

21. Guido LA PAROLA. — Ricerca e determinazione dell'acido benzoico e dei suoi derivati nei prodotti alimentari.

L'acido benzoico ed i suoi derivati sono largamente usati come agenti chimici di conservazione degli alimenti perchè presentano azione tossica o inibitrice verso gli organismi inferiori, tossicità minima verso gli organismi superiori, ed assenza di sapori, odori e colori speciali che possano farli svelare organoletticamente.

La tossicità dell'acido benzoico è considerata piuttosto limitata, come è risultato anche da esperienze pratiche eseguite nel 1910 negli S. U. d'America ed in Germania dalle quali fu dimostrata l'innocuità dell'acido benzoico e del benzoato sodico sino a dosi di 1 g al giorno, mentre alla dose di 1 g per chilo di peso corporeo dà, nei cani, non trascurabili disturbi ed alla dose di 5 g per chilo uccide i conigli nello spazio di poche ore.

L'acido benzoico usato nella proporzione dell'1 %, come nella conservazione degli alimenti, ha limitata azione tossica; il suo sale sodico è quasi privo di azione conservativa.

Anche l'acido p-ossibenzoico ha scarse proprietà antisettiche, mentre gli esteri che da esso derivano, dalla formula (4) $\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{COOR}$ (1), hanno elevato coefficiente antisettico sia come inibitori dello sviluppo di germi sia come germicidi. Il Sabalitschka, che ha il merito di aver segnalato per primo il potere antisettico di questi esteri, ha trovato i seguenti valori:

	Coefficiente dell'azione	
	Inibitrice	Germicida
Fenolo	1	1
Et. metilico dell'ac. p. ossibenzoico . .	3	3
» etilico »	8	7
» propilico »	17	15
» butilico »	32	37
» amilico »	50	61
» fenilico »	109	83

dai quali risulta che gli esteri dell'acido p-ossibenzoico sono più antisettici dell'acido fenico, preso come termine di paragone, e che il loro potere antisettico è proporzionale al peso molecolare dell'alchile esterificante. Con altre ricerche lo stesso A. ha potuto accertare che il campo di applicazione

di questi esteri è molto esteso: infatti essi preservano dalla decomposizione prodotti alimentari vari, polpe e succhi di frutta, estratto di malto, birra, uova, pasta d'amido, glutine, cosmetici, prodotti farmaceutici vari come colliri, sieri, sostanze agglutinanti, liquidi per iniezioni, supposte ecc.

Le ricerche farmacologiche condotte da vari AA. hanno dimostrato che gli esteri dell'acido p-ossibenzoico posseggono una tossicità trascurabile. Ajazzi Mancini ha inoculato ai conigli, per via endovenosa, i sali sodici degli esteri metilico, etilico e propilico dell'acido p-ossibenzoico nella quantità di g 0,43 - 0,48 - 0,51 per chilo di peso c., senza rilevare alcun fenomeno tossico. Cremer ha somministrato per lungo tempo ad animali sani e ad animali ammalati gli esteri senza che la crescita o il peso subissero perdite nei confronti degli animali di controllo. Lo stesso A. ha sperimentato su animali in carenza di vitamina C e di altre vitamine accertando che la somministrazione continua degli esteri non aggravava il quadro patologico nè lo prolungava. Nell'organismo umano gli esteri vengono saponificati in alcoli ed in acido p-ossibenzoico il quale non esercita alcuna azione farmacologica e tossicologica; l'acido viene inoltre facilmente distrutto per l'80 % nell'organismo ed il resto eliminato attraverso il rene. Il Sabalitschka stesso ed il suo assistente Dietrich hanno ingerito sistematicamente per 1 mese g 2 di estere metilico al giorno, senza mai aver risentito alcun disturbo.

L'estere etilico e propilico sono rispettivamente meno tossici, sull'uomo, del metilico, mentre sono in modo crescente più tossici sugli organismi inferiori. Rispetto all'acido benzoico la tossicità sull'uomo dell'estere metilico e propilico è rispettivamente 15 o 30 volte minore. Questi esteri presentano il vantaggio di esplicare azione antisettica anche in ambiente perfettamente neutro, quindi di avere un campo di applicazione esteso, specie in quegli alimenti contenenti forti percentuali di proteine che verrebbero alterate dall'ambiente acido.

Gli esteri dell'acido p-ossibenzoico sono poco solubili in acqua e per tal fatto sono stati posti in commercio i derivati sodici, ottenuti per salificazione dell'ossidrile fenolico, i quali in genere sono circa 100 volte più solubili degli esteri. Il potere microbica dei derivati sodici è però minore di quello degli esteri. Le concentrazioni alle quali, in soluzione

acquosa, i prodotti del commercio esercitano il loro potere antisettico sono:

Nipagina M (= etere metilico dell'ac. p. ossibenzoico)	0,2	%
Nipagina A » etilico » »	0,1	%
Nipasol » propilico » »	0,04	%
Nipabenzil » fenilico » »	0,015	%

Il fenil derivato trova però limitato impiego a causa della sua scarsa solubilità e perciò, in pratica, si dà la preferenza all'estere propilico (Nipasol). Vi è ancora l'estere isopropilico che esercita il suo potere in soluzione acquosa, alla concentrazione di 0,03%. Una miscela dei sali sodici di quest'ultimi esteri si trova in commercio col nome di Nipacombina. Il prodotto Solbiol è identico alla Nipagina M.

Un altro derivato dell'acido benzoico, usato come conservativo, è l'acido p-clorobenzoico, il cui sale sodico (4) $\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COONa}$ (1) è stato messo in commercio col nome di Microbin. Esso viene impiegato nella dose da g 0,03 a 0,01% per la conservazione degli alimenti, dando buoni risultati. Esplica la sua azione in ambiente acido ed è dotato di pochissima tossicità. Wohlgemcet ha dimostrato che la tossicità dell'acido p-clorobenzoico è inferiore a quella dell'acido benzoico. Neisser e Tillmans ritengono la microbina tossica tutto al più come l'acido benzoico. Schübel e Manger trovarono che, sui cani e sui gatti, si manifestano fenomeni di vomito e di inappetenza somministrando g 0,5 per chilo di p.c. di microbina; nei conigli si determina albuminuria elevando la somministrazione a g 1-2 per kg di peso, mentre fenomeni letali si hanno con g 2-2,5 per kg di p.c. Secondo Wührer la microbina si elimina dall'organismo animale in combinazione con la glicocola sotto forma di acido p-cloroippurico.

La microbina si presenta come polvere bianca, microcristallina, solubile in acqua a 18° nella proporzione del 27,79%; per acidificazione della soluzione precipita l'acido. L'acido p-clorobenzoico cristallizza dall'alcole e dall'etere in aghi incolori; fonde a 241-242°, sublima in scaglie. E' pochissimo solubile in acqua: a 18° se ne sciolgono mg 6,7 in 100 cm³, a 50° mg 30. E' facilmente solubile in alcole: in quello al 10,4% in volume a 15° la solubilità è di 0,0141; in quello al 51,6% a 20° è di g 0,258%; nell'alcole assoluto a 20° se ne scioglie il 31,13%.

RICERCA E DETERMINAZIONE DELL'ACIDO BENZOICO

I metodi attualmente in uso per la ricerca e la determinazione dell'acido benzoico nelle sostanze alimentari si possono dividere in due gruppi: appartengono al primo quelli basati sull'estrazione dell'acido con solventi, previa acidificazione della sostanza alimentare e successiva ricerca dell'acido nel residuo ottenuto dall'evaporazione del solvente; appartengono all'altro i metodi fondati sulla separazione dell'acido per distillazione in corrente di vapore. Nel primo caso si ottiene sempre acido impuro mentre nel secondo caso l'acido è praticamente puro essendo le impurezze costituite da piccole quantità d'acidi volatili, di olii essenziali ecc.

Estrazione dell'acido con solventi. — In molti casi l'estrazione con solventi è preceduta da un trattamento preliminare della sostanza alimentare allo scopo di eliminare le proteine, i grassi ed altre sostanze che possono dare emulsioni o comunque provocare perdite d'acido. Come è noto, le proteine si possono eliminare mediante precipitazione e filtrazione oppure per idrolisi con acidi o con alcali.

L'eliminazione delle proteine per precipitazione è stata principalmente adottata per il latte e per i suoi derivati. Meissel rende alcalino il latte con acqua di calce o di barite e lo evapora a secchezza in presenza di sabbia o di polvere di pomice o di solfato di calcio. Il residuo, seccato su acido solforico, viene estratto con alcole al 50% a temperatura ambiente. Questo metodo venne usato da Spaet per il succo di frutta, ma venne ritenuto da altri lungo e poco agevole. Horn coagula il latte con l'aggiunta di acido cloridrico o ac. acetico e dopo ebollizione evapora il filtrato a secchezza ed estrae il residuo con alcole a 50%. Si può obiettare che tale procedimento può provocare perdite di acido benzoico perchè, per effetto dell'acidificazione, l'acido benzoico può rimanere parzialmente occluso dal grasso o volatilizzare in parte durante l'evaporazione. Mohler rende alcalino il latte o altro liquido e quindi l'evapora a b. m. fino a consistenza pastosa. Il residuo viene mescolato con sabbia, acidificato con acido cloridrico ed estratto con etere. Richmond e Miller precipitano le proteine con acido acetico ed estraggono l'acido benzoico dal filtrato con miscela di etere ed etere di petrolio o con cloroformio. Per evitare che parte dell'acido benzoico rimanga nel precipitato, Revis propone di effettuare la precipitazione con cloruro di calcio in presenza di carbonato sodico; ma

secondo Hinks non si raggiunge lo scopo, quantunque il benzoato di calcio che si forma sia facilmente solubile in acqua.

Il solfato di rame è stato usato come precipitante da vari autori e pure offrendo il vantaggio di non dare emulsioni, non impedisce la perdita di acido benzoico che Hinks valuta al 3% mentre Krüger dal 5 al 15%.

Il nitrato mercurico usato da Girard è preferibile al solfato di rame, ma anch'esso non elimina le perdite.

Baumann e Grossfeld usano l'acido fosfotungstico e, nel caso che siano presenti acidi grassi e saponi, consigliano di aggiungere cloruro di calcio prima dell'acido fosfotungstico allo scopo di evitare perdite considerevoli di acido benzoico.

