

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

SECRETARIA

La presente Tesis Doctoral  
queda registrada en el fo-  
lio número            del corres-  
pondiente libro de Registro  
con el número

GRANADA Julio de 1972

El Encargado del Registro

DEPOSITO LEGAL  
Gr. 373-1972

Impreso en la Facultad de Ciencias de la Universidad  
de Granada.

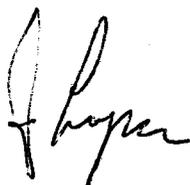
---

R: 24-507

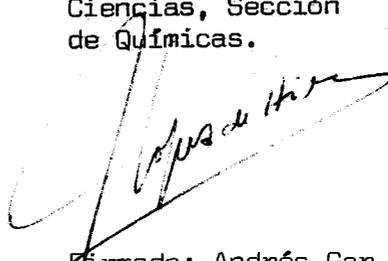
EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO CON AMINAS DE ALTO PESO  
MOLECULAR: AISLAMIENTO DE ACIDOS.-

Andrés García-Granados López de Hierro

Memoria presentada  
para optar al Gra-  
do de Doctor en  
Ciencias, Sección  
de Químicas.



Firmado: F. Jorge López  
Aparicio, Catedrático -  
Director del Dpto. Inter  
facultativo de Química  
Orgánica de la Universidad  
de Granada.



Firmado: Andrés Gar-  
cía-Granados López  
de Hierro. Licencia  
do en Ciencias, Sec-  
ción de Químicas.

VºBº EL DECANO

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	513428135
N.º Copia	15374797



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
ENTRADA

Fecha 28 NOV 1972  
Número 3751

A Maria Esther

El trabajo a que se refiere la presente memoria ha sido realizado en el Laboratorio del Dpto. Interfacultativo de Química Orgánica de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Excmo. Sr. D. F. Jorge López Aparicio, a quien deseo expresar mi agradecimiento.

Agradezco al Dr. D. Juan Antonio López Sastre la ayuda prestada en la realización de la primera parte de las investigaciones, así como a todos los compañeros del Departamento por sus consejos y sugerencias.

Deseo agradecer también la ayuda y facilidades que el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de Granada y el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de Sevilla me concedieron.

Durante la realización del presente trabajo he disfrutado una beca concedida por la Dirección General de Investigación y Coordinación.

## SUMARIO

1.- INTRODUCCION.-	25
2.- ANTECEDENTES.-	25
2.1.- Poder extractor de las aminas de alto peso molecular.	25
2.2.- Estudio cuantitativo de la extracción de ácidos orgánicos.	26
2.3.- Reextracción de ácidos orgánicos.	31
2.4.- Recuperación de los ácidos orgánicos.	31
2.5.- Extracción de ácidos contenidos en zumos.	31
2.6.- Métodos utilizados en el aislamiento de ácidos de zumos.	32
2.7.- Reextracción y recuperación de los ácidos extraídos.	37
2.8.- Productos naturales empleados.	38
2.9.- Métodos analíticos utilizados.	41
3.- PARTE TEORICA.-	
3.1.- Estudio cuantitativo de la extracción de ácidos orgánicos.	69
3.2.- Reextracción de ácidos extraídos.	80
3.3.- Recuperación de ácidos extraídos.	82
3.4.- Extracción, reextracción y recuperación de ácidos contenidos en zumos naturales.	86
3.5.- Sistema rápido de microanálisis de zumos.	89
3.6.- Métodos de análisis.	92
4.- PARTE EXPERIMENTAL.-	
4.1.- Pruebas preliminares.	121
4.2.- Extracción de los ácidos.	122
4.2.1.- Material y materias necesarias.	122
4.2.2.- Preparación de soluciones.	123
4.2.3.- Método de extracción.	123
4.2.4.- Método de análisis.	124
4.2.5.- Expresión de datos y consignación de resultados.	124
4.3.- Reextracción y recuperación de los ácidos extraídos.	138
4.4.- Extracción de los ácidos del zumo de limón.	143
4.4.1.- Obtención, purificación y análisis del zumo.	143

4.4.2.- Extracción con DUA.	144
4.4.2.1.- Tratamiento con solución bencénica de DUA.	144
4.4.2.2.- Separación de fases y tra <u>ta</u> tamiento de la interfase.	144
4.5.- Reextracción del ácido cítrico. Purifica - ción de las fases.	146
4.6.- Purificación del ácido cítrico obtenido. Análisis.	148
4.7.- Extracción de los ácidos del zumo de uva.	150
4.7.1.- Obtención del zumo.	150
4.7.2.- Purificación del zumo.	150
4.7.3.- Extracción con DUA.	151
4.7.3.1.- Tratamiento con solución bencénica de DUA	151
4.7.3.2.- Separación de las fases. Purificación.	151
4.8.- Reextracción. Purificación de las fases.	152
4.9.- Intercambio iónico.	153
4.10.- Análisis de los productos aislados de la uva.	154
4.11.- Cromatografía en papel y capa fina de los productos aislados del zumo de uva.	154
4.12.- Extracción de los ácidos contenidos en el alpechín.	158
4.12.1.- Origen del alpechín utilizado	158
4.12.2.- Purificación del alpechín.	158
4.12.3.- Extracción con DUA.	160
4.12.3.1.- Tratamiento con solu- ción bencénica de DUA.	160
4.12.3.2.- Separación de fases.	160
4.12.3.3.- Tratamiento de la in- terfase	161
4.12.3.4.- Purificación de las fases.	161

4.13.- Recuperación de los ácidos extraídos del alpechín de la aceituna.	163
4.13.1.- Tratamiento con ácido clorhídrico.	163
4.13.2.- Separación de fases.	163
4.13.3.- Recuperación de los productos precipitados.	164
4.13.4.- Concentración de la fase acuosa (VI). Purificación.	164
4.14.- Fraccionamiento de las mezclas obtenidas del alpechín.	166
4.14.1.- Fraccionamiento de S-1	167
4.14.2.- Fraccionamiento de VIII.	168
4.14.2.1.- Fraccionamiento de VIII-2.	168
4.14.2.2.- Fraccionamiento de VIII-3	170
4.14.2.2.1.- F. de VIII-3-1	172
4.14.2.2.2.- F. de VIII-3-3	176
4.14.2.2.3.- F. de VIII-3-4	177
4.15.- Recuperación de la DUA utilizada en el primer proceso de extracción del alpechín	178
4.16.- 2ª fase de extracción, reextracción y recuperación de los ácidos contenidos en el alpechín.	179
4.17.- Extracción de los ácidos contenidos en la manzana.	181
4.17.1.- Obtención del zumo.	181
4.17.2.- Purificación del zumo.	181
4.17.3.- Tratamiento con solución bencénica de DUA.	183
4.17.4.- Tratamiento con columnas de resinas de cambio aniónico.	184
4.17.5.- Recuperación de los ácidos contenidos en las soluciones I y II	186
4.17.5.1.- Reextracción	186

4.17.5.2.- Fraccionamiento.	186
4.17.6.- Recuperación de los ácidos contenidos en las columnas I y II.	188
4.17.6.1.- Desplazamiento.	188
4.17.6.2.- Fraccionamiento.	188
4.17.7.- Aislamiento de los ácidos de la manzana inicialmente en forma de sales.	189
4.17.7.1.- Tratamiento con resinas catiónicas.	189
4.17.7.2.- Extracción de los ácidos con soluciones de DUA.	189
4.17.7.3.- Reextracción y recuperación	189
4.18.- Extracción de los ácidos del zumo de ciruela.	191
4.18.1.- Obtención del zumo. Purificación.	191
4.18.2.- Tratamiento con soluciones benéficas de DUA.	191
4.18.3.- Tratamiento con resinas de cambio aniónicas.	192
4.18.4.- Reextracción y recuperación de los ácidos contenidos en CI, - CII, CIII y CIV.	195
4.18.5.- Desplazamiento y recuperación de los ácidos contenidos en las columnas CVI, CVII, CVIII y CIX.	195
4.18.6.- Tratamiento de las soluciones V y X con columnas de cambio catiónicas.	197
4.18.7.- Extracción con DUA de los ácidos inicialmente en forma de sales.	197
4.18.8.- Extracción con resinas de cambio aniónico de los ácidos inicialmente en forma de sales,	198
4.19.- Cromatografías en papel y capa fina de los productos extraídos de la manzana y de la ciruela.	200

4.20.- Cromatografía gas-líquido cualitativa.-	
4.20.1.- CG-L de ésteres metílicos.	202
4.20.1.1.- Preparación de diazometano.	202
4.20.1.2.- Preparación de patrones.	203
4.20.1.3.- Esterificación de fracciones de productos naturales.	204
4.20.1.4.- Aparatos utilizados columnas, condiciones de trabajo. Tiempos de retención.	205
4.20.1.5.- Cromatogramas de ésteres metílicos del alpechín 1ª extrac.	209
4.20.1.6.- Cromatogramas del zumo de limón.	211
4.20.1.7.- Cromatogramas del zumo de uva.	213
4.20.1.8.- Cromatogramas del extracto de manzana	215
4.20.1.9.- Cromatogramas del zumo de ciruela.	217
4.21.- Cromatografía de gases cualitativa y cuantitativa por TMS derivados.-	219
4.21.1.- Formación de derivados.	219
4.21.2.- Construcción de columnas.	221
4.21.3.- Cálculo de las características de la columna.	223
4.21.4.- Análisis cualitativo.	230
4.21.5.- Análisis cuantitativo.	239
4.21.6.- Cromatogramas del alpechín.	249
4.21.7.- Cromatogramas del zumo de limón	251
4.21.8.- Cromatogramas del zumo de uva.	253
4.21.9.- Cromatogramas del extracto de manzana.	255
4.21.10.- Cromatogramas del zumo de ciruela.	257
4.21.11.- Análisis del alpechín de la campaña de 1971.	259
4.21.12.- Microanálisis de ácidos de productos naturales.	262

5.- RESULTADOS.-	267
6.- CONCLUSIONES.-	299
7.- BIBLIOGRAFIA.-	

INTRODUCCION.-



En el presente trabajo se pretende realizar, por una parte el estudio del poder extractivo de aminas de alto peso molecular, concretamente de la Di(2-undecil)amina, frente a ácidos orgánicos. Es también objetivo fundamental el estudio de ácidos contenidos en zumos naturales, principalmente los contenidos en el alpechín de la aceituna, no estudiados por procedimientos como los que aquí se han seguido, aislando productos ácidos que en él se encuentran.

Puede dividirse la parte experimental en dos bloques fundamentales:

Por una parte se hace el estudio cuantitativo de las extracciones de una serie de ácidos, que consideramos interesantes, de sus soluciones acuosas. Se ha llevado a cabo con soluciones bencénicas de la mencionada amina, que de ahora en adelante denominaremos DUA.

Como segundo aspecto, se hace la extracción de ácidos de zumos naturales que los posean a ser posible iguales o análogos a los investigados en la primera parte del trabajo.

La DUA se sintetizó por primera vez en los Laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de Valladolid por López Aparicio y colaboradores (1). El presente trabajo es parte del estudio del comportamiento de la DUA en distintos aspectos:

Como agente extractor de sales de elementos de transición interna (1)

Como agente catalítico en la hidrólisis de polisacáridos.(2).

Como agente extractor de ácidos carboxílicos y fenólicos.

Teniendo en cuenta el carácter súmamente básico de la DUA (1), de su escasa solubilidad en agua(2 ppm)(1) y su gran solubilidad en solventes orgánicos del tipo benceno u otro de similar constante dieléctrica(1), es de suponer que sea un buen agente de secuestro de ácidos en solución acuosa.

Partiendo de soluciones patrón de diversos ácidos carboxílicos en agua y de soluciones bencénicas de DUA mezclando por agitación ambas fases, parte del ácido quedará atrapado por la DUA y pasará a la fase bencénica. Es interesante saber cuanto ácido pasará a la fase bencénica, y esto es lo que se investiga en este trabajo.

En cuanto a la extracción de ácidos en zumos vegetales, se ha procedido a aislar el ácido cítrico contenido en el zumo de limón con objeto de ver el rendimiento de la operación. Algo similar se ha hecho con el tartárico de la uva, pero teniendo en cuenta que ya en este caso el ácido principal va acompañado por otros en cantidad apreciable. La investigación realizada en manzana y ciruela tiene como objeto la comparación de la DUA con resinas sólidas fuertemente básicas. El estudio realizado de los ácidos contenidos en el alpechín de la aceituna tiene carácter de primicia. Tan sólo hay publicado un trabajo sobre los ácidos orgánicos del alpechín (3), pero el procedimiento, normal en las fechas en que se realizó el trabajo, no ofrecía total seguridad en cuanto a la identificación de estos ácidos.

El nombre de alpechín proviene del árabe y significa "líquido que tiene muchas heces". Ya su denominación indica los problemas que su manejo y estudio presentan, siendo la causa de que sean muy pocos los trabajos encaminados a esclarecer su composición química.

Teniendo en cuenta la cantidad de alpechín que se desaprovecha totalmente en España y otros países es por lo que hemos decidido proceder a un estudio de sus componentes, ya que cualquier pequeño aprovechamiento tendría una gran repercusión económica, aparte de su indudable interés científico. Según datos aproximados, el alpechín que anualmente se desperdicia en España asciende a 1 millón de toneladas por año.

Es de hacer notar la regresión en el cultivo de la aceituna en nuestro país debido a la carestía en su recogida del árbol, lo que obliga a los cultivadores a injertar sus olivos en variedades de verdeo, pero donde esto no es posible, el cultivo se encuentra en peligro. Solucionar

este problema es asegurar el futuro del olivo.

Puede pensarse con fundamento que la auxina que provoque la caída de la aceituna sea hidrosoluble y, en este caso, si queda al menos parte de ella inalterada se encontrará en el alpechín. Muchas auxinas son de carácter ácido, y el estudio de microcomponentes de las mezclas de ácidos por nosotros aisladas puede llevarnos en un futuro a la determinación de esta auxina. Confirma todo lo expuesto el que se acelere la caída de la aceituna en un olivo regado con alpechín.

En este trabajo se utilizan técnicas actualizadas de análisis y constituye el inicio de una serie de investigaciones en el campo de las sustancias naturales.



## 2.- ANTECEDENTES.-



## 2.1.- PODER DE EXTRACCION DE LAS AMINAS DE ALTO PESO MOLECULAR.-

Desde que ADAMS y HOLME (4) introdujeron las aminas como resinas de cambio aniónico, numerosos trabajos se han publicado en los que se pone de relieve la enorme utilidad que, para la investigación y la industria, han tenido y seguirán teniendo en distintos aspectos.

Posteriormente, en el año 1948 se publicó un trabajo (5) en el que llamaba la atención sobre la utilidad de las aminas líquidas como agentes extractores de ácidos. Se trataba concretamente de la metil-dioctil-amina.

Las primeras experiencias realizadas demostraban que, en el caso de ácidos fuertes como el clorhídrico, las soluciones acuosas del mismo tratadas con suficiente cantidad de metil-dioctil-amina quedaban a un pH de 6,5 unidades, lo que es significativo.

La purificación de la solución acuosa se lograba mediante sucesivos lavados con un disolvente orgánico, por ejemplo cloroformo.

Se comprobó que la extracción es más sencilla de controlar si la amina se encuentra disuelta en un solvente apropiado (benceno, cloroformo, alcohol n-butílico, tetracloruro de carbono, dicloroetileno, acetato de etilo, metil-etil-cetona, éter de petróleo de 80-100°, nitrobenceno y tolueno). El mejor resultado se consiguió utilizando como disolvente cloroformo o nitrobenceno.

## 2.2.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LA EXTRACCION DE ACIDOS.-

SMITH y PAGE (5) llevaron a cabo extracciones con los siguientes ácidos: Acético, crómico, glucónico, glutámico, aminoacético, clorhídrico, láctico, nítrico, oxálico, fosfórico, succínico, sulfúrico y p-toluénsulfónico, en soluciones en general 0,1N, y empleando cantidades similares de metil-dioctil-amina en cloroformo al 5%. La cantidad de ácido remanente en la solución acuosa después de la extracción no llega al 5% en los ácidos crómico, acético, clorhídrico, nítrico, oxálico, sulfúrico y p-toluénsulfónico. Queda un 16% de láctico y un 11% de succínico. Hay que hacer notar que queda sin extraer el 100% de ácido glutámico, el 98% de aminoacético y un 98% de ácido glucónico. Este último resultado parece anómalo, pues no existe causa que lo justifique. El hecho de quedar sin extraer un 44% de ácido fosfórico tampoco es un resultado que resulte acorde con lo que cabía esperar.

Los citados autores probaron también la reextracción del ácido tratando la solución clorofórmica con soluciones acuosas de hidróxido sódico.

Experimentaron asimismo que en el caso de que coexistiesen en disolución dos ácidos de muy diferente fuerza ácida y tratando con determinada cantidad de equivalentes de amina, se podía extraer selectivamente el más fuerte de los dos.

Investigaron la extracción de ácido clorhídrico con diversas aminas de alto peso molecular, exactamente 13 de ellas, comprobando que los mejores resultados se obtenían con aminas terciarias: Metil-dinonil-amina, trioctil-amina, decilpiperidina, metil-dioctil-amina y amiloctil-amina, y entre ellas las menos impedidas estéricamente, siempre que tuviesen al menos dos ramas con 9 átomos de carbono como es el caso de la metil-dinonil-amina era la más eficiente con un 97% de ClH extraído (normalidad inicial 0,1).

Compararon la metil-dioctil-amina con una amina sólida comercializada, la De Acidite C, con resultados halagueños para la metil-dioctil-amina.

Es preciso hacer notar que aunque para todas las experiencias utilizaron valores únicos de concentración de una y otra fase y un único valor de relación de cantidad - de equivalentes de ácido y amina, este trabajo puede considerarse la base de la utilización de las aminas líquidas - como agentes de extracción de ácidos, adelantando además - posibles aplicaciones que en parte llevaron a la práctica:

- a) Eliminación de ácidos fuertes de los hidrolizados de caseína, gelatina y hemoglobina.
- b) Purificación de penicilinas.
- c) Eliminación de ácidos una vez cumplida su misión de catalizadores.
- d) Extracción de ácidos orgánicos de los vegetales.
- e) Extracción de ciertos metales, una vez oxidados a aniones.

Los apartados c, d y e no los llevaron a la práctica.

En 1950 se iniciaron una serie de investigaciones en el Oak Ridge National Laboratory con aminas de alto peso molecular. En el aspecto que a nosotros nos interesa publicó MOORE(6) un nuevo estudio de la metil-dioctil-amina, así como de la tribencil-amina. La primera de las dos extrae mucho mejor los ácidos inorgánicos.

El sistema utilizado para las medidas cuantitativas consistía en analizar los ácidos reextraídos con un exceso de solución acuosa de hidróxido potásico. La normalidad original de los ácidos era de 0,2 y la relación de equivalentes amina/ácido de 1,5 teniendo en cuenta que la amina fue utilizada en solución clorofórmica al 5%.

En este trabajo se empieza a relacionar el % de ácido extraído con la mayor o menor normalidad del ácido a extraer. MOORE opera con tan sólo 5 valores en total, pero se puede apreciar que a mayor concentración inicial de ácido, mayor % extraído. Asimismo indica que para pequeñas concentraciones de ácido se forman emulsiones muy estables

Con respecto a los ácidos orgánicos opera en las mismas condiciones de concentración y relación de equivalentes, pero con cantidades fijas solamente.

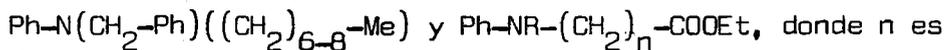
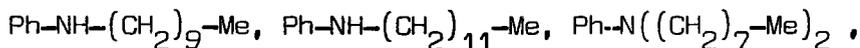
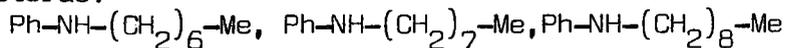
La amina utilizada para los ácidos orgánicos es la metil-dioctil-amina, comprobando que se podía extraer - el 75% de acético, 98,7% de tricloroacético, 0% de aspártico, 0,3% de glutámico, 86,9% de glutárico, 96% de pícrico, 95,9% de fumárico, 97,5 de maleico y 90,8% de málico.

Es interesante señalar que en los laboratorios - antes mencionados se llevó a cabo la mayor investigación - de esa época para la separación de uranio de otros elementos, y con este fin precisamente se sintetizó la DUA que - ahora utilizamos en este trabajo(1).

En 1960 se publicó una revisión de lo realizado en el Oak Ridge Laboratory, con 93 referencias(7).

Existen otro trabajo sobre Amberlita LA-II y ácido clorhídrico(8) y bastantes del Instituto Tecnológico de Moscú, con N-octil-anilina (9) y ácidos inorgánicos, extracción de ácido oxálico de soluciones de ácido nítrico - (10), mecanismo de la extracción de ácidos y basicidad de los extractantes(11). Los mismos investigadores rusos también han publicado un trabajo sobre el efecto del alcohol n-octílico(conocido antiespumante) en la extracción de ácido sulfúrico con trioctil-amina(12). Persiguen que se forme el sulfato y no el bisulfato de trioctil-amina. Por medidas crioscópicas comprobaron que se obtenía el sulfato - acompañado de 2 moléculas de alcohol, con una constante de estabilidad del orden de  $10^2$ , y un coeficiente de extracción mayor.

El trabajo más amplio de los investigadores rusos versa sobre la extracción de ácidos inorgánicos con derivados de la anilina(13). Estudian los ácidos clorhídrico nítrico, sulfúrico y perclórico, cada uno de ellos en concentraciones iniciales que varían de 0,1 a 5 molar. Utilizan como disolvente p-xileno, y una variedad grande de aminas extractoras:



8, 10, 8 y 8 y R es H, H, Me y Et respectivamente.

Para pequeñas concentraciones iniciales de ácido en la fase acuosa, la cantidad del mismo en la fase orgánica, una vez realizada la extracción, es proporcional al cuadrado de la concentración inicial:

$$y = K x^2$$

y = concentración ácido en fase orgánica

x = concentración inicial de ácido en fase acuosa.

$$K = (\text{amina} \cdot \text{AH}) / (\text{amina})(\text{H}^+)(\text{A}^-)$$

En el caso de  $\text{NO}_3\text{H}$  y  $\text{ClH}$  K vale respectivamente 35, 30 y 10, pero en el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  K depende de la concentración. Cuando x es muy grande, puede aparecer una tercera fase.

En el siguiente trabajo de FROLOV y col. (14) se opera con trioctilamina y ácidos inorgánicos monopróticos poniendo de manifiesto que es muy complejo el tipo de asociación que existe en la fase orgánica, e intentan explicar algo de porqué las aminas secundarias son más efectivas en determinadas ocasiones, cuando haya posibilidad de asociaciones moleculares.

En 1965, BRUSSET y col. (15) estudiaron la extracción de los ácidos clorhídrico, nítrico, perclórico y sulfúrico por una parte, y por otra fosfórico, además de los carboxílicos fórmico y acético. Utilizaron soluciones en xileno de trilauril-amina. Afirman que los ácidos sulfúrico, perclórico, nítrico y clorhídrico se extraen en función lineal de la molaridad del ácido y con buen rendimiento. Para una relación de equivalentes ácido/amina = 1, y bajas concentraciones de acético y fórmico, se extraen sólo en un 6,14% respectivamente. En el caso del ácido fosfórico indican un máximo de extracción para una acidez en fase acuosa de 4,5 m/l.

Confirman los resultados utilizando también Amberlita L.A. II en queroseno. No especifican detalles experimentales, por lo que no se puede deducir gran cosa, si bien es la primera vez que se realiza una curva de extracción para ácidos carboxílicos. Investigan igualmente la cantidad de agua extraída en el proceso.

En 1967 apareció un trabajo de investigadores ru

tos, del Instituto de Investigaciones de Procesos Petroquímicos(16) en el que separaban pequeños ácidos alifáticos del agua en que se encontraban disueltos mediante aminas, en presencia de agentes demulsificantes.

En 1968, FUKUTUMI (17) revisa, para los ácidos - clorhídrico, sulfúrico y nítrico, la extracción con tri - amil-amina, trioctil-amina, bis(1-isobutiril-3,5dimetil - hexil)-amina, metil-dioctil-amina, 1-(3 etilpentol)-4etil-octil-amina, didecil-amina y trionil-amina.

MIROSLAV y col., en 1969, (18), extrae ácido - clorhídrico con dioctil-amina, indicando que a bajas con - centraciones de ácido no hay extracción total. Aseguran - que para concentraciones iniciales mayores de 5 molar, se da una hiperestequiometría.

RICCI y col.(19) utilizaron trioctilamina en un trabajo sobre ácido fosfórico, confirmando en líneas gene - rales anteriores trabajos(15), al tiempo que lo amplían es tudiando brevemente la influencia de la temperatura.

En el presente año se han publicado dos trabajos del tema que nos ocupa: Uno de ellos trata de la extrac - ción de ácido selenioso con aminas(20), pero sobretodo es interesante señalar el realizado por MATTOX y col.(21), a - parecido en marzo pasado, una vez terminada toda la parte . experimental de nuestro trabajo, y en el que aplica cambia - dores de iones líquidos para el aislamiento de de ácidos - glucosidurónicos esteroideos.

### 2.3.- REEXTRACCION DE ACIDOS ORGANICOS.-

Hay pocos antecedentes sobre este tipo de operación. Existen dos procedimientos para devolver a una solución acuosa el ácido extraído por soluciones de aminas:

Tratamiento con soluciones alcalinas  
Tratamiento con soluciones ácidas.

SMITH y PAGE(5) utilizaron soluciones alcalinas para la reextracción.

MOORE (6) aplica también soluciones alcalinas para reextraer los ácidos y llevarlos a fase acuosa.

### 2.4.- RECUPERACION DE ACIDOS ORGANICOS.-

No se encuentra referencia de recuperación en el sentido que se le pretende dar en este trabajo. La recuperación implica reextracción pero con fines de aislamiento, es decir, seguida de eliminación de disolvente y siempre cuidando el procedimiento para que no haya alteración de los componentes reextraídos.

### 2.5.- EXTRACCION DE ACIDOS CONTENIDOS EN ZUMOS NATURALES.-

Antes de realizar este trabajo no existían antecedentes del empleo de aminas líquidas en zumos naturales. Tan sólo hay que hacer notar la indicación de su posible utilización, contenida en el trabajo de SMITH y PAGE(5).

Con posterioridad a nuestro trabajo señalamos la extracción de ácidos glucosidurónicos esteroideos del ya citado MATTOX y col.(21).

## 2.6.- METODOS UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO DE ACIDOS EN ZUMOS NATURALES.-

Fundamentalmente, los métodos aplicados al aislamiento de ácidos a partir de zumos vegetales o de tejidos de animales, se resumen a extracción por disolventes seguidos de procesos de purificación o bien a la aplicación de técnicas más directas que nos den de una forma rápida los ácidos aislados.

Los procedimientos han ido variando o modificándose a lo largo del tiempo. En principio casi todo se basaba en la simple extracción por disolventes y ahora los autores se inclinan por el uso de resinas de cambio iónico

En muchas ocasiones se prefiere formar sales insolubles, con el fin de liberar después los ácidos y proceder a su análisis o bien como parte de técnicas que después comentaremos más detenidamente.

Lo más corriente es una primera purificación del zumo por precipitación de sustancias que no interesen, ya sea con disolventes o con reactivos defecantes del tipo ácido perclórico o similares. Depende en gran manera de las características específicas del zumo de que se trate y de los métodos de análisis que se vayan a utilizar.

A continuación vamos a hacer una rápida revisión de los procedimientos principales que se han llevado a cabo en el presente siglo, de una manera aproximadamente cronológica.

HORTVET (22), en el año 1904 empleó una técnica que, en nuestros tiempos, posee una amplia vigencia, sobre todo cuando se trata de aislar y analizar un pequeño número de ácidos conocidos: Precipitación de sales de plomo.

En los años que le sucedieron, otros autores (WINTON(23) y ROSS(24)) utilizaron una técnica similar.

Pocos años después(1911) YODER(25) procedió a ex

traer ácidos con éter y después los precipitó en forma de sales cálcicas.

Los ácidos que se encuentran en la naturaleza - son, en su mayoría, muy poco volátiles, por lo que si de - sea utilizar técnicas de destilación fraccionada para aislarlos o separarlos unos de otros no hay mas remedio que - proceder previamente a la formación de alguno de sus derivados volátiles, cosa que hizo WELSON(26) en 1924, formando ésteres de los referidos ácidos.

HARTMANN y colaboradores(27) utilizaron en 1930 el procedimiento de las sales de plomo, mientras que HILLIG (28), siete años después, utilizaba técnicas extractivas - para la determinación de ácido láctico.

STAUDINGER(29) desarrolló una técnica consistente en fraccionar por disolventes y, en determinadas fracciones, precipitar las sales cálcicas de los ácidos que allí hubiese.

ISHERWOOD(30), en el año 1946, aisló ácidos de - sustancias naturales mediante columnas de sílice, y LONG y col.(31), empleó en 1951 columnas de celulosa. Por estos - años comenzó el gran desarrollo de la cromatografía en diferentes modalidades.

BRYANT y OVERELL(32) utilizaron columnas de intercambio iónico para separar ácidos de sustancias naturales, usando concretamente la Amberlita IRA-400.

BUCH y col(33) utilizaron una combinación de resinas, Zeo-Rex (H) y De Acidite para aislar ácidos del zumo de manzana previamente despectinizado. El utilizar la De Acidite, se debe a que procuraban no alterar azúcares, cosa que puede suceder si se utiliza una resina fuertemente básica.

BOVE y RAVEUX(34), utilizan columnas de sílice - para aislamientos similares(1957), pero en el año siguiente HULME y WOLTORTON(35) utilizan columnas de cambio iónico. ROUX y LESAIN(36) siguen, sin embargo, un procedimiento análogo a BOVE Y RAVEUX(34).

En 1960, WHITTING y COGGINS(37) utilizan columnas de IRA-400 en ciclo acetato para el análisis de zumos de manzana ácida y de los mismos una vez realizadas fermentaciones sulfídricas. Como paso previo se pasa el zumo por resinas catiónicas( IR-120 ciclo H ) para que haya extracción total de los ácidos.

Hay autores que siguen procedimientos más específicos en determinadas ocasiones. Si se trata de aislar cetoácidos, como ROSAN y NIELAND(38), precipitan los referidos cetoácidos en forma de 2,4 dinitrofenilhidrazonas. No es éste el único trabajo en este sentido, pues SJOVAL (39) por ejemplo, los aislaba en forma de N,N dimetilhidrazonas.

COURTOISIER y RIBERAU-GAYON(40), por una parte, y por otra HARLOW y MORMAN(41), emplearon técnicas de cambio iónico, sólo que estos últimos autores dan un procedimiento de valoración automático. Este procedimiento(41) se sigue con mezclas de ácidos hechas en laboratorio, pero es el método seguido por otros autores en el campo de sustancias naturales. La mayor pega que el método posee consiste en que es difícil el aislamiento de los ácidos una vez valorados, y como método puramente analítico se ha visto desbordado por otros procedimientos que veremos más adelante.

MAZLIAK y SALSAC(42) emplean resinas de cambio - para el aislamiento de ácidos de hojas de plantas, utilizando una combinación de resinas catiónica(Dowex-50 ciclo H) y aniónica (Amberlita IRA-400, ciclo carbonato).

GEE(43) utiliza Dowex-1 para aislar ácidos del - tomate, aunque en su trabajo no especifica el ciclo en que trabaja la resina.

A partir de 1966 hay una serie de investigadores que emplean de nuevo las sales de plomo para el aislamiento y determinación de ácidos en vegetales.

BRUNELLE y col.(44) usa las sales de plomo como parte de una técnica analítica que más adelante veremos, - pero en la misma época, tanto ZERFING y col.(45) como LEE y SAMUELSON(46) utilizan resinas de cambio iónico.

Es muy importante el trabajo, aparecido en 1967, de KUKSIS y PRIORESCHI(47), como lo prueba el gran número de autores que hacen referencia de él en años sucesivos. Comparan diferentes métodos de aislamiento y purificación de ácidos no sólo procedentes del reino vegetal, sino también del animal.

Refiriéndonos a ácidos que provienen de fuentes vegetales, comienzan por tratar con etanol del 75%, calentando a continuación para lograr fluocular el precipitado formado y eliminar después el mismo por centrifugación. A continuación tratan la solución sobrenadante con ácido perclórico 0,33N, centrifugan de nuevo y después proceden a la evaporación del disolvente hasta conseguir una solución muy concentrada.

La purificación del extracto lo llevan a cabo mediante cinco procedimientos diferentes:

1) Columnas de cambio iónico. Tratamiento con Dowex-1 en ciclo formiato y desplazamiento con ácido fórmico seguido de purificación con Dowex-50 en ciclo hidrógeno.

2) Columnas de gel de sílice. Acidifican con ácido sulfúrico, mezclan con ácido silícico, introducen la mezcla en una columna de vidrio y eluyen con éter dietílico.

3) Cromatografía en capa fina preparativa. Eluyen con benceno-dioxano-acético(90/25/4 en volumen) o bien con benceno-metanol-acético(45/8/4 en volumen) durante 30 minutos. Visualizan con vapor de yodo, raspan la zona elegida de la forma más cuantitativa posible y después recuperan el ácido.

4) Formación de sales de plomo. Tiene lugar por por tratamiento con acetato de plomo hasta que no se observe precipitación. Se centrifuga, lava y se vuelve a centrifugar. El precipitado resultante se suspende en metanol al 50% y se regeneran los ácidos por burbujeo de sulfuro de hidrógeno a través de la suspensión. Después de filtrar se evapora el disolvente.

5) Formación de hidrazonas. Siguen los métodos de ROSAN y NIELAND(38) y también el descrito de SJOVLL(39)

En todos los casos se llevan a cabo los análisis posteriores por cromatografía de gases, encontrando que el mejor procedimiento de purificación es el primero de los investigados.

KOLLAS(48) emplea Dowex-1 (ciclo acetato) para extraer los ácidos de la pulpa de manzana, Los ácidos fueron eluidos de la resina por desplazamiento con acético y fórmico, en gradiente de polaridad.

LI y WOODROFF(49) aislan ácidos de ciertas variedades de peras en forma de sales de plomo. Después de lavar con metanol del 70% se regeneran los ácidos con sulfuro de hidrógeno. La finalidad de sus análisis es determinar succínico, málico y cítrico.

FITELSON y BOWDEN(50) realizan análisis de ácidos orgánicos de los extractos de vainilla formando las sales de plomo de los mismos.

En el año siguiente(1969), FITELSON vuelve a utilizar sales de plomo en el análisis de ácidos orgánicos (51).

JOHNSON y FERNANDEZ-FLORES(52) precipitan los ácidos presentes en sirupos de azúcares como sales de plomo. Persiguen principalmente el análisis de oxálico y aconítico. En este mismo trabajo se indica una combinación de Dowex-50(ciclo H) y de Amberlita IR-4B para aislar aminoácidos y ácidos respectivamente. La elución puede hacerse con Clorhídrico 2N ó con hidróxido amónico 2N.

Si se desea separar todos los ácidos orgánicos se puede introducir la muestra directamente en la Amberlita IR-4B, medianamente básica. Puede eluirse después con NaOH 1N, eliminando a continuación el catión  $\text{Na}^+$  con la Dowex-50 en ciclo H.

En este mismo año no se abandona ni mucho menos la utilización de resinas de cambio iónico para el aislamiento directo de ácidos, y así, ZAURA y METCOFF(53), aislan 7 ácidos tricarbóxicos y otros similares de orina humana, mediante Dowex AG 2x8 en ciclo formiato.

BENGTSSON y SAMUELSON(54) prefieren la utilización de resinas de cambio, así como SALMINEN y KOIVISTONEN(55).

En 1970, FERNANDEZ-FLORES y col.(56) vuelven a -

utilizar sales de plomo para el análisis de los ácidos de 26 frutos diferentes, determinando glicólico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, siríngico y quínico. El hecho de utilizar las sales de plomo se debe a la facilidad de formar los TMS derivados que precisan para el análisis por cromatografía de gases.

En 1971, MORARD y BOURRIER(57) analizan las hojas del Sorghum dochna por extracción con alcohol, extracción con agua, adición de resina catiónica que libere sales y por fin extracción con Dowex-2 en ciclo formiato

En este mismo año, JANSEN y SAMUELSON,(58) emplean Dowex-1 X8 para la separación de hidroxiácidos dicarboxílicos de las mezclas de azúcares de que provienen.

## 2.7.- REEXTRACCION Y RECUPERACION DE LOS ACIDOS EXTRAIDOS.

No habiéndose utilizado las aminas de alto peso molecular como agentes de extracción líquido-líquido de ácidos en productos naturales, no puede haber antecedentes de estas operaciones.

En el caso de los métodos revisados en el apartado anterior, es preciso tener en cuenta el método utilizado para el aislamiento, pensando además que sólo se siguen procedimientos de recuperación en el caso de que se pretenda aislar los ácidos en principio extraídos.

En muchas ocasiones se sigue el procedimiento de formar las sales de plomo, pero este método puede tener dos fines diferentes: Por una parte puede servir para aislar una cantidad, generalmente muy pequeña, de ácidos que se destinen después a métodos analíticos, fundamentalmente cromatografía de gases. A veces también forman las sales de plomo, pero para tratarlas después con sulfuro de hidrógeno y liberar los ácidos. Este último procedimiento se lleva a cabo, en casi todas las ocasiones, a escala bastante mayor, y en este caso el fin perseguido sí puede ser la recuperación de los ácidos en cuestión.

Con el empleo de resinas de cambio iónico sucede

una cosa similar. Podemos utilizar una resina aniónica para atrapar ácidos y después tratar con un ácido mineral o una base para eluir los ácidos de la columna, pero también se puede utilizar un ácido muy débil o un gradiente de acidez para realizar una separación cromatográfica que puede tener un doble fin: Separación y aislamiento o simple valoración de los ácidos cuando sean eluidos de la columna con un fin meramente analítico.

Podemos citar los métodos utilizados por otros autores para el caso de aminas sólidas con fines preparativos, y que se reducen a elución básica (42)(52) o ácida — (37)(57), teniendo en cuenta que si se realiza la primera modalidad, será necesario utilizar procedimientos de liberación de los ácidos, mientras que con la segunda, si el ácido eluyente es volátil, podrá eliminarse por evaporación

## 2.8.- SUSTANCIAS NATURALES ESTUDIADAS.-

En este trabajo se ha hecho el análisis de zumo de limón, uva, pulpa de ciruela y manzana y fracción acuosa de la aceituna, es decir, alpechin.

Bien sabido es la gran cantidad de ácido cítrico que contiene el zumo de limón, además de pequeñas cantidades de otros ácidos, principalmente málico y succínico(56) Según KUKSIS y PRIORESCHI(47) existe además fumárico, oxálico, alfa-cetoglutárico, aconítico y, en la piel del limón, isocítrico.

El componente principal del zumo de uva es ácido tartárico, aunque le acompañan ácido málico y quínico (56) Estos mismos autores encuentran que en algunas variedades existe mayor cantidad de cítrico que de ningún otro ácido.

Se han publicado algunos trabajos sobre los ácidos de la ciruela. FERNANDEZ-FLORES y col (56) realizan análisis de distintos tipos de ciruela, encontrando siempre gran cantidad de ácido málico, al que acompañan cítrico y siríngico, pero en la ciruela pasa italiana, aunque siguen encontrando mucho ácido málico, no detectan cítrico y siríngico pero sí succíco y quínico.

Los trabajos que se han hecho sobre los ácidos de las diversas variedades de la manzana son incontables.

No especificamos variedades al ir revisando los trabajos efectuados, pues no tratamos en nuestro estudio de la manzana mas que comparar las resinas comerciales — con la DUA, ya que, por los exhaustivos estudios que sobre ella se han realizado, no tiene objeto un nuevo estudio — dentro de la finalidad que perseguimos. Sin embargo, como identificamos ácidos, conviene tener en cuenta los encontrados por otros autores.

HULME(59) detecta cítrico, málico, y aisla varios gramos de ácido l-quinico.

BRYANT y OVERELL(32) detectan succínico, isocítrico y málico.

HULME(60), en un nuevo trabajo, detecta cítrico, oxálico, pirúvico, alfa-cetoglutarico, oxalacético, citramálico, málico y quinico.

TANNER y ENSTCHLER(61) realizan un estudio de manzanas suizas, encontrando, dentro del total de ácidos orgánicos, un 85% de ácido málico, 1-3% de cítrico y 3-20% de quinico, además de trazas de glicólico.

BUSCH y col.(33) indican la presencia de galacturónico, quinico, fosfórico, cítrico, málico, clorogénico, citramálico, cafeico, succínico y láctico.

LUCKWILL(62) aisla de la manzana tres auxinas ácidas, que no identifica, pero asegura que ninguna de ellas es el ácido indolacético.

BUCHLON y HANE(63) detectan pirúvico, glioxílico, oxalacético, alfa-cetoglutarico, málico, fumárico y succínico, aunque aseguran que al madurar desaparecen los dos últimos.

WHITING y COGGINS(37), identifican málico, quinico, trazas de citramálico, clorogénico, p-cumaril quinico, sikímico y cítrico en muy poca cantidad.

WUCHERPFENNIG y BRETTHAUER(64) afirman taxativamente que no hay ácido tartárico en la manzana.

VEITCH y BRUERLEY(65) publican un método para valorar ácido tartrónico en manzana.

KOLLAS(48) detecta sikímico, quínico, citramálico, málico, cítrico, fosfórico, láctico, fumárico, glicólico, succínico y clorogénico.

MAZLIAK y SALSAC(42) y MAZLIAK(66) detectan quínico y sikímico, pirúvico, glicólico, oxálico, fumárico, succínico, málico, cítrico e isocítrico.

KODESNIK y AUDEEVA(67) aseguran que existe en la manzana ácido malónico, dihidroxisuccínico(tartárico), además de los conocidos málico, cítrico, oxálico, fumárico y succínico.

HAMMET y INGLE(68) encuentran maleico, lo cual es bastante raro.

JARCZYK(69) indica que existe málico, quínico, cítrico, trzas de glutámico, aspártico, sikímico, galacturónico, succínico, malónico, clorogénico y fosfórico, mientras que SALIKOVA y KIKIFOROVA(70) encuentran málico, cítrico, succínico, clorogénico, sikímico y quínico.

Por último, FERNANDEZ-FLORES y colaboradores(56) indican que la composición depende de la variedad, pero, en conjunto, encuentran glicólico, succínico, fumárico, málico, cítrico y siríngico. La variedad que contiene mucho málico, carece por el contrario de succínico y siríngico.

Resumiendo los resultados de los trabajos reseñados sobre la manzana, podemos apreciar que todos los autores indican la presencia de málico en gran cantidad, así como de cítrico y quínico en mucha menor proporción. Detectan, en mayor o menor cantidad, una serie de ácidos como succínico, glicólico, fumárico, siríngico, sikímico, clorogénico, galacturónico, malónico, fosfórico, isocítrico, citramálico, oxálico, oxalacético, alfa-cetoglutárico, p-cumaril-quínico, caféico, láctico, pirúvico y glioxílico. Como hemos ido viendo, no hay coincidencia de los diversos autores sobre la identificación de ácidos, hasta el punto de

que alguno de ellos afirma taxativamente que no existe tartárico y sin embargo otros lo detectan. También se indica en un sólo trabajo la presencia de ácido maleico, cosa que parece poco probable, pues es bien sabido que el que suele encontrarse en sustancias naturales es su isómero el fumárico, debido a que constituye un eslabón en el denominado ciclo de Krebs.

Refiriéndonos a los ácidos orgánicos del alpe — chín de la aceituna, sólo podemos citar el trabajo de FIES TAS ROS DE URSINOS(71), en el que se detectan varios ácidos orgánicos, y se aísla uno de ellos, concretamente el malónico. El aislamiento y fraccionamiento de los ácidos — del alpechín, se lleva a cabo siguiendo aproximadamente el método de STAUDINGER(29), y en las fracciones que analizan encuentran manitol, ácido tricarbálico, tartárico, acético, oxálico, glicérico, malónico, fumárico ó glutárico, málico y láctico. Es preciso hacer notar que no se especifica en el trabajo, ni zona ni fecha de recogida.

## 2.9.- METODOS ANALITICOS UTILIZADOS.-

Es preciso hacer notar el gran incremento que — las técnicas cromatográficas han tomado, hasta el punto de que en el análisis de los ácidos que nos ocupan, son las únicas utilizadas.

El paso del tiempo ha hecho que las técnicas empleadas se vayan modificando, incluso variando de modalidad, pero dentro técnicas cromatográficas al fin y al cabo

En este apartado nos limitaremos a reseñar las — técnicas utilizadas, dejando para la parte teórica el estudio crítico de las mismas.

Con objeto de hacer la recopilación de la forma más ordenada posible, vamos a referir los distintos trabajos siguiendo un orden preestablecido: Cromatografía de partición en columna, papel y capa fina, cromatografía de cambio iónico y cromatografía gas-líquido.

ISHERWOOD(30) utiliza columnas de gel de sílice

con agua como fase estacionaria. El eluato se lleva, de forma continua, a un sistema donde se valora con indicador ácido-base. Realiza análisis de succínico, malónico, oxálico, málico, tartárico y cítrico.

MARVEL y RANDS(72) separaron gran número de ácidos alifáticos y aromáticos en una columna de ácido silícico con mezclas sucesivas de n-butanol y cloroformo, cuyas concentraciones van desde el 5% de n-butanol - 95% de cloroformo hasta el 100% de butanol, esto es, mediante un gradiente de concentración de n-butanol.

FROHMAN y col(73) han utilizado columnas de partición de gel de sílice para la determinación de los ácidos del ciclo del cítrico en los tejidos.

Diversos autores han perfeccionado el método original de MARVEL y RANDS(72), empleando un gradiente de etanol o alcohol amílico terciario, aplicándolo a la separación de acético, láctico, pirúvico, fumárico, succínico, málico, alfa-cetoglutarico y oxalacético. Podemos citar a DONALDSON y col(74), MARSHALL y col.(75), SHKOL'NIK(76), HULME(77)(78) y HULME y RICHARDSON(79).

PHARES y col(80) emplean columnas de Celita conteniendo ácido sulfúrico 0,5N utilizando como eluyentes butanol-cloroformo y después éter dietílico.

BULEN y col.(81) utilizan una serie de columnas de ácido silícico impregnado con sulfúrico para realizar una primera separación fraccionada y posterior resolución de cada fracción obtenida. De esta manera separan un gran número de ácidos de sustancias naturales.

KINNORY y col(82) emplean también columnas de ácido silícico con sulfúrico, eluyendo con benceno-éter dietílico.

SCOTT(83) eluye con 4-metil-2 pentanona-cloruro de metileno, consiguiendo separar fumárico, succínico, oxálico, glicólico, málico e isocítrico.

RESNIK y col.(84) eluyen con butanol terciario-cloroformo.

DREW y col(85) separaron los 2,4 dinitrofenilhidrazonas de los ácidos pirúvico, oxalacético y alfa-ceto-glutárico en columnas de celulosa(Solka Flow BW 100).

BUSCH y col(33) emplean un método combinado de cromatografía de partición sobre gel de sílice y cromatografía en papel(93). Las fracciones eluidas las valoran por su acidez y después proceden a identificar ácidos por sus Rf y reacciones coloreadas. Emplean como líquidos de desarrollo alcohol n-amílico/fórmico 5M(1/1); n-butanol/acético/agua(4/1/5); etanol/amoníaco/agua(20/1/4) y como visualizadores anhídrido acético/piridina; vanadato amónico y nitrato cérico-amónico, observando los colores aparecidos tanto en el visible como en el ultravioleta.

MAZLIAK y SALSAK(42) realizan separaciones de los ácidos contenidos en las hojas de castaño, sobre gel de sílice, comparando este método con otro de cromatografía gas-líquido.

LUGG y OVERELL(86 y 87) fueron los pioneros en la separación de hidroxiaácidos y cetoácidos, así como de policarboxílicos. La formación de colas es un inconveniente que se presenta en la cromatografía en papel de estos compuestos, intentando paliar este inconveniente mediante la adición de ácido fórmico o acético al líquido de desarrollo. Esta técnica presenta el inconveniente de que es preciso eliminar estos ácidos si se pretende visualizar posteriormente con un indicador ácido-base, y esto no es rápido ni fácil de hacer. Emplean como visualizadores azul o verde de bromocresol. La mezcla óxido de mesitilo/ ácido fórmico/agua es la más rápida de eliminar por corriente de aire.

CHEFTEL y col(88) introducen eucaliptol en los líquidos de desarrollo para lograr una mayor rapidez en la posterior eliminación de los mismos

STARK y col(89) aplican estas técnicas para la separación de ácidos de origen vegetal, utilizando diversos eluyentes, mezclas diversas en las que se incluyen cloroformo, isooctano y fenol, además de agua y ácido fórmico

OPIENSKA-BLAUT y col(90) utilizan fenol/fórmico/agua. Indican que determinados ácidos dan lugar a más de una mancha en el cromatograma.

NORRIS y CAMPBELL(91) separan ácido glucónico, -2-cetoglucónico, alfa-cetoglutárico eluyendo con metanol y etanol.

BRYANT y OVERELL(32) analizan manzana y zanahoria mediante aislamiento con resina Amberlita IR-400(forma carbonato) y posterior cromatografía en papel. Algún tiempo después publicaron otros trabajos en el mismo sentido - (92)

AIRAN y BARNABAS(93), KATZ y CHAIKOFF(94), CHEFTEL y col(95), ISHERWOOD y col(96) han publicado trabajos sobre la separación de algunos ácidos.

OVERELL(97) efectúa la separación de ácidos hidroxí y dicarboxílicos por cromatografía bidimensional.

CHEFTEL y col(98 y 99) también realizan cromatografía bidimensional, utilizando primero un disolvente hidroalcohólico alcalinizado con amoníaco, y después con otro eluyente en medio ácido fórmico.

ISHERWOOD y HANES(100) utilizan mezclas de n-propanol/amoníaco acuoso. Concretamente, utilizan cuatro tipos diferentes: 90/10; 80/20; 70/30 y 60/40 sobre papel Whatman N°1 lavado.

AIRAN y col(101), GIRI y col(102) y SCOT(103) desarrollan técnicas de cromatografía circular sobre papel.

ANET y REYNOLDS(104) han publicado un análisis de los ácidos del albaricoque, aislándolos con resinas de cambio iónico y eluyéndolos cromatográficamente. Las fracciones obtenidas las analizan por cromatografía sobre papel Whatman N°1. Emplean como líquidos de desarrollo acetona/cineol/ácido fórmico del 53% (50/50/36 v/v) y por otra parte, etanol(95%)/amoníaco/agua (80/5/15 v/v). Indican los Rf de 30 ácidos diferentes. Visualizan con nitrato de plata-hidróxido sódico.

WHITTIN y COGGINS(37), en trabajos sobre la manzana y sus productos de fermentación, identifican ácidos por cromatografía en papel de las fracciones obtenidas en las ya descritas columnas de silicagel. Los solventes usados son: Alcohol bencílico/alcohol isopropílico/alcohol —

tercbutílico/agua(3/1/1/1) y fórmico al 2% del total; n- - propanol/amoniaco(7/3); fenol/agua/ácido fórmico(3/1/1%); acetato de etilo/acético/agua(2/1/2 fase superior). Los - tres primeros eluyentes los emplean sobre papel Whatman N1 y el último sobre Whatman N°54.

Se han realizado algunos trabajos sobre ácidos - orgánicos empleando la técnica de capa fina y utilizando líquidos de desarrollo ácidos o básicos.

BRAUN y GEENEN(105) emplean etanol(96%)/agua/hidróxido amónico(25%)(100/12/10).

PETROWITZ y PATUSKA(106) utilizan en cambio lí - quidos de desarrollo de caracter ácido: Benceno/metanol/a - cético(90/16/8) y benceno/dioxano/acético(90/25/4).

Hay un trabajo publicado por KNAPPE y PETERI - (107) en el que emplean éter diisopropílico/ácido fórmico/ agua(90/7/3) saturado con polietilénglicol de peso molecu - lar 1000, para eluir ácidos sobre capas de Kieselguhr-G-po - lietilénglicol.

Estos trabajos nos traen como referencia común - el hecho de que no hay buena separación debido a la inevi - table presencia de colas. En conjunto, abarcan los siguien - tes ácidos: oxálico, malónico, succínico, glutárico, adípi - co, pimélico, subérico, azeláico, sebácico, cítrico, tartá - rico, ftálico, tereftálico, benzoico, p-toluico y o-fosfó - rico.

PREY y col(108) utilizan piridina/petróleo(20/ - 50) ó metanol/amoniaco/agua (80/4/16) en silicagel.

Se presenta, a la hora de visualizar los ácidos con indicadores ácido-base, los mismos problemas que los - descritos para la cromatografía en papel, pero, en este ca - so podemos eliminar el ácido del líquido de desarrollo ca - lentando a 120° durante 60 minutos.

No existen demasiados trabajos sobre esta técni - ca, ya que su mayor desarrollo se realizó en años posterio - res a la de papel, y al presentar también el problema de - fuertes estelas que dificultan la buena apreciación y loca - lización de manchas, se vió superada por otras técnicas -

sensibles y cuantitativas.

En cuanto a cromatografía de cambio iónico, KU - NIN y MYERS(109) estudiaron el comportamiento de Amberlita IR-4B frente a los ácidos fórmico, acético, oxálico, cítrico, benzóico y salicílico, tanto en ciclo cloruro como en ciclo hidroxilo. Aseguran que la fuerza ácida no parece ser factor importante en la retención de los ácidos.

BRYAN y OVERELL(110), HULME Y SWAIN(111) y HULME y RICHARDSON(79), además de NORDMAN y col(112 y 113) las - utilizan para separar ácidos de azúcares.

BUSCH y col(114) utilizan Dowex-1 en ciclo for - miato para la separación de los ácidos del ciclo de Krebs, eluyendo con gradiente de ácido fórmico. La separación no es demasiado buena.

OWENS y col(115) y SCHENKER y RIEMAN(116) sepa - ran el mismo tipo de ácidos sobre Dowex-1 ó Resina S de la Permutit Corp.

BERNTOSSON y SAMUELSON(117) realizaron estudios cuantitativos de las Dowex 2 y 3 frente a ácidos orgánicos

MAZLIAK y SALSAC(42) realizan cromatografía de - cambio iónico de ácidos de la pulpa de la manzana con obje - to de comparar éste método con el de reparto en columnas - de gel de sílice impregnada con sulfúrico y el de cromato - grafía de gases de esteres metílicos. Utilizan Amberlita - IRA-400 bajo forma carbonato. Eluyen con solución normal - de carbonato amónico en el caso de que utilicen la resina sólo como agente purificador de los ácidos extraídos por - solventes.

KOLLAS(48) investiga la influencia de la atmósfe - ra en los ácidos de manzanas almacenadas. Utiliza Dowex-1 (200-400 mesh) en forma acetato, y eluye con gradiente de acético y fórmico.

WHITING y COGGINS(37) emplean una combinación de resinas catiónicas(Amberlita IR-120 ciclo H) para liberar ácidos. Los ácidos liberados los hacen pasar a través de - una Amberlita IR-400(forma acetato) y, después de lavada, eluyen los ácidos con acético de normalidad creciente(0,5-

-6N), y después, fórmico 6 y 8 N. Las fracciones colectadas se recromatografian sobre columnas de gel de sílice, y las distintas fracciones obtenidas de esta forma se analizan por cromatografía sobre papel. También aislan ácidos para identificarlos químicamente.

BRYANT y OVERELL(32) cromatografian ácidos carboxílicos en Amberlita IRA-400. Eluyen con solución de carbonato sódico, desalifican con Amberlita IR-120 en ciclohidrógeno y vuelven a cromatografiar sobre papel.

ANET y REYNOLDS(104) utilizan varios tipos de columnas y diversas resinas: Columnas de 0,6; 0,9; 1,2; 1,7; 2,5; 3,8 y 5,1 cm de diámetro interno. Resinas: Amberlita IRA-400(20-50 mesh), Dowex-1X4(50-100 mesh), Dowex-2X4 (100-200 mesh), en varios ciclos( cloruro, hidroxilo y acetato), Eluyen siempre con ClH 0,1 N.

JOHNSON y FERNANDEZ- FLORES(52) comparan la cromatografía de cambio iónico con la cromatografía de gases en varios productos naturales. Para separar ácidos y aminoácidos, pasan el extracto vegetal por una columna rellena de Dowex-50 X8, introduciendo el eluato en una segunda columna que contiene Amberlita IR-4B. La Dowex-50 retiene los aminoácidos y los cationes que el extracto contenga, - sustancias que podemos eluir con ClH 2 N ó hidróxido amónico 2 N. La Amberlita IR-4B retiene todos los ácidos orgánicos.

Para separar sólo los ácidos orgánicos, pasan el extracto directamente a través de la columna de resina Amberlita IR-4B. Eluyen después con NaOH 1N, para pasar a continuación el eluato a través de una columna Dowex 50 en ciclo H. Así se deja a los ácidos libres. Esta última columna es importante lavarla hasta que las aguas de lavado no salgan ácidas en absoluto, pues este tipo de columna también retiene a los ácidos orgánicos. En la cromatografía propiamente dicha, eluye los ácidos de la citada resina a iónica con ácido fórmico en gradiente de concentración. Las fracciones recogidas, de 4 ml, las valora con NaOH de normalidad 0,002 N, previa eliminación del ácido fórmico por evaporación, y empleando cloroformo para eliminar los últimos restos de ácido fórmico.

HARLOW y MORMAN(41), en un trabajo al que nos hemos referido anteriormente, emplean un valorador automático. Se compone el conjunto del sistema de un inyector de e-

luyente, columna cromatográfica, sistema de valoración potenciométrica, adición automática de solución alcalina valorante y registro gráfico de tipo diferencial. La originalidad de este trabajo consiste en que, a diferencia de todos los citados, emplea una resina de cambio de tipo catiónico Dowex-50-X12, para la retención de los 50 ácidos tratados. Como agente de elución utiliza simplemente agua. No hay muchos autores que apliquen posteriormente este procedimiento.

En cuanto a lo que se refiere a la cromatografía de gases, concretamente en su especialidad gas-líquido, se hay que tener en cuenta que los ácidos que pretendemos analizar son muy poco volátiles, por lo que, en principio, la cromatografía gas-líquido es difícil de realizar. En el caso de los ácidos alifáticos normales (sobre todo los de tipo graso), los procedimientos de análisis por cromatografía gas-líquido se desarrollaron rápidamente, pero en ácidos — del tipo de los del ciclo de Krebs, los procedimientos se perfeccionaron posteriormente.

La poca volatilidad de los citados ácidos es debida, por una parte, a la presencia de varios grupos carbonilos, y por otra, a que la mayoría de ellos poseen grupos -OH. Bloqueando los referidos grupos polares, se logra que la tensión de vapor, a una temperatura dada, sea mayor que la del ácido original en las mismas condiciones.

Los procedimientos utilizados para aumentar la volatilidad de los compuestos pueden resumirse en dos:

Formación de ésteres

Formación de trimetil-silil-derivados (TMS)

aunque esporádicamente se han utilizado otros derivados.

En 1960, ACKMAN y col (118) determinan succinato de metilo por cromatografía gas-líquido.

En 1962, EXPOSITO y SWANN (119) determinan succínico, fumárico y maleico en forma de ésteres metílicos, utilizando una columna polar (Carbowax 20M hasta la mitad de columna, y, en la otra mitad, Dietilenglicolsuccinato) y otra apolar de grasa silicona, aunque no especifica su trabajo de qué silicona se trata.

Operan con inyector a 330°C, detector a 300°C y temperatura programada 4°C/min de relación de calentamiento, teniendo en cuenta que, en el caso de utilizar columna polar, la isoterma inicial es de 105°C y en la apolar de 75°C, para alcanzar 225 y 250°C respectivamente.

MIROSCHA y DEVA(141) determinaron succínico, fumárico y málico en forma de esteres metálicos.

En 1963, LUKE y col(120) estudian succínico, málico, cis y trans- aconítico, fumárico, cítrico, maleico e isocítrico previa formación de sus esteres metálicos. Columnas utilizadas: 66 cm de longitud, acero inoxidable, grasa silicona DC al 20% en Chromosorb W, lavado-ácido, de 60-80 mallas. No indican grosor de la columna. Inyector a 260°C. Isoterma inicial 90°C, relación de calentamiento a 11°C/min. Temperatura detector 280°C (catarómetro). Gas portador He a 90 ml/min. Columna polar: DEGS (LAC 728), 2 metros de longitud, al 5% sobre Chromosorb W lavado-ácido, (60-80 mallas). No indican diámetro de la columna. Condiciones de trabajo: Similares a las utilizadas en la columna de silicona. Obtienen mejores resultados con la silicona que con el poliéster.

Obtención de metilésteres: Reacción con diazometano en éter, obtenido de la N-metil N'-nitro N-nitroso-guanidina.

GEE(121) analiza ácidos extraídos de plantas mediante el empleo de Dowex-1, eluye con hidróxido amónico 2 N, y después concentra en rotavapor a presión reducida hasta sequedad. Esterifica con clorhídrico del 5-10% en metanol anhidro, a reflujo, y elimina después el exceso de reactivo por evaporación y arrastre con nueva cantidad de metanol. La muestra, disuelta en metanol, la inyecta en el cromatógrafo,

Otro procedimiento de esterificación, también usado por este autor, consiste en tratar con cloruro de tionilo, para formar los correspondientes cloruros de acilo, y, por fin, tratar con metanol para formar el éster metálico. Después de eliminar el exceso de reactivo, disuelve en metanol e inyecta en el cromatógrafo.

El cromatógrafo utilizado es un F y M 810, con programación lineal de temperatura. Las columnas son de Neopentilglicolsuccinato, al 5% en Chromosorb W (tratado con hexametildisilazano). Longitud 75 cm, diámetro interno 3 mm. Acero inoxidable. Isotherma inicial 64°C. Isotherma final 186°C. Relación de calentamiento: 6°C/min. Inyector y detector a 250°C. Gas portador He a 50 ml/min. Detector de ionización de llama. Flujo de hidrógeno: 31 ml/min.

Patrones utilizados: Pirúvico, láctico, glicólico, oxálico, malónico, fumárico, levulínico, maleico, málico, tartárico y cítrico. Resolución: En malónico, fumárico y maleico, mala.

Aplica después el método al polvo de tomate seco y pulverizado.

MAZLIAK y SALSAC(42) realizan un estudio comparativo del análisis de ácidos de origen vegetal hecho por cromatografía gas-líquido, cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía de cambio iónico.

Los ésteres metílicos de patrones y problemas los obtienen por esterificación con metanol en exceso, catalizando en unos casos con ácido p-toluénsulfónico, y, en otros, con trifluoruro de boro. Emplean el segundo procedimiento para los estudios cuantitativos y no calientan a reflujo, limitándose a dejar en contacto la mezcla durante doce horas.

La columna empleada para la cromatografía gas-líquido, es de latón, de tres metros de longitud y 6 mm de diámetro interior. Relleno: Butanodiolsuccinato al 20% en peso sobre Chromosorb W silanizado (60-80 mallas). Nitrógeno como gas portador, a un flujo de tres litros/hora. La temperatura utilizada es en régimen isoterma a 120, 150 y 200 grados centígrados, en algunos casos, y programa da de 165-200°C. No precisan si los estudios cuantitativos los realizan en condiciones isotérmicas o a temperatura programada. No emplean patrón interno, sino respuestas de todos y cada uno de los ésteres metílicos, inyectando patrón a continuación de cada problema.

Utilizan también DEGS como fase estacionaria, -

pero sólo aplicándolo a patrones de forma cualitativa.

McKEDOWN y READ(122) realizan la esterificación de los ácidos no cetónicos del ciclo de Krebs por tres — procedimientos diferentes:

Tratamiento con solución etérea de diazometano del ácido disuelto en 1 ml de metanol, todo ello a 25°C.

Esterificación con solución etérea de diazometano del ácido disuelto en metanol, pero realizado a -70°C.

Formación de los ésteres metílicos con metanol y ácido sulfúrico como catalizador de la reacción.

Para la cromatografía de gases, emplean columna de vidrio de 60 cm de longitud y 6 mm de diámetro interior, con DEGS al 5% en Chromosorb W. Bloque inyector a 160°C, temperatura del horno: 100°C. después programada — a 180°C (80°C/24min) y 180°C isoterma final.

Como resultados, averiguan que la esterificación sulfúrico-metanol es mala, que el diazometano da — buen resultado, y que a menos 70°C no hay peligro de la — formación de pirazolininas por parte del fumárico y cis-acónítico.

SWEETLEY y col.(123) han separado con éxito carbohidratos y otros compuestos hidroxilados en forma de — TMS ( trimetilsilil derivados).

En 1965, ZEN-ICHI HORII y col(124) forman TMS derivados de los ácidos del ciclo de Krebs, y los logran separar rápidamente y muy bien. El tratamiento de estos — ácidos con trimetilclorosilano y hexametildisilazano en — piridina, logra una rápida derivación de grupos hidroxilo y carboxilo de estos compuestos.

En el caso de cetoácidos, tales como el alfa-cetoglutarico y oxalacético, el problema consiste en que no dan un sólo pico, pero lo podemos resolver si, antes de la trimetilsililación, se forma la correspondiente oxima por tratamiento con hidrocloreuro de hidroxilamina.

El procedimiento standard consiste en introducir 10 mg del ácido y 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina, si es cetoácido, en un vial de 5 ml y disolver con 1 ml de piridina seca. Dejar pasar 10 min a temperatura am-

biente y añadir 0,1 ml de trimetilclorosilano, y después, 0,1 ml de hexametildisilazano. La reacción se completa a los pocos minutos, y podemos inyectar directamente de 0,1 a 0,5 microlitros en el cromatógrafo de gases.

La resolución es muy buena, por lo que se perfila el método como una excelente vía para el análisis cuantitativo.

La columna, de 2 metros de longitud por 3 mm de diámetro interior, está rellena de grasa silicona SE-52 - al 3% en peso sobre Chromosorb W (60-80 mallas). El no existir colas en los picos, indica que se ha utilizado el soporte silanizado, pero los autores no indican nada al respecto. Temperatura: 90-170°C a 2°C/min. Gas portador: Nitrógeno a 35 ml/min. El análisis cromatográfico dura 40 minutos para los ácidos: Láctico, pirúvico, succínico, fumarico, málico, oxalacético, alfa-cetoglutarico, lactoiscitrónico, cis- aconítico y cítrico.

Este trabajo marca un hito en la cromatografía de gases de los ácidos de este tipo, y, aunque como iremos viendo, son muchos los autores que continúan empleando ésteres metílicos, en los últimos tiempos se tiende ya al empleo de TMS derivados.

ESTES y BACHMANN(125) determinan, mediante ésteres metílicos, los ácidos del ciclo de Krebs, incluso los alfa-hidroxi, alfa-ceto y alfa-beta- insaturados.

Los ésteres metílicos los logran por tratamiento con solución etérea con diazometano (obtenido a partir del N-metil, N-nitroso, p-toluénsulfonamida). El método es cuantitativo para láctico y pirúvico, pero para los demás es tan sólo cualitativo.

Una vez obtenidos los ésteres, los destilan a presión reducida para hallar el rendimiento (lo cual es muy arriesgado pues no son demasiado estables).

Utilizan un Barber-Colman mod. 15, con detector de argón-estroncio-90, y columna en U de 2,5 m de longitud y 10 mm de diámetro interior, rellena con DEGS al 15%

en peso sobre Gas-Chrom P(80-100 mallas). Inyector a 215° Detector a 215°C, gas portador: Argon a 88 ml/min. Temperatura de columna: 65°C durante 10 min, 65-175°C en 25 minutos, e isoterma final a 175°C. El cítrico, por ejemplo, tarda en salir de la columna 120 minutos, y la eficiencia de las columnas es, tal como se puede esperar del grosor de columnas utilizado, muy mala. Aseguran además - que el ácido oxalacético emerge de la columna después del ácido cítrico, y por supuesto, después del alfa-cetoglutarico, su homólogo superior. Aseguran, según la figura de su publicación, una resolución total de malónico, fumárico y succínico. Aunque se parte de una temperatura muy baja, el separar los citados ácidos con una columna de las características citadas, es bastante difícil.

SIMMONDS y col(126) realizan el análisis de cetoácidos del ciclo de Krebs, empleando ésteres metílicos, detector de ionización de llama, de captura electrónica - dos columnas capilares y una preparativa.

Las capilares son de 66 m y 0,03 pulgadas, una de ellas de Apiezón L, y otra de Ucón HB 2000. La preparativa es de 50' piés por 6 mm de diámetro interior, y rellena con SE-30 sobre Gas-Chrom-P.

En el caso de la capilar, emplea un flujo de nitrógeno de 30 ml/min. y temperatura isoterma a 135°C.

KUKSIS y PRIORESCHI(47) indican, entre otras cosas, el análisis de los ácidos del ciclo de Krebs, mediante cromatografía de gases. Los ésteres metílicos fueron - preparados por diazometilación ó por tratamiento con trifluoruro de boro- metanol. Análisis cuantitativo, previo calibramiento del detector. Es preciso indicar que los ácidos se tratan con N-N dimetil hidracina siempre que haya posibilidad de encontrar cetoácidos. Utilizan columnas de 2,5 m por 3 mm de diámetro interior. Fase estacionaria Carbowax 20M al 3% sobre polvo de teflón(90-100 mallas). Temperatura programada de 50 a 200°C.

Emplean además otras columnas de Carbowax 20M, DEGS y SE-30 sobre Chromosorb W(70-80 mallas) silanizado. Estos autores encuentran en todos los casos que el ácido oxalacético tiene un tiempo de retención menor que el alfa-cetoglutarico, lo cual ya si está de acuerdo con lo -

previsible. No pueden separar succínico y fumárico, e indican que el ácido láctico tiene un tiempo de retención mayor que el succínico y fumárico, en el caso de utilizar columnas de Carbowax 20M.

HAUTALA(127) asegura que en las columnas: 66 cm por 6 mm de diametro interior del 5% NPGS en Chromosorb W (100-110 mallas), otra igual de Carbowax 20M al 5% sobre el mismo soporte, y otra de 2 metros al 10% de silicona - DC-200 sobre el mismo soporte, no puede realizar el análisis del éster metílico del ácido tartárico.

Intenta analizar málico, tartárico y cítrico, formando sus ésteres metílicos con metanol-ácido sulfúrico. Neutraliza después con metóxido sódico y centrifuga para separar el sulfato sódico formado. Asegura que el tartárico no es eluido de la columna, por lo que recomienda investigar sobre TMS derivados.

Puede pensarse que si mantuvo el éster del tartárico en presencia de metóxido sódico en exceso, pueda posiblemente producirse una saponificación. Los resultados obtenidos no son corrientes.

Al año siguiente, en 1967, este mismo autor(128) modifica el procedimiento en cuanto que destruye el exceso de diazometano con metanol y acético, empleando además DEGS como fase estacionaria. Trabaja a 100°C durante 3 minutos, y después calienta a 10°C/min hasta 160°C. Ahora no se le presenta ningún problema, salvo la aparición de segundo pico en el caso del ácido málico.

BRUNELLE y col(44) emplean los TMS derivados de los ácidos no volátiles de varios vinos. Forman los TMS derivados directamente de sus sales de plomo. Después de tomar una muestra del vino a analizar, ponen medio ácido de sulfúrico y tratan con acetato de plomo, añaden Celita 545 y después centrifugan, lavan con metanol y vuelven a centrifugar, procediendo después a secar.

Realizan la suspensión de una parte de sales de plomo en solución standard de patrón interno(undecanoico en piridina), añaden unos granos de Drierita y después trimetilclorosilano y hexametildisilazano. Esta última o-

peración se lleva a cabo en un vial.

La cromatografía gas-líquido la efectúan sobre columnas de silicona SE-30 al 3,8% sobre Diatoport (soporte silanizado). Medidas: 2 metros de longitud por 6 mm de diámetro interior.

Utilizan otra columna de idénticas medidas, pero rellena de Apieznón L al 20% en Chromport XXX (60-80 mallas). De todas maneras, se trata de otra fase de casi idéntica polaridad a la SE-30.

Trabajan en condiciones isoterma a 130°C. Sistema inyector y detector a 180°C. Gas portador: Helio a 50 ml/min. Detector de ionización de llama.

Para el análisis cuantitativo, calibran previamente el detector, utilizando en los análisis el sistema de patrón interno.

Debido al corto número de ácidos que pretenden analizar, utilizan un sistema isoterma para las columnas, lo que indudablemente simplifica todo a la hora de un análisis cuantitativo.

LI y WOODROF (49) son otros autores que analizan ácidos (fumárico, succínico, málico, tartárico y cítrico) en forma de ésteres metílicos, pero admiten que el análisis completo de los ácidos presentes en diversas variedades de peras, sólo puede llevarse a cabo mediante la formación de TMS derivados.

Emplean columnas metálicas de 2 metros de longitud por 5 mm de diámetro interno, rellenas, en su caso, con DEGS al 20% y, en otro, con SE-52 al 3%. Temperatura de columna 155°C durante 2 minutos, y programada, 7,5 °C/minuto, hasta 215°C en la de DEGS, Para la de SE-52, 80 °C durante 2 minutos, y después programada a 2,5°C/min. hasta 225°C. Gas portador: Helio a 90 ml/min. Inyector a 170°C. Detector 235°C.

FITELSON y BOWDEN (50) aislan ácidos de los extractos de vainilla en forma de sales de plomo, forman TMS derivados y los cromatografían en la forma usual, pe-

ro no parece de gran interés el comentario, puesto que no identifican ni un sólo ácido, limitándose a comentar y comparar el número de picos y hacer la suma de todas sus áreas. Emplean el sistema de patrón interno (ácido glutárico).

WILSON y col(129) determinan ácido clorogénico en forma de TMS derivado, en extractos de las hojas de tabaco. Emplean columnas de acero inoxidable de 2 metros de longitud por 6 mm de diámetro interior, rellenas de UCW-98 al 3% sobre Gas-Chrom Q (100-120 mallas). Temperatura de columnas: 240°C. Inyector a 300°C, detector a 280°C. Gas portador: Helio a un flujo de 80ml/minuto.

Formación del derivado: Tratamiento con HMDS (hexametildisilazano) en dimetilformamida.

JOHNSON Y FERNANDEZ-FLORES(52) comparan métodos de cromatografía de cambio iónico, ya descrita en páginas anteriores, con los de cromatografía gas-líquido de TMS derivados.

Forman los derivados a partir de sales de plomo empleando como agente silanzante una mezcla, preparada de antemano en un vial, formada por la introducción, en el orden estricto en que se indica, de unos granos de Drierita, 9 partes en volumen de piridina, 3 partes de HMDS y una parte de TMCS. La piridina debe haberse secado durante varias horas sobre Drierita.

Considera que para una total silanización de la muestra, debe de mantenerse el conjunto a 37°C durante una hora, pudiendo inyectar seguidamente.

Concluyen afirmando que el método de cromatografía gas-líquido es mejor y más cómodo.

DALLOS y KOEPL(130) analizan una serie de compuestos fenólicos no volátiles, mediante la formación de TMS derivados, empleando BSA(N,O-bis(trimetilsilil)acetamida). Compuestos analizados: Acido cinámico, p-hidroxibenzoico, vinílico, o-hidroxicinámico, p-hidroxicinámico gálico, siríngico, protocatéquico, ferúlico, caféico y sinápico.

Hallan los índices de retención de Kovats a 150 175, y 200°C.

Columnas: Analítica de 180 cm de longitud por 3 mm de diámetro interior, en cobre, con relleno de grasa -silicona OV-1 en Chromosorb G-HP (gran rendimiento, silanizado, 60-80 mallas). Gas portador: Nitrógeno a 65 ml/min. Detector de ionización de llama. Flujo de hidrógeno: 30 ml/min. Temperatura de columnas: 70°C, programación de -- temperatura a 4°C/min durante 10 minutos, 6°C/min durante 28 min. Isotherma final a 280°C durante 10min. Inyector a 260°C. Detector a 280°C. Aparato: Aerograph 1525-B. Preparativa: Mismo aparato con columnas de 3/8" de diámetro interior y 330 cm de longitud, en aluminio, con OV-1 al 4% en Chromosorb W (30-60 mallas) y divisor de salida al 10%.

Es interesante señalar que los compuestos formados son estables, y después de colectados, pueden realizarse medidas espectrofotométricas.

ZAURA y METCOFF(53) analizan ácidos contenidos en la orina de una forma cuantitativa, empleando ésteres metílicos. Utilizan una columna polar (DEGS al 12,5% en -- Chromosorb W, ácido-lavado, 45-60 mallas), y otra apolar (XE-60 al 6% en Gas-Pack S, 45-60 mallas), siendo en ambas ocasiones columnas de vidrio de 2m de longitud por 4 mm de diámetro interior. El gas portador es helio, con -- flujo a través de la columna de 180 ml/min., repartido en 60 ml/min al exterior, y 120 al detector de ionización de llama, adonde llega también un flujo de 55 ml/min. de hidrógeno y 300 ml/min. de aire.

Se dan los tiempos de retención, sobre la fase polar, de los derivados de los ácidos: Pirúvico, láctico, fumárico, succínico, laúrico, málico, alfa-cetoglutárico y cítrico.

Los ésteres metílicos los realizan por tratamiento de ácidos con metanol y cloruro de hidrógeno o -- trifluoruro de boro. Indican que los cetoácidos dan picos parásitos.

Quisiera hacer notar que logran separar el succínico y fumárico, debido al empleo de una columna bastan

te estrecha, a las condiciones de temperatura en que trabajan (sistema multilevel) 180°C durante un minuto, 80—100°C a 2,9°C/min, 100—133°C a 4,7°C/min, 133—220°C a —4,8°C/min, y 220°C durante 2,5 minutos. Inyector 220 min y detector 255°C. Este sistema permite resolver satisfactoriamente mezclas muy diversas. Hay que tener en cuenta el gran flujo de gas portador utilizado, a pesar de lo relativamente estrecha de la columna, lo que también ayuda a la resolución. Sin embargo, en el cromatograma de su publicación, no existe deriva positiva en la línea de base, a pesar de que se sobrepasa la temperatura permitida para esta fase estacionaria, utilizando además detector de — gran sensibilidad, pero no empleando sistema de doble columna, y esto no es lo que se puede esperar. La fase apolar la utilizan como confirmación para la identificación de algún ácido sobre el que haya duda.

Para el análisis cuantitativo emplean el sistema de patrón interno, utilizando laurato de metilo para este fin.

FERNANDEZ -FLORES y col.(56) emplean la misma mezcla de silanización que la reseñada en (52). Para cada 10 mg emplean 1,5 ml de agente silanizante. Agitan fuertemente y esperan 15 minutos a 45°C para que se complete la reacción.

Utilizan, para la medida cuantitativa, el sistema de patrón interno. Como ácidos patrones usan succínico, fumárico, mesacónico, glutárico, l-málico, tartárico, acónítico, cítrico, siríngico y quínico.

Aparato: Aerograph mod. A-350, detector catarmétrico, sistema de doble columna de 2 metros por 6 mm de diámetro interior, acero inoxidable, relleno de silicón SE-30 al 3,8% sobre Diatoport S silanizado de 60-80 ma — llas. Inyector y detector a 240°C. Temperatura de columna de 90-240°C a 6°C/minuto. Gas portador: Helio a 50 ml/min

No pueden separar el mesacónico y glutárico. Aplican el método a 25 frutos.

ATKINS y CANVIN(131) realizan un estudio de la formación y separación de más de 20 ácidos policarboxili-

cos, oxi y cetoácidos en forma de ésteres metílicos.

Formación de derivados: De un microgramo a un - miligramo de ácido orgánico, sólo ñ en mezcla, se disuelve en 2 ml de metanol seco y se añade solución etérea de diazometano en exceso, dejando reaccionar a temperatura ambiente. Los disolventes y el exceso de reactivo se eliminan a vacío a temperatura ambiente, y el producto se recoge cuantitativamente con metanol. Puede inyectarse ya directamente en la columna. También preparan los metilés- teres usando metanol-cloruro de tionilo. Una solución de metanol, conteniendo de uno a 100 mg de ácido orgánico, - se enfría en baño de hielo seco y metanol y se añade un- ligero exceso (un ml/100 mg ácido) de cloruro de tionilo. La mezcla se deja a temperatura ambiente de 20 a 30 minu- tos, (para ácidos que tengan dificultad en reaccionar, 5 - minutos a 40°C). Los productos se recogen con metanol.

Para estudiar cuantitativamente la reacción con diazometano, utilizan los siguientes ácidos marcados con carbono-14: Máfico, succínico, glicérico y cítrico, todos ellos de actividad radiactiva conocida. Realizan la meti- lación, separan por columna de cambio iónico (Dowex-1, ci- clo formiato) el posible ácido no reaccionado y miden ac- tividad radiactiva del eluato, lo mismo que la del ácido atrapado una vez eluido con fórmico 6 N. Comprueban que, transcurrida una hora, la reacción es cuantitativa.

Indican que, utilizando cloruro de tionilo-meta- nol, los ácidos alfa-cetoglutárico, oxalacético, pirúvico glioxílico e hidroxipirúvico dan productos únicos.

Cofirman la formación de anillos de pirazolina en el caso del fumárico y aseguran que el ácido glicérico da tres productos diferentes, aunque dos de ellos en tan poca cantidad que no interfieren en el análisis cuantita- tivo.

Comprueban que el málico da un pequeño pico pa- rásito, de menor tiempo de retención, no ácido, quizá pro- ducto de descarboxilación.

Las medidas de radiactividad las hacen en un - contador de centelleo líquido.

Columnas: Reoplex 400 al 10% en Chromosorb W — (60-80 mallas). Tubo de cobre de 25 x 1/4 de pulgada. Inyector a 180°C. Detector a 242°C. Temperatura inicial 45° programada a 4°C/min hasta 175°C. Isoterma a 175°C. Gas — portador: Helio de 50 a 100 ml/min. Detector de conductividad térmica. Los ésteres radiactivos se detectaron al salir de la columna con un sistema radiocromatográfico Nuclear Chicago(mod 4997).

En este mismo año 1971, EHRSSON(132) forma derivados de ácidos carboxílicos y fenólicos con bromuro de pentafluorobencilo. Los compuestos son extraídos a una fase de cloruro de metileno que contiene el agente que forma el derivado. El tiempo de reacción es de 15 minutos. —

Emplea columnas de OV-17 al 3% en Chromosorb W silanizado de 80-100 mallas. No indican dimensiones de la columna. Trabajan isotérmicamente a 160°C y con un flujo de nitrógeno de 31 ml/min. El detector es de ionización — de llama.

MORARD y BOURRIER(57) realizan análisis de ácidos orgánicos procedentes de vegetales, en forma de ésteres metílicos. El sistema de cromatografía gas-líquido utilizado es similar al de otros autores( DEGS y Reoplex — 400 ). Este trabajo interesa por el estudio crítico que realizan de los sistemas de formación de los metilésteres

Primer procedimiento: El ya conocido tratamiento con solución etérea de diazometano, estando la muestra disuelta en metanol.

Segundo procedimiento: Metanol-trifluoruro de boro, según METCALFE y SCHMITZ(133). La muestra se disuelve en un exceso de metanol(5 ml) que contiene trifluoruro de boro al 10%. La reacción se efectúa bien a 20°C durante tres o cuatro días ó a 60°C durante 1 hora. Los ésteres son extraídos en cloroformo. Se introduce en un tubo de ensayo un ml de la solución a extraer, 2 ml de cloroformo y un ml de agua. Después de agitar, se decanta la fase clorofórmica y se evapora casi a sequedad por corriente de aire. Los ésteres vuelven a disolverse ahora — en 2 ml de éter dietílico.

Tercer procedimiento: Metanol-ácido clorhídrico (43) ligeramente modificado por RUMSEY y WOLLER(134). Disolver la muestra en 5 ml de metanol y 0,25 ml de ácido clorhídrico, efectuando la reacción a 60°C en cuatro horas. Los ésteres se extraen en cloroformo, como en el caso anterior, y después, como está descrito, disueltos en éter dietílico.

Aseguran que los ácidos insaturados dan pirazolinas, ya sean cis ó trans, cosa que no sucede en el caso del trifluoruro de boro-metanol ó clorhídrico-metanol. El hecho de las sucesivas extracciones que describen, están motivadas por la corrosividad del trifluoruro de boro y de los compuestos halogenados, teniendo además en cuenta que el metanol da a veces colas como disolvente, si el soporte del relleno de la columna no es demasiado inerte.

Los análisis cuantitativos los efectúan por el procedimiento de patrón interno(ácido adípico).

Obtienen mejores resultados con Reoplex 400, — aunque sólo separan nueve ácidos. Como valor de medida — cuantitativa miden la altura, y no el área, lo que siempre es un poco arriesgado.

JANSEN y SAMUELSON(58) ensayan varias fases estacionarias para la separación de hidroxiaácidos obtenidos sintéticamente, pero que por sus características pueden, muchos de ellos, encontrarse en la naturaleza, y un sistema de análisis que puede ser interesante.

Investigan 24 ácidos -áricos y desoxiaácidos con fases estacionarias de silicona: 0,5% OV-1 en Chromosorb W(AW-DMCS); OV-17 al 0,5% en el mismo soporte. Silicona - DG QF-1 al 3% en Gas-Chrom Q y silicona GE XE-60 al 1% en Gas-Chrom Q.

Trabajan con TMS derivados, formados a partir de las sales sódicas de los ácidos, formadas a su vez con NaOH a pH 10 durante dos horas a 60°C para romper las lactonas que se forman normalmente en este tipo de hidroxiaácidos.

Dan los tiempos de retención a 120 y 160°C, de-

pendiendo de la fase estacionaria utilizada. Aunque tra-  
bajan isotérmicamente, separan bastante bien los citados  
compuestos, tanto mejor cuanto más polar es la silicona -  
empleada. Para la identificación de alguno, emplean la -  
combinación cromatografía gas-líquido/espectrometría de -  
masas. También utilizan, para los mismos fines, un siste-  
ma automático de cromatografía líquido-líquido con bastan-  
te éxito.

MENSEN de SILVA(32) realiza una buena separa-  
ción de ésteres metílicos de los ácidos del ciclo de -  
Krebs a base de utilizar una original columna corta y es-  
trecha.

Procedimiento de esterificación: Trifluoruro de  
boro-metanol. Columna utilizada: 4 m de longitud por 1mm  
de diámetro interior, rellena de PEGA (polietilenglicoladi-  
pato) al 5% sobre Gas-Pack W (100-120 mallas) silanizado,  
primamente lavado con ácido, base, alcohol y cloroformo.  
Gas portador a 40 ml/min. Isotherma inicial a 80°C durante  
1,33 minutos. Temperatura programada a 10°C/min hasta 180  
grados centígrados. Utilizan detectores de ionización de  
rayos beta, y otro aparato con detectores de ionización -  
de llama.

El trabajo cuantitativo lo llevan a cabo por el  
método de patrón interno (malónico y adípico), Aunque en -  
su publicación no incluyen reproducción de cromatogramas,  
sino tan sólo dibujo, la separación se aprecia como muy -  
buena, cosa previsible por el método utilizado. Téngase -  
en cuenta que la cromatografía se completa en tan sólo 14  
minutos.

Realizada la parte experimental de este trabajo  
aparece en Abril de 1972 una publicación de ROSENQUI y -  
col(135) en la que analiza los ácidos del ciclo de Krebs  
del *Esterichia coli* en forma de TMS derivados.

Es preciso hacer notar que cada vez se utiliza  
más el sistema cromatografía de gases- espectrometría de  
masas, aunque es un sistema fuera de nuestras posibilida-  
des. La enorme ventaja de utilizar como detector un siste-  
ma de EM es que la cromatografía de gas deja de ser un -  
"método ciego", ya que no sólo se manejan tiempos ó volú-

menes de retención, sino que puede, en muchas ocasiones, dar amplia información o determinar el compuesto de que se trata. Para los compuestos que procesamos, podemos citar a WOLFF(136), BATT(137).

INOUE(138), citando un trabajo reciente, investiga la combinación de cromatografía de gases y espectrometría de forma continua, bien sea por infrarrojo o ultravioleta.

KASAREK(141), en Abril del presente año, realiza una interesante revisión de la combinación GC/EM/computadoras, para la detección y determinación de diversas sustancias. Asegura que la combinación GC/EM es capaz de detectar  $10^{-11}$  gramos y determinar de qué sustancia se trata disponiendo de tan sólo  $10^{-10}$  gramos.

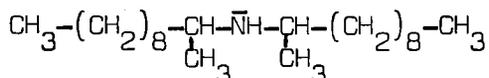
Aunque tiene poco interés en estos ácidos, también se utiliza la combinación pirólisis-cromatografía de gases, tal y como lo hace UNO y col(139) para el ácido cítrico, y BAILEY(140) realiza el análisis de ésteres metílicos formados por pirólisis de sus sales de tetrametilamonio.



PARTE TEORICA.-

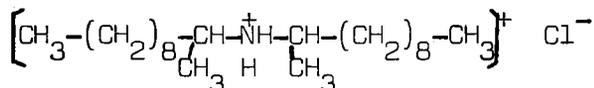


La DUA, debido a las grandes cadenas lipófilas que posee, es muy insoluble en agua (menos de 2 ppm), e in finitamente soluble en disolventes apolares.

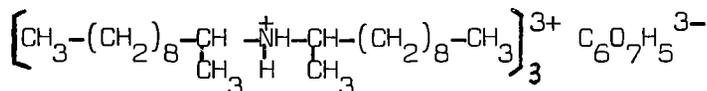
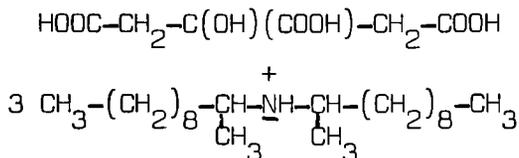


Posee un grupo de amina secundaria, lo que hace que la molécula sea muy básica, teniendo además en cuenta que el efecto inductivo positivo de sus grandes cadenas - exaltan en gran manera su carácter básico.

Es propiedad general de todo grupo básico el -- formar sales con sustancias ácidas. Así por ejemplo, la DUA puede formar sales con el ácido clorhídrico, dando lu gar a la formación de clorhidrato de DUA.



Asimismo, puede dar lugar a sales con ácidos mo no ó policarboxílicos.



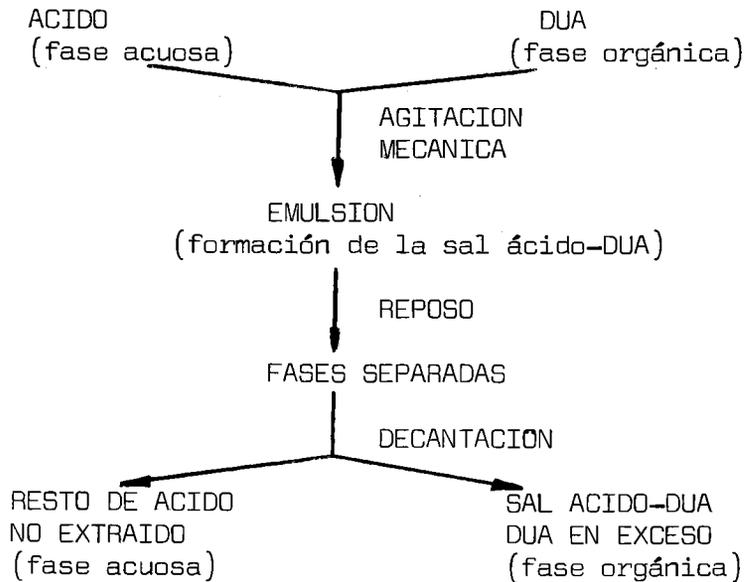
En determinadas ocasiones también podrá dar lu gar a sales ácidas.

Es interesante señalar que si la DUA no es solu- ble en agua, sus sales tampoco lo son, aunque siempre lo serán algo más que la amina libre. Sin embargo, como ire- mos viendo a lo largo de seta parte teórica, siempre va a existir en contacto una fase polar con una apolar, y, en

estas condiciones, la sal estará siempre en la fase apolar, y prácticamente nada en la polar.

En caso de que la amina utilizada no tuviese unas cadenas carbonadas tan grades, no podríamos hacer la anterior aseveración, y por este motivo empleamos esta DUA de tan elevado peso molecular.

Nuestro fin es extraer ácidos disueltos en agua mediante el empleo de soluciones de DUA en líquidos muy apolares, fundamentalmente en benceno. Para ello, pondremos en contacto, mediante agitación enérgica, una solución acuosa conteniendo los ácidos y otra bencénica de DUA, hasta lograr que se forme la sal, que será soluble en benceno y de esta manera lograremos hacer que el ácido ó ácidos, inicialmente disuelto en agua, pase a la solución apolar. Todo esto podemos comprenderlo mejor si observamos el siguiente esquema:



Para expresar los resultados, emplearemos una serie de signos que a continuación vamos a detallar.

Concentración inicial de ácido en la fase acuosa (Ac)<sub>a</sub> (equivalentes/litro, o sea, normalidad)

Concentración final de ácido en la fase acuosa (Ac)<sub>a</sub> (Equivalentes/litro)

Concentración final de ácido en la fase orgánica (Ac)<sub>o</sub> (Equivalentes/litro).

V<sub>a</sub> = Volumen de fase acuosa.

V<sub>o</sub> = Volumen de fase orgánica.

b = Relación de equivalentes ácido/DUA antes de realizar la extracción.

K<sub>d</sub> = Constante de reparto, constante de partición, coeficiente de reparto o coeficiente de partición - (143)

$$K_d = \frac{[(Ac)_o]_i}{[(Ac)_a]_i}$$
 refiriéndonos a una especie química determinada i.

En nuestro caso, nos interesa expresar los resultados en función del coeficiente de extracción D

$$D = \frac{(Ac) \text{ total en fase orgánica}}{(Ac) \text{ total en fase acuosa}} = \frac{(Ac)_o}{(Ac)_a}$$

para simplificar, expresaremos siempre D como

$$D = \frac{(Ac)_o}{(Ac)_a}$$

sabiendo que siempre nos referimos a la suma de todas las posibles especies químicas de los ácidos que estudiemos.

Podemos suponer, con gran aproximación, que:

Los ácidos empleados son muy solubles en agua y muy poco en benceno, de forma que la constante de reparto fase acuosa/fase orgánica, debida sólo a solubilidades, es muy grande.

La DUA no es soluble en agua y es muy soluble en disolventes apolares (p.e. benceno).

Las sales ácido/DUA son muy solubles en solvente apolar y muy poco en polar, o sea, la constante de reparto fase acuosa/fase orgánica es muy pequeña.

Con la agitación mecánica llevada a cabo hemos conseguido formar la mayor cantidad posible de sal, es decir hemos llegado al equilibrio para las condiciones de concentración y temperatura en que trabajamos.

Podemos considerar que, por tratarse de una reacción de interfase, a mayor superficie de contacto entre ambas fases, mayor velocidad de reacción. Por eso, mientras que no haya agitación, la velocidad de reacción es prácticamente nula. Téngase además en cuenta que la fase orgánica en contacto con la acuosa, sin agitación, se satura pronto de sal ácido-DUA, y es preciso que, por difusión, se renueve en moléculas de DUA libre.

Teniendo en cuenta todo esto, podemos afirmar que la velocidad de reacción, antes de agitar, es prácticamente nula.

El tipo de agitación ha de ser tal que logre una buena emulsión de una fase en otra. Esto no puede conseguirse con cualquier tipo de agitador. Además, los solventes orgánicos son, en su mayoría, volátiles, por lo que el procedimiento de agitación debe permitir que el sistema reaccionante permanezca cerrado.

El tiempo de agitación no precisa ser demasiado grande, pues tratándose en resumidas cuentas de una reacción ácido-base, el equilibrio se alcanza con bastante rapidez.

Una vez terminado el periodo de agitación, es -

preciso dejar reposar un cierto tiempo para lograr una total ruptura de la emulsión.

El solvente apolar utilizado ha de ser, lógicamente, inmiscible con el agua.

Las ecuaciones que expresan los resultados de estas extracciones son las que a continuación se indican:

$$(Ac) V_a = (Ac)_a V_a + (Ac)_o V_o$$

que expresa simplemente que el número de equivalentes de ácido en todo el sistema ha de permanecer constante a lo largo de todo el proceso.

Despejando la concentración de ácido en la capa acuosa después de extraer, es decir, concentración de ácido remanente, resulta:

$$(Ac)_a = \frac{(Ac) V_a - (Ac)_o V_o}{V_a} = (Ac) - \frac{(Ac)_o V_o}{V_a}$$

b = Relación de equivalentes ácido/DUA antes de extraer.

$$b = \frac{(Ac) V_a}{(DUA) V_o} = \frac{(Ac) V_a}{0,1 V_o} = \frac{(Ac) V_a}{0,1 \times 50 \times 10^{-3}}$$

ya que  $V_o$  en todas nuestras extracciones es de 50 ml de solución de DUA 0,1M.

$$V_a = \frac{5 \times 10^{-3} b}{(Ac)}$$

$$(Ac)_a = (Ac) - \frac{(Ac)(Ac)_o V_o}{5 \times 10^{-3} b}$$

$$= (Ac) \left[ 1 - \frac{(Ac)_o V_o}{5 \times 10^{-3} b} \right]$$

Para saber la cantidad de ácido presente en la fase orgánica, después de realizada la extracción:

$$(Ac) - (Ac) \frac{(Ac)_o V_o}{5 b 10^{-3}} = (Ac)_a$$

$$(Ac) - (Ac)_a = (Ac) \frac{(Ac)_o V_o}{5 b 10^{-3}}$$

$$\left[ \frac{(Ac)}{(Ac)} - \frac{(Ac)_a}{(Ac)} \right] 5 \cdot b \cdot 10^{-3} = (Ac)_o V_o$$

$$(Ac)_o V_o = 5 \times 10^{-3} b \left[ 1 - \frac{(Ac)_a}{(Ac)} \right]$$

Por otra parte

$$B = \frac{V_o}{V_a} D = \frac{(Ac)_o V_o}{(Ac)_a V_a} = \frac{(Ac) V_a - (Ac)_a V_a}{(Ac)_a V_a} =$$

$$= \frac{(Ac)}{(Ac)_a} - 1 = \text{Relación de equivalentes de}$$

ácido fase orgánica/fase acuosa después de extraer.

%E = Tanto por ciento de ácido extraído =

$$= 100 \left[ 1 - \frac{(Ac)_a}{(Ac)} \right]$$

Es interesante comprobar experimentalmente la relación que existe entre la cantidad de ácido que ha sido extraído en función de la concentración inicial del mismo, para una misma relación de equivalentes ácido/DUA(b)

y asimismo, como medida de la eficiencia extractora de la amina, veremos el grado de extracción (B y D) de cada uno de los ácidos en función de la relación de equivalentes - ácido/DUA (b), con objeto de conocer, a la hora de la extracción de un ácido determinado, el máximo valor de b compatible con el grado de extracción que se desee.

La extracción debe de cumplir con la regla de las fases. Una vez alcanzado el equilibrio, la regla de las fases indica que:

$$V = C - F + 2$$

siendo

V = varianzas o grados de libertad.

C = número de componentes.

F = número de fases.

En estas extracciones vamos a emplear dos fases acuosa y orgánica, y un soluto a repartir.

Luego si:

$$F = 2; \quad C = 3$$

$$V = 3 - 2 + 2 = 3$$

Suponiendo que trabajamos a temperatura y presión constante, nos queda una tercera variable, que es la concentración del soluto a repartir, o sea, que si el reparto se realizase de una forma ideal, esto es, sin reacciones químicas, asociaciones, disociaciones y actuación de todos los equivalentes del ácido,  $K_D$  habría de ser constante para cualquier concentración de soluto conque trabajásemos. Esto no es fácil que ocurra en las extracciones que nosotros estamos llevando a cabo, es más, nuestra extracción se basa precisamente en provocar una reacción química, además de las posibles complicaciones que se puedan presentar debido a la naturaleza especial de los compuestos a extraer.

Según hemos podido comprobar en la revisión bibliográfica expuesta en los antecedentes de este trabajo, y aunque no se trata de los mismos ácidos ni de la misma amina, a medida que aumenta la concentración inicial de ácido, también aumenta en forma absoluta la cantidad de á-

cido extraido, pero no sabemos lo que sucederá respecto al % extraido, esto es, qué sucederá en forma relativa, - aunque es posible que, al menos cuantitativamente, dependa de la relación de equivalentes dentro de las concentraciones comparadas.

Podemos considerar de antemano que, para un ácido y concentración determinada, a mayores valores de  $b$  (relación de equivalentes ácido/DUA) el % de ácido extraido debe ser menor, aunque debido a la naturaleza de los ácidos, es muy difícil de predecir.

Hemos señalado algunos trabajos en los que se ha pretendido, sin conseguirlo, establecer ecuaciones que expresen estos procesos de extracción. Tan sólo para ácidos minerales monopróticos y a pequeñas concentraciones se ha establecido una relación directa entre concentración inicial y cantidad extraida, pero por ejemplo, el ácido sulfúrico ya no cumplía las reglas.

Supuesta una temperatura determinada, la cantidad extraida de ácido puede depender de la fuerza ácida del mismo, pero a esto cabe objetar que, a no ser que exista competencia y limitada cantidad de amina, a medida que se vaya consumiendo ácido disociado, el ácido no disociado lo hará rápidamente, y podrá combinarse con la amina, siendo extraido.

El carácter más o meno hidrófobo del ácido puede influir quizá en la mayor o menor dificultad de acercamiento de la molécula ácida a la fase orgánica, pero habrá que tener en cuenta que la difusión del protón a temperatura ambiente es muy elevada, y que una vez unido al par electrónico del nitrógeno amínico, habrá una falta de neutralidad eléctrica en ambas fases, que necesariamente habrá de terminar en muy poco tiempo.

En ácidos policarboxílicos como los estudiados en este trabajo, la dificultad en las consideraciones teóricas aumentan, pues no sabemos si la reacción tendrá lugar de equivalente a equivalente ó, por el contrario, cada molécula de ácido estará unida sólo a una molécula de amina. Es de suponer que esto último se realizará cuando la relación de equivalentes ácido/DUA ( $b$ ) sea elevada, -

más o menos dependiendo del ácido de que se trate.

Quizá sea interesante señalar el grado de sobrecarga que una solución de DUA puede adquirir en determinadas ocasiones. Esto será debido a que le ácido sólo actúe por alguno de sus carboxilos, o bien que existan asociaciones de unas moléculas de ácido con otras del mismo ácido.

Cuantitativamente podemos expresarlo en forma absoluta como:

$S = \text{Sobrecarga} = \text{Número de equivalentes de ácido extraído} - \text{Número de equivalentes de DUA}$

Con relación a la DUA utilizada:

$S_r = \text{Sobrecarga} / \text{Número de equivalentes DUA}$

Podríamos también expresarlo como:

$S_b = \text{Sobrecarga} / b$

Debemos considerar también el factor estérico, por doble vía, es decir, tanto en lo que a la amina se refiere como en lo que respecta al ácido.

Otro factor que influye es la posible asociación entre moléculas de ácido, una de ellas unida a amina y la otra quizá no. Esto puede traer consigo una sobrecarga de la amina extractora.

Algunos autores señalan también el arrastre de moléculas polares, bien sea de agua u otro compuesto polar que se encuentre en la fase acuosa. Esto ocurre con algunos demulsificantes que diversos autores utilizan para mejorar los rendimientos de la extracción, como por ejemplo alcohol n-octílico. Entre los ácidos tratados por nosotros, tienen especial relieve los hidroxiacidos, y es posible que puedan ser arrastrados lo mismo que el al-

cohol n-octílico, por los grupos -OH.

Como consecuencia de todo lo expuesto, podemos asegurar que es preciso realizar las extracciones y juzgar los resultados para ver el comportamiento de estos ácidos, no pudiendo prever lo que puede suceder antes de haber hecho las citadas experiencias,

No podemos olvidar que el fin último de estos estudios de extracción con aminas de alto peso molecular es la posible aplicación al análisis de ácidos procedentes de fuentes naturales, y por ello vamos a programar unos estudios previos de extracciones de soluciones patrón de los ácidos típicos que es de prever se encuentran en los productos naturales, y además en las gamas de concentraciones en que en éstos se van a encontrar.

Vamos a trabajar con concentraciones de ácidos por bajo de 0,5N, concentración que es difícil superar en zumos,

La relación en cantidad entre los ácidos a extraer y el agente extractante es conveniente estudiarla para conseguir después buenos resultados en el caso de que se considere conveniente su aplicación.

Empezaremos por probar y estudiar la DUA frente a diversos ácidos-tipo, y, si los resultados son halagüeños, la aplicaremos al estudio de diversos frutos.

Los ácidos patrón utilizados para la primera serie de pruebas son: Acido succínico, ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico. Tres pertenecen al ciclo de Krebs, son policarboxílicos todos ellos y tres contienen grupos -OH. Además, en la serie succínico-málico-tartárico, el número de grupos -OH va en aumento, por lo que veremos si este aumento de grupos -OH influye en los coeficientes de extracción de cada ácido, en igualdad de condiciones experimentales.

Todos ellos son ácidos fundamentales en determinados frutos, y de ahí que se hayan escogido para observar el comportamiento de la DUA.

Las soluciones preparadas son, en todos los casos, 0,1; 0,2 y 0,3N de ácido en agua destilada. El solvente apolar elegido para preparar las soluciones de DUA es el benceno, debido a su poco precio, poca polaridad, ser un magnífico disolvente de la DUA y por el contrario disolver muy mal los citados ácidos, al tiempo que es muy poco miscible con el agua. Es fácil de purificar y eliminar, ayudando ésto al buen desenvolvimiento de las operaciones.

Para ver la variación de la cantidad de ácido extraído en relación a su agente extractante podemos realizar varias experiencias manteniendo siempre constante la cantidad de agente extractante y su concentración, al tiempo que vamos variando de una forma gradual la cantidad de equivalentes a extraer.

En principio, mantendremos también constante la concentración de ácido, por lo que conseguiremos variar los equivalentes de ácido tomando una serie de volúmenes crecientes de solución acuosa del ácido considerado. Trabajaremos independientemente con normalidades de ácido 0,1; 0,2 y 0,3, pudiendo observar dentro de cada serie qué es lo que sucede, sacando interesantes consecuencias en la comparación de las diversas series.

Se podrá comprobar la influencia de la concentración en el rendimiento de la operación, dato muy interesante.

Si representamos, por ejemplo, el % de ácido extraído en función de la relación de equivalentes ácido extractable/agente extractor, esto es, ácido/DUA, podemos construir una curva de extracción para este ácido de concentración inicial dada.

Para comprender mejor el comportamiento del agente extractor, podemos construir varios tipos de representaciones gráficas, todo ello para cada concentración inicial de ácido. Así podemos reseñar el índice de extracción, coeficiente de reparto, relación de equiv. ácido en fase orgánica/fase acuosa después de extraer, tanto por ciento extraído y grado de sobrecarga.

Consideraremos siempre como variable independiente la relación de equivalentes ácido/DUA antes de extraer (b). Como segundo aspecto, representaremos y consideraremos todos estos valores indicados, pero comparativamente es decir, tomando los valores de las tres series de concentración dentro de cada ácido, y por último, para cada concentración, haremos la comparación de los diferentes ácidos entre sí.

Un factor, comentado brevemente antes, es el tipo y modo de agitación. Es obvio que si se pretende hacer un estudio comparativo, el sistema de agitación ha de ser mecánico, y además, muy enérgico. Por otra parte, y como se detallará en la parte experimental de esta Tesis, debe permitir la agitación simultánea de la mayor cantidad posible de unidades de extracción, ya sean iguales o de distintos valores de  $b$  dentro de una serie de extracciones, para evitar dentro de lo posible los errores experimentales.

Es ideal que podamos agitar de una sola vez todas las unidades de extracción de una serie.

