



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO MONOGRAFICO PARA LA DETERMINACION
DE ALGUNOS ELEMENTOS INORGANICOS
POR FLUOROMETRIA

M O N O G R A F I A

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A N :

JORGE ROJAS ALVAREZ

RENE SLACK WONG

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

711.1.303



UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY

LIBRARY OF CHEMISTRY

LIBRARY OF CHEMISTRY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY



M.D. 1954
LIBRARY OF CHEMISTRY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY

Jurado asignado originalmente según el tema

PRESIDENTE	Profr. Carlos Romo Medrano
VOCAL	Profr. Jorge A. Campos Robles
SECRETARIO	Profr. Pedro Villanueva González
1er. SUPLENTE	Profr. Benjamín Ortiz Mendoza
2do. SUPLENTE	Profr. Roberto Contreras Reyes

Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

Jorge Rojas Alvarez.

René Slack Wong.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Profr. Carlos Romo Medrano.

I N D I C E

I.- INTRODUCCION

II.- GENERALIDADES

III.- METODOS

- | | |
|--------------|--|
| 1.- Aluminio | a) Con Saliciliden-Orto-Amino
fenol. |
| | b) Con Purpurin-Sulfonato de
Sodio. |
| 2.- Berilio | a) Con Morina. |
| 3.- Calcio | a) Con 1,5-Bis (dicarboxime--
til-aminometil)-2,6-dihi--
droxinaftaleno. |
| 4.- Cadmio | a) Con Calceina. |
| 5.- Galio | a) Con Saliciliden-Orto-Amino
fenol. |
| 6.- Magnesio | a) 0,0'-Dihidroxi-Azo-Benceno.
b) Con compuestos 0,0'-Dihi--
droxi-Azo. |
| 7.- Indio | a) Salicilideno-0-Aminofenol. |
| 8.- Uranio | |

IV.- TABLAS, GRAFICAS

V.- CONCLUSIONES

VI.- BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

Las técnicas fluorométricas por su grado de exactitud y sensibilidad han sido utilizadas con agrado por los químicos analistas para la resolución de problemas.

Se ha buscado dar un enfoque aplicativo a este estudio, para la solución de problemas analíticos que puedan ser resueltos en el laboratorio, tomando en cuenta las limitaciones que ofrece la falta de espacio, de los componentes, funcionamiento, manejo y cuidado de los instrumentos que pueden encontrarse en un laboratorio de análisis químico, o con los cuales puede enfrentarse una persona dedicada al análisis químico instrumental.

Los análisis presentados fueron seleccionados por su facilidad de aplicación a problemas comunes con los que más frecuentemente se enfrentan los analistas.

GENERALIDADES

La Fluorometría es la determinación de la característica y cantidad de luminiscencia producida por una sustancia, cuando es examinada bajo condiciones cuidadosamente controladas.

Todos los cuerpos al someterse a la acción de la radiación electromagnética absorben energía en diferentes partes del espectro. El exceso de energía que adquieren los cuerpos los mantiene en un estado excitado poco estable, por lo que tienden a regresar a su estado normal o basal; esto lo logran mediante la emisión de parte de la energía absorbida, lo cual ocurre a lo largo del espectro.

La luminiscencia puede ser de dos tipos: fluorescencia o fosforescencia. En el primer fenómeno, una molécula absorbe energía radiante y los electrones del estado basal son elevados a un estado excitado, algunos de estos electrones deben perder energía de una manera no fluorescente para poder alcanzar el nivel vibracional más bajo del estado excitado, antes de regresar a su estado basal, esta energía emitida al retornar al estado basal es menor que la absorbida. Como la energía (E) está relacionada a la frecuencia vibracional (γ) por la ecuación:

$$\Delta E = -h\gamma$$

donde h es la constante de Planck, la frecuencia está relacionada con la longitud de onda (λ) por la expresión:

$$\frac{c}{\lambda}$$

donde c es la velocidad de la luz, podemos decir - que:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

es decir que E varía inversamente con λ .

Por lo anterior, podemos concluir que la - longitud de la radiación emitida debe ser mayor - que la de la energía de excitación. El proceso de - fluorescencia es instantáneo y sucede en 10^{-8} se- - gundos.

Cada compuesto que fluoresce tiene un espec- tro característico, el cual es llamado espectro de - emisión o fluorescencia. La proporción que existe - entre la luz total emitida y la luz total absorbi- da, se llama eficiencia cuántica, la cual es cons- tante y característica para cada tipo de substan- cia fluorescente.

El espectro de emisión y la eficiencia cuán- tica son independientes de la longitud de onda de - excitación. Para que un compuesto fluaresca, parte - de la luz de excitación debe ser absorbida. El com- puesto puede absorber radiación a diferentes longi- tudes de onda y por lo tanto puede fluorescer a va- rias longitudes de excitación, sin importar la lon- gitud de onda que se use, el espectro de emisión - de una sustancia, siempre tendrá la misma forma y - localización para ella. Sin embargo, mientras más - cerca esté el espectro de excitación (longitudes -

de onda de luz excitante) del espectro de absorción, mayor será la porción de luz absorbida y proporcionalmente emitida, y por ende mayor será la intensidad de la fluorescencia.

Para que una molécula presente fluorescencia debe poseer una estructura que contenga electrones de tipo π . Los compuestos que tienen un sistema conjugado de dobles ligaduras, los compuestos aromáticos, etc. tienden a fluorescer, sobre todo si contienen átomos que contribuyen a la delocalización de los electrones. Los sustituyentes que "jalan" electrones del anillo aromático, reducen o eliminan la fluorescencia, puesto que reducen la libertad de estos electrones.

Los compuestos que no son fluorescentes por si mismos o que son debilmente fluorescentes, pueden ser convertidos químicamente a derivados altamente fluorescentes. Por medio de reacciones de condensación, substitución, deshidratación u oxidación, o un simple cambio en el pH logran este objetivo.

La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de la sustancia fluorescente en soluciones diluidas. De la Ley de Beer tenemos:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-acd}$$

Donde

I = Intensidad de la luz emitida.

I_0 = Intensidad de la luz excitante.

a = Absorbancia.

c = Concentración.

d = Espesor de la celda.

Entonces:

$$I - \frac{I}{I_0} = 1 - 10^{-acd}$$

$$I_0 - I = I_0 (1 - 10^{-acd})$$

Donde $I_0 - I$ = cantidad o fracción de luz absorbida.

La eficiencia cuántica Q , es la proporción de luz total emitida (fluorescencia ϕF) a luz total absorbida.

Por lo tanto:

$$F = Q (I_0 - I)$$

$$\phi F = Q I_0 (1 - 10^{-acd})$$

$$\phi F = Q I_0 (2.3 \text{ acd} - \frac{(-2.3 \text{ acd})^2}{2} -$$

$$- \frac{(-2.3 \text{ acd})^3}{6} - \dots - \frac{(-2.3 \text{ acd})^n}{n!}$$

Y si c es pequeña, a_{cd} también lo es

$$F = Q I_0 2.3 a_{cd}$$

Combinando todas las constantes en un sistema particular tenemos:

$$F = k c$$

Para las ecuaciones anteriores, c debe ser lo suficientemente pequeña para que sea absorbida la radiación incidente, en no más de aproximadamente el 5%. Esto significa que a concentraciones bajas, F es lineal con c , y a concentraciones elevadas se obtiene una curva parecida a la de una desviación negativa de la Ley de Beer.

En los métodos de absorción la sensibilidad de la medición depende de la absorción parcial de energía radiante por una sustancia en solución; - lo cual a su vez es función de la sustancia, de - su concentración y de la longitud de la celda.

En la Fluorometría la sensibilidad de la medición también depende de la intensidad de la radiación de excitación y de los medios de detección y medición de la fluorescencia. Por lo tanto se - puede aumentar la sensibilidad, incrementando la - intensidad de la radiación de excitación y, o la - sensibilidad del aparato de detección.

Los procedimientos fluorométricos pueden - por tanto ser más sensibles que los espectrofotométricos de absorción por un orden de magnitud de -

10^3 a 10^4 .

Explicando lo anterior en terminos más prácticos, tenemos que, en los métodos de absorción el detector está captando pequeñas diferencias de un rayo de luz que emana directamente de la fuente luminosa. En la Fluorescencia el detector capta diferencias grandes en la radiación generada en la muestra contra un fondo negro.

Existen además de los factores instrumentales, otros que afectan la intensidad de la fluorescencia, tales como:

a).- La concentración del material fluorescente puede absorber tanta radiación excitante, que se produzca en la solución un gradiente en la intensidad de la energía excitante. Por lo tanto la intensidad se reduce en la solución, y consecuentemente lo mismo puede suceder con la fluorescencia.

b).- Las variaciones en la concentración de la substancia fluorescente pueden afectar las propiedades fluorescentes de las moléculas, por disociación, asociación y solvatación.

c).- La Fluorescencia es sensible a variables tales como la naturaleza del disolvente - - - (usualmente se desplaza a longitudes de onda menores, a medida que la constante dieléctrica se incrementa), pH, temperatura, impurezas y la presencia de iones.

d).- Los materiales extraños pueden interfe

rir de varias maneras; fluoresciendo, absorbiendo la energía de excitación o la energía emitida como fluorescencia, etc.

e).- Los efectos intramoleculares, como -- transiciones electrónicas en las moléculas absor-- bentes, y efectos intermoleculares que involucran-- colisiones bimoleculares, o formación de compues-- tos, pueden provocar que la energía de excitación-- se disipe en forma de calor. La disminución de la-- intensidad de emisión teórica es llamada "Quen- - ching".

La luz puede ser dispersada de muchas mane-- ras y si esto no se reconoce y es remediado, puede interferir con los métodos fluorescentes. La dis-- persión Rayleigh es la reemisión de radiación de - la misma longitud de onda que la de la luz inciden-- te y se produce cuando los electrones del soluto o disolvente caen al estado basal desde un nivel vi-- bracional alto resultante de la absorción de la ra-- diación.

