

BIBLIOGRAFIA

1. - *Charlson, A.J., et. al.* "Potential antitumor activity of some amino acids metal systems". J. Clin. Hematol. Oncol. 7(1), 293-300 (1977).
2. - *Hayes, R.L.* "Factors affecting uptake to Radioactive agents by tumour and other tissues". Tumour localization with radioactive agents." Proc. Panel OIEA (Vienna 1974), (1976), 31.
3. - *Javanovic, et. al.* "Visualization of malignants tumours by ⁷⁵Se-Selenomethionine scintigraphy". Proc. Symp. on Medical Radioisotope Scintigraphy OIEA. (Salzburg 6-15 Agosto 1968) II, 753.
4. - *Cotton, F.A., Wilkinson, G.* "Advanced Inorganic Chemistry". 3a. ed. (Interscience Publishers), (1972), 982.
5. - *Merlin, L.; Bernard, M.; Cohen, Y.* "Chimie du technetium: influence des systemes oxydoreducteurs sur la stabilité des complexes utilisés comme radiopharmaceutiques". Radiopharmaceuticals and labelled compounds. Proc. Symp. Copenhagen, 1973. OIEA. (Vienna 1973), 63-70.
6. - *Ibid* (5), 361, 395.
7. - *Re Chervo, L.* "Use of ^{99m}Tc-Cu-DTPA complex as a renal function agent". J. Nucl. Med. 18, (1977), 62-66.
8. - *Barker, R.* "Química Orgánica de los compuestos biológicos". Ed. Alhambra, (1974), 71-74.
9. - *Persson, H.B.R.; Strand, S.E.* "Labelling processes and shortterm byodynamical behaviour of different types of ^{99m}Tc-Labelled complexes". Radiopharmaceuticals and labelled compounds. Proc. Symp. Copenhagen, 1973. OIEA (Vienna 1973), 169-186.
10. - *Colombetti, L.G.; Barnes, W. Earl.* "Effect of chemical and radiochemical impurities from eluants on ^{99m}Tc-Labeling efficiency". J. Nucl. Med. 18 (1977), 273.
11. - "The radiochemistry of Technetium", USAEC, Nuclear Science Series, 3021, (1960), 9.
12. - *Kolthoff y Elving.* "Treatise on Analytical Chemistry". Vol. 7 ("Rhenium").
13. - "The radiochemistry of Rhenium" USAEC, Nuclear Science Series, Nº 3028 (1961), 20.
14. - *Carlin, R.L.* "Transition metal chemistry". A series of advances, 4 (1968), 013, 06, 08.
15. - *Hambright, P., et. al.* "Chemistry of Technetium radiopharmaceuticals. I. Exploration of the tissue distribution and oxidation state consequences of Technetium (IV) in Tc-Sn-Gluconate and Tc-Sn-EHDP using carrier Tc-99." J. Nucl. Med. 16 (1975), 478.

CONTRIBUCION A LA DETERMINACION DE FOSFORO CON EL REACTIVO VANADOMOLIBDICO

I.Q. TOMAS BENSE. TERESITA BONILLA*

RESUMEN

La determinación espectrofotométrica del fósforo con el reactivo vanadomolibdico es ampliamente aplicada a variados problemas analíticos, y usualmente las medidas se efectúan a longitudes de onda superiores a 400 nm. Cuando la sensibilidad se convierte en factor crítico, suele preferirse el método del azul de molibdeno. En el presente trabajo dirigido al análisis foliar de P, se demuestra que con el reactivo vanadomolibdico puede lograrse una sensibilidad comparable a la del azul de molibdeno si las medidas se efectúan a 315 nm. La mayor estabilidad de la absorbancia se logra en medio sulfúrico ca. 0.12N. Se detecta una ligera desviación de la ley de Bouguer-Beer y un comportamiento anormal en las proximidades del límite de detección. Se efectúa un análisis de la varianza del método y se estudia su correlación con el método del azul de molibdeno.

1. INTRODUCCION

La reacción coloreada producida por el ácido fosfórico en presencia de vanadio V y molibdeno IV en medio ácido fue, ya en el año 1908 [1], propuesta para fines analíticos. Desde entonces se aplicó con éxito a la determinación de fósforo en materias muy variados, como calizas [2], aceros [3], rocas fosfatadas [4], etc. Kitson y Mellon [5] realizaron un extenso estudio acerca de los factores que influyen en el desarrollo y estabilidad del color, como la acidez del medio, la concentración y orden de agregado de los reactivos, la temperatura y la presencia de diversos iones interferentes. También Quinlan y De Sesa [6], tratando de aclarar contradicciones en los procedimientos propuestos en la literatura para llevar a cabo la reacción realizaron un estudio de sus condiciones óptimas.