La bondad del equipo de agitación se puede comprobar fácilmente sin más que observar dos aspectos de una determinada serie de extracción: Rapidez en el establecimiento del equilibrio de extracción y reproducibilidad de la operación. Todo ello puede hacerse de la siguiente manera: Disponer en el sistema de agitación varios grupos de unidades de extracción, comenzar la agitación e ir sacando de tiempo en tiempo un grupo de las citadas unidades de extracción. Si cada grupo de unidades de extracción da los mismos valores una vez realizados los análisis pertinentes, es un dato a favor del sistema de agitación, y si comprobamos mediante el análisis de cada serie que se alcanza el equilibrio de forma suficientemente rápida, el método de agitación podemos considerarlo válido.

El procedimiento de valoración de la fase acuosa, una vez realizada la extracción debe ser sencillo de efectuar, y suficientemente exacto para los fines que nos proponemos. Como se trata de valorar un ácido débil en fase acuosa, el método que podemos considerar como más idóneo es una volumetría de neutralización, utilizando como indi

cador la fenolftaleina para valorar todos los grupos carboxilos de los ácidos empleados.

Tal y como se indica en la parte experimental, los volúmenes empleados son pequeños por requerimiento de los sistemas de agitación, y es necesario utilizar en algunos casos técnicas de microvaloración. En el caso concreto de algunos ácidos se intentó aplicar técnicas polarimétricas, empleando para ello un aparato Perkin-Elmer modelo 141 que puede emplear microcubetas y aprecia hasta la milésima de grado de poder rotatorio, de forma digital. Hechas las pruebas pertinentes, el método se descartó debido a que incluso pequeñas cantidades de solventes apolares, en este caso benceno, falsea un poco los resultados, lo suficiente como para eliminar el procedimiento. Se intentó aplicar el método a tartárico y málico.

Para el análisis de ácido cítrico se intentó un procedimiento fotocolorimétrico, y, aunque sea suficientemente exacto, no suponía ventaja frente al volumétrico normal y consume más tiempo que éste último.

La fase acuosa, después de realizada la extracción, contiene, como se ha indicado, pequeñas cantidades de benceno, pero se ha comprobado que no influye en los resultados del análisis volumétrico. Esta prueba se hizo agitando una solución valorada de ácido con benceno puro, dejando decantar y valorando de nuevo. Las diferencias obtenidas están dentro del error experimental. También se procedió a lavar la solución acuosa extraída, con teniendo como antes hemos indicado, pequeñas cantidades de benceno, que es lógico tenga su parte proporcional de DUA o sales de DUA, con benceno puro. Valorando antes y después del citado lavado, no se aprecia variación en los resultados obtenidos. Lo mismo sucede si se filtra la solución acuosa, es decir, tampoco se aprecia variación antes y después de filtrar. Naturalmente, para que todo esto se cumpla y la valoración sea exacta, es necesario que haya separación total de fases, esto es, que ambas fases queden totalmente transparentes, y eso sólo se consigue después de cierto tiempo (unas 24 horas según hemos constatado en la parte experimental).

La valoración se lleva a cabo tomando 3 mues -

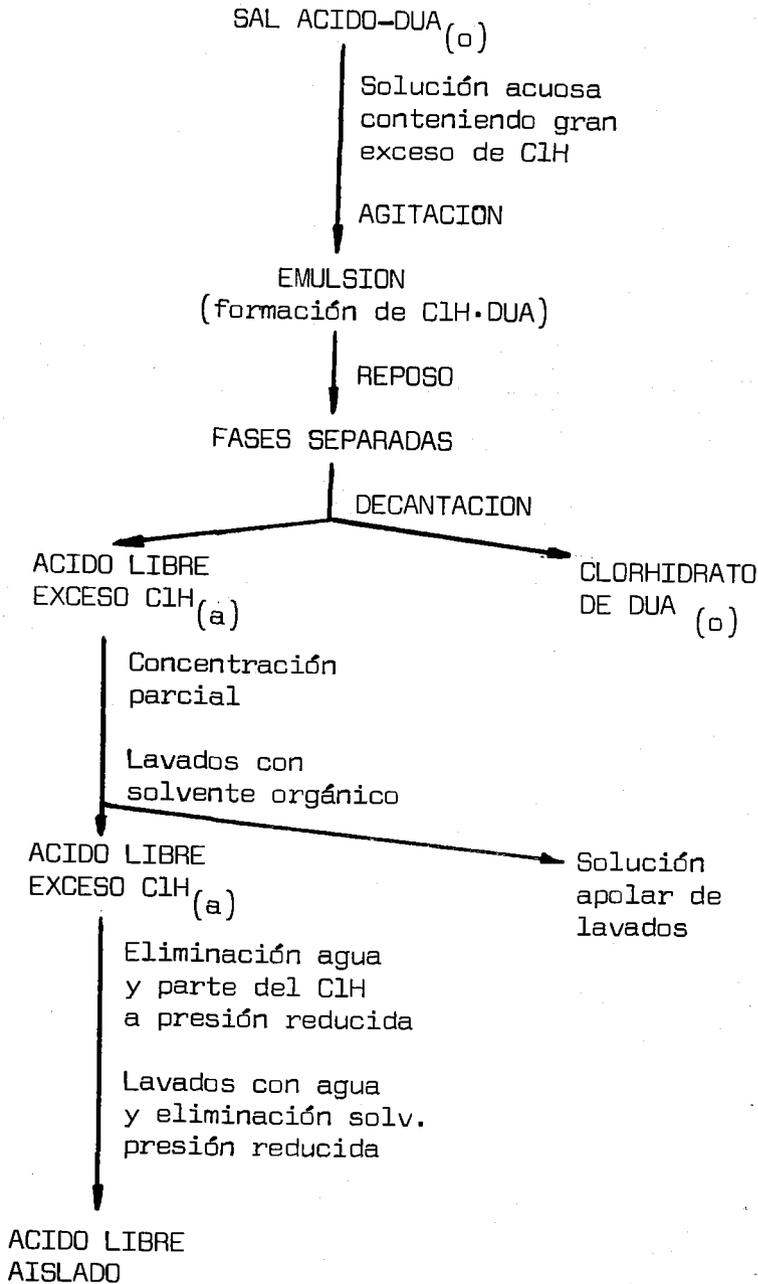
tras de cada unidad de extracción, y si tenemos en cuenta que cada unidad de extracción está realizada por partida triple, cada punto de las curvas de extracción está avalado por tres extracciones y nueve resultados analíticos, lo que hace que las conclusiones sean de gran fiabilidad.

Una vez completado este primer estudio del comportamiento de la DUA frente a soluciones de un sólo ácido de normalidad conocida, pasamos a comprobar otro factor importante como paso previo a la aplicación de esta amina en el estudio de sustancias naturales. Si interesante es ver cuanto ácido podemos extraer, también es interesante determinar cómo podemos recuperarlo y comprobar además si el ácido aislado es de pureza suficiente.

El tratamiento necesario para romper la sal de amina formada y volver a poner en solución acuosa el ácido extraído constituye el proceso de reextracción, y esta operación, unida al proceso de purificación y eliminación de solvente y otras sustancias hasta dejar puro el ácido en cuestión, constituye lo que podemos llamar recuperación del mismo.

Es obvio que si tratamos la fase bencénica que contiene la sal de DUA y ácido orgánico con un gran exceso de ácido mineral, por ejemplo solución acuosa de ácido clorhídrico, éste último desplazará al primero por formación del correspondiente clorhidrato de DUA, y el ácido orgánico libre pasará a la fase acuosa que contiene el exceso de ácido clorhídrico empleado. Podemos decantar la fase acuosa, evaporar parcialmente el agua que contiene el ácido, lavar algunas veces con benceno puro, evaporar a sequedad a presión reducida y tendremos el ácido en cuestión aislado.

Todo esto queda representado en el esquema de la página siguiente.



También se han hecho pruebas para ver si el proceso de reextracción se puede considerar como cuantitativo. Concretamente se ha realizado esto para el ácido cítrico, teniendo en cuenta que el procedimiento de volumetría de neutralización no puede utilizarse ya, pues hay mezcla de ácido cítrico y clorhídrico. En estas circunstancias se ha preferido un procedimiento fotocolorimétrico, utilizando cloruro férrico y midiendo frente a un blanco a 445 nm.

Comprobaremos que el ácido se aisla en buenas condiciones de pureza cristalizándolo, viendo su punto de fusión y viendo si coincide con el correspondiente químicamente puro.

Otro posible procedimiento consiste en tratar la solución bencénica con solución acuosa básica, bien sea con hidróxido sódico o potásico, o con una sal básica del tipo carbonato sódico. Ambos procedimientos tienen el inconveniente de que se obtiene la sal del ácido reextraído, pero sobretodo es preciso hacer notar que esta sal se encontrará en un medio muy básico. Normalmente, el medio básico molesta más que el medio ácido, pues puede provocar más alteraciones en determinados ácidos, aunque esto no quiere decir que el medio ácido no moleste en algunas ocasiones.

El medio ácido tiene la ventaja de que, en el caso de utilizar clorhídrico, tal y como lo hemos hecho nosotros, los ácidos orgánicos quedan libres y se puede eliminar fácilmente por evaporación el ClH sobrante.

Si tratamos de evaporar el disolvente en la reextracción básica, aunque la operación se realice a vacío es al fin y al cabo calentar en medio básico, y esto puede originar transformaciones en muchos casos teniendo en cuenta que vamos a trabajar con ácidos polihidroxilados y cetónicos. Ciertamente el medio ácido puede producir des-carboxilaciones de los muy lábiles.

Siempre nos encontraremos con una sal y el resto de la base, a no ser que empleemos hidróxido amónico, siendo en caso de reextracciones de tipo básico, el agente a emplear. Aunque el medio básico por él provocado pue

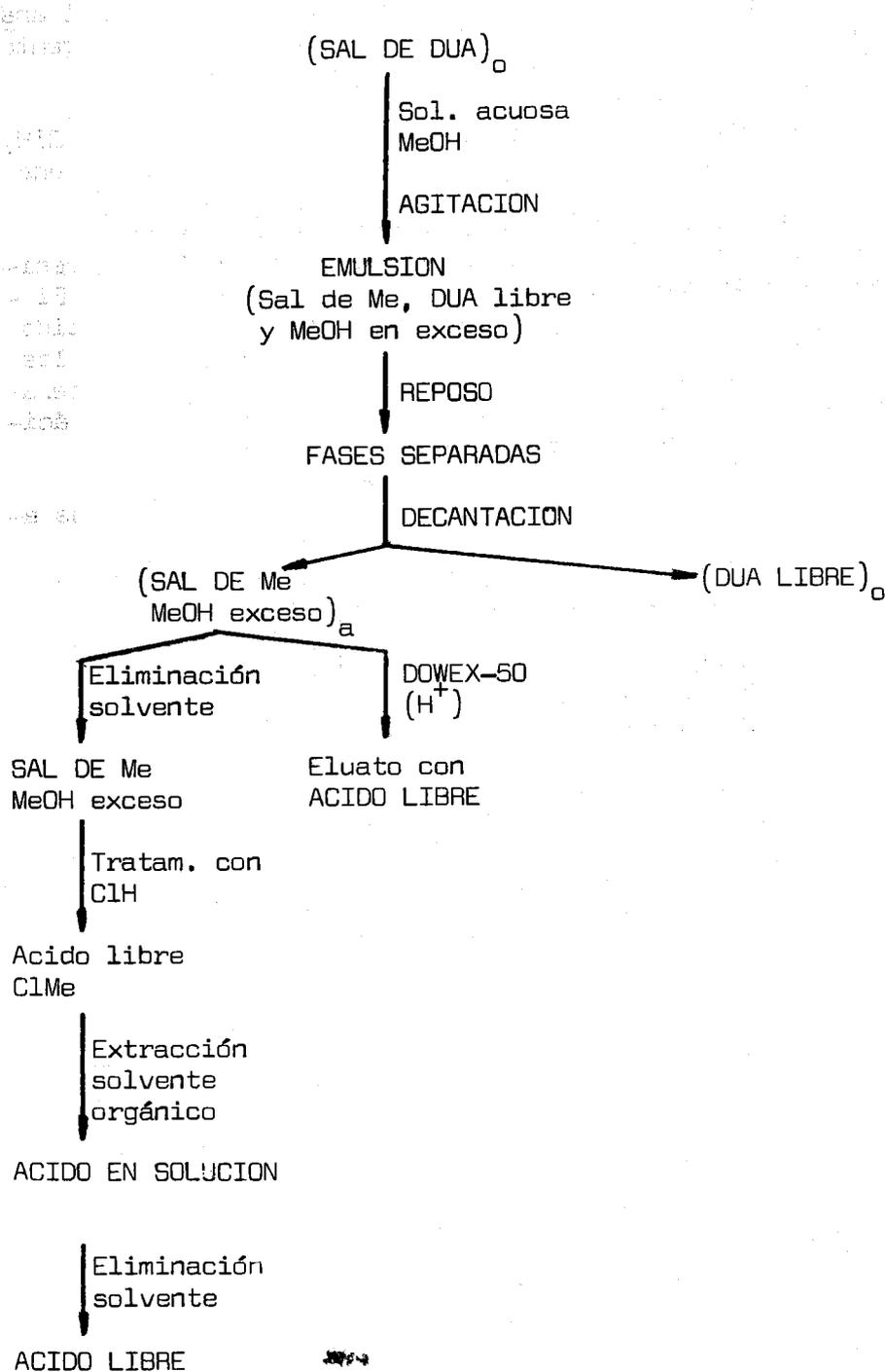
de alterar algún compuesto, en el caso de intentar el aná lisis de ácidos inestables en medio ácido, será el agente reextractor a utilizar.

Si tratamos con ácido mineral, por ejemplo  $\text{ClH}$ , dejaremos libre el ácido, y obtenerlo de esta manera una vez eliminado el disolvente a presión reducida.

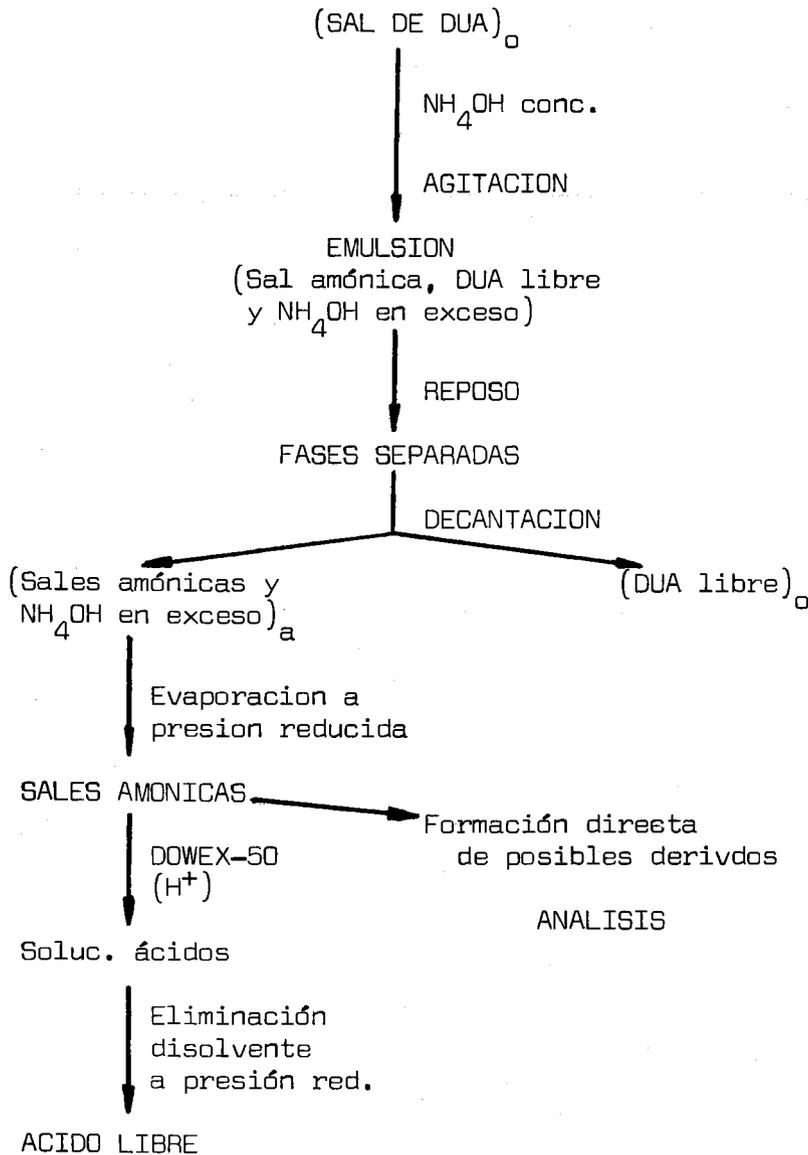
Podemos recurrir sin embargo al empleo de resinas catiónicas con objeto de desalar la fase acuosa. El proceso de realizará con una resina catiónica tipo ácido sulfónico en ciclo hidrógeno, con lo que atraparemos los cationes de la fase acuosa, pero ésto obliga a una operación más que en el caso de la reextracción en medio ácido.

En el esquema de la página siguiente podemos apreciar mejor lo anteriormente expuesto.

ESQUEMA DE REEXTRACCION BASICA



En el caso concreto de que la reextracción se realice con hidróxido amónico, el conjunto de la operación difiere algo, pudiendo resumirse en el siguiente esquema:



Hay otro punto que interesa señalar: Las soluciones bencénicas de DUA pueden ser regeneradas perfectamente. Por tratamiento con gran exceso de solución acuosa de base fuerte, logramos dejar la DUA libre, y después de algunos lavados con agua destilada, tenemos preparada de nuevo la solución de DUA para futuras extracciones.

Es aconsejable, en el caso de pruebas comparativas o extracciones de gran precisión, utilizar soluciones recién preparadas de DUA.

Siempre puede recuperarse la DUA empleada anteriormente por destilación a vacío, una vez dejada libre por tratamiento con base fuerte, aunque en determinadas ocasiones también podemos recurrir al arrastre con vapor de agua como método de purificación previa. Si se emplea alto vacío, puede destilarse cómodamente a unos 150°C, como se detallará más adelante.

La segunda parte de este trabajo de investigación se refiere a las aplicaciones de la DUA a la extracción y aislamiento de ácidos procedentes de pulpa o zumos vegetales.

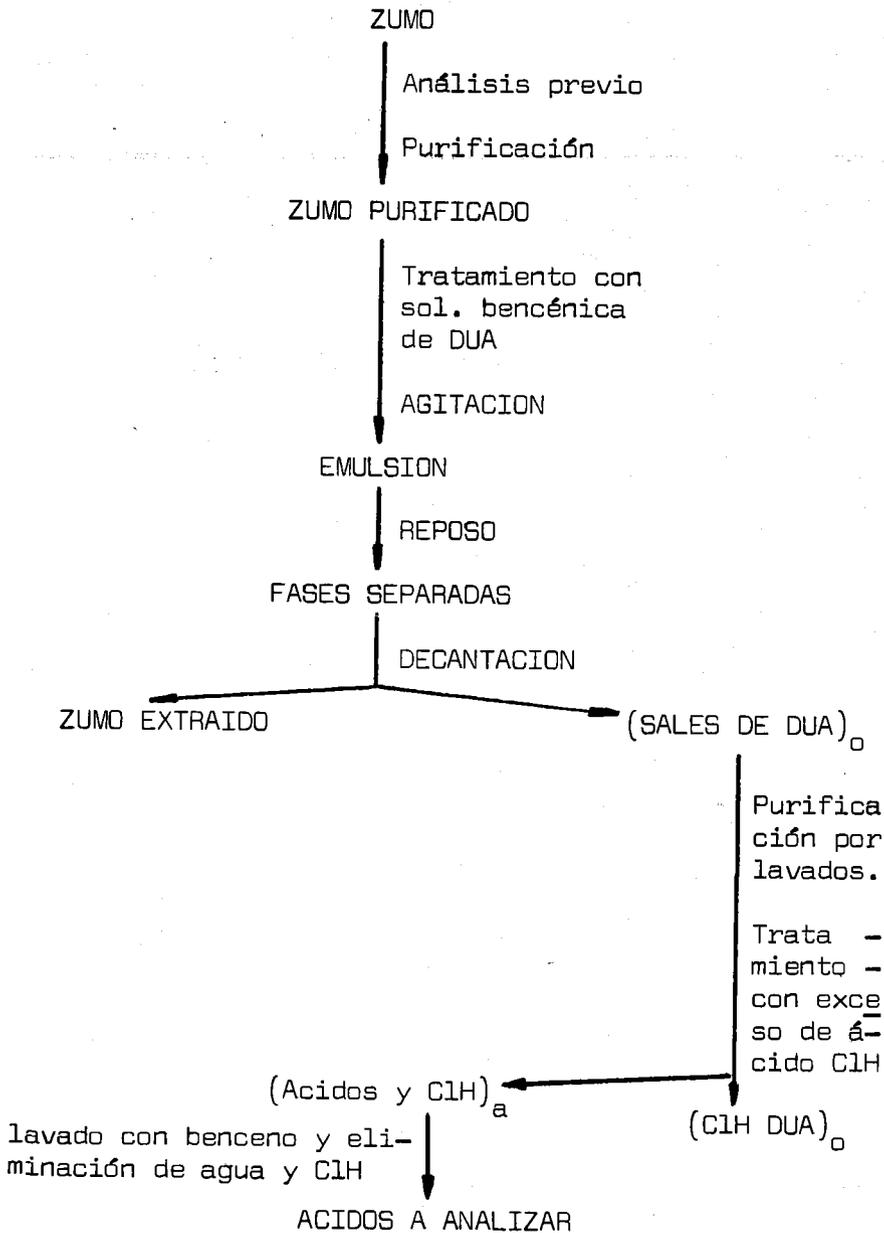
La confirmación de la bondad como agente extractor podemos comprobarla aplicándola a la siempre compleja extracción de ácidos que se encuentran acompañados por un gran número de sustancias que pueden interferir o molestar en el conjunto o en parte del proceso de extracción.

Será interesante comprobar cuanto ácido, contenido en un zumo, extrae. Previo análisis del mismo podemos saber cuánto hay originalmente y una vez hecha la extracción calcular el rendimiento de la operación.

Como hemos podido constatar en los antecedentes bibliográficos, hay infinidad de autores que emplean resinas de cambio para el aislamiento de ácidos en zumos. La comparación de la eficiencia extractora de la DUA con respecto a la de las citadas resinas de cambio iónico nos dirá hasta qué punto podemos sustituir dichas resinas por soluciones bencénicas de DUA.

Podemos expresar mejor nuestra intención mediante

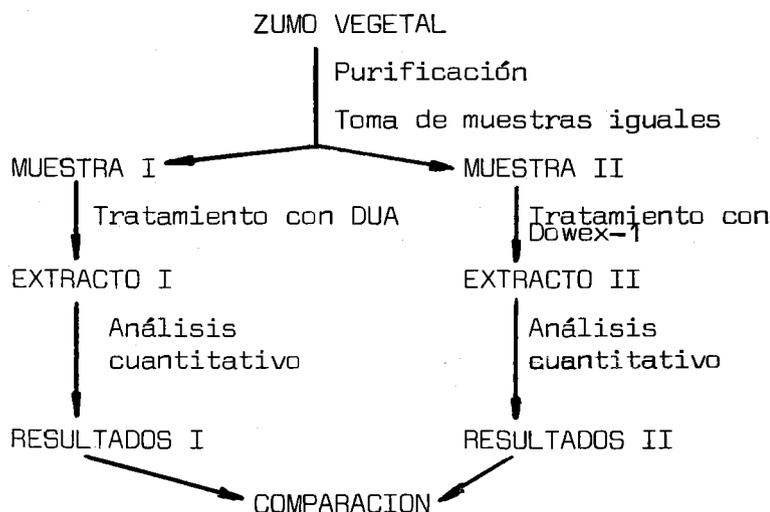
te los siguientes esquemas, aunque quiero aclarar que para el primer aspecto de análisis de zumos, se ha elegido alguno que contenga fundamentalmente un componente, o al menos que el componente controlado cuantitativamente sea mayoritario.



A pesar de que existe bibliografía referente al comportamiento de las resinas aniónicas comerciales en la extracción de ácidos en zumos, siempre es un poco problemático el adoptar como buenos unos valores concretos para un fruto determinado, pues, en primer lugar, los diversos autores no están totalmente de acuerdo, sobretodo en el aspecto cuantitativo, y a veces ni siquiera en el cualitativo. Por otra parte, la época del año, clima y variedad de la fuente natural escogida influye a veces enormemente en su composición. Por todo esto, es preferible realizar dos procesos paralelos, uno de ellos empleando DUA como agente extractor y otro en el que se utilice una resina comercial ampliamente utilizada.

Como se ha hecho notar en los antecedentes bibliográficos, la comparación entre resinas sólidas de naturaleza amina primaria o secundaria y soluciones de aminas líquidas parece indicar que se obtienen mejores resultados con estas últimas. Puesto que este aspecto está en cierto modo estudiado, hemos preferido comparar la DUA con resinas sólidas de tipo sal de amonio cuaternario. Una de ellas, ampliamente utilizada, es la Dowex-1X8 (20-50 mallas). Para hacer el estudio más completo, la Dowex-1X8 ha sido probada en ciclo acetato y ciclo -OH.

Podemos resumir esquemáticamente el proceso de la forma siguiente:

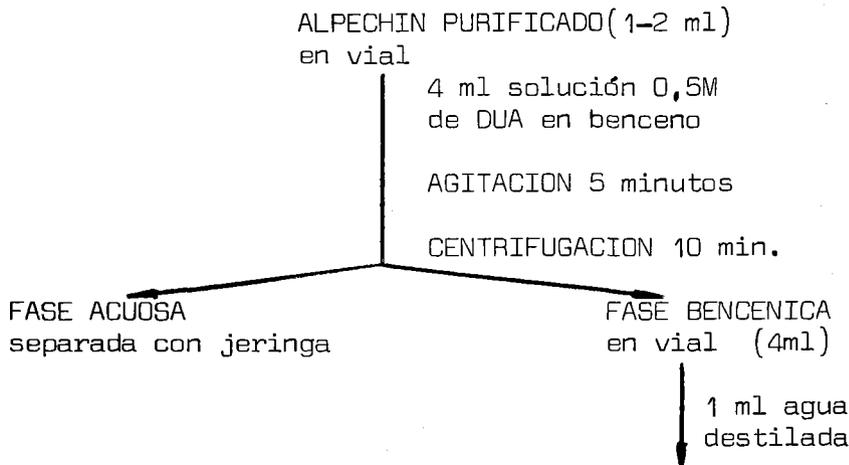


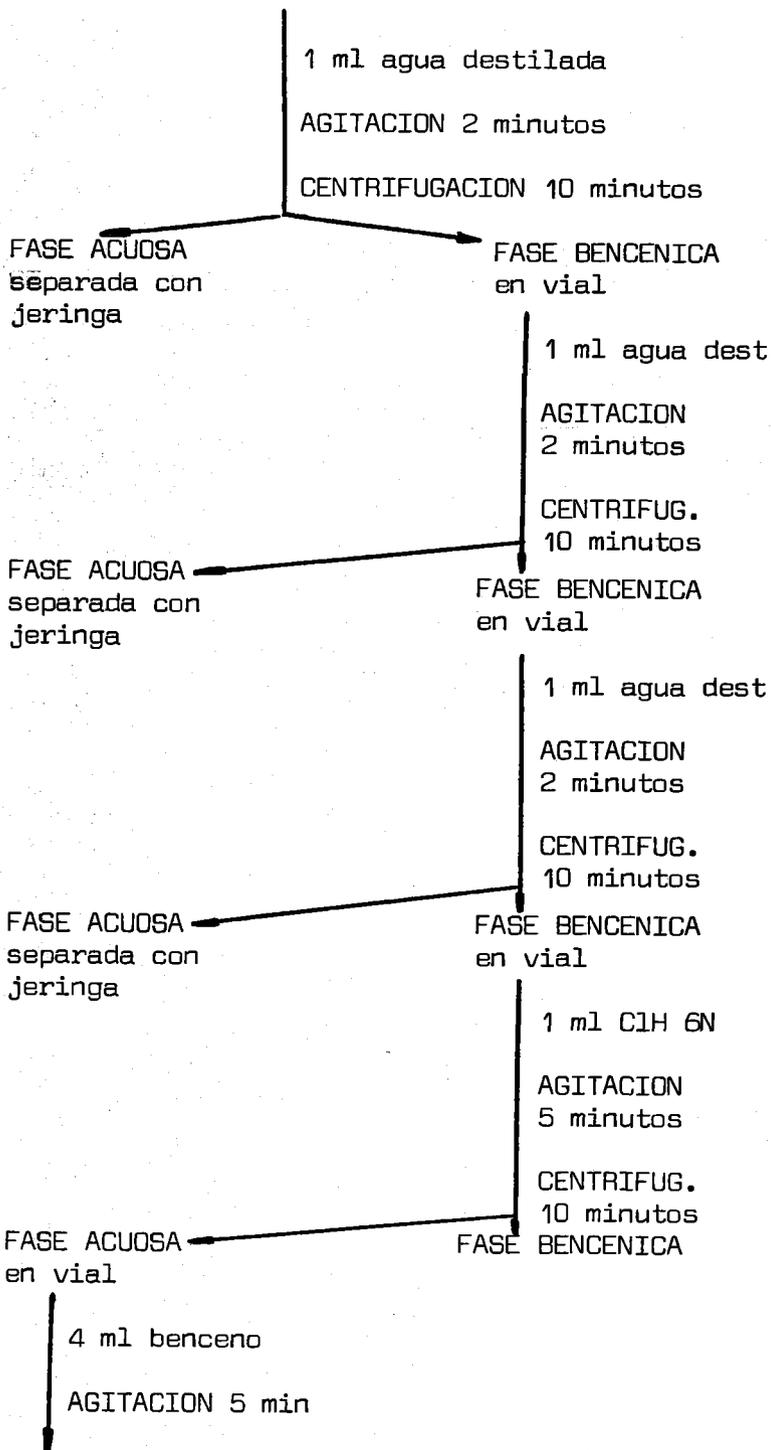
Desde el punto de vista cuantitativo, hemos de tener en cuenta que se ha de emplear el mismo número de equivalentes de DUA y Dowex-1, pues no sería válido un resultado obtenido mediante el empleo de cantidades diferentes de los agentes extractores utilizados.

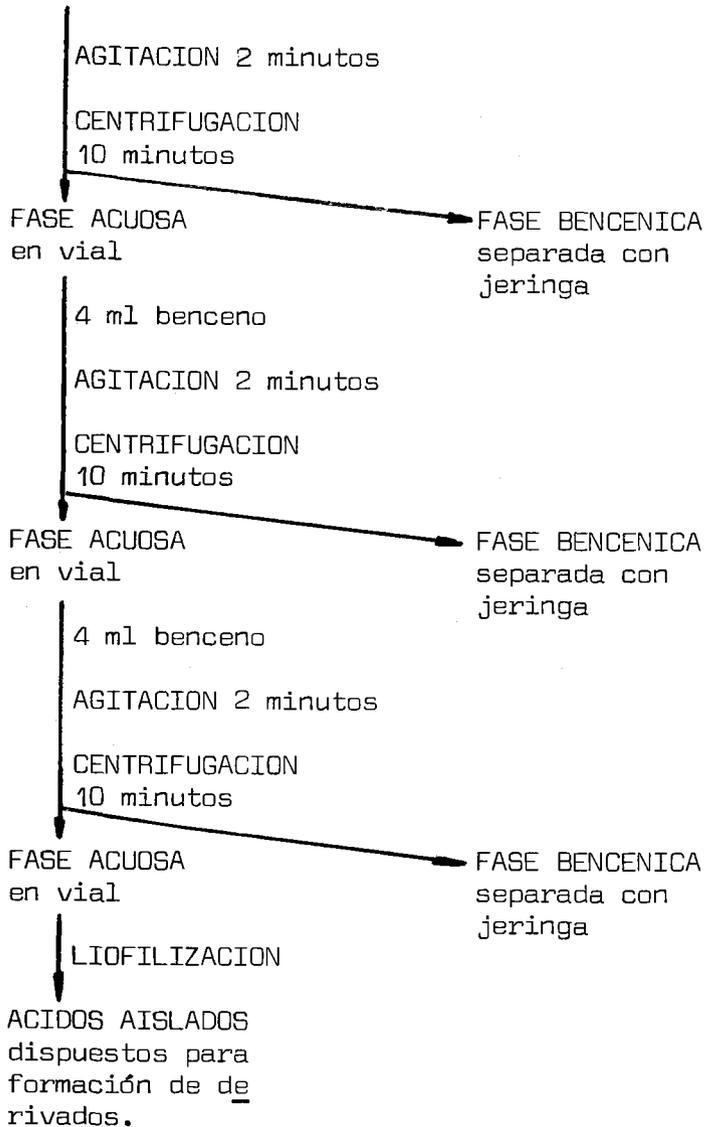
Si los resultados obtenidos son positivos, el empleo de las aminas de alto peso molecular en la extracción líquido-líquido puede generalizarse, pues aunque como veremos en la parte experimental y ya hemos indicado antes, las soluciones deben de dejarse en reposo durante bastante tiempo, si trabajamos a pequeña escala (micro ó semimicro) las separaciones pueden llevarse a cabo por centrifugación de una manera excelente y total. Aprovechando esta rapidez de separación y algunos factores más, como el trabajar siempre a temperatura ambiente y manejar en todas las fases del proceso no más de 5-6 ml, sin tener que concentrar nunca, formando los derivados para análisis en el mismo recipiente de la extracción, reextracción y liofilización, se puede realizar análisis en un corto espacio de tiempo y con garantías de exactitud.

El esquema de un proceso micro nos dará una idea de conjunto de todo el procedimiento de análisis.

Se indican los volúmenes usuales que pueden usarse concretamente para el alpechín de la aceituna, producto natural en el que hemos aplicado el citado procedimiento a esta escala micro.







Es preciso indicar que se puede seguir un proceso análogo con reextracción con hidróxido amónico si no importa el obtener al final sales amónicas. Sumando los tiempos indicados en todo el proceso se puede apreciar que el análisis se hace en unas dos horas. Naturalmente se podrá aplicar el proceso si disponemos de métodos precisos de microanálisis.

### Métodos de análisis.-

Teniendo en cuenta que hemos de analizar mez — clas complejas, los procedimientos analíticos utilizados han de darnos la composición cualitativa y cuantitativa de los compuestos que integran la mezcla extraída y reextraída previa separación de los mismos.

Tal y como hemos podido apreciar en la revisión bibliográfica, los procedimientos que se emplean hoy día son todos cromatográficos.

En principio, según la manera de operar, podemos agrupar estos métodos en cromatografía de papel y capa fina por una parte, y por otra en columna, bien sea de absorción o reparto, aunque a veces se emplea una combinación de unas y otros. Refiriéndonos a la cromatografía de papel y capa fina, los ácidos son en general difíciles de analizar, debido a que los cromatogramas son una cola continua en la que no siempre se distinguen bien las manchas en las que están situados los diversos ácidos. Además, muchos ácidos son capaces de dar más de una mancha en el cromatograma, con lo que su interpretación se complica. — Si a todo esto añadimos el que vamos a realizar análisis de sustancias prácticamente no investigadas y de gran complejidad, podemos fácilmente comprender que por sí sólo este procedimiento no puede ser tenido en cuenta. Puede servirnos, si fuese necesario, para confirmar o comprobar algún detalle.

Es preciso hacer notar que podemos esperar muchos componentes que deseamos determinar, lo que es una nueva razón para no considerar estos procedimientos como los más idóneos.

Por fin, el hecho de que deseemos realizar los análisis de forma cuantitativa, descartan la cromatografía en papel y capa fina, pues aunque existen varios procedimientos para el análisis cuantitativo en papel y capa fina, mediante fotodensitometría, colorimetría o medidas de fluorescencia, no tienen la precisión deseable.

Podemos emplear una combinación de cromatografía líquido-líquido en columna con la cromatografía en papel o capa fina. Mediante la columna podemos separar grupos de sustancias que serían después cromatografiados en papel o capa fina. Sigue existiendo el problema del análisis cuantitativo.

Otra técnica con posibilidades de empleo es la formada por una columna en la que se va valorando (volumetría ácido-base) el eluyente, con lo que se obtiene valores cuantitativos, procediendo a identificar en papel o capa fina cada uno de los ácidos medidos cuantitativamente al salir de la columna.

Debe descartarse totalmente el empleo de la cromatografía líquido-líquido en columna para la separación de los diversos ácidos e identificación de los mismos por los volúmenes de retención de cada uno de ellos, pues el método, por inexacto, no se emplea en la actualidad.

En todos los sistemas de cromatografía líquido-líquido nos vamos a encontrar con el número insuficiente de platos teóricos que nos permitan buenas separaciones de mezclas complejas.

Debemos además contar con la gran lentitud de todos estos procedimientos.

Lo ideal es encontrar un método que nos permita separaciones excelentes, poder trabajar de forma cuantitativa y a ser posible con gran rapidez y desde luego de gran sensibilidad. Un procedimiento que cumple todas estas condiciones es la cromatografía de gases, en sus variantes de cromatografía gas-líquido ó gas-sólido.

Ya hemos reseñado varios trabajos en los que se compara procedimientos más clásicos con el de la cromatografía gas-líquido, modalidad más empleada. Los autores concuerdan en que es superior el análisis por cromatografía de gases debido a su exactitud, repetibilidad, sensibilidad, rapidez y facilidad para hacer medidas cuantitativas.

Una buena columna de relleno posee alrededor de

5000 platos teóricos, y los detectores que hoy se utilizan permiten detectar hasta nanogramos de componentes inyectados. Los análisis raramente superan la hora en cuanto a duración, y los buenos cromatógrafos de gases permiten un control de parámetros que aseguran un mínimo error en las pruebas cuantitativas que se realizan.

La cromatografía de gases es hoy una técnica — muy extendida, por lo que la descripción de los aparatos normales no es necesario. Tan sólo especificaremos características técnicas de los utilizados, modificaciones que se hayan realizado y operaciones que son necesarias para calcular, confeccionar y probar las columnas que se vayan a utilizar.

La cromatografía de gases, hablando en general, abarca todos aquellos procesos cromatográficos en los que la fase móvil utilizada sea un gas. La principal limitación es que sólo puede aplicarse a sustancias que sean volátiles, es decir, que tengan una presión de vapor suficientemente elevada en las condiciones en que trabajemos, y, por supuesto, que no se descompongan en esas condiciones de trabajo. Ya hemos mencionado, sin embargo, que a veces se busca intencionadamente la destrucción de las — sustancias a analizar( métodos de pirólisis), con objeto de caracterizarlas en función de sus productos de decomposición, pero no es una técnica corriente, y por supuesto, muy poco aplicada a los compuestos que nosotros analizaremos.

El método contrario al visto para el análisis — de sustancias no volátiles consiste en formar derivados — de las mismas que tengan una suficiente tensión de vapor. Ya comentaremos más adelante los tipos de derivados usados, sus ventajas e inconvenientes.

Nuestro trabajo versará sobre la modalidad denominada cromatografía gas-líquido, caso particular de lo — que antes hemos definido como cromatografía de gases.

Emplearemos columnas con una fase estacionaria líquida, y a esto se debe su denominación gas-líquido.

Los gases practicamente no presentan interac —

ciones entre sus moléculas, ni tienen capacidad para desalojar las moléculas de soluto con suficiente tensión de vapor de la fase estacionaria siempre que estén fijadas a ella por fuerzas intermoleculares, porque la relación de las fuerzas de atracción intermoleculares entre gases y líquidos es del orden de 1:10000.

Hemos asegurado antes que la cromatografía de gases es un método analítico rápido, y ello se debe a la diferencia de difusividad entre líquidos y gases, siendo su relación en el orden indicado de 1:100000. En cromatografía de gases la velocidad óptima de flujo es del orden de  $10^4$ - $10^5$  veces superior a la fase líquida, además de que en fase líquida el equilibrio de la separación se alcanza de manera mucho más lenta.

Incluso si consideramos que hacemos una cromatografía líquido-líquido a la misma temperatura que otra de cromatografía de gases, la viscosidad de los líquidos es bastante apreciable, por lo que no se puede utilizar columnas muy largas sin someter el sistema a presiones excesivas. En el caso de cromatografía de gases, se utilizan a veces columnas extremadamente largas, pudiendo realizarse buenas separaciones hasta en 15 segundos.

La cromatografía de gases presenta muchas ventajas, pues se pueden detectar fácilmente los diversos componentes separados a la salida de la columna y evaluarlos cuantitativamente incluso en cantidades pequeñísimas. En el caso de los detectores catarmétricos podemos detectar hasta una parte por millón, y con los detectores de ionización, hasta una parte por mil millones de gas portador.

Las cantidades de sustancias manipuladas son del orden del miligramo, e incluso del microgramo. Se puede citar artículos recientes en los que se ha puesto a punto métodos para la determinación de nanogramos de aminoácidos para la determinación de los mismos en extractos acuosos de los materiales de la superficie lunar traídos por los Apolos norteamericanos(142).

En el presente trabajo utilizaremos la modalidad de cromatografía gas-líquido, puesto que las bandas de elución son estrechas, dan picos de elución simétricos y el equilibrio de distribución del soluto entre la fase

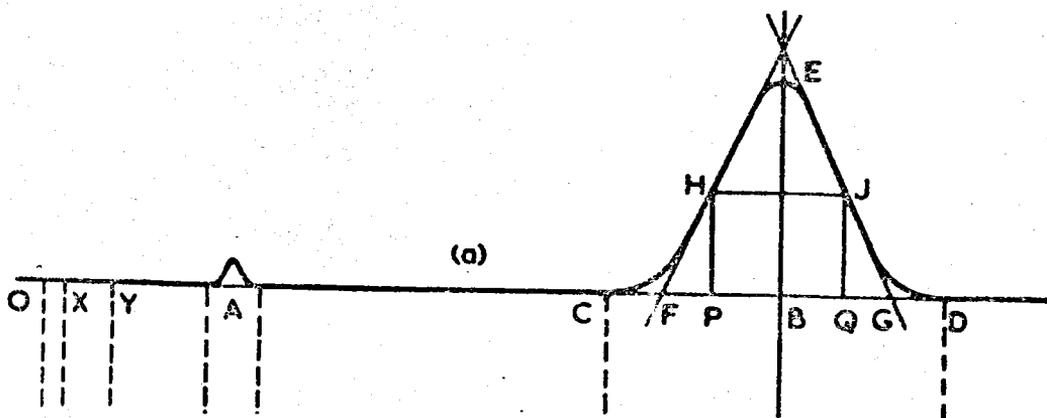
móvil y estacionaria se alcanza rápidamente, lo que permite operar a grandes velocidades de gas portador y obtener separaciones en tiempos relativamente cortos.

Cuando se necesita realizar una separación cromatográfica puede seguirse dos caminos diferentes: Consultar bibliografía, adoptar una columna y condiciones concretas y pedir a las firmas suministradoras la determinada columna, a veces incluso probada, o bien, previa consulta orientativa de bibliografía, proyectar, construir y rellenar una columna, estableciendo asimismo las condiciones óptimas de trabajo, es decir, seguir un método establecido de análisis o bien encontrar o modificar otro.

En este trabajo, las columnas utilizadas en los análisis cualitativos han sido las standard suministradas por casas comerciales, pero para el estudio cuantitativo, las columnas han sido calculadas y hechas por nosotros, al tiempo que también hemos determinado las condiciones de trabajo.

Antes de hacer una breve introducción de la forma de calcular rellenos y columnas quiero hacer hincapié en que nos vamos a ceñir a las normas dadas por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en Febrero de 1972(143). Para no extenderme demasiado sólo detallaré la figura geométrica del cromatograma y su nomenclatura. Los demás términos que se utilizan pueden ser consultados en la referencia (143).

Teniendo en cuenta que utilizaremos un detector de tipo diferencial, el cromatograma obtenido tendrá la forma siguiente:



Volumen muerto  $V_M$ : Volumen de gas de transporte requerido para eluir un componente no retenido en la columna (OA), incluyendo el volumen de inyección y de detector (OX, XY)

Base del pico: Interpolación de la línea de base entre las extremidades del pico (CD)

Area del pico: Area comprendida entre el pico y la base del pico (CHEJD).

Máximo del pico: Punto del pico cuya distancia a la base del pico, medida en una dirección paralela al eje que representa la respuesta del detector, es máxima (E)

Altura del pico: Distancia entre el máximo del pico y base del pico, medida en dirección paralela al eje que representa la respuesta del detector (BE).

Anchura del pico  $W$ : Segmento de base de pico interceptada por tangentes a los puntos de inflexión a ambos lados del pico y proyectados en el eje que representa tiempo o volumen (FG).

Anchura del pico a media altura  $W_{0.5}$ : Longitud de línea paralela a la base del pico y corta a la línea de altura por la mitad, tomada entre las intersecciones con el pico.

Vamos a ver a continuación las ecuaciones y determinaciones que en la práctica se han de seguir para determinar los parámetros de una columna y separar lo mejor posible una serie de sustancias.

La relación que existe entre la velocidad lineal con que un gas circula a través de una columna y el gradiente de presión a que está sometida en un punto determinado nos la da la ley de Darcy generalizada:

$$u = - \frac{k}{\eta} \frac{dp}{dz}$$

donde  $u$  es la velocidad intersticial del gas portador en el punto de la columna que dista  $z$  del principio,  $\eta$  significa la viscosidad del gas,  $dp$  es el gradiente de presión en un elemento de columna  $dz$ , y  $k$  es una constante característica de la columna utilizada, de sus dimensiones y forma geométrica, y se denomina permeabilidad.

Suponiendo que el gas se comporta como ideal,

$$p \cdot u = p_0 \cdot u_0$$

indicando el sufijo  $0$  que se trata de valores tomados a la salida de la columna. Introduciendo esta suposición, podemos integrar, obteniendo:

$$z + \text{constante} = - \frac{k}{\eta} \frac{p^2}{2p_0 u_0}$$

cuando  $z = 0$  (entrada de columna),  $p = p_i$ , y obtenemos que

$$z = \frac{k}{\eta} \frac{p_i^2 - p^2}{2p_0 u_0}$$

cuando  $z = L$  (salida de columna)

$$L = \frac{k}{\eta} \frac{p_i^2 - p_0^2}{2p_0 u_0}$$

y relacionando estas ecuaciones obtenemos que:

$$\frac{z}{L} = \frac{p_i^2 - p^2}{p_i^2 - p_0^2}$$

obteniendo al representar esta ecuación una familia de curvas una para cada valor de  $p_i/p_0$ , y que por su forma nos indican que en la columna hay un gradiente de presión

grande al principio de la misma, disminuyendo después.

Podemos transformar esta expresión de manera — que intervengan las velocidades lineales del gas portador

$$\frac{z}{L} = \frac{(p_1/p_0)^2 - (u_0/u)^2}{(p_1/p_0)^2 - 1}$$

La velocidad media  $\bar{u}$  para toda la columna puede calcularse así:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} = \frac{L}{\int_0^L \frac{dz}{u}}$$

siendo  $t_M$  igual a tiempo muerto, tiempo que tarda el gas portador en recorrer la columna.

Podemos llegar por fin a la expresión:

$$\bar{u} = \frac{3}{2} \frac{(p_1/p_0)^2 - 1}{(p_1/p_0)^3 - 1} u_0$$

en la que podemos calcular  $\bar{u}$  en función de  $u_0$ .

Es interesante señalar que existe un factor  $j$  de corrección de la compresibilidad o factor de obstrucción de JAMES y MARTIN(144), dado por:

$$j = \frac{3}{2} \frac{(p_1/p_0)^2 - 1}{(p_1/p_0)^3 - 1}$$

En la práctica podemos calcular  $u_0$  de la siguiente manera

$$u_0 = \frac{L}{j d_0} \times \text{velocidad del registro gráfico}$$

siendo  $d_o$  la distancia que en el cromatograma corresponde a  $t_M$ , es decir,  $OA$ .

$\eta$  viene tabulado para los distintos gases utilizados como portador, pero la relación entre  $\eta$  y  $I_c$  nos la da una ecuación que concretamente para el nitrógeno es:

$$\eta = k T_c^{0,718}$$

Es más cómodo medir directamente en representaciones gráficas de esta curva publicada con este objeto(145)

Podemos calcular la permeabilidad de una columna de la siguiente manera:

a) Hallar  $d_o$  a tres valores diferentes de  $p_m$  ( $p_m$  es la presión leída en manómetro).

b) Calcular los correspondientes valores de  $u_o$

c) Representar  $u_o$  frente a  $(p_i^2/p_o^2 - 1)$

y la pendiente será  $\frac{k}{\eta} \frac{p_o}{2L}$ , de donde podremos calcular  $k$

En una columna de relleno el volumen ocupado por la fase móvil es pequeño en relación al volumen total de la columna ( $X$ ), pues la mayor parte de este volumen lo ocupa el relleno. Hay un término que nos da idea de la fracción de volumen que ocupa la fase móvil, y es la fracción intersticial de la columna ( $\epsilon_I$ ). Podemos calcular este valor de la siguiente manera:

$$u_o = \frac{F_c}{\pi r^2 \epsilon_I} = F_m \frac{T_c}{T_a} \frac{p_o}{p_n} \frac{1}{\pi r^2 \epsilon_I}$$

donde  $F_c$  es el flujo volumétrico a la salida de la columna medido a la temperatura de la columna y presión normal  $F_m$  es el flujo volumétrico a la salida de la columna, medido a temperatura y presión ambiente, esto es, el que se mide en la práctica con el flujómetro,  $r$  es el radio -

de la columna, pues normalmente son circulares (radio interior);  $T_a$  es la temperatura absoluta del medio ambiente  $p_o$  es la presión que se puede leer en el barómetro del laboratorio y  $p_n$  es la presión barométrica corregida a 25°C

Los valores de retención de una sustancia los podemos medir de la siguiente manera:

Factor de capacidad  $k'$  puede ser hallado

$$k' = \frac{d-d_o}{d_o}$$

Para un soluto determinado, el cálculo se realiza por inyección de la muestra en el cromatografo y medida directa sobre el cromatograma de  $d_o$  (OA) y  $d$  (OB)

La relación frontal también puede calcularse con estos datos:

$$R_f = \frac{d_o}{d}$$

aunque tiene poca importancia y no tiene el mismo significado que el acostumbrado en TLC

Volumen de retención neto  $V_N$ :

$$V_N = j \frac{T_c}{T_a} \frac{p_o}{p_n} F_m \frac{d - d_o}{\text{velocidad de registro}}$$

En la práctica  $p_o/p_n$  se toma como la unidad.

Volumen de retención específico  $V_g$ :

Podemos expresarlo como

$$V_g = \frac{1}{W_L} \frac{273}{T_a} \frac{p_o}{p_n} j F_m \frac{d - d_o}{\text{veloc. de registro}}$$

teniendo en cuenta que  $W_L$  es el peso de la fase estacionaria que contiene la columna.

Retención relativa  $r_{A/B}$ :

$$\text{Puede expresarse como } r_{A/B} = \frac{d_A - d_0}{d_B - d_0} \quad \text{según}$$

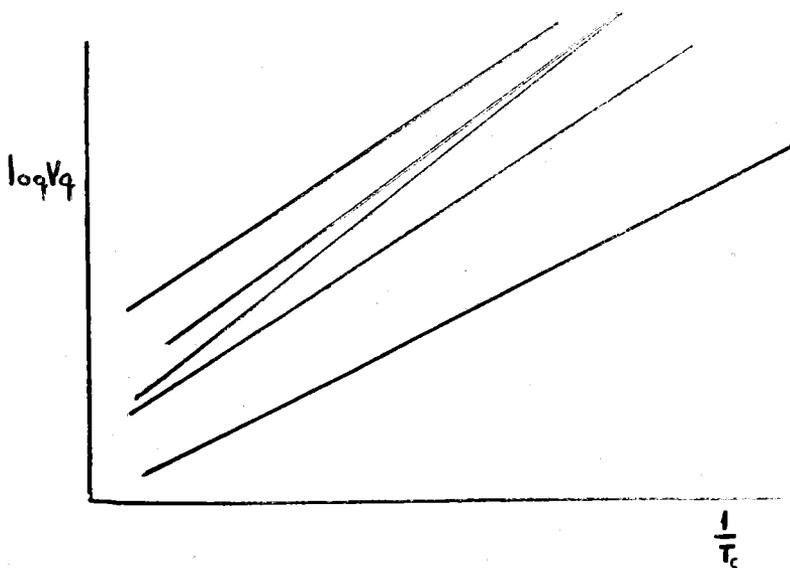
distancias en el cromatograma, aunque según las normas de la IUPAC se expresa en función de volúmenes de retención

$$r_{A/B} = \frac{(V_g)_A}{(V_g)_B} = \frac{(V_N)_A}{(V_N)_B} = \frac{(V'_R)_A}{(V'_R)_B}$$

siendo  $V'_R$  volumen de retención ajustado.

Variación de los volúmenes de retención específicos con la temperatura de la columna:

Podemos representar gráficamente los logaritmos de los volúmenes de retención específicos respecto al inverso de la temperatura de la columna, haciendo primero la inyección de cada uno de los patrones a varias temperaturas de columna, calculando sus correspondientes  $V_g$  y  $r$  representando después gráficamente lo encontrado. Obtendremos así una serie de rectas tal como se indican en la figura siguiente:



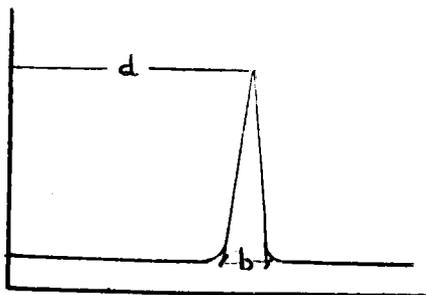
Cuanto más alejadas estén las rectas de una pareja de compuestos, mejor podremos separarlos. Si las rectas correspondientes a una pareja de compuestos no son paralelas intentaremos establecer en las columnas la temperatura para la que las rectas estén más distantes. Los puntos de cruce son temperaturas prohibidas para la separación de los compuestos representadas por las rectas en cuestión. Si a lo largo de toda la gama de temperaturas no hay separación suficiente de las rectas de algunos compuestos, esto quiere decir que la fase estacionaria utilizada es incapaz de realizar la separación.

Para una mezcla compleja, en que se utiliza siempre la programación de temperatura, generalmente la programación lineal, el gráfico nos es de gran utilidad, pues nos permitirá determinar la isoterma inicial y final dándonos una valiosa orientación para el cálculo de la relación de calentamiento.

Es inevitable que la mejora de separación de una pareja determinada de compuestos traiga a veces consigo el empeoramiento en la separación de otros. Si la mezcla es extremadamente compleja, aparte de los cálculos preliminares, es la habilidad e intuición del operador la que debe encontrar las condiciones óptimas de separación.

El sistema gráfico anterior puede construirse con tiempos de retención en lugar de volúmenes específicos de retención, siendo igualmente valiosa para la determinación de condiciones óptimas de separación.

Cálculo de la eficacia de una columna: Podemos determinar la eficacia de una columna mediante el cálculo del número de platos teóricos  $n$  de la misma. Para ello empleamos un patrón determinado, y por medidas directas en el cromatograma



$$n = \frac{16 d^2}{b^2}$$

Cuanto más estrechos sean los picos obtenidos más eficiente es la columna utilizada y más número de platos teóricos tendrá.

Según las últimas normas de la IUPAC

$$n = 16 \frac{V_R^2}{W^2}$$

En cromatografía de gases a temperatura programada el cálculo de la eficiencia puede darse como

$$n = 16 \frac{(V_{TR})^2}{W^2}$$

Para calcular  $V_{TR}$  hacemos la inyección del patrón con la programación  $T_{TR}$  de temperatura elegida, calculamos  $T_R$  (temperatura de retención), calculamos  $W$  y después hacemos otra inyección a isoterma  $T_R$ , calculando entonces el volumen de retención a esta temperatura. Después sólo quedará aplicar la anterior fórmula.

El número de platos teóricos efectivos  $N$  viene dado por

$$N = 4 R_S / (\alpha - 1)$$

En el análisis de mezclas difíciles, no sólo hay que buscar el que los tiempos y volúmenes de retención sean lo más diferentes posibles sino que además exista el mayor número posible de platos teóricos efectivos. Sobre todo con vistas al análisis cuantitativo, a veces es preferible menor diferencia en tiempos de retención y conseguir picos más estrechos para que no haya solapamiento de los mismos.  $\alpha_{A/B}$ , que por acuerdo es mayor que la unidad, es el factor de separación del componente A y el componente B, ó la relación de coeficientes  $D_A/D_B$ , que también se denomina factor de capacidad  $k'$ .

Podemos escribir que

$$N = 4 R_S / (\alpha - 1) = 4 R_S / \frac{k'_A}{k'_B} - 1 =$$

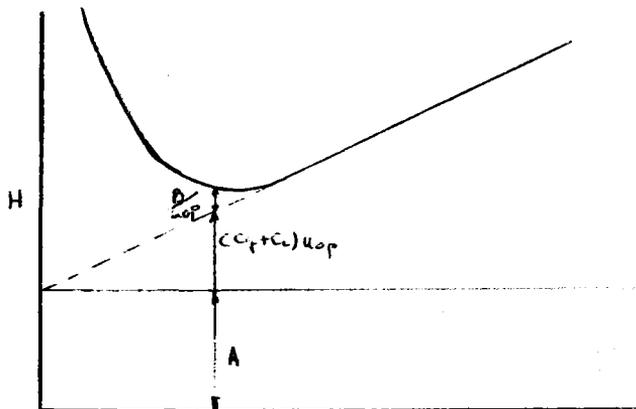
$$= 4 R_S / \frac{d_A - d_B}{d_B - d_0}$$

expresión válida si  $d_A > d_B$ , esto es, se ha de tomar siempre las distancias en el cromatograma de manera que  $N$  sea positivo.

Conocidos  $n$  y  $N$  podemos calcular  $h$  y  $H$  sin más que dividir los primeros valores por la longitud de la columna  $L$ .

El cálculo de la relación entre  $h$  y velocidad del gas portador puede realizarse de una forma experimental. Bastará para ello disponer de una sustancia, a ser posible un nalcano, que tenga un valor de  $k'$  aproximadamente 2. Realmente considero que para una fase estacionaria determinada y siempre que se trate de utilizar columnas para el análisis de nuestras sustancias el patrón utilizado podrá ser un prototipo de los empleados por nosotros, concretamente de la zona del cromatograma donde veamos una separación más problemática o más interesante.

Realizaremos una serie de inyecciones a diferentes velocidades de gas portador, calculando para cada inyección el correspondiente valor de  $h$ , y representándolo gráficamente frente a  $u$ .



Sabemos que:

$$h = A + \frac{B}{u} + (C_g + C_L)u$$

El mínimo de  $h$  corresponde a  $\underline{u}_{op}$  (  $u$  óptima )

$$u_{op} = \sqrt{\frac{B}{C_g + C_L}}$$

$$\bar{h} = A + \frac{B}{u_o} + C_g u_o f + C_L j u_s$$

$$u_{op} = \sqrt{\frac{B}{C_g + (j/f)C_L}}$$

Hay que tener en cuenta que  $f$  es

$$f = \frac{g}{B} \frac{\left[ \left( \rho_i / \rho_o \right)^4 - 1 \right] \left[ \left( \rho_i / \rho_o \right)^2 - 1 \right]}{\left[ \left( \rho_i / \rho_o \right)^3 - 1 \right]^2}$$

y puede no ser tenido en cuenta al oscilar siempre entre 1 y 1,125.

Puede hacerse también la representación frente a  $\bar{u}$ , con sólo variar  $\underline{u}$  por

$$u_o = \frac{\bar{u}}{j}$$

Trabajando a temperatura programada nos encontraremos con varias complicaciones por el aumento de temperatura y disminución del caudal del gas portador debido al aumento de viscosidad de la fase estacionaria, pero siempre será posible encontrar un valor óptimo de  $\underline{u}_o$  y  $\bar{F}_m$

que nos reuna: Buena eficiencia en todas las zonas del - cromatograma y buena respuesta del detector.

En principio vamos a trabajar con columna clásica de relleno en razón de su menor costo, facilidad de - manejo y permitir que sin disponer de material excesiva - mente especializado pueda construirse en el propio labora - torio la columna calculada de antemano.

Podemos elegir entre columnas de acero inoxidable tratadas interiormente, columnas de cobre ó columnas de vidrio. La forma de las mismas depende fundamentalmente del aparato de que se dispone, pero por sencillez de - manejo y construcción son preferibles las de tipo en U.

A la hora de un estudio cuantitativo de sustancias que pueden descomponerse a la temperatura a que se - trabaja, por catálisis, no hay duda en que se debe utili - zar un sistema lo más inerte posible, y esto sólo se consigue si los componentes a separar no tocan nunca una superficie metálica, es decir, se debe emplear lo que los - cromatografistas denominan un sistema todo-vidrio. Para - ello la columna ha de ser de vidrio, el sistema de inyección ha de ser tal que nos permita una inyección en la ca - beza de la columna, y a pesar de ello las superficies del sistema inyector pueden, por efecto de posibles expansio - nes en el momento de la inyección, tocar las sustancias - por lo que es conveniente modificar los reductores de espacio muerto, generalmente metálicos, sustituyéndolos por otros de vidrio. La conducción del final de la columna al detector debe poder ser forrada de vidrio con el mismo - fin, como es el caso del cromatógrafo de que disponemos. Nos aseguraremos de la ausencia de grupos activos perturbadores si todo el sistema descrito está además desactiva - do, para lo cual se lavará con ácido nítrico y posterior - mente se silanizará. Esto, además, nos conseguirá una mejor eficiencia en el análisis, pues eliminaremos las co - las de los picos.

La columna clásica posee la mayor parte de su - interior ocupada por el relleno, lo que hace que su per - meabilidad sea relativamente baja y no se pueda hacer uso de columnas excesivamente largas, aunque esto dependerá - bastante del tamaño del grano del relleno. Cuanto más pe -

queño sea, menor permeabilidad tendrá la columna.

La ecuación de VAN DEEMTER para este tipo de columnas es:

$$h = 2\gamma d_p + \frac{2 D_m}{u} + \frac{8}{\pi} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_f}{D_s} u$$

en la que se ha suprimido el término correspondiente a la difusión molecular en la fase estacionaria por ser despreciable, así como el término debido a la resistencia a la transferencia de masas que opone la fase móvil, también despreciable en este tipo de columnas.

Tengamos en cuenta que la ecuación general es:

$$h = 2\gamma d_p + \frac{2 D_m}{u} + \frac{1-R_f}{R_f} \frac{2 D_s}{u} + qR_f (1 - R_f) \frac{d_f^2}{D_s} u + c \frac{d_p^2}{D_m} u$$

Las columnas rellenas analíticas tienen un diá-  
interior de 2-6 mm, pero a veces se emplean columnas de -  
diámetro menor.

Columnas de d.i. entre 1 y 2 mm no se conside-  
ran columnas analíticas normales, y por debajo ó iguales  
a 1 mm ya entran dentro de las denominadas capilares re-  
llenas. En estas, la relación entre diámetro interior del  
tubo y el de la partícula de relleno es del orden de 3 a  
5, con lo que se consigue un relleno más irregular, per-  
meabilidad mayor, del orden de 10 veces superior, la capa-  
cidad de carga es pequeña y en ellas no se puede despre-  
ciar el valor de la resistencia de masas que opone la fa-  
se móvil ( $C u$ ), por lo que hay que tenerla en cuenta al -  
considerar  $\frac{C}{h}$ .

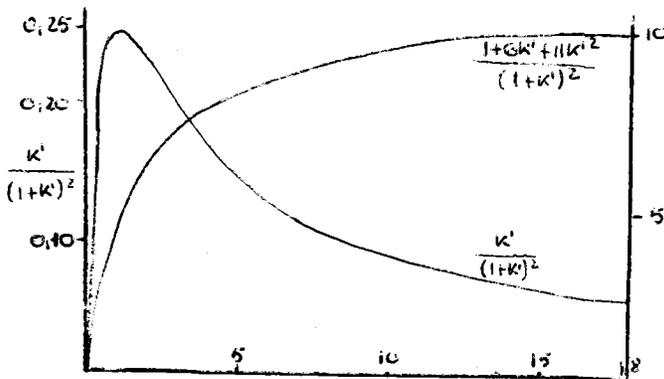
Sin entrar en consideraciones teóricas que alar

garían demasiado esta exposición, podemos considerar simplemente los factores que nos interesan en lo que respecta a los términos de resistencia a la transferencia de masas, la debida a la fase estacionaria ( $C_L u$ ) y la debida a la fase móvil ( $C_g u$ ). Ambas, para un valor determinado de  $u$  sólo dependen del factor de capacidad de la columna  $k'$ :

$$C_L \propto \frac{k'}{(1+k')^2}$$

$$C_g \propto \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{(1+k')^2}$$

Representando estos valores frente a  $k'$  obtenemos:



Podemos apreciar que  $C_g$  es siempre mayor que  $C_L$  para cualquier valor de  $k'$ , y que  $C_L$  sólo tiene valor apreciable para valores de  $k'$  comprendidos entre 0,5 y 5 unidades. Teniendo en cuenta que a mayor valor de  $C_g$  ó  $C_L$ , - mayor valor de  $h$ , cosa que no nos interesa, convendrá bajar en zonas y con columnas que nos permitan valores pequeños de  $C_g$  y  $C_L$ .

En columnas clásicas  $C_g$  es despreciable, en columnas capilares  $C_L$  es ahora el que puede no ser tenido en cuenta. Las clásicas separan mejor, teniendo sólo en cuenta este factor, en valores grandes de tiempos de retención, y las capilares, para pequeños valores de  $k'$ .

Una columna muy estrecha que sea casi una capilar rellena tendrá un valor de  $C_g$ , y pequeño también el factor  $C_L$ .

Para los análisis, en la práctica, nos interesan columnas que separen bien al principio y al final del análisis. Esto puede conseguirse bien con columnas muy estrechas, prácticamente entre capilares rellenas y analíticas normales, lo que hemos de tener en cuenta a la hora de construir una columna.

Una forma de expresar la resolución de una columna es:

$$R_S = \frac{r-1}{r} \frac{k'}{1+k'} \frac{n}{4}$$

teniendo en cuenta, a una temperatura determinada, que  $r$  (retención relativa) depende de la fase estacionaria,  $n$  siempre es mayor en las capilares debido a la gran longitud que pueden poseer, pero a  $k'$  pequeñas la resolución será buena si poseemos un número adecuado de platos teóricos. Una columna muy estrecha y de suficiente longitud será aceptable y dará buen rendimiento.

Cuanto más longitud posea una columna, mayor número de platos teóricos tendrá, pero hay que tener en cuenta que a mayor longitud de la columna, más comprimimos el gas portador, y para conseguir una determinada  $u_0$ , el gradiente de presión a utilizar sería demasiado grande para cromatógrafos normales, lo que limita la longitud de columna, aunque en todo esto siempre hay que contar con la permeabilidad de la misma.

Es preciso tener en cuenta que la resolución sólo es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud, por lo que es preciso hacer una columna muy larga para aumentar algo la resolución. Además, a veces se alargan demasiado los tiempos de análisis.

En las columnas de relleno, el diámetro del tubo influye en la eficacia de la columna, por ser responsable de los efectos intercanales distantes y transcolum

na.

Influye el hecho de que a menor diámetro interno y misma longitud de columna, la cantidad de fase estacionaria es menor para el mismo tipo de relleno, por lo que  $k'$  es menor, siendo entonces menor la altura del plato teórico, obteniéndose mejores resultados siempre y cuando no se sobrecargue la columna.

El tamaño del grano es bastante importante, pues afecta a las condiciones dinámicas de la columna. Cuanto menor es su diámetro, menor es  $h$ , pero en la práctica un diámetro muy pequeño origina algunos problemas. Por una parte ya hemos comentado las sobrepresiones que trae consigo, pero además conviene recordar que cuanto más pequeño sea el grano, para los márgenes en número de mallas que se encuentran en el comercio, más dispersión hay en su tamaño, con lo que es mayor, pudiendo incluso llegar a compensar la ventaja que da el menor tamaño del grano.

El menor tamaño de partícula trae consigo que, para un relleno a un tanto por ciento determinado en fase estacionaria, la cantidad absoluta de fase estacionaria sea mayor, y esto disminuye la eficacia de la columna.

Es preciso tener en cuenta de que vamos a trabajar con detector de ionización de llama, y que el flujo de gas portador ha de ser de un orden tal que permita obtener una buena señal del citado detector.

En columnas muy estrechas el flujo óptimo permite obtener buenas señales del detector, pero en columnas más gruesas, aún dentro de la gama de analíticas, si queremos conseguir una buena señal del detector, es preciso disponer de un divisor de flujo al final de la columna. En ambos casos hay de todas maneras que encontrar las condiciones óptimas de trabajo del detector. Fijando una temperatura suficientemente alta como para impedir que haya algún depósito de los componentes, lo que falsearía respuestas cuantitativas y contaminaría el detector, hemos de ir variando los flujos de hidrógeno y aire hasta conseguir una señal lo mejor posible para una determinada cantidad de sustancia.

Vamos a comentar brevemente los métodos seguidos para la identificación de componentes y determinación cuantitativa de los mismos.

Ya hemos indicado en anteriores ocasiones que el primer paso para el análisis en cromatografía gas-líquido de este tipo de ácidos es la formación de derivados que bloqueen sus grupos polares y aumenten su tensión de vapor. En los antecedentes bibliográficos hemos podido apreciar que se utilizan preferentemente los ésteres metílicos, y en el último lustro, los TMS derivados.

Con la formación de ésteres metílicos se consigue bloquear el grupo carboxilo. Este procedimiento, primero de los utilizados, fue aplicado con anterioridad para ácidos grasos, y se sigue aplicando en la actualidad, aunque en estos últimos tiempos se prefieren los TMS derivados. El gran problema de los ésteres metílicos de los ácidos con los que vamos a operar es que siguen poseyendo grupos -OH libres, lo que hace que todavía posean bastante polaridad, con los perjuicios que esto supone en cromatografía de gases: Volúmenes de retención altos, picos bajos y formación de colas por interacción con el soporte sólido del relleno utilizado en las columnas.

Hay muchos ácidos que no pueden cromatografiarse en forma de ésteres metílicos, pero sí hay bastantes que se eluyen sin dificultad con buenos resultados.

Respecto a la forma de derivación, seguiremos el método visto en los antecedentes bibliográficos de metilación con solución etérea de diazometano, estando el ácido ó los ácidos en solución metanólica, todo ello a 25 °C. Existe el problema de la formación de pirazolininas por parte del ácido fumárico, pero para análisis cualitativo, no importa demasiado que parte del ácido se transforme.

La solución de ésteres metílicos puede ser inyectada en el cromatógrafo en solución metanólica, disueltos en acetona o en cloruro de metileno. El metanol es un aceptable disolvente para este tipo de sustancias, aunque tiene el inconveniente de que produce grandes colas que interfieren con la detección de los componentes más volátiles.

tiles de la muestra. El cloruro de metileno es un excelente disolvente de estos ésteres metílicos estudiados, pero es bien sabido que estos compuestos halogenados son corrosivos y a la larga molestan a los aparatos y a muchas fases estacionarias, incluso a determinados tipos de soportes sólidos con tratamiento silanizante especial. A pesar de todo, se ha utilizado en alguna ocasión. La acetona es muy buen solvente y no tiene los inconvenientes de los anteriores, por lo que la hemos utilizado ampliamente.

Como detallaremos en la parte experimental, hemos empleado para los ésteres metílicos columnas de Butanodiolsuccinato, pero sobre todo, de Dietilenglicolsuccinato. Se ha trabajado en condiciones isotérmicas de temperatura, programada linealmente, consiguiéndose mejores resultados con la programación lineal de temperatura en la zona de 150-200°C. En estas últimas condiciones se empleó una columna de DEGS al 20% en Chromosorb W (lavado-ácido, de 60-80 mallas), en tubo de acero inoxidable tratado, suministrado por Carlo Erba de Milán.

La identificación de compuestos se realizó en la forma usual con patrones, inyectando simultáneamente el problema y el patrón del compuesto ó compuestos a identificar. Tratándose de sustancias naturales, es muy aventurado identificar compuestos por valores de retención dados en bibliografía, tal y como suelen hacerse en algunas publicaciones, empleando unos pocos patrones y relacionando con ellos los otros picos del cromatograma. Es también costumbre, aunque se va desechando, el identificar series homólogas por el método de la representación gráfica de  $\log V_r$  en función del número de átomos de carbono, aunque se empleen columnas polares y apolares, y sobretodo si se utilizan columnas de polaridades similares.

El uso de todos y cada uno de los patrones de los ácidos a identificar da una mayor garantía de seguridad en las identificaciones, sobretodo si se emplea más de una fase estacionaria, pero, dentro de los errores que el método de cromatografía de gases lleva consigo, creemos que se pueden aceptar como buenos los compuestos identificados por la determinación independiente de dos derivados diferentes de un determinado ácido, empleando en cada caso las columnas que mejor resuelvan la mezcla a separar.

rar e identificar. Son dos procedimientos paralelos que - al final se comparan.

En nuestro caso concreto, creemos tener más seguridad en la identificación de estos compuestos analizando ésteres metílicos por una parte y por otra los TMS derivados de los mismos ácidos. Son sustancias totalmente diferentes incluso para un mismo ácido original, y ambos tipos de derivados están suficientemente probados para el análisis de los ácidos por nosotros investigados.

El uso de columnas polares y apolares para un determinado derivado tiene el inconveniente de que en multitud de ocasiones una de ellas separa bien las mezclas, pero la otra no, sobretodo si el problema es complejo. Para ésteres metílicos van perfectamente columnas polares — del tipo DEGS, EGA, BDS, NPGS y otras similares, pero las fases estacionarias polares no van demasiado bien.

Hay determinados casos en que el análisis sólo puede realizarse mediante un tipo concreto de derivados. Así, en el caso de ácidos fenólicos y polihidroxilados, solamente se obtienen buenos resultados con TMS derivados y en estos casos concretos tendremos que ceñirnos a un sólo análisis.

En una publicación próxima daremos cuenta de la identificación de componentes menores y microcomponentes por métodos espectroscópicos, una vez realizada la separación en cromatografía de gases preparativa. Este proceso nos permitirá concretar identificaciones de una forma absoluta.

La formación de TMS derivados la hemos llevado a cabo por el procedimiento ya descrito en los antecedentes bibliográficos (52, 56). Como veremos en la parte experimental, el tiempo que dan estos autores, no partiendo de las sales de plomo de los ácidos, es insuficiente, necesiéndose aguardar más para que la reacción se complete. La reacción se produce suavemente y la mezcla silanizante Piridina-HMDS-TMCS da excelentes resultados.

En las muestras con posibilidad de que existan cetoácidos, se sigue previamente la indicación dada en —

(124), tratando previamente los ácidos con clorhidrato de hidroxilamina en piridina. En la parte experimental podremos comprobar el efecto de este tratamiento previo.

Las separaciones conseguidas con los TMS derivados son mucho mejores que las de los ésteres metílicos, por lo que el estudio cuantitativo lo hemos realizado con estos TMS derivados. Además, debido a la limitación de los ésteres metílicos para determinados ácidos, al menos para estos ácidos, no hay otra alternativa.

El análisis es rápido, la separación es buena y además hemos de tener en cuenta que debido al detector empleado, los TMS derivados tienen una respuesta mucho más alta que sus correspondientes ésteres metílicos, y esto es también muy importante en un análisis cuantitativo. Sólo tiene el conocido inconveniente de los derivados de silicio, y es que ensucian con bastante rapidez el detector

La fase estacionaria empleada ha sido silicona SE-30, conocida por su excelente estabilidad y rendimiento en operaciones a temperatura programada, a 3% en peso sobre Chromosorb W ácido-lavado y silanizado de 60-80 mallas.

Para el análisis cuantitativo se ha calibrado el detector para todos y cada uno de los patrones empleados, pero además se ha seguido el método de patrón interno (ácido glutárico) que elimina una gran cantidad de posibilidades de error.

La introducción del patrón se ha hecho por pesada en balanza monoplato semimicro, lo que nos garantiza una suficiente exactitud en su determinación.

Añadiendo el patrón interno antes de la preparación de la muestra, podemos compensar los errores que pueden cometerse en la preparación de la misma, eliminando además los errores de aparato y procedimiento. Por este sistema puede llegar a conseguirse una precisión del 0,1%

Un factor importante a considerar es la forma de medir la magnitud de los picos del cromatograma. La medida de la altura del pico es normalmente desechada por

ser un método impreciso, ya que el dato cuantitativo que un detector de tipo diferencial ofrece es el área de cromatograma comprendida por el pico. Habrá por tanto que medir el área de los picos. Los procedimientos usuales de medir áreas son: Planimetría, método de la altura x anchura a media altura, corte del cromatograma y cálculo de áreas por pesada en balanza de precisión, triangulación, u utilización del integrador de disco ó electrónico digital. Desechamos el método de pesada porque se destruye el cromatograma, el integrador de disco porque sólo puede medir picos totalmente resueltos y línea de base totalmente horizontal, el integrador electrónico por no disponer de él la triangulación y el método de altura x anchura a semialtura debido a que tenemos picos muy estrechos y no puede precisarse bien la anchura, siendo los errores que se cometen excesivos. Sólo nos quedamos con la utilización del planímetro. Según publicaciones(146), la precisión, según desviaciones relativas en las medidas de una serie de picos, es del 4,06% en el planimétrico, 2,58% en el método de la semialtura, 1,74% en el método de la pesada, 1,29% en el integrador de disco y 0,44% en el integrador digital.

Para saber la cantidad absoluta de un componente en el total de la muestra analizada nos bastará medir el área del citado componente y del patrón interno, realizando a continuación el siguiente cálculo:

$$\text{mg de ácido en la muestra tomada} = \text{relación de respuestas} \frac{\text{patrón interno}}{\text{ácido}} \times \text{mg de patrón interno puesto} \times \text{relación de áreas} \frac{\text{ácido}}{\text{patrón interno}} \text{ en el cromatograma}$$

Es interesante señalar que en este cálculo no influye la cantidad de muestra inyectada si es del orden de las utilizadas en la calibración previa, ni sensibilidades a que se trabaje, ni errores cometidos en el manejo de volúmenes en la formación de derivados en el problema. Sólo será necesario medir con precisión áreas, realizar las pesadas de forma exacta, lo que no es difícil si se utiliza una balanza apropiada, y haber realizado una buena calibración previa.

Los ácidos manejados en este estudio, tal y como veremos en la parte experimental, son: Oxálico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, citracónico, succínico, fenilacético, glutámico, mállico, tartárico, ascórbico, aconítico, tricarbálflico, cítrico, quínico, caféico, múcico, gálico, fumárico, alfa-hidroxiglutarico, alfa-cetoglutarico, oxalacético, mevalónico, clorogénico, abscísico, giberélico, ftálico, salicílico, amigdálico, benzóico, alcanfórico, maleico y adípico.

[The page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. No specific content can be transcribed.]

## PARTE EXPERIMENTAL



#### 4.1.- PRUEBAS PRELIMINARES.-

Se realizaron unas experiencias previas con carácter semicuantitativo para los ácidos: Tartárico, cítrico, succínico, maleico y oxálico, ensayándose diversos tipos de agitación y formas de análisis de las muestras.

Fueron desechados los sistemas de agitación por vibración, agitación magnética, rotatoria de hélice y de movimiento horizontal longitudinal para una sola unidad de extracción.

El análisis, para el tartárico, se llevó a cabo por polarimetría en un aparato digital Perkin-Elmer 141, en el caso del ácido cítrico se recurrió a una colorimetría con  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  como reactivo, para el oxálico se siguió un procedimiento similar con reactivo de indol-sulfúrico y otro permanganométrico, y en el caso del ácido maleico y ácido succínico, volumetría de neutralización empleando azul de timol como indicador.

El método más apropiado fué la volumetría de neutralización, salvo si el ácido a analizar va acompañado de algún compuesto interferente, cosa que no sucede en las extracciones normales, pero sí en otras experiencias.

#### 4.2.- EXTRACCION DE ACIDOS.-

##### 4.2.1.- Material y materias necesarias.-

La DUA utilizada en estas operaciones se sintetizó en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento de LOPEZ APARICIO y col(1). La metil-nonil-cetona necesaria para la síntesis se aisló de esencia de Ruda suministrada por Destilerías García de la Fuente. No se consideró pura la DUA obtenida hasta no haberla redestilado a alto vacío

Derivados: Se obtuvo el clorhidrato.  
Punto de fusión 81°C, acorde (1)

Acidos empleados: SUCCINICO r.a. FEROSA  
MALICO para usos bioquímicos  
MERCK  
TARTARICO r.a. PROBUS  
CITRICO r.a. PROBUS

HIDROXIDO SODICO r.a. MERCK

FENOLFTALEINA: Solución de FENOLFTALEINA MERCK al 0,1% en ALCOHOL ETILICO MERCK del 95%.

SISTEMA DE AGITACION: Aparato agitador de movimiento horizontal fabricado en nuestro laboratorio. Consiste en un carro de agitación con capacidad para 15 erlenmeyer de 250 ml. El carro va movido, a través de una ex céntrica, por un motor eléctrico. Utilizando las debidas relaciones de poleas, se consigue un movimiento de unos 250 ciclos/minuto. La carrera seguida en cada ciclo es de 15 cm.

BURETAS: Juego de microburetas PROTON. Fundamentalmente se utilizó una microbureta de 2 ml, con depósito. Esta microbureta permite una gota mínima de 0,03 ml, aun lógicamente ésta no es la mínima cantidad que se puede precisar. Está graduada en centésimas de ml.

PIPETAS: Juego de pipetas contrastadas PROTON,

juego de pipetas graduadas WITEG-DIFFICO.

DISOLVENTES: Agua bidestilada, controlando su - posible acidez por valoración con hidróxido sódico y fenolftaleína.

Benceno comercial purificado por - los métodos usuales.

#### 4.2.2.- Preparación de soluciones.-

Solución 0,1 N de NaOH, preparada por pesada y contrastada de la forma usual con ftalato ácido de potasio.

Soluciones de ácidos: Para cada ácido en estudio se prepararon soluciones 0,1; 0,2 y 0,3 N por pesada inicial y después por contraste con solución de NaOH contrastada, cálculo del factor, aunque siempre se logró que el factor fuese prácticamente la unidad.

Debido a la posible alteración de estas soluciones, se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas

Solución de DUA en benceno: En todos los casos se utilizó solución de DUA 0,1 M en benceno. La solución se preparó por pesada de 32,500 g de DUA, introduciéndola en un matraz aforado de 1000 ml, enrasando con benceno.

#### 4.2.3.- Método de extracción.-

Para cada serie de extracciones de una determinada normalidad, se emplean 15 erlenmeyer de 250 ml. En ellos se introducen las soluciones acuosas contrastadas de los ácidos y la solución bencénica de DUA 0,1M. Cada problema, con una relación de equivalentes determinada, se introduce por partida triple, es decir, que introduciendo cinco grupos de tres unidades de extracción iguales. Debidamente cerrado el sistema, se procede a su agitación.

#### 4.2.4.- Método de análisis.-

El contenido de los erlenmeyer descritos en el apartado anterior se introduce en otros 15 embudos de decantación. Se deja en reposo un breve período de tiempo para lograr la separación de fases y la fase acuosa, despreciando un poco al principio y al final de ella, se recoge para el análisis. Se realizarán tres análisis de cada fase acuosa, tomándose la media de los resultados obtenidos. Cada resultado final será la media de nueve análisis.

La valoración llevada a cabo en estas extracciones consiste en una volumetría ácido-base, empleando la solución descrita de fenolftaleína como indicador.

En todos los casos hubo una excelente concordancia entre los valores encontrados para el análisis de cada módulo de extracción, así como entre los módulos de extracción equivalentes, lo que es una prueba de la bondad del método de extracción y método de valoración.

#### 4.2.5.- Expresión de datos y consignación de resultados.-

Ya hemos descrito en la parte experimental las distintas expresiones que hemos tomado como indicadoras del comportamiento de la DUA frente a estos ácidos.

Los valores de  $\underline{S}$ ,  $\underline{D}$ ,  $\underline{b}$ ,  $\underline{(Ac)}$ ,  $\underline{(Ac)}_a$ ,  $\underline{(Ac)}_o$ ,  $\underline{\%E}$ ,  $\underline{(Ac)}\underline{V}_a$ ,  $\underline{(Ac)}_a\underline{V}_a$ ,  $\underline{(Ac)}_o\underline{V}_o$ , para cada uno de los ácidos propuestos los iremos dando en los apartados sucesivos.

#### 4.2.6.- Cálculo del tiempo de agitación y reposo.-

Para determinar el tiempo de agitado necesario para obtener la mayor extracción posible, se ha realizado una experiencia de extracción a tiempo variable con 10 unidades de extracción iguales, formados por 25 ml de solu

ción acuosa de ácido succínico 0,1 N y 50 ml de solución - 0,1 M de DUA en benceno.

UNIDAD DE EXTRACCION	TIEMPO DE AGITACION	TIEMPO DE REPOSO	(Ac) <sub>a</sub>
Nº 1	1 min.	20 h.	0,0263
Nº 2	2 min.	20 h.	0,0249
Nº 3	3 min.	20 h.	0,0249
Nº 4	4 min.	20 h.	0,0248
Nº 5	5 min.	20 h.	0,0249
Nº 6	6 min.	20 h.	0,0250
Nº 7	7 min.	40 h.	0,0248
Nº 8	8 min.	40 h.	0,0249
Nº 9	9 min.	40 h.	0,0249
Nº 10	10 min.	40 h.	0,0248

Se observa que a partir de 2 minutos, la norma - lidad no varía, y además no hay diferencia en los resulta - dos si se mantiene un tiempo de reposo de 20 horas ó si se agurda 40 horas antes de realizar el análisis.

## 4.2.6.- Extracción de ácido cítrico.-

$$(Ac) = 0,1012 \text{ N}$$

$$(DUA) = 0,1 \text{ M}$$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,1012	0,0024	$0,5060 \times 10^{-3}$	$0,0123 \times 10^{-3}$	0,0098	$0,4937 \times 10^{-3}$	4,1	-4,5	97,57
0,2024	0,0028	1,0120 "	0,0280 "	0,0197	0,9840 "	7,0	-4,0	97,24
0,3036	0,0027	1,5180 "	0,0414 "	0,0296	1,4766 "	11,0	-3,5	97,28
0,5060	0,0023	2,5300 "	0,0825 "	0,0489	2,4475 "	14,8	-2,5	96,74
1,0120	0,0051	5,0600 "	0,2550 "	0,0961	4,8050 "	19,0	-0,1	94,97

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE ACIDO CITRICO 0,1 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

(Ac) = 0,1987

(DUA) = 0,1M

b	(Ac) <sub>a</sub>	(Ac)V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>a</sub> V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>a</sub> V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>o</sub>	(Ac) <sub>o</sub> V <sub>o</sub>	D	S	% E
0,1987	0,0042	0,9935x10 <sup>-3</sup>	0,0210x10 <sup>-3</sup>	0,0194	0,9725x10 <sup>-3</sup>	4,6	-4,0	97,89	
0,3974	0,0051	1,9870 "	0,0510 "	0,0387	1,9360 "	7,6	-3,0	97,44	
0,5961	0,0052	2,9805 "	0,0780 "	0,0580	2,9025 "	11,1	-2,1	97,39	
0,9935	0,0072	4,9675 "	0,1800 "	0,0957	4,7875 "	12,9	-0,2	96,38	
1,9870	0,0653	9,9350 "	3,1750 "	0,1352	6,7600 "	2,1	1,7	67,14	

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE CITRICO 0,2 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

$(Ac) = 0,3001 \text{ N}$

$(DUA) = 0,1 \text{ M}$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,3001	0,0034	$1,5005 \times 10^{-3}$	$0,0170 \times 10^{-3}$	0,0296	$1,4835 \times 10^{-3}$	8,85	-3,5	98,88
0,6002	0,0047	3,001 "	0,0470 "	0,0590	2,9541 "	12,60	-2,0	98,44
0,9003	0,0062	4,5015 "	0,0930 "	0,0881	4,4085 "	14,25	-0,6	97,93
1,2004	0,0148	6,0020 "	0,2960 "	0,1141	5,7060 "	7,70	0,7	95,07
1,5005	0,0492	7,5025 "	1,2300 "	0,1254	6,2725 "	2,55	1,27	83,59
1,8006	0,0747	9,0030 "	2,2410 "	0,1352	6,7620 "	1,82	1,76	75,10
3,0010	0,1640	11,0050 "	8,2000 "	0,1301	6,8050 "	0,79	1,80	45,34

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE CITRICO 0,3 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

4.2.7.- Extracción de ácido tartárico.-

(Ac) = 0,1004 N

(DUA) = 0,1 M

b	(Ac) <sub>a</sub>	(Ac)V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>a</sub> V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>o</sub>	(Ac) <sub>o</sub> V <sub>o</sub>	D	S	% E
0,1004	0,0030	0,5020×10 <sup>-3</sup>	0,0150×10 <sup>-3</sup>	0,0097	0,4870×10 <sup>-3</sup>	3,2	-4,51	97,01
0,2008	0,0029	4,0040 "	0,0290 "	0,0195	0,9750 "	6,7	-4,02	97,11
0,3012	0,0026	1,5060 "	0,0390 "	0,0295	1,4670 "	11,4	-3,53	97,41
0,5020	0,0030	2,5100 "	0,0750 "	0,0487	2,4350 "	16,3	-2,56	97,11
1,0040	0,0172	5,0200 "	0,8600 "	0,0986	4,9340 "	5,7	-0,06	82,87

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE TARTARICO 0,1 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

$(Ac) = 0,2015 \text{ N}$

$(DUA) = 0,1 \text{ M}$

b	$(Ac)_a$	$(Ac) V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,2015	0,0029	$1,0075 \times 10^{-3}$	$0,0144 \times 10^{-3}$	0,0198	$0,9931 \times 10^{-3}$	6,8	-4,01	95,58
0,4030	0,0035	2,0150 "	0,0350 "	0,0402	2,0120 "	11,5	-2,99	98,26
0,6045	0,0049	3,0225 "	0,0739 "	0,0589	2,9486 "	12,0	-2,05	97,55
1,0075	0,0295	5,0375 "	0,7375 "	0,0860	4,3000 "	2,9	-0,70	85,36
2,0150	0,1098	10,0750 "	5,4900 "	0,0917	4,5850 "	0,8	-0,41	45,51

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE TARTARICO 0,2 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

$$(Ac) = 0,3012 \text{ N}$$

$$(DUA) = 0,1 \text{ M}$$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,3012	0,0029	$1,5060 \times 10^{-3}$	$0,0149 \times 10^{-3}$	0,0298	$1,4911 \times 10^{-3}$	10,0	-3,51	99,02
0,6024	0,0049	3,0120 "	0,0490 "	0,0592	2,9630 "	12,1	-2,04	98,38
0,9036	0,0221	4,5180 "	0,3315 "	0,0837	4,1865 "	13,8	-0,81	92,67
1,5060	0,1195	7,5300 "	2,9875 "	0,0908	4,5425 "	0,8	-0,45	60,33
3,0120	0,2105	15,0600 "	10,5250 "	0,0907	4,5350 "	0,4	-0,46	30,12

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE TARTARICO 0,3 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO

## 4.2.8.- Extracción de ácido málico.-

$$(Ac) = 0,0999 \text{ N}$$

$$(DUA) = 0,1 \text{ M}$$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,0999	0,0086	$0,4995 \times 10^{-3}$	$0,0430 \times 10^{-3}$	0,0091	$0,4565 \times 10^{-3}$	1,0	-4,54	91,32
0,2997	0,0077	1,4985 "	0,1155 "	0,0276	1,3830 "	3,6	-3,62	92,23
0,4995	0,0084	2,4975 "	0,2100 "	0,0457	2,2875 "	5,4	-2,71	91,52
0,6993	0,0110	3,4965 "	0,3850 "	0,0623	3,1115 "	5,7	-1,89	88,99
0,9990	0,0178	4,9950 "	0,8900 "	0,0821	4,1050 "	4,6	-0,89	82,19

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE MALICO 0,1 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO

$(Ac) = 0,1956 \text{ N}$

$(DUA) = 0,1 \text{ M}$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,1956	0,0157	$0,9780 \times 10^{-3}$	$0,0785 \times 10^{-3}$	0,0179	$0,8995 \times 10^{-3}$	1,1	-4,10	91,98
0,5868	0,0148	2,9340 "	0,2220 "	0,0542	2,7120 "	3,6	-2,29	92,44
0,9780	0,0264	4,8900 "	0,6600 "	0,0846	4,2300 "	3,2	-0,77	86,51
1,3692	0,0475	6,8460 "	1,6625 "	0,1036	5,1835 "	2,1	0,18	75,62
1,9560	0,0812	9,7800 "	4,0600 "	0,1141	5,7200 "	1,4	0,72	58,49

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE MALICO 0,2 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

$$(Ac) = 0,3063 \text{ N}$$

$$(DUA) = 0,1 \text{ M}$$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,3063	0,0125	$1,5315 \times 10^{-3}$	$0,0625 \times 10^{-3}$	0,0294	$1,4690 \times 10^{-3}$	2,3	-3,53	95,92
0,9189	0,0232	4,5945 "	0,3480 "	0,0859	4,2965 "	3,7	-0,70	92,43
1,5315	0,0636	7,6575 "	1,5900 "	0,1213	6,0675 "	1,9	1,07	79,57
2,1441	0,1122	10,7205 "	3,9270 "	0,1358	6,7925 "	1,2	1,80	63,37
3,0630	0,1618	15,3150 "	8,0900 "	0,1441	7,2250 "	0,8	2,22	47,18

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE MALICO 0,3 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENGENO.

4.2.8.- Extracción de ácido succínico

$(Ac) = 0,0962 \text{ N}$

$(DUA) = 0,1 \text{ M}$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,0962	0,0131	$0,4808 \times 10^{-3}$	$0,0656 \times 10^{-3}$	0,0083	$0,4152 \times 10^{-3}$	0,6	-4,60	86,36
0,2880	0,0207	1,4425 "	0,3105 "	0,0226	1,1320 "	1,1	-3,80	78,48
0,4808	0,0249	2,4042 "	0,6232 "	0,0356	1,7810 "	1,4	-3,20	74,12
0,6732	0,0320	3,3659 "	1,1196 "	0,0449	2,2462 "	1,4	-2,75	66,75
0,9617	0,0392	4,8085 "	1,8610 "	0,0589	2,9475 "	1,5	-2,05	59,22
0,1923	0,0167	0,9617 "	0,1670 "	0,0156	0,7947 "	0,9	-4,2	82,64

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE SUCCINICO 0,1 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO

$$(Ac) = 0,1962 N$$

$$(DUA) = 0,1 M$$

b	$(Ac)_a$	$(Ac)V_a$	$(Ac)_a V_a$	$(Ac)_o$	$(Ac)_o V_o$	D	S	% E
0,1962	0,0323	$0,9810 \times 10^{-3}$	$0,1645 \times 10^{-3}$	0,0163	$0,8165 \times 10^{-3}$	0,5	-4,20	83,55
0,5886	0,0446	2,9430 "	0,6690 "	0,0454	2,2730 "	1,0	-2,72	77,27
0,9810	0,0578	4,9050 "	1,4450 "	0,0692	3,4600 "	1,2	-1,54	70,54
1,3734	0,0729	6,8670 "	2,5515 "	0,0863	4,3155 "	1,1	-0,68	62,85
1,9620	0,0959	9,8100 "	4,7935 "	0,1000	5,0135 "	1,0	0,01	51,19

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE SUCCINICO 0,2 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENCENO.

(Ac) = 0,3014 N

(DUA) = 0,1 M

b	(Ac) <sub>a</sub>	(Ac)V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>a</sub> V <sub>a</sub>	(Ac) <sub>o</sub>	(Ac) <sub>o</sub> V <sub>o</sub>	D	S	% E
0,3014	0,0326	1,5070×10 <sup>-3</sup>	0,1630×10 <sup>-3</sup>	0,0269	1,3440×10 <sup>-3</sup>	0,8	-3,65	89,19
0,9042	0,0526	4,5210 "	0,7890 "	0,0746	3,7320 "	1,4	-1,26	82,55
1,5070	0,0866	7,5350 "	2,1650 "	0,1074	5,3700 "	1,2	0,37	71,27
2,1098	0,1224	10,5490 "	4,2840 "	0,1253	6,2650 "	1,0	1,26	59,39
3,0140	0,1635	15,0700 "	8,1750 "	0,1379	6,8950 "	0,8	1,90	45,76

TIEMPO DE AGITACION 5 MINUTOS

TIEMPO DE REPOSO 24 HORAS

EXTRACCION DE SUCCINICO 0,3 N CON SOLUCIONES DE DUA 0,1 M EN BENZENO.

## 4.3.- Reextracción y recuperación de los ácidos extraídos.-

Se ha realizado la reextracción y recuperación de ácido cítrico y ácido tartárico unido a DUA en solución bencénica, para lo cual se trató la referida solución con ClH acuoso 1 N. No se trata de ver el desplazamiento gradual que un ácido orgánico pueda sufrir por parte del ClH, sino de comprobar el desplazamiento total del ácido orgánico debido a un gran exceso de ácido clorhídrico. Hemos empleado cinco veces más equivalentes de ClH que de solución bencénica de DUA que contiene el ácido orgánico.

Para ver el rendimiento de la operación, debemos saber la cantidad exacta de ácido que hay en fase bencénica, para lo cual podemos utilizar fases bencénicas procedentes de las anteriores experiencias de extracción.

Como se indica en las siguientes tablas de valores, se tomaron 40 ml de los 50 originales, y con ellos se realizó la experiencia.

Los métodos de análisis seguidos en esta ocasión no consisten en volumetrías de neutralización, pues hay mezcla del ácido carboxílico y ácido clorhídrico, por lo que se recurre a métodos más específicos.

Reextracción de ácido cítrico:

Solución bencénica procedente de la unidad de extracción  $b = 0,9003$  ;  $(Ac) = 0,3$  N

$V_o$	$(Ac)_o V_o$	mgs cítrico	$V_a$	(ClH)	$(ClH)V_a$
40 ml	$3,5268 \times 10^{-3}$	225,85	20 ml	1 N	$20 \times 10^{-3}$

Tiempo de agitación 5 minutos.

Procedimiento de análisis: A 5 ml de solución de ácido cítrico o la parte alícuota que contenga 1-15 mg de ácido cítrico, se añaden 4ml de ClH 1:110. Se agrega 1 ml de solución acuosa de cloruro férrico al 6,2% recién preparada. Todo ello se ha de enrasar a 10 ml.

Lectura a 445 m frente a un blanco.

Aparato utilizado: Spectronic 20.

Construcción de la recta patrón:

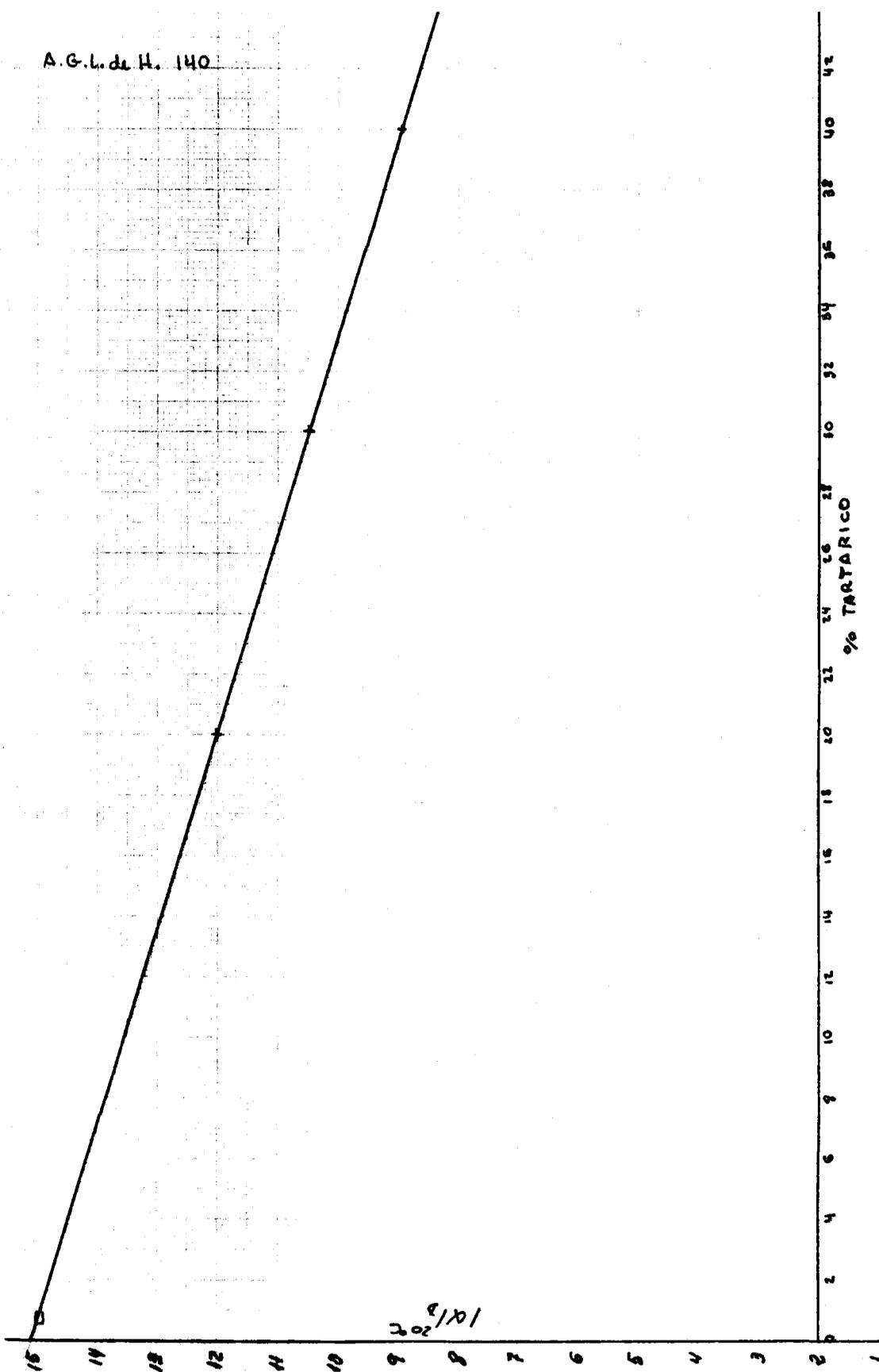
SOLUCION	CONCENTRACION	ABSORVANCIA	% TRANSMIT.
I	19,212 mgs/ml	0,66	22
II	9,606 "	0,45	35,5
III	4,803 "	0,25	60
IV	2,401 "	0,13	76
V	1,200 "	0,08	83,5

Solución acuosa de la reextracción:

Absorbancia	mgs/ml	mgs totales	%Reextr.
0,525	11,20	224,0	99,1

Como podemos apreciar, la reextracción es cuantitativa, pues el 0,9% que resta está dentro del error experimental.

A.G.L. de H. 140



## Reextracción de ácido tartárico:

Se ha realizado con la unidad de extracción  
 $b = 0,9036$ ;  $(Ac) = 0,3 N$

$V_o$	$(Ac)_o V_o$	mgs tartár.	$V_a$	$(ClH)$	$(ClH)V_a$
40 ml	$3,3492 \times 10^{-3}$	251,19	20 ml	1 N	$20 \times 10^{-3}$

Tiempo de agitación: 5 minutos.

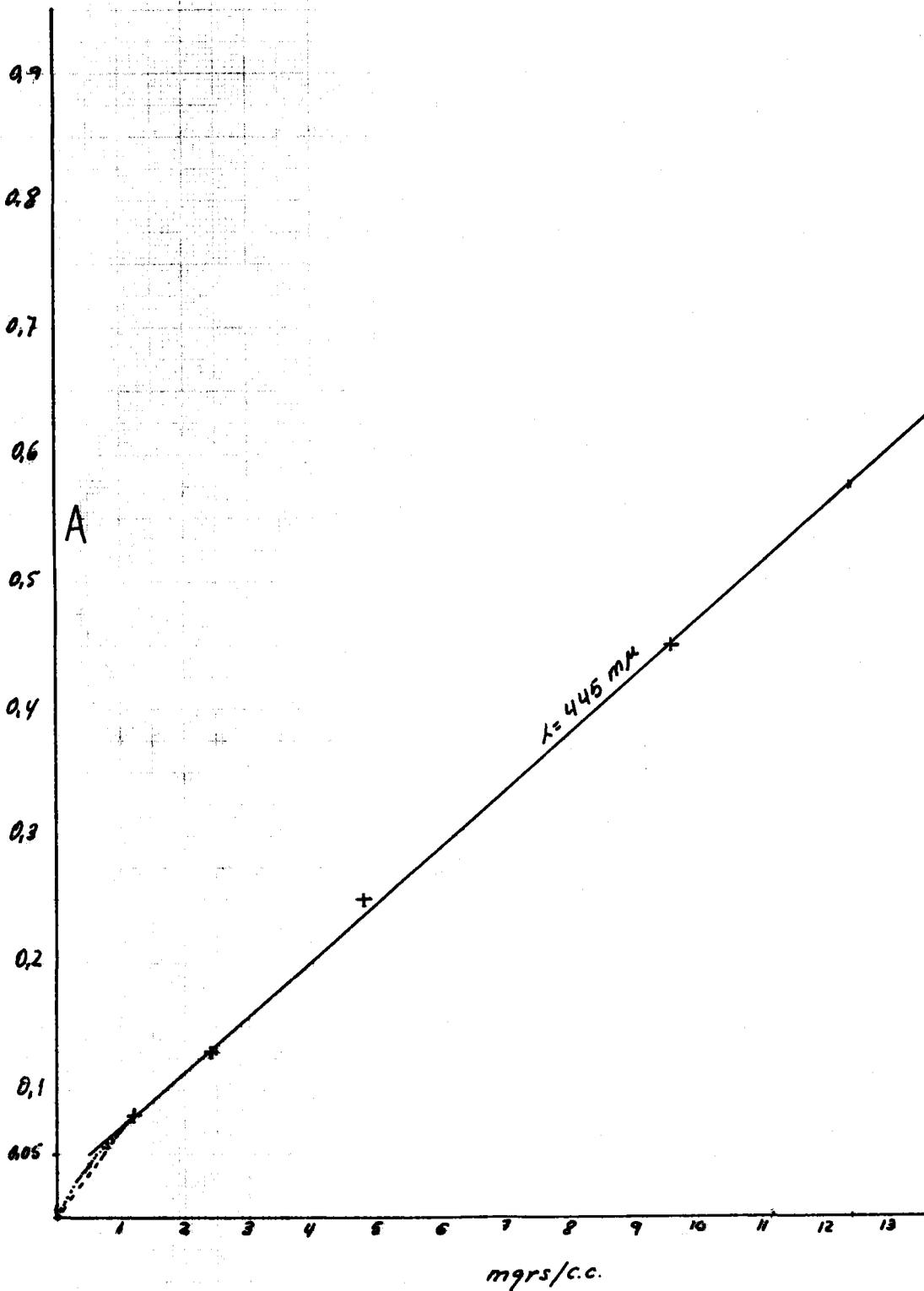
Procedimiento de análisis: Se utiliza el método polarimétrico. En la gráfica de la página siguiente se puede apreciar la variación del poder rotatorio específico del ácido tartárico con la concentración. Para la gama de concentraciones manejadas, el poder rotatorio específico medido a 20°C y en la raya D del sodio, se tomará como igual a 14,9

## Solución acuosa de la reextracción:

Desviación polarimétrica	mgs reextraídos	% reextraído
0,176°	249,43	99,3

Puede apreciarse que la reextracción es también en este caso prácticamente cuantitativa.

