcelona, 1942, traducido por el Profesor Torres de la 4.^a Ed. alemana y en el pequeño Apéndice que dedica al estudio histórico de los principales descubrimientos en el campo de la orgánica, basado en parte en las *Zeittafeln zur geschichte der Organischen Chemie*, de von Lippman, cita a Runge como descubridor de la cafeína en el café y como observador de la presencia de anilina, quinoleína, pirrol y fenol en la brea de hulla.

(26) Una buena parte de los datos referentes a la vida de Runge han sido tomados del trabajo de B. Anft «Friedlieb Ferdinand Runge: A Forgotten Chemist of the nineteenth Century», *J. Chem. Ed.* 32, 566 (1955).

Otros trabajos interesantes acerca de la vida y obras de Runge son las obras: «F. F. Runge, Sein Leben und sein Werk» de B. Anft. Emil Ebering Verlag, Berlín (1937); «F. F. Runge, der Entdecker der Teerfaben» Orianenburg (1935) de M. Rehberg (obras que no nos ha sido posible consultar). Y los trabajos de H. Schlenz, *Chemiker Zeit.* 30, 807 (1906), *Pharm. Centralhalle*, 1907, 301, 332; 1906, 751; *Chemiker Zeit.* 32, 268 (1908) y G. Kranzlein, *Z. Angew. Chem.* 48, 1 (1935). H. Heinz, *Chem. Ztg.* 66, 183 (1942).

(27) G. Lockemann y R. E. Oesper, «Friedrich Stromeyer and the History of Chemical Laboratory instruction». *J. Chem. Ed.* 30, 202 (1953).

(28) Prandtl *J. Chem. Ed.* 27, 176 (1950).

tigaciones relacionadas principalmente con la química de las plantas e iniciando —a instancias del famoso poeta alemán— el estudio que le condujo al poco tiempo al descubrimiento en el café del alcaloide cafeína.

El período de sus investigaciones en Jena contiene todavía otro importante descubrimiento. En sus estudios acerca de la corteza de cincona separó un constituyente básico que llamó «China base». Casi todas las Historias de la Química atribuyen, por otra parte, el descubrimiento del alcaloide quinina a los químicos franceses Pelletier y Caventou (29). Si se comparan sin embargo las propiedades descritas por Runge para su «China base» con las citadas por los dos químicos franceses para su quinina, se llega a la conclusión de que ambas sustancias eran idénticas. En consecuencia se debe considerar a Runge al menos como co-descubridor de este alcaloide ya que sus resultados fueron publicados en el año 1819, es decir un año antes que los trabajos de Pelletier y Caventou.

Algo parecido ocurre con su descubrimiento de la purpurina, colorante cuya preparación se ha atribuido de ordinario a Robiquet y Colín en el año 1826. Los catálogos de patentes de los Archivos del Estado Prusiano muestran que Runge solicitó una patente para la purpurina en el año 1822, la cual le fué concedida por el Ministerio de Comercio alemán el 15 de febrero de 1823.

A los 28 años había descubierto Runge, por lo tanto, tres nuevas e importantes especies químicas: la cafeína, la quinina y la purpurina, así como la acción midriática de la belladona, hallazgos cualquiera de los cuales hubiera bastado, en sí, para dar celebridad notoria a su descubridor.

En el año 1822 se inicia para Runge lo que podríamos denominar el período docente de su vida, al ser nombrado Privatdozent de la Universidad de Berlín, para aspirar a cuyo cargo —por ser condición previa para ello— publica en este año su tesis doctoral con el título de «De pigmento Indico ejusque connubis cum metallorum non nullorum oxidis», excelente investigación en la que apunta su afición por la química de los colorantes, en la que había de obtener, como veremos, éxitos muy señalados. Es curioso indicar el hecho de que el de Runge fué el segundo título de Doctor expedido por la Facultad de Filosofía de la Universidad de Berlín fundada en el año 1810

(29) P. J. Pelletier y J. B. Caventou «Recherches chimiques sur les Quinquinas» *Ann. Chim. et Phys.* 15, 289, 337 (1820).

y que el primero de los mismos fué otorgado a Gustav Rose el que años más tarde habría de convertirse en famoso mineralogista.

Tras un año de permanencia en Berlín se trasladó a la Universidad de Breslau, desde la que inmediatamente inició un viaje que proyectado para un año, duró en realidad desde Octubre de 1823 hasta Abril de 1826. De este viaje nacieron —digámoslo como resumen— sus investigaciones sobre los principios narcóticos de la belladona realizado en París bajo la dirección de J. B. Quesneville, su afición a la agricultura que más tarde había de cristalizar en sus investigaciones en el terreno de la química agrícola y su amistad adquirida en París con sus ilustres compatriotas Alexander von Humboldt y Justus von Liebig (30).

Tras esta larga ausencia de su país natal, regresó Runge a la Universidad de Breslau en la que había de desempeñar su cargo de Privatdozent y en la que permaneció hasta el año 1831. Durante este período de tiempo prosiguió sus investigaciones químicas, en el terreno ahora, de la fitoquímica, estudiando especialmente los pigmentos de las flores.

A esta época corresponde igualmente su libro «Grundlehren der Chemie für Jedermann: besonders für Artze, Apotheker, Landwirte, Fabrikanten und Gewerbetreibende» que fué publicado en el año 1830, escrito en un sencillo estilo muy característico de su autor.

Las dificultades que encontró para el desarrollo de la enseñanza experimental así como sus desavenencias con los demás profesores, motivadas por su carácter y porte, le fueron alejando de la Universidad, de la que se apartó definitivamente en el año 1831 a pesar de haber sido nombrado, tres años antes, Profesor extraordinario de Química Técnica de la Facultad.

Con ello termina para Runge su período académico al que ha de seguir a partir de 1832 su período industrial.

Existía en aquel entonces en la pequeña ciudad de Orianenburg, situada en las cercanías de Berlín, una importante fábrica de productos químicos la Chemische Produkten Fabrik zu Orianenburg, de la que era director Ernst E. Cochius y en la que en aquel entonces actuaba como químico principal G. F. A. Hempel, su antiguo director y propietario. A esta fábrica llegó Runge en el año 1832 como químico adjunto de Hempel y en ella desarrolló las investigaciones sin duda alguna más importantes de su carrera científica.

(30) R. Oesper *J. Chem. Ed.* 4, 1461 (1927).

Destilando el alquitrán de hulla (31) que se despreciaba como producto secundario e inservible de las fábricas de gas del alumbrado y mediante sencillos procedimientos consiguió aislar un compuesto al que llamó ácido carbólico, algunas de cuyas propiedades tales como la «acción paralizadora de la podredumbre» (acción antiséptica) describió. En sus trabajos no cita sin embargo la constitución del compuesto en cuestión, cuya composición elemental permaneció ignorada hasta el año 1841 en que el químico francés Laurent (32) destilando alquitrán de hulla obtuvo un compuesto al que llamó «ácido fénico» o «hidrato de fenilo» y cuyas propiedades demostró ser idénticas en muchos aspectos a las del ácido carbólico de Runge, sustancia a la que Gerhardt dió su actual nombre de fenol.

Operando así mismo sobre el líquido obtenido por destilación del alquitrán de hulla separó un ácido de color rosado al que dió el nombre de «ácido rosólico», sustancia que figura en algunas Historias de la Química como descubierta por Kolbe y Schmidt y simultáneamente por Persoz, autor, este último, que patentó su descubrimiento en Francia en el año 1862. La publicación de Runge anteriormente mencionada correspondiente al año 1834, describe este ácido, así como algunas de sus propiedades colorantes.

Otro descubrimiento, acaso el más importante de los que debemos a Runge fué el de una sustancia, presente como las anteriores en el destilado del alquitrán de hulla, a la que por sus propiedades de ser un aceite y adquirir color azul (en realidad es un color violeta-azulado), por la acción de los polvos de blanquear denominó «Kyanol», sustancia de la que describió así mismo otras muchas propiedades. Seis años más tarde, en 1840, el químico alemán Fritzsche, destilando indigo previamente alcalizado con hidróxido potásico, obtuvo un compuesto al que llamó anilina (del portugués anil, indigo), compuesto que en el mismo año fué reconocido por Erdmann como idéntico a otro compuesto químico, el «cristalino», obtenido por destilación del indigo y denominado así por Unverdorben en 1826. Por otra parte y en el año 1842 el químico Zinin, estudiando la acción del sulfuro amónico sobre derivados nitrogenados, entre los que se encontraba el nitrobenceno, obtuvo a partir de este último un compuesto, al que llamó «benzidam», compuesto que Fritzsche

(31) F. F. Runge. «Über die Produkte der Steinkohlendestillation» *Pogg. Ann.* 31, 65, 513 (1834), 32, 308, 328 (1835).

(32) A. Laurent, *Ann. pharm.* 43, 200 (1842).

reconoció como idéntico a su anilina. Sospechando Hoffman, ayudante de Liebig, que todas estas substancias podían tener alguna relación entre sí, procedió a la determinación analítica de la composición de «cristalino», «Kyanol», «anilina» y «benzidam», llegando a la conclusión de que todos ellos respondían a la fórmula bruta $C_{12}H_{14}N_2$. Posteriormente el mismo Hoffman demostró que los cuatro compuestos eran idénticos y propuso la adopción, para el compuesto, del nombre de «cristalino», nombre que no prosperó y que fué en definitiva sustituido, a propuesta de Berzelius, por el de anilina, que es el que actualmente detenta.

Es pues evidente que Runge fué descubridor, si no único, sí independiente de la anilina.

Sería alargar excesivamente este relato, el continuar la descripción de otras substancias descubiertas por Runge. Me limitaré a citar únicamente que el pírrol (al que denominó pírrol o rotöl), el negro de anilina, (atribuida en unión de otros colorantes derivados del alquitrán de hulla al químico inglés Williams Henry Perkin, a quien por sus importantísimos trabajos se le considera como el promotor de la moderna industria de colorantes, y cuyo centenario se celebra este año) el «leucol o weisöl» (como denominó, por ser un aceite incoloro, a un producto obtenido del alquitrán de hulla que Hoffman demostró en 1845, está constituido por una mezcla de quinolina, isoquinolina y quinaldina) fueron descubiertos por Runge y se hallan descritos en los trabajos por él publicados en 1834 y 1835.