Nella determinazione dell'acido ippurico nel sangue, dopo idrolisi ad acido benzoico, Kingsburg precipita le proteine con acido tannico e soluzione di solfato di magnesio.

Taylor consiglia l'acetato basico di mercurio previa saturazione del liquido con cloruro sodico e successiva estrazione dell'acido benzoico con cloroformio; ma secondo Fellemborg risultati migliori si hanno con l'acetato neutro di mercurio e tale reattivo è prescritto anche nei metodi del « Manuel Suisse des denrées alimentaires ».

La precipitazione delle proteine può essere effettuata con soluzioni saline; l'uso di soluzione satura di cloruro sodico offre il vantaggio di evitare in molti casi la formazione di emulsioni e di diminuire la solubilità dell'acido benzoico rendendone più facile l'estrazione. Tale procedimento consigliato da Moerk per la determinazione degli acidi benzoico e salicilico nel latte ed esteso da La Wall e Bradshaw alle conserve di pomodoro, venne successivamente modificato da vari sperimentatori, molti dei quali adoperano soluzione satura di solfato di ammonio per evitare emulsioni.

Krüger ritiene che i metodi sopracennati non siano quantitativi perchè le proteine trattengono acido benzoico, per cui consiglia di idrolizzare le proteine facendo bollire le sostanze con egual volume di acido solforico al 70% e di estrarre successivamente l'acido benzoico con etere o meglio per distillazione in corrente di vapore. Metodi simili sono già noti in chimica analitica così quello di Hinks per la determinazione dell'acido benzoico nel latte e nella crema e quello di Werner-Schmid per la determinazione del grasso nei formaggi. Nella carne o nei prodotti similari la ri-

cerca e determinazione dell'acido benzoico viene eseguita col metodo Baumann e Grossfeld facendo cioè bollire il prodotto con egual peso di soluzione di idrossido sodico al 5% e separando l'acido per distillazione in corrente di vapore previa acidificazione della soluzione ottenuta.

Per estrarre l'acido benzoico nei grassi il metodo generalmente usato è di agitare fortemente in separatore l'olio o il grasso fuso con soluzione di bicarbonato sodico. Tale procedimento è stato studiato e modificato da numerosi sperimentatori che hanno proposto soluzioni di bicarbonato a concentrazione varia o di sciogliere i grassi solidi in benzene e di adoperare soluzioni di carbonato potassico, o di latte di calce o di aggiungere soluzione di solfato ammonico prima di effettuare l'estrazione.

E' stato pure proposto di sciogliere il grasso in miscuglio di etere e di etere di petrolio e di estrarre l'acido benzoico con soluzione diluita di idrato d'ammonio. Nella crema di latte oltre a piccole quantità di saccharina spesso si aggiunge come conservativo una miscela di piccole quantità di acido borico, benzoico e salicilico. Monier William consiglia in questo caso di riscaldare con cura la crema fino a separazione del grasso, filtrare ed estrarre con soluzione di bicarbonato sodico.

La solubilità dell'acido benzoico in acqua e nei vari solventi è la seguente:

Solvente	t.	g di acido benzoico in 100 cm ³ di soluzione satura
Acqua	25°	0,343
Acetone	»	55,60
Acetato d'amile	»	22,00
Alcole amilico	»	32,37
Alcole assoluto	»	58,40
Benzene	14-16°	7,04
»	25°	12,23
»	50°	25,30
Cloroformio	25°	18,03
Dicloroetilene	15°	9,67
Etere etilico	14-16°	39,80
Etere di petrolio	25°	0,98
Glicerina	15-16°	9,07
Ligroina	14-16°	0,72
Solfuro di carbonio	»	4,24
Tetracloruro di carbonio	»	4,50
»	25°	6,70
Tricloro etilene	15°	6,44
»	25°	13,62
Toluene	20°	8,00
»	50°	22,30

Solubilità in acqua					
t.	Grammi di acido in 100 g di		t.	Grammi di acido in 100 g di	
	acqua	soluzione		acqua	soluzione
0	0,170	0,170	40	0,555	0,551
10	0,210	0,209	50	0,775	0,768
20	0,290	0,289	60	1,155	1,142
25	0,345	0,343	80	2,715	2,643
30	0,410	0,408	100	5,875	5,549

Solubilità a 25° dell'acido benzoico in soluzione acquosa di alcole etilico:

g di alcole in 100 g di solvente	g in 100 g di soluzione satura	
	alcole	ac. benzoico
0	0	0,367
10	9,94	0,60
20	19,66	1,70
30	28,83	3,90
40	36,36	9,10
50	41,50	17
60	45,72	23,80
70	49,21	29,70
80	52,80	34
90	57,60	36
100	63,10	36,90

Solubilità dell'acido benzoico nelle soluzioni acquose di:

Cloruro di potassio a 25°

g KCl per litro	C ₆ H ₅ CO ₂ H disciolto %
1,49	0,339
3,37	0,333
14,92	0,322
37,30	0,295

Nitrato di potassio a 25°

g KNO ₃ per litro	C ₆ H ₅ CO ₂ H disciolto %
2,02	0,340
5,06	0,341
20,24	0,340
50,59	0,334

Cloruro sodico

g NaCl per litro	g di C ₆ H ₅ CO ₂ H per 100 g di soluzione	
	a 25°	a 45°
0,00	0,340	0,667
1,17	0,339	0,663
2,93	0,335	0,654
11,70	0,336	0,617
29,25	0,282	0,546

Nitrato sodico

g NaNO ₃ per litro	g di C ₆ H ₅ CO ₂ H per 100 g di soluzione	
	a 25°	a 45°
1,70	0,340	0,666
8,51	0,339	0,663
17,02	0,333	0,647
42,54	0,319	0,613
85,09	0,294	—

Ripartizione a 19° dell'acido benzoico tra:

Acqua e benzene

g di ac. benzoico in 100 cm ³	
fase acquosa	fase benzolica
0,0718	0,538
0,1078	1,146
0,1560	2,285
0,2260	4,84
0,329	9,70

Acqua ed etere etilico

g di ac. benzoico in 100 cm ³	
fase acquosa	fase eterica
0,0765	5,38
0,158	11,45
0,190	14,05
0,268	21,20
0,460	35,40

Solubilità a 25° dell'acido benzoico nella soluzione acquosa di:

Acido cloridrico

g mol. per litro		g mol. per litro	
HCl	C ₆ H ₅ COOH	HCl	C ₆ H ₅ COOH
0,0	0,0276	3,308	0,0153
0,2828	0,0254	4,410	0,0140
0,6308	0,0235	5,238	0,0130
1,180	0,0211	7,172	0,0113
1,848	0,0185	9,522	0,0109

Acido nitrico

g mol. per litro		g mol. per litro	
HNO ₃	C ₆ H ₅ COOH	HNO ₃	C ₆ H ₅ COOH
0,0208	0,0272	1,019	0,0271
0,0807	0,0269	1,623	0,0272
0,1351	0,0268	2,430	0,0275
0,2021	0,0268	3,880	0,0277
0,5514	0,0270	4,784	0,0284

La solubilità in acqua a temperatura ambiente è aumentata dalla presenza di acetato sodico e di altri sali organici, mentre è diminuita dagli acidi minerali, dal cloruro e dal nitrato sodico o potassico. Questo fatto viene utilizzato per separare con la distillazione in corrente di vapore l'acido dai prodotti alimentari che lo contengono.

L'etere etilico estrae dalle soluzioni acquose una notevole quantità di sali, di acidi minerali ed organici e di altre sostanze, tuttavia viene largamente impiegato per estrarre l'acido benzoico dalla sostanza alimentare tal quale o dopo avere eliminato da essa le proteine. Per diminuire la solubilità delle sostanze estratte assieme all'acido benzoico, si consiglia di impiegare come solvente una miscela a volumi uguali di etere e di etere di petrolio. Tale miscela è adottata da Guarnieri, da Formenti e Scipiotti per le conserve di pomodoro.

Gli olii eterici contenuti in alcuni prodotti possono interferire sulla determinazione dell'acido benzoico per cui è opportuno eliminarli mediante estrazione con etere, dopo di aver reso alcalina la soluzione in esame.

Secondo Hinks se ad una miscela di 1 p. di etere e 2 p. di etere di petrolio, con cui è stato estratto l'acido benzoico, si aggiunge ammoniaca

a gocce, si forma in seno al solvente un precipitato di benzoato d'ammonio, nel caso sia presente l'acido.

Genersich impiega il benzene come solvente dell'acido benzoico, ed usa un adatto estrattore data la scarsa solubilità dell'acido in detto solvente, valutata da alcuni sperimentatori del 4%, e da altri del 9%. Il benzene però ha tendenza a dare emulsioni che possono essere impedita per aggiunta di alcole. Secondo Laan e Tydens il benzene estrae anche gli acidi butirrico, lattico, tannico, salicilico e la saccarina ma non gli acidi solforico, fosforico, borico, formico, acetico, succinico, malico e citrico. Baumann e Grossfeld preferiscono impiegare una miscela di 5 p. di benzene ed una di etere per evitare emulsioni.

Il toluene è un ottimo solvente. Così pure il cloroformio che viene usato da vari sperimentatori specie per il succo di frutta, per le conserve di pomodoro ecc. previa aggiunta di cloruro sodico, poichè in presenza di sale o di sali minerali questo solvente discioglie tracce di acido acetico, lattico, glicolico e non gli acidi ossalico, malico, citrico, tartarico e gli amminoacidi.

Il tetracloruro di carbonio è stato pure consigliato dato che non discioglie gli acidi minerali liberi, l'acido lattico e succinico, ma solo piccole quantità di acido acetico.

Anche il dicloroetilene è un buon solvente dell'acido benzoico ed offre il vantaggio di non disciogliere, secondo Van Raalte, l'acido solforico, fosforico, borico, tartarico, malico, tannico; discioglie però piccole quantità di acido succinico e forti quantità di acido acetico, lattico, butirrico e di saccarina.

Il tricloroetilene è solvente dell'acido benzoico, ma anche dell'acido salicilico, mandelico, cinnamico, discioglie poco il lattico e non discioglie gli acidi ossalico, malonico, succinico, malico, tartarico, citrico, gallico, tannico e meconico.

L'alcole discioglie numerose sostanze ed è stato impiegato da vari sperimentatori con determinate modalità e concentrazioni.