Componentes Básicos de un fluorómetro.

- 1.- Fuente de radiación.
- 2.- Monocromador primario, que selecciona - la longitud de onda de excitación, lo que se puede hacer usando filtros, rejillas de difracción o - - prismas.
- 3.- Porta muestras (sin fluorescencia).
- 4.- Monocromador secundario, que selecciona

la longitud de onda de emisión.

5.- Fotodetector, Que convierte la luz en energía eléctrica.

6.- Medidor, que mide la energía eléctrica.

1.- Fuentes de radiación.- Estas fuentes deben ser ricas en luz ultravioleta y de una intensidad alta. Las fuentes más comunes son lámparas de arco de mercurio y xenón, aunque también se pueden usar las de filamentos de tungsteno o zinc.

Una lámpara de arco de xenón emite un espectro continuo de 200 nm. y no emite un espectro lineal; la lámpara de arco de mercurio es la más usada y emite un espectro lineal de 200 a 1000 nm., cuyas líneas principales son de 365, 405, 436 y 546 nm. Si un compuesto fluorescente no es suficientemente excitado con una de estas longitudes de onda, se puede usar la línea más cercana al pico de absorbancia del compuesto.

2.- Monocromadores.- Los fluorómetros de filtro usan filtros de vidrio o filtros Wratten. El filtro primario se coloca frente a la fuente de radiación, y se usa para seleccionar la línea de mercurio más próxima al pico de absorbancia del compuesto a analizar. El filtro secundario se coloca frente al fotodetector, y se usa para seleccionar la longitud de onda de la luz fluorescente que debe medirse.

Los filtros primario y secundario, no deben tener una longitud de onda común, es decir, deben-

ser mutuamente excluyentes, tal que si se colocan juntos frente a una fuente de luz, no deben permitir el paso de la misma. Si ambos filtros permiten el paso de una longitud de onda igual, esta luz puede alcanzar al fotodetector al ser dispersada por la solución.

En los espectrofluorómetros las longitudes de onda de excitación y emisión, pueden seleccionarse con prismas o rejillas de difracción. El monocromador se coloca frente a la fuente de luz en el caso del primario y frente al fotodetector en el caso del secundario.

3.- Portamuestras.- A longitudes de onda de 315 a 320 nm., se pueden utilizar portamuestras de vidrio, pero a longitudes de onda menores se deben usar de cuarzo. También pueden usarse los tubos transparentes de poliestireno en las partes visibles y ultravioleta del espectro, siendo factor limitante el efecto del disolvente sobre el poliestireno.

4.- Detectores.- Se usan tubos fotomultiplicadores en los cuales el potencial eléctrico varía directamente con la cantidad de fluorescencia y por lo tanto con la concentración del compuesto fluorescente. Este potencial es amplificado y leído en un medidor.

Manejo y Cuidados.-

1.- Los disolventes usados no deben ser fluorescentes y no deben absorber energía en las regiones espectrales usadas en un experimento dado.

2.- Los portamuestra de pyrex o de cuarzo, - deben ser los adecuados para este tipo de determinaciones puesto que los de vidrio presentan una ligera fluorescencia. Debe evitarse que se rayen, - puesto que se aumentaría la dispersión. Las ventanas no deben ser tocadas con los dedos, ya que se pueden contaminar con materiales fluorescentes o - absorbentes de radiación. La limpieza de los porta objetos debe hacerse con detergentes no fluorescentes o con ácido nítrico caliente.

3.- Se deben revisar los filtros puesto que algunos presentan fluorescencia.

4.- Se han encontrado contaminantes fluorescentes en el agua y en los reactivos que han estado en contacto con tapones de hule, polietileno y - baquelita.

5.- El pH debe ser cuidadosamente controlado debido al gran efecto que ejerce sobre la fluoresencia, en el caso de muchas sustancias.

6.- La temperatura debe controlarse por dos razones:

a).- La fluorescencia decese al aumentar - la temperatura.

b).- Los cambios de temperatura durante las mediciones provocan dispersión de la luz, debido a la estratificación, variación del índice de refracción y turbulencia.

7.- Las soluciones a analizar deben estar -

libres de burbujas de gas, sólidos suspendidos y - turbiedad. Para evitar la formación de burbujas - puede ser necesario hervir y enfriar la solución.

Tanto las partículas como las burbujas provocan que las lecturas de fluorescencia sean menores que los valores reales, ya que dispersan la - luz emitida.

Los sólidos en suspensión pueden eliminarse por centrifugación o filtración; el papel usado pa - ra este último proceso debe estar libre de toda - sustancia extraña que pueda interferir en la fluo - rescencia.

8.- La energía radiante excitante, algunas - veces varía el color o la intensidad de la fluores - cencia, y en estos casos debe hacerse la lectura - rápidamente, puesto que el efecto descrito se efectu - a lentamente.

9.- Cuando se trabaja con cantidades del or - den de microgramos, se tienen pérdidas por adsor-- ción del material del vidrio, fotodescomposición - de los derivados fluorescentes al prepararse y du - rante las lecturas y, o por oxidación con disolventes.

10.- La presencia de sustancias que inter - fieren provocando quenching, o alterando el color - de la fluorescencia, pueden ser detectadas corriendo un estandar interno. Si se obtienen lecturas ba - jas para éste, el cual ha sido preparado en una - porción de la muestra, sabemos que existe material interferente. Comparando la muestra con el estan--

dar interno, se puede corregir el quenching.

Manejo:

La manera de manejar los fluorómetros varía de aparato a aparato, y se describe detalladamente en los folletos que acompañan al equipo, pero los pasos principales son: el instrumento se lleva a cero con un blanco de reactivo no fluorescente, y después un punto conveniente se ajusta a un estándar de referencia, por ejemplo, un punto de referencia de 50 en el medidor puede ser escogido para un standard equivalente a 50g/100 ml. Para ajustar el fluorómetro es conveniente usar una solución fluorescente estable como la de sulfato de quinina, fluoresceína de sodio o un vidrio fluorescente.

Ventajas y desventajas de la fluorometría.

La principal ventaja de la fluorometría es la mayor sensibilidad que tiene con respecto a los otros métodos de absorción. En la fluorometría se mide directamente la cantidad de luz absorbida por diferencia. A medida que la transmitancia de una solución se acerca al 100% se incrementa el error.

Una segunda ventaja de este método es la especificidad, puesto que una substancia que absorbe luz pero no fluoresce, no interfiere con la medición efectuada.

En la fluorometría se usan dos longitudes de onda (la de excitación y la de emisión) y aunque dos substancias absorben a la misma longitud de onda, no necesariamente emiten a longitudes - -

idénticas.

La principal desventaja de este método es - que es muy sensible al medio ambiente.

Un incremento en la temperatura provoca un decremento en fluorescencia; un compuesto puede - fluorescer, algunas veces en una pequeña variación de pH, o puede ser que lo haga en una variación amplia, pero manteniendo su máxima fluorescencia en una área pequeña.

El disolvente también puede afectar la in- tensidad de la fluorescencia. Muchos compuestos - fluorescentes sufren fotodescomposición al ser ex- puestos a la luz ultravioleta, lo cual obliga a hacer la medición rápidamente o a disminuir la ener- gía de excitación.

Finalmente, la fluorescencia de una substan- cia puede verse disminuida por interacción con - - otra sustancia presente en la solución.

Determinación de Aluminio con Saliciliden-Orto-Aminofenol.

Reactivos:

a).- Saliciliden-Orto-Aminofenol (SAP). Este reactivo fue preparado a partir de Salisilaldehído y Orto-aminofenol en Etanol al 95% (1).

b).- Solución estandar de Aluminio.- La solución de Aluminio se preparó disolviendo 0.2 g. de Aluminio metálico en 10 ml. de HCl diluído 1:1 y completando con agua a un litro. La solución resultante de Aluminio tiene una concentración de $8.07 \pm 0.03 \times 10^{-5}$ M. (2)

Aparatos:

Se usa un espectrofotómetro Cary Modelo 14-con registrador. Todas las mediciones de pH fueron hechas con un medidor de pH Beckman Zero-Matic, usando electrodos de Cloruro de Potasio como referencia y el de vidrio como medición.

Procedimiento:

Las condiciones necesarias para determinar-espectrofotométricamente la composición del quelato de Aluminio con Saliciliden-Orto-Aminofenol, fueron determinadas experimentalmente, y bajo estas condiciones se forma un quelato conteniendo una relación 2:1 de SAP a Aluminio formado. (Gráficas 2, 3 y Tabla 1).

Determinación de Aluminio con Purpurinsulfonato de Sodio. (3)

Reactivos:

a) Solución de Aluminio Al(III).- Se preparó por disolución de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada. La concentración exacta en Al (III) se determinó gravimétricamente precipitándolo en forma de 8-Hidroxiquinoleato, secándolo a continuación a 110°C hasta peso constante. El promedio de tres determinaciones dió como valor para tal concentración 4,995 g/l en Al (III).

b) Solución Reguladora.- Es una mezcla de Acido Acético y Acetato de Sodio a un pH aproximado de 5.3.

c) Solución de Purpurinsulfonato de Sodio.- Se preparó una solución estándar de esta sal con una concentración de $1 \times 10^{-3} \text{M}$, utilizando agua desionizada. A partir de esta solución se prepararon las correspondientes soluciones de trabajo.

Aparatos:

a) Termostato.

b) Espectrofluorómetro Beckman modelo DU.-- Equipado con lámpara de Xenón como fuente de radiación, fototubo microfotométrico como unidad de registro, registrador y cubetas de cuarzo fundido en 1 cm.

