

69. Lavinia CARTA-DE ANGELI e F. DENTICE di ACCADIA. — **Determinazione colorimetrica del ferro con o-fenantrolina nei brodi di fermentazione.**

Riassunto. — Si descrive un metodo per la determinazione del ferro in sostanze organiche e nei brodi di fermentazione basato sulla formazione del complesso ferro ferroso-o-fenantrolina, dopo trattamento a caldo con acido perclorico seguito da riduzione con idrosolfito.

Si discutono i risultati ottenuti in oltre trecento analisi, di cui duecento eseguite su brodi di fermentazione impiegati per la produzione di ferroverdina, e le altre su soluzioni standard di ferro, su citrato di ferrocina e su cloridrato di ematina.

Tutte le operazioni vengono eseguite in un singolo palloncino Kjeldahl, tarato a 50 cm³.

Summary. — A method for the iron determination in organic substances and in fermentation broths is described. After hot digestion with perchloric acid, followed by reduction with dithionate, the concentration of ferrous ions is determined colorimetrically as a complex with o-phenanthroline.

Results of more than 300 determinations (most of them were carried on fermentation broths used for the production of ferroverdin, the others on standard solutions of iron, ferrocholine citrate and haematin hydrochloride) are discussed.

All operations are performed in a single 50 ml Kjeldhal flask.

Il metodo qui descritto per la determinazione del ferro in sostanze organiche e nei brodi di fermentazione, si basa sulla formazione del complesso ferro ferroso-o-fenantrolina. Questo complesso di colore rosso-arancio e dalla formula $(C_{12}H_8N_2)_3Fe^{++}$, si forma quando una molecola di ferro-ferroso si combina con 3 molecole di o-fenantrolina ⁽¹⁾. L'intensità della colorazione che si ottiene è proporzionale alla concentrazione di ferro e viene misurata al fotometro Hilger con filtro 603 (blue-green). La colorazione diventa stabile in 30 minuti ⁽²⁾ e non cambia per almeno 48 ore ⁽³⁾.

PARTE SPERIMENTALE

REATTIVI.

- 1) Acido perclorico al 72%; densità: 1,67;
- 2) Acido solforico al 95%; densità: 1,84;
- 3) Sodio idrosolfito depurato. Si adopera una soluzione acquosa al 20% preparata prima dell'uso;
- 4) p-Nitrofenolo all'1% in alcool etilico a 95°;
- 5) Idrato di ammonio al 19%; densità: 0,925. Si diluisce la soluzione concentrata nel rapporto 1:4;
- 6) Acido solforico 10 N;
- 7) Idrossilammina cloridrato ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$); p. m. 69,5. 10 gr. di sostanza si sciolgono in un palloncino tarato a 100 cm³ con acqua distillata; a soluzione avvenuta si porta a volume e si mantiene la soluzione in frigorifero;
- 8) o-Fenantrolina cloridrato (o-phenantrolinhydrochloride Riedel de Haen A. G.). Si prepara una soluzione acquosa al 0,25% e si mantiene la soluzione in frigorifero;
- 9) Citrato sodico neutro (p.m. 294,12). Si prepara una soluzione acquosa al 25%;
- 10) Filo di ferro puro per analisi (Carlo Erba);
- 11) Acido nitrico al 65%; densità: 1,40.

ANALISI DEI CAMPIONI.

Procedimento.

Una quantità di sostanza organica contenente da 0,02 mg a 0,15 mg di ferro, viene messa a distruggere per due ore in un palloncino Kjeldahl con taratura a 50 cm³ e munito di apposito tappo a smeriglio, con 1 cm³ di acido perclorico (reattivo 1) e 1 cm³ di acido solforico (reattivo 2). A digestione avvenuta, si raffredda e si aggiunge 1 cm³ di idrosolfito sodico al 20% (reattivo 3) lasciando poi bollire per 1 ora. Dopo raffreddamento, si aggiungono lentamente 1-2 cm³ di acqua distillata, si agita, e si procede lasciando cadere nel palloncino una goccia di soluzione alcolica di p-nitrofenolo (reattivo 4). Si neutralizza con idrato di ammonio (reattivo 5) fino al viraggio dell'indicatore, e si acidifica fino a pH 2 circa