Per separare l'acido benzoico dal solvente impiegato, data l'eccessiva volatilità dell'acido, conviene evaporare il solvente a temperatura ambiente e mai distillarlo, specie quando si usa etere solforico.

Distillazione in corrente di vapore. — Formenti e Scipiotti usarono per primi la distillazione in corrente di vapore non per separare ma per

purificare l'acido estratto dalle conserve di pomodoro con miscela di etere e di etere di petrolio.

L'acido che si separa con la distillazione può essere impuro per la presenza di acidi volatili, i quali possono essere eliminati con una successiva distillazione in corrente di vapore da soluzione acida per acido fosforico.

Il metodo secondo alcuni dà buoni risultati anche quando le sostanze contengono grassi, come nel latte e suoi derivati, invece nei prodotti contenenti zuccheri bisogna aver cura di non aggiungere grande eccesso di acido fosforico e di distillare cautamente.

Nei prodotti contenenti alcole i risultati sono generalmente bassi, a meno che esso non sia eliminato preventivamente per evaporazione, dopo di aver reso il liquido alcalino. Nei prodotti ricchi di proteine conviene, secondo alcuni AA. procedere prima all'idrolisi delle proteine, e successivamente alla distillazione in presenza di molto acido solforico.

Secondo molti sperimentatori l'estrazione dell'acido benzoico in corrente di vapore è lunga e non quantitativa ed offre lo svantaggio di far ritrovare nel distillato piccole quantità di acido solforico, fosforico impiegate per acidificare.

Per eliminare tali inconvenienti, Monier Williams ha studiato un nuovo metodo fondato sull'estrazione dell'acido benzoico in corrente di vapore, previa saturazione del liquido con cloruro sodico per diminuire la solubilità dell'acido ed aumentare la volatilizzazione di esso. Nelle sue linee essenziali il metodo Monier è il seguente: in pallone da 500 si introducono da 30 a 100 g del campione e, se questo è liquido, lo si satura con cloruro sodico nella proporzione di g 40 di sale per ogni 100 cm³; se invece non è liquido viene aggiunto di acqua fino a renderlo della consistenza desiderata e poi saturato con sale. La miscela ottenuta viene resa nettamente acida con acido fosforico e poi distillata con una rapida corrente di vapore, raccogliendo circa 500 cm³ di distillato in pallone contenente circa 10 cm³ di NaOH N/1. E' opportuno riscaldare anche il pallone contenente la sostanza per evitare condensazione di vapore ed è essenziale che in esso rimanga sempre una piccola quantità di sale indisciolti. Si lava bene il refrigerante con circa 25 cm³ di NaOH N/1 ed il distillato, assieme alle acque di lavaggio, si evapora a b. m. fino a ridurre il volume primitivo a circa 10-30 cm³. Monier consiglia di non evaporare in becher o in capsula di porcellana a fiamma diretta perchè le piccole quantità di silice che pos-

sono eventualmenute passare in soluzione potrebbero provocare emulsioni nella successiva estrazione dell'acido con solventi. Il residuo dell'evaporazione, quasi sempre di colore giallo, si lascia raffreddare a 40-50° e si tratta con soluzione acquosa al 5-6% di permanganato potassico fino a che il colore violetto del permanganato persista per qualche minuto nel liquido sovrastante l'abbondante precipitato di biossido di manganese formatosi. In genere occorrono circa 10 cm³ di soluzione di permanganato. La miscela si riscalda alla fiamma per qualche minuto, poi si lascia raffreddare e si distrugge l'eccesso di permanganato con piccole quantità di solfito sodico o di anidride solforosa. Si aggiungono poche gocce di acido solforico che discioglie il precipitato e rende la soluzione incolore; in caso contrario si aggiunge ancora un poco di anidride solforosa. La soluzione e le acque di lavaggio sono quindi versate quantitativamente in un cilindro da 100; il volume totale del liquido che si ottiene è di circa 80 cm³. Si satura anche questa volta il liquido con sale nel rapporto di g 33 di sale per 100 cm³, e si agita fino a quasi totale dissoluzione del sale. Nel caso che la soluzione contenga molto acido benzoico, per effetto della saturazione si nota la separazione di esso. Quindi la soluzione viene estratta 4 volte con 15 cm³ di una miscela a volumi uguali di etere e di etere di petrolio, quest'ultimo con p. e. tra 30 e 50°. Per effettuare l'estrazione basta capovolgere più volte il cilindro. Dopo ciascuna estrazione il solvente viene sifonato con adatto sifone in altro recipiente. Si lava il sifone con un poco di solvente. Così operando si ottiene una soluzione eterea contenente l'acido, dalla quale per evaporazione del solvente, a temperatura ambiente, si ha l'acido benzoico. Per determinarlo Monier usa il metodo per sublimazione di Polenske al quale ha apportato alcune modifiche.

Purificazione dell'acido benzoico. — L'acido benzoico separato dalle sostanze alimentari — con uno dei metodi sudescritti — è generalmente impuro e non può essere pesato o titolato direttamente; spesso è impuro per acido acetico proveniente dalla sostanza esaminata o dal solvente impiegato, ma anche per acido lattico, butirrico, acidi grassi (nel caso del latte e dei suoi derivati) acido tannico, acido salicilico, acido cinnamico, sostanze coloranti, olii essenziali ecc.

Per allontanare tali impurezze è sufficiente in pratica lavare il solvente varie volte con pochi cm³ di acqua. Ben difficilmente però si riesce ad eliminare tutto l'acido acetico o lattico eventualmente presente ed an-

cora più difficile è eliminare l'acido butirrico. Le soluzioni benzeniche non possono essere lavate con molta acqua senza incorrere in sensibili perdite di acido benzoico, data la limitata solubilità dell'acido nel benzene. Molti sperimentatori consigliano di lavare il solvente con pochi cm^3 di soluzione satura di cloruro sodico; l'acido acetico è solubile nella soluzione salina quanto in acqua, lo stesso forse avviene per l'acido lattico, mentre l'acido butirrico non può essere eliminato con questo mezzo essendo meno solubile in soluzione salina.

Vari sperimentatori consigliano di eliminare gli acidi grassi presenti come impurezze, per precipitazione come sali di calcio o di bario dato che i corrispondenti sali dell'acido benzoico sono facilmente solubili in acqua. Il metodo è utile solo per gli acidi grassi a peso molecolare elevato, Per tal fatto la determinazione dell'acido benzoico nei formaggi è difficile per la presenza di forti quantità di acidi grassi liberi.

Un metodo usato da molti è quello di ossidare le impurezze che accompagnano l'acido benzoico. A tale scopo il solvente contenente l'acido viene dibattuto energicamente con pochi cm^3 di idrato sodico; la soluzione alcalina viene ossidata con permanganato fino a persistente colore rosa. Quindi si distrugge l'eccesso di permanganato con anidride solforosa o solfito sodico; si acidifica la soluzione e si estrae varie volte con etere. Per evaporazione del solvente si ottiene l'acido. In tali condizioni vengono ossidate molte impurezze tra cui l'acido lattico, l'acido salicilico ed i fenoli; rimangono inalterati: l'acido acetico, l'acido butirrico, l'acido succinico, molti acidi grassi e la saccarina. L'acido cinnamico è trasformato prima in benzaldeide e poi in acido benzoico ed è probabile che molti composti aromatici con catene laterali eventualmente presenti, come componenti di sostanze coloranti o odoranti, possono essere ossidati ad acido benzoico. Il metodo al permanganato ha ricevuto larga applicazione, malgrado qualche inconveniente che esso può presentare.

Il carbone animale è stato pure proposto come mezzo di purificazione ma vari autori ne sconsigliano l'uso.

La sublimazione è frequentemente impiegata per la ricerca e determinazione dell'acido benzoico; va notato però che la presenza di forti quantità di impurezze impedisce la sublimazione. A tal fine sono stati consigliati vari procedimenti e vari tipi di apparecchi; alcuni consigliano anche di procedere alla sublimazione dopo effettuata l'ossidazione con per-

manganato in soluzione alcalina. Assieme all'acido benzoico possono volatilizzare altre sostanze: le carni affumicate danno spesso un sublimato simile a quello dell'acido benzoico; l'acido salicilico, il cinnamico, la sacarina, la vaniglina — usata come sostanza odorante — volatilizzano sebbene il sublimato di quest'ultima sia diverso da quello dell'acido benzoico.

E' stato pure proposto di separare l'acido benzoico precipitandolo come benzoato di metalli pesanti, insolubile, ma i metodi relativi hanno avuto finora limitata applicazione.

RICONOSCIMENTO DELL'ACIDO BENZOICO

1) *Reazione con cloruro ferrico.* — Il cloruro ferrico ed i sali ferrici producono in soluzione neutra un precipitato rosa carnicino di benzoato ferrico. Per rendere sicuramente neutra la soluzione, conviene evaporarla a b. m. in presenza di ammoniaca e disciogliere il residuo ottenuto in poca acqua. Si abbia cura di non riscaldare troppo sul b. m. il residuo perchè il benzoato d'ammonio è volatile. Alla soluzione si aggiunge qualche goccia di soluzione di cloruro ferrico molto diluita perchè il precipitato che si forma è solubile in eccesso di cloruro ferrico. Soluzioni molto diluite si colorano solamente in giallastro senza che si formi precipitato.

Si abbia cura di non riscaldare dopo l'aggiunta del cloruro ferrico perchè può precipitare idrato di ferro. Le sostanze coloranti artificiali possono mascherare la reazione del cloruro ferrico. L'acido tannico dà un precipitato bruno; l'acido succinico un precipitato simile a quello dell'acido benzoico; l'acido fenilacetico un precipitato non distinguibile da quello dell'acido benzoico.

2) *Reazione di Mohler.* — E' la più sensibile e delicata tra le reazioni dell'acido benzoico ed è fondata sulla nitratura dell'acido benzoico ad acido dinitrobenzoico e sulla successiva riduzione di questo ad acido m-diaminobenzoico, il cui sale di ammonio, in soluzione acquosa, è di colore rosso.

