

Automazione nelle analisi.

VII. Mineralizzazione e determinazione automatica del fosforo organico (*)

PEPPINO BETTO, REMO GABRIELE, GIOVANNI BATTISTA MOCHI E GINO MORISI

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Si descrive un apparecchio automatico idoneo alla mineralizzazione del fosforo in composti organici. L'apparecchio consiste di una piastra di alluminio, riscaldata elettricamente, in cui sono stati ricavati 80 alloggiamenti per altrettante fiale in cui si pongono i campioni. Un dispositivo a parte permette il controllo automatico delle operazioni di riscaldamento che viene eseguito a due differenti temperature ($100 \div 120^\circ\text{C}$, 150°C). La determinazione dell'ortofosfato viene effettuata successivamente per via fotometrica con un apparecchio automatico precedentemente descritto.

Summary (*Automation in analysis. VII. Mineralization and automatic determination of organic phosphorus*). — An automatic manifold for the organic phosphorus mineralization is described. The device at issue does consist in an electrically heated aluminium blok, in wich 80 holes are drilled, in order to hold 80 hydrolysis vials. The heating is automatically controlled by an independent unity.

The ortophosphate determination is performed photometrically with the previously described automatic apparatus.

INTRODUZIONE

In molti settori della chimica analitica, all'analista possono venire richiesti quotidianamente numerosi dosaggi di fosforo legato a composti organici. È il caso, ad esempio, dei laboratori di controllo di farmaci, insetticidi, detersivi, dei laboratori di controllo delle acque di scarico, di controllo dell'inquinamento ambientale.

(*) Una comunicazione sui risultati preliminari è stata presentata al I Congresso Nazionale di Chimica Analitica, Ferrara 16-18 ottobre, 1973.

L'uso di apparecchiature che rendano possibile l'automazione dei procedimenti di mineralizzazione del fosforo, accoppiate a quelle necessarie per la successiva determinazione dell'ortofosfato, semplifica ed accelera in modo determinante l'intero procedimento analitico. È stata descritta una apparecchiatura molto sofisticata, ad alto grado di automazione, costosa e complessa nella sua realizzazione, la cui utilizzazione può risultare vantaggiosa in corrispondenza di necessità di qualche migliaio di determinazioni al giorno [1].

In alternativa riteniamo utile proporre un sistema analitico realizzato con apparecchiature sviluppate nel nostro laboratorio, di facile costruzione e di semplice uso, e riportare i risultati ottenuti in differenti applicazioni.

APPARECCHIATURA E METODO

L'apparecchiatura costruita ed utilizzata per la mineralizzazione del fosforo di composti fosforilati (Fig. 1) è costituita essenzialmente da una piastra di alluminio, sufficientemente spessa, tanto da potere su di essa ricavare delle sedi cilindriche profonde 45 mm, di diametro 15 mm (nell'esempio riportato in numero di 80), ove vengono introdotte apposite fiale. Nella

