

8. G. B. MARINI-BETTÒLO. — Metodi e nuovi orientamenti della cromatografia. (*)

Riassunto. — L'A., dopo avere sottolineata l'importanza della cromatografia come mezzo ausiliario fondamentale della moderna ricerca scientifica, ricordate le origini di questa tecnica, è passato a descrivere sommariamente i vari metodi cromatografici: cromatografia di adsorbimento, cromatografia continua, cromatografia di partizione su colonna e su carta e cromatografia di scambio.

Passando, in un secondo tempo, ad illustrare i recenti sviluppi di queste tecniche, particolare risalto è stato dato all'impiego dei metodi biologici in cromatografia di grande interesse per il riconoscimento, la localizzazione e talvolta il dosaggio di vitamine, fattori di crescita, di microorganismi ed antibiotici.

Accennati i principi della tecnica dei radioisotopi nella cromatografia su carta, l'A. ha illustrato i risultati più brillanti conseguiti in questo campo che si può dire aprano la via allo studio e all'interpretazione dei fenomeni biologici ed in particolare alle biosintesi e al metabolismo di esseri inferiori e superiori.

Infine è stata trattata la separazione degli stereoisomeri, argomento di grande interesse teorico e pratico che in questo momento è in pieno sviluppo.

Dopo avere esposto i metodi delle carte trattate nella cromatografia, l'A. conclude la sua esposizione riferendo una serie di esempi che dimostrano la diffusione della cromatografia nella chimica e nella medicina, dalle analisi degli esplosivi a quelle dei liquidi biologici, dalla tossicologia all'analisi inorganica, dai procedimenti analitici a quelli di preparazione industriale e che confermano l'importanza di queste tecniche che oggi sono in continua evoluzione.

Résumé. — Après avoir souligné l'importance de la chromatographie comme méthode auxiliaire de première importance dans la recherche scientifique actuelle et après avoir évoqué les débuts de cette technique, l'auteur décrit sommairement les diverses méthodes chromatographiques: chromatographie d'adsorption, chromatographie continue, chromatographie de partage sur colonne et sur papier et chromatographie d'échange de ions.

(*) Dalle conferenze tenute rispettivamente il 28 luglio 1951 alla Sezione Campana della Società Chimica Italiana a Napoli, il 20 marzo 1952 alla Sezione Piemontese a Torino e alla Sezione Toscana a Firenze il 9 maggio 1952.

Traitant ensuite des développements récents de ces diverses techniques, il met particulièrement en évidence l'emploi des méthodes biologiques en chromatographie, méthodes qui s'avèrent du plus grand intérêt pour reconnaître, déceler et parfois doser vitamines, facteurs de croissance, micro-organismes et anti-biotiques.

Ayant rappelé les principes de la technique des radio-isotopes dans la chromatographie sur papier, l'auteur souligne les plus brillantes réussites obtenues dans ce domaine, qui ouvrent une voie nouvelle à l'étude et à l'interprétation des phénomènes biologiques et en particulier aux biosynthèses et au métabolisme des êtres inférieurs et supérieurs.

L'A. s'occupe enfin de la séparation des stéréo-isomères, argument de grande importance théorique et pratique qui en ce moment est en plein développement.

Après avoir exposé les méthodes du papier traité pour la chromatographie, l'auteur conclut son exposé en rapportant une série d'exemples qui démontrent la diffusion de la chromatographie en chimie et en médecine, de l'analyse des explosifs à celle des liquides biologiques, de la toxicologie à l'analyse inorganique, des processus analytiques à ceux de la préparation industrielle, ce qui confirme l'importance de ces techniques qui sont aujourd'hui en pleine et rapide évolution.

Summary. — After having traced the historical development of chromatography and stressed its importance as a fundamental technique in modern scientific research, the author briefly described the various chromatographic methods: absorption chromatography, liquid chromatography, partition chromatography on columns and paper, and exchange chromatography.

A discussion of recent developments in these techniques was next presented, with particular emphasis on biological methods in chromatography, which have been widely and successfully employed in the recognition, localization, and quantitative determination of vitamins, growth factors, microorganisms, and antibiotics.

The principles of radioisotope technique in paper chromatography were elaborated, and the brilliant results achieved in this field were described as having opened the way, in a sense, to the study and interpretation of biological phenomena, and in particular, to an understanding of lower and higher organisms.

The separation of stereoisomers, a subject of great theoretical and practical interest which is being intensely developed at the present time, was next treated.

After having described the methods of treating the paper employed in inverse phase chromatography, the author concluded his exposition by referring to a number of examples which demonstrated the widespread use of chromatography in chemistry and medicine, from the analysis of explosives to the examination of biological fluids, from toxicology to inorganic analysis, from analytical procedures to industrial preparations. All of which confirm the importance of these continually evolving techniques in the contemporary scientific world.

Zusammenfassung. — Nachdem der Verfasser die Bedeutung der Chromatographie als grundlegendes Hilfsmittel der modernen wissenschaftlichen Forschung unterstrichen und die Anfänge dieser Technik in Erinnerung gebracht hat, geht er zur zusammenfassenden Beschreibung der verschiedenen chromatographischen Methoden über: Adsorptionschromatographie, Durchlauf, Verteilung, Austauschchromatographie.

Bei der sodann folgenden Erläuterung der jüngsten Entwicklung dieser Technik ist der Anwendung biologischer Methoden besonderes Augenmerk gewidmet worden. Diese chromatographischen Methoden interessieren speziell für die Erkennung, die Lokalisierung und manchmal auch die Dosierung von Vitaminen, Wachstumsfaktoren, Mikroorganismen und Antibiotika.

Nach einem Hinweis auf die Grundlagen der Radioisotopentechnik bei der Papierchromatographie hat der Verfasser die wichtigsten Ergebnisse erläutert, die auf diesem Gebiet erzielt wurden und die gewissermassen einen neuen Weg freimachen zur Untersuchung und Deutung der biologischen Phänomene und in erster Linie zur Biosynthese und zum Metabolismus niederer und höherer Lebewesen.

Schliesslich ist die Trennung der Stereoisomeren behandelt worden, ein Thema von grossem technischen und praktischen Interesse, das augenblicklich in voller Entwicklung begriffen ist.

Nachdem der Verfasser die Methoden der Chromatographie auf vorbehandeltem Papier auseinandergesetzt hat, schliesst er seine Darlegung mit dem Bericht einer Reihe von Beispielen ab, die die Verbreitung der Chromatographie in der Chemie und in der Medizin, von der mit vorbehandelten Analyse von Sprengstoffen zu der von biologischen Flüssigkeiten, von der Toxikologie zur anorganischen Analyse, von analytischen Prozessen zu industriellen Fabrikationsverfahren aufzeigen und die Bedeutung dieser Techniken bestätigen, die heute in ununterbrochener schneller Entwicklung begriffen sind.

Nello sviluppo storico della scienza è sempre esistito uno stretto parallelismo tra le scoperte di nuove tecniche ed i progressi scientifici.

Le tecniche di lavoro infatti hanno il merito di aprire nuovi campi alla ricerca e di fornirle quei mezzi materiali di cui essa ha bisogno per affrontare nuovi problemi. Per sottolineare la loro importanza basterebbe, come esempio, citare l'influenza che hanno avuto nel campo della Fisica e della Chimica i metodi spettroscopici, in quello della Biologia e della Biochimica i metodi manometrici ed infine in ogni branca delle scienze l'impiego dei raggi X.

Le tecniche che nel momento presente attirano maggiormente la attenzione sono quella dei radioisotopi e soprattutto la cromatografia, che di tutti i metodi di lavoro fino ad oggi impiegati si può dire abbia il privilegio di essere quello di più facile e semplice realizzazione.

L'influenza che la cromatografia ha avuto su tutto lo svolgimento delle ricerche in questi ultimi quindici anni è stata fondamentale permettendo di ottenere risultati che si può dire hanno caratterizzato le brillanti ricerche chimiche e biologiche di questo periodo.

Non è oggi facile, e soprattutto in uno spazio limitato, riassumere quanto è oggi noto sulla cromatografia. Infatti dal nucleo originario delle prime memorie di TSVETT, DHÉRE, KUHN e LEDERER, ZECHMEISTER e KARRER hanno preso origine numerosissimi metodi e applicazioni nei campi più diversi dalla patologia alla fisico-chimica, dalla biochimica all'industria (1).

Ritengo non inutile, per la chiarezza della esposizione e soprattutto per definire il significato di alcuni termini, iniziare con una rassegna delle varie tecniche fondamentali prima di passare ad illustrare i recenti progressi e le moderne applicazioni dei metodi cromatografici.

La cromatografia, come è noto, fu scoperta e applicata la prima volta alla risoluzione di problemi pratici dallo TSVETT — un russo nato ad Asti da madre italiana — che fin dal 1906 aveva messo a punto, non solo la tecnica fondamentale di separare su una colonna adsorbente una miscela di sostanze coloranti, ma che aveva altresì previsto la possibilità di separare sostanze incolori formulando le regole che governano questo adsorbimento (2). Allo TSVETT si devono la descrizione delle prime osservazioni sui pigmenti delle foglie e gli stessi nomi di *cromatografia* e *cromatogramma*, nomi che ancor oggi si applicano a questi processi, con una certa larghezza per ciò che riguarda la etimologia.

Bisognava attendere però circa 25 anni, dopo le esperienze dello

(1) ZECHMEISTER, Ann. New York Acad. Sciences, 49, 145 (1948).

(2) TSVETT, « Chromophylles in the plant and animal world », Varsavia 1910; TSVETT, Ber. deut. bot. Ges. 24, 1349 (1931).

TsvETT perchè la cromatografia uscisse dal suo stato di latenza, cioè fino a che KUHN e LEDERER non la ripresero applicandola allo studio dei caroteni che solo allora risultarono essere una miscela di vari componenti (3). Da allora ad oggi, in vent'anni, è un rapidissimo susseguirsi di nuovi metodi e nuovi risultati: la risoluzione dei pigmenti polienici, isolamento di nuove sostanze naturali, impiego a scopo preparativo; poi la cromatografia delle sostanze incolori, la cromatografia continua. Quando le tecniche cromatografiche sembrava avessero oramai esaurito tutte le loro possibilità, ecco affermarsi la cromatografia di partizione con tutte le sue brillantissime applicazioni.

Oggi questo campo è ancora intensamente studiato e le sue applicazioni sono in così rapida evoluzione che risulta difficile a chi desideri farne una rassegna riuscire a tracciare un panorama completo dello stato attuale delle ricerche. In sintesi si può dire che la cromatografia ci offre la possibilità di separare miscele complesse non altrimenti frazionabili, preparare od isolare sostanze che si trovano allo stato di estrema diluizione, riconoscere l'identità di due sostanze in base alle loro proprietà cromatografiche e inoltre stabilire criteri di purezza e di unitarietà del composto.

Per lo svolgimento del tema, dato che è necessario limitarsi ai punti essenziali, si esporranno in primo luogo le linee principali della pratica cromatografica di adsorbimento, di partizione e di scambio. In secondo luogo si tratteranno alcuni aspetti più recenti della cromatografia quali l'impiego dei metodi biologici e dei radioisotopi, la separazione degli stereoisomeri, i nuovi orientamenti della cromatografia su carta.

METODI CROMATOGRAFICI

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

La cromatografia di adsorbimento è basata sulla diversa capacità di distribuzione di un soluto tra un solvente e una fase solida. A questo scopo una sostanza, disciolta in un solvente, viene fatta passare attraverso a una colonna contenente materiale inerte ed adsorbente, sulla quale essa si fissa a seconda delle sue proprietà e della sua natura chimica.

Il primo ed oramai classico esempio di cromatografia, è quello offertoci dallo stesso TsvETT, della separazione delle sostanze colorate delle foglie in clorofille e caroteni.

(3) KUHN e LEDERER, Ber. 64, 1349 (1931).

L'adsorbimento rappresenta però solo la prima fase del processo cromatografico: infatti si ha solo fissazione dei vari componenti sulla colonna, ma non ancora la loro separazione, che si realizza invece se si fa passare nella colonna a questo punto del solvente puro: si sposterà in questo modo solo la sostanza meno adsorbita, mentre le altre rimarranno indietro.