La reazione, che è stata modificata da vari analisti, viene eseguita nel modo seguente: l'acido benzoico dopo purificazione con permanganato viene disciolto in 1-3 cm³ di idrato sodico N/3 e la soluzione viene evaporata a secchezza. Il residuo viene aggiunto di 5-10 gocce (non più) di acido

solforico conc. e di g 0,1 di nitrato potassico e riscaldato in b. m. per 20 minuti. Quindi si raffredda, si aggiungono 2 cm³ di acqua e, dopo ulteriore raffreddamento, una soluzione acquosa di ammoniaca fino a rendere fortemente alcalino il miscuglio. In genere basta aggiungere 10 cm³ di soluzione acquosa al 15% di idrato di ammonio. Quindi si tratta il miscuglio con 2 cm³ di soluzione acquosa al 2% di cloridrato di idrossilamina: in presenza di acido benzoico si ottiene già a freddo ma lentamente una colorazione rossa. Per accelerare lo sviluppo della colorazione conviene immergere per poco tempo il tubo da saggio prima in acqua bollente e poi in acqua fredda. La reazione rivela la presenza di mg 0,1-0,5 di acido benzoico. L'impiego dell'idrossilamina come riducente è dovuto a Grossfeld; Heide e Jacob usano invece una goccia di solfuro di ammonio aggiunta al miscuglio con precauzione: nella zona di contatto si forma colorazione rossa, che però è meno netta e meno persistente di quella ottenuta con idrossilamina.

E' da ricordare che l'acido salicilico, l'acido cinnamico, l'acido fenilacetico, molti fenoli, la fenoftaleina e la saccarina disturbano o possono dare la reazione di Mohler. Così pure se per estrarre l'acido benzoico si è usato come solvente il benzene e non si è avuto cura di eliminarlo completamente, si può avere reazione positiva.

3) *Trasformazione dell'acido benzoico in acido salicilico. Reazione di Jonescu modificata da Heide e Jakob.* — La soluzione contenente l'acido benzoico libero viene trattata con 3-5 gocce di acqua ossigenata al 0,3% per ogni mg di acido benzoico e riscaldata a b. m. per 5 minuti. Si lascia raffreddare e si aggiungono 1-3 gocce di soluzione acquosa all' 1% di cloruro ferrico: si ottiene subito o dopo qualche tempo la colorazione violetta caratteristica dell'acido salicilico formatosi.

Si può anche eseguire la reazione senza riscaldare il liquido a b. m.; in tal caso la colorazione violetta, dovuta alla parziale trasformazione dell'acido benzoico in salicilico, appare dopo qualche ora.

Questa reazione è meno sensibile e meno netta di quella di Mohler; tuttavia essa è largamente adoperata per la rapidità di esecuzione e quando si ricercano quantità relativamente forti di acido.

La reazione è data pure dalla saccarina.

4) *Reazione di Fischer e Gruenert.* — Anche questa reazione è fondata sulla trasformazione dell'acido benzoico in salicilico. Si scioglie il

residuo contenente l'acido benzoico in poche gocce di idrato sodico e si aggiunge 1 cm³ di acqua. Si versa la soluzione in capsula d'argento e si evapora a secco su b. m. Si aggiungono al residuo circa 2 g di potassa caustica grossolanamente polverizzata e si fonde il miscuglio su piccola fiamma, avendo cura di mantenerlo fuso sulla fiamma per due minuti e di agitarlo con adatto filo di platino. In tali condizioni l'acido benzoico si trasforma principalmente in acido p-ossibenzoico ed, in piccole quantità, in acido meta ed orto ossibenzoico, cioè in acido salicilico. La massa fusa si discioglie in acqua, si acidifica la soluzione con acido solforico e si estrae con etere solforico. La soluzione eterea si lava tre volte con poca acqua, poi si aggiunge 1 cm³ di acqua e si evapora l'etere in corrente d'aria. Nel residuo acquoso si ricerca l'acido salicilico con poche gocce di soluzione di cloruro ferrico al 0,05%. Questo metodo fa rilevare, secondo gli AA., mg 0,5 di acido benzoico.

La reazione non è specifica essendo data anche dall'acido cinnamico e probabilmente da altre sostanze.

5) *Ricerca secondo Guerberty*. — Il residuo contenente l'acido benzoico viene trattato con poco acido nitrico fumante e la soluzione viene evaporata. Il miscuglio di acidi nitrobenzoici ottenuto si riscalda con una goccia di soluzione al 10% di cloruro stannoso. Si lascia raffreddare e si aggiungono, per diazotare, 2 gocce di soluzione all'1% di nitrito sodico e quindi si tratta con soluzione all'1% di β -naftolo disciolto in ammoniacca al 10%. Si ottiene un precipitato di acido β -naftol-azobenzoico di colore rosso arancione che si discioglie per aggiunta di 1 cm³ di acido solforico conc. dando una soluzione colorata in rosso violetto; versando tale soluzione in acqua la colorazione diventa giallo arancione.

6) *Ricerca secondo Harpal*. — Il residuo dell'estrazione viene riscaldato per 5 minuti a b. m. con 2 cm³ di un miscuglio ottenuto con due parti di acido solforico conc. ed una parte di acido nitrico fumante. Poi si versa la soluzione in becher, si lava la capsulina con poca acqua in modo da raccogliere in totale circa 20 cm³ di liquido. Si aggiunge alla soluzione un pezzettino di zinco per ridurre gli acidi nitrobenzoici formati e si riscalda per 10 minuti. Quindi si separa lo zinco, si lascia raffreddare si aggiunge 1 cm³ di soluzione acquosa all'1% di nitrito sodico e dopo 5 minuti ammoniacca in eccesso. Si diluisce con acqua a 100 cm³. In presenza di acido benzoico si ottiene una colorazione gialla intensa.

7) *Trasformazione in aldeide benzoica.* — La reazione è stata studiata e modificata da vari analisti. Secondo Lehmann si riduce a piccolissimo volume (0,5-1 cm³) la soluzione contenente l'acido benzoico, previa aggiunta di pochissima potassa N/10. Il residuo si versa su vetro di orologio, si acidifica con acido solforico diluito, si aggiunge un granello di amalgama di sodio e si copre con un altro vetro di orologio. Cessato lo sviluppo di idrogeno si percepisce nettamente l'odore caratteristico dell'aldeide benzoica, anche per la presenza di 1 mg di acido benzoico. La reazione può essere eseguita anche in presenza di acido salicilico.

8) *Reazione di Röhring, del benzoato di etile.* — Si fa bollire il residuo contenente acido benzoico con poche gocce di alcole assoluto e poche gocce di acido solforico conc. Si lascia raffreddare, si aggiunge acqua, e si estrae con etere il benzoato di etile. Per riconoscerlo basta evaporare un poco della soluzione eterica su carta da filtro: si percepisce facilmente l'odore caratteristico del benzoato di etile anche se è presente in quantità minime. Tale reazione non è applicabile quando si ricerca l'acido benzoico nei vini.

9) *Reazione della rosanilina.* — De Brevans suggerisce una reazione basata sulla colorazione azzurra che si ottiene riscaldando a b. m. l'acido benzoico con anilina contenente piccole quantità di cloridrato di rosanilina.

Secondo Heide e Jacob tale reazione non è specifica essendo data, con maggiore o minore intensità, da quasi tutti gli acidi organici e da molti acidi inorganici. L'acido succinico dà una colorazione azzurra molto più intensa dell'acido benzoico.

10) *Ricerca microchimica.* — E' stata pure proposta la ricerca microchimica. A tale scopo si riscalda, in opportune condizioni, il residuo ottenuto dall'estrazione con etere-etere di petrolio, e si osserva al microscopio il sublimato raccolto su un vetrino porta oggetti. Sul sublimato si possono eseguire microreazioni di conferma. Cultrera adotta tale metodo per la ricerca degli acidi benzoico, salicilico, cinnamico e della saccarina.

Altri metodi sono stati proposti da vari analisti per la ricerca dell'acido benzoico.

Determinazione per sublimazione, secondo Polenske. — Si versa il residuo contenente l'acido benzoico in una provetta della lunghezza di cm 16 e della larghezza di cm 1,5 e si copre con g 2 di sabbia preventivamente lavata con acqua regia, poi con acqua distillata e infine calcinata.

Si introduce nella provetta un disco di carta che si colloca a circa 3-4 cm dal fondo ed in modo da occupare tutto il diametro della provetta. Con tale disco si fa in modo di asportare dalla superficie interna della provetta le piccole quantità di acido benzoico e di sabbia rimaste eventualmente attaccate. Come bagno si adopera un piccolo bicchiere contenente olio di paraffina. Si copre il bicchiere con cartone d'amianto che porta due fori per uno dei quali passa la provetta e per l'altro un termometro. Si copre la provetta con un vetro d'orologio e si immerge nell'olio fino all'altezza di 4 cm. Si scalda il bagno, posto su rete, per 4 ore a 180-190°. In tal modo l'acido benzoico va a depositarsi al di sopra della striscia di carta e del cartone di amianto. Si lascia raffreddare alquanto, si pulisce bene la superficie esterna della provetta e si taglia quest'ultima ad 1 cm al disotto del deposito del sublimato. Si scioglie questo in alcole neutro e si titola la soluzione con NaOH N/10, indicatore la fenoftaleina. 1 cm³ di NaOH N/10 corrisponde a g 0,0122 di ac. benzoico.