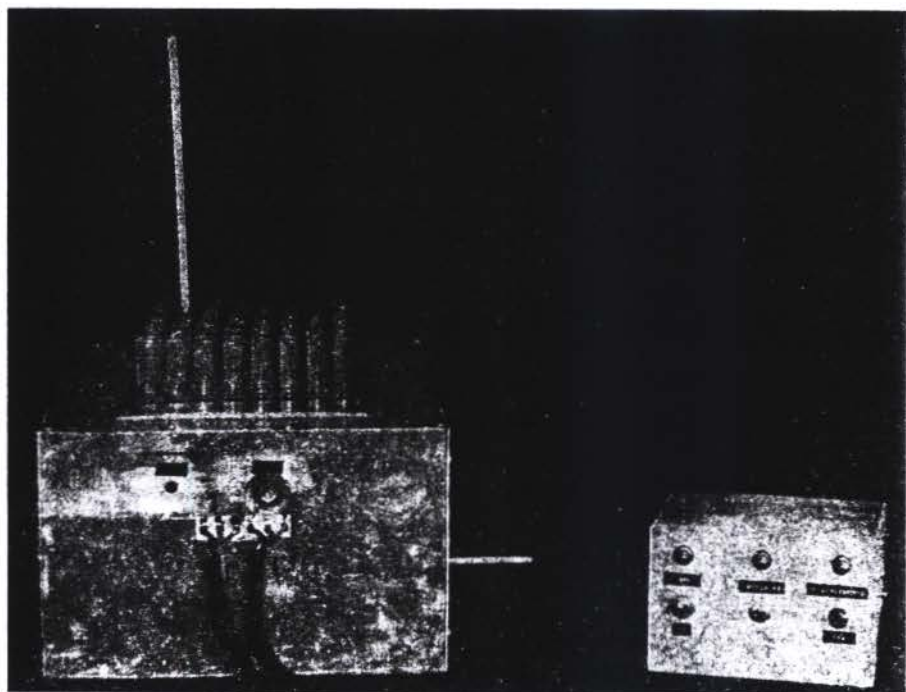


Fig. 1. — Apparecchio per la mineralizzazione del fosforo organico. A sinistra: piastra riscaldante; a destra: dispositivo di comando e di controllo.

parte inferiore della piastra sono incorporate, in appositi incavi paralleli, omogeneamente distribuiti, una serie di resistenze elettriche opportunamente isolate, e sul fronte sono ricavati due alloggiamenti per termoregolatori, accessibili dall'esterno per la loro regolazione. Sul fronte della piastra viene pure alloggiata una morsettiera di porcellana a cui sono collegati i capi delle resistenze e dei termoregolatori, e i capi del cavo elettrico di collegamento col dispositivo di comando e di controllo (Fig. 2). La piastra, alloggiata in

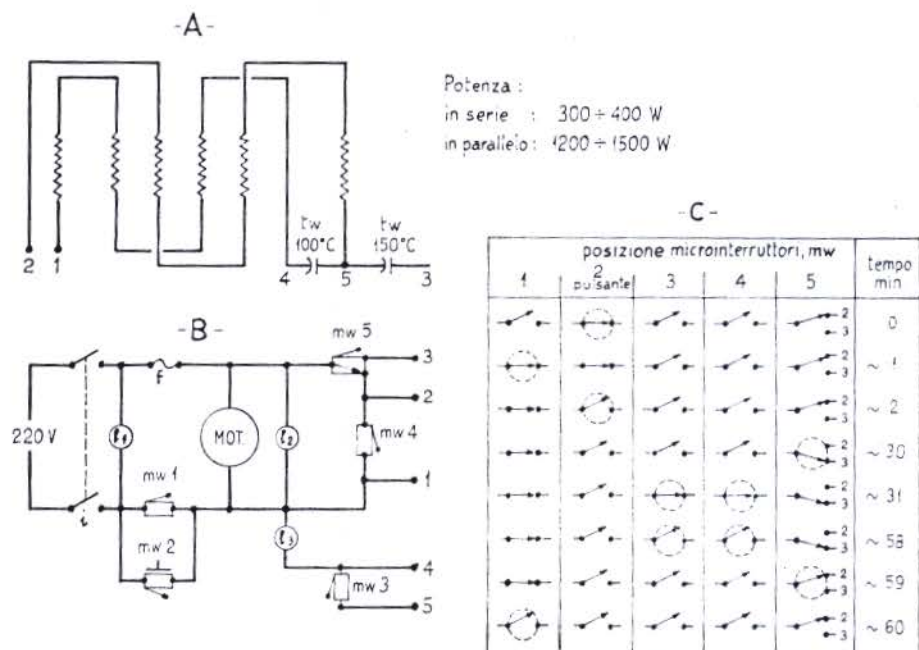


Fig. 2. — A) Resistenze e termoregolatori alloggiati nella piastra. Le resistenze possono essere alimentate in serie, attraverso i capi 1 e 2: in tal caso la temperatura viene regolata dal termoregolatore $tw\ 100^\circ C$; oppure in parallelo, attraverso i capi 1-2 (cortocircuitati) e 3: la temperatura viene regolata dal termoregolatore $tw\ 150^\circ C$. B) Dispositivo di comando e di controllo: i, interruttore generale; l_1 , relativa lampadina spia; f, fusibile; mw2, microinterruttore a pulsante, senza molla di richiamo: premendo il pulsante, a interruttore generale chiuso, si chiude il circuito di alimentazione e si avvia il motorino (MOT). Subito dopo una camma agisce sul (microinterruttore mw1, chiudendo anche attraverso questa via il circuito, e successivamente, per mezzo della relativa camma, viene ripristinata la posizione iniziale di mw2. l_2 , lampadina spia del motorino; mw3 e mw4, microinterruttori la cui chiusura (che deve avvenire solo dopo che il deviatore mw5 ha spostato il collegamento dalla posizione 2 alla posizione 3), cortocircuitando rispettivamente i capi 1-2 e 4-5, permette l'alimentazione delle resistenze in parallelo. l_3 , lampadina spia del funzionamento delle resistenze in parallelo. C) Posizioni dei microinterruttori, comandati dalle rispettive camme, durante un intero ciclo operativo. Per i primi 30 min circa è predisposta l'alimentazione in serie delle resistenze e, per il tempo restante, in parallelo. Alla fine il microinterruttore I (mw1) disinserisce il circuito.

una scatola di lamiera opportunamente dimensionata, viene isolata termicamente riempiendo le intercapedini con lana di vetro.