Aun cuando estas aportaciones de Runge tienen en la Historia de la Química un interés evidente, hay sin embargo otro aspecto de sus investigaciones muy poco conocido hasta hace unos años (33) que presenta para nosotros, dado el tema que nos ocupa, en esta Lección Inaugural un interés extraordinario. Me refiero a sus investigaciones sobre reacciones conducidas en papel, por las que se le considera como iniciador de la Cromatografía en papel, o al menos de la Cromatografía radial por precipitación, así como de la técnica analítica conocida con el nombre de «Reacciones a la gota».

(33) Añt el biógrafo de Runge, no resalta en su primera publicación los trabajos de Cromatografía y en su trabajo (26) los toma de las publicaciones de Weil. Reberg (26) en su publicación de 1935 lo considera en cambio «como padre del Análisis Capilar». Liesegang (*Natur und Volk*, 77, 162 (1947) le atribuye en cambio la invención de la Cromatografía radial en papel.

Está hoy fuera de toda duda que, aparte del antecedente de la reacción mencionada por Plinio—que anteriormente citamos—, los fabricantes de pigmentos coloreados se servían de algunas pruebas empíricas conducidas sobre papel, algodón u otras substancias porosas, para dictaminar acerca de los colorantes producidos y seguir el proceso de fabricación de los mismos.

Posiblemente conocía Runge algunas de estas reacciones que acaso se limitó a poner en práctica o mejoró. Pero es lo cierto que la primera descripción escrita de las mismas se da en sus trabajos acerca del particular. Y así, en la primera parte de su libro «Farbenchemie» (34) cita un procedimiento para determinar el poder colorante de los «polvos de blanquear» basado en la adición de una gota de la disolución a un trozo de algodón teñido con anilina y cuyo fundamento se halla en la aparición del color azul provocado por los polvos de blanquear sobre esta substancia (18) hecho este, que como anteriormente dijimos, le indujo a proponer la denominación de «kyanol» para este último compuesto.

Por otra parte en el volumen II de la misma obra, describe un procedimiento para revelar la presencia de cloro libre en la disolución, basado en el color azul que origina la adición de una gota de la misma, a un papel previamente impregnado con ioduro potásico y almidón. Indudablemente es ésta la primera vez que se halla descrita una reacción de identificación en papel de filtro, ya que antecede en 17 años a la propuesta por Schiff (35) para el reconocimiento del ácido úrico en papel impregnado con carbonato de plata.

En su libro «Grundriss der Chemie» (36) se hallan descritas algunas aplicaciones de la técnica a gota, así como una serie de experiencias realizadas con tablas finas de madera por las que hacía subir, por acción capilar, diversas disoluciones cuya velocidad de acción media y con las que se conseguían separaciones parecidas a las realizadas en papel poroso, técnica que años más tarde veremos utilizar a Goppelsröder. En este libro se ocupa, así mismo, de

(34) F. F. Runge «Farbenchemie, Teil I: Die Kunst zu färben gegründet auf das chemische Verhalten der Baumwollfaser zu den Salzen und Säuren. Lehrbuch der praktischen Baumwollfärberei», Berlín 1834; Teil II: Die Kunst drucken» 1842. Teil III: Die Kunst der Farbenbereitung» 1850.

(35) H. Schiff, *Ann* 109, 67 (1859) y F. Feigl «Specific, Selective and sensitive Reactions» New York 1949, pág. 582.

(36) F. F. Runge «Grundriss der Chemie» II Teil. München 1848. Citado por T. I. Williams y H. Weil en «Farbenchromatographie». (2).

la acción decolorante del carbón vegetal y de su empleo en la industria.

Ilustró su libro con numerosos «cuadros químicos» que elaboraba en papel y pegaba a cada ejemplar del libro. En opinión de Weil y Williams (18) algunos de estos cuadros pueden ser considerados como verdaderos cromatogramas.

En 1850 se publicaron dos libros de Runge que pueden considerarse como las obras más antiguas en el campo de la Cromatografía en papel. Fué uno de ellos, la 3.^a parte de su «Farbenchemie» y el otro su famoso «Musterbilder» (37).

La primera de estas publicaciones contiene únicamente un pequeño capítulo titulado «Sobre el papel secante como medio para las separaciones químicas», en el que se ocupa de la separación de mezclas, fundamentalmente de colorantes, en papel secante por medio de fuerzas capilares, «señalando por tanto una separación cromatográfica que comprende una adsorción física» (18). La segunda de estas obras es una monografía en la que se ocupa exclusivamente de lo que hoy denominamos reacciones a la gota y en la que se consignan así mismo algunas separaciones de sustancias inorgánicas por precipitación diferenciada en papel, utilizando «la difusión radial del líquido en papel secante con lo que aparecen anillos o zonas circulares más o menos concéntricas, conteniendo cada uno de ellos, de preferencia, una sola sustancia» (18).

En un trabajo publicado en 1862 (38) da cuenta así mismo de algunas reacciones verificadas sobre placas de porcelana y entre otras cita la formación de una mancha de color púrpuro, circundada por un anillo azul que se obtiene al tratar una gota de Kianol (anilina) depositada en la placa, con cloruro de oro, reacción que al parecer fué utilizada por él en 1834 (22).

Es de señalar que Runge se dió cuenta de la enorme influencia ejercida por distintas variables, entre otras, por la calidad del papel y las impurezas presentes en el mismo y en los reactivos, sobre el resultado de sus cuadros y de la necesidad por tanto de su standar-

(37) F. F. Runge «Zur Farbenchemie. Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verziehrer und Zeugdrucker. I Lieferung. Dargestellt durch chemische Wechselwirkung», que fué seguido del titulado «Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in Selbständig gewachsenen Bildern», impreso privadamente en Orianenburg en 1855).

(38) F. F. Runge, *National Zeitung* 1862 o *Farbereizeitung* 1, 195 (1890).

dización para conseguir resultados reproducibles. No apreció (y el hecho es sorprendente) sin embargo, como años más tarde habían de hacerlo Schönbein y Goppelsröder en su análisis capilar ascendente, la importancia que tiene el hecho de que el disolvente difunda más rápidamente que las sustancias coloreadas en él disueltas.

Su libro «Musterbilder», que dedicó al Rey Federico de Prusia, contiene 120 cuadros originales cuyo maravilloso colorido puede hoy aún apreciarse en la copia que se conserva en el Museo Británico (18).

Su «Bildungstrieb der Stoffe» es de señalar que se trata, como ya Goppelsröder consideró, más bien de un ensayo filosófico que de un estudio científico (39).

Runge atribuyó la formación de sus cuadros en color a una fuerza misteriosa que consideró distinta por completo de las conocidas, que se halla latente en las sustancias originales y se hace activa al tener lugar una reorganización de las moléculas de los componentes al encontrarse estas sustancias sobre el papel, y a la que llamó «fuerza generativa» («Generative Kraft»), considerándola por otra parte como prototipo de la energía vital que actúa en las plantas y en los animales, con lo que estableció un concepto que puede incluirse, sin duda alguna, en el Vitalismo.

La mayor parte de las sustancias con que operó Runge para la formación de los cromatogramas, eran de tipo inorgánico. En este sentido pues, debe concedérsele en el orden histórico una prioridad a la Cromatografía Inorgánica, contrariamente a lo que se viene aceptando.

Runge permaneció como Director Técnico de la Fábrica de Orianenburg hasta el 31 de diciembre de 1852. Murió en la misma ciudad el 25 de marzo de 1867.

Uno de los pocos antecedentes de los trabajos de Runge que no invalidan su prioridad en el campo de la Cromatografía en papel, se halla en un trabajo de C. Matteucci (40) en el que indica que «al co-

(39) Un detallado estudio así como una clasificación de las «pinturas cromatográficas» de Runge se halla contenido en el trabajo de E. Deiss «Über Runge-Bilder und Liesegang-Ringe auf Filtrierpapier». *Kolloid Z.* 29, 146 (1939).

(40) C. Matteucci. «Lezioni sui fenomeni fisico-chimici dei corpi vivente». Firenze 1844, traducido al inglés en 1847 con el título «The Physical Phenomena of Living Beings». London 1847. Citado por Weil y Williams (24) y por Weil (22).

locar unas gotas de chocolate o de tinta sobre un papel de filtro o un pedazo de tela, aparece en este, externamente a la mancha oscura central, otra zona más clara» experiencia que le condujo a un estudio sistemático de la altura alcanzada por diversas soluciones en tubos llenos de arena y otros materiales, por lo que puede así mismo considerarse como un antecedente directo de los trabajos de Goppelsröder.

En realidad Matteucci se interesaba únicamente en la altura alcanzada en las disoluciones en las columnas y no por su resolución en bandas.

El impulso acaso más considerable de entre los que recibiera la Cromatografía en papel en su época primera, se debe a la obra de dos ilustres químicos suizos: F. Schönbein y F. Goppelsröder creadores del método analítico conocido con el nombre de «análisis capilar».

Cristhian Frederick Schönbein, alemán de nacimiento ya que nació en Metzingen, Wurtemberg, en el año 1799, a quien debe la química el descubrimiento del ozono y el de la pasividad del hierro entre otros importantes hallazgos, demostró (41) por vez primera que cuando se introduce una tira de papel por uno de sus extremos en una solución que contiene un determinado soluto, tanto el agua como el soluto en ella disuelto, ascienden a través del papel, siendo la altura alcanzada por el agua superior a la del soluto y distinta ésta según la naturaleza del compuesto de que se trate. Por la medida de la altura alcanzada en una tira de papel es posible en consecuencia la deducción de datos analíticos cualitativos. Schönbein intuyó certeramente el valor que un día podría tener este tipo de análisis «que puede servir al químico analítico como un método cualitativo de investigación en aquellos casos en que el uso de otros reactivos lo dejen en la duda» (42).

(41) F. Schönbein «Über einige durch die Haasrröhrenanziehung hervorgebrachten Trennungswirkungen» *Ann. Phys. Chem.* 114, 275 (1871).

