

Determinación espectrofotométrica y fluorimétrica en fase orgánica de microgramos de cinc en material vegetal

Por J. AZNAREZ, T. OROZ, J. C. VIDAL y F. PALACIOS.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, ZARAGOZA

Recibido el 21-XII-82

ABSTRACT

J. AZNAREZ, T. OROZ, J. C. VIDAL and F. PALACIOS (1982). EXTRACTION AND SPECTROPHOTOMETRIC AND FLUORIMETRIC DETERMINATION OF MICROGRAMS OF ZINC IN PLANTS'. *An. Aula Dei* 16 (1-2):150-158.

Two new spectrophotometric and fluorimetric methods for micrograms determination of zinc have been applied to plants analysis. After dissolution of the sample, zinc was extracted into 0.05 M trioctylamine in toluene solution from 1-3 M HCl aqueous solution.

The development of the colour or the fluorescence was carried out in the same organic phase of the extraction, without back-extraction into aqueous phase, by addition of oxine solution in N, N-dimethylformamide and t-butylamine in DMF solution.

In the spectrophotometric method the absorbance was measured at 403 nm. Beer's law was obeyed in the range from 1 up to 10 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ of zinc in the organic phase. The relative standard deviation for ten determinations of 50 $\mu\text{g.}$ of zinc was 0,8%

In the fluorimetric method a wavelength excitation radiation of 403 nm and a wavelength fluorescence emission of 450 nm were used. The relative intensity of fluorescence was linear with the concentration of zinc in the range from 0.01 up to 1 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ of zinc in the organic phase. The standard relative deviation in the fluorimetric determination for ten determinations of 0.5 $\mu\text{g.}$ of zinc was 2.2%. The mean recovery of 0.5 $\mu\text{g.}$ of zinc in spiked solutions was 98.5%

The results obtained for the determinations of zinc by both proposed methods in plants supplied by M. PINTA (Comité Inter-Instituts pour l'Analyse Foliaire) show good accuracy and precision.

INTRODUCCION

El interés en la determinación de elementos traza se ha incrementado en los últimos años en diferentes campos de investigación como biología, medicina, nutrición animal y contaminación ambiental. En medicina se aplica en diagnóstico de enfermedades, de alteraciones del metabolismo y con fines terapéuticos (PRASOD *et al*, 1976).

En cuanto al cinc se refiere, este elemento desempeña un importante papel como co-enzima en algunos procesos enzimáticos, como en la producción de queratina y fibras colágenas. Se han observado deficiencias en el contenido de cinc en la cirrosis hepática y en la etiología del cancer (BRATTER *et al*, 1980).

De lo expuesto se deduce el interés por la determinación de cinc en alimentos, bebidas, productos naturales y material biológico. No obstante, el contenido de cinc en estas muestras está comprendido entre ppm y ppb, lo que hace más difícil su determinación, si se tiene presente la falta de selectividad de los reactivos o métodos propuestos para su determinación. Para la determinación espectrofotométrica del cinc se han empleado la ditizona, la difenilcarbazona y más recientemente el PAR, PAN, TAR y TAN (ACKERMANN *et al*, 1979). Como reactivos fluorimétricos se han propuesto la oxina, y la zefiramina, la oxina-5-sulfónico, la benzoína y recientemente el 2-(4-metil-piridil)-5,6-fenil-benz-imidazol (SCHILT *et al*, 1980). En todos los casos existen serias interferencias debido a la presencia de elementos como hierro, cobalto, níquel, cadmio, cobre, berilio, antimonio, aluminio y magnesio, que es preciso eliminar por enmascaramiento o por otras técnicas.

En el presente trabajo se ha aplicado un método original (AZNAREZ *et al*, 1983) de determinación de cinc a su determinación en hojas de plantas. El método está basado en la separación y concentración del cinc mediante extracción con el reactivo adecuado y el desarrollo de color o fluorescencia con otro reactivo en la misma fase orgánica de extracción sin efectuar ningún proceso de re-extracción a fase acuosa.

El cinc se extrae fácilmente de soluciones clorhídricas mediante aminas de alto peso molecular (UNY *et al*, 1971), como la tri-oc tilamina (TOA) en disolventes no polares como benceno, tolueno o cloroformo. De soluciones 1 a 3 M en ácido clorhídrico y con solución 0,05 M de TOA en tolueno, con agitación de cinco minutos, se extraen microgramos de cinc con rendimientos próximos al 100% (SCHADE, 1980). Simultáneamente se extraen elementos que posteriormente se estudian cómo posibles interferencias en la determinación de cinc.