A parte è stato realizzato un dispositivo di comando e di controllo, operativamente schematizzato nella Fig. 2. Le operazioni sono predisposte da un motorino elettrico il cui asse, all'uscita della scatola di riduzione, ruota alla velocità di 1 giro/ora. Il motorino è fissato, mediante un apposito sostegno, su di una base di lamiera. L'asse del motorino è solidale con un albero a cui sono fissate 5 camme, ognuna delle quali aziona un microinterruttore. L'altro estremo dell'albero a camme alloggia in una boccia, fissata alla base mediante un apposito sostegno; 4 microinterruttori sono fissati su di un'asta fissata alla base, parallela all'albero a camme.

L'interruttore a pulsante (Fig. 2, B: mw 2) è fissato sul pannello frontale della scatola che racchiude il dispositivo. Su questo pannello vengono pure fissati l'interruttore generale, le lampadine spia, il fusibile (Fig. 2, B). Le sagomature e le posizioni delle camme sono tali da predisporre in sequenza le operazioni schematizzate in Fig. 2, C. Queste permettono di ottenere:

- 1) un iniziale lento riscaldamento della piastra (resistenze in serie), fino ad una temperatura di $100 \div 120$ °C, per la durata di circa 30 min;
- 2) un successivo più forte riscaldamento (resistenze in parallelo), fino a $150 \div 160$ °C, per una durata di circa 30 min;
- 3) il disinserimento finale delle resistenze e dello stesso dispositivo di controllo.

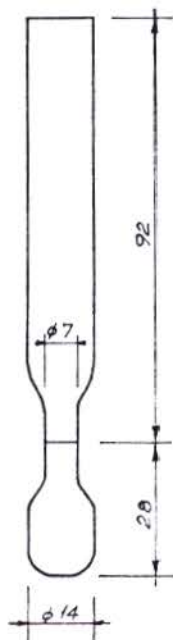


Fig. 3. — Fiala per la mineralizzazione.

Nella Fig. 3 è riportato il disegno schematico di una fiala usata per la mineralizzazione, tarata (segno sulla strozzatura) a 1,5 ml. Se il livello del liquido introdotto nella fiala rimane al disotto della strozzatura, la forma particolare della fiala ed il fatto che la stessa rimane inserita solo per la metà della sua altezza nella piastra riscaldante, impediscono l'ebollizione violenta del liquido e ne riducono l'evaporazione.

Si preparano con le sostanze fosforilate da esaminare soluzioni con acido perclorico o solforico (a titolo finale rispettivamente 1 M e 5 M). In ogni fiala viene introdotto 1 ml di soluzione così preparata.

Poste le fiale sulla piastra si inizia il riscaldamento premendo il pulsante del microinterruttore (Fig. 2, B: mw 2), sul pannello del dispositivo di comando, che inserisce alla rete di alimentazione, per un ciclo di operazioni, il dispositivo di controllo e le resistenze elettriche. Ad operazione di mineralizzazione avvenuta, il contenuto della fiala viene portato a 1,5 ml con acqua distillata.

Il successivo dosaggio del fosforo, come ortofosfato, viene effettuato mediante la reazione con molibdato di ammonio (soluzione allo 0,25 %) ed acido 1-ammino-2-idrossinaftalen-4-solfonico (0,0125 %, in soluzione contenente sodio solfito, 0,05 % e sodio bisolfito, 1,5 %) [2], utilizzando un apparecchio automatico descritto da Gualandi e Morisi [3].