*Cátedra de Análisis Instrumental, Facultad de Química.

Si bien durante mucho tiempo se aconsejó el agregado por separado de los reactivos (vanadato de amonio en medio nítrico y molibdato de amonio), Barton [4] propuso en 1948 el empleo de un reactivo mezclado, procedimiento que fue adoptado por otros investigadores.

2. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

El método basado en la formación del complejo fosfovanao-molibdico (CFVM) es muy sensible, aconsejándose su aplicación a la determinación de fósforo en el rango de concentraciones de 5-40 ppm [7]. Los procedimientos más corrientes se basan en la medida de la absorbancia a longitudes de onda superiores a 400 nm, usualmente a 460 nm. Sin embargo, cuando los niveles de concentración de P se vuelven críticos suelen preferirse para su determinación los métodos basados en la formación de azul de molibdeno (AM), producido por reducción selectiva del ácido molibdofosfórico. El compuesto azul formado posee un máximo de absorción en la región de 650-700 nm, lo que permite determinar concentraciones de fósforo en el rango de 0.1 - 1.2 ppm de P [7]. El método de AM presenta, sin embargo, algunas desventajas frente al de CFVM, particularmente en lo referente a la inestabilidad de algunos de los reductores propuestos (cloruro estannoso, hidrazina, ac. 1-2-4-amino-naftolsulfónico, etc.). Existe, por otra parte, la posibilidad de aumentar la sensibilidad del reactivo vanadomolibdico (RVM) en sus aplicaciones cuantitativas. El efecto, Michelsen [8] propone una modificación del método, utilizando reactivos más diluidos y midiendo a 315 nm, donde el CFVM posee un máximo de absorción. El autor mencionado señala que de este modo se pueden determinar fosfatos en un rango de concentración de 0.1 a 1 ppm con un error del $\pm 3\%$. Sin embargo, se limita a trabajar con soluciones puras de fosfato. Cuando nosotros intentamos aplicar esta técnica al análisis foliar determinando fósforo en soluciones obtenidas del ataque de material vegetal con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno [9] encontramos dificultades (efectos de solución) que obligaron a una revisión de la técnica, particularmente en lo referente a interferencias espectrales y acidez del medio. En el presente trabajo se resumen los resultados obtenidos en dicha revisión.

3. COMPOSICION DEL RVM UTILIZADO

Se preparó un reactivo concentrado mezclando las siguientes soluciones:

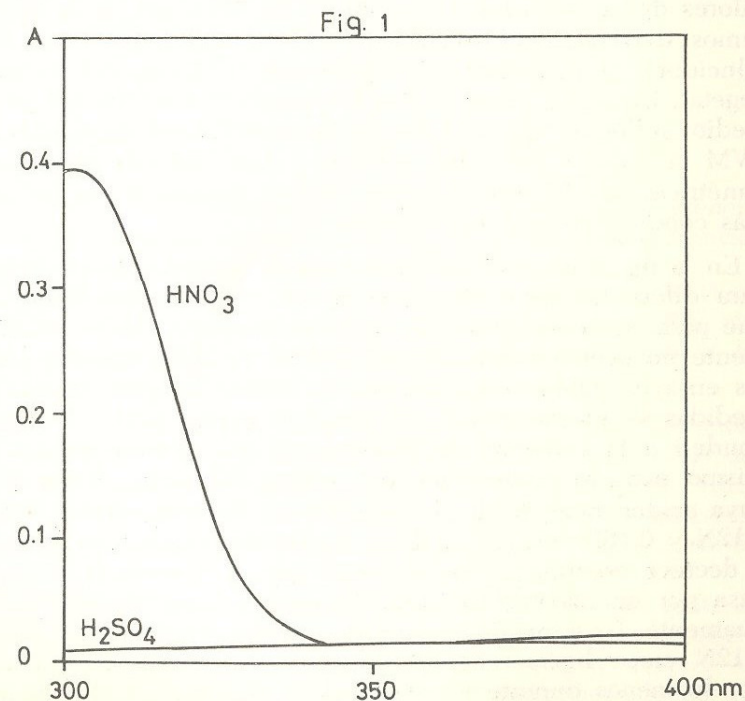
Solución A: 25 g. de $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 400 ml de agua.

Solución B: 1.25 g. de NH_4VO_3 se disolvieron en 300 ml de agua hirviendo. Luego de enfriar se agregaron 10 ml de H_2SO_4 conc. ($D=1.84$).