(42) F. Schönbein. «Über einige durch Haaröhrenwirkung des Papiere hervorgebrachten Trennungswirken» *Verh. Naturf. ges. Basel* 3, 249 (1861). Citados por Feigl. Loc. cit. (6) pág. 569.

Schönbein ha sido considerado por muchos investigadores (43, 44) como el iniciador del uso del papel de filtro con fines de adsorción selectiva.

Goppelsröder, uno de los discípulos de Schönbein prosiguió las investigaciones por aquél iniciados. Su labor experimental en 45 años (1861-1906) de labor (*) ininterrumpida le permitió un formidable acopio de datos experimentales referentes a las alturas alcanzadas por numerosas sustancias en papel de filtro y otros medios capilares fibrosos, con los que pudo demostrar la influencia que ejercen sobre las alturas y velocidades diversos factores tales como la naturaleza y concentración de los solutos, el medio capilar utilizado y la temperatura, fundamentalmente.

La importancia que el análisis capilar puede tener para la concentración y reconocimiento de muy pequeñas cantidades de sustancias presentes en una disolución, puede ponerse de manifiesto a través de una de las experiencias más famosas de Goppelsröder, en la que dejando ascender por capilaridad en una tira de papel, 1 c. c. de una disolución aproximadamente 1: 40.000.000.000 de azul de metileno, pudo poner de manifiesto la presencia de esta sustancia por la banda ligeramente coloreada que aparece. Goppelsröder cita en varias de sus publicaciones (45, 46, 47) la obra de Runge «Bildungstrieb der Stoffe» obra que fué por lo tanto conocida por Tswett ya que este menciona los escritos de Goppelsröder en alguna ocasión (18).

(43) L. Zechmeister «Paper Disk Columns in Glass Chromatographic tubes» *Science* 113, 35 (1951).

(44) Feigl. «Chemistry of Specific, selective and sensitive Reactions» *Research* 3, 350 (1950).
entre otros.

(*) El resumen de su obra se halla en su libro «Anregung zum Studium der auf Capillaritäts und Adsorptionerscheinungen beruhenden Capillaranalyse» Basilea 1906.

(45) F. Goppelsröder. «Über capillaranalyse und ihre verchiedenen Anwendungen, und über das Emporsteigen der Pflanzensäfte in den Pflanzen», *Mitteilungen technologischen Gewerbemuseums, Sektion für Chemisches Gewerbe (Wien)* 3/4, 86 (1888).

(46) F. Goppelsröder. «Über ein neues Verfahren, Farbstoffe in ihren Gemischen zu erkennen», *Dinglers polytechn. J.* 164, 212 (1862).

(47) F. Goppelsröder: «Über Capillar —und Adsorptionsanalyse. Auszug meinem seit 1861 bis 1907 erschienen Publikationem über das auf Capillaritäts— und Adsorptionsserscheinungen beruhende Gebiet der Kapillaritätsanalyse, *Kolloid Z.* 4, 23 (1909).

Goppelsröder propuso para esta técnica el nombre de «análisis por capilaridad» sin duda por creer inicialmente que es la capilaridad la fuerza que origina el fenómeno.

Bajo este punto de vista hoy no podría considerarse la denominación como correcta ya que en el fenómeno toma parte, además de la capilaridad, la adsorción, de manera, incluso, más decisiva.

El análisis capilar de Goppelsröder se puede considerar hoy, a todos los efectos, como parte de la Cromatografía debiéndose reservar el nombre de análisis por capilaridad para la técnica propuesta por Traube (48) en la que las disoluciones se hacen ascender por capilares de vidrio.

Cuando se compara la obra de Runge con la de Schönbein y Goppelsröder se observan claras diferencias que pueden resumirse de acuerdo con Weil (2) en los siguientes puntos:

- a) El principal interés de estos últimos investigadores se hallaba en la consecución de determinados datos específicos concernientes a numerosas sustancias consideradas aisladamente y muy especialmente a la determinación de las alturas alcanzadas por las disoluciones de las mismas en el papel de filtro, así como en el tiempo requerido para el ascenso. No perseguían por lo tanto conseguir separaciones de las sustancias integrantes de una mezcla, aun cuando al observar la diferencia de comportamiento en la ascensión de tales sustancias vieran también la posibilidad de establecer un método de separación sistemática.
- b) Schönbein y Goppelsröder prefirieron el ascenso vertical a la difusión radial de Runge ya que permitía la obtención de datos más exactos, a pesar de la mayor lentitud de aquel método de trabajo.
- c) Schönbein reconoció como un hecho esencial la circunstancia de que la migración del agua es superior a la de los solutos en ella disueltos, hecho que sorprendentemente no fué observado por Runge.
- d) Goppelsröder, a diferencia de Runge, excluyó de sus experiencias toda reacción química y atribuyó el fundamento de la acción separadora, con notable anterioridad a Tswett, a una adsorción diferencial, asignando a la capilaridad una mera función de transporte.

(48) Traube. *Z. Anal. Chem.* 53, 138 (1916) citado por Feigl loc. cit. pág. 570.

Para seguir en un orden cronológico la Historia de la Cromatografía en papel, en su época anterior a 1944, sería preciso continuar describiendo la obra de una serie de investigadores que en unión de los ya mencionados completaron el estudio de este tema, aportando con ello la base científica experimental que abrió cauces a la iniciación del estado actual de este tipo de Cromatografía.

El esbozar simplemente la obra de estos investigadores nos conduciría forzosamente a una desmesurada extensión del tema. Para evitarlo nos limitaremos simplemente a mencionar los nombres de Bayler (1878), Lloyd (1885), Fischer y Schmidner (1892), Reed (1892), Ostwald (1895), Trey (1898), Holmgren (1913), Skraup (1910), Krulla (1909) y muy especialmente los de J. Gruess —en el que pueden encontrarse claros antecedentes de las modernas técnicas cromatográficas en papel— y Liesegang, una breve descripción de cuya obra así como la relación de las citas bibliográficas de sus trabajos originales pueden hallarse en alguno de los trabajos (6, 22, 24) que hemos venido mencionando, como igualmente en algunas otras publicaciones (49) (50).

La obra de estos investigadores unida a los avances realizados en el campo de las teorías de partición entre fases no homogéneas, el desarrollo de las teorías electroquímicas y el enorme auge alcanzado por la técnica cualitativa de «ensayos a la gota» (22) crearon la base científica y experimental sobre la que pueden asentarse las aportaciones de Consden, Martin y Gordon, con las que se abre, a nuestro entender, el actual período de la Cromatografía en papel.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Los primeros antecedentes ciertos de la Cromatografía científica en columna, —ya que los experimentos de Runge en tablillas de madera, anteriormente mencionados, no pueden considerarse, a nuestro juicio, como antecedentes de esta técnica—, se encuentran en los tra-

(49) H. Weil. «Periodic Structures, Rhythmic Chromatograms and radio-isotopes». *Atomics*, 4, 286 (1953).

(50) H. Weil «Grundlagen und Entwicklung der Papierchromatographie» *Naturw. Rdsch.* 7, 110 (1954).

bajos de los químicos agrícolas ingleses H. S. Thompson (51) y J. T. Way (52) publicados en el año 1850. El objetivo que perseguían estos investigadores era comprobar las ideas de Justus von Liebig —de las que difirían— concernientes al aprovechamiento de los abonos por parte de las plantas. Sus investigaciones se dirigieron con preferencia a la determinación de las cantidades de abono tomadas por las plantas a distintas profundidades del suelo y muy especialmente a la de fracción de fertilizante que se pierde por pasar a las capas más profundas del mismo. Trataron para ello de imitar las condiciones naturales, haciendo pasar soluciones de abonos por cilindros de vidrio llenos de diferentes tipos de suelos porosos, con lo que observaron la aparición en la columna de estratos, que, con frecuencia, se hallaban distintamente coloreados. En algunas ocasiones llegaron a separar, incluso, las diversas zonas formadas en la columna, para lo que, una vez extraída ésta del cilindro de vidrio, procedían a su corte mecánico guiándose por el olor o por el color de aquellas, extrayendo cada una a continuación por uso de disolventes adecuados.

Es de observar la semejanza existente en la técnica seguida por estos investigadores con la que unos cincuenta años más tarde había de proponer Tswett.

Tanto Thompson como Way no supieron ver, sin embargo, las posibilidades analíticas de su método, lo que fué debido, en parte, a la creencia errónea de que las irregularidades que observaron en el flujo del líquido, habían de hacer imposible toda separación cuantitativa (53).

Otro investigador cuyo nombre han incorporado recientemente Feigl (*) y Farradane (54) a la Historia de la Cromatografía y que debe mencionarse entre el de los precursores de la cromatografía en columna, es el del investigador americano L. Reed. Publicó este autor un trabajo en el año 1893 (55) en el que, al ocuparse de la

(51) H. S. Thompson. «On the adsorbent power of soils» *J. Roy. Agric. Soc.* 11, 68 (1850).

(52) J. T. Way. «On The power of soils to adsorbe manure». *J. Roy. Agric. Soc.* 11, 313 (1850) 13, 135 (1852). Citados por H. Weil (2,24).

(53) T. I. Williams y H. Weil. «The origin of Column Chromatography» *Experientia*, 8, 476 (1952).

(*) Loc. cit. (6) pág. 601.

(54) J. Farradane. «History of Chromatography». *Nature*, 167, 120 (1951).

(55) L. Reed. *Proc. Chem. Soc.* 9, 123 (1893) citado por (54).

separación de diversas sustancias según las técnicas del análisis capilar de Goppelsröder, utiliza como medio poroso telas, papel de filtro, etc. Prescindiendo de este aspecto de su trabajo que indudablemente presenta ya, en sí, un marcado interés, la parte que más nos interesa destacar es la que constituye el final del mismo, la cual, por su indudable interés traducimos a continuación literalmente. Dice así: «Con respecto al empleo de medios porosos o papel de filtro» (debo manifestar) «que he obtenido resultados satisfactorios tanto con la mezcla del cromato potásico y eosina, como con las de cloruro férrico y sulfato de cobre, utilizando tubos que contenían caolín pulverizado, suavemente comprimido, a cuya parte se aplicó la disolución, dejándola discurrir hacia abajo». Acaso más interesante todavía son las siguientes líneas: «Yo confío en que pueda probarse que este método de separación, o alguna modificación del mismo es útil para la separación de alcaloides a partir de sustancias orgánicas de naturaleza diversa, con vista a su ulterior identificación aunque hasta aquí he obtenido en esta dirección de trabajo un éxito muy parcial».