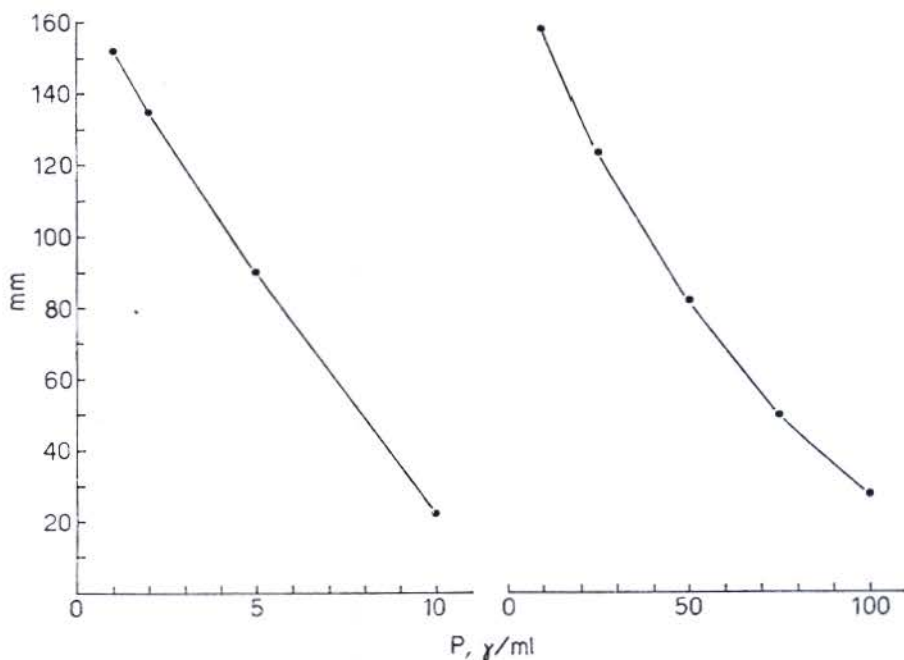


Fig. 4. — Curve di taratura: risposta fotometrica (trasmittanza) verso la concentrazione di fosforo.

In particolare le cuvette poste nella fila interna del piatto porta-campioni vengono riempite col contenuto delle fiale di mineralizzazione. Attraverso l'apposito dispositivo vengono prelevati 200 μ l del campione e trasferiti nelle cellette di reazione e di misura, poste nella fila esterna del piatto, ove contemporaneamente viene introdotto 1 ml di reattivo molibdico e successivamente 1 ml di reattivo a base di acido 1-ammino-2-idrossi-4-naftalensolfonico. Le cellette passano quindi attraverso il sistema di lettura fotometrico, a 617 nm, la cui risposta viene tracciata sulla carta del registratore.

La Fig. 4 mostra 2 curve di taratura ottenute con soluzioni di ortofosfato monopotassico, rispettivamente a contenuto di fosforo da 1 a 10 mcg/ml e da 10 a 100 mcg/ml, ovviamente operando a due diverse sensibilità del sistema di lettura fotometrico. Si fa rilevare che nel primo intervallo di concentrazioni la curva è praticamente lineare.

APPLICAZIONI E RISULTATI

Il procedimento di mineralizzazione e di determinazione del fosforo sopra descritto, in un primo caso è stato applicato a soluzioni di diversi prodotti fosforilati, contenenti fosforo in quantità variabili da 10 a 20 mcg/ml idrolizzati con acido perclorico.

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tab. 1.

TABELLA 1

Risultati delle analisi di alcuni composti fosforilati

C O M P O S T O	N. di analisi	Dato trovato (medie)	Deviazione standard %
Glucoso-6-fosfato	102	0,99	2,08
Adenosin-monofosfato	116	0,99	2,12
Piridossal-fosfato	48	0,99	2,49
Rogor	85	1,01	2,64

Un altro esempio particolare di applicazione del metodo descritto riguarda la determinazione, dopo separazione cromatografica su resina a scambio ionico, di composti fosforilati, precisamente fosforilcolina, fosfoctanolammina e glicerofosfato, spesso usati insieme come principi attivi in diversi preparati farmaceutici. La tecnica usata è quella già sperimentata in analoghe precedenti separazioni [4]. Si è usata una colonna 1×100 cm

riempita con resina A G 1, $\times 4$, minore di 400 mesh, HCOO^- e tamponata con HCOONH_4 0,1 M a pH 6. L'eluizione è condotta mediante un gradiente concavo ottenuto ponendo nel miscelatore cilindrico 1000 ml di HCOONH_4 0,1 M a pH 6 e nel recipiente conico di riserva 750 ml di HCOONH_4 2 M a pH 5. La velocità di diluizione viene mantenuta a 0,6 ml/min raccogliendo frazioni da 10 ml.