Determinazione colorimetrica secondo Grossfeld. — Si basa sulla reazione di Mohler; l'acido benzoico viene nitrato ad acido dinitrobenzoico e questo ridotto ad acido aminobenzoico col cloridrato di idrossilamina. Grossfeld opera nel modo seguente: la soluzione etere-etere di petrolio contenente l'acido benzoico o la soluzione alcolica di benzoato viene portata a secco in una provetta. Al residuo si aggiungono g 0,1 di nitrato potassico e 1 cm³ di acido solforico conc. e si riscalda il miscuglio per 20 minuti in bagno maria bollente. Si lascia raffreddare e si aggiungono 2 cm³ di acqua. Dopo ulteriore raffreddamento si rende la soluzione fortemente ammoniacale con 10 cm³ di ammoniaca al 15 % circa; quindi si aggiungono 2 cm³ di soluzione di cloridrato di idrossilamina al 2 %. In presenza di acido benzoico ed in funzione della quantità presente si sviluppa più o meno rapidamente una colorazione rossa. Per accelerare lo sviluppo della intensità massima della colorazione, si immerge la provetta prima in acqua calda e successivamente in acqua fredda. L'intensità della colorazione ottenuta può essere confrontata con quella di una soluzione al 2 % di solfocianato di potassio o di ammonio trattata con sale ferrico. Convienne usare una soluzione di allume ferrico di cui 1 cm³ corrisponde a mg 0,1 di ossido di ferro e pertanto si sciolgono g 0,860 di allume ferrico ammonico in 1 litro di acqua e la soluzione si acidifica con acido cloridrico. Per il confronto si mette in una seconda provetta della stessa

forma e grandezza 1 cm³ di HCl al 25% e 13 cm³ di soluzione di solfo-
cianato ammonico al 2%. In essa si fa gocciolare da una buretta, agitando
la miscela, tanta soluzione di allume ferrico fino a che le colorazioni rosse
delle soluzioni delle due provette appaiano uguali, osservate dall'alto in
basso. Dalla quantità di soluzione di allume impiegata si può calcolare
la quantità di acido benzoico secondo la tabella seguente:

Soluz. allume ferrico cm ³	Ac. benzoico mg	Soluz. allume ferrico cm ³	Ac. benzoico mg
0,1	0,3	1,5	6,7
0,2	0,7	1,6	6,9
0,3	0,9	1,7	7,2
0,4	1,2	1,8	7,5
0,5	1,6	1,9	7,8
0,6	2,1	2,0	8,0
0,7	2,7	2,1	8,3
0,8	3,2	2,2	8,5
0,9	3,7	2,3	8,8
1,0	4,3	2,4	9,0
1,1	4,8	2,5	9,3
1,2	5,3	2,6	9,5
1,3	5,9	2,7	9,8
1,4	6,4	2,8	10,0

Per effettuare una determinazione più precisa si ripete la determi-
nazione tenendo conto dei risultati ottenuti nella 1^a prova che è orienta-
tiva, e si fa in modo di operare su 1 mg di acido benzoico. Nello stesso
tempo, in un'altra provetta della stessa forma e dimensioni si porta a
secco 1 mg di acido benzoico (mg 100 di acido benzoico disciolti in 10 cm³
di NaOH N/10 e portati a 100 cm³) per eseguire una prova di confronto.
Le due provette vengono nitate contemporaneamente nelle stesse con-
dizioni e trattate in tutto nello stesso modo. La esattezza del metodo
dipende anzitutto dalla durata e dalle condizioni di nitratura.

Determinazione secondo Nicholls. — Il metodo è basato sulla par-
ziale ossidazione dell'acido benzoico ad acido salicilico per azione del-
l'acqua ossigenata a caldo e sulla colorazione data dall'acido salicilico con
il cloruro ferrico. Operando nel modo indicato dall'autore, il 10,50 %
di acido benzoico viene ossidato ad acido salicilico. A tal fine si neutra-
lizza la soluzione contenente l'acido benzoico, se ne preleva una parte
aliquota in modo che il contenuto d'acido benzoico non sia superiore
a 4 mg e si diluisce con acqua a 15 cm³. Si aggiungono cm³ 1 di cloruro
ferrico (50 cm³ di cloruro ferrico N aggiunti di 13 cm³ di acido solfo-

rico N e diluiti con acqua a 100) ed 1 cm³ di acqua ossigenata a 0,1 % (1 cm³ di acqua ossigenata a 20 vol. diluito con acqua a 60 cm³) e si riscalda fino all'ebollizione. Quindi si aggiungono cm³ 0,5 di NaOH N ed il miscuglio bollente si filtra in un cilindro di Nessler, si lava il residuo con acqua bollente, si raffredda il filtrato e si porta al volume di 50 cm³. Si aggiunge una goccia di cloruro ferrico. La colorazione ottenuta si confronta con quella data da una soluzione di acido salicilico al 0,01 % con cloruro ferrico.

La soluzione di acido benzoico non deve contenere oltre 30 mg di acido per 100 cm³, in caso contrario occorre diluirla; non deve contenere inoltre quantità apprezzabili di sali minerali, fatta eccezione per i nitrati.

RICERCA E DETERMINAZIONE DEI DERIVATI DELL'ACIDO BENZOICO.

ACIDO P.OSSIBENZOICO C₆H₄(OH).COOH.

1) *Ricerca secondo Weiss.* — L'acido p.ossibenzoico, p. f. 215°, dà col reattivo di Millon ⁽¹⁾ una colorazione rossa, specialmente a caldo; non dà le reazioni dell'acido benzoico. Con i sali di rame dà il p.ossibenzoato di rame, difficilmente solubile in acqua ed in alcole. Si utilizza questa reazione per separarlo. A tal fine, il residuo contenente l'acido p.ossibenzoico viene disciolto in eccesso di ammoniaca e la soluzione riscaldata su b. m. fino a scomparsa dell'odore ammoniacale. Quindi si aggiunge una piccola quantità di solfato di rame, finemente macinato. Si ottiene subito il precipitato di p.ossibenzoato di rame, in piccoli cristalli di colore celeste chiaro. Il sale viene raccolto, sospeso in acqua decomposto con acido solforico diluito e la soluzione estratta con etere. Si separa l'etere, si secca con solfato sodico, si filtra, si evapora il solvente a temperatura ordinaria e si determina il p. di fusione sul residuo ottenuto.

(¹) Reattivo di Millon. 1) Soluzione di solfato mercurico ottenuta sciogliendo g 5 di ossido mercurico in 20 cm³ di acido solforico conc. e 100 cm³ di acqua, e riscaldando fino ad incipiente ebollizione.

2) Soluzione al 2 % di nitrito sodico.

Si riscalda per 2 minuti il residuo dell'estrazione con etere con 1 cm³ di soluzione di solfato mercurico, si lascia raffreddare e si tratta con 1 goccia di nitrito sodico: appare più o meno rapidamente una colorazione rossa che raggiunge il massimo di intensità dopo 3-5 minuti. Gli eventuali confronti di colorazione si possono fare soltanto dopo trascorso questo tempo.

L'acido salicilico dà col reattivo di Millon colorazione simile e precisamente rosso-bruna. Bisogna perciò accertare con la reazione del cloruro ferrico che sia assente l'acido salicilico.

La soluzione neutra di salicilato di ammonio non dà precipitato col solfato di rame, ma solo una colorazione verde.

Per ricercare l'acido p.ossibenzoico in presenza di altri acidi si può trarre profitto della insolubilità del sale di rame, o della insolubilità di esso nel tetracloruro di carbonio oppure della distillazione in corrente di vapore. L'acido p.ossibenzoico è difficilmente solubile in tetracloruro di carbonio, mentre il benzoico, il salicilico, l'orto ed il p.clorobenzoico, la vaniglina sono facilmente solubili.

Secondo Fellenberg e Krauze l'acido p.ossibenzoico è completamente insolubile in etere di petrolio e pertanto se la reazione di Millon è positiva sull'estratto d'etere solforico e negativa su quello di etere di petrolio si può affermare la presenza di acido p.ossibenzoico.

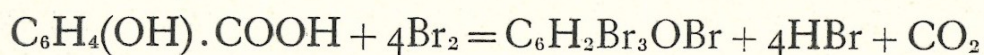
Con la distillazione in corrente di vapore l'acido p.ossibenzoico può essere separato dagli acidi benzoico e salicilico. Il residuo della distillazione viene estratto con etere solforico e l'acido p.ossibenzoico identificato dal punto di fusione.

Determinazione: Secondo Weiss. — Se nella sostanza in esame sono presenti l'acido p-ossibenzoico e gli eteri di esso, la sostanza viene estratta con etere ed il residuo, ottenuto per evaporazione del solvente, viene saponificato con potassa diluita. La soluzione alcalina viene acidificata e poi estratta con etere; l'etere viene evaporato e la quantità di acido p-ossibenzoico determinata per pesata.

In presenza degli acidi benzoico, salicilico, o - e p-clorobenzoico il residuo dell'estrazione con etere viene trattato con tetracloruro di carbonio oppure distillato in corrente di vapore, come si è detto precedentemente.

Per separare la vaniglina, nel caso che sia presente, si tratta la soluzione del residuo con qualche cm³ di soluzione acquosa satura e calda a 30° di semiossamazide ($H_2N.CO.CO.NH.NH_2$) e si agita: precipita il semiossamazone che viene separato per filtrazione. La eliminazione della vaniglina comporta però perdite talora notevoli di acido p-ossibenzoico o dei suoi derivati.

Come tribromofenolbromo. — Si tratta la soluzione acquosa di acido p-ossibenzoico con un eccesso di acqua di bromo satura; si forma un precipitato rosso bruno di tribromofenolbromo, secondo l'equazione



Si lascia il miscuglio di reazione per 1 o 2 ore in ghiacciaia agitando spesso ed energicamente, oppure a temperatura ordinaria per una notte oppure si agita per 3 ore con agitatore. Quindi si raccoglie il precipitato su filtro e si essica su H_2SO_4 , nel vuoto.

Con questo metodo si trova il 97-99% dell'acido presente.

I fenoli, l'alcole salicilico, l'aldeide salicilica, l'acido salicilico, l'acido p-ossibenzoico danno la stessa reazione e si determinano nello stesso modo.

Eteri dell'acido p-ossibenzoico.

Etere metilico	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COOCH}_3$	p. f.	131°
» etilico	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO.C}_2\text{H}_5$	»	116°
» propilico	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO.C}_3\text{H}_7$	»	176°
» fenilico	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO.C}_6\text{H}_5$	»	96,2°

Questi eteri sono facilmente solubili in alcole, cloroformio, meno in etere di petrolio, facilmente in acqua bollente e poco in acqua fredda. Cristallizzano bene e sublimano facilmente tanto che è possibile dalle loro forme cristalline, riconoscere i diversi derivati dell'acido p-ossibenzoico con il metodo proposto da Ficher e Stander.

Per la ricerca e la determinazione degli esteri, nel caso che si tratti di marmellate, confetture, conserve ecc., g 50 del campione vengono trattati in bevuta con 50 cm³ di acqua calda. Si chiude la bevuta e si agita fortemente per 15 minuti circa e di tanto in tanto si riscalda leggermente su b. m. Si lascia raffreddare e si filtra attraverso tela, avendo cura di spremere bene il residuo sul filtro per allontanare il più possibile il liquido. Si acidifica leggermente il filtrato con qualche goccia di acido solforico diluito e si aggiungono, agitando, 2-3 cm³ di liquido di Carrez ⁽²⁾ per chiarificare. Si porta a volume e si filtra. Una parte aliquota del filtrato si estrae

⁽²⁾ Soluzione al 15% di ferrocianuro di potassio e soluzione al 30% di solfato di zinco. I liquidi da chiarificare si trattano generalmente con 1 cm³ di ognuna di queste soluzioni o con 2-3 cm³ se ricchi di albiminoidi; si agitano bene e dopo riposo si filtrano.

due volte con 20-30 cm³ per volta di una miscela a parti uguali di etere-
etere di petrolio.