In pratica la cromatografia di adsorbimento si realizza disponendo omogeneamente l'adsorbente in un tubo di vetro, o *colonna*, che può avere, a seconda che serva per scopi analitici o preparativi, la capienza di pochi grammi o di alcuni chili (fig. 1). Se si fa passare attraverso

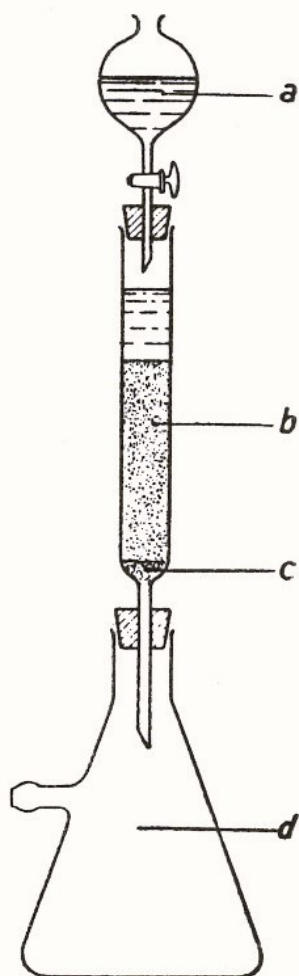


FIG. 1 - Colonna cromatografica di assorbimento.

a: serbatoio - *b*: colonna di allumina - *c*: lana di vetro - *d*: recipiente di raccolta.

questa colonna una opportuna soluzione di più sostanze colorate, queste si fissano sulla colonna, si ha cioè un *cromatogramma*, nel quale in un primo tempo non vi è suddivisione tra i vari componenti, che si separano invece in *zone* o *bande* quando si lavi per qualche tempo la colonna con il solvente puro, cioè quando si *sviluppa il cromatogramma* (fig. 2).

La scelta dei solventi e dell'adsorbente è stata fatta in base alla

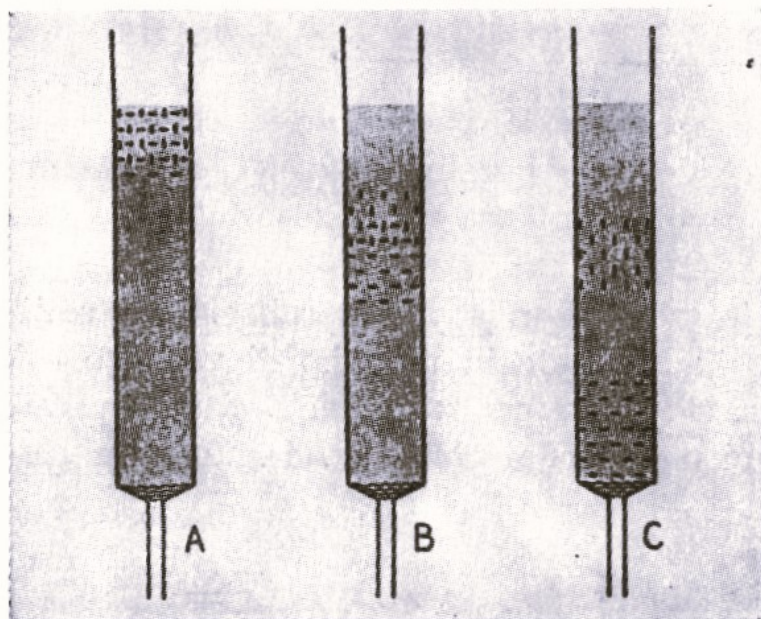


FIG. 2 - Schema di sviluppo di una cromatografia.

esperienza: oggi è possibile prevedere con il calcolo quanto è stato acquisito empiricamente (tab. 1).

TABELLA 1

CROMATOGRAFIA DI ASSORBIMENTO		
Colonna	Solventi	Eluenti
Saccarosio	Etere di petrolio	Etanolo
Talco	Benzolo	Metanolo
CaCO ₃	Etere etilico	Acido acetico
MgO	Acetato di etile	Piridina
CaO		Acqua
Al ₂ O ₃		
Carboni attivati		

Per ricavare le sostanze fissate sulla colonna, si spinge questa fuori del tubo di vetro con un apposito bastone — questa operazione è chiamata *estrazione* — e le varie frazioni diversamente colorate vengono separate meccanicamente e quindi *eluite* con un opportuno solvente (figura 3).

Le numerose ricerche sperimentali hanno permesso di trarre alcune

deduzioni sulle relazioni tra l'adsorbimento di una sostanza da parte di un determinato adsorbente e le sue funzioni chimiche. E' stato infatti stabilito che una sostanza non ossigenata è tanto più facilmente adsor-



FIG. 3 - Estrusione della colonna cromatografica e separazione delle zone.

[da T. I. WILLIAMS: « An Introduction to Chromatography » London 1947]

bita quanto maggiore è il numero dei doppi legami presenti nella sua molecola; che tra i composti ossigenati — che sono fissati più facilmente dei corrispondenti idrocarburi — gli alcoli sono più adsorbiti dei chetoni e degli eteri, ecc.

Quanto si è detto trova una brillante illustrazione nelle esperienze di KUHN, LEDERER e WINTERSTEIN che hanno fatto rilevare le analogie tra gli spettri di assorbimento di una sostanza e la capacità di questa di essere adsorbita su una colonna cromatografica: tanto più i massimi di adsorbimento della sostanza si spostano verso le minori lunghezze d'onda, cioè verso l'ultravioletto, tanto minore diventa la capacità di venire adsorbite da una colonna di allumina ⁽⁴⁾ (fig. 4). Così, ad esempio, per i polieni l'adsorbimento da parte della colonna decresce dal licopene al γ -carotene, cioè esso è inversamente proporzio-

⁽⁴⁾ KUHN e WINTERSTEIN. *Helv. Chim. Acta*, 11, 87, 116, 123, 144 (1928).

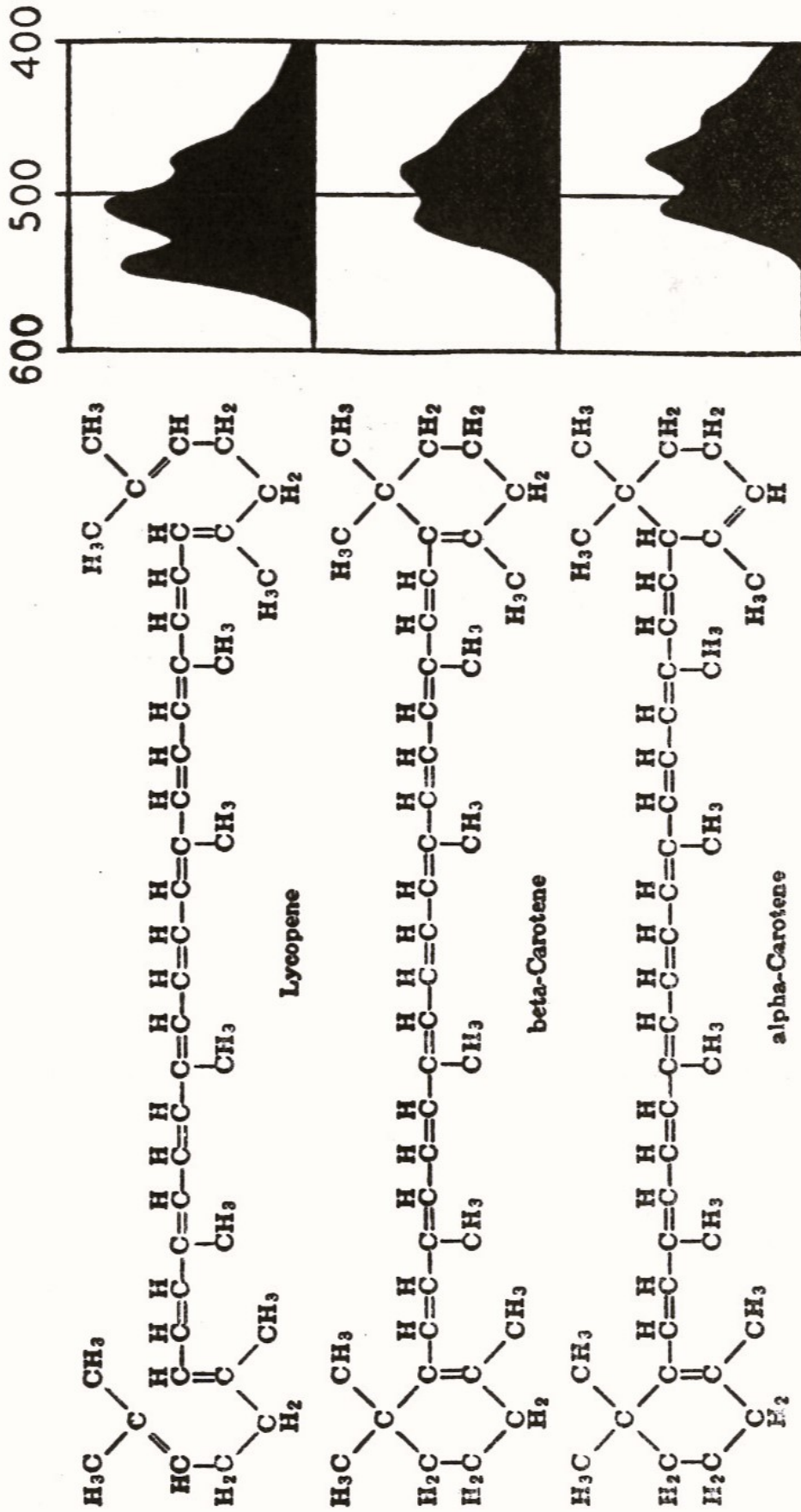


FIG. 4 - Relazione tra spettri di assorbimento e adsorbimento cromatografico.
[da STRAIN: «Chromatographic Adsorption Analysis»].

nale al numero dei doppi legami, cosa che è in accordo con quanto si è detto sul comportamento spettrale:

Licopene	13 doppi legami	di cui 11 coniugati
γ -carotene	12 » »	» » 11 »
δ -carotene	12 » »	» » 10 »
β -carotene	11 » »	» » 11 »
α -carotene	11 » »	» » 10 »

Anche nella serie del difenil-etilene l'adsorbimento è funzione del numero dei doppi legami; così, mentre lo stilbene, incolore, è poco adsorbito, l'1-14-difenil-tetradecaepitene, violetto, è invece fortemente trattenuto.

Anche il solvente ha una importanza notevole nella separazione dei composti. Infatti, giocando sulle solubilità preferenziali dei vari gruppi presenti nei prodotti, è possibile rendere più complete talune separazioni. Ad esempio, nel caso di una serie di acidi carbossilici, essendo comune a tutti i termini il gruppo funzionale carbossilico, la diversità sarà legata alla lunghezza della catena. Pertanto i termini inferiori saranno più solubili nei solventi polari, ad esempio etanolo-acquoso, che non i termini superiori ed in tal modo potranno essere meno adsorbiti sulla colonna.

E' appunto sul diverso comportamento rispetto all'adsorbente delle sostanze, dovuto ai gruppi funzionali, alla posizione di questi tra loro, alla dimensione delle molecole come anche alla natura del solvente, che la cromatografia di adsorbimento consente le realizzazioni di separazioni così complete ed efficaci.

CROMATOGRAFIA DI SOSTANZE NON COLORATE

La cromatografia, come era stata concepita, limitava le sue applicazioni a sostanze colorate, come d'altra parte risulta dal nome di questa tecnica. Tuttavia il metodo era troppo efficace nella separazione di sostanze molto simili, per non tentare di applicarlo alla separazione di sostanze incolore. Sono stati così studiati e messi a punto diversi metodi per effettuare la cromatografia di sostanze incolore. Uno di questi sistemi, designato con il nome di *ultracromatografia*, è basato sulla osservazione delle zone della colonna alla luce di Wood. In tal modo è possibile estendere le regole della cromatografia di adsorbimento a un numero notevolissimo di sostanze non colorate, ma fluorescenti alla luce

di Wood. Questo sistema è riuscito molto utile per lo studio di molti idrocarburi policiclici.