Las soluciones de A y B se mezclaron y diluyeron a 1 litro.

Este reactivo concentrado se diluyó posteriormente en la proporción 1:20 con ácido sulfúrico diluido de modo de lograr una acidez final aprox. 0.72N.

Tradicionalmente el ácido utilizado para el RVM es el nítrico. Sin embargo, dada la intensa absorción UV de dicho ácido, Michelson recurrió al HCl, señalando que su elección era arbitraria, pudiéndose recurrir también a los ácidos sulfúrico y perclórico. En nuestro caso recurrimos al ácido sulfúrico, elección consistente con el hecho de que las soluciones problema objeto de nuestro estudio provienen de un ataque con dicho ácido. La absorción UV del H_2SO_4 es insignificante comparada con la del HNO_3 , tal como puede apreciarse en la fig. 1.

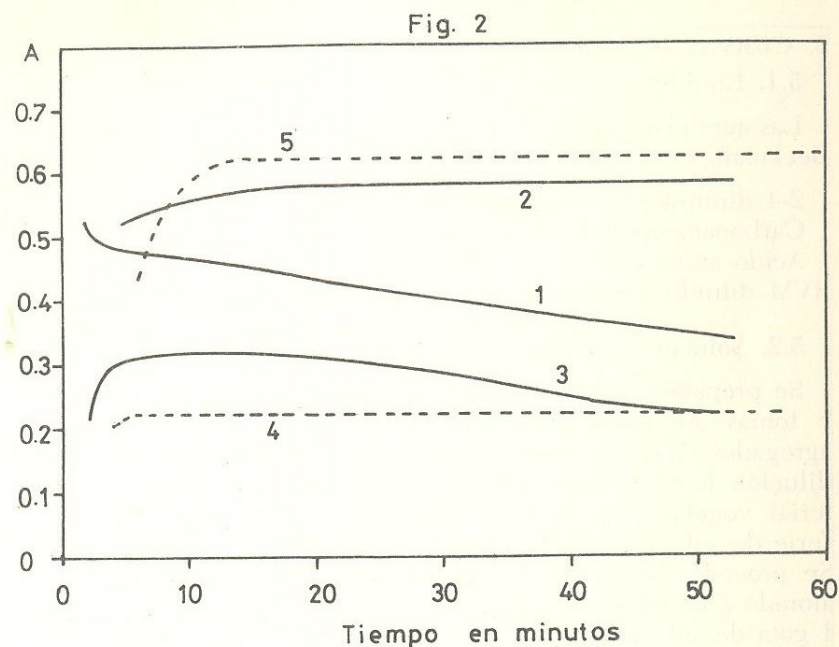


En cuanto a la concentración que proponemos para el ácido está relacionada con el resto de las etapas de la técnica analítica, y se calculó de modo que la concentración final en el medio donde se produce la reacción sea aprox. 0.12N, puesto que bajo tales condiciones hemos comprobado que es mayor la estabilidad del compuesto formado, tal como se detalla en la sección siguiente.

4. INFLUENCIA DE LA ACIDEZ SOBRE LA ESTABILIDAD DEL CFVM

Nuestra experiencia previa sobre la aplicación del RVM, así como la información publicada, indican que el color desarrollado varía con el tiempo. Existen discrepancias en la bibliografía acerca del lapso óptimo para efectuar la medida espectrofotométrica, lo cual puede deberse a las diferentes condiciones de acidez, temperatura, concentración del reactivo, etc. utilizadas por los diferentes investigadores. Nuestras experiencias indican que la acidez constituye un parámetro cuyo ajuste es relativamente crítico si se desea lograr una estabilidad adecuada de los valores de absorbancia. Para estudiar la influencia de la acidez hemos trabajado con soluciones tipo de fosfato así como con soluciones provenientes de digestiones sulfúricas del material vegetal. En ambos casos dichas soluciones se encontraban en un medio sulfúrico aprox. 1.4N, y previamente al agregado del RVM se neutralizaron con CO_3Na_2 . Las medidas espectrofotométricas se efectuaron contra blancos preparados en las mismas condiciones que las muestras.

En la fig. 2 se observan las curvas de absorbancia vs. tiempo para diferentes concentraciones de H_2SO_4 . Hemos observado que para concentraciones de ácido superiores a 0.25N prácticamente no ocurre formación del CFVM, de modo que en todos los ensayos trabajamos a niveles de acidez menores. Todas las medidas se efectuaron a 315 nm. Las curvas 1, 2 y 3 corresponden a la variación de absorbancia con el tiempo para un mismo extracto proveniente del ataque del material vegetal y cuya acidez final, luego de agregado el reactivo, resultó 0.06N, 0.12N y 0.16N respectivamente. Puede observarse que la curva 1 decrece continuamente, mientras que la 3 aumenta primero, pasa por un máximo de corta duración y luego decrece continuamente. La curva 2, en cambio, correspondiente a una acidez 0.12N crece ligeramente al principio para luego estabilizarse por lo menos durante los 90 minutos que duró la experiencia.