Como reactivo espectrofotométrico o fluorimétrico para el desarrollo del color o de la fluorescencia en fase orgánica de extracción se ha adoptado la oxina (8-hidroxiquinoleína). La adición de solución de oxina en N,N dimetilformamida (DMF) y de solución de t-butilamina en DMF al extracto de cinc-TOA, dá lugar a la formación de oxinato de cinc, cuya formación viene favorecida por la ruptura del par iónico $ZnCl_3 : TOAH$, por el incremento de la constante dieléctrica del disolvente por adición de DMF y por el carácter básico de la t-butilamina.

El espectro de absorción del oxinato de cinc así formado presenta un máximo de absorbancia a 403 nm, frente a la solución blanco de reactivo en las mismas condiciones exenta de cinc. La absorbancia a 403 nm permanece constante durante 45 minutos, después de 5 minutos de reacción a la temperatura ambiente. La correspondiente curva de calibrado demuestra que la absorbancia a 403 nm es lineal con la concentración en el intervalo de 1 a 10 $\mu g. ml^{-1}$ de cinc en la fase orgánica final (correspondientes a 10-100 μg de cinc en la fase acuosa inicial), con una absorptividad molar de $4,44 \times 10^3 l.mol^{-1}.cm^{-1}$. La desviación estandar relativa para diez determinaciones de 50 μg de cinc fué de 0,8%.

En el cuadro 1 figuran los límites de tolerancia en la determinación de 50 $\mu g.$ de cinc por el método espectrofotométrico propuesto. Como límite de tolerancia se ha considerado la mayor cantidad de interferencia presente que causa un error no mayor del 1% en la medida de la absorbancia a 403 nm.

CUADRO 1. — Límites de tolerancia en la determinación espectrofotométrica de 50 μg de cinc, en 10 ml de sol. orgánica final.

$\mu g.$ AÑADIDOS DEL ION INTERFERENTE	IONES TOLERADOS
10.000	F^- , PO_4^{-3} , NO_3^- , SO_4^{-2} , Cl^- , $BO_3H_2^-$, Fe^{+2} , NH_4^+ , iones alcalinos y alcalinoterreos.
2.500	Mo (VI), Mn (II).
1.000	Ni, Sn (II).
500	Cu (II), Co (II), U (VI), Zr (IV), Ti (IV), Pb (II), Al, Cr (III).
50	Bi, Cd, Fe (III).

El Bi, Cd y Fe (III) interfieren a concentraciones del mismo orden que el cinc a determinar. La interferencia del Fe (III) se elimina fácilmente por reducción a Fe (II), mediante adición de 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10% (M/V) en agua destilada, en el proceso de extracción. Las interferencias de Cu (II), Co (II) y Pb (II) a concentraciones superiores a los límites de tolerancia indicados en el cuadro 1, se eliminan mediante adición de 1 ml de solución de sulfuro sódico al 10% (M/V), antes de efectuar el proceso de extracción con el TOA de acidez 1 a 3 M en HCl.

En la determinación fluorimétrica de cinc, el espectro de excitación presenta un máximo de intensidad a 403 nm y el espectro de emisión un máximo de intensidad relativa de fluorescencia a 450 nm, permaneciendo constante durante 30 minutos después de un tiempo de reacción de cinco minutos a la temperatura ambiente. La intensidad relativa de fluorescencia ($f=450$ nm y $ex=403$ nm) es lineal con la concentración de cinc en el intervalo de 10 a 1.000 ng. ml⁻¹ de cinc en fase orgánica final, correspondientes a 0,1 a 1 µg de cinc en fase acuosa. La desviación estandar relativa de diez determinaciones de 0,5 µg de cinc, fué de 2,2%. El estudio de las interferencias al método fluorimétrico viene resumido en el cuadro 1. En este caso, el límite de tolerancia viene definido como la mayor cantidad de ión extraño que produce un error no mayor del 3% en el valor de la intensidad relativa de fluorescencia.

CUADRO 2. — Límites de tolerancia en la determinación fluorimétrica de 5 µg de cinc, en 10 ml de solución orgánica final.

<i>µg. AÑADIDOS DEL</i>	<i>IONES TOLERADOS</i>
<i>ION INTERFERENTE</i>	
5.000	F ⁻ , PO ₄ ⁻³ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ⁻² , BO ₃ H ₂ ⁻ , Fe (II), NH ₄ ⁺ , U (VI), iones alcalinos y alcalinotérreos.
2.500	Mn (II), Ni, Mo (VI).
250	Al, Pb (II), Cr (III), Zr (IV), Ti (IV)
50	Bi (III), Cu (II), Sn (II), Fe (III)
5	Cd.

Se observa que el Cd (II) interfiere a concentraciones del mismo orden que la del cinc a determinar. La interferencia del Cu (II) es menor que en la determinación espectrofotométrica debido posiblemente al carácter no fluorescente del oxinato de cobre (II). La interferencia del Fe (III) se elimina igualmente por reducción a Fe (II) mediante adición del 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10% (M/V) antes del proceso de extracción.