La lectura de las líneas que anteceden evidencia, aun cuando Weil y Williams (56) no lo admitieran así en principio, que si bien Reed no consiguió establecer, como él mismo confiesa, una base experimental adecuada, sí que intuyó claramente la posibilidad de que un día, al modificarse convenientemente su técnica, sirviera para la separación de sustancias. Pocos años más tarde, como veremos, una simple modificación del método, permitirá a Tswett, quien acaso conoció este y otros antecedentes (57), separaciones que recuerdan las intuídas por L. Reed.

Para seguir en un orden cronológico la Historia de la Cromatografía es preciso abandonar el campo de actividad de los químicos agrícolas e introducirse en el de los químicos oleícolas y del petróleo, pues como a continuación vamos a ver, en él se encuentran claros antecedentes de las técnicas cromatográficas.

En el año 1886 diseñaron Engler y Boehm (58) un aparato especialmente destinado a la decoloración de aceites por *filtración de*

(56) Weil y William «Early History of Chromatography» *Nature* 167, 907 (1951).

(57) T. I. Williams «Chromatography past and present», *Discovery* 11, 53 (1953).

(58) C. Engler y M. Boehm, «Über die chemische Natur des Vaselins» *Dinglers polytechnisches Journal*, 262, 470 (1886).

los mismos a través de carbón, mediante el que pudieron observar un cierto fraccionamiento de la mezcla, ya que los últimos filtrados contenían una superior proporción de hidrocarburos saturados, mientras que el adsorbato se hallaba enriquecido en hidrocarburos no saturados. Debe señalarse, sin embargo, el que la importancia real del método pasó totalmente inadvertida para estos investigadores.

El primer investigador que realmente se dió cuenta, a través de los trabajos por él realizados, de la importancia que el método podía tener y por lo que en opinión de Weil y Williams (56) (59) debe considerarse como el iniciador de la Cromatografía en columna, fué el americano D. T. Day. Antes de entrar, sin embargo, en la descripción de su obra, creemos conveniente relatar, siquiera sea brevemente, las ideas que impulsaron a Day y demás químicos petrolíferos americanos a sus trabajos en el campo de lo que hoy llamamos Cromatografía.

La primera idea que impulsó estas investigaciones fué el intentar una base experimental que demostrara la hipótesis geológica emitida por la escuela petrolífera de Pensylvania, la que con el nombre de «hipótesis de la filtración» explicaba las diferencias entre los petróleos naturales, suponiendo que los petróleos «primarios», negros en color y con un alto contenido en hidrocarburos pesados y en compuestos de azufre, existentes en los estratos más profundos de los yacimientos petrolíferos, penetrarían a través de capas esquistosas ascendiendo por ellas a capas arenosas superiores, con lo que a causa de la adsorción selectiva que tendría lugar en el recorrido, se conseguiría la transformación de aquel petróleo en otro de color más claro, enriquecido en hidrocarburos de bajo punto de ebullición y pobre en sustancias no hidrocarbonadas.

Otro incentivo para el desarrollo de estos trabajos, fué en opinión de Weil, la prosecución y estudio de la práctica existente ya en Norte América en 1887 —similar a la que anteriormente mencionamos para los aceites de tipo vegetal y animal— de decolorar el petróleo o sus productos residuales por adición de carbón o por filtración a través de tierras que, como la «de Florida» o las «tierras de batanero», presentan un notable poder decolorante.

(59) H. Weil «History of Chromatography» *Nature*, 166, 1000 (1950) Citado así mismo por L. Zechmeister en (1) y en «Early History of Chromatography» *Nature*, 167, 405 (1951).

La tercera fuerza impulsora para las investigaciones que comentamos fué el interés suscitado a finales del pasado siglo en el campo de los fenómenos de la adsorción y el intento de distinguir esta fuerza frente a las fuerzas capilares de Schönbein y Goppelsröder, conceptos frecuentemente confundidos hasta el extremo de que el fraccionamiento por filtración a través de carbón o de tierras decolorantes se llegó a denominar difusión capilar, atribuyendo el fenómeno a la mayor movilidad de los hidrocarburos ligeros en los conductos capilares.

Fué al parecer Ubbelohde el primero en distinguir claramente la acción de ambos fenómenos atribuyendo el cambio de concentración exclusivamente a la adsorción y afirmando que la capilaridad ejerce su acción sólo como impelente del flujo.

Estos tres motivos fueron los que impulsaron a Day y demás investigadores a la realización de las experiencias que en forma somera citaremos a continuación.

D. T. Day, Jefe de división de la American Geological Survey afirma en 1897 (60): «Mediante adecuada experimentación puede demostrarse fácilmente que si se satura una caliza, como la caliza de Tranton, con el petróleo característico de esta roca y se ejerce una presión sobre ella de manera que pueda ascender a través de la arcilla finamente dividida, es fácil cambiar su color y obtener petróleos de apariencia similar al de Pensylvania, siendo el petróleo que filtra en primer lugar más claro de color y los que le siguen más oscuros».

Utilizó Day como medio de filtración tierra de bataneros, colocada en un tubo de vidrio por la que dejaba ascender sin ayuda alguna es decir, por la simple acción de las fuerzas capilares un espeso petróleo «primario». Cuando el flujo ascendente alcanzaba la parte superior de la columna daba por terminada esta primera etapa de la operación y procedía a la extrusión de la columna presionando sobre ella en forma adecuada. Extraída la misma procedía al corte mecánico de la columna en una forma más o menos empírica, tras de lo cual recuperaba las fracciones por desplazamiento con agua.

De esta manera consiguió aislar diversas fracciones ya que la

(60) D. T. Day «A Suggestion as to the origin of Pennsylvania petroleum». *Proc. Am. Phil. Soc.* 36, 154, 112 (1897).

fracción retenida en la parte superior de la columna estaba constituida por hidrocarburos ligeros, los eluatos de la parte central lo integraban hidrocarburos medios, mientras que los de la parte inferior contenían una especie de vaselina semisólida.

Presentó Day su trabajo, acompañado de muestras obtenidas por uso de su procedimiento, en el Primer Congreso Internacional del Petróleo, celebrado en París el 20 de agosto de 1900, fecha, que en opinión de Weil, debe considerarse en lugar del 21 de marzo de 1903 en que Tswett leyó en Berlín las primeras consecuencias de sus investigaciones, como la fecha de nacimiento de la Cromatografía.

Creemos conveniente para cerrar esta breve exposición de las investigaciones de Day transcribir ligeramente las conclusiones con que cierra su trabajo: «La separación parcial de los constituyentes del petróleo bruto, por filtración en la forma que he demostrado, permite abrigar la esperanza de que mediante este método pueda conseguirse una separación completa.....» «Permítaseme afirmar mi creencia de que antes de que haya pasado el próximo invierno habré conseguido mediante mi método separaciones totales.....» Day se equivocó en su última creencia ya que no consiguió esas separaciones de los componentes del petróleo con la facilidad y rapidez con que creía conseguirlo. Habían de pasar muchos años y había de sufrir su procedimiento muy notables modificaciones hasta que tal propósito se viera realizado.

El «fenómeno de Day», como se dió en llamar a su descubrimiento, llamó la atención, a través del mencionado Congreso de París, de numerosos investigadores y hasta no es aventurado suponer con Weil (23) que alguno de los trabajos que suscitó llegaron a conocimiento del propio Tswett antes de empezar sus propias investigaciones.

Es evidente por tanto, a través de esta breve descripción, la similitud de este procedimiento con el que años más tarde había de utilizar Tswett. Hay sin embargo entre ambos procedimientos algunas diferencias esenciales: Day opera sobre un *producto líquido natural*, Tswett trabaja con *disoluciones* obtenidas de extractos de plantas. Aquel deja que el líquido ascienda «per se» en la columna. Tswett en cambio opera facilitando el descenso de la disolución con ayuda de una suave succión. Además, y esto tiene como dijimos una decisiva importancia, terminado el primer proceso, es decir, alcanzado por el líquido el final de la columna, Day procede a la extracción de la columna del adsorbente y al corte mecánico de la misma sin

intercalar entre estos dos procesos el de lavado de la columna con disolvente puro. Es decir, falta en el procedimiento de Day lo que Tswett llama desarrollo del Cromatograma, operación ésta de una tal importancia que bien puede afirmarse que es la base esencial de la cromatografía de Tswett y la que dió a ésta, en su origen, la posibilidad del auge que más tarde había de alcanzar.

—=—

Entre los trabajos que continuaron la obra de Day merece una especial mención el publicado por Engler y Albrecht (61) en el año 1901, en el que modificando el dispositivo experimental de Day establecieron un antecedente de la modificación cromatográfica actualmente conocida con el nombre de «Cromatograma líquido o fluvente», técnica cuyo descubrimiento en el año 1936 viene atribuyéndose a Koschara (62) por desconocimiento de este dato.

Las innovaciones que introdujeron estos investigadores en el método de Day las resume Weil (23) en los siguientes puntos:

- 1.—Day deja ascender el líquido por acción de las fuerzas capilares u ocasionalmente aplica succión a la parte superior de una columna de unos 80-90 cm. de longitud y 6 cm. de diámetro, mientras que Engler y Albrecht colocan el líquido en un recipiente externo a la columna y colocado en un plano superior con lo que al unirlo a la parte inferior de ésta, facilitan la percolación ascendente. Consiguen en consecuencia, al acelerar la velocidad con que fluye el líquido, disminuir el tiempo requerido para la operación.
- 2.—Day paraliza el flujo del líquido y en forma, como dijimos, similar a la que años más tarde recomendara Tswett, extrae la columna del adsorbente del interior del recipiente que la contiene y procede después al corte mecánico de la columna. Engler y Albrecht en cambio, no paralizan el flujo del líquido y cortan la columna una vez extraída, antes por el contrario recogen el líquido a medida que va saliendo de la parte superior de la columna en recipientes que reemplazan periódicamente.