Una medida complementaria, efectuada a las 24 hs. evidenció un decrecimiento de sólo 6% en el valor de la absorbancia.

Obsérvese que para el nivel de acidez 0.12N la absorbancia es sensiblemente mayor que para los niveles 0.06N y 0.16N, de modo que no sólo se mejora la estabilidad sino también la sensibilidad.

Como experiencias confirmatorias, las curvas 4 y 5 fueron obtenidas a partir de soluciones tipo de fosfato, procesadas de igual manera que las muestras anteriores, siendo la acidez final 0.12N en ambos casos. Las concentraciones finales de P fueron de aprox. 0.3 ppm para la curva 4 y aprox. 1 ppm para la curva 5.

De acuerdo a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la posibilidad de que las soluciones de mayor concentración exijan un tiempo de estabilización algo mayor (según lo sugiere la comparación de las curvas 2 y 5 con la 4) decidimos adoptar 30

minutos como intervalo mínimo de tiempo entre el agregado del reactivo y la lectura espectrofotométrica.

5. CURVAS DE CALIBRACION

5.1. Equipos y reactivos

Las medidas espectrofotométricas se realizaron con equipos Beckman, modelos DU y 25. Los reactivos empleados fueron:

2-4 dinitrofenol, solución al 0.05%.

Carbonato de sodio, solución 4N.

Acido sulfúrico, solución 2N.

RVM diluido, preparado según detalle en la Sec. 3.

5.2. Soluciones patrón

Se prepararon soluciones de fosfato de concentración conocida y tomas adecuadas de ellas fueron sometidas a los mismos agregados (H_2SO_4 , H_2O_2) y tratamientos (digestión en caliente, dilución hasta un volumen prefijado) que las muestras de material vegetal a analizar (v. más adelante). Se obtuvo así una serie de soluciones patrón conteniendo 1, 2, 4, 6 y 8 ppm de P. Se procedió luego de acuerdo a la siguiente técnica: en tubo aforado a 25 ml se colocaron 5 ml de solución patrón. Se agregó 1 gota de solución de 2,4 dinitrofenol y luego se neutralizó con solución de CO_3Na_2 hasta viraje al amarillo. Se tornó a incoloro con la cantidad justamente necesaria de H_2SO_4 2N. Se enrasó a 25 ml con agua. Se agregaron luego con pipeta aforada 5 ml del RVM diluido. Al cabo de 30 minutos se efectuó la lectura espectrofotométrica a 315 nm.

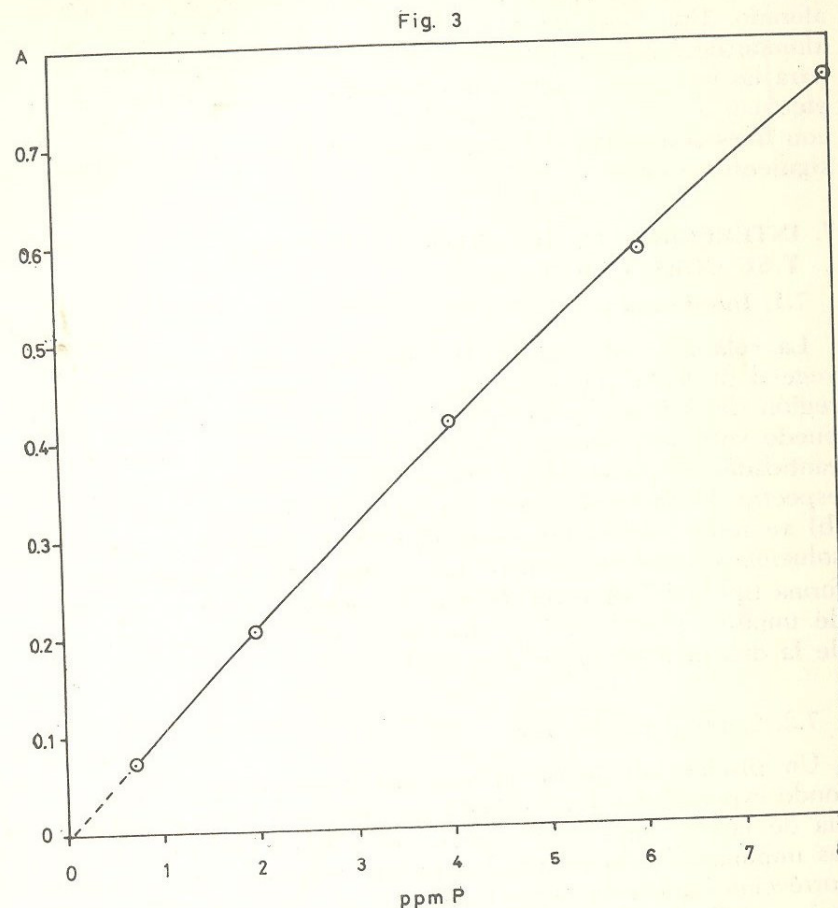
5.3. Relación Absorbancia vs. concentración.