Las soluciones acuosas procedentes de la reextracción se llevan a sequedad en rotavapor a presión reducida cristalizando inmediatamente los ácidos reextraídos, aunque poseen un intervalo de fusión demasiado elevado. Se puede conseguir una pureza completa si se procede a lavar con benceno la solución acuosa concentrada. También es conveniente añadir varias veces agua destilada y evaporar a continuación, con el fin de arrastrar el ClH remanente. De esta manera conseguimos ácidos con un punto de fusión totalmente coincidente con los ácidos originales.



#### 4.4.- Extracción de los ácidos del zumo de limón.-

##### 4.4.1.- Obtención, purificación y análisis del zumo.-

El zumo de limón objeto de nuestro estudio se obtuvo de 5Kg de limones adquiridos durante el mes de Mayo, sanos pero sin ningún tipo de selección especial.

Los limones se partieron en dos mitades y se procedió a exprimir sólo la pulpa de los mismos.

El zumo obtenido se centrifugó y filtró, tomando se 100 ml para su análisis y 1000 ml para el proceso de extracción.

Análisis del zumo: Efectuado por el método WA—RHINGTON, empleado normalmente en la industria. Consiste en precipitar el citrato tricálcico en solución acuosa hirviendo, lavar con agua hirviendo, reunir todo el precipitado obtenido (original y procedente de las aguas de lavado), calcinarlo, agregar un exceso conocido de ácido sulfúrico y valorar por retroceso con NaOH. Este método de análisis tiene siempre el defecto de dar un error por defecto, pues siempre hay pérdidas de citrato en las aguas de lavado. Se admite como correcto el hacer una sola recuperación, es decir, recuperar el citrato sólo de las primeras aguas de lavado.

Resultado obtenido: 34,6 g/litro de ácido cítrico habiéndose realizado el análisis con 75ml de zumo diluido, es decir del zumo obtenido de 100 ml del original enrasando a 1000 ml, el sulfúrico utilizado es 0,1027 N, el hidróxido sódico 0,0964 N, teniendo en cuenta que este resultado se refiere a cítrico monohidratado (p.m. 210,14)

Cítrico puro contenido en la muestra

31,7 g/l

#### 4.4.2.- Extracción con DUA.-

##### 4.4.2.1.- Tratamiento con soluciones bencénicas de DUA.-

Partimos de 1000 ml de zumo filtrado y centrifugado. Este zumo se trató con 500 ml de benceno para eliminar materias grasas, pero se formó una emulsión tan estable que se optó por tratar esta emulsión con la solución bencénica de DUA.

Se ha tratado inicialmente con 500 ml de solución 0,1 M de DUA en benceno, procediendo a centrifugar el precipitado resultante, así como las dos fases, acuosa y bencénica. La fase acuosa se trató con nuevas cantidades de solución 0,1 M de DUA en benceno, hasta completar un total de 4.930 ml de la misma. La solución bencénica empleada contiene pues un total de 0,5 equivalentes de DUA, cantidad prácticamente igual a los equivalentes de ácido cítrico presentes inicialmente en solución acuosa.

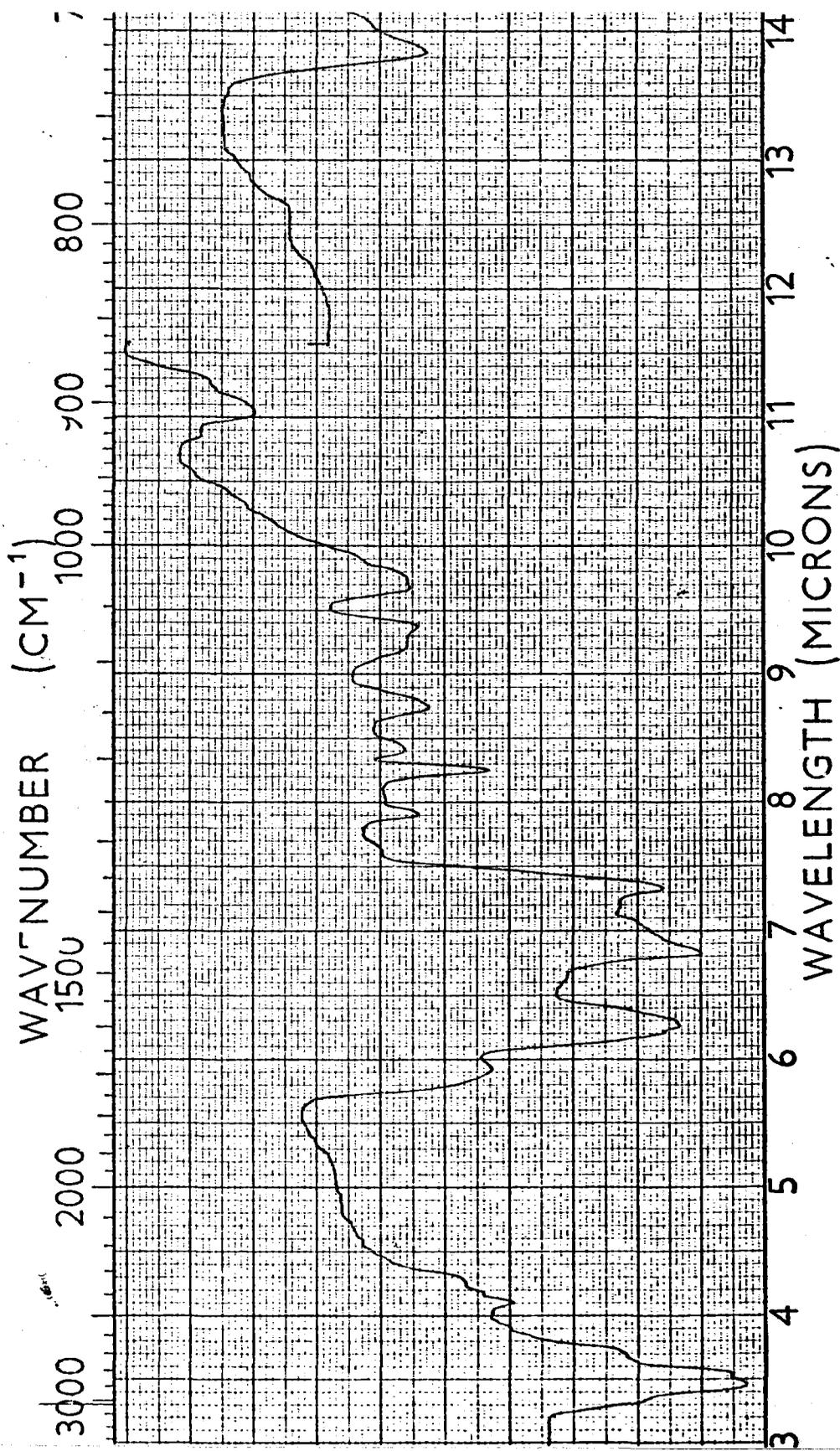
Es preciso recordar que para  $b=1$ , el % de ácido extraído sobrepasa el 95% en las pruebas de extracción anteriormente realizadas, teniendo además presente que  $(Ac)=0,5 N$ , lo que debe influir favorablemente en el rendimiento de la operación de extracción

##### 4.4.2.2.- Separación de fases y tratamiento de la interfase.

Para separar ambas fases se hubo de recurrir a repetidos procesos de centrifugación, pues la interfase formada impedía la buena marcha de la operación.

El residuo sólido procedente de la interfase ha sido extraído con una mezcla de acetona y alcohol etílico, cristalizando un sólido que se recrystalizó en acetona.

Punto de fusión 98-99°C. Espectro IR N° 491. Parece contener una pequeña cantidad de nitrógeno, aunque no se aprecia bien, no contiene halógeno ni presenta insaturación frente al bromo. No ha sido identificado.



ESPECTRO 491 SOLIDO BrK

#### 4.5.- Reextracción del ácido cítrico. Purificación de las fases.-

Para la reextracción del ácido cítrico contenido en la fase orgánica se ha utilizado un gran exceso de ClH, con el objeto de asegurar una total reextracción.

Cantidad empleada: 3.000 ml de ClH 2 N.

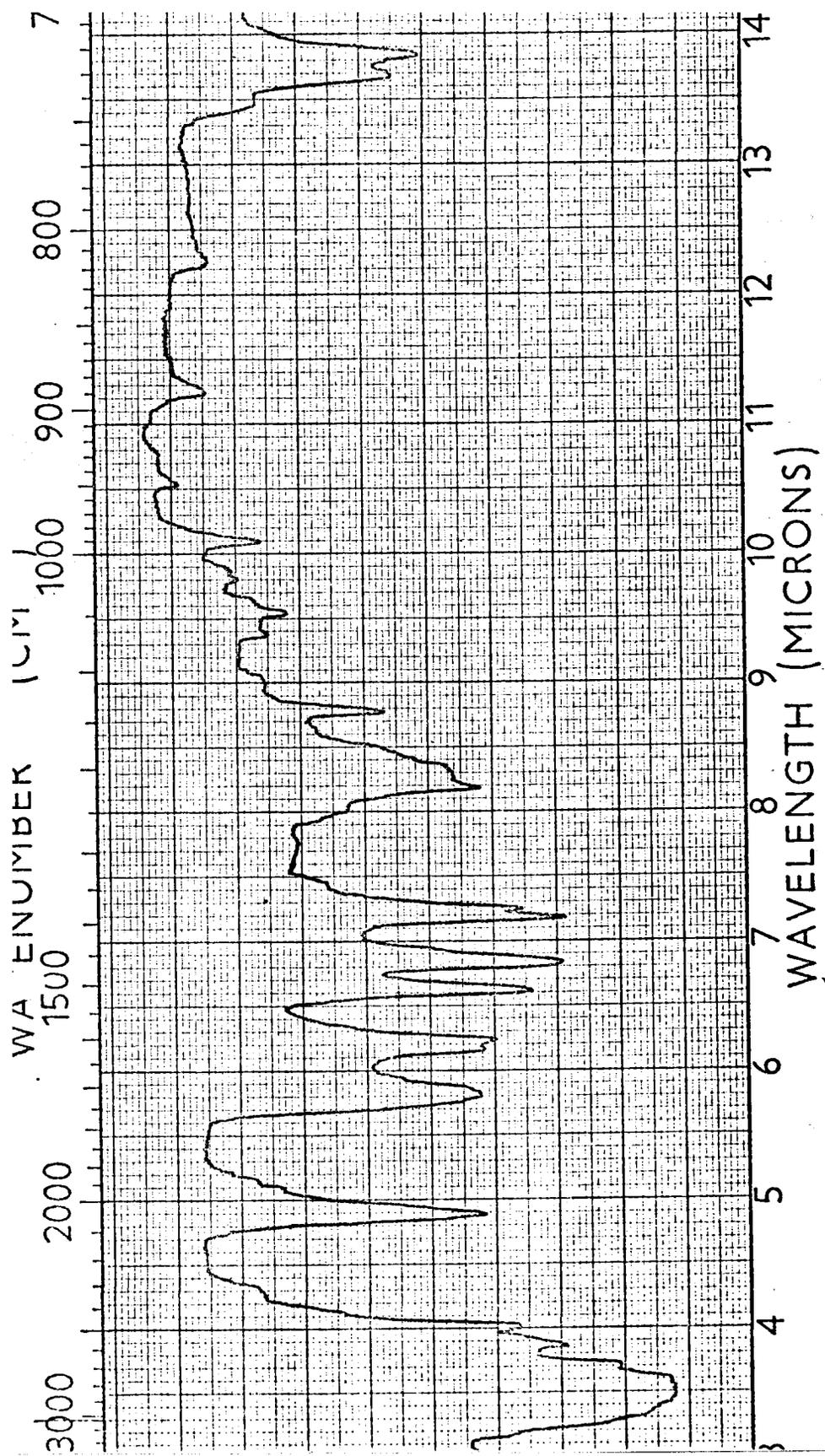
Después de separadas ambas fases se ha procedido a lavar repetidas veces con agua la fase bencénica, añadiendo las aguas de lavado a la solución acuosa procedente de la reextracción.

La solución acuosa total se ha concentrado a 50° en evaporador rotatorio bajo presión reducida. Una vez alcanzada una consistencia siruposa, se ha procedido a añadir agua, evaporando a continuación, con el objeto de eliminar la mayor cantidad posible de ClH. Se repitió este paso varias veces.

Cuando se concentró finalmente a 200 ml, la solución acuosa presentaba una fuerte coloración roja, por lo que se intentó purificar por lavados con benceno. El color rojo de la solución acuosa fue disminuyendo, dejando de lavar con benceno cuando se comprobó que el benceno de los lavados no dejaba residuo sólido.

La solución bencénica obtenida presentaba un fuerte color rojo. Se evaporó el benceno a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en acetona hirviente. Precipitó en frío un compuesto semicristalino, de color blanco sucio y de punto de fusión extremadamente bajo. Se tomó una muestra y se disolvió en éter de petróleo (50-70°) hirviente, cristalizando unas masas de punto de fusión 73-74°C. Recristalizaciones sucesivas hicieron aumentar su punto de fusión hasta 80-82°C. Contiene indicios de nitrógeno, presencia de halógenos de tipo iónico, y parece corresponder a clorhidrato de DUA. Su espectro IR es el 500.

La solución acuosa de la reextracción, en donde está contenido el ácido cítrico, se evaporó a sequedad en



ESPECTRO SOLIDO EN BrK

500

ESPECTRO

evaporador rotatorio, obteniéndose un sólido cristalizado y verdoso.

Cantidad obtenida 40,60 g

Punto de fusión 145-148°C

#### 4.6.- Purificación del cítrico obtenido. Análisis.-

Una muestra del ácido cítrico obtenido se ha disuelto en agua y se ha decolorado con carbón activo, obteniéndose un ácido cítrico casi blanco, de punto de fusión 150-151°C. Se ha procedido al análisis del ácido cítrico - purificado de esta manera, utilizando el método fotocolorimétrico descrito cuando se hizo el estudio cuantitativo de la extracción de cítrico puro.

Se ha tomado una muestra de 1,921 g y disuelto en agua destilada, enrasando a 100 ml en matraz aforado. La solución de tricloruro férrico se preparó en este momento. El aparato Spectronic 20 se deja estabilizar durante media hora, efectuándose tres medidas:

1ª medida  $A = 0,68$

2ª "  $A = 0,65$        $A_{media} = 0,67$

3ª "  $A = 0,68$

% de cítrico en la muestra 75,22

En la operación de decoloración se ha comprobado que se pierde el 18,5% del ácido cítrico.

El rendimiento neto de la operación es del 78,5%

Se han realizado cromatografías en papel de los

productos obtenidos siguiendo la técnica descrita por ISHERWOOD y HANES (100), con su líquido de desarrollo N° 4 - tiempos de desarrollo de 6, 14, 22 y 24 horas, visualizando los ácidos sobre el papel mediante solución al 0,1% de púrpura de bromocresol en etanol, neutralizado exactamente con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , y exponiendo posteriormente el papel a vapores de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado. Los ácidos aparecen como manchas amarillas sobre fondo azul. Estas cromatografías denotan la presencia de ácido cítrico, acompañado por otras manchas que también poseen carácter ácido. A pesar de utilizar diversos ácidos patrón, es muy arriesgado el intentar identificar ninguno de ellos.

#### 4.7.- Extracción de los ácidos del zumo de uva.-

##### 4.7.1.- Obtención del zumo.-

El zumo que se va a procesar procede de 1,7 Kg - de uva blanca. El mosto se obtuvo aplastando la uva en un mortero, separando el mosto por filtrado a vacío y poste - rior compresión para sacar todo el zumo posible.

##### 4.7.2.- Purificación del zumo. Análisis,-

El mosto obtenido como se indica en el apartado anterior se filtró prime o por una tela, y posteriormente se filtró en placas de vidrio poroso de tamiz progresivo. No se consigue un mosto totalmente transparente. Obtenemos finalmente 980 ml.

Para el análisis de los tartratos contenidos en este zumo recurrimos al método rápido de PASTEUR(147). Se ha tomado 20 ml de mosto, evaporando en baño-maría hasta - consistencia siru posa. Añadir 3 ml de disolución tampón de acetato potásico(pH= 3,5). Mezclar bien con una varilla y llevar la cápsula tapada al frigorífico a 5°C, manteniendola allí durante 48 horas. Se filtra por por filtro de - cristal poroso con capa de amianto dislacerado. Los cristales que quedan en el filtro se lavan cuatro veces con al - cohol del 50, previamente saturado de tartrato ácido de po - tasio, y una vez con mezcla a partes iguales de alcohol y éter. Se disuelven en agua hirviendo los cristales de bi - tartrato formados y después se valora con NaOH 0,1 N y fenolftaleina como indicador.

Hemos realizado cuatro veces el análisis de mos - to por este procedimiento, obteniéndose los valores medios que se detallan a continuación:

ml de zumo de uva empleado:	20 ml
" " NaOH 0,0988 N	6,1 ml
g de tartárico(en ácido libre) contenidos en 800 ml de zumo	3,6 g

#### 4.7.3.- Extracción con DUA.-

##### 4.7.3.1.- Tratamiento con solución bencénica de DUA.-

Para esta extracción se ha utilizado solución — 0,1 M de DUA en benceno.

Se ha hecho un cálculo previo de la cantidad de disolución de DUA a utilizar para que la extracción se realice con buen rendimiento. Para ello se ha calculado la acidez libre total del zumo empleado por valoración de una muestra con solución decinormal de NaOH, empleando fenolf-taleína como indicador. Se ha encontrado que 800 ml del zumo contienen 0,0596 equivalentes de ácido, por lo que se empleará una cantidad de solución 0,1 N de DUA en benceno que contenga un total de 0,2 equivalentes, manteniendo con ello una proporción b que no asegure una buena extracción de sustancias ácidas. La extracción se ha realizado en dos etapas, tratando en cada una de ellas con 0,1 mol de DUA.

##### 4.7.3.2.- Separación de fases. Purificación.

Durante la extracción aparece una gran cantidad de interfase que es preciso separar por filtración, lavando con agua y benceno sucesivamente y uniendo los líquidos de lavado a sus respectivas fases aunque queda un resto inso-

luble en ambos solventes.

Cada una de las fases se lavó repetidas veces con el solvente contrario.

#### 4.8.- Reextracción. Purificación de las fases.

La reextracción se ha efectuado mediante solución de ácido clorhídrico, empleándose para ello 1l de solución 1N. La reextracción se efectuó por sucesivos tratamientos con dos porciones de 500 ml del citado ClH. Después de realizada la decantación se procedió a lavar cada fase con el solvente contrario, reuniéndose todas la soluciones similares.

La solución acuosa se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida, y una vez alcanzada una consistencia siruposa se volvió a lavar con una nueva cantidad de benceno hasta que este no dejase residuo. Se siguió evaporando la solución acuosa hasta que apareció una masa cristalina de color marrón, que se mantuvo 15 horas en desecador a vacío sobre pentóxido de fósforo.

Tartárico sucio obtenido            3,51 g

Se ha procedido a decolorar el ácido tartárico - obtenido hirviendo una muestra pesada con carbón activo, - encontrando que se se obtiene una pérdida por decoloración del 8,9%.

Punto de fusión del tartárico decolorado, previamente desecado en las condiciones antes descritas  
140 - 143°C.

El tartárico decolorado ha sido recrystalizado y secado en pistola de secado a 1 mm de Hg y temperatura la del punto de ebullición de la acetona, consiguiendo obtenerse un punto de fusión de 147-151°C. No se consigue eliminar el color marrón claro que posee.

Se tomó una muestra pesada de tartárico de p.f. 147-151°C se disolvió en agua destilada y se introdujo en un matraz de boca esmerilada, tapándose perfectamente.

Al cabo de 48 horas aparecieron unas colonias en el fondo del matraz. Se filtró la solución y evaporó el agua en evaporador rotatorio a presión reducida, cristalizando el ácido tartárico en el mismo matraz durante la evaporación. Se recogieron los cristales y se secaron en la pistola de secado en las condiciones antes expuestas, consiguiéndose un punto de fusión de 154-156°C.

Obtenemos 3,14 g de ácido tartárico de esta pureza.

#### 4.9.- Intercambio iónico.-

Teniendo en cuenta que parte de ácido tartárico encontrado durante el análisis del zumo de uva puede encontrarse en forma de bitartrato ó tartrato, se ha procedido a efectuar un cambio iónico de las sales de los ácidos presentes en el zumo con solución bencénica de clorhidrato de DUA.

El zumo libre de ácidos se ha tratado con 2 l de solución 0,1 N de clorhidrato de DUA, obtenida por tratamiento de 2 l de solución bencénica de DUA 0,1 N con un gran exceso de ClH, y posteriores lavados con agua de la solución bencénica.

Una vez agitadas ambas fases, dejadas en reposo y decantadas, se procedió a lavar la fase bencénica con agua, tratándola después con 1 l de ClH 1N, con objeto de desplazar los ácidos que allí estuviesen contenidos.

La fase acuosa se concentró a vacío en evaporador rotatorio, apareciendo gran cantidad de espuma blanca, se lavó con agua, que se evaporó a continuación, al objeto de eliminar la mayor cantidad de ClH posible y se obtuvo una solución muy oscura. Aunque se lavó repetidamente con benceno, persistió la fuerte coloración.

Se ha intentado por dos veces consecutivas la coloración con carbón activo, que si bien ha logrado una

pequeña mejora, el sirupo obtenido sigue presentando un color marrón oscuro.

Por desecación durante 100 horas a vacío en pistola de secado se consigue una masa semicristalina que ha dado un peso de 1,72 g.

#### 4.10.- Análisis de los productos aislados de la uva.-

Análisis del ácido tartárico de p.f. 154-156°C :

Ha consistido en el método PASTEUR ya descrito, encontrando que el ácido tartárico puro constituye el 63% de la muestra purificada.

Mediante los cálculos pertinentes podemos encontrar que hemos obtenido puro una cantidad de ácido tartárico libre igual a 2 g, lo que nos da un rendimiento con respecto al encontrado por análisis previo del zumo del 55,5%

Análisis procedente del cambio iónico:

Empleando el método PASTEUR se puede encontrar que el ácido tartárico constituye el 21,5% de la masa semicristalina, por lo que en conjunto el rendimiento total de la operación de extracción de ácido tartárico procedente del zumo de uva mediante extracción del ácido libre y cambio iónico del combinado es del 65,4%.

#### 4.11.- Cromatografía en papel y capa fina de los productos aislados del zumo de uva.-

Se han hecho cromatografías en papel y capa fina de los productos aislados de la uva, bien por DUA libre ó

por clorhidrato de DUA.

Las cromatografías en papel se realizaron en las siguientes condiciones:

Papel Whatman Nº1, lavado con solvente.

Temperatura 22°C

Cámara saturada de vapor

Cromatografía descendente

Líquido de desarrollo: Nº4 de I. y H. (100)

Visualizador: Nitrato de plata amoniacal(1:1)  
(Nitrato de plata 0,1N, NH<sub>4</sub>OH 5N)

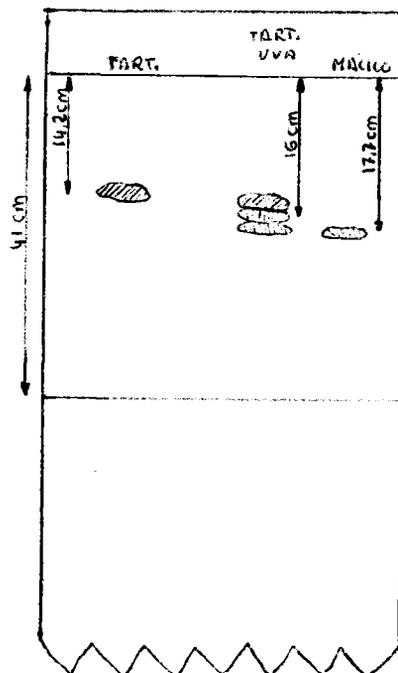
Seleccionamos las siguientes, representativas de todas las realizadas por este procedimiento:

Cromatografía en papel Nº1:

Tiempo de revelado: 15 horas

recorrido del frente: 41 cm

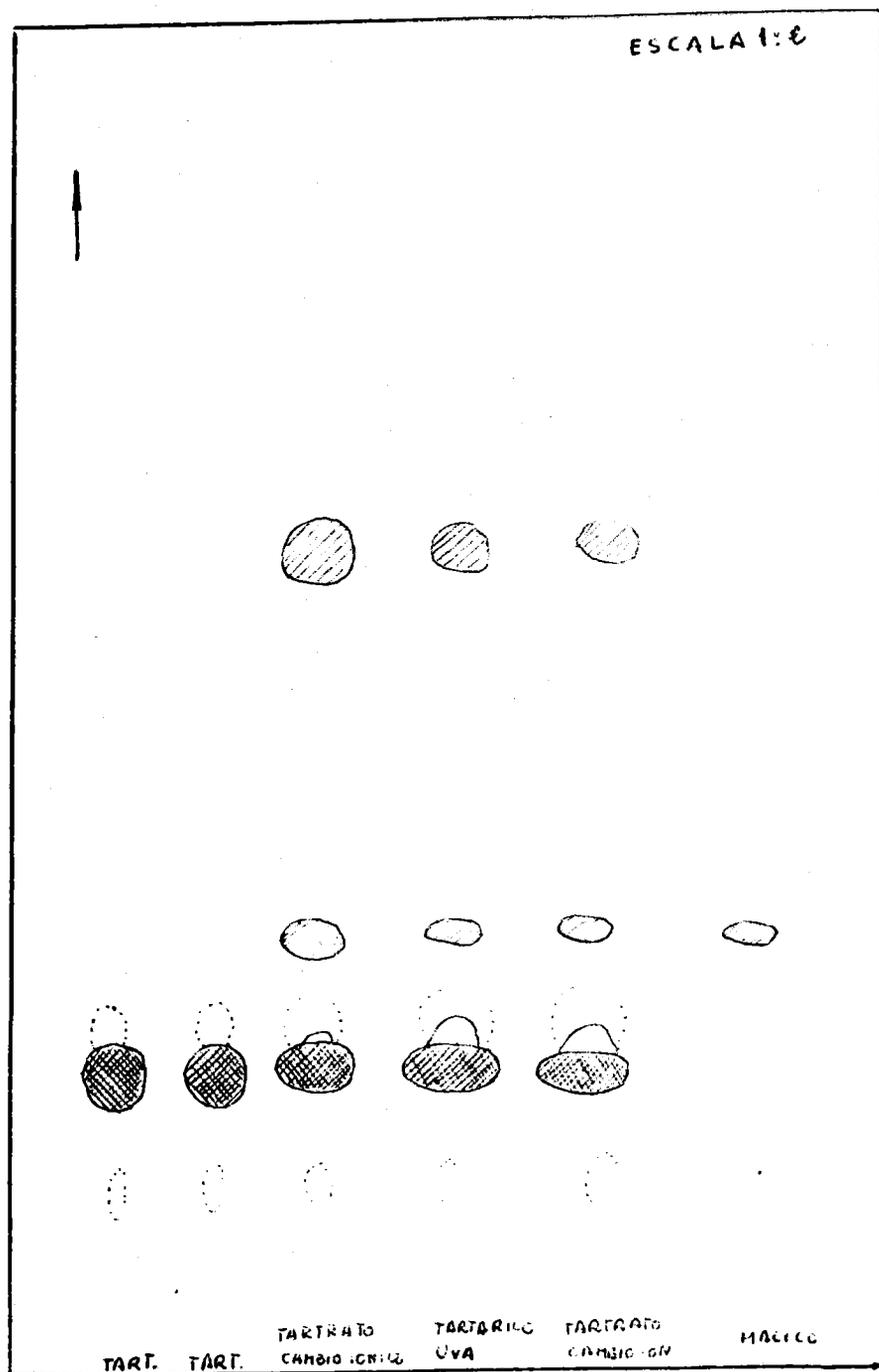
Representación gráfica:



Cromatografía en papel Nº2:

Recorrido del frente 37 cm

Representación gráfica:



Cromatografías en capa fina:

Material y condiciones experimentales:

Gel de sílice Merck según Stahl para capa fina.

Espesor de capa: 0,25 mm

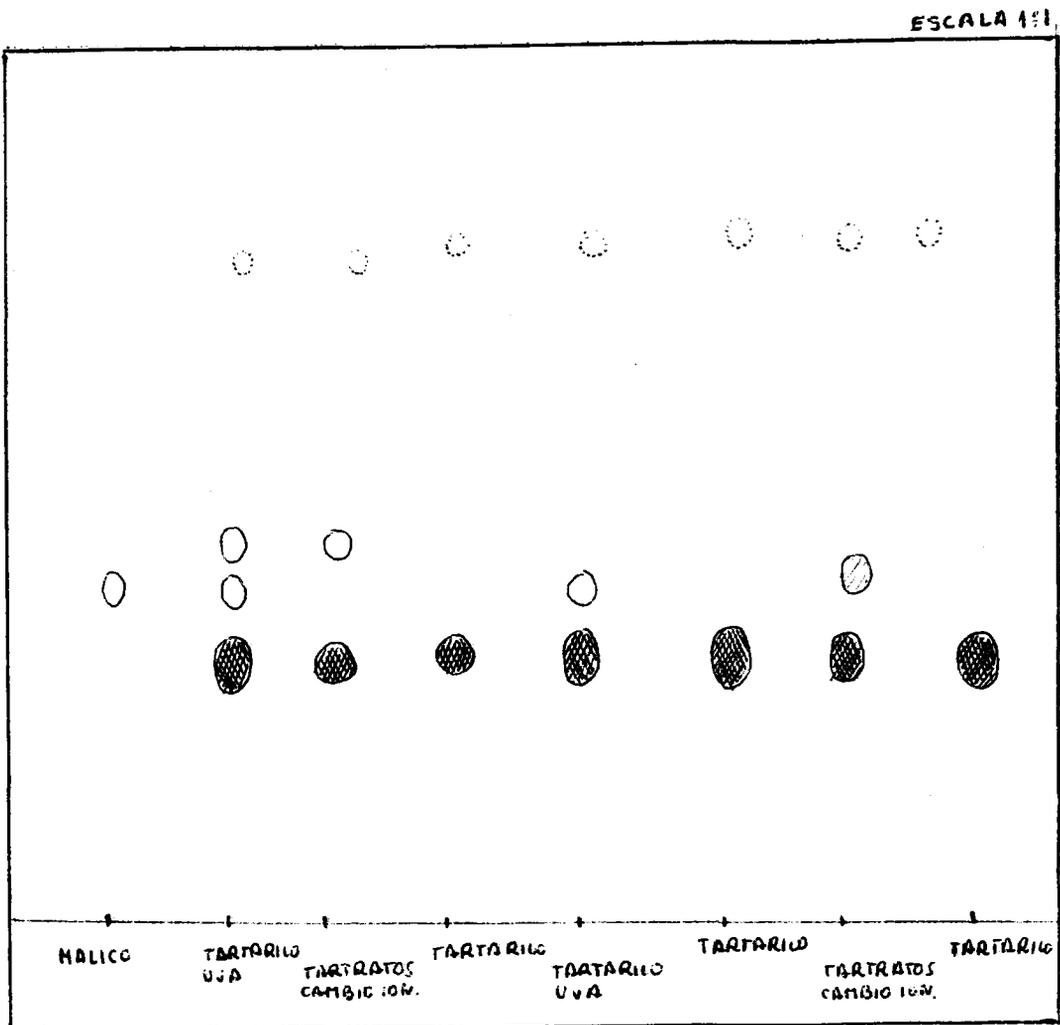
Temperatura: 22°C.

Cámara saturada de vapor.

Líquido de desarrollo: El indicado en las cromatografías en papel.

Visualizador: El indicado en las cromatografías en papel.

Representación gráfica:



#### 4.12.- Extracción de los ácidos contenidos en el alpechín.-

##### 4.12.1.- Origen del alpechín utilizado.-

El alpechín utilizado en nuestras experiencias - procede de la Cooperativa Santa Teresa de Osuna(Sevilla).

La muestra de alpechín se recogió a la salida de los decantadores, antes de ser centrifugado, con el objeto de conseguir un alpechín lo menos contaminado posible, garantía de evitar toda contaminación inmediata.

Fecha de recogida: Principio de campaña del año 1970.

pH del alpechín: 5,25 unidades.

Cantidad inicial de alpechín tomado: 20 litros.

##### 4.12.2.- Purificación del alpechín.-

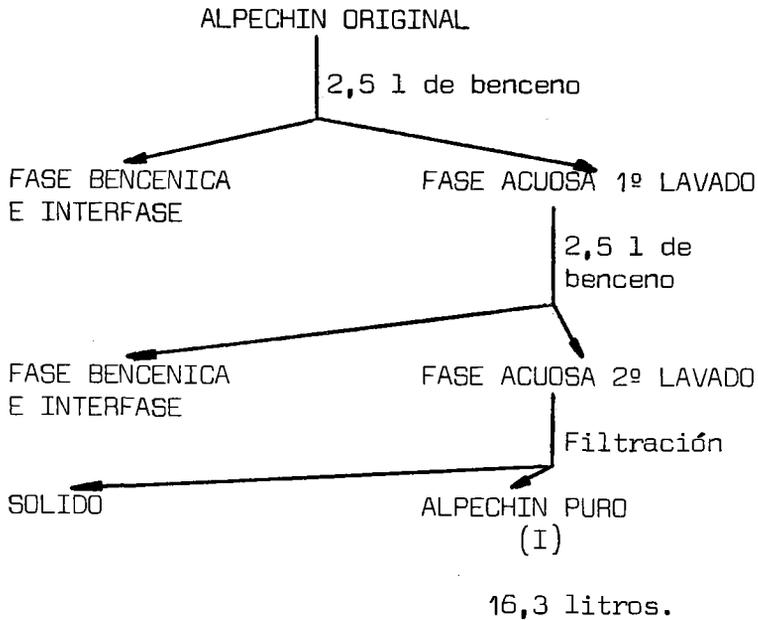
Ante la gran cantidad de materia sólida y grasa que llevaba el alpechín en suspensión, se procedió, a pié de fábrica, a una purificación consistente en someterlo a un proceso de filtración y un lavado con benceno.

Se comenzó con un intento de filtrar el alpechín por filtro de pliegues de porosidad normal, pero se desistió ante la poca velocidad de filtración(60 ml/hora).

Antes de filtrar se lavó con benceno(5 litros - del mismo) por dos veces consecutivas. Aparecieron enormes precipitados que se desecharon junto con la solución bencénica. Después, se filtró la fase acuosa por filtro de plieg

gues de papel más poroso, concretamente del conocido como "papel jarabes".

Del alpechín lavado y filtrado se tomaron 16,3 l.



Es preciso hacer notar que en todas las operaciones de purificación sólo se invirtieron unas pocas horas, no apreciándose síntoma alguno de fermentación.

#### 4.12.3.- Extracción con DUA.-

##### 4.12.3.1.- Tratamiento con solución bencénica de DUA.-

Una vez finalizada la purificación, se trató el alpechín con 0,5 moles de DUA disuelta en un litro de benceno. Se agitó fuertemente para asegurar una íntima mezcla de las dos fases y a continuación se procedió a su transporte durante la noche del mismo día en que se inició la operación de purificación. En el Laboratorio se agregó de nuevo 0,5 moles de DUA y cuatro litros de benceno, agitando enérgicamente durante 15 minutos. Terminado el periodo de agitación se dejó reposar para lograr la separación de las fases.

Durante esta operación ha vuelto a aparecer un precipitado muy viscoso que se localiza en la interfase.

##### 4.12.3.2.- Separación de las fases.-

Debido al precipitado presente en la interfase, se tomaron precauciones para lograr una perfecta separación clave de la pureza de los productos que se pretenden aislar

Se comenzó por una filtración por pliegues de papel jarabes. Para dar cuenta de la dificultad de la filtración bastará indicar que, a pesar del frecuente cambio de filtro, se necesitó un total de 60 horas para llevar a cabo este paso.

El filtrado consistía en una emulsión grosera de las dos fases, no apreciándose en ningún momento síntomas de fermentación.

La disolución, ya libre de materia sólida, se pudo separar en una batería de embudos de decantación de 2 l de capacidad cada uno. Obtenemos así la fase acuosa(II) y -

la fase bencénica(III).

#### 4.12.3.3.- Tratamiento de la interfase.-

Los papeles de filtro que quedaron impregnados por una sustancia casi negra se trataron con objeto de evitar toda pérdida de ácidos objeto de nuestro estudio.

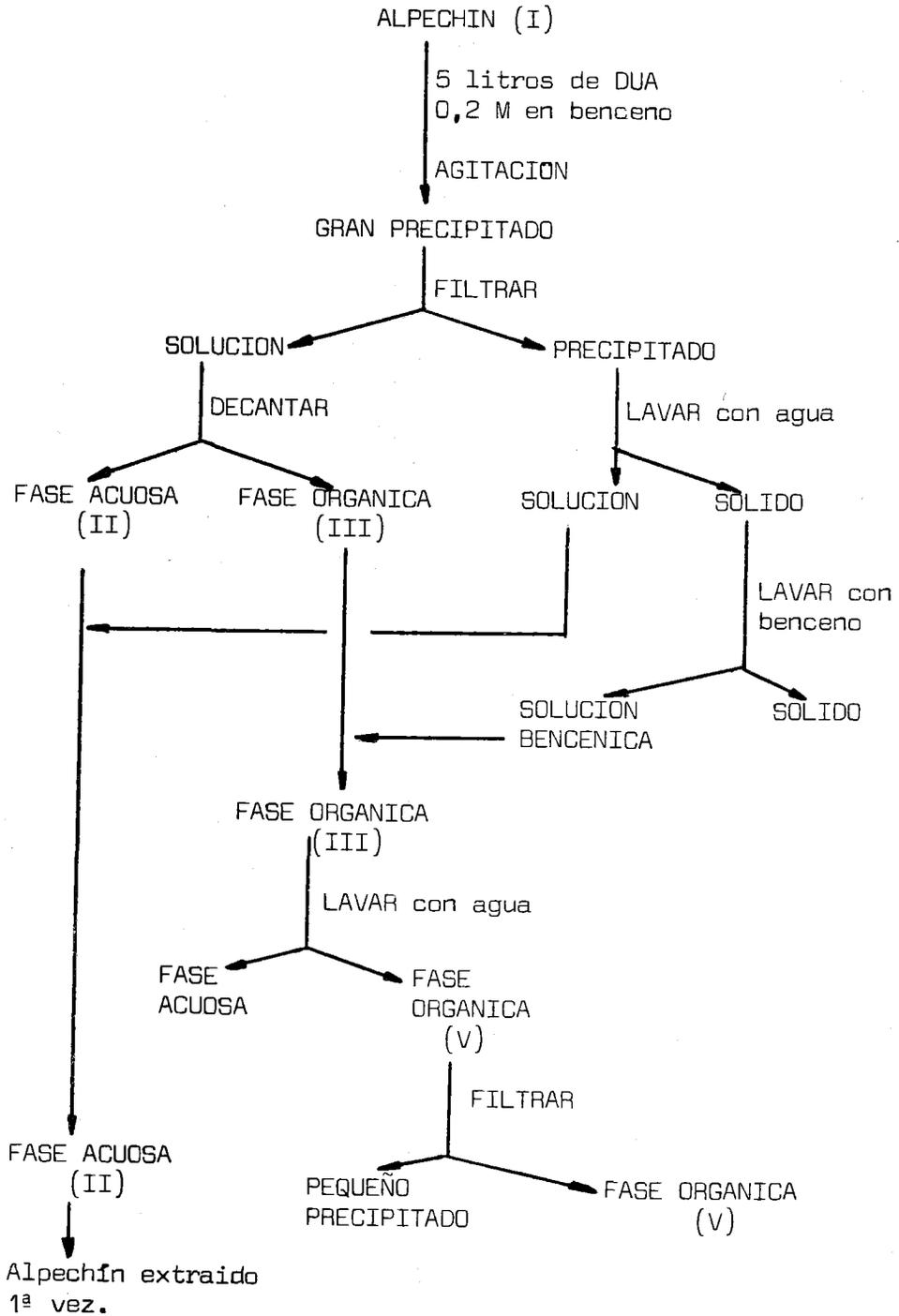
Se tomaron los papeles de filtro y se trocearon, sometiéndolos a sucesivos lavados con agua y benceno. La solución acuosa resultante se agregó a la fase acuosa (II) y las soluciones bencénicas obtenidas, a la fase bencénica (III).

#### 4.12.3.4.- Purificación de las fases.-

Se ha procedido a lavar la fase bencénica(III) con agua y la fase acuosa(II) con benceno.

La fase bencénica ya lavada con 500 ml de agua(IV) se dejó reposar durante 25 horas, al cabo de las cuales se filtró y separó de los pequeños restos de agua que tenía en emulsión. En el papel de filtro quedaron retenidos unos pequeños aglomerados negros, gomosos, que se suponen materia inicialmente en suspensión que no pudo ser retenida por papel de filtro, y que ahora se desprecian.

Se ha obtenido una fase bencénica(V) totalmente transparente, muy pura, que presenta un color verde oscuro



#### 4.13.- Recuperación de los ácidos extraídos del alpechín.-

##### 4.13.1.- Tratamiento con ácido clorhídrico.-

La fase bencénica (V), conteniendo las sales de DUA de los ácidos contenidos inicialmente en el alpechín, se trató con 4 litros de ácido clorhídrico 1 N, manteniendo la agitación durante 15 minutos.

La solución bencénica, de color verde oscuro, - tomó color rojo al tratarla con el mencionado ácido clorhídrico.

##### 4.13.2.- Separación de las fases.-

Al añadir el ClH tuvo lugar la aparición de unos precipitados abundantes de color marrón, que se localizaron inmediatamente en la interfase.

Dejado en reposo durante 24 horas, se procedió a filtrar en embudos de placa de vidrio poroso del N°3, tanto la fase acuosa como la bencénica, empleándose en la filtración a vacío un total de 70-80 horas.

Los filtrados se introdujeron en embudos de decantación de 2 litros de capacidad para separar ambas fases.

La solución acuosa resultante (VI), presentaba un intenso color rojo. La fase bencénica es la que se indica en el presente esquema como (VII).

## 4.13.3.- Recuperación de los productos precipitados.-

Al término de la filtración, los embudos de placa contenían gran cantidad del precipitado antes indicado.

Se tomó una pequeña muestra del precipitado y se comprobó que era soluble en agua, por lo que se supuso que se trataba de sustancias insolubles en medio ácido pero solubles en agua, sin olvidar además que la solución de alpechín era de 16 litros y esta nueva solución acuosa sólo consta de 4 litros, por lo que pueden ser sustancias insolubilizadas por este motivo.

Pudo comprobarse que parte del precipitado era soluble en benceno, por lo que se procedió a lavar sucesivamente el precipitado con agua y benceno en los embudos de placa que lo contenía.

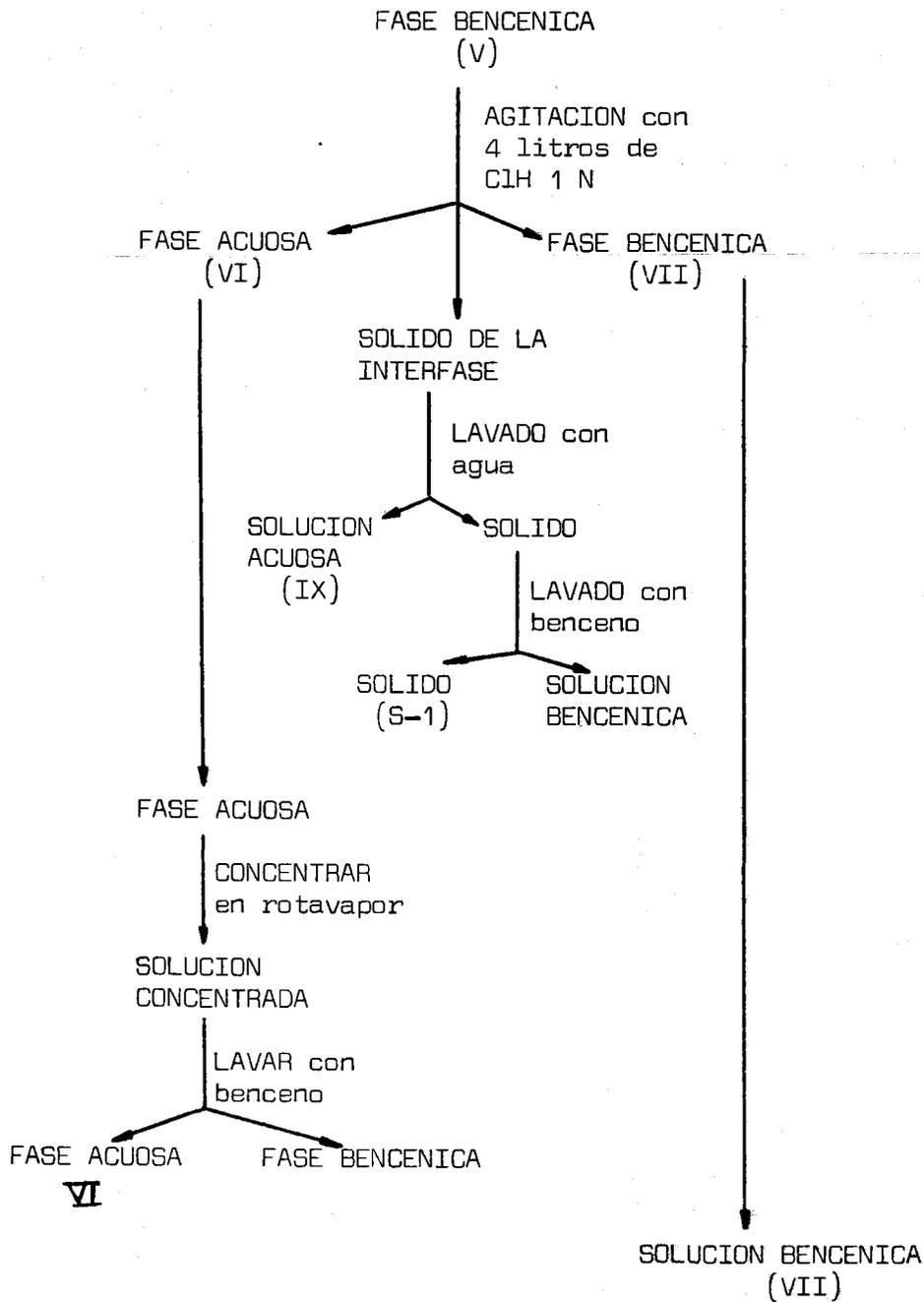
Se realizaron los lavados hasta que el benceno y el agua procedentes de los lavados no dejaban residuo sólido, invirtiéndose un total de unas 100 horas en conseguirlo.

Hemos obtenido una solución acuosa (IX) y una solución bencénica que se agregó a (VII), quedando 7,55 g de insolubles (S-1).

## 4.13.4.- Concentración de la fase acuosa (VI), Purificación.-

Se tomó la totalidad de la fase acuosa (VI) y se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida hasta alcanzar un volumen de unos 500 ml, no alcanzando el baño de agua una temperatura superior a los 45°C.

La solución, originalmente roja y transparente, fue aumentando de viscosidad, tomando un color rojo muy oscuro. En este momento se procedió a lavar con 100 ml de benceno, agitando, dejando reposar durante 24 horas y repitiendo la operación varias veces. La solución bencénica sólo contenía clorhidrato de DUA impuro.

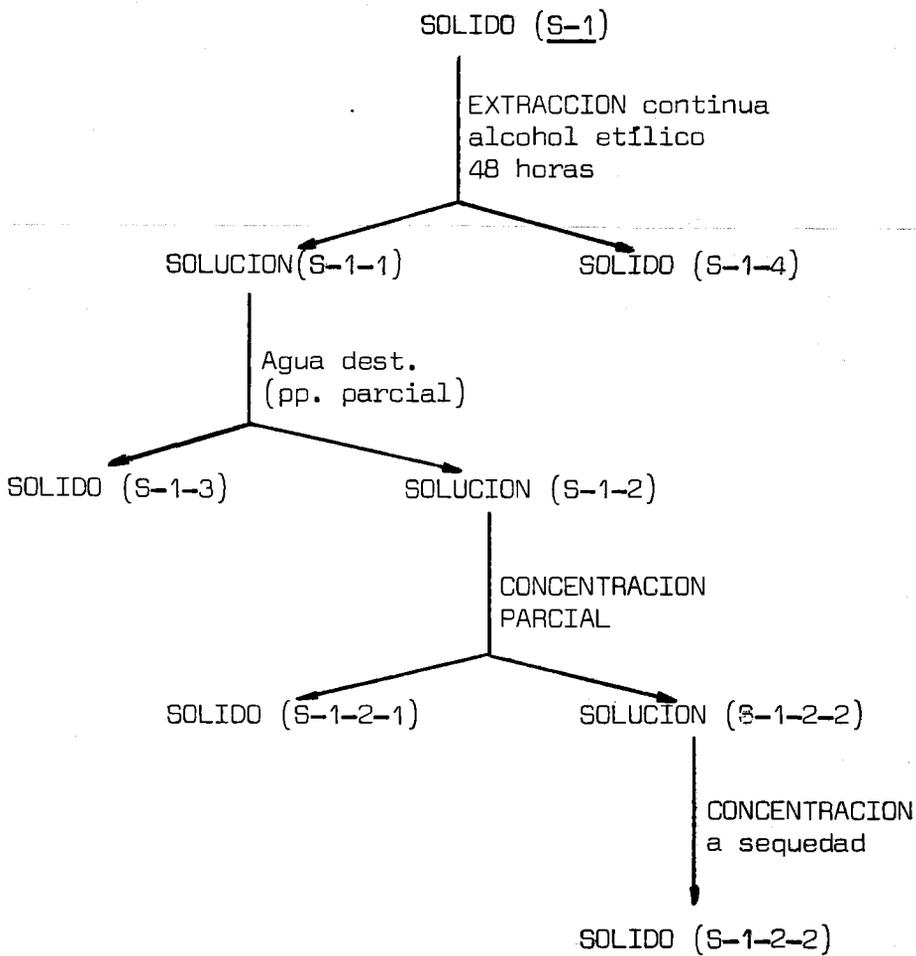


4.14.- Fraccionamiento de las mezclas obtenidas del alpechín.-

4.14.1.- Fraccionamiento de S-1.-

El S-1 no es soluble en benceno, cloroformo, éter dietílico, éter de petróleo(50-70°C), soluble en parte en acetona, bastante soluble en alcohol etílico y alcohol metílico. No es soluble en agua, al menos en forma apreciable.

Del total de 7,5 g obtenidos en la primera extracción se ha tomado 3 g, sometiendo esta cantidad a una extracción continua en caliente con alcohol metílico durante 48 horas. Se disolvió de esta manera la casi totalidad de S-1, quedando como resto insoluble 0,2 g de lo que llamaremos S-1-4. La solución alcohólica resultante S-1-1 se trató con 50 ml de agua destilada(en conjunto solución metanólica al 20%), lográndose una precipitación parcial. Se recogió por filtración sobre placa del N°3 un sólido negro, con aspecto de carbón finísimamente dividido(S-1-3) en cantidad de 0,65 g. La solución hidroalcohólica resultante (S-1-2) se concentró a mitad de volumen, con lo que volvió a precipitar 0,75 g de sólido negro(S-1-2-1), quedando ahora la solución de un color mucho más claro. Concentrada esta solución a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y 45°C, resultó un sólido marrón (S-1-2-2) en cantidad de 0,15 g.



#### 4.14.2.- Fraccionamiento de VIII.-

La solución de la mezcla de ácidos VIII dió lugar, paulatinamente, a un sirupo marrón muy oscuro, una solución del mismo color y un sólido blanco pulverulento. Por decantación se separó el sirupo oscuro (VIII-2) de la solución y el sólido blanco. Una filtración de esto último dió como resultado 1,5 g del sólido blanco (VIII-1) y la solución (VIII-3).

El sólido blanco VIII-1 no funde por debajo de  $360^{\circ}\text{C}$ , calentado a la llama no arde. No es soluble en  $\text{ClH}$ , acetona ni metanol.

Este sólido presentaba en principio un débil tonalidad roja, que se eliminó lavando con acetona. El compuesto blanco presenta en su espectro IR las características de sílice.

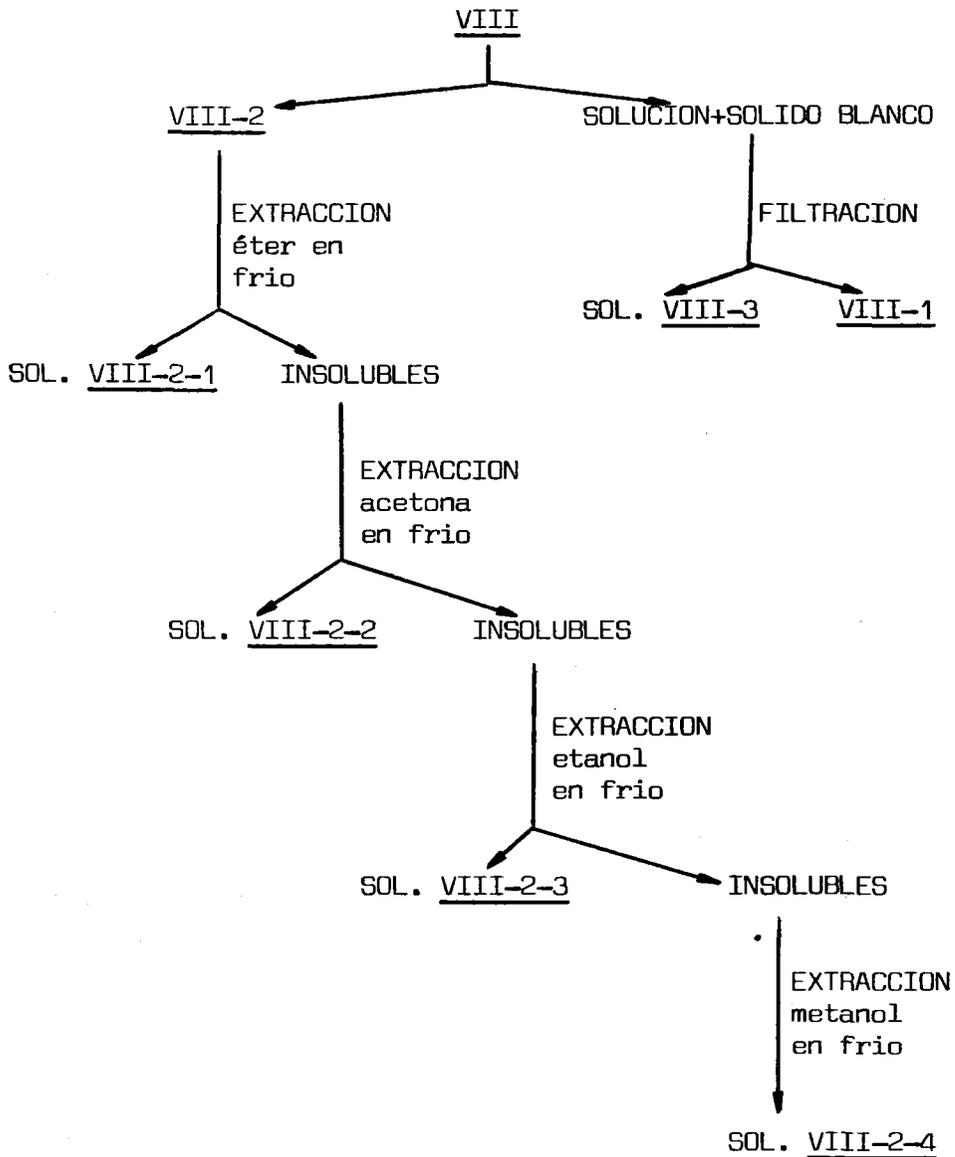
Suponemos que esta sílice se ha producido debido al medio  $\text{ClH}$ , que ha insolubilizado silicatos con carácter ácido extraídos.

##### 4.14.2.1.- Fraccionamiento de VIII-2.-

El sirupo negro VIII-2 fue extraído en frío con éter dietílico, resultando una solución VIII-2-1 y unos insolubles, que tratados en frío con acetona dan una solución de color oscuro VIII-2-2. Llevada a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida se obtuvo un sólido de color caramelo en cantidad de 3,7 g.

Las sustancias no solubles en acetona se tratan en frío con alcohol etílico, resultando una solución alcohólica que llevada a sequedad en las mismas condiciones que en el caso anterior produjo un sólido (VIII-2-3) en cantidad de 0,5 g.

Quedó un pequeñísimo resto insoluble que fue solubilizado en metanol absoluto, dando 2 mg de VIII-2-4.



4.14.2.2.- Fraccionamiento de VIII-3.-

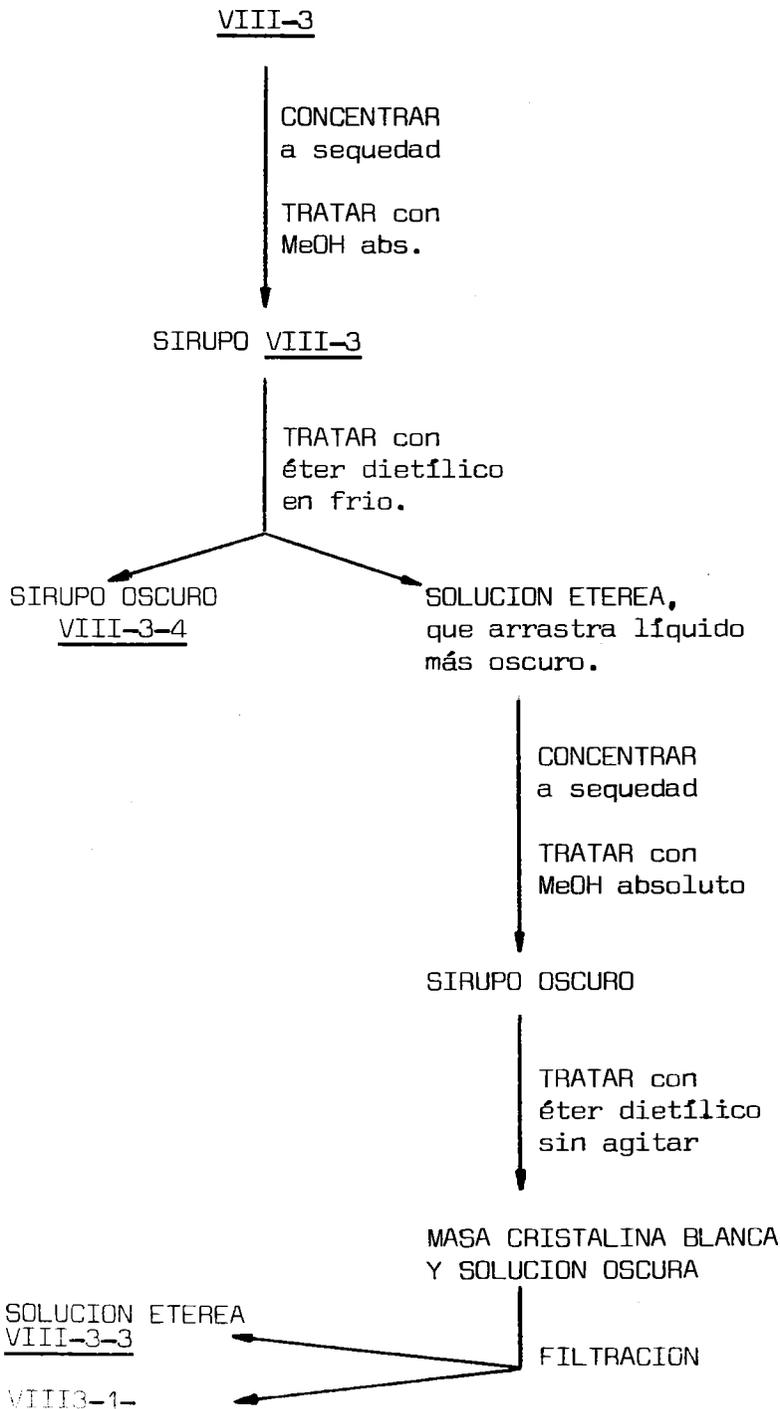
La solución VIII-3 se concentró a sequedad en las condiciones acostumbradas, consiguiéndose la sequedad final por tratamiento con metanol absoluto. El sólido obtenido, de consistencia siruposa, se trató con éter dietílico en frío, quedando la mayor parte del sirupo oscuro sin disolver.

La solución etérea, amarillenta, arrastra un líquido oscuro, bastante denso. El conjunto se concentró lo más posible, añadiendo metanol absoluto y acetona al final porque de esta manera se conseguía una mayor consistencia en el sirupo. A continuación se recubría el sirupo con éter dietílico, sin agitar, cristalizando el sirupo de forma rapidísima. Se obtienen cristales en forma de agujas — (VIII-3-1), con un punto de fusión microscópico de 74-80°C

El sirupo negro es objeto de nuevos tratamientos en frío con éter dietílico, logrando obtener de esta forma sucesivas cantidades de VIII-3-1.

Como resultado de todo esto obtenemos 0,8 g de VIII-3-1, una solución etérea marrón oscura (VIII-3-3) y un resto siruposo oscuro (VIII-3-4).

Este proceso se repite varias veces hasta agotamiento de VIII-3:



4.14.2.2.1.- Fraccionamiento de VIII-3-1.-

La fracción VIII-3-1 puede considerarse como un compuesto de cierta pureza, y se ha intentado purificar y aislar el componente principal del mismo. Su espectro IR es el contraseñado como ALP-7.

Punto de fusión microscópico, realizado con aparato REICHERT, es de 79-80°C.

Recristalizado en éter-metanol da un punto de fusión de 77-77,5°C. Su espectro IR es el ALP-8 que no ha sufrido variación apreciable.

El compuesto se vaporiza al fundir o pocos grados después, lo que se observó en el microscopio de puntos de fusión, cristalizando sobre el cubre del mismo aparato.

A 100°C y 12 mm de Hg, puede recogerse un producto cristalino de punto de fusión microscópico 69-72°C y es su espectro IR contraseñado como ALP-VIII-3-1. Podemos observar una disminución de las bandas de absorción correspondiente a 2000  $\text{cm}^{-1}$  y a la zona 2300-2800  $\text{cm}^{-1}$ .

Se ha intentado un fraccionamiento de VIII-3-1 basándonos en su volatilidad, introduciendo una muestra del mismo en un sublimador, recogiendo fracciones en condiciones cada vez más forzadas de presión y temperatura.

Muestra tomada: 365 mg  
Condiciones: 10 mm/Hg y 85°C  
Recogemos 35 mg de p.f. 69-70°C y IR ALP-9

El resto lo sometemos 10 mm/Hg y 95°C.  
Recogemos 45 mg de p.f. 70-72°C y IR ALP-10

Resto no volatilizado sometido a 1 mm/Hg y 95°C  
Recogemos 260 mg de p.f. 90-94°C y IR ALP-11

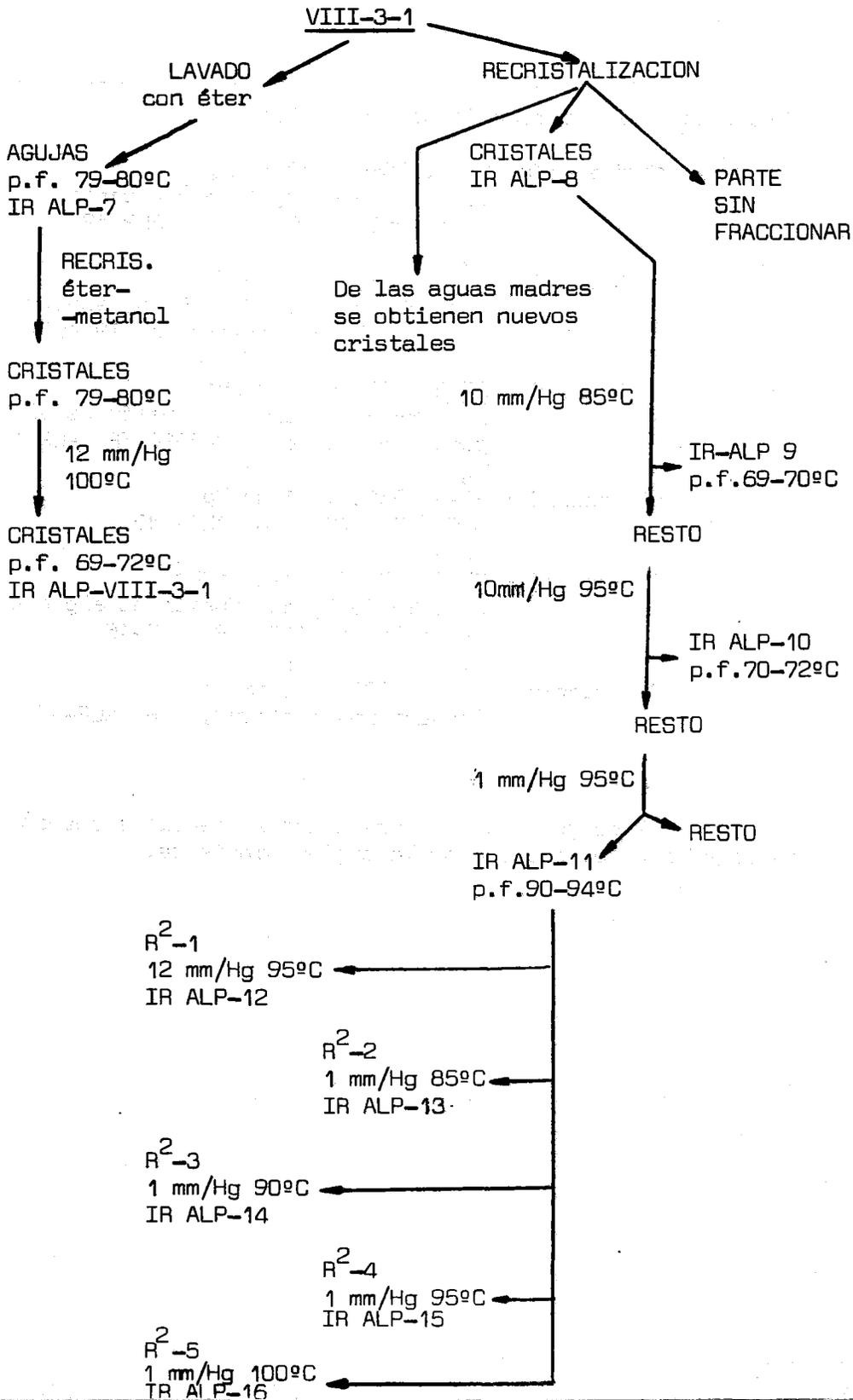
Queda un pequeño resto (5 mg) que comienza a fundir a 50°C y termina a 200°C.

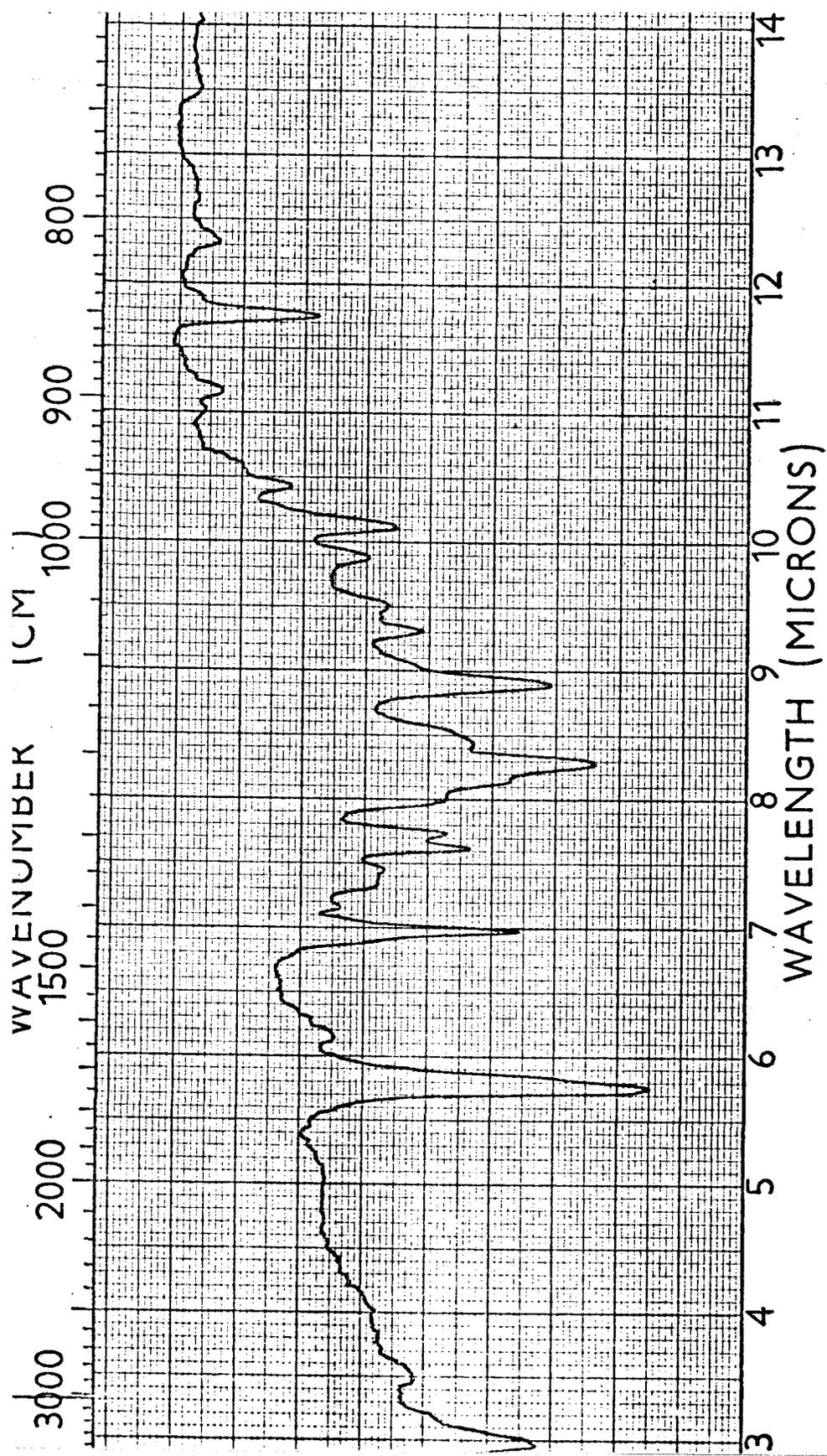
Se han tomado 200 mg del sólido ALP-11, realizán

dose nuevos fraccionamientos por el procedimiento anterior obteniéndose las 6 fracciones siguientes:

- 1ª Fracción:  $R^2-1$ , 95°C y 12 mm/Hg  
p.f. Parte a 73, la mayor parte a 77  
y un resto a 89°C. IR ALP-12
- 2ª Fracción:  $R^2-2$ , 85°C y 1 mm/Hg  
p.f. 90-94°C, a 79-80°C hay semifusión  
de algunos cristales. IR ALP-13
- 3ª Fracción:  $R^2-3$  90°C y 1 mm/Hg  
p.f. 89-94°C, con semifusión de al-  
gunos cristales a 79-80°C IR ALP-14
- 4ª Fracción:  $R^2-4$  95°C y 1 mm/Hg  
p.f. 89-94°C IR ALP-15
- 5ª Fracción:  $R^2-5$  100°C y 1-2 mm/Hg  
p.f. 90-93°C, con fusión de algunos  
cristales a 81°C IR ALP-16
- 6ª Fracción:  $R^2-6$  100°C y 1 mm/Hg  
Pequeñísima cantidad, IR ALP-17

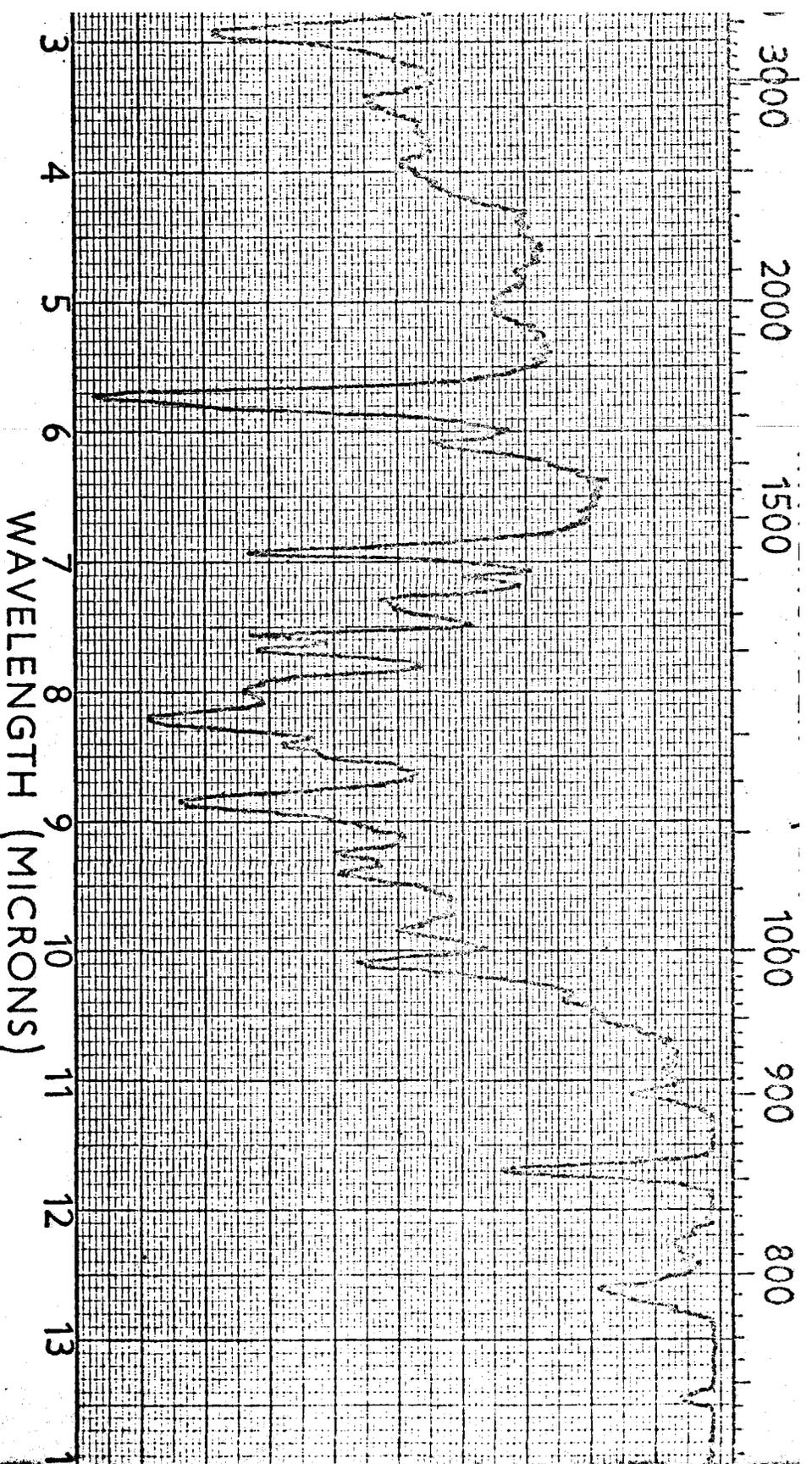
El conjunto de las operaciones descritas quedan reflejadas en el esquema de la página siguiente.