con poche gocce di acido solforico 10 N (reattivo 6). Si chiude il palloncino con l'apposito tappo, si agita, e si controlla il pH con un capillare. Dopo raffreddamento della soluzione in bagno di acqua corrente, si aggiunge 1 cm³ di cloridrato di idrossilammina al 10% (reattivo 7) e, dopo aver agitato, si lascia riposare per 15 minuti. Si aggiungono quindi 5 cm³ di o-fenantrolina (reattivo 8), si agita e si porta il pH della soluzione a 3,5-4 con citrato sodico al 25% (reattivo 9). Dopo aver controllato il pH, si porta al volume di 50 cm³ con acqua distillata, si agita, e si immerge infine il palloncino in bagno-maria a 35° per 30 minuti. Si raffredda sotto acqua corrente e si legge l'intensità di colorazione della soluzione allo spekker contro acqua, usando il filtro 603 (bleu-green).

Prova in bianco.

Per la prova in bianco si procede come per il campione, sostituendo al campione stesso acqua distillata o, in caso di sostanza solida, l'involucro in cui si è effettuata la pesata che può essere costituito da una cartina da sigarette priva della striscia gommata.

Calcolo.

La differenza tra il valore dell'assorbimento letto per il campione e quello dell'assorbimento letto per la prova in bianco, rappresenta il valore relativo al complesso colorato formatosi con il ferro presente nel campione in esame. Questo valore viene letto su una curva standard ottenuta con soluzioni di ferro a titolo noto.

Curva standard.

Si pulisce con carta a smeriglio e si sgrassa con acetone o toluolo del filo di ferro puro (reattivo 10). Se ne pesano esattamente 100 mg e si travasano in un pallone tarato a 1000 cm³; si aggiungono 9 cm³ di acqua distillata e 1 cm³ di acido solforico (reattivo 2). Si agita di tanto in tanto fino a soluzione completa del ferro. Si aggiungono poi 900 cm³ circa di acqua distillata e, dopo agitazione, 3 cm³ di acido nitrico (reattivo 11) (4), si agita e si porta a volume con acqua distillata. Si ottiene così una soluzione contenente 0,1 mg di ferro per cm³. Si prelevano, con pipette graduate, quantità di 0,5, 1 e 1,5 cm³ corrispondenti rispettivamente a 0,05, 0,1 e 0,150 mg di ferro e si travasano in palloncini tarati a 50 cm³ contenenti 49,5 cm³ di acqua distillata. La differenza di volu-

me nei tre palloncini viene colmata con l'aggiunta di una soluzione contenente in 100 cm³ di acqua distillata 0,1 cm³ di acido solforico (reattivo 2) e 0,3 cm³ di acido nitrico (reattivo 11). A ciascun palloncino si aggiunge 1 cm³ di cloridrato di idrossilammina (reattivo 7), si agita e si lascia riposare per 15 minuti. Si aggiungono quindi 5 cm³ di o-fenantrolina cloridrato (reattivo 8) e si procede come già descritto per l'ana-