(61) C. Engler y E. Albrecht «Über der Vorgang bei der Filtration von Petroleum durch Florida erde» Z. ang. Chem. 889 (1901).

(62) W. Koschara. Hopp. Seyler's Z. physiol. Chem. 239, 89 (1936).

camente y estudian las características de los eluatos recogidos, por determinación de pesos específicos, viscosidades, puntos de ebullición y propiedades químicas de los mismos.

3.—No se limitan Engler y Albrecht a introducir estas modificaciones, sino que con objeto de poder estudiar los fenómenos que tienen lugar durante el proceso cromatográfico, dotan a la columna cromatográfica de un sistema de ventanas, que pueden abrirse y cerrarse a voluntad, y que distribuidas a lo largo de aquélla, permiten la toma de muestras en diferentes planos de la columna lo que les permite, a través del estudio de las fracciones efluyentes y la de los adsorbatos en la columna, establecer una buena aproximación de la dinámica del proceso.

4.—Engler y Albrecht no limitaron sus experiencias a la resolución exclusiva de mezclas de hidrocarburos, sino que consideraron el método aplicable a la separación de otras sustancias. Por ejemplo, cromatografiaron una solución conteniendo alcohol y anilina con lo que obtuvieron uno de los primeros cromatogramas coloreados de que se tiene noticia.

Es de señalar que Day y Engler no supieron atribuir el fundamento de sus métodos de separación a fenómenos de adsorción y que a Tswett corresponde, indudablemente, la primacia en haberlo descubierto, aún cuando Engler vió las posibilidades de su método de fraccionamiento dinámico.

La historia de la Cromatografía del Petróleo recientemente estudiada por Herbert Weil (63, 64, 65, 66, 67) recoge los nombres de numerosos investigadores que aportaron sus conocimientos al desarrollo de esta técnica. Invocando una vez más la razón de la obligada brevedad que la naturaleza de esta Lección impone, hago caso omiso de los mismos para pasar a continuación al comentario de la

(63) H. Weil. «Industrial Petroleum Chromatography» *Petroleum*. 14, 5, 205, (1951).

(64) H. Weil. id. id. 15, 1, 9, (1952).

(65) H. Weil. id. id. 16, 40, 95 (1953).

(66) H. Weil. id. id. 17, 88 (1954).

(67) H. Weil. «50 Years of Petroleum Chromatography». *Petroleum Proc.* 7, 812 973 (1952).

vida y obras del investigador que, como dijimos al iniciar esta exposición, fué considerado hasta hace muy pocos años como el descubridor de la misma.

Vida y obras de Miguel Tswett

Hasta el año 1940 en que Briquet publicó en el libro «Biographies de Botanistes a Gêneve» una corta noticia (de 27 líneas) relativa a la biografía de Tswett nada seguro se conocía acerca de la misma. Tanto es así, que en el prefacio de la edición de 1938 del libro de Zechmeister y Cholnoky (68) puede leerse: «Al escribir este prólogo tuvimos la intención de incluir en él una biografía de Tswett, lo cual no nos ha sido posible, ya que hasta la fecha no se conocen datos seguros acerca de la agitada vida de este investigador».

Aún cuando no con todo detalle hoy nos es conocida la vida de Tswett gracias a la labor de distintos autores tales como Dheré (69) Zechmeister (70) y Hesse y Weil (71) de cuyos trabajos daremos a continuación un breve resumen.

Mikhail Tswett (o De Zevett nombre con el que aparece escrito en su partida de nacimiento o Zwett con el que aparece en otras ocasiones), nació en Asti, capital de la provincia del mismo nombre, en el Piamonte (Italia) el día 14 de mayo de 1872 (*) de padre ruso, Simeón Tswett y madre italiana, María Dorozza. No se conoce el lugar donde transcurrieron los años de su niñez. Se sabe sin embargo que

(68) Zechmeister y Cholnoky «Die Chromatographische Adsorptionsmethode» (1938).

(69) Charles Dheré. «Michel Tswett. Le createur de l'analyse Chromatographique par adsorption. Sa vie, ses travaux sur les pigments chlorophylliens». *Candollea* 10, 23-73 (1943).

(70) L. Zechmeister. «Mikhail Tswett The inventor of Chromatography» *Isis* 36, 108 (1946).

(71) G. Hesse y H. Weil «Michael Tswett's first paper on Chromatography» M. Woelm, Eschwege, 1954, pág. 27.

(*) Debo indicar que Dheré (69) cita como fecha de nacimiento el día 19 de mayo; Zechmeister (70) toma esta fecha del anterior autor. En cambio Hesse y Weil (71) sin aludir a estos trabajos y citando el certificado de nacimiento, indican la fecha del 14 del expresado mes. Es notable el hecho de que en esta misma publicación incluyen Hesse y Weil el facsimile de un «curriculum vitae» de Tswett, escrito de su puño y letra, en el que da como fecha de su nacimiento el día 19.

en el año 1883 vivía en Lausana (Suiza) en donde fué alumno del Colegio Galliard y posteriormente en Ginebra de cuya Universidad fué alumno desde 1891 a 1896. Su primer trabajo data de 1894 y lleva por título «Recherches d'anatomie physiologique sur le leptome intraxillaire des Solanaciés, Loganiacées et Nolanacées», trabajo que realizado bajo la dirección y en los laboratorios del Profesor de Botánica R. Chodat, le valió la concesión del Premio Davy, (instituido en 1829 por Lady Davy viuda del ilustre químico inglés, en recuerdo de su marido fallecido en Ginebra el 28 de mayo de 1829).

En 1896 presenta su tesis titulada «Etudes de physiologie cellulaire. Contributions a la connaissance des mouvements du protoplasme des membranes plasmiques et de chloroplastes», dedicada al Profesor de Botánica Marc Thury bajo cuya dirección la realizó.

A partir de 1901 reside Tswett en Varsovia, ciudad en aquel tiempo perteneciente al imperio ruso. En este año y tras la presentación de una segunda tesis titulada «Investigaciones acerca de la constitución físico-química del grano de clorofila» (la tesis está redactada en ruso) recibe el título de «Magister» en la Universidad de Kazan.

Desde 1901 a 1908 es «Assistant» y desde 1902 «Privat-Dozent» de la Universidad de Varsovia. En 1907 es nombrado Profesor de Botánica y de Agronomía en el Instituto Veterinario y en 1908 de Microbiología en el Instituto Politécnico de esta ciudad.

Al ser ocupada Varsovia en 1915 por las tropas alemanas se refugia Tswett en Moscú y más tarde en Nijni-Novogorod —la actual Gortzi— donde es nombrado Profesor de la Escuela Politécnica que había de establecerse en Varsovia y que no llegó al parecer a funcionar.

Al año siguiente es nombrado Profesor de Botánica y Director del Jardín Botánico de la Universidad de Jourjeff (Dorpat o Tartu) de cuyo cargo y debido a una grave enfermedad no tomó posesión hasta finales del año 1917 o principios de 1918. Jourjeff fué ocupada por las tropas alemanas y la Universidad fué trasladada a Voroneje en cuya ciudad murió el 26 de junio de 1919, (*) posiblemente víctima de la tuberculosis.

(*) Dheré en su trabajo anteriormente citado, así como Zechmeister que se basa en el mismo, indican que murió en mayo de 1920, «desconociéndose la fecha exacta» en que tuvo lugar. La fecha que cito está tomada de la publicación de Hesse y Weil.

En el período de tiempo comprendido entre los años 1896 y 1912 publicó Tswett, según Dheré, 37 trabajos de investigación 2 tesis doctorales y un libro en el que resume sus principales hallazgos debidos al empleo de la Cromatografía.

En sus trabajos acerca de la cloroplastina y cloroglobina publicados respectivamente en los años 1896 y 1899 expresa de una manera precisa la idea de que los pigmentos clorofilianos se hallan «incorporados a una substancia protéica». Aún cuando sus trabajos en este sentido no tuvieron una suficiente base experimental (que no se encuentra hasta 1938-1941) debe considerarse a Tswett en opinión de Dheré (69) como uno de los precursores en este campo de investigación.

Otra importante contribución de Tswett fué su descubrimiento de que la «clorofila cristalizada» es de composición mixta. Ya en el año 1908 Tswett afirmaba que esta substancia no preexiste como compuesto químicamente definido en los cloroplastos, sino que se forma a partir de la clorofila en el proceso de extracción mediante alcohol, razón por la que llamó «metaclorofilina» a aquella substancia. Este proceso de alcoholisis había de ser perfectamente aclarado dos años más tarde (1910) por Willstätter y Stoll con su descubrimiento del enzima clorofilasa, que al saponificar el éster formado por los grupos carboxilos con el fitol, permite la sustitución de este alcohol por los radicales metilo, etilo, etc., correspondientes a los alcoholes utilizados en la extracción.

En el año 1911 estableció Tswett definitivamente mediante su procedimiento cromatográfico, la existencia de dos feofitinas (las clorofilinas a y b) y de dos feofórbidos correspondientes a las clorofilinas, en cuyas investigaciones fué una vez más precursor de los famosos trabajos de Willstätter y Fischer.

Otras aportaciones en el campo de los pigmentos vegetales, al que Tswett se dedicó preferentemente, fué el establecimiento de que la xantofila de las hojas no es una substancia simple, sino que se halla formada por cuatro xantofilas distintas a las que denominó α , α' , α'' y β , afirmando que la «xantofila cristalizada» estudiada por Willstätter, estaba constituida por dos o tres xantofilas diferentes. Gracias a los trabajos de Karrer, Kuhn, Zechmeister y Strain hoy sabemos que las xantofilas obtenidas a partir de hojas de diversas plantas son mezclas de 12 o más pigmentos, lo que ha venido a comprobar si nó el número de xantofilas propugnado por Tswett, sí la pluralidad de las mismas. Análogamente los trabajos de Kuhn, Le-

derer y Winsterstein han demostrado que la xantofila cristalizada que Willstätter y Escher habían obtenido en 1912 y que creían se hallaba exclusivamente formada por luteína, se halla en realidad formada por una mezcla en proporciones variables de luteína y zeaxantina.