Se si tratta di carne, di burro, di margarina, g 50 del campione vengono trattati nel modo anzidetto con 150 cm³ di acqua calda. Per chiarificare il filtrato si impiegano 5 cm³ di liquido di Carrez nel caso della carne, 1 cm³ se si tratta di burro o di margarina. L'estrazione viene fatta due volte con 50 cm³, per volta, di miscela eterea.

Nel caso di olii e di grassi ed in genere di prodotti che contengono grassi è più utile separare gli esteri con la distillazione con vapore. g 10 del campione, riscaldati in bagno di paraffina tenuto a 100°, vengono distillati con una forte corrente di vapore, raccogliendo 200 cm³ circa di distillato. Poi si filtra il distillato per filtro bagnato e si estrae due volte con 50 cm³, per volta, di etere-etere di petrolio.

Nel caso dei vini, succhi, bevande ecc., g 50 del campione si diluiscono con 40 cm³ di acqua. La soluzione si acidifica leggermente, si chiarifica e si porta a segno, procedendo per il resto come si è detto precedentemente per le conserve.

Il latte si può trattare sia come i vini che come i grassi.

Ricerca. — Secondo Weiss il residuo ottenuto evaporando l'etere-etere di petrolio viene saponificato con soluzione di KOH diluita e nella soluzione si ricerca con i metodi già detti l'acido p-ossibenzoico.

Per la ricerca degli alcoli che si liberano durante la saponificazione si possono seguire i seguenti metodi:

1) *Estere metilico.* — Si versa almeno 1 mg di residuo in un palloncino, con l'aiuto, se del caso, di alcune gocce di etere che vengono poi evaporate a temperatura non superiore a 40°. Si aggiungono 5 cm³ di KOH al 2% e qualche pezzettino di porcellana e si collega il palloncino con un piccolo refrigerante Liebig. Si riscalda lentamente il liquido fino alla ebollizione e se ne distillano 3 cm³. Sul distillato si ricerca l'alcole metilico secondo Denigès e Fellenberg.

Il procedimento di Denigès e Fellenberg è basato sull'ossidazione con permanganato di potassio dell'alcole metilico a formaldeide e sulla ricerca di quest'ultima con fucsina bisolfittica.

Preparazione della soluzione di fucsina bisolfittica. g 0,5 di cloridrato di rosanilina si disciolgono a caldo in 200 cm³ di acqua. Si aggiungono

g 12,5 di solfito sodico cristallizzato e cm^3 7,5 di HCl (al 25%) e si porta la soluzione a 500 cm^3

Esecuzione. In un ampio tubo da saggio cm^3 0,25 del distillato alcolico in esame si trattano con 5 cm^3 di soluzione all'1% di KMnO_4 e con cm^3 0,2 di H_2SO_4 conc. e si agita. Dopo 2-3 minuti si aggiunge 1 cm^3 di soluzione all'8% circa di acido ossalico e si agita. Dopo pochi secondi il liquido assume una leggera colorazione; si aggiunge 1 cm^3 di H_2SO_4 conc. che rende il liquido incolore e quindi si tratta con cm^3 5 di fucsina. In presenza di alcole metilico compare dopo breve tempo una colorazione da violetta a rossa che raggiunge la massima intensità dopo 15-20 minuti.

L'alcole propilico normale, l'isopropilico, l'isobutilico, l'amilico e lo zucchero danno reazione debolmente positiva; la glicerina dà forte reazione positiva. Queste sostanze, se presenti, possono essere eliminate per distillazione e la reazione viene eseguita sulle prime frazioni del distillato. Anche l'alcole etilico e l'acetaldeide danno reazioni simili ma più tendenti al rosso e che scompaiono entro 1 ora; per eliminare l'influenza di queste due ultime sostanze non si deve omettere l'aggiunta di 1 cm^3 di H_2SO_4 .

Se nel liquido in esame è presente la formaldeide, bisogna eliminarla prima dell'esecuzione della reazione, per esempio con bisolfito.

2) *Esteri etilico e propilico.* — Si versa il residuo ottenuto dalla estrazione con etere-etere di petrolio in un palloncino, si aggiungono circa 4 cm^3 di acqua. Si collega il palloncino con un refrigerante verticale a mezzo di un tubo piegato due volte ad angolo retto; il braccio del tubo collegato al palloncino è lungo circa 10 cm. Si unisce poi il refrigerante con una bevuta che viene raffreddata con ghiaccio. Si riscalda la soluzione alcalina del palloncino e si mantiene in debole ebollizione per 1 ora; poi se ne distillano 4 cm^3 .

A 2 cm^3 di distillato si aggiungono 4-5 gocce di soluzione di acido cromico al 50% e si ricercano, col metodo Griebel ⁽³⁾, le aldeidi formate durante l'ossidazione.

⁽³⁾ Sul fondo di una vaschetta di vetro larga 15 mm ed alta altrettanto si pongono 2-3 cm^3 di soluzione nella quale si ricerca l'aldeide o se si tratta di sostanza solida pochi mg di sostanza, quindi si copre la vaschetta con un vetrino copri oggetti la cui superficie inferiore è stata inumidita con una goccia di reattivo. Il reattivo si prepara al momento sciogliendo qualche granellino di cloridrato di p-nitrofenilidrazina in alcune gocce di acido acetico al 15%. Si lascia la vaschetta in riposo per

L'aldeide acetica, che si può formare dall'alcole etilico se è presente il corrispondente estere, trattata con m. o con p-nitrofenilidrazina dà il corrispondente idrazone in piccoli cristalli, di forma caratteristica.

La forma cristallina del propiliden-4-nitrofenilidrazina non è invece molto definita.

Tuttavia il riconoscimento dell'estere etilico in presenza del propilico non è sempre possibile perchè la mescolanza dà spesso cristalli aghiformi irregolari. L'estere etilico è invece sempre riconoscibile in presenza dell'estere metilico e propilico se si usa la m-nitrofenilidrazina perchè l'aldeide formica e l'aldeide propilica — a differenza dell'aldeide acetica — non danno cristalli con il predetto reattivo.

Ricerca degli esteri secondo Sabalitschka. — La ricerca viene eseguita col reattivo di E. Nichel, che secondo Kreis e Studinger, si prepara sciogliendo g 7 di cloruro mercurico e g 4,4 di nitrato potassico in 100 cm³ di acqua e filtrando il leggero precipitato marrone che si forma. Per la ricerca si mescola il reattivo con ugual volume della soluzione acquosa dell'estere oppure si aggiunge 1 cm³ di reattivo all'etere allo stato secco, polverulento. Nell'un caso e nell'altro si riscalda per 15 minuti immergendo il tubo nel bagno maria. La presenza dell'estere è rivelata dalla graduale colorazione rossa che assume il liquido, e che si forma anche impiegando una soluzione acquosa di estere a 0,0015%. Poichè la vaniglina dà con il reattivo di Nichel la stessa colorazione, si lascia raffreddare la soluzione acquosa e poi si dibatte con etere: in presenza dell'estere, l'etere etilico si colora in rosso violetto mentre la soluzione acquosa assume colorazione bruna-gialla e per energico dibattimento diventa quasi incolora; in pre-

qualche tempo a temperatura ambiente, oppure si riscalda leggermente per 10-30 secondi sull'orlo esterno del b. m. In presenza di aldeidi e di chetoni si ha l'intorbidamento del reattivo per la formazione di cristalli di nitrofenilidrazoni, specie lungo i bordi della goccia, intorbidamento che si può facilmente rilevare con una lente di ingrandimento. Quindi si toglie il vetrino e si osserva al microscopio con un ingrandimento di 100 d. L'aldeide acetica dà cristalli aghiformi di colore giallo, l'acetone cristalli simili, l'aldeide benzoica aggregati di cristalli fogliiformi di colore giallo bruno, il furfurolo piccoli cespugli di colore bruno, l'aldeide formica aggregati cristallini con punti lanciformi. Il limite di sensibilità per 1 cm³ di liquido, è di 30 γ per l'aldeide acetica e benzoica, di 10 γ per l'acetone, di 5 γ per il furfurolo.

senza di vaniglina, invece, l'estere si colora in azzurro violetto e la soluzione acquosa in rosso ciliegia.

Determinazione degli esteri secondo Weiss. — Si effettua separando e pesando l'acido p-ossibenzoico. A tal fine si saponificano gli esteri, si acidifica la soluzione, si dibatte questa con un miscuglio di etere-etere di petrolio e si pesa il residuo che si ottiene dopo l'evaporazione spontanea del solvente. Dalla quantità di acido p-ossibenzoico si può risalire a quella degli esteri tenendo conto dei pesi molecolari di questi ultimi e precisamente la quantità dell'estere metilico (il cui peso molecolare è 152,07) viene calcolata col fattore 1,1, quella dell'estere etilico (p. m. 202,11) col fattore 1,2; quella dell'estere propilico (p. m. 202,11) col fattore 1,3.

L'estere metilico può essere calcolato pure col metodo Denigès e Fellenberg determinando per via colorimetrica l'alcole metilico che si forma saponificando l'estere. La quantità di alcole metilico trovata $\times 4,75$ dà quella dell'estere. A tale scopo si confrontano al colorimetro la soluzione in esame ed una soluzione tipo trattata con fucsina secondo il metodo di Denigès e Fellenberg per la ricerca dell'alcole metilico. Tale metodo è particolarmente adatto per la determinazione di piccole quantità di alcole metilico. La intensità della colorazione non è proporzionale al contenuto di alcole metilico e per tal fatto è necessario preparare una serie di soluzioni tipo, in modo che il contenuto in alcole metilico di una di esse sia assai vicino a quello della soluzione in esame. La colorazione data dalla fucsina è favorita dalla presenza di alcole etilico e pertanto è opportuno aggiungere una goccia di esso nelle soluzioni aventi bassa percentuale di alcole metilico.

Jeglienski ha dimostrato che la intensità della colorazione dipende dalla concentrazione in alcole etilico della soluzione. Un liquido, per es., avente 0,3% in volume di alcole metilico dà colorazione corrispondente al contenuto se la concentrazione in alcole etilico del liquido è del 20%. Bisogna quindi badare che le concentrazioni di alcole etilico nella soluzione in esame e nella soluzione tipo siano, per quanto possibile, uguali.

