

52. Carla JACOBELLI TURI. — **Analisi delle tinture per capelli. —**
Nota III. Osservazioni e avvertenze sulla cromatografia delle
ammine aromatiche.

Riassunto. — Dopo aver descritto una vaschetta per cromatografia di dimensioni ridotte, l'A. mostra i vantaggi che questo piccolo apparecchio presenta, specialmente per sostanze facilmente ossidabili quali sono certe diammine aromatiche e certi ammino-fenoli.

L'A. espone poi alcune osservazioni e avvertenze riguardanti la formazione di code o comete durante la cromatografia delle sostanze facilmente ossidabili e suggerisce alcuni modi per evitarle o almeno ridurle al minimo.

L'A. richiama poi l'attenzione degli sperimentatori sul fatto che, quando si cromatografano soluzioni acide di alcune ammine si hanno macchie con Rf corrispondenti a quelle della base libera o se la soluzione conteneva acidi forti, anche macchie di Rf diversi, generalmente più basse, corrispondenti a quelle dei loro sali.

Viene infine richiamata l'attenzione degli sperimentatori (quando devono riferire i valori degli Rf che hanno trovati) sulle necessità di indicare sempre chiaramente in quali condizioni hanno ottenuto i loro dati, se cioè li hanno determinati con la cromatografia ascendente o discendente, in quali solventi hanno fatto le loro determinazioni, la qualità della carta impiegata ecc.: tutte avvertenze banali che qualche volta vengono però dimenticate e possono allora dar luogo a equivoci.

Viene poi riportata una tabella contenente i valori degli Rf delle sostanze che più spesso si ritrovano nelle tinture per capelli, che è la tabella che l'A. tiene sempre a portata di mano per comodità.

Un'altra tabella viene infine riprodotta (fuori testo) contenente gli spot-tests colorati di alcune sostanze, in aggiunta alle tabelle riferite nella Nota II.

Résumé. — Après avoir décrit une cuvette à dimensions réduites pour chromatographie, l'auteur explique les avantages présentés par ce petit appareil surtout en ce qui concerne des substances facilement oxydables telles que certaines amines aromatiques et certains aminophénols.

L'auteur fait quelques observations et quelques remarques concernant la formation de queues ou comètes au cours de la chromatographie des substances facilement oxydables et suggère des méthodes pour les éviter ou, au moins, les réduire au minimum.

L'auteur attire l'attention des expérimentateurs sur le fait que lorsqu'on effectue la chromatographie de solutions acides de certaines ammines on obtient des tâches ayant un Rf correspondant à celui de la base libre ou, si la solution contenait des acides forts, aussi des tâches en général plus basses ayant des Rf différents, correspondants à celles de leurs sels.

On attire enfin l'attention des expérimentateurs (lorsque ils doivent donner les valeurs trouvées des Rf) sur la nécessité d'indiquer toujours clairement quelles sont les conditions dans lesquelles ils ont obtenu les données; c'est à dire, s'ils les ont déterminées par chromatographie ascendante ou descendante, dans quels solvants leurs déterminations ont été faites, la qualité du papier employé etc.: il s'agit là de mesures banales qui toutefois sont de temps en temps oubliées et qui peuvent engendrer des équivoques.

On donne aussi un tableau contenant les valeurs des Rf des substances les plus communes, qui est le tableau que l'auteur tient toujours à la portée de sa main pour commodité.

Un autre tableau encore est reproduit (hors texte) donnant les spot-tests colorés de quelques substances, s'ajoutant aux tableaux joints à la Note II.