Con lo dicho creemos haber puesto de manifiesto cumplidamente la personalidad científica de Tswett. Y ello sin haber mencionado otros trabajos que como su descubrimiento, en 1911 de la thuyorhodina colorante vegetal que extrajo por cromatografía de las hojas de la Thuya orientalis y otras especies y al que Monteverde y Lubimenko denominaron en 1913 rodoxantina, sus investigaciones acerca de la fucoxantina o su predicción de la pluralidad de los carotenos hubieran bastado para asegurarle un puesto preeminente en la Historia de la Química de los Vegetales.

—=—

En el trabajo de J. Briquet que anteriormente hemos mencionado se da una relación posiblemente completa de los trabajos de Tswett en la que se citan 56 publicaciones del mismo de las cuales 13 se hallan redactadas en francés, 28 en alemán y únicamente 15 en ruso.

El primer trabajo de Tswett relacionado con la Cromatografía fué el que tituló (72) «Sobre una nueva categoría del fenómeno de la adsorción y su aplicación al Análisis bioquímico» trabajo que fué leído por su autor el 21 de marzo de 1903 ante la Sección Biológica de la Sociedad de Ciencias Naturales de Varsovia. Hasta hace muy pocos años esta fecha fué considerada por diversos autores (*) como la de la «presentación oficial» de la Cromatografía. Hoy, como hemos venido demostrando en lo que antecede, se conocen numerosos antecedentes de la obra de Tswett. A pesar de ello creemos que sus trabajos ocupan un lugar preeminente en la Historia de esta Técnica y pueden considerarse algunos, como magníficos ejemplos de cómo a

(72) M. Tswett. «Ueber eine neue Kategorie von Adsorptiveserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemische Analyse» Arb. naturf. Ges., Warschau, XIV (1903).

(*) Zechmeister en su citada publicación (1) acaso ignorando entonces la existencia de este trabajo, cita como «fecha de nacimiento oficial de la Cromatografía» (según su propia expresión) el 21 de junio de 1906, fecha en que llegó a manos de los editores a la Deutsch Botan. gesell. el trabajo de Tswett (1906).

través de sencillas experiencias puede llegar un investigador ingenioso a demostraciones de transcendental valor.

Por esta razón y por ser desconocida su obra en lengua castellana seámos permitida aquí en forma esquemática una especial mención de este primer trabajo (*).

ESQUEMA DEL TRABAJO DE TSWETT, EN EL QUE SE DA A CONOCER POR VEZ PRIMERA SU PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO

Antecedentes.—Gracias a la labor de diversos investigadores y a la suya propia (**) conoce Tswett el hecho de que la clorofila presente en las hojas verdes de las plantas no se solubiliza al tratar éstas con ligroina o gasolina, mientras que lo hace fácilmente al tratarlas con alcohol, siendo incluso suficiente para conseguir la extracción agregar a la ligroina una pequeña cantidad de aquel disolvente. Conocía así mismo que el caroteno, contenido al mismo tiempo, en las hojas es fácilmente extraíble de las mismas por cualquiera de estos disolventes.

Este hecho había sido explicado por Monteverde afirmando que la «verdadera» clorofila es insoluble en alcohol y atribuyéndolo a una transformación de la clorofila durante el proceso de extracción mediante alcohol que daría origen a una modificación de la misma fácilmente soluble en este disolvente.

Objeto del trabajo.—Explicar el fenómeno comprobando si la afirmación de Monteverde es correcta.

Experiencias realizadas.—1.^a) Somete a extracción con alcohol una determinada cantidad de hojas verdes. Evaporado el disolvente trata el residuo con ligroina. Observa que se disuelve fácilmente. Comprueba espectroscópicamente que la clorofila subsiste inalterada a lo largo de estas operaciones.

2.^a) Obtenida la disolución en ligroina introduce en élla una tira de papel. Al extraerla observa que tiene un intenso color verde.

(*) Los datos que aquí se resumen han sido tomados de la publicación de Hesse y Weil (71) anteriormente mencionada.

(**) El mismo indica que la idea se inició «con algunas experiencias que llevé a cabo hace algunos años acerca de la insolubilidad de la clorofila en petróleo o ligroina». Estas experiencias se hallan descritas en la Tesis Doctoral que presentó Tswett para aspirar al Grado de Magister en la Universidad de Kazán.

Expuesta la tira de papel, así impregnada, al vacío, para eliminar el disolvente, la trata con ligroina. La disolución que obtiene presenta color verde pero éste es exclusivamente debido a la acción del caroteno ya que espectroscópicamente se demuestra la ausencia en la misma la clorofila. En cambio si se agrega una pequeña cantidad de alcohol a la ligroina se consigue fácilmente extraer esta sustancia. La tira así preparada se ha comportado por lo tanto frente a la acción del alcohol de manera análoga a como se comportaban las hojas verdes.

Consecuencias —1.^a) «El experimentador puede transformar a voluntad la clorofila «soluble» en «insoluble» sin que se altere la naturaleza química del pigmento como ha sido comprobado mediante el análisis espectroscópico». «Puesto que la existencia de la afinidad química entre la celulosa del papel de filtro y los pigmentos de la clorofila es muy improbable, nos hallamos aparentemente ante un caso típico de adsorción». «La insolubilidad en gasolina o ligroina de la mayor parte de los pigmentos de la clorofila de las hojas no puede atribuirse a su insolubilidad en estos líquidos, sino que es debida a la interferencia de las fuerzas moleculares del tejido, es decir, a la adsorción. Sin embargo esta fuerza es vencida por otros disolventes como el alcohol, de aquí el que la adición de alcohol absoluto a la ligroina aún en pequeñas cantidades permita una inmediata extracción de todos los pigmentos».

Estas experiencias indujeron a Tswett a pensar que podían existir otras sustancias que se comportaran frente a la clorofila de manera análoga al papel de filtro. Inició por ello una investigación sistemática del problema con el fin de «elucidar la naturaleza de la adsorción y suministrar *un nuevo método físico de separación* basado en la adsorción para la separación de solutos».

Consecuente con esta idea ensayó Tswett el comportamiento frente a la clorofila (y como veremos más tarde frente a otras sustancias) de más de 100 compuestos químicos, la naturaleza de los cuales puede conocerse consultando el trabajo anteriormente mencionado.

La realización experimental la aborda en tres direcciones:

1.^o—El adsorbente finamente dividido lo introduce en una pequeña columna de vidrio preparada estirando a la llama un tubo de vidrio corriente hasta que la abertura del mismo sea de

alrededor de 1 mm. de diámetro, en cuyo final coloca un taco de papel de filtro para sostener la columna del adsorbente. Una vez apelmazada la columna por presión mediante una varilla de vidrio, hace pasar la disolución de la clorofila en ligroina a su través, aunque a veces inicia la operación haciendo pasar el disolvente puro con objeto de expulsar el aire. Facilita el proceso de percolación, aplicando una ligera presión a la parte superior del tubo o una succión a la parte inferior.

2.^o—Coloca la solución de clorofila en un tubo de ensayo e introduce en él, a continuación, el adsorbente y, tras agitación vigorosa, centrífuga, con lo que consigue separar así el adsorbente con las sustancias en él retenidas. En algunas ocasiones sigue el procedimiento inverso, es decir, introduce en primer lugar el adsorbente y tras agregar a continuación una pequeña cantidad de ligroina añade, finalmente, la solución de clorofila.

3.^o—En el caso de sustancias higroscópicas, como por ejemplo, nitratos de cobre o de calcio, cloruro cúprico, etc., coloca la solución de clorofila en un mortero, le agrega el adsorbente y tritura la sustancia, así dispuesta, mediante la mano del mortero.

Observa que, de todas las sustancias antes mencionadas con que opera, un hidrato de carbono, la inulina, es la que proporciona resultados más claros.

Pasando por alto la descripción de las operaciones que en su trabajo detalla referente al comportamiento como adsorbente de esta sustancia frente a la clorofila, queremos transcribir aquí un párrafo en el que describe un hecho, en apariencia insignificante, pero al que posiblemente debe la Cromatografía de Tswett sus éxitos fundamentales. Dice así tal párrafo: «Es muy instructivo observar el fenómeno de la adsorción durante la filtración a través del polvo de inulina. En primer lugar fluye del final del embudo un líquido incoloro, después uno amarillo (caroteno) al mismo tiempo que se forma un anillo verde brillante en la parte superior de la columna de inulina, debajo del cual aparece enseguida un anillo de color amarillo bien definido. *En los subsiguientes lavados de la columna de inulina con ligroina pura, ambos anillos, el verde y el amarillo se amplían considerablemente y se mueven hacia abajo en la columna*».

Esta sencilla operación de pasar el disolvente puro a través de la columna una vez pasada por ella la disolución a la que el mismo Tswett la llamará más tarde «desarrollo del cromatograma», es en opinión de algunos autores (54), no solo la parte fundamental del método, sino incluso posiblemente su única innovación (*).

—=—

Mediante su método cromatográfico intentó Tswett la consecución de dos fines: Obtener al estado de pureza óptica, separándolas cuantitativamente las clorofilas a y b (que él denominó clorofilinas α y β ; su actual denominación se debe a Willstätter, entendiéndose hoy por clorofilinas los ácidos resultantes de la saponificación de las clorofilas con liberación simultánea de alcohol metílico y fitol) y obtenerlas sin la menor alteración. Su primer objetivo lo consiguió plenamente hasta el extremo de que, aún hoy en día, el método cromatográfico debe considerarse como el mejor entre los que permiten conseguir tal fin. Es forzoso reconocer, sin embargo, que su segundo objetivo no lo consiguió plenamente, ya que en sus condiciones operatorias sufren las clorofilas una ligera modificación que Fischer y Stern denominaron «alomerización», modificación que no altera sin embargo, prácticamente, los correspondientes espectros de absorción y que ya fué conocida por Tswett, ya que en uno de sus trabajos (**) puede leerse «por el simple reposo prolongado en solución o en contacto con los adsorbentes, las clorofilinas sufren transformaciones intramoleculares que dejan los espectros intactos». Ello no fué por consiguiente obstáculo para que pudiera determinar correctamente los espectros de absorción de estas sustancias en la región azul del espectro visible, resolviendo de esta manera las dudas que hasta entonces se habían tenido respecto a aquéllos y que eran motivadas por hallarse impurificadas siempre las clorofilas obtenidas por la presencia de carotinoides (nombre dado también por Tswett a estos pigmentos—carotinas y xantofilas—que acompañan a las clorofilas en las hojas verdes) que absorben en la misma región del espectro.