Curva de mejor ajuste

Se efectuaron cinco repeticiones para cada punto de la escala y los resultados de las medidas espectrofotométricas se sometieron a tratamiento estadístico para hallar la ecuación de mejor ajuste, ensayándose los modelos lineal y cuadrático ambos sin ordenada en el origen. En nuestro caso obtuvimos la ecuación

$$A_{315} = 0.108 C - 0.002 C^2 \quad (1)$$

donde A_{315} es la absorbancia a 315 nm y C la concentración expresada en ppm de P. La correspondiente representación gráfica se da en la fig. 3. Será conveniente confirmar el valor de los coeficientes de la (1) cada vez que se prepare un nuevo lote de RVM.



6. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El material vegetal se procesó por la técnica de Cotton [9] adaptada: 0.5 g. (u otra toma adecuada) de material vegetal, pesados exactamente, se colocan en un matraz Kjeldahl de 100 ml. Se agregan 10 ml de H_2SO_4 concentrado. Al cabo de este período se agregan 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y se calienta hasta desprendimiento de vapores densos. Luego de enfriar se agregan otros 2 ml de peróxido y se calienta hasta

destrucción de éste. La solución remanente resultará incolora o casi incolora. Se deja enfriar y se diluye a 250 ml en matraz aforado. Una toma de 5 ml de esta solución se pasa a tubo aforado de 5 ml y se procede del modo descrito en la Sec. 5.2. para las soluciones patrón. Las medidas espectrofotométricas se efectúan a 315 nm y 305 nm. Esta última medida se efectúa con fines correctivos del fondo espectral debido a impurezas (v. siguiente sección).