Summary. — A chromatography rank of reduced dimensions is described and the advantages which it possesses, particularly for readily oxidable substances such as certain aromatic amines and amino-phenols, are outlined. Certain observations and precautions are described concerning the formation of tails during the chromatography of readily oxidable substances and some ways of avoiding this or at least reducing it to a minimum, are suggested. Attention is also drawn to the fact that with some bases, spots are obtained corresponding not only to the free base but, when acidic solutions by strong acids are used, also to their salts giving generally lower spots with different Rf. Again the importance is emphasised of clearly stating, when quoting Rf values, the exact conditions employed to obtain the figures whether ascending or descending chromatography, the solvents used, the type of paper etc. All the trivial precautions which are some times forgotten simply because of their triviality, can give rise to misunderstandings.

A table of the Rf values of the most common substances is presented. This table the author always keep ready to hand for convenience. Another table, finally reproduced outside the text contains colour spot-tests for each substance in addition to the table referred to in Note II.

Zusammenfassung. — Nachdem er eine kleine Wanne für die Chromatographie in kleinem Umfange beschrieben hat zeigt der Verfasser die Vorteile die dieser kleine Apparat darbietet, hauptsächlich für leicht oxydierende Substanzen, wie zum Beispiel einige aromatischen Diamine und einige Aminophenole.

Der Verfasser legt einige Beobachtungen und Bemerkungen dar in Bezug auf die Bildung der Schweife oder Komete während der Chromatographie der leicht oxydierenden Substanzen und gibt einige Ratschläge zur Vermeidung oder mindestens zur Herabsetzung bis ins kleinste derselben.

Der Verfasser lenkt dann die Aufmerksamkeit der Forscher auf die Tatsache, dass man, bei der Chromatographie der Säurelösungen einiger Amine, Flecken mit R_f hat, korrispondierend mit diesen der freien Base, oder wenn die Lösung starke Säuren enthielt, auch Flecken mit verschiedenen R_f , meistens niedriger als ihre Basen.

Schliesslich wird die Aufmerksamkeit der Forscher (wenn sie über die Werte des R_f , die sie gefunden haben, berichten müssen) auf die Notwendigkeit gelenkt immer klar anzugeben unter welchen Bedingungen sie Ihre Daten erhalten haben, das heisst ob Sie sie mit der aufsteigenden oder absteigenden Chromatographie bestimmt haben, die Qualität des verwendeten Papiers usw: alle banalen Bemerkungen, die leider manchmal vergessen werden und die dann zu Missverständnissen führen können. Dann wird eine Tabelle gebracht die die R_f - Werte der bekanntesten Substanzen enthält, dies ist die Tabelle die der Verfasser zu seiner Bequemlichkeit immer griffbereit hat.

Schliesslich wird eine andere Tabelle gebracht (nicht im Test) die die gefärbten spot-tests einiger Substanzen enthält, zusätzlich der Tabellen der Note II.

Nella esecuzione delle analisi delle tinture per capelli delle quali da qualche tempo mi occupo, valendomi dei metodi di cromatografia su carta, specialmente quando nelle sostanze da analizzare erano contenute certe diammine aromatiche, ebbi occasione di notare alcuni fatti un po' fuori dell'ordinario per i quali mi fu necessario cercare una spiegazione e trovare gli opportuni rimedi.

Sia nelle mie Note precedenti (1 e 2) sia in un'altra che ho in corso di stampa, la discussione di queste questioni di indole generale avrebbe costituito una divagazione che, rompendo la linearità della esposizione, sarebbe stata nociva alla chiarezza della descrizione dei metodi di analisi da me messi in opera.

Perciò ho creduto opportuno esporre in questa Nota separata alcune osservazioni che ho fatte sul comportamento cromatografico delle diammine aromatiche e anche di alcuni loro derivati e degli amminofenoli, tutte sostanze facilmente ossidabili per le quali era prevedibile che si dovessero mettere in opera alcuni accorgimenti speciali. Quello che ho osservato sul comportamento cromatografico delle diammine aromatiche può tuttavia essere utile anche per altre sostanze. Per questo mi decido a pubblicare a parte le mie osservazioni anche se queste possono sembrare banali.