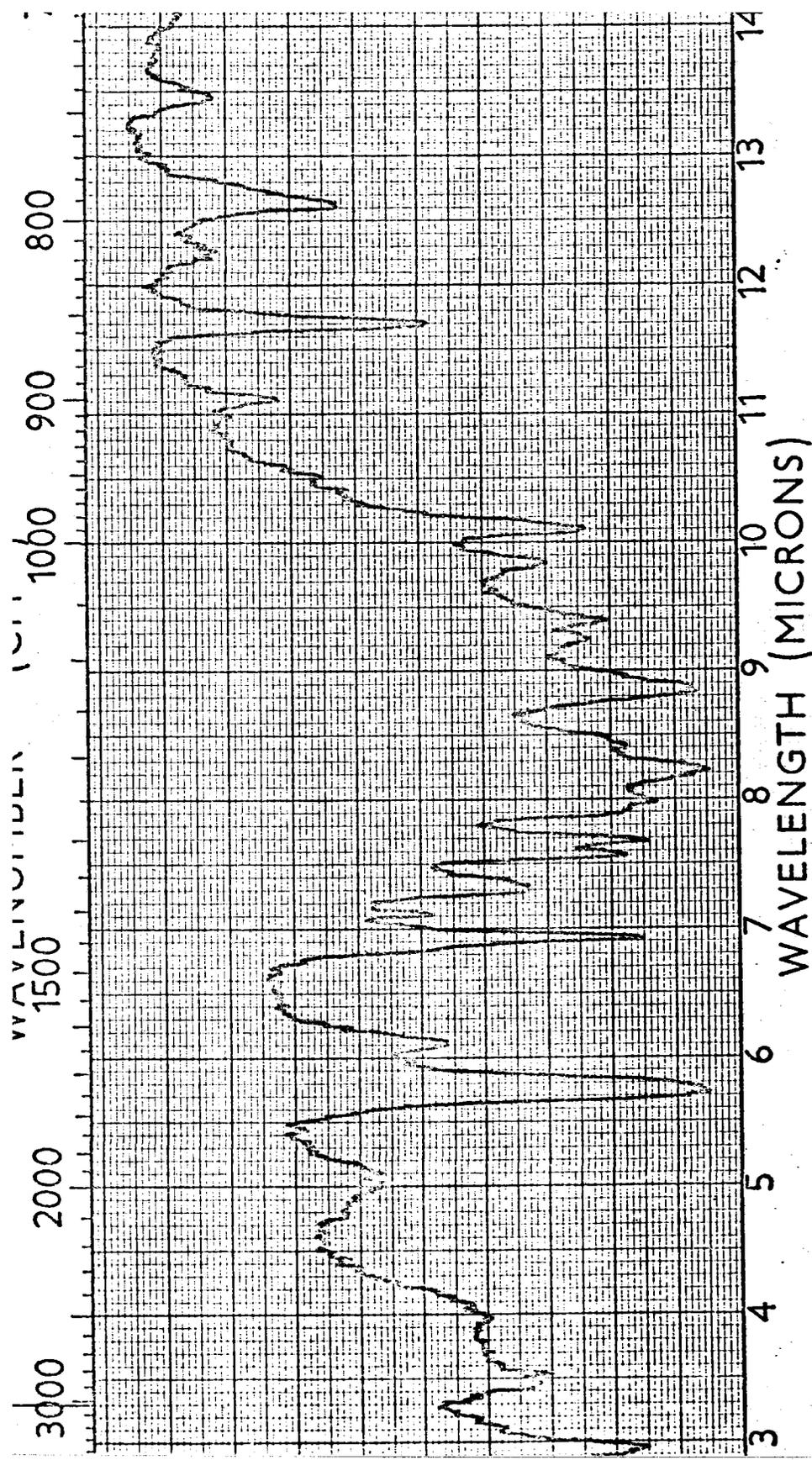
ALP-VIII-3-1

SOLIDO en BrK



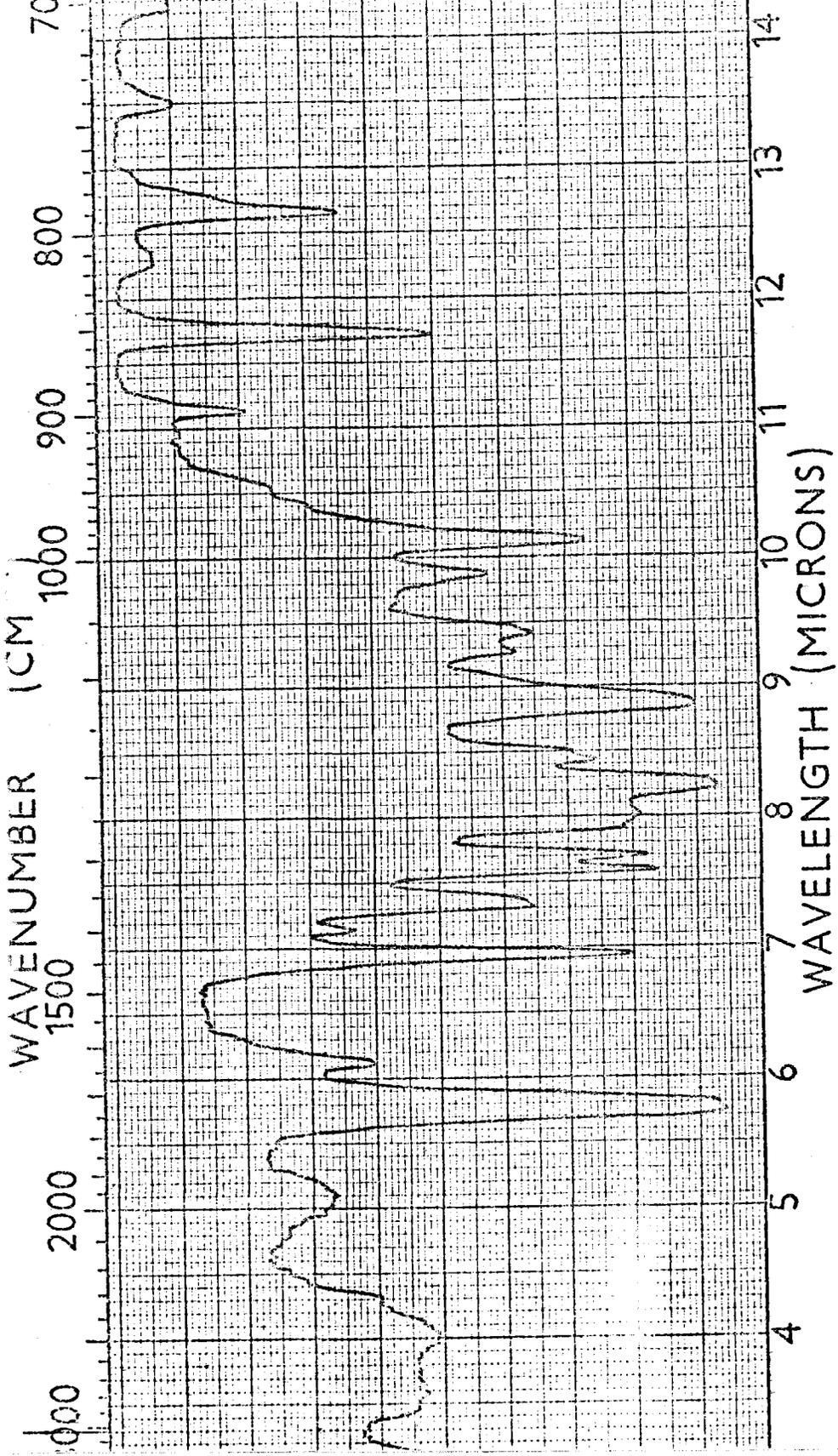
ALP-6

SOLIDO en Brk



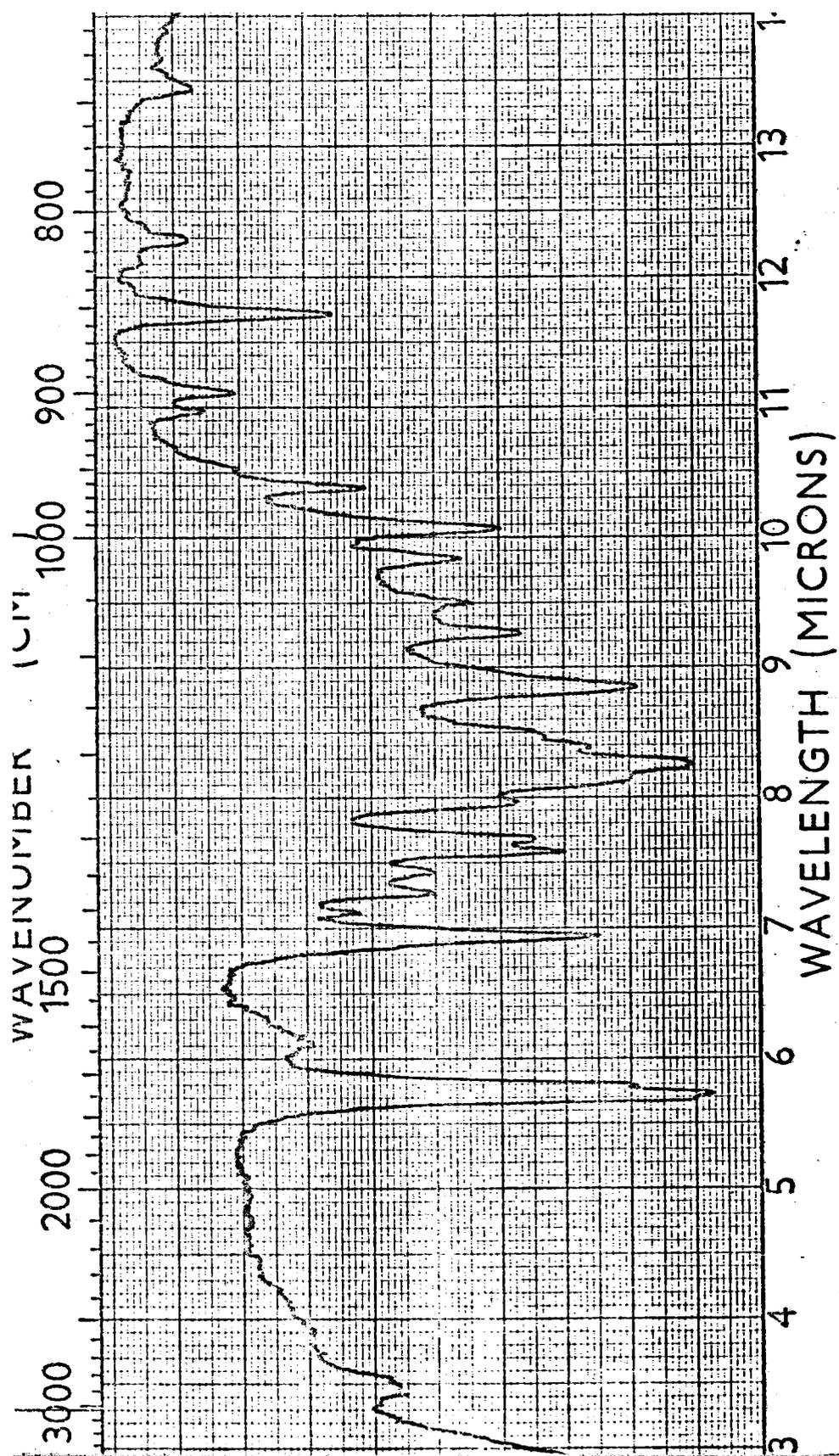
ALP-7

SOLIDO en Brk



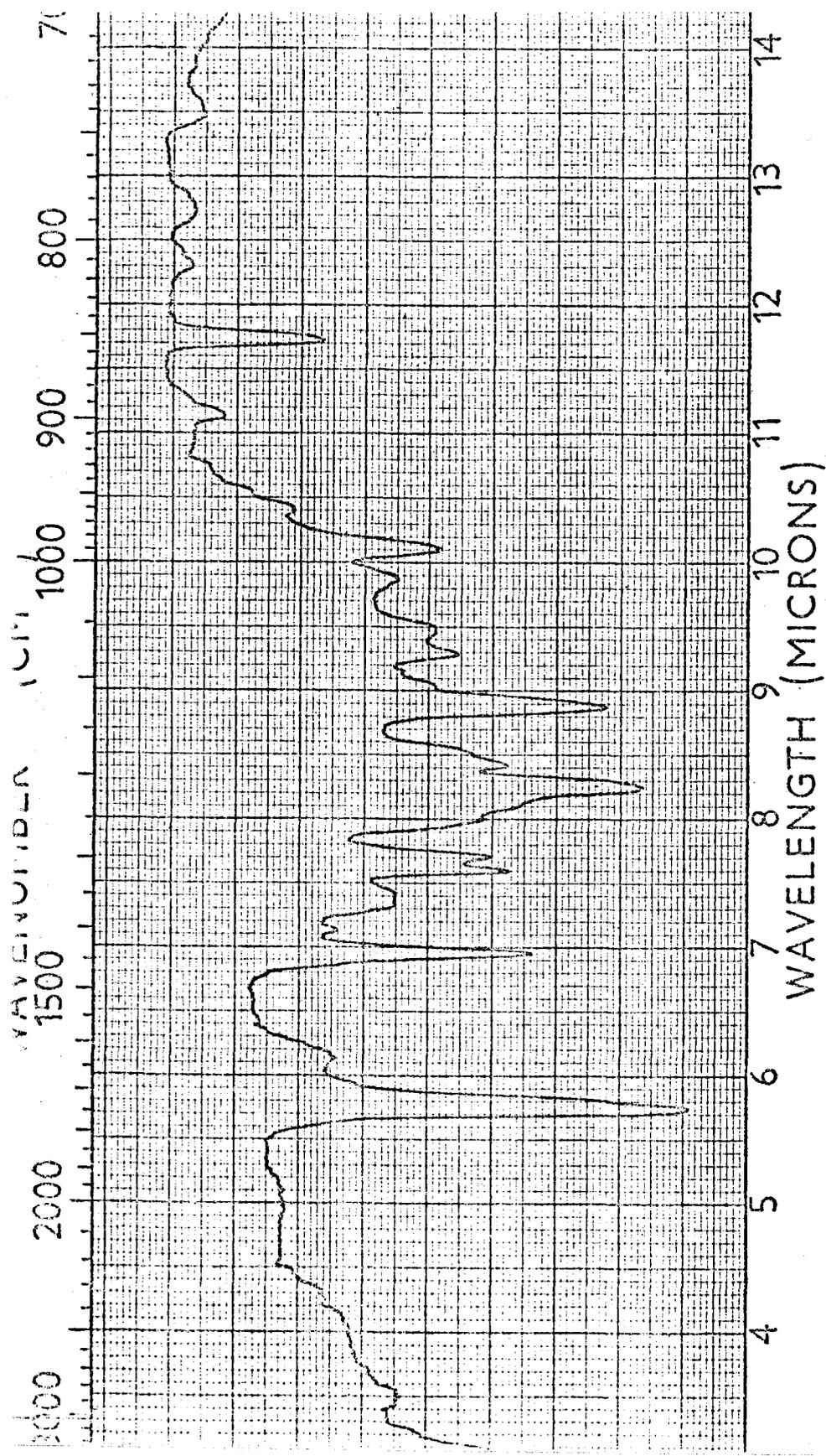
SOLIDO en Brk

ALP-8



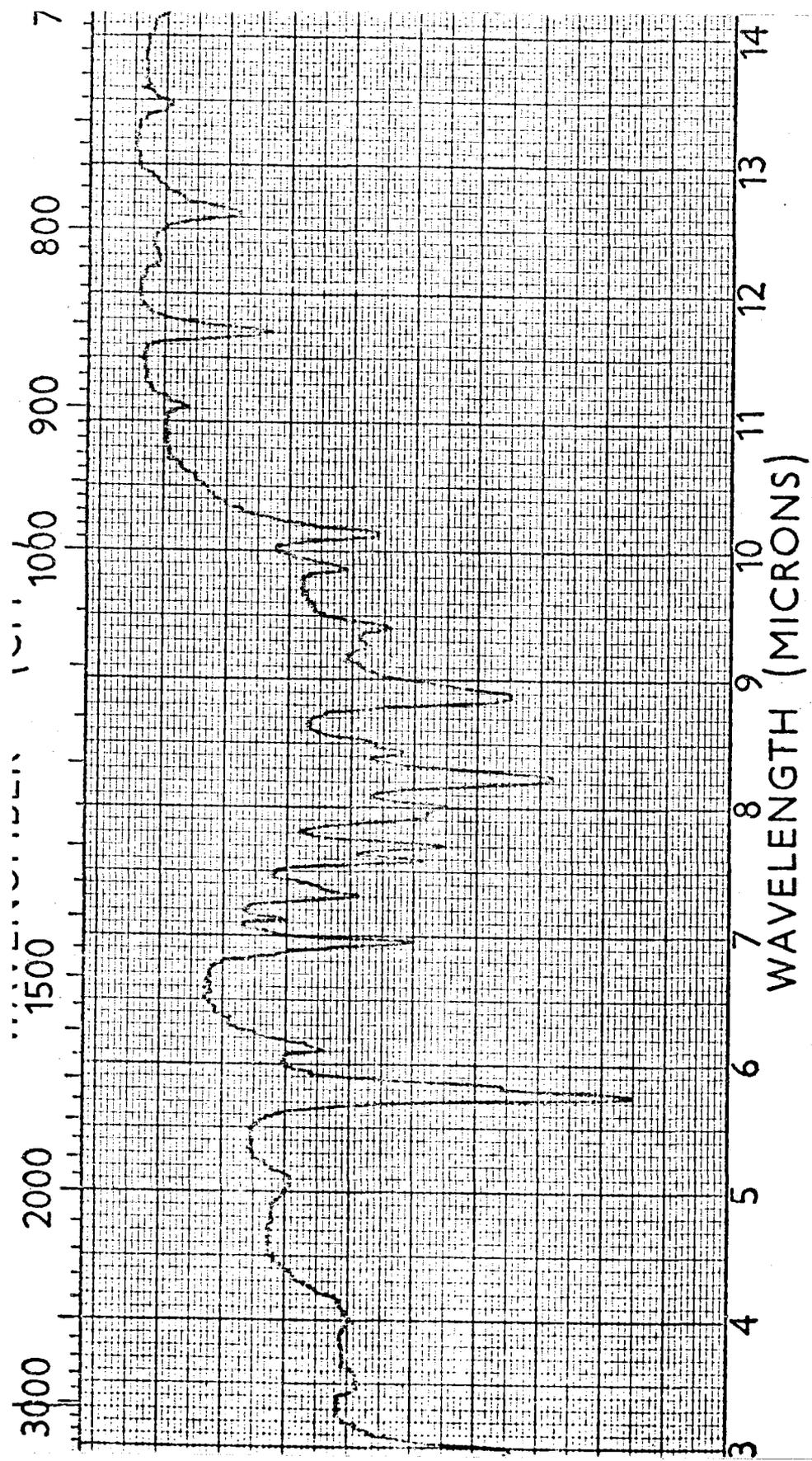
SOLIDO en Brk

ALP-9



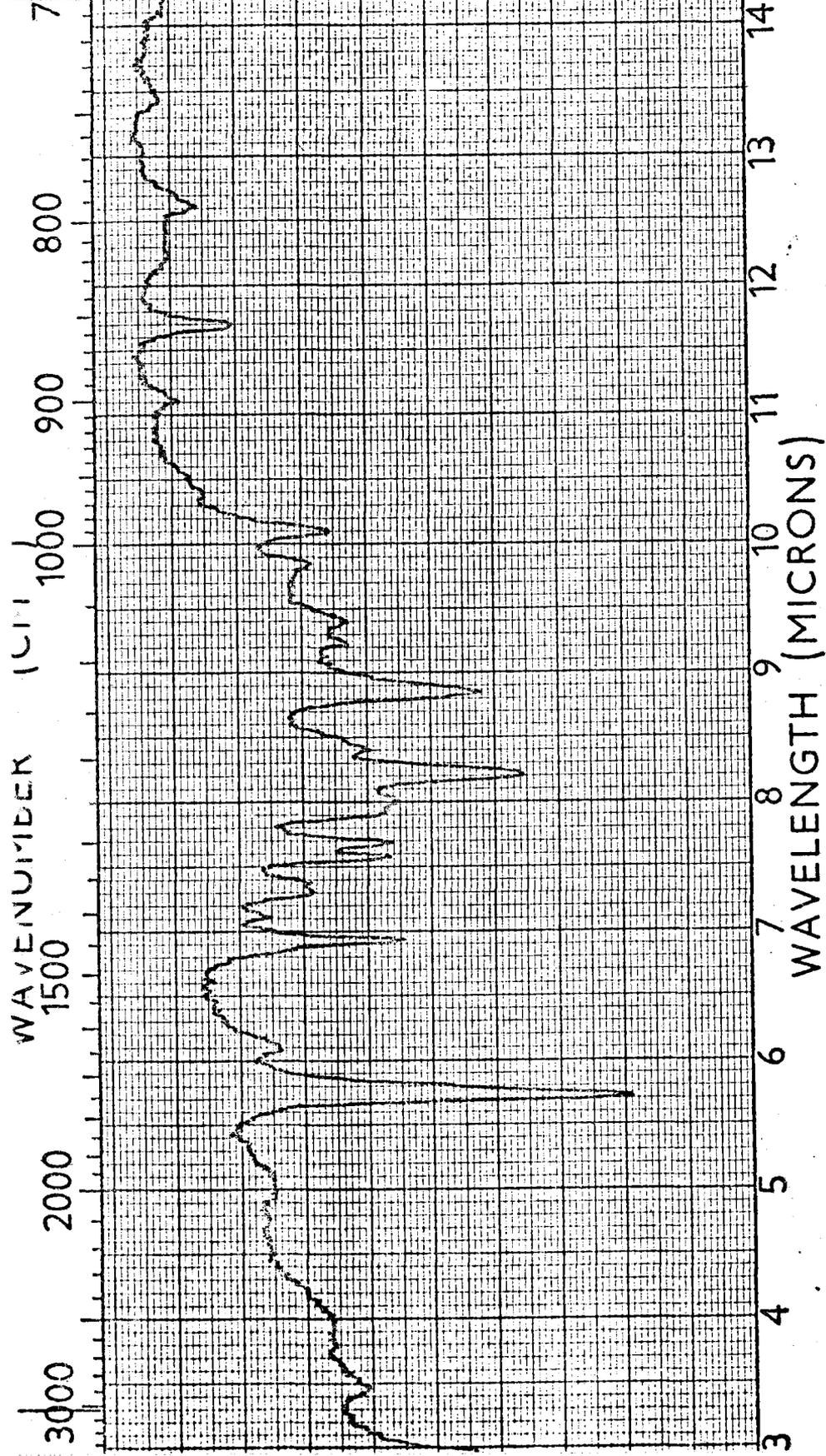
ALP-10

SOLIDO en BrK



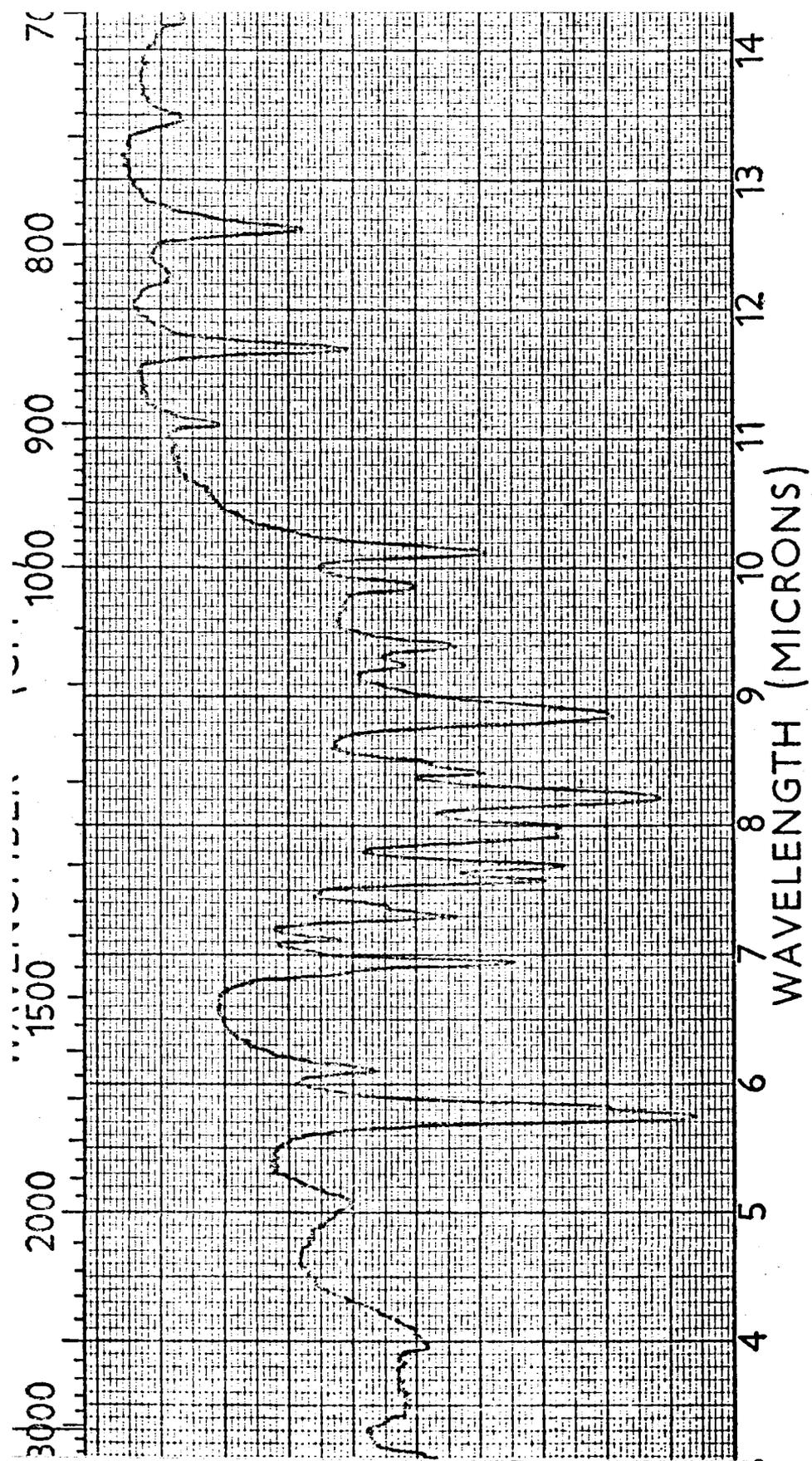
ALP-11

SOLIDO en Brk



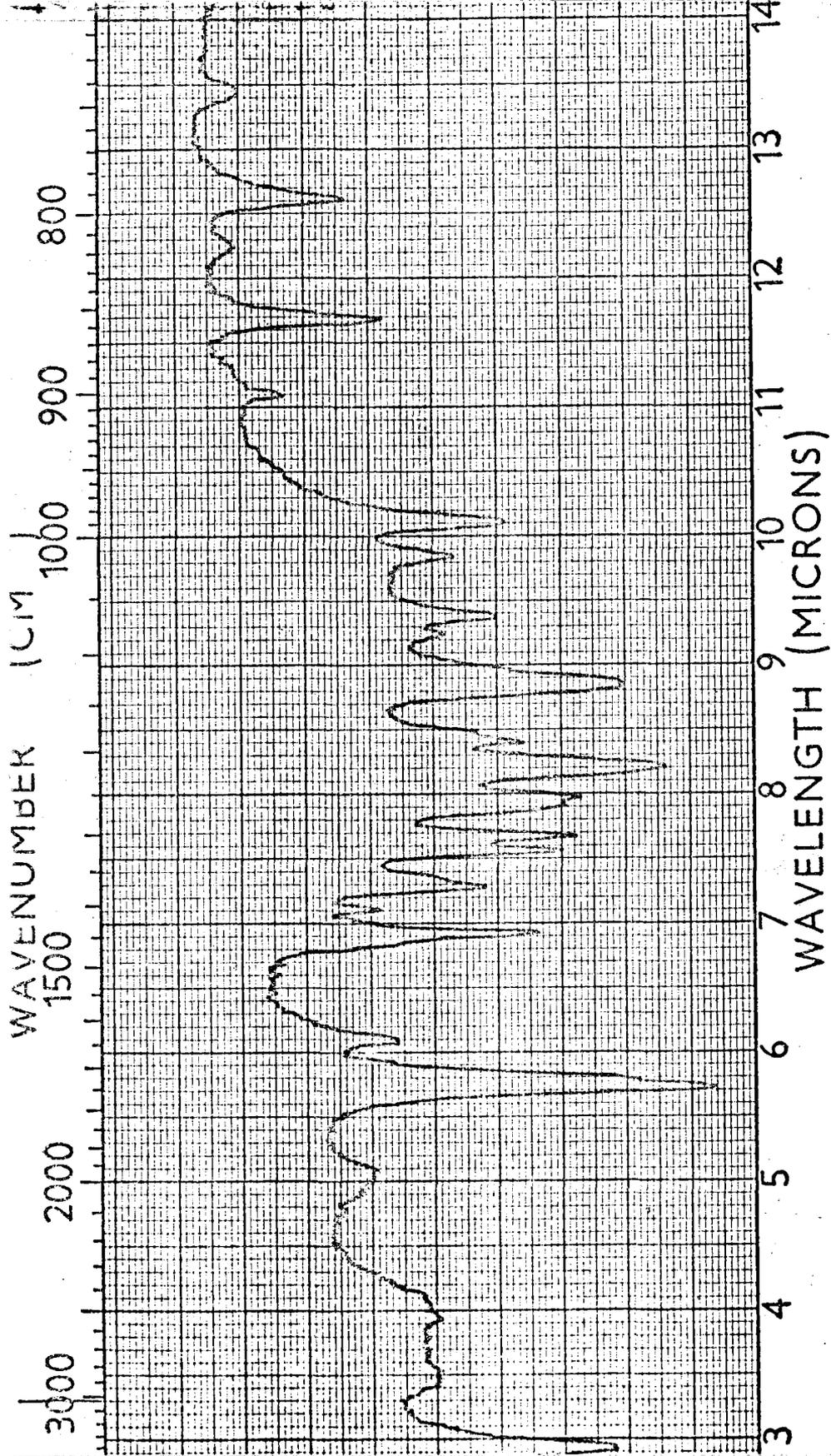
ALP-12

SOLIDO en Brk



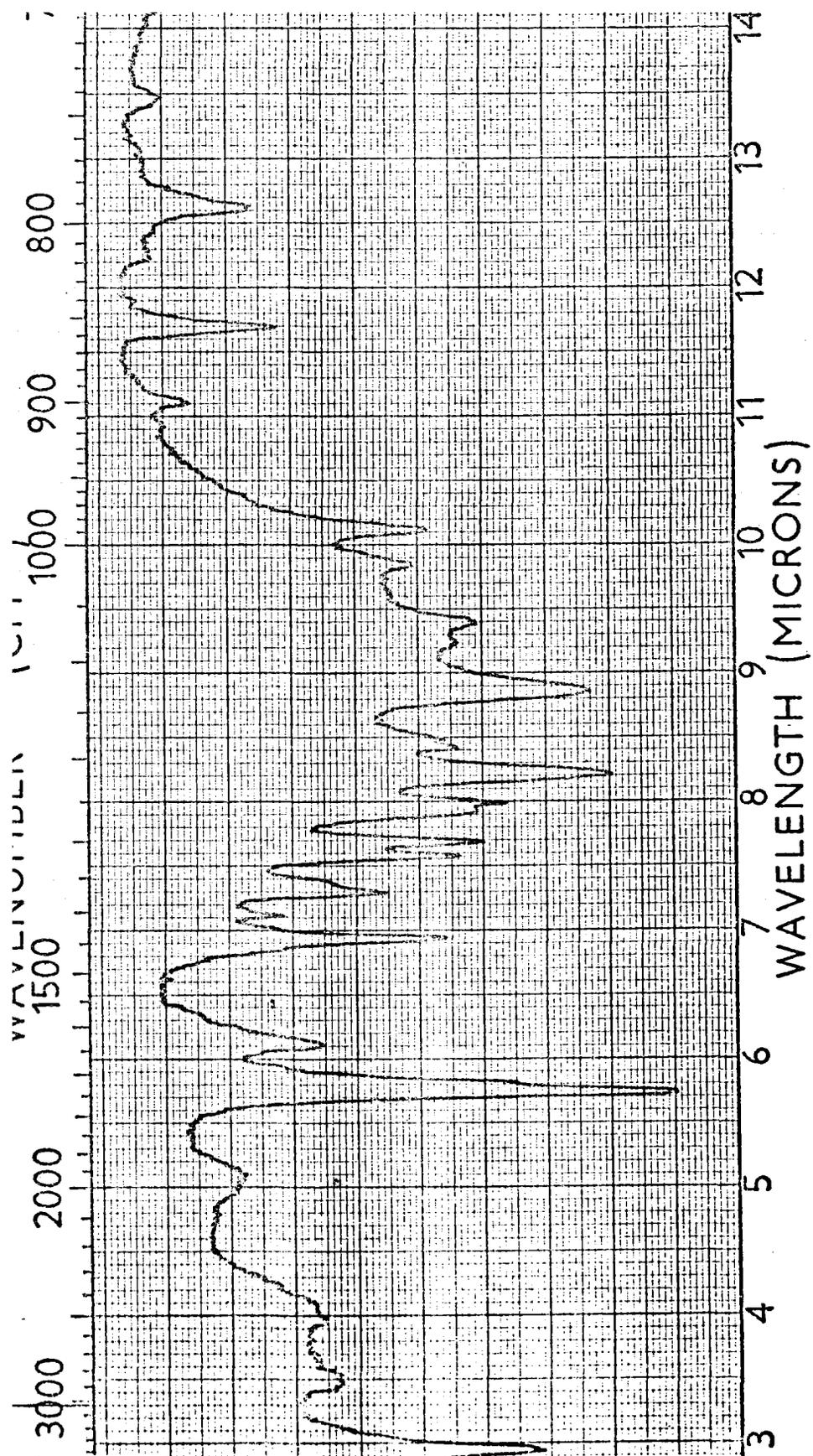
ALP-13

SOLIDO en Brk



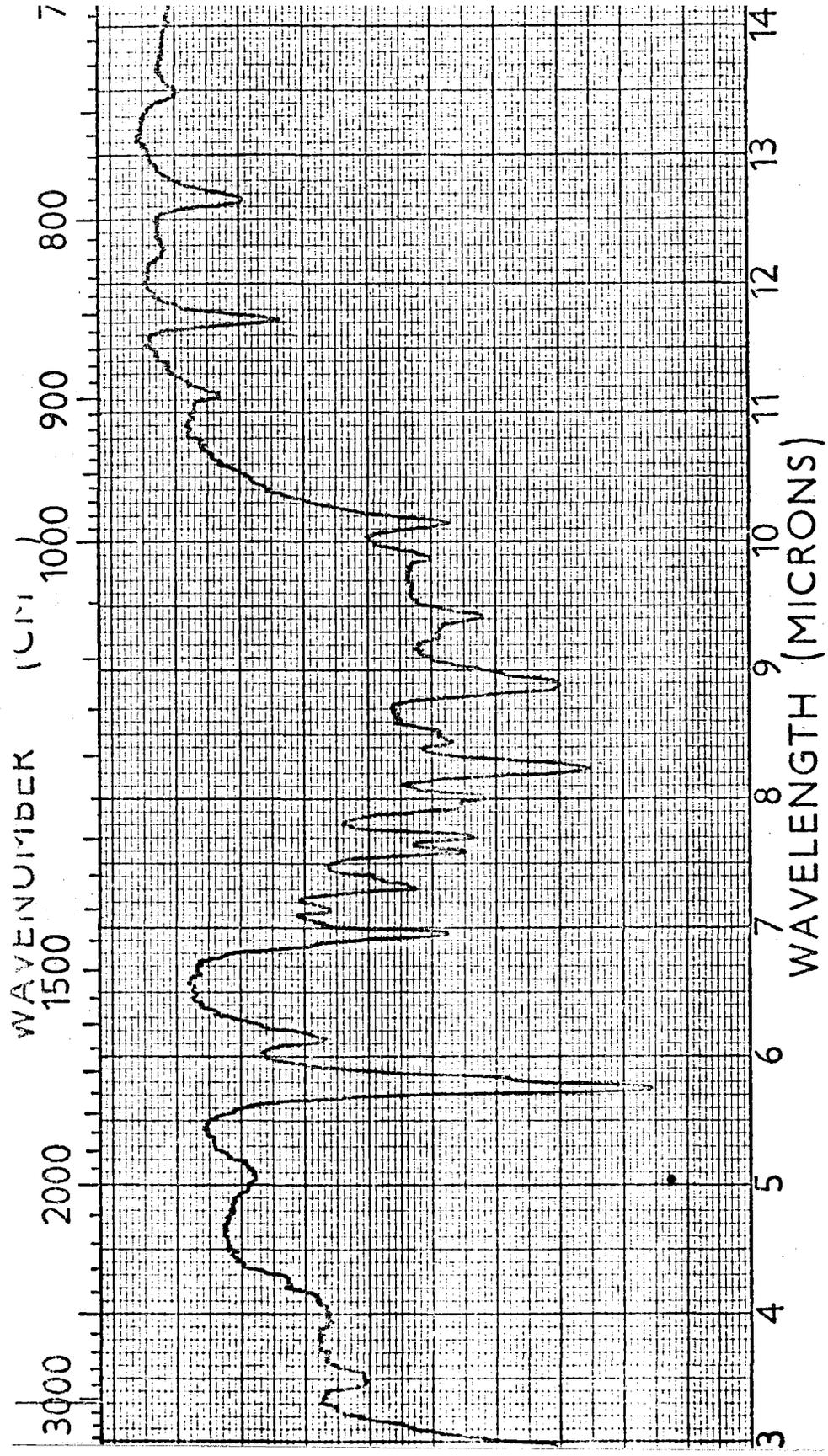
ALP-14

SOLIDO en Brk



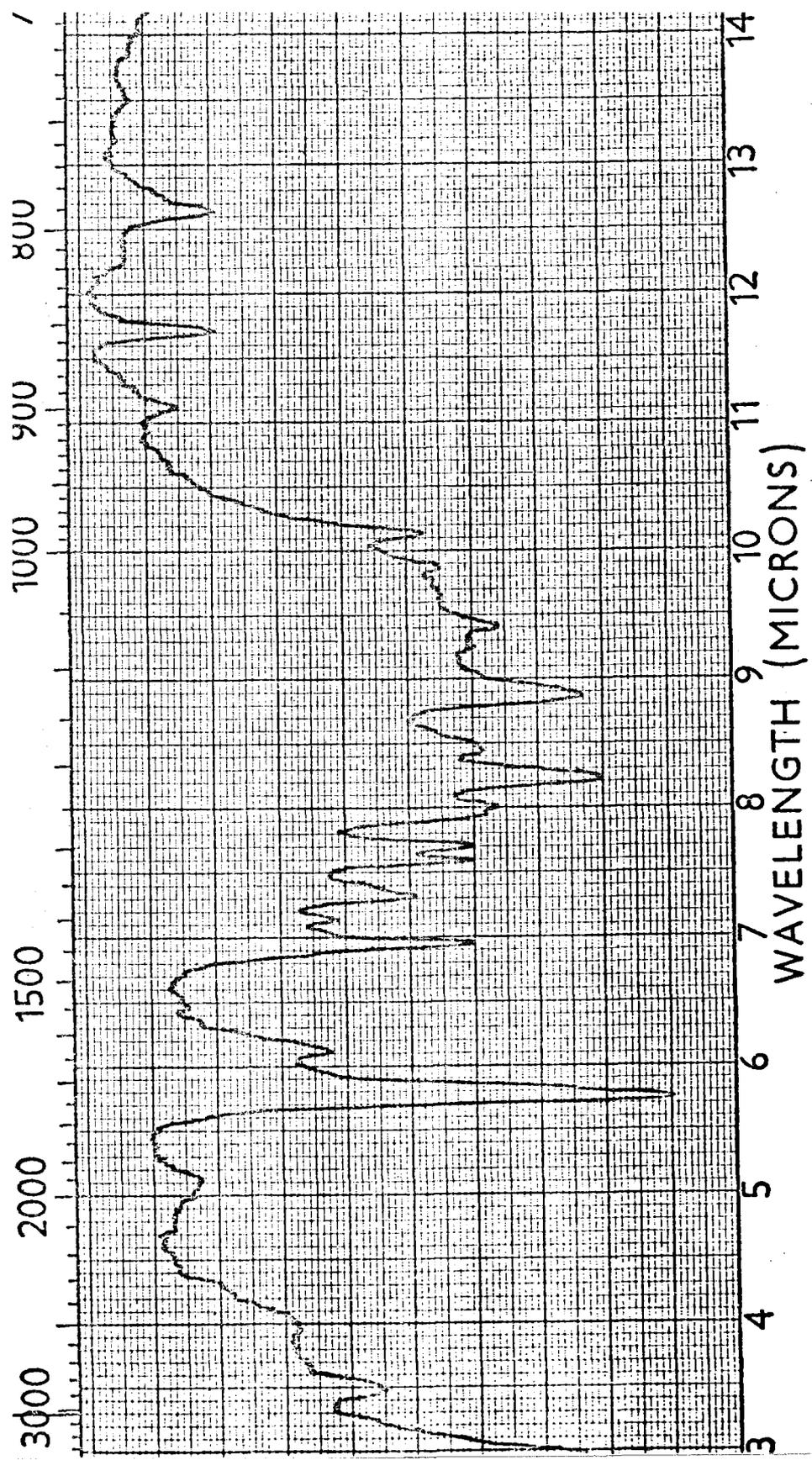
SOLIDO en Brk

ALP-15



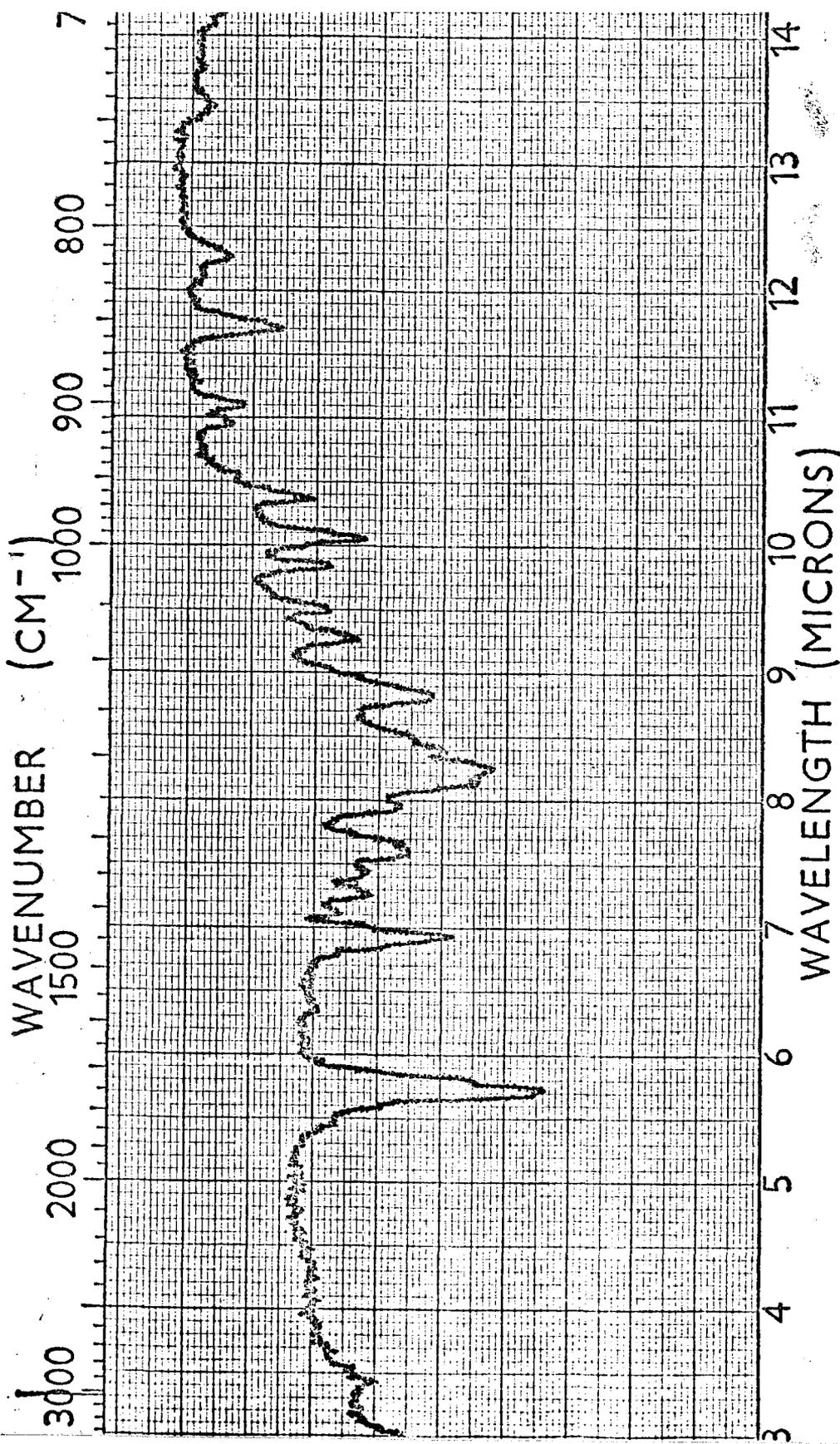
ALP-16

SOLIDO en Brk



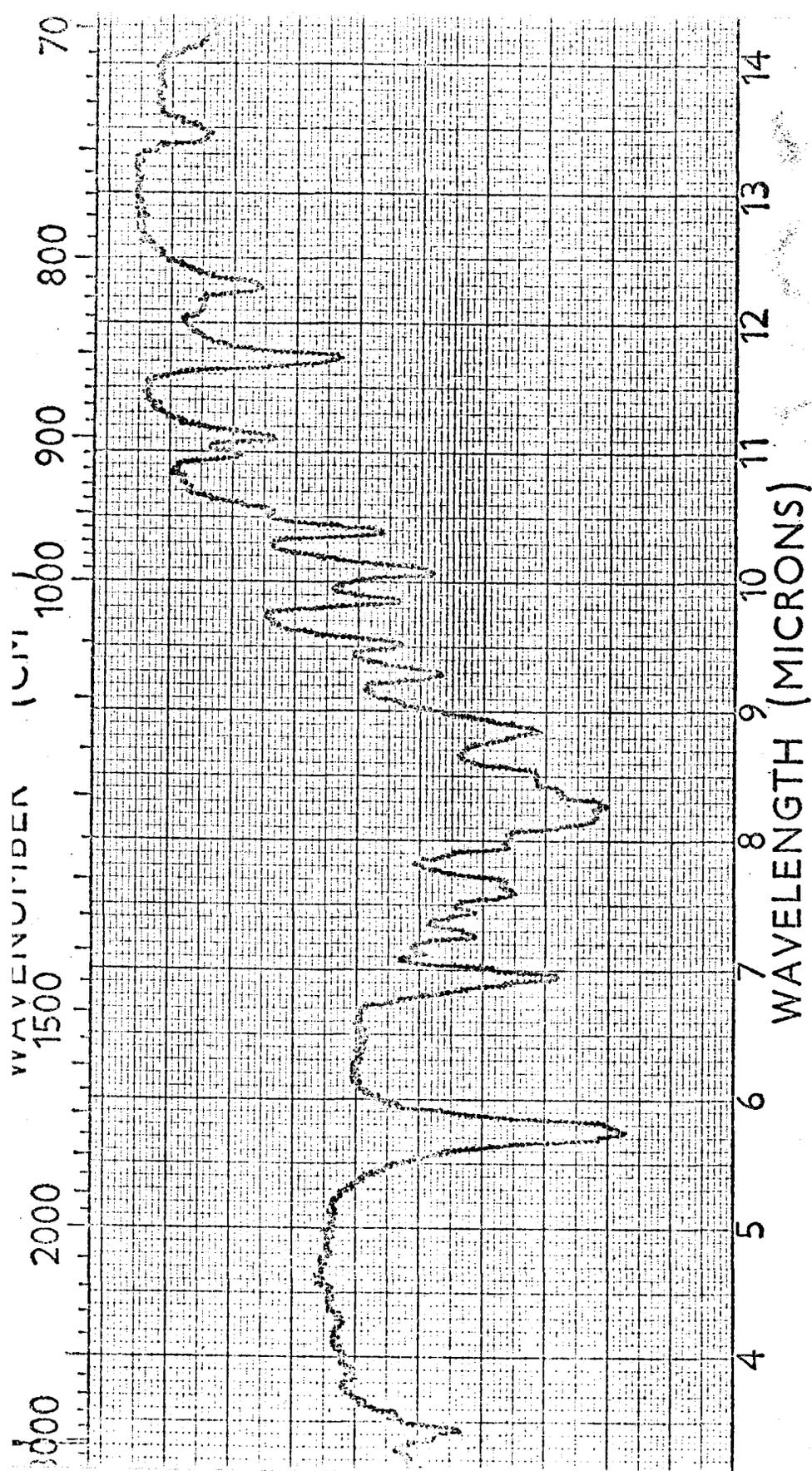
ALP-17

SOLIDO en Brk



CITRATO DE METILO

SOLIDO en BrK



R<sup>2</sup>-2 metilado

SOLIDO en Brk



Las pruebas que se han realizado para dilucidar la estructura del conjunto de la fracción han sido las siguientes:

Tomamos la fracción más abundante de las obtenidas de VIII-3-1, esto es, la R<sup>-</sup>2.

Compuesto blanco, inodoro, cristales en forma de placas.

Análisis elemental: No contiene nitrógeno, ni azufre ni halógenos.

No decolora el agua de bromo, ni es oxidable con permanganato.

Colorea ligeramente de amarillo la solución de cloruro férrico.

Reacciona con solución etérea de diazometano.

Es soluble en agua, alcohol etílico y metílico, - muy poco soluble en éter dietílico.

Su solución acuosa da una ligera reacción ácida.

Análisis elemental cuantitativo:

C 39,78%; H 5,52%; O 54,70%.

Da una sola mancha en cromatografía de capa fina según el procedimiento seguido en los ácidos de la uva y - limón(100).

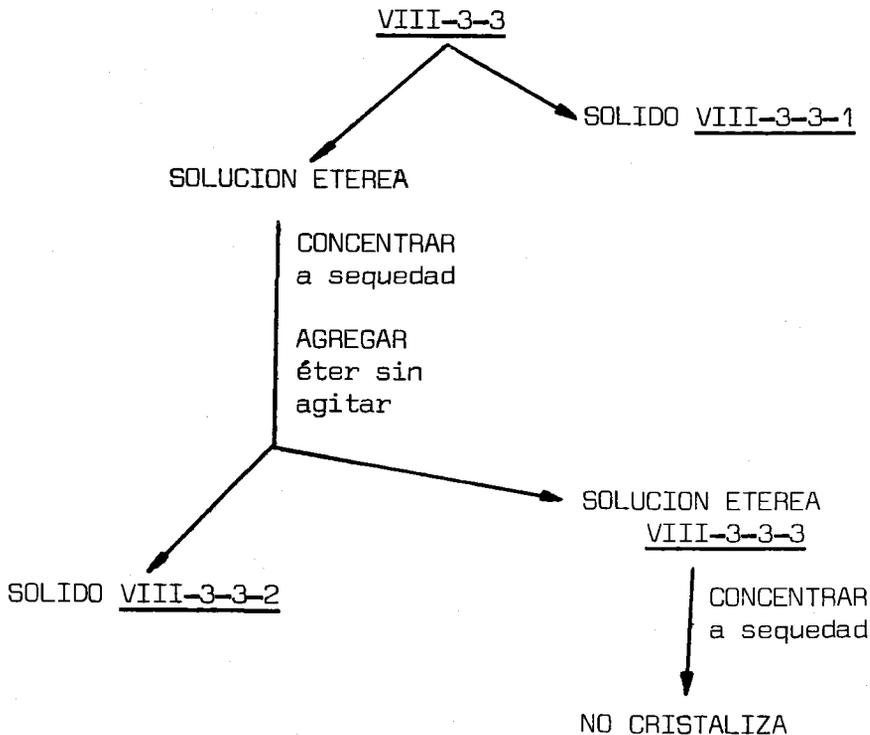
Se ha tomado una muestra y metilado con solución etérea de diazometano. El espectro IR del producto obtenido coincide perfectamente con el del citrato de metilo.

En los apartados de esta Tesis correspondientes a cromatografía gas-líquido se dan más pruebas con el fin de demostrar su estructura.

4.14.2.2.2.- Fraccionamiento de VIII-3-3.-

De la solución VIII-3-3 se obtuvo una pequeña cantidad de sólido VIII-3-3-1 (200 mg) en primer término. Concentrando un poco la solución y agregando éter sin agitar se obtuvo 500 mg de VIII-3-3-2, sólido de color marrón a pesar de repetidos lavados.

La solución etérea VIII-3-3-3 no da más producto cristalino.

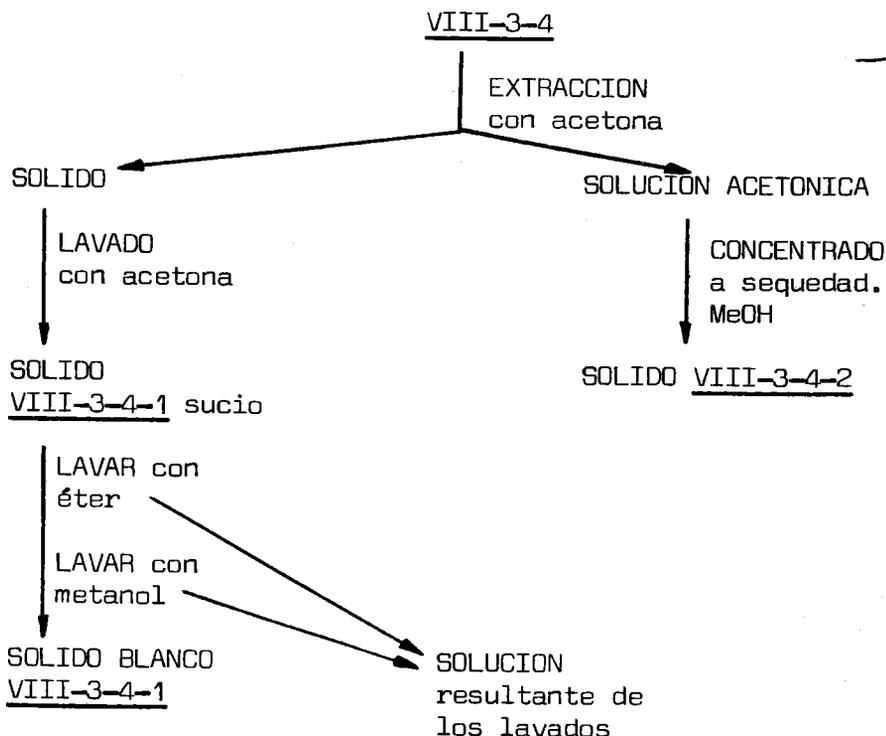


4.14.2.2.3.- Fraccionamiento de VIII-3-4.-

El sirupo VIII-3-4 se extrajo en frio con acetona hasta lograr solubilizar en la misma la mayor cantidad posible de sólido.

La solución acetónica se concentra a sequedad, - ayudando con metanol absoluto, hasta dar un sólido de color caramelo(VIII-3-4-2) en cantidad de 8,7 g.

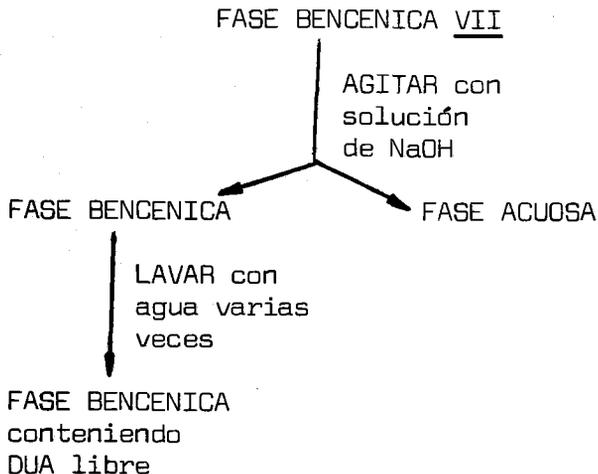
La parte insoluble en acetona es un sólido que por sucesivos lavados toma color blanco. Todas las pruebas realizadas sobre él nos indican que se trata de materia inorgánica. Se obtienen 500 mg de este sólido(VIII-3-4-1)



4.15.- Recuperación de la DUA utilizada en el primer proceso de extracción de ácidos del alpechín.-

La solución bencénica VII contiene una mezcla de sustancias, entre ellas clorhidrato de DUA, sales de DUA con ácidos del alpechín y no destruidas por el ácido clorhídrico y alguna sustancia soluble en benceno que provenga del alpechín.

Para dejar la DUA en libertad se trata con un gran exceso de NaOH acuosa. Después de agitar fuertemente y se deja en reposo para lograr la separación de ambas fases. La fase acuosa tomó un color rojo fuerte, y la fase bencénica, después de algunos lavados con agua, quedó con su color original amarillo dorado.



4.16.- 2ª fase de extracción, reextracción y recuperación de los ácidos contenidos en el alpechín.-

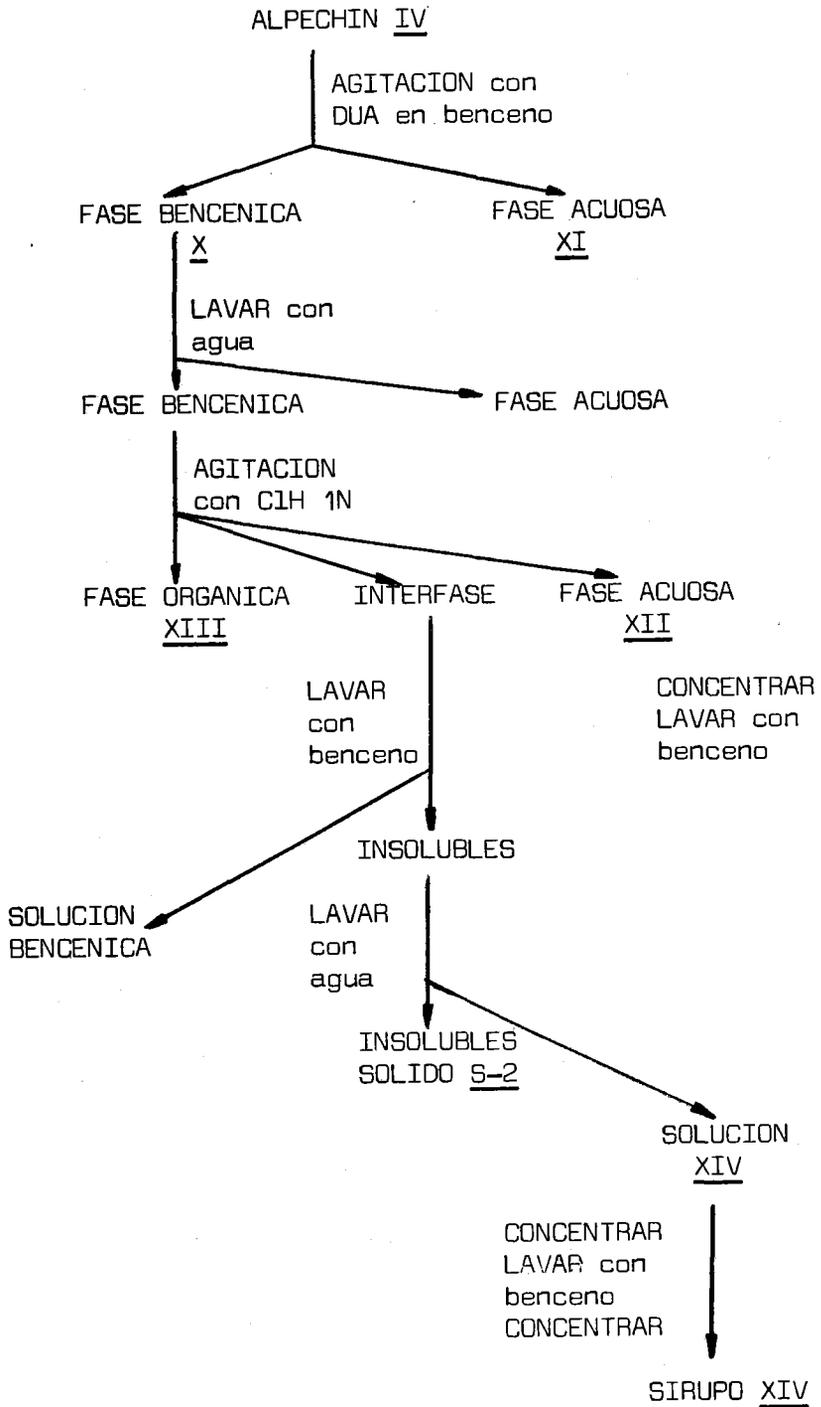
Utilizando la DUA libre obtenida tal y como se describe en el apartado anterior, se procede a una nueva extracción del alpechín ya extraído una vez (IV), seguida de los correspondientes procesos de reextracción y recuperación de los ácidos extraídos. Todas las operaciones se han llevado a cabo de forma similar a como se ha descrito en los apartados anteriores.

Después de agitar el alpechín con la solución bencénica de DUA, dejamos reposar, obteniendo por decantación una fase orgánica X y una fase acuosa XI.

La fase orgánica se lava con agua, y las aguas de lavado así obtenidas se agregan a XI. La fase orgánica, lavada y filtrada, se trata con 4 litros de ClH 1N, obteniéndose por decantación una fase orgánica XIII y una fase acuosa XII, presentándose, como en el primer proceso, la aparición de un precipitado en la interfase, que por sucesivos lavados con agua y benceno, da lugar a una solución acuosa XIV y a un insoluble S-2.

La solución acuosa XII, una vez concentrada a unos 500 ml, se lavó con benceno, incorporándose la solución bencénica obtenida a XIII.

El producto bruto resultante de esta extracción no ha sido fraccionado.



#### 4.17.- Extracción de los ácidos contenidos en la manzana.-

##### 4.17.1.- Obtención del zumo.-

El zumo de manzana se ha obtenido tomando 5 Kg - de las mismas, eliminando la parte central del fruto y troceándolas a continuación.

Los trozos se van introduciendo en una picadora eléctrica, añadiendo a la vez agua destilada. Se introdujo un total de 3 litros de agua destilada, obteniéndose una papilla que fué filtrada primero por papel jarabes y después por papel de filtro de porosidad normal. Obtenemos así aproximadamente 3,2 litros de zumo.

##### 4.17.2.- Purificación del zumo.-

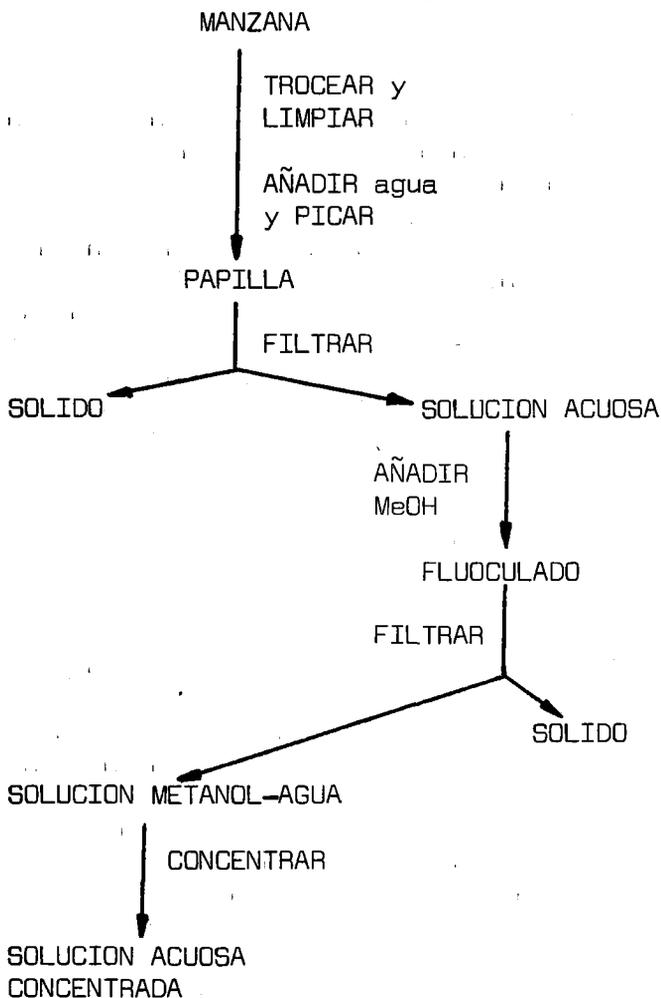
El mayor problema que se ha presentado en todas las anteriores extracciones con DUA es la aparición de precipitados al tratar las soluciones acuosas con las soluciones bencénicas de la mencionada DUA. Teniendo en cuenta que este precipitado era debido fundamentalmente a las pectinas que poseía la solución acuosa, comenzamos en esta extracción a aplicar un procedimiento de purificación con objeto de lograr una despectinización previa al tratamiento con DUA.

La totalidad de la solución acuosa anterior se trata con 4 litros de metanol, apareciendo de forma inmediata un gran precipitado con aumento de la temperatura de la nueva solución obtenida.

Después de filtrar a vacío obtenemos una solución acuosa-metanólica perfectamente transparente que concentramos en evaporador rotatorio a presión reducida hasta obte-

ner una solución acuosa de 600 ml.

El conjunto de las operaciones descritas queda reflejado en el siguiente esquema:



## 4.17.3.- Tratamiento con solución bencénica de DUA.-

Tomamos 300 ml de la solución acuosa obtenida en el apartado anterior y la tratamos con 1 litro de solución 0,1 M de DUA en benceno, agitando enérgicamente durante 15 minutos, apareciendo un gran precipitado, aunque en cantidad mucho menor que en anteriores extracciones.

Por decantación obtenemos una solución bencénica y otra acuosa, además un pequeño sólido ya filtrado que — despreciamos.

La solución acuosa se trata con otro litro de solución 0,1 M de DUA en benceno, agitando 15 minutos y dejando decantar, tardando mucho esta vez en separarse las dos fases, cosa que ocurre normalmente cuando hay poca cantidad de ácido presente en la fase acuosa.

Hemos obtenido por lo tanto dos soluciones bencénicas, que podemos llamar I y II, producto de la primera y segunda extracción de la solución original de la manzana, y nos queda una solución acuosa agotada en ácidos libres.

Las soluciones bencénicas han sido lavadas y filtradas como se describe en anteriores procesos.

LLamamos solución III a la fase acuosa extraída por segunda vez.

4.17.4.- Tratamiento con columnas de resinas de cambio aniónico.-

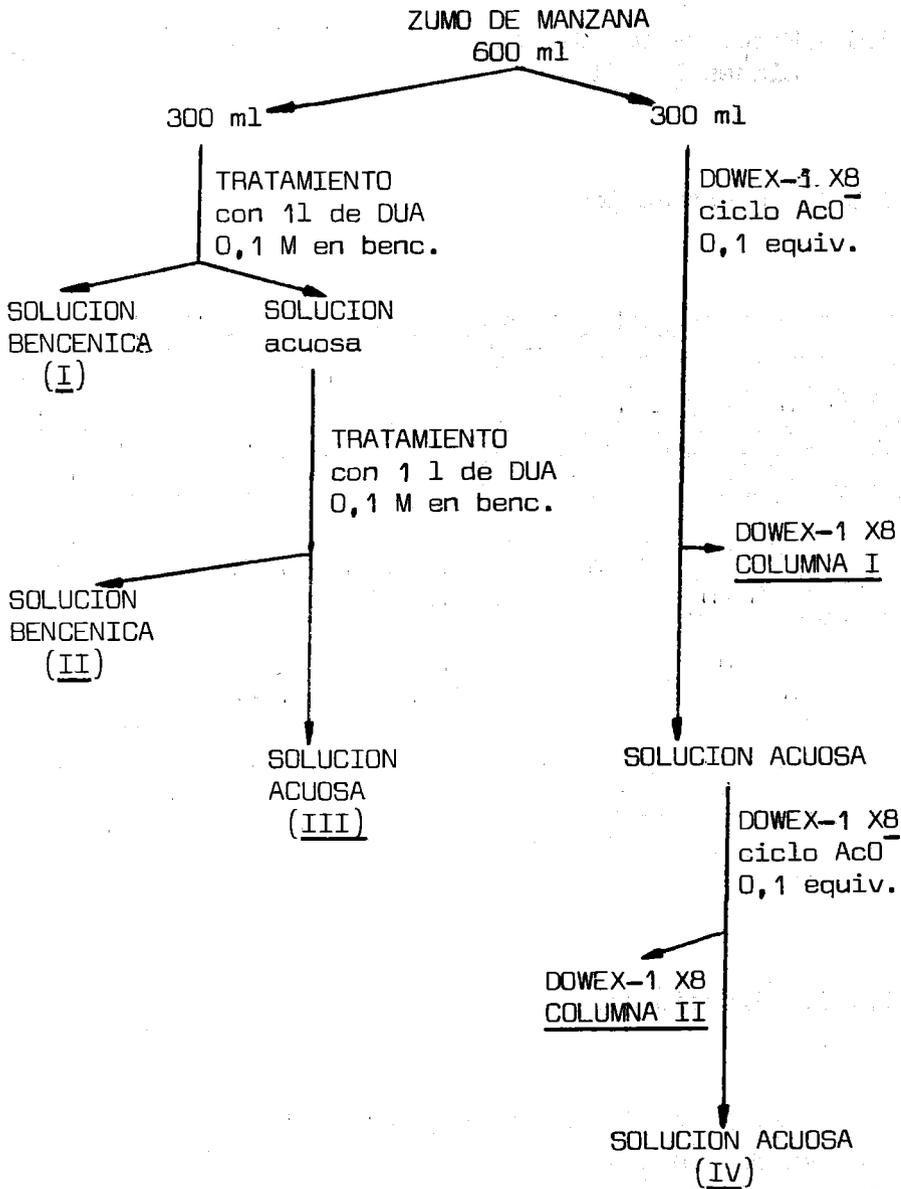
Hemos preparado resina sólida DOWEX-1X8, suministrada por la BDH, en ciclo acetato siguiendo la forma acostumbrada de hinchamiento y cambio.

Se ha tomado 100 mequiv. de resina en ciclo acetato convenientemente lavada y se ha introducido en una columna de vidrio Pyrex de 3 cm de diámetro por 70 de longitud.

La solución original obtenida de la manzana, en cantidad de 300 ml, se ha pasado a través de la columna mencionada, lavando a continuación con agua destilada hasta que el eluyente no tenga color ni presente reacción ácida. Llamaremos a esta columna de resinas COLUMNA I.

El eluato de la anterior columna se hace pasar a través de otra columna idéntica, que llamaremos COLUMNA II quedando una solución acusa que designaremos SOLUCION IV.

Hemos efectuado así un tratamiento similar al realizado en el apartado anterior, empleando en ambos casos mismo número de equivalentes de agente extractante y la misma cantidad de solución a extraer.



4.17.5.- Recuperación de los ácidos contenidos en las soluciones I y II.-

4.17.5.1.- Reextracción.-

La solución bencénica de DUA, que contiene los ácidos extraídos de la manzana por la citada amina, una vez purificada por lavados y filtración sobre papel, se agita con una solución acuosa de ClH. Tratamos la solución I con 1 litro de ClH 1 N, agitando fuertemente durante 15 minutos. Igual tratamiento se realiza sobre la solución II

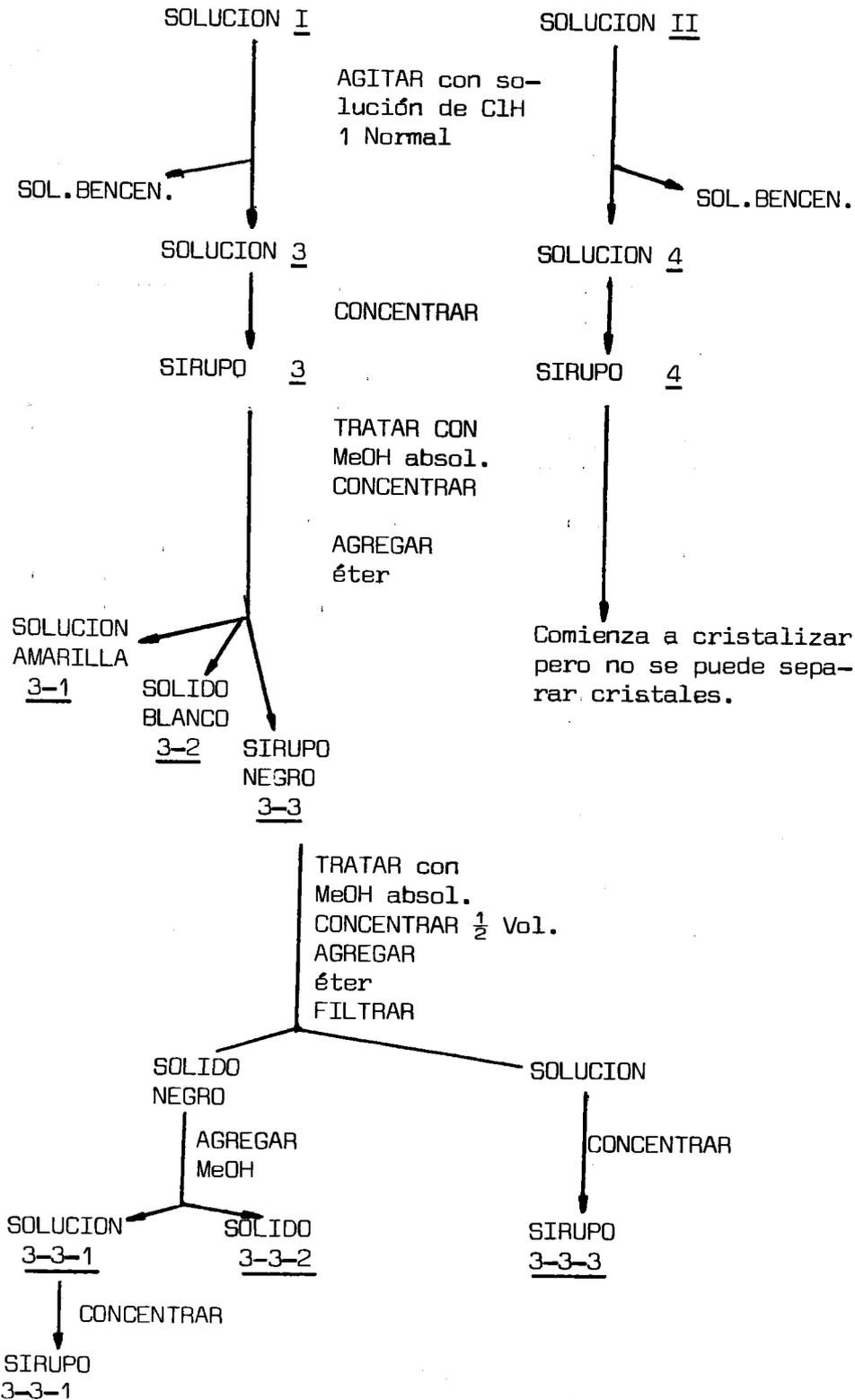
Pasado el tiempo necesario para la separación de las dos fases, se decanta, lavando con benceno la fase acuosa como en anteriores ocasiones.

Obtenemos dos soluciones acuosas, la solución 3 que proviene de la I y la solución 4 obtenida de II.

La concentración de ambas soluciones se realiza en evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose los sirupos 3 y 4. Estos sirupos se lavan repetidamente con benceno.

4.17.5.2.- Fraccionamiento.-

Se ha intentado un fraccionamiento de los productos contenidos en 3 y 4, sin conseguir aislar ningún producto puro. A continuación se indica lo realizado en un esquema.



4.17.6.- Recuperación de los ácidos contenidos en las columnas I y II.-

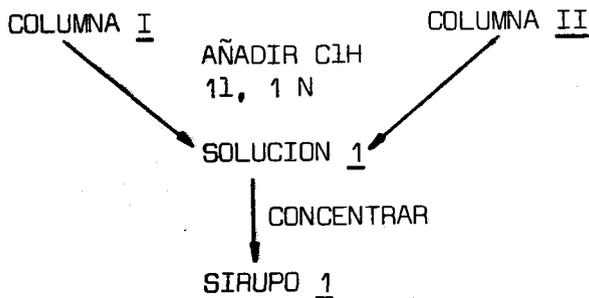
4.17.6.1.- Desplazamiento.-

Las columnas I y II, convenientemente lavadas, son tratadas cada una con 1 litro de solución acuosa de  $\text{ClH}$  1 N, con el objeto de desplazar los ácidos atrapados en las referidas columnas. Se lavan a continuación con agua destilada hasta que el eluyente no presente reacción ácida, juntando a continuación los eluatos de ambas columnas, que constituyen en conjunto la solución 1.

La solución 1 se concentra en evaporador rotatorio a presión reducida, y después de repetidos intentos de llevar a sequedad total, no se consigue más que obtener un sirupo oscuro, que por tratamiento con éter de la manera descrita en anteriores procesos comienza a cristalizar, pero no se puede conseguir separar los cristales del sirupo en que se encuentran.

4.17.6.2.- Fraccionamiento.-

En vista de los malos resultados obtenidos en los productos similares extraídos con la DUA, no se intenta en esta ocasión fraccionar la mezcla obtenida.



4.17.7.- Aislamiento de los ácidos de la manzana inicialmente en forma de sales.-

4.17.7.1.- Tratamiento con resinas catiónicas.-

La solución acuosa III, conteniendo las sales de ácidos orgánicos, ha sido pasada a través de una columna - conteniendo un exceso de resina catiónica Dowex-50 en ciclo  $H^+$ , con lo que se consigue transformar todas las sales existentes en ácidos libres.

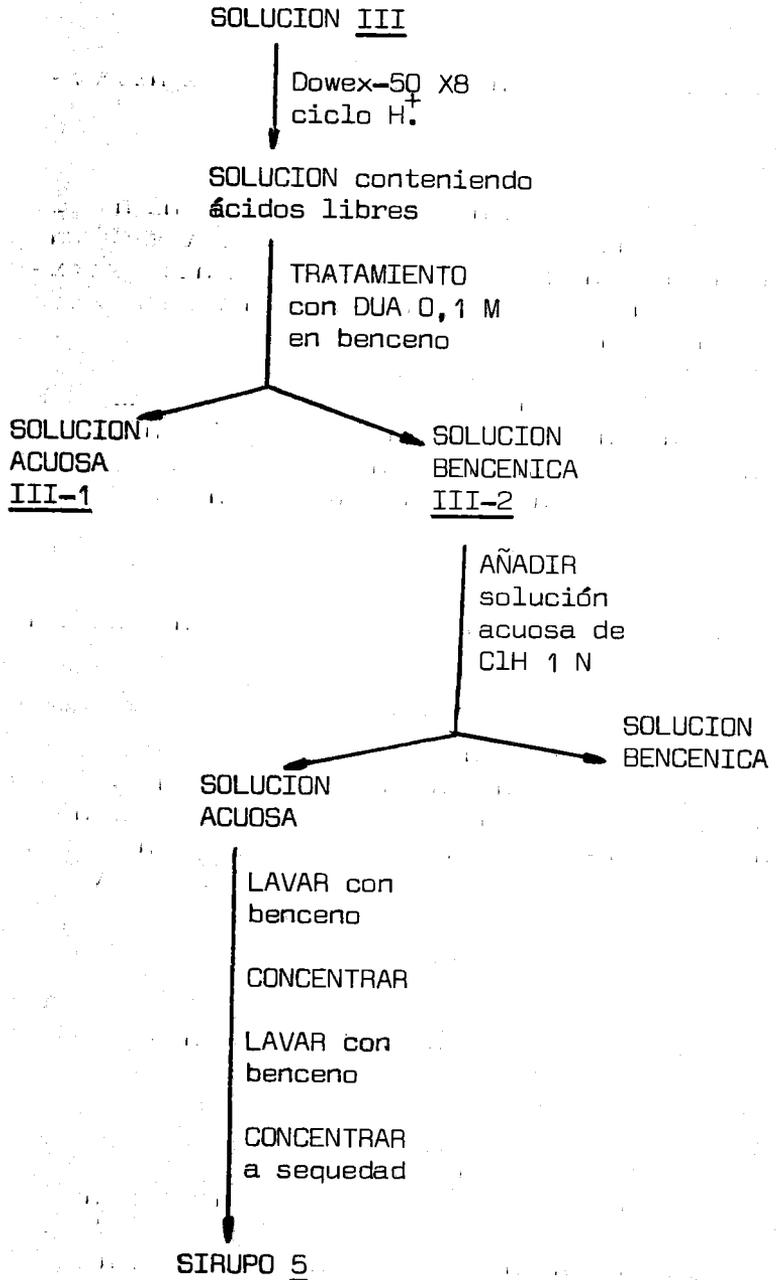
La resina se lava con agua destilada hasta que - el eluyente no de reacción ácida y el conjunto de la solución acuosa se concentra en evaporador rotatorio a presión reducida hasta un volumen final de unos 300 ml.

4.17.7.2.- Extracción de los ácidos con soluciones de DUA.-

La solución acuosa III, ya cambiada, se trata con 1 litro de solución bencénica de DUA 0,1 M. Después de 15 minutos de agitación se deja reposar, separándose por decantación una solución acuosa (III-1) y una solución bencénica (III-2) que se purifica por repetidos lavados con agua destilada y posterior filtración.

4.17.7.3.- Reextracción y recuperación.-

La solución bencénica III-2 se trata con 1 litro de solución acuosa de  $ClH$  1N, agitando durante 15 minutos, dejando reposar y separando las dos capas. La fase acuosa se lava con benceno, se concentra a presión reducida, se vuelve a lavar con benceno y se continúa concentrando hasta obtener el sirupo S, sobre el que se hicieron algunos - intentos de fraccionamiento sin resultado.



#### 4.18.- Extracción de los ácidos contenidos en la ciruela.-

##### 4.18.1.- Obtención del zumo.- Purificación.-

Se ha tomado 5 Kg de ciruela de color amarillo de la variedad conocida como " Japonesa", troceado mecánicamente, despreciando el hueso sólomente.

El peso de lo despreciado ha ascendido a 350 g.

La pulpa y la piel han sido picadas en batidora, añadiendo 200 ml de agua destilada. Ante la imposibilidad de ningún filtrado previo, se procedió a despectinizar directamente, añadiendo 7 litros de alcohol metílico, observando, como en anteriores ocasiones, un desprendimiento de calor.

Se ha obtenido una solución metanólica-acuosa de color amarillo oscuro, totalmente transparente después de filtrar, primero en filtro de pliegues y después a vacío en kitasato y buchner.

La solución acuosa se concentra en evaporador rotatorio a presión reducida hasta conseguir un volumen final de 750 ml.

Se han reservado 50 ml para realizar diversas pruebas. La valoración de acidez total, empleando fenolf-taleina como indicador, nos da un valor aproximado de 0,7N

##### 4.18.2.- Tratamiento con soluciones bencénicas de DUA.-

A 350 ml de la solución acuosa de los ácidos de la ciruela se le añadió solución bencénica de DUA 0,1 M. Para ello se dividió la solución acuosa en dos porciones iguales de 175 ml cada una, añadiendo a cada porción 1 litro de solución 0,1 M de DUA en benceno, agitando a conti-

nuación durante 15 minutos.

Después de un tiempo de reposo, se separan las - fases acuosa y bencénica. Esta última se lava y filtra, - resultando una solución limpia y transparente de cada una de las dos extracciones. Las designaremos con las siglas - CI y CII.

Las soluciones acuosas resultantes se reúnen y - tratan con 1 litro de DUA 0,1 M en benceno, obteniéndose - otra solución bencénica por el mismo procedimiento, que - llamaremos CIII, y quedando una solución acuosa resultante

La solución acuosa resultante es tratada ahora - con 0,3 equivalentes de solución de DUA 0,1 M en benceno, con lo que obtenemos otra solución bencénica que denomina- remos CIV.

Nos queda una solución acuosa agotada en ácidos, llamada CV.

El objeto de realizar las extracciones de la for- ma descrita es lograr una buena extracción y manejar poca cantidad de DUA, ya que la utilizada en una extracción sir- ve para la siguiente, una vez llevado a cabo el proceso de reextracción, que expongo en otros apartados para mayor - claridad, y tratamiento posterior del clorhidrato de DUA de la manera expuesta en el apartado 4.15 de esta Tesis.

#### 4.18.3.- Tratamiento con resinas de cambio aniónicas.-

Hemos empleado resina sólida Dowex-1 X8, sumis- trada por la BDH y puesta en ciclo -OH y lavada a la mane- ra usual, preparándose a continuación columnas con 0,1 e - equivalente cada una.

El tratamiento se ha efectuado sobre 350 ml de - la solución original, esto es, del zumo de ciruela concen- trado, misma cantidad que la utilizada en el apartado ante- rior en el caso de la DUA.

Se ha dividido el zumo en dos porciones de 175 - ml cada una, haciendo pasar cada porción por una columna

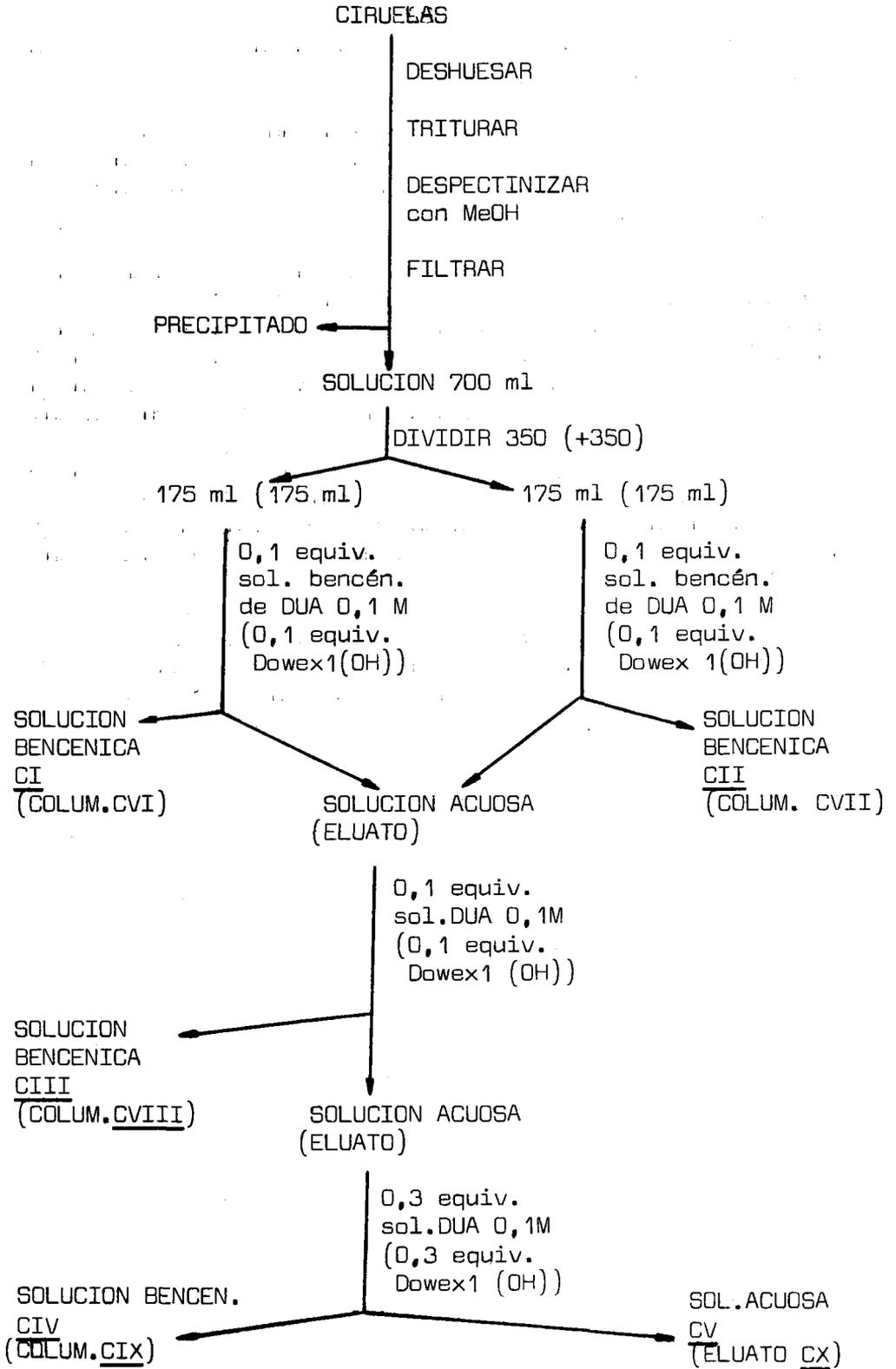
de las preparadas anteriormente, conteniendo 0,1 equivalente de resina en ciclo -OH.

Las columnas se lavan a continuación con 5 litros de agua destilada, 1 litro de metanol y posteriormente con 2 litros de agua destilada. Obtenemos así dos columnas que poseen ácidos en su interior, y que llamaremos CVI y CVII.

Los eluatos de las dos columnas se reúnen, con -centran a volumen original y se hacen pasar a través de -una tercera columna conteniendo 0,1 equivalente de resina en ciclo -OH. La columna se lava de igual manera que en el caso anterior y obtenemos así la columna CVIII y el conjunto del eluato, que vuelve a concentrarse a volumen original

El eluato se hace pasar por una cuarta columna - que contiene 0,3 equivalentes de resina en ciclo -OH, se lava convenientemente la columna y se obtiene así la columna CIX y la solución acuosa, concentrada a volumen original, CX.

La extracción con columnas resulta muy difícilo sa debido a los grandes volúmenes que hay que manejar y a los procesos de concentración de soluciones que efectuar.



4.18.4.- Reextracción y recuperación de los ácidos contenidos en CI, CII, CIII y CIV.-

Cada una de las soluciones bencénicas CI, CII, CIII y CIV se tratan con 1 litro de solución acuosa de ClH 1 Normal, manteniendo a continuación un periodo de agitación de 15 minutos.

Después de un tiempo de reposo, se separan las fases acuosas de las correspondientes fases bencénicas, obteniendo así las soluciones acuosas CXI, CXII, CXIII y CXIV.

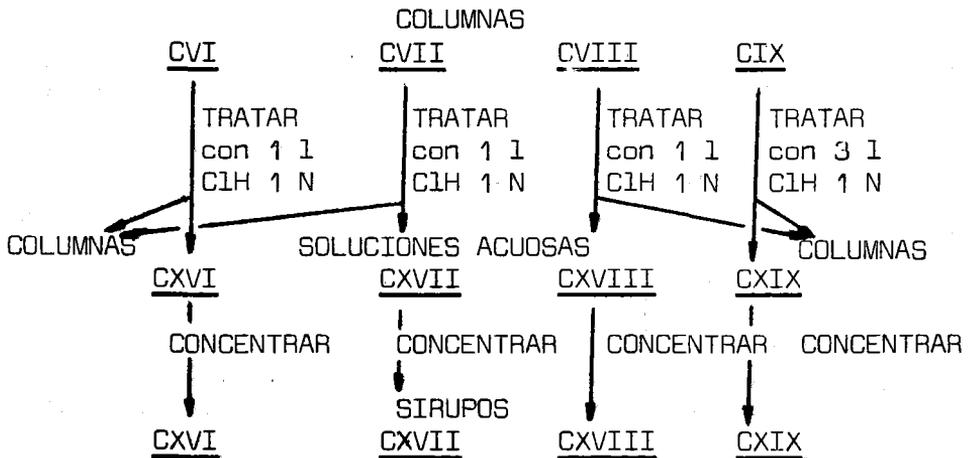
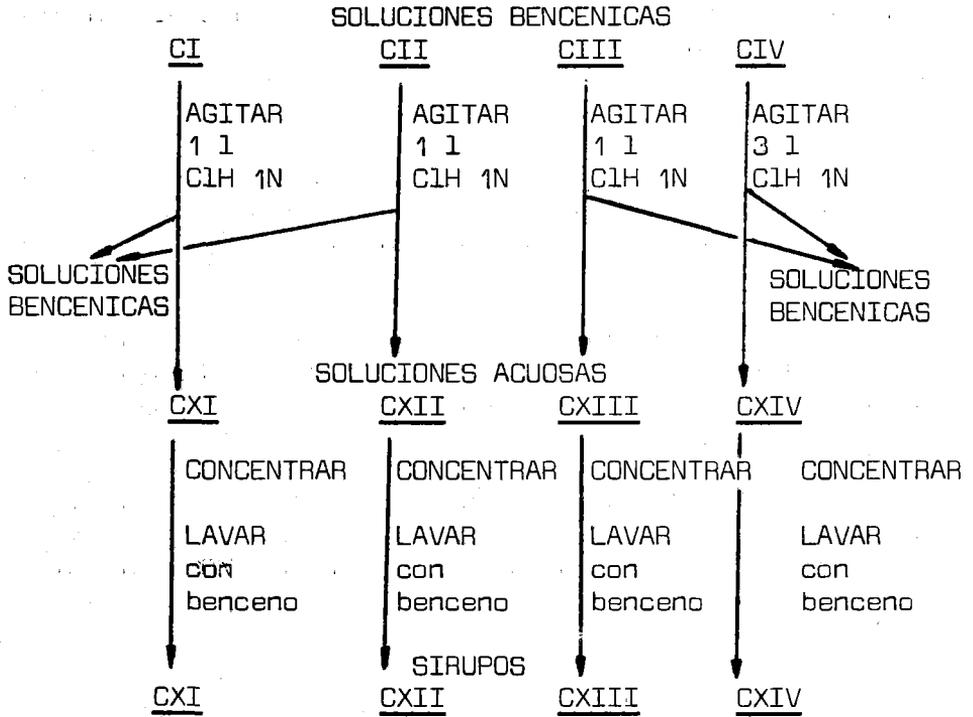
Las soluciones acuosas se lavan con benceno, concentran en evaporador rotatorio a presión reducida y vuelven a lavarse con benceno, para continuar concentrando a continuación la solución acuosa hasta la mayor sequedad posible.

Hemos obtenido los sirupos CXI, CXII, CXIII y CXIV, que en un intento de obtener compuestos sólidos se trataron con metanol absoluto, acetona seca y alcohol etílico, intentando cristalizaciones que nunca fueron completas, no pudiendo separar los cristales formados de los sirupos en los que se formaron.

4.18.5.- Desplazamiento y recuperación de los ácidos contenidos en las columnas CVI, CVII, CVIII y CIX.-

Se ha seguido un tratamiento análogo al efectuado en el apartado anterior, tratando todas y cada una de las columnas con 1 litro de solución acuosa de ClH 1 N, lavando a continuación con agua destilada hasta que el eluyente no tenga acidez. Obtenemos así las soluciones acuosas CXVI, CXVII, CXVIII y CXIV, que son concentradas hasta dar respectivamente los sirupos de la misma denominación.

Los sirupos se trataron en la forma que los anteriores para intentar una cristalización, obteniéndose resultados igualmente negativos.



4.18.6.- Tratamiento de las soluciones V y X con columnas de cambio catiónicas.-

Las soluciones acuosas CV y CX, conteniendo ácidos orgánicos en forma de sales, son pasadas, independientemente, a través de sendas columnas de resina sólida DO - WEX-50 X8, ciclo  $H^+$ , con el fin de romper las citadas sales y dejar los ácidos en libertad.

Se ha empleado un gran exceso de resina catiónica con el objeto de asegurar un completo cambio.

En ambos casos se ha lavado la columna con agua destilada hasta que el eluyente no contenga acidez alguna, concentrando después el eluato hasta volumen inicial.

Mediante este tratamiento obtenemos la solución acuosa CXV a partir de la solución CV y la solución CXX a partir de la CX.

4.18.7.- Extracción con DUA de los ácidos inicialmente en forma de sales.-

La solución acuosa CXV se somete a extracción con 3 litros de solución 0,1 M de DUA en benceno, de la forma usual, y a la solución acuosa resultante se le vuelve a procesar con 3 litros de solución 0,1 M de DUA en benceno. El total de la solución bencénica del primer proceso lo denominamos CXXI y a la solución bencénica resultante del segundo la llamamos CXXII.

Las referidas soluciones bencénicas se tratan con 1 litro de ácido clorhídrico 3 N cada una, agitando en la forma usual, obteniéndose de esta forma las soluciones acuosas de reextracción números CXXIII y CXXIV, que debidamente lavadas con benceno y concentradas nos dan los sirupos de igual denominación.

4.18.8.- Extracción con resinas de cambio aniónico de los ácidos inicialmente en forma de sales.-

La solución CXX, obtenida con intervención de resinas catiónicas en ciclo hidrógeno, es pasada a través de 2 columnas de Dowex-1 X8, ciclo -OH, conteniendo cada una 0,3 equivalentes de la citada resina.

La resina se lava a continuación con agua destilada, metanol y agua destilada de nuevo, eluyendo a continuación cada una de las columnas con 1 litro de ClH 3,N, - lavando con agua destilada hasta no encontrar ácida el agua de lavado.

Reunimos el eluato de las dos columnas y obtenemos la solución acuosa CXXV, que por concentración en evaporador rotatorio a presión reducida nos da un sirupo denominado CXXV.

El sirupo CXXV se intentó fraccionar y cristalizar sin resultado.



4.19.- Cromatografías en papel y capa fina de los productos extraídos de la manzana y ciruela.-

Se ha realizado un gran número de cromatografías en papel de los ácidos contenidos en los extractos de ciruela y manzana, tanto en lo que se refiere a los realizados con soluciones de DUA como a los efectuados con resinas Dowex-1.

El procedimiento seguido ha sido, para las cromatografías en papel, el descrito por BUCH, DRYDEN y HILLS (33), utilizando papel Whatmans Nº1 y diversos líquidos de desarrollo y visualizadores.

Líquidos de desarrollo:

Nº1 Alcohol n-amílico/ ácido fórmico 5M (1/1)

Nº2 Alcohol n-butílico/ácido acético/ agua(4/1/5)

Nº3 Alcohol etílico/amoniaco/agua (20/1/4)

Visualizadores:

Nº1 Anhidrido acético/piridina (a.a. 10% en pir.) calentando a 100°C durante 5 minutos.

Nº2 Vanadato amónico, solución acuosa saturada.

Nº3 Nitrato cérico-amónico al 2% en nítrico 1 N.

Nº4 Nitrato de plata amoniacal.

Nº5 Cloruro férrico, solución acuosa al 1%.

Los cromatogramas se observaron después de realizar la aspersion a la luz visible y ultravioleta no filtrada y a las 24 horas bajo luz visible y ultravioleta.

Las cromatografías fueron en todos los casos descendentes y se realizaron en cámara saturada de vapor a temperatura ambiente( 24°C al comenzar las cromatografías)

teniendo en cuenta que en todos los casos se utilizaron patrones para comparación.

La conclusión sacada de estas cromatografías es que, tanto en el caso de la manzana como en el de la ciruela, si no se realiza un fraccionamiento previo tal y como realizan los autores anteriormente citados, es muy difícil asegurar la presencia de tal o cual ácido en la mezcla, — salvo el caso, también en ambas ocasiones, del ácido málico que puede detectarse debido a la gran cantidad que de él existe en las muestras analizadas.

Los cromatogramas, sea mayor o menor la cantidad de muestra tomada, son una continua cola con débiles aumentos de intensidad de respuesta en algunas zonas, lo que hace muy aventurado el asegurar la presencia de determinados ácidos.

Sólo podemos dar como positivo:

Manzana, ácido málico  
Ciruela, ácido málico

habiendo encontrado estos dos ácidos en todas las fracciones obtenidas de ambos frutos excepto en 3-3-2 de la manzana.

#### 4.20.- Cromatografía gas-líquido.-

La cromatografía gas-líquido de los productos -- aislados del limón, uva, manzana, ciruela y 1ª y 2ª extracción del alpechín de la aceituna, dada la escasa volatilidad de los mismos, se ha llevado a cabo previa transformación en ésteres metílicos y TMS derivados, efectuando con estos últimos el análisis cuantitativo.

##### 4.20.1.- Cromatografía gas-líquido de ésteres metílicos.-

###### 4.20.1.1.- Preparación de diazometano.-

La obtención del diazometano necesario para la formación de ésteres metílicos de los ácidos se ha llevado a cabo a partir de N-nitroso,N-metil-urea sintetizada en nuestros Laboratorios según el procedimiento normal descrito en (148)

Punto de fusión de la N-nitroso,Nmetil urea obtenida: 124-125°C.

Da satisfactoriamente la prueba de solubilidad - en metanol hirviente.

Obtención de diazometano: Se ha seguido en esencia el procedimiento abreviado de ARNDT(149), aunque alterándolo en algunos aspectos. Se ha preparado una mezcla -- frigorífica hielo-sal y en ella se ha dispuesto de un ma - traz y agitador magnético, introduciendo a continuación la cantidad prevista de éter dietílico y N-nitroso,N-metil-u-rea. Una vez enfriado todo el conjunto, se ha ido añadiendo poco a poco una solución saturada de KOH en agua, enfriada previamente a -30°C. La solución etérea, saturada de diazometano, se ha decantado y hecho pasar a través de un fil - tro de pliegues, introduciéndola en un erlenmeyer, provisto de tapón de ajuste, que contiene abundante cantidad de lentejas de KOH, almacenándose a continuación en congela - dor

Las soluciones etéreas de diazometano se mantienen sobre KOH y en congelador por lo menos 12 horas antes de usarse, pudiendo mantenerse en frío perfectamente durante un periodo elevado de tiempo.

#### 4.20.1.2.- Preparación de patrones de ésteres metílicos.-

Se ha seguido el procedimiento de McKEOWN y READ (122) a 25°C ya descrito en la parte teórica, empleando metanol absoluto MERCK y las soluciones etéreas de diazometano preparadas por nosotros.

Una vez obtenidos los ésteres metílicos se evaporan los disolventes en corriente de N<sub>2</sub> seco y se disuelven en acetona, tomándose de esta solución la muestra para inyectar en el cromatógrafo.

Los ácidos empleados como patrón son todos de pureza R.A. ó similares de las casas MERCK, ALDRICH, BDH, SIGMA y FEROSA, comprobándose los ésteres metílicos obtenidos por espectroscopía IR.

Se ha preparado una cantidad apreciable de citrato de metilo, obteniéndose cristales que se han lavado con agua destilada y recristalizado en cloruro de metileno — éter dietílico.

P. de fusión del citrato obtenido 78°C.

Acidos esterificados: Acético, pirúvico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, succínico, fumárico, málico, glutárico, adípico, salicílico, alcanfórico, amigdólico, tricarbálico, aconítico, alfa-cetoglutárico, ftálico tartárico y cítrico.

4.20.1.3.- Esterificación de las fracciones aisladas de los productos naturales.-

La esterificación de las diversas fracciones se ha llevado a cabo según un proceso similar al efectuado con los ácidos patrón.

Cada una de las fracciones se ha disuelto en alcohol metílico absoluto, añadiendo a continuación la solución etérea de diazometano ( 25 ml por cada 10 mg de muestra).

Surge el problema de la aparición de precipitados en la mayor parte de las fracciones a esterificar al agregar la solución etérea de diazometano. Añadiendo nuevas porciones de alcohol metílico se logra paliar este inconveniente.

Al cabo de 1 hora, se introducen las soluciones etéreas en una vitrina que posea buena ventilación para ir eliminando paulatinamente el diazometano y el éter, empezando además a pasar una corriente de nitrógeno seco a través de cada una de las soluciones. Concentramos hasta dejar reducido el volumen a unos 3-4 ml. momento en que ya la solución es exclusivamente metanólica y puede conservarse en frigorífico hasta el momento de usarse.

Cuando se haya de inyectar en el cromatógrafo, se termina de eliminar el metanol a vacío a temperatura ambiente o bien por corriente de nitrógeno seco y se disuelve el resto en acetona seca, estando listo para realizar la inyección en el cromatógrafo de gases. En algunos casos concretos se prefiere disolver en cloruro de metileno, por ser un excelente disolvente de estos compuestos, aunque siempre tratará de evitarse debido a los efectos nocivos de los disolventes halogenados sobre las columnas metálicas y soportes silanizados.

Las fracciones sometidas a metilación son las siguientes: S-1-3; S-1-4; S-1-2-1; S-1-2-2; VIII-1; VIII-2-2; VIII-2-3; IX-1; IX-2; IX-3; VIII-3-1; R<sup>2</sup>-2; VIII-3-3-1; VIII-3-3-2; VIII-3-4-1; VIII-3-4-2; LIMON; UVA FER; UVA; M-1; M-2; M-3-1y2; M-3-3; M-4; M-5; CXVI; CXVII; CXVIII; —

CXIX; CXI; CXII; CXIII; CXIV; CXXIII; CXXIV.

4.20.1.4.- Aparatos utilizados, columnas condiciones de —  
trabajo. Tiempos de retención de los patrones —  
utilizados.-

Hemos empleado diversos cromatógrafos de gases,  
utilizando columnas diferentes y condiciones de trabajo —  
también diferentes.

Como prueba preliminar de los análisis de estos  
compuestos se trabajó en un aparato Perkin-Elmer F-21, con  
las características y en las condiciones que se indican:

Detectores de ionización de llama, control inde-  
pendiente de la temperatura de inyectores y detectores. Ca-  
rece de programación lineal de temperatura, equipado con —  
divisor de flujo a la salida de la columna, no existiendo  
posibilidad de utilización de sistema de doble columna.

Columna: Dos columnas en U de 90 cm cada una ins-  
taladas en serie, de acero inoxidable tratado interiormente.  
Diámetro interno 8mm. Diámetro externo 9,5 mm. Relleno  
de BUTANODIOLSUCCINATO (LAC-6-R860) al 5% en CHROMOSORB-G  
de 60/80 mallas.

Gas portador: Nitrógeno, con un flujo a través de  
de columna, medido a 150°C, de 140 ml/min.

Detector de ionización de llama, con un flujo de  
hidrógeno de 35 ml/min, flujo de aire de 350 ml/min y flu-  
jo de gas portador a través de él de 10 ml/min. Temperatu-  
ra de detector 220°C.

Temperatura de inyector: 270°C

Registro: L & N Speedomax. Velocidad 0,5 pulgadas  
por minuto.

Tiempos de retención de los ésteres metílicos de los siguientes ácidos en esta experiencia y a las temperaturas que se indican:

ACIDO	a 150°C	a 170°C
TIEMPOS DE RETENCION EN MINUTOS		
PIRUVICO	0,4	1,0
LACTICO	0,6	0,9
OXALICO	0,8	1,3
GLICOLICO	1,0	1,4
MALONICO	1,25	1,9
SUCCINICO	1,75	2,75
GLUTARICO	2,45	4,3
MALICO	8,0	13,6
TRICARBALILICO	14,5	28,0
ACONITICO	15,3	31,0
TARTARICO	16,5	35,0
CITRICO	32,5	69,5

Los tiempos de retención están tomados teniendo en cuenta el tiempo muerto que invierte el gas en recorrer la columna y que se considera igual al invertido en hacerlo el frente del disolvente.

El estudio definitivo de los ésteres metílicos - se realizó con otro aparato más adecuado, empleando columnas distintas y en otras condiciones totalmente diferentes

Aparato utilizado: Carlo Erba modelo FractovapGV provisto de control independiente de temperaturas en el inyector y detector. Inyección directa en cabeza de columna, pudiendo trabajar con sistemas de doble columna. Detector de ionización de llama. Provisto de módulo para programación lineal de temperatura, con enfriamiento automático.

Columna empleada: Columna en U de acero inoxidable tratada interiormente, de 2 metros de longitud y 5 mm - de diámetro interno. Relleno de DIETILENGLICOLSUCCINATO - (LAC-728) al 20% en CHROMOSORB W (AW- 60/80 mallas)

Gas portador: Nitrógeno N-47, con un flujo a través de la columna de 140 ml/min medido a 150°C.

Repartidor de caudal a la salida de la columna, enviando 90 ml/min al detector y el resto al exterior.

Bloque de inyectores a 270°C

Detector de ionización de llama a 300°C. Con un flujo de hidrógeno de 40 ml/min y un flujo de aire de 300 ml/min.

Registrador L&N Speedomax WLN, con 2,5 mV a toda la escala. Velocidad del papel 0,5 pulgadas/minuto.

Sensibilidad del amplificador a que se ha trabajado: 100x4 - 100x64.

Temperatura de columnas: Se ha trabajado con programación lineal de temperatura 150-200°C con una relación de calentamiento de 3,5°C/min, trabajando isotérmicamente a 200°C una vez terminado el programa.

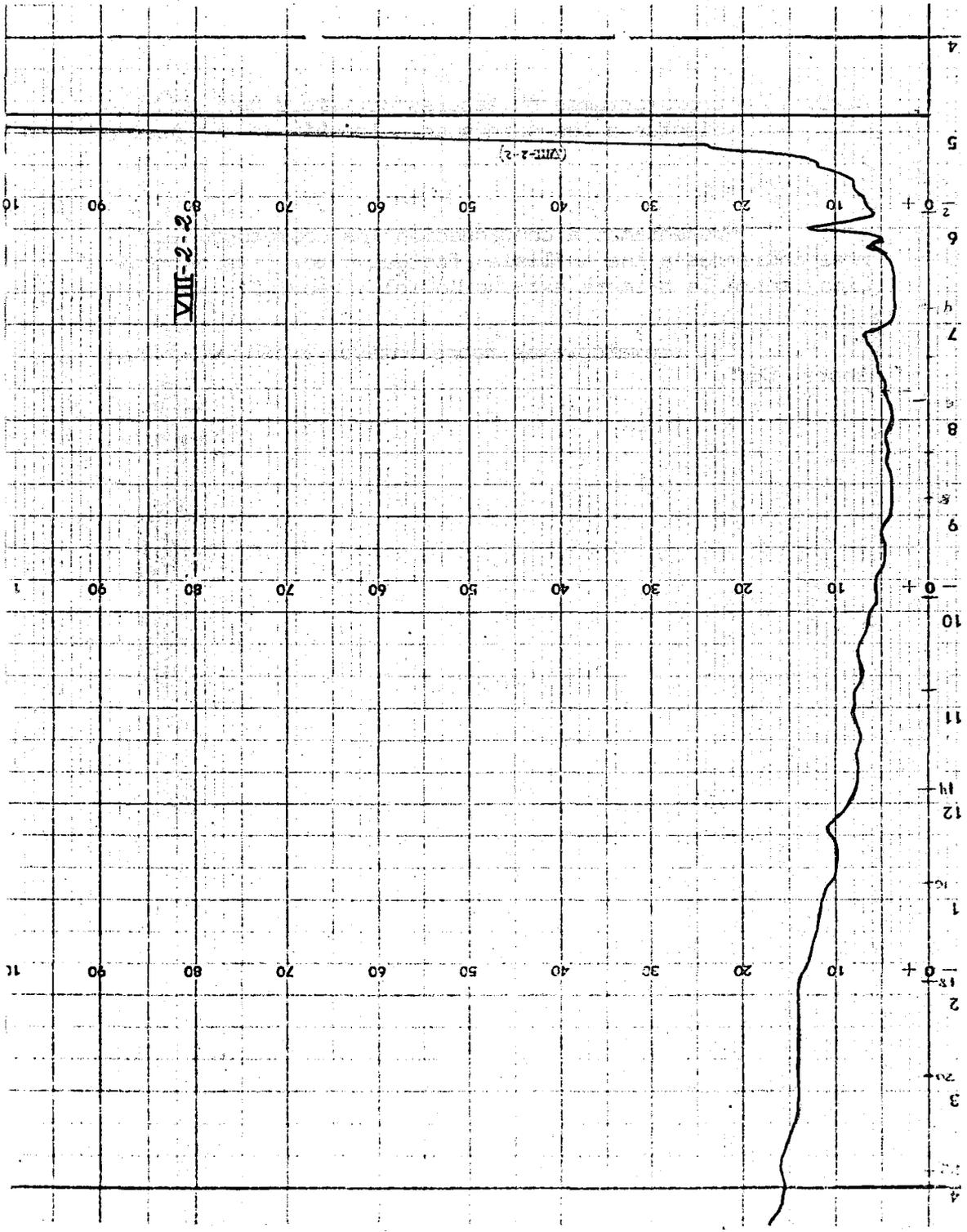
Los tiempos de retención se han tomado a partir del frente del disolvente, es decir, no teniendo en cuenta el tiempo muerto propio de la columna empleada. Estos tiempos pueden transformarse en distancias  $d$  teniendo en cuenta la velocidad del papel del registrador.

<u>ACIDO</u>	<u>TIEMPO DE RETENCION</u>
PIRUVICO	1,3
LACTICO	1,65
GLICOLICO	2,6
OXALICO	3,0
MALONICO	4,5
FUMARICO	5,0
SUCCINICO	5,5
GLUTARICO	7,2
SALICILICO	8,4
ADIPICO	9,5
MALICO	14,9
ALFA-CETOGLUTARICO	16,5 y 18,3
AMIGDALICO	19,9
ACONITICO	20,0
TRICARBALILICO	20,0
FTALICO	23,2
TARTARICO	28,0
CITRICO	32,0

4.20.1.5.- Cromatogramas de ésteres metílicos correspondientes a los ácidos del alpechín 1ª extracción.-

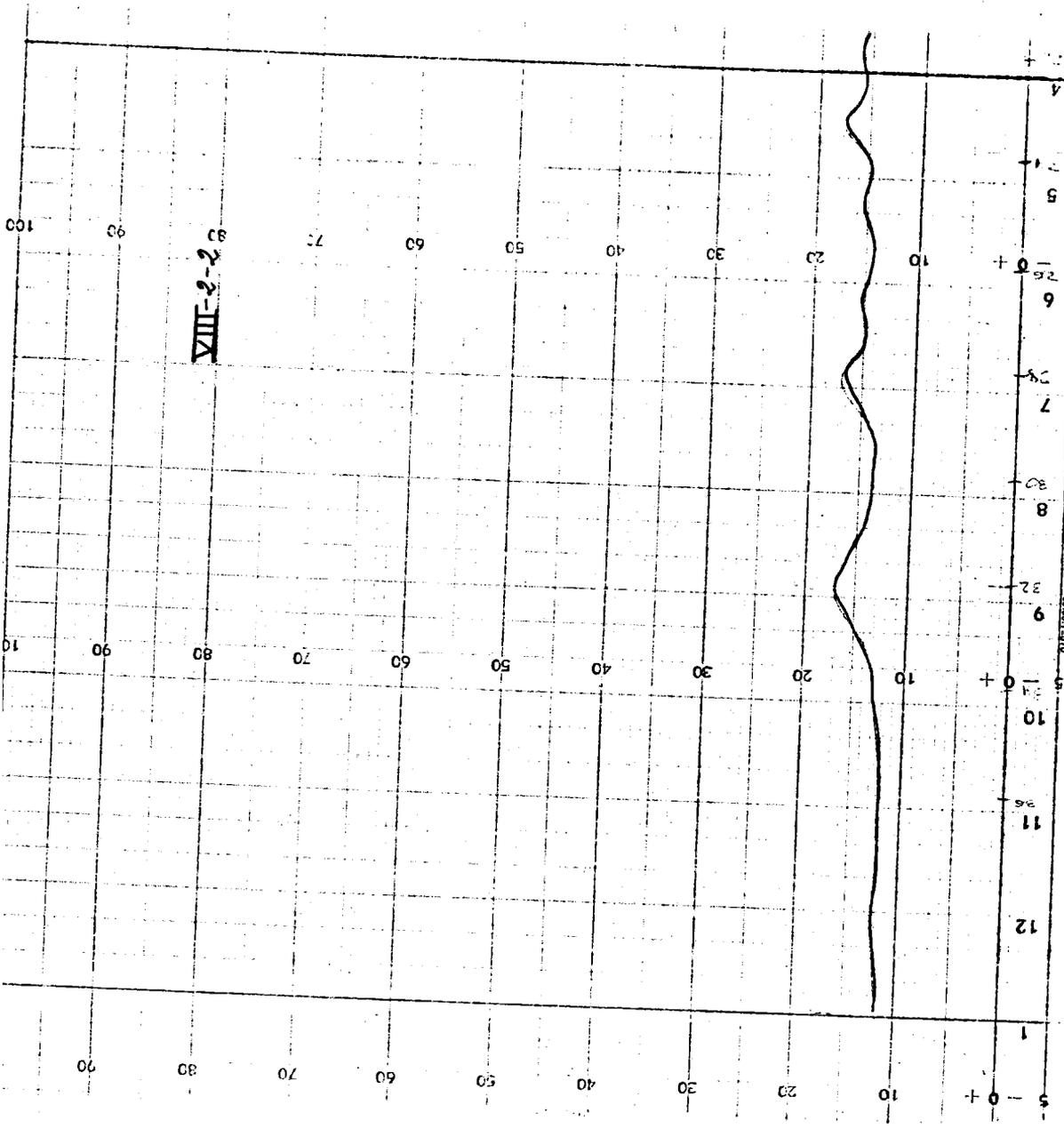
Presentamos a continuación los cromatogramas correspondientes a los análisis efectuados por ésteres metílicos sobre la primera extracción del alpechín.

Los cromatogramas representados están realizados sobre DEGS.

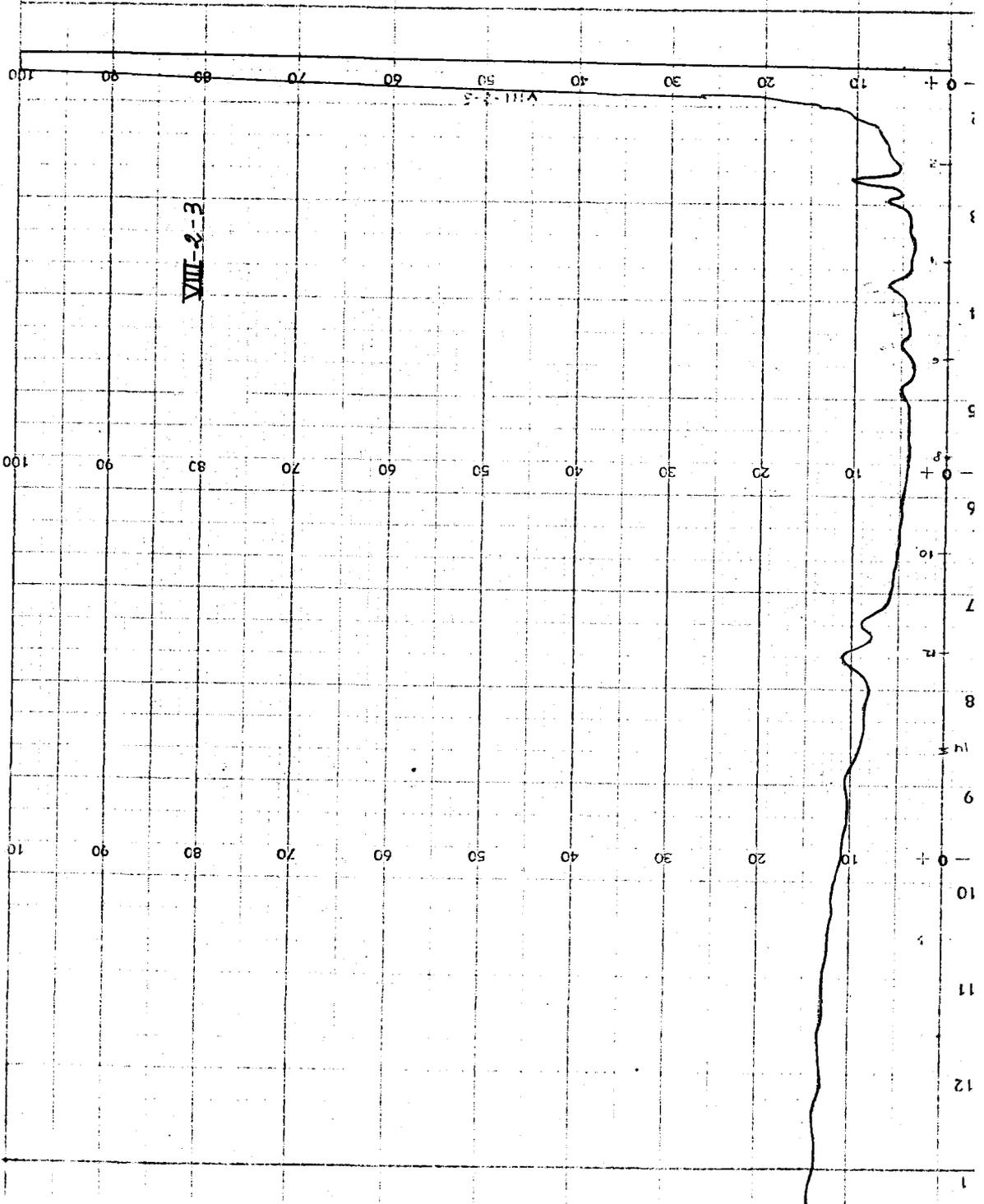


4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100

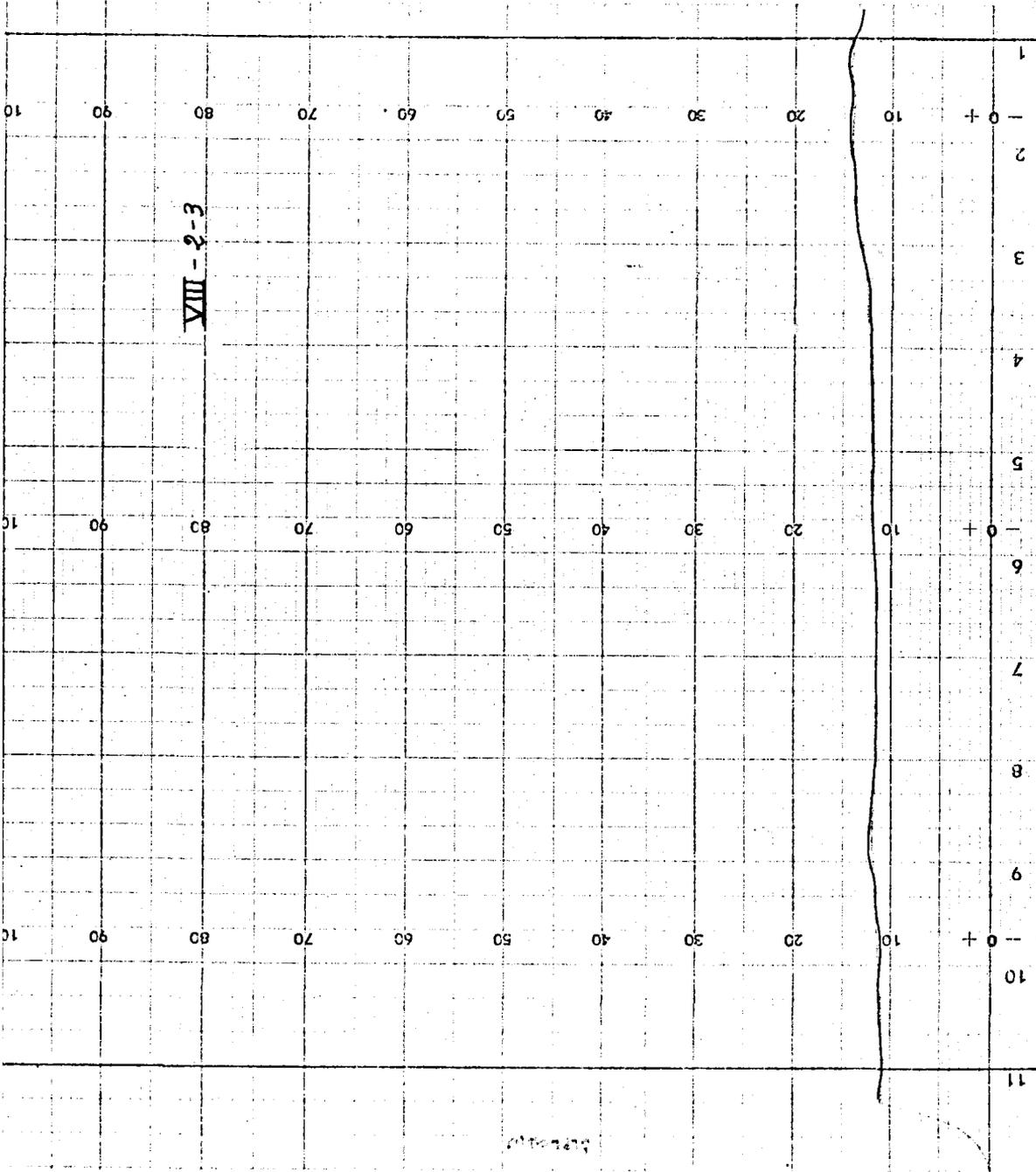


VIII-2-2-2-III



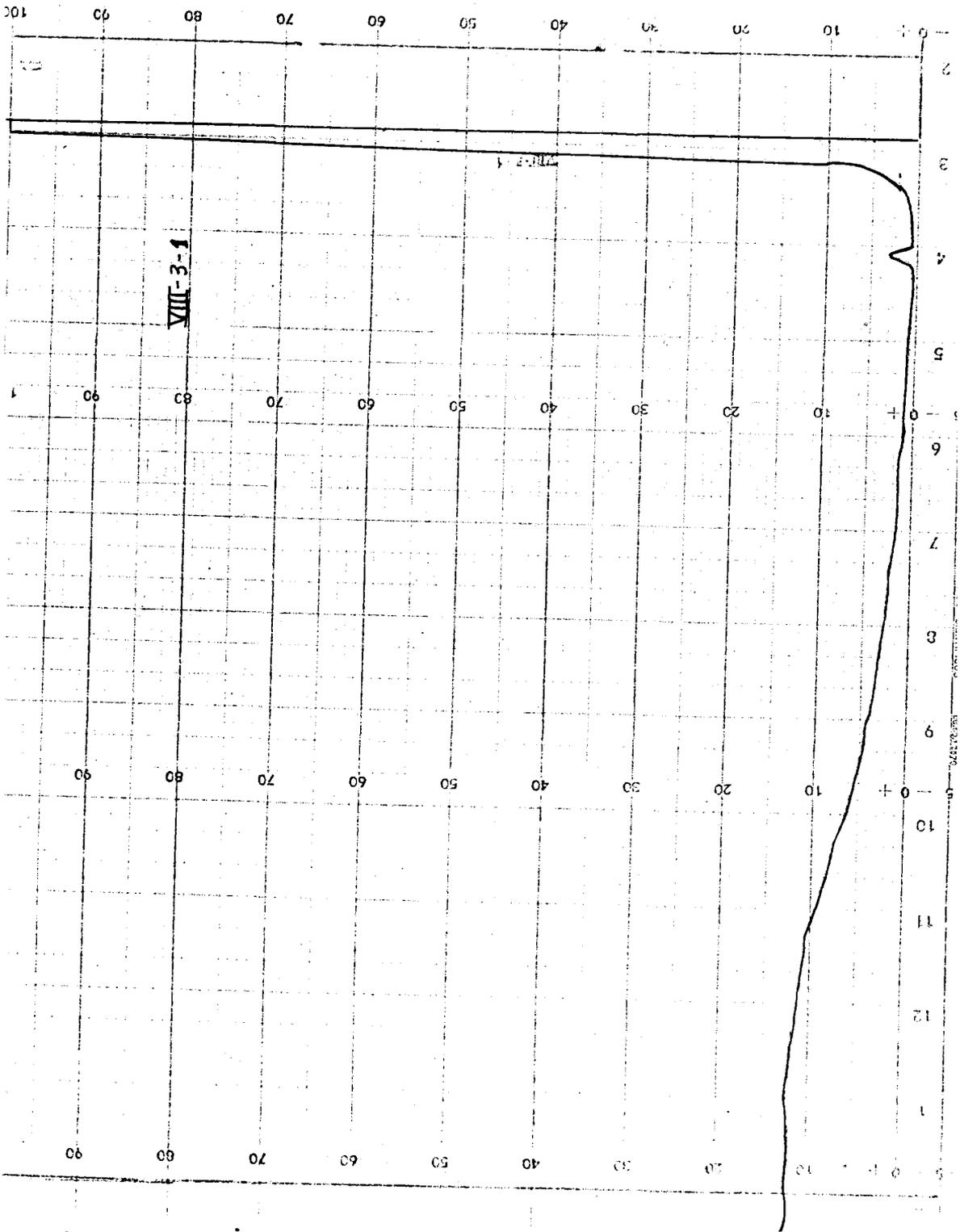
VIII-2-3

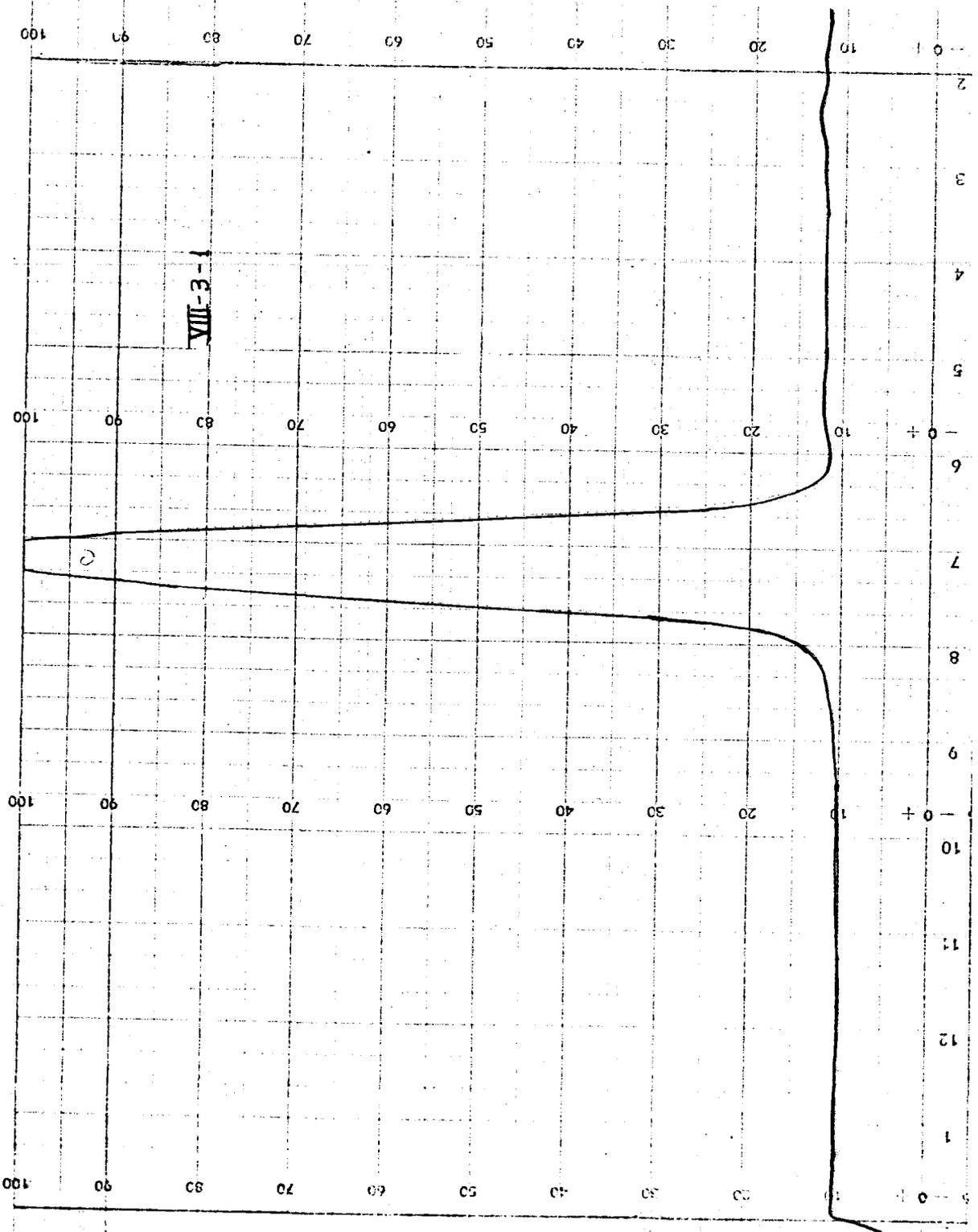
WILLIAMS



VIII - 2-3

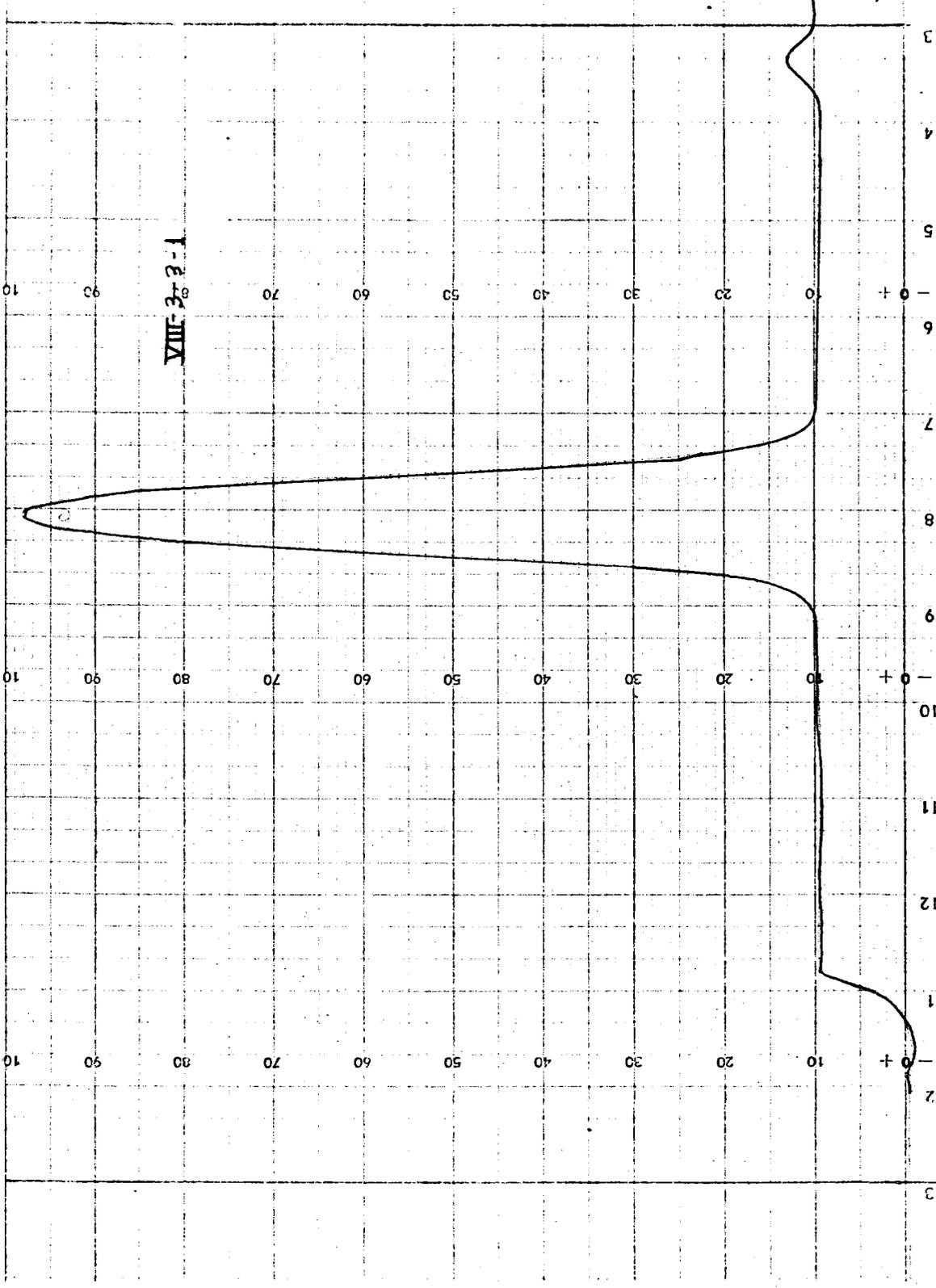
635412372



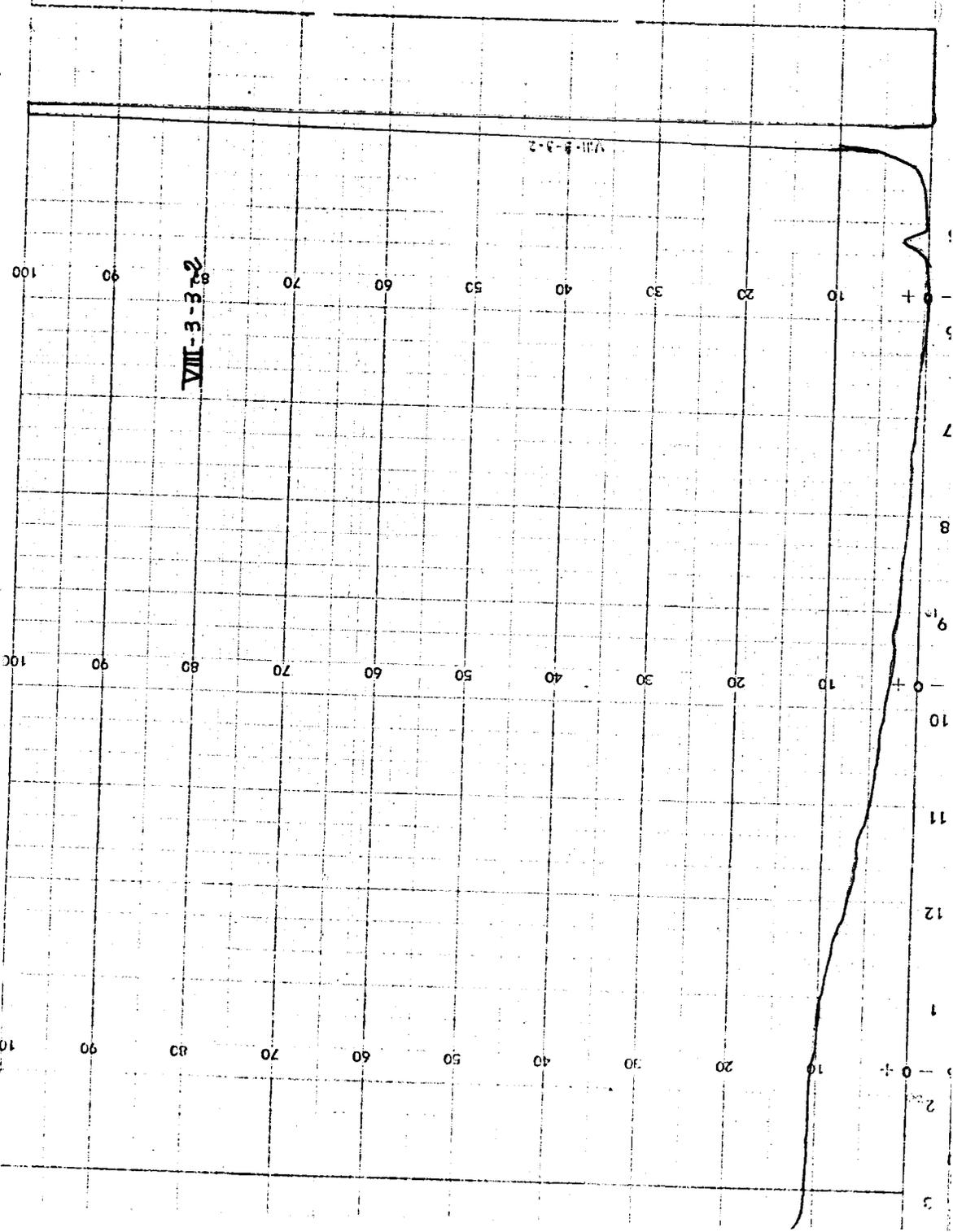


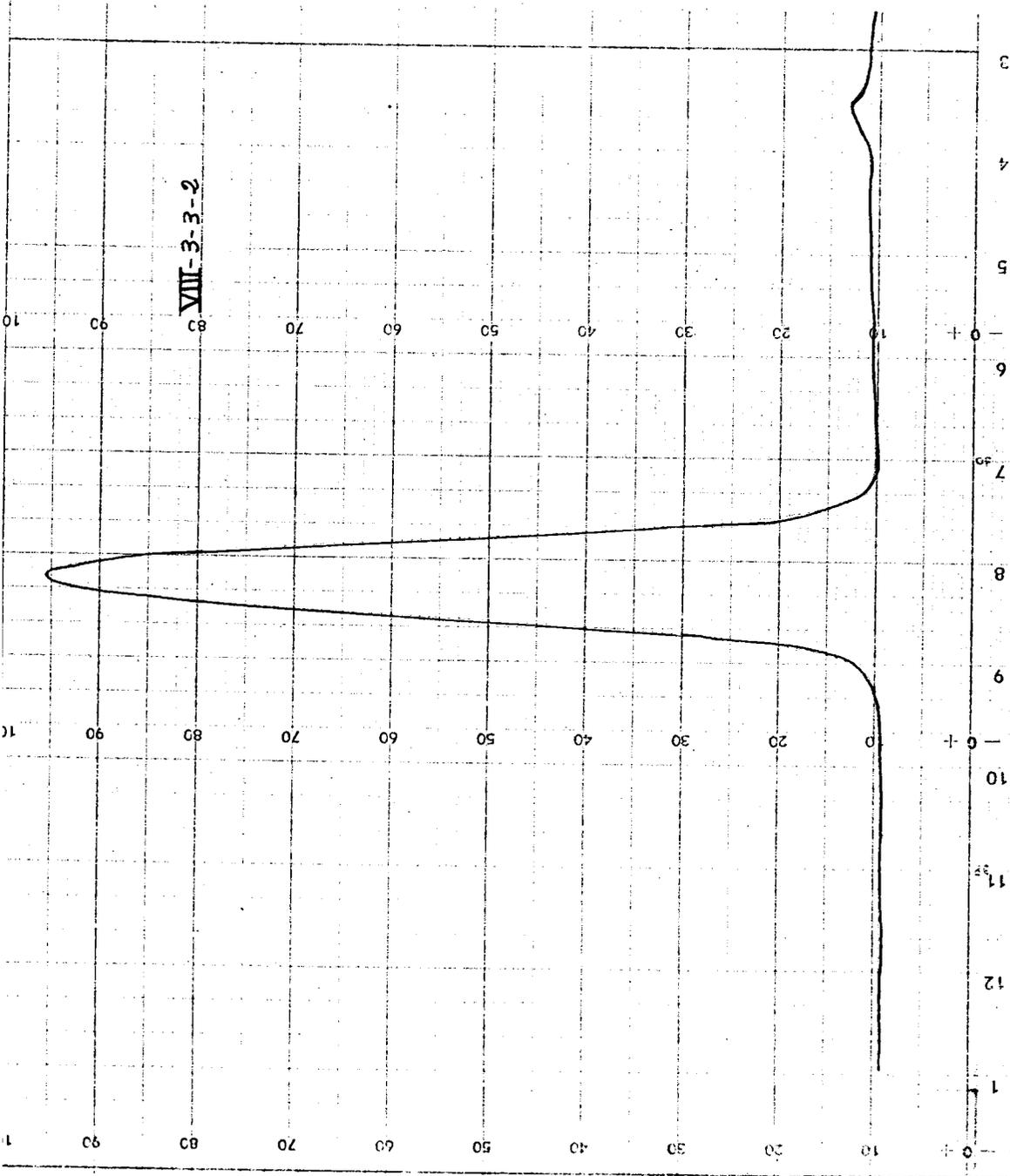


U.S. GEOLOGICAL SURVEY WATER RESOURCES DIVISION  
CANAAN SPRING, ILLINOIS  
98011550



1-3-38  
8  
9  
10





VIII-3-3-2

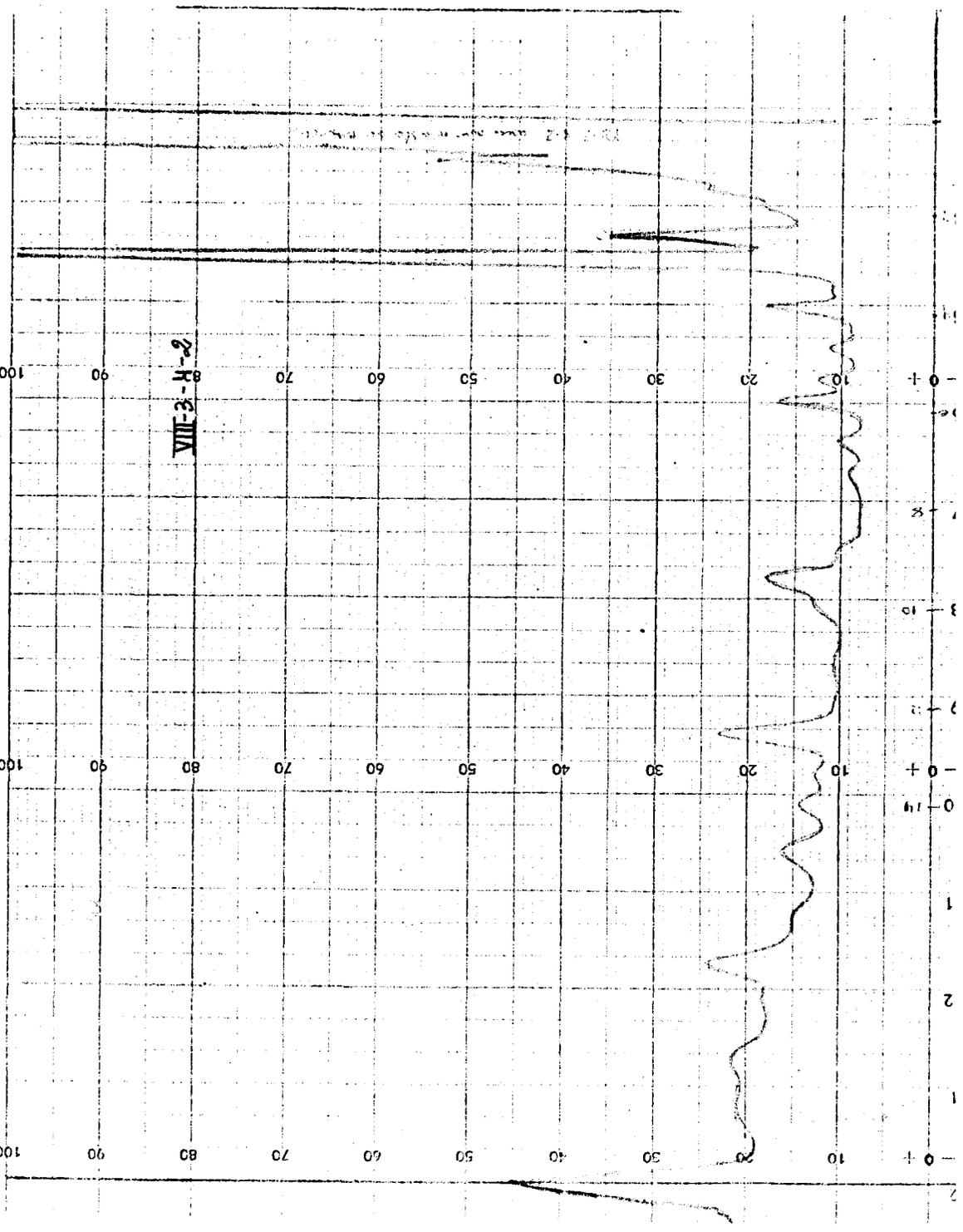
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

