32. Margherita MARZADRO — **Determinazione selettiva di varie forme di azoto col micrometodo di Kjeldahl. Nota III.**

Riassunto. — Viene esteso a numerosi altri composti eterociclici il metodo di dosaggio precedentemente descritto per le forme di azoto nucleare ed extranucleare. Si stabilisce che l'acridina resiste all'attacco solforico mentre vengono demoliti integralmente gli anelli del pirrolo, indolo, imidazolo, pirimidinico, purinico, il tiazolo, il benzotiazano e le triazine.

Viene posto in evidenza il comportamento dell'azoto legato al metile che si trasforma in qualche caso integralmente in metilammina.

Résumé. — L'auteur s'est proposé d'étendre à la détermination de l'azote dans de nouveaux composés, la méthode précédemment appliquée au noyau de la quinoléine, insoquinoléine et pyridine.

On a relevé que: l'acridine résiste à l'attaque sulfurique. L'azote contenu dans les cycles du pyrrol, de l'indol, de l'imidazol, de la pyrimidine, de la purine, du thiazol, du benzothiazane et de la triazine vient déterminé intégralement.

Les produits N-méthylés sont dans quelques cas susceptibles de se décomposer en methyl-amine.

Summary. — The method for the determination of ring nitrogen and chain nitrogen previously described has been extended to many additional other heterocyclic compounds. It has been established that acridine resists sulphuric acid attack, the rings of pyrrole, indole, imidazole, purine, thiazole, benzothiazine and triazine undergo complete depradation.

The behavior of N-methyl groups is discussed; complete conversion to methylamine sometimes occurs.

Zusammenfassung. — Die früher beschriebene Methode zur Bestimmung des Ring- und Seitenketten-Stickstoffes wird auf eine weitere Anzahl heterocyclischer Verbindungen angewandt. Es wird festgesetzt, dass Acridin ben der Veraschung mit Schwefelsäure nicht zerstört wird, während die Ringe des Pyrrols, Indols, Imidazols, Pirimidins, Purins, Thiazols, Benzothiazans und Triazins total zerstört werden.

In due note precedenti, presentate al I Congresso Internazionale di Microchimica di Graz (1) e al VI Congresso Nazionale di Chimica di Milano (2), ho reso noto un metodo per il dosaggio selettivo di varie forme di azoto presenti in composti azotati eterociclici, basato sulla resistenza all'attacco solforico (Kjeldahl) di alcuni nuclei.

Alle osservazioni fatte in precedenza vengono ora ad aggiungersi altre che risultano da una indagine più approfondita ed estesa a numerosi altri composti.

Ho anzitutto preso in esame altri anelli eterociclici oltre a quelli già considerati e precisamente i seguenti: l'acridina, il pirrolo, l'indolo, l'imidazolo, la pirimidina, la purina, il tiazolo, il benzotiazano ed i nuclei condensati e idrogenati presenti in molti alcaloidi (morfina, cocaina, atropina, ecc.).

L'osservazione che molte sostanze, per le quali ho ottenuto valori anomali (generalmente inferiori al teorico), contenevano l'aggruppamento $>N.CH_3$, mi ha portato ad attribuire questo comportamento alla formazione durante l'attacco solforico di metilammina; l'azoto di questa sostanza, che peraltro è anche attaccata con molta difficoltà dall'acido solforico, poteva sfuggire in quanto il metodo da me adottato mette in evidenza soltanto l'ammoniaca (reattivo di Nessler).

Per verificare questa ipotesi è stato necessario determinare se in tali casi, la titolazione diretta della base volatile (NH_3 + $CH_3.NH_2$) desse i risultati attesi.

Le esperienze hanno confermato la fondatezza della ipotesi, come è chiaramente visibile nella tabella (3); si confrontino ad es. i valori trovati coi due metodi 1) titolazione colorimetrica della sola ammoniaca e 2) titolazione diretta delle due basi, per i composti n. 16, 23, 34, 35.

