

33 . Margherita MARZADRO. — L'impiego del fotometro di Pulfrich nella determinazione dell'azoto col microkjeldahl.

La colorimetria dell'ammoniaca che si forma nella distruzione delle sostanze organiche azotate col metodo di Kjeldahl è stata molto studiata per la determinazione dell'azoto in liquidi biologici, dove è sufficiente una precisione inferiore a quella richiesta per una microanalisi elementare su pochi milligrammi di una specie chimica pura.

Alcuni autori ⁽¹⁾ hanno cercato di evitare la distillazione dell'ammoniaca: essi aggiungono il reattivo di Nessler al liquido solforico che ha operato la mineralizzazione, opportunamente diluito e alcalinizzato. Ma i risultati che si ottengono in tal modo sono poco precisi: la soluzione colloidale del complesso iodomercurioammonico in quelle condizioni è instabile ed intorbida rapidamente.

Per ovviare a questo inconveniente alcuni, come Fuchs e von Falkenhausen ⁽²⁾, aggiungono gomma arabica od altri stabilizzanti; ma l'aggiunta di queste sostanze diminuisce la sensibilità della reazione. Altri, come Cleghorn ⁽³⁾, aumentano la quantità dell'ioduro di potassio o, come von der Heide ⁽⁴⁾, aggiungono direttamente questo sale alla soluzione da esaminare, così che il reattivo di Nessler si forma al momento dell'aggiunta col sale mercurico, già presente, che ha servito a catalizzare la distruzione della sostanza organica.

I risultati che si ottengono con questi metodi non raggiungono quella costanza e precisione che sono richieste nella microanalisi elementare secondo Pregl. Occorre ritornare alla distillazione dell'ammoniaca.

Ling ⁽⁵⁾ aveva già proposto una determinazione colorimetrica sul distillato ma per semplice comparazione ad occhio con soluzioni campione.

⁽¹⁾ ACÉL, *Biochem. Z.*, 121, 120 (1924); PONDER, *Ber. ges. Physiol.*, 15, 516 (1922); FUCHS U. FALKENHAUSEN, *Biochem. Z.*, 245, 304 (1932); CLEGHORN U. JENDRASIK, *Biochem. Z.*, 274, 188 (1934); R. VON DER HEIDE, *Z. anal. chem.*, 96, 7-16 (1934); BÉLA, *Biochem. Z.*, 283, 59-61 (1935).

⁽²⁾ loc. cit.

⁽³⁾ loc. cit.

⁽⁴⁾ loc. cit.

⁽⁵⁾ *J. soc. Chem. Ind.*, 41, 149 (1922).

Pure Kleinmann ⁽⁶⁾ determina l'ammoniaca sul distillato per via colorimetrica ma il metodo è notevolmente complicato perchè richiede non solo un suo colorimetro particolare non in uso nei laboratori italiani, ma anche l'uso di una soluzione speciale al posto dell'acqua distillata e la preparazione di soluzioni di confronto esattamente titolate da trattare ogni volta col reattivo di Nessler.

Il metodo che io descrivo in questa Nota è assai semplice: evita la laboriosa preparazione e conservazione delle soluzioni titolate N/100 esatte occorrenti nella microdeterminazione secondo F. Pregl ⁽⁷⁾ ed ogni altra complicazione introdotta coi metodi colorimetrici degli autori citati e raggiunge una precisione che — specialmente per la determinazione di quantità molto piccole di azoto dell'ordine di mg 0,1 — è superiore a quella che si può raggiungere con qualunque altro micrometodo. Richiede, è vero, l'uso del fotometro di Pulfrich e l'apparecchio di Parnas-Wagner, però il primo è in uso nella maggior parte dei laboratori di chimica e il secondo può essere facilmente costruito da qualunque soffiatore di vetro.

Si distrugge la sostanza organica col metodo di Pregl ⁽⁷⁾ e si distilla l'ammoniaca nell'apparecchio di Parnas e Wagner ⁽⁸⁾; si raccoglie il distillato su pochi cm³ di acqua (che è inutile acidificare) e si porta a volume in palloncino tarato da 100 cm³, sempre con acqua distillata. Si aggiunge 1 cm³ di reattivo di Nessler e si osserva la soluzione così ottenuta al fotometro di Pulfrich usando la vaschetta da 3 cm ed il filtro S 43.

Il diagramma che fornisce i valori dell'azoto per ciascun valore dell'estinzione non è una linea retta, come crede l'Urbach ⁽⁹⁾, ma una curva con la concavità volta verso l'asse delle concentrazioni. Non vi è, cioè, proporzionalità fra estinzione e concentrazione: quella cresce più lentamente di questa come del resto avviene spesso negli esami colorimetrici, specialmente se fatti con l'aiuto di filtri colorati, per i motivi rilevati in un esauriente lavoro di C. Toffoli ⁽¹⁰⁾.