ATTREZZATURA. — Per la esecuzione delle analisi descritte nelle mie Note precedenti usai sempre una comune vaschetta cromatografica di $30 \times 38 \times 55$ cm adatta per cromatografie discendenti con fogli di carta Whatman N. 1 di misura 30×48 . Già nella Nota II riferii che avevo provato anche a fare cromatografie ascendenti su carta utilizzando una larga provetta di vetro invece della vaschetta.

Oggi uso comunemente un altro piccolo apparecchio (che si potrebbe chiamare micro-cromatografico) (vedi Figura 1) costituito da una vaschetta di vetro rettangolare di misura $9 \times 15 \times 18$ cm sulla quale è appoggiata una lastra di resina di 12×18 cm circa che in corrispondenza

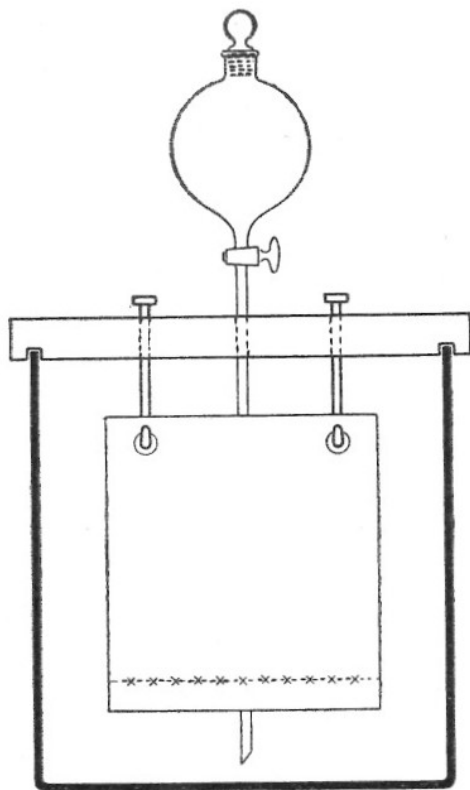


Fig. 1

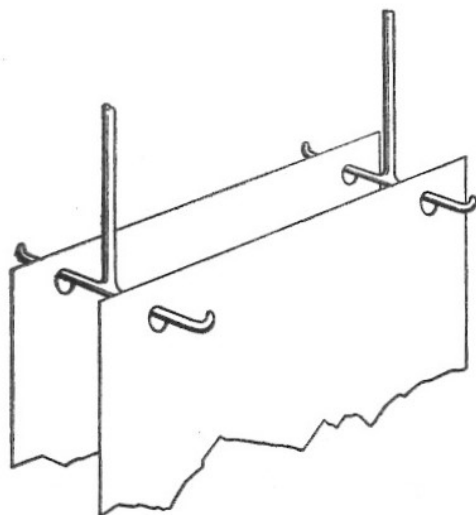


Fig. 2

Microvaschetta per cromatografia

dell'orlo della vaschetta ha una scanalatura che si incastra sull'orlo stesso assicurando una sufficiente tenuta.

In questa lastra di resina che fa da sostegno sono infilate due bacchette di vetro abbastanza grosse all'estremità di ognuna delle quali, nell'interno, è saldata una sbarretta orizzontale (di vetro o di platino) lunga 3-4 cm circa leggermente incurvata in modo da farla somigliare ad un'ancora: la distanza fra le due ancore è di circa 8-9 cm.

Alle 4 punte delle due ancore si appendono due fogli di carta Schleicher e Schüll N. 2043 MgJ tagliati nella misura di 12×12 cm. Sulle punte, ai margini di ogni foglio, si ritagliano due fori che servono a infilare la carta sui rami delle ancorette in modo che un foglio resta appeso alla punta davanti a destra di una ancoretta e alla punta davanti a sinistra dell'altra ancoretta e l'altro foglio alle corrispondenti punte di dietro (vedi Figura 2).

Sulla lastra di resina viene infilato anche un imbuto a rubinetto che pesca fino in fondo alla vaschetta. I tre buchi della lastra attraverso due dei quali passano i gambi delle ancorette e quello attraverso il quale passa il gambo del separatore sono disposti in modo da formare un triangolo.