Lo ZECHMEISTER, d'altra parte, per stabilire la presenza dei diversi componenti nella colonna ha proposto il metodo al « pennello », che consiste nell'estrudere la colonna e nel percorrerla quindi nel senso verticale con un pennello o una bacchetta bagnati con un reattivo specifico capace di dare una reazione cromatica con le sostanze fissate nelle varie zone. Si possono a questo scopo impiegare sostanze coloranti o anche permanganato di potassio, che si è dimostrato molto utile per rilevare le posizioni dei vari glucidi nella separazione di miscele di zuccheri. Con lo stesso reattivo si possono inoltre mettere in evidenza composti con doppi legami ed altri riducenti (5).

Con reattivi diversi si possono formare, oltre a derivati colorati, anche derivati fluorescenti. E' facile comprendere, dato il numero delle reazioni cromatiche e di fluorescenza, come sia quasi illimitata la possibilità di potere sfruttare questo sistema per la cromatografia di sostanze incolori.

Numerosi altri accorgimenti sono stati proposti allo stesso fine; tra questi va ricordato quello fondato sulla formazione di derivati colorati di sostanze incolori e sulla successiva separazione cromatografica di questi; così dai chetoni si preparano i dinitrofenilidrazoni, dagli steroli i dinitrobenzoati, dalle ammine i picrati, ecc.

CROMATOGRAFIA CONTINUA

Una svolta decisiva nella cromatografia di adsorbimento è stata impressa dagli studi di REICHSTEIN, come pure dei collaboratori, che hanno, sulla base degli elementi, che offriva la cromatografia di adsorbimento, sviluppato un metodo preparativo efficacissimo per la separazione di sostanze tra loro molto simili, quali quelle ad esempio appartenenti a gruppi di composti naturali. Sono appunto queste ricerche cromatografiche che hanno reso possibile l'enorme e rapido sviluppo degli studi sui composti naturali del gruppo degli steroli, diterpeni, sesquiterpeni, politerpeni e glucosidi.

Il principio sul quale si basa la cromatografia continua è il seguente: consideriamo una colonna cromatografica già sviluppata; vi saranno diverse zone, che a scopo di esemplificare consideriamo colorate. Invece di estrudere la colonna e di tagliare le varie zone e di eluirle quindi, si potrà lavare con del solvente la colonna stessa fino a che

(5) ZECHMEISTER, CHOLNOKY, UJHELY, Bull. Soc. Chim. Biol. 18, 1885 (1936).

una frazione dopo l'altra non passi nel filtrato in ragione inversa alla sua capacità di fissarsi sull'adsorbente. Si comprende come in questo caso sia necessario un solvente o dei solventi tali che siano capaci di fare muovere e di eluire selettivamente le varie zone. Per questo scopo si usa una serie di solventi che va dall'etere di petrolio puro all'acido acetico, passando attraverso a una serie di miscele fino all'acido acetico, cioè passando da solventi apolari a solventi polari dotati di maggiore potere eluente (tabella 2).

TABELLA 2

CROMATOGRAFIA CONTINUA	
Colonna	Solventi (·)
Al ₂ O ₃ (1)	Etere di petrolio Benzolo Cloroformio Etere Acetone Acetato di etile Etanolo Metanolo

L'operazione si effettua in pratica impiegando colonne di allumina a diversa attività (fig. 5). Questa deve essere circa 20-30 volte il peso della sostanza da cromatografare e viene sospesa nel primo solvente e si sposta così nel tubo in modo da avere una distribuzione il più possibile omogenea. Si fa quindi passare la sostanza disciolta in volume noto di solvente, ad es. 20 cc., e si raccoglie il liquido che passa attraverso la colonna, e precisamente se ne raccolgono 20 cc. Man mano che il liquido si esaurisce, al disopra della colonna se ne aggiunge un nuovo eguale volume e così pure si raccolgono eguali volumi di filtrati. Le

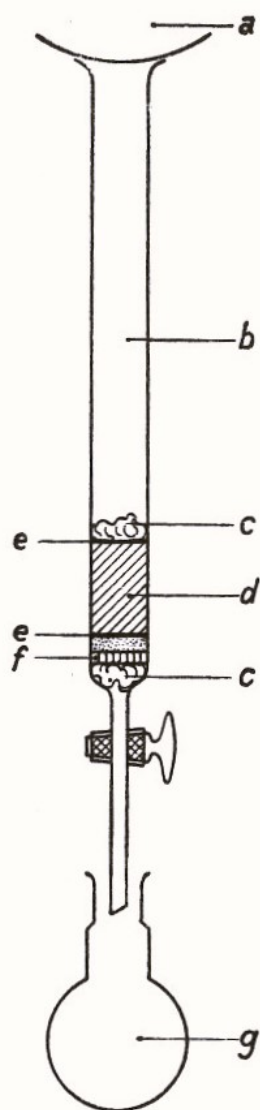


FIG. 5 - Colonna per cromatografia continua.

[da REICHSTEIN e SHOPPEE (6)].

a: vetro d'orologio - *b*: colonna - *c*: ovatta - *d*: alumina - *e*: disco di carta da filtro - *f*: setto di porcellana - *g*: palloncino con smeriglio intercambiabile.

varie porzioni dei filtrati si raccolgono separatamente, si evaporano a secchezza e se ne pesano i residui.

Se i pesi dei residui sono crescenti o stazionari, ciò sta ad indicare che il solvente impiegato sta eluendo il prodotto; in questo caso si continua il trattamento con il medesimo solvente fino a che, passando attraverso un massimo, non si ottengano frazioni quasi senza residuo, cioè fino a che il solvente impiegato non eluisca più nulla. A questo punto si cambia il solvente, seguendo la serie indicata più sopra e si ripete l'operazione fino ad ottenere una serie di frazioni caratterizzate da punto di fusione diverso. Il seguente esempio tratto da un recente lavoro di REICHSTEIN varrà meglio ancora a chiarire il metodo (tab. 3).

La maggiore difficoltà che presenta questo sistema è dovuta alla lentezza con la quale si opera; va notato che nell'esempio sopra riportato vi sono 22 separazioni e distillazioni, ma generalmente se ne effettuano

(6) REICHSTEIN e SHOPPEE, « Chromatographic Analysis », Disc. Faraday Soc., 7, 305 (1949).

TABELLA 3

Separazione cromatografica dell'estratto etero di <i>Xysmalobium undulatum</i> (REICHSTEIN e Coll. <i>Helv. Chim. Acta</i> 34, 58 - 1951)		
Numero delle frazioni	Solvente	Residuo della distillazione
1 - 5	Benzolo, fino benzolo-cloroformio (1:1)	amorfo
6 - 7	Benzolo-cloroformio	pf. 122-148°
8 - 10	Cloroformio	pf. 230-256°
11 - 12	Cloroformio	amorfo
13 - 15	Cloroformio, fino cloroformio-metanolo (19:1)	pf. 290-320°
16 - 22	Cloroformio-metanolo (19:1), fino a miscela più 1% di acido acetico	amorfo

molto di più; il costo dei solventi è molto elevato, poichè di rado sono recuperabili dato che si impiegano in miscela. Ad ogni modo questo sistema, come è già detto, è di valore incalcolabile per la separazione e la preparazione di composti naturali puri e, si può dire, in questo momento insostituibile.

Gli Autori di questo metodo, svizzeri, lo denominano « Durchlauf-Chromatographie » cioè cromatografia di attraversamento. In inglese questo termine è stato tradotto con « Liquid chromatography ». In italiano ci sembra opportuno, invece di adottare il termine improprio di cromatografia liquida, usare quello di « *cromatografia continua* » dato che si renderebbe meglio l'idea del procedimento e non si ingenererebbero confusioni con alcuni aspetti della cromatografia di partizione. Il termine di « *cromatografia per eluizione frazionata* », adottato recentemente dallo stesso REICHSTEIN, potrebbe anche essere impiegato (6).

CROMATOGRAFIA DI PARTIZIONE

Mentre la cromatografia di adsorbimento è fondata sui fenomeni di equilibrio che si verificano tra una fase solida e una fase liquida, la *cromatografia di partizione* è basata sull'equilibrio che si manifesta tra due fasi liquide: una stazionaria e una mobile. MARTIN e SYNGE furono indotti ad adottare una simile tecnica mentre effettuavano una ricerca per ottenere una completa separazione di composti molto simili tra loro.

fondandosi sul diverso coefficiente di ripartizione tra due solventi immiscibili, quali l'acqua e il cloroformio. Per ottenere una maggiore suddivisione, e quindi una maggiore superficie di contatto tra i due liquidi, pensarono di fare adsorbire l'acqua sul gel di silice che, come è noto, ne può trattenere circa il 70% del suo peso senza apparire bagnato e di fare passare attraverso il cloroformio (7). In questa operazione il gel di silice non ha funzione di adsorbente, ma di semplice supporto del liquido, questa volta acqua, che funziona da fase stazionaria. A queste caratteristiche rispondono bene anche altri materiali quali la cellulosa e l'amido che vengono anche essi largamente usati nella cromatografia di partizione (tab. 4).

TABELLA 4

CROMATOGRAFIA DI PARTIZIONE	
Fase stazionaria	Fase mobile
Acqua su gel di silice su cellulosa su amido (Benzolo su gomma)	Cloroformio Butanolo Collidina Etere acetico Miscele: CHCl ₃ -cicloesano Butanolo-cicloesano Solventi misti

Come fase mobile si impiegano di solito solventi poco miscibili con l'acqua quali il cloroformio, il butanolo, la collidina, ecc.

Nel caso si voglia impiegare una colonna di gel di silice per separare, ad esempio una miscela di acetil-ammino-acidi, si aggiunge all'acqua inglobata al gel di silice un opportuno indicatore, ad esempio metil-arancio, un'antocianina, ecc. Se si fa passare nella colonna una soluzione cloroformica degli acetil-ammino-acidi, si avrà un passaggio di questi dalla fase cloroformica a quella acquosa, mentre in corrispon-

(7) MARTIN e SYNGE, *Biochem. J.* 35, 1358 (1941); 35, 91 (1941).

denza cambierà di colore la colonna per il viraggio dell'indicatore. In questo modo è possibile seguire il movimento delle zone colorate e quindi separare e anche dosare le varie frazioni mano a mano che esse passano nel filtrato.

Quando non sia possibile separare con una sola operazione tutti i componenti di una miscela, la si ripete sulle diverse frazioni su una altra colonna con solventi diversi.

Oggi la cromatografia di partizione non fa più ricorso a questi indicatori dato che, adottando un sistema di analisi continua delle frazioni eluite, è perfettamente possibile seguire il passaggio dei vari componenti di una miscela anche molto complessa (ad es. metodo di STEIN e MOORE) (8).

CROMATOGRAFIA SU CARTA

Un aspetto molto importante della cromatografia di partizione è la cromatografia su carta, che per la sua semplicità e facilità di esecuzione rappresenta uno dei metodi più brillanti per la separazione ed il riconoscimento di miscele di composti organici.

Nella cromatografia su carta, la fase stazionaria è rappresentata dall'acqua contenuta nella carta in ambiente saturo di solvente saturo di acqua, e la fase mobile di solito da una soluzione di fenolo, o collidina e butanolo o alcool benzilico, saturi d'acqua. Spesso si possono impiegare anche miscele di due o tre solventi (tab. 5).

TABELLA 5

CROMATOGRAFIA DI PARTIZIONE SU CARTA		
Fase stazionaria	Fase mobile	Rivelatori
Acqua	Butanolo-acido acetico	Ninidrina
(Fenolo)	Butanolo-alcool benzilico	AgNO ₃
(Formammide)	Collidina	KMnO ₄
(Propilenglicol)	Fenolo	Iodio
	(Benzolo)	

(8) STEIN e MOORE, J. Biol. Chem. 176, 337 (1948).

In pratica si dispone una quantità piccolissima di sostanza disciolta in un solvente volatile su una striscia o un foglio di carta a circa 3-4 centimetri da una sua estremità, segnando il punto con una matita, quindi la striscia o il foglio vengono messi a contatto a una estremità con il solvente in un ambiente chiuso saturo d'acqua e possibilmente a temperatura costante (vedi fig. 6). Il solvente in questo modo scorre

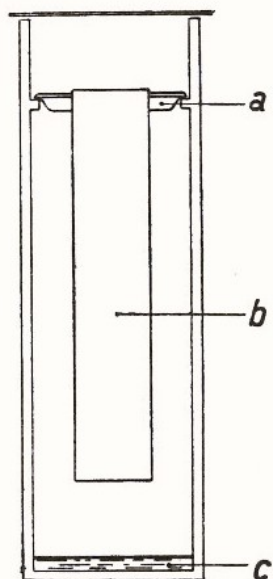


FIG. 6 - Apparecchio per cromatografia su carta con il metodo discendente.

a: vaschetta - *b*: striscia di carta - *c*: solvente in equilibrio.

lungo la carta e le sostanze si vengono a ripartire in posizioni diverse lungo la striscia e il foglio. L'operazione viene interrotta quando il fronte del solvente raggiunge circa la estremità opposta della striscia e del foglio. Si fa poi un segno con una matita per fissare il fronte e si fa asciugare il cromatogramma (fig. 7).