Espectros de excitación y emisión del complejo Pur

purinsulfonato-(Al-III).- Los espectros se establecieron tomando 3 ml. de solución de Aluminio 1.85×10^{-4} M., 3 ml. de solución de reactivo de igual molaridad y se diluyó con agua desionizada hasta un volumen final de 50 ml. Se operó en esta forma, con 0.3 p.p.m. de Al(III) y la cantidad de reactivo necesaria para que la relación molar fuera 1:1. El pH de la mezcla es de 5.18. Se deja estabilizar durante una hora y se hace la lectura.

Influencia de la acidez sobre la intensidad de - - fluorescencia.

Se observó que la fluorescencia aparece en una cierta zona de pH, obteniéndose un máximo de - emisión en 5.2. Se efectúan las lecturas a 540 nm- la de excitación y a 595 la de emisión. En cada ca- so se comprueba la ausencia de fluorescencia en el blanco.

Influencia de la concentración de reactivo.- Se - preparó una serie de 16 matraces, conteniendo una- cantidad de Al(III) constante en todos ellos e - - igual a la contenida en 2.5 ml de solución 1.85×10^{-4} M, cantidades crecientes de reactivo desde 0.5 a 22 ml. de su solución 1.85×10^{-4} M, 3 ml.- de solución reguladora de pH 5.4 y agua desioniza- da hasta un volumen final de 50 ml. Los datos obte- nidos se presentan en la gráfica 5.

Influencia de la concentración de Al (III).- Para- estudiar tal influencia, se prepararon 15 matraces conteniendo un volumen total de 50 ml, una canti- - - dad de reactivo constante e igual a 5 ml de solu- - - ción 1.85×10^{-4} M, cantidades de Al (III) crecien-

tes de 0.3 a 10 ml. de solución de igual molaridad que el reactivo, 3 ml. de solución reguladora de pH 5.4 y agua desionizada hasta el aforo. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 6.

Influencia de la Temperatura.- Es conocido en general que, la temperatura afecta notablemente a la intensidad de fluorescencia, por ello preparamos 2 soluciones de complejo; la primera, que llamaremos A, contiene 3 ml. de solución de Al (III) $1.85 \times 10^{-4}M$, 3 ml. de reactivo de igual concentración, 3 ml. de solución reguladora de pH 5.4 y agua desionizada hasta un volumen total de 50 ml. La segunda solución, B contenía en igual volumen que la anterior, 2 ml. de la solución de Al (III) $1.85 \times 10^{-4}M$, 2 ml. de reactivo de igual concentración, 3 ml. de solución reguladora y agua desionizada hasta el aforo. Después de transcurridos 60 minutos, se midió la fluorescencia de las soluciones a diferentes temperaturas, a una longitud de onda de emisión de 595 nm; excitando a 540 nm, frente a un blanco compuesto por reactivo, solución reguladora y agua en cantidad idéntica a la contenida en las soluciones del complejo. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 7.

Curva estandar.- Se preparan soluciones conteniendo en un volumen final de 50 ml., cantidades variables de Al (III) de 20 a 100 p.p.b. (1 p.p.m. = 1000 p.p.b.), 5 ml. de la solución de reactivo $1.85 \times 10^{-4}M$, 3 ml. de solución reguladora de pH 5.4 y agua desionizada hasta el aforo. Las medidas fluorométricas se realizaron a los 60 minutos de preparadas las soluciones cerciorándose de que la temperatura está dentro del intervalo anteriormen-

te citado, excitado con radiación de 540 nm y midiendo la emisión a 595 nm. Como blanco se preparó una solución que contenía la misma cantidad de reactivo y solución reguladora que la soluciones de complejo. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 8.

Método:

En un matraz aforado de 50 ml. se coloca el volumen de la solución de Al(III), necesario para que su concentración en Al(III) esté comprendida entre 20 y 100 p.p.b. Se le agregan 5 ml. de la solución acuosa de reactivo $1.85 \times 10^{-4}M$, 3 ml. de solución reguladora de pH 5.4 y se afora con agua desionizada. Una vez transcurridos 60 minutos de preparadas las soluciones, se medirá la fluorescencia de las mismas a una longitud de onda de 595 nm., siendo la longitud de excitación 540 nm. frente a un blanco compuesto por reactivo, solución reguladora y agua desionizada, en igual cantidad que en las soluciones del complejo. Se cuidará asimismo que las medidas se efectuen estando las muestras a una temperatura comprendida entre 22 y 36°C. Los parámetros del aparato deberán ser los mismos en las medidas conducentes al trazado de la recta patrón y en la del problema.

Determinación de Berilio con Morina.

Reactivos:

Todas las soluciones se hacen con agua y reactivos Q.P. (4)

a) Solución standard de Berilio.- Se disuelven 0.1964 g. de Sulfato de Berilio tetrahidratado, en 10 ml. de ácido Perclórico al 72% y se afora a 500 ml. La solución es estable indefinidamente. 1-ml. de la solución de trabajo contiene 0.1000 μ de Berilio. Puede trabajarse con una alicuota de 1 a 5 ml.

b) Solución de Morina al 0.0078%.- Se disuelven 7.8 mg. de Morina pura en 25 ml. de alcohol etílico al 95%. Se agregan 25 ml. de solución de Perclorato de Sodio 8 M. libre de Fierro y dos gotas de solución disódica de EDTA. al 10%, en un matraz de 100 ml. y se diluye con agua hasta el aforo.

c) Solución de Estanito alcalino.- Se disuelven 2.40 g. de NaOH en 10 ml. de agua y se enfría completamente en agua corriente. Por otro se agregan 2 ml. de agua a 1.5 g. de Cloruro de Estanito (II) dihidratado. Cuando los cristales están disueltos se agregan 25 ml. de agua fría y a la suspensión lechosa se le agrega la solución de NaOH con agitación constante. Se transfiere a un matraz de 50 ml. y se diluye hasta la marca. Esta suspensión es inestable y deberá prepararse inmediatamente antes de usarse.

d) Solución buffer de piperidina.- Se pesan 10 g. de Sulfato de Hidrazina, $N_2H_4H_2SO_4$ y 5 g. de EDTA en un vaso de precipitados de 250 ml. Se agregan 30 ml. de agua y 50 ml. de piperidina bidestilada y se agita hasta que la solución se aclare. - (5) Se diluye a 100 ó 500 ml. dependiendo de si se van a usar volúmenes de 10 ó 25 ml. en las mediciones fluorométricas.

e) Solución 8.2 M de Perclorato de Sodio.-- Se agregan 300 ml. de agua a 500 g. de Perclorato de Sodio anhidro, para obtener 500 ml. de solución. Se agregan de 2 a 3 gotas de NaOH 8 M. y se filtra al través de fibra de vidrio. Para limpiar el filtrado se agregan 10 mg. de Sulfato de Hidrazina. - Si hay olor a cloro se agrega Sulfato de Hidrazina en porciones de 10 ml. hasta que el olor desaparezca. Se agregan 5 gotas de Sulfato de Quinina al 0.01% y Acido Perclórico al 72% hasta que se produzca una fluorescencia azul claro, cuando la solución se examina bajo una luz ultravioleta. luego se agrega una gota de exceso. Si la solución no permanece fluorescente se deduce la presencia de hipoclorito o clorato. Alternativamente la solución puede prepararse neutralizando 165 gr. de NaOH con Acido Perclórico y después tratarla como se describe anteriormente.

f) Solución Lavadora.- Se agrega 1 ml. de Acido Sulfúrico concentrado y 2 ml. de solución de EDTA disódico al 10% por 100 ml. de agua. Se agregan dos gotas de rojo de clorofenol al 0.1% y suficiente Hidróxido de Amonio para cambiar el color de amarillo a rojo.

g) EDTA-Trietanolamina.- Se disuelven 5 g. de EDTA disódico, dihidratado y 3 ml. de trietanolamina incolora en 95 ml. de agua.

h) Sulfato de Quinina al 0.01%. - Se disuelven 50 mg. de Sulfato de Quinina en 500 ml. de agua conteniendo 10 ml. de Acido Perclórico al 72% e Hidróxido de Sodio 8.2 M. Se disuelven 165 g. de NaOH en agua, se enfría y diluye a 500 ml. Se filtra al través de fibra de vidrio y se guarda en una botella de polietileno.

Método:

A la muestra de Berilio se agrega exactamente 3.00 ml. de NaOH 8.2 M. y tres gotas de Sulfato de Quinina al 0.01%. Se neutraliza la solución agregando gota a gota Acido Perclórico al 72% hasta que aparezca una fluorescencia azul brillante, cuando se examina bajo luz ultravioleta. El punto final podrá alcanzarse rápidamente agregando ácido mientras se agita la solución continuamente sobre la lámpara ultravioleta, observando el efecto producido por cada gota. Se agrega una gota de exceso de ácido perclórico y se agita la solución cuidadosamente alrededor de los lados del vaso para redissolver todo el Hidróxido de Berilio. La solución debe estar definitivamente ácida antes de transferirla o se perderán cantidades serias de Berilio. Transfiera la solución cuantitativamente a un matraz volumétrico, teniendo cuidado que el volumen total no exceda los 17 ml. Esta técnica permite que el contenido de sales de la neutralización de las cantidades variables de ácido fuerte puedan mantenerse constantes y permitir una cantidad máxima de

agua para que se transfiera al matraz volumétrico (cuantitativamente). Se lleva la solución standard y los testigos al través del mismo procedimiento, usando los mismos reactivos para una precisión máxima. Se trata una alicuota de 5 ml. de 0.1 por ml. standard de la solución Be y 5 ml. de agua para el testigo, como una muestra regular. Después de neutralizar se lava el cuello del matraz con unas pocas gotas de agua para asegurarse de que no hay ácido o alcali fuerte sin neutralizar. Cuando las muestras han sido preparadas para el desarrollo de la fluorescencia, se trata una muestra a la vez sin tardarse en la adición del alcali al través de la adición de Morina. Se agregan 0.5 ml. de solución de Trietanolamina-EDTA y se ajusta la acidez adicionando solución 1N, de NaOH, hasta que la fluorescencia desaparezca, se agregan dos gotas de exceso, se adicionan 0.5 ml. de estanito alcalino y se enjuagan los lados del matraz con unas gotas de agua. Se mezcla la solución, se agregan 5 ml. de buffer de piperidina diluida lentamente a la solución, y se vuelve a mezclar rápidamente. Es necesario mezclar en cada paso, para prevenir una ligera precipitación de hidróxido estanoso cuando la solución de buffer y estanito reaccionan. Cuidadosamente se diluye la solución exactamente hasta la marca, de preferencia usando una piseta de punta fina. Se tapa el matraz con un tapón de neopreno y se mezcla la solución. Se introduce una alicuota de un mililitro de solución de Morina bajo la superficie de la solución, el contenido de sales hace que caiga hasta abajo previniendo el contacto con el aire. Se vuelve a tapar y se mezcla toda la solución varias veces, después se agita dándole vueltas, se coloca el matraz en un baño a temperatura-

constante, por lo menos 5 minutos para que se llegue a la temperatura exacta antes de la medición de la fluorescencia. Se usa una pipeta de un mililitro con la punta en forma de capilar, deberá limpiarse la punta con un papel absorbente para prevenir una contaminación.