In fondo alla vaschetta si pone prima un piccolo strato di solvente: poi si appoggia sulla vaschetta stessa la lastra di resina con i fogli appesi infilati nelle rispettive ancorette, preparati prima con le sostanze in esame, fissando le gocce di liquido da cromatografare a distanza di circa 1 cm l'una dall'altra lungo una linea (punteggiata) distante circa 1 cm dall'orlo inferiore del foglio. Si lasciano i fogli in questo ambiente per 20-30 minuti affinché la carta si saturi dei vapori del solvente stesso. Allora dall'imbuto a rubinetto si lascia cadere nella vaschetta altro solvente finché questo non venga a contatto col bordo inferiore della carta che era sospesa a 2 cm circa dal fondo della vaschetta. Dopo circa un'ora il solvente è salito di circa 7-8 cm e si può togliere il foglio dalla vaschetta.

Trattandosi di una vera microcromatografia, è bene prelevare con un capillare di vetro le gocce delle soluzioni in esame in modo che occupino sulla carta una piccola area.

In questo modo si possono avere rapidamente risultati comparabili a quelli che si hanno con le vaschette grandi in cromatografia ascendente con lo stesso solvente e con lo stesso tipo di carta.

Questo mio piccolo apparecchio permette di eseguire cromatografie anche bidimensionali in poche ore, invece che impiegare un'intera giornata e anche di più, come avviene normalmente quando si fanno cromatografie con la vaschetta grande. Ne viene di conseguenza che le so-

stanze facilmente ossidabili (come sono appunto certe diammine aromatiche e certi ammino-fenoli) hanno poco tempo per ossidarsi e quindi non lasciano lunghe code come avviene con la vaschetta grande.

Questo piccolo apparecchio che oggi uso comunemente costituisce veramente un vantaggio sui metodi comuni non solo per la rapidità con cui si può operare ma anche per l'economia del materiale e per il poco ingombro sui banchi di lavoro, senza per questo essere inferiore per esattezza ai metodi comuni anche se applicato a quantità minime di sostanze.

CODE O COMETE. — E' noto che molte sostanze (e non solo le para-fenilen-diammine) lasciano dietro la macchia terminale una striscia più o meno marcata che costituisce quella che in linguaggio di laboratorio si chiama *coda* o *cometa*. Queste code (quando non sono dovute ad impurità delle sostanze esaminate) sono da attribuirsi generalmente alla formazione di prodotti di trasformazione della sostanza in esame che prendono origine durante la diffusione della sostanza sul foglio, tanto più nel mio caso in cui si tratta di sostanze facilmente ossidabili come certe diammine aromatiche o certi ammino-fenoli.

Era facile pensare che mentre la p-fenilen-diammina percorre il suo cammino sul foglio durante la cromatografia, essa si ossidi formando prodotti di ossidazione che non si diffondono o si diffondono lentamente e che di mano in mano che si formano restano fissati sulla carta, mentre la fenilen-diammina continua a diffondersi lasciando più in basso una nuova quantità di prodotti di ossidazione e quindi una serie di nuove macchie. Sottoponendo infatti alla cromatografia una goccia di una soluzione di fenilen-diammina che avevo prima lasciato ossidare all'aria, si avevano queste code molto più marcate, alterando anche l'Rf finale.

Questo inconveniente si potrebbe forse eliminare o almeno ridurre al minimo se l'atmosfera della vaschetta fosse costituita da un gas inerte (per es. azoto) ma ciò avrebbe resa necessaria un'apparecchiatura più o meno complicata, mentre io per sistema ho sempre cercato di evitare le complicazioni.

Un vantaggio l'ottenni (come accennai anche nella mia Nota I) apportando sulla carta insieme alla goccia di sostanza da analizzare anche una goccia di soluzione di idrosolfito sodico. Questo sale non reagisce con le ammine e con gli ammino-fenoli ma per la sua azione riducente ostacola la formazione dei prodotti di ossidazione.