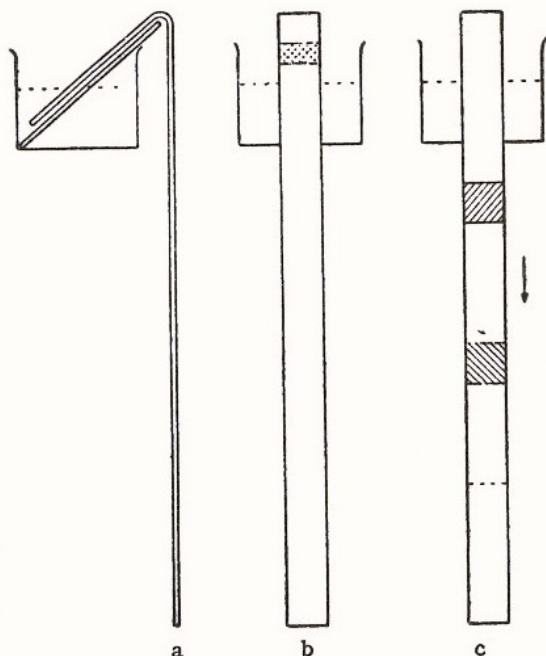
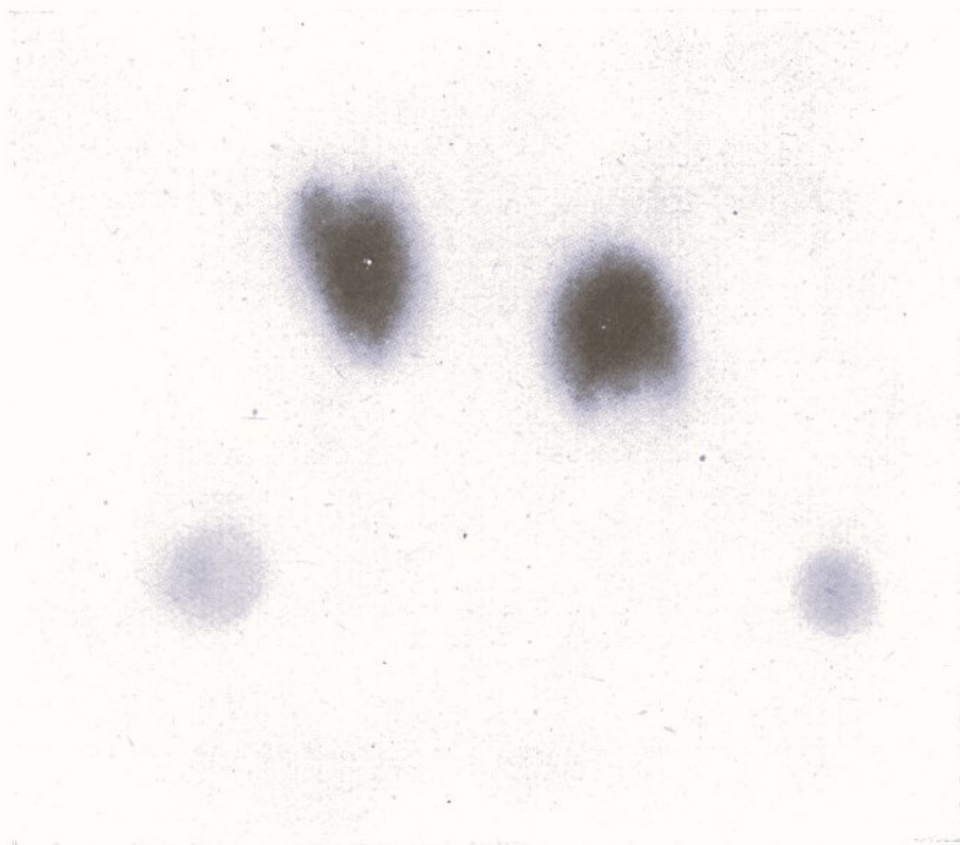


FIG. 7 - Schema di una cromatografia discendente su carta - Nella fig. *c* si vedono schematizzate la formazione di bande. - Nella fig. *b*, si nota dove è disposta la sostanza.



1

2

3

4

Cromatografia discendente unidimensionale di zuccheri
(1:glucosio, 2:xilosio, 3:arabinosio, 4:galattosio)

Solvente: butanolo, acido acetico, acqua (4:1:5) - Carta What-
man N. 1 - Rivelatore ftalato acido di anilina (11).

Con il reattivo subito dopo lo sviluppo i pentosi danno una
colorazione rosso ciliegia, mentre gli esosi si colorano in
giallo bruno.

Se le sostanze che costituiscono la miscela sono colorate la loro posizione viene stabilita direttamente. Qualora si tratti di sostanze non colorate, ma fluorescenti, l'esame alla luce di Wood consentirà di individuare le posizioni relative. In caso di sostanze incolori e non fluorescenti si usano reattivi capaci di metterle in evidenza come si vedrà in seguito.

Il rapporto tra la distanza tra il punto di partenza e la posizione della macchia e la distanza tra lo stesso punto di partenza e il fronte del solvente è indicato dalla notazione R_F (che significa Ratio: rapporto in inglese, F : fronte) che è un valore costante per ogni sostanza, per un determinato solvente e a una determinata temperatura e un dato pH (fig. 8).

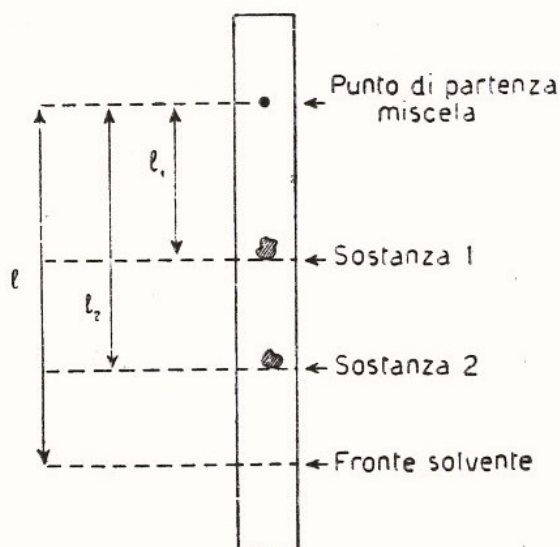


FIG. 8 - Schema di calcolo R_F

$$R_{F_1} = \frac{l_1}{l} \quad R_{F_2} = \frac{l_2}{l}$$

I valori degli R_F si deducono sperimentalmente per confronto con sostanze pure: molti R_F sono riportati nella letteratura. L'esame delle macchie e la determinazione dei vari R_F ha permesso varie volte di stabilire, in una miscela sottoposta alla cromatografia su carta delle sostanze nuove.

Può avvenire che in miscele molto complesse gli R_F non siano così diversi da consentire una chiara e netta separazione delle diverse sostanze. Per questa ragione è stato proposto di effettuare sul primo cromatogramma una seconda cromatografia in una direzione a 90° dalla precedente con un solvente diverso. In questo modo le piccole differenze di R_F esistenti nella prima separazione si moltiplicano nell'altra direzione e si hanno in questo modo separazioni ben nette di miscele complesse, ad esempio quelle degli amminoacidi. Naturalmente si avranno risultati diversi usando anche gli stessi solventi in ordine di-

verso (fig. 9). Questa operazione è nota con il nome di *cromatografia bidimensionale* (fig. 10) ⁽⁹⁾.

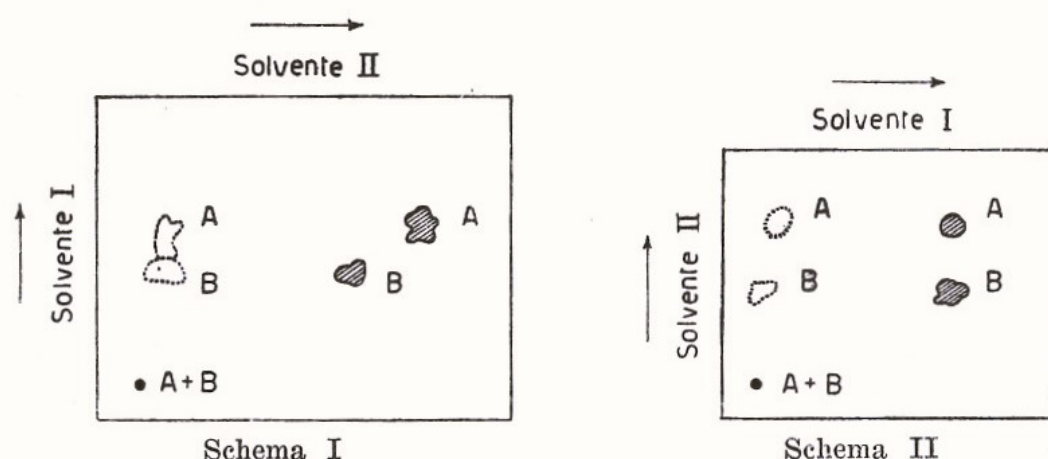


FIG. 9 - Schema di cromatografia bidimensionale su carta.

Si vede nei due schemi 1 e 2 quale può essere il risultato con una medesima miscela di due sostanze qualora nella cromatografia bidimensionale si usi prima un solvente I e poi un solvente II e viceversa. Negli schemi sono riportate punteggiate le posizioni che occuperebbero le sostanze A e B al termine della cromatografia unidimensionale.

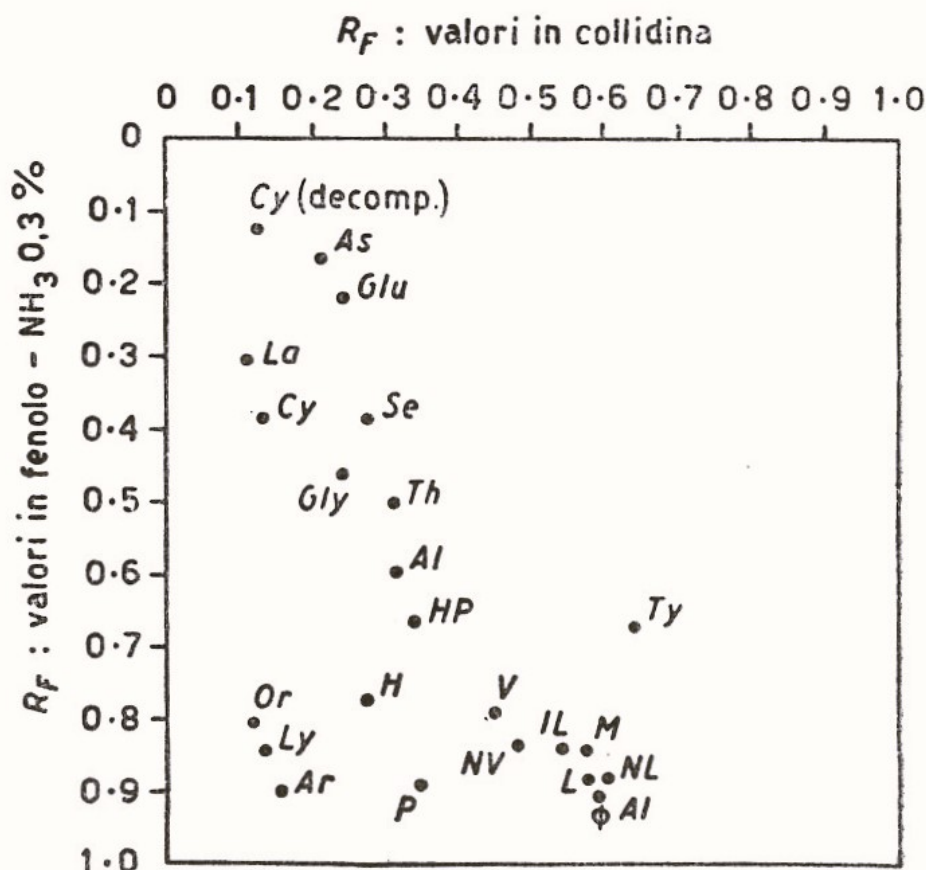


FIG. 10 - Leggenda: *Al*: Alanina; ϕAl : Fenilalanina; *Ar*: Arginina; *As*: Acido aspartico; *Cy*: Cisteina; *Glu*: Acido glutammico; *Gly*: Glicolla; *H*: Istidina; *HP*: Ossiprolina; *IL*: Isoleucina; *La*: Lantionina; *L*: Leucina; *Ly*: Lisina; *M*: Metionina; *NL*: Norleucina; *Th*: Treonina; *Ty*: Tirosina; *V*: Valina. [da CONSEDEH, GORDON e MARTIN (9)].