Se podrá obtener un aumento de sensibilidad de 2.5 usando volúmenes de 10 ml. aunque se deberá tener más cuidado y atención en las determinaciones, y mantenerse en los volúmenes especificados. Si los extractos originales se colocan en un vaso de 50 ml. y éste se lava frecuentemente agregando gotas de agua alrededor del borde, se puede hacer una transferencia cuantitativa de la solución a un matraz de 10 ml. (volumétrico) y un volumen total menor a 7 ml.

Se prepara la solución de Morina disolviendo 3.3 mg. de Morina en 2.5 ml. de alcohol etílico al 95% y se completa según se describe. Se toman 2 ml. de solución de Be de 0.1 γ /ml. para el estándar y se usa 1 ml. NaOH 8.2 M, una gota de solución de Quinina al 0.01% y 1 ml. de solución buffer fuerte, permanenciando las demás indicaciones igual. Se corren los testigos y los estándares bajo las mismas condiciones.

La gráfica No. 9 muestra que la fluorescencia es una función lineal de la concentración del Berilio hasta 1 γ por 26 ml. y es como 13% menor a 2 γ . Es necesaria una curva de calibración. De hecho una determinación de un factor de calibración, incluyendo un estándar de Be de 0.5 y un testigo con cada juego de muestras es mas exacto.

La intensidad de la fluorescencia de 0.5 de Be se incrementa con el aumento de la concentración de Morina hasta un máximo de $2.5 \times 10^{-4} \%$. Si se desea una precisión alta, un rango amplio, y las determinaciones cuantitativas más grandes de Be, o si el instrumento que se está usando tiene una sensibilidad muy baja, la concentración de Morina debiera ser la máxima posible. (6)

Efecto de la alcalinidad:

Las condiciones fueron las mismas para el procedimiento recomendado, excepto que se omitió el buffer y se redujo el NaOH en la solución de estanito a 2.0 g. La absorción del dióxido de carbono del aire o la presencia de pequeñas cantidades de sales de amonio o metales que puedan consumir iones hidroxilo, disminuirán la apreciación máxima que se pueda obtener.

La eficiencia del sistema buffer es inmediatamente puesta de manifiesto (pH = 11.5) al aumentar la precisión y realibilidad del procedimiento.

Las soluciones de Be definitivamente tendrán que ser ácidas antes de pasarlas a otro recipiente. Todos los aparatos que han tenido contacto con soluciones alcalinas de Be, tales como embudos de separación usados en la extracción, matraces o celdas de absorción y tapones de hule usados en la preparación y medida de la fluorescencia, deberán ser limpiados con HCl antes de volverse a usar. Cualquier precipitado en la solución alcalina puede causar una pérdida total del Be, volviéndolo Hidróxido de Berilio, que como dijimos antes es muy-

viscoso e insoluble. Trazas de precipitados insolubles, incluyendo silica-gel prevendrán la formación de complejos de Morina en muchos casos.

Límite de detección y precisión.- El límite de detección se define como un nivel de confianza de 95%, como la cantidad de Be que es igual al doble de la desviación standard a su determinación.

Extracción de Berilio.- A la solución que contiene Berilio, se le agregan 10 ml. de solución de EDTA-disódico al 10%, 2 gotas de rojo de fenol al 0.1% y se neutraliza parcialmente con hidróxido de amonio, se agregan 10 gotas de acetyl acetona pura de un gotero, y la solución se agita vigorosamente por unos segundos para disolver el reactivo. Después se agrega hidróxido de amonio concentrado gota a gota hasta que el color del indicador cambia de rojo a la forma de rojo alcalino. Si se produce turbiedad la solución deberá volverse a acidificar, se deberá agregar más EDTA y se repetirá la adición de hidróxido de amonio. Después se extrae la solución con dos porciones de 10 ml. de cloroformo agitando vigorosamente por 2 minutos cada vez. Después de sacar la primera extracción, la segunda porción se saca \pm 1 ml. del cloroformo presente para minimizar pérdidas del extracto principal en el tubo del embudo. Se agregan 3 ó 4 gotas de acetyl acetona y se vuelve a agitar por una segunda vez.

Los extractos se colocan en un embudo de separación limpio y se agitan vigorosamente por un minuto con un volumen igual de solución lavadora.- El extracto de cloroformo se coloca en un vaso de 100 ml. que contiene 3 ml. de HClO_4 y 3 ml. de - -

HNO_3 . A la solución lavadora se le hace una extracción³ con 10 ml. de cloroformo y 2 gotas de acetilacetona y el extracto se agregan al extracto principal. El vaso se cubre con un vidrio de reloj y se evapora el cloroformo cuidadosamente evitando burbujeo. No deberán usarse piedras de ebullición debido a que puede contaminarse y perderse Be en las piedras, es mejor agitar el vaso con agitador magnético que reduce bastante el burbujeo. Después de que se ha evaporado el cloroformo, la solución se hierve hasta que la mayoría del HC10_4 ha desaparecido y el fondo del vaso está un poco mojado con ácido. La solución no debe permitir que aparezcan humos secos aún en manchas dentro del vaso debido al peligro de una descomposición del perclorato de Berilio o del óxido que no se podrá redissolver en los siguientes pasos.

La acetil acetona y el EDTA forman productos que son bastante fluorescentes y bastante absorbentes a la luz ya en las regiones visibles, si la destrucción del extracto orgánico es incompleto. Una cantidad de tales productos, que podrían producir un color amarillo claro en la solución de HC10_4 pudieran volverse a un color café amarillo intenso, cuando la solución se hace alcalina. El tratamiento con ácido perclórico y nítrico no deberá hacerse muy rápido o pararse antes que la mayoría del HC10_4 ha desaparecido. Después de agregar el hidróxido⁴ de sodio como se describe bajo el procedimiento, la solución deberá examinarse cuidadosamente y si hay alguna turbiedad, o algún color que indique una destrucción completa de materia orgánica, o una separación inadecuada de los metales pesados, la solución deberá volverse a acidificar-

y se deberá repetir la separación. La solución deberá ser incolora y no fluorescente ni en ácido ni en alcali. Sin embargo el examen deberá hacerse rápidamente y re-acidificarse la solución de inmediato manteniéndose lo más fría posible, para minimizar las trazas de Be y Sílice del vaso de precipitados que es de vidrio de borosilicato. La reacción entre acetil acetona y ácido nítrico es muy vigorosa, si no se modera podrá proyectar los reactivos fuera del vaso. La oxidación de los extractos deberá comenzarse en una parrilla, apenas lo suficientemente caliente para hervir el cloroformo. Después de que sea removido el cloroformo y la reacción de oxidación se ha completado, el vaso se coloca en una parrilla caliente y se evaporan los humos de HClO_4 .

Modificación al método de determinación de Berilio con Morina. (7)

Reactivos:

Las soluciones se hacen en NaOH 0.4 M y EDTA 5.372×10^{-3} M; conteniendo 1.2 ml. de alcohol etílico por 25 ml. Los niveles bajos de pH se obtuvieron con HCl y los altos con NaOH o KOH. Las soluciones en los intermedios de pH, fueron reguladas con mezclas estandar de H_2PO_4 y KOH. Para ajustar la fuerza iónica (u) se usó KCl, a un valor de 0.6

Aparatos:

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo DU, equipado con un espectro-cordón Warren, -

con registrador para todas las mediciones de absor**u**bancia.

Los filtros primarios arreglados en orden - de la lámpara a la muestra, fueron como sigue: ais**l**ador 443 $m\mu$, filtros Corning 1-56 y 3-73, filtro- de interferencia Photovolt GAB 443 y Corning 5-58, aislador 365 $m\mu$, filtros Corning 0-52, 7-39 y 7-37. Los filtros secundarios acomodados en orden desde- la muestra al fototubo fueron: Corning 1-5', 4-64, filtro de interferencia Photovolt GAB 550. (8, 9)

Se usó un potenciómetro Beckman Modelo G, - para las mediciones de pH.

Método:

El curso de las reacciones fue seguido por- medición de la abosrbancia "A" y la intensidad de- fluorescencia "F". Se trazó el espectro de absor- ción completo, para longitudes de onda entre 350 y 750 $m\mu$, y se midieron las intensidades de fluore- scencia de 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 25 ml. de solución. Las celdas ópticas usadas para la solución tienen- espesor de 0.1296 cm. por mililitro.

Todas las intensidades de fluorescencia co- rresponden a la máxima sensibilidad, definida pre- viamente (10), a menos que se indique lo contrario. Los valores de las mediciones, fueron ajustados a- la sensibilidad necesaria.

Se operó la excitación a 365 y 443 $m\mu$. La - longitud de onda 443 $m\mu$, está en la región donde - una mezcla de Morina con un gran exceso de Berilio

en NaOH 0.04M, dá la diferencia positiva mayor para la Morina testigo, y donde el testigo es reproducible.