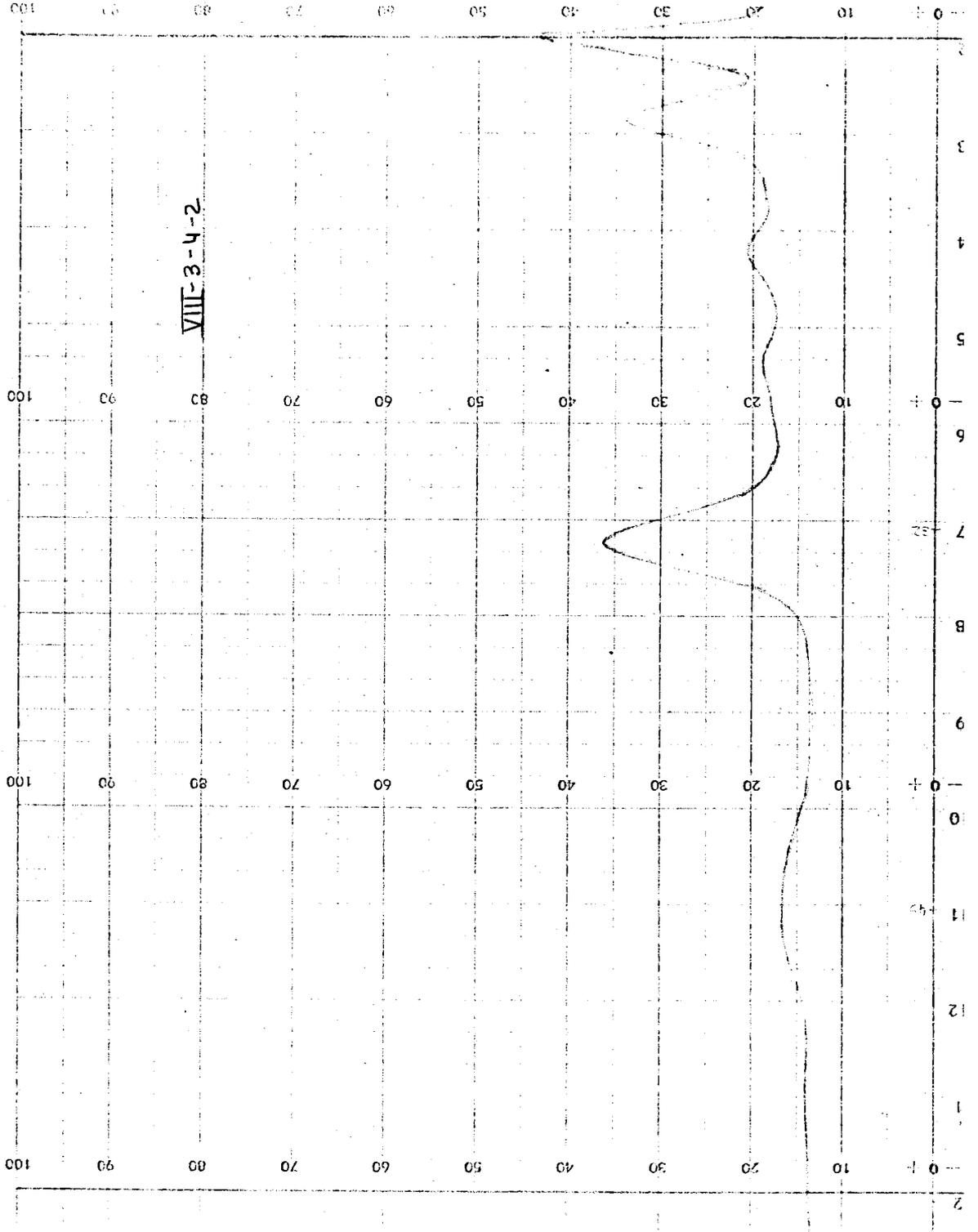
VIII-3-H-2

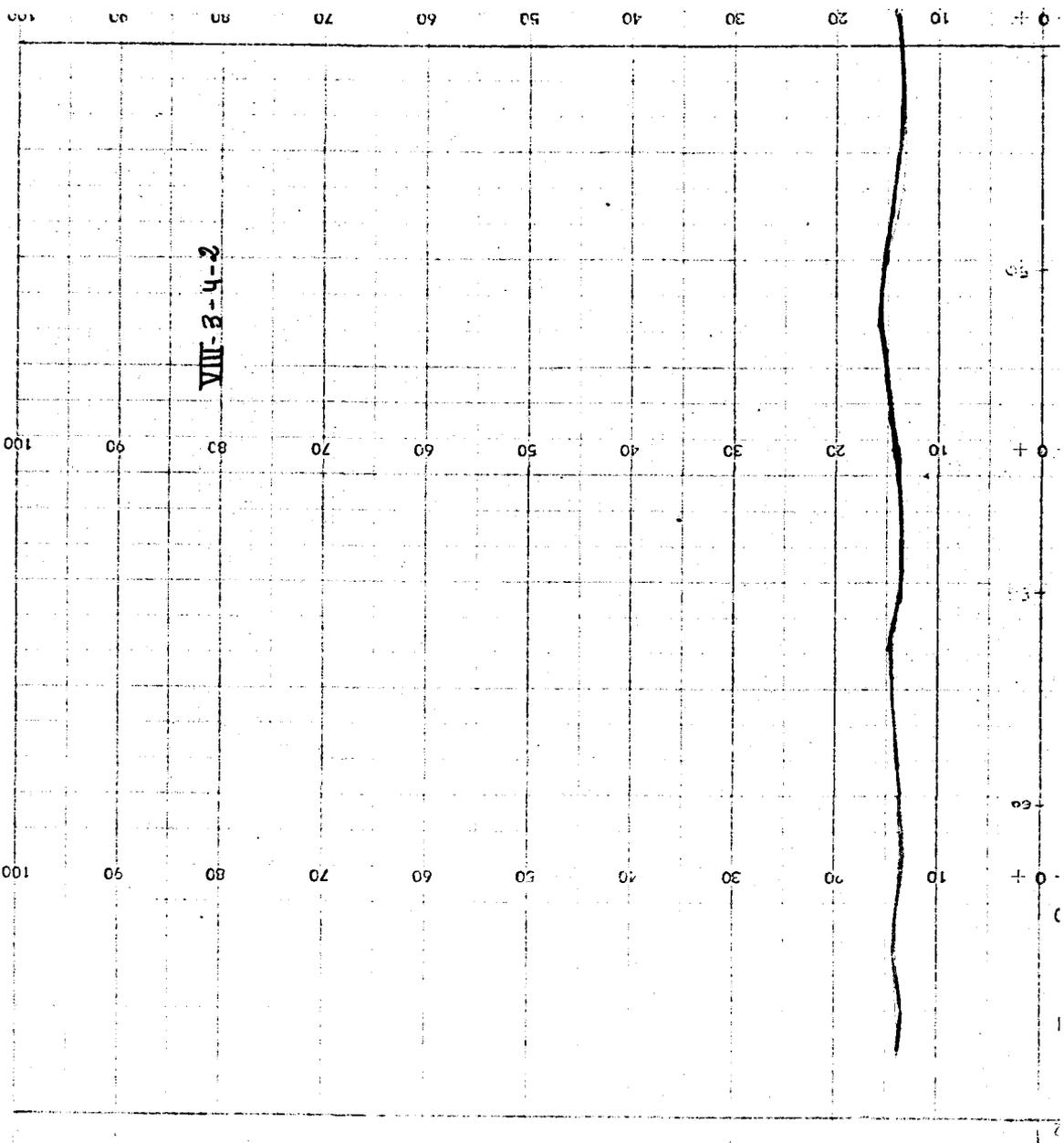
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

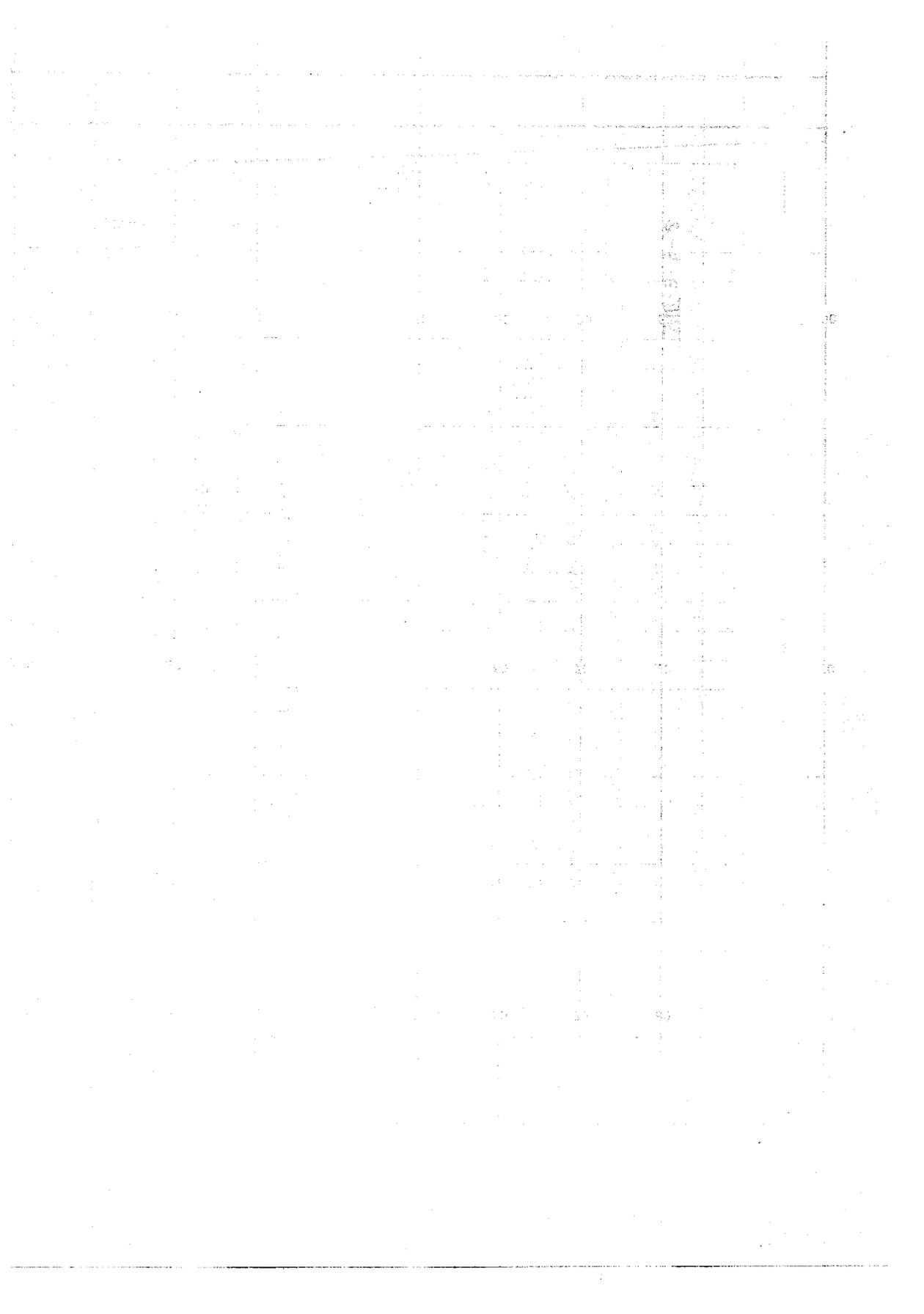
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

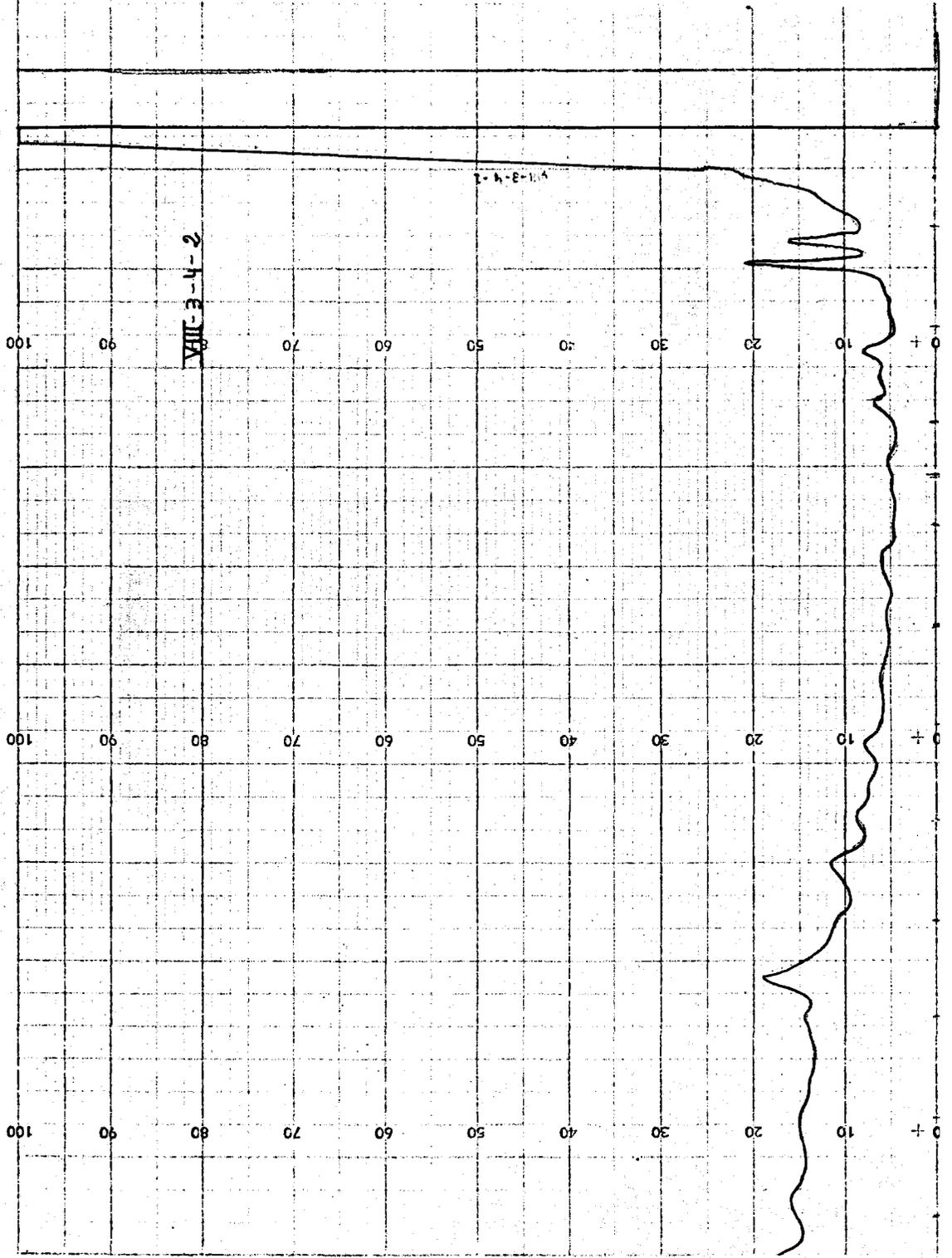




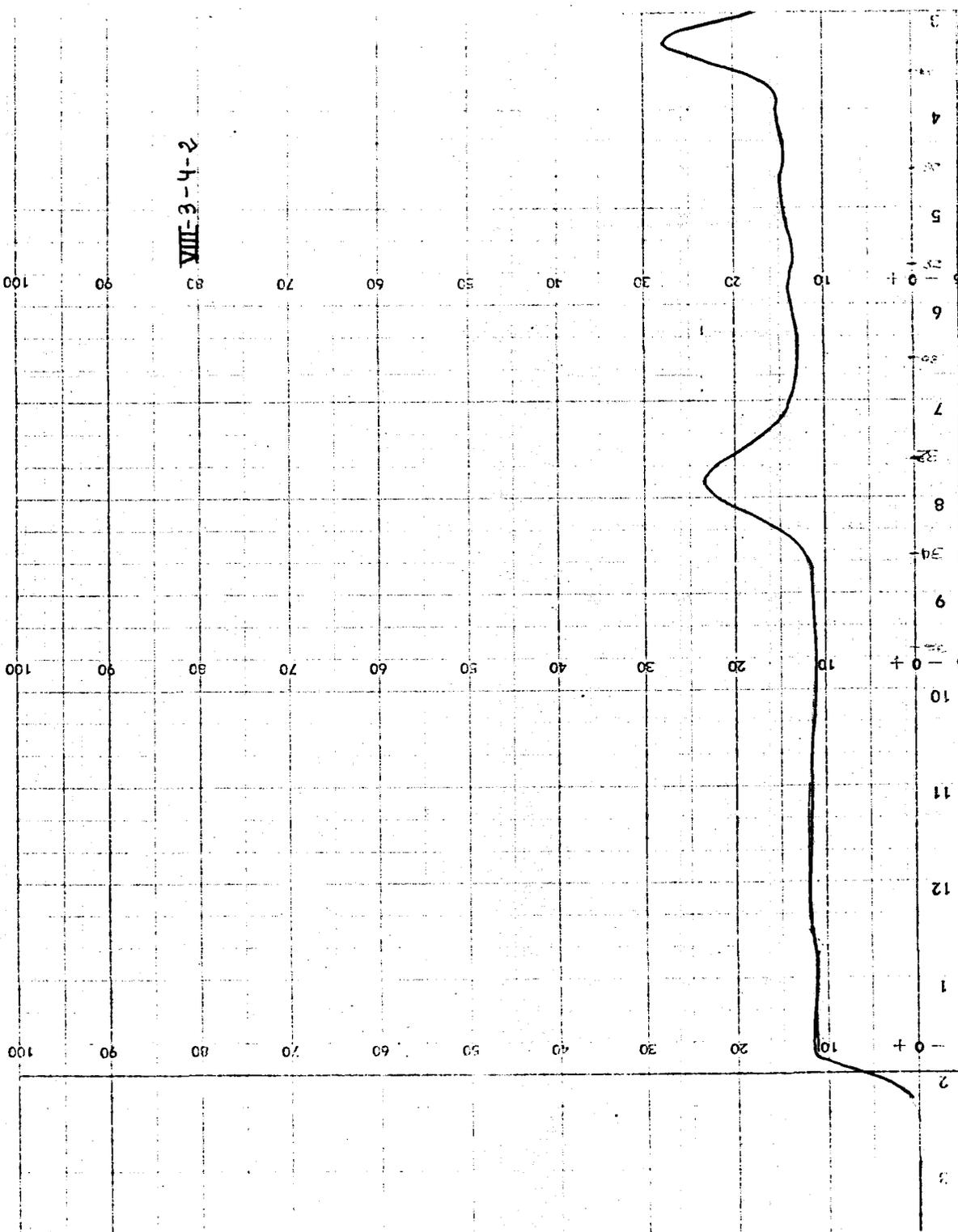


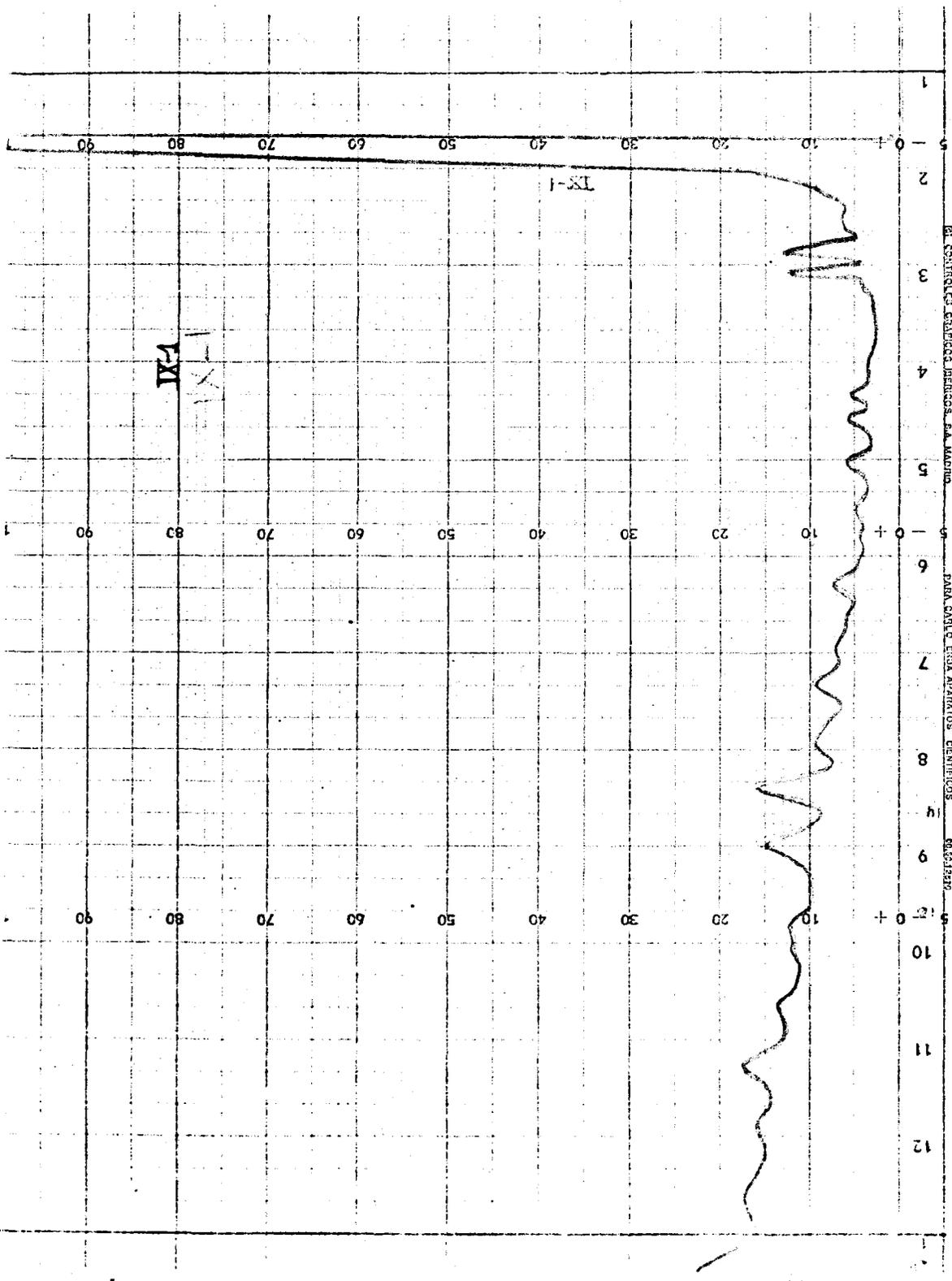
VIII-3-4-2

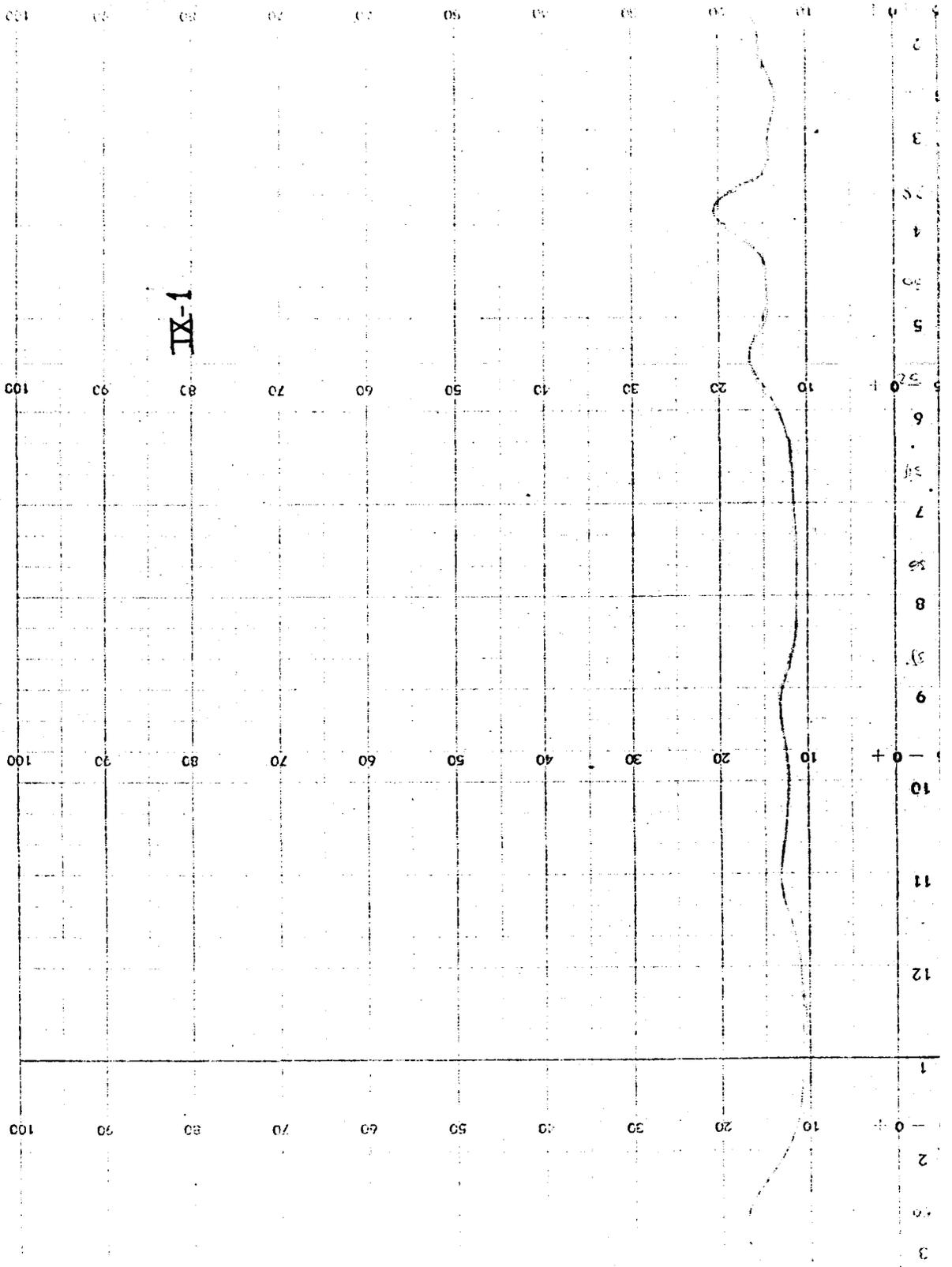


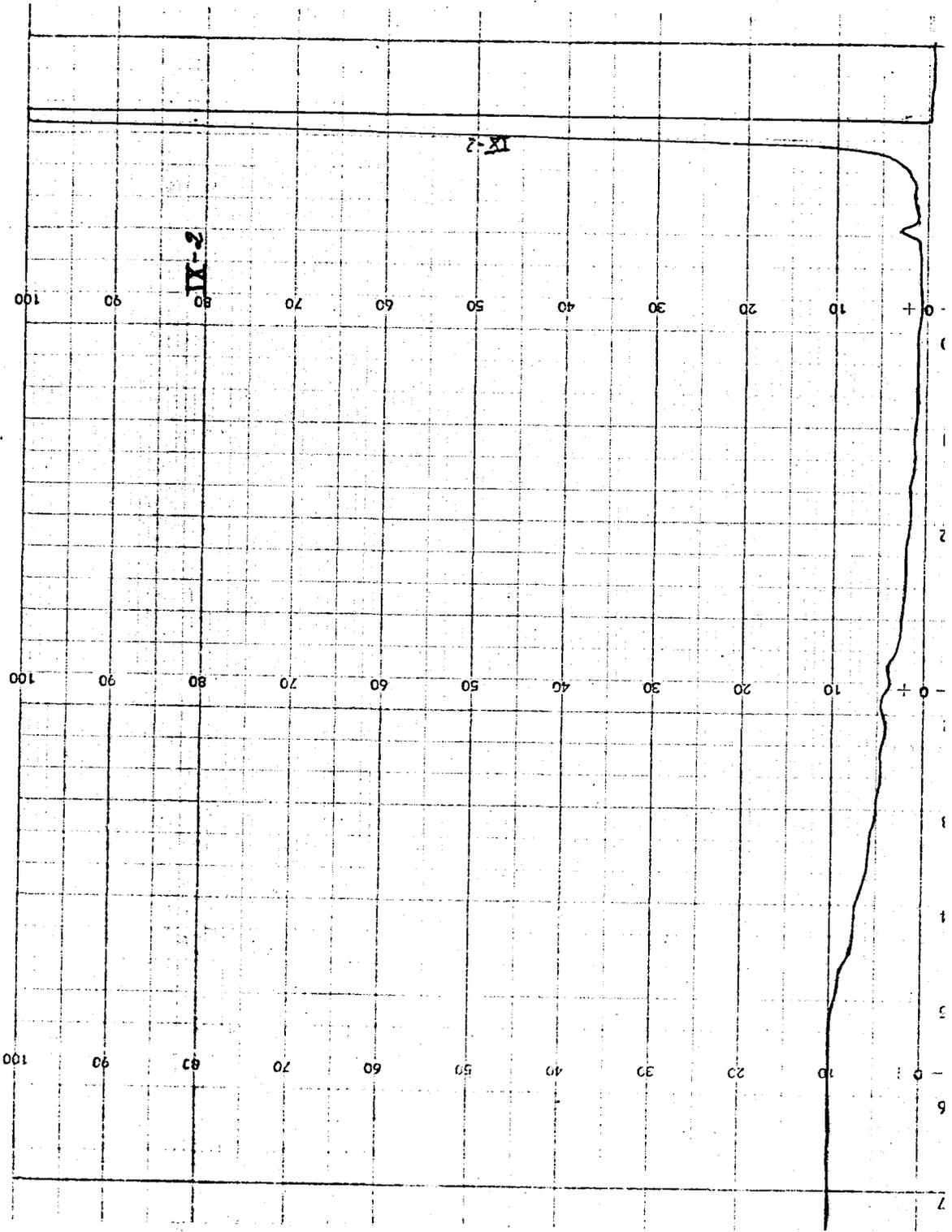


VIII-3-4-2









IX-2

IX-2

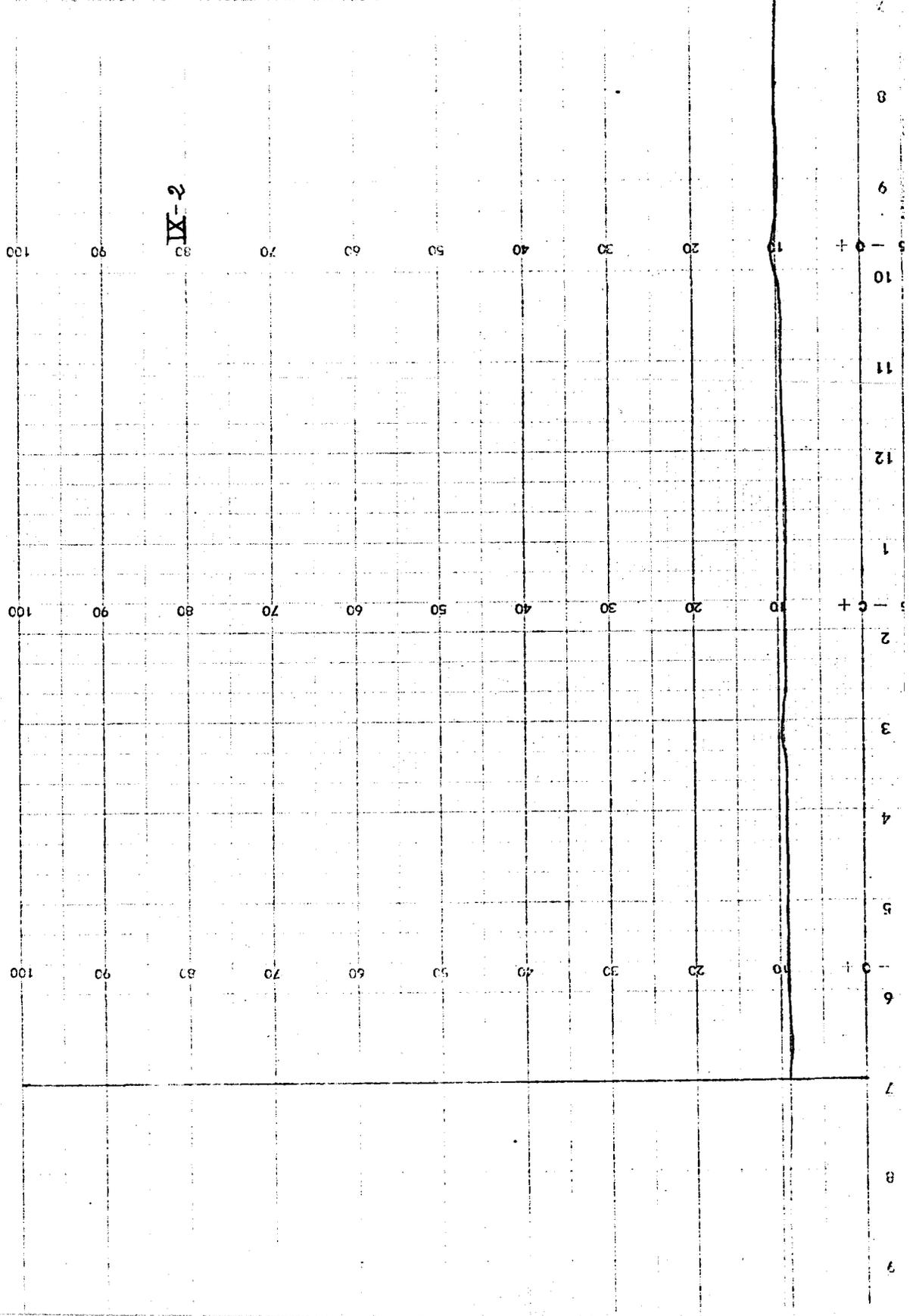
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

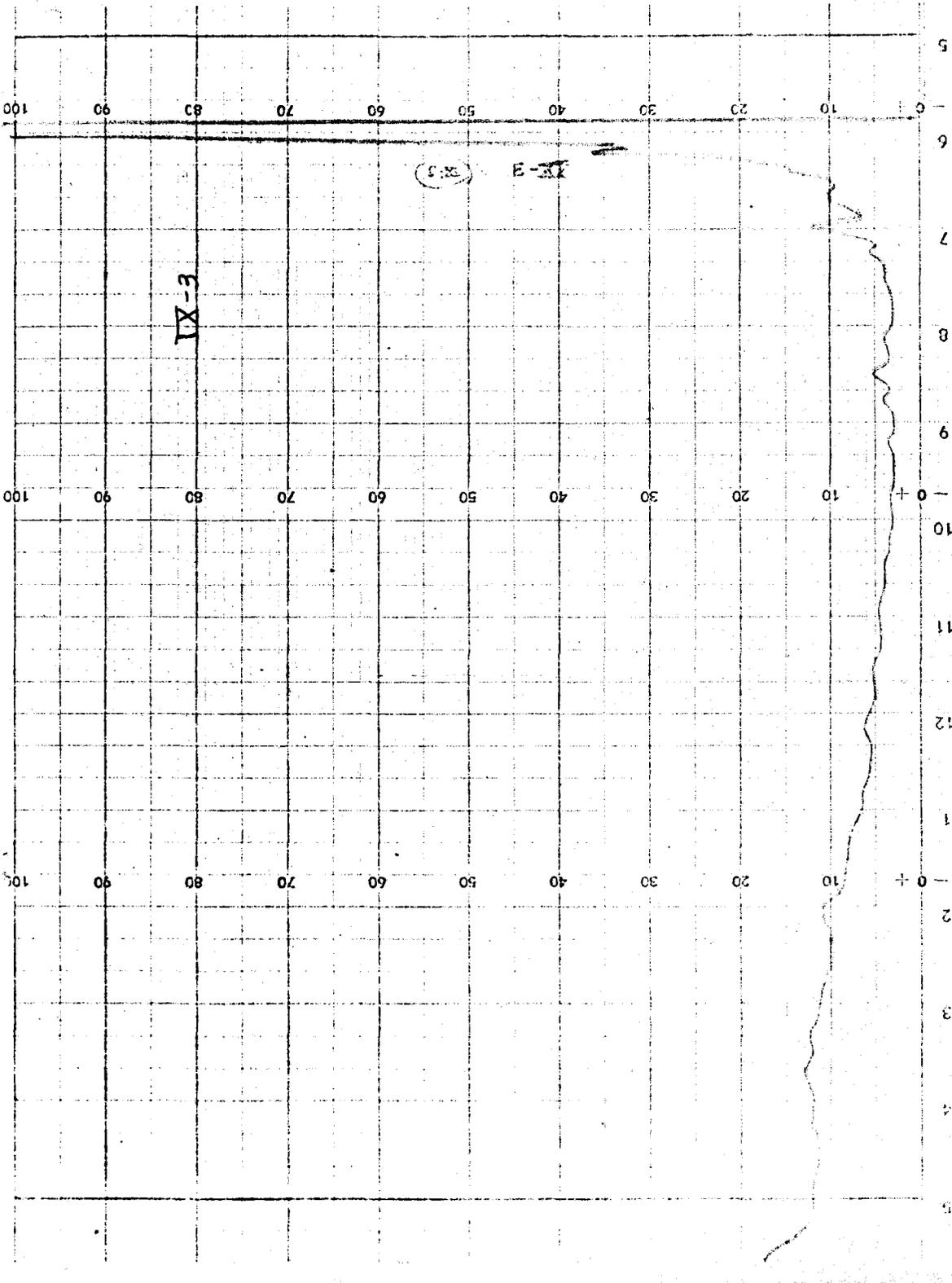
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

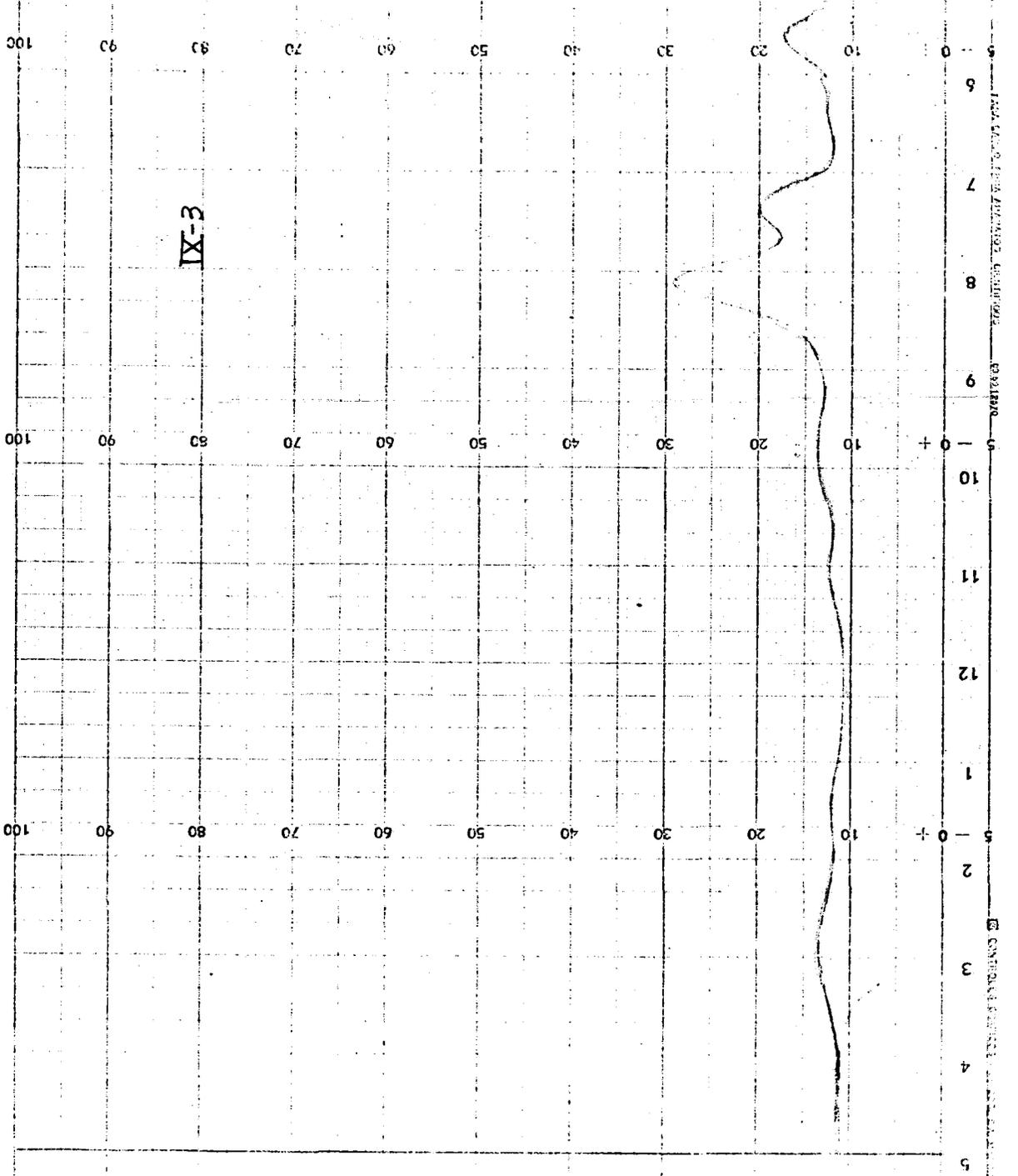
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

0 1 2 3 4 5 6 7

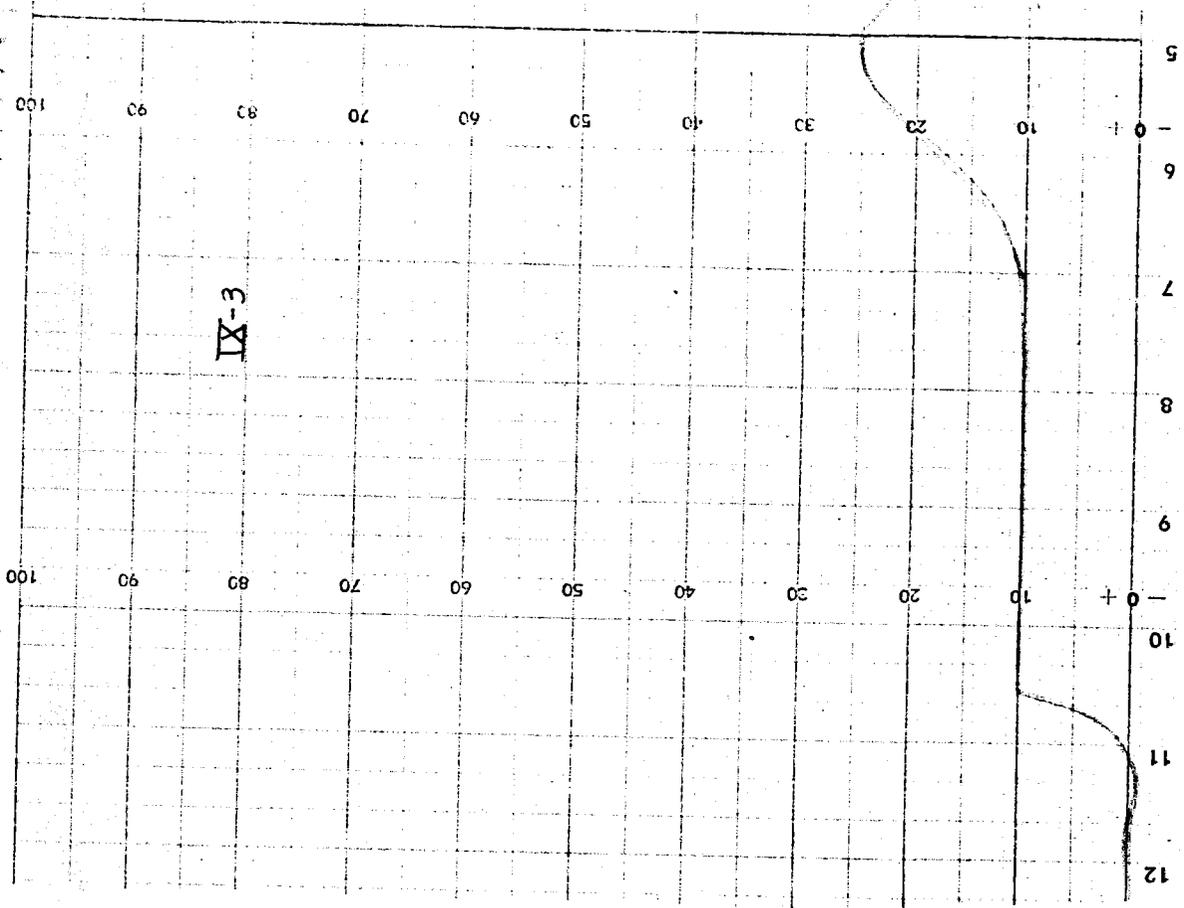
IX-2

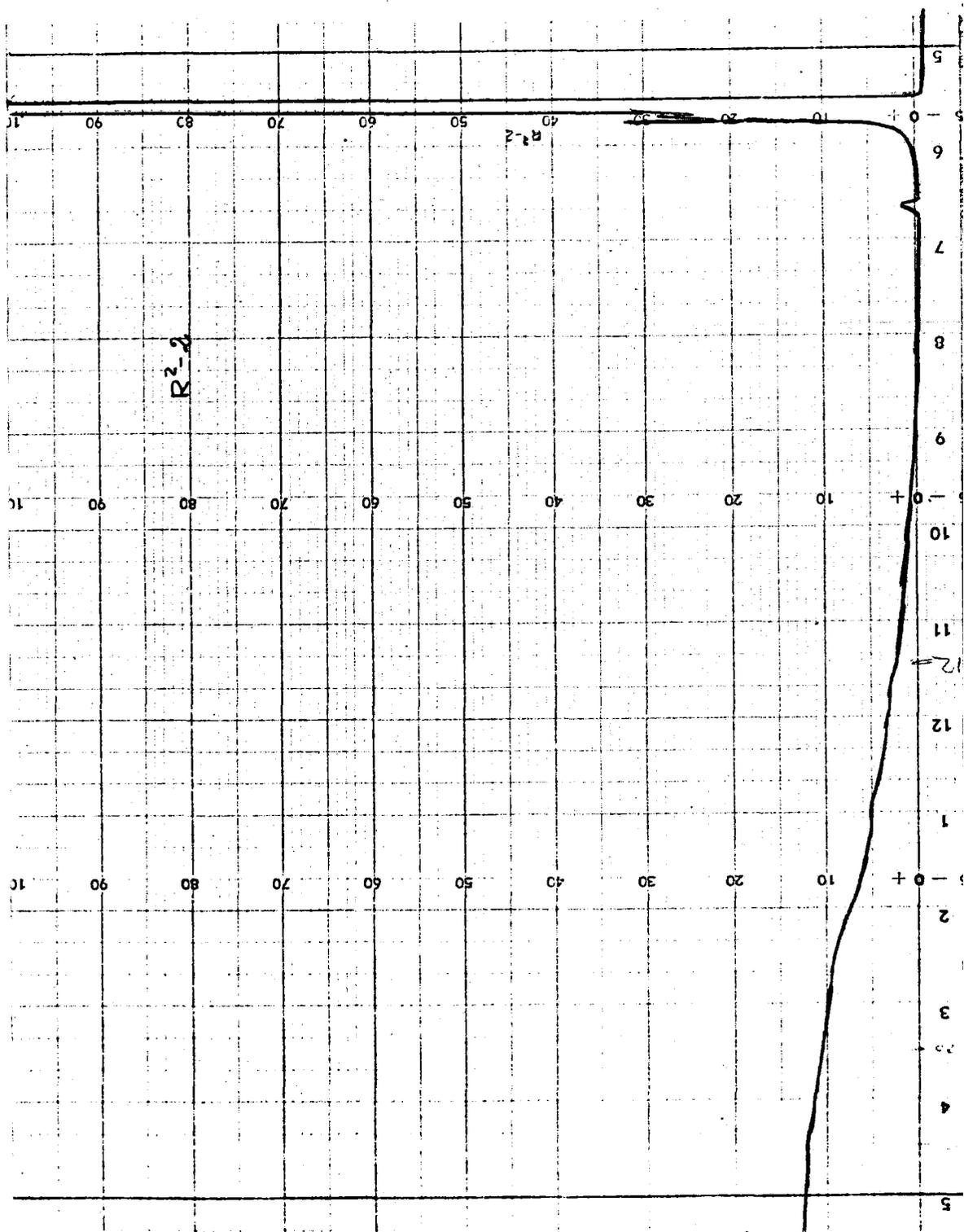




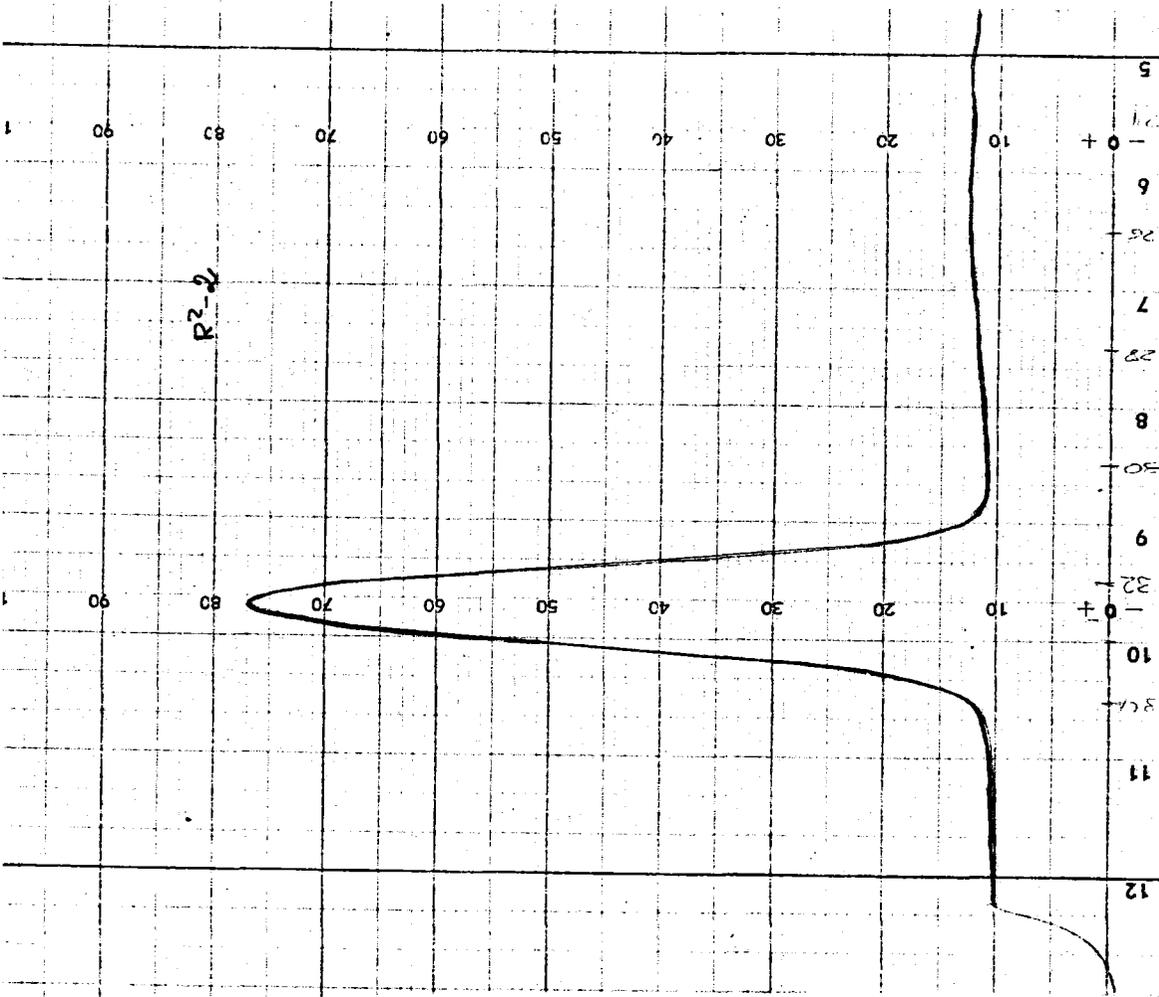




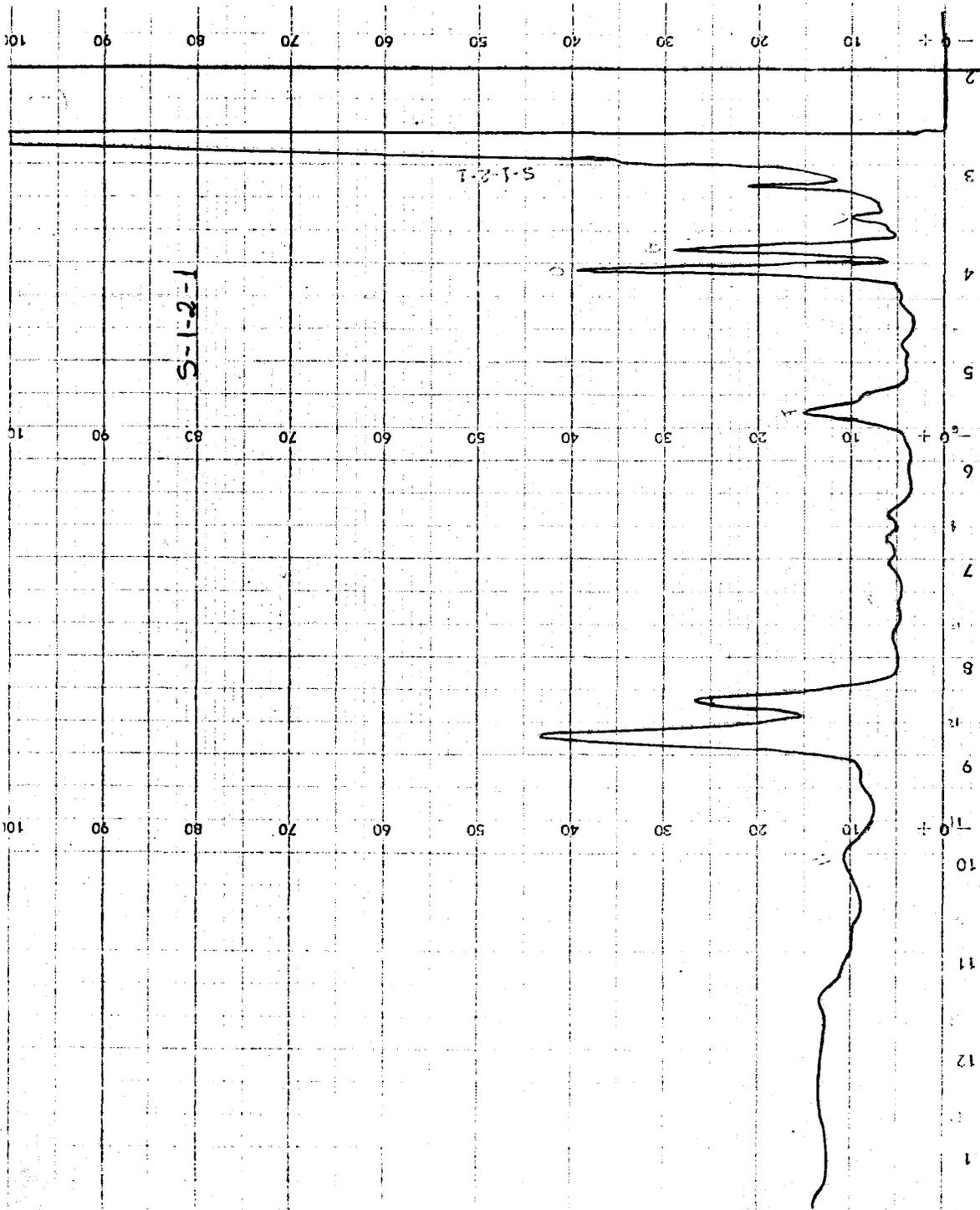




Sal. Agua PARA CURVO, ERGA APARTOS, CENICIENTOS, DE POLARIZ. 90. 10. 11. 12.

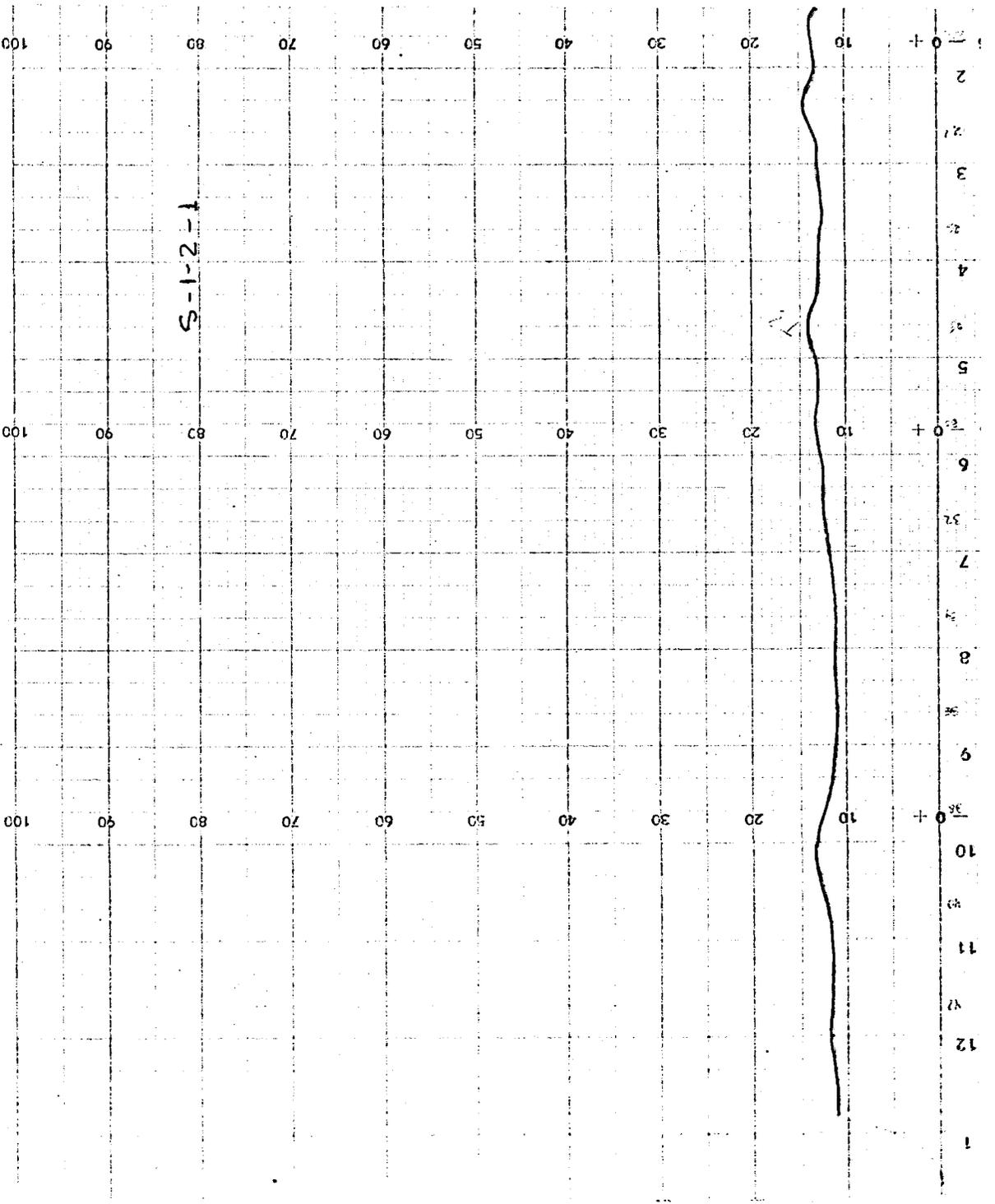


R²-21



S-1-2-1

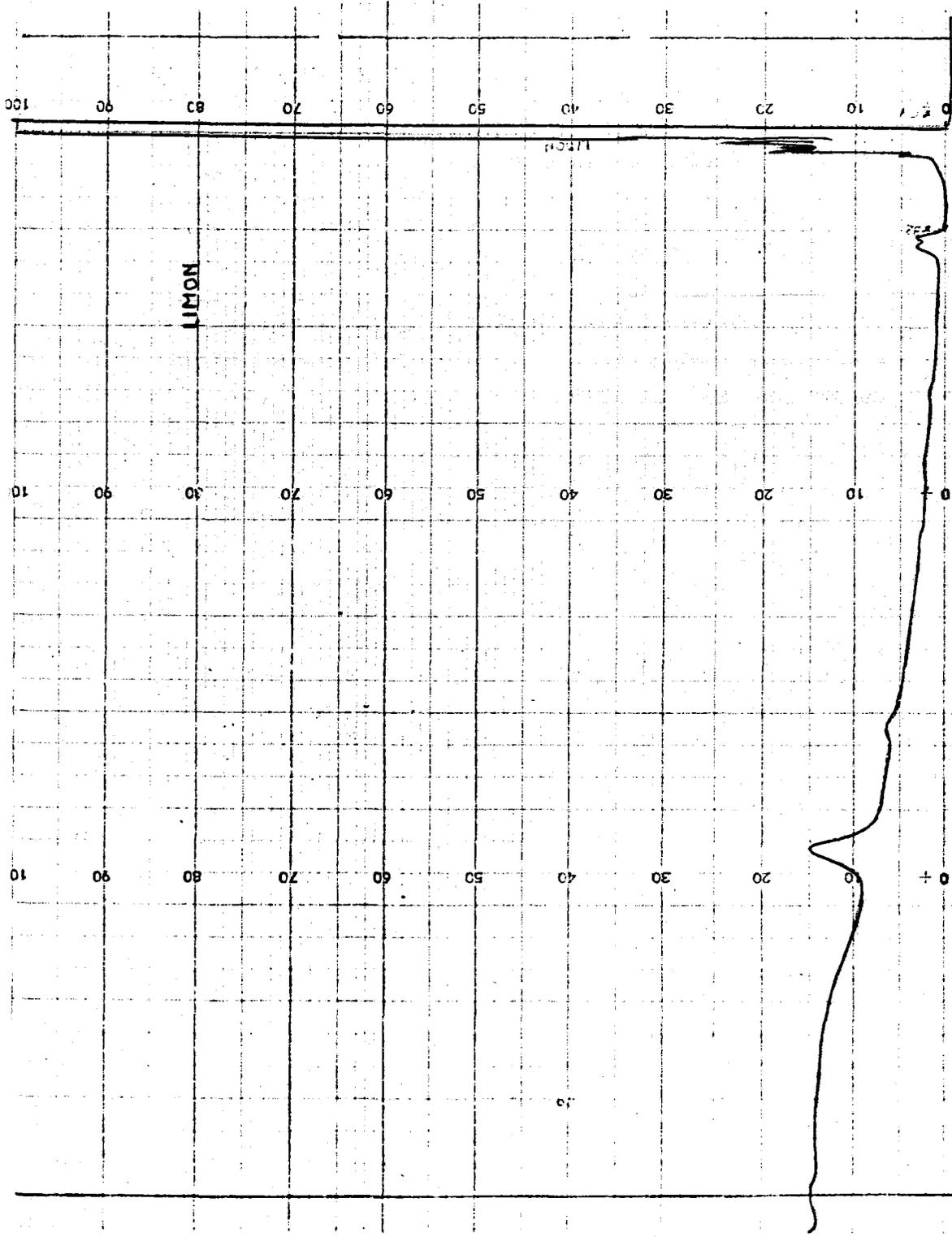
17





4.20.1.6.- Cromatogramas de los esteres metílicos de los -  
ácidos aoslados del zumo de limón.-

Incluimos los cromatogramas de los ésteres metí-  
licos de los ácidos aislados, mediante soluciones bencéni-  
de DUA, del zumo de limón.



LIMON

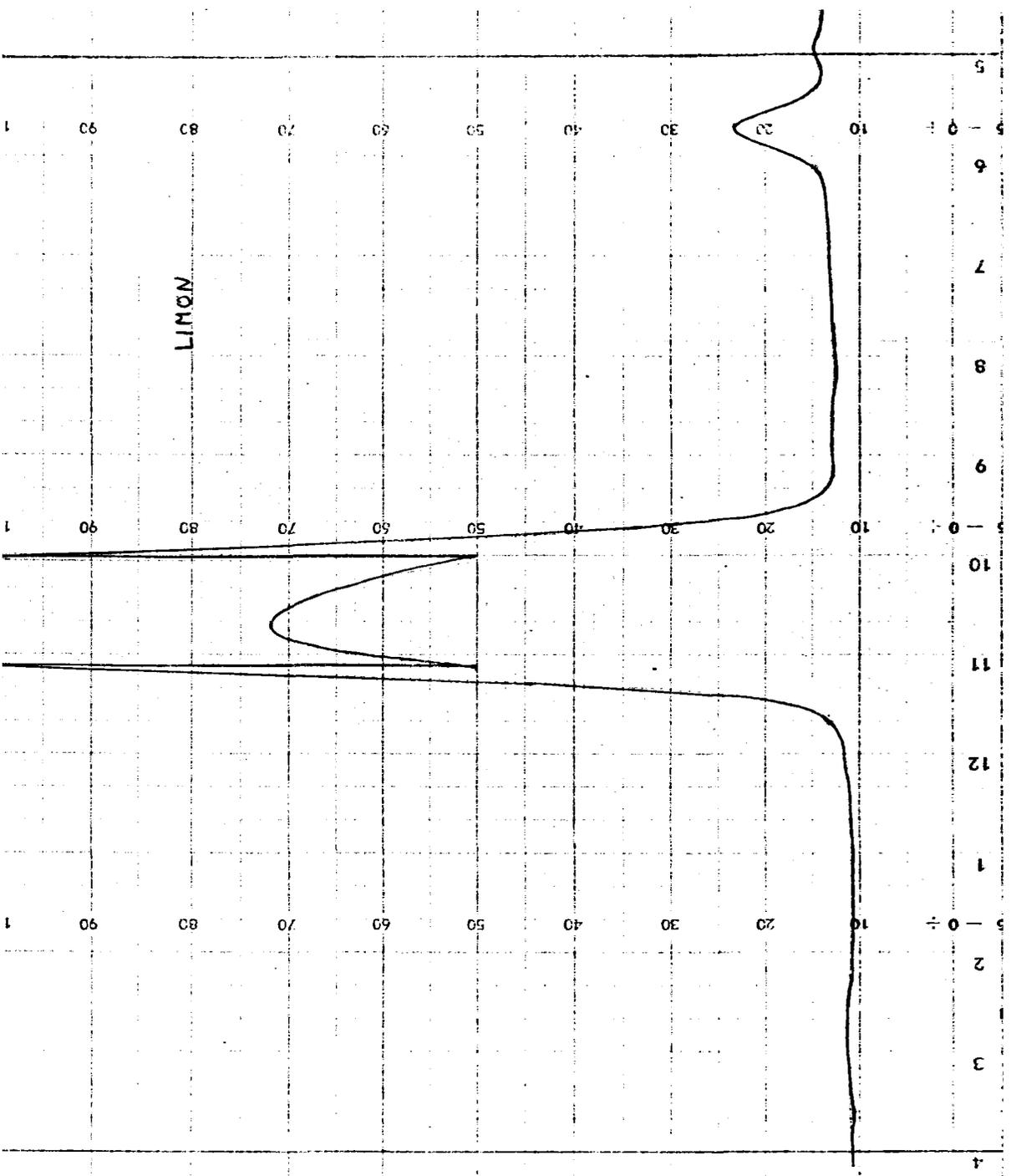
LITON

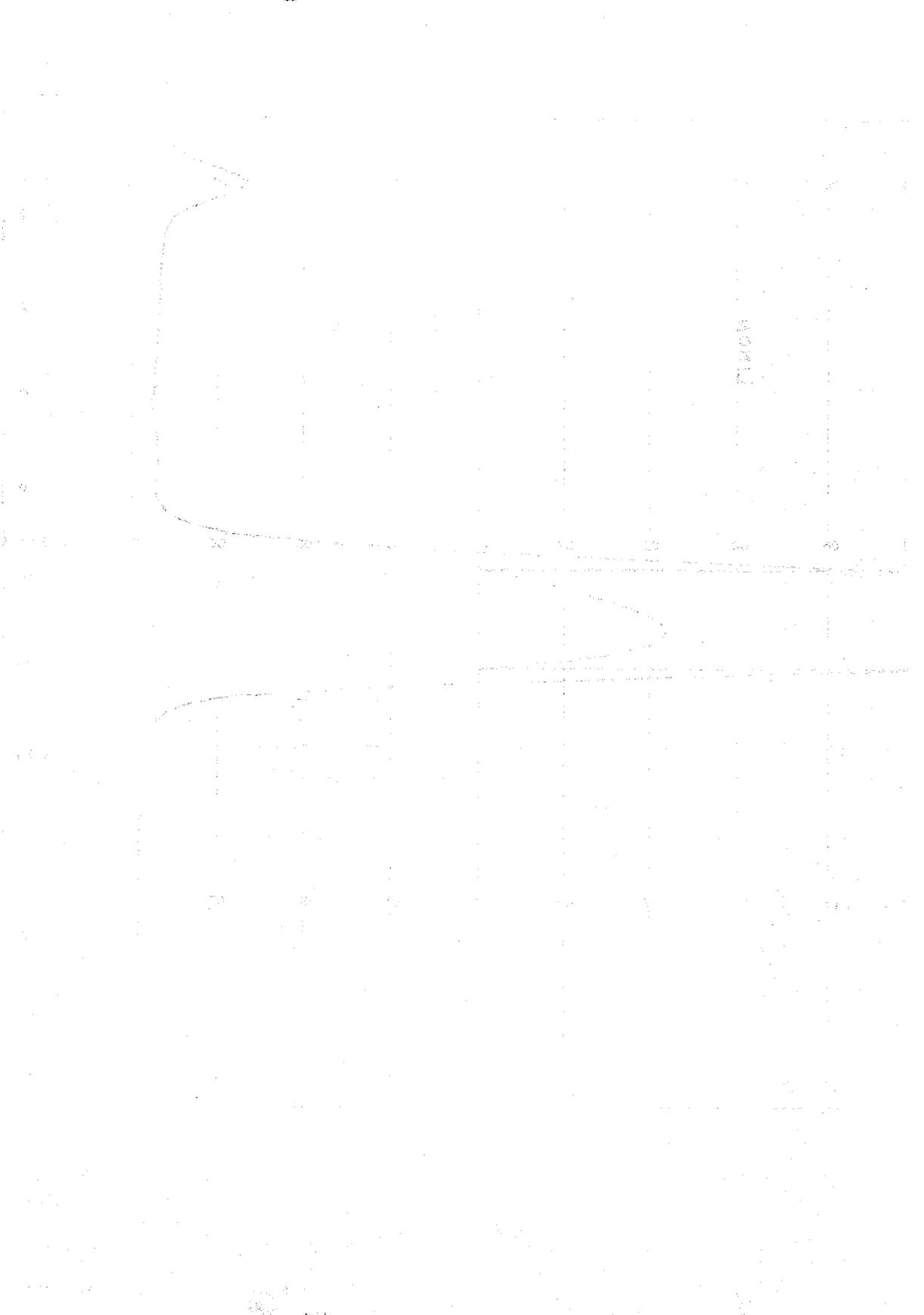
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

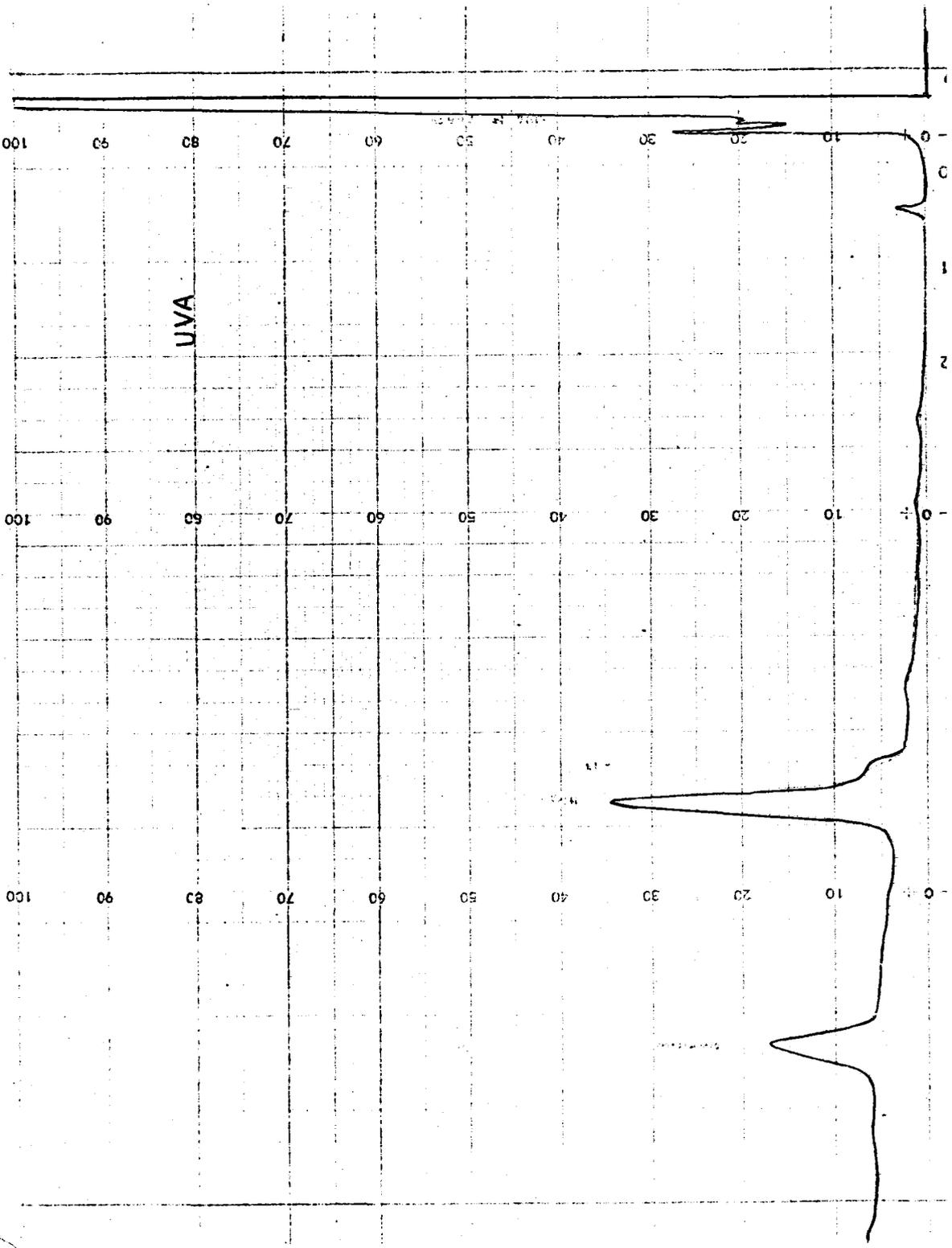
10

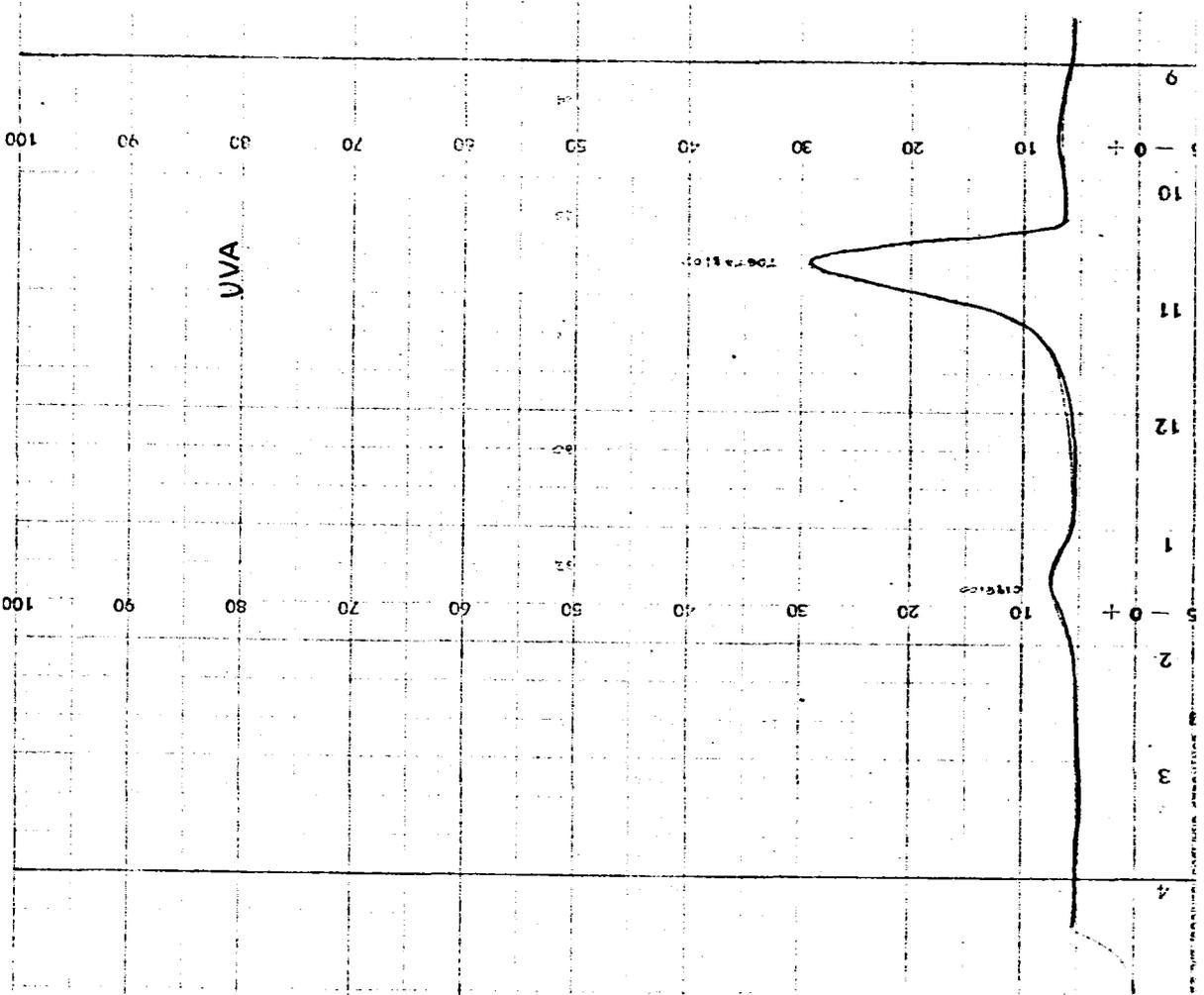




4.20.1.7.- Cromatogramas de los ésteres metílicos de los -  
ácidos aislados del zumo de uva.-

Los cromatogramas de los ácidos aislados con so-  
luciones de DUA del zumo de uva vienen representados a con  
tinuación.



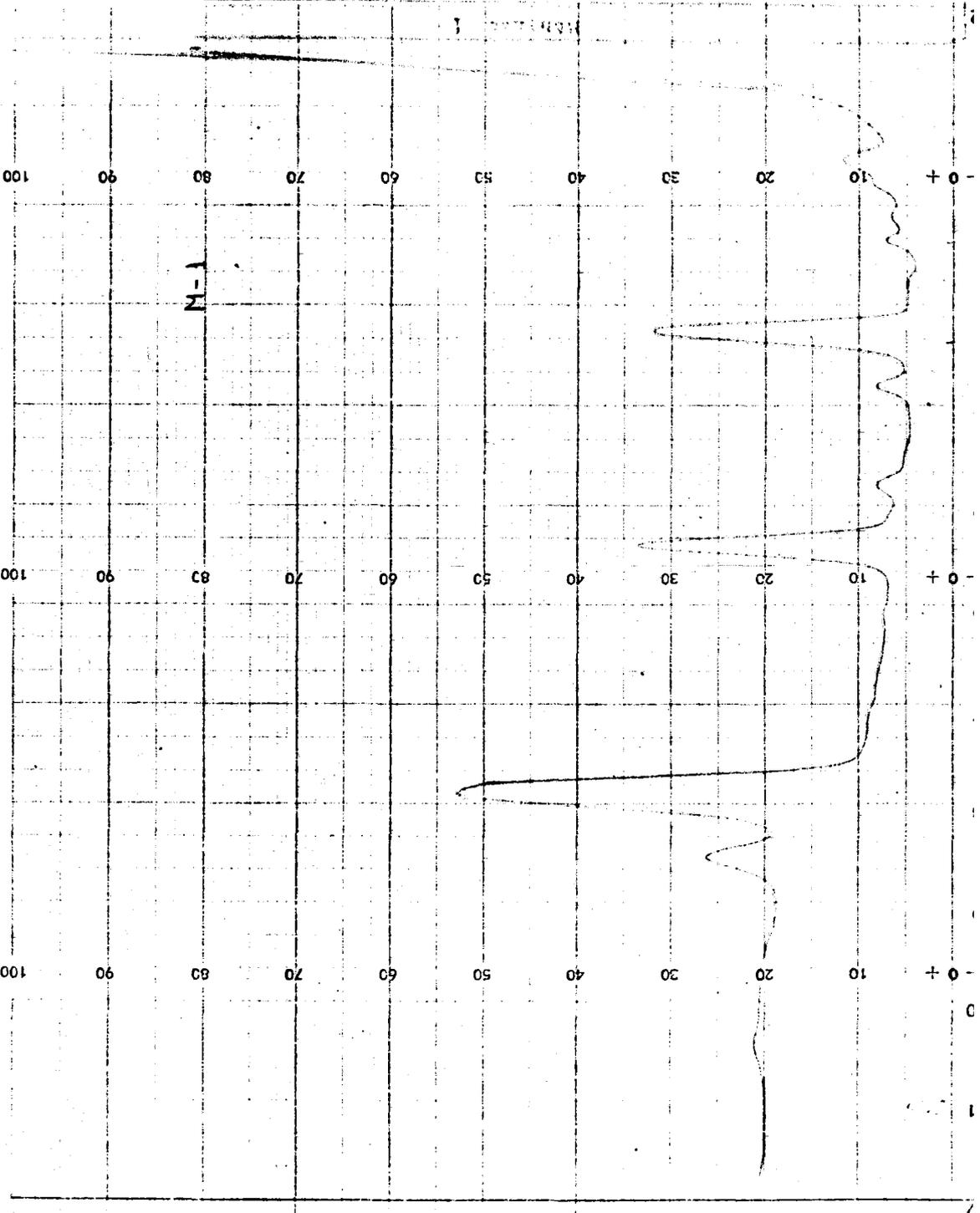




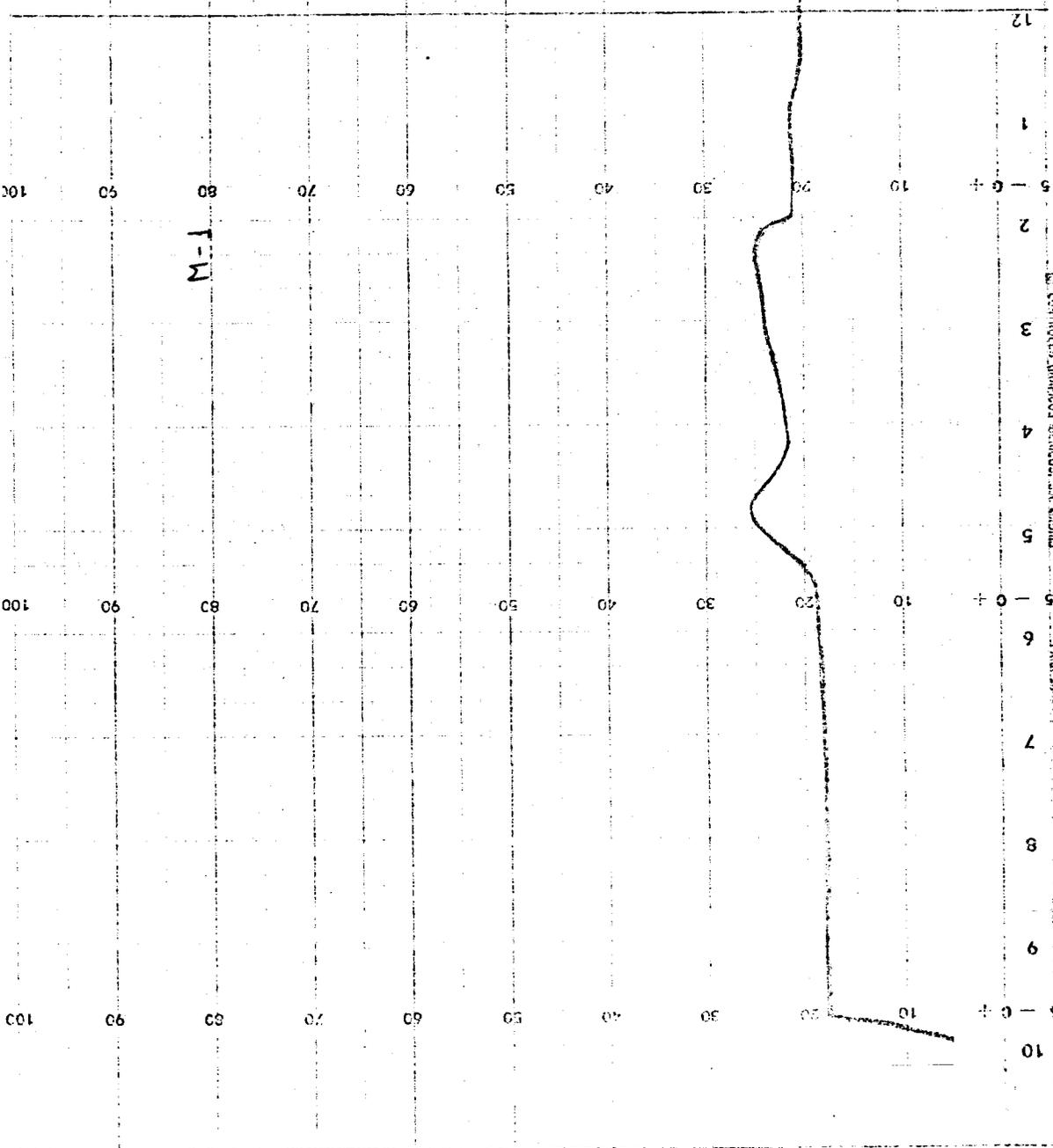
4.20.1.8.- Cromatogramas de los ésteres metílicos de los -  
ácidos aislados de la manzana.-

Los cromatogramas de los ácidos aislados de la -  
manzana, tanto por soluciones bencénicas de DUA como por -  
resinas DOWEX-1, vienen dados a continuación.