7. INTERFERENCIA DEL FONDO ESPECTRAL Y SU CORRECCION

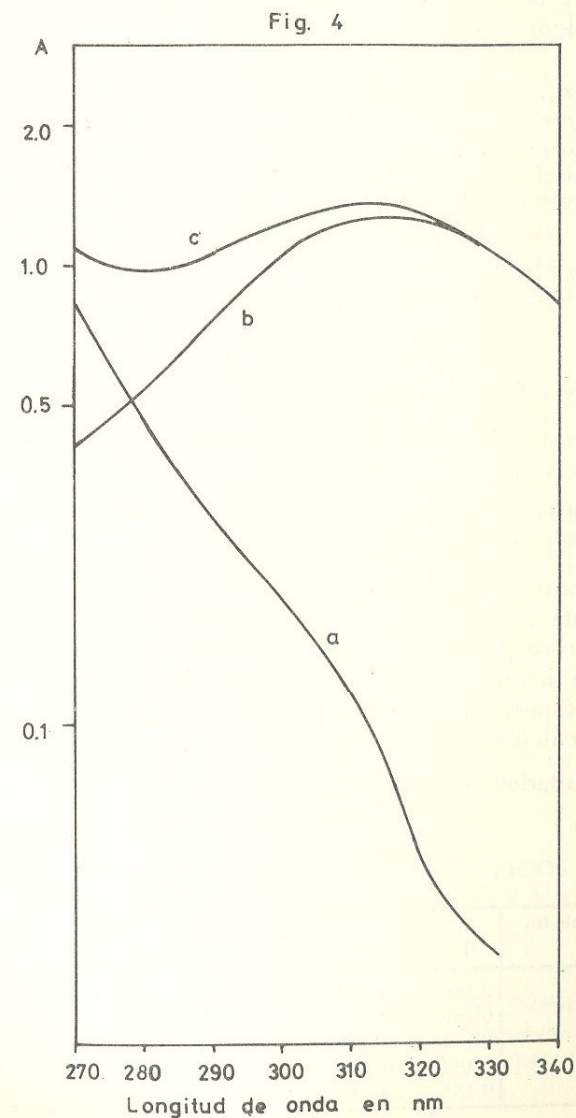
7.1. Interferencia

La solución obtenida de la digestión sulfúrica del material vegetal presenta impurezas capaces de absorber radiación en la región de 315 nm, pudiendo introducir un error analítico que puede volverse relativamente importante cuando se determinan cantidades pequeñas de P. En la fig. 4 (a) se representa un espectro de absorción típico de dichas impurezas. En la fig. 4 (b) se reproduce el espectro del CFVM obtenido a partir de soluciones puras de fosfato. En la fig. 4 (c) se representa la forma típica del espectro del CFVM interferido por el espectro de impurezas, tal como se observa en soluciones provenientes de la digestión de material vegetal.

7.2. Corrección propuesta

Un primer intento de aplicar una corrección geométrica de fondo espectral no dio resultados satisfactorios como consecuencia de la curvatura relativamente pronunciada del espectro de las impurezas en la región de 315 nm. Se ensayó entonces una corrección basada en la realización de una medida complementaria a 305 nm y en la utilización de relaciones espectrales previamente establecidas para el espectro del CFVM y de la impureza, que aparentemente presenta las mismas características espectrales en las diversas especies vegetales investigadas. En el Apéndice se detalla el fundamento teórico del método de corrección. Para probar la eficiencia de dicho método se efectuó en una serie de casos el estudio comparativo de la corrección de absorbancia calculada y la corrección verdadera. La última pudo evaluarse obteniendo el espectro de las soluciones problemas antes del agregado del reactivo vandomolibdico. Los resultados fueron muy satisfactorios, tal como se observa en el cuadro siguiente:

| Muestra N° | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbancia de impurezas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Verdadera | 0.051 | 0.038 | 0.041 | 0.028 | 0.045 |
| Calculada | 0.043 | 0.045 | 0.046 | 0.026 | 0.042 |



8. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

En la literatura consultada existen referencias poco precisas acerca del efecto de la temperatura sobre el valor de la absorbancia del CFVM. Nuestros resultados, concordantes con los publicados por Snell y Snell [11], indican que, por lo menos en el intervalo estudiado (20 a 30° C) no se produce un efecto significativo de la temperatura sobre la absorbancia a 315 nm, tal como se deduce de los valores siguientes

$$A_{315} (21^{\circ} \text{C}) = 0.428 \pm 0.004$$

$$A_{315} (25.5^{\circ} \text{C}) = 0.427 \pm 0.009$$

$$A_{315} (29.5^{\circ} \text{C}) = 0.430 \pm 0.006$$

Las absorbancias indicadas constituyen los promedios de 6 réplicas y sus límites de confianza para el nivel de 95%, para diferentes tomas de una misma solución, habiéndose desarrollado la reacción a las temperaturas indicadas.

9. ANALISIS DE LA VARIANZA DEL METODO

Para estudiar las contribuciones a la varianza total del método de las etapas de

- a) muestreo y digestión sulfúrica y
- b) análisis espectrofotométrico

se extrajeron 5 muestras de un mismo lote de material vegetal, previamente molido y cuidadosamente homogeneizado, efectuándose las correspondientes digestiones sulfúricas. Sobre cada una de las soluciones obtenidas se realizaron 5 determinaciones espectrofotométricas, efectuando las correcciones de fondo espectral y calculando el % de P en la muestra original.

Los resultados se resumen en la Tabla I.

TABLA I

| Muestra | Réplicas espectrofotométricas | | | | |
|---------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0.185 | 0.184 | 0.184 | 0.180 | 0.179 |
| 2 | 0.185 | 0.186 | 0.188 | 0.192 | 0.190 |
| 3 | 0.184 | 0.184 | 0.183 | 0.191 | 0.182 |
| 4 | 0.184 | 0.188 | 0.187 | 0.190 | 0.187 |
| 5 | 0.181 | 0.181 | 0.181 | 0.181 | 0.180 |

El estimador $s_{\bar{y}}^2$ de la varianza para una determinación aislada entre filas será

$$s_{\bar{y}}^2 = 4.88 \times 10^{-5}$$

El estimador s_{rep}^2 de la varianza de reproductibilidad será

$$s_{\text{rep}}^2 = 6.62 \times 10^{-6}$$

Se calcula así para el estadístico F el valor

$$F = \frac{s_{\bar{y}}^2}{s_{\text{rep}}^2} = 7.37$$

con 4 grados de libertad para $s_{\bar{y}}^2$ y 20 para s_{rep}^2 . Este valor de F supera el valor crítico para los mismos grados de libertad y un nivel de confianza de 95%. Se concluye pues que existe una contribución significativa s_M^2 de la etapa de muestreo y digestión a la varianza total.