Como consecuencia de la sensibilidad de ambos métodos y del estudio de las interferencias, se ha considerado la posibilidad de la aplicación de los métodos propuestos a la determinación de cinc en material vegetal, objeto del presente trabajo.

MATERIAL Y METODOLOGIA

1. APARATOS.

Espectrofotómetro Pye-Unicam SP-8-100 con accesorio para la medida de fluorescencia molecular. Cubetas de cuarzo de 1 cm para fluorescencia molecular.

pHmetro Beckman Research con electrodos de vidrio y calomelanos.

Agitados mecánico Koterman.

Embudos de separación de 100 ml de capacidad.

2. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Solución patrón de cinc, conteniendo 1.000 ppm de cinc en HCl 1 M, obtenida por disolución de cinc (R.A., Merck) en ácido clorhídrico concenc. Merck, (R.A.).

Solución de oxina al 0,05% (M/V) en DMF.

Solución de oxina al 0,025% (M/V) en DMF.

Solución de t-butil-amina al 30% (V/V) en DMF.

Solución de ácido ascórbico al 10% (M/V) en agua destilada, recién preparada.

Solución de sulfato de quinina al 0,05% (M/V) en ácido sulfúrico 0,1 M.

3. PROCEDIMIENTO.

3.1. DISOLUCION DE LA MUESTRA

Se pesa exactamente la muestra vegetal (de 1 a 2 g, según el contenido de cinc) previamente pulverizada y desecada según normas. Se somete a calcinación en cápsula de porcelana, en un horno de mufla, manteniendo la temperatura a 200 °C y a 300 °C durante media hora y finalmente a 500 °C durante tres horas. Se deja enfriar y una vez a la temperatura ambiente se ataca el residuo con 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1 ml de ácido nítrico concentrado. Seguidamente se calienta en plancha caliente durante diez minutos. Se diluye finalmente a 50 ml en matríz aforado con agua destilada. La acidez final debe estar comprendida entre 1 y 3 M en HCl.

3.2. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION

A un volumen medido de la solución anterior de la muestra (conteniendo de 10 a 100 µg de cinc para la determinación espectrofotométrica y de 0,1 a 1 µg de cinc en la determinación fluorimétrica), se añade 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10% (M/V) recién preparada. A continuación se extrae con 10 ml de solución de TOA 0,05 M en tolueno, con agitación mecánica durante cinco minutos, en un embudo de separaciones de 100 ml de capacidad. Se dejan separar las fases.

3.3. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA

Se toman 3 ml del extracto, se añaden 3 ml de solución de oxina al 0,5% (M/V) en DMF y 3 ml de solución de t-butil-amina al 30% (V/V) en DMF, aforando finalmente a 10 ml con DMF en matríz aforado.

Se mide la absorbancia de la solución a 403 nm en el intervalo de 30 minutos, frente a un blanco de reactivo preparado de igual forma, pero exento de cinc. Simultáneamente se prepara una curva de calibrado con soluciones conocidas de cinc, preparadas por dilución de la solución patrón de cinc.

3.4. DETERMINACION FLUORIMETRICA

Se toman 3 ml del extracto (conteniendo menos de 10 µg totales de cinc), se añaden 3 ml de solución de oxina al 0,025% (M/V) en DMF y 3 ml de solución de t-butil-amina al 30% (V/V) en DMF. Se

mide la intensidad de fluorescencia a 450 nm empleando radiación de 403 nm como excitación. Se emplea solución de sulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1 M como solución de referencia.

De igual forma se procede con soluciones conocidas de cinc preparadas por dilución de la solución patrón de cinc, para obtener la recta de calibrado. La intensidad relativa de fluorescencia resulta lineal en el intervalo de 0,01 a 1 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de cinc en la solución orgánica final.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los métodos propuestos han sido aplicados a la determinación de cinc en muestras de material vegetal. Las muestras han sido suministradas amablemente por M. PINTA del Comité Inter-Institutos de Análisis Foliar (C.I.I.A.F.). El método espectrofotométrico ha sido aplicado a aquellas muestras de mayor contenido en cinc, con los resultados indicados en el cuadro 3, donde se exponen también los resultados correspondientes al citado Comité Inter-Institutos de Análisis Foliar por métodos espectrográficos y por absorción atómica. La desviación estandar relativa para diez determinaciones de cada muestra ha sido inferior al 1,5%, como puede observarse en el cuadro indicado.

CUADRO 3. — Valores de cinc determinados por el método espectrofotométrico (3) en cuatro especies vegetales.

MUESTRA VEGETAL	$\mu\text{g. g}^{-1}$ de cinc			DESV. ESTN.
	1	2	3	RELT. %
GOSSYPIUM HIR SUTUM	90	125	92,5	1,1
VITIS VINIFERA	90	74	85,0	1,3
MALUS COMMUNIS (COX)	100	77	78,2	1,0
CITRUS SINENSIS	90	68,5	70,3	1,4

(1) Resultados del C.I.I.A.F. por métodos espectrográficos.