A questo proposito v'è da fare una osservazione interessante: è noto (4) che nella clorurazione della caffeina l'alogeno entra contemporaneamente nella posizione 8 e nel metile in 7 formando un prodotto che bollito poi con acqua ,perde formaldeide e acido cloridrico e dà l'8-cloroteofillina (5) sì che appariva logico pensare che anche all'attacco solforico il metile in 7 della caffeina venisse ossidato e quindi solo due dei quattro azoti della molecola si rivelassero come metilammina e gli altri due come ammoniaca. L'esperienza ha infatti dimostrato che la caffeina dà prati-

---

(1) M. Marzadro: Mikrochemie, *37*, 671 (1951).
(2) M. Marzadro: Mikrochemie, *38*, 372 (1951).
(3) Non è improbabile che su questa osservazione possa basarsi un metodo di dosaggio dell'azoto presente nella molecola sotto forma di aggruppamento $> N.CH_3$. A questo proposito ho in programma di istituire delle nuove esperienze.
(4) Beilstein XXVI, 475; C. 1904, II, 626.
(5) loco citato e Ber., *39*, 429.

camente metà del suo azoto sotto forma di ammoniaca e metà come metilammina.

A conferma di questo ragionamento ho voluto esaminare anche il comportamento all'attacco solforico secondo Kjeldahl della teobromina, che avendo due soli metili (in 3 e in 7) avrebbe dovuto, a prima vista, comportarsi come la caffeina, dimetilandosi in 7 e dando quindi tre quarti del suo azoto come ammoniaca e solo un quarto come metilamina (del metile in 3). L'esperienza ha invece mostrato come nel caso della teobromina l'azoto si ripartisca metà e metà nelle due forme.

Una interpretazione di questo fatto apparentemente inspiegabile si potrebbe forse trovare, a mio avviso, nel comportamento sostanzialmente diverso alla clorurazione della teobromina rispetto alla caffeina. Gli AA. ([6]) che hanno studiato questa reazione hanno infatti trovato che nei numerosi e spesso complicati prodotti di reazione si riscontrano ancora inalterati i due metili uniti originariamente agli atomi di azoto 3 e 7; così pare lecito supporre che anche nell'attacco solforico questi metili non si distacchino e si riscontrino quindi come metilamina.

Se e fino a qual punto queste conclusioni siano corrette potrebbe forse chiarire una indagine più approfondita, estesa anche ad altre basi puriniche metilate.

Per quanto concerne la resistenza all'attacco solforico dei vari nuclei, ho osservato quanto segue:

Escluso il nucleo acridinico, che resiste come i nuclei della chinolina e piridina, tutti gli altri presi in esame in questa nota vengono facilmente demoliti, siano essi semplici o anelli condensati.

Una posizione intermedia occupano i nuclei ad anelli condensati e idrogenati presenti nelle molecole degli alcaloidi come l'atropina, la cocaina, la morfina ecc. In questo caso si osserva solo un attacco parziale con formazione anche di metilamina; è da ritenersi che in buona parte la molecola di queste sostanze si semplifichi durante l'attacco solforico dando luogo a derivati della piridina e isochinolina stabili e non volatili ([7]).

In aggiunta a quanto già detto in precedenza in merito all'influenza di vari gruppi sulla resistenza del nucleo piridinico e chinolinico, ho ef-

---

([6]) H. Biltz e E. Topp: Ber., *44*, 1526; H. Biltz e P. Damm: Ann., *406*, 32, 44, 68.

([7]) Torna qui a proposito citare alcune nuove esperienze da me effettuate sul comportamento al metodo di Kjeldahl della sparteina che, come ho riferito nella nota precedente, cede all'attacco solforico solo metà dell'azoto come ammoniaca. Senza dilungarmi in dettagli sperimentali ho potuto stabilire che realmente una metà dell'azoto si libera come ammoniaca, mentre l'altra metà si ritrova in piccola parte come ammoniaca, mentre l'altra metà dell'azoto si ritrova in piccola parte come piridina ed in massima parte sotto forma differente non volatile diversa dall'acido nicotinico. E' probabile si tratti di un acido piridin-solfonico. Questo risultato conferma sostanzialmente il meccanismo di demolizione della sparteina che avevo precedentemente proposto.

TABELLA 1.