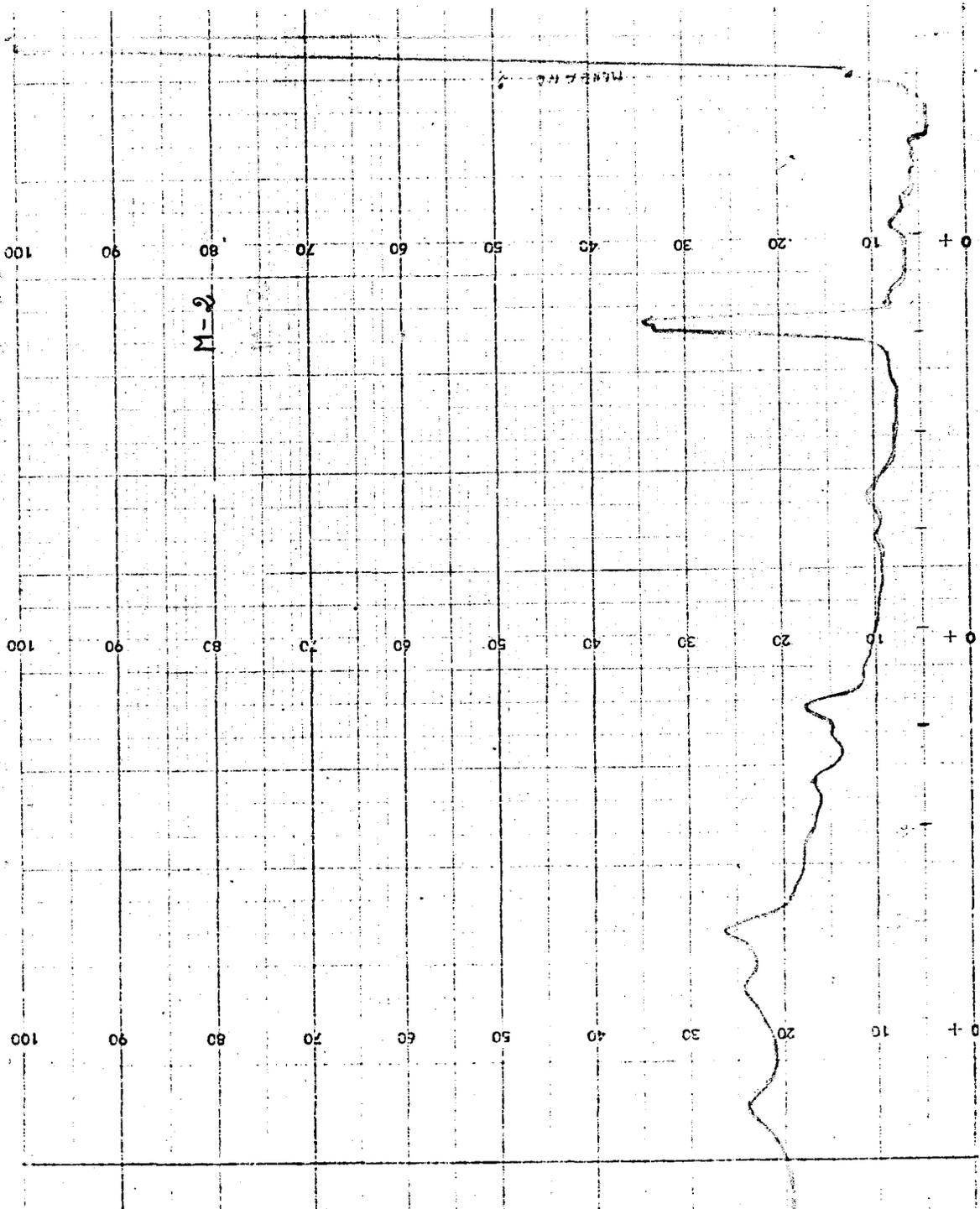
1000000



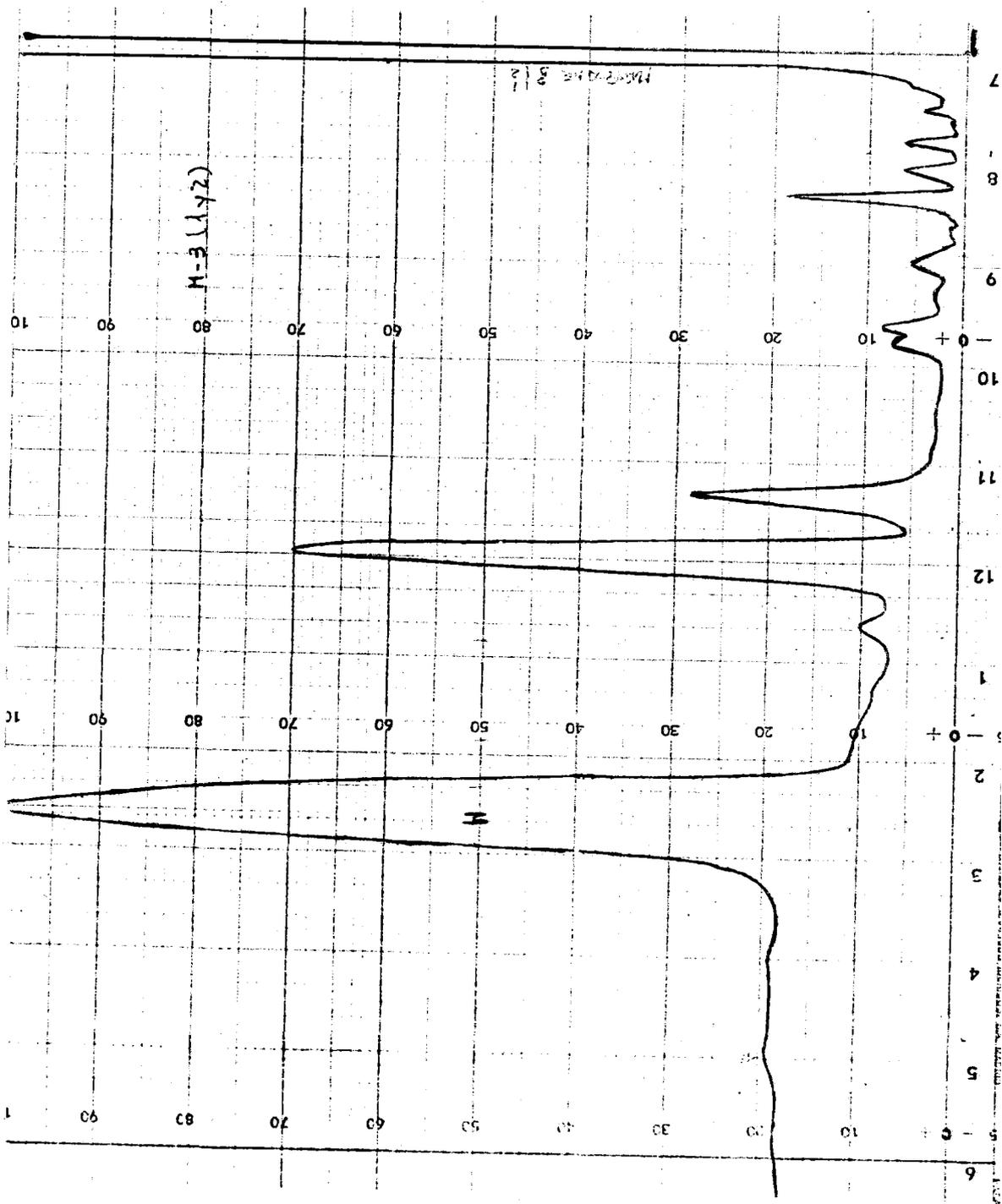
1000000



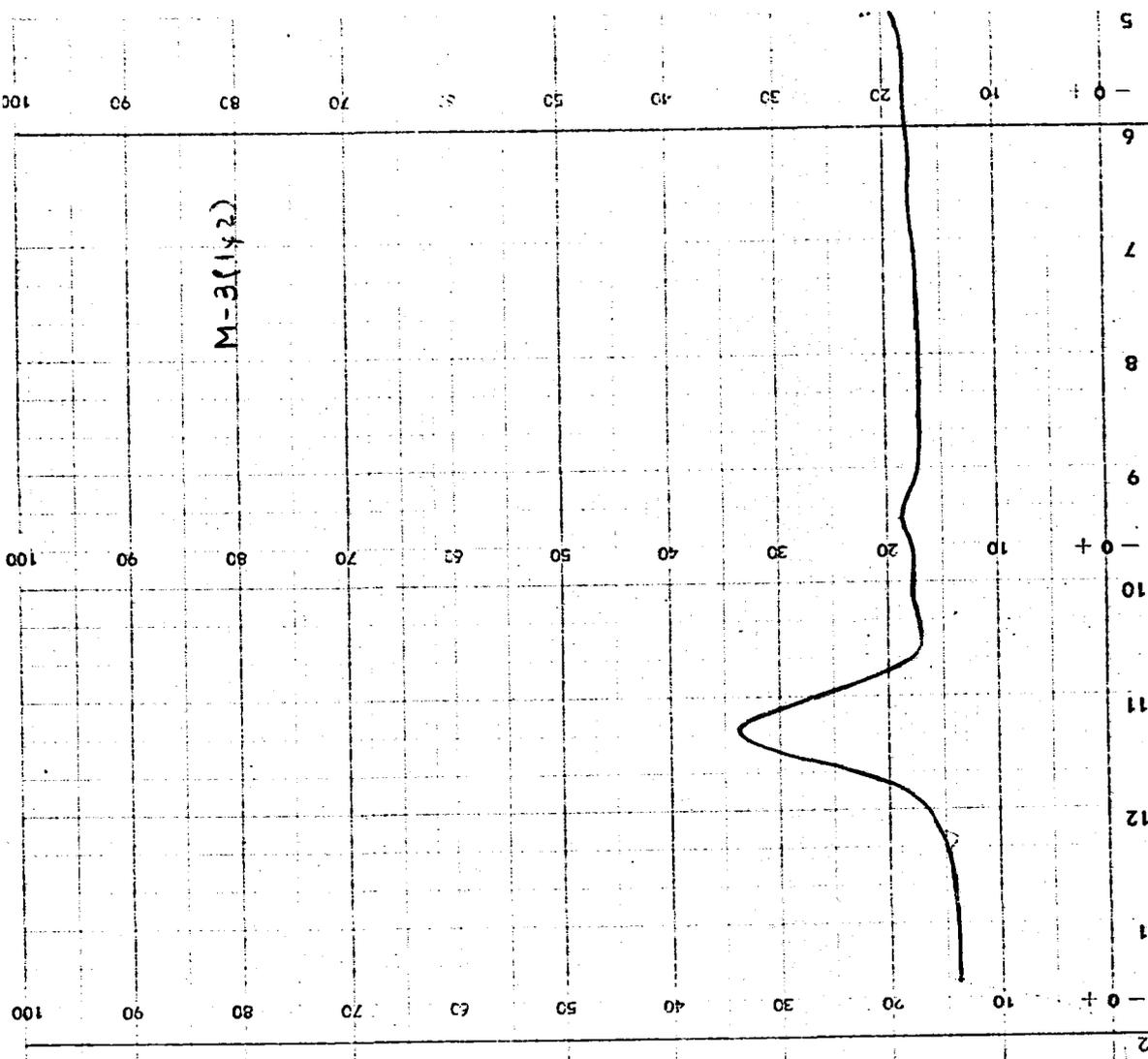
F-M

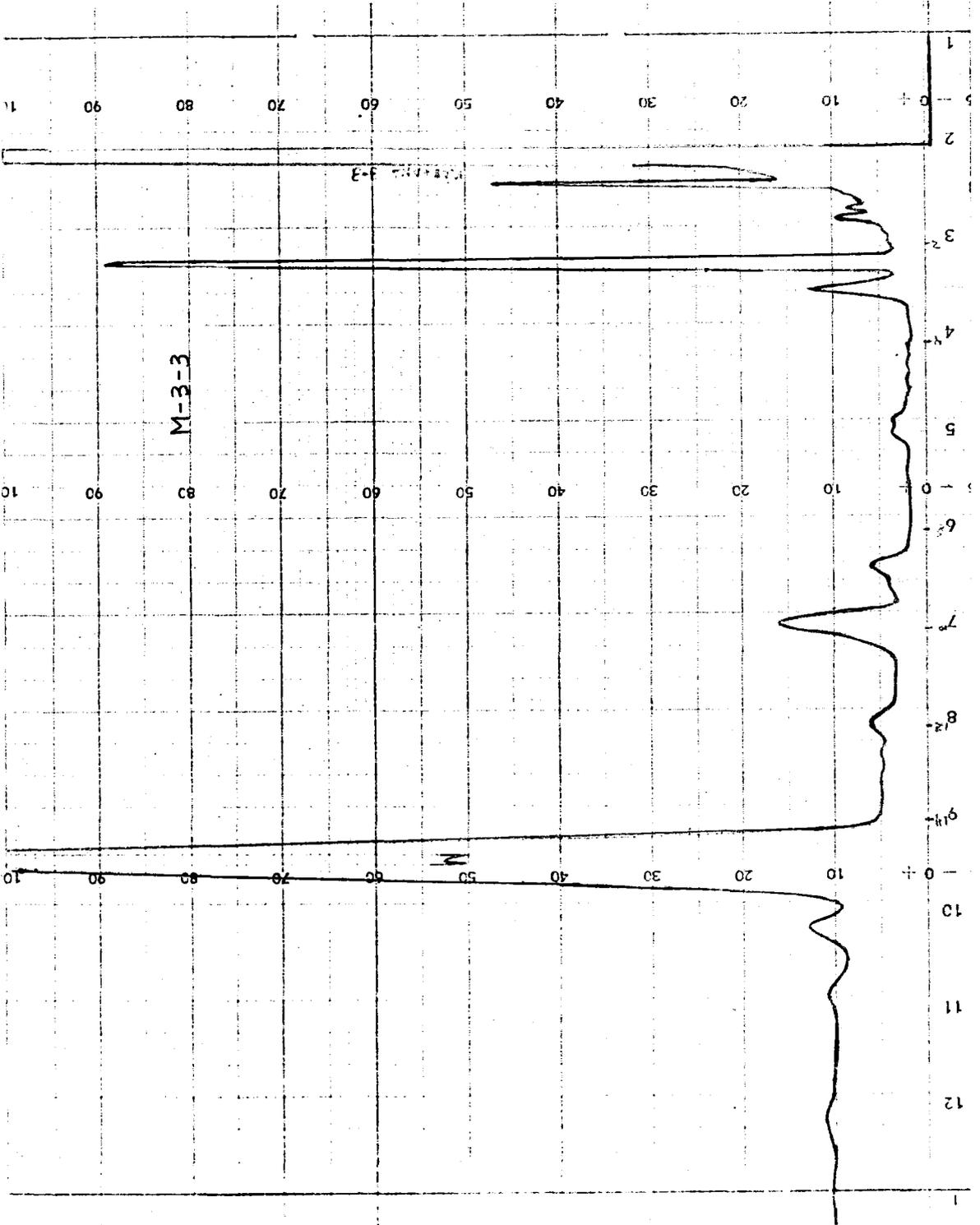




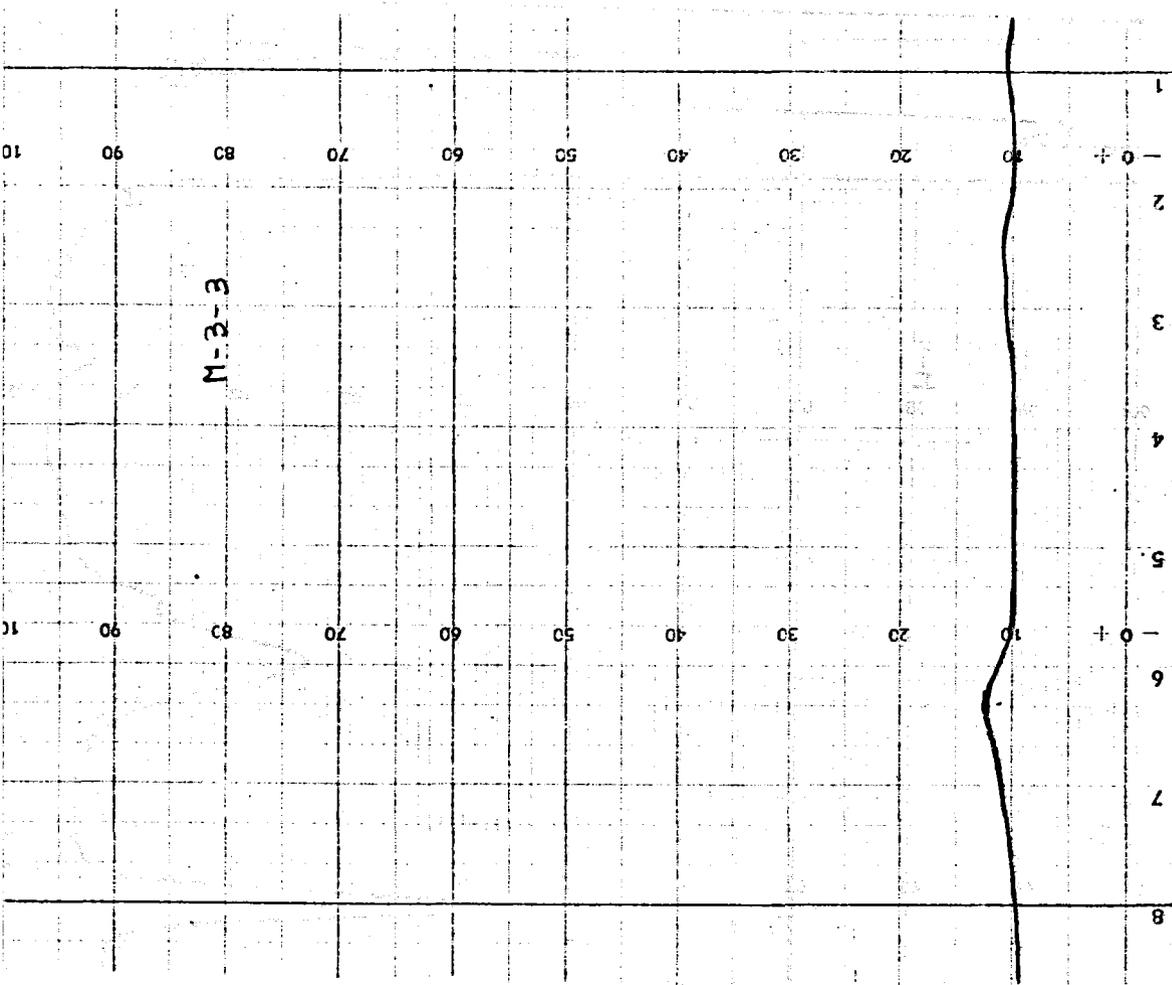


LAURENCE ENGINEERING - MASSACHUSETTS





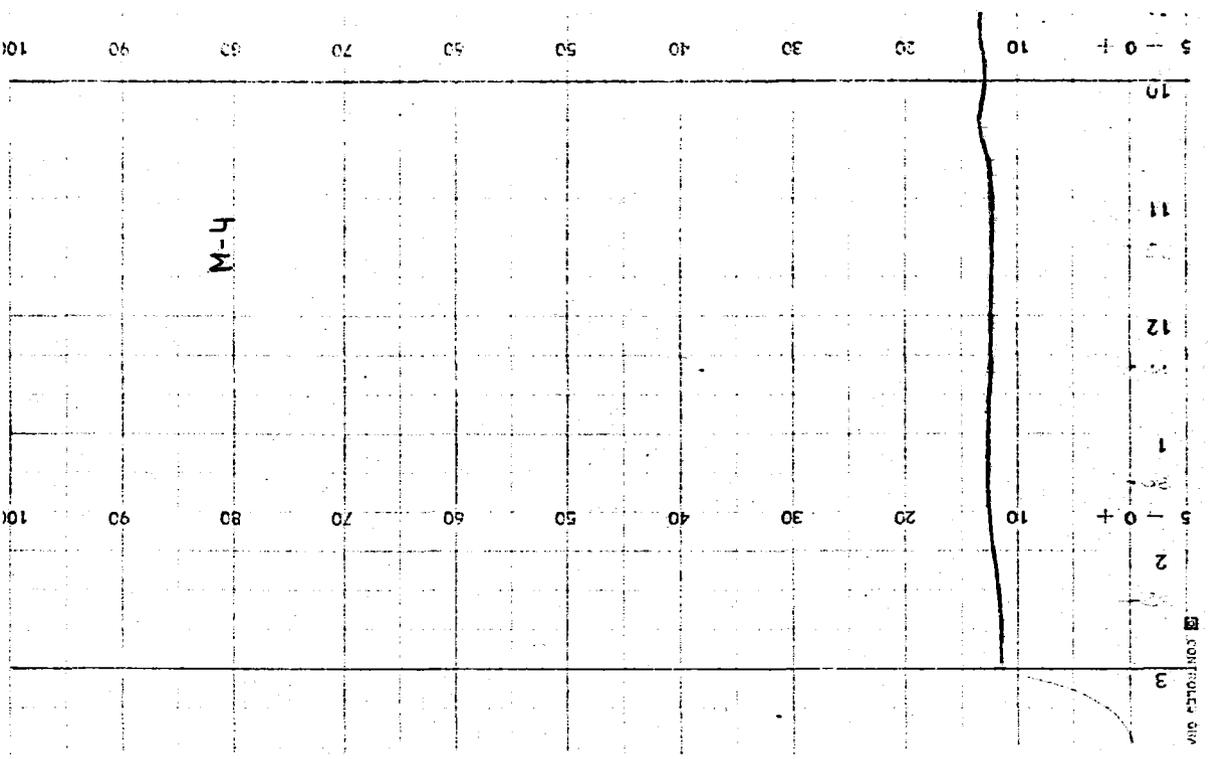
CONTROLES ANTERIORES DE LA MANA  
PARA CALIBRO ENDA APARATOS DE PUNTEROS

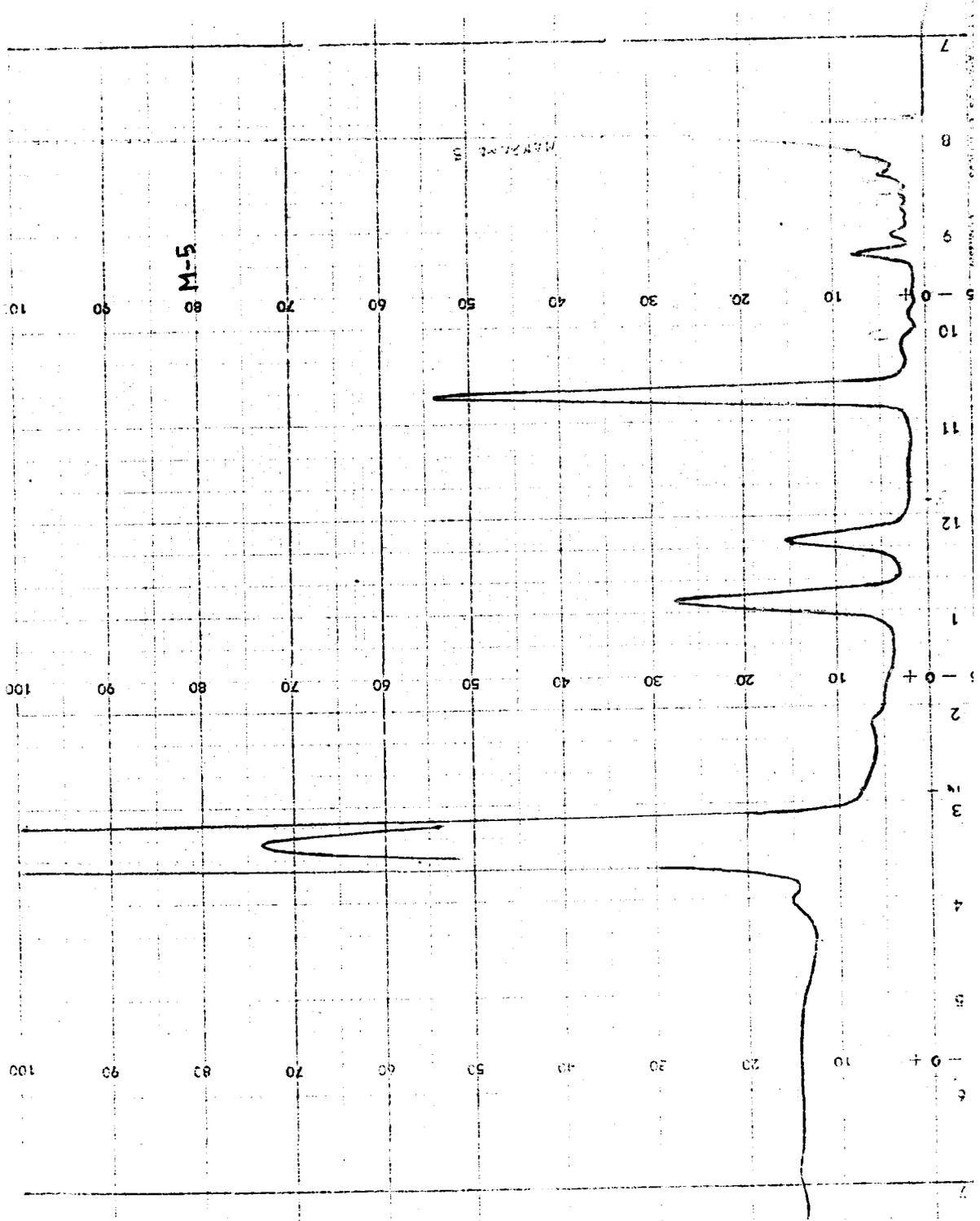


M-3-3

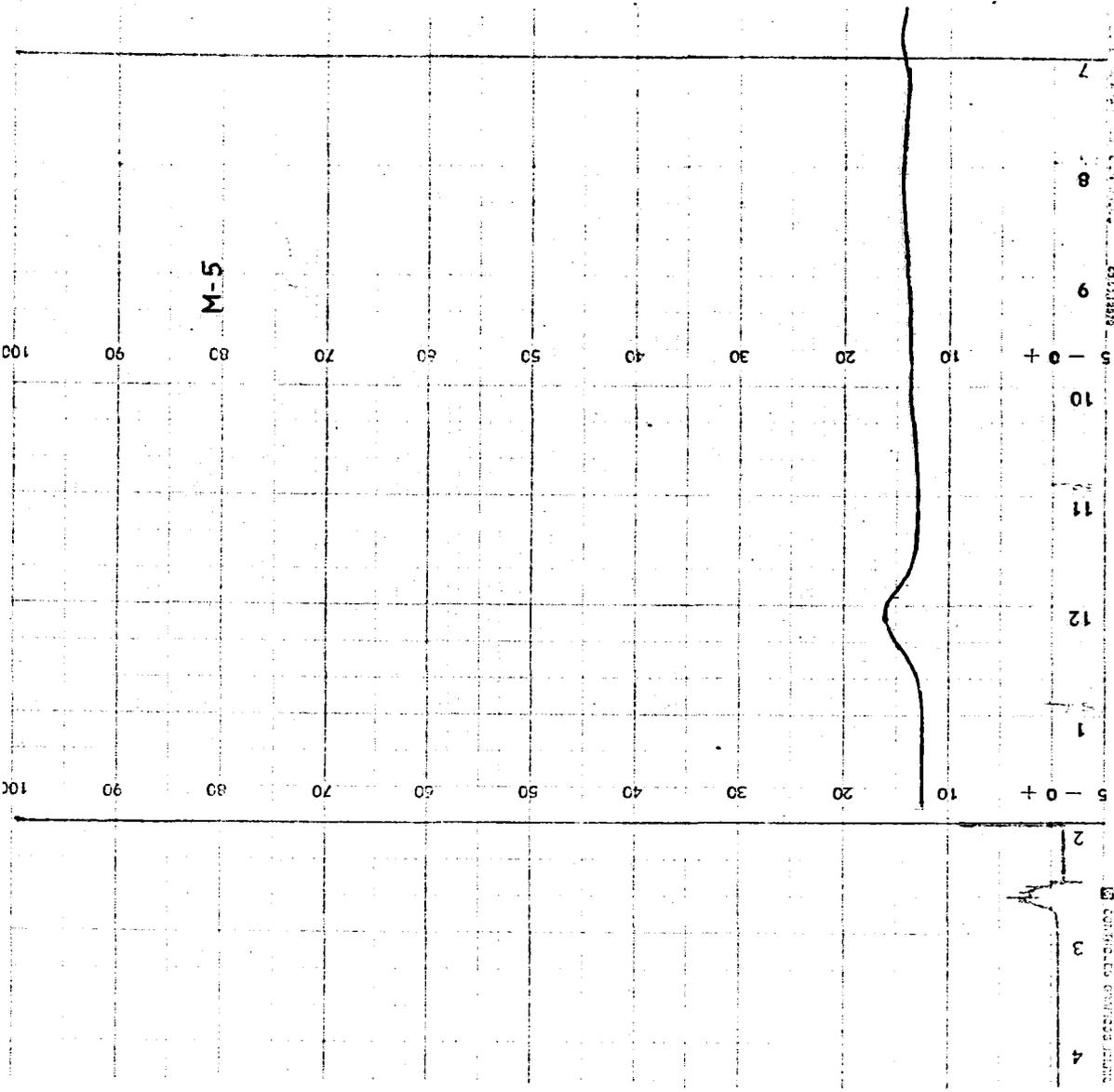


04524001





MONZANO



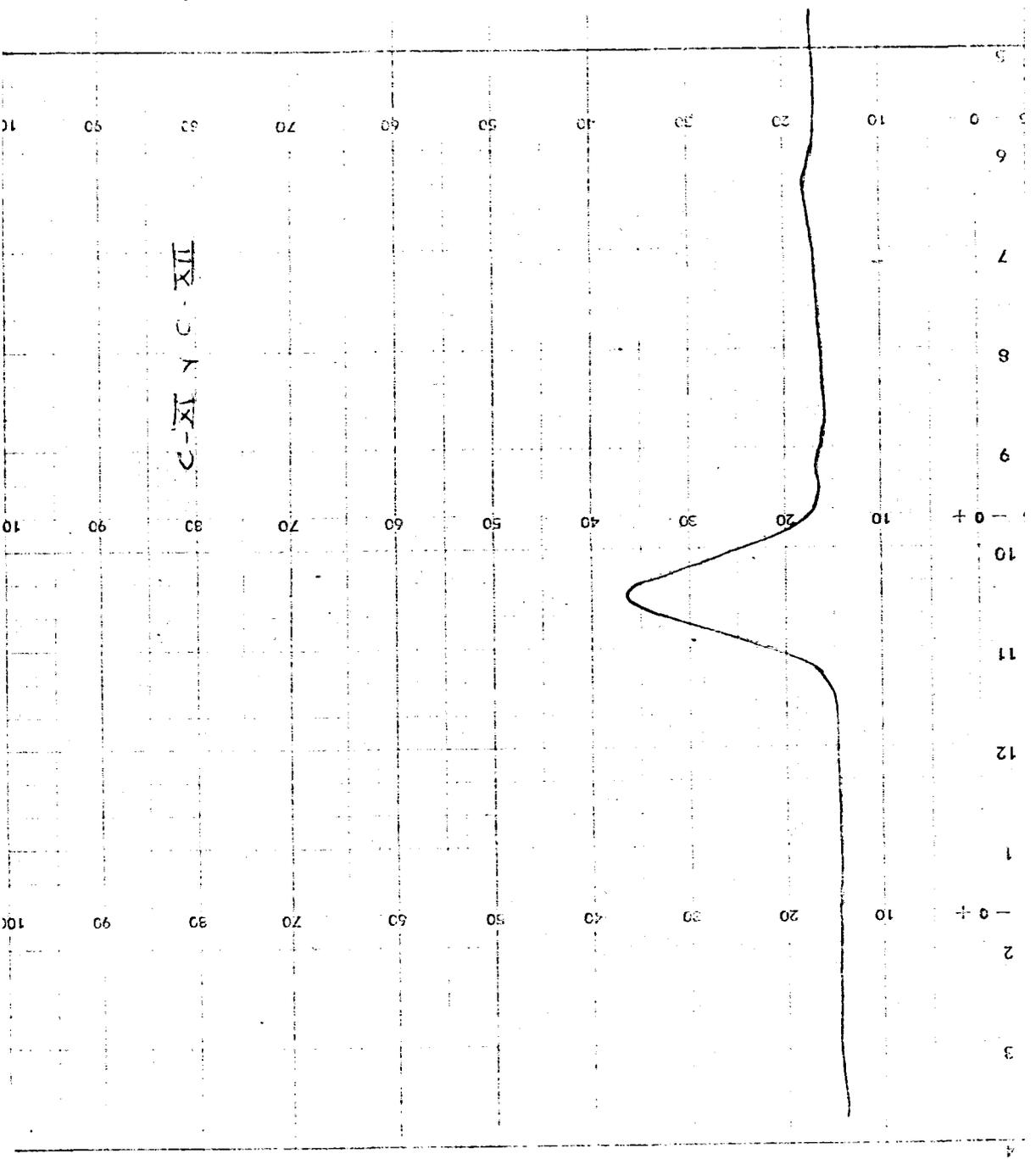


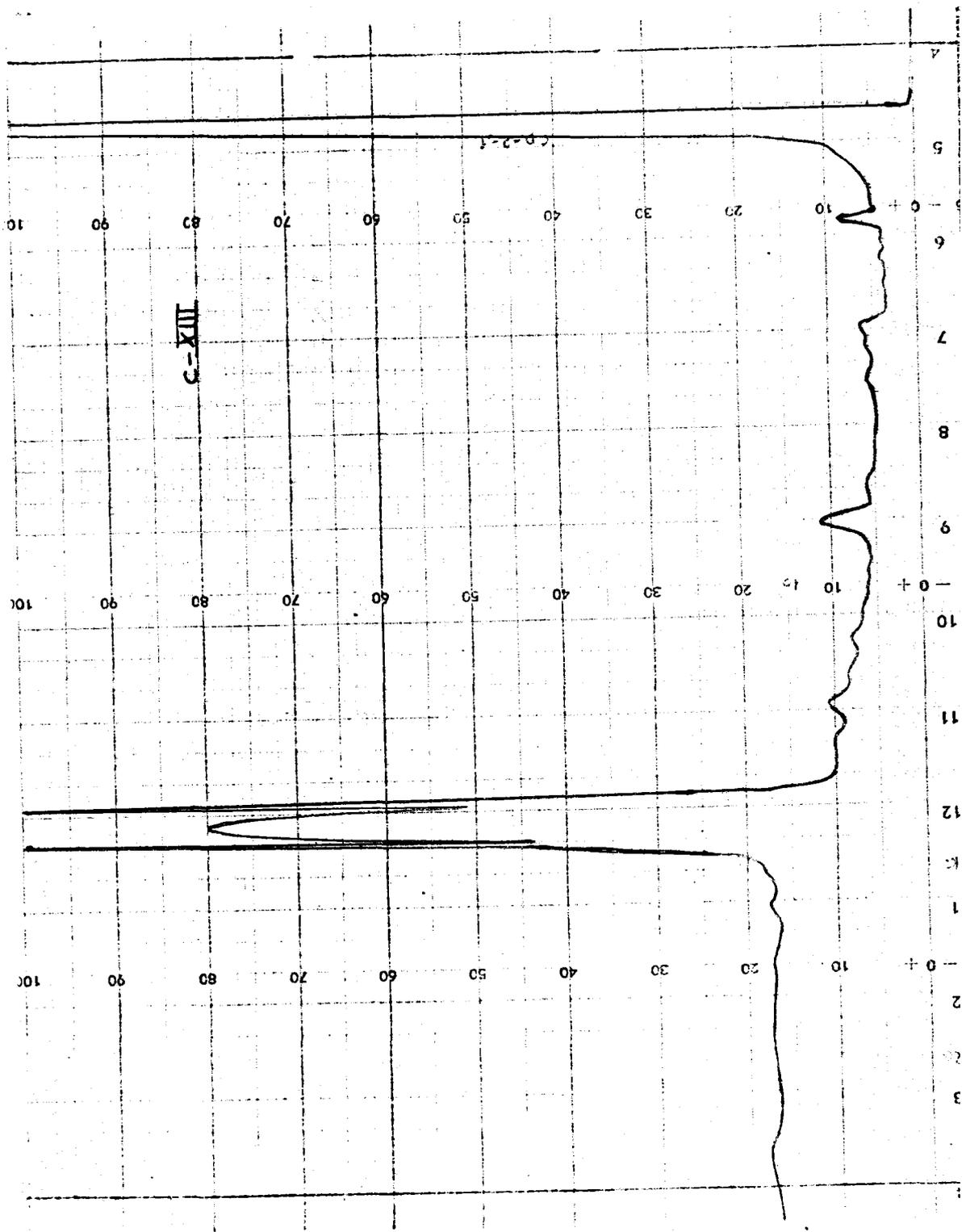
4.20.1.9.- Cromatogramas de los esteres metílicos de los ácidos aislados de la ciruela.-

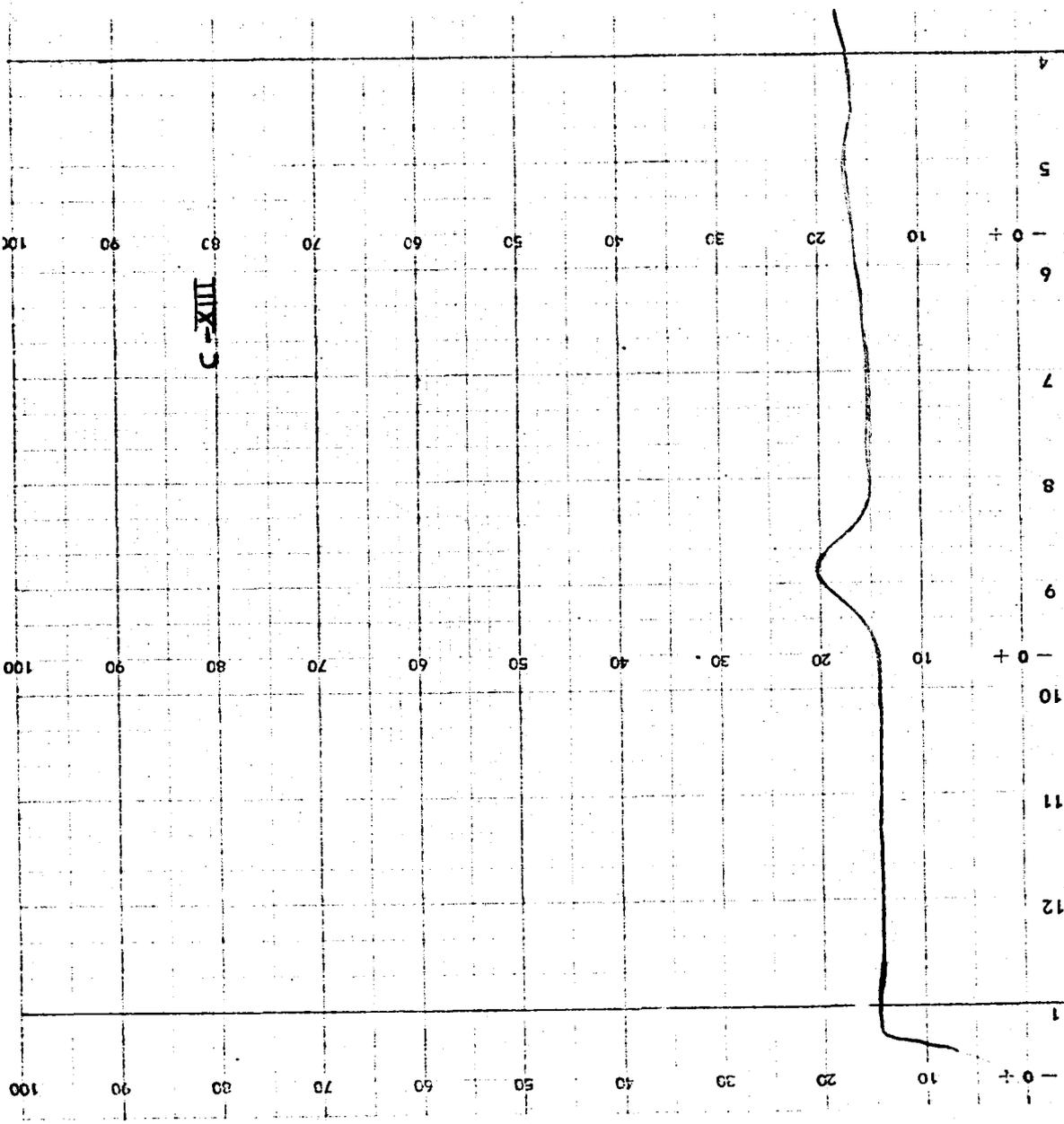
A continuación representamos los cromatogramas de los ácidos aislados de la ciruela por soluciones bencénicas de DUA y por resinas DOWEX-1 en ciclo  $\text{OH}^-$ .



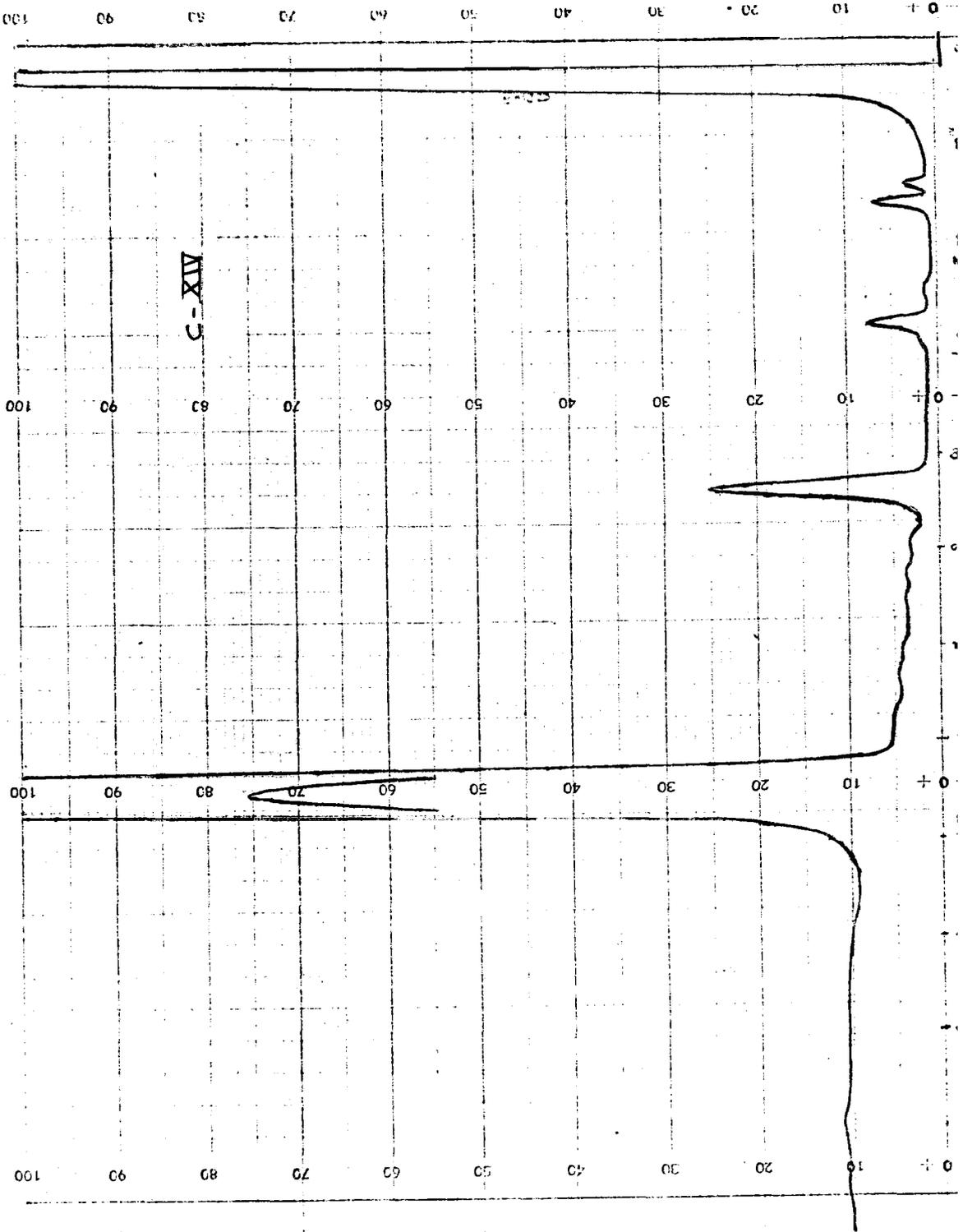
IX - C - XII

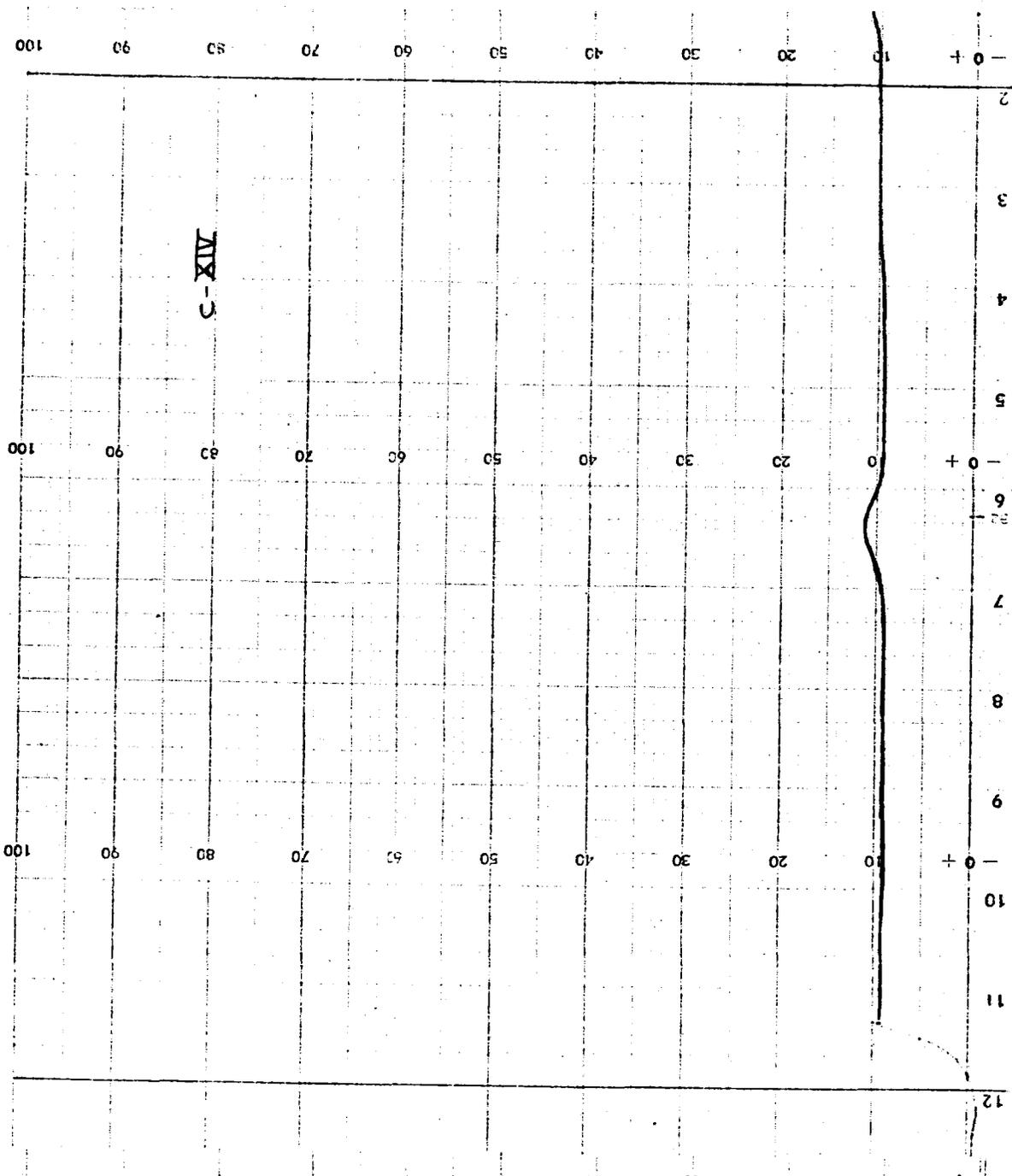






C-XIII





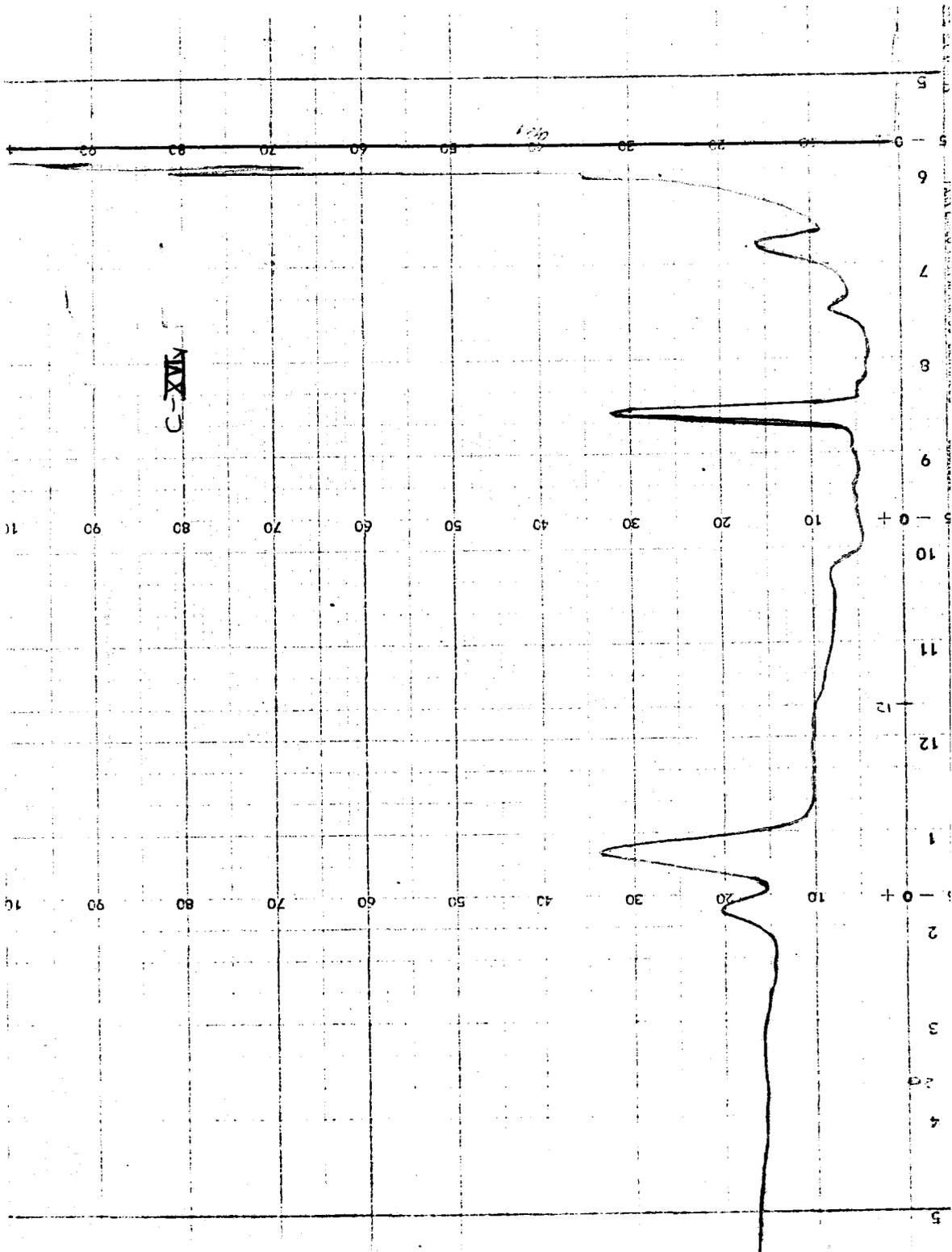
VIIA-5

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + -

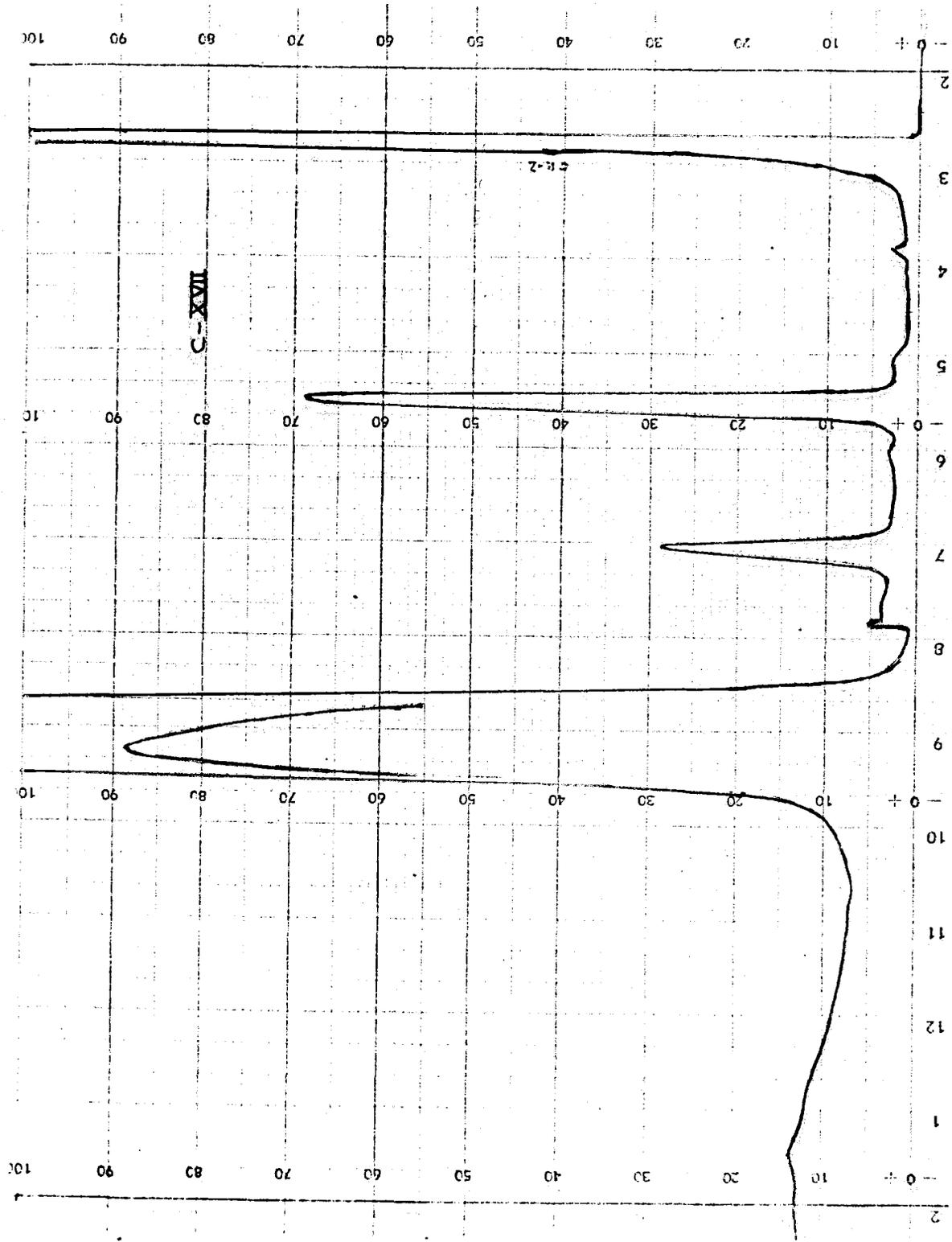
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + -

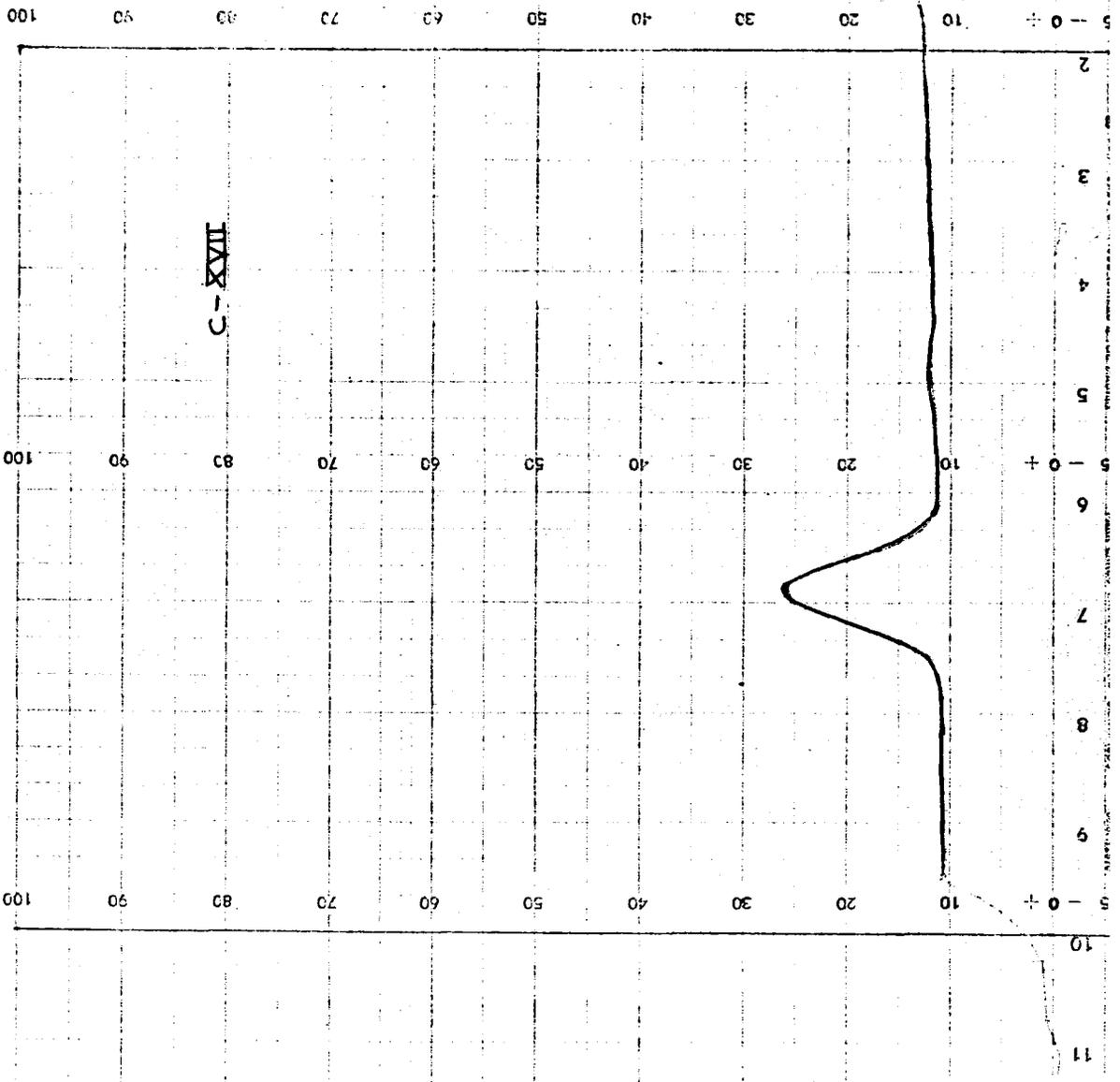
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 + -

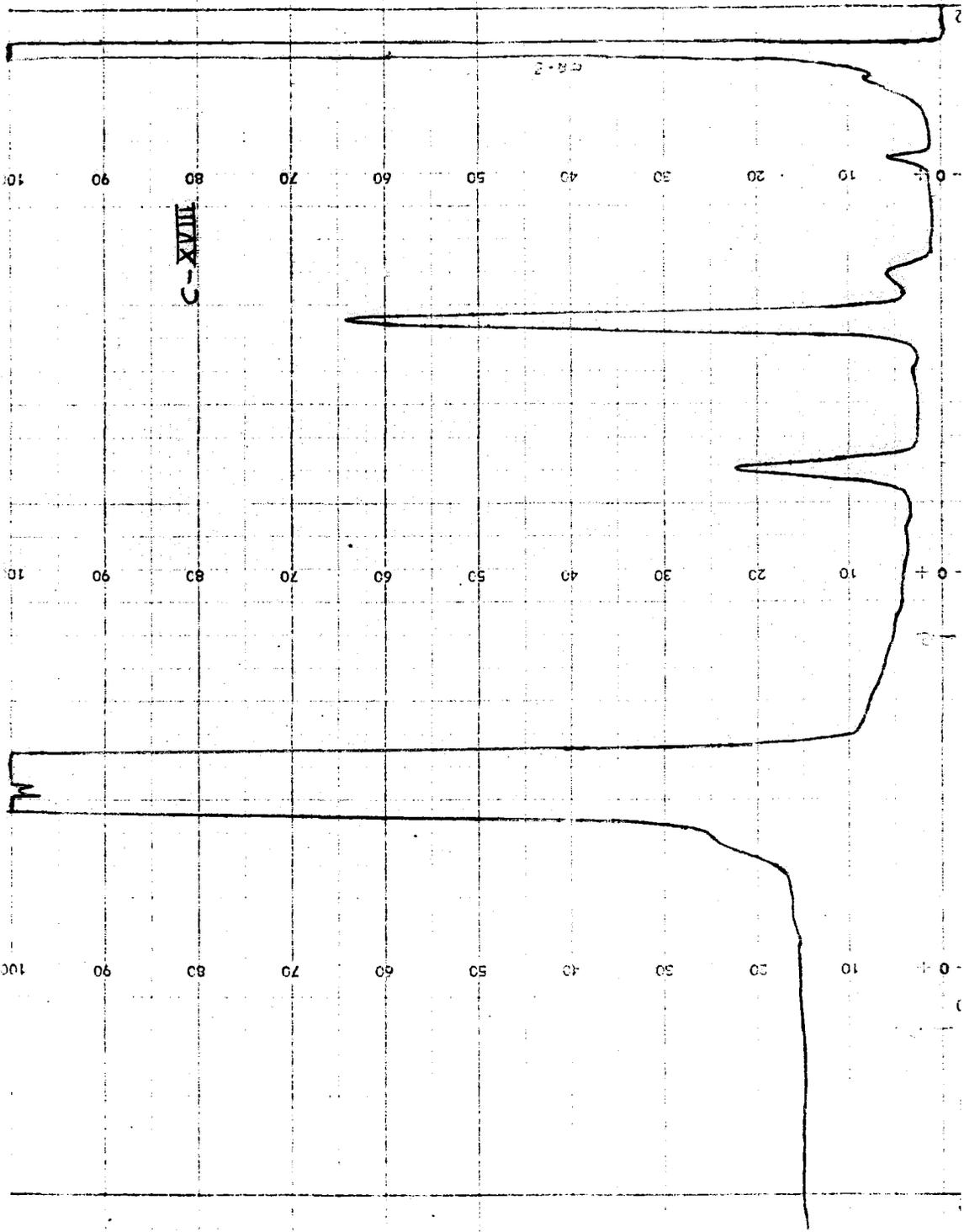
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12



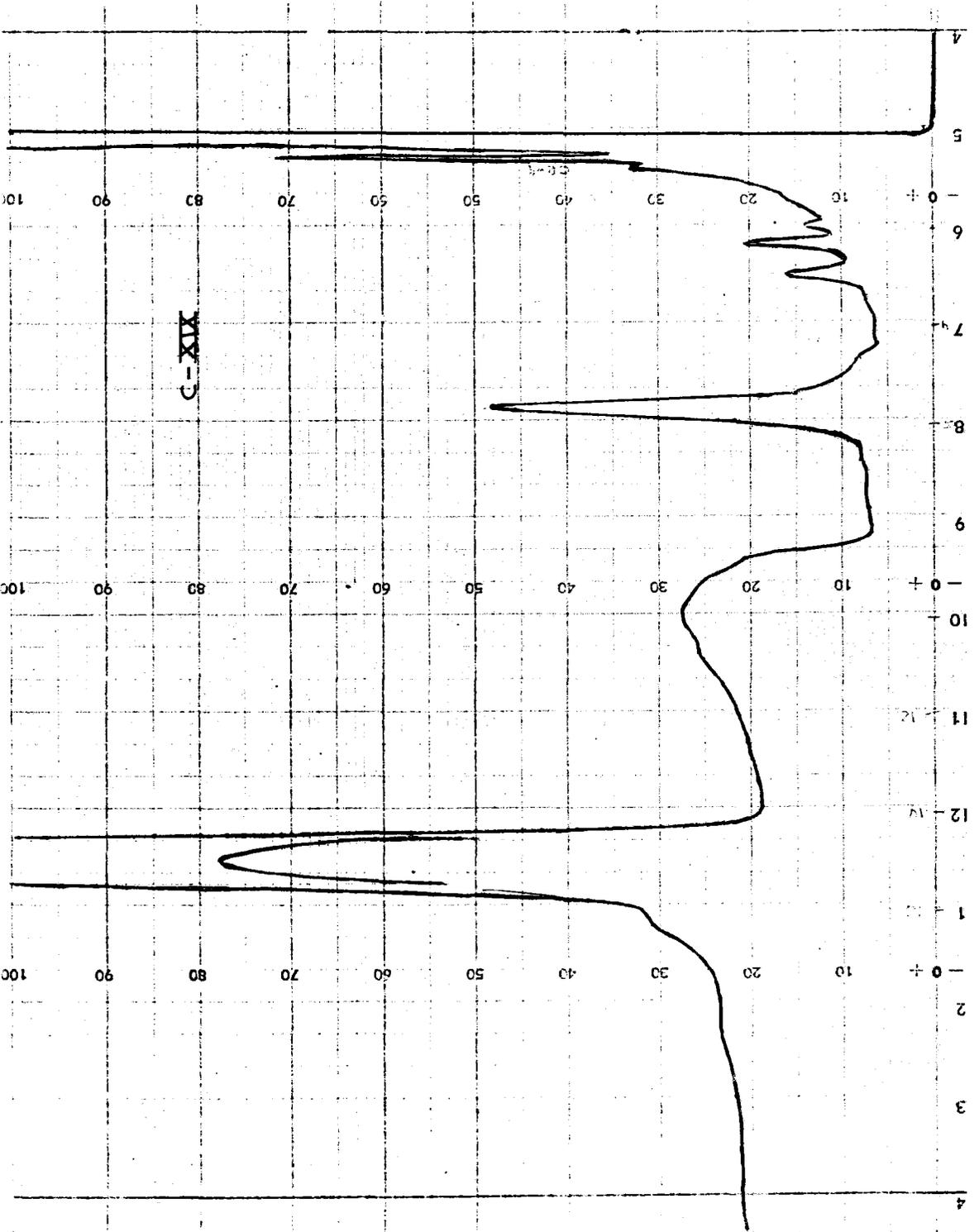




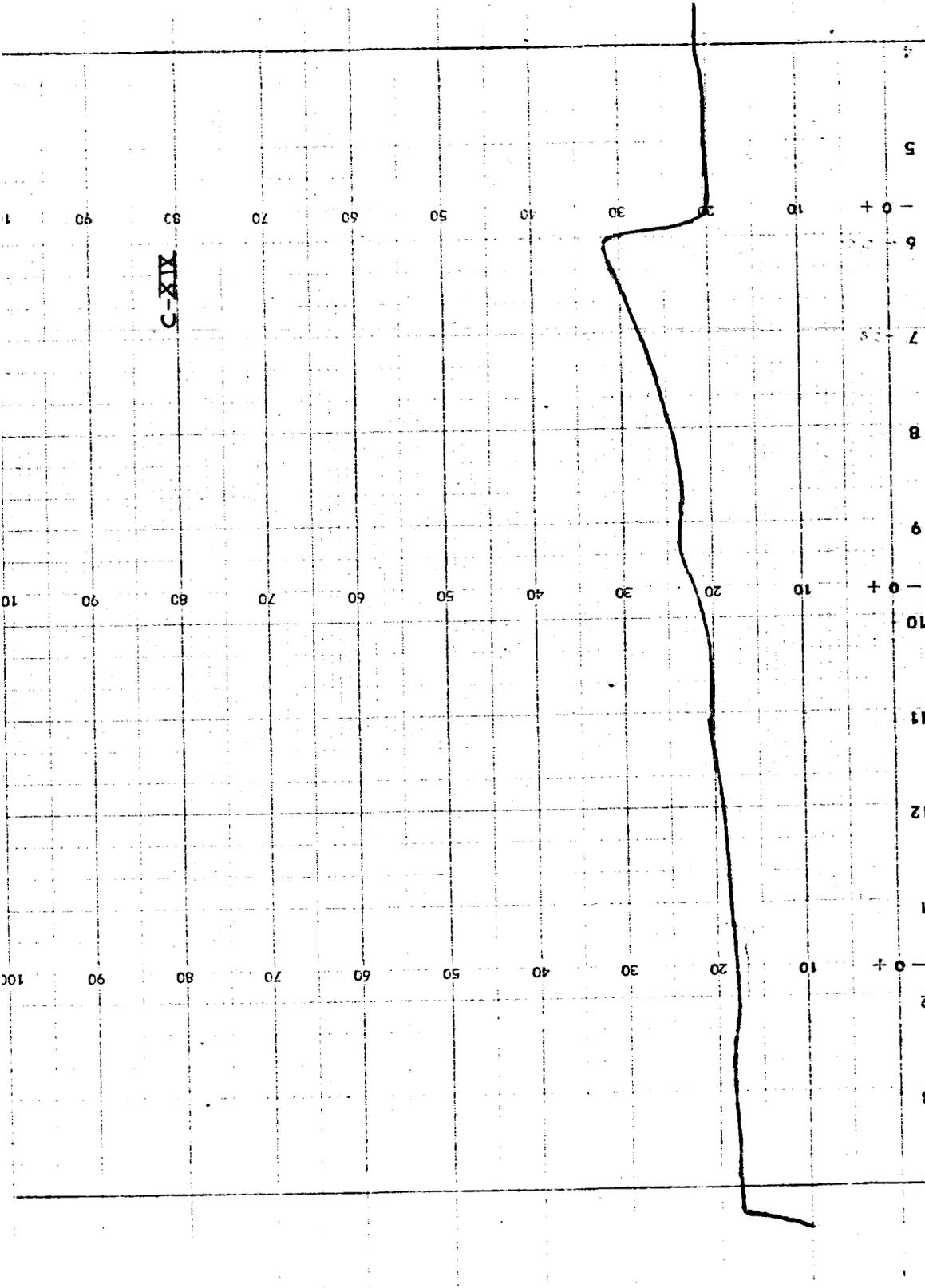




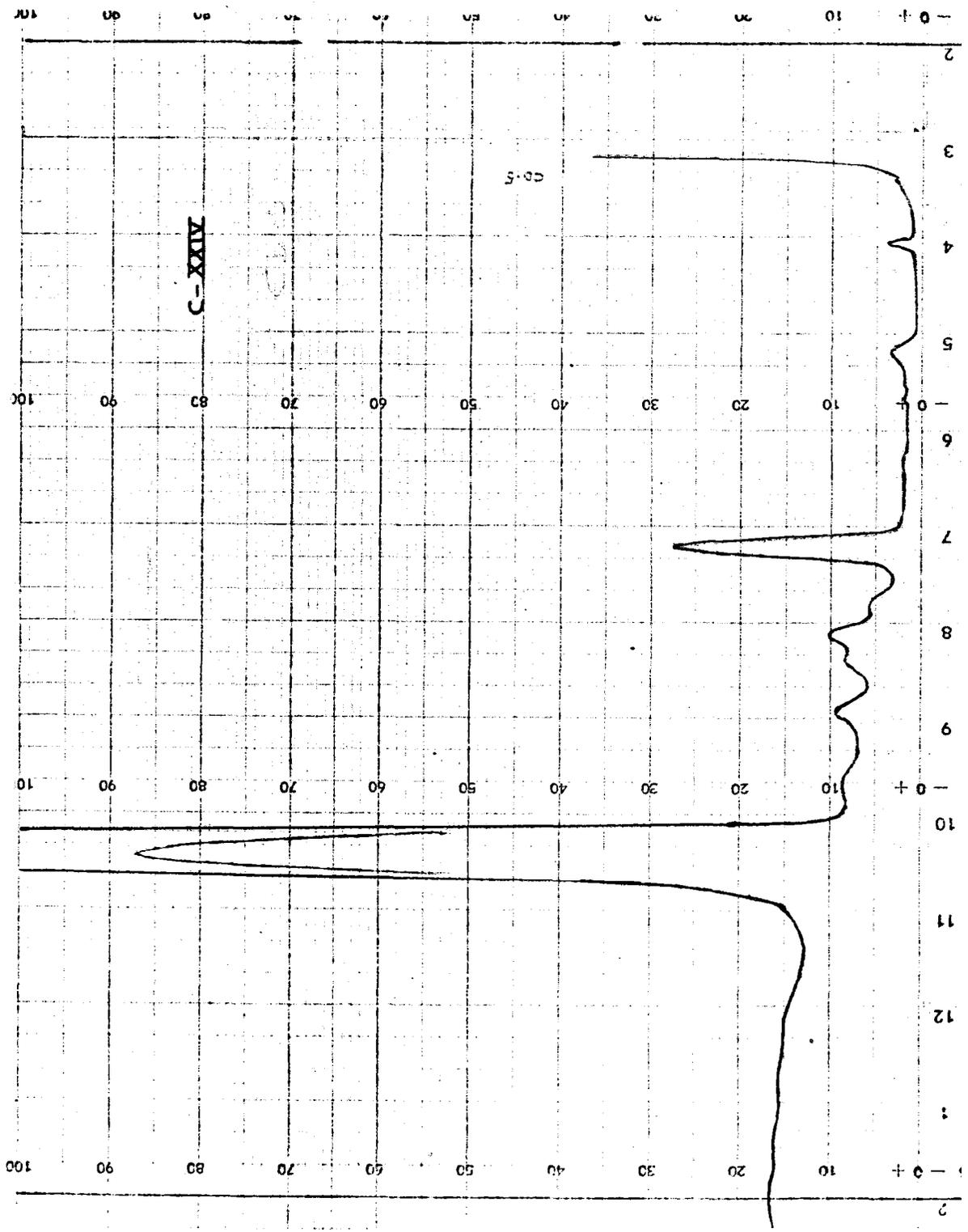




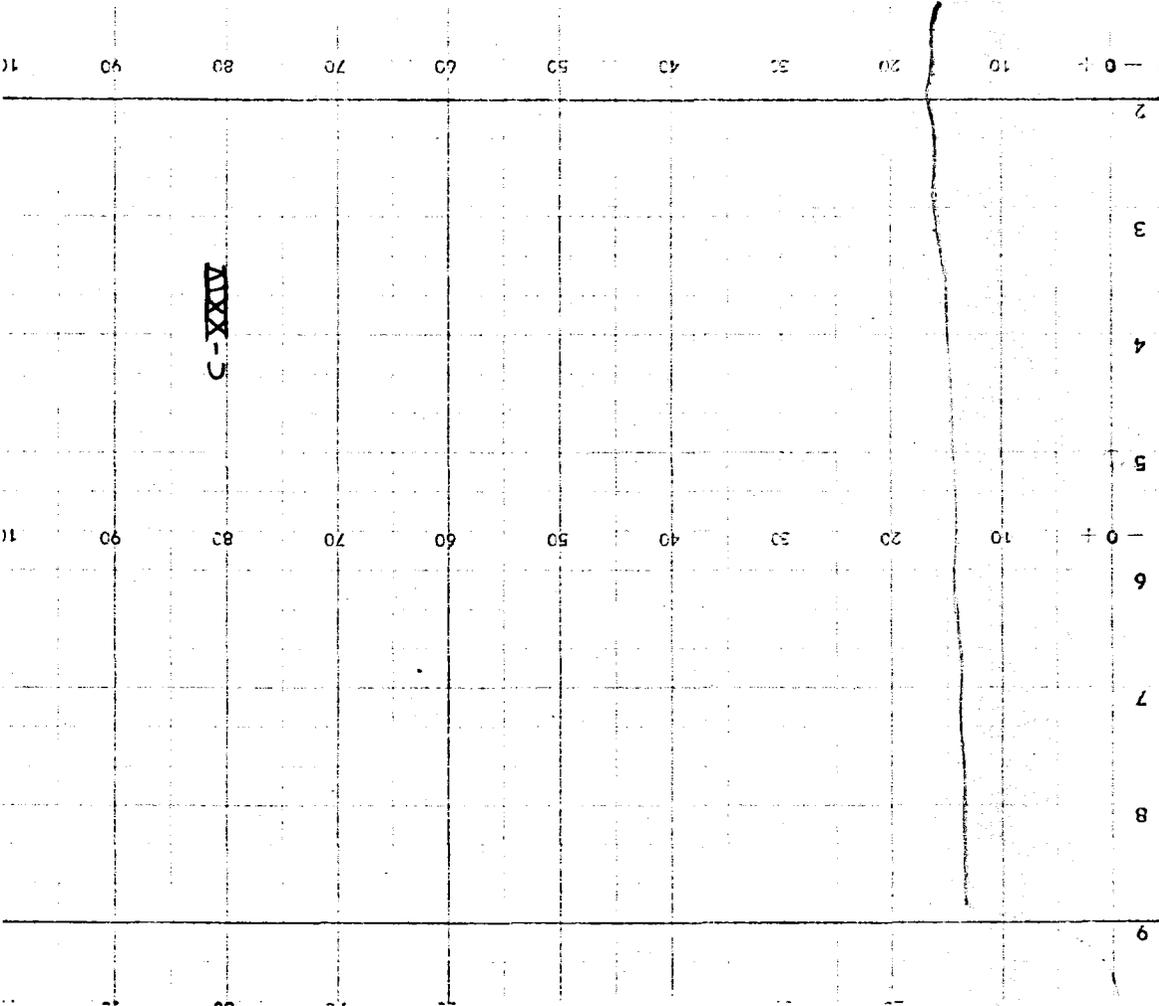
ESTACIONES DE MONITOREO  
ESTACION CARLO ERIC ANDRÉASSEN, PENÍNSULA DE BARANCO  
M. 2011110  
CONTIENES ESTACIONES  
A

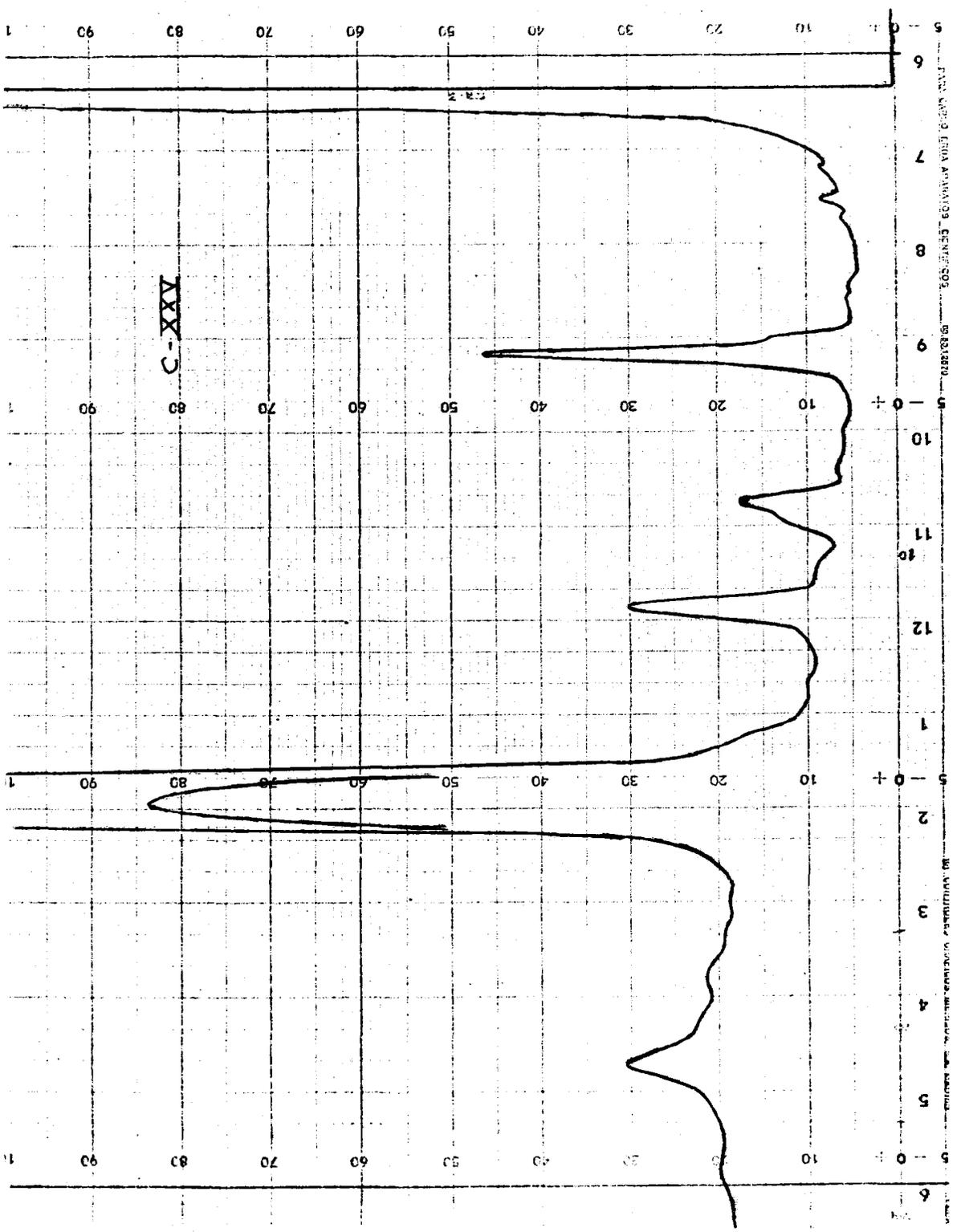


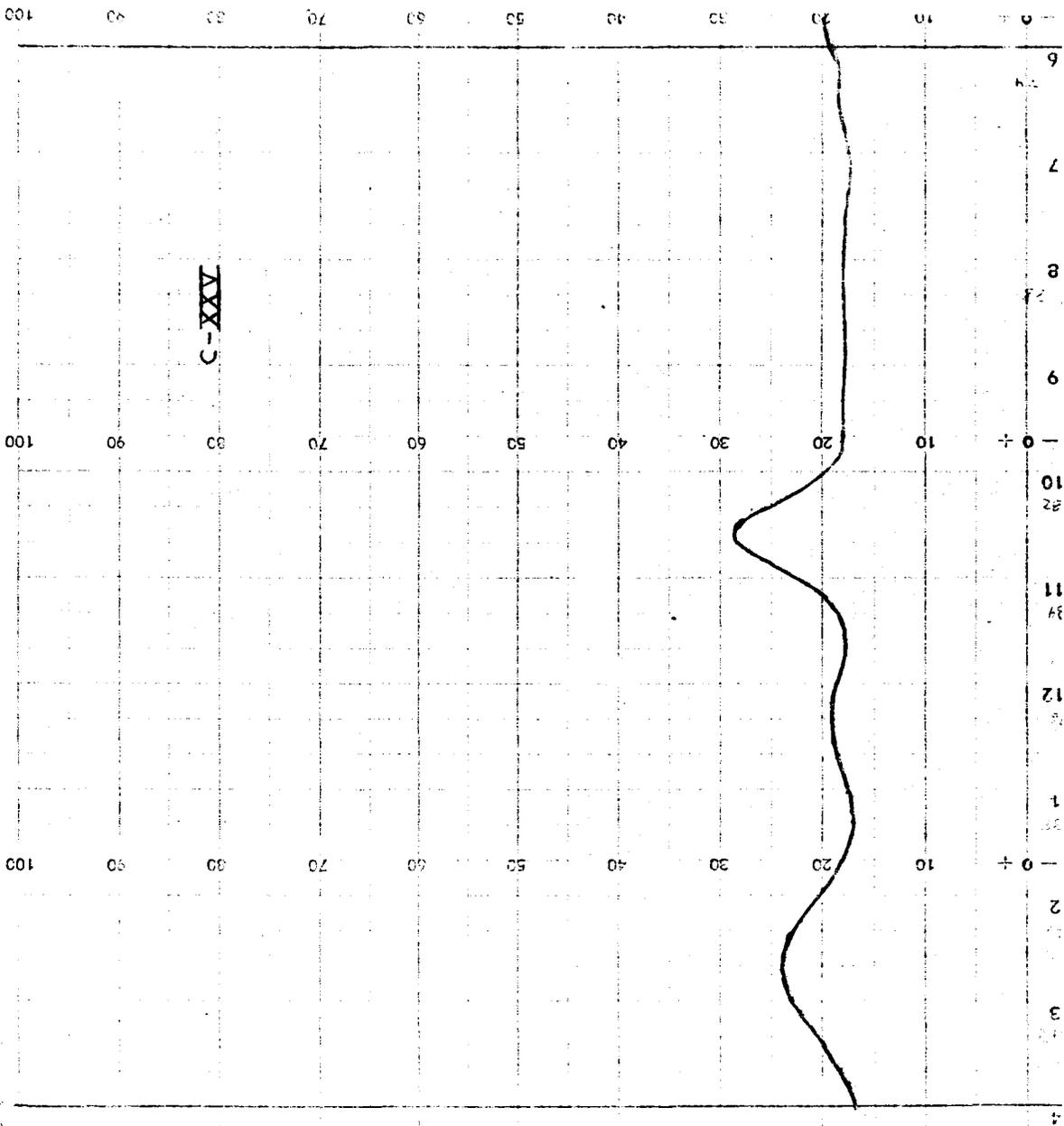
C-XIX



CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS  
SERIE: C-XXIV









#### 4.21.- Cromatografía de gases de TMS derivados.-

##### 4.21.1.- Formación de derivados.-

La formación de TMS derivados de los ácidos patrón y los de las muestras de sustancias naturales se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento de FERNANDEZ — FLORES y col.(52)(56) en combinación con la modificación de ZEN-ICHI y col(124) en lo que respecta a la formación previa de oximas de los cetoácidos que han de ser cromatografiados.

Mezcla silanizante: Mezcla preparada previamente de Piridina/HMDS/TMCS (9/3/1 en volumen) mezclados estrictamente en el orden indicado, pues de lo contrario hay dificultad para silanizar los hidroxilácidos.

Procedimiento: Añadir un ml de mezcla silanizante por cada 10 mg de muestra de ácidos. El tiempo de silanizado ha de ser de 2 horas como mínimo.

Formación de oximas: Tratamiento con solución en piridina de clorhidrato de hidroxilamina durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Viales utilizados: De vidrio con tapa de teflón roscada para lograr un cierre hermético y 5 ml de capacidad.

Las operaciones de trasvase han sido realizadas siempre con jeringas normales de 5 ml de capacidad.

Cuando se trata una muestra de productos naturales, y debido a que durante el secado queda la muestra fuertemente adherida al fondo del tubo y resulta difícil realizar la reacción en estas condiciones, se ha introducido de forma previa a la adición de la mezcla silanizante, dos pequeñas bolas de vidrio. Una vez añadida la mezcla silanizante se ha procedido a agitar vigorosamente, disgregando la muestra y realizando la reacción en estas condiciones.

Reactivos empleados:

Piridina para cromatografía FEROSA (contenido en agua 0,05%)

Clorhidrato de hidroxilamina Merck r.a.

HMDS y TMCS FLUKA

Se han preparado TMS derivados a partir de ácidos libres y también a partir de sales de cinc y amónicas, utilizando en todos los casos el mismo método de silanización.

Acidos patrón empleados:

Glicólico, oxálico, láctico, malónico, benzoico, fenilacético, succínico, fumárico, glutárico, málico,  $\alpha$ -hidroxiglutarico,  $\alpha$ -cetoglutarico, tartárico, aconítico, cítrico, quínico, gálico, tricarbálico, citracónico, múcico, cafeico, abscisico, salicílico, mevalónico.

Todos los ácidos empleados son de calidad r.a. de las firmas ALDRICH, SIGMA, MERCK, FLUKA y FEROSA.

Es muy importante realizar todas las operaciones de formación de derivados en condiciones anhidras.

#### 4.21.2.- Construcción de la columna para TMS derivados.-

Se ha construido una columna de vidrio pırex de 2 m de longitud y 1,75 mm D.I., procediéndose a continuación a desactivarla por lavados con ácido nítrico durante 24 horas, y posterior tratamiento con solución al 5% de TMCS en tolueno, lavando después con acetona y secando por corriente de aire.

Relleno utilizado:

Silicona SE-30 al 3% en peso sobre Chromosorb W lavado con ácido y silanizado, de 60/80 mallas. Ambas cosas son de la casa Carlo Erba.

La cantidad apropiada de silicona se pesó en una balanza semimicro de la casa Mettler, se disolvió en cloruro de metileno (para cromatografía, de la Carlo Erba), y se agregó sobre la cantidad justa de Chromosorb, pesado sobre la misma balanza y empapado del mismo cloruro de metileno. Se procedió a continuación a eliminar lentamente el cloruro de metileno en evaporador rotatorio bajo presión reducida, lográndose una masa semiseca que se termina de secar en un lecho fluido con nitrógeno seco y caliente.

Después de un ligero tamizado se procedió a llenar la columna, sometiéndola a vacío por un extremo y manteniendo siempre una vigorosa vibración.

El acondicionamiento de la columna se llevó a cabo de una forma progresiva en cuanto a temperaturas se refiere.

## 4.21.3.- Cálculo de las características de la columna.-

Los datos experimentales tomados para calcular el comportamiento de la columna son los siguientes:

$T_c$  100°C

$P_M$	$P_i$	$P_o$	$P_i/P_o$	$j$	$(P_i^2/P_o^2)^{-1}$	$u_{\bullet}$
1,5	2,42	0,92	2,68	0,505	6,2	950
1,8	2,72	0,92	2,90	0,475	7,4	1300
2,0	2,92	0,92	3,22	0,445	9,4	1800

$T_c$  373°K —  $T_a$  298°K —  $P_M$  1,8 —  $F_m$  20 ml/min

$T_c$  398°K —  $T_a$  298°K —  $P_M$  2,41 —  $F_m$  30 ml/min

$T_c$  423°K —  $T_a$  298°K —  $P_M$  2,55 —  $F_m$  25,5ml/min

$T_c$  448°K —  $T_a$  298°K —  $P_M$  2,69 —  $F_m$  23 ml/min

$T_c$  473°K —  $T_a$  298°K —  $P_M$  2,85 —  $F_m$  19 ml/min

$T_c$  423°K —————→  $P_M$  —————→  $d_o$

2,46                      0,30

2,00                      0,40

1,41                      0,60

Para el cálculo de  $K$  y  $\epsilon$  :

$T_c$	150°C
$T_a$	25 °C
$r^2$	$7,5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$
$\eta$	$2,3 \times 10^{-4} \text{ poises}$
$P_M$	2,55 atms.
$F_m$	25,5 ml/min
$d_o$	0,18 cm
$P_o$	$0,92 \times 10^6 \text{ dinas/cm}^2$
$P_i/P_o$	3,77
$j$	0,373
$u_o$	63 cm/seg

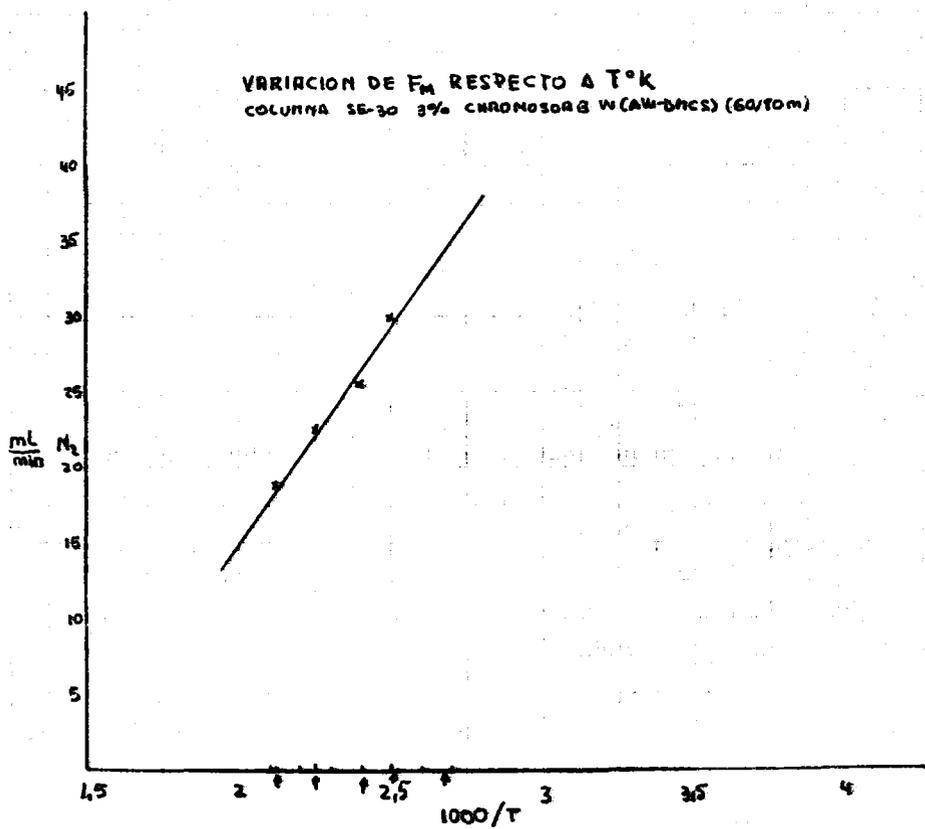
$$\epsilon = F_M \frac{T_c}{T_a} \frac{P_o}{P_n} \frac{1}{\pi r^2 u_o}$$

$\epsilon$  de la columna = 0,40

Cálculo de  $K$  segun KOZENY y CARMAN:

$$K = \left[ \frac{2 \eta_g L P_o}{P_i^2 - P_o^2} \right] u_o$$

$K$  de la columna  $1,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$



Cálculo de la altura de un plato teórico.-

Salvo si se indica expresamente lo contrario, los cálculos están realizados sobre el TMS derivado del ácido benzoico.

Temperatura de columna 160°C

$P_M$	$F_M$	H
1,5	15	1,3
1,8	20	1,8
2,0	24	1,9
2,2	28	2,2
2,4	30	2,4
2,6	33	2,5

Temperatura de columna 150 °C

$P_M$	$F_M$	H
1,5	12	2,1
1,8	17	2,8
2,1	20	3,2
2,4	25	4,1

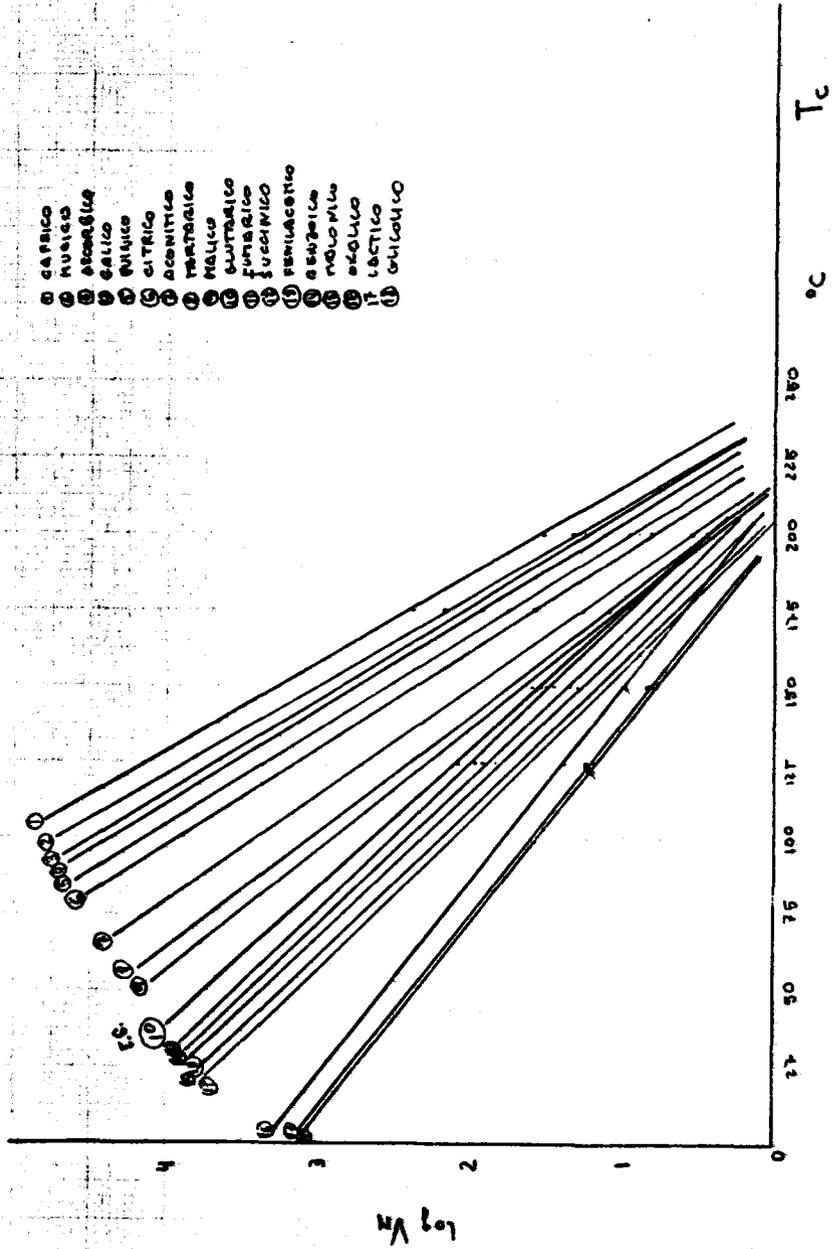
## 4.21.4.- Análisis cualitativo.-

DISTANCIA DEL MAXIMO DEL PICO AL FRENTE DEL  
DISOLVENTE (cm)

ACIDO(TMS)	200 °C	175 °C	150 °C	125 °C	100 °C
OXALICO			0,4	1,0	3,2
GLICOLICO			0,3	0,7	2,3
LACTICO			0,3	0,7	
MALONICO			0,8		
CITRACONICO	0,3	0,6	1,4	3,6	
SUCCINICO			1,1	2,95	
FENILACETICO			1,0	2,6	
GLUTARICO	0,4	0,75	1,7	5,0	
MALICO	0,5	1,10	2,9	9,1	
TARTARICO	0,9	2,30			
ASCORBICO	3,2	8,7			
ACONITICO	1,3	3,4			
TRICARBALILICO	1,25	3,2			
CITRICO	1,9	5,1			
QUINICO	2,5	6,6			
CAFEICO	5,7	16,9			
MUCICO	4,9	14,3			
GALICO	3,1	8,6			
FUMARICO			1,35	3,7	

VOLUMENES DE RETENCION NETO DE LOS PATRONES  
EN REGIMEN ISOTERMO ( $V_N$ )

ACIDO(TMS)	200 °C	175°C	150°C	125°C
GLICOLICO			6,1	17,5
LACTICO			6,3	17,6
OXALICO			9,0	25,0
MALONICO			17,0	
BENZOICO			17,5	
FENILACETICO			20,0	65,0
SUCCINICO			23,1	75,0
FUMARICO			28,0	93,0
GLUTARICO	2,85	12,5	36,0	125,0
MALICO	3,6	18,4	61,0	228,0
$\alpha$ -HIDROXIGLUT.				
$\alpha$ -CETOGLUTAR.				
TARTARICO	6,4	38,5		
ACONITICO	9,3	57,0		
CITRICO	13,6	85,0		
QUINICO	17,8	110,0		
GALICO	22,0	144,0		
ASCORBICO	23,0	145,0		
MUCICO	35,0	240,0		
CAFEICO	41,0	280,0		
ABSCISICO				

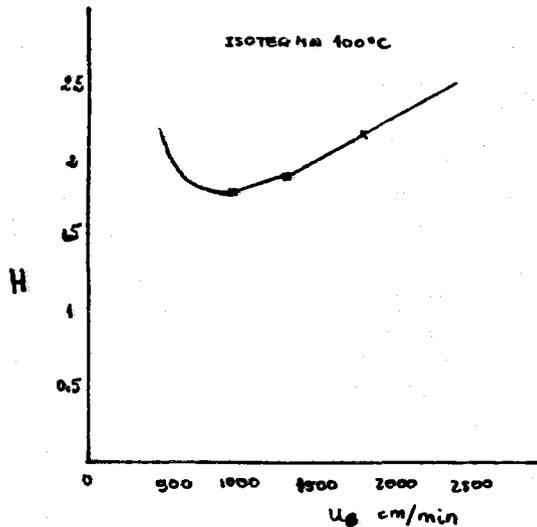


CALCULO DEL REGIMEN OPTIMO DE TEMPERATURAS=

Como puede apreciarse en el gráfico de la página anterior, esta columna nos permite realizar la separación con una relación de calentamiento elevada, lo que nos favorecerá en la rapidez de análisis y en las separaciones efectivas, pues los picos conseguidos serán muy estrechos y la altura equivalente a un plato teórico muy pequeña.

Podemos partir de una isoterma inicial de 100°C durante 3 minutos y después una programación a 10,5 °C/min hasta alcanzar los 205°C, manteniendo después esa temperatura en régimen isoterma.

Se ha hecho un cálculo previo, en condiciones isotérmicas, de la relación existente entre  $U_0$  y  $H$ , lo que representamos en la siguiente figura:



En la práctica se ha escogido una  $P_M$  que proporcione una  $u_0$  mayor que la óptima representada en la figura pues teniendo en cuenta que se ha trabajado a temperatura programada el flujo disminuye al aumentar  $T_C$ , comprobándose empíricamente que se debía trabajar a un flujo más elevado.

Se ha trabajado por tanto en las siguientes condiciones:

Temperatura del horno:

100°C durante 3 minutos

Programación lineal de -  
temperaturas a 10,5 °C/min hasta alcanzar 205 °C.

Isoterma a 205 °C

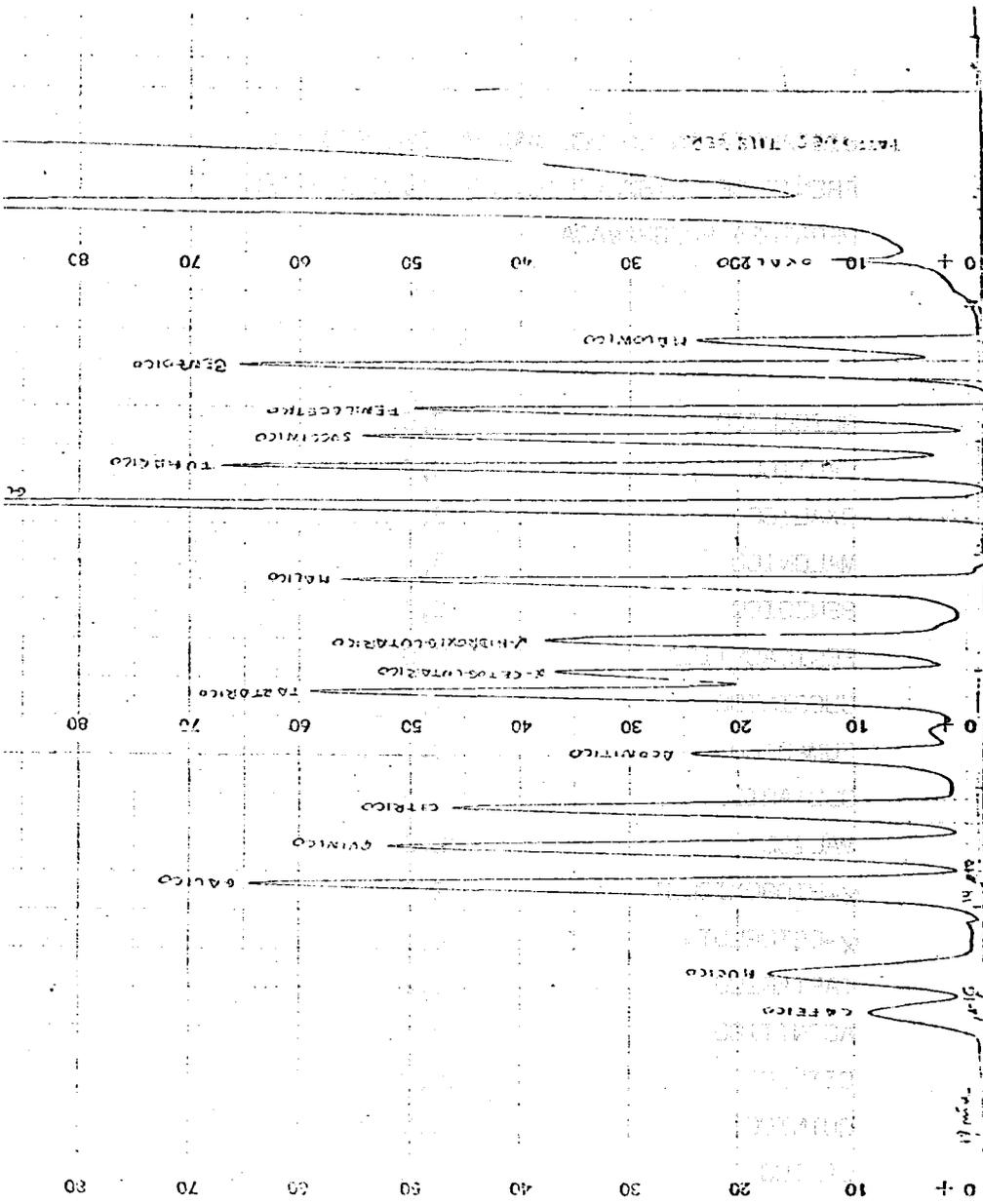
Presión manométrica(100°C): 2,1 atm.

Flujo de  $N_2$  : 26 ml/min

Temperatura de inyector: 240 °C

Temperatura de bloque de detectores: 290 °C

En la página siguiente podemos apreciar el cromatograma obtenido de los TMS derivados de los patrones.



SEPARACION CROMATOGRÁFICA DE LOS TMS DERIVADOS DE LOS ÁCIDOS PATRON

DISTANCIA EN CM DEL MAXIMO DEL PICO AL  
FRENTE DEL DISOLVENTE, TRABAJANDO A TEM-  
PERATURA PROGRAMADA

GLICOLICO	2,5
LACTICO	2,7
OXALICO	3,7
MALONICO	5,4
BENZOICO	6,1
FENILACETICO	7,0
SUCCINICO	7,6
FUMARICO	8,3
GLUTARICO	9,1
MALICO	10,8
$\alpha$ -HIDROXIGLUT.	12,0
$\alpha$ -CETOGLUT=	12,7
TARTARICO	13,2
ACONITICO	14,5
CITRICO	15,7
QUINICO	16,5
GALICO	17,3
MUCICO	19,3
CAFEICO	20,1

En el siguiente cuadro podemos apreciar el valor de  $H$  cuando trabajamos a temperatura programada:

$P_M$	$H_{Benz.}$	$H_{Glut.}$	$H_{Citrico}$
1,5	0,25		
1,9	0,55		
2,1	0,69	0,36	0,13
2,3	0,81		

Trabajando en estas condiciones,  $H$  medido para el benzoico ( $d-d_0 = 6,1$  para  $P_M = 2,1$ ) es tanto menor para valores pequeños de  $P_M$ . Sin embargo se ha trabajado a  $P_M = 2,1$  debido a que en estas condiciones la respuesta del detector era mejor y la separación en las últimas zonas del cromatograma también mejoraba en estas condiciones.

Si comparamos los valores de  $H$  obtenidos a temperatura programada con los realizados en similares condiciones pero en régimen isoterma, podemos apreciar una clara ventaja para la programación lineal de temperatura, que permite

además realizar la cromatografía en tan sólo 19 minutos.

Se ha conseguido una columna que, trabajando en las condiciones citadas, posee una media de 8000 platos - teóricos, pues en la primera zona del cromatograma tiene 2880 platos teóricos (benzoico,  $d-d_0 = 6,1$  cm), en la zona media posee 5560 (glutárico,  $d-d_0 = 9,1$  cm) y en la zona última del cromatograma 15.760 (cítrico,  $d-d_0 = 15,7$  cm).

Se han realizado experiencias con objeto de encontrar las condiciones óptimas de trabajo del detector, encontrando que las mejores respuestas, para el flujo de  $N_2$  empleado, se obtiene para valores de  $P_M$  Hidrógeno de 0,9 atms. y  $P_M$  aire de 1,8 atms.

#### 4.21.5.- Análisis cuantitativo.-

El análisis cuantitativo se ha llevado a cabo mediante el empleo de ácido glutárico como patrón interno.

El patrón interno se ha añadido siempre antes de iniciarse el proceso de derivación, y en el caso de muestras de productos naturales, se añade el patrón interno en cuanto se termine la operación de secado.

En el caso de que haya habido algún proceso extraordinario, como por ejemplo saponificación de la muestra en algún vso determinado, el patrón interno se ha añadido antes de realizar la saponificación.

Todas las pesadas se han realizado en balanza Mettler semimicro.

Para el cálculo de respuestas relativas se han pesado exactamente alrededor de 6 mg de cada uno de los patrones, introduciendo el total en un matraz aforado de 25 ml de capacidad, añadiendo mezcla silanizante hasta completar los 25 ml. Previamente se habían formado las oximas de los cetoácidos de la forma indicada anteriormente.

Para el cálculo de las respuestas relativas se han inyectado 5, 4, 3 y 2  $\mu$ l de la solución de derivados de los ácidos patrón.

La forma de realizar la pesada queda reflejada - en el siguiente cuadro. De esta forma no hay que realizar ningún trasvase. La cantidad de cada ácido se puede determinar por diferencia.

MALONICO	6,29
FENILACETICO	13,32
SUCCINICO	20,37
FUMARICO	27,30
GLUTARICO	33,12
MALICO	38,65
$\alpha$ -CETOGLUT.	45,58
TARTARICO	52,25
ACONITICO	58,22
CITRICO	68,15
QUINICO	74,33
GALICO	83,02
MUCICO	88,58
CAFEICO	95,16
LACTICO	111,53
OXALICO	123,57
BENZOICO	129,79
GLICOLICO	139,62
$C_{11}H_{21}NH_2OH$	155,32 mg totales

CORRESPONDENCIA ENTRE  $\mu\text{g}$  INYECTADOS Y AREAS  
DE LOS CORRESPONDIENTES PICOS (RESPUESTAS  
ABSOLUTAS)

	$\mu\text{g} \times 10$	$\text{mm}^2$
GLICOLICO	19,66	380
LACTICO	32,74	400
OXALICO	17,20	160
MALONICO	12,58	90
BENZOICO	12,44	200
FENILACETICO	14,06	155
SUCCINICO	14,10	166
FUMARICO	13,68	200
GLUTARICO	11,64	223
MALICO	11,06	170
$\alpha$ -CETOGLUT.	13,46	160
TARTARICO	13,34	230
ACONITICO	11,94	100
CITRICO	18,16	210
QUINICO	12,36	235
GALICO	17,38	290
MUCICO	11,12	140
CAFEICO	15,16	120

CORRESPONDENCIA ENTRE  $\mu\text{g}$  INYECTADOS Y AREAS  
DE LOS CORRESPONDIENTES PICOS  
(RESPUESTAS ABSOLUTAS)  
(TODAS LAS AREAS ESTAN MEDIDAS CON PLANIMETRO)

	$\mu\text{g} \times 10$	$\text{mm}^2$
GLICOLICO	15,73	300
LACTICO	27,10	350
OXALICO	13,75	100
MALONICO	10,10	70
BENZOICO	10,00	190
FENILACETICO	11,20	110
SUCCINICO	11,30	140
FUMARICO	11,05	180
GLUTARICO	9,31	190
MALICO	8,85	140
$\alpha$ -CETOGLUT.	10,08	125
TARTARICO	10,06	205
ACONITICO	9,81	82
CITRICO	14,65	180
QUINICO	9,87	200
GALICO	13,90	220
MUCICO	8,85	115
CAFEICO	12,20	95

CORRESPONDENCIA ENTRE  $\mu\text{g}$  INYECTADOS Y AREAS  
 DE LOS CORRESPONDIENTES PICOS  
 (RESPUESTAS ABSOLUTAS)

	$\mu\text{g} \times 10$	$\text{mm}^2$
GLICOLICO	11,90	250
LACTICO	19,65	235
OXALICO	10,30	100
MALONICO	7,60	50
BENZOICO	7,46	150
FENILACETICO	8,41	100
SUCCINICO	8,52	100
FUMARICO	8,32	135
GLUTARICO	6,99	140
MALICO	6,65	107
$\alpha$ -CETOGLUT.	8,05	95
TARTARICO	8,00	150
ACONITICO	7,19	60
CITRICO	11,10	120
QUINICO	7,45	135
GALICO	10,40	150
MUCICO	6,70	85
CAFEICO	9,07	60

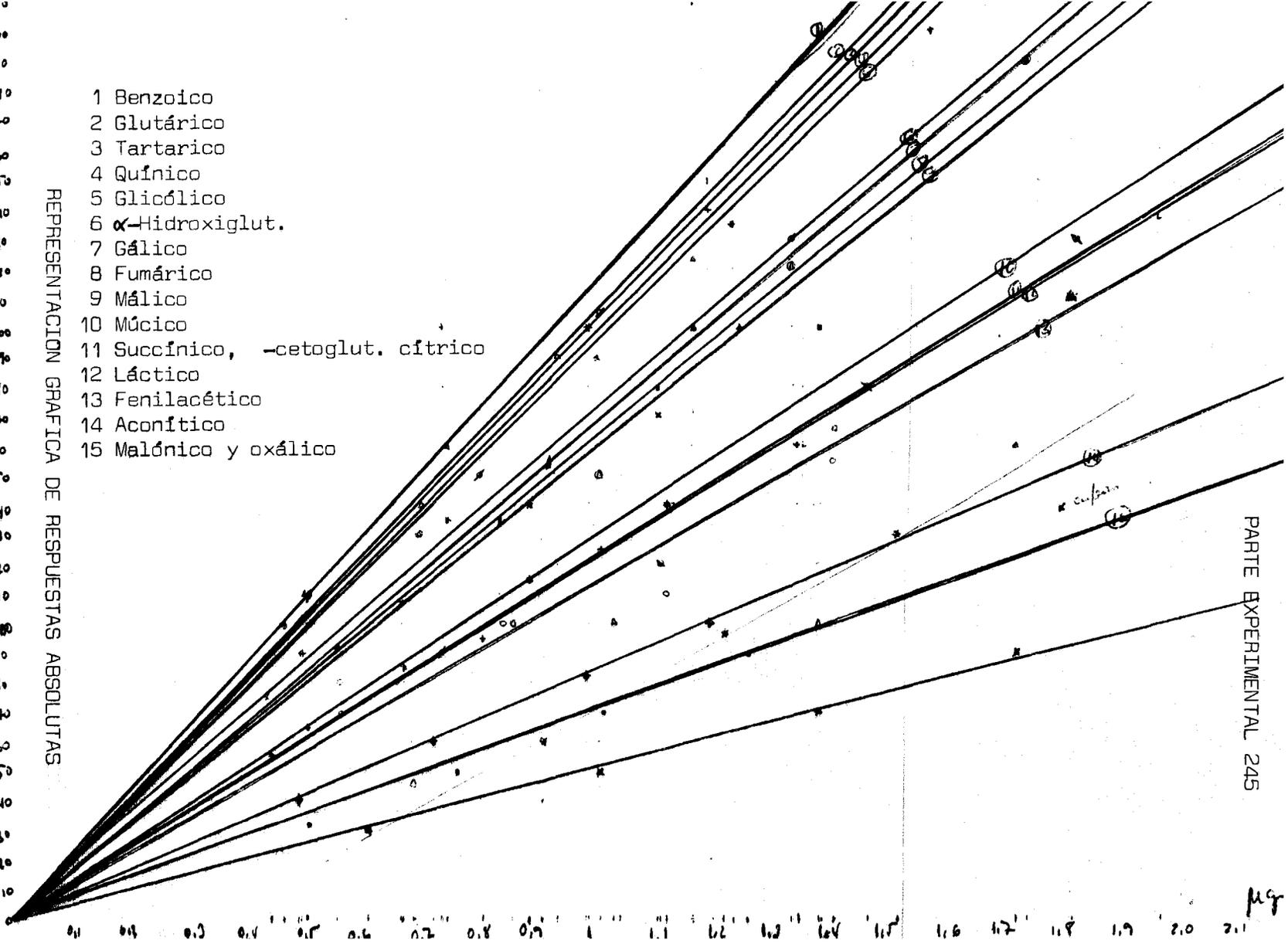
CORRESPONDENCIA ENTRE  $\mu\text{g}$  INYECTADOS Y AREAS  
DE LOS CORRESPONDIENTES PICOS  
(RESPUESTAS ABSOLUTAS)

	$\mu\text{g} \times 10$	$\text{mm}^2$
GLICOLICO	7,36	190
LACTICO	13,55	150
OXALICO	6,87	46
MALONICO	5,05	32
BENZOICO	5,00	110
FENILACETICO	5,60	80
SUCCINICO	5,65	70
FUMARICO	5,52	92
GLUTARICO	4,65	100
MALICO	4,47	75
$\alpha$ -CETOGLUT=	5,04	65
TARTARICO	5,03	110
ACONITICO	4,90	40
CITRICO	7,32	90
QUINICO	4,95	120
GALICO	6,95	130
MUCICO	4,42	55
CAFEICO	6,10	30

310  
300  
290  
280  
270  
260  
250  
240  
230  
220  
210  
200  
190  
180  
170  
160  
150  
140  
130  
120  
110  
100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

- 1 Benzoico
- 2 Glutárico
- 3 Tartarico
- 4 Quínico
- 5 Glicólico
- 6  $\alpha$ -Hidroxi-glut.
- 7 Gálico
- 8 Fumárico
- 9 Málico
- 10 Múico
- 11 Succínico, -cetoglut. cítrico
- 12 Láctico
- 13 Fenilacético
- 14 Aconítico
- 15 Malónico y oxálico

REPRESENTACION GRAFICA DE RESPUESTAS ABSOLUTAS



PARTE EXPERIMENTAL 245

149

RELACION DE RESPUESTAS RELATIVAS FRENTE  
AL PATRON INTERNO (GLUTARICO)

ACIDO (TMS)	REL. RESP.	<u>GLUT.</u> ACIDO
GLICOLICO	1,12	
LACTICO	1,59	
OXALICO	2,89	
MALONICO	2,89	
BENZOICO	0,95	
FENILACETICO	1,82	
SUCCINICO	1,68	
FUMARICO	1,26	
GLUTARICO		
MALICO	1,25	
$\alpha$ -HIDROXIGLUT.	1,19	
$\alpha$ -CETOGLUT.	1,68	
TARTARICO	1,01	
ACONITICO	2,43	
CITRICO	1,68	
QUINICO	1,04	
GALICO	1,23	
MUCICO	1,58	
CAFEICO	2,64	

Para calcular la cantidad de un componente en la muestra original se opera de la siguiente manera:

$$\text{mg de ácido} = \text{R.R.} \times \text{mg de patrón interno} \times \\ \times \text{relación areas} \times \text{mg de muestra} \\ \text{total} / \text{mg tomados para análisis.}$$

R.R. es la respuesta relativa tabulada en la página 246.

La relación de respuestas se toma por medida directa del cromatograma del problema.

Como numerador tomamos también el valor en mg de la muestra completa que se desea analizar.

El denominador consta de los mg de muestra que hemos utilizado para el análisis por cromatografía de gases

El cálculo de areas en los cromatogramas problema, lo mismo que en los cálculos anteriores de los patrones, se realiza siempre por medida mediante un planímetro, realizando tres veces la medida y tomando el valor medio.

**Modificación del reductor de espacio muerto.-**

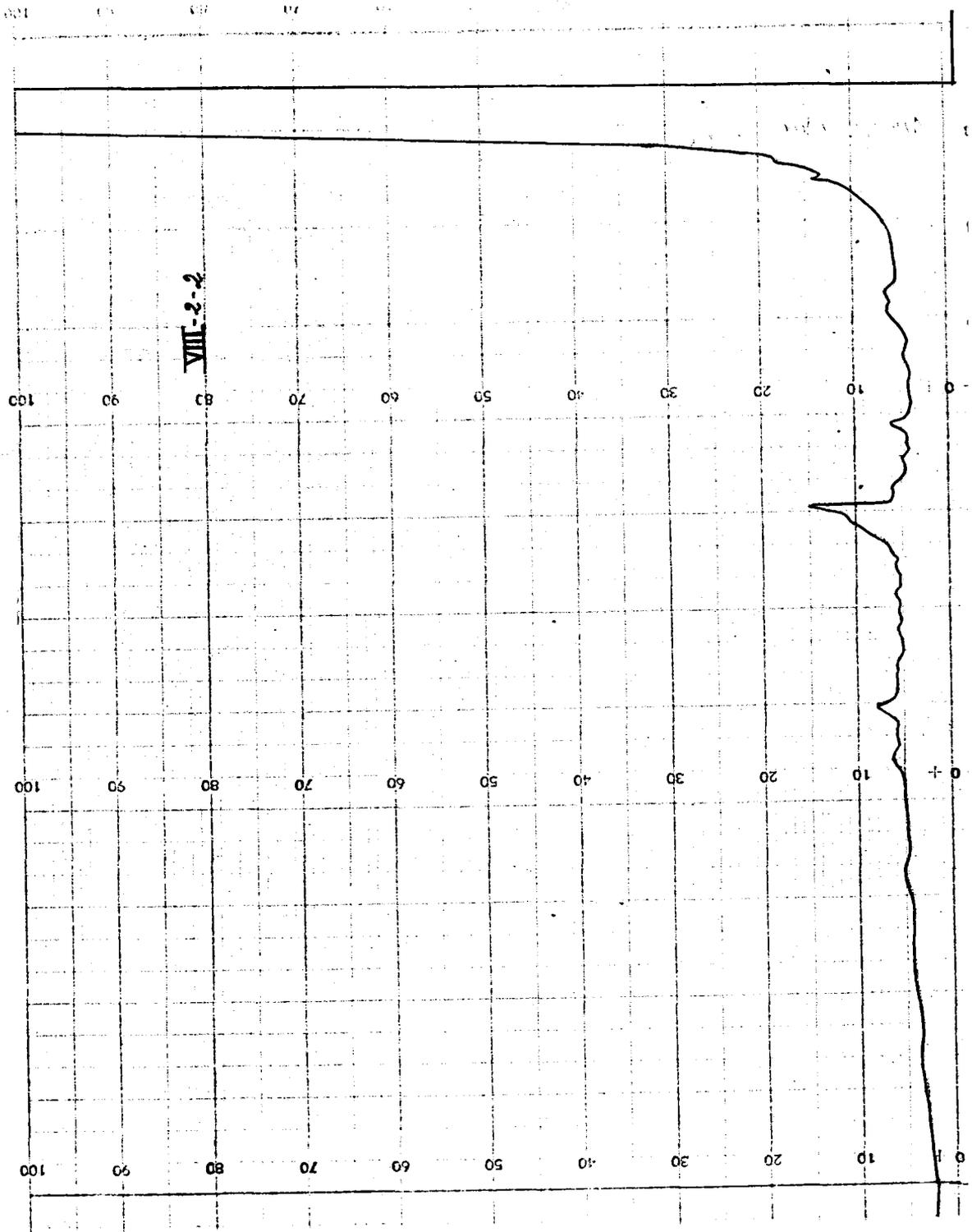
Se ha sustituido el reductor de espacio muerto para columnas de 4 mm de diámetro exterior, que posee el inyector del cromatógrafo de gases Carlo Erba Fractovap GV en metal, por otro de vidrio lavado con ácido nítrico y silanizado con solución al 5% de TMCS en tolueno seco.