(*) Weil afirma en diversas ocasiones (22, 50, 66) de acuerdo con Deiss (39) que en los trabajos de Runge pueden encontrarse antecedentes del «desarrollo» de Tswett.

(**) «L'etat actuel de nos connaissances sur la chimie de la chlorophylle». Rev. gen. sc. pures XXIII, 141-148, citado por Dheré (69).

La labor experimental de Tswett no se limitó al estudio de los pigmentos de la clorofila, sino que de acuerdo con su afirmación (*). «Es indudable que de la misma forma que los pigmentos de la clorofila, muchas otras sustancias solubles en ligroina, benceno o sulfuro de carbono, se pueden adsorber fácilmente de sus disoluciones en estos compuestos», investigó el comportamiento frente a distintos adsorbentes, de la alcanina (materia colorante aislada de la alcanna tinctoria y derivado de la naftazarina) el azul de cianina (colorante quinoleínico) y el Sudan III.

Digno de mención es también su estudio del comportamiento de la lecitina, sustancia incolora de la que mediante un procedimiento en el que a nuestro juicio se halla en germen el procedimiento hoy conocido con el nombre de «cromatografía» por elución continua» consiguió separar sus constituyentes fundamentales.

Tswett fué indudablemente el primer investigador en el campo de la Cromatografía que se dió cuenta del alcance que podría llegar a tener la nueva técnica y que entendió el fundamento de la misma. Muchas son las pruebas extraídas de su obra que podríamos aducir en pro de esta afirmación. Bástenos citar aquí algunos párrafos de su primer trabajo que transcribimos literalmente; «A partir de los datos que anteceden, puede verse la posibilidad de elaborar un *nuevo método* para la separación física de diversas sustancias solubles en líquidos orgánicos. Este procedimiento se basa en la tendencia de las sustancias disueltas a entrar en combinación adsorptiva con varios sólidos minerales y orgánicos. La cantidad de sustancia disuelta que se combina por adsorción con una cantidad definida del adsorbente, depende del grado de subdivisión del último, de su naturaleza, de la naturaleza de la sustancia disuelta y de la naturaleza del disolvente». «Ulteriores estudios del mecanismo de la adsorción mejorarían indudablemente el *nuevo método analítico*».

Creemos por todo ello que si bien no puede considerarse a Tswett como el iniciador de esta técnica, su admirable y sencilla labor experimental, su genial interpretación de la misma y su clara visión del alcance que habría de tener, permiten considerarlo como el investigador más destacado de entre los que crearon la Cromatografía.

—=—

(*) Hesse y Weil (71) pág. 17.

A partir del año 1912 en que Tswett publicó sus últimos trabajos puede afirmarse que salvo muy raras excepciones como las constituidas por los trabajos de Dheré (73) y sus colaboradores (74, 75, 76) o los de Palmer (77, 78) Coward o Lipmaa (79) la cromatografía quedó completamente olvidada, hasta que Kuhn y Lederer volvieron a utilizarla en el año 1931.

Se ha dicho por parte de diversos autores, que una de las causas que motivó esta paralización de la investigación en el campo de la Cromatografía, fué la opinión desfavorable de Willstätter acerca de esta técnica de trabajo. A mi entender esta afirmación no es exacta.

Willstätter, no la empleó por dos causas fundamentales: Por que conocía el fenómeno de la alomerización que se dá particularmente en las clorofilas a y b con las cuales operó en muchos de sus trabajos (*) y porque dado que él necesitaba preparaciones *en cuantía*

(73) C. Dheré. «Transformation de l'helicohaematin dans hematoporphyrin», *J. physiol. et path. gen.* 1917, 67.

(74) C. Dheré y G. Vegezzi. «Composition pigmentaire de l'hepatoclorophylle» *Compt. Rend.* 163, 399 (1916); «Helicorubine» id. id., 164, 869 (1917); «Investigations sur l'helicorubine», *J. physiol. et path. gen.* 44, 53 (1917).

(75) W. Rogowsky, «Recherches sur les espec tres d'absortion ultraviolets et sur les espec tres d'emission par fluorescence des pigments chlorophylliens» Tesis Doctoral. Friburgo 1912. Citado por Dheré (69) y Strain (80), pág. 4.

(76) G. Vegezzi, «Recherches sur quelques pigments des Invertébrés: Hélicorubine, Hépatoclorophylle, Tétrónérytrine». Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Friburgo (1916). Citado por Dheré (69) y Strain (80), pág. 4.

(77) L. S. Palmer, «Carotenoids and related pigments», The Chemical Catalog Co. New York, 1922. Citado por Meinhardt (13) y Zechmeister (1).

(78) L. S. Palmer, «Carotin, the principal natural yellow pigment of milk fat», Tesis Doctoral, Universidad de Missouri. 1913. Citado por Strain (83), pág. 4 y Weil y Williams (2).

(79) T. Lipmaa, «Propietes physiques et chimiques de la rhodoxantine» *Compt. Rend.* 182, 867, 1040 (1926).

(*) Las alteraciones que una substancia puede sufrir a lo largo del proceso cromatográfico, no se limitan en modo alguno a este proceso de alomerización. Zechmeister loc. cit. (1), pág. 153, cita un número bastante elevado de trabajos, en los que se demuestran alteraciones de tipo muy diverso. Estas transformaciones no son, sin embargo, frecuentes, si se compara con el enorme número de substancias que pueden cromatografiarse sin que se alteren. El propio Zechmeister concluye su relación diciendo: «La posibilidad de tales complicaciones no debe desanimar a los cromatografistas, ya que la aparición de una alteración en un proceso cromatográfico se puede convertir en muchas ocasiones en un nuevo y valioso artificio operatorio». Y cita a continuación diversos casos en apoyo de su aserto.

notable para sus estudios acerca de la constitución de las mismas, de sus productos de transformación, etc. (que le valieron el Premio Nobel de 1915) y los métodos químicos tanto preparativos como analíticos que se hallaban a su alcance lo eran exclusivamente en escala macro, la técnica no le servía, ya que su utilización únicamente le hubiera permitido la obtención de pequeñas cantidades de muestras.

Cierto es, que en sus trabajos de investigación no hace mención alguna ni de Tswett ni de su técnica y que este hecho ha sido interpretado como indicio de que no le concedía el análisis cromatográfico un gran valor (*). Esta interpretación tampoco es a mi juicio perfectamente correcta. El hecho de que un investigador no utilice una técnica, porque sepa que no le es útil para el fin que persigue no presupone ni desconocimiento ni menosprecio de la misma. Buena prueba de ello se halla en los siguientes párrafos traducidos literalmente de su libro «Untersuchungen über enzyme», publicado en 1928: «Al referirse al empleo de los métodos de adsorción para el fraccionamiento de mezclas de substancias orgánicas semejantes, no se debe olvidar el éxito del análisis Cromatográfico por adsorción de Tswett. Aún cuando su método no era apropiado para el trabajo preparativo, Tswett consiguió resolver, sin embargo, mediante un proceso de adsorción, mezclas de pigmentos de hojas en una cierta proporción analítica».

En la misma obra puede así mismo leerse: «El análisis cromatográfico de adsorción que en manos de Tswett ha conducido a importantes resultados en lo que atañe a la clorofila y sus derivados, lo consideramos no utilizable *para el trabajo en gran escala* y tampoco, por lo tanto, para fines preparativos».

En cambio si Willstätter hubiera utilizado la cromatografía, es indudable que su autoridad indiscutible hubiera impulsado enormemente la nueva técnica.

Se han dado también otras razones tendentes a explicar este «vacío» en la Historia de la Cromatografía, tales como el hecho de que el libro de Tswett «Las Cromofilas en los Reinos animal y vegetal» (**) se publicó en ruso, lengua poco conocida que impidió la popularización de sus trabajos. A este respecto debe señalarse con

(*) Dheré (69), pág. 54.

(**) «Chromofill w rastitelnom i schivotnom mirje. Warsaw 1910.

Dheré (*) que si bien el hecho citado es cierto, Tswett publicó en alemán ya en el año 1906 un excelente resumen de su método y que, como anteriormente dijimos, de los 56 trabajos de Tswett citados por Brignet, solo 15 se hallan redactados en ruso, mientras que de los 41 restantes, 28 están en alemán y 13 en francés.

Es evidente también que la primera guerra mundial contribuyó (**) a esta paralización de la Cromatografía, ya que por lo menos obligó a Tswett a abandonar sus trabajos de investigación, según mencionamos en su biografía.

La explicación definitiva de este hecho, que es común a numerosas otras técnicas, se halla en realidad en el hecho ya apuntado y citado por Strain al afirmar brevemente que la tercera razón del mismo fué «la imposibilidad de preparar mediante esta técnica cantidades suficientes para el análisis mediante las técnicas macro entonces en uso» (80).

Yo agregaría a esta otra razón íntimamente ligada a ella: el que en la época en que Tswett puso a punto su técnica no se había despertado en los químicos el interés por las sustancias existentes en la naturaleza en pequeñas cantidades. En efecto la mayoría de las vitaminas, hormonas, etc. fueron descubiertas, aisladas y sintetizadas con posterioridad a la obra de Tswett.

La posibilidad de abordar un estudio determinado depende, si no exclusiva, sí fundamentalmente de los medios con que el investigador cuenta para conseguirlo. Lo que trasladado al campo de la química de los productos naturales equivale a decir que la posibilidad de aislar las sustancias existentes en la misma, en minúsculas cantidades, obligaba a disponer tanto de métodos adecuados para su aislamiento y ulterior síntesis, como de procedimientos analíticos con que orientar la investigación emprendida.