(9) CONSDEN, GORDON e MARTIN, *Biochem. J.* 38, 231 (1949).

Per realizzare praticamente la cromatografia su carta, nel caso di cromatografia unidimensionale, basterà ricorrere all'impiego di un grosso cilindro, chiuso a mezzo di una lastra di vetro e munito in alto di una vaschetta dove disporre il liquido. Nel caso si desideri fare uso della cromatografia bidimensionale, siccome si deve impiegare un foglio quadrato o rettangolare, si potrà ricorrere ad apparecchi speciali che si trovano in commercio, ma volendo si potranno realizzare con delle scatole di vetro da accumulatori (fig. 6).

L'apparecchiatura è ancora più semplice se si impiega il metodo capillare ascendente di WILLIAMS e KIRBY ⁽¹⁰⁾ in quanto è necessario disporre in alto la vaschetta per il liquido; d'altra parte, siccome la altezza utile massima in questi casi è di 35 cm., sono sufficienti a questo scopo un grosso becher e una scatola di Petri, entro i quali si dispone una striscia di carta unita alle sue estremità (fig. 11).

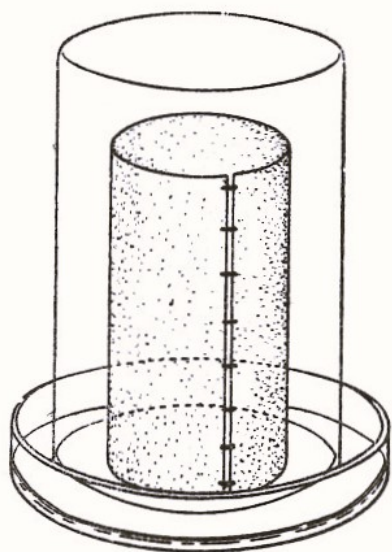


FIG. 11 - Cromatografia ascendente.

L'apparecchio è costituito da un becher rovesciato su una scatola di Petri, a chiusura idraulica con il solvente impiegato. La carta viene disposta a cilindro dentro il becher stesso. L'altezza massima utile in queste separazioni è di 35 cm.

Il metodo di WILLIAMS e KIRBY è molto comodo e semplice, però è soprattutto orientativo ed è limitato dal fatto che non è facile separare sostanze con R_F vicini. Nella cromatografia su carta va d'altra parte tenuto presente che in taluni rari casi può avvenire che una sostanza pura dia due macchie. LESTER SMITH ha raccolto recentemente in un articolo critico tutti i dati riferentisi a questa apparente anomalia ⁽¹¹⁾, risalendo alle possibili cause di questi errori, i quali generalmente vanno attribuiti a una non perfetta ripartizione tra le due fasi.

(10) WILLIAMS e KIRBY, *Science*, 107, 481 (1947).

(11) LESTER SMITH, *Nature* 168, 60-62 (1952).

Uno dei problemi più interessanti della cromatografia su carta è quello di trovare rivelatori per macchie, adatti a mettere in evidenza tutte le sostanze presenti nella miscela originaria. Generalmente non è difficile trovare un reattivo specifico che dia una reazione cromatica con una classe di sostanze; ad es. la ninidrina si colora a caldo con i diversi ammino-acidi dal verde al blu scuro, il nitrato d'argento ammoniacale dà con gli zuccheri una macchia nera; il cloruro ferrico permette di rivelare sostanze di natura fenolica; inoltre per distinguere pentosi da esosi il PARTRIDGE ha proposto l'impiego di un nuovo sensibilissimo reattivo, la ftalil-anilina ⁽¹²⁾. Sostanze ossidabili, quali l'adrenalina, possono mettersi in evidenza con ossidanti, quali ad es. il ferrocianuro di potassio.

I reattivi si impiegano generalmente nebulizzandoli o spruzzandoli sulle carte previamente seccate ed asciugate.

Alcune volte per ovviare alla difficoltà della rivelazione, come già si è visto per la cromatografia di adsorbimento, si possono trasformare i composti da sottoporre alla cromatografia in derivati colorati. Così possiamo ricordare le ricerche di CAVALLINI, FRONTALI e TOSCHI ⁽¹³⁾, nelle quali i chetoacidi vengono trasformati in dinitrofenilidrazoni e successivamente sottoposti alla cromatografia.

La cromatografia su carta si è dimostrata, oltre a un sensibilissimo

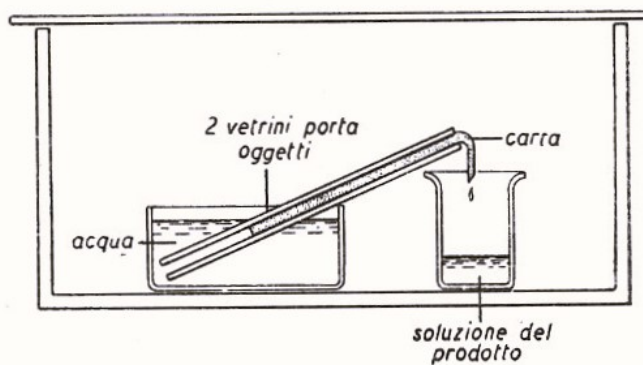


FIG. 12 - Procedimento per l'estrazione delle sostanze dai cromatogrammi su carta.

[da DENT e Coll. Nat. 160, 682 (1947)].

metodo analitico, anche un importante metodo micropreparativo ed i chimici si sono preoccupati di cercare reattivi capaci di rivelare la presenza delle sostanze, e consentire quindi di determinare l' R_F , senza

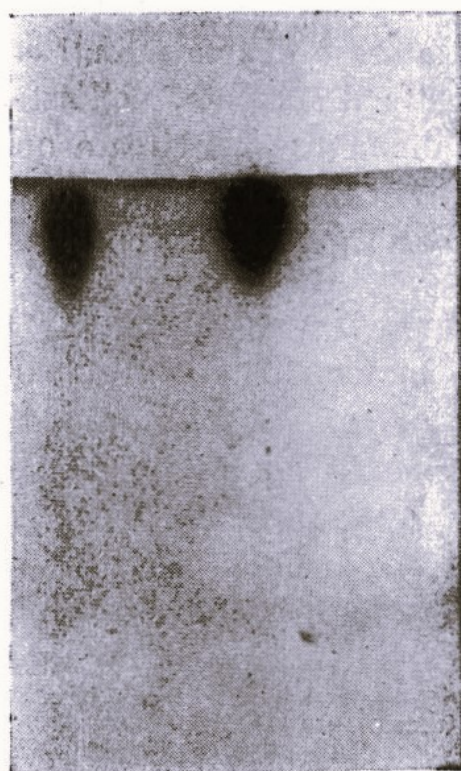
(12) PARTRIDGE, *Nature*, 164, 443 (1948).

(13) CAVALLINI, FRONTALI e TOSCHI, *Nature* 163, 568 (1949) e 146, 792 (1949).

tuttavia distruggerle o trasformarle. In questo modo è infatti possibile, con opportuni accorgimenti, eluire le piccole quantità di sostanze e recuperarle così allo stato puro (vedi fig. 12).

Per evitare la distruzione della sostanza il BOISSONAS (14) ha recentemente proposto di applicare il reattivo sul cromatogramma a mezzo di uno speciale tampone a punti, in modo da realizzare una rivelazione per punti che, secondo l'Autore, distruggerebbe solo l'1% del prodotto presente.

Un'altra esigenza della rivelazione dei cromatogrammi era quella di possedere dei reattivi generali per tutte le sostanze. MARINI-BETTÒLO e GUARINO (15), partendo dalla osservazione che lo iodio si fissa sulla carta a seconda della natura fisica di questa e della sua permeabilità,



1 2 3

FIG. 13 - Rivelazione con vapori di iodio di una cromatografia su carta. Cromatografia ascendente: solvente Butanolo, acido acetico, acqua (4:1:5).

1:Resorcina, 2:Pirocatechina,
3:Acido tartarico, 50 γ

hanno dimostrato che lo iodio può essere un prezioso reattivo generale di rivelazione per la cromatografia su carta e non solo, come aveva osservato il BRANTE, un reattivo specifico delle ammine (16). Infatti in questo caso le macchie possono apparire come brune su fondo chiaro, ad esempio nel caso dei fenoli e delle ammine, oppure chiare su fondo scuro come avviene nel caso dei glucidi, degli acidi, ecc. (fig. 13). Tale

(14) BOISSONAS, *Helv. Chim. Acta* 33, 1966, 1982 (1950).

(15) MARINI-BETTÒLO e GUARINO, *Experientia* 6, 309 (1950).

(16) BRANTE, *Nature*, 163, 651 (1949).

sistema inoltre soddisfa alcune volte alla condizione di potere ripristinare la sostanza allontanando per esposizione all'aria lo iodio, in modo che si può fare uso successivo dei reattivi specifici e si può estrarre il composto, come si è già visto.

Come metodo squisitamente analitico la cromatografia su carta è rimasta ancora, malgrado i numerosi tentativi effettuati, alla fase qualitativa. Tentativi per rendere quantitativi questi metodi ve ne sono già numerosi, ad es. applicando il dosaggio fotometrico agli estratti delle macchie ⁽¹⁷⁾, misurando il raggio delle macchie e perfino impiegando isotopi radioattivi come indicatori ⁽¹⁸⁾. Si tratta di metodi che rispondono spesso allo scopo, ma sono limitati ancora e privi di quella qualità, la semplicità, che ha assicurato il vero grande successo di questa tecnica.

Un caso particolare di cromatografia su carta, che è utile qui rammentare, è la cromatografia su disco ⁽¹⁹⁾ proposta e realizzata dal RUTTER. A questo scopo si fa uso di un cristallizzatore o di due piccoli cristallizzatori concentrici: nel più interno si mette il solvente, nell'esterno acqua. Si prende poi un disco di carta di diametro pari circa a quello del cristallizzatore più grande, e si taglia fino al centro in modo da formare un peduncolo che si ripiega a 90° dal piano del disco (vedi fig. 14). Al

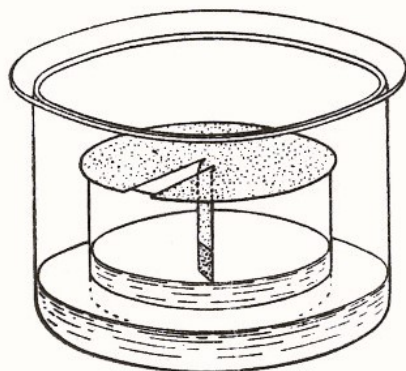


FIG. 14 - Cromatografia su disco secondo RUTTER.

punto di intersezione del peduncolo con il disco, si dispone una goccia della soluzione da cromatografare, la si fa asciugare e quindi si immerge il peduncolo nel solvente, chiudendo il sistema con una lastra di vetro. Per capillarità il solvente dal peduncolo si diffonde rapidamente realizzando una cromatografia in una ventina di minuti.

Questo sistema è indicato per stabilire in pochi minuti il solvente più idoneo per una determinata separazione.

(17) FISHER, PARSON e MORRISON, *Nature* 161, 764 (1948).

(18) KESTON, UNDEFRIED e LEVY, *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1351 (1947).

(19) RUTTER, *Nature* 161, 435 (1948).

Estensione di questo metodo è la *cromatografia in archi di cerchio* di MARCHAL e MITTWER ⁽²⁰⁾ che consente la separazione di numerosi ammino-acidi senza ricorrere alla cromatografia bidimensionale e il metodo su disco modificato di BERLINGOZZI e SERCHI, che utilizza una piramide di carta invece del peduncolo ⁽²¹⁾.