L'estere metilico si può calcolare determinando il gruppo metossilico col noto metodo di Zeisel. La quantità pesata di ioduro moltiplicata per 0,648 dà quella dell'estere.

Determinazione secondo Fellenberg e Krauze. — La sostanza in esame si dibatte con etere e l'estratto eterico viene evaporato in palloncino

da 50 cm³; si riprende il residuo con 5 cm³ di acqua e si fa bollire per breve tempo per scacciare i residui eteri ed altre eventuali sostanze volatili. Si lascia raffreddare e si aggiungono 2 cm³ di NaOH al 10%, si fa bollire per 5 minuti unendo il palloncino ad un refrigerante a ricadere; poi si distillano 4 cm³

Ossidazione con acido cromico. — 1 cm³ del distillato, posto in una provetta molto pulita, viene addizionato di un volume noto ed in eccesso (in genere basta 1 cm³) di soluzione 0,2 N di bicromato potassico e di 4 cm³ di acido solforico conc. e puro. Si agita la mescolanza e se il colore del liquido diventa verde, occorre aggiungere altra soluzione di bicromato. Nel tempo stesso si fa una prova in bianco usando le stesse quantità di soluzione di bicromato e di acido solforico. Si lasciano le soluzioni in riposo per almeno 1 quarto d'ora, poi si versano in palloncino Erlenmeyer e si lavano le provette con 80 cm³ di acqua. Si aggiungono alle soluzioni ben fredde g 0,2 di ioduro di potassio e si titola l'iodio messo in libertà con soluzione 0,1 N di iposolfito sodico. Sottraendo la quantità di acido cromico consumata nella prova in bianco si ricava quella consumata per 1 cm³ di distillato. 1 cm³ di soluzione 0,2 N di bicromato potassico corrisponde a mg 0,54 di alcole metilico, a mg 1,15 di alcole etilico, a mg 0,60 di propilico.

Determinazione dell'alcole metilico. - Reattivi: 1) Alcole-acido solforico. — Si addizionano 10 cm³ di alcole a 95% con 60 cm³ di acqua, si aggiungono 20 cm³ di acido solforico conc. e si porta al volume di 100 cm³.

2) Fucsina. — Si disciolgono g 0,5 di fucsina in 40 cm³ di acqua bollente e la soluzione si diluisce a 80 cm³, si aggiungono g 1,2 di solfito sodico disciolti in circa 6 cm³ di acqua e poi cm³ 10 di acido solforico N e si porta la soluzione a 100 cm³. Si filtra dopo alcune ore e si conserva al riparo dalla luce.

3) Soluzione di alcole metilico. — g 0,10 di alcole metilico si portano a 100 cm³; 1 cm³ = 1 mg di alcole metilico.

Procedimento. — Si tratta 1 cm³ del distillato con cm³ 0,3 di alcole-acido solforico e con cm³ 0,3 di soluzione di permanganato potassico (5 g in 100 cm³). Si agita la miscela e si lascia in riposo per 2 minuti precisi.

Ai fini del confronto si trattano nello stesso modo mg 1 e mg 0,5 di alcole metilico. Trascorsi i due minuti si aggiungono, a ciascuna prova, cm³ 0,3 di soluzione di acido ossalico (8 g in 100 cm³), e poi, dopo agita-

zione, cm^3 0,3 di acido solforico conc. e cm^3 1,6 di fucsina. Si agita ancora e si lascia in riposo per mezz'ora. Quindi si diluiscono tutte e tre le prove con 5 cm^3 di acqua e si confrontano al microcolorimetro le colorazioni ottenute. Le soluzioni che contengono piccolissime quantità di aldeide sono di colore verde-grigio, quelle che ne contengono notevoli quantità sono azzurre, per quantitativi ancora più elevati si ha colorazione violetta.

Confronto con campione contenente 1 mg

Intensità di colore:	0,1	-	0,2	-	0,3	-	0,4	-	0,5	-	0,6	-	0,7	-	0,8	-	0,9	-	1,0	
CH ₃ OH mg	:	0,15	-	0,29	-	0,42	-	0,55	-	0,67	-	0,77	-	0,83	-	0,88	-	0,95	-	1,0

Confronto con campione contenente mg 0,5

Intensità di colore:	0,1	-	0,2	-	0,3	-	0,4	-	0,5	-	0,6	-	0,7	-	0,8	-	0,9	
CH ₃ OH mg	:	0,07	-	0,24	-	0,34	-	0,42	-	0,50	-	0,63	-	0,71	-	0,77	-	0,81
		1,0	-	1,1	-	1,2	-	1,3	-	1,35								
		0,86	-	0,90	-	0,94	-	0,97	-	1,00								

Se le colorazioni si differenziano molto da quelle di confronto, allora è opportuno ripetere la determinazione diluendo il distillato oppure le soluzioni di confronto, secondo il caso.

La quantità di alcole metilico $\times 5$ dà la quantità di estere metilico.

Determinazione dell'alcole propilico. - Reattivi: 1) p-ossibenzaldeide.

— Si sciolgono g 0,25 di p-ossibenzaldeide pura in 100 cm^3 di alcole purissimo al 50%.

2) Soluzione di alcole propilico. cm^3 0,25 (= g 0,2) di alcole propilico si portano con acqua a 100 cm^3 ; $0,5 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mg}$ di alcole propilico.

Procedimento. — Si trattano cm^3 0,5 di distillato con cm^3 0,25 di soluzione di p-ossibenzaldeide e con 1 cm^3 di acido solforico conc. Si agita e si riscalda la miscela per 20 minuti in bagno maria bollente. Per il confronto e per la prova in bianco si trattano contemporaneamente e nello stesso modo cm^3 0,5 di alcole propilico e cm^3 0,5 di acqua. Dopo raffreddamento, si paragonano le colorazioni ottenute al microcolorimetro facendo uso della seguente tabella:

Confronto con campione contenente 1 mg

Intensità di colore:	0,2	-	0,25	-	0,3	-	0,4	-	0,5	-	0,6	-	0,7	-	0,8	-	0,9	-	1,0	
C ₃ H ₇ OH mg	:	0	-	0,18	-	0,33	-	0,48	-	0,57	-	0,66	-	0,75	-	0,84	-	0,93	-	1,0

Se la colorazione della soluzione in esame è molto diversa da quella di confronto è necessario ripetere la determinazione diluendo secondo il caso il distillato oppure la prova di confronto.

Determinazione dell'alcole etilico. — Per tale determinazione manca finora una reazione sufficientemente sensibile e caratteristica. La quantità di alcole etilico può essere calcolata sottraendo dalla quantità di soluzione di acido cromico consumata nell'ossidazione quella che compete all'alcole metilico ed all'alcole propiico.

Acido p-clorobenzoico. - Ricerca secondo Weiss. — Si riscaldano per immersione a b. m. e per 20 minuti, 2-3 mg di sostanza, ottenuta per distillazione con vapore o per estrazione con etere, con cm^3 0,25 di acido solforico conc. e qualche cristallino di nitrato di potassio. Quindi si aggiungono, agitando, 2 cm^3 di acqua e 2 cm^3 di ammoniaca e poi con precauzione, per avere la stratificazione, 1 cm^3 di soluzione di cloridrato di idrossilamina al 2%. Nella zona di contatto si forma una colorazione verde più o meno intensa a seconda della quantità di acido presente. Se l'idrossilamina si aggiunge sulla soluzione fredda la colorazione appare ugualmente, sebbene dopo molto tempo.

Ricerca secondo Fellenberg e Krauze. — Si effettua ricercando il cloro. Il residuo dell'estrazione con etere viene trattato in capsula di platino con 1 goccia di soluzione satura di carbonato di potassio ed un cristallino di nitrato di potassio. Si evapora con cautela e si fonde per breve tempo. Si riprende con poca acqua la sostanza fusa, si acidifica la soluzione con acido nitrico e si ricerca con nitrato di argento l'ione cloro. E' opportuno accertare che i reattivi siano esenti di cloruri.

Ricerca secondo Visintin. — E' basata sulla trasformazione per fusione con soda dell'acido p-clorobenzoico e sulla ricerca di quest'ultimo col reattivo di Millon.

Nel caso di vini, ed in genere di succhi, cm^3 100 si acidificano leggermente con acido solforico, si trattano, allo scopo di chiarificarli, col liquido di Carrez e si agitano bene. Dopo riposo si filtrano, si sottopongono all'estrazione entro separatore con cm^3 20 di etere etilico e si ripete tale estrazione per una seconda volta con cm^3 3-4 di acqua, dopo di che si versa l'estratto eterico entro piccola capsula di argento, e si lascia evaporare il solvente. Sul residuo si ricerca l'acido p-clorobenzoico.

Nel caso delle marmellate e conserve g 50 si sbattono energicamente entro matraccio Erlenmeyer con cm^3 70 di acqua previamente scaldata a circa 50° . Il tutto si filtra attraverso tela, avendo cura di spremere bene il residuo rimasto, allo scopo di allontanare il più possibile il liquido. Il filtrato si acidifica leggermente e si chiarifica secondo il metodo Carrez; si agita bene, si lascia in riposo per alcuni minuti, quindi si filtra per carta e il nuovo filtrato si sottopone all'estrazione come per i vini e succhi.

Per il riconoscimento si scioglie il residuo in cm^3 2 di soluzione di idrossido di sodio al 30% e si riscalda leggermente su cartone di amianto avendo cura di evaporare lentamente l'acqua. Indi si riscalda direttamente fino a leggera fusione del prodotto e si continua a riscaldare per 3-4 minuti, cioè finchè la schiuma sia scomparsa e il liquido sia diventato limpido e giallognolo. Dopo raffreddamento si scioglie in acqua il prodotto della fusione, la soluzione si versa in un separatore e si acidifica con acido solforico. Si estrae con etere, si lava l'estratto eterico con cm^3 2 di acqua, si versa la soluzione in capsulina di porcellana e si lascia evaporare spontaneamente. Sul residuo si fanno cadere 2-3 gocce di reattivo Millon: in presenza di acido p-ossibenzoico si ha colorazione rossa, che presto si intensifica in rosso bruno. Inoltre il liquido acquoso da cui è stato estratto l'acido p-ossibenzoico deve dare, se trattato con nitrato di argento, la reazione dei cloruri.