⁽⁶⁾ Biochem. Z., 179, 287 (1926)

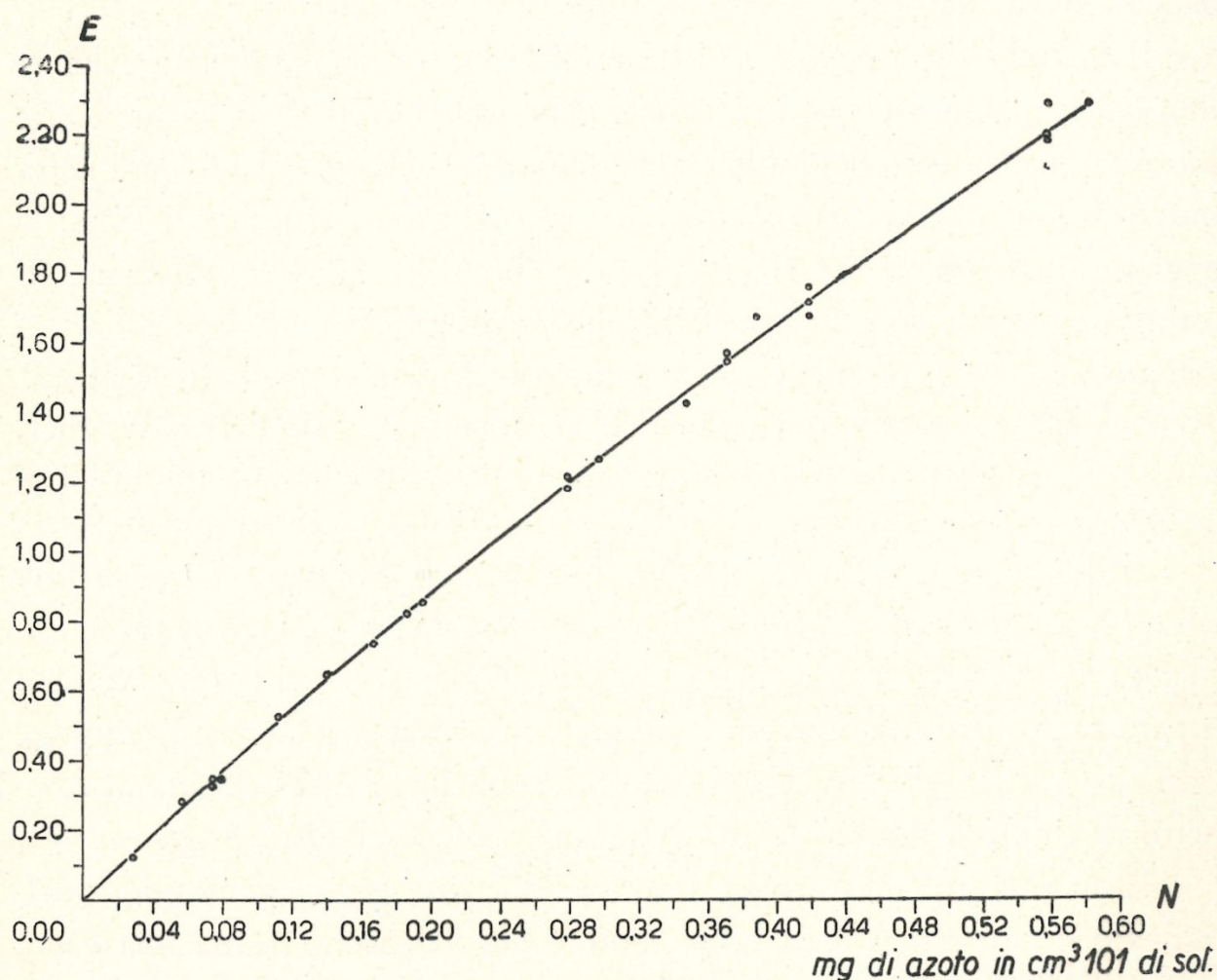
⁽⁷⁾ F. PREGL, Die quantitative organische Mikroanalyse, Verlag J. Springer, Berlin, 4^a ed. (1935).

⁽⁸⁾ Op. cit.

⁽⁹⁾ Mikrochemie 11, 50 (1932) e Stufenphotometrische Trinkwasseranalyse v. C. URBACH, Ed. Hain, Vienna-Lipsia (1937).

⁽¹⁰⁾ Questi Rendiconti, 2, 575 (1939); vedi, anche, dello stesso autore: idem, 2, 587 (1939).

A tale proposito si deve avvertire che, per gli stessi motivi, le letture possono presentare piccoli scarti da un osservatore all'altro, cosicchè è sempre consigliabile che il microanalista si costruisca il suo diagramma o la sua formola seguendo le indicazioni che verranno date nella parte sperimentale.



PARTE SPERIMENTALE

Si prepara una soluzione esattamente N/500 di cloruro di ammonio contenente g 0,010700 di prodotto purissimo Merck (essiccato a 100° sino a peso costante) in 100 cm³. Si portano al volume di 100 cm³ quantità variabili e crescenti di detta soluzione madre e precisamente cm³ 1, 2, 4, 5, 10, 15 e 20. Si ottengono 7 soluzioni a ciascuna delle quali si aggiunge un cm³ di reattivo di Nessler ⁽¹¹⁾.