Con questo accorgimento ottenni dalle fenilen-diammine e dagli ammino-fenoli dei buoni cromatogrammi senza code o almeno con coda poco marcata.

Un altro metodo che praticamente ho riscontrato semplice e vantaggioso consiste nel mettere a contatto con un po' di carbone animale le soluzioni di queste sostanze facilmente ossidabili, riscaldando rapidamente il liquido fin quasi a farlo bollire e filtrando subito dopo che è cominciata l'ebollizione. Il carbone assorbe i prodotti di ossidazione colorati che la sostanza conteneva: dopo filtrazione si ha una soluzione perfettamente incolore che quando viene fissata sulla carta resta incolore. Se si usa il mio piccolo apparecchio sopra descritto per mezzo del quale si può compiere una cromatografia in breve tempo, queste sostanze non hanno tempo di ossidarsi e quindi lasciano macchie molto nette senza code.

Questo accorgimento è importante specialmente per gli ammino-fenoli che hanno una tendenza particolare ad ossidarsi e a dare code colorate, le quali possono nascondere le macchie che altre sostanze possono lasciare: per es. la macchia del 2,4-diammino-fenolo (R_f 0,42) che resta nascosta dalla coda della macchia (R_f 0,57) del para-ammino-fenolo.

Credo che questo sistema sia applicabile in generale ad altre sostanze facilmente ossidabili, purché non siano esse stesse assorbite dal carbone animale.

CROMATOGRAFIA DEI SALI DELLE AMMINE AROMATICHE. — Più volte ebbi occasione di osservare che sottoponendo alla cromatografia su carta una soluzione contenente p-fenilen-diammina si aveva comunemente la caratteristica macchia a $R_f = 0,48$ ma qualche volta appariva invece una macchia a $R_f = 0,17$ e qualche volta si avevano contemporaneamente l'una e l'altra. Questa seconda macchia della para-fenilen-diammina con $R_f = 0,17$ spesso non si vedeva perché rimaneva nascosta nella coda che la para-fenilen-diammina lascia quando non si cromatografa con le precauzioni indicate nel paragrafo precedente. Dopo aver trovato il modo per evitare o almeno per ridurre al minimo le code, mi accorsi che la para-fenilen-diammina lasciava soltanto la macchia a $R_f = 0,48$ quando si sottoponeva alla diffusione cromatografica la para-fenilen-diammina base e lasciava invece la macchia a R_f 0,17 quando si faceva la cromatografia di una soluzione di para-fenilen-diammina fortemente acida per acido cloridrico. Era facile pensare allora che le macchie a R_f 0,17 fossero dovute al cloridrato della fenilen-diammina e che quando si avevano due macchie, una era dovuta alla base e una al sale, perché nella soluzione poco acida il sale era parzialmente idrolizzato.

Se la soluzione di para-fenilen-diammina è acida per acido solforico avviene lo stesso: però il solfato di para-fenilen-diammina ha un R_f molto basso e la macchia resta vicina al punto di partenza. Quando la solu-

zione è diluita e debolmente acida per acido solforico allora il solfato è parzialmente idrolizzato ed è allora rivelabile la macchia della para-fenilen-diammina a Rf 0,48.

Invece con soluzioni di para-fenilen-diammina contenenti acido acetico, siccome l'acetato è completamente idrolizzato in soluzione diluita, non si ha la macchia dell'acetato ma soltanto quella della base.

Feci numerose prove di confronto non solo con la para-fenilen-diammina ma anche con la meta e con la orto, con la 2,5-toluilen-diammina e con la para-amino-difenilammina, prove che confermano le esperienze fatte prima, dalle quali si può dedurre che in presenza di acidi deboli si hanno sali che in soluzione acquosa diluita sono completamente idrolizzati e si hanno quindi soltanto le macchie della base libera. Quando sono presenti acidi forti come l'acido cloridrico o il solforico si possono avere due macchie una della base e una del sale secondo la concentrazione dell'acido nella soluzione.