Toda medida de fluorescencia es hecha a 550 $m\mu$, las soluciones no absorben a esta longitud de onda.

Reacción entre Berilio y Morina.- Varias series de soluciones en las cuales el Berilio o la Morina permanecen constantes y las otras varían sobre un amplio intervalo, se usaron para determinar las características de los complejos.

Se adicionó sosa para neutralizar el ácido, sumado con el Berilio, enseguida todas las soluciones fueron valoradas con NaOH 0.04M. y EDTA $5.372 \times 10^{-3}M$, conteniendo 1.2 ml. de alcohol etílico por 25 ml. Los reactivos se adicionaron en el siguiente orden: Be, EDTA, NaOH, Morina. Las concentraciones de Be y Morina para estas mezclas son dadas en la tabla (5). En lo sucesivo, los símbolos Be y Mo, serán usados para señalar las concentraciones totales de Be y Morina. Datos para estas soluciones se presentan en la gráfica (10).

Determinación de Calcio con 1,5 - Bis (Dicarboximetil Amino-Metil) - 2,6 - Dihidroxinaftaleno. (11)

Reactivos:

Soluciones, 1.00×10^{-4} M. de BDDN y sales grado analítico. La solución de BDDN es estable por solo 5 horas. Cianuro de potasio, 0.10 M; 8-hidroquinoleína 0.10 M. en cloroformo. La acidez de las soluciones es ajustada con las siguientes soluciones: ácido perclórico 9.35 M. (H° 5.00 - 0.50); ácido perclórico 0.50 + hexamina 1.00 M. + perchlorato de sodio 0.50 M. (pH 1.10 - 7.44); 10.00 M. de hidróxido de sodio (pH 13.00 - 15.80). La concentración de los iones se mantuvo constante (0.10 N) con un rango de pH de 1.10 - 13.00 a través de estos experimentos.

Aparato:

Las mediciones fueron hechas con un espectro fluorómetro monocromático doble, ajustado con una lámpara de arco de xenon 150 - W y fotomultiplicador, y celdas de cuarzo de 10 x 20 x 50 mm.

Método

Cuando iones Tr y cuadrivalentes están presentes.- Se ajusta una muestra de solución conteniendo entre 10 - 500 ng. de calcio a un pH de 6.00 (medidos con potenciómetro). Agitar por 2 minutos con 3 porciones de 10 ml. de 8-hidroquinoleína en cloroformo. Separar las trazas de 8-hidroquinoleína de la solución acuosa por agitación con 2 porciones de cloroformo (este procedimiento se - -

efectúa con objeto de eliminar la interferencia de algunos iones Ter o cuadrivalentes). Añadir 5 ml. de cianuro de potasio 0.01 M. y 0.50 ml. de hidróxido de sodio 0.50 M. y mezclarlos. Añadir 5.00 ml. de BDDN 5.00×10^{-6} M, diluir a 25 ml. con agua y mezclarlos. Exactamente 5 minutos después, medir la fluorescencia a 445 nm. con un monocromador para excitar a 385 nm. Construir una curva de calibración para el rango de 10 - 500 ng. de calcio - por el mismo procedimiento; se debe obtener una línea recta.

Cuando iones Ter y cuadrivalentes están ausentes.- Seguir el mismo procedimiento pero sin extracción con 8-hidroquinoleína.

Determinación de Calcio con Calceína. (12)

Reactivos:

El agua utilizada para preparar todas las soluciones, es agua destilada y fue pasada a través de una columna intercambiadora de iones. Todas las soluciones fueron almacenadas en botellas de polietileno. Los reactivos utilizados son de grado analítico.

Solución estandar de calcio.- Una solución conteniendo 40.0 mg. de calcio por litro, es preparada por disolución de calcio en una mínima cantidad de HCl y diluyendo a un litro.

Solución de calceína.- Calceína (sal disódica del ácido imino acético), fue disuelta en propilenglicol grado fluorescente para preparar una solución conteniendo 60 mg. de calceína por litro. - Para soluciones acuosas de calceína, la solución fue disuelta en una mínima cantidad de KOH 0.40 N. y diluida a un litro.

Si es necesario añádase una pequeña cantidad de EDTA a la solución de calceína, para permitir el equilibrio del testigo en el fluorómetro. - La cantidad de EDTA requerida es establecida por titulación, y es una constante para soluciones de calceína del mismo frasco de reactivo sólido. (Una cantidad típica de EDTA añadida es, 1.00 ml. de EDTA 0.030 M. por 100 ml. de solución de calceína).

(13)

Aparato:

El instrumento utilizado fue un fluorómetro Beckman Modelo G, equipado con filtros primarios y secundarios, y una lámpara ultravioleta.

Método.- El procedimiento recomendado para la determinación del calcio contenido en suero sanguíneo con calceína es: Se colocan 5.00 ml. de hidróxido de potasio 2.0 N. en matraces volumétricos de 25 ml.; se agregan 20 ml. de muestra, y se agrega a cada uno de los matraces 1.0 ml. de calceína; los reactivos son mezclados por agitación y diluidos al volumen. Se ajusta el fluorómetro con el testigo, y se lee la muestra. Los miligramos de calcio por 100 ml. de muestra se calculan con la curva de calibración.

Determinación de Cadmio con Calceina. (14)

Reactivos:

Se preparó agua destilada, destilando agua-desionizada, usando cuarzo como amortiguador. Esta agua se denomina tridestilada (TDW) y se usa para preparar todas las soluciones.

Se usa Hidróxido de Potasio grado reactivo, en escamas en la neutralización de soluciones ácidas con concentraciones de 0.5 y 0.1 M. por dilución.

Calceina.- La calceina pura fue sintetizada preparando soluciones frescas de calceina en KOH - 0.5 M. pesando 1.60 mg. de calceina y diluyendo a 50 ml. Se agrega una pequeña cantidad de ácido ascórbico para incrementar la estabilidad de las soluciones reactivas. Las concentraciones de calceina en todos los casos, fueron hechas en un exceso de 10 a 20 Molar sobre las concentraciones de Cadmio para su determinación.

Aparatos.- En columnas de 20 cm. de longitud, se coloca resina Amberlite 400 (100-200 malla). La longitud promedio de la resina fue de 3 a 4 cm. usando tubería de 7 y 8 mm. de diámetro interior.

Todas las medidas de fluorescencia fueron hechas con un espectrofotofluorómetro Beckman Modelo DU, con el monocromador de excitación a 490 nm. y la lectura de emisión de 520 nm. Las aberturas de excitación y emisión puestas a 0.5 nm. y 2.0 nm.

respectivamente.

Procedimiento.- Soluciones de Cadmio puro, de concentraciones conocidas (las menores concentraciones de las soluciones finales fueron Cd^{2+} 2×10^{-9} M., 0.2 ng/g.) fueron combinadas con calceína y diluidas a 50 ml. con KOH 0.5 M. para producir soluciones de pH constantes 13.3. Las medidas de fluorescencia fueron efectuadas dentro de los 50 minutos después de su preparación. Las medidas de fluorescencia se hicieron a temperatura ambiente, debido a que las soluciones de calceína muestran gran estabilidad entre 20° y 30° C. (15). Se observó que las soluciones pierden aproximadamente 7% de la fluorescencia total en 2 horas.

Se estudió la interferencia de varios cationes por adición de cantidades conocidas de ellos para conocer las soluciones de Cadmio y medir la fluorescencia. Con iones (Zn y Pb) en los cuales parece tener pequeño efecto o no tenerlo sobre la fluorescencia Cd - Calceína, la concentración se incrementó en 5000 veces el exceso sobre la concentración del Cadmio.

La separación de iones que interfieren fue llevada utilizando un método de intercambio de aniones, similar al descrito por Krause & Moore. (16) La solución preparada para cambio de iones fue Cd^{2+} 5×10^{-6} M. con los siguientes iones: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{8+} , Al^{8+} ; cada uno presente en concentración de 5×10^{-3} M. La solución se hizo con HCl 2M. Un volumen suficiente de HCl 2M. se usó para eluir los iones de la columna y para hacer posible que la columna estuviera en -

forma clorhídrica (alrededor de 4 ml. de HCl 2M).-- Se colocó sobre la resina 1 ml. de la muestra que contiene Cadmio y los iones metálicos fueron eluïdos de la columna en la siguiente secuencia: Ca, - Mg, Co, Ni, Al, Cr y Cu, con 5 ml. de HCl 2M. Fe y Zn con 9 ml. de HCl 1M. En este punto el único ión remanente de la columna fue el Cadmio. Se eluyó 1-ml. de agua tridestilada al través de la columna y después de haber pasado 5-10 gotas el efluente se-colectó. El Cadmio fue extraido de la columna con- 3 ml. de KOH 0.1M., 1 ml. de agua tridestilada, 2-ml. de HNO₃ 1M. y 8 ml. de agua tridestilada, todo el efluente se colectó. Se agregó suficiente pota- sa sólida al efluente, para compensarlo por la aci- dez y la dilución. Se agregó la Calceina. Se dilu- yó la solución a exactamente 50 ml. con KOH 0.5 M. y se midió la fluorescencia. Los estandares fueron tratados exactamente como las muestras, durante el procedimiento; ello fue posible para operar arriba de diez columnas intercambiadoras de iones, con una curva de calibración que puede hacerse con cada se- rie de muestras problema.