(2) Resultados del C.I.I.A.F. por absorción atómica.

En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos por el método fluorimétrico propuesto y corresponden a la media de seis determinaciones de cada muestra. La desviación estandar relativa de seis determinaciones ha sido inferior en todos los casos al 3%.

Con fines comprobatorios se ha empleado también la técnica de adición patrón, obteniendo recuperaciones del 98,5% de 0,5 jug. de cinc añadidos a las muestras.

CUADRO 4. — Valores de cinc por el método fluorimétrico propuesto (3) y resultados del C.I.I.A.F. por métodos espectrográficos (1) y por absorción atómica (2).

MUESTRA VEGETAL	$\mu g. g^{-1}$ de cinc			DESV. ESTN
	(1)	(2)	(3)	RELT. %
EUCALIPTUS GLOBULUS	13	13	10,5	2,8
HEVEA	40	40	41,2	1,8
CODIA DISCOLOR	10	16	16,0	2,2
OLEA EUROPEA	20	16	18,1	2,5
PHOENIX DACTYLIBERA	35	23	23,5	2,5
MALUS COMMUNIS (GOLDEN)	30	30	33,7	2,5

Los resultados de las muestras analizadas se corresponden con los presentados por el Comité Inter-Institutos de Análisis Foliar por métodos espectrográficos y por absorción atómica, mostrando, sin embargo, una mayor precisión y reproducibilidad.

RESUMEN

Se han aplicado dos nuevos métodos originales, espectrofotométrico y fluorimétrico, a la determinación de microgramos de cinc en material vegetal.

Después de la disolución de la muestra, el cinc se extrae en solución 0,05 M de trioctilamina en tolueno, desde soluciones 1-3 M HCl en fase acuosa.

El desarrollo del color o de la fluorescencia se efectúa en la misma fase orgánica de la extracción sin efectuar re-extracción a fase acuosa,

mediante adición de solución de oxina en N,N-dimetilformamida (DMF) y de solución de t-butil-amina en DMF. La absorbancia se mide a 403 nm. La ley de Beer se cumple en el intervalo de 1 a 10 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de cinc en la fase orgánica final. La desviación estandar relativa para diez determinaciones de 50 μg de cinc fué de 0,8%.

En el método fluorimétrico, se ha empleado una radiación de excitación de 403 nm de longitud de onda y una emisión de fluorescencia de 450 nm. La intensidad relativa de fluorescencia de 450 nm. La intensidad relativa de fluorescencia era lineal con la concentración de cinc en el intervalo de 0,01 a 1 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ en la fase orgánica final. La desviación estandar relativa en la determinación fluorimétrica para diez determinaciones de 0,5 μg de cinc fué de 2,2%. El valor medio de la recuperación de 0,5 μg de cinc añadidos a las soluciones de las muestras fué del 98,5%.

Los resultados obtenidos en la determinación de cinc por ambos métodos propuestos en muestras de material vegetal suministradas amablemente por M. PINTA del Comité Inter-Institutos de Análisis Foliar, muestran buena precisión y exactitud.

REFERENCIAS

ACKERMANN, G. and KOTHE.

1979 Vergleichende untersuchung an reagenien zur spektral photometrischen bestimmung von zink. *Talanta*, 26 (8), 693-703.

AZNAREZ J., OROZ, T., VIDAL, J.C. and PALACIOS F.

1983 New spectrophotometric and fluorimetric methods for zinc determination. *Talanta*. En prensa.

BRATTER, P. and SCHRAMEL, P.

1980 Trace element analytical chemistry in medicine and biology. *Walter de Gruyter. New York*. 851 pp.

PINTA, M.

1976 Les etalons vegetaux pour L'Analyse foliaire. Resultats complementaires obtenus pour les elements: sodium, chlore, soufre, boreoligoelements. *Comité Inter-Instituts pour l'Analyse Foliaire. Comptes-Rendus. -Vol. II. Gent. 4^e Colloque International*.

PRASOD, A.S. and OBERLEAS, D.

1976 Trace elements in human health and disease. *Academic Press. New-York*.

SCHADE, W.

1980 Extraction of zinc from acid solutions with long-chain amines in organic solvents. *Chem. Tech (LEIPZIG)*, 32, (6), 305-306.

SCHILT, A. and HILLYSON, T.

1980 Investigation of selected ferriin-type compounds as fluorimetric reagents for zinc. *Talanta*, 27, 1021.

UNY, G., MATHIEN, N. TARDIF, J. P. et TRAN VAN DANH.

1971 Dosage du zinc, du fer et du plomb dans un cobalt de tres haute purete. *Anal. Chim. Act.* 53: 108.