	Formula bruta	% Azoto totale Dumas-Zimmermann		% Azoto extranucleare Kjeldahl modificato		% Azoto nucleare per differenza	
		calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	trov.
Acridine							
1) Acridina	$C_{13}H_9N$	7,82	7,93	0	0	7,82	7,93
2) Tripaflavina cloridrato	$C_{14}H_{14}N_3Cl.HCl$	14,19	14,27	9,46	9,47	4,73	4,80
3) Atebrina	$C_{23}H_{30}N_3OCl.2H_2O.2HCl$	8,26	8,46	5,50	5,65	2,76	2,81
4) 2 - metossi - 6 - cloro - 9 - α - ammino - β - idrossi - γ - dietilamminopropil - acridina - bicloridrato	$C_{21}H_{26}O_2N_3Cl.2HCl$	9,12	9,10	6,08	6,03	3,04	3,07
Chinoline e piridine							
5) 4-amminochinolina .	$C_9H_8N_2$	19,43	19,20	9,71	9,70	9,71	9,50
6) Etere metilenico della 2 - fenil - 3 - ossimetil - 4 - ossichinolina . .	$C_{17}H_{13}O_2N$	5,32	5,44	0	0	5,32	5,44
7) Ammide dell'ac. 2-clorocinconinico . . .	$C_{10}H_7O_3N_2Cl$	13,56	13,65	6,78	8,30 8,31 8,97 8,99		
8) Ammide dell'ac. 2-cloro - 6 - nitro - 4 - chinolincarbonico . . .	$C_{10}H_6O_3N_3Cl$	16,70	16,63	11,14	13,45 14,03		
9) β - ossietilammide dell'ac. 2 - cloro - 6 - nitrocinconinico . . .	$C_{12}H_{10}O_4N_3Cl$	14,24	13,96	9,48	11,40		
10) 2 - ossipiridina . . .	C_5H_5 O N	14,73	14,55	0	9,55 6,25 4,80 2,72		

TABELLA 2.

	Formula bruta	% Azoto totale Dumas-Zimmermann		% Azoto Kjeldahl modificato colorimetrico		% Azoto Kjeldahl modificato per titolazione	
		calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	trov.
Composti a nuclei condensati e idrogenati							
11) Atropina	$C_{17}H_{23}O_3N$	4,84	5,04	4,84	0	4,84	0,5
12) Cocaina cloridrato . .	$C_{17}H_{21}O_4N.HCl$	4,12	4,19	4,12	0		
13) Scopolammina cloridrato	$C_{17}H_{21}O_4N.HCl.2H_2O$	3,73	3,89	3,73	0,4		
14) Morfina cloridrato .	$C_{17}H_{19}O_3N.HCl.3H_2O$	3,73	3,61	3,73	0,5		
15) Codeina	$C_{18}H_{21}NO_3$	4,68	4,78	4,68	0,9	4,68	2,0
16) Apomorfina cloridrato	$C_{17}H_{17}O_2N.HCl$	4,61	4,54	4,61	1,68 2,65 2,68 1,50	4,61	3,28
17) Arecolina cloridrato .	$C_8H_{13}O_2N.HCl$	7,31	7,52	0	0	0	0,6
Pirroli							
18) Pirrolo	C_4H_5N	20,88	21,05	20,88	20,73		
19) N-fenilpirrolo . . .	$C_{10}H_9N$	9,78	9,91	9,78	9,54		
20) N-metilpirrolo . . .	C_5H_7N	17,27	17,43	17,27	5,92 5,73 6,19 6,29	17,27	17,28

TABELLA 3.

	Formula bruta	% Azoto totale Dumas-Zimmermann		% Azoto Kjeldahl modificato colorimetrico	
		calc.	trov.	calc.	trov.
Indoli					
21) Indolo	C_8H_7N	11,96	12,26	11,96	11,91
22) Benzilossindolo	$C_{15}H_{13}$ O N	6,27	6,22	6,27	6,23
23) β-dimetilammino-metilindolo	$C_{11}H_4N_2$	16,08	16,29	16,08	8,87 (*)
24) 3-metilossindolo	C_9H_9 O N	9,52	9,46	9,52	9,34
Imidazoli					
25) Istidina monocloridrato	$C_6H_9O_2N_3.HCl.H_2O$	20,05	20,16	20,05	20,10
26) 2-metilbenzimidazolo	$C_8H_8N_2$	21,20	21,05	21,20	20,28
Pirimidine					
27) Acido feniletilbarbiturico	$C_{12}H_{12}O_3N_2$	12,06	12,35	12,06	12,16
28) Acido dietilbarbiturico	$C_8H_{12}O_3N_2$	15,21	14,93	15,21	15,28
29) 2-mercapto 4,5,difenilpirimidina . . .	$C_{16}H_{12}N_2S$	10,60	10,69	10,60	10,45
30) Vitamina B_1	$C_{12}H_{17}ON_4S$ Cl.HCl	16,61	16,31	16,61	16,25