$$s_M^2 = \frac{s_{\bar{y}}^2 - s_{\text{rep}}^2}{n} = 8.43 \times 10^{-6}$$

(n = 5)

Eventualmente, el conocimiento de esta cantidad permitirá establecer el número de réplicas de muestreo y digestión (m) y espectrofotométricas (n) para mantener en un valor prefijado la varianza total. Para ello se recurre a la siguiente expresión para su estimador $s_{m,n}^2$ [10]

$$s_{m,n}^2 = \frac{s_{\text{rep}}^2 (nk + 1)}{mn} \quad (2)$$

donde $k = s_M^2 / s_{\text{rep}}^2$

10. COMPARACION DE RESULTADOS ANALITICOS OBTENIDOS POR LOS METODOS DEL RVN Y DEL AM

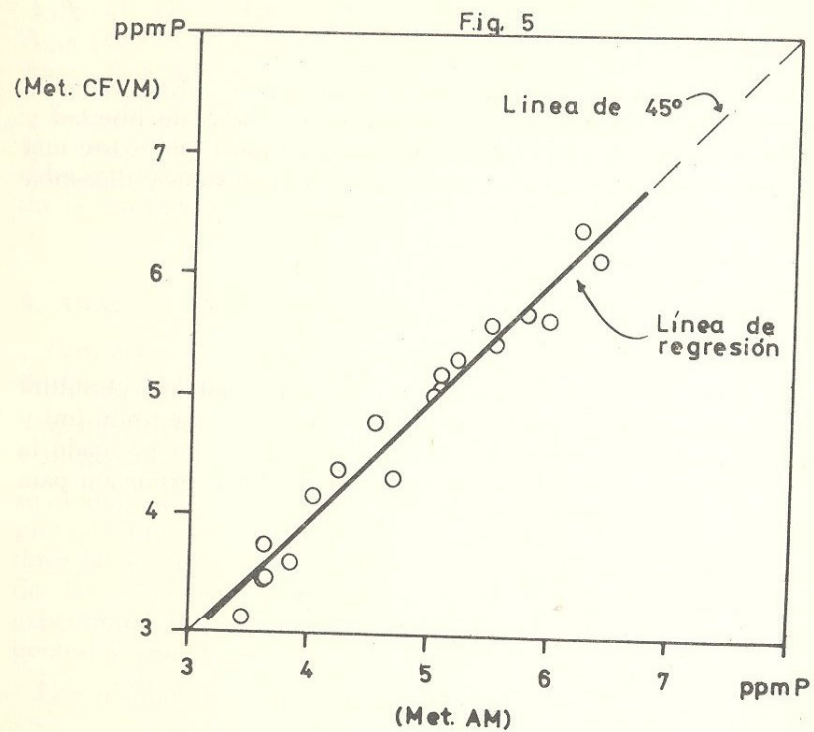
10.1 Correlación

En la fig. 5 se correlacionan los resultados obtenidos de 20 muestras de material vegetal de diversos orígenes analizadas simultáneamente por los métodos del RVM y del AM. La ecuación de la línea de regresión es

$$y \text{ (mét RVM)} = 1.001 x \text{ (mét AM)} - 0.059 \quad (3)$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.98$. El tratamiento estadístico de la información experimental indica que la pendiente y ordenada en el origen de la (3) no difieren en forma significativa de la unidad y cero respectivamente.

La correlación es pues excelente y ambos métodos conducen a resultados concordantes.



