

APPARECCHIATURE E TECNICHE PER LA MICROANALISI ELEMENTARE ORGANICA

Anna Farina

BILANCE E ACCESSORI PER LA PESATA

L'operazione fondamentale dei metodi microanalitici quantitativi, come è facile intuire, è la pesata che permette di determinare, con un'adeguata precisione, una massa di sostanza dell'ordine del milligrammo. Il primo problema che si è posto è stato pertanto quello di mettere a punto una bilancia adeguata alla situazione (pesare cioè qualche milligrammo di campione) *i.e.* di disporre di una microbilancia.

Si deve a Pregl il merito di aver adattato alla microanalisi la bilancia sperimentale per metalli preziosi di Kuhlmann, arrivando con speciali accorgimenti ad una precisione dell'ordine di 1-2 microgrammi.

Da queste prime bilance ad oscillazione (periodica) si è giunti, attraverso continui perfezionamenti, alle prime microbilance automatiche a smorzamento d'aria molto più rapide. Successivamente anche queste bilance sono state sostituite da diversi tipi di micro e ultramicrobilance che per il loro funzionamento debbono essere collocate su adeguati supporti in ambienti dedicati (Figura 1).

La collezione di strumenti impiegati nel Laboratorio di Microanalisi dell'Istituto Superiore de Sanità comprende: cinque microbilance Bunge, due bilance ultramicro e una serie di accessori vari per la pesata in parte riportati nelle figure da pag. 101 a pag. 104.

MICRODETERMINAZIONE DEGLI ELEMENTI

Microdeterminazione del carbonio e idrogeno

La microdeterminazione simultanea del carbonio e dell'idrogeno è stata sicuramente la più importante di tutte le microdeterminazioni organiche. Già nel 1910 Pregl è riuscito a definire un procedimento universale per la determinazione del carbonio e dell'idrogeno in pochi milligrammi di campione anche in presenza di azoto, di zolfo, di alogeni e di arsenico.

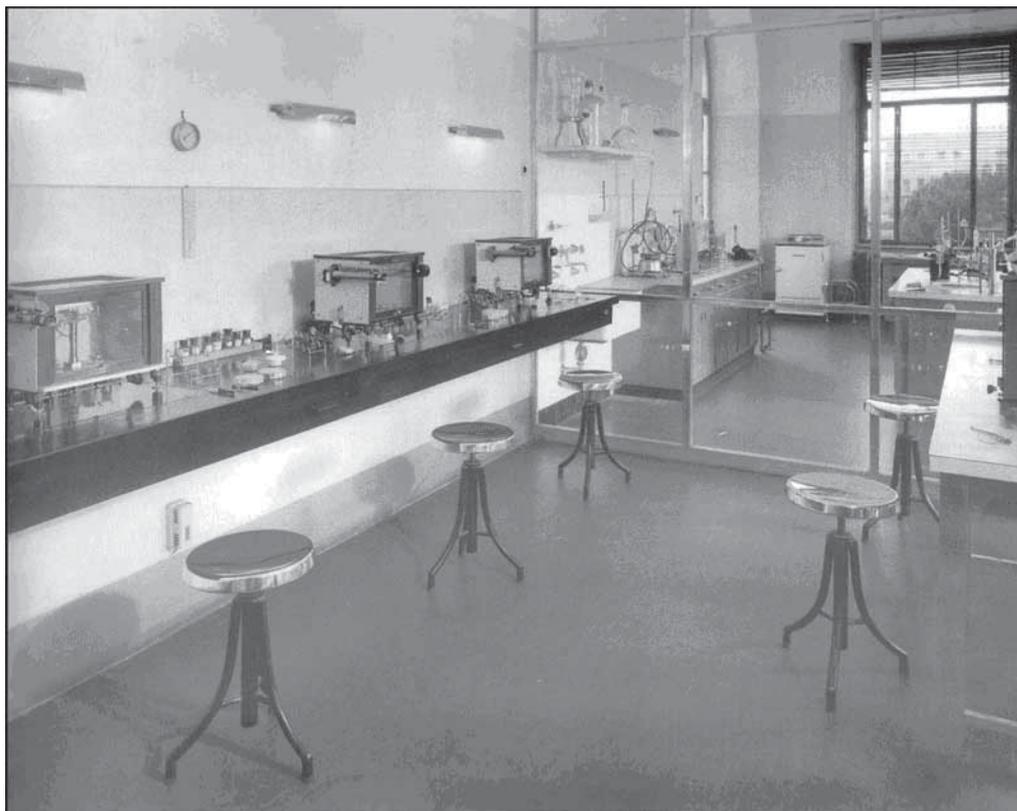


Figura 1. - *Alcune microbilance nella stanza per microanalisi organica dell'Istituto Superiore di Sanità.*

Dal 1912 in poi le modifiche e i perfezionamenti apportati al metodo sono stati moltissimi, tuttavia il principio rimase sempre quello ideato da Pregl (1917) basato sulla combustione del composto organico in corrente di ossigeno ed in presenza di ossidanti allo stato solido (chiamati riempimento). In queste condizioni il carbonio si trasforma quantitativamente in anidride carbonica e l'idrogeno quantitativamente in acqua. Questi prodotti venivano poi determinati gravimetricamente dopo assorbimento su adatte sostanze.

In presenza di altri elementi come azoto, alogeni, zolfo, i prodotti di combustione, che ne derivavano, erano eliminati mediante assorbimento su adeguati supporti posizionati prima dei tubi di assorbimento dell'acqua e dell'anidride carbonica: il biossido di piombo a 185 °C assorbiva il perossido di azoto; per l'assorbimento dell'acqua, formata durante la combustione, furono sperimentate varie sostanze fra cui il cloruro di calcio, il solfato di calcio anidro e l'anidride fosforica, per poi essere quasi tutte sostituite dall'anidride o perclorato di magnesio in grado di assorbire acqua dall'aria umida fino al 60% del proprio peso, senza ricederla; per l'assorbi-

mento dell'anidride carbonica sono stati usati calce sodata, amianto sodato o una miscela dei due prodotti.

L'apparecchio per la determinazione del carbonio e dell'idrogeno (schema in Figura 2) era costituito da:

- *un forno per la combustione* che, a gas ai tempi di Pregl, ha subito negli anni varie modifiche. Quello conservato in questa collezione di strumenti è un fornello di Hans Hösli, costruito a Bischofszell, in Svizzera. Comprende 4 fornelli elettrici separati. Un fornello F₁ per la purificazione dell'ossigeno regolato a 700 °C, un fornello mobile F₂ lungo 70 mm per la combustione della sostanza (850 °C) e due fornelli fissi, F₃ lungo 110 mm (700 °C) e F₄ lungo 80 mm (560 °C) per il riscaldamento della canna di combustione. Per il riscaldamento della prima parte del tubicino d'assorbimento dell'acqua interveniva un altro fornello F₅ lungo 35 mm (90 °C);
- *un sistema per la purificazione dell'ossigeno* formato da un regolatore di pressione (1) a vasi comunicanti contenente una soluzione al 5% di idrato di sodio collegato alla valvola a spillo della bombola di ossigeno, un tubo d'assorbimento (2) con cloruro di calcio, un tubo per la combustione (3) con ossido cobaltoso-cobaltico (Vecera *et al.*, 1958) riscaldato a 700 °C e collegato con una spirale in vetro (4) per il raffreddamento dei gas, un contabolle (5) contenente una miscela solfo-cromica ed il tubo d'assorbimento ad U contenente ascarite e anidrone per l'assorbimento di eventuali tracce di anidride carbonica e di acqua provenienti da impurezze trascinate dalla corrente di ossigeno;
- *una canna di combustione* (6) in quarzo munita di un tubo a squadra per il collegamento con il tubo ad U e che termina da un lato

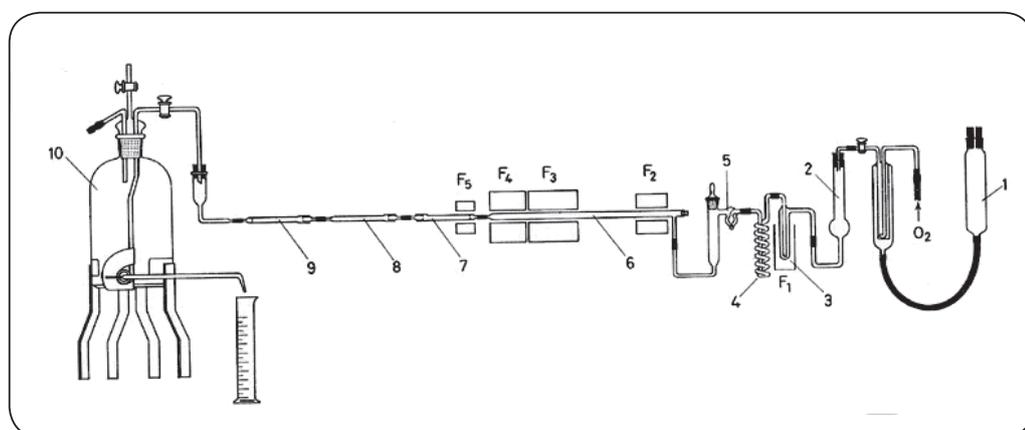


Figura 2. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione del carbonio e dell'idrogeno.

con un capillare per il collegamento vetro a vetro con il tubo d'assorbimento dell'acqua;

- *una serie di tre tubicini d'assorbimento* contenenti il primo (7), per l'assorbimento dell'acqua, anidrone, il secondo (8), per l'assorbimento degli ossidi d'azoto, uno strato di biossido di manganese e uno di anidrone per fissare l'acqua formata durante la reazione, il terzo (9), per l'assorbimento dell'anidride carbonica, 2/3 di ascarite e 1/3 di anidrone;

- *una bottiglia di Mariotte* (10) collegata mediante un tubicino contenente anidrone al tubo d'assorbimento per l'anidride carbonica.