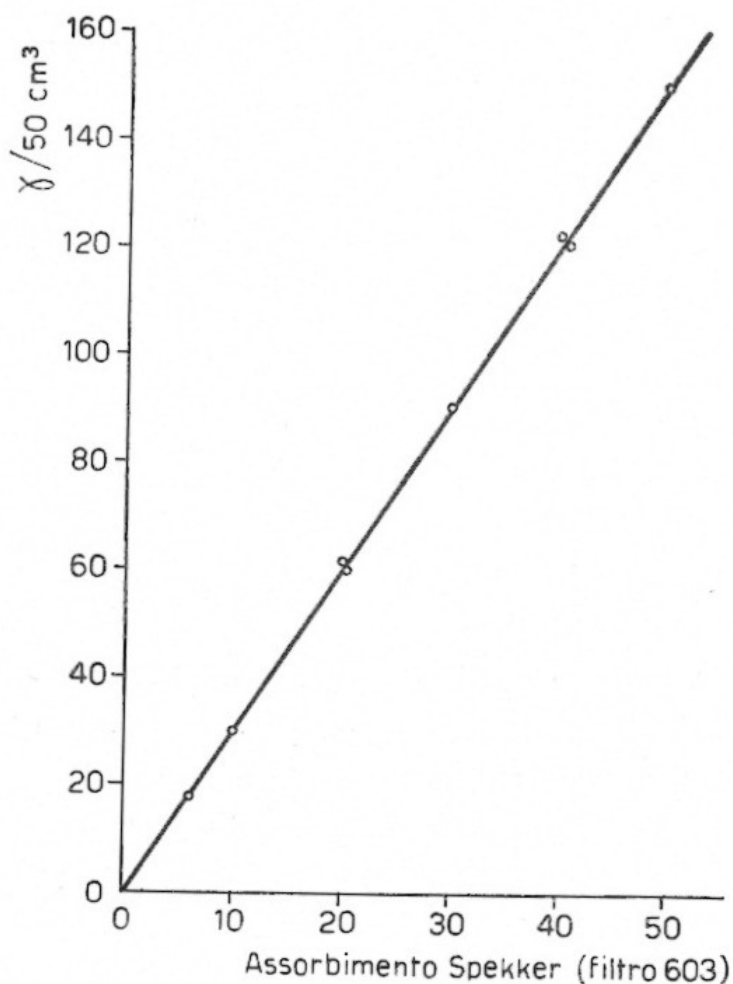


Fig. 1. - Curva standard.

lisi dei campioni. Si legge il valore dello assorbimento di ciascuna soluzione allo spekker, si detrae il valore della prova in bianco, e con i valori così ottenuti si traccia la curva standard su un grafico in cui si pone in ascisse l'assorbimento allo spekker e in ordinate i gamma di ferro in 50 cm³ di soluzione. Questa curva segue la legge di Beer (fig. 1).

Per la prova in bianco si procede come per le soluzioni standard, sostituendo ad esse, 1,5 cm³ di una soluzione contenente in 100 cm³ di acqua distillata 0,1 cm³ di reattivo 2 e 0,3 cm³ di reattivo 11.

DISCUSSIONE

L'aggiunta di idrosolfito alla soluzione proveniente dalla distruzione, è necessaria per ridurre l'eccesso di biossido di cloro presente dopo la distruzione ⁽⁵⁾. La sua presenza infatti interferisce nella reazione con o-fenantrolina poichè, durante la neutralizzazione con ammoniaca, esso si trasforma parte in clorito e parte in clorato ⁽⁶⁾.

Per quanto riguarda la riduzione del ferro da ferrico a ferroso mediante idrossilammina, è necessario che il pH non sia superiore a 2, dato che avvicinandosi verso il pH 3 la riduzione avviene troppo lentamente ⁽⁷⁾. Il complesso colorato che si forma dalla reazione della fenantrolina con il solfato ferroso in soluzione acquosa leggermente acida, non viene decomposto per parecchie ore a temperatura ambiente da acidi forti, sebbene questi inibiscano la sua formazione ⁽⁸⁾. Esso, infatti, non si sviluppa a pH molto inferiore a 2.

La temperatura del bagno-maria a 35° facilita molto lo sviluppo del colore, che si completa entro mezz'ora al massimo ⁽⁹⁾. La colorazione rosso-arancio è quantitativamente proporzionale alla concentrazione del ferro, in un intervallo di pH che va da 2,5 a 8. L'optimum di pH è intorno a 3-4; a questo pH lo sviluppo del colore è al massimo e si previene qualsiasi precipitazione ⁽¹⁰⁾.

Il piombo, lo zinco, l'alluminio, il mercurio, l'arsenico, i fluoruri e gli ioduri non interferiscono. Il rame reagisce con o-fenantrolina in quantità superiori ai 0,2 mg e lo stagno precipita a pH 3,5 solo se in quantità superiori a 0,6 mg; il metodo non risente l'interferenza dei pirofosfati se, dopo l'aggiunta di o-fenantrolina, si aggiusta il pH a 6, e si lasciano 2 ore di tempo affinché la conversione del ferro nel complesso ferroso-o-fenantrolina sia completa ⁽⁹⁾.