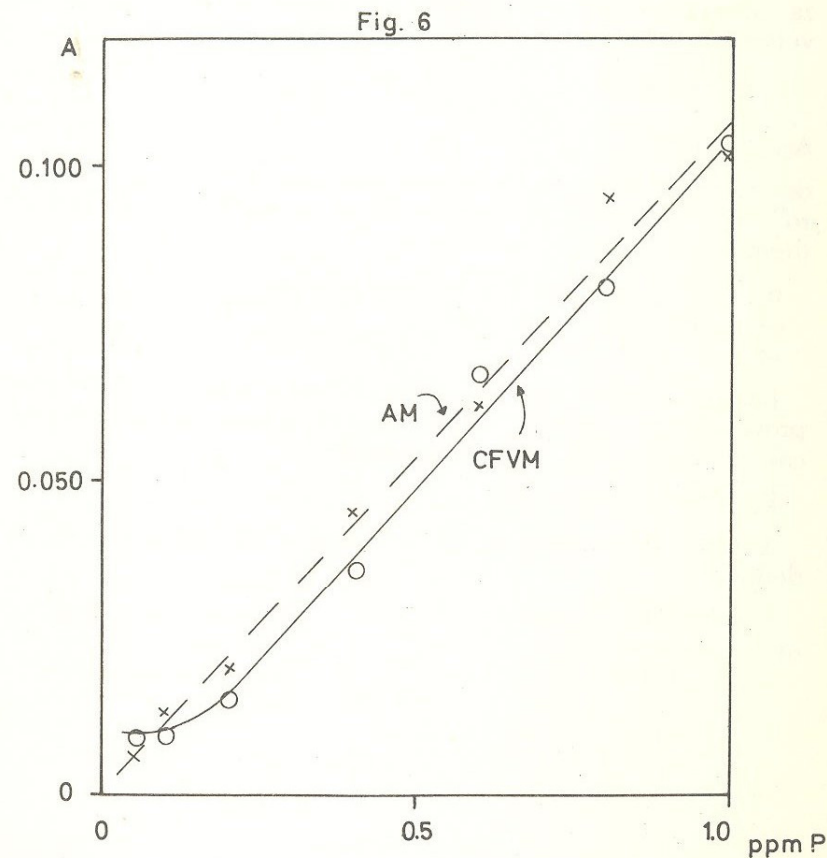
10.2 Límites de detección

La determinación de estos límites se realizó efectuando medidas de absorbancia hasta concentraciones muy bajas de fosfato, aplicando luego el método de corredor de confianza [12] para estimar los límites de detección. En la fig. 6 se representan los resultados obtenidos en las medidas de absorbancia. Puede observarse que a concentraciones muy bajas el CFVM presenta

un comportamiento francamente anormal, lo cual no ocurre con el AM. Tenido en cuenta este comportamiento, la estimación final de límites de detección conduce a los siguientes resultados para las condiciones experimentales adoptadas:

Método RVM: 0.4 ppm de P

Método AM: 0.2 ppm de P



APENDICE

Corrección de fondo espectral

Del espectro del CFVM "puro" se obtiene la siguiente relación, supuesta válida para todas las concentraciones:

$$\frac{A_{315}}{A_{305}} = \text{constante} = k \quad (A - 1)$$

Si el espectro está deformado por la presencia de una impureza cuya absorbancia es aditiva, los valores de A_{315} y A_{305} se verán falseados por cantidades m y n tales que

$$A_{315} = A'_{315} - m \quad (A - 2)$$

$$A_{305} = A'_{305} - n$$

donde A'_{315} y A'_{305} son los valores obtenidos del espectro "impuro". Si la impureza es siempre de la misma naturaleza supondremos que

$$\frac{n}{m} = \text{const.} = k' \quad n = k'm \quad (A - 3)$$

Las constantes k y k' pueden calcularse a partir de un estudio previo de los espectros del CFVM y de la impureza. En nuestro caso obtuvimos los siguientes valores:

$$k = 1.10 \quad k' = 1.62$$

A partir de éstos y de las ec. (A - 1), (A - 2) y (A - 3) se deduce:

$$m = \frac{1.10 A'_{305} - A_{315}}{0.765} \quad (A - 4)$$

BIBLIOGRAFIA

1. - *Mission*, Chem. Ztg. (1908), 32, 633.
2. - *Brabson, J.A., Karchmer, J.H. y Katz, M.S.* Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. (1944), 16, 553.
3. - *Hill, U.T.*, Anal. Chem. (1947), 19, 318.
4. - *Barton, Ch.J.*, Anal. Chem. (1948), 20, 1068.
5. - *Kitson, R.E. y Mellon, M.G.*, Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. (1944), 16, 379.

6. - *Quinlan, K.P. y De Sesa, M.A.* Anal. Chem. (1955), 27, 1626.
7. - *Boltz, D.*, "Colorimetric Determination of Nonmetals". (1958) Interscience.
8. - *Michelsen, O.D.*, Anal. Chem. (1957), 29, 60.
9. - *Cotton, R.H.*, Anal. Chem., (1945), 17, 734.
10. - *Nalimov, V.V.*, "The Application of Mathematical Statistics to Chemical Analysis". (1963). Pergamon Press.
11. - *Snell, F.D. Y Snell, C.T.*, "Colorimetric Methods of Analysis" (1949). Van Nostrand.
12. - *Bense, T. y Dol, I.*, "Consideraciones Teórico Prácticas acerca de los límites de Detección en Espectrofotometría de Absorción". Jornadas Químicas "Cincuentenario de la Facultad de Química". Noviembre de 1979.