Le soluzioni colorate così ottenute vengono esaminate al fotometro di Pulfrich in vaschette da 3 cm e con disco S 43 nell'intervallo di tempo

⁽¹¹⁾ Per la preparazione del reattivo di Nessler vedi: WINKLER, Chem. Zentr., 25, 586 (1901).

compreso fra 5 e 25 minuti dall'aggiunta del reattivo. Nell'altra vaschetta, anzichè acqua, si pone una soluzione ottenuta in modo simile, aggiungendo un cm³ di reattivo a 100 cm³ di acqua distillata; e ciò allo scopo di evitare l'eventuale piccolo errore dovuto al colore proprio del reattivo.

TABELLA I.

cm ³ sol. NH ₄ Cl al 0,01070% in cm ³ 101	D%	E	mg N cont. in 101 cm ³ di soluzione	calcolato con la form.
a) 1	75,5	0,122	0,028	0,028
2	51,5	0,288	0,056	0,059
4	29,6	0,529	0,112	0,115
5	22,5	0,648	0,140	0,143
10	6,1	1,215	0,280	0,283
15	2,1	1,678	0,420	0,408
20	0,75	2,150	0,560	0,544
b) 6	18,5	0,733	0,167	0,162
10	6,6	1,181	0,280	0,275
12,5	3,73	1,429	0,349	0,340
15	1,93	1,715	0,420	0,419
cm ³ sol. NH ₄ Cl al 0,014920% in cm ³ 101	D%	E	mg N cont. in 101 cm ³ di soluzione	calcolato con la form.
c) 2	45,1	0,346	0,078	0,074
5	14,0	0,854	0,195	0,193
10	2,1	1,678	0,390	0,408
15	0,49	2,314	0,583	0,592
cm ³ sol. NH ₄ Cl al 0,014283% in cm ³ 101	D%	E	mg N cont. in 101 cm ³ di soluzione	calcolato con la form.
d) 2	46,5	0,333	0,074	0,072
5	15,0	0,824	0,186	0,186
10	2,7	1,569	0,373	0,378
15	0,65	2,210	0,560	0,530
cm ³ sol. NH ₄ Cl al 0,014283% in cm ³ 101	D%	E	mg N cont. in 101 cm ³ di soluzione	calcolato con la form.
e) 2	45,0	0,347	0,074	0,074
5	15,0	0,824	0,186	0,186
8	5,4	1,268	0,298	0,297
10	2,8	1,552	0,373	0,374
15	0,66	2,200	0,560	0,559

I risultati sono raccolti nella tabella I. Le soluzioni sono state preparate altre quattro volte, ogni volta partendo da distinte quantità pesate di cloruro di ammonio puro secco: i nuovi risultati sono riportati nella tabella I in *b*, *c*, *d*, ed *e*. Tutti insieme sono riuniti nel diagramma del quale si è già detto sopra. Esso fornisce per ciascun valore dell'estinzione *E* i mg N di azoto contenuti nella soluzione portata a volume e esaminata

al fotometro dopo l'aggiunta del reattivo. Allo stesso scopo serve la seguente formola:

$$N = 0,208 E + 0,021 E^2$$

che esprime analiticamente e con buona precisione la stessa funzione.

E' ovvio che quando la quantità di azoto è molto piccola, anzichè al volume di 100 cm³ si può portare la soluzione distillata a un volume inferiore qualunque: allora anche la quantità di reattivo ed il risultato finale dovranno venire diminuiti nelle stesse proporzioni. Ad es. la soluzione sia stata portata ad un volume di 40 cm³; si aggiungano cm³ 0,40 di reattivo ed i mg ottenuti con il diagramma o con la formola (non l'estinzione) si moltiplichino per il rapporto $\frac{40}{100}$ (identico a $\frac{40,4}{101}$).

TABELLA II.

sost.	mg sost.	D%	E	Vol. in cm ³	mg N	N%		errore
						trov.	calc.	
Isatina	3,832	3,4	1,469	100	0,351	9,16	9,45	— 0,29
	2,545	9,3	1,032	»	0,237	9,31	»	— 0,14
	2,977	6,2	1,208	»	0,283	9,50	»	+ 0,05
	3,107	5,7	1,244	»	0,297	9,55	»	+ 0,10
	2,583	9,2	1,036	»	0,238	9,22	»	— 0,23
Acetanilide	3,090	18,3	0,738	200	0,165×2	10,6	10,3	+ 0,30
	2,686	14,7	0,833	150	0,187×1,5	10,3	»	0,00

La tabella II porta i risultati ottenuti in due analisi di acetanilide e cinque di isatina. Gli scarti dal valore teorico non superano $\pm 0,3$ per cento di sostanza e rientrano perfettamente nei limiti consentiti nelle microanalisi secondo Pregl.

RIASSUNTO

Si descrive un metodo semplice e preciso per la microdeterminazione colorimetrica dell'azoto che sostituisce vantaggiosamente il delicato procedimento acidimetrico nel metodo secondo Pregl. Esso è fondato sull'aggiunta del reattivo di Nessler al distillato e sull'esame al fotometro di Pulfrich del colore che si forma.

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