Resultados:

La comparación de la fluorescencia de Cal- ceina sola y en presencia de Cadmio, como una fun- ción del pH se muestra en la Gráfica (11). La fluo- rescencia (490 nm, 520 nm) de ambas soluciones es- la misma bajo pH 9; y arriba de éste valor la fluo- rescencia de Calceina decrece lentamente; sobre pH 13, el complejo Cadmio Calceina exhibe pronunciada fluorescencia. Pequeños residuos de Calceina, fluo- rescentes a pH 13 y superior, se han atribuido a - impurezas de fluorescencia (17) aunque todas las -

medidas de fluorescencia se hicieron con KOH 0.5 M., correspondientes a un pH 13.3. La diferencia de fluorescencia a varias emisiones de longitud de onda de Calceina, con o sin Cadmio, aparece en la Gráfica (12). La máxima diferencia de fluorescencia se observa en la emisión de longitud de onda de 520 nm. La fluorescencia del testigo de Calceina, puede minimizarse conservando la concentración de Calceina a no más de 20 veces el exceso molar de Cadmio. Se puede usar un pequeño exceso de Calceina, pero la calibración tiene algo de curvatura para la mayor concentración de soluciones de Cadmio.

La fluorescencia de ciertos cationes con Calceina ha sido estudiada por Diehl (18) y la determinación de Calcio y Magnesio, ya ha sido reportada. Se ha observado que Cu, Fe, Co, Ni, Pb(II), Pd, Zr y Bi, efectivamente apagan la fluorescencia; de esta manera se ha investigado el efecto sobre la fluorescencia del quelato Cadmio-Calceina a pH 13.3 por Cu, Zn, Fe, Pb, Hg y otros cationes. El plomo a pH 13.3 no afecta la fluorescencia. Cobre y Hierro causan apagamiento de la fluorescencia. El Zinc causa un muy pequeño pero constante incremento en fluorescencia, que es aparentemente independiente de la concentración de Zinc, con exceso molar de 50 a 5000 veces. El Mercurio Hg (II) causa incremento de fluorescencia, que varía con la concentración de Mercurio. El Cadmio puede determinarse en presencia de Pb o Zn, pero no en presencia de otros iones. Si se sospecha de la existencia de Zn, en una muestra de análisis, esto se puede corregir por adición de cantidades conocidas en exceso de Zn a estándares y muestra.

El método de intercambio de aniones parece ser superior a los métodos de electrodeposición, - intentados para la remoción de interferencias de - metales de las muestras de Cadmio. El procedimiento de Krauss & Moore (16), ha sido modificado para producir óptimas separaciones y para eliminar la - mayoría de las posibles interferencias de interés - como son: Be^{2+} o Zr^{4+} (las excepciones pueden ser: Bi^{3+} , Sb^{3+} , Hg^{2+} , I^-). Los metales seleccionados - para el esquema de separación, son aquellos espera dos para encontrarse con Cadmio en muestras bioló - gicas o metalúrgicas.

El Mercurio no es separado del Cadmio usan - do una resina intercambiadora de aniones, sin em - bargo puede ser eliminado previamente a un inter - cambio de aniones por el uso de un papel brillante de cobre; el cobre será removido por la resina. To dos los iones que se considera que interfieren pue den eliminarse con menos de 15 ml. de volumen elui do.

Varios esquemas de elución para Cadmio, - usando Hidróxido de Amonio, fueron insatisfacto - rios para nuestros propósitos, debido a la interfe - rencia del complejo $\text{Cd}(\text{NH}_3)_4^{2+}$.

La elución de microcantidades de Cadmio, - después de la separación de otros cationes, se fa - cilita convirtiendo las columnas a la forma de hi - dróxido, seguida por la adición de HNO_3 diluido. - Este tratamiento permite recuperar más ³ del 95% - - cuando compara los estándares en los cuales no hay tratamiento de intercambio. De alguna manera más - bajos resultados pueden atribuirse a la elución de

resina disuelta. Los estándares son tratados en la misma forma que las mezclas y están de acuerdo con los valores encontrados para el Cadmio. Los valores encontrados para estándares de Cadmio y para las mezclas, se muestran en la Tabla (9). El límite de detección para muestras y estándares después de la elución es $\text{Cd}^{2+} 2 \times 10^{-8}$ (0.2 ml. de $\text{Cd}^{2+} 5 \times 10^{-6} \text{M}$. diluidas a 50 ml. después de la elución). - Esto corresponde a $\text{Cd}^{2+} 2.24 \times 10^{-6} \text{mg./ml.}$ ó 2.24 ng./ml. Los límites de detección pueden decrecer por el uso de columnas pequeñas y pequeños volúmenes de elución, o cuidando que la dilución final sea menor de 50 ml.

Determinación de Galio con Saliciliden-Orto-Aminofenol. (1)

Reactivos:

El Saliciliden-Orto-Aminofenol se preparó - por condensación de Salicilaldehído y Orto-Aminofenol en Etanol al 95%.

La solución de Galio se preparó disolviendo 0.6 g. del metal en H_2SO_4 concentrado, y diluyendo a 1 litro. La solución resultante tiene una concentración de $5.95 \pm 0.02 \times 10^{-3} M$. (19)

Aparatos:

Se usa un espectrofluorómetro Cary Modelo - 14 para registrar los espectros de absorción y - fluorescencia. Todas las medidas de pH se hicieron con un medidor de pH calibrado con solución buffer acuosa. Los valores de pH se refieren a los valores de medición.

Considerando todos los datos existentes, la mejor propiedad que regula la coloración y la quelación es el pH. Después que este pH fue encontrado, la quelación de Saliciliden-Orto-Aminofenol - ocurre a mayor valor que el cambio de color.

La longitud de onda para la determinación - espectrofotométrica, se determinó por el sistema - de quelato. Los quelatos metálicos no se absorben en la misma región de longitud de onda que el Saliciliden-Orto-Aminofenol. El quelato tiene su máxima diferencia de absorbancia para Saliciliden-Orto

-Aminofenol a longitudes de onda mayores a 400 μ .

A esa longitud de onda, el Saliciliden-Orto-Aminofenol ácido no absorbe; por lo tanto la determinación de absorbancia en esta región de longitud de onda fue solamente para dos especies absorbentes, quelato y Saliciliden-Orto-Aminofenol neutro. Para el estudio de relación de moles solamente fue necesaria una longitud de onda.

Esto ha sido mostrado previamente (20, 21)- el cambio de color no ocurre a valores de pH menores de 3. Por lo tanto toda la solución inicial de quelato tiene valores de pH menores de 3.

En el orden establecido de pH óptimo para quelación de Ga (III) se prepararon soluciones conteniendo 1.00×10^{-4} M. de Saliciliden-Orto-Aminofenol, 1×10^{-4} M. de Galio, 0.1 M. de KCl y 3% de Etanol. El pH de la solución se ajustó para el valor final por la adición de Acetato de Sodio 2 M. con una micropipeta. Los espectros ultravioleta y visible de absorción se registraron 48, 72 y 96 horas después de la preparación. Estos datos son presentados en la Tabla (10). De estos datos se determinaron las condiciones óptimas de tiempo y pH. Los datos espectrofotométricos para estos estudios y las condiciones óptimas, se dan en la Gráfica (1).

Los datos indicados en la composición del quelato son 2:1 (2 Saliciliden-Orto-Aminofenol:1 Galio), bajo las condiciones experimentales.

Determinación de Magnesio con 0,- 0' Dihidroxi-azobenceno. (21)

Reactivos:

Preparación del 0,- 0' Dihidroxi-azobenceno. El 0,- 0' Dihidroxi-azobenceno puede prepararse por el método Willstater (22), por la interacción del Orto-Nitrofenol e Hidróxido de Sodio. La reacción tiene aspectos espectaculares, y se le aconseja al operador mantener su cabeza hacia atrás para evitar ser lastimado por el fuego; esta reacción se puede moderar obteniéndose un incremento del producto. Un segundo método es el de Freeman and White (23) en el cual el Orto-Aminofenol diazotizado se trata con Cloruro Cuproso Amoniacal, y el precipitado de color cobre-café se descompone con Acido Clorhídrico concentrado.

Aparatos:

Para las medidas de fluorescencia se usó un espectrofotofluorómetro Cary Modelo 14 equipado con una lámpara de xenon como la fuente, y con un fotomultiplicador como el detector.

Determinación Fluorométrica.- El método fluorométrico para medir el Mg con el 0,- 0' Dihidroxi-azobenceno puede ser llevado a cabo ya sea en una solución acuosa o en una mezcla de agua y etanol. La fluorescencia del 0, - 0' Dihidroxi-azobenceno Magnesio es suficientemente mayor en presencia de etanol, en tanto que la medida puede ser hecha con fluorómetros menos caros o sea con aquellos que usan simples celdillas fotovoltaicas como

receptores. La intensidad de la fluorescencia en agua sola es tal, que la medida se hace mejor en un instrumento utilizando un tubo fotomultiplicador como elemento receptor. Se han dado antes procedimientos para llevar a cabo la determinación en agua sola como el solvente final (Procedimiento A) o en agua etanol (Procedimiento B). Se hace provisión en cada procedimiento para eliminar las interferencias, de Fe, Al, Cu o Zn. Un procedimiento adicional es también dado para la determinación de Mg (Procedimiento C) se puede llevar a cabo ya sea en suero entero o en la solución que queda después de la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético. El hierro que contiene el suero es normalmente tan bajo que no causa interferencia. La determinación fluorométrica del Mg con 0, - 0' - Dihidroxiazobenceno puede ser llevada a cabo en presencia de grandes cantidades de Ca; la interferencia por grandes cantidades de Calcio puede ser compensada o corregida. Como se debe esperar, el pH, la cantidad de reactivo agregado, y la cantidad de alcohol en la solución final, todos aceptan la fluorescencia y se debe tomar cuidado de que cada uno de estos factores sea controlado favorablemente, además la fluorescencia es dependiente de la temperatura, por lo que se debe evitar un calentamiento inadecuado de la fuente de luz.