Microdeterminazione dell'azoto

Per la microdeterminazione dell'azoto sono stati utilizzati sia metodi gasvolumetrici applicabili in qualsiasi composto organico, sia metodi volumetrici o colorimetrici, impiegati specialmente per analisi in liquidi biologici e per la determinazione dell'azoto in particolari legami e gruppi funzionali.

Determinazione gasvolumetrica

I micrometodi gasvolumetrici derivano tutti dal classico macrometodo di Dumas basato sull'ossidazione della sostanza organica in una canna di combustione aperta contenente ossido di rame e rame metallico nella parte finale per ridurre gli ossidi di azoto in azoto molecolare. Quest'ultimo era trasportato in un recipiente (azotometro) mediante una corrente di anidride carbonica e misurato; l'azotometro conteneva una soluzione di idrato di potassio al 50% che assorbe l'anidride carbonica ed eventuali altri gas.

Varie innovazioni, specie riguardo il riempimento della canna e la sorgente di anidride carbonica, sono state poi introdotte nel micrometodo messo a punto da Pregl (1917) per renderlo più rapido e preciso: nel 1943 da Zimmermann bruciando la sostanza in canna chiusa, nel 1949 da Unterzaucher con la combustione della sostanza in corrente umida di anidride carbonica ed ossigeno, che permette di ottenere una combustione completa anche di prodotti che bruciano difficilmente in sola corrente d'anidride carbonica.

Presso il Laboratorio di Microanalisi dell'Istituto Superiore di Sanità il metodo di Unterzaucher (1951) leggermente modificato è stato usato per la microdeterminazione dell'azoto totale anche in sostanze

ricche di azoto, con tendenza a formare masse carboniose che inglobano azoto. La combustione avveniva in presenza di ossigeno, sviluppato per elettrolisi, e di un catalizzatore molto attivo quale l'ossido cobalto-cobaltico (Vecera, 1962). I gas della combustione erano trasportati da una corrente di anidride carbonica su rame metallico, riscaldato a 500 °C, in grado di trattenere l'ossigeno in eccesso e ridurre gli ossidi di azoto liberando tutto l'azoto che veniva raccolto in un microazotometro e misurato. Gli alogeni e lo zolfo, eventualmente presenti nella sostanza organica, venivano trattenuti da una rete d'argento, riscaldata sempre a 500 °C, sotto forma di alogenuro e di solfato di argento.

In Figura 3 la fotografia dell'apparecchio utilizzato presso il nostro laboratorio, nella Figura 4 lo schema delle unità che lo formavano:

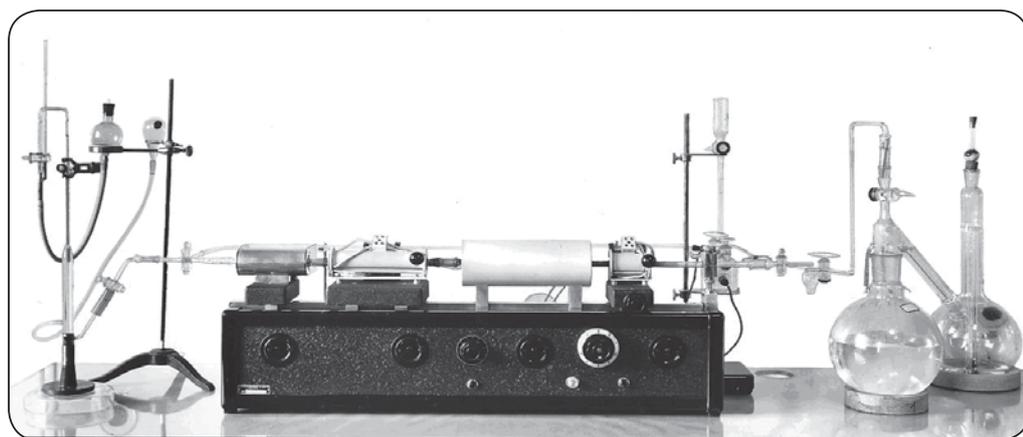


Figura 3. - *Apparecchio per la microdeterminazione dell'azoto in corrente di anidride carbonica e ossigeno secondo Unterzaucher (Foto del 1955). Lo strumento è conservato presso il Museo di Chimica dell'Università "La Sapienza" di Roma.*

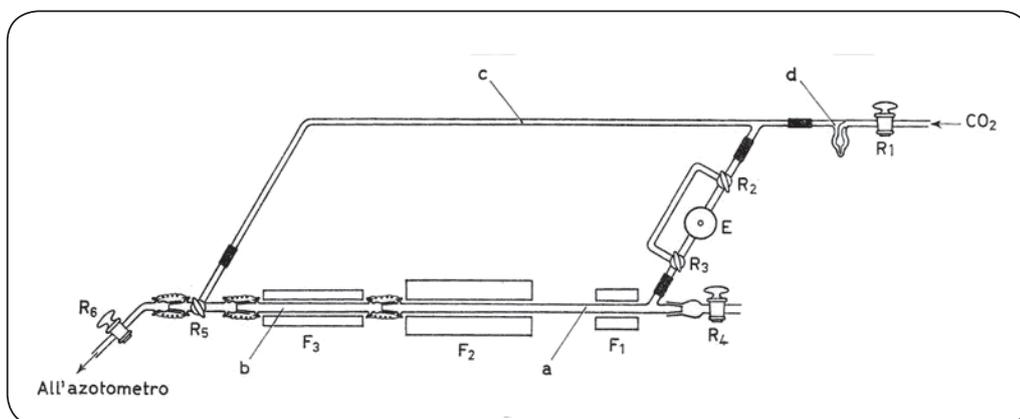


Figura 4. - *Schema dell'apparecchio raffigurato in Fig. 3.*

un apparecchio di combustione composto da un fornello mobile F₁, e due forni F₂ e F₃;

- *una canna di combustione* (a) in quarzo munita di due coni smerigliati, da un lato chiusa da un tappo a smeriglio con rubinetto R₄, e dall'altro collegata con la canna di riduzione (b). La canna di combustione conteneva uno strato di miscela di ossido cobaltoso-cobaltico e ossido di rame 1:2 tra due strati di ossido cobaltoso-cobaltico granulare, il tutto fissato tra tamponcini di lana di quarzo di 1-2 mm;

- *una canna di riduzione* (b) in quarzo munita di due coni smerigliati riempita con uno strato di ossido di rame, uno strato di rame metallico e un rotolino di rete d'argento, sempre fissati tra tamponcini di lana di quarzo di 2 mm;

- *una canna a squadra per controcorrente* (c) collegata da un lato ad un contabolle (d) contenente olio di paraffina ed alla sorgente di anidride carbonica per mezzo del rubinetto R₁, dall'altro lato alla canna di riduzione per mezzo del rubinetto a tre vie R₅. Questa canna consentiva di far arrivare l'anidride carbonica alla canna di combustione in senso inverso, cioè da R₅ a R₄ per liberare il sistema dall'aria e per evitare l'entrata di aria durante l'introduzione della navicella con la sostanza;

- *un apparecchio per elettrolisi* (E) (schematizzato in Figura 5) per lo sviluppo dell'ossigeno (Manser, Egli, 1954). Dopo aver evacuato e riempito con anidride carbonica per tre volte l'apparecchio, vi si introduceva, sempre in corrente di anidride carbonica, una soluzione di acido solforico al 5%, fino a coprire i due elettrodi;

- *un generatore di anidride carbonica*: si faceva sviluppare anidride carbonica o in un Dewar munito di valvola a mercurio, pressando ghiaccio secco finemente macinato, oppure in un Kipp da marmo purificato e acido cloridrico 1:1 secondo Reihlen (1939);

- *un microazotometro* (lo schema in Figura 6): per evitare perdite dal rubinetto superiore è stato usato un azotometro secondo Cropper (1954) con una parte calibrata di 1,5 ml con divisioni da 0,01 ml, un capillare a squadra nella parte superiore, collegato per mezzo di un rubinetto ed un tubo di gomma ad una bolla contenente mercurio che serviva a portare a zero il menisco della soluzione di idrato di potassio prima dell'analisi. L'azotometro era collegato alla canna (Figura 4) per mezzo di un giunto smerigliato con rubinetto (R₆) e ad una bolla contenente la soluzione di idrato di potassio.

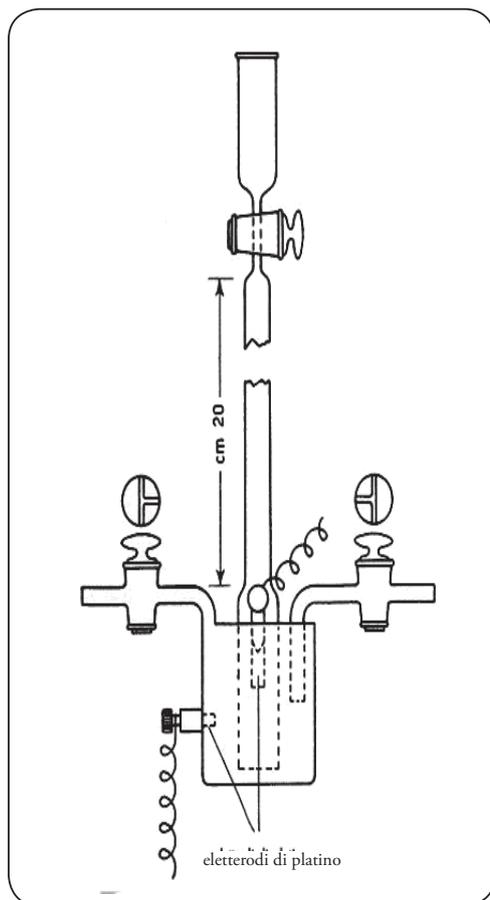


Figura 5. - Schema dell'apparecchio per lo sviluppo dell'ossigeno.

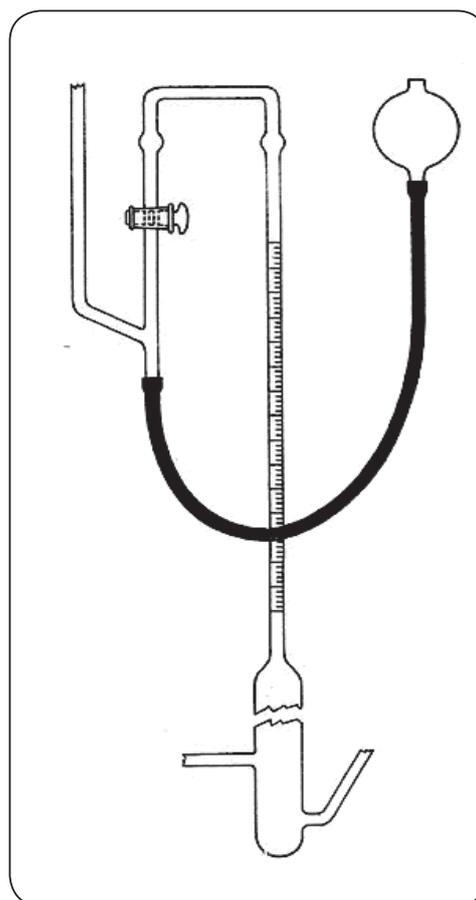


Figura 6. - Schema del microazotometro secondo Cropper (1954).

Il volume dell'azoto misurato nell'azotometro veniva corretto tenendo conto della temperatura della stanza e della pressione atmosferica, misurata utilizzando il barometro raffigurato a pag. 105.

Determinazione volumetrica secondo Kjeldahl

Questa determinazione, applicata in special modo ai liquidi fisiologici per determinazioni in serie, era indispensabile per definire il legame dell'azoto nella molecola, cioè se nel nucleo o in una catena laterale. Il metodo (Kjeldahl, 1883) si basa sulla distruzione della sostanza organica con acido solforico in presenza di catalizzatori con formazione di solfato ammonico e liberazione, per aggiunta di alcali, di ammoniaca che veniva titolata con acido cloridrico 0,01 N dopo distillazione o determinata per via colorimetrica. Nel 1911 F. Pilch ha adattato il metodo su microscala e successivamente Pregl è riuscito ad accelerare il processo di distruzione della sostanza organica

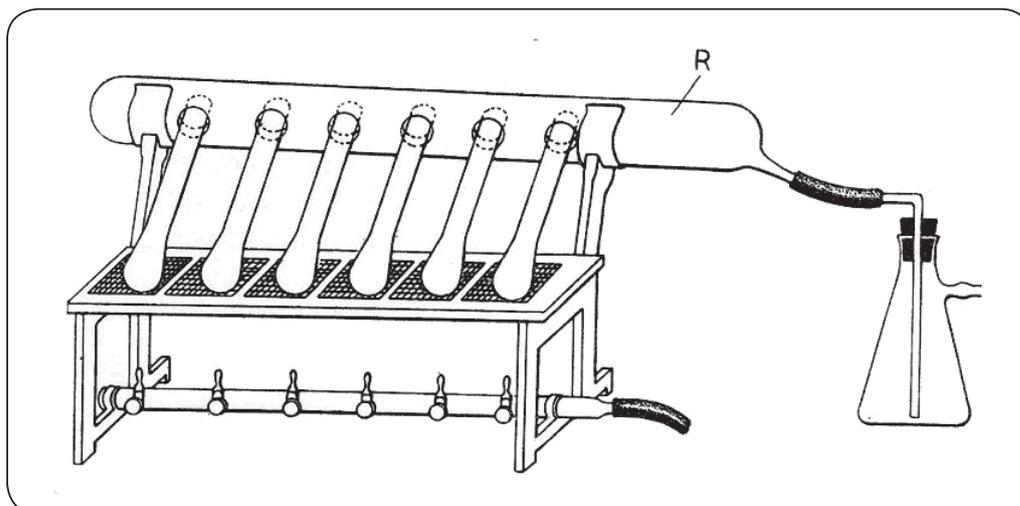


Figura 7. - Forno e palloncini per la distruzione della sostanza organica.

aggiungendo alcune gocce di peridrolo. Con questo metodo sono stati analizzati ammine, amminoacidi, ammidi, derivati dell'urea e tiurea e sostanze di natura proteica, mentre i gruppi nitrici e nitrosi dei composti organici erano prima sottoposti a riduzione.

In Figura 7 è schematizzato l'apparecchio per la distruzione della sostanza organica, formato da: un fornello a sei o più microfiamme con lastra di eternite forata in corrispondenza dei beccucci, e sostegni per sorreggere

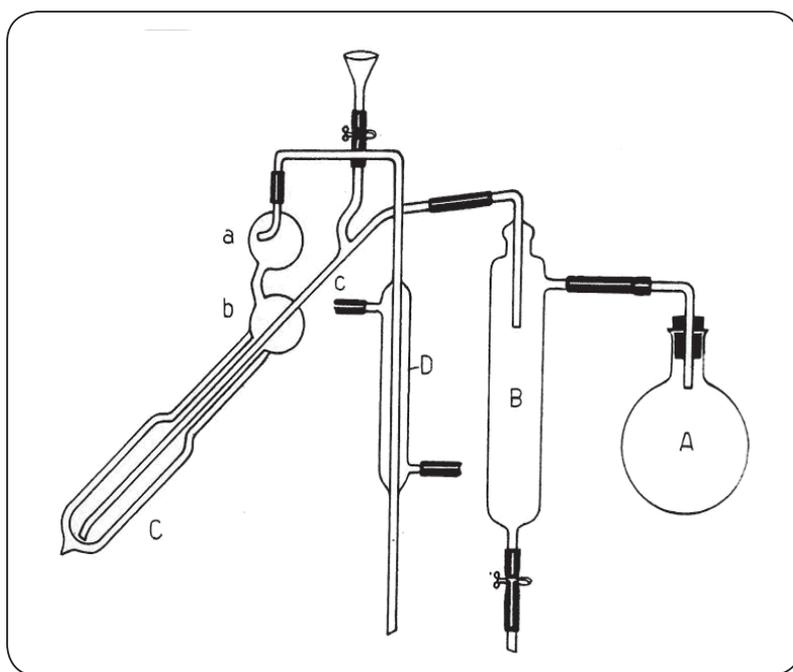


Figura 8. - Schema dell'apparecchio di Parnas e Wagner (1921).

un cilindro di vetro orizzontale munito di sei fori che servivano per introdurre i colli dei palloncini di Kjeldhal. Il cilindro di vetro finiva in un tubo da collegare con una pompa ad acqua per aspirare i vapori di acidi.

L'apparecchio di Parnas e Wagner (1921) per la distillazione dell'ammoniaca, schematizzato in Figura 8, è formato da:

- *un pallone (A) da un litro, per la produzione del vapor d'acqua;*
- *un cilindro (B);*
- *un recipiente (C) per la distillazione dell'ammoniaca in corrente di vapore, formato da un vaso di Dewar che termina nella sua parte superiore con una bolla attraversata da un tubicino, che arriva fino al fondo del Dewar per il trasporto del vapore da (A) attraverso (B) in (C). La sostanza e la soluzione alcalina erano introdotte dall'imbutino collegato mediante un tubo di gomma munito di una pinza.*

La bolla superiore (a) è collegata con una seconda bolla (b) attraversata dal tubicino (c) che attraversa il refrigerante (D) e dal quale si raccoglie il distillato;

- *un refrigerante (D);*
- *una beutina da 50 cm³ in quarzo o vetro Jena.*

Microdeterminazione del carbonio, idrogeno e azoto con strumenti automatici

Lo sviluppo tecnico-scientifico ha dato origine negli anni '60 a strumenti automatici per la microdeterminazione del carbonio, idrogeno e azoto. Il Laboratorio di Microanalisi ebbe in dotazione gli strumenti sotto descritti.

Analizzatore automatico "Coleman" per la microdeterminazione dell'azoto

La determinazione dell'azoto con questo strumento (Gustin, 1960), nel quale i fornetti elettrici, le canne di combustione e di riduzione e i tubi di assorbimento sono in posizione verticale, si basava sul classico metodo di Dumas, descritto a pag. 66. Di questo strumento è rimasto l'azotometro di Gustin raffigurato a pag. 106.

Analizzatore elementare Perkin Elmer 240 per la microdeterminazione simultanea del carbonio, idrogeno e azoto

Lo strumento è attualmente conservato attualmente presso il Museo di Chimica (la fotografia a pag. 106). Il principio del metodo si basa sulla combustione della sostanza in un sistema statico in presenza di un eccesso di ossigeno e catalizzatori (Condon, 1966). I prodotti della combustione venivano purificati dai gas alogenati, solforati o fosforati eventualmente

presenti per mezzo di argento e vanadato d'argento e trasportati da una corrente di elio su rame metallico, riscaldato a 600 °C, per la riduzione degli ossidi d'azoto e per trattenere l'eccesso di ossigeno.

L'acqua, l'anidride carbonica e l'azoto erano trasportati dalla corrente di elio alle tre coppie di celle, dove venivano determinate le variazioni della conducibilità termica. Queste erano poi registrate automaticamente e consentivano di ottenere con un semplice calcolo le percentuali dell'azoto, del carbonio e dell'idrogeno nella sostanza in esame.

La procedura si applicava anche a sostanze contenenti alogeni, zolfo e fosforo, composti organometallici e boroderivati; per questi ultimi era tuttavia necessaria l'aggiunta di pentossido di vanadio o di ossido di tungsteno al campione nella navicella. Era possibile anche analizzare sostanze igroscopiche, sostanze liquide e liquidi volatili, facendo uso di appositi contenitori di alluminio chiusi con una pressa speciale.

Lo stesso apparecchio, con la semplice sostituzione dei reattivi è stato impiegato per determinare l'ossigeno.

In Figura 9 è riportato lo schema dello strumento costituito da:

- un sistema per la purificazione dei gas (a, b), formato da un forno riscaldato a 550 °C contenente due canne, una (a) per la purificazione dell'elio con all'interno rete d'argento, rame metallico e ossido di rame, ed una (b) per la purificazione dell'ossigeno con rete d'argento, ossido di rame e rete di platino;
- un forno per il riscaldamento della *canna di combustione* (c) a 700 °C e quella *di riduzione* (d) a 600 °C;

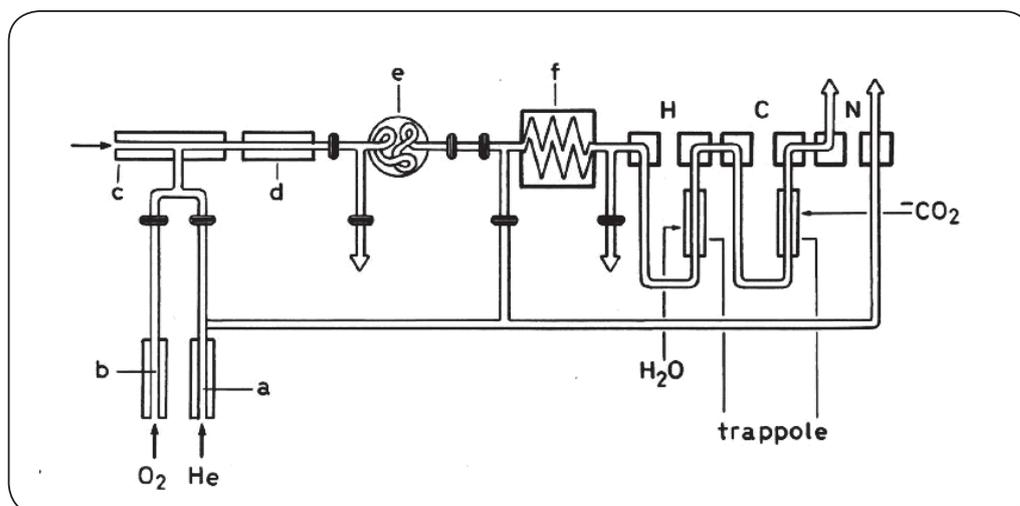


Figura 9. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione simultanea del carbonio, idrogeno e azoto.

- *una bolla di vetro termostata* (e), per la miscelazione dei prodotti della combustione, anidride carbonica, acqua e azoto con l'elio e per trattenerli fino a raggiungere la pressione di due atmosfere;
- *una spirale* (f), per l'espansione dei gas, una volta raggiunta la pressione di due atmosfere nella bolla;
- *tre coppie di celle* (H, C e N) per la determinazione della differenza di conducibilità termica.

Microdeterminazione degli alogeni

La microdeterminazione degli alogeni nei composti organici era basata sulla distruzione della sostanza organica con trasformazione dell'alogeno in ione alogenuro, poi determinabile in vari modi.

La sostanza organica era distrutta per ossidazione con ossigeno in una canna di combustione o in beuta (Schöniger, 1955-1956), per ossidazione umida con acido nitrico (Carius, 1860), oppure per fusione e ossidazione con perossido di sodio in bombola.

Altre reazioni di distruzione utilizzate sono state la riduzione in corrente di idrogeno o la fusione con un metallo alcalino.

Nella determinazione dell'alogeno sono stati utilizzati metodi sia gravimetrici (pesata dell'alogenuro di argento o della rete di argento ricoperta di alogenuro d'argento), sia volumetrici (titolazione alcalimetrica, iodometrica, argentometrica, ecc.).

Determinazione mediante combustione in canna

Nel classico metodo (Pregl, Roth 1949) la sostanza veniva bruciata in corrente d'ossigeno, i gas di combustione attraversavano catalizzatori di platino e l'alogeno libero veniva fissato da una soluzione di carbonato sodico contenente bisolfito, aggiunto per ridurre gli alogenati o ipoalogeniti eventualmente formati. Gli alogenuri contenuti nella soluzione acidificata venivano precipitati con nitrato d'argento e il cloruro d'argento determinato per pesata.

Il metodo è stato modificato da vari autori: Safford e Stragand nel 1951 evitavano la reazione di precipitazione introducendo nella canna di combustione un cilindro di rete di argento sul quale si deponiva l'alogeno con formazione di alogenuro di argento. La differenza di peso della rete d'argento prima e dopo la combustione dava la quantità di alogeno contenuto nella sostanza. Questo metodo era rapido e sicuro se si poneva la massima attenzione a non perdere tracce di alogenuro d'argento estraendo il cilindro di rete d'argento dalla canna di combustione.

Wagner e Bühler nel 1951 misero a punto una procedura con distruzione della sostanza organica in canna di quarzo contenente lana di quarzo, seguita da titolazione dell'alogeno con soluzione di nitrato di argento, indicatore diclorofluoresceina.

Negli ultimi anni di attività del Laboratorio di Microanalisi è stato utilizzato con ottimi risultati il metodo di Wagner e Bühler opportunamente modificato. L'apparecchiatura (schema in Figura 10 e fotografia a pag. 107) è costituita da:

- un apparecchio di combustione, formato da un fornello mobile F₁ a 1000 °C, azionato automaticamente, un forno fisso F₂ a 900-1000 °C ed un forno F₃ a 650 °C;
- una canna di combustione (1), in quarzo, munita di due setti porosi a distanza di 130 e 190 mm rispettivamente dal cono smerigliato di collegamento al tubo di assorbimento degli alogeni. Dall'altro lato la canna terminava con un tubo a squadra per il collegamento con la sorgente di ossigeno;
- un tubo di assorbimento (2) in quarzo o Pyrex, munito di due coni a smeriglio, con all'interno perline di quarzo o vetro;
- contabelle;
- regolatore di pressione o flussimetro (vedi determinazione del carbonio e idrogeno).

La titolazione veniva effettuata in una capsula di porcellana utilizzando o una microburetta automatica o una microsiringa di precisione Agla. Le fotografie di questi oggetti sono riportate a pag. 107 e a pag 109.

Metodo rapido di combustione in beuta

La combustione rapida della sostanza organica per la microdeterminazione non solo del cloro e del bromo ma anche dello iodio, fluoro, zolfo, fosforo, mercurio, boro e altri metalli veniva fatta avvenire

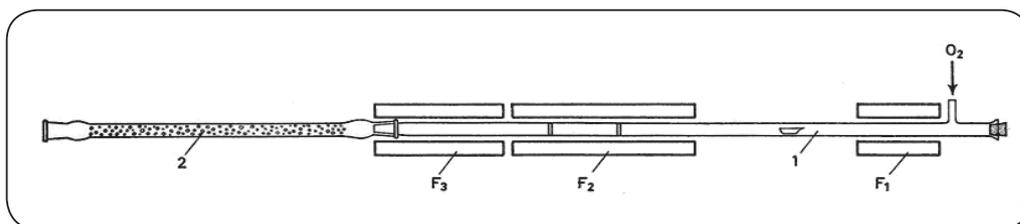


Figura 10. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione degli alogeni e dello zolfo.

nire in una beuta speciale in atmosfera di ossigeno (Schöniger, 1955-1956). La beuta era munita di un tappo a smeriglio con inserito un filo di platino portante un cestello in rete di platino per contenere la sostanza (Figura 11a). Introdotti alcuni ml di soluzione di assorbimento, si faceva arrivare ossigeno da una bombola. Il campione da analizzare era versato su carta da filtro speciale esente da ceneri (Figura 11b) e racchiuso in modo

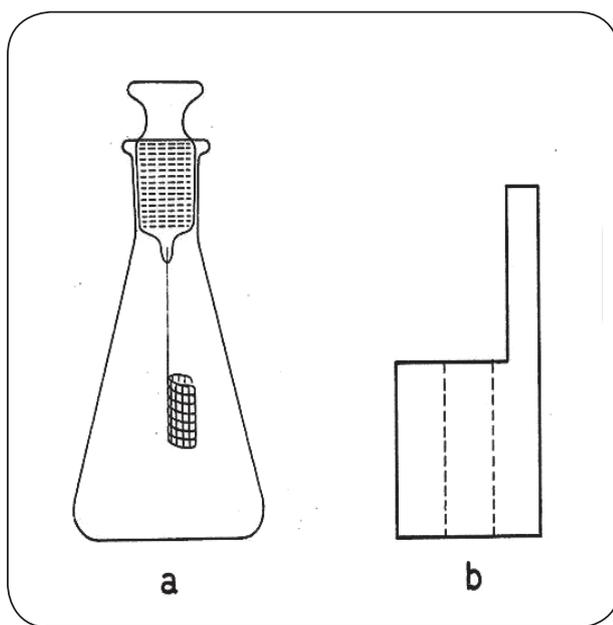


Figura 11. - Beuta e carta da filtro (o contenitore di cellulosa) per la combustione secondo Schöniger.

da formare un pacchetto da dove fuoriusciva solo la linguetta per l'accensione. Dopo aver inserito il pacchetto nel cestello di platino, si accendeva la linguetta e chiudendo rapidamente il tappo si capovolgeva la beuta al fine di evitare la fuoriuscita dei gas. Si aveva una fiammata viva con combustione completa del pacchetto. In alcuni casi, per favorirla, si aggiungeva alla sostanza una punta di spatola di glucosio o di saccarosio. La fotografia di beute di Schöniger a pag. 108.

Al termine della combustione si verificava una depressione nella beuta giacché i prodotti della reazione venivano man mano assorbiti dalla soluzione di assorbimento. Si agitava la beuta per 10 minuti oppure, trattandosi di determinazioni in serie, la si lasciava a riposo per 30 minuti agitando di tanto in tanto. Prima di aprire il tappo si versava un po' di liquido di lavaggio nel bordo del collo, da dove veniva risucchiato nella beuta lavandone così il collo e le pareti. Si lavava poi il tappo, il cestello di platino, il collo e le pareti della beuta con altro liquido di lavaggio, acqua, alcol etilico o isopropilico a seconda della determinazione.

Gli alogeni erano poi determinati sia per via gravimetrica, dopo trasformazione in alogenuro d'argento, sia per via volumetrica (argentometrica, mercurimetrica, iodometrica o complessometrica).

Microdeterminazione dello zolfo

I numerosi micrometodi per la determinazione dello zolfo si basavano sulla sua ossidazione a solfato o sulla riduzione a solfuro.

Nel metodo per ossidazione catalitica secondo Pregl, la sostanza era bruciata in corrente di ossigeno e canna di combustione aperta; i prodotti della combustione dopo passaggio su catalizzatori di platino arroventati erano poi assorbiti in acqua ossigenata. Seguiva la determinazione gravimetrica dell'acido solforico sotto forma di solfato di bario, o volumetrica, secondo Wagner, mediante titolazione con una soluzione di perclorato di bario, indicatore Thorin.

Nel metodo di Stragand e Safford (1949) i prodotti della combustione erano fatti passare su una rete d'argento pesata prima e dopo la combustione. L'aumento di peso corrispondeva allo ione solfato formato dallo zolfo contenuto nel campione.

Sempre sull'ossidazione catalitica della sostanza si basava il metodo rapido di Schöniger (1956), che ha esteso alla determinazione dello zolfo il procedimento utilizzato per gli alogeni (descritto a pag. 75). La sostanza veniva bruciata in beuta chiusa piena di ossigeno, i prodotti della combustione assorbiti in acqua ossigenata e l'acido solforico formatosi era determinato con idrato sodico 0,01 N.

Nel metodo a riduzione catalitica di E. Wiesenberger (1941) l'idrogeno solforato formato dall'idrogenazione a 700 °C con idrogeno e catalizzatori di platino veniva assorbito da idrato sodico e determinato per via iodometrica.

Il metodo di riduzione catalitica (Zimmermann, 1943), descritto di seguito, permetteva di determinare sia lo zolfo organico che quello inorganico con una grande precisione. Parte della strumentazione è conservata in buone condizioni (vedi pag. 110).

Il procedimento era basato sulla fusione della sostanza da analizzare con metallo alcalino in tubo chiuso (Bürger, 1942). Si formavano solfuro alcalino, eccesso di metallo alcalino, carbonio e prodotti di demolizione. Questi composti erano versati in un palloncino contenente acqua. Dopo aggiunta di bicarbonato di sodio il tutto era travasato in una soluzione solforica di iodio a titolo noto. Lo iodio in eccesso era titolato con soluzione titolata di tiosolfato. Dalla quantità di iodio consumato si risaliva alla quantità di zolfo presente nella sostanza.

Tuttavia i risultati non erano sempre buoni; nel caso di sostanze organiche, il carbonio era in grado di fissare iodio e quindi di altera-

re i risultati. Inoltre, i metalli potevano svolgere idrogeno che riduce lo iodio. W. Zimmermann ha migliorato il metodo con la “distillazione” dell'idrogeno solforato ottenuto dai prodotti di distruzione mediante acido cloridrico, facendo assorbire l'idrogeno solforato in una soluzione tamponata di acetato di cadmio. Il precipitato di solfuro di cadmio era aggiunto a una quantità nota di soluzione di iodio acidificata. Dalla quantità di iodio consumata si calcolava la percentuale di zolfo presente.

L'apparecchiatura, in vetro Jena, utilizzata nel laboratorio (lo schema in Figura 12) e conservata presso il Museo di Chimica, comprendeva:

- un recipiente per la decomposizione (a), formato da una beutina di Supremax o quarzo oppure da un provettone di quarzo (con schegge di quarzo fuse sul fondo per favorire una ebollizione regolare) muniti di un cono a smeriglio;
- un refrigerante (C) a sei bolle, un tubicino (d) per l'uscita del gas, munito nella parte superiore di un tappo a smeriglio che permetteva il lavaggio quantitativo del tubicino dopo la reazione;
- un apparecchio a cinque bolle per l'assorbimento dell'idrogeno solforato (D). La strozzatura tra le varie bolle doveva essere tale da lasciare uno spazio tra la strozzatura e il tubicino (d) per permettere un lento passaggio dei gas e quindi un completo assorbimento nella soluzione;

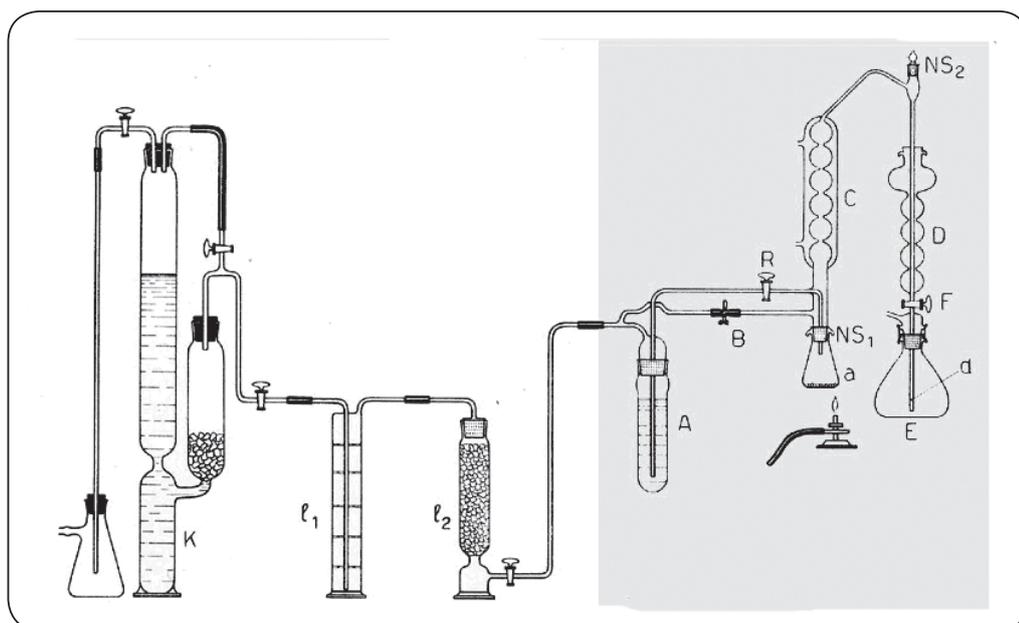


Figura 12. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione dello zolfo secondo Zimmermann (evidenziata la parte conservata nel Museo di Chimica).

- *un erlenmeyer* per la titolazione (E), di forma speciale munito di un tappo a smeriglio.

Per il trasporto dell'idrogeno solforato ci si serviva di idrogeno o di azoto, prelevati da una bombola, oppure di anidride carbonica, esente da aria, prodotta da un sistema (Reihlen, 1939) come quello illustrato nello schema e formato da:

- *un apparecchio di Kipp* (K) per lo sviluppo di anidride carbonica;
- *bottiglie di lavaggio per il gas* (l₁ e l₂), contenenti (l₁) una soluzione acquosa di tricloruro di titanio e (l₂) una torre di essiccazione con cloruro di calcio, usate per togliere all'anidride carbonica eventuali tracce di ossigeno o di altri gas ossidanti che potevano ossidare l'idrogeno solforato e quindi portare a perdite di zolfo.

MICRODETERMINAZIONE DEI GRUPPI FUNZIONALI

Microdeterminazione dei gruppi metossilici, etossilici e gruppi metilici legati allo zolfo

I gruppi alchilici ed in particolare i gruppi metilici legati all'ossigeno o allo zolfo ed i gruppi etilici legati all'ossigeno, sono stati determinati dopo reazione con acido iodidrico (ebollizione a ricadere), formazione quantitativa del corrispondente ioduro alchilico, e successivo dosaggio (iodometrico, argentometrico o gravimetrico).

Nella determinazione gravimetrica (Pregl, Roth 1949) lo ioduro alchilico era assorbito in una soluzione alcolica di nitrato d'argento formando ioduro d'argento che era determinato per pesata.

Nella determinazione iodometrica (Vieböck, Brecher 1930) lo ioduro alchilico veniva ossidato in una soluzione tamponata di bromo con formazione di acido iodico che era poi titolato con tiosolfato sodico secondo Leipert.

Nella determinazione argentometrica secondo Volhard (Bürger, Baláz 1941) lo ioduro di metile veniva raccolto in soluzione alcolica di nitrato di argento, si procedeva quindi alla titolazione dell'eccesso di reattivo con solfocianato di potassio usato come indicatore l'allume ferrico.

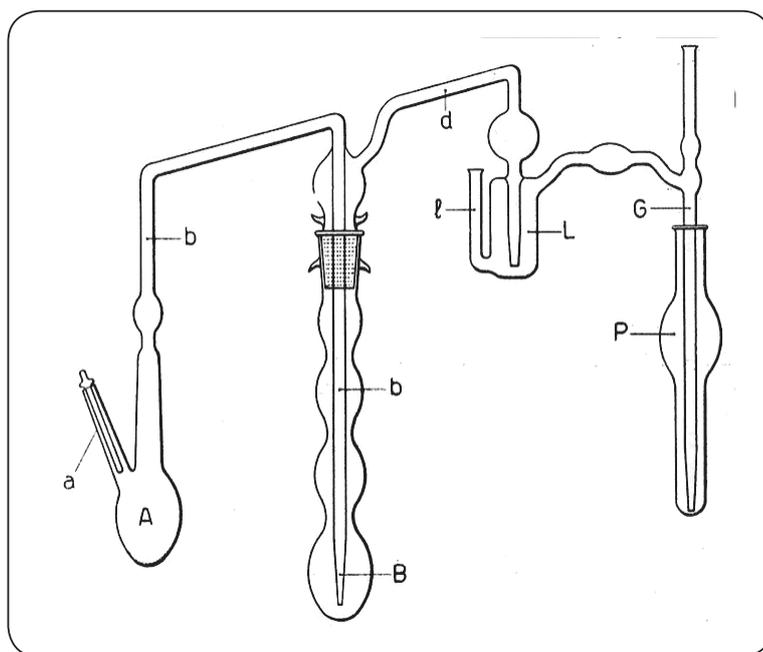


Figura 13. - *Apparecchio per la microdeterminazione dei gruppi metossilici.*

Apparecchio per la microdeterminazione degli ossialchili (secondo Zeisel 1885). L'apparecchio per la trasformazione quantitativa degli ossialchili nei corrispondenti ioduri (lo schema in Figura 13, l'immagine a pag. 111) era costituito da:

- *un palloncino (A) a forma di oliva di volume di circa 14 ml, saldato con due tubicini (a e b). Il tubicino (a) per l'introduzione del campione e per il collegamento dell'apparecchio con la sorgente di anidride carbonica. Il tubicino a squadra (b) per la distillazione, con una bolla a 4-5 cm di altezza, fungeva da refrigerante a ricadere e terminava al fondo del recipiente (B). Per evitare che i vapori della distillazione salissero nel tubicino (a), vi si inseriva un tubicino completamente chiuso con un rigonfiamento a una estremità che ne evitava la caduta in (A). Due scanalature nel rigonfiamento permettevano il passaggio dell'anidride carbonica;*
- *un tubo a bolle (B) collegato con un giunto a smeriglio al resto dell'apparecchio;*
- *un sistema di lavaggio (L) munito di un tubicino laterale (l) per il riempimento;*
- *un tubicino (G) di sviluppo dei gas;*
- *una provetta con rigonfiamento ad oliva (P) per l'assorbimento dello ioduro alchilico. La provetta utilizzata era molto stretta nella parte inferiore, in questo modo lo spazio tra il tubicino (G) e le pareti della provetta era di pochi millimetri. Le bolle di gas uscenti da (G) erano quindi schiacciate contro le pareti, con un più sicuro assorbimento del gas nel liquido.*

Microdeterminazione dei gruppi acetilici e benzoilici

La microdeterminazione dei gruppi acetilici presenti in una molecola ha avuto una notevole importanza nella chimica organica ed in particolare, anche se in modo indiretto, nel campo degli idrati di carbonio; infatti l'acetilazione dei gruppi ossidrilici, e le successive determinazioni dei gruppi acetilici formatisi, ha costituito un metodo per la determinazione dei gruppi ossidrilici stessi.

Il procedimento base utilizzato per determinare il gruppo acetilico, legato all'ossigeno o all'azoto, era costituito dall'idrolisi (saponificazione) del legame estereo e successivo dosaggio dell'acido acetico. Questo procedimento presentava notevole difficoltà per il differente comportamento dei vari prodotti alla saponificazione.

Era quindi di capitale importanza effettuare la saponificazione a seconda della natura della sostanza.

Varie sostanze sono state sperimentate; fra queste l'acido p-toluensolfonico si è dimostrato un ottimo reattivo ed è stato usato da molti autori (Pregl, Soltys, 1929).

Un metodo relativamente semplice e che dava buoni risultati è stato quello di E. Wiesenberger (1942, 1947, 1954) basato sul principio che il gruppo acetile dà, per ebollizione con acido p-toluensolfonico e alcol etilico, l'estere acetico. Lo stesso autore aveva messo a punto un metodo di determinazione dei gruppi acetilici e C-metilici che permetteva l'uso di un solo apparecchio per tutte e due le determinazioni.

Il principio del metodo si basava sulla saponificazione della sostanza organica contenente gruppi acetilici attaccati all'ossigeno o all'azoto effettuata, a seconda della natura della sostanza, in mezzo acido oppure alcalino.

I prodotti dell'idrolisi venivano poi distillati e l'acido acetico titolato per via alcalimetrica o per via iodometrica.

Presso il Laboratorio di Microanalisi è stato utilizzato l'apparecchio (l'immagine a pag. 111) di E. Wiesenberger (1941) che serviva anche per la determinazione dei gruppi metilici legati al carbonio.

In Figura 14 è riportato lo schema dell'apparecchio, costruito in vetro Jena, formato da:

- *un palloncino* (A) per la saponificazione e distillazione munito di collo a smeriglio inserito sul cono (c) del refrigerante oppure sul cono (b) dell'apparecchio per la distillazione;

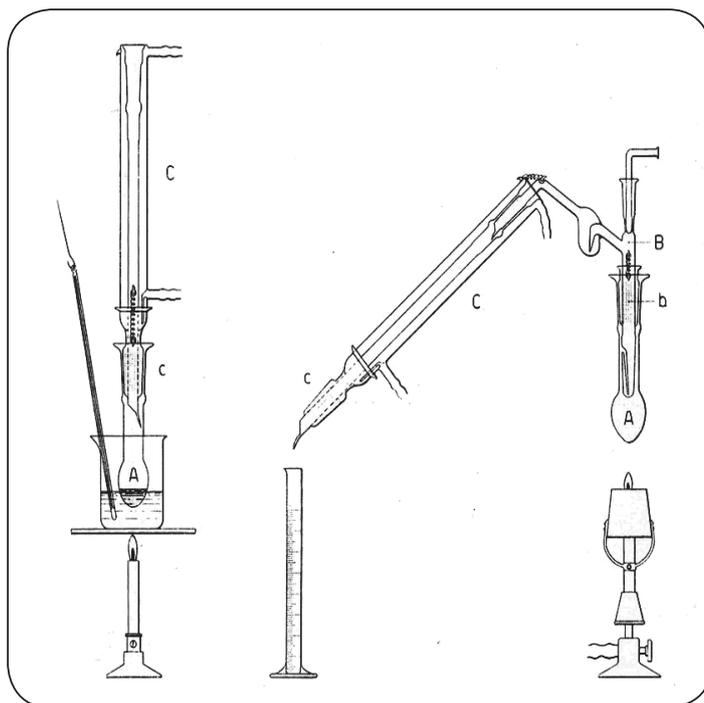


Figura 14. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione del gruppo acetile e C-metile secondo Wiesenerger.

- un apparecchio (B) per la distillazione dell'acido acetico. Nella distillazione i vapori passavano per un capillare di 0,5 mm. Espandendosi poi sulle pareti del tubo gli acidi meno volatili si condensavano trascinati dal vapore, mentre l'acido acetico distillava attraverso la bolla di sicurezza e il refrigerante (C). La bolla di sicurezza

tratteneva eventuali tracce di vapori secondari trascinati durante la distillazione;

- un refrigerante (C) che terminava con una punta che permetteva distillazioni regolari.

L'acqua distillata necessaria per le ripetute distillazioni era introdotta dall'imbutino munito di cono a smeriglio (B).

Microdeterminazione degli idrogeni attivi

Gli idrogeni dei gruppi ossidrilici presenti negli alcoli, acidi e fenoli danno luogo con adeguati reattivi a specifiche reazioni che sono state utilizzate per la loro determinazione. La determinazione secondo Zerewitinoff (1907) di questi idrogeni, detti anche idrogeni attivi, era basata sulla misurazione del metano sviluppato dalla reazione tra le sostanze in esame ed il reattivo di Grignard (ioduro di metil-magnesio).

Nel 1925 il metodo, che si eseguiva in atmosfera di aria, fu ridotto su microscala. Tuttavia l'elevata reattività dello ioduro di metil-magnesio con l'ossigeno dell'aria e con l'acqua in fase vapore poteva rendere il micrometodo stesso poco preciso. Questa difficoltà è stata superata sostituendo l'aria con un gas inerte.

Il reattivo di Grignard può reagire, oltre che con gli idrogeni attivi, anche con altri gruppi funzionali presenti nella sostanza in esame senza dar luogo a sviluppo di metano; questo permetteva di valutare la presenza di più gruppi funzionali conoscendo la quantità di reattivo consumato e la quantità di metano svolto durante la reazione.

Nel 1936 A. Soltys ha modificato il metodo di Zerewitinoff rendendo possibile la microdeterminazione degli idrogeni attivi e la contemporanea determinazione del consumo di reattivo dovuto alla presenza di altri gruppi funzionali con un unico semplice apparecchio (Figura 15) formato da:

- un recipiente per la reazione (A) con collo a smeriglio, collegato al resto dell'apparecchio tramite un giunto a smeriglio S munito di un tubo collegato alle burette B₁ e B₂ mediante un rubinetto speciale R a tre vie e di un tubo per l'immissione della corrente di azoto proveniente dalla bombola;

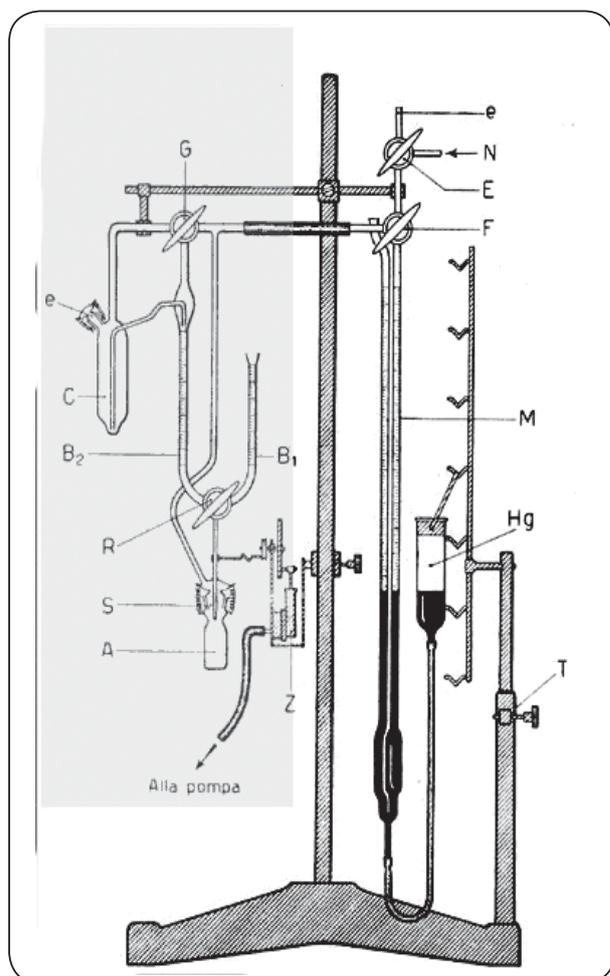


Figura 15. - Schema dell'apparecchio per la microdeterminazione degli idrogeni attivi secondo Tschugaeff e Zerewitinoff (evidenziata la parte conservata nel Museo di Chimica).

collegato alle burette B₁ e B₂ mediante un rubinetto speciale R a tre vie e di un tubo per l'immissione della corrente di azoto proveniente dalla bombola;

- una buretta per l'anilina (B₁), volume di 1 ml, divisioni a 0,02 ml;

- una buretta per il reattivo (B₂) di Grignard, volume di 2 ml, divisioni a 0,02 ml per la lettura del gas e collegata al recipiente di riserva (C) con un tubo capillare per lo zero automatico;

- un recipiente di riserva (C) per il reattivo.

Il rubinetto G a tre vie permetteva di far passare la corrente di azoto sia nel recipiente di riserva (C) che nella buretta B₂; anche i rubinetti (E) ed (F) erano a tre vie.

APPARECCHIATURE PER LA DETERMINAZIONE DEL PUNTO DI FUSIONE

Il punto di fusione di una sostanza organica è una costante fisica che caratterizza la sostanza stessa allo stato puro.

Presso il Laboratorio di Microanalisi sono stati utilizzati i metodi di seguito descritti.

Nel tubo capillare

Il metodo standard del tubo capillare utilizzava un bagno di liquido riscaldabile, dotato di un termometro. Un tubo capillare in vetro, contenente la sostanza da analizzare, era introdotto nel liquido in vicinanza del bulbo di mercurio del termometro (Figura 16). Al raggiungimento della fusione, veniva letta la temperatura indicata dal termometro (punto di fusione). L'immagine dell'apparecchio riportata a pag. 112.

Al microscopio

La determinazione con l'aiuto del microscopio studiata esaurientemente da L. Kofler (1954) ha presentato il vantaggio sia di operare su una quantità minima di campione (da 0,1-0,001 mg) che, con-

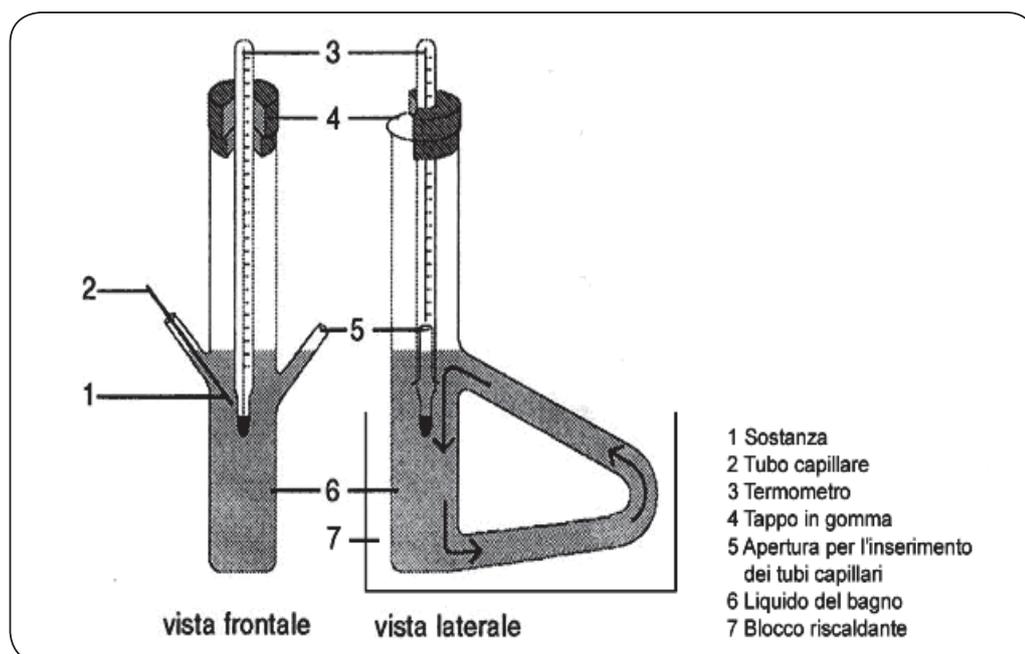


Figura 16. - Schema dell'apparecchio Buchi per la determinazione del punto di fusione nel tubo capillare.

temporaneamente, di poter seguire il comportamento della sostanza in esame prima, durante e dopo la fusione. Si poteva osservare l'eventuale sublimazione, la presenza di acqua di cristallizzazione, la decomposizione o la presenza di due o più fasi solide. Si ricavavano informazioni sulla purezza del campione in quanto la presenza di impurezze determina un punto di fusione non netto.