CROMATOGRAFIA PER SCAMBIO IONICO

Se per cromatografia si accetta la definizione di GORDON MARTIN e SYNGE ⁽²²⁾ che essa è un « procedimento d'analisi per percolazione di un liquido attraverso una sostanza finemente suddivisa e porosa indipendentemente dai processi che conducono alla separazione », è necessario fare rientrare in essa tutti i procedimenti di scambio ionico che vengono oggi comunemente e talvolta impropriamente indicati con il nome di cromatografia di scambio. In questo caso la colonna cromatografica, invece di un adsorbente come allumina o carbone, conterrà una sostanza dotata della capacità di scambiare ioni: generalmente si impiegano a questo scopo delle resine sintetiche specialmente studiate. Si tratta di solito di acidi e di basi ad elevato peso molecolare capaci di formare sali insolubili rispettivamente con sostanze di natura basica e di natura acida. Da questi sali insolubili si possono poi rigenerare i composti selettivamente per aggiunta di un opportuno eluente.

La tecnologia di queste resine scambiatrici di ioni si è enormemente sviluppata in questi ultimi anni per diversi usi industriali e indirettamente per impieghi cromatografici. Le più comuni sono note in commercio con il nome di Amberliti, Zeo-Karb, Dowex e sono caratterizzate con una sigla a seconda della loro capacità scambiatrice. Nel caso si abbiano scambiatori di cationi si tratta di resine fenolo-formaldeide contenenti gruppi solfonici, mentre per gli scambiatori di anioni si hanno resine ammine formaldeide.

CONDEN e GORDON ⁽²³⁾ hanno realizzato con la cromatografia di scambio ionico separazioni di miscele di ammino-acidi con ottimo risultato. A questo scopo essi usano sia resine anioniche che cationiche, e dopo avere fatto passare nella colonna la soluzione da separare; i vari componenti vengono quindi spostati con soluzioni di acidi deboli quali il lattico e l'acetico, oppure con basi come l'idrato di ammonio.

L'analisi delle varie frazioni eluite, al fine di stabilire la presenza

(20) MARCHAL e MITTWER, C. r. Soc. Chim. Biol. 145, 418 (1951).

(21) BERLINGOZZI e SERCHI, Lo Sperimentale, Sez. biol., 3, 1-2 (1952).

(22) GORDON, MARTIN e SYNGE, Biochem. J. 38, 65 (1944).

(23) CONDEN e GORDON, Biochem. J. 46, 8 (1950); PARTRIDGE e WESTALL, Biochem. J. 44, 418 (1949).

e il passaggio dei vari ammino-acidi, viene fatta in base alla misura del *pH* oppure alla conduttività della soluzione e talvolta anche in base a metodi ottici.

Notevole successo ha avuto la cromatografia di scambio nella separazione e purificazione degli acidi nucleici, nella caratterizzazione degli esteri fosforici dell'adenosina come anche nella separazione dei fosfati dei pentosi e degli esosi (24). Ma la più importante applicazione della cromatografia di scambio è l'analisi e la separazione industriale degli isotopi e dei prodotti radioattivi della fissione nucleare: metodi che hanno consentito le separazioni di numerosi isotopi come pure di nuovi elementi come l'americio ed il berkelio, come lo studio delle applicazioni cromatografiche alla chimica inorganica (25).

NUOVI ORIENTAMENTI NELLA CROMATOGRAFIA

METODI BIOLOGICI IMPIEGATI IN CROMATOGRAFIA

Le tecniche biologiche hanno in questi ultimi anni dato un notevolissimo impulso allo sviluppo della cromatografia. Infatti l'impiego dei rivelatori biologici in cromatografia, oltre a rappresentare uno dei sistemi più semplici ed eleganti della biochimica moderna, risulta un metodo molto comodo per localizzare e stabilire rapidamente la presenza di antibiotici e di altre sostanze biologicamente attive. Ad esempio, volendo stabilire la presenza della Vitamina B₁₂ in una cultura oppure in un estratto di fegato, si effettua la cromatografia su carta di un estratto del materiale biologico in esame con n-butanolo. Quindi le strisce si fanno asciugare e si dispongono su una piastra di agar seminata con *Lactobacillus Dörber*. Dopo di che, la piastra si mette in termostato a 37°. La cultura si sviluppa così in modo da formare un visibile alone in corrispondenza alla zona contenente la Vitamina B₁₂, come pure attorno ad un'altra zona contenente timidina (26).

In modo simile si effettua la determinazione delle vitamine del gruppo B₆, in questo caso si impiega il *Saccharomyces Carbergensis* come indicatore biologico; in corrispondenza delle posizioni occupate dal piridossale, piridossamina e piridossina si ha uno sviluppo carat-

(24) McCREDY e HASSID, J. Am. Chem. Soc. 66, 560 (1944); CARTER e COHN, J. Am. Chem. Soc. 72, 2604 (1950).

(25) SPEDDING, « Chromatographic Analysis », Disc. Faraday Soc. (1949) 214.

(26) LESTER SMITH e CUTBERTSON, Biochem. J. 45, XII (1949).

teristico del microorganismo che permette di localizzare queste sostanze e determinarne l' R_F (27).

I due metodi surriferiti si basano sullo sviluppo di un microorganismo in corrispondenza alla presenza di un fattore di crescita. Altri sistemi, come quello di GOODALL e LEVI per le penicilline, sono fondati invece sulla inibizione della crescita dei microorganismi (28). A questo scopo si impiegano carte trattate con una soluzione al 3% di fosfato di potassio e quindi seccate; il cromatogramma viene sviluppato con etere solforico saturo di acqua. Le striscie dei vari cromatogrammi vengono fatte asciugare e quindi disposte su piastre di agar seminate con *Staphylococcus aureus* e poi incubate per alcune ore a 37°. In queste condizioni si ha un anello dovuto all'inibizione presentata dall'antibiotico che si è diffuso dalla carta nell'agar. Anzi, data la coesistenza di più penicilline, si può effettivamente stabilire la presenza e la posizione di queste con un saggio biologico (fig. 15).

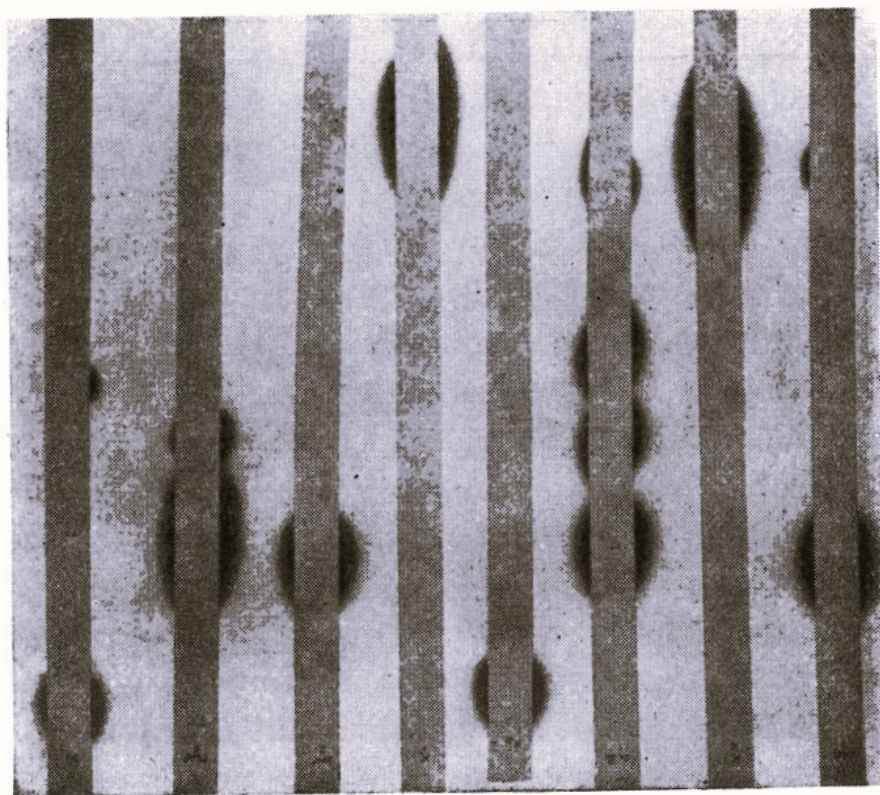


FIG. 15 - Cromatografia su carta di penicilline rivelate con *Staphylococcus aureus*.

Le diverse strisce sono poggiate sulla superficie di un terreno nutritivo di agar seminato con *S. aureus*. Dopo l'incubazione a 37° il fondo appare omogeneo per lo sviluppo del batterio, tranne gli aloni oscuri corrispondenti alle zone di diffusione della penicilina nel mezzo.

(27) WINSTEN e EIGEN, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67, 513 (1948).

(28) GOODALL e LEVI, Nature 158, 675 (1950).

Una tecnica analoga si impiega anche largamente per localizzare gli antibiotici in una colonna cromatografica. A questo scopo si sottopone all'adsorbimento cromatografico l'estratto di una cultura. Si estrude quindi la colonna e la si taglia in varie sezioni che si dispongono su una piastra di agar seminata con *S. aureus*, quindi la piastra viene incubata a 37°. Solo in corrispondenza delle sezioni, sulle quali si è fissato l'antibiotico, si forma un alone dovuto all'inibizione dello sviluppo del batterio.

Applicando i metodi della cromatografia su carta allo studio della tiamina e dei relativi composti fosforilati SPADONI e TECCE [*Quaderni Nutr.* 11, 2 (1950)] hanno potuto disporre di un metodo per studiare l'assorbimento intestinale della tiamina ed in seguito TECCE e GAUDIANO [*Rend. Ist. Sup. Sanità* 13, 730 (1950)] hanno esteso questi studi al tiocromo.

Anche per lo studio degli enzimi e dei substrati la cromatografia è stata feconda di applicazioni e di risultati. ZECHMEISTER e RHODENWALD hanno effettuato la separazione cromatografica di alcuni enzimi (29). Per rivellarli, il substrato specifico è stato applicato alla colonna con il metodo del pennello. Dopo questa operazione la colonna viene tenuta per qualche ora in termostato e quindi viene, con lo stesso sistema, applicato un reattivo capace di dare una reazione cromatica con il prodotto di scissione enzimatica, ad es. una soluzione di iodio nel caso l'enzima sia amilasi ed il substrato una soluzione di amido. In tal modo è possibile mettere in evidenza chiaramente i limiti della zona sulla quale si è fissato l'enzima.

D'altra parte l'aiuto che la cromatografia su carta può dare per seguire i processi di biosintesi sono incalcolabili, in quanto consente di rivelare moltissime trasformazioni rapide di queste sostanze altrimenti difficilmente afferrabili.

BRUNNER, MULLER e PFISTER (30) hanno potuto in questo modo dimostrare la formazione di un dipeptide e quindi di un tripeptide dalla metionina per azione della chimotripsina sull'estere isopropilico della metionina.

Nello studio dei processi enzimatici la cromatografia su carta può essere di grande aiuto. WHITTAKER (31) ha potuto recentemente dimostrare per via cromatografica il meccanismo dell'azione della colinesterasi sulla succinil-colina, ancor meglio che con il metodo di Warburg,

(29) ZECHMEISTER e RHODENWALD, *Enzymologia* 13, 388 (1950).

(30) BRUNNER, MULLER e PFISTER, *Helv. Chim. Acta* 33, 568 (1948).

(31) WHITTAKER, *Experientia* 7, 217 (1951).

mettendo in evidenza con i vapori di iodio i vari prodotti che si formavano.

RADIOISOTOPI IN CROMATOGRAFIA

L'utilizzazione della tecnica degli isotopi radioattivi nella cromatografia su carta ha permesso di aprire nuove vie allo studio biochimico del metabolismo sia delle piante che degli esseri superiori. Infatti con l'impiego di sostanze con atomi marcati e usando i metodi cromatografici per le analisi e le separazioni successive è possibile seguire il metabolismo dei microorganismi, delle piante e degli animali con una sensibilità e una delicatezza di indagine che non è raggiungibile con altri metodi.