Procedimientos recomendables.- Preparación de una solución de reserva de 0, - 0' Dihidroxiazobenceno $2.50 \times 10^{-3}M$. Se disuelve a 0.5355 g. de Dihidroxiazobenceno cristalino en 10 ml. de etanol y 10 ml. de KOH 2M. agregando agua cuanta sea necesario para completar la solución, se transfiere la solución a un frasco volumétrico de 1 litro, se di

luye hasta la marca con agua desionizada y se revuelve, se almacena en un recipiente de polietileno, usando esta solución de reserva, se prepara una solución para trabajar como se describe en los procedimientos A, B, o C, antes mencionados.

Solución estandar de Magnesio.- (Aproximadamente de 2×10^{-4} M. ó 5 ng/1 ml.). Se pesan precisamente 0.24 g. de Mg. metálico grado Grignard, se disuelve en una cantidad mínima de HCl diluido, se transfiere la solución a un frasco volumétrico de 1 litro, se diluye hasta la marca y se revuelve a conciencia, se toma una alícuota de 10.0 ml. de esta solución en un matraz volumétrico de 500 ml., se diluye hasta la marca y se revuelve, calculando la exacta concentración en términos de microgramos de Mg por ml.

Agua.- Se usa agua destilada y desionizada, preparada al pasar agua destilada por resinas de intercambio de cationes y aniones; por ejemplo a través de una capa de Amberlite MB-1 de una sola cama.

Procedimiento A.- Determinación fluorométrica del Mg. Agua solamente como solvente final. Se prepara una solución para trabajar 2.5×10^{-4} M. en 0, - 0' Dihidroxiazobenceno, de la siguiente manera. En un frasco volumétrico de 1 litro se ponen 100 ml. de agua, 100 ml. de KCl 2.5 M., 67 ml. de etilendiamina redistilada y 50 ml. de trietanolamina si hay Al, si no, no es necesaria. Se mezcla y se deja enfriar la solución, se agregan exactamente 100 ml. de la solución de reserva de Dihidroxiazobenceno 2.50×10^{-3} M, se mezcla, se diluye has-

ta la marca con agua desionizada y se revuelve. Se almacena en botellas ya sea de polietileno o de vidrio borosilicato. Se prepara la muestra de tal manera para que se pueda llevar todo el Mg a la solución. La solución debe ser relativamente regulada y libre de sustancias orgánicas. Para el análisis se toman alicuotas conteniendo de 5 a 25 mg. de Mg. Si la muestra contiene hierro, se agregan a la alícuota de 10 a 20 mg. de Hidrosulfito de Sodio - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 1 ml. de Hidróxido de Amonio y 2 ml. KCN al 5%, se calienta la solución y se deja hervir suavemente por 1 a 2 minutos. Si hay presente Cu o Zn, se agregan 2 ml. de KCN al 5% omitiendo el tratamiento anterior si fue aplicado para el hierro. Se transfiere la solución a un matraz volumétrico de 50 ml. Se agregan 10.0 ml. de la solución de trabajo y se lleva al aforo.

De una manera similar se preparan una serie de estándares cubriendo un rango de 5 a 25 mg. de Mg.

Procedimiento B.- Determinación Fluorométrica del Mg (mezcla de agua etanol como solvente final). Se prepara una solución de trabajo de 0, - 0' Dihidroxiazobenceno de $7.15 \times 10^{-5}\text{M}$. de la siguiente manera: En un matraz volumétrico de 1 litro se ponen 100 ml. de etanol de 95% y 19 ml. de etilendiamina redestilada, se revuelve y se enfría en un baño de hielo. Se enfría de nuevo, se agregan 14.3 ml. de trietanolamina y 28.6 ml. de Dihidroxiazobenceno, solución de reserva $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$. Se diluye la mezcla a 1 litro con etanol de 95% y se revuelve bien. Se almacena la solución en una botella ya sea de polietileno o de vidrio borosilicato.

Se prepara la muestra de tal manera que todo el Mg puede ser llevado a la solución. La solución debe ser relativamente regulada y libre de sustancias orgánicas. Para el análisis se transfieren alicuotas conteniendo 5 a 25 mg. de Mg y sin exceder a 15 ml. de volumen en un matraz volumétrico de 50 ml. Si hay hierro presente, proceder como en el análisis anterior. Se agregan 35.0 ml. de la solución de trabajo del 0,- 0' Dihidroxiazobenceno regulado, se mezcla bien la solución, se lleva al aforo, y se mide la fluorescencia de cada solución.

Procedimiento C.- (Mezcla de agua etanol como solvente final) se prepara una solución de trabajo $2.5 \times 10^{-4}M$. en 0,- 0' Dihidroxiazobenceno de la siguiente manera. En matraz volumétrico de 1000 ml. ponga 100 ml. de etanol 95% y 67 ml. de etilendiamina anhidra redestilada, se enfría y se agregan 53 ml. de HCl 1:1. Se mezcla bien. Se agregan 50 ml. de trietanolamina y exactamente 100 ml. de 0,-0' Dihidroxiazobenceno de la solución de reserva. Se diluye a 1 litro con etanol de 95%, se mezcla bien y se almacena en una botella de polietileno o de vidrio borosilicato.

Se toma una alicuota de la mezcla que debe ser de tal tamaño que contenga entre 0.5 y 20 microgramos de Mg en un volumen que no exceda 4 ml., en un tubo de centrifugación graduado de 15 ml. de capacidad. Se agregan 10.0 ml. de la solución de trabajo de 0,-0' Dihidroxiazobenceno. Se tapa el tubo con un tapón de plástico y se mezcla.

De manera similar se prepara una serie de estándares que contengan de 0.5 a 20 microgramos -

de Mg y se mide la fluorescencia.

Se lee la intensidad de fluorescencia de es tandares y de los desconocidos tan rápido como sea posible, y se evita cualquier calentamiento de las soluciones. De los datos obtenidos en los estandares, se prepara una gráfica de intensidad de fluorescencia contra concentración de Mg.

Modificaciones si hay grandes cantidades de Ca.- Si la solución por analizar contiene suficiente Ca, Sr, o Ba para influenciar la fluorescencia, se agregan las cantidades necesarias de cada uno - de estos elementos a los estandares de manera que la composición de ellos se aproxime a la de la - - muestra. Si las muestras contienen cantidades de - Ca que difieren grandemente de aquellas que van a ser analizadas de tiempo en tiempo, se prepara de una vez una familia de curvas de calibración representando varios niveles de concentraciones de Ca - (Gráfica 13).

Fluorescencia de O,-O' Dihidroxiazobenceno de Magnesio y factores que afectan su intensidad.- Los espectros de excitación y fluorescencia del - - O,-O' Dihidroxiazobenceno de Magnesio y del reactivo sólo o en la presencia de Ca fueron obtenidos - con el espectrofluorómetro. Las soluciones en las cuales se obtuvieron los espectros fueron cada una de 2×10^{-5} M. en O,-O' Dihidroxiazobenceno, 0.1 M en KCl y a un pH de 11.4. Una fue también de 1×10^{-4} M. en Mg, una de 1×10^{-4} M. en Ca y a una se le agregó una gota de EDTA de 0.01 M. para desenmascarar cualquier Ca o Mg que pudiera estar presente en los reactivos usados. Se obtuvieron los -

espectros de excitación y fluorescencia de los compuestos de Mg en la mezcla de agua-etanol; la solución fue preparada esencialmente como en el Procedimiento B.

Los efectos del pH en la intensidad de la fluorescencia de 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio se estudiaron preparando una serie de soluciones, cada una con cantidades idénticas de solución de trabajo de Mg. En cada una la concentración de Dihidroxiazobenceno fue de 5×10^{-5} M. y el Mg 2×10^{-5} M. El pH se ajustó agregando HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. Se midió entonces la intensidad relativa de fluorescencia de cada solución. Este trabajo se repitió usando la mezcla de agua-etanol recomendado como solvente final en el Procedimiento B, el medidor de pH se calibró usando una solución Buffer de pH = 10.0 y el pH aparente en la mezcla agua-etanol fue reportado (la mezcla era de alrededor 60% etanol y 40% agua).

Los efectos del exceso del 0,-0' Dihidroxiazobenceno en la fluorescencia de los compuestos de Mg se investigaron preparando una serie de curvas de calibración, cada curva representa una cantidad diferente pero constante de reactivo. Soluciones recién preparadas de 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio (5×10^{-5} M. en el reactivo, 2×10^{-5} M. en el Magnesio, pH = 11.4) fueron comparadas con soluciones idénticas que habían sido almacenadas bajo condiciones normales de laboratorio por varios días.

Los efectos de agregar etanol a la solución del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio se estu-

diaron en algunos detalles. La relativa intensidad de la misma cantidad de Magnesio medida más allá - de un campo de 0 a 35 ml. de etanol en un volumen final de 50 ml. En manera similar los efectos de - agregar etanol, isopropanol, butanol y alcohol - - isoamílico fueron también estudiados. En los experimentos con butanol y con alcohol isoamílico fue necesario agregar etanol para mantener una fase - simple.

Los efectos de un número de iones metálicos en la intensidad de la fluorescencia de 0,-0' Dihidroxiazobenceno solo y en presencia de 20 microgramos de Mg fue estudiada. La interferencia del Ca - fue estudiada en más detalle preparando curvas de calibración que representaban diferentes concentraciones de Ca. Agentes desenmascarantes como el cianuro o la trietanolamina se introdujeron donde era estrictamente necesario.

Los experimentos fueron llevados a cabo para aprender si el 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio podría ser extraído con varios solventes inmiscibles con agua. Soluciones que contenían 10 ml. de la solución de trabajo del Procedimiento A con agua como solvente único y varias cantidades de Mg en un volumen final de alrededor de 50 ml. fueron mezcladas con unos cuantos ml. de cada uno de varios solventes orgánicos. Las fases fueron separadas y la fase orgánica fue examinada por su color y fluorescencia. En el caso del alcohol isoamílico el coeficiente de distribución se determinó aproximadamente.