**Procedimiento de saponificación.-**

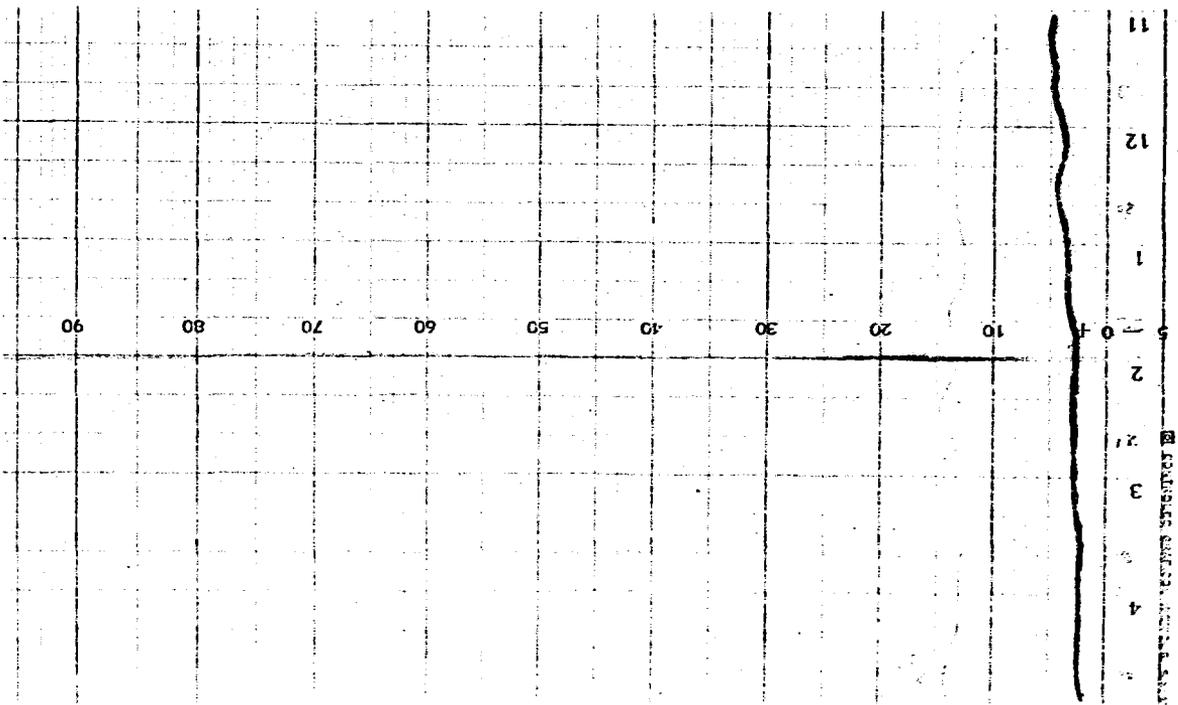
En determinadas fracciones de la primera extracción de los ácidos del alpechín de la aceituna se ha procedido a saponificar los ésteres metílicos en ellas contenidos mediante soluciones acuosas de NaOH 0,5 N. Se ha calentado en baño de aceite a 80°C durante 15 minutos, neutralizando aproximadamente a continuación con ClH 0,2 N, procediéndose después a secar la muestra para formar los TMS derivados.

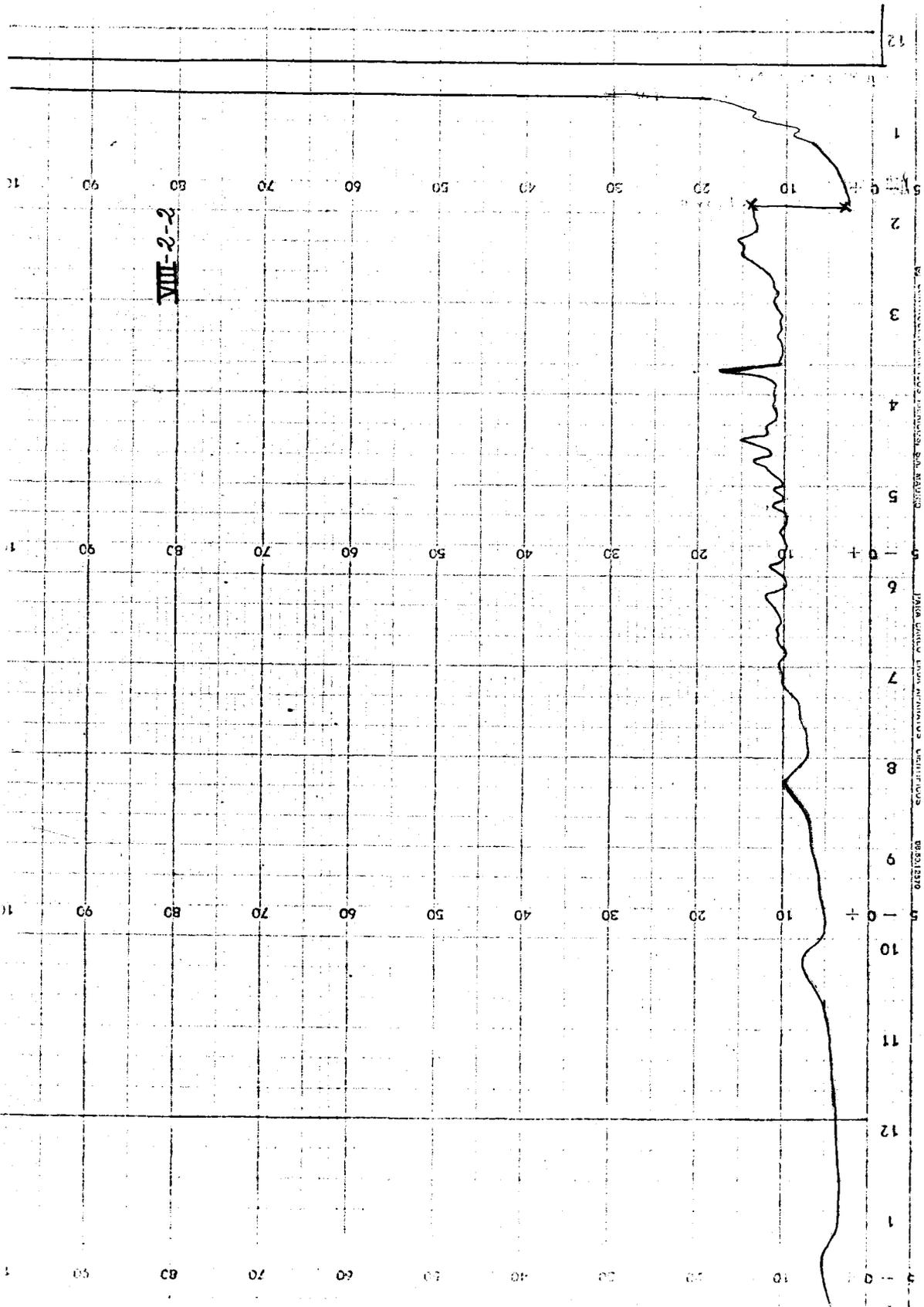
4.21.6.- Cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos del alpechín de la aceituna.-

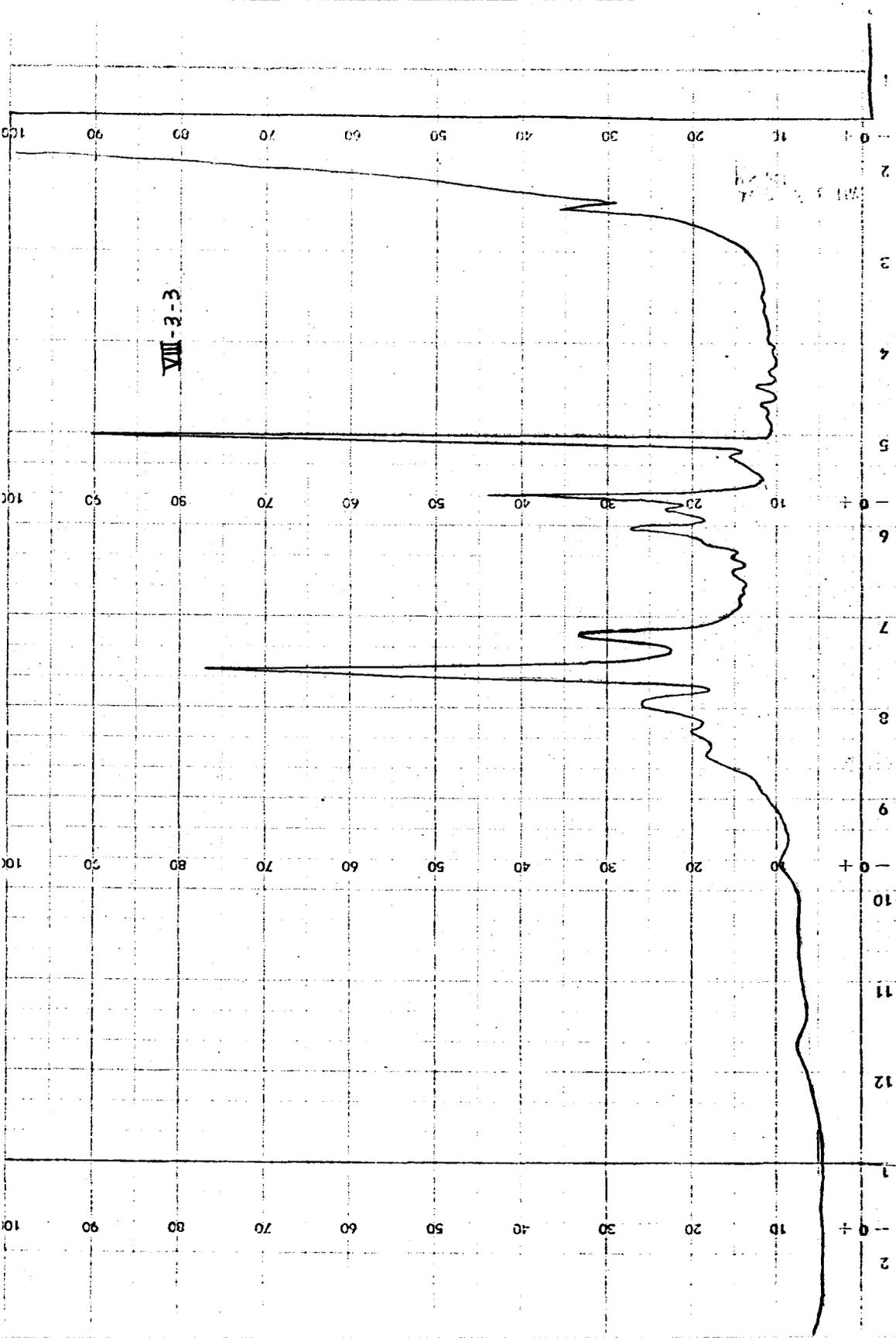
A continuación están representados los cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos del alpechín de la aceituna de la campaña de 1970 (1ª y 2ª extracción)



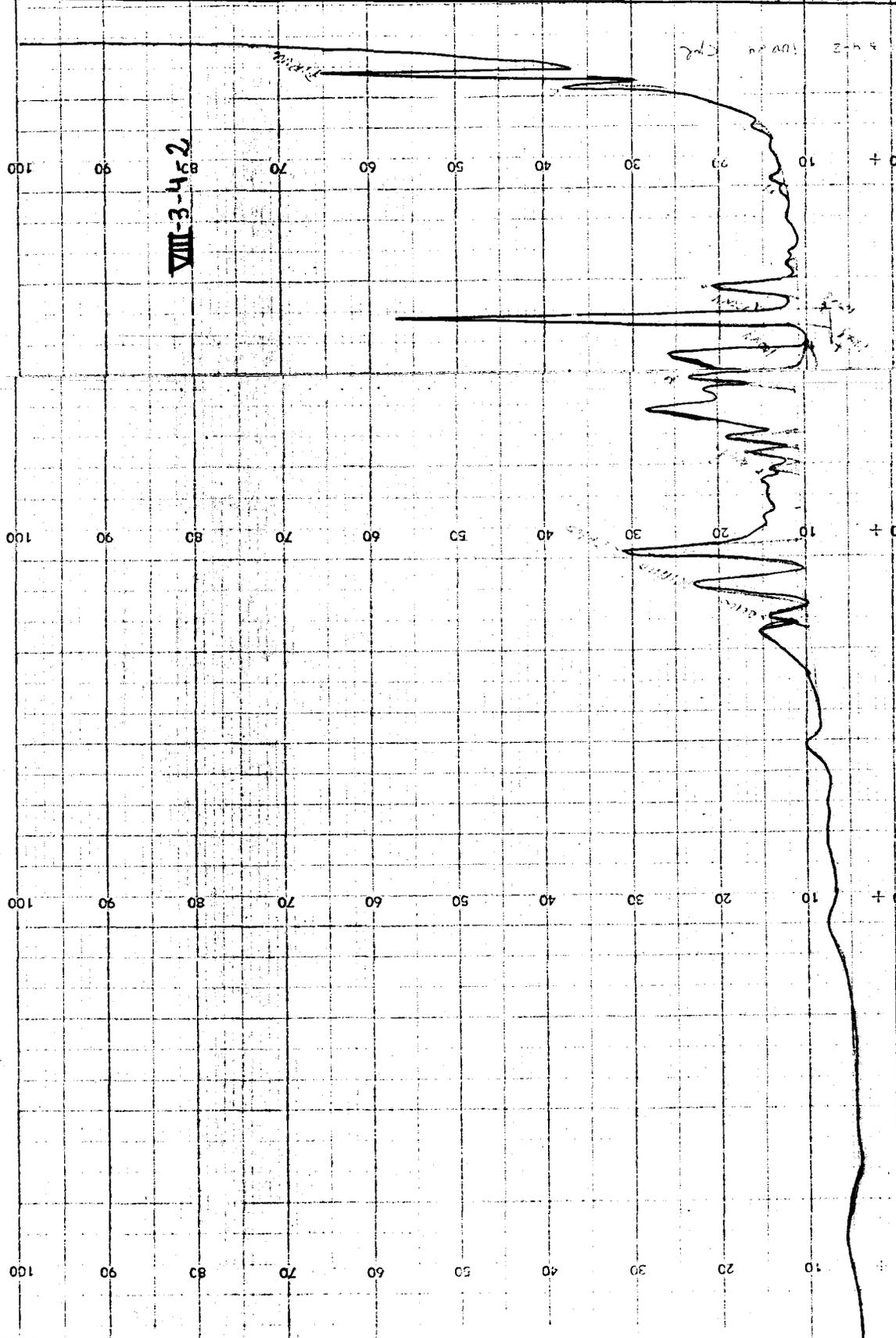
VII-3-2







VIII-3-3

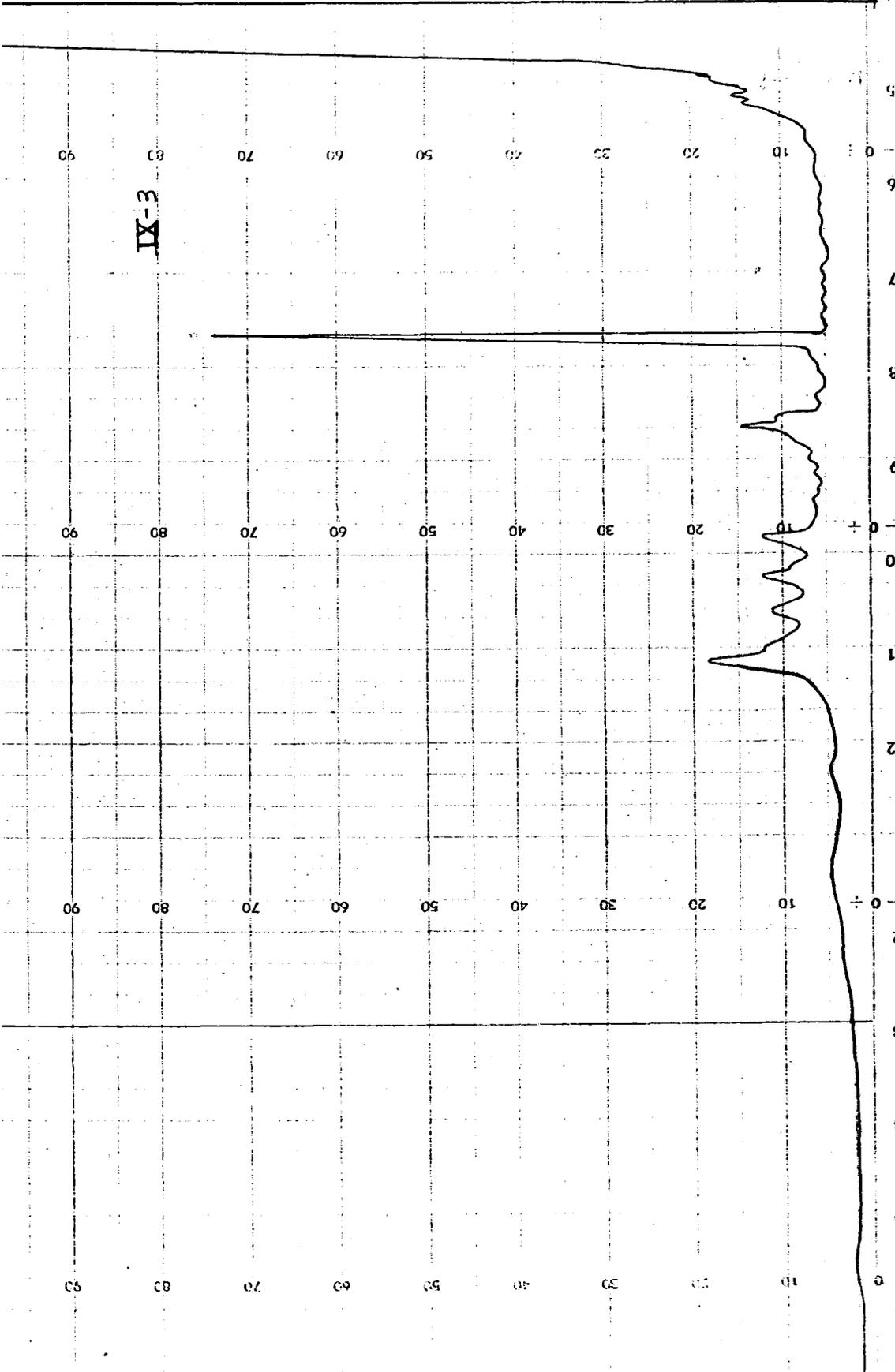


135A 60000 100A ANALOG CENTERED 00321990

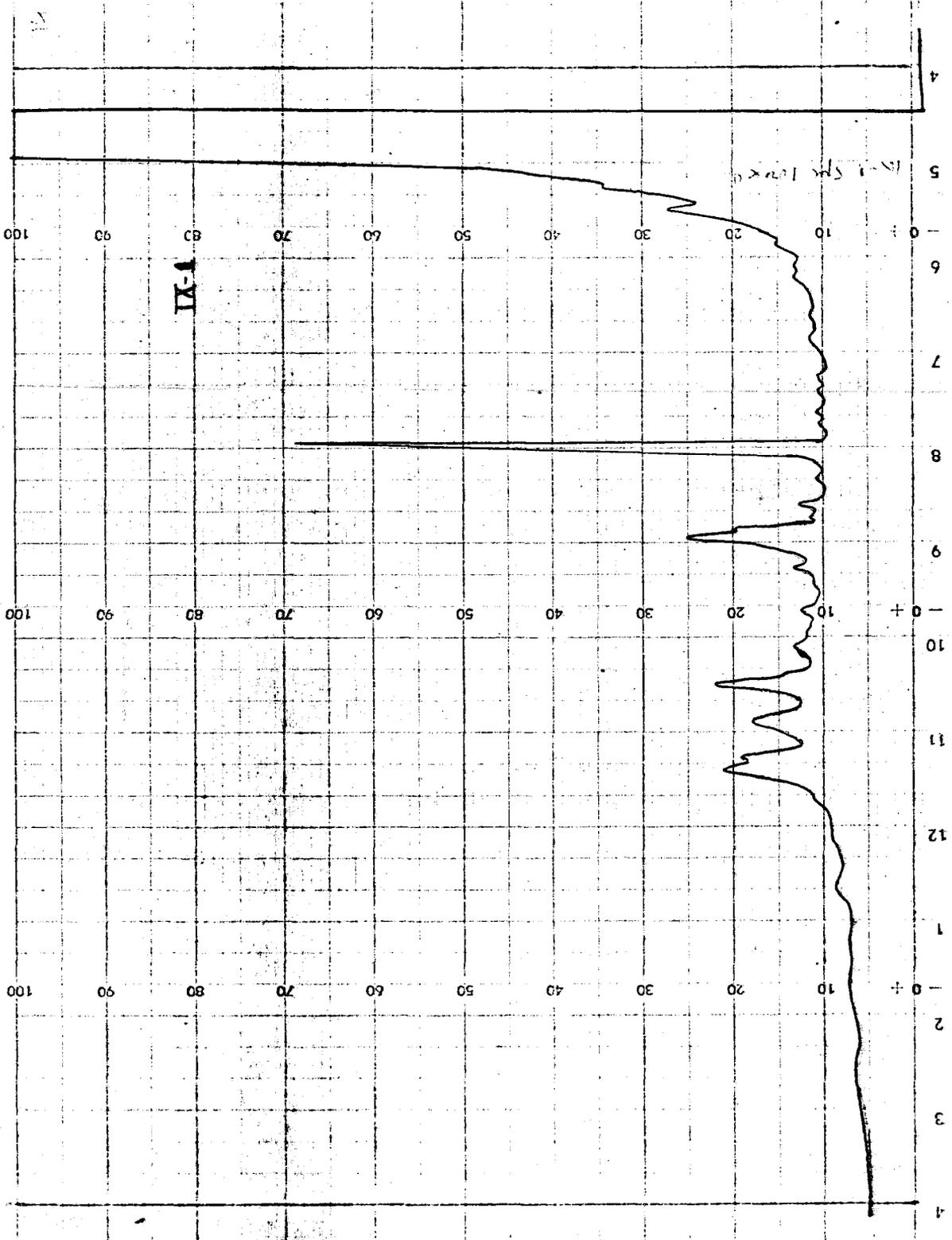
00321990

+

CONTINUED FROM PAGE 23 IN REPORT SA 75070

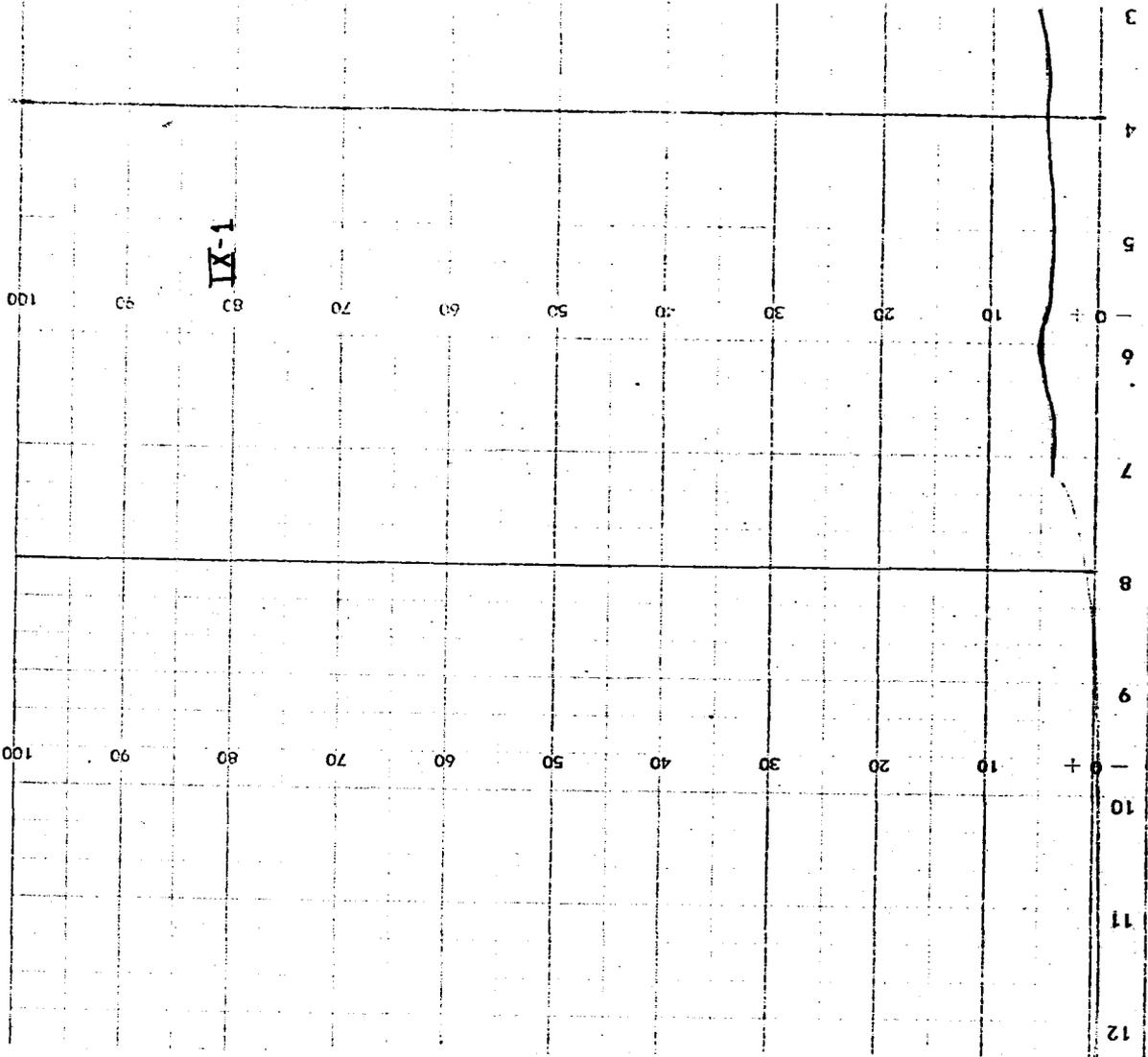


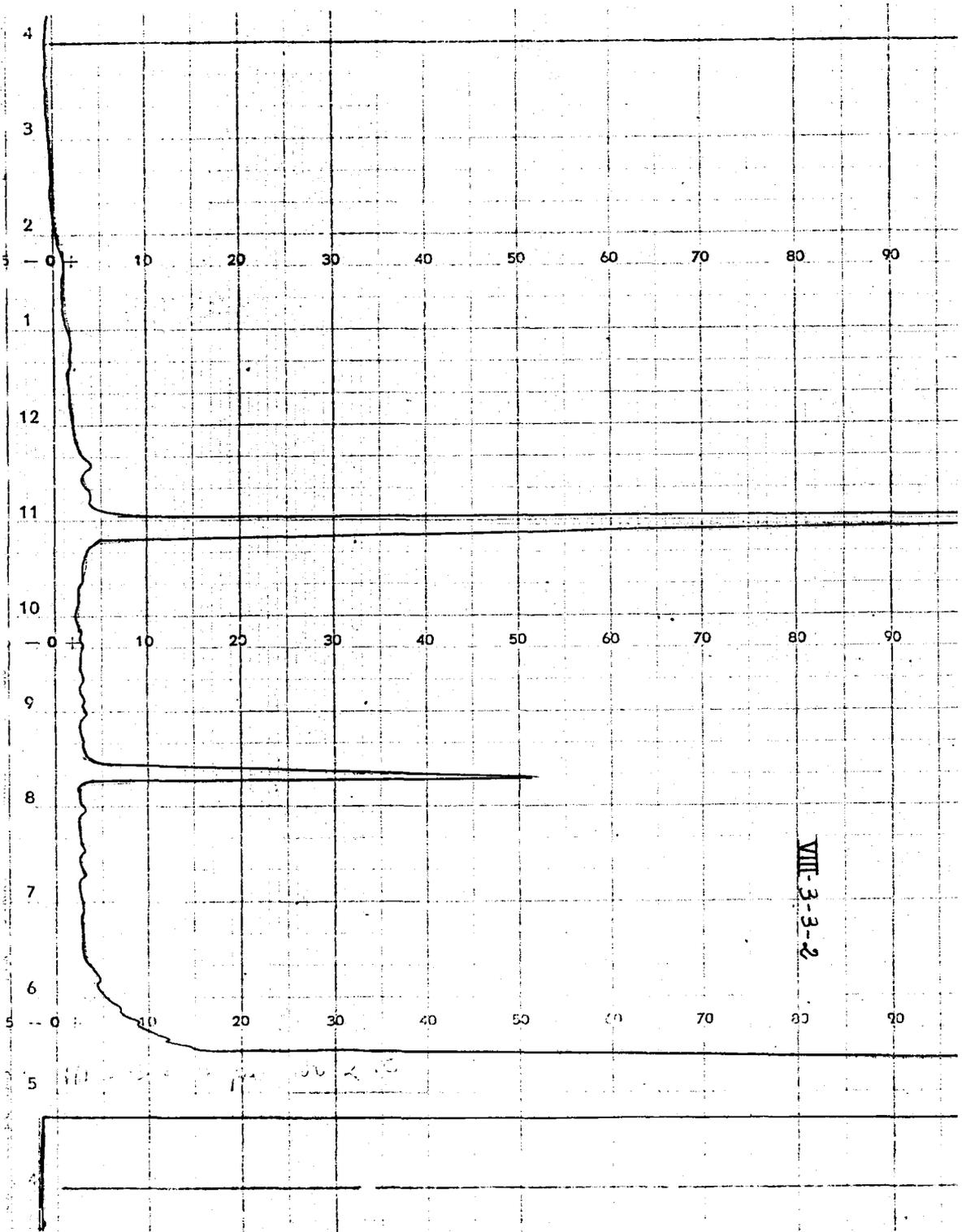
IX-3



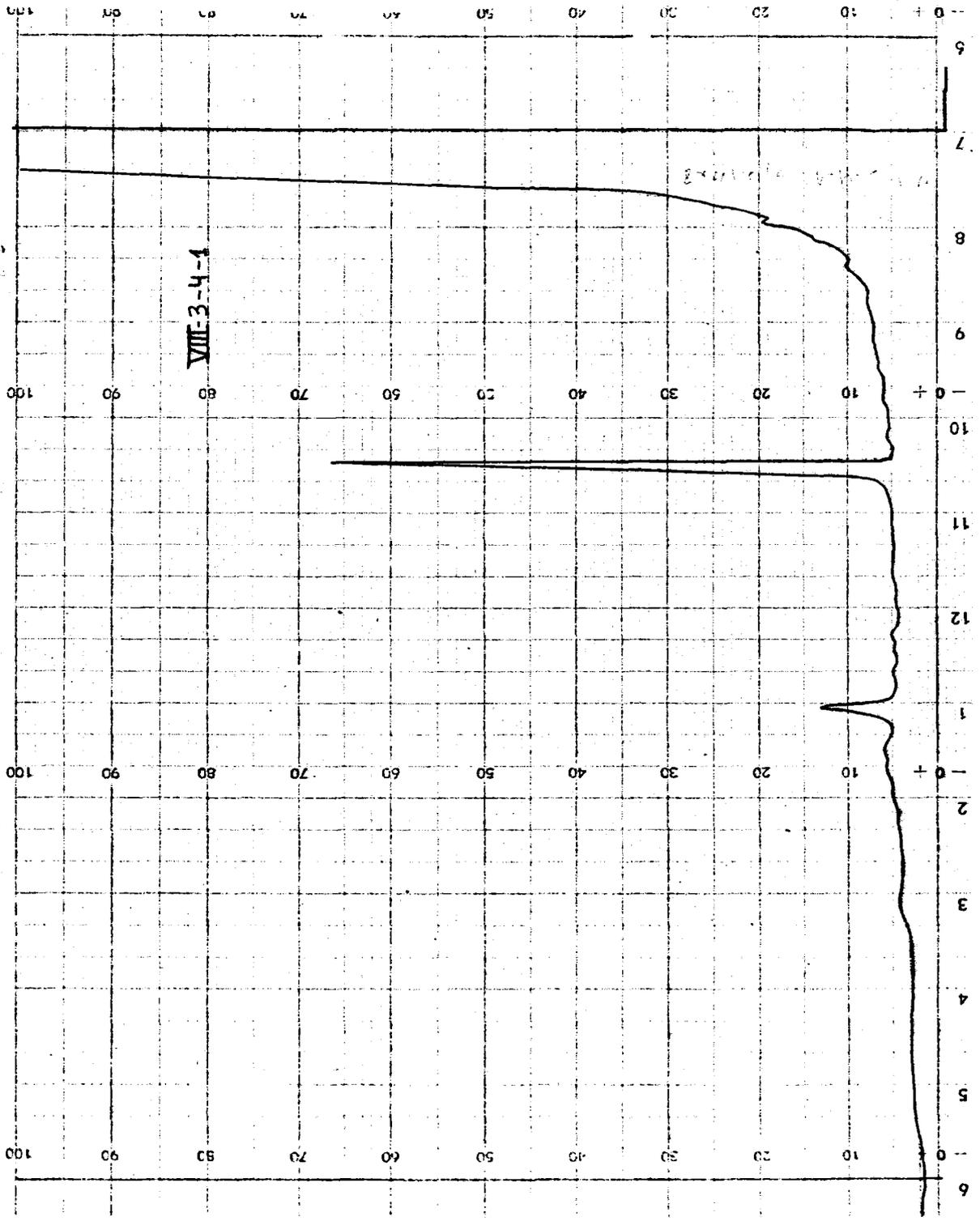
I-VI

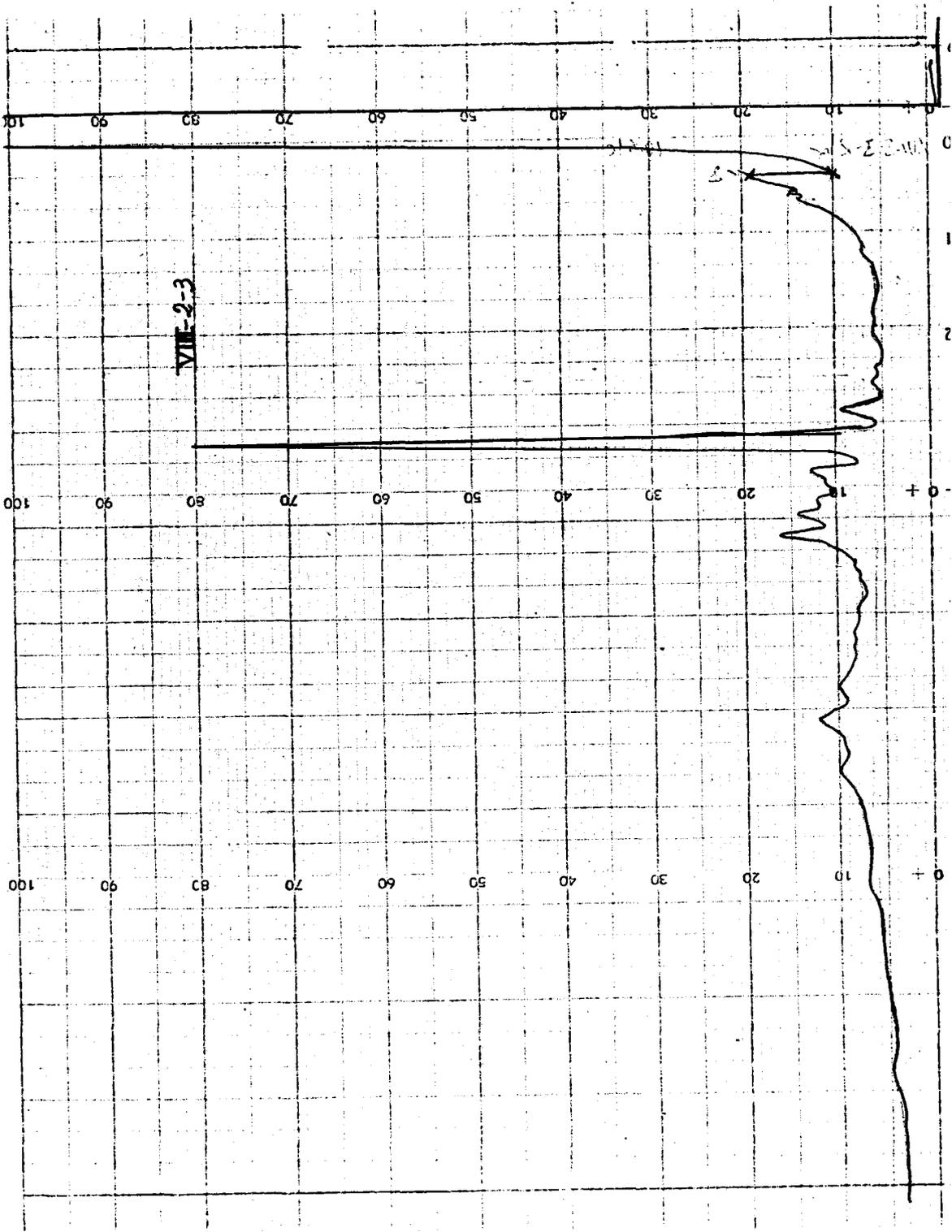
10-15 m 1000

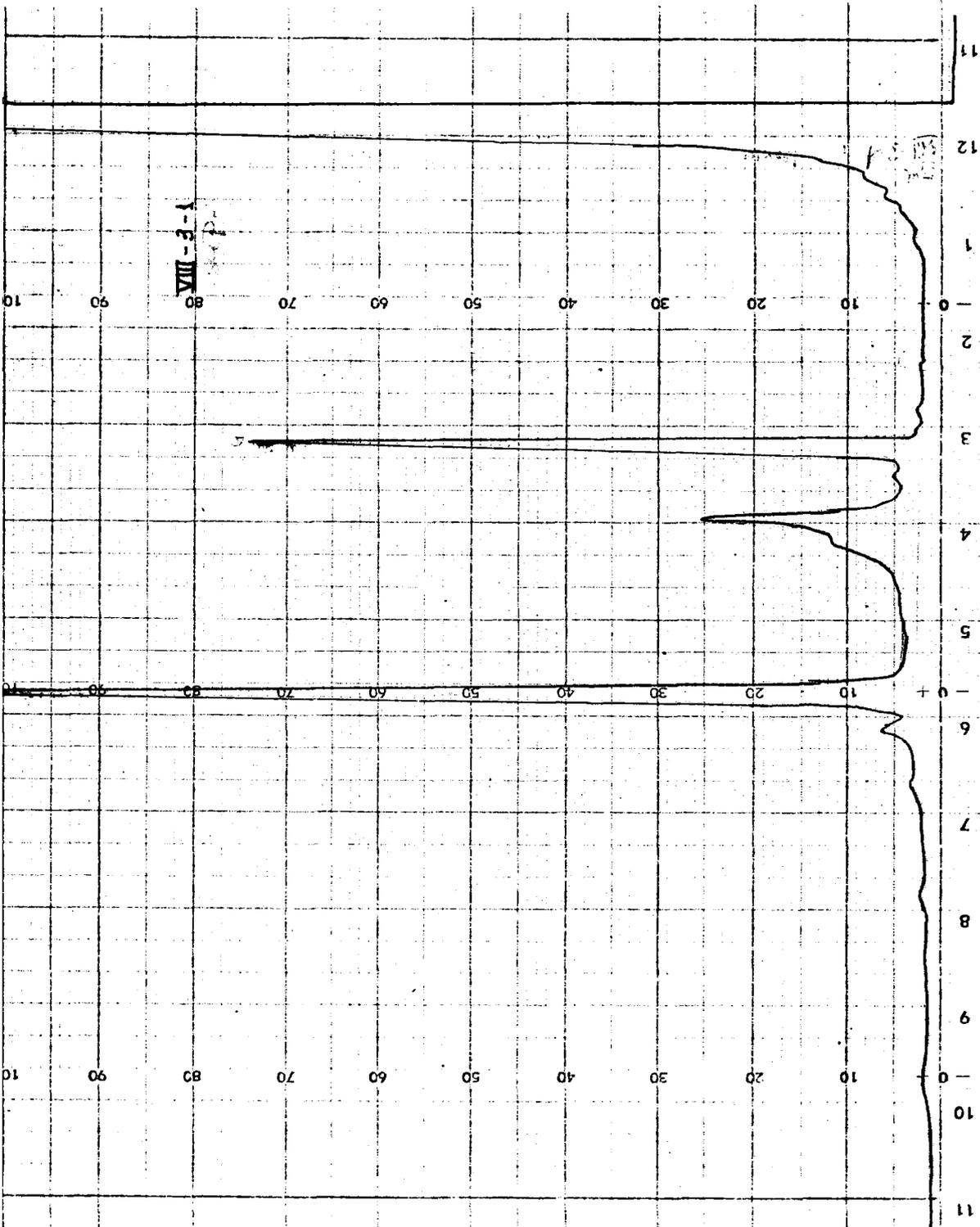


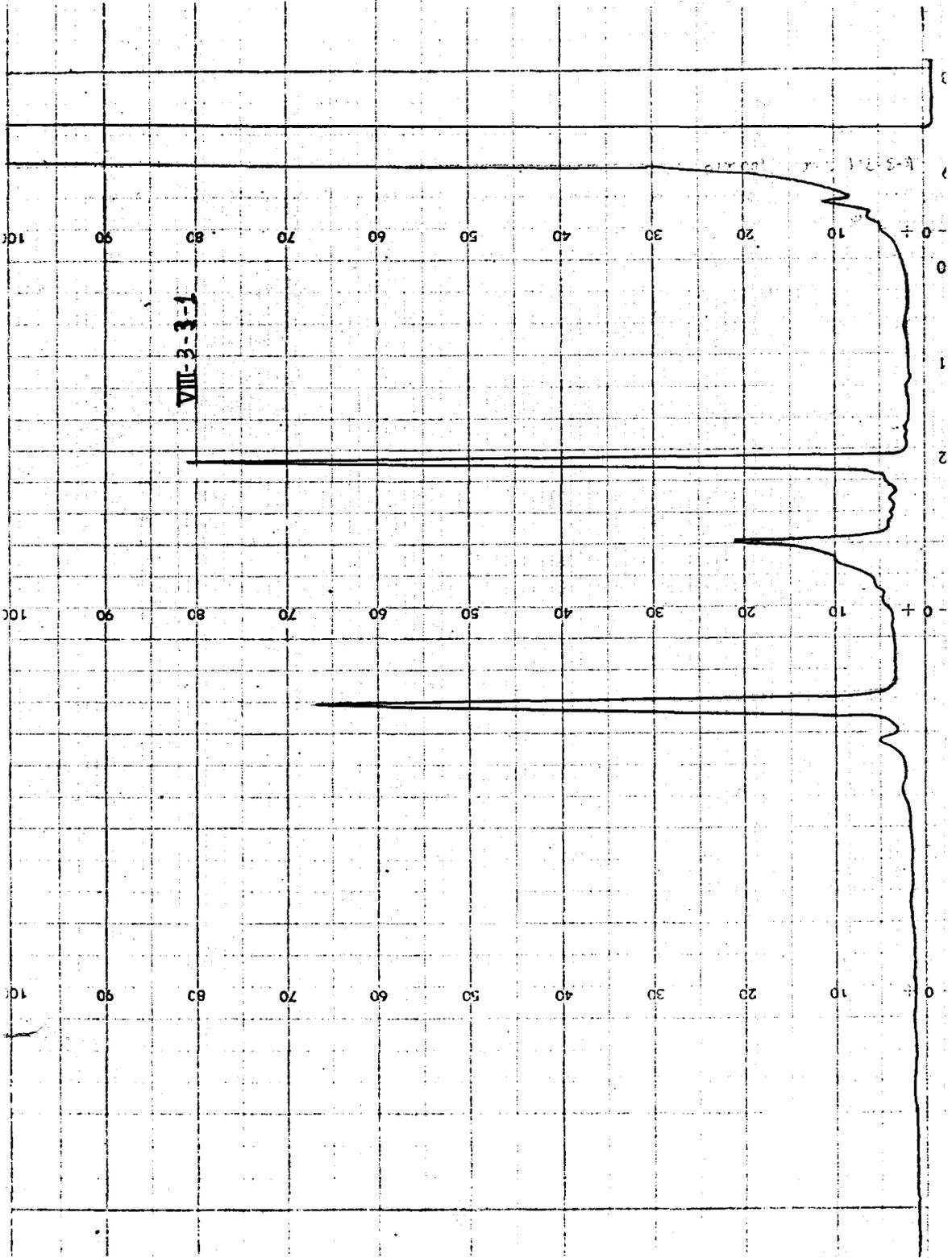


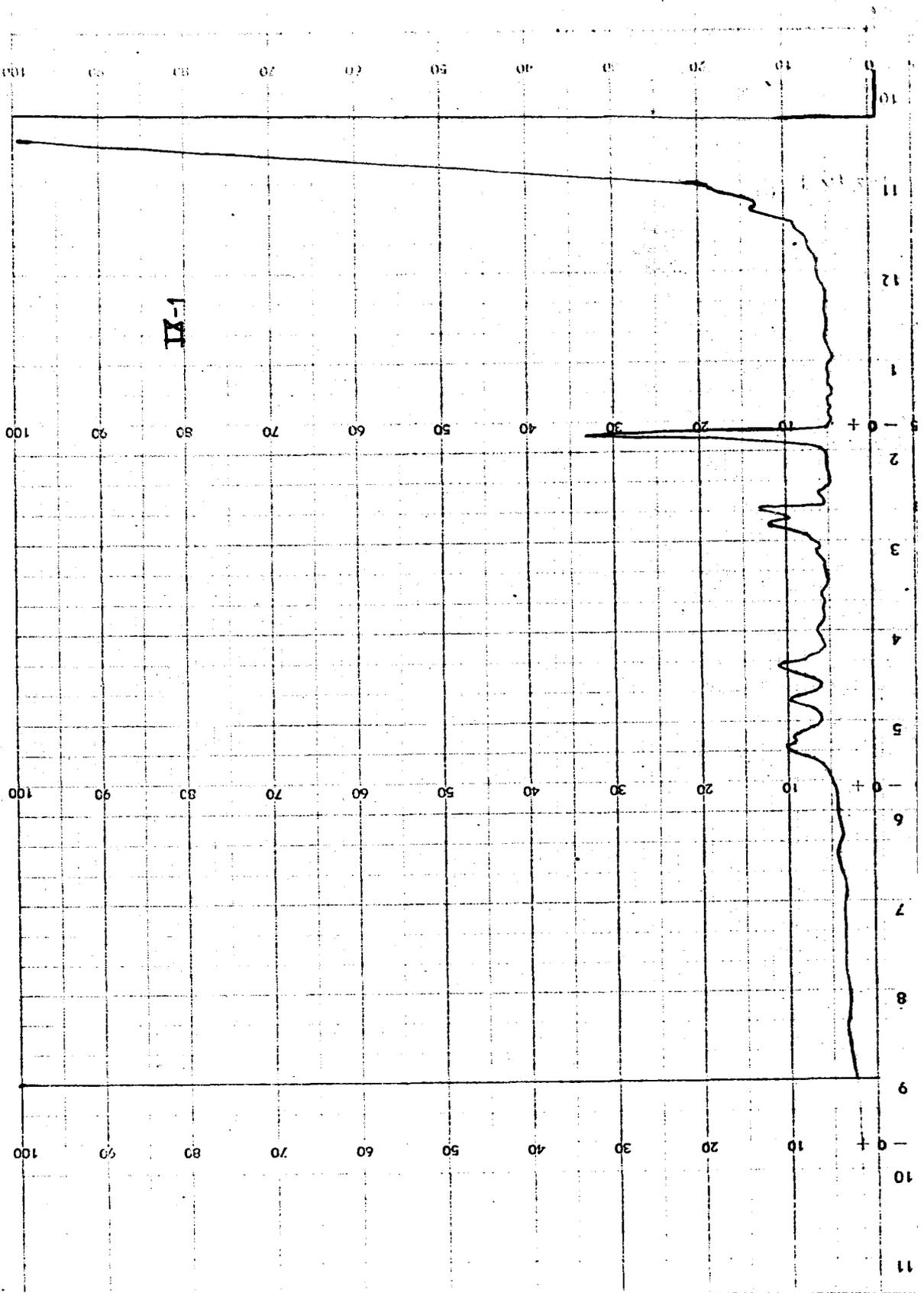
VIII-3-4-1

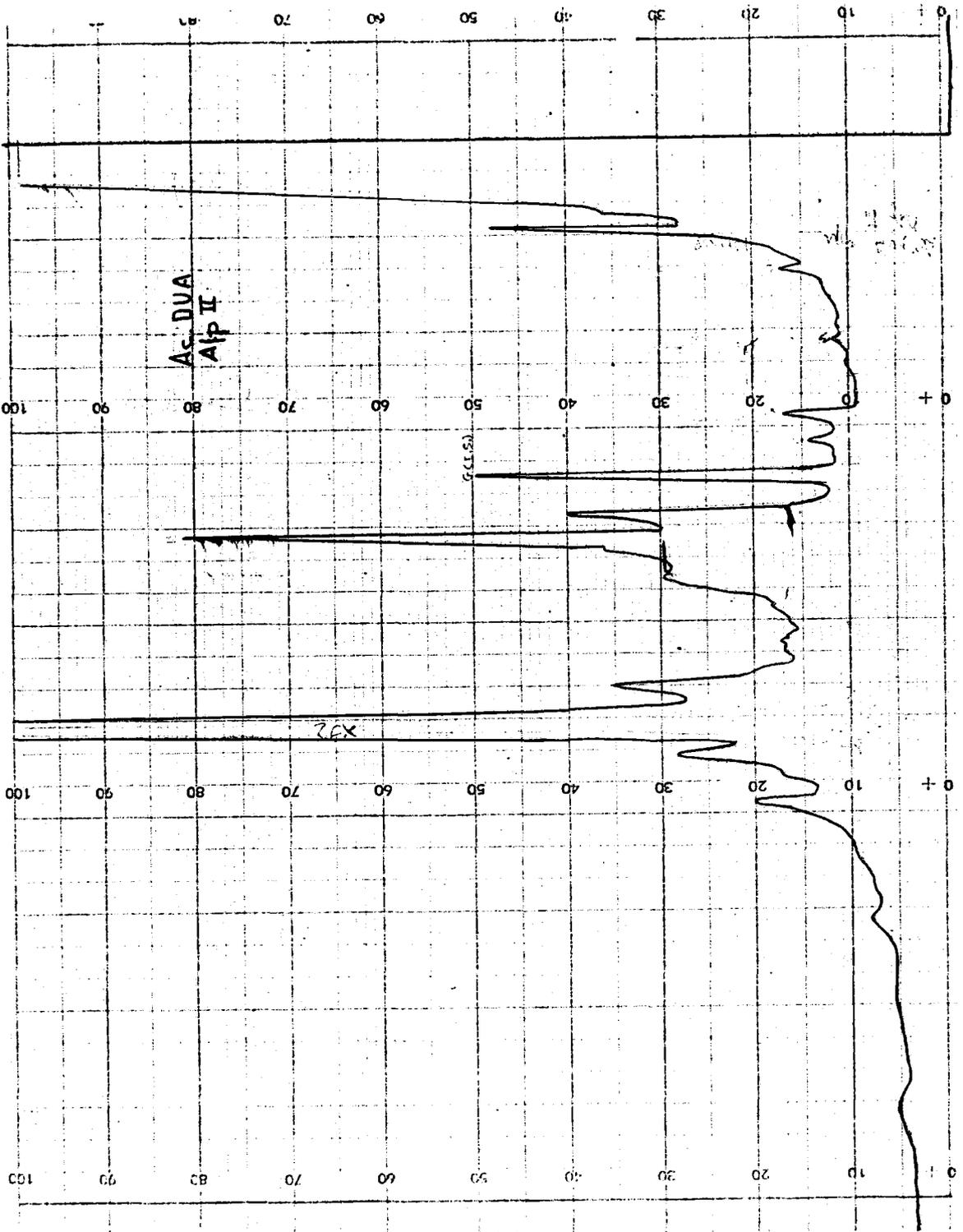












AS DVA  
Alp II

CS 11.5

3EX

11.5  
11.5

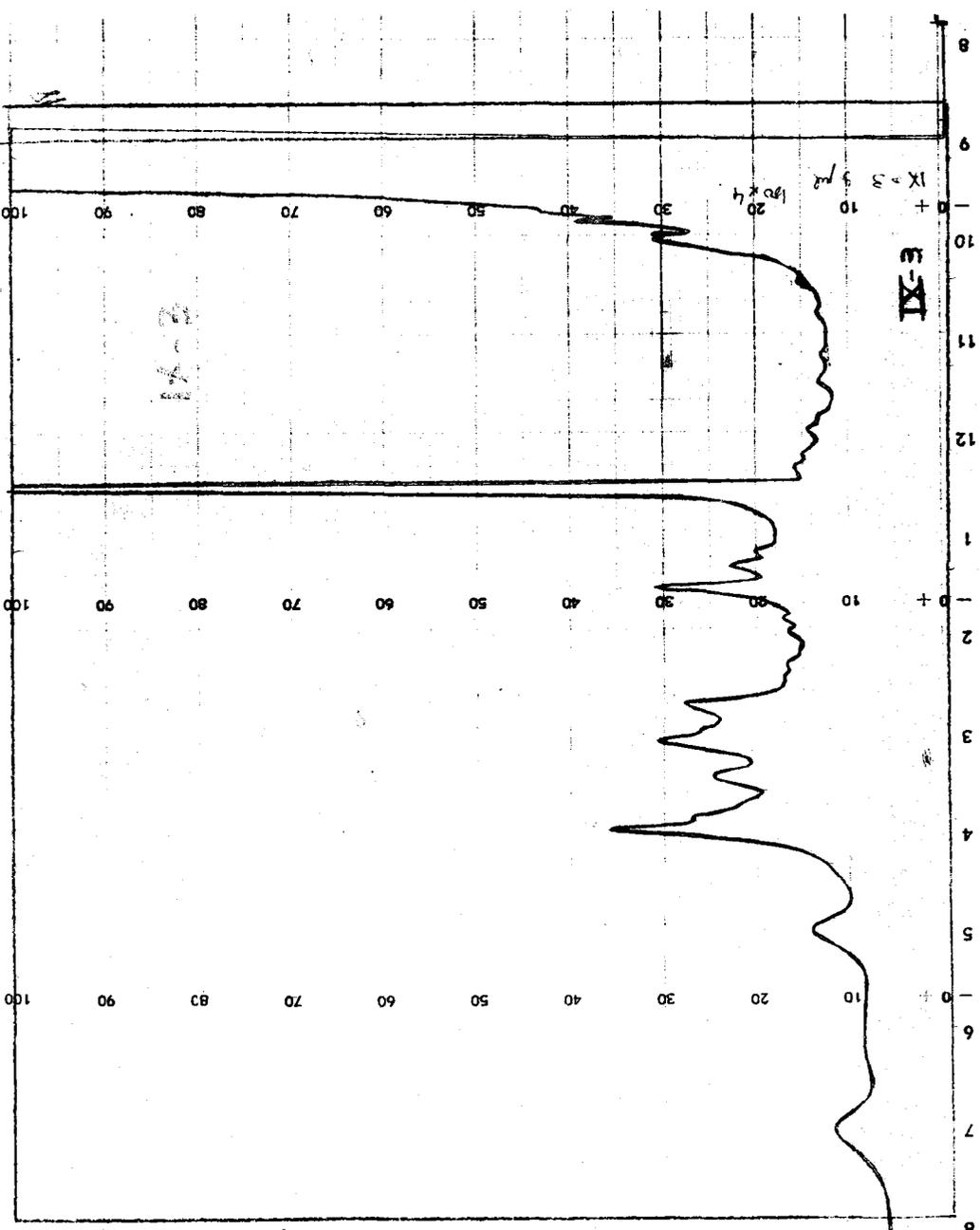


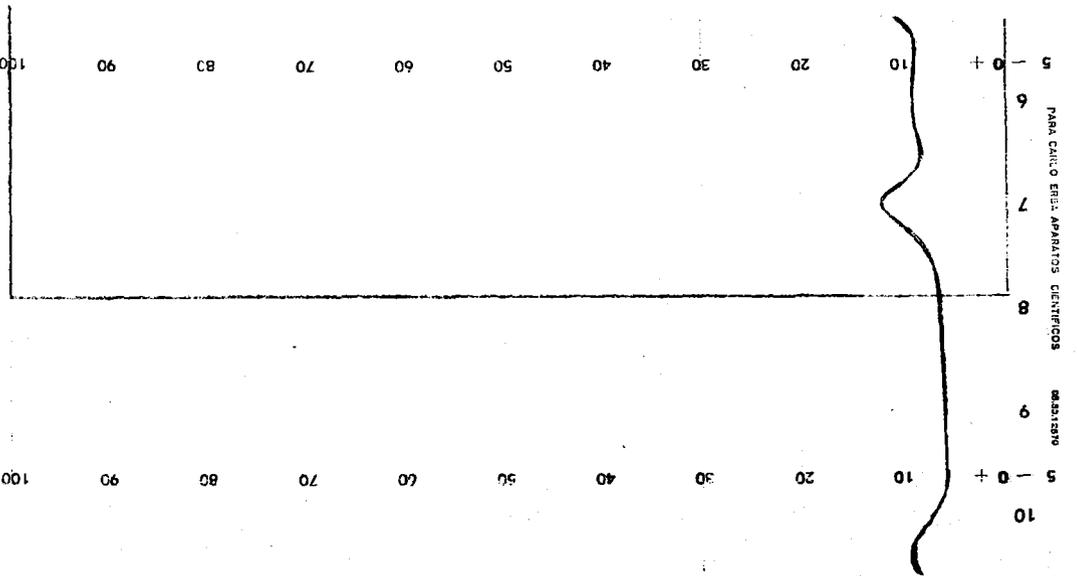
CENTRICOS

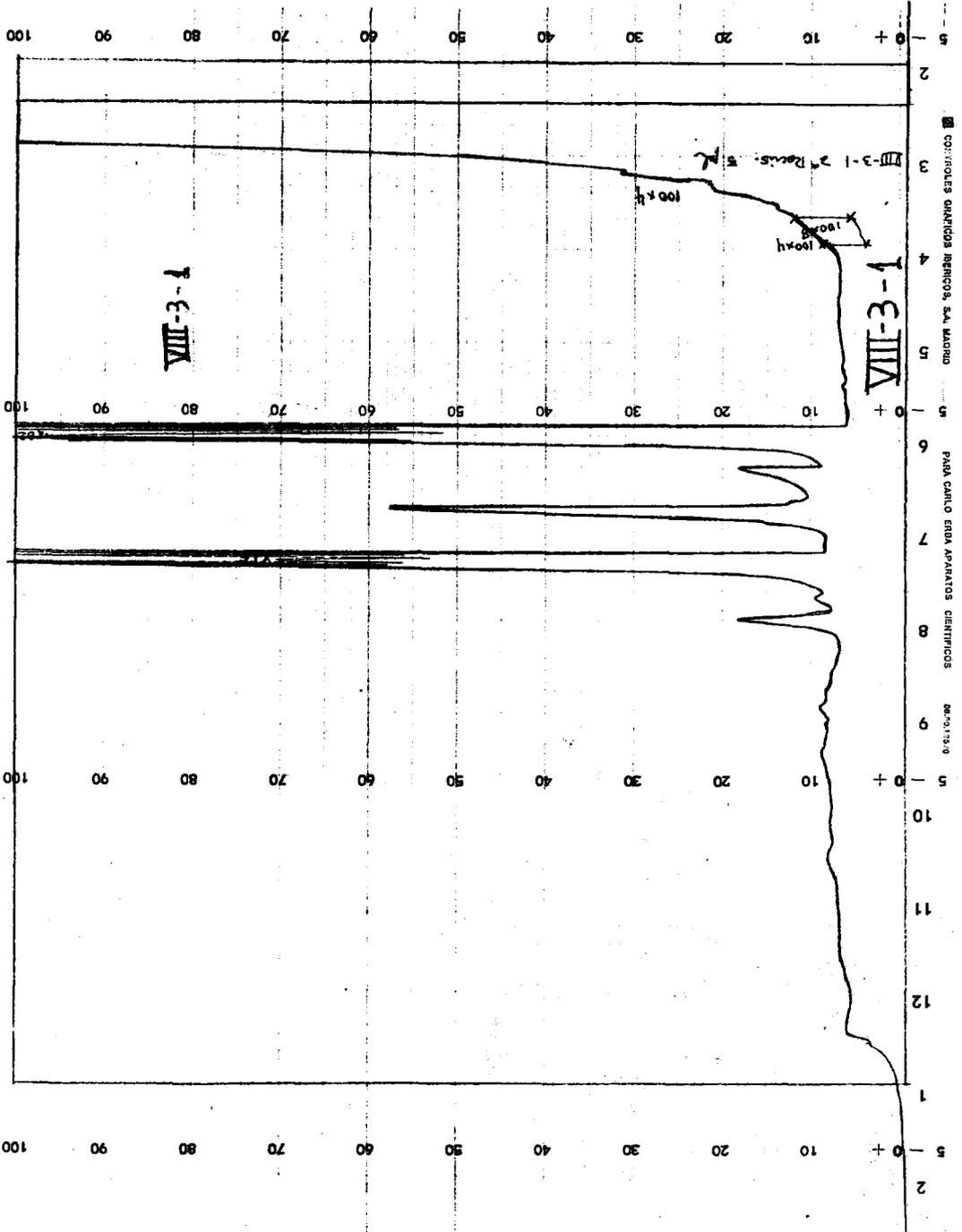
MASSASB

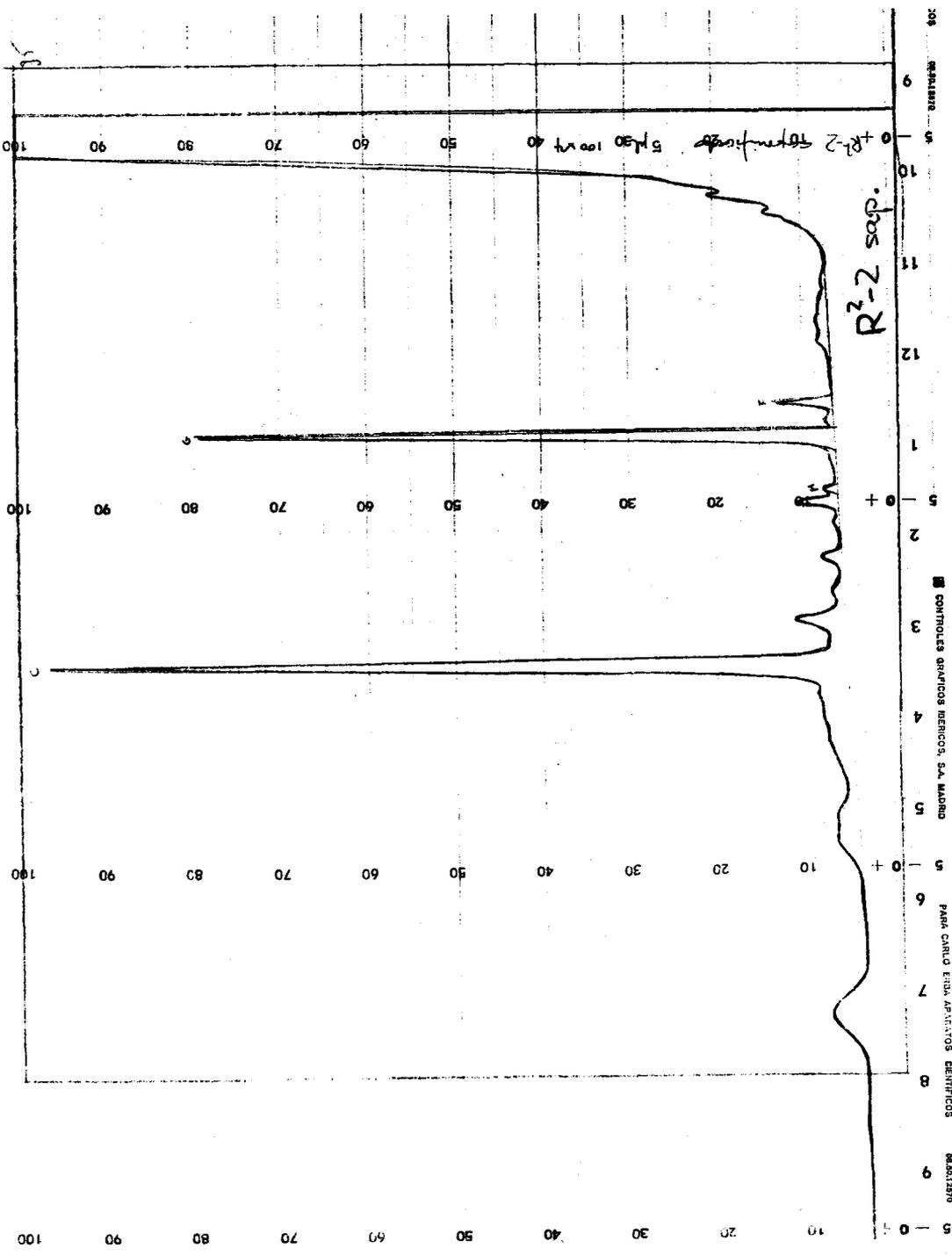
CONTROLER GRAFICOS BENFOS, S.A. MADRID

PARA CALIB. ENCL. APARATOS ENCL.











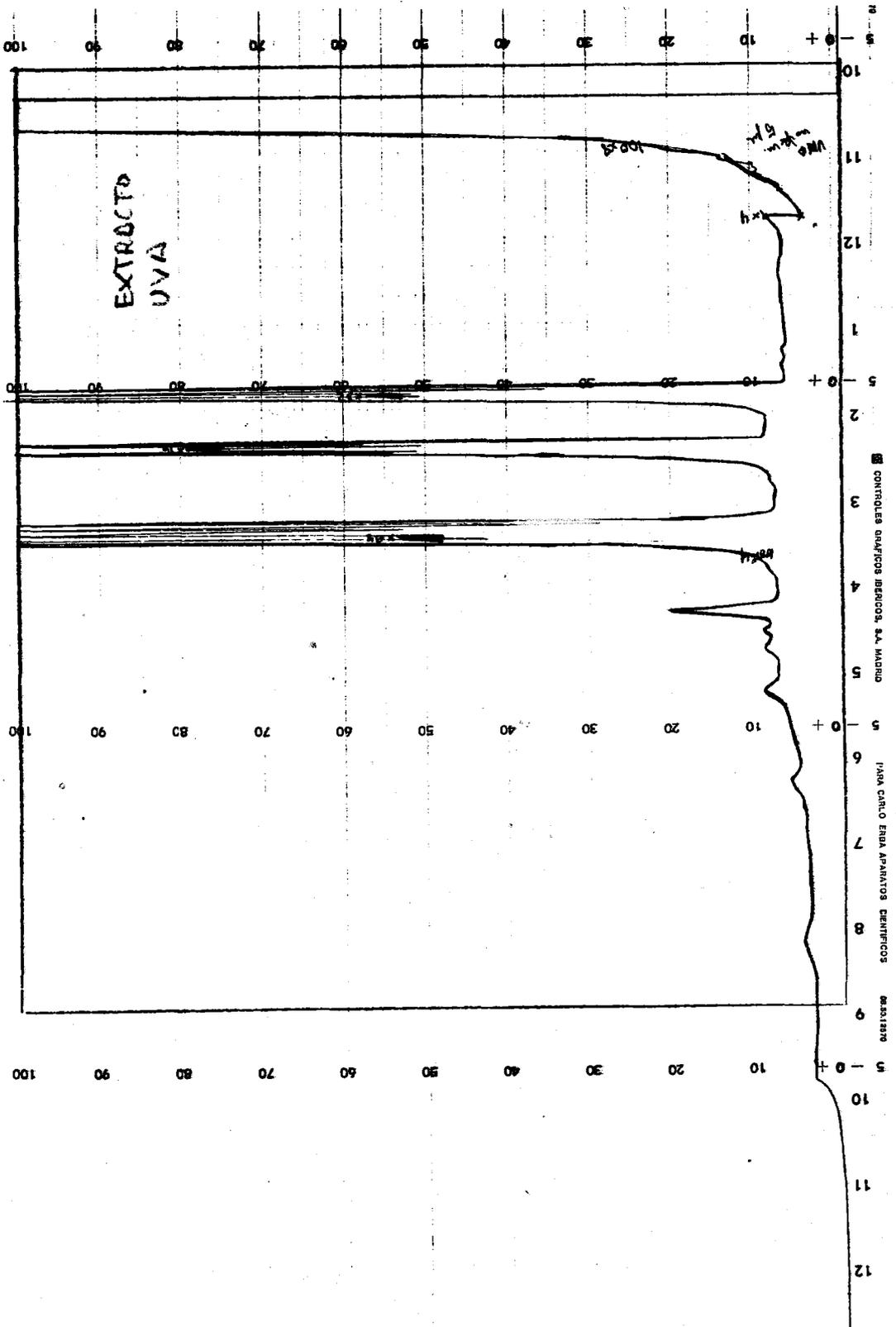
4.21.7.- Cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos del zumo de limón.-

Los cromatogramas siguientes corresponden a TMS derivados de los ácidos extraídos del zumo de limón por soluciones de DUA en benceno.



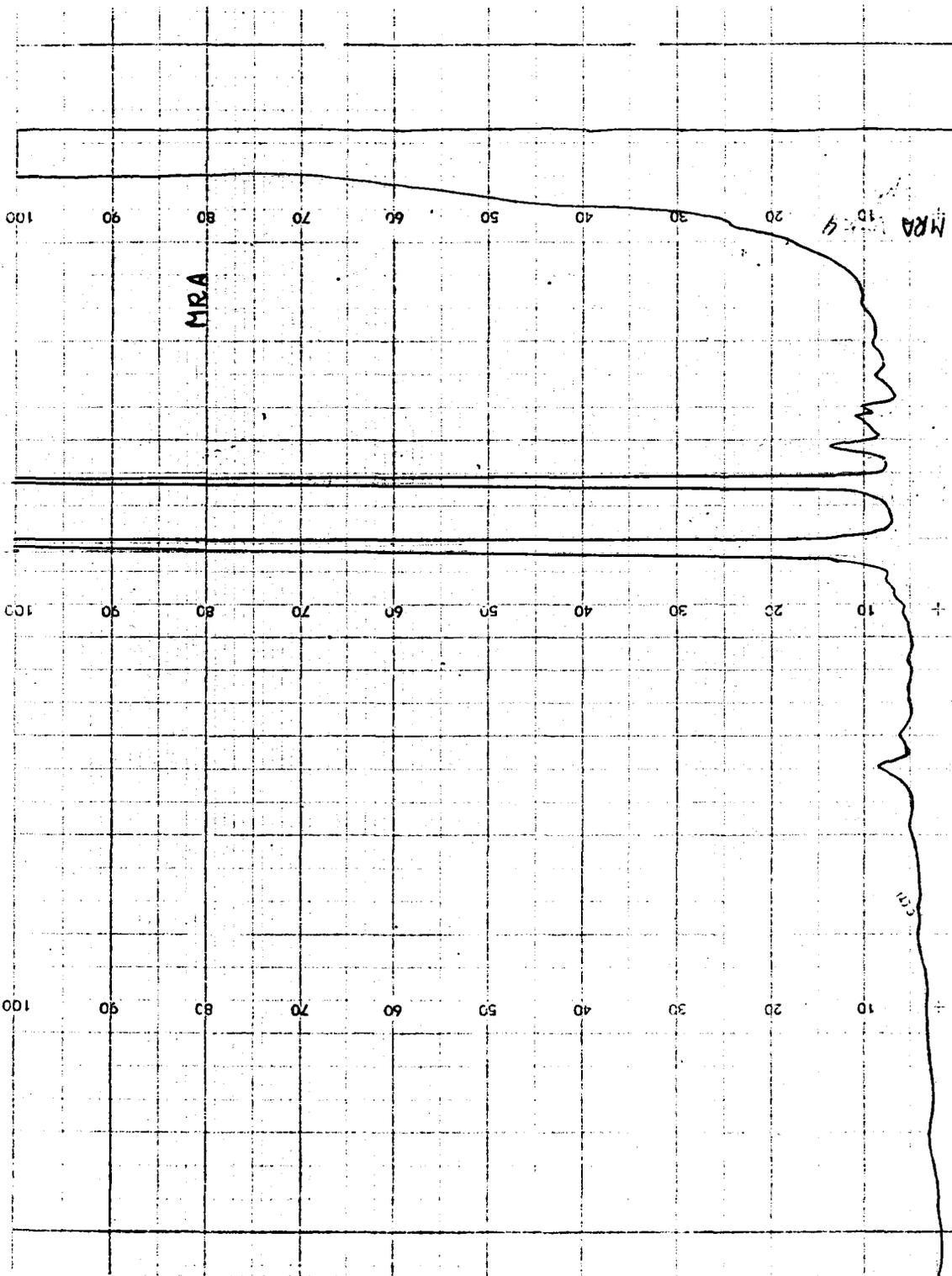
4.21.8.- Cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos del zumo de uva.-

Los TMS derivados de las mezclas de ácidos extraídos del zumo de uva, separados en columna de SE-30 descrita, vienen representados en los cromatogramas que a continuación se insertan.

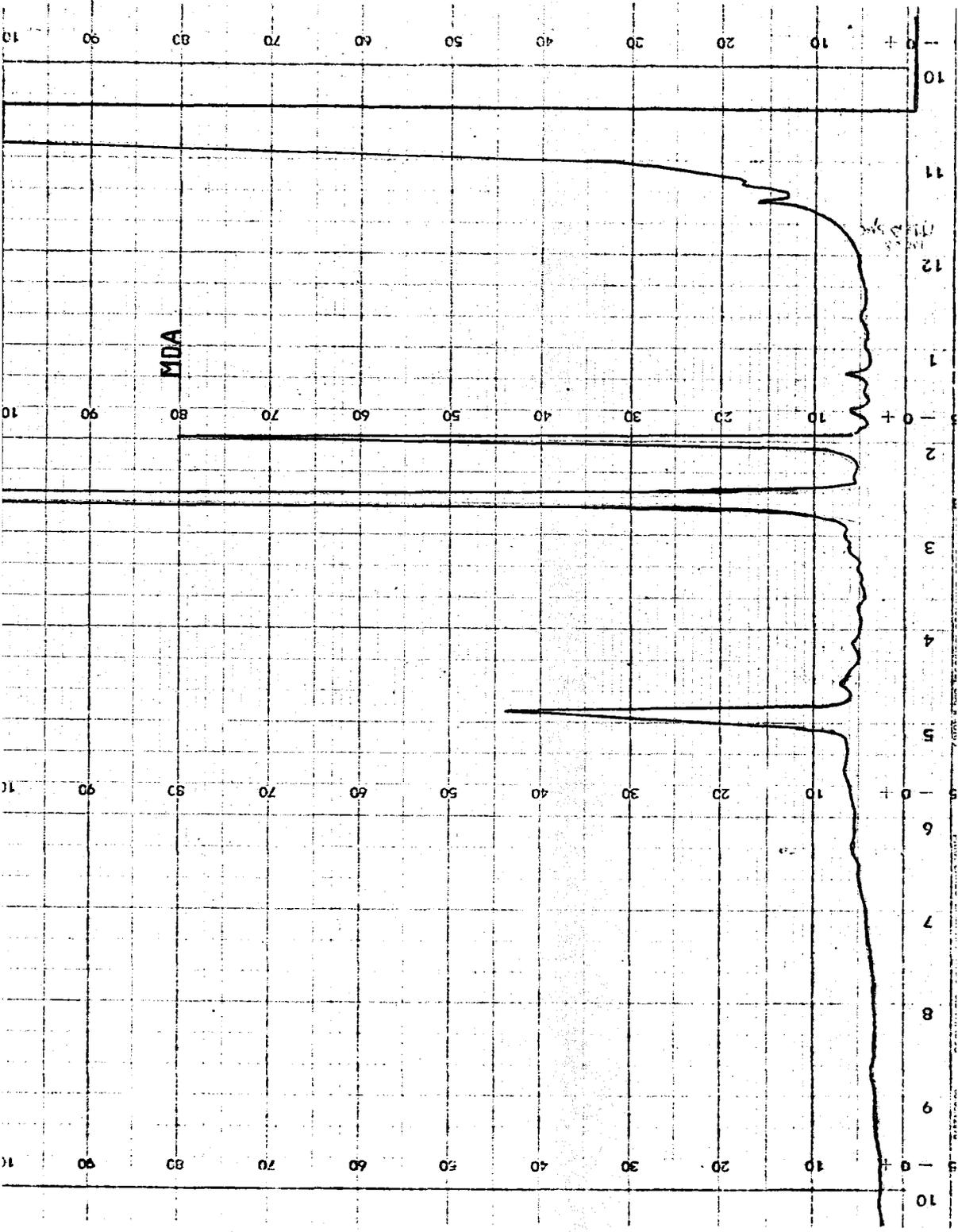


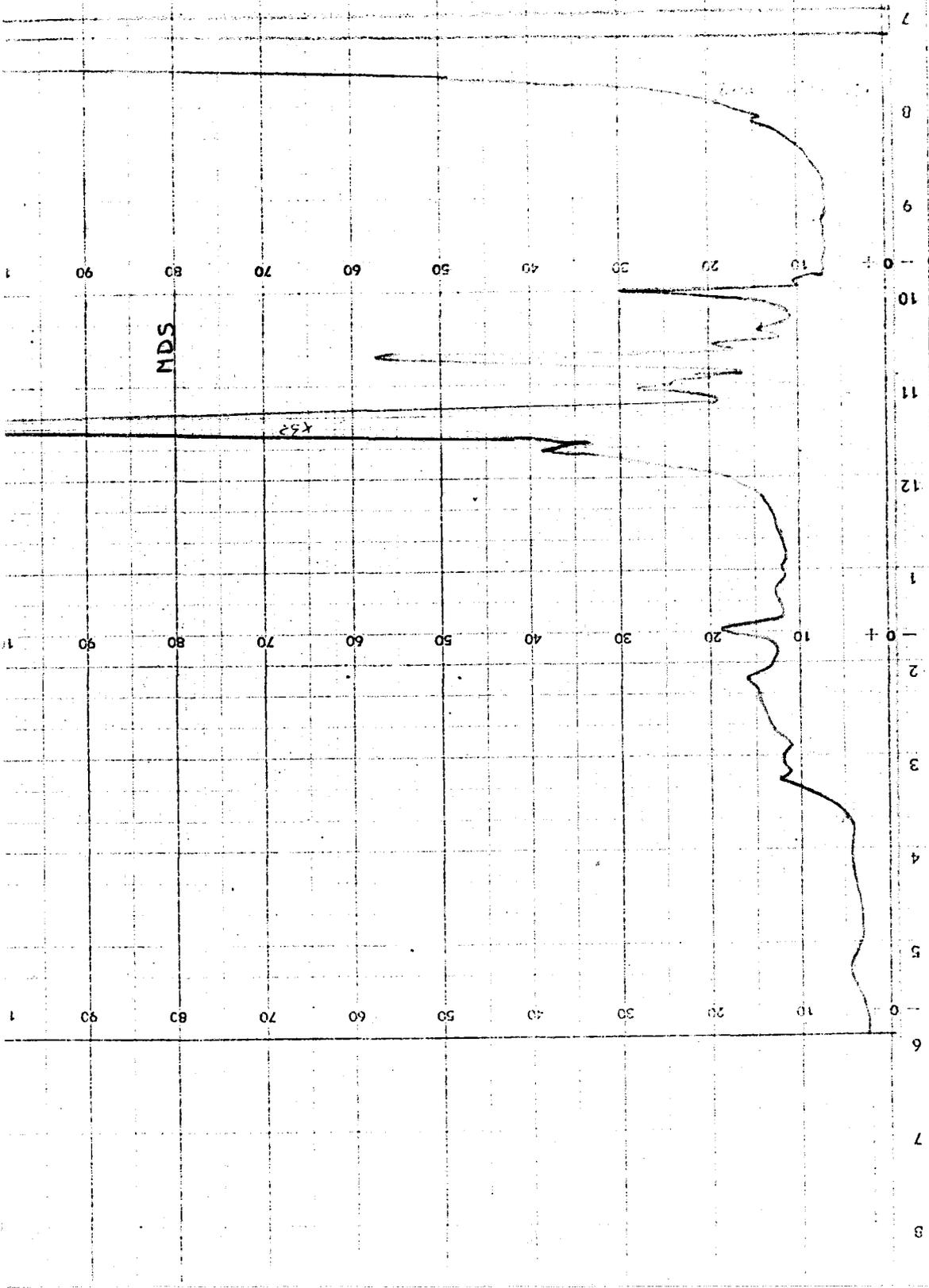
4.21.9.- Cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos de la manzana.-

Reproducimos los cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos de la manzana por soluciones - bencénicas de DUA y DOWEX-1 X8 ciclo acetato.



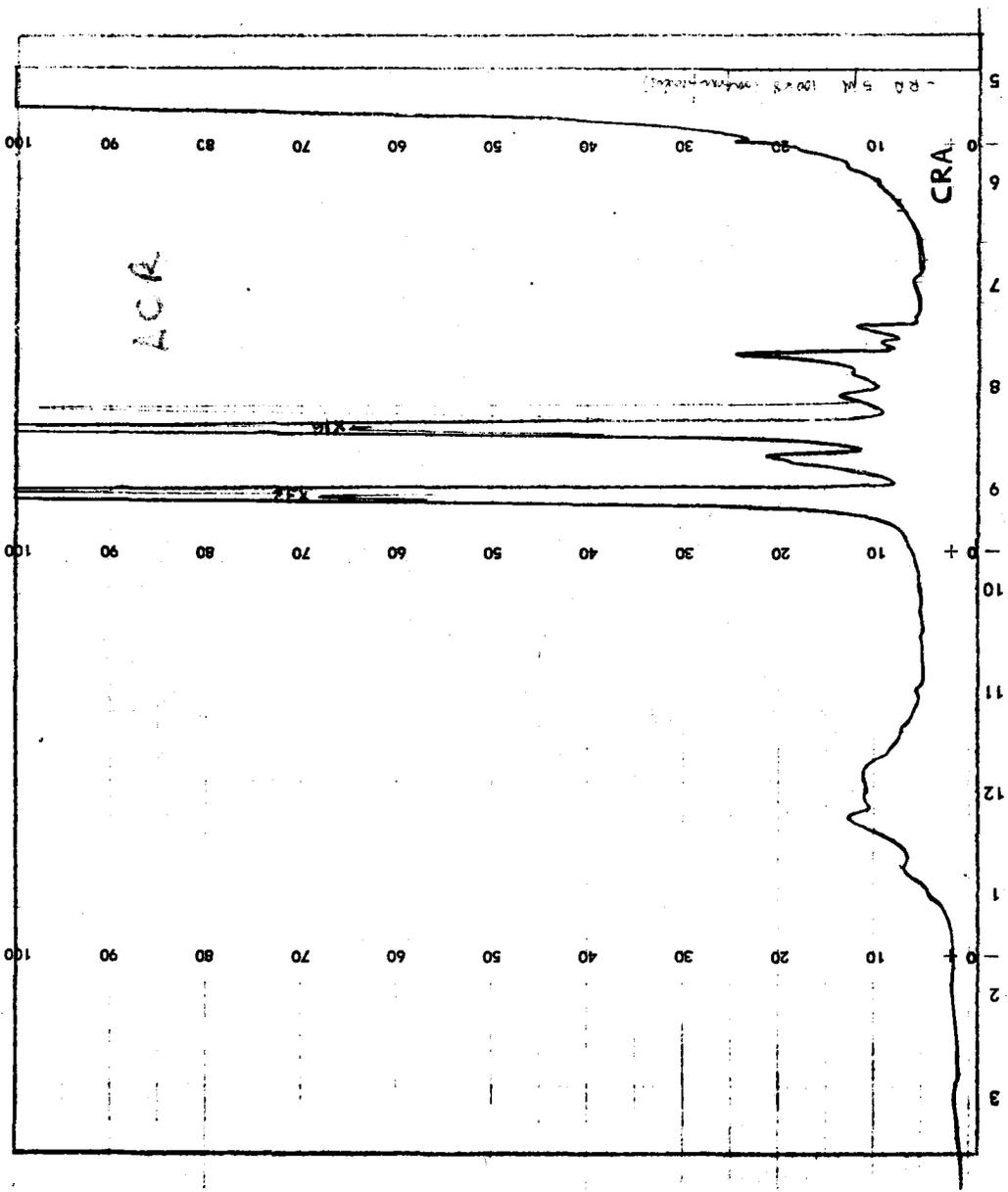
MDA

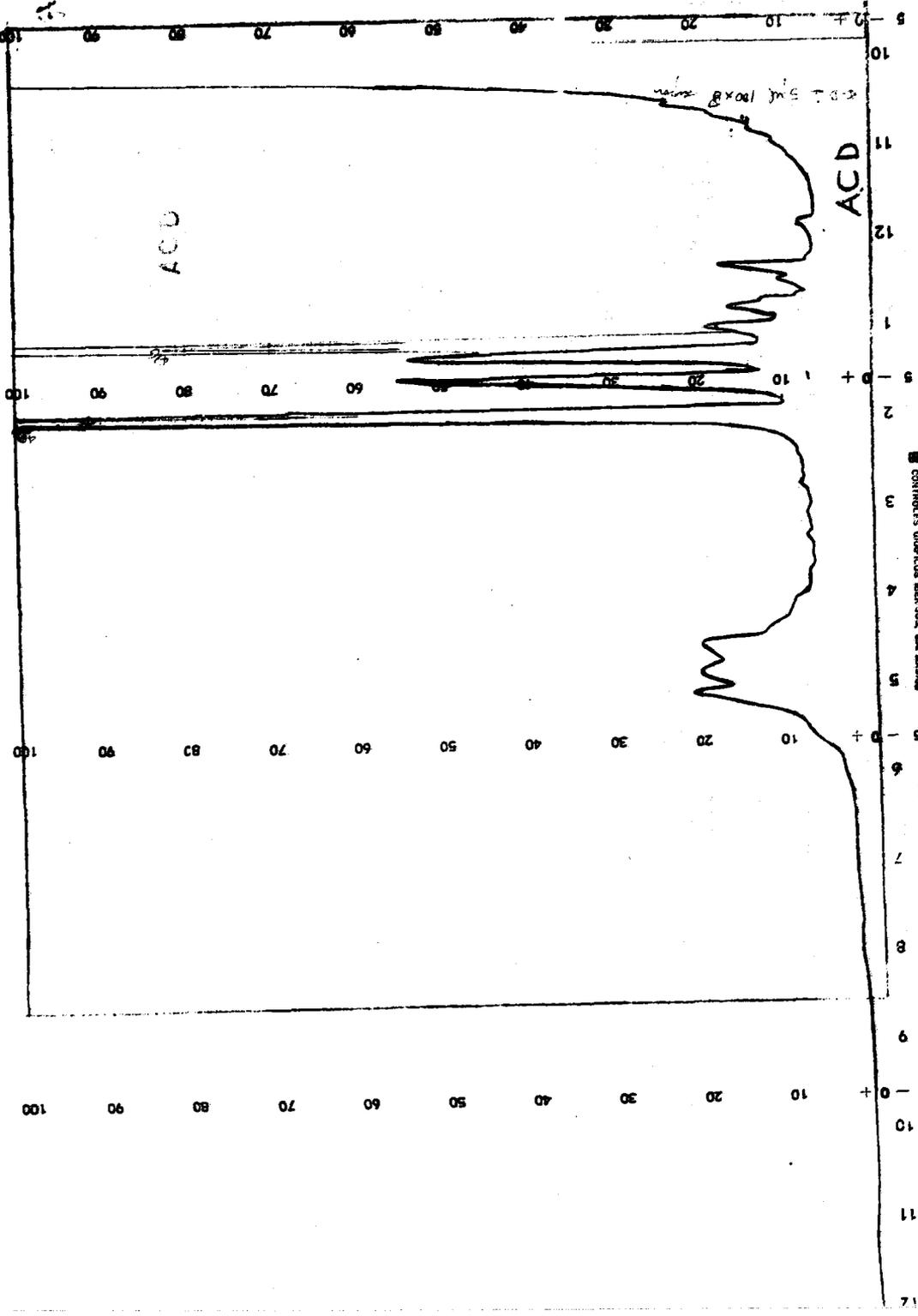


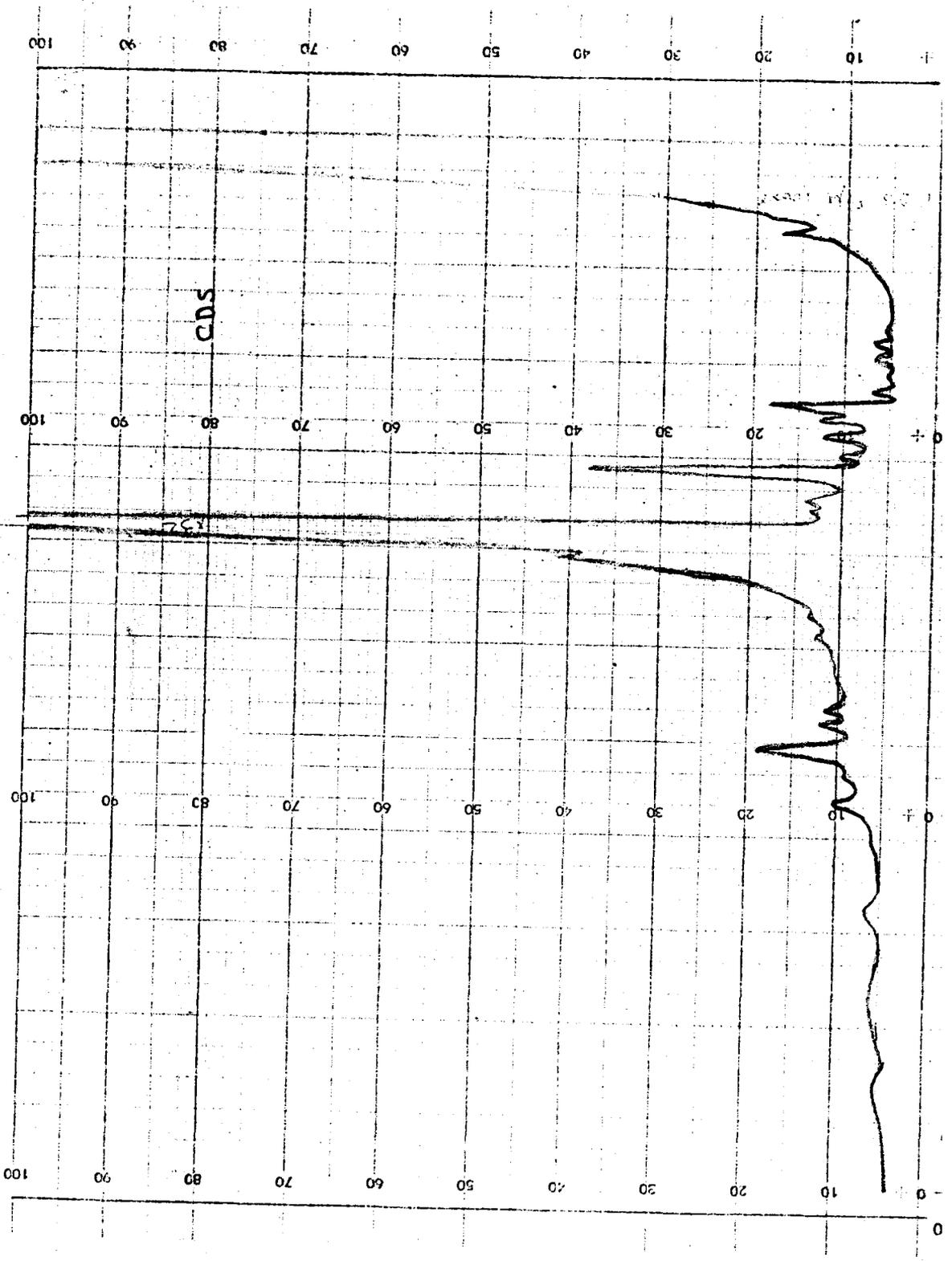


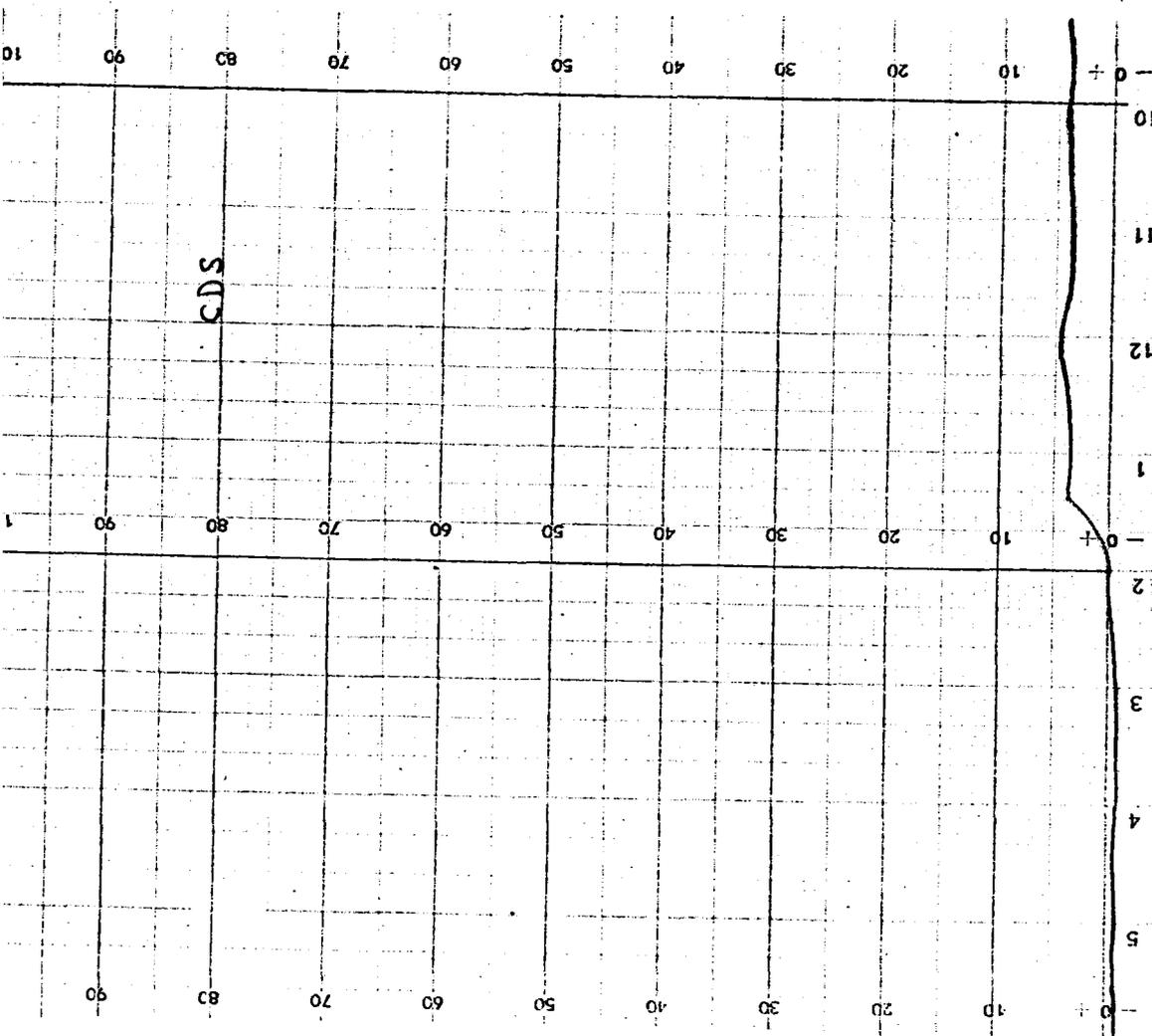
4.21.10.- Cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos de la ciruela.-

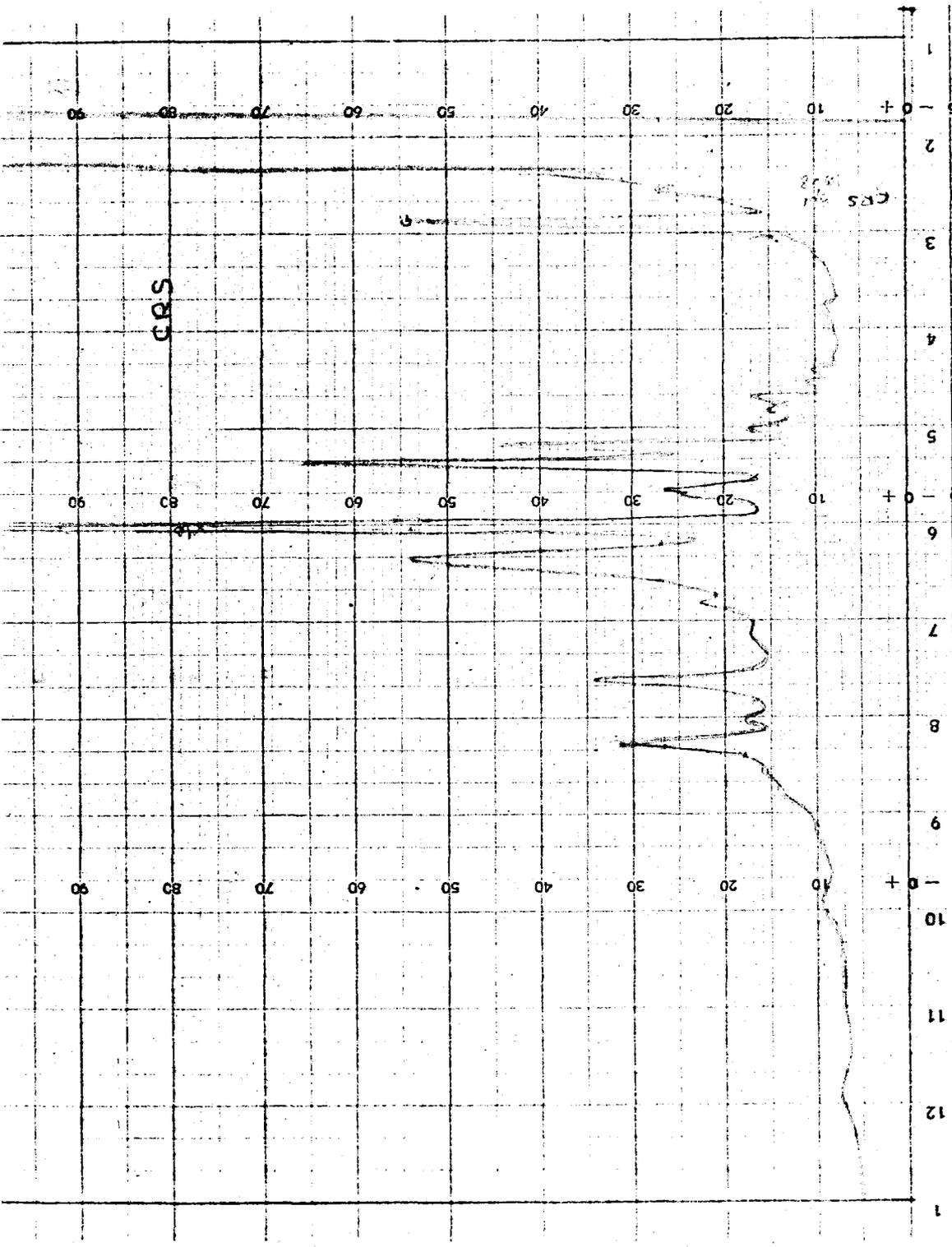
Representamos los cromatogramas de los TMS derivados de los ácidos extraídos de la ciruela por soluciones bencénicas de DUA y DOWEX-1 X8 en ciclo -OH.

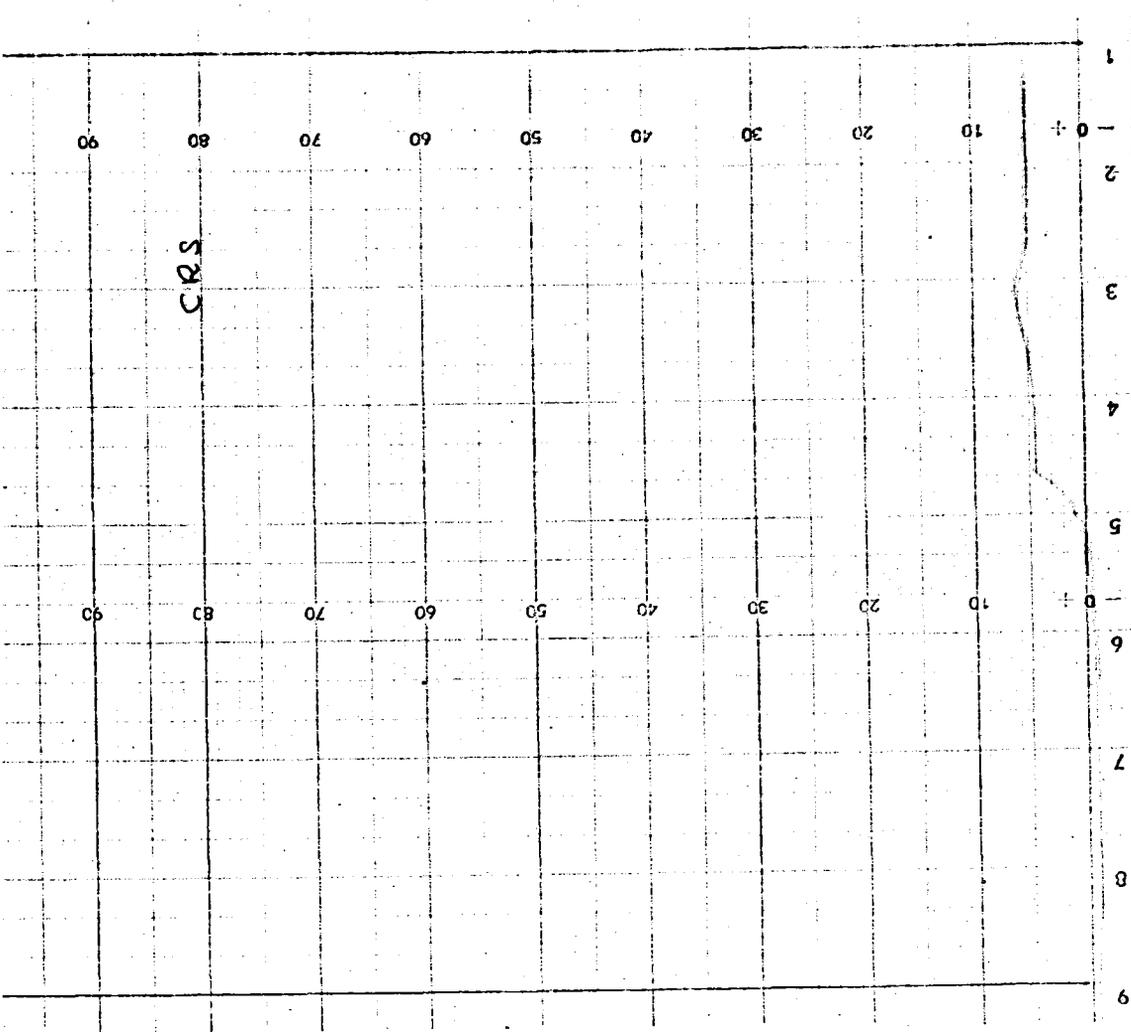












CRS



## 4.21.11.- Análisis del alpechín de la campaña de 1971.-

Se toman 2 litros de alpechín a pié de prensa, procediéndose a lavar rápidamente con 4 litros de benceno y filtrando a continuación por filtros de pliegues de "papel jarabes".

El alpechín lavado y filtrado se pasa por resina catiónica DOWEX-50 (ciclo  $H^+$ ), se despectiniza con metanol y se concentra en evaporador rotatorio bajo presión reducida.

Se toman 2 fracciones de 100 ml, que se extrae cada una con 400 ml de solución bencénica de DUA (0,5 M).

La reextracción llevada a cabo es de tipo ácido.

La mezcla reextraída y purificada por lavado, se lleva a sequedad, disolviendo en acetona y metanol y tomando 1 ml de cada una de ellas para su análisis.