(*) Il valore 8,87 si riferisce all'azoto del nucleo il cui valore teorico è 8,04. La metilammina della catena laterale si libera quasi totalmente come tale e dà solo in piccola parte ammoniaca. Dosando colorimetricamente si determinano perciò, oltre all'azoto del nucleo solo quelle tracce di ammoniaca.

TABELLA 4.

	Formula bruta	% Azoto totale Dumas-Zimmermann		% Azoto Kjeldahl modificato colorimetrico		% Azoto Kjeldahl modificato per titolazione	
		calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	trov.
Purine							
31) Biossipurina . . .	$C_5H_4O_2N_4$	36,84	37,09	36,84	36,75		
32) Triossipurina . . .	$C_5H_4O_3N_4$	33,33	33,41	33,33	33,40		
33) 6-amminopurina .	$C_5H_5N_5$	51,85	51,69	51,85	51,79		
34) 1,3,7,trimetilxantina .	$C_8H_{10}O_2N_4$	28,85	28,80	14,43 (*)	15,77 14,16 14,15 15,49	28,85	28,92
35) 3,7,dimetilxantina .	$C_7H_8O_2N_4$	31,11	30,88	15,56 (*)	15,45	31,11	30,89
Tiazoli							
36) 2-p-metossifenilammino-benzotiazolo . .	$C_{14}H_{12}ON_2S$	10,94	11,07	10,94	11,01		
37) 6-nitro-2-p-fenilammino-benzotiazolo . .	$C_{13}H_9O_2N_3S$	15,50	15,42	15,50	15,80		
Benzotiazani							
38) Benzotiazano . . .	C_8H_9NS	9,28	9,25	9,28	9,05		
39) 7-amminobenzotiazano	$C_8H_8N_2SO$	15,55	15,42	15,55	15,66		
40) Fenilbenzotiazano . .	$C_{14}H_{13}NS$	6,16	6,23	6,16	6,11		

(*) Valore calcolato per due molecole di ammoniaca pro molecola di sostanza.

fettuato alcune esperienze su derivati chinolinici clorurati in 2 e sulla 2-ossipiridina. Si è confermato quanto era stato già osservato e cioè che il cloro in posizione 2 rende parzialmente fragile l'anello azotato e altrettanto può dirsi per l'OH sebbene in misura minore; non si hanno infatti valori riproducibili, ma dipendenti in larga misura dalle condizioni dell'esperienza.

A conferma poi di quanto preannunciato nelle altre note, ho verificato che il gruppo OH e il gruppo NH_2 in posizione 4 non indeboliscono la resistenza dell'anello chinolinico.

In esperienze tuttora in corso ho trovato che anche l'anello delle 1, 2, 4 triazine si lascia facilmente demolire dall'attacco solforico. I risultati di questa indagine saranno resi noti in altra occasione, in cui si approfondiranno le cause dei risultati anomali presentati dalla tiosemicarbazide e da molti suoi derivati a struttura aperta o ciclica.

Sono vivamente riconoscente al Prof. Raffaello Fusco per l'interesse con cui ha seguito questo lavoro e per i suoi preziosi consigli.

Le sostanze n. 6, 7, 8, 9, 19, e dal 21 al 26 e dal 36 al 40 che sono in parte prodotti di lavoro in corso di pubblicazione mi sono stati gentilmente forniti da A. Ballio, G. Bargellini, R. Fusco, L. Monti, A. Oliverio, G. Palazzo che qui sentitamente ringrazio.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica.