

DETERMINAZIONE MICRO-ANALITICA DELL'AZOTO (\*)

W. SCHÖNIGER

DIPARTIMENTO MICROANALITICO, SANDOZ S.P.A., BASILEA (SVIZZERA)



---

Per la determinazione del contenuto in azoto di composti organici sono principalmente possibili due vie: o la cosiddetta combustione della sostanza per via secca, secondo il principio di *Dumas-Pregl* con le sue varianti, o la demolizione della sostanza per via umida mediante acido solforico, secondo *Kjeldahl*.

Mentre secondo il procedimento di *Dumas-Pregl* può essere determinato l'azoto legato secondo un tipo qualunque di legame chimico, ciò non è possibile nel caso del procedimento secondo *Kjeldahl*. Nel seguito si descrivono i due procedimenti e vengono indicate le modificazioni che hanno un certo interesse:

1) *Descrizione della combustione per via secca.*

Il procedimento originariamente sviluppato da *Pregl*, e questo dato di fatto deve essere ricordato, dà al microanalista ben preparato la possibilità di ottenere risultati esattamente controllabili. D'altra parte la tecnica di lavoro per la determinazione dell'azoto non è facile da apprendere e per l'esecuzione di una sola analisi richiede relativamente molto tempo. Fu perciò un grande progresso, allorchè vent'anni fa *Zimmermann* (1) pubblicò una modificazione del procedimento con « combustione automatica ». La principale modificazione adottata è senza dubbio l'introduzione del cosiddetto « recipiente per la uguaglianza delle pressioni ». Per mezzo di questo piccolo gasometro si rende possibile di bruciare la sostanza in tubo chiuso e di raccogliere il gas grezzo che si sviluppa. Alla fine questo gas grezzo viene convogliato

---

(\*) Conferenza tenuta al Seminario di Chimica Terapeutica presso l'Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Pavia (5 - 18 aprile 1960).

all'azotometro attraverso il riempimento del tubo di combustione ancora rovente. La velocità della corrente gassosa non ha più perciò grande significato, mentre secondo il procedimento di Pregl, proprio questa velocità (misurata in base al numero di bolle all'azotometro) giocava un ruolo importantissimo. Secondo il nuovo procedimento era inoltre per la prima volta divenuto possibile di effettuare una analisi micro-elementare in meno di mezz'ora. L'unico svantaggio era, che secondo Zimmermann bisognava sempre mescolare la sostanza con ossido di rame (CuO) polverizzato.

Ricerche di scienziati giapponesi (2 - 4) mostrano in seguito una via, secondo la quale una modificazione del procedimento di Pregl descritta da Gysel (5, 6) può essere combinata al « metodo » di Zimmermann in modo tale, che il mescolare la sostanza con ossido di rame (CuO) polverizzato non è più necessario.  $\text{Co}_2\text{O}_3$  dà a  $800^\circ$  apprezzabili quantità di ossigeno. Se ora si pesa la sostanza in una navicella di porcellana e la si ricopre con uno straterello di ca 200 mg di  $\text{Co}_2\text{O}_3$ , quando il fornello mobile ha raggiunto la navicella si sviluppa abbastanza ossigeno da permettere una combustione completa della sostanza. Noi abbiamo per parecchi anni eseguito le determinazioni dell'azoto secondo questo procedimento e sempre abbiamo avuto risultati soddisfacenti. Con la introduzione di una sorta di corto lavaggio poté essere guadagnato tempo di lavoro prezioso, cosicchè per una analisi completa abbisognammo di 20 - 25 minuti.

Con l'impiego della via della doppia combustione proposta da Zimmermann, in corrispondenti apposite apparecchiature il tempo totale di analisi può essere ancora apprezzabilmente ridotto. Così, per es., secondo un procedimento di analisi sviluppato nel laboratorio di Pregl in Graz è possibile eseguire 4 determinazioni di azoto all'ora (7). Una simile apparecchiatura venne nello stesso tempo sviluppata in America (USA) (8). Mediante automatizzazione completa di questo apparato Gustin (9) riuscì nell'ultimo anno ad eseguire 8 - 10 analisi in un'ora.

Kirsten (10 - 12) trovò che, impiegando rame ed ossido di rame come riempimento del tubo, la prescritta temperatura di  $700^\circ$  è troppo bassa per una combustione completa, specialmente se si tratta di composti difficilmente combustibili; egli propose perciò di impiegare nichel ed ossido relativo per il riempimento del tubo di combustione. In questo caso la temperatura del fornello mobile deve essere fissata ad oltre  $1000^\circ$  e di conseguenza bisogna fare attenzione che il CO che si può formare per disproporzionamento termico della  $\text{CO}_2$  venga arrestato prima che esso riesca a giungere all'azotometro.

Interessante e significativo è un procedimento proposto da *Unterzacher* (13), secondo il quale alla  $\text{CO}_2$ , che serve quale veicolo di trasporto dei gas di combustione, viene mescolato ossigeno. La sostanza può allora essere pesata in una navicella di platino e, come per la determinazione del C e dell'H, possono essere in tal modo determinati eventuali residui ripesando la navicella alla fine dell'analisi. L'ossigeno in eccesso deve essere naturalmente fermato ancora prima dell'entrata dei gas di combustione nell'azotometro, ciò che si può facilmente fare con rame rovente. Mentre *Unterzacher* otteneva l'ossigeno per mezzo della decomposizione catalitica di acqua ossigenata, l'ottenimento di questo gas, secondo sia *Cropper* (14) come *Manser e Egli* (15), avviene per via elettrolitica, poichè in questo modo può essere meglio dosata la sua quantità. Noi pure abbiamo introdotto, sia pure da pochi mesi, questo procedimento nel nostro laboratorio, quale unico metodo di analisi dell'azoto. I risultati sono ottimi; fino ad ora il numero delle analisi ripetute è stato del 3% circa. L'osservazione fatta da *Manser e Egli*, secondo cui si forma alquanto CO che deve essere arrestato mediante « Hopcalite » oppure pentossido di iodio ( $\text{I}_2\text{O}_5$ ), non poté essere da noi confermata (16).

In questa relazione sono degni di nota un lavoro in cui viene descritta l'analisi con lo spettrometro di massa dei gas raccolti nell'azotometro come « azoto » (17). Accanto ad  $\text{N}_2$ , sono stati messi in rilievo CO,  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ . D'altra parte per queste ricerche venne impiegato il procedimento classico di determinazione dell'azoto, e non quello ora descritto di *Unterzacher*.

*Wurzschmitt* (18) propose alcuni anni fa di determinare simultaneamente con l'azoto, anche il contenuto in idrogeno del composto da analizzare. Ciò può facilmente accadere, se si fa avvenire la combustione in  $\text{CO}_2$  secca e se tra il tubo di combustione e l'azotometro si mette un tubo per l'assorbimento dell'acqua. Questo procedimento non si è però finora imposto.

Il procedimento per la prima volta descritto da *Ter Meulen* (19, 20) della idrogenazione catalitica dell'azoto ad *ammoniacca* e determinazione finale volumetrica di quest'ultima non ha trovato alcun impiego pratico, sebbene proprio in questi ultimi anni siano nuovamente apparsi due lavori sull'argomento (21, 22). Una causa per la quale non solo questo, ma anche altri procedimenti catalitici non hanno trovato affermazione nel campo della analisi elementare, dovrebbe soprattutto trovarsi nel fatto che tutti i catalizzatori usati possono essere facilmente « avvelenati ».

Una posizione d'eccezione trovano i metodi riduttivi, secondo cui

la sostanza viene trattata in tubo d'arroventamento con metalli, quali Mg (23, 24) o Ca (25). In questo caso si formano i corrispondenti nitru-ri che per decomposizione danno facilmente ammoniaca. Questi metodi sono soprattutto importanti, perchè in questo modo è possibile con una sola pesata determinare oltre l'azoto, anche gli alogeni e lo zolfo contenuti simultaneamente nella sostanza. Si opera sostanzialmente nel modo seguente: Si mescola la sostanza pesata in un tubetto infusibile con polvere di magnesio e si chiude alla fiamma con esclusione di aria. Dopo raffreddamento si decompone con acido in apparecchiature adatte e si determina, secondo Z i m m e r m a n n l'idrogeno solforato che si libera (26). Nella soluzione acquosa ottenuta, la quale è fortemente acida, si determina volumetricamente l'alogeno. Infine la soluzione stessa, la quale è servita per la titolazione dell'alogeno, viene posta in un'apparecchiatura di K j e l d a h l, resa alcalina e distillata come di consueto in corrente di vapore. Si determina infine l'azoto.

A questo punto bisogna ricordare che tra i numerosi metodi azotometrici pubblicati, la modificazione di M ü l l e r (27) è importante, perchè in questo azotometro la soluzione alcalina non viene più a contatto con pezzi di tubo di gomma.

## 2) *Descrizione della demolizione per via umida.*

Da quando K j e l d a h l (28) 75 anni fa pubblicò il suo metodo per la determinazione dell'azoto, sono apparsi innumerevoli lavori che si riferiscono a questo metodo. Principalmente il problema consiste nel fatto che è molto difficile ed in alcuni casi impossibile, trasformare in ammoniaca l'azoto organico per mezzo della cosiddetta demolizione per via umida. In base al comportamento dei composti organici trattati con questo procedimento, K a i n z (29) ha indicato 4 gruppi principali di composti contenenti azoto che non si possono sottoporre a questo procedimento: prodotti contenenti il raggruppamento  $\text{—N=N—}$ , quelli con N eterociclico, quelli con legami  $\text{H—N—}$  e con gruppi  $\text{—NO}$  o  $\text{—NO}_2$ .

In tutti questi casi bisogna aggiungere all'acido solforico usato per la « demolizione »  $\text{K}_2\text{SO}_4$  per elevare il punto di ebollizione, poichè la temperatura di « combustione » è oltremodo importante. Inoltre è necessario l'uso di un catalizzatore, che in molti casi è un composto contenente mercurio o selenio. Composti il cui azoto è contenuto come raggruppamento  $\text{—N=N—}$  oppure come gruppo  $\text{—NO}$  o  $\text{—NO}_2$  prima della loro « mineralizzazione » devono essere convenientemente ridotti. Perciò viene aggiunto secondo F r i e d r i c h (30) acido iodidrico,

oppure secondo una relazione pubblicata da *Steyermark e Coll.* (31) polvere di zinco e ferro.

Per la determinazione finale degli ioni ammonio che si formano dopo la demolizione della sostanza la via più conosciuta e semplice è pur sempre la distillazione in corrente di vapore. Il distillato può essere raccolto direttamente in acido cloridrico in eccesso oppure in acido bórico. Anche una titolazione iodometrica dell'eccesso di acido cloridrico è possibile e soprattutto consigliabile, se si tratta della determinazione di piccole quantità di azoto. (Terminata la distillazione, la  $\text{CO}_2$  viene scacciata per ebollizione; si aggiungono ioduro di potassio e soluzione di iodato e si titola lo iodio che si è liberato con soluzione titolata di tiosolfato). Altre, tra le molte possibilità di determinazione consigliabili, sono l'apprezzamento colorimetrico con il reattivo di *Nessler* (32) oppure la reazione colorimetrica con ipoclorito e fenato (33). Una interessante proposta venne pubblicata da *Belcher e Bhatt*y (34). La sostanza viene rinchiusa con acido solforico,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ed  $\text{HgSO}_4$ . Nella soluzione neutralizzata l'ammoniaca viene ossidata con ipoclorito; quindi viene aggiunta una quantità nota di acido arsenioso e l'eccesso di quest'ultimo è rititolato con soluzione titolata di ipoclorito. D'altra parte questo metodo si può impiegare solo se la sostanza da analizzare non deve essere preventivamente ridotta.

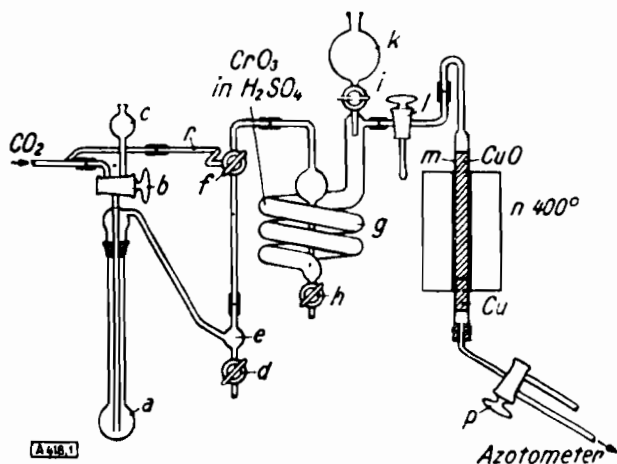


Fig. n. 1

*Apparecchio per la determinazione dell'azoto secondo Kjeldahl.*

- a) palloncino di reazione; c) imbuto per il riempimento; e) bolla; g) recipiente di lavaggio a spirale; k) imbuto di riempimento per  $\text{CrO}_3$ ; m) tubo ad ossido di rame; n) riscaldamento elettrico; r) tubo di raccordo; b, d, f, h, i, l, p) rubinetti.

Si deve ancora ricordare un metodo di Zinneke (35), il quale modificò il procedimento di Kjeldahl, in modo da determinare alla fine l'azoto in un azotometro. Secondo questo procedimento l'operazione si compie con solo acido solforico in un palloncino di Kjeldahl collegato con l'azotometro. Una parte dell'azoto si sviluppa sotto forma gassosa e viene determinato nell'azotometro, mentre la parte restante viene raccolta come di solito sotto forma di ammoniaca. Sulla base del rapporto azoto-ammoniaca si possono fare preziose previsioni sul tipo del legame d'azoto. Secondo un altro tipo di determinazione si rinchioda la sostanza parimenti con acido solforico, ma in presenza di nero di platino. Di conseguenza l'azoto si sviluppa come elemento e può essere determinato in un azotometro (Fig. n. 1).

Alla fine di queste considerazioni si deve ancora brevemente parlare dei

#### PROCEDIMENTI DI ULTRAMICRO-ANALISI.

Di ciò si parla alla fine delle considerazioni sulla determinazione dell'azoto, soprattutto perchè i primi procedimenti ultramicro-analitici sono stati elaborati proprio per la determinazione di questo elemento.

Per determinazioni ultramicro-analitiche si intendono determinazioni per le quali si lavora con pesate inferiori a 1 mg. Molto spesso a questo scopo devono essere ideate, od anche solo trovate, nuove vie non solo rispetto alla parte chimica, ma anche per ciò che riguarda le apparecchiature. Una ulteriore difficoltà, che ancora si frappone all'impiego generale di tali metodi al momento attuale, è la mancanza di una robusta ultramicro-bilancia, che sia così semplice da maneggiare come lo sono le attuali micro-bilance.

Come appunto è stato detto, la ultramicro-determinazione dell'azoto è conosciuta già da molto tempo. Sostanzialmente si tratta di un procedimento del tipo Kjeldahl, mediante il quale la sostanza viene riscaldata, in un piccolo tubo sigillato, con acido solforico concentrato a 470°. L'ammoniaca che si forma non può più essere distillata in corrente di vapore dalla soluzione che la contiene. Si adoperano o i sopra accennati metodi colorimetrici, oppure si separa l'ammoniaca dalla soluzione che la contiene mediante piccoli recipienti per micro-diffusione. In questo caso può seguire una determinazione finale per via acidimetrica (36). Kuck e Altieri (37) come Kirsten e Grunbaum (38) descrivono procedimenti secondo Dumas, per i quali si possono raccogliere anche microgrammi di azoto in speciali azotometri.

Per la determinazione del carbonio Van Slyke (39) per primo

ha elaborato un procedimento il cui principio è ben noto. La determinazione finale viene qui effettuata manometricamente, dopo che la sostanza è stata decomposta con una speciale miscela di riempimento e di acidi.

Un procedimento gas-volumetrico, secondo il quale oltre al carbonio può essere determinato anche l'idrogeno e successivamente l'azoto, viene descritto da *Kirsten* (40). La sostanza viene riscaldata in un tubo di quarzo fuso che contiene ossigeno ed alquanto rame ad alta temperatura. Il miscuglio di  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ed  $\text{N}_2$  che si forma, viene separato gasvolumetricamente in un complicato apparecchio e si determinano così i singoli costituenti (Fig. n. 2).

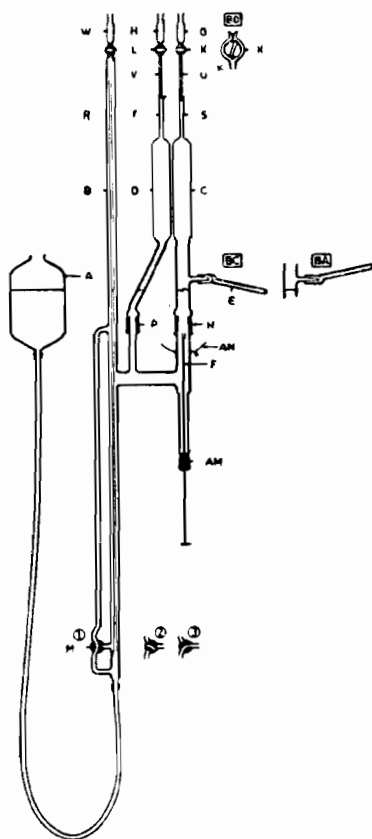


Fig. n. 2

Il già nominato procedimento volumetrico per la determinazione



di C ed H secondo Unterzaucher (41) è analiticamente valido anche operando su campioni di 1 mg.

Anche per la determinazione di *alogeni, solfo e fosforo* sono noti parecchi ultramicro-metodi, anche se essi sono stati elaborati per lo più solamente per l'analisi di uno od alcuni composti. Tra i più conosciuti sono qui i metodi per la *determinazione dello iodio* (42). La demolizione della sostanza avviene naturalmente in apparecchi opportunamente dimensionati e secondo un processo micro-analitico idoneo. La determinazione finale quando possibile, viene eseguita per via colorimetrica.

Infine deve essere chiarito che la ultramicro-analisi organica è allo inizio del suo sviluppo. Si può dire che appena venga trovata una ultramicrobilancia veramente di pronto impiego, la ultramicro-analisi assumerà uno sviluppo ed un impiego tale, quale ha ora assunto la cosiddetta micro-analisi classica.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) ZIMMERMANN W., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **31**, 42; 1943.
- 2) HOZUMI K., KINOSHITA S., *J. Pharm. Soc. Japan*, **76**, 1157; 1956; *Through Anal. Abstr.*, **4**, 2993; 1957.
- 3) HOZUMI K., IMAEDA K., KINOSHITA S., *J. Pharm. Soc. Japan*, **76**, 1161; 1956; *through Anal. Abstr.*, **4**, 2993; 1957.
- 4) HOZUMI K., KINOSHITA S., *J. Pharm. Soc. Japan*, **76**, 1167; 1956; *Through Anal. Abstr.*, **4**, 2993; 1957.
- 5) GYSEL H., *Helv. Chim. Acta*, **22**, 1088; 1939.
- 6) GYSEL H., *Helv. Chim. Acta*, **35**, 802; 1952.
- 7) SCHÖNIGER W., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **39**, 229; 1952.
- 8) SHELBERG E. F., *Anal. Chem.*, **23**, 1492; 1951.
- 9) GUSTIN G. M., *Microchem. J.*, **4**, 43; 1960.
- 10) KIRSTEN W., *Anal. Chem.*, **19**, 925; 1947.
- 11) KIRSTEN W., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **39**, 245; 1952.
- 12) KIRSTEN W., *Anal. Chem.*, **29**, 1084; 1957.
- 13) UNTERZAUCHER J., *Chem. Ing. Tech.*, **22**, 128; 1950; *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **36/37**, 706; 1951.
- 14) CROPPER F. R., REED R. H., ROTHWELL R., *Mikrochim. Acta*, 223; 1954.
- 15) MANSER W., EGLI A., *Helv. Chim. Acta*, **37**, 1048; 1954.
- 16) SCHÖNIGER W., Ricerche non pubblicate.
- 17) VAN METER J. C., BAILEY C. W., BRODIE E. C., *Anal. Chem.*, **23**, 1638; 1951.
- 18) WURZSCHMITT B., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **36/37**, 614; 1951.
- 19) TER MEULEN H., *Bull. Soc. Chim. Belgique*, **49**, 103; 1940.
- 20) TER MUELEN H., HESLINGA J., *Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse*, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1927, pp. 20-27.
- 21) HOLOWCHAK J., WEAR G. E. C., BALDECHWIELER E. L., *Anal. Chem.*, **24**, 1754; 1952.
- 22) KING R. W., FAULCONER W. B. M., *Anal. Chem.*, **28**, 255; 1956.
- 23) FEDOSEEV P. N., IVASHOVA N. P., *Zhur Anal. Khim.*, **7**, 112; 1952.
- 24) SCHÖNIGER W., *Mikrochim. Acta*, **44**, 1955.
- 25) TERENTJEV A. P., FEDOSEEV P. N., IVASHOVA N. P., *Zhur. Anal. Khim.*, **13**, 344; 1958.
- 26) ZIMMERMANN W., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **31**, 15; 1944; **33**, 122; 1947; **35**, 80; 1950; **40**, 162; 1952.
- 27) MÜLLER A., *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, **33**, 192; 1948.

- 28) KJELDAHL J., *Z. Anal. Chem.*, **22**, 366; 1883.
- 29) KAINZ G., *Österr. Chemiker. Z.*, **57**, 242; 1956.
- 30) FRIEDRICH A., *Z. physiol. Chem.*, **216**, 68; 1933.
- 31) STEYERMARK A., MCGEE B. E., BASS E. A., KAUP R. R., *Anal. Chem.*, **30**, 1561; 1958.
- 32) SCHAFFER F. L., SPRECHER J. C., *Anal. Chem.*, **29**, 437; 1957.
- 33) VAN SLYKE D. D., HILLER A., *J. Biol. Chem.*, **102**, 499; 1933.
- 34) BELCHER R., BHATTY M. K., *Mikrochim. Acta*, 1183, **1956**.
- 35) ZINNEKE F., *Angew. Chem.*, **64**, 220; 1952.
- 36) KIRK P. L., *Mikrochemie*, **21**, 260; 1936.
- 37) KUCK J. A., ALTIERI P. L., *Mikrochim. Acta*, 17, **1954**.
- 38) KIRSTEN W. J., GRUNBAUM B. W., *Anal. Chem.*, **27**, 1806; 1955.
- 39) VAN SLYKE D. D., FOLCH J., *J. Biol. Chem.*, **136**, 509; 1940.
- 40) KIRSTEN W. J., *Chim. anal.*, **40**, 253; 1958.
- 41) UNTERZAUCHER J., *Mikrochim. Acta*, 448, **1957**.
- 42) SPITZY H., REESE M., SKRUBE H., *Mikrochim. Acta*, 488, **1958**.