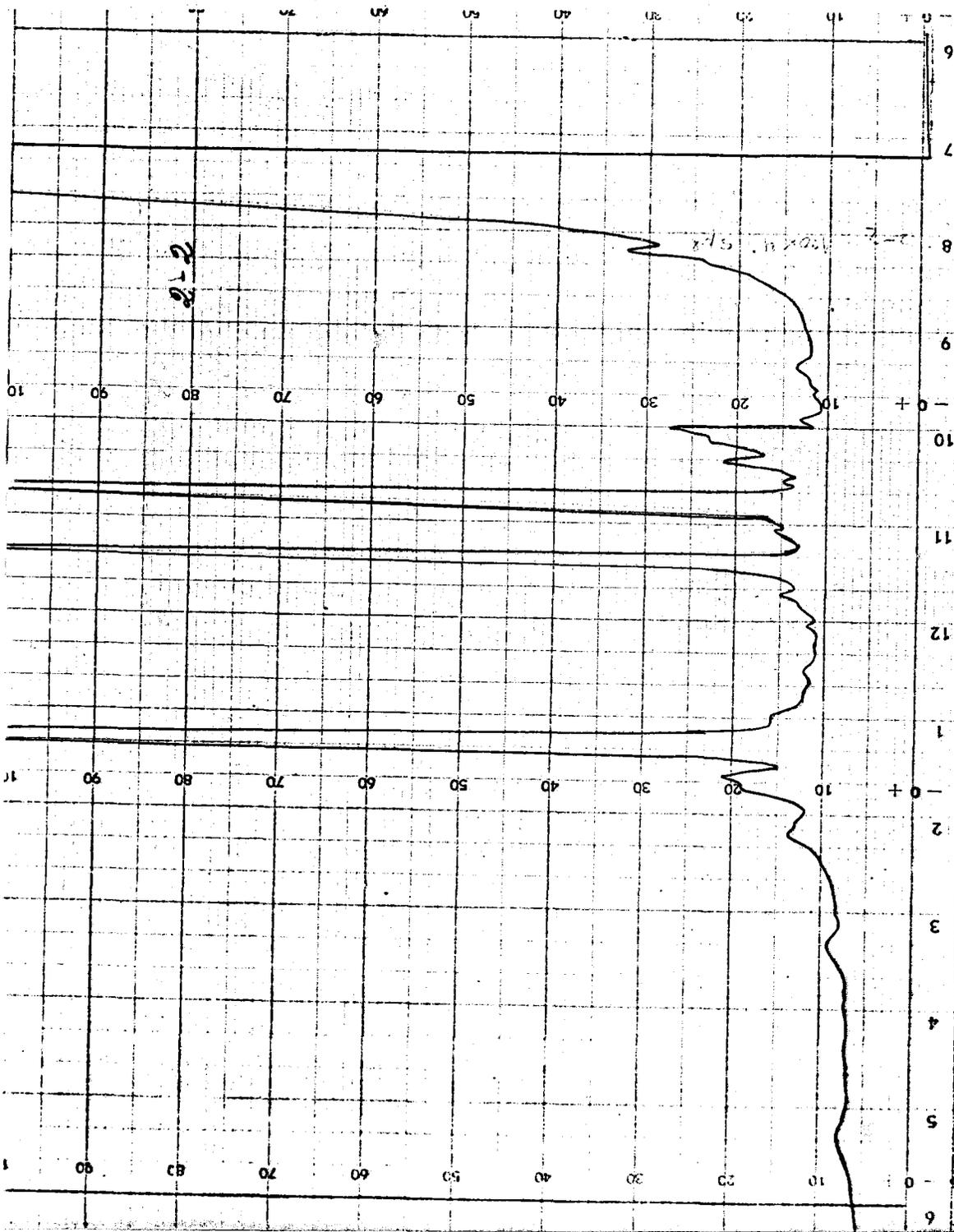
El alpechín analizado tiene las siguientes características:

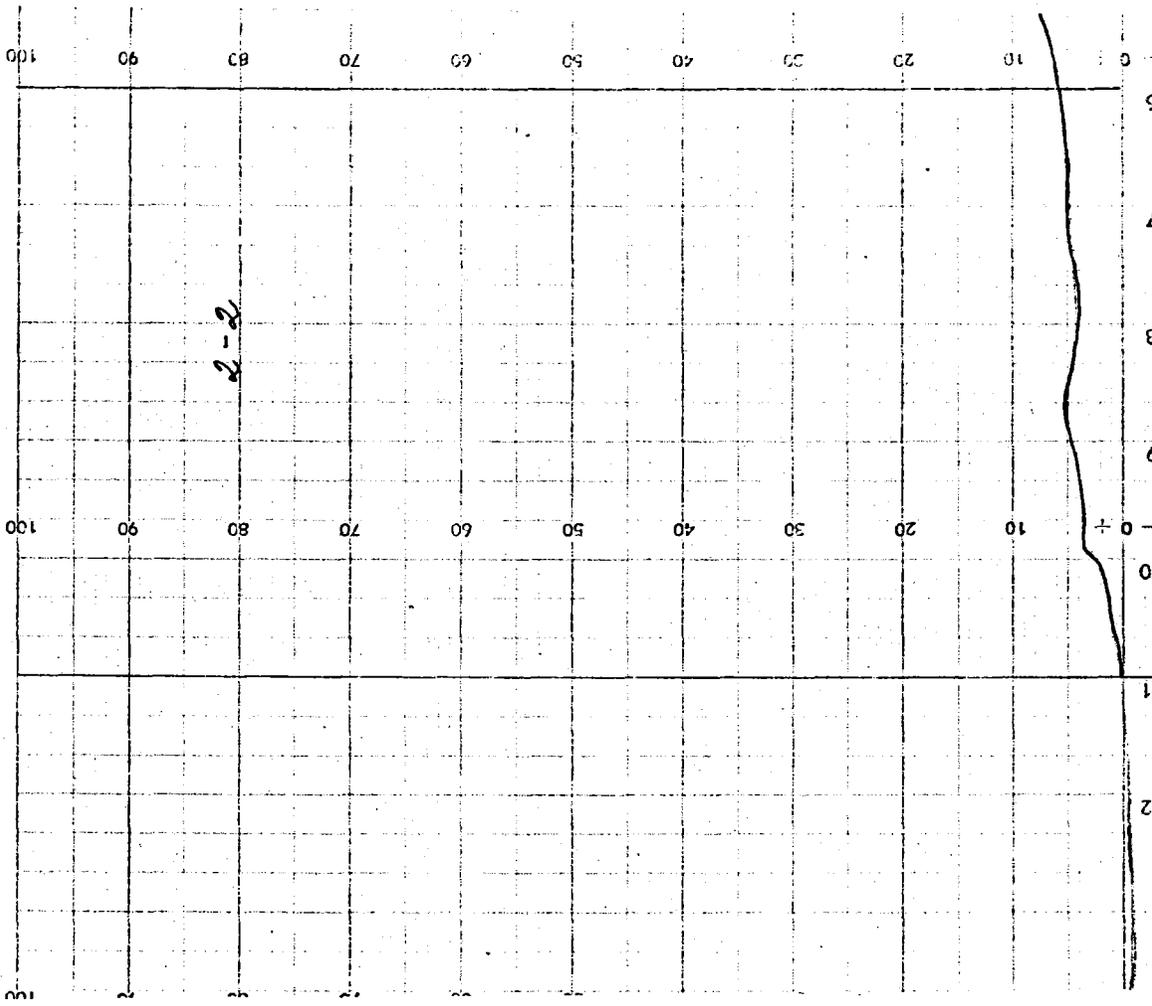
Residuo sólido total 17,7%

Acidos libres 0,1435 N (valoración potenciomét.)

Acidez total 0,5054 N " "

Las pérdidas de acidez en el proceso son del 12%





4.21.12.- Microanálisis de ácidos de productos naturales.-

Proceso seguido para zumos. Análisis total de —  
ácidos:

PREPARACION Y PURIFICACION.-

Toma de muestra conteniendo aprox. 1 mequiv.

Filtración

Paso a través de una columna de DOWEX-50(H<sup>+</sup>)

Concentración a presión reducida

Adición de MeOH, doble volumen que la sol. acuosa

Filtración

Eliminación de MeOH

Concentrar hasta concentración aprox. 1 N

EXTRACCION.-

Introducir en vial de aprox. 8 ml con tapa de te  
flón roscada

Añadir 4 ml de solución 0,5 M de DUA en benceno

Agitar vigorosamente durante 5 minutos

Separar por centrifugación

Eliminar la fase acuosa con jeringa

Lavar 3 veces con 1 ml cada vez de agua destilada  
separando siempre las aguas de lavado por centri-

fugación y eliminación con jeringa.

## REEXTRACCION.-

Introducir en el vial 1 ml de  $\text{ClH } 3 \text{ N}$  ó  $\text{NH}_4\text{OH}$  de la misma normalidad.

Agitar vigorosamente durante 5 minutos

Separar por centrifugación

Lavar 3 veces con 1 ml de benceno cada vez, separando siempre por centrifugación y utilizando je ringa para separar la fase bencénica.

## SECADO.-

Desecador sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  en frio ó en caliente, a presión normal o reducida.

Puede también realizarse una liofilización

## ANALISIS.-

Añadir a la muestra seca alrededor de 2 mg de glutarico exactamente pesados en balanza semi micro.

Añadir 5 mg de  $\text{ClH}\cdot\text{NH}_2\text{OH}$  en 0,1 ml de piridina.

Después de 15 minutos, añadir 2 bolitas de vidrio y 3 ml de mezcla silanizante.

Agitar fuertemente

Dejar estar 2 horas a temperatura ambiente ó media hora a  $60^\circ\text{C}$

Injectar en el cromatógrafo alrededor de 5  $\mu\text{l}$ .

Variante: En el caso de querer realizar sólo el análisis de ácidos libres, se prescindirá del paso de la muestra a través de la resina catiónica

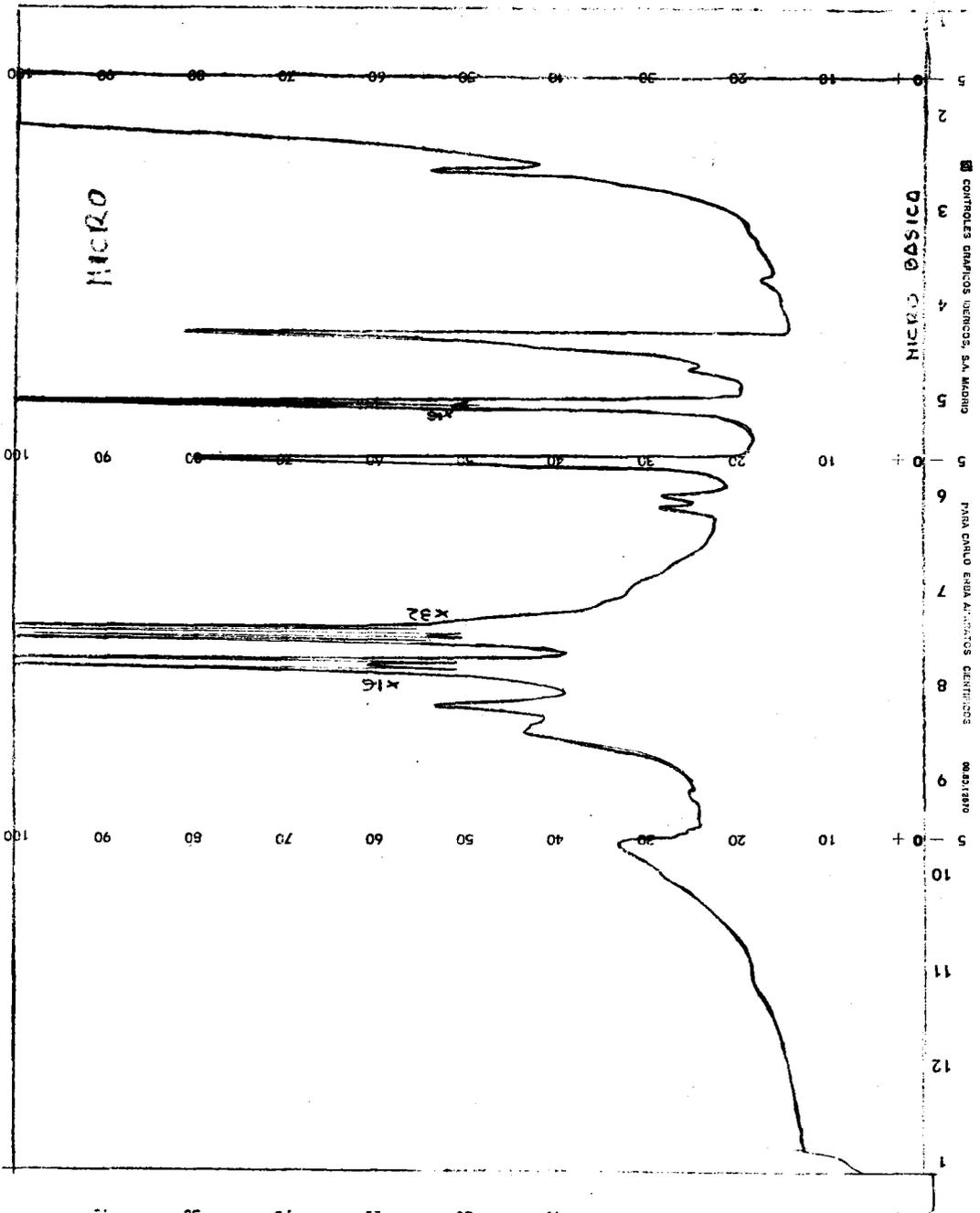
Se han realizado diversas pruebas del método micro con el alpechín de la aceituna.

Los mejores resultados se obtienen con la reextracción básica y secado en frío.

La muestra de alpechín utilizado tiene las siguientes características:

Acidos libres 0,2368 N  
Acidos totales 1,0326 N  
Residuo sólido 6,64 %  
Residuo sólido total 7,85 %

El cromatograma de la microextracción puede verse en las páginas siguientes



CONTROLES GRÁFICOS DEBIDOS S.A. MICRO PARA CUALquier ESTADÍSTICA DEBIDOS



RESULTADOS .-



Con los datos consignados en las páginas 126 a 138 podemos realizar unas representaciones gráficas que nos permitan apreciar mejor los resultados obtenidos del estudio de las extracciones de las soluciones de ácidos patrón.

En la gráfica I podemos apreciar que el comportamiento de la DUA no es independiente de la concentración inicial de ácido en la fase acuosa, en este caso ácido cítrico. La extracción es tanto mejor cuanto mayor sea la concentración inicial de ácido en fase acuosa.

En términos absolutos la diferencia, en este caso, no es muy grande, pero se puede apreciar. Para valores de  $\underline{b}$  menores de la unidad, esto es, cuando hay exceso de DUA, hay una diferencia de %E entre las concentraciones estudiadas de alrededor del 2%.

La extracción es de todas formas buena para cualquiera de estas concentraciones iniciales, pues para valores de  $\underline{b}$  menores de la unidad, la cantidad de ácido extraído se mantiene por encima del 95% de la cantidad inicial, lo que significa que el rendimiento de la extracción es excelente.

En el caso de concentración inicial 0,3N, para valores de  $\underline{b}$  menores de 0,9, siempre extraemos más del 98% del ácido original, y para valores de  $\underline{b}$  menores de 0,5, la extracción puede considerarse cuantitativa, lo que constituye un dato apreciable en los estudios de la extracción de ácidos de fuentes naturales, sobre todo en el micrométodo explicado en la parte teórica y de cuyos resultados hablaremos más adelante.

Otro dato que podemos tomar como referencia es el que, para concentración inicial 0,3 N, cuando realizamos la extracción con una relación de equivalentes igual a 3, extraemos el 50% de todo el ácido que había inicialmente en solución acuosa. Esto nos indica claramente que la amina se sobrecarga de ácido, es decir, que si empleamos una cantidad tres veces mayor de ácido que de amina, se ex

trae la mitad del total de ácido, que resulta ser vez y media la cantidad de amina empleada como agente de extracción, luego hay un 50% de equivalentes de ácido que no están unidos, al menos en forma de sal normal, a la amina, pero que se encuentran en la fase orgánica. Esto tiene importancia en cuanto que indica que la amina extrae más de lo que estequiométricamente cabía esperar, constituyendo un dato más que corrobora el buen comportamiento extractor de la DUA frente al ácido cítrico.

En la gráfica V podemos apreciar perfectamente que el efecto de sobrecarga tiende asintóticamente a un valor 2, que es el 40% de los equivalentes de DUA empleados al extraer.

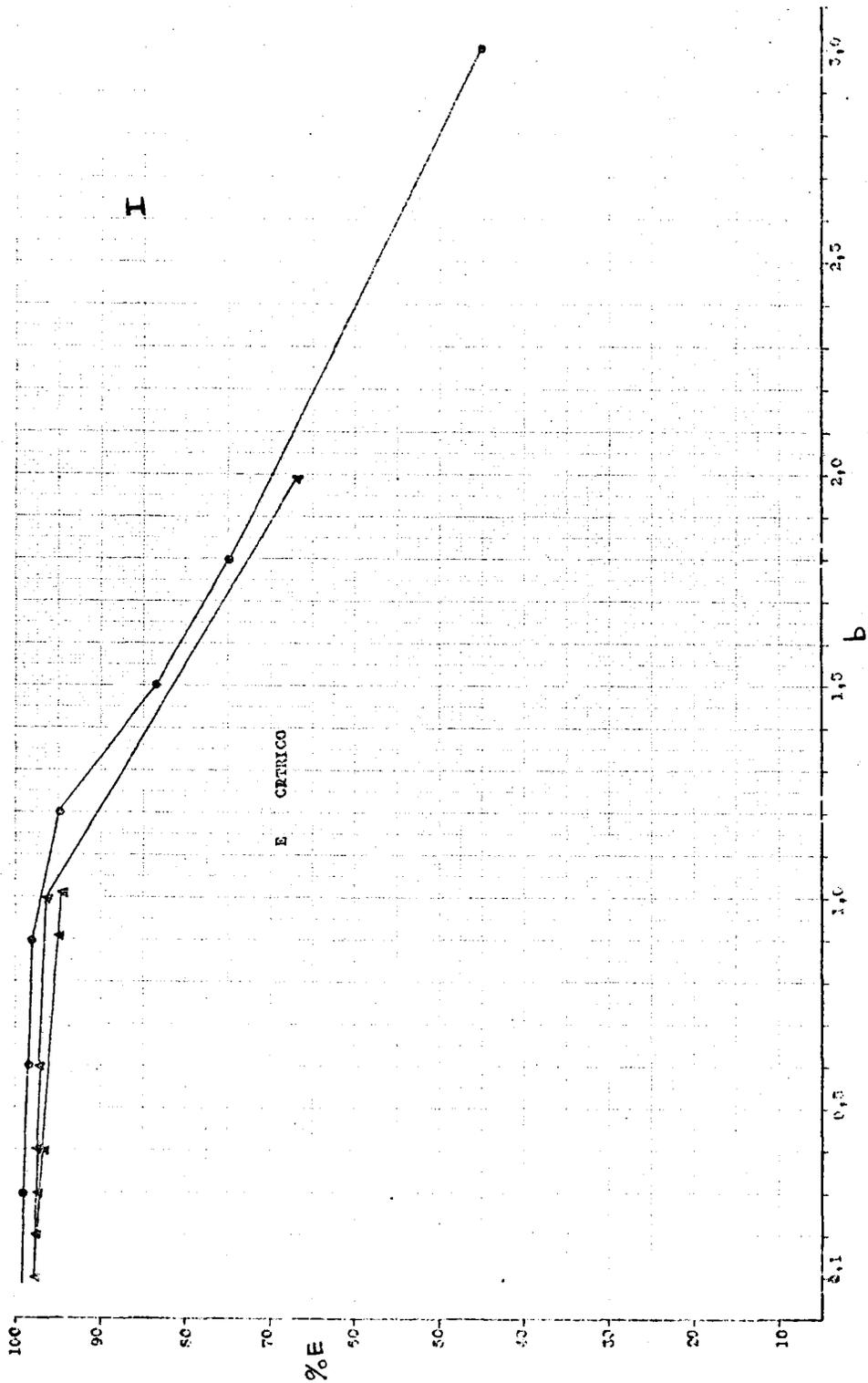
Es interesante ver la forma de la curva de distribución del ácido cítrico entre las dos fases, una vez realizada la extracción (gráfica VI). Podemos apreciar que la fase acuosa queda agotada prácticamente en una sola extracción, siempre que exista exceso o igualdad del agente extractante (DUA) respecto al ácido cítrico a extraer, teniendo además en cuenta que, en la gama de valores por nosotros estudiada, es indiferente la concentración inicial de ácido en la fase acuosa.

Incluso aunque exista un exceso del 10-15% de equivalentes de ácido frente a los equivalentes de DUA, sólo queda en solución acuosa, mediante una sola extracción, alrededor de un 5% del ácido originalmente en la fase acuosa.

El ácido tartárico se comporta en todo de una manera algo diferente.

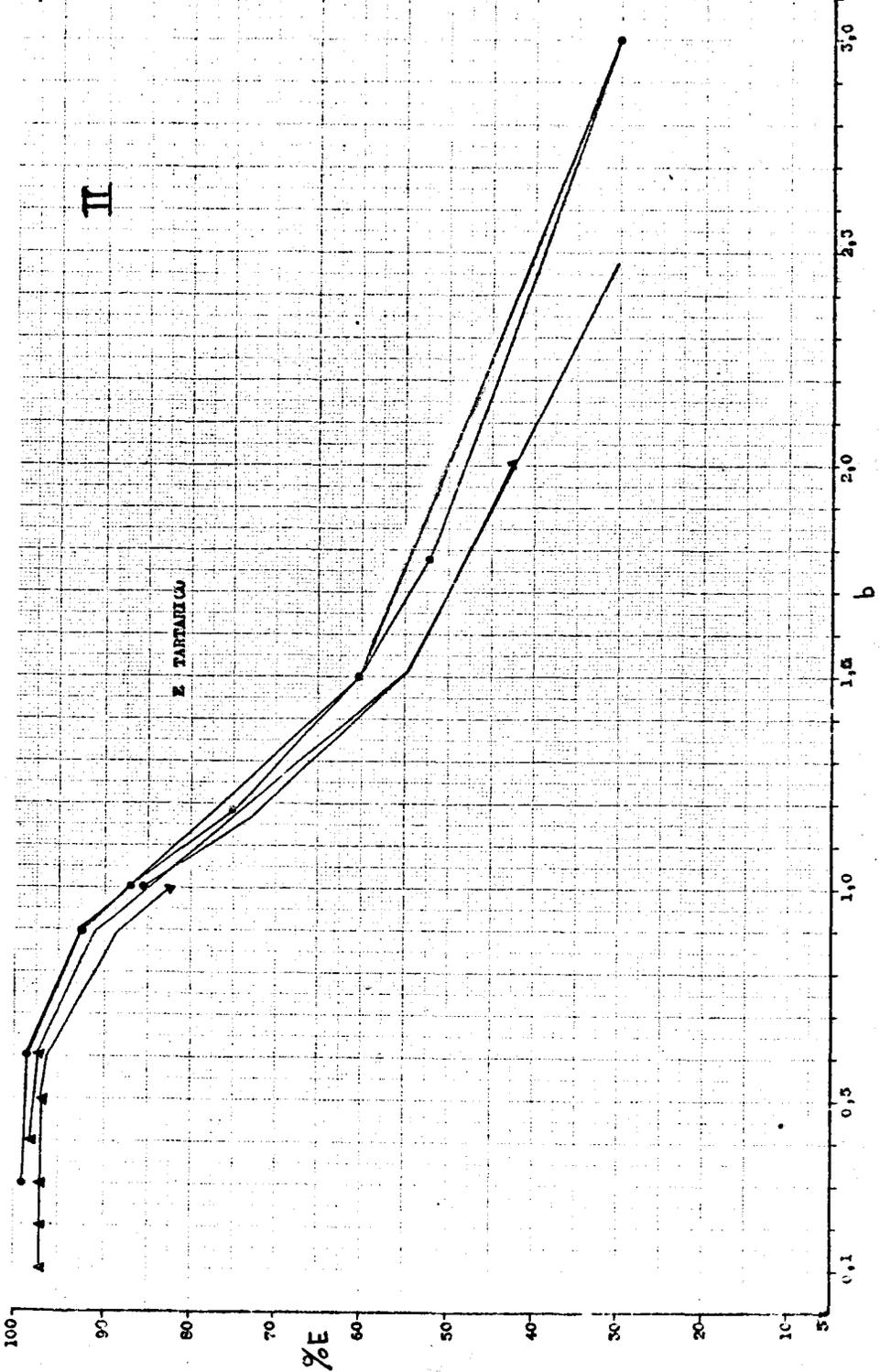
En el gráfico II tenemos representado el % de ácido extraído frente a la relación original de equivalentes ácido/DUA. Para valores de b menores de 0,5, el comportamiento es totalmente similar al ácido cítrico.

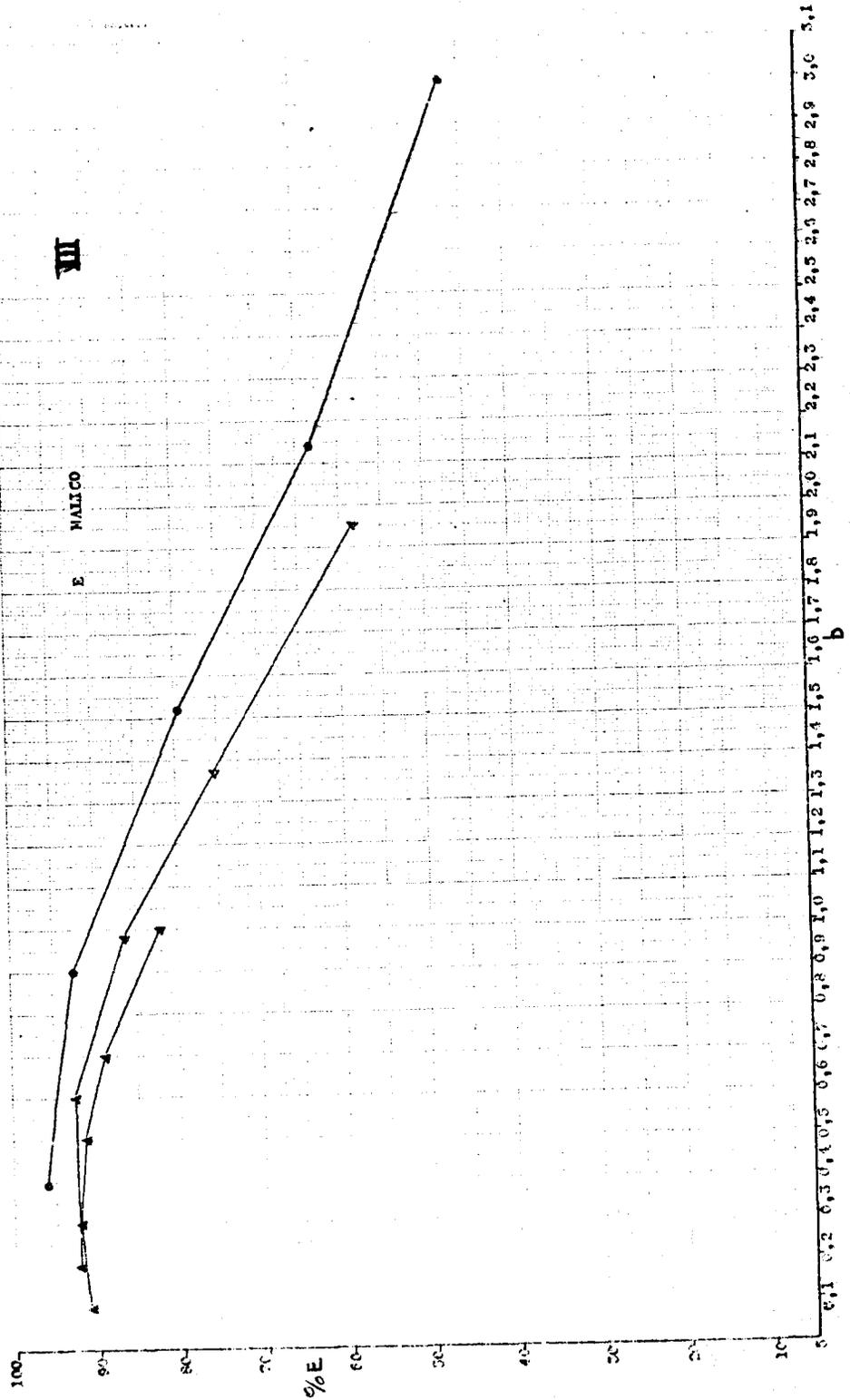
En este caso, la diferencia de comportamiento de la DUA frente a soluciones acuosas de diferente normalidad es más acusada, siendo mejor el rendimiento de la extracción cuanto mayor sea la concentración inicial de ácido en la fase acuosa.



# II

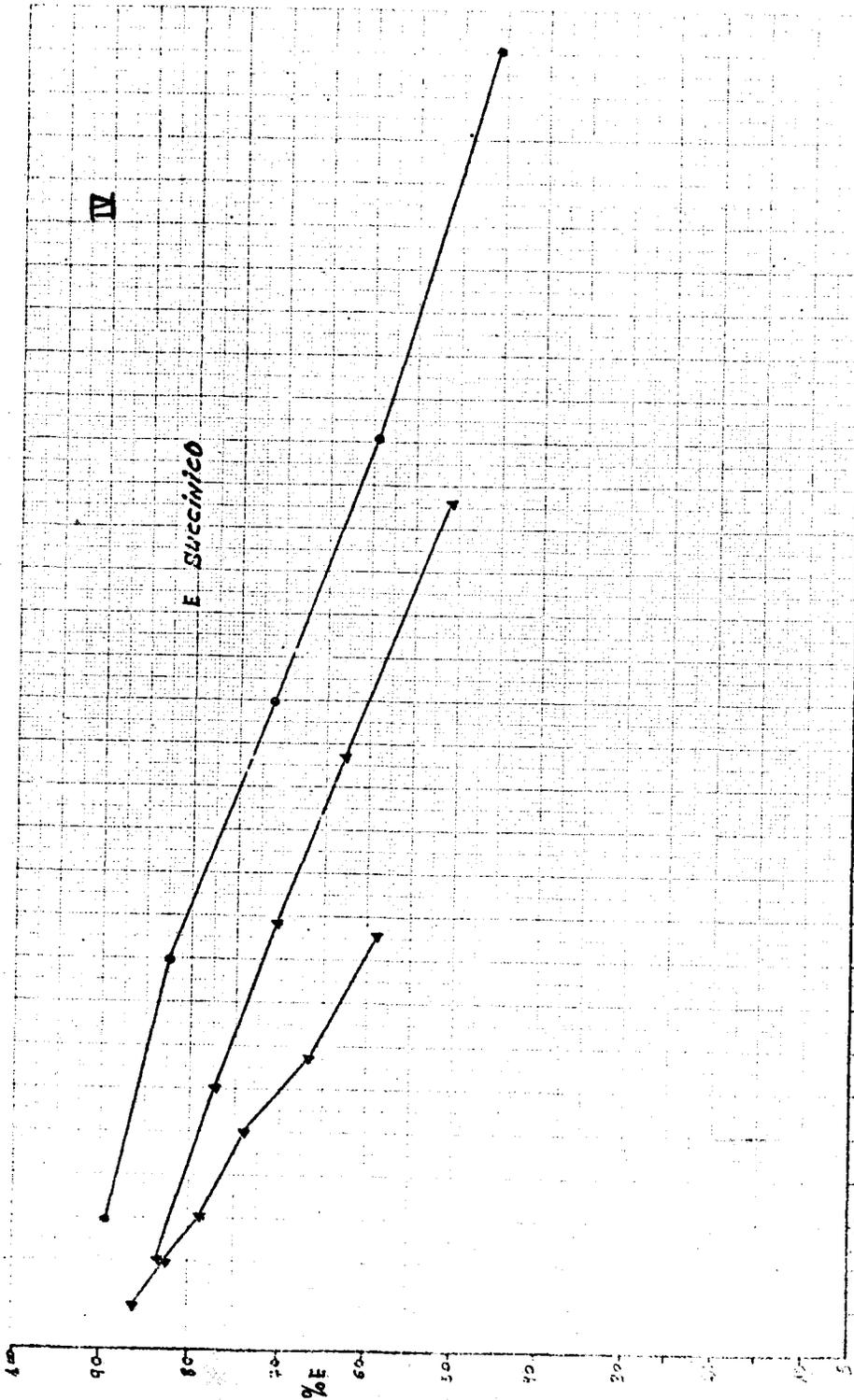
Z TARTARIC CO





IV

E. succinico

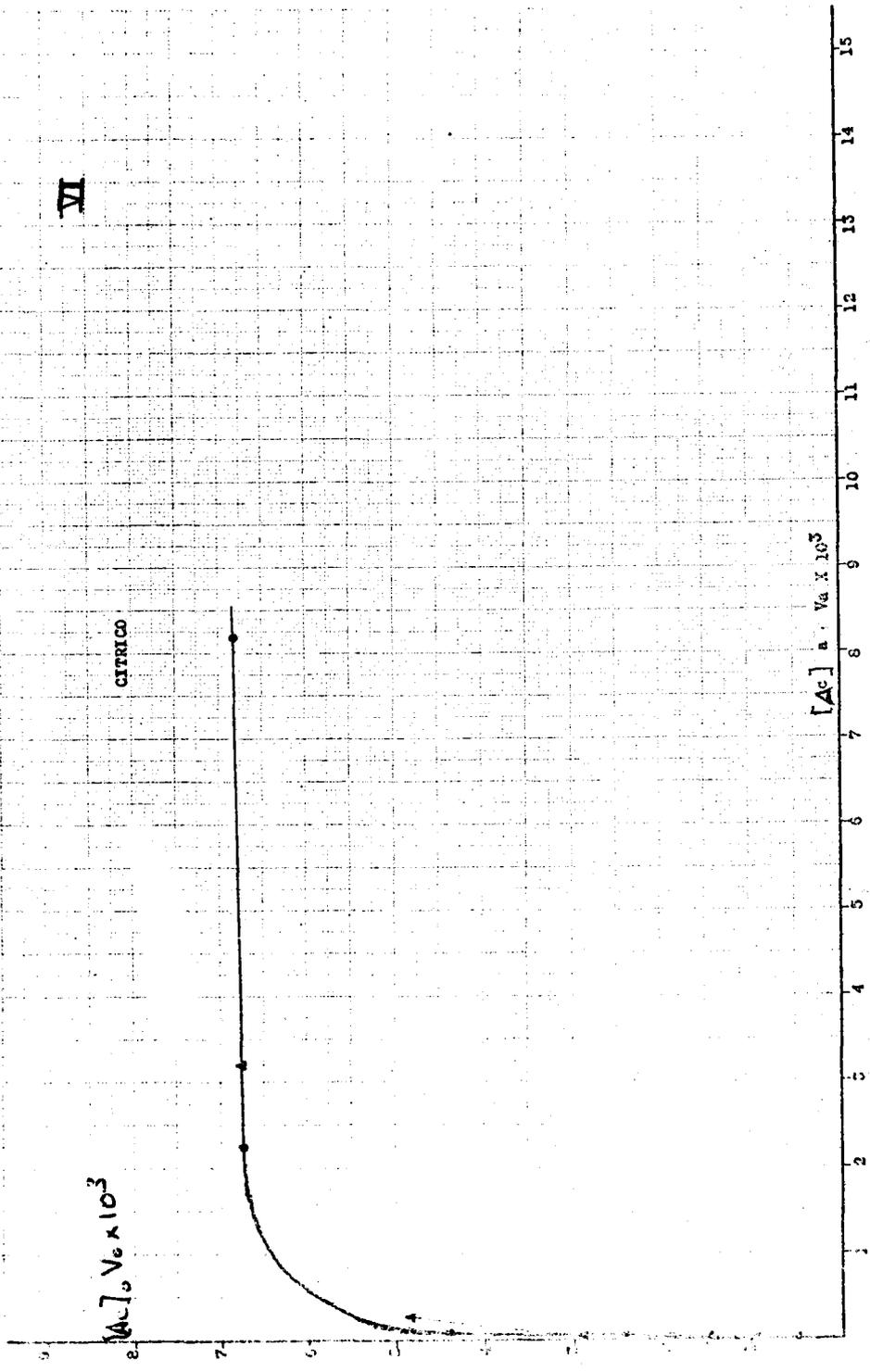


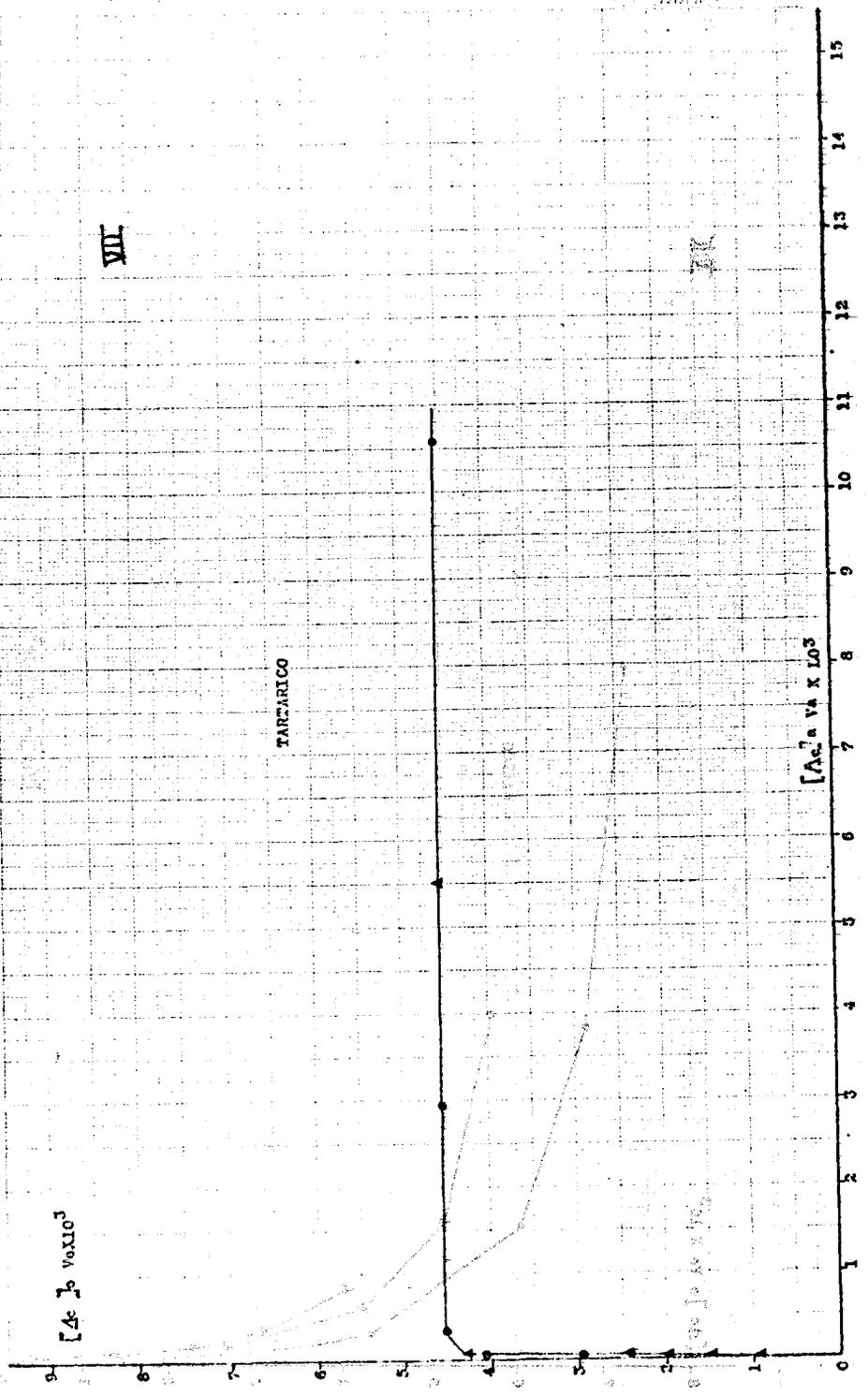
0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 1.5 2.0 3.0

6



VI

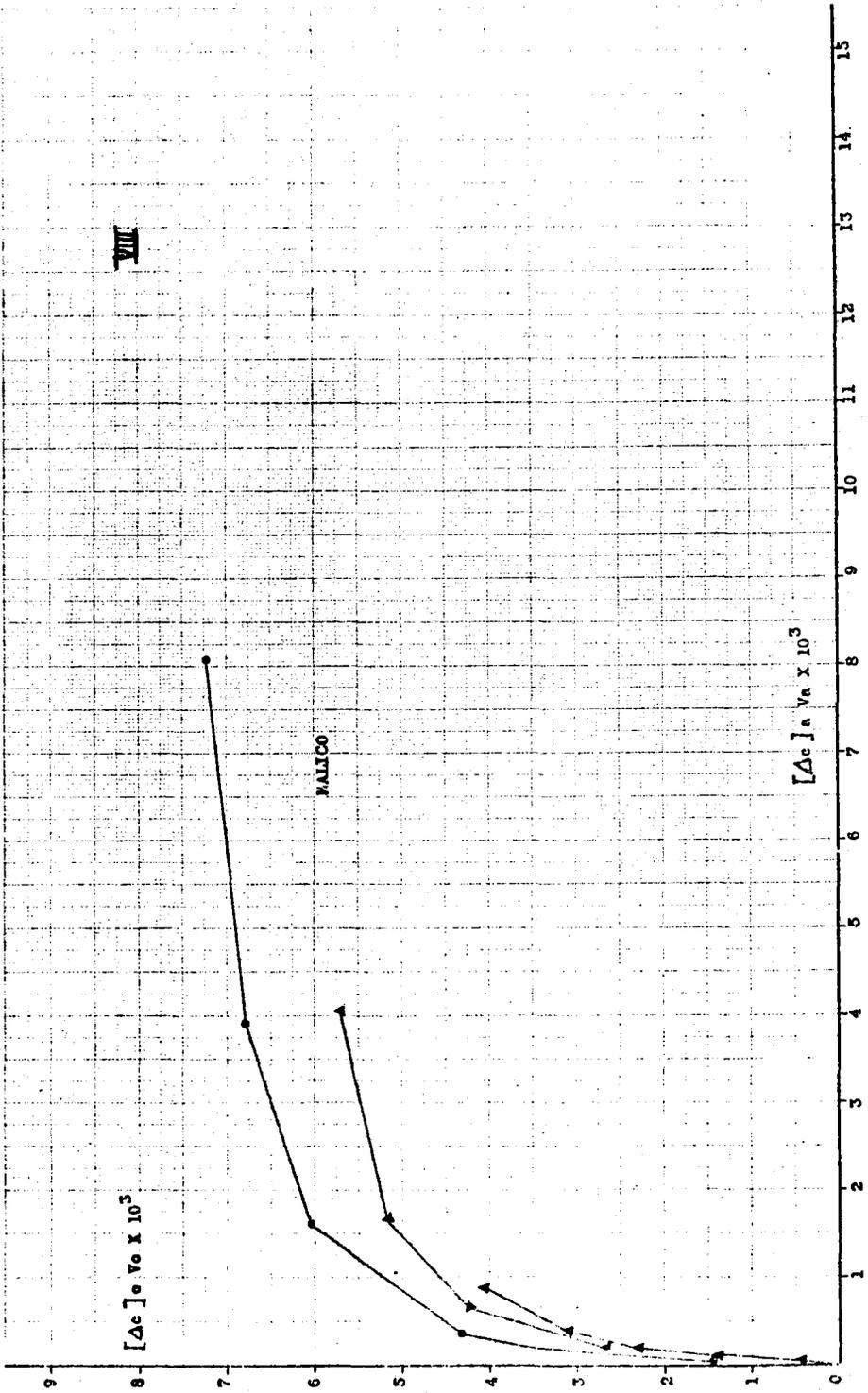




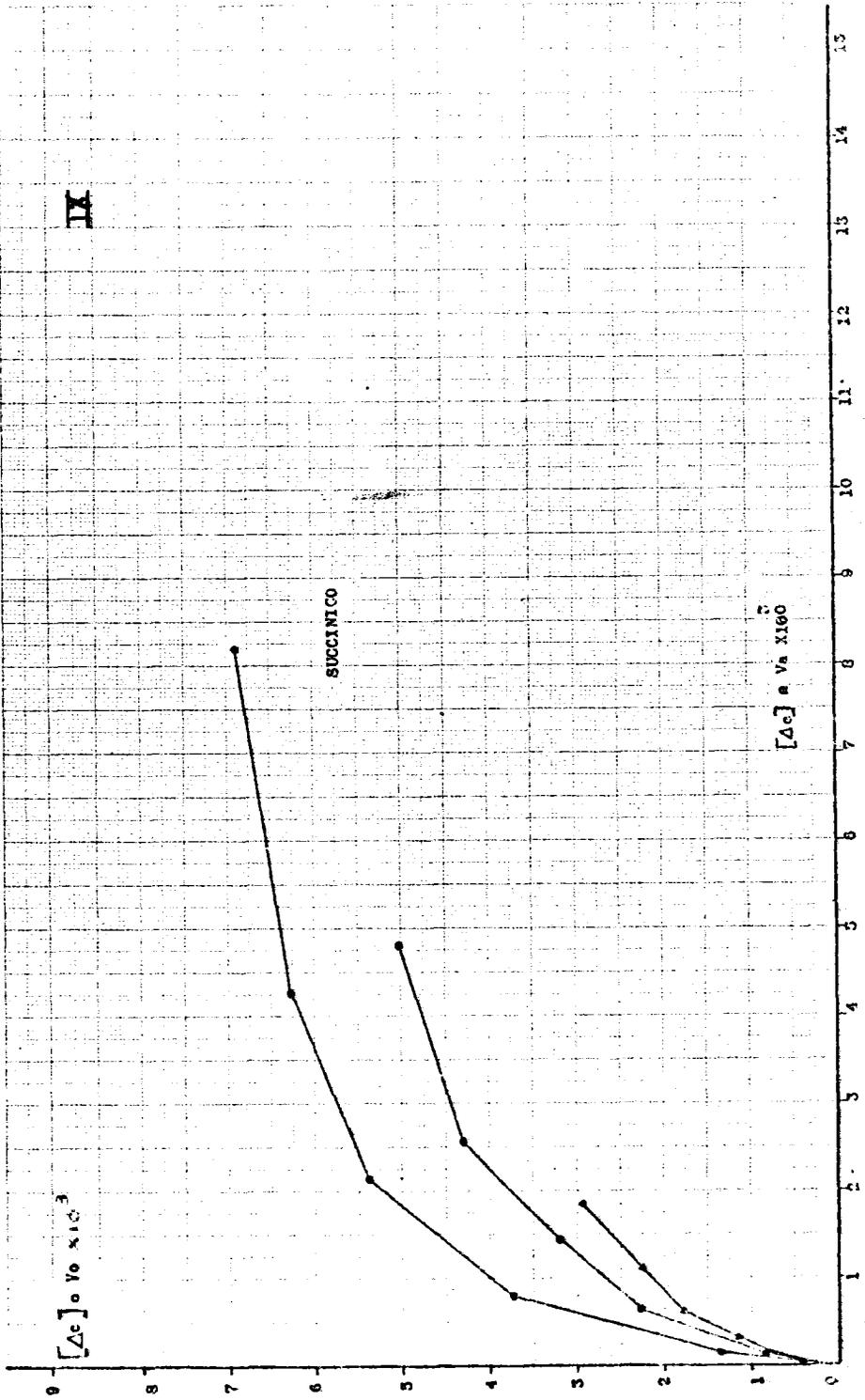
VII

III

VIII



IX





El rendimiento de la extracción es bueno, pero para valores de  $b$  superiores a 0,5, empieza a decrecer muy rápidamente el  $\%E$ , dando lugar a una curva muy similar a las de neutralización, de manera que el valor del 50% de ácido extraído se alcanza para una relación original de equivalentes igual a 1,9, cifra sensiblemente inferior que en el caso del ácido cítrico ( $b = 3$ ).

Podemos concluir diciendo que la DUA extrae peor el ácido tartárico que el ácido cítrico, salvo para valores de  $b$  menores de 0,5 unidades, pero que a pesar de todo la extracción es excelente, puesto que por debajo de ese valor se extrae más del 97 % en las condiciones iniciales empleadas por nosotros.

En el gráfico V se puede apreciar que el ácido tartárico no sobrecarga en ningún momento al agente extractante, lo que nos da una explicación de porqué el rendimiento de la extracción es, para casi todas las gamas de relación de equivalentes, inferior al observado para el cítrico.

En el gráfico VII puede apreciarse que los miliequivalentes de ácido presentes en la fase orgánica tienden asintóticamente a un valor de 5, que es el número de miliequivalentes de DUA utilizados en nuestras experiencias, es decir, que aunque en la fase acuosa exista un gran exceso de ácido orgánico, la solución bencénica sólo toma la cantidad justa de equivalentes que neutralicen la DUA, teniendo además en cuenta que los toma aunque haya pocos en solución acuosa siempre que no exista exceso de ácido en la misma frente al número de equivalentes de DUA empleada.

El hecho de que la DUA no se sobrecargue de ácido puede explicarse fácilmente sabiendo que la fuerza ácida de ambos grupos carboxilos es alta y no hay gran diferencia entre  $pK_1$  y  $pK_2$ . Por lo tanto cada molécula de tartárico se neutralizará con 2 de DUA.

La probabilidad de reacción entre un carboxilo de una molécula ya unida una vez a la DUA será similar a la de un carboxilo de otra molécula de tartárico libre to-

davía y como la sal (inicialmente ácida) de tartárico y DUA será mucho más soluble en medio bencénico que el tartárico libre, la reacción se completa con más facilidad si se forma la sal neutra que si se forma una nueva molécula de sal ácida.

No sucede igual con el ácido málico. El rendimiento de la extracción es también muy bueno, pero hay una diferencia apreciable en el comportamiento de las soluciones acuosas de diferente normalidad.

Los mejores resultados se obtienen con la solución originalmente 0,3 N, esto es, con la más concentrada de las estudiadas. Para valores de relación de equivalentes (b) menor de 0,5, la extracción en la solución 0,3 N se mantiene por encima del 95%, cosa que no sucede con las originalmente 0,2 y 0,1 N, que alcanzan valores comprendidos entre el 90 y el 95 de %E. Sin embargo, este ácido se comporta en algunos aspectos como el ácido cítrico, es decir, puede sobrecargar la DUA, por lo que hay un nivel medio de extracción muy bueno.

Refiriéndonos a la solución originalmente 0,3 N, podemos apreciar en el gráfico III que se extrae el 50 % del ácido inicial para una relación de equivalentes 2,85 lo que es un valor bastante alto.

Podemos apreciar en el gráfico V que, salvo en la zona central del mismo, el comportamiento del ácido málico es muy parecido al del ácido cítrico.

El ácido málico posee una estructura análoga al ácido tartárico, aunque tiene un hidroxilo menos. Este hidroxilo condiciona en gran manera el comportamiento del ácido: Por una parte influye en que actúen desigualmente soluciones de distinta normalidad y además provoca la sobrecarga de la amina. Ambas cosas suceden si este hidroxilo falta.

Se observa una variación gradual de comportamiento en la serie de ácidos tartárico-málico-succínico.

La extracción, aunque siempre buena, es tanto mejor cuanto más hidroxilado esté el ácido, y la diferencia

de comportamiento de soluciones de diferente normalidad es tanto más acusada cuanto menos hidroxilos tenga el ácido - en cuestión.

El ácido succínico no llega nunca a extraerse, - ni a concentración inicial 0,3 N, más del 90 %, y la diferencia de comportamiento depende en gran manera de la concentración inicial de ácido.

En el gráfico IV podemos ver perfectamente lo - que acabamos de decir.

Las curvas de extracción del gráfico IV, sobretodo la correspondiente a concentración inicial 0,3 N, son - poco pendientes, y esto es señal inequívoca de que existe una sobrecarga tal y como hemos podido apreciar para el - ácido cítrico y málico. Cuanto menos pendiente es la curva más sobrecarga existe.

En el gráfico V podemos apreciar que existe la - sobrecarga mencionada, y, aunque en la zona media del gráfico la sobrecarga sea menor, el hecho de que para  $b = 3$  sea igual a la experimentada por el ácido cítrico y málico indica que existe en gran magnitud. Si la curva del succínico queda por debajo se debe a que, sin contar el efecto de sobrecarga, se extrae peor que los demás.

Cuando la relación de equivalentes ácido/DUA es muy pequeña, resulta lógico esperar que todos los grupos - carboxilos reaccionen con la DUA, pues existe un gran exceso de ésta. en estas condiciones no debe darse los fenómenos que motiven la sobrecarga, y podemos apreciar la reaccionabilidad que nos causará un mayor o menor grado de extracción.

Podemos apreciar en los gráficos VI, VII, VIII y IX que, para valores pequeños de  $b$ , encontramos una recta, en el caso de VI y VII única para todas las concentraciones iniciales, no sucediendo lo mismo para VIII y IX. La pendiente de la recta vendrá dada por

$$p = \frac{(Ac)_o V_o}{(Ac) V_a}$$

es decir, por la relación de equivalentes en el equilibrio después de la extracción. Como siempre hemos empleado la misma cantidad de agente extractor, los resultados pueden ser comparativos.

Cuanto mayor sea la pendiente, mayor facilidad de reacción de forma estequiométrica tendrá el ácido en cuestión frente a la amina.

Nos encontramos con los siguientes valores:

Acido cítrico	44				
" tartárico	82				
" málico	18	(para(Ac) = 0,3 N)			
" succínico	6	"	"	"	"

Podemos observar que, en principio, el ácido que mejor se extrae es el ácido tartárico, pero después, debido a que no crea sobrecarga en la DUA, es aventajado en rendimientos de extracción por el ácido cítrico.

En la serie tartárico- málico- succínico se aprecia claramente una variación gradual de comportamiento.

Los valores antes establecidos siguen el orden tartárico málico succínico. En principio, la curva es más pendiente en el orden indicado, y los % E siguen la pauta indicada de mayor a menor.

A medida que realizamos extracciones con mayor relación de equivalentes ácido/DUA, se va notando más el efecto de sobrecarga y por eso, viendo los gráficos II, III y IV podemos apreciar perfectamente que aunque en principio se logra mejor extracción para el tartárico que para los otros dos, a valores más elevados de b (mayores de 0,5) el tartárico se ve superado por el málico y succínico.

Como en principio la facilidad extractora para el ácido málico es mayor que para el ácido succínico, el mejor rendimiento para el málico continua para valores de

b comprendidos entre 0,5 y 2,5, pero finalmente hay una igualdad de comportamiento entre ambos ácidos, debido a que cuando hay exceso de ácido frente a la cantidad usada de DUA, ambos ácidos reaccionan con ella sólo mediante un grupo carboxilo de los dos que poseen, y al comportarse igual la extracción es también igual en su aspecto cuantitativo.

Para valores altos de b el tartárico se extrae mucho peor que cualquiera de los otros tres ácidos estudiados, al no provocar sobrecarga en la DUA. Por el contrario el ácido succínico parece producir mayor sobrecarga, pues aunque cuando exista exceso de DUA se extrae peor que el ácido tartárico y málico, cuando el exceso es de ácido frente a la DUA, la extracción de succínico es mejor que la de tartárico e igual que la del ácido málico.

Podemos resumir los resultados del estudio cuantitativo diciendo que la DUA se comporta, en las condiciones estudiadas, como un excelente agente extractor de ácidos de sus soluciones acuosas. Extrae tanto mejor cuanto más policarboxílico sea el ácido y además también constituye un efecto positivo para la extracción la presencia de grupos hidroxilos.

Interesa aplicar las soluciones bencénicas de DUA a soluciones concentradas de ácidos, pues la extracción se lleva a cabo mejor en el aspecto cuantitativo.

Trabajando con exceso de agente extractante, la extracción puede considerarse casi cuantitativa, y cuando, por el contrario, hay exceso de ácido frente a la cantidad de DUA utilizada, la extracción tiene un mayor rendimiento del que cabía esperar, debido al efecto de sobrecarga antes comentado.

De todo lo expuesto se deduce que hemos encontrado conveniente el empleo de soluciones bencénicas de DUA para realizar extracciones de ácidos policarboxílicos de sus soluciones acuosas.

También es conveniente resaltar que las extracciones se realizan en un tiempo mínimo, pues 5 minutos es tiempo más que suficiente para alcanzar el equilibrio. Hemos podido comprobar que las extracciones, incluso las del

ácido succínico, se realizan en dos minutos en nuestro sistema de agitación. Esto permite realizar las extracciones de forma muy rápida, lo que es un dato que es preciso tener en cuenta en cuanto a las posibles aplicaciones de la DUA.

La separación de fases puede realizarse por simple reposo o, de forma muy rápida, mediante centrifugación

Cuando la solución acuosa de ácido está muy diluida existe el inconveniente de que se forman emulsiones enormemente persistentes. Hemos llegado a comprobar que algunas duran más de tres meses. Sin embargo estas emulsiones pueden romperse fácilmente si se agrega suficiente cantidad de cloruro sódico a la solución acuosa, agitando a continuación.

Los ácidos extraídos mediante soluciones de DUA pueden recuperarse fácilmente. Hemos comprobado que el ácido cítrico y tartárico pueden desplazarse de forma prácticamente cuantitativa de la fase bencénica mediante soluciones acuosas que contengan suficiente exceso de ácido clorhídrico ó hidróxido amónico. En realidad pueden desplazarse con cualquier ácido fuerte o base fuerte, pero elegimos los citados por su volatilidad. Se han recuperado los citados ácidos cristalinos y en perfectas condiciones de pureza.

El estudio del comportamiento de la DUA frente a zumos ha sido también satisfactorio.

El zumo de limón se emplea como fuente de ácido cítrico, aislándose en forma de citrato de calcio, insoluble en caliente en agua. El componente mayoritario es el citado ácido cítrico, aunque le acompañan los ácidos señalados en los antecedentes bibliográficos.

En las extracciones realizadas por nosotros, utilizando como siempre soluciones bencénicas de DUA, se ha conseguido aislar ácido cítrico con un rendimiento del 78% y una pureza del 75%. Este ácido cítrico viene acompañado por otras sustancias de carácter ácido, que no pueden identificarse por cromatografía en papel ni capa fina, pero sí por cromatografía de gas-líquido.

El cítrico decolorado se analizó por cromatografía de gases pudiéndose comprobar que se ha logrado un ácido cítrico del 94% de pureza, al que le acompañan los ácidos: Málico, tartárico, aconítico, quínico, glicólico y pequeñas cantidades de succínico y fumárico. En conjunto no constituyen ni el 1 % del ácido cítrico.

Hay algunos componentes, también en pequeña cantidad, detectados por cromatografía de gases y que no han sido identificados.

Resumen de los resultados del limón:

Rendimiento neto 78,5%

Cítrico obtenido y purificado por decoloración con carbón activo y cristalización, con una pureza en cada caso del 75% y 94%.

Le acompañan los ácidos: Málico, tartárico, glicólico, aconítico, quínico y pequeñas cantidades de succínico y fumárico, así como otros no identificados. Análisis hecho por CG-L

El cítrico también ha sido detectado en cromatografía en papel.

Para realizar el análisis por cromatografía de gases de los ácidos aislados de éste, y sobretodo de otros zumos más complejos, hemos modificado el procedimiento de cromatografía de gases en lo que respecta a sus TMS derivados.

Las columnas de 1,75 mm de diámetro interior se han mostrado muy eficaces. En la parte experimental se encuentran calculados los valores más representativos de estas columnas.

Rellenas con sílica SE-30 al 3 % en Chromosorb W silanizado muestra una porosidad y permeabilidad normal, presentando una enorme eficacia y resolución en las condiciones de trabajo empleadas.

Las rápidas programaciones de temperatura no afectan casi a la línea de base, y mejoran enormemente la eficacia y rapidez de los análisis.

A pesar de utilizar silicona muy apolar, la resolución de patrones ha sido suficientemente buena. En bibliografía consta la separación de 9 de los ácidos empleados, mientras que nosotros hemos podido separar en tan sólo 18 minutos 19 ácidos y en condiciones de hacer un análisis de tipo cuantitativo.

Hemos conseguido construir una columna de tipo normal de relleno que posee, en nuestras condiciones de trabajo, 15.000 platos teóricos en la última zona del cromatograma (15-16 minutos). Debido a la compleja mezcla de ácidos que nos hemos visto obligados a analizar, hay zonas del cromatograma en los que la resolución no resulta completa, Por ello, y ya fuera del presente trabajo, estamos consiguiendo separaciones mucho mejores con otras fases estacionarias, lo que será objeto de nuestra próxima publicación. Con las nuevas fases estacionarias en cuestión, la separación es tal que permitirá realizar cromatografías de gas de tipo preparativo.

Hemos realizado extracciones de los ácidos contenidos en el zumo de uva, analizando previamente el ácido tartárico que contenía.

Se ha hecho una primera extracción de los ácidos libres, intentándose después una extracción de los que están en forma de sales mediante soluciones bencénicas de clorhidrato de DUA.

Se ha conseguido mejores resultados en la extracción de los ácidos libres, pero en las de los combinados sólo se han obtenido sirupos extremadamente impuros.

Los ácidos libres extraídos han sido analizados por diversos procedimientos. El contenido en ácido tartárico ha sido puesto de manifiesto mediante el procedimiento Pasteur, cromatografía en papel, capa fina y cromatografía de gases cualitativa y cuantitativa. Las cromatografías en papel y capa fina determinaron la presencia de tartárico, málico y trazas de cítrico.

El procedimiento Pasteur pone de manifiesto que el tartárico constituye el 63% de la muestra obtenida, al

tiempo que la cromatografía de gases indica que se trata del 60%.

El rendimiento neto de la extracción de ácido tartárico ha sido del 55 % del total analizado, lo que constituye un buen rendimiento parcial. Sin embargo, el intercambio aniónico sólo ha podido recuperar, y muy sucio - pues sólo constituye el 21,5 % de la mezcla, el 10 % del ácido inicialmente presente.

En conjunto, el rendimiento de la operación ha sido del 65,4 % .

Resumimos los resultados para el ácido tartárico del zumo de uva:

Tartarico original 3,6 g

Extraido con DUA 3,14 g (purificado)

Riqueza 63%

Rendimiento 55,5%

Extraido por cambio aniónico 1,72 g

Riqueza 21,5 %

Rendimiento 9,9%

Rendimiento total 65,4 %

Acidos extraidos y que acompañan al tartárico:

En la muestra extraida con DUA, la composición, obtenida por cromatografía de gases, es la siguiente:

Tartárico 60 %  
Málico 18%  
Cítrico 1,5 %

Aconítico 0,2%  
Quínico 0,2%  
Fumárico, succínico y glicólico Trazas

Sacamos como consecuencia que las soluciones benécnicas pueden emplearse con garantía para extraer ácidos de zumos o jugos naturales.

Es preciso tener en cuenta que los rendimientos están calculados sobre muestras ya purificadas. En la parte experimental se detallan los % de pérdidas producidas en algunas purificaciones significativas. Los rendimientos en bruto son casi cuantitativos, pero la DUA además de extraer el ácido en cuestión extrae todas las demás sustancias ácidas que allí existan. La disminución de rendimientos no está en el proceso de extracción, sino en el proceso de purificación. Así por ejemplo, en el caso en que podemos fijarnos más, debido a la mayor seguridad de encontrar el ácido libre, el rendimiento en la extracción del ácido cítrico del zumo del limón es del 78,5%, pero es preciso tener en cuenta que sólo en el proceso de decoloración ya se ha perdido un 18,5%, según puede comprobarse en la parte experimental. Teniendo esto en cuenta podemos asegurar que el rendimiento de la operación es de cerca del 95 %, lo que es un resultado excelente.

Las extracciones realizadas de los ácidos contenidos en la manzana y ciruela tienen un carácter comparativo. En la parte teórica hemos explicado su finalidad, y en la parte experimental la forma de realizarla.

Los resultados son satisfactorios debido a que - hemos podido comprobar que la DUA se comporta tan bien como las resinas sólidas comerciales enciclo acetato e hidroxilo.

En la manzana, los resultados no han podido ser obtenidos mas que por cromatografía de gases, tanto en el aspecto cuantitativo como cualitativo. En cromatografía en papel sólo hemos podido demostrar la presencia de ácido málico, macrocomponente del zumo de manzana.

Por cromatografía de gases hemos identificado y determinado los siguientes ácidos:

Extracción con solución bencénica de DUA.-

PIRUVICO	T
LACTICO	T
GLICOLICO	14 mg
OXALICO	T
MALONICO	22 mg
FUMARICO	8 mg
SUCCINICO	6 mg
MALICO	1200 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	T
ACONITICO	9 mg
CITRICO	9 mg
QUINICO	200 mg
CAFEICO	T

Extracción con DOWEX-1X8 ( $\text{AcO}^-$ )

GLICOLICO	T
MALONICO	15 mg
FUMARICO	34 mg
SUCCINICO	14 mg
MALICO	1035 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	T
ACONITICO	T
CITRICO	4 mg
QUINICO	9 mg

La extracción con DUA ha sido un poco más completa. Los componentes que no aparecen en la DOWEX-1 son mínimos en la extracción con DUA y su falta puede deberse a cualquier pequeño error experimental. La extracción de málico, glicólico y quínico es superior en el caso de la extracción con DUA, sobretodo para el ácido quínico. Sin em-

bargo las extracciones de succínico y fumárico son mejores en el caso de la DOWEX-1 que en el caso de la DUA. Parece darse aquí lo que cabía pronosticar viendo los resultados del estudio físico-químico.

A nuestro entender, al ventaja clara de la extracción con DUA frente a la realizada por resinas sólidas consiste en su facilidad de manejo. La enorme cantidad de litros de aguas de lavado que hay que emplear en el caso de la resina sólida dificultan y alargan enormemente el proceso, pues se gasta mucho tiempo en lavar y concentrar después todas las aguas de lavado. En el caso de la DUA los volúmenes manejados son mínimos, los lavados muy rápidos y todas las operaciones pueden llevarse a cabo en un corto espacio de tiempo. Por otra parte es mucho más fácil regenerar la DUA que cualquier resina, debido sobretodo a la rapidez de los lavados subsiguientes.

Los ácidos extraídos en uno y otro caso coinciden con la bibliografía mencionada en los antecedentes.

La fracción del zumo de manzana ya extraída por la DUA se pasó a través de una resina catiónica en ciclo ácido y se volvió a extraer con solución bencénica de DUA, obteniéndose los siguientes resultados:

PIRUVICO	T
LACTICO	T
GLICOLICO	7 mg
OXALICO	T
MALONICO	13 mg
FENILACETICO	27 mg
SUCCINICO	38 mg
FUMARICO	38 mg
MALICO	2150 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	50 mg
CITRICO	51 mg
QUINICO	134 mg
CAFEICO	130 mg

Estos ácidos, ahora extraídos, no estaban como ácidos libres en la anterior fase de extracción, y al ser liberados por la resina catiónica han podido ser atrapados por la DUA en esta ocasión.

Hemos querido hacer el estudio más completo de comparación con resinas sólidas, y por ello se ha realizado la comparación de la habilidad extractora de soluciones bencénicas de DUA con resina DOWEX-1 X8 en ciclo  $\text{-OH}^-$ .

Comparamos ahora la DUA, amina secundaria, con un hidróxido de amonio cuaternario. Hemos elegido el zumo de ciruela por ser fácilmente asequible, de gran contenido en ácidos suficientemente estudiado y que posee además mucho ácido málico, ácido que se ha tratado en el estudio físicoquímico inicial y en el anterior estudio comparativo de DUA y DOWEX-1 en ciclo  $\text{AcO}^-$ .

Los resultados son ahora también satisfactorios, habiéndose detectado y determinado los ácidos encontrados por otros autores en el fruto en cuestión.

Las muestras obtenidas por extracción han sido cromatografiadas en papel tal y como se detalla en la parte experimental. A pesar de haber utilizado varios líquidos de desarrollo y diferentes visualizadores, tan sólo se puede detectar con claridad el ácido málico. Cual quier otra identificación es extremadamente aventurada.

Por cromatografía de gases puede llevarse a cabo una buena detección y determinación.

Se ha procedido a extraer en primer lugar los ácidos libres contenidos en el zumo de ciruela. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos han resultado satisfactorios, pues se han identificado los ácidos que cita la bibliografía, incluso de forma cuantitativa en la mayoría de ellos.

Los resultados obtenidos mediante análisis por cromatografía de gases han sido los indicados en las tablas de la página siguiente.

## Acidos extraidos con solución bencénica de DUA

LACTICO	T
GLICOLICO	T
OXALICO	T
MALONICO	85 mg
SUCCINICO	50 mg
FENILACETICO	54 mg
FUMARICO	215 mg
MALICO	5077 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	25 mg
CITRICO	T
QUINICO	T
GALICO	180 mg aprox.
CAFEICO	T

Acidos extraidos con resina DOWEX-1 X8 (OH<sup>-</sup>)

LACTICO	T
GLICOLICO	T
OXALICO	T
MALONICO	95 mg
SUCCINICO	55 mg
FENILACETICO	60 mg
FUMARICO	125 mg
MALICO	5012 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	T
CITRICO	T
QUINICO	T
GALICO	120 mg aprox.
CAFEICO	T

Podemos apreciar una gran similitud en los resultados obtenidos por uno y otro procedimiento. Sólo se aprecia una ligera ventaja a favor de la solución de DUA en el caso de los ácidos fumárico y málico.

Si revisamos los resultados obtenidos en el caso de la manzana, podemos también apreciar que las soluciones de DUA resultaban mejores para la extracción del ácido málico, repitiéndose aquí el fenómeno.

En este proceso se hubo de manejar, en el caso de la resina DOWEX-1, volúmenes de soluciones acuosas cercanas a 50 litros, lo que constituye un gran inconveniente. En el caso de la DUA no se llegó a manejar jamás un volumen mayor de 2-3 litros. Esto es una gran ventaja y avala la utilidad de las soluciones de DUA como agentes extractores de ácidos.

Con la DUA hemos extraído un total aproximado de 5686 mg de ácidos libres, mientras que con la resina DOWEX el total de ácidos extraídos de la ciruela ha sido, también aproximado, de 5.467.

Aunque se fraccionaron un poco los ácidos los ácidos obtenidos por ambos procedimientos, como se indica en la parte experimental, para realizar el análisis cuantitativo se creyó más exacto juntar todas las fracciones para eliminar fuentes de error. El total es un sirupo que en el caso de la extracción con DUA pesa 13,76 gramos y en el caso de la resina DOWEX-1 pesa 15,66 gramos. Esto quiere decir que, suponiendo la cantidad de agua en uno y otro sirupo del mismo orden, puesto que se han intentado secar por el mismo procedimiento, la cantidad de impurezas es mayor en la extracción con resina DOWEX-1. Esto tiene su razón de ser debido a que la DOWEX-1 en ciclo  $\text{OH}^-$  es mucho más básica que la solución de DUA, lo que trae como consecuencia el que atrape otras sustancias, como por ejemplo aminoácidos. Sin embargo la DUA no los atrapa, cosa que intentamos demostrar en otro trabajo diferente que está actualmente en prensa.

Las primeras fracciones del zumo pasadas por la resina DOWEX-1 en ciclo  $\text{OH}^-$  tenían, recién pasadas por la columna, un fuerte carácter básico. Esto indica que la DO-

WEX-1 en ciclo  $\text{OH}^-$  es capaz de atrapar ácidos que estén en forma de sales iónicas, normalmente en este caso sódicas ó potásicas.

El paso de los zumos libres de ácidos por resinas catiónicas en ciclo  $\text{H}^+$  nos ha permitido realizar un nuevo proceso de extracción con DOWEX-1( $\text{OH}^-$ ) y solución bencénica de DUA. Los resultados obtenidos son en ambos casos muy similares, lográndose nuevas cantidades de ácido málico y ácidos acompañantes, con ligera ventaja de rendimiento de extracción de málico en el caso de la DUA, cosa que cabía esperar. La ligera ventaja en este caso de la extracción de algunos ácidos por parte de la resina sólida puede explicarse perfectamente si se tiene en cuenta que en esta fracción de zumo quedaba mayor cantidad de estos ácidos sin extraer. De todas formas, esta extracción no tiene el mismo valor comparativo que la primera, por no ser las soluciones iniciales exactamente iguales.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

#### Extracción con DUA

GLICOLICO	25 mg
OXALICO	5 mg
MALONICO	20 mg
SUCCINICO	20 mg
FUMARICO	38 mg
MALICO	2940 mg
α- CETOGLUT.	T
CITRICO	15 mg
QUINICO	250 mg
GALICO	60 mg
CAFEICO	25 mg

Acidos extraidos con DOWEX-1 X8 ciclo  $\text{OH}^-$ :

GLICOLICO	95 mg
OXALICO	T
MALONICO	27 mg
SUCCINICO	43 mg
FUMARICO	42 mg
MALICO	2040 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	T
CITRICO	23 mg
QUINICO	270 mg
GALICO	70 mg
CAFEICO	36 mg

Del alpechín de la aceituna hemos podido aislar ácido cítrico en forma de éster metílico, siendo la primera vez que este ácido se detecta y aísla del citado zumo. El hecho de haberlo aislado en forma de éster metílico no quiere decir que se encuentre como tal en el alpechín, sino que ha sido formado en el proceso de aislamiento mediante alcohol metílico absoluto, catalizado por ácido clorhídrico.

Se aisló el ácido cítrico en el primer proceso que se realizó para estudiar los ácidos del alpechín, consiguiéndose obtener unos 25 gramos de materia extraída seca y 27 gramos de materia siruposa.

El éster aislado parece estar constituido por una mezcla de mono y dimetílico. Para una caracterización se ha metilado totalmente con diazometano, y se ha identificado por comparación con un patrón puro, realizándose puntos de fusión, espectros y cromatografías de gases. Se procedió también a saponificar el éster metílico y formar un TMS derivado, comparándose por cromatografía de gases con TMS derivado de ácido cítrico patrón.

Para eliminar la posibilidad de existencia en el

alpechín de cítrico más o menos metilado se realizó la cro  
matografía de gases de los TMS derivados de la mezcla obten  
nida artificialmente de los ésteres metílicos, no habiéndo  
se podido encontrar compuestos análogos en otras muestras  
de alpechín analizadas posteriormente.

Podemos concluir diciendo que en el alpechín de  
la aceituna se encuentra el ácido cítrico y en forma libre

Los fraccionamientos realizados sobre la primera  
muestra de alpechín estudiada no han dado más resultado in  
mediato que el citado aislamiento de ácido cítrico, obte-  
niéndose sin embargo una serie de fracciones que han sido  
analizadas por cromatografía de gases en forma de ésteres  
metílicos y TMS derivadas.

En la visión conjunta de las mencionadas fraccion  
es puede apreciarse la complejidad del contenido en sus -  
tancias ácidas del alpechín, destacando como componente ma  
yoritario el ácido cítrico.

FRACCION VIII-3-3-2

Peso fracción 500 mg

CITRICO	365 mg
GLICOLICO	T
OXALICO	7 mg
FUMARICO	3 mg
GALICO	15 mg
CAFEICO	T

FRACCION VIII-3-4-1

Peso fracción 500 mg

GLICOLICO	3 mg
OXALICO	3 mg
FUMARICO	T
MALICO	T
CITRICO	28 mg

## FRACCION VIII-2-2

Peso de la fracción 3,70 g

OXALICO	T
MALONICO	440 mg
BENZOICO	145 mg
FUMARICO	20 mg
SUCCINICO	T
MALICO	190 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	190 mg
CITRICO	190 mg
QUINICO	590 mg

## FRACCION VIII-3-3

Peso fracción 29,44 g

PIRUVICO	T
GLICOLICO	60 mg
LACTICO	T
MALONICO	T
SUCCINICO	70 mg
FUMARICO	35 mg
MALICO	1000 mg
CITRICO	3800 mg
QUINICO	540 mg
GALICO	390 mg

## FRACCION VIII-3-1

Peso fracción 800 mg

SUCCINICO	20 mg
MALICO	50 mg
CITRICO	730 mg

FRACCION VIII-3-4-2

Peso fracción 8,7 g

	T
PIRUVICO	
GLICOLICO	29 mg
LACTICO	200 mg
OXALICO	60 mg
MALONICO	60 mg
FUMARICO	225 mg
SUCCINICO	25 mg
MALICO	280 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	110 mg
TARTARICO	38 mg
CITRICO	800 mg
QUINICO	430 mg
GALICO	140 mg

FRACCION VIII-2-3

Peso fracción 500 mg

GLICOLICO	2 mg
OXALICO	2 mg
MALONICO	2 mg
SUCCINICO	2 mg
FUMARICO	6 mg
MALICO	8 mg
CITRICO	6 mg
QUINICO	8 mg

## FRACCION IX-1

Peso fracción 1,2 g

GLICOLICO	10	mg
LACTICO	9	mg
MALONICO	5	mg
FUMARICO	2	mg
SUCCINICO	3	mg
MALICO	4	mg
ACONITICO	38	mg
CITRICO	63	mg
QUINICO	28	mg
GALICO	26	mg

## FRACCION IX-3

Peso fracción 2,9 g

PIRUVICO	T	
LACTICO	25	mg
GLICOLICO	8	mg
OXALICO	22	mg
MALONICO	15	mg
FUMARICO	16	mg
SUCCINICO	9	mg
MALICO	46	mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	35	mg
ACONITICO	250	mg
CITRICO	215	mg
QUINICO	85	mg
GALICO	110	mg
TARTARICO	16	mg

## FRACCION VIII-3-3-1

Peso fracción 200 mg

GLICOLICO	2 mg
FUMARICO	1 mg
MALICO	3 mg
$\alpha$ -CETOGLUTAR.	6 mg
CITRICO	185 mg

La cantidad total de compuestos extraídos, en la primera extracción ha sido alrededor de 55 g

Los fraccionamientos, realizados siempre en frío para evitar posibles alteraciones, no logran buenas separaciones, aunque han servido para lograr el aislamiento del ácido cítrico.

Repasando los cuadros anteriores se puede apreciar la gran cantidad de ácidos detectados y la cantidad en que se hayan presentes en cada una de las fracciones.

El ácido cítrico se encuentra fundamentalmente en la VIII-3-1, R<sup>2</sup>-2, VIII-3-3-1, VIII-2-2 y VIII-3-3 aunque muy impuro en esta última.

Realizando el recuento del ácido cítrico presente en las anteriores fracciones, nos encontramos con que hemos extraído casi 6 gramos en este primer proceso, así como 1,5 gramos de ácido málico, 1,7 g de ácido quínico, 650 mg de ácido gálico, 500 mg de ácido malónico, 300 mg de ácido fumarico, 100 mg de ácido succínico, 200 mg de lactico, y 300 mg de ácido aconítico y cantidades menores de pirúvico, glicólico, oxalico,  $\alpha$ -cetoglutárico, benzoico, fenilacético, tartárico y cafeico.

En los cromatogramas puede comprobarse la complejidad de las muestras, existiendo una serie de ácidos de los que no puede afirmarse su presencia, pero que están siendo objeto de un estudio de próxima publicación. Podemos citar entre otros ácido citramálico, glicérico, citracónico, isocítrico, salicílico, abscísico, siríngico y otros más, sobre todo ácidos fenólicos en abundancia.

Con la DUA recuperada de este primer proceso se repitió la extracción sobre el mismo alpechín, con los resultados siguientes:

GLICOLICO+LACTICO	125 mg aprox.
OXALICO	26 mg
MALONICO	29 mg
BENZOICO	25 mg
SUCCINICO	78 mg
FUMARICO	35 mg
MALICO	700 mg
$\alpha$ -CETOGLUT.	10 mg
CITRICO	3550mg
QUINICO	220 mg
CAFEICO	T

Podemos ver de nuevo que el componente mayoritario es el ácido cítrico, seguido de málico, quínico y otros

Como en anteriores ocasiones, la columna cromatográfica es incapaz de separar la totalidad de la muestra inyectada.

Los análisis realizados del alpechín de la aceituna en la campaña de 1971 han dado resultados similares. En este caso el alpechín fue despectinizado y pasado por resina DOWEX-50 X8 ( $H^+$ ).

Los resultados obtenidos vienen tabulados en la página siguiente.

OXALICO	T	
MALONICO	88	mg/litro
FENILACETICO	28	"
SUCCINICO	128	"
FUMARICO	132	"
MALICO	1480	"
$\alpha$ -CETOGLUT.	T	"
TARTARICO	T	"
ACONITICO	T	"
CITRICO	3440	"
QUINICO	80	"
GALICO	56	"
MUCICO	T	"
CAFEICO	T	"

En este caso ya hemos podido realizar la consignación de concentración real de los ácidos en el alpechín, esto es, mg/litro directamente.

Puede apreciarse una buena concordancia, aunque es preciso tener en cuenta que se trata de muestras diferentes de alpechín.

En esta muestra, el componente mayoritario es el ácido cítrico (3,5 g/l), seguido del ácido málico (1,5 g/l) y fumárico, estando los demás en mucha menor cantidad.

El micrométodo desarrollado por nosotros para el análisis rápido de ácidos de soluciones de soluciones acuosas ó zumos, ha contribuido a agilizar el análisis de los mismos.

Hemos comprobado que posee las siguientes ventajas:

- Se lleva a cabo a temperatura ambiente
- Es muy rápido
- No hay trasvases
- Puede realizarse reextracción ácida ó básica
- Puede secarse por liofilización

El paso más lento es común a todos los métodos utilizados, y consiste en el secado de la muestra, dependiendo simplemente de los medios técnicos con que se cuente en el laboratorio.

La prueba global de la bondad del método consiste en que hemos podido comprobar que las pérdidas de acidez a lo largo de todo el proceso no han sido nunca mayores del 5%, incluyendo en esto la valoración de las pectinas despreciadas, mientras que los macrométodos daban pérdidas del 10-15%.

La bondad de la formación de TMS derivados para estas sustancias está comprobada por otros autores, así que el conjunto del análisis es de garantía.

Por este procedimiento hemos obtenido los siguientes resultados para una muestra de alpechín de la campaña 1971, realizándose el análisis según está descrito en la parte experimental:

OXALICO	T
MALONICO	13 mg/l
SUCCINICO	275 mg/l
FUMARICO	90 mg/l
MALICO	510 mg/l
$\alpha$ -CETOGLUT.	T
ACONITICO	60 mg/l
CITRICO	3700mg/l
QUINICO	1140mg/l
GALICO	T
MUCICO	T
CAFEICO	50 mg/l

En esta otra muestra de alpechín podemos observar la preponderancia del ácido cítrico, málico, gálico y succínico.

La gran cantidad de ácido quínico puede ser debida a una mejor formación de derivado (cuando se realiza una

reextracción básica se parte de sales amónicas para formar los TMS derivados, lo que es importante en el caso de compuestos fenólicos), o bien a que el alpechín lo contenga - en mayor cantidad. Podemos apreciar asimismo un disminución del ácido málico. Se está realizando un estudio de la variación de estos ácidos a lo largo de la campaña de producción de aceite ( y del alpechín). Si hay cambios significativos nos indicaría que estos cambios ocurren en el período de postmaduración de la aceituna.

El ácido cítrico está bioquímicamente relacionado con la formación de los ácidos grasos, pero su presencia en la cantidad en que lo hemos encontrado indica que no se trata de un producto intermedio del metabolismo, sino que constituye un producto de almacenamiento en el fruto.

Dada la producción anual del alpechín en España, podemos calcular aproximadamente que se desperdician 3.500 -4000 Tm de ácido cítrico por año, lo que puede constituir una fuente de riqueza complementaria a la producción de aceite de oliva.

Nosotros hemos intentado aislarlo por los procedimientos clásicos de precipitación de sales cálcicas, sin haber podido lograrlo de momento, aunque seguiremos intentando encontrar el método de aislamiento económico.

Nuestro objetivo de formación de sales cálcicas se debe a que en las mismas fábricas de aceite se podía - realizar la reacción, enviando el bruto de sales cálcicas a fábricas ya especializadas, de forma similar a como se hace normalmente con los limones en muchos sitios del Levante español y en otros países mediterráneos.

Se han realizado pruebas en las que parece ser - que se podrá poner de manifiesto el ácido absísico en los restos acuosos de la aceituna, lo que está siendo objeto - de un estudio, dada la trascendencia que todo lo relaciona do con la caída del citado fruto posee.

Hemos continuado investigando sobre columnas y - rellenos que nos ofrezcan mejor separación de los componentes del alpechín. La separación se ha mejorado notablemen-

te, por lo que se va a proceder a la cromatografía de gases preparativa de los macro y microcomponentes del citado zumo, constituyendo una próxima publicación.

CONCLUSIONES.-

1.- Se estudia la extracción de los ácidos hidrosolubles ( succínico, málico, tartárico y cítrico) de sus soluciones acuosas mediante solución bencénica de Di-Undecil-Amina (DUA).

2.- El proceso de estas extracciones liquido - liquido se lleva a cabo en diferentes condiciones experimentales y a partir de soluciones sintéticas de los citados ácidos de concentraciones variables.

3.-Para todas las demás variables iguales, la extracción del ácido cítrico es tanto mas efectiva cuanto mayor es la concentración inicial de la solución cítrica.

4.- Para relaciones acido/DUA (b) menores de 1, la extracción de cítrico es siempre mayor del 95% en un proceso simple.

5.- Para relaciones (b) menores de 0,5 la extracción es practicamente cuantitativa.

6.- La isoterma de reparto del cítrico muestra una gran horizontalidad en la zona de  $(Ac)_a V_a \times 10^3 > 2$  y un tramo muy vertical en la zona  $< 0,1$  como es necesario para una adecuada efectividad del proceso de extracción .

7.- Operando a valores de b mayores de 1 se observa una sobrecarga de la amina, es decir que cada molecula de esta extrae mas de una de acido. Esta sobrecarga se acerca asintóticamente al valor del 40% sobre la relación 1:1.

8.- La extracción del ácido tartárico se observa análoga a la del cítrico en la primera zona hasta valores de la del orden de 0,5 pero para valores superiores disminuye rapidamente la efectividad de la extracción . Para valores inferiores a 0,5 la extracción es mayor del 97%.

9.- En el ácido tartárico no se observa el fenómeno de sobrecarga.

10.- La inflexión de la isoterma de reparto en el caso del tartárico es mucho más aguda que en la del cítrico, lo que muestra una mayor efectividad de la DUA para la extracción en un solo estadio.

11.- El ácido málico produce efecto de sobrecarga, como el cítrico, pero la efectividad de la extracción decae más rápidamente al disminuir la concentración inicial del ácido en la fase acuosa. Las curvas del cítrico y del málico se asemejan mucho en los tramos iniciales y finales.

12.- El ácido succínico es el que presenta mayores diferencias y menor pendiente de la gráfica.

13.- En la serie : Tartárico, málico, succínico— al disminuir el número de hidróxilos aparece menor pendiente de la primera zona de la isoterma con los valores de  $(A_c)_o V_o / (A_c)_a V_a$  82; 18 y 6 respectivamente. El cítrico dió el valor 44.

14.- Se ha estudiado la reextracción (Striping) y recuperación de los ácidos a partir de sus soluciones bencénicas de extracción con DUA. Se puede realizar este striping mediante soluciones de HCl. o de  $NH_4OH$ . Por evaporación de las nuevas soluciones acuosas se pueden recuperar los ácidos cristalinos o sus sales

15.- En la extracción del zumo de limón con solución bencénica de DUA y reextracción con HCl se obtuvo un ácido cítrico sólido crudo de un 75% de pureza. Después de decoloración y cristalización dió 94% de pureza.— Entre las impurezas que restan se identificaron los ácidos málico, tartárico, aconítico, quínico, glucólico y pequeñas cantidades de succínico y fumárico junto a otros componentes detectados por cromatografía de gases que no nos hemos detenido a investigar.

16.- Aunque hemos conseguido una columna cromatográfica de más de 15.000 platos teóricos no se han podido resolver totalmente las mezclas extraídas de los zumos naturales.

17.- Se han extraído con solución bencénica de DUA los ácidos libres del zumo de uva. Entre estos se encontraron los ácidos tartárico, málico y cítrico.

18.- Por una segunda extracción o intercambio iónico mediante solución bencénica de clorhidrato de DUA se separa una mezcla compleja de ácidos ligados en los que el tartárico se encuentra sólo en un 2.4%.

19.- Se han estudiado comparativamente la extracción de zumo de manzana mediante soluciones de DUA o mediante resina DOWEX-1x8 ( $\text{AcO}^-$ ). El primer reactivo extrajo mejor los ácidos málico, glicólico y quínico, mientras el segundo fue más efectivo para el succínico y el fumárico.

20.- También en la manzana se aislaron después los ácidos ligados. En este caso por pasada del zumo a través de una columna de resina catiónica. En este segundo extracto se identificaron los mismos ácidos que en la fracción de los ácidos libres salvo el aconítico y junto a estos se identificó el fenilacético.

21.- El zumo de ciruela se extrajo comparativamente con soluciones de DUA y con resina DOWEX 1x8 ( $\text{OH}^-$ ). La mínima diferencia observada a favor de la DUA fueron rendimientos ligeramente superiores en fumárico, málico,  $\alpha$ -cetoglutarico y gálico.

22.- Probablemente la mayor ventaja de la DUA fue el ahorro de emplear grandes volúmenes de soluciones acuosas.

23.- Hemos comenzado el estudio de las sustancias ácidas del alpechin de la aceituna, utilizando extracciones con soluciones bencénicas de DUA de diversas muestras de alpechin de dos cosechas sucesivas.

24.- Se ha logrado aislar e identificar por primera vez ácido cítrico del alpechin de la aceituna.

25.- El análisis, mediante CGL, de las mezclas de ácidos obtenidas por extracción con soluciones de DUA nos permite identificar y determinar hasta 16 ácidos diferentes en el alpechín de la aceituna, aunque existe un gran número de compuestos ácidos todavía sin identificar. Se detectan y determinan por primera vez, además del cítrico, los ácidos: Fenilacético, succínico,  $\alpha$ -cetoglutarico, aconítico, quínico, gálico, glicólico, mícico y cafeico. Se confirma, realizando por primera vez su estudio cuantitativo, la existencia de tartárico, malónico, fumárico, málico y láctico.

26.- Hemos podido comprobar, en las muestras por nosotros estudiadas, la ausencia de ácido tricarbálico en cantidades detectables.

27.- Se ha desarrollado un método de análisis cuantitativo de 19 ácidos mediante TMS derivados, realizándose el estudio previo de construcción de columna, determinación de parámetros y condiciones operativas al objeto de obtener óptimos resultados. Para obtener resultados realmente cuantitativos hemos calibrado el detector para todos y cada uno de los patrones empleados, utilizando además el procedimiento del patrón interno.

28.- Hemos desarrollado igualmente un micrométodo que permite el análisis cuantitativo rápido de hasta 19 ácidos diferentes de forma simultánea y a temperatura ambiente, combinando extracciones a pequeña escala con soluciones bencénicas de DUA, reextracciones ácidas ó básicas y análisis por CGL de sus TMS derivados. Los volúmenes totales manejados de forma simultánea son siempre inferiores a 5 ml y la sensibilidad del método es la que lleva consigo la CGL con detectores de ionización de llama. Los errores nunca son mayores del 5%, siempre por defecto en lo que respecta a la fase de extracción.

29.- A través de nuestros estudios del alpechín puede apreciarse la conveniencia de proseguir las investigaciones para aislar e identificar espectroscópicamente la gran cantidad de compuestos de carácter ácido que el alpechín posee, entre los que se pueden encontrar las posibles auxinas causantes del desprendimiento de la aceituna.

30.- Estimamos que desperdician anualmente en España de 3.500 a 4.000 Tm de ácido cítrico del alpechín de la aceituna, por lo que señalamos la conveniencia de proseguir las investigaciones para encontrar un método económico de aislamiento del citado ácido cítrico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- LOPEZ APARICIO, F.J., LOPEZ TORRECILLA, M<sup>a</sup>. J.  
MATO VAZQUEZ, F. y SANTOS LOPEZ, J.

Société Europeenne de L'Energie Atomique  
C.R. du Coll. de Extraction par solvant (Oct. 1959)

- 2.- LOPEZ APARICIO, F.J. y SAENZ LOPEZ, A.  
Tesis Doctoral. Univ. Valladolid 1965
- 3.- FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A.  
Grasas y aceites 10(1) 30 (1959)
- 4.- ADAMS, B.A. y HOLMES, E.E.  
J.S.C.I. 1935, 54, I
- 5.- SMITH, E.L. y PAGE, J.E.  
J.S.C.I. 1948, 67 pag 48
- 6.- MOORE, F.L.  
Anal. Chem. 29, 1660 (1957)
- 7.- MOORE, F.L.  
Oak Ridge Natl. Lab. Oak Ridge, Tenn. U.S. Atom. Energy  
Comm. NAS- NS - 3101, 83 pp. (1960)
- 8.- WERT, J.L., BROWN, G.M. y DRANOFF, J.S.  
Am. Inst. Chem. Engrs. J. 9(6), 857-860 (1963)
- 9.- SUDARIKOV, B.N., FROLOV, Yu. G., PUSHKOV, A.A., LISITSYN,  
V.N. e ILISCHEV, V.A.  
Tr. Mosk. Khim.- Teknol. Inst. 1963 (43), 9-11.
- 10.- PUSHKOV, A.A., SUMIDT, V.S. y SHESTERIKOV, V.N.  
Tr. Mosk. Khim.- Teknol. Inst. 43, 12-15 (1963)
- 11.- FROLOV, Yu. G.  
Tr. Mosk. Khim.- Teknol. Inst. 43, 5-8 (1963)  
  
Zh. Neorgan. Khim. 7, 1486 (1962)
- 12.- FROLOV, Yu. G. y SERGIESUSKII, U.V.  
Zh. Neorgan. Khim. 10(3), 697-702 (1965)
- 13.- ZUYAGIUTSEV, O.E., FROLOV, Yu, PUSHKOV, A.R. y DUSCK, B.  
Zh. Neorgan. Khim. 10(2), 512-517 (1965)
- 14.- FROLOV, Yu. y SERGIEVSKII, U.V.  
Tr. Mosk. Khim.- Teknol. Inst. 51, 116-123 (1966)

- 15.- BRUSSET, H., HAMELIN, R. y MATUTANO, L.  
Comptes Rendues 261(8), 1979(1965)
- 16.- YAKUSHKIN, M.I., ZHELEZNYA, A.S., IVANOVA, T.V.  
205,006 (Cl. CO 7c), 13 Nov. 1967, Appl. 13 Enero 1965  
de IZOBRET; Prom. Obraztsy, Tovaruye Znakii 1967, 44(23)19
- 17.- FUKUTOMI, H.  
Kobunshi 1968, 17(199), 943-53
- 18.- MIROSLAV, Mrka., CELEDA, J.  
(Vys. Sik. Chem. Technol., Praga)  
Chem. Prmn. 1969, 19(11), 489-95
- 19.- RICCI, P.F., SEBASTIANINI, E., VARIALI, G.  
Anal. Chim. (Roma) 60(2) 116-31 (1970)
- 20.- GIGANOV, G.P., TSEREKOV, A.M., PRIKHODK, R.I.  
Zh. Neorg. Kh. 17, 195 (1972)
- 21.- MATTOX, V.R., LITWILLE, R.D. y GOODRICH, J.E.  
Biochem. J. 126, 545 (1972)
- 22.- HORTVET, J.  
J. Amer. Chem. Soc. 26, 1523-1545 (1904)
- 23.- WINTON, R.L.  
J. Amer. Chem. Soc. 28, 1204-1206 (1906)
- 24.- ROSS, S. H.  
Circ. 53, Bureau of Chemistry US. DA (1910) y Proc.  
A.O.A.C. Bull. 132, Bureau of Chemistry. USDA (1910).
- 25.- YODER, P.A.  
J. Ind. Eng. Chem. 3, 604-646 (1911)
- 26.- NELSON, E.K.  
J. Amer. Chem. Soc. 46, 2506 (1924)
- 27.- HARTMANN, B.G. y HILLIG, F.  
J.A.O.A.C. 13, 99-112 (1930)
- 28.- HILLIG, F.  
J.A.O.A.C. 20, 130-140 (1937)

- 29.- STAUDINGER, H.  
Introducción al análisis orgánico cualitativo.  
Ed. Labor S.A. 1935
- 30.- ISHERWOOD, F.A.  
Biochem. J. 40: 688(1946)
- 31.- LONG, A.G., QUAYLE, J.R. y STEDMAN, R.J.  
J. Chem. Soc. 2197 (1951)
- 32.- BRYANT, F. y OVERELL, B.T.  
Nature 167, 361 (1951)  
MENSEN DA SILVA  
Anal. Chem. 43, 1031 (1971)
- 33.- BUCH, M.L., DRYDEN, E.C. y HILLS, C.H.  
Agric. Food Chem. 3(1) 960 (1955)
- 34.- BOVE, J. y RAVEUX, R.  
Bull. Soc. Chim. France 376 (1957)
- 35.- HULME, A.C. y WOOLVERTON, L.S.C.  
J. Sci. Food Agric. 3, 150 (1958)
- 36.- ROUX, L. y LESAIN, C.  
Ann. Physiol. vég. 1, 83 (1959)
- 37.- WHITTIG, G.C. y COGGINS, R.A.  
J. Sci. Food Agric. 11, 337 (1960)
- 38.- ROSAN, R.C. y WIELAND, M. I.  
Anal. Biochem. 6, 125 (1963)
- 39.- SLOWALL, J.  
Biomedical Applications of Gas- Chromatography  
(Szymanski, H.A. ed.) p. 159 Plenum Presse, New York 1964
- 40.- COURTOISIER, J. y RIBERAU-GAYON, A.J.  
Bull. Soc. Chim. France 350 (1963)
- 41.- HARLOW y MORMAN  
Anal. Chem. 36, 2483-2492 (1964)
- 42.- MAZLIAK, P. y SALSAC, L.  
Phytochemistry 4, 693-703 (1965)

- 43.- GEE, M.  
Anal. Chem. 37, 926 (1965)
- 44.- BRUNELLE, R.L., SCHOENEMAN, R.L. y MARTIN, G.E.  
J.A.O.A.C. 50, 329 (1967)
- 45.- ZERFING, R.C. y VEENING, H.  
Anal. Chem. 38, 1312 (1966)
- 46.- LEE, K.S., y SAMUELSON, O.  
Anal. Chim. Acta 44, 217 (1969)
- 47.- KUKSIS, A. y PRIORESCHI, P.  
Anal. Biochem. 19, 468 (1967)
- 48.- KOLLAS, D.A.  
Nature, 204, 758 (1964)
- 49.- LI, K.C. y WOODROF, J.G.  
J. Agric. Food Chem. 16, 543 (1968)
- 50.- FITELSON, J. y BOWDEN, G.L.  
J.A.O.A.C. 51, 1224 (1968)
- 51.- FITELSON, J.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 52, 646 (1969)
- 52.- JOHNSON, A.R., FERNANDEZ-FLORES, E.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 52, 559 (1969)
- 53.- ZAURA, D.S. y METCOFF, J.  
Anal. Chem. 41, 1871 (1969)
- 54.- BENGTTSSON, L. y SAMUELSON, O.  
Anal. Chim. Acta 44, 217 (1969)
- 55.- SALMINEN y KOIVISTONEN  
Anal. Abs.
- 56.- FERNANDEZ-FLORES, E., KLINE, D.A. y JOHNSON, A.R.  
J.A.O.A.C. 55, 17 (1970)
- 57.- MORARD, P. y BOURRIER, E.  
Chim. Anal. 53(5) 315 (1971)

- 58.- JANSEN, L. y SAMUELSON, O.  
J. of Chromat. 57, 353(1971)
- 59.- HULME, A.C.  
J. Expl. Botany (London) 2, 298-315 (1951)
- 60.- HULME, A.C.  
Rapps. et communs. 8 (11/12) 394-8(1954)
- 61.- TANNER, H. y ENTSCHER, H.R.  
Mitt. Lebensm. Hyg. 45, 305-311 (1954)
- 62.- L UCKWILL, L.C.  
J Hort. Sci. 22, 18-33(1957)
- 63.- BUCHLON, G. y HANE, M.  
Gauterbanwissenschaft 23, 507-11 (1958)
- 64.- WUCHERPFFENNING, K. y BRETTHAUER, G.  
Pent. Lebesm.- Rundschau 58, 190-2 (1962)
- 65.- VEITCH, F.P. y BRIERLEY, G.P.  
Biochem. Biophys. Acta 58, 467-73 (1962)
- 66.- MAZLIAK, P.  
Chromatogr. Methods Immd. Sep.,  
Proc. Meet. 1, 101-106 (1965)
- 67.- KODESNIK, A.A. y AUDEEVA, L.I.  
Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 3(6) 693-8 (1967)
- 68.- HAMMET, L.K. y INGLE, M.  
Proc. West Va. Acad. Sci. 39, 201-7 (1967)
- 69.- JARCZYK.  
WARSZAWIL Technol. Rolno- Spozyn. 5, 21-38 (1968)
- 70.- FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A.  
Grasas y aceites 10(1) 30-35 (1959)
- 71.- FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A.  
Grasas y aceites 4, 63-67 (1953)
- 72.- MARVEL, C.S. y RANDS, R.D. Jr.  
J. Am. Chem. Soc. 72, 2642 (1950)

- 73.- FROHMAN, C.E. ORTEN, J. M. y SMITH, A.H.  
J. Biol. Chem. 193, 277 (1951)
- 74.- DONALDSON, K.O., TULANE, V.S. y MARSHALL, L.M.  
Anal. Chem. 24, 185 (1952)
- 75.- MARSHALL, L.M., DONALDSON, K.O. y FRIEBERG, F.  
Anal. Chem. 24, 773 (1952)
- 76.- SHKOL'NIK, R.Ya.  
C.A. 49, 3321h (1955)
- 77.- HULME, A.C.  
Biochem. Biophys. Acta 14, 36 (1954)
- 78.- HULME, A.C.  
Biochem. Biophys. Acta 14, 44 (1954)
- 79.- HULME, A.C. y RICHARDSON, A.  
J. Sci. Food Agr. 5, 221 (1954)
- 80.- PHARES, E.F., MOSBACH, E.H. y DENISON, F.W. Jr.  
Anal. Chem. 24, 660 (1952)
- 81.- BULEN, W.A., VARNER, J.E., BURRELL, R.C.  
Anal. Chem. 24, 187 (1952)
- 82.- KINNORY, D.S., TAKEDA, I. y GREENBERG, D.M.  
J. Biol. Chem. 212, 379 (1955)
- 83.- SCOTT, R.W.  
Anal. Chem. 27, 367 (1955)
- 84.- RESNIK, F.E., LEE, L.A. y POWELL, W.A.  
Anal. Chem. 27, 928 (1955)
- 85.- DREW, F.D., MARSHALL, L.M. y FRIEDBERG, F.  
J. Amer. Chem. Soc. 74, 1852 (1952)
- 86.- LUGG, J.W.H. y OVERELL, B.T.  
Nature 160, 87 (1947)
- 87.- LUGG, J.W.H. y OVERELL, B.T.  
Australian J. Sci. Res. 1, 98 (1948)

- 88.- CHEFTEL, R.I., MUNIER, R. y MACHEBEDUF, M.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 840 (1951)
- 89.- STARK, J.B., GOODBAN, A.E. y OWENS, H.S.  
Anal. Chem. 23, 413 (1951)
- 90.- OPIENSKA-BLAUT, J., MADECKA-BORKOWSKA, I. y BURKOWSKI, T.  
Nature, 169, 798 (1952)
- 91.- NORRIS, F.C. y CAMPBELL, J.J.R.  
Can. J. Res. 27 C, 253 (1949)
- 92.- BRYANT, F. y OVERELL, B.T.  
Biochim. Biophys. Acta 10, 471 (1953)
- 93.- BUCH, M.L., MONTGOMERY, R. y PORTER, V.L.  
Anal. Chem. 24, 489 (1952)
- 94.- KATZ, A. y CHAIKOFF, I.L.  
J. Amer. Chem. Soc. 77, 2659 (1955)
- 95.- CHEFTEL, R.I., MUNIER, R. y MACHEBOEUF, M.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1091 (1953)
- 96.- ISHERWOOD, F.A., CHEN, Y.T. y MAPSON, L.W.  
Biochem. J. 56, 17 (1954)
- 97.- OVERELL, B.T.  
Australian J. Sci. 15, 28 (1952/53)
- 98.- CHEFTEL, R.I., MUNIER, R. y MACHEBOEUF, M.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 380 (1952)
- 99.- CHEFTEL, R.I., MUNIER, R. y MACHEBOEUF, M.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1085 (1953)
- 100.- ISHERWOOD, F.A. y HANES, C.S.  
Biochem. J. 55, 824 (1953)
- 101.- AIRAN, J.W., JOSHI, G.V., BARNABAS, J. y MASTER, R.W.P.  
Anal. Chem. 25, 659 (1953)
- 102.- GIRI, K.V., KRISNA MURTHY, D.V. NARASIMBARAO, P.L.  
J. Ind. Inst. Sci., Sect. A 35, 93 (1953)

- 103.- SCOTT, J.E.  
Anal. Chem. 27, 367 (1955)
- 104.- ANET, E.F.L. y REYNOLDS, T.M.  
Australian J. Chem. 8, 267 (1955)
- 105.- BRAUN, D. y GEEWEN, H.  
J. Chromatog. 7, 56 (1962)
- 106.- PETROWITZ, y PATUSKA  
J. Chromatog. 7, 128 (1962)
- 107.- KNAPPE, E. y PETERI, D.  
Z. anal. chem. 188, 184 y 352 (1962)
- 108.- PREY, U., BERBALK, H. y KAUSZ, M.  
Mikrochim. Acta 44, 2193 (1961)
- 109.- KUNIN, R. y MYERS, R.J.  
J. Amer. Chem. Soc. 1947, 69 (2874)
- 110.- BRYANT, F. y OVERELL, B.T.  
Nature, 1951, 167, 361
- 111.- HULME, A.C. y SWAIN, T.  
Nature, 1951, 168, 254
- 112.- R. NORMAN y col.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1641.
- 113.- R. NORMAN y col.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 1641
- 114.- BUSCH, H., HULBERT, R.B. y POTTER, V.R.  
J. Biol. Chem. 1952, 196, 717.
- 115.- OWENS, H.S., GOODBAS, A.E. y STARK, J.B.  
Anal. Chem. 1953, 25, 1507.
- 116.- SCHENKER, H.H. y RIEMANN III, W.  
Anal. Chem. 1953, 25, 1637.
- 117.- BERNTSSON, S. y SAMUELSON, O.  
Acta Chem Scand. 1955, 9, 277.

- 118.- ACKMAN, R.G., BANNERMAN, H.A., VANDENHEUVEL, F.A.  
Anal. Chem. 32, 1209 (1960)
- 119.- ESPOSITO, G.G. y SWANN, M.H.  
Anal. Chem. 34, 1048 (1962)
- 120.- LUKE, H.H., FREEMAN, T.E. y KIER, L.B.  
Anal. Chem. 35, 1916 (1963)
- 121.- GEE, M.  
Anal. Chem. 37, 926 (1965)
- 122.- McKEDOWN, G.G. y READ, S.I.  
Anal. Chem. 37, 1780 (1965)
- 123.- SWEELEY, C.C., BENTLEY, R., MAKITA, M. y WELLS, W.W.  
J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497(1963)
- 124.- HORII, Z., MAKITA, M. y TAMURA, Y.  
Chem. Ind. 34, 1494(1965)
- 125.- ESTES, F.L. y BACHMANN, R.C.  
Anal. Chem. 38, 1178 (1966)
- 126.- SIMMONDS, P.G., PETTITT, B.C. y ZLATKIS, A.  
Anal. Chem. 39, 163 (1967)
- 127.- HAUTALA, E.  
J.A.O.A.C. 49, 619 (1966)
- 128.- HAUTALA, EARL  
J.A.O.A.C. 50, 287 (1967)
- 129.- WILSON, J.L., DUNLAP, W.J. y WENDER, S.H.  
J. Chromatog. 35, 329 (1968)
- 130.- DALLOS, F.C. y KOPPL, K.G.  
J. Chromatog. Sci. 7, 565 (1969)
- 131.- ATKINS, C.A. y CANVIN, D.T.  
Can. J. Biochem. 49, 949 (1971)
- 132.- EHRSSON, H.  
Acta Pharm. Suecica 8, 113 (1971)

- 133.- METCALFE, L.D. y SCHMITZ, A.A.  
Anal. Chem. 33, 363 (1971)
- 134.- RUMSEY, T.S., NOLLER, C.H., RHYKERD, C.L. y BURNS, J.C.  
J. Dairy Sci 50, 214 (1967)
- 135.- ROSENQUI, H., KALLIO, H. y NURMIKO, V.  
Analyt. Bioc. 46, 224 (1972)
- 136.- WOLF, R.E.  
Chim. Ind. M. 53, 866 (1971)
- 137.- BATT, R.D. y ROBERTSON, J.G.  
Bioc. Biop. A. 239, 368 (1971)
- 138.- IWOVE, M. y ISHII, D.  
Kog. Kag Zas 74, 2045 (1971)
- 139.- Uno, T., NAKAGAWA, T. y MATSUMUT, M.  
Jap. Analyst. 20, 1245 (1971)
- 140.- BAILEY, J.J.  
Anal. Chem. 39, 1485 (1967)
- 141.- MIROCHA, C.J. y DeVAY, J.E.  
Phytopathology 51, 274 (1961)
- 142.- GEHRKE, C.W., ZUMWALT, R.W. y KENNETH, K.  
J. Agr. Food Chem. 19, 605 (1971)
- 143.- IUPAC. Boletín de información Nº 15. Febrero de 1972.
- 144.- JAMES, A.T. y MARTIN, A.J.P.  
Biochem. J. 50, 679 (1952)  
J. Chromatog. 2, D-33 (1959)
- 145.- GASCO, L.  
Cromatografía en fase gaseosa.  
pág. 123, Ed. J.E.N. Madrid 1969
- 146.- Variant Aerograph. Instrument and accesories.  
March 1971. USA

- 147.- Técnicas modernas aplicadas al análisis de vinos.  
Antonino Godet y Mur  
Ed. DOSSAT S.A. 1964, pag 155
- 148.- ARNDT, F.  
Organic Syntheses C.V. 2 (1948)  
Wiley, New York pag 461
- 149.- ARNDT, F.  
Organic Syntheses C.V. 2 (1948)  
Wiley, New York pag 165

### DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
la fecha, constituido por:

- D. Fidel Jorge López Aparicio  
D. Jesús Sáenz de Buruaga Sánchez  
D. Francisco García González  
D. Antonio González González  
D. Manuel Gómez Guillén

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
Andrés García-Granados López de Hierro  
se acordó por unanimidad otorgar la califica-  
ción de Sobresaliente "cum laude"  
y para que conste, se extiende firmada por los  
componentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

Granada, a 9 de Diciembre de 1972

El Secretario,

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



Biblioteca Universitaria de Granada



01052346