La mineralizzazione viene effettuata ponendo nella fiala 0,5 ml di eluato e 0,5 ml di H_2SO_4 10 N (l'acido perclorico è stato sostituito con acido solforico perché interferiva con il sale del tampone causando un precipitato); la successiva determinazione automatica del fosforo viene poi condotta nel modo usuale. La Fig. 5 mostra la separazione delle sostanze prese in esame. Per una più precisa valutazione quantitativa delle stesse, una quantità nota delle frazioni in cui risultano eluite sono riunite, portate a volume, e le soluzioni così ottenute sono analizzate per il fosfato nel modo descritto. La riproducibilità del metodo è stata verificata su 10 dosaggi eseguiti su una

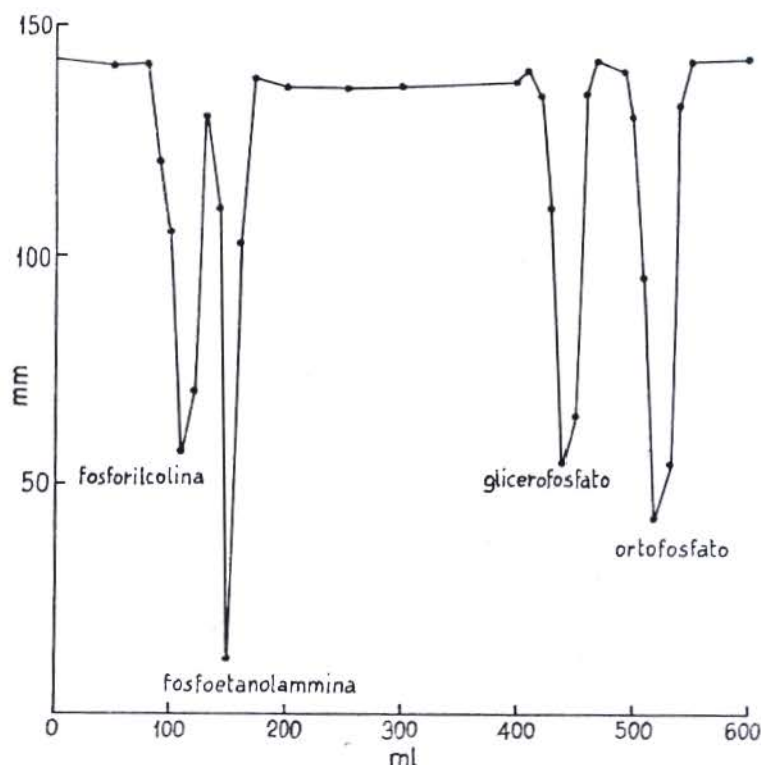


Fig. 5. — Separazione cromatografica di una miscela di fosforilcolina, fosfoetanolamina, glicerofosfato e ortofosfato, rivelata attraverso la determinazione del fosforo. Quantità posta in colonna: circa 10 mg di ciascuna sostanza.

TABELLA 2

**Risultati delle analisi di alcuni composti fosforilati e di ortofosfato,
separati cromatograficamente**

C O M P O S T O	Quantità determinata (μ moli)	Deviazione standard
Fosforil-colina	65,84	$\pm$ 4,22
Fosfo-etanolammina	64,48	$\pm$ 4,22
Glicerofosfato	64,13	$\pm$ 4,67
Ortofosfato	60,95	$\pm$ 2,84

stessa soluzione contenente fosforilcolina, fosfoetanolammina, glicerofosfato e ortofosfato. In Tab. 2 sono riportati i risultati sotto forma di deviazione standard.

Ricevuto il 30 settembre 1976.

Accettato il 3 dicembre 1976.

BIBLIOGRAFIA

1. BESSMAN, S. P. 1974. An automated apparatus for quantitative aliquot measurement of phosphorylated intermediates. *Anal. Biochem.* **59**: 524-532.
2. GUALANDI, G. & G. MORISI. 1967. Automation in analysis. I. Apparatus for photometric determination. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **3**: 589-612.
3. MARINETTI, G. V. 1962. Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *J. Lipid Res.* **3**: 1-20.
4. BETTO, P. & L. LONGINOTTI. 1966. Determinazione di uridin-5'-trifosfato, uridin-5'-difosfato, uridin-5'-monofosfato e uridina mediante separazione per cromatografia a scambio ionico e dosaggio spettrofotometrico. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **2**: 50-62.