Alcune osservazioni riguardanti la formazione di due macchie diverse dalla stessa base erano già state fatte da diversi ricercatori ma non si era data ad esse molta importanza.

WALDROM EDWARD ⁽³⁾ per es. accennò alla formazione di due macchie, una più alta e una più bassa quando si fa la cromatografia di diammine aromatiche in presenza di ioni SO_4 e si trova citato ⁽⁴⁾ anche il caso della para-ammino-dimetil-anilina che in soluzione contenente acido cloridrico dà una macchia a Rf 0,91 mentre in soluzione contenente acido acetico (essendo l'acetato completamente idrolizzato) si ha una macchia a Rf 0,73.

Se ne deduce da ciò la necessità per non ingenerare equivoci, di indicare sempre se la cromatografia era stata eseguita con soluzioni della base libera oppure con soluzioni contenenti un acido forte.

AVVERTENZE SUI VALORI DEGLI Rf. — Un'avvertenza banale ma importante è da tener presente quando in una pubblicazione si vogliono riferire i valori degli Rf di qualche sostanza: è cioè necessario specificare sempre (per evitare equivoci) se questi valori sono stati calcolati in base ad una cromatografia discendente o ascendente e la qualità della carta impiegata perché questi valori sono generalmente più o meno differenti. Così ad es. i valori da me riferiti nella mia prima Nota, calcolati in base a cromatografia discendente con carta Whatman N. 1 e solvente butanolo-ac. acetico-acqua 4 : 1 : 5 sono quelli indicati nella colonna A, mentre quelli calcolati in base ad una cromatografia ascendente eseguita con carta Schleicher e Schüll con la piccola vaschetta da me descritta

nelle pagine precedenti e con lo stesso solvente sono quelli indicati nella colonna B e sono quelli da me riferiti nella presente Nota e nella Nota IV in corso di stampa.

	A discendente	B ascendente
para-fenilen-diammina	0,38	0,48
2,5-toluilen-diammina	0,48	0,52
para-ammino-fenolo	0,55	0,57
pirogallolo	0,71	0,70
resorcina :	0,83	0,90

Con la cromatografia discendente ho sempre usato grandi fogli di carta Whatman N. 1 mentre per le cromatografie ascendenti ho preferito usare i piccoli fogli 12 × 12 di carta Schleicher e Schüll N. 2043 MgJ che la Ditta mette in commercio già tagliati nella misura indicata.

Quando poi in una pubblicazione si vogliono riferire gli Rf di qualche sostanza è anche necessario indicare sempre con quale solvente sono stati ottenuti. Per avere un termine fisso di comparazione, io ho sempre eseguito le mie determinazioni con un solvente misto costituito da butanolo-ac. acetico-acqua nella proporzione di 4: 1 : 5. Quando gli Rf sono stati determinati con un solvente differente (nel mio caso con butanolo-etanolo-acqua 4 : 1 : 5) occorre indicare espressamente la sua composizione.

Ma anche limitandosi al mio caso delle miscele di butanolo-acido acetico-acqua è bene curare la esattezza delle proporzioni indicate perché basta un po' più o un po' meno di acido acetico per avere valori di Rf differenti. Aumentando o diminuendo la quantità di acido acetico nel miscuglio aumenta o diminuisce la quantità di acqua assorbita dal butanolo.

La tabella riportata anche nel trattato del LEDERER che riferisce i dati trovati da EKMAN ⁽⁵⁾ è significativa per mostrare quanto possono variare gli Rf delle ammine aromatiche sperimentate quando si cambiano le proporzioni dei singoli componenti nel miscuglio che si usa per la cromatografia (per la para-fenilen-diammina variano da 0,25 a 0,75).