Determinazione. — Secondo Heide e Follen si versa la soluzione neutra dell'acido p-clorobenzoico in capsula di platino e si concentra aggiungendo ripetutamente piccole quantità di perossido di sodio esente di cloro. Si porta a secco e si calcina. Si riprende con acqua, si filtra, si lava bene il residuo sul filtro e nella soluzione si determina, per pesata, con nitrato d'argento, il cloro presente. 1 g di cloruro d'argento corrisponde a g 1,0918 di acido p-clorobenzoico, ed a g 1,2452 del sale sodico.

Secondo Weiss per la determinazione approssimativa dell'acido si può trarre profitto della poca solubilità dell'acido p-clorobenzoico in acqua (1 p. in circa 5200 p. di acqua a 20°), purificando il residuo più volte con acqua.

In genere per la determinazione dell'acido è sufficiente la pesata del residuo eterico.

RIASSUNTO

Vengono passati in rassegna i metodi usati per la ricerca e determinazione dell'acido benzoico e dei suoi derivati nei prodotti alimentari.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica. 1945.

BIBLIOGRAFIA

- AUERBACH e WEBER, *Z. anorg. Chem.*, 68, 147 (1925). Solubilità del benzoato di piombo. Separazione da altri sali di piombo.
- BAUMANN e GROSSFELD, *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, 29, 397 e 465 (1915). Determinazione dell'acido benzoico nel latte, nella carne ecc.
- BEHRE, GROSSE e SCHMIDT, *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, 16, 734 (1908). Presenza dell'acido benzoico nei prodotti vegetali.
- BIERNATH, *Analyst*, 37, 349 (1912). Modifica della reazione di Jonescu.
- BIGELOW, *Analyst*, 35, 21 (1910). Ricerca dell'acido cinnamico.
- BREUSTEDT, *Arch. Pharm.*, 237, 170 (1899). Ricerca ac. benzoico nel latte; reazione della benzaldeide.
- BREVANS, *J. Pharm. Chim.*, 14, 438 (1901). Ricerca ac. benzoico con la rosanilina.
- BRÜHL, *Ber.*, 22, 238 (1889). Apparecchio per sublimazione dell'acido benzoico.
- CHAUVET, *Ann. Falsif.*, 18, 31 (1925). Modifica della reaz. di Jonescu.
- CHELLE, *Ann. Falsif.*, 18, 134 (1925). Modifica della reaz. di Jonescu.
- CHIPMANN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 46, 2445 (1924). Solubilità dell'acido benzoico nel benzene e nel toluene.
- DAKIN e HERTER, *J. Biol. Chem.*, 3, 419 (1907). Ossidazione dell'acido benzoico a salicico con acqua ossigenata.
- DUBAQUIÉ, *Ann. Falsif.*, 18, 149 (1925). Modifica della reaz. di Jonescu.
- EDWARDS, *Analyst*, 62, 172 (1937). Determ. ac. benzoico.
- ENELL, *Pharm. Zentr.*, 45, 405 (1904). Ricerca ac. cinnamico con la reaz. della benzaldeide.
- FELLENBERG, *Trav. Chim. Alim.*, 1, 139 (1910). Determinazione ac. benzoico.
- FILAUNDEAU e BONIS, *Ann. Chim. Analyt.*, 7, 230 (1925). Determ. ac. benzoico nei vini con la reaz. di Mohler e di Heide e Jakob.
- FILIPPI, *Arc. Farm. Sperim.*, 26, 243 (1918). Trasformazione dell'acido ippurico in benzoico.
- FISCHER e GRUENERT, *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, 17, 721 (1909); 20, 580 (1910). Determ. ac. benzoico nella carne e nei grassi.
- FLEURY, *J. Pharm. Chim.*, 8, 460 (1913). Modifica della reaz. di Jonescu.
- FOLIN e WENTWORTH, *J. Biol. Chem.*, 7, 423 (1908). Determ. ac. benzoico.
- FORMENTI e SCIPIOTTI, *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, 12, 288 (1906). Determ. ac. benzoico nelle conserve di pomodoro.

- FRIESE, Pharm. Zentralh., 52, 1201 (1911). Determ. ac. benzoico nei grassi.
- GENERSICH, Z. Unters. Nahr. Genussm., 16, 222 (1908). Il benzene come solvente dell'acido benzoico.
- GIBERTINI, Boll. Chim. Farm., 71, 397 (1932). Ricerca ac. benzoico nei prodotti alimentari.
- GIRARD, Z. anal. Chem., 22, 277 (1883). Precipitazione delle proteine del latte con nitrato mercurico.
- GOWING-SCOPES, Analyst, 35, 238 (1910). Solubilità dell'acido benzoico e di altri acidi nel tricloroetilene.
- GRETHE, Z. Unters. Nahr. Genussm., 49, 51 (1925). Determ. ac. benzoico nel rosso d'uovo.
- GRIEBEL, Z. Unters. Nahr. Genussm., 19, 241 (1910). Ac. benzoico nella mortella.
- GROSSFELD, Z. Unters. Nahr. Genussm., 30, 271 (1915). L'idrossilamina come riducente nella reaz. di Mohler.
- GROSSFELD, Z. Unters. Nahr. Genussm., 53, 467 (1927). Determ. ac. benzoico nei prodotti alimetnari.
- GUARNIERI, Staz. Sperim. agrar. ital., 38, 906 (1905). Ricerca ac. benzoico in presenza degli acidi salicilico e tannico.
- GUEBERT, Compt. rend., 171, 40 (1920). Ricerca ac. benzoico.
- HALPHEN, J. Pharm. Chim., 28, 201 (1908). Modifica delal reaz. di Mohler.
- HARRAL, Analyst, 55, 445 (1930). Ricerca ac. benzoico.
- HEIDE E JAKOB, Z. Unters. Nahr. Genussm., 19, 137 (1910). Determ. ac. benzoico nei prodotti alimentari.
- HILLYER, Ind. Eng. Chem., 1, 538 (1909). Determ. ac. benzoico come benzoato di argento.
- HINKS, Analyst., 38, 555 (1913). Determ. ac. benzoico nel latte dopo idrolisi delle proteine.
- JONESCU J., Pharm. Chim., 29, 533 (1909). Trasformazione ac. benzoico in salicilico con acqua ossigenata.
- KINGSBURY, J. Biol. Chem., 21, 289 (1915). Determ. ac. benzoico nel sangue; precipitazione delle proteine con ac. tannico.
- KRUGER, Z. Unters. Nahr. Genussm., 26, 12 (1913). Determ. ac. benzoico nella carne dopo idrolisi delle proteine con ac. solforico e distillazione con vapore.
- LEHMANN, Chem. Ztg., 32, 949 (1908). Trasformazione in benzaldeide.
- LYTHGOE e MARSH, Ind. Eng. Chem., 3, 842 (1911). Sostanze che danno reazioni simili a quelle dell'ac. benzoico.
- MARDEN e DOVER, J. Amer. Chem. Soc., 38, 1235 (1916). Solubilità dell'ac. benzoico nelle miscele di solventi.
- MARRE, Ann. Falsif., 8, 16 (1915). Ricerca dell'ac. benzoico nella carne.
- MOHLER, Bull. Soc. Chim., 3, 414 (1890). Ricerca dell'ac. benzoico come m-diamminobenzoato di ammonio.

- MONIER-WILLIAMS, *Analyst*, 52, 572 (1927). Nuovo metodo per la determ. dell'ac. benzoico.
- MONIER-WILLIAMS, La determinazione dell'ac. benzoico negli alimenti. Reports on Public health and medical subjects n. 39. Ed. Majesty's stationery office. London, 1927.
- NEUBERG, *Biochem. Z.*, 27, 271 (1910). Trasformazione dell'ac. benzoico in salicilico per azione della luce.
- NICHOLLS, *Analyst*, 53, 19 (1928). Determ. ac. benzoico.
- PAJETTA, *Boll. Chim. Farm.*, 1906, 485. Solubilità del ben benzoato di piombo.
- PHILIPPE, *J. Chem. Soc.*, 108, 707 (1915). Ricerca ac. benzoico nel latte. Precipitazione delle proteine con solfato di rame.
- POLENSKE, *Z. anal. Chem.*, 52, 390 (1913). Determ. ac. benzoico.
- REVIS, *Analyst*, 37, 346 (1912). Ricerca ac. benzoico nel latte.
- RICHMOND e MILLER, *Analyst*, 32, 144 (1907). Ac. benzoico nel latte.
- ROHRIG, *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, 15, 29 (1908). Reaz. del benzoato di etile.
- SEIDEL, *Solubilities of inorganic and organic compauds*; II ed. D. von Nostrand Company, New York.
- WALTZINGER, *Chem. Ztg.*, 50, 949 (1926); 51, 170 (1927). Determ. ac. benzoico nel rosso d'uovo e nella carne.

Derivati dell'acido benzoico.

- BÖMER-JUCKENACH-TILLMANS, *Handbuch der Lebensmittelchemie*, ed. von Julius Springer, Berlino, 1934.
- D'AMBROSIO, *Chimica e industria*, 19, 504 (1937).
- EDWARDS, NANJI e HASSAN, *Analyst*, 62, 172 e 178 (1937).
- FELLENBERG e KRAUZE, *Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene*, 23, 111 (1932).
- FISCHER e STAUDER, *Mikrochemie*, 8, 330 (1930); *Z. Untersuch. Lebensm.*, 62, 658 (1931).
- GAROGGIO, *Trattato di enologia*, ed. Il Progresso Vinicolo ed Oleario, Firenze, 1942.
- HEIDE e FOLLEN, *Z. Untersuch. Lebensm.*, 53, 487 (1927).
- HOSTETTLER, *Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene*, 23, 65 (1932); 24, 247 (1933).
- JEGLINSKI, *Chem. Zentr.*, 104, I, 3225 (1933).
- KREIS e STUDINGER, *Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene*, 18, 333 (1927).
- SABALITSCHKA, *Z. angew. Chem.*, 42, 936 (1929).
- SCHWAIBOLD, *Pharmz. Zentr.*, 73, 513 (1932).
- VISINTIN, *Ann. Chim. Applicata*, 25, 148 (1935).
- WEISS, *Z. Untersuch. Lebensm.*, 55, 24 (1928); 59, 472 (1930); 67, 84 (1934).
-