Análisis de muestras estandar.- El Mg en 4-

muestras del Bureau Nat de estandares (N.B.S.) fue determinado utilizando el Procedimiento A (con agua como único solvente), y Procedimiento B (con agua-etanol como solvente final). No. 1 Piedra caliza argilacea; No. 26, Mineral de hierro; No. 177 Cemento Portland, y No. 88, Dolomita. Se tomó una muestra que pesa alrededor de 100 g. para análisis. La mezcla fue fundida en un crisol de platino por 10-15 minutos con 1.0 g. de una mezcla 1:1 de Na_2CO_3 y de tetraborato de sodio decahidratado. La mezcla fundida y enfriada se tomó con 10 ml. de agua y 5 ml. de HCl concentrado. En ningún caso permaneció residuo alguno de color oscuro. La solución resultante fue diluida a exactamente 250 ml. (Procedimiento A) o a 1000 ml. (Procedimiento B), sin esperar la sílica. Tomando alicuotas para análisis se evitó la transferencia de pequeñas cantidades de sílica. Las operaciones subsecuentes fueron aquellas detalladas anteriormente bajo los Procedimientos A y B. Las alicuotas apropiadas fueron tratadas en cuanto fue necesario para evitar iones presentes que pudieran interferir. No se requirió semejante tratamiento para la Dolomita (No. 88). Las otras fueron tratadas con hidrosulfito de sodio, amoniaco y cianuro para prevenir la interferencia del hierro presente y con trietanolamina para desenmascarar el aluminio.

Los análisis del suero sanguíneo de las ovejitas fueron llevados a cabo siguiendo el Procedimiento C, dado anteriormente. Los análisis se llevaron a cabo en 0.100 ml. de suero. Los resultados no fueron registrados por el análisis del suero por otro método. Algunas muestras de suero fueron calcinadas primeramente con una mezcla de HNO_3 y -

HC10₄, en otras las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético y el precipitado fue centrifugado, ambos calcinados. El objeto fue determinar si el análisis hecho directamente en el suero era válido. El método directo, Procedimiento C, - fue finalmente aplicado al suero de un gran número de ovejas, las cuales, bajo los controles convenientes habían sido sometidas a ciertas tensiones psicológicas (Dr. William Buck, Depto. de Fisiología, del Depto. de Agricultura de los Estados Unidos; Laboratorio de Enfermedades Animales Ames, - Iowa).

Los espectros de excitación y fluorescencia del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio se muestran en la Gráfica (14). También se ilustra la muy escasa fluorescencia mostrada por el reactivo sólo y en presencia de Ca. Los máximos ascensos en los espectros de excitación y fluorescencia ocurren a 470 μ y 580 μ respectivamente. Así en el uso de un fluorómetro de filtro, los filtros deben ser escogidos para tener la máxima capacidad de transmisión a estas longitudes de onda.

Efectos del pH.- La intensidad de la fluorescencia del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio en agua, es esencialmente lineal sobre el intervalo de pH de 11.0 a 12.2, cayendo en los máximos y mínimos valores de pH. El mismo efecto se observa en el solvente de etanol-agua usado en el Procedimiento B, pero el campo se cambia a los valores menores, 9.9 a 11.3 que es el pH aparente como se indica por el electrodo de vidrio de alta alcalinidad. El 0,-0' Dihidroxiazobenceno es un ácido dibásico débil, $pK_1 = 7.8$ y $pK_2 = 11.5$ y el des

censo en intensidad de la fluorescencia a un pH bajo es probablemente causado por la formación incompleta del compuesto de magnesio. El descenso a niveles altos de pH es probablemente resultado de la competencia del ión hidroxilo por magnesio. El descenso de intensidad de la fluorescencia a elevado-pH no es eliminado por la extracción en alcohol amílico.

Efectos del exceso de reactivos.- Para asegurar la completa formación del compuesto de magnesio es necesario tener presente un exceso moderado de 0,-0' Dihidroxi-azobenceno, el cual tiene su máximo punto de absorción a 470 μ , que es aproximadamente la longitud de onda de la máxima excitación de la fluorescencia de los derivados del magnesio. Esto impide el uso de grandes excesos de reactivo y también requiere trabajar a bajas concentraciones. La cantidad de reactivo usado debe ser constante y precisa al ser medida.

Efectos de tiempo y temperatura.- El 0,-0'-Dihidroxi-azobenceno de Magnesio parece formarse instantáneamente y ser indefinidamente estable. La intensidad de fluorescencia del compuesto disminuye a medida que la solución se calienta un poco más allá de la temperatura ambiente. Debido al poder disipado en la fuente de luz y la proximidad de la lámpara a la celda en algunos instrumentos, se debe prestar atención a los efectos de calentamiento en el compartimiento de las celdas, si estas últimas han sido calentadas más allá de la temperatura ambiente por una continua operación de la lámpara.

Efectos del etanol y otros alcoholes.- La intensidad de la fluorescencia del 0,-0' Dihidroxi-azobenceno de Magnesio es aumentada por la presencia de etanol, siendo cuatro veces más grande en etanol de 67% que en agua. El efecto es lo suficientemente grande para hacer posible el medir el Magnesio con 0,-0' Dihidroxi-azobenceno con el fluorómetro más económico, esto es con aquellos que emplean una simple celdilla fotovoltaica, en lugar de una celdilla fotomultiplicadora. El aumento en intensidad con el aumento en la concentración de alcohol es tan grande que se deben tomar algunos cuidados para introducir siempre el mismo volumen de alcohol.

No hay diferencia esencial en la acción de varios alcoholes al aumentar la fluorescencia de 0,-0' Dihidroxi-azobenceno de Magnesio. Ver tabla (11).

Efectos de iones extraños.- La presencia de grandes cantidades de metales alcalinos y de $BaCl_2$ parece que no tiene un efecto dañino en la determinación del Magnesio. La presencia de grandes cantidades de Ca, Sr o Ba tienden a suprimir la fluorescencia; cantidades moderadas pueden ser toleradas como se desprende de los datos presentados en la tabla (12). Es posible compensar mayores cantidades de estos iones de metales alcalinoterreos teniendo la composición de los estándares aproximados de los problemas con respecto al ión interferente. El efecto del Calcio se ilustra en detalle en la Gráfica (13).

Extracción del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio.- Ninguna cantidad apreciable ya sea de 0,-0' libre o de sus derivados de Magnesio es extraída en benceno, nitrobenceno, ether, ether de petróleo, metil-isobutil cetona o hidrocarburos clorinados de una solución de pH 11.4. Los solventes de ester fueron hidrolizados y los cambios del pH resultante fueron molestos. La extracción sí ocurrió en alcohol isoamílico y en alcohol isobutílico. El alcohol isoamílico se escogió para estudios más profundos porque es menos soluble en agua. El coeficiente de distribución a un pH de 11.4 del derivado de Magnesio se encontró que era de 9, - - mientras que el 0,-0' Dihidroxiazobenceno libre fue alrededor de 6. Así sí se desea que como parte de un procedimiento analítico por lo menos 99% del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio sea extraído de 25 ml. de solución, se requerirán tres porciones de 10 ml. de alcohol isoamílico. La aplicación de un extracto de alcohol isoamílico es útil no para obtener un efecto de concentración, sino porque la intensidad de la fluorescencia es grandemente aumentada por el solvente orgánico y porque la tolerancia al Ca es mayor. Una serie de curvas de calibración representando diferentes concentraciones de Ca fue preparada utilizando un procedimiento de extracción. Este procedimiento no resultó en una completa extracción del 0,-0' Dihidroxiazobenceno de Magnesio, pero el volumen de cada una de las fases fue controlado de modo que el grado de extracción fue capaz de reproducirse. Soluciones de 50 ml. en volumen hasta 2×10^{-5} M. de Mg y aun pH de 11.4 fueron extraídas con porciones de 5 y 10 ml. de alcohol isoamílico. Los extractos fueron combinados y diluidos a 50 ml. con etanol de 95%. La in

tensidad de cada uno fue medida con el fluorómetro, manteniendo los monocromadores de excitación y - fluorescencia a 480 y 570 m μ respectivamente, La fluorescencia de los extractos cuando son diluidos de este modo es alrededor de diez veces tan intensa como aquella de la solución acuosa de la cual fueron hechas las extracciones. Las curvas de calibración se muestran en la Gráfica (15).

El procedimiento de extracción permite el uso de fluorómetros menos sensibles pero este mismo efecto puede lograrse simplemente diluyendo la solución acuosa con etanol como se recomienda en el Procedimiento B. El paso de extracción se recomienda sólo si la cantidad de Calcio presente es excepcionalmente grande, digamos 2000 veces tanto como Magnesio.

Análisis de Piedra Caliza.- Cemento Portland, Mineral de Hierro, y Suero Sanguíneo.- Los resultados obtenidos aplicando el Procedimiento A en el cual el agua es el único solvente, a ciertas muestras está dados en la Tabla (12). Los resultados utilizando el Procedimiento B donde el agua y el metanol son solventes finales se dan en la Tabla 13. Los resultados de estos métodos directos sin separaciones preliminares están de acuerdo con los valores y la precisión publicados considerando las muestras relativamente pequeñas que se tomaron y que las alicuotas hechas sean buenas. Hay pocas razones para creer que los resultados obtenidos por este método no pueden ser tan confiables como los reportados. El reciente método gravimétrico incluye numerosas separaciones previas, la acumulación de Mg extraño que se introduce como impurezas

en los numerosos reactivos agregados y las dudas - existentes en cuanto a la composición exacta del - precipitado de Mg y su forma final al pesarlos.

Los resultados obtenidos aplicando el método fluorométrico directamente al suero sanguíneo - de las ovejas, Procedimiento C fueron muy satisfactorios respecto a precisión. Tomando un método - - apropiado para comprobar y en vista del conocimiento obtenido a lo largo de este estudio en cuanto a la acción de elementos interferentes se tiene que los resultados se consideran correctos. Resultados idénticos se obtuvieron en suero por el método directo y por calcinación preliminar; aparece por - consecuencia que en el suero de oveja el Magnesio - no está