In questi metodi la cromatografia su carta consente la separazione rapida dei prodotti del metabolismo. Per stabilire poi la posizione e la natura dei prodotti che hanno atomi marcati, ad es.: il carbonio, l'azoto, lo iodio o lo zolfo, basterà mettere a contatto per qualche tempo il cromatogramma con della carta sensibile ai raggi X. Sviluppando dopo qualche tempo la carta sensibile si noteranno delle tracce, in corrispondenza dei punti radioattivi. Si realizza in tal modo la *autografia* del cromatogramma, che consente di stabilire la posizione e la distribuzione delle sostanze radioattive. Se dopo avere effettuato la *autografia* si sviluppa lo stesso cromatogramma con i metodi normali, si potranno determinare tutte le macchie e il loro R_F per un utile confronto con l'autografia stessa.

Queste tecniche hanno consentito, impiegando anidride carbonica con C^{14} , di studiare nelle piante il ciclo della fissazione del carbonio (32).

Anche il metabolismo dello iodio nella tiroide è stato seguito perfettamente somministrando I^{131} ed effettuando quindi la cromatografia su carta degli idrolizzati della tiroide degli animali trattati.

Nello stesso modo è stato studiato il metabolismo di alcuni acidi negli organismi viventi e soprattutto si può prevedere quale interesse può avere il metodo quando possa essere applicato per spiegare la formazione in natura di sostanze come grassi, alcaloidi, ecc. (33).

Questo procedimento per la sua specificità e per l'elevatissimo potere risolvete costituisce il metodo di indagine più perfezionato per lo studio di sistemi difficili a studiare quali quelli organici viventi, che altrimenti non potrebbero neanche venire aggrediti con i comuni metodi analitici.

(32) CLENDENNING, Arch. Biochem, 27, 75 (1950).

(33) McINTOSH, J. Am. Pharm. Ass. 39, 512 (1950).

Un altro aspetto dell'impiego dei radioisotopi nella cromatografia è il dosaggio quantitativo dei vari componenti di miscele complesse, quali ad esempio degli ammino-acidi. KESTON e Collaboratori (34) per dosare gli ammino-acidi ne preparano i derivati *N-p-I*¹³¹-fenil-solfonati (derivati pipsylici), ne effettuano poi la separazione cromatografica e ne misurano la radioattività delle macchie.

Nel caso di separazione incompleta ed anche per stabilire la natura di miscele non note, si aggiunge una quantità nota del derivato *N-p-S*³⁵-iodofenilsolfonato dell'ammino-acido o degli ammino-acidi da determinare, in modo che se ne può fare il dosaggio dal rapporto I^{131}/S^{35} che si può determinare per mezzo dei comuni sistemi per le sostanze radioattive.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA DEGLI STEREOISOMERI

Un campo nuovo nel quale si sta oggi cimentando la cromatografia è la separazione degli stereoisomeri. Malgrado infatti che i chimici da molti anni fossero convinti della possibilità di queste separazioni, i risultati positivi in questo campo sono piuttosto limitati sebbene si facciano intravedere nuovi ulteriori progressi.

Come è noto, gli antipodi ottici non possono venire separati in base alle loro proprietà fisiche da un mezzo isotropo, ma saranno invece separabili miscele di diastereoisomeri, in quanto le proprietà fisiche di questi, non essendovi specularità come negli antipodi ottici, non sono identiche.

Un esempio di separazione di due antipodi ottici su un mezzo anisotropo è stato dato da HENDERSON e RULE che sono riusciti a scindere la *p*-fenilenbis-immينو-canfora per ripetuti adsorbimenti su una colonna di lattosio. E' da notare che il metodo non è di importanza pratica in quanto, per scindere 30 milligrammi di racemo, sono occorsi 5 litri di etere di petrolio benzolo e 6 kg. di lattosio (35).

Il primo esempio pratico della separazione di una miscela di due diastereoisomeri è stato dato da STOLL e HOFFMANN (36) che sono riusciti a scindere su una colonna di allumina la *d*-isopropanol-ammide dell'acido-*l*-lisergico dalla *d*-isopropanol-ammide dell'acido *d*-lisergico.

Di grande interesse è la risoluzione realizzata da PRELOG (37) di una base racemica — cioè senza ricorrere alla formazione di una coppia di diastereoisomeri per salificazione — con l'impiego di una colonna di

(34) KESTON e Coll., J. Am. Soc. 72, 748 (1950).

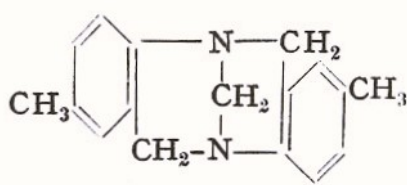
(35) HENDERSON e RULE, J. Chem. Soc. 1939, 1568.

(36) STOLL e HOFMANN, Z. physiol. Chem. 251, 155 (1938).

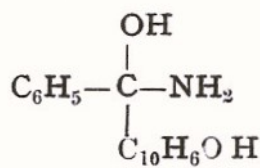
(37) PRELOG e WIELAND, Helv. Chim. Acta 27, 1127 (1944).

un adsorbente otticamente attivo. Infatti il PRELOG ha potuto isolare dalla base di TRÖGER racemica disciolta in etere di petrolio su una colonna di acido d-tartarico o meglio di lattosio degli eluati rispettivamente destrogiri e levogiri, dai quali ha potuto ottenere per cristallizzazione i due antipodi puri.

Di notevole interesse teorico e pratico è la recente esperienza di BONINO e CARASSITI, che sono riusciti a realizzare la separazione di due antipodi ottici a mezzo della cromatografia su carta ⁽³⁸⁾. A questo scopo gli AA. impiegano come fase stazionaria fenolo fissato sulla carta e come fase mobile una soluzione acquosa concentrata di acido d-tartarico. Le esperienze sono state effettuate sulla base di BETTI, β -naftol-benzilamina; hanno dato risultati molto netti consentendo la separazione dei due antipodi in 5-10 ore.



Base di TRÖGER



Base di BETTI

Un ulteriore progresso in questo campo è stato portato dai lavori di BERLINGOZZI, ADEMBRI e SERCHI ⁽³⁹⁾, che hanno dimostrato la possibilità di scindere nei suoi antipodi ottici l'acido α -fenil-ammino-acetico, impiegando come fase stazionaria il fenolo e come fase mobile una soluzione di acido canfo-10-solfonico.

E' possibile intravedere che per tale via sia realizzabile in modo abbastanza semplice e facile la separazione di tutti gli ammino-acidi.

Autori giapponesi, che in questi ultimi mesi si sono occupati di questo problema, sono giunti anche essi alla separazione degli ammino-acidi racemi con la cromatografia su carta, impiegando un solvente otticamente attivo quale la 1-metil- β -fenil-isopropil-ammina ⁽⁴⁰⁾.

La conseguenza più interessante delle numerose esperienze effettuate da KOTAKE e Collaboratori è che la separazione degli ammino-acidi racemi non è affatto legata al carattere ottico del solvente impiegato, perchè gli stessi risultati si possono ottenere sia impiegando la d-l-metil-fenilisopropilammina, cioè sia la base racema che l'antipode destrogiro.

E' ancora prematuro trarre deduzioni da queste esperienze che sono

⁽³⁸⁾ BONINO e CARASSITI, Rend. Acad. Lincei (8), 9, 229 (1950).

⁽³⁹⁾ BERLINGOZZI, ADEMBRI e SERCHI, Lo Sperimentale, 2, 79-89 (1951).

⁽⁴⁰⁾ KOTAKE, NAKAMURA, SAKAN, SENOH, J. Am. Chem. Soc. 73, 2973 (1951).

ancora in completa evoluzione, però è interessante notare che questi Autori ammettono che la causa prima di questa risoluzione di racemi sia dovuta al carattere asimmetrico della cellulosa stessa; come si vede non si è molto lontani dal caso di colonne di prodotti otticamente attivi quali il lattosio e l'acido d-tartarico impiegati sia dall'HENDERSON che dal PRELOG,

Sempre nel campo della separazione di antipodi ottici, un'osservazione di notevole interesse è quella di G. DI MODICA ed E. ANGELETTI ⁽⁴¹⁾ che hanno realizzato su colonna di lattosio la separazione degli antipodi ottici della serie del ditolile non contenenti atomi di carbonio asimmetrici.

Notevolmente più semplice si presenta la separazione degli isomeri cis-trans, anche quando di legami etilenici, e quindi di possibilità di isomeria, ve ne siano più di uno in una stessa molecola, come avviene con i polieni. ZECHMEISTER e la sua scuola per circa un decennio si sono dedicati a questo lavoro con grande successo ⁽⁴²⁾ ed hanno potuto realizzare la scissione cromatografica di molte sostanze che altrimenti erano ritenute uniche come alcuni caroteni e altri polieni. Queste separazioni sono state realizzate generalmente su colonne di allumina. Malgrado il numeroso materiale sperimentale a disposizione non si possono ancora dedurre molte regole generali; ad esempio, nel caso delle bixine isomere l'isomero cis viene più fortemente trattenuto dalla colonna di allumina che non l'isomero trans. Infatti in questi casi più che la posizione relativa dei doppi legami nella molecola l'adsorbimento selettivo sembra venga determinato soprattutto dalla simmetria generale della molecola.

LA CROMATOGRAFIA DELLE SOSTANZE INORGANICHE

Quando si parla di cromatografia si ha soprattutto l'impressione di un metodo specifico per lo studio delle sostanze organiche. Questo non significa che non siano state effettuate numerose applicazioni alla analisi e alla separazione delle sostanze inorganiche; dipende soprattutto dal fatto che gli essenziali risultati della cromatografia delle sostanze organiche hanno fatto passare in seconda linea gli importanti risultati della cromatografia delle sostanze inorganiche.

E' ben noto che la cromatografia su colonna di allumina delle sostanze inorganiche viene perfettamente realizzata; dobbiamo a questo

(41) G. DI MODICA e E. ANGELETTI, *Ricerca scientifica* 22, 715 (1952).

(42) ZECHMEISTER, *Ann. New York Acad. Science* 49, 220 (1948).

proposito ricordare che in Italia SACCONI ⁽⁴³⁾ si è con particolare successo dedicato allo studio dei processi che avvengono sulle colonne stesse, mentre VENTURELLO si è occupato di molte separazioni di cationi ⁽⁴⁴⁾.

In questi ultimi anni si sta sviluppando la cromatografia su carta delle sostanze inorganiche, tecnica che, malgrado non indifferenti difficoltà, si va progressivamente affermando ⁽⁴⁵⁾.

Bisogna ricordare, tra i primi che hanno impiegato questi sistemi, LINSTEAD e Collaboratori che hanno effettuato la separazione su carta di vari gruppi di cationi — ad es. metalli alcalino-ferrosi — con l'impiego di solventi organici. I fenomeni che interverrebbero in questa separazione possono essere, a seconda dei casi, estrazione selettiva, formazione di complesse e adsorbimento selettivo di ioni da parte della carta ⁽⁴⁶⁾.

Recentemente POLLARD, Mc OMIE e Collabor. ⁽⁴⁷⁾ hanno proposto un metodo sistematico per la separazione su carta di un numero notevole di cationi fondato sul principio di trasformare i sali dei cationi (generalmente cloruri e nitrati) in complessi organici, con l'impiego di benzoilacetone, antipirina o altri chetoni e usando per lo sviluppo comuni solventi della cromatografia su carta quali il butanolo-acqua, la collidina-acqua, ecc. Si viene, a rigore, ad avere la cromatografia non già di cationi ma di un complesso metallo-organico. Come rivelatori delle macchie il POLLARD ha proposto un reattivo fluorescente costituito da una miscela di acido kojico-8-ossi-chinolina. Esso ha la proprietà di rendere visibili le macchie alla luce ultravioletta, sia come punti fluorescenti che come punti scuri con elevata sensibilità. Tale metodo ha il vantaggio di consentire la separazione di molti cationi, anche senza che questi siano stati previamente sottoposti alla separazione in gruppi.

Recentemente lo stesso POLLARD ha intrapreso lo studio per la separazione su carta degli anioni.

Tra gli altri metodi proposti per la cromatografia su carta delle sostanze inorganiche vanno ricordati i procedimenti bidimensionali per la separazione degli elementi dei gruppi I, II e III.