La cromatografía de Tswett abrió cauces al aislamiento y purificación de pequeñas cantidades de productos, mas la consecución definitiva de este objetivo requería el concurso de los correspondientes y adecuados procedimientos analíticos. Y éstos, salvo contadas y valiosísimas excepciones, se hallaban en edad de desarrollo o no se habían establecido todavía. Bastará para convencernos de

(*) Loc. cit. (69), pág. 53.

(**) Strain, loc. cit (80), pág. 4.

(80) H. H. Strain. «Chromatographic Analysis», Interscience Publishers Inc. New York 1945, pág. 4.

este hecho, recordar que los procedimientos analíticos con los que se sigue hoy el problema que venimos apuntando, tiene como fundamento el micro análisis. Pues bien Pregl publicó su primer libro —en el que recogía fundamentalmente su experiencia personal— en el año 1917. Y las técnicas que permiten el análisis de trazas o muy pequeñas cantidades, tales como la espectrofotometría, medidas radioactivas, etc., encontraron su desarrollo en épocas todavía posteriores.

A partir del año 1931 inicia la Cromatografía su verdadero desarrollo. A los escasos nombres de los investigadores que inician esta segunda época (*) (Kuhn, Lederer, Winsterstein, Strain, Zechmeister, Brockman, Karrer, etc.) van agregándose lentamente al principio, otros numerosos, que al mejorar la técnica van ampliando el campo de la Cromatografía clásica de Tswett y permiten su aplicación a la resolución de numerosas mezclas de productos incoloros.

Pronto los éxitos alcanzados con la nueva técnica atraen la atención de numerosos investigadores quienes ponen a punto nuevas variantes de la misma.

Strain (81) combina, en 1932, la Cromatografía con la electroforesis. Koschara (62) en 1936 y Steiger y Reichstein (82) en 1938, introducen el procedimiento llamado del «cromatograma líquido o fluvente». Tiselius (83) inicia en 1940 sus publicaciones en las que dará cuenta de las importantísimas técnicas que denomina «Cromatografía frontal» y «Análisis por elución». Martín y Synge (84) abren nuevos horizontes a la técnica con su «cromatografía de reparto». Consden, Martín y Synge (19) inician en 1944, con su «cromatografía bidimensional», un nuevo Capítulo en la Historia de esta técnica. En 1947 un grupo de investigadores americanos de entre los cuales

(*) Zechmeister caracteriza los dos periodos, anterior y posterior a 1931, con las denominaciones «Latenzzeit» (periodo latente) y «Blutzeit» (periodo floreciente) respectivamente.

(81) H. H. Strain, *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1292 (1932).

(82) M. Steiger y T. Reichstein, *Helvetica Chim. Acta*, 21, 546 (1938).

(83) A. Tiselius, *Ark. för Kemi*, 41 B, núm. 22 (1940). Véase su discurso con motivo de la recepción del Premio Nobel en la obra «Les Prix Nobel en 1948» Imprimerie Royales. P. A. Norstedt & Söner, Stockholm 1949.

(84) A. J. P. Martín y R. L. M. Synge, *Advances in Proteins Chemistry*, II, 1-83 (1945).

destacan los nombres de Boyd, Marinsky, Sppeding y Tompkins (85, 86, 87, 88), publican los primeros resultados de sus investigaciones con resinas cambiadoras de iones. Con ellos aparece una nueva e importantísima variante: la «Cromatografía por cambio iónico». La nueva técnica, que ha nacido impulsada por las investigaciones atómicas, alcanza éxitos tan resonantes como la separación de los elementos de las tierras raras o la de cuerpos radiactivos. Wieland y Fischer (89) publican en 1948 sus investigaciones concernientes a la «Electroforesis en papel». Tiselius y Hadgahl (90) introducen en 1950 su «análisis por desplazamiento»...

En 1947 se monta la primera fábrica —la Valley Vitamins Inc. en McAllen (Texas)— en la que se intenta por primera vez la resolución en escala industrial mediante métodos cromatográficos.

Aun cuando algunas de las nuevas técnicas son de difícil y costosa aplicación, la mayoría son, en cambio, de fácil adaptación incluso a los laboratorios más modestos. Sin embargo, todavía en 1948 puede escribir Zechmeister (1) «El deplorable estado actual en este terreno es tal que nos hace pensar en el Laboratorio de Bunsen, hace 100 años, cuando cada investigador tenía que construirse y calibrarse sus propias buretas y pipetas antes de iniciar su tarea».

Esta situación cambia sin embargo rápidamente, pues la Cromatografía —y especialmente las técnicas en papel— empiezan bien pronto a utilizarse en el trabajo habitual de un gran número de laboratorios e incluso en el de «rutina».

A partir de 1950 el número de trabajos publicados con relación a esta técnica va creciendo en forma vertiginosa, ya que siendo de 30 en 1941 o de 74 en 1947, alcanza en 1950 la cifra de 303 para llegar a 1041 en el año 1954. (*)

(85) G. E. Boyd, A. W. Adamson y L. S. Meyers Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 2836 (1947).

(86) J. A. Marinsky, L. E. Glendenia y C. D. Coryell, *J. Am. Chem. Soc.* 69, 2781 (1947).

(87) F. H. Sppeding, E. I. Fulmer, T. A. Butler, E. M. Gladrow, M. Gobush, P. E. Porter, J. E. Powell y J. M. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* 69, 2812 (1947).

(88) E. R. Tompkins, J. X. Khyn y W. W. Cohn, *J. Am. Chem. Soc.* 69, 2769 (1947).

(89) T. Wieland y E. Fischer, *Naturwiss.* 35, 29 (1948).

(90) A. Tiselius y Hagdahl, *Acta Chem. Scand.* 4, 394 (1950).

(*) Estas cifras corresponden a los trabajos cuyo resumen aparece en los números de la revista *Índice Chemical Abstracts* correspondientes a los años que se citan.

El químico sueco Arne Tiselius recibe en 1947 el Premio Nobel como recompensa a los extraordinarios servicios prestados a la química —y en especial a la de las proteínas— con sus métodos cromatográficos. En 1952 son dos químicos ingleses Archer J. P. Martín y Richard L. M. Synge los que reciben el preciado galardón, por análoga causa. La ciencia sanciona así la importancia de esta técnica.

Creemos que con lo dicho hasta ahora, hemos puesto de manifiesto como nació y se desarrolló en sus comienzos la Cromatografía, así como la importancia actual de la misma.

Permítasenos terminar esta Lección, citando las palabras pronunciadas por el ilustre químico P. Karrer en ocasión del Congreso de Química Pura y Aplicada celebrado en Londres en 1947:

«Ningún otro descubrimiento ha ejercido una influencia tan considerable y ampliado el campo de investigación del químico orgánico como el método de análisis cromatográfico de Tswett. La investigación en el campo de las vitaminas, hormonas, carotenoides y numerosos otros compuestos naturales, no hubiera progresado tan rápidamente y alcanzado tan importantes resultados, si no hubiera sido por este método, el cual ha revelado así mismo la enorme variedad de compuestos estrechamente parecidos existentes en la naturaleza».

HE DICHO.

Obras sobre Cromatografía publicadas a partir de 1950

Ion exchange Resins.—Kunin R. y Myers R.—John Wiley, New York 1950.

«Adsorption and Chromatography».—Cassidy H. G. en el libro «Technique of Organic Chemistry» de A. Weissberger. Vol V, Interscience Publishers. New York 1950.

Progress in Chromatography, L. Zechmeister, Chapman & Hall, London, 1950.

Electrical Phenomena at Interfaces in Chemistry, Physics and Biology.—Charlwood P. A.—New York, Mac Millan, Co. 1951.

Progresos recientes de la Cromatografía, 1.^a Parte. Química Orgánica y biológica, M. Lederer, traducido por el Prof. Dr. V. Iranzo, Ediciones Nucleo, Barcelona. 1951.

Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography.—Balston J. M. y Talbot B. E.—H. Reeve Angel and Co. Ltd. London. W. and R. Balston Ltd. Maidstone, 1952.

Chromatographic Analysis for the Metal Ions of a first course in Qualitative Analysis.—Fillinger H. H.—Collins College Va. 1952.

Progrés Récents de la Chromatographie. Deuxieme Partie. Chimie Minerale.—Lederer M.—Paris, Hermann et Cie. 1952.

«Analisi Cromatografica su carta».—Schoen G.—Soc. Edit. Farmacéutica Milano. 1952.

Foams. Theory and Industrial Applications.—Bikerman J. J., Booth R. B., Perri, J. M. and Currie C. C.—Reinhold Publishing Corp. New York 1953.

Paper Chromatography. A Laboratory Manual.—Bloch R. J., Le Strange R. y Zweig G.—New York Academic Press 1953.

Practical Chromatography.—Brimley R. C. y Barret F. C.—New York Reinhold Pu. Corp. 1953.

«Papierchromatographie».—Cramer, Friedrich.—Verlag Chemie, Weinheim 1953.

«Chromatography. A review of Principles and Applications».—Lederer E. y Lederer M. Houston.—Elsevier Pub. Co. 1953.

«Chromatographic Methods of Inorganic Analysis» Pollard y McOmie.—New York Academic Press. 1953.

«Ion exchangers in Analytical Chemistry».—Samuelson O.—John Wiley and Sons. Inc. New York 1953.

«Cromatografía, su Carta».—Savoia F.—Milán, Li. Hoepli, 1953.

«Inorganic Chromatography».—Smith O.—New York, D. Van Nostrand Co. 1953.

«Michael Tswet's first paper Chromatography»; Hesse y Weil. M. Woelm. Eschwege, Germany. 1954.

«Cromatografía sobre papel», V. Villar Palasi, Monografías de Ciencia Moderna, N.º 33, C. S. J. C. Madrid 1954.

«Chromatography». J. I. Williams. Philosophical Library. New York 1954.

«Die Papierelektrophorese».—Wunderly Ch.—H. R. Sauerlander und Co. Aarau 1954.