Il variare della temperatura a cui si fa l'esperienza ha probabilmente una influenza analoga perché a diverse temperature può il butanolo assorbire più o meno acqua. Nel mio caso però questa causa di errore è

SOSTANZE DIVERSE

ac. p - ammino difenil-ammino solfonico	ac. diammino difenil-ammino solfonico	ac. 2 - ammino fenol - 4 - solfonico	nitro-p-fenilen diammina	glicina
1				
2				
3				
6				
8				
9				
10				
11				

ridotta al minimo perché io ho sempre avuto cura di fare le mie esperienze a temperature vicine a 20°.

Credo non inutile riferire qui una tabella che durante le mie ricerche tengo sempre alla mano per comodità. In questa tabella, che naturalmente potrà col tempo essere ampliata, sono riferiti gli Rf delle sostanze che più comunemente si ritrovano nelle tinture per capelli e anche gli Rf di alcune sostanze simili che nelle tinture non sono state mai ritrovate per ora.

S o s t a n z e	Rf solvente A Butanolo-acido acetico-acqua 4 : 1 : 5	Rf solvente B Butanolo-eta- nolo-acqua 4 : 1 : 5
Resorcina	0,90	0,92
Pirocatechina	0,90	0,92
Idrochinone	0,90	0,91
Pirogallolo	0,70	0,74
Orto-ammino-fenolo	0,72	0,82
Meta-ammino-fenolo	0,70	0,74
Para-ammino-fenolo	0,57	0,74
Amidolo (2,4-diammino-fenolo)	0,42	0,38
Metolo (metil-p-ammino-fenolo)	0,69	0,58
Glicina	0,50	0,51
4-Nitro-2-ammino-fenolo	0,93	0,88
Acido picrammico	0,85	0,52
Orto-fenilen-diammina	0,66	0,74
Meta-fenilen-diammina	0,53	0,58
Para-fenilen-diammina	0,48	0,54
Nitro-orto-fenilen-diammina	0,78	0,73
Nitro-para-fenilen-diammina	0,67	0,73
Acetil-para-fenilen-diammina	0,63	0,73
1,2,3-toluilen-diammina	0,52	0,55
1,2,4-toluilen-diammina	0,59	0,70
Para-ammino-difenil-ammina	0,82	0,89
Diammino-difenil-ammina	0,46	0,66
Acido para-fenilen-diammino-solfonico	0,19	0,13
Acido para-ammino-difenilammino-solfonico	0,56	0,44
Acido diammino-difenilammino-solfonico	0,23	0,24
Acido 2-ammino-fenol-4-solfonico	0,20	0,17

SPOT-TESTS COLORATI SU CARTA. — Nella mia Nota II riprodussi in alcune tabelle i colori degli spots colorati su carta che si possono avere con diversi reattivi e alcune delle sostanze che più spesso si ritrovano nelle tinture per capelli. Queste tabelle mi sono state molto utili come termine di confronto con gli spots colorati che ottenevo nella esecuzione delle analisi che saranno descritte nella mia Nota IV. Nei nuovi campioni esaminati trovai però anche altre sostanze diverse da quelle

ritrovate nella mia prima serie di analisi, sostanze che naturalmente davano spot-tests differenti.

Dovei perciò preparare un'altra tabella (che qui riproduco fuori testo) contenente gli spot-tests colorati di queste sostanze che allora non avevo preso in considerazione.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. JACOBELLI TURI - Rend. Istituto Sup. Sanità, 19: 461 (1956).
 - (2) C. JACOBELLI TURI - Rend. Istituto Sup. Sanità, 20: 570 (1957).
 - (3) WALDROM EDWARD - Chem. and Ind., 1954, 104, Lederer 2^a ed. pag. 206.
 - (4) TEIJI UKAI e TSUTOMU OHASHI - Chem. Abstr., 1953, 9863 f.
 - (5) G. EKMAN - Acta Chem. Scand., 2: 383 (1948).
-