L'apparecchio per la determinazione al microscopio (vedi pag. 112) è formato da una piastra elettrica, applicata a un microscopio (ingrandimento 80-100). Un anello metallico e un disco di vetro evitano la dispersione di calore. Il termometro inserito nella piastra era tarato mediante fusione di sostanze standard. L'apparecchio era corredato da due termometri, con scala rispettivamente da 20 a 220° e da 80 a 350 °C. Il riscaldamento elettrico veniva regolato da un reostato.

Inoltre l'apparecchio era dotato di un blocco per temperature elevate (da 250 a 750 °C) e di uno per il raffreddamento (da -55 a +80 °C) che consentivano di utilizzare questo strumento per seguire la fusione delle sostanze in un campo molto vasto.

Su blocco di metallo (fusione immediata)

Per le sostanze che prima di fondere si decompongono o danno luogo a modificazioni polimorfe, è stato applicato il metodo che utilizza un blocco di metallo, ad es. ottone, riscaldato in maniera uniforme e prevede due fasi distinte. Si iniziava riscaldando il bloc-

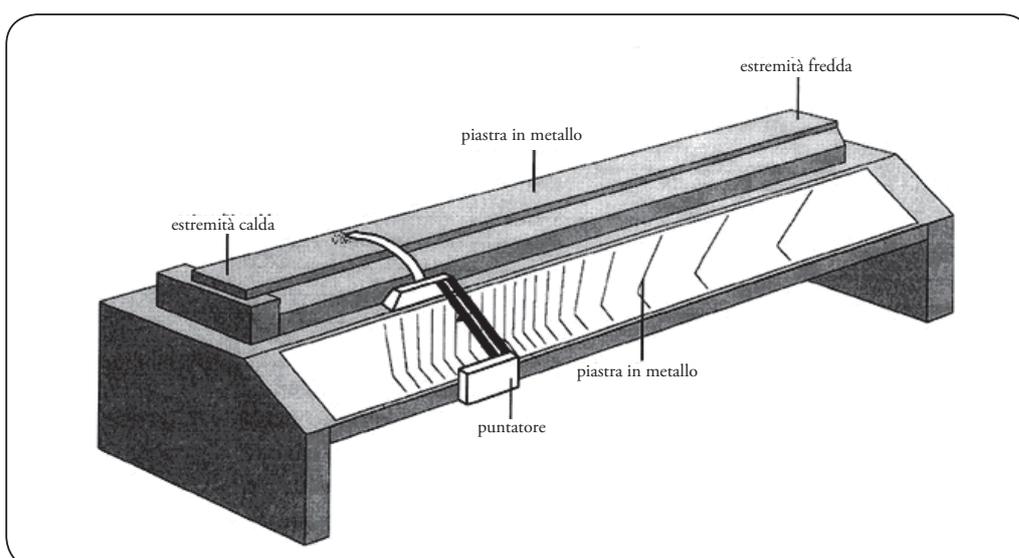


Figura 17. - *Apparecchio Kofler con blocco in metallo per la determinazione del punto di fusione immediato.*

co metallico sul quale, ad intervalli regolari, venivano sparsi alcuni cristalli della sostanza da analizzare; la temperatura di fusione della sostanza a contatto con il blocco metallico era annotata come t_1 . Il riscaldamento veniva interrotto e si continuava a spargere, sempre ad intervalli regolari, cristalli della sostanza sul blocco che si andava raffreddando; la temperatura alla quale la sostanza cessava di fondere si annotava come t_2 . Il punto di fusione era calcolato dall'espressione $\frac{1}{2}(t_1 + t_2)$.

Lo schema e la figura dello strumento conservato nella collezione sono riportati nella Figura 17 e a pag. 113.

Bibliografia

- Bürger K. (1941). *Angew. Chem.* 54, 392; (1941) *Die Chemie* 55, 245.
- Bürger K, Baláz F. (1941). *Z. Angew. Chem.* 54, 58.
- Carius L. *Ann.* 116, 1 (1860); 136, 129 (1865); 146, 301 (1868); *Berichte der Chemischen Gesellschaft*, 3, 697 (1870).
- Condon RD. (1966). *Microchem. J.* 10, 408.
- Cropper FR. (1954). *Analyst* 79, 178.
- Gorbach G. (1956). *Mikrochemisches Praktikum*. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen Heidelberg.
- Gustin GM. (1960). *Microchem. J.* 4, 43.
- Kjeldahl JZ. (1883). *Anal. Chem.* 22, 386.
- Koffler L, Koffler A. (1954). *Thermo Mikro Methoden*. Verlag Chemie Weinheim.
- Manser V, Egli A. (1954). *Helv. Chim. Acta* 37, 1048.
- Marzadro M. (1950-1951). *Mikrochemie* 36/37, 671.
- Marzadro M. (1951). *Mikrochemie* 38, 372.
- Marzadro M. (1953). 40, 359 *Rend. Istituto Sup. Sanità*, 17, 282 (1954).
- Marzadro M. (1958). *Microanalisi quantitativa organica*. Ed. Sci, Napoli.
- Marzadro M, Zavattiero J, Mazzeo Farina A. (1972). Micrometodi in analisi quantitativa organica: microdeterminazione degli elementi. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* (fascicolo speciale 1).
- Parnas JK, Wagner R. (1921) *Biochem.* 125, 253.
- Pilch. (1911). *Monatsh F. Chem* 32, 21.
- Pregl F. (1917). *Die Quantitative Organische Mikroanalyse*. 1a ed. Berlin.
- Pregl F. (1930). *Die Quantitative Organische Mikroanalyse*. 3a ed. J. Springer, Berlin.
- Pregl F, Roth H. (1949). *Quantitative Organische Mikroanalyse*. 6a ed. Springer-Verlag, Wien.
- Pregl F, Roth H. (1958). *Quantitative Organische Mikroanalyse*. Springer-Verlag, Wien.

- Pregl F, Soltys A. (1929). *Mikrochemie*, 7,1.
- Reihlen H. (1939). *Berichte der Chemischen Gesellschaft*, 72, 112.
- Safford HW, Stragrand GL. (1951). *Anal. Chem.* 23, 520.
- Schöniger W. (1955). *Mikrochim Acta*, 123.
- Schöniger W. (1956). *Mikrochim Acta*, 869.
- Soltys A. (1936). *Mikrochemie* 20, 107.
- Stragrand GL, Safford HW. (1949). *Anal. Chem.* 21, 625.
- Unterzaucher J. (1949). *Angew. Chemie* 61, 451
- Unterzaucher J. (1950) *Chemie Ing. Tech.* 22, 128; *Mikrochemie* 36-37, 706 (1951).
- Vecera M. (1962). *Mikrochimica Acta*, 896.
- Vecera M, Snöbl e Synek. (1958). *Mikrochimica Acta*, 9.
- Vieböck F, Brecher C. (1930). *Berichte der Chemischen Gesellschaft*, 63, 2818, 3207.
- Wagner H, Bühler F. (1951). *Mikrochemie* 36-37, 641.
- Wiesenberger E. (1941). *Mikrochemie* 29, 73.
- Wiesenberger E. (1942). *Mikrochemie* 30, 241; a) *Mikrochemie* 33, 51 (1947); b) *Mikrochimica Acta* 1954, 127.
- Zeisel J. (1885). *Monatshefte* 6, 989.
- Zerewitinoff T. (1907). *Berichte der Chemischen Gesellschaft*, 40, 2023; id., 41, 2233 (1908); id., 42, 4802 (1909); id. 43, 3590 (1910); id., 47, 1659, 2417 (1914); *Z. Anal. Chem.* 50, 680 (1911).
- Zimmermann W. (1943). *Mikrochemie* 31, 42.
- Zimmermann W. (1952). *Mikrochemie* 40, 162.