Lo zolfo può, eventualmente, dar luogo ad un precipitato, dopo la ebollizione con idrosolfito sodico; ma tale precipitato non interferisce sullo sviluppo del colore e, in ogni modo, lo si può allontanare per semplice decantazione prima di leggere al fotometro.

Infine, è bene sottolineare che, il citrato sodico — per portare il pH a 3,5 — deve essere aggiunto dopo l'idrossilammina e l'o-fenantrolina; e ciò, perchè, se si aggiungesse prima, specialmente in soluzioni contenenti fosforo, potrebbe formarsi un complesso ferro-fosfato, che non reagisce, poi, con o-fenantrolina, neanche a caldo ⁽¹¹⁾.

Col presente metodo sono state eseguite, ottenendo soddisfacenti risultati, oltre trecento analisi, di cui circa duecento su brodi di fermentazione impiegati per la produzione di ferroverdina, un nuovo pigmento

estratto da *Streptomyces* ⁽¹²⁾. Le rimanenti sono state eseguite, su soluzioni standard di ferro, su citrato di ferrocina e su cloridrato di ematina (*).

Nei brodi di fermentazione, il ferro, immessovi sotto forma di componente inorganico, è stato determinato, dopo la completa distruzione acida del mezzo, costituito da glucosio e autolisato di lievito. L'andamento delle fermentazioni si è potuto, così, agevolmente seguire, poichè i dati ottenuti, specialmente sui prelievi effettuati all'inizio delle fermentazioni stesse, hanno coinciso perfettamente con le quantità di ferro immesse nei brodi sotto forma di cloruro ferrico.

Inoltre i dati ottenuti sul cloridrato di ematina sono risultati quasi uguali al teorico: infatti, in relazione alla percentuale di ferro di 8,1 dichiarata dalla ditta produttrice, sono stati ottenuti, operando su quantitativi di 1 mg circa di sostanza, i risultati percentuali di 7,94 - 7,94 - 7,95 - 7,98 - 8,18 - 7,95 - 7,94.

Si sottolinea, infine, la praticità del presente metodo, in quanto tutte le operazioni — dalla distruzione della sostanza organica allo sviluppo del complesso colorato — vengono eseguite in un solo palloncino Kjeldahl, tarato a 50 cm³.

Gli autori ringraziano il Sig. R. Parlamenti per la valida assistenza tecnica.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SNELL F. D. e SNELL C. T. - Colorimetric Methods of Analysis, Vol. II - Inorganic, 314 (1933).
- (2) *Ibidem*, 315.
- (3) PEPI M. S. - Ind. eng. Chem., Anal. Ed., 18: 111 (1946).
- (4) SNELL F. D. e SNELL C. T. - Colorimetric Methods of Analysis, Vol. II - Inorganic, 306 (1933).
- (5) BRUNI G. - Chimica Generale ed Inorganica, 678 (1930).
- (6) *Ibidem*, 676.
- (7) SAYWELL L. G. e CUNNINGHAM B. B. - Ind. eng. Chem., Anal. Ed., 9: 67 (1937).
- (8) WALDEN G. H. JR., HAMMETT L. P. e CHAPMAN R. P. - J. am. chem. Soc., 53: 3908 (1931).
- (9) SNELL F. D. e SNELL C. T. - Colorimetric Methods of Analysis, Vol. II - Inorganic, 316 (1933).
- (10) HUMMEL F. C. e WILLARD H. H. - Ind. eng. Chem., Anal. Ed., 10: 13 (1938).
- (11) BANDEMER S. L. e SCHAIBLE P. J. - Ind. eng. Chem., Anal. Ed., 16: 317 (1944).
- (12) BALLIO A., BERTHOLDT H., CHAIN E. B. e DI VITTORIO V. - Nature, 194: 769 (1962).

(*) Sostanza pura per analisi fornita dalla B.D.H.