Malgrado questi risultati, e la possibilità di impiegare con questi sistemi quantità di sostanze piccolissime, l'importanza della cromato-

(43) SACCONI, Gazz. Chim. Ital. 78, 683 (1948); 79, 141 (1949); « Chromatographic Analysis », Disc. Faraday Soc. (1949) 173.

(44) G. VENTURELLO, Ann. chim. applicata 30, 220 (1940).

(45) M. LEDERER, R. Australian Chem. J. 17, 308 (1950).

(46) ARDEN, BURSTALL DAVIES, LEWIS e LINSTEAD, Nature 162, 691 (1950).

(47) POLLARD McOMIE e STEVENS, J. Chem. Soc. 1951, 466, 771; Endeavour 10, 213 (1951).

grafia su carta delle sostanze inorganiche non si può paragonare ancora a quella delle sostanze organiche.

Una rivoluzione fondamentale nell'utilizzazione della cromatografia per le sostanze inorganiche è stata l'applicazione della cromatografia di scambio alla separazione delle terre rare e degli isotopi radioattivi.

Come si è già accennato, si deve a questi sistemi la possibilità pratica di separare queste sostanze in modo quanto mai semplice sia sul piano analitico che su quello industriale. I primi lavori su questo argomento, compiuto da un gruppo di chimici fin dal 1942 in relazione alla produzione dell'energia atomica, furono pubblicati nel 1947. L'idea di separare per via cromatografica le terre rare non era nuova in Italia, infatti CROATTO aveva realizzato la concentrazione del lantanio fin dall'anno 1941 ⁽⁴⁸⁾.

Il gruppo dei chimici di Clinton, negli studi effettuati per la separazione di miscele di ittrio e cerio su una resina scambiatrice di ioni quali l'Amberlite IR-1, introdussero un nuovo principio: l'eluizione del catione fissato sulla resina viene effettuato non già con un acido bensì con una soluzione di acido citrico e citrato di ammonio. Infatti siccome le terre rare formano complessi molecolari con l'acido citrico, la loro eluizione sarà legata alla costante di equilibrio dei complessi delle singole terre rare, costanti che pur differendo poco tra loro consentono una separazione abbastanza netta dei vari elementi ⁽⁴⁹⁾.

Lo stesso principio è stato applicato alla separazione degli isotopi radioattivi: così sono stati separati il neodimio e l'elemento 61. Gli eluati in queste tecniche vengono analizzati rispetto alla loro radioattività, in modo che, riportando la variazione di radioattività in funzione del numero di centimetri cubici eluiti, si possono seguire facilmente le diverse frazioni contenenti i vari isotopi. In questo caso rimane stabilito che l'ordine di eluizione è inversamente proporzionale al numero atomico, in modo così rigido che è anche possibile riconoscere un elemento o un isotopo dal posto che esso occupa nella serie dell'eluizione. La sensibilità di questo metodo è di 0,1-1 curie.

Oltre agli isotopi radioattivi e alle terre rare isolati dai processi nucleari, SEABORG pubblicava lo scorso anno dettagli dell'isolamento di tre nuovi elementi, il berkelio, il curio e l'americio, a mezzo della cromatografia di scambio su resine (Dowex 50) con l'impiego di acido cloridrico come eluente, che ha la capacità di formare complessi solo con

(48) CROATTO, *Ricerca Scient.* 12, 1197 (1941). *Atti R. Ist. Veneto Scienz. Belle Arti* 102, II 103 (1943).

(49) cfr. tutto il gruppo dei lavori compresi tra pag. 2769 e pag. 2874 del *J. Am. Chem. Soc.* vol. 69 del 1948 a nome dei numerosi autori del gruppo di Clinton.

gli attinidi e non con i lantanidi e la successiva separazione dei primi con eluenti a base di acido citrico-citrato di sodio a diversi pH ⁽⁵⁰⁾.

Queste tecniche, passate dal laboratorio analitico alla fase di preparazione industriale, consentono oggi la completa utilizzazione dei prodotti di fissione nucleare come pure la separazione e la preparazione di un numero notevole di isotopi allo stato puro.

NUOVI ORIENTAMENTI DELLA CROMATOGRAFIA SU CARTA

Recentemente sono state introdotte nella cromatografia su carta numerose ed interessanti varianti; ad esempio è stato proposto di effettuare l'operazione a bassa temperatura tra 0 e 5°C in modo da ottenere R_F più netti ⁽⁵¹⁾.

Un altro campo nel quale si è decisamente orientata la cromatografia su carta è la tecnica delle carte trattate. Il principio è di sostituire l'acqua, che costituisce la fase stazionaria della carta, con altro solvente. Questi sistemi sono stati impiegati al fine di realizzare la separazione degli steroidi ed in particolare quella dei corticosteroidi.

ZAFFARONI e Collaboratori hanno proposto a questo scopo di usare carte trattate con formammide o glicol propilenico, che vengono così a costituire la fase stazionaria, e come fase mobile benzolo o toluolo ⁽⁵²⁾.

E' possibile con questi accorgimenti intravedere un ben più largo campo di applicazione della cromatografia su carta, dato che il ricercatore non è legato alla sola fase stazionaria costituita dall'acqua adsorbita sulla carta, ma ad una gamma molto vasta di altri solventi.

Nel caso dei corticosteroidi questo sistema consente non solo una buona separazione dei vari componenti, ma altresì di eliminare le macchie non nette le così dette « tailing » che potremmo tradurre « comete » che renderebbero altrimenti inutilizzabile il cromatogramma.

REICHSTEIN ha recentemente esteso questo sistema allo studio e alla separazione dei glucosidi e degli agliconi del gruppo dello strofanto usando carte trattate con formammide e come solvente benzolo. I cromatogrammi venivano in questo caso rivelati con una soluzione alcalina di dinitrobenzolo, che dà una colorazione solo con quegli steroidi che possiedono un anello lattonico pentatomico come quello del gruppo dello strofanto ⁽⁵³⁾. E' con questo sistema che il REICHSTEIN ha portato

(50) STREET e SEABORG, J. Am. Chem. Soc. 72, 2790 e 2798 (1950); THOMPSON, CUNNINGHAM e SEABORG, Ind. Eng. Chem. 42, 1307 (1950).

(51) GIRI e PRASAD, Nature 168, 786 (1951); BANDURSKY e AXELROD, J. Biol. Chem. 193, 405 (1951).

(52) ZAFFARONI, Science 111, 6 (1950); J. Biol. Chim. 177, 109 (1949); J. Am. Chem. Soc. 72, 4330 (1949).

(53) REICHSTEIN e SCHINDLER, Helv. Chim. Acta 34, 108 (1951).

a termine, con una rapidità non consentita con altri metodi, l'esame qualitativo degli estratti di semi di moltissime piante africane del genere *Strophantus* nell'intento di ritrovare la sarmentogenina, già scoperta anni or sono in una pianta non bene definita di questo genere, e che è una importante materia prima per la preparazione del cortisone.

Una estensione della tecnica delle carte trattate è la cromatografia su carta con inversione di fase; cioè la fase stazionaria in questo caso viene ad essere costituita da un solvente non polare e la fase mobile da una soluzione acquosa.

TISELIUS a questo scopo rende idrofoba la carta impregnandola con una miscela di silicone in cicloesano e poi facendola seccare in una stufa a 110° per un'ora; come fase mobile per gli steroidi si impiega una miscela di alcool-acqua e cloroformio (54).

APPLICAZIONI E PROSPETTIVE NUOVE DELLA CROMATOGRAFIA

Nella ricerca scientifica di ogni giorno la cromatografia, oltre che a fornire delicatissimi metodi analitici per riconoscere e anche per determinare quantitativamente numerosi composti, ci offre anche un metodo per stabilire la presenza di nuovi composti naturali. Bisogna a questo proposito ricordare che appunto con una cromatografia su carta fu ritrovato per la prima volta un trisaccaride formatosi per sintesi enzimatica dal glucosio, ed altri composti ancora nel campo degli zuccheri (55).

Tra gli amminoacidi ottenuti dai diversi liquidi organici ne sono stati in questi ultimi anni ritrovati dei nuovi appunto con metodi di cromatografia su carta.

Nel campo delle sostanze naturali la cromatografia su carta è diventata di un'estrema utilità per il riconoscimento e l'individuazione di nuove sostanze.

D'altra parte le applicazioni della cromatografia alle analisi correnti si fanno sempre più frequenti. Tra l'altro un importante rapporto di SCHROEDER (56) ci informa che nell'ultimo conflitto mondiale la cromatografia è stato un mezzo di somma importanza per l'analisi qualitativa e quantitativa rapida delle polveri esplosive, specialmente efficace se viene abbinata con l'analisi spettrofotometrica degli eluati. In questo

(54) KRITCHEVSKY e TISELIUS, *Science* 114, 299 (1951).

(55) BLANCHARD e ALBON, *Arch. Biochem.* 29, 220 (1950).

(56) SCHROEDER, *Ann. New York Ac. Scienze* 49, (1948).

modo è stato possibile agli Americani durante l'ultimo conflitto mondiale di analizzare rapidamente miscele esplosive molto complesse usate dai Tedeschi e che venivano a cadere nelle loro mani.

Se queste applicazioni possono essere di utilità per i chimici esplosivisti, la cromatografia è anche importante per gli altri chimici in quanto fa prevedere con questo sistema la possibilità di affrontare analisi sistematiche di miscele molto complesse.

Un'altra applicazione pratica di grande importanza è la cromatografia su carta di estratti di urina e di sangue dovuta soprattutto al DENT, che permette di mettere in evidenza rapidamente la presenza di fattori normali e patologici. Il DENT stesso, che in questo campo ha portato un contributo decisivo, ha in questo modo stabilito la presenza di amminoacidi fino ad ora sconosciuti (57).

Una estensione alla cromatografia della elettroforesi, realizzata dallo stesso TISELIUS con un apparecchio della massima semplicità, consente la separazione su carta di proteine come tali e non di idrolizzati come era fino ad ora avvenuto (58).

L'impiego delle così dette cromatopile, insieme di dischi sovrapposti e pressati in una colonna cromatografica, consente di utilizzare a fini preparativi la cromatografia su carta (59). Qualora si riescano a superare le difficoltà di ordine pratico che ancora rendono complessa questa tecnica si avrà a disposizione un importante sistema per la separazione delle sostanze organiche.

Ancora nel campo della farmacognosia e della tossicologia la cromatografia viene con successo impiegata per la separazione ed il riconoscimento dei principî attivi delle droghe. Bisogna qui ricordare i brillanti lavori di COVELLO per la separazione cromatografica dei principî attivi della *Canabis indica* e del loro successivo dosaggio (60).

Si è accennato già all'interesse industriale dei metodi cromatografici che oggi oltre alla separazione e alla concentrazione di sostanze vitaminiche consentono la preparazione di terre rare e di isotopi radioattivi.

E' veramente sorprendente constatare l'importanza oggi assunta da un procedimento di laboratorio che, pur costituendo uno dei metodi

(57) DENT, «Symposium on Chromatography» - Cambridge 1948, Exp. Ann. Bioch. Medicae 13, 79 (1951).

(58) TISELIUS, Journ. Gen. Phys. 35, 89 (1951).

(59) ZECHMEISTER, Science 113, 35 (1951); BURSTALL, DIVIES e WELLS, «Chromatographic Analysis» (loc. cit. a nota 25) 179.

(60) COVELLO, Farmaco 3, 7 (1948).

più raffinati di cui dispone l'indagine chimica, è caratterizzato da una grande semplicità e direi quasi rudimentalità di mezzi.

I risultati fino ad oggi raggiunti, il fervore delle ricerche, il superamento quotidiano delle mete raggiunte, ci fanno comprendere come questo tema sia ben lungi oramai dall'essere esaurito, e che esso ci potrà aprire nuove vie e nuovi orizzonti per farci meglio conoscere il mondo che ci circonda ⁽⁶¹⁾.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica terapeutica.

(61) Inoltre sui metodi della cromatografia si potranno consultare, oltre agli ottimi testi dello STRAIN, del CASSIDY e dello ZECHMEISTER, le seguenti rassegne monografiche di aggiornamento:

STRAIN, *Analytical Chem.*, 23, 25 (1951).

BOULANGER e BISERTE. «*Chromatographie de partage*», in *Exp. Annuels de Biochimie Médicale* 11, 53 (1950).

CRAMER, «*Papierchromatographie*», *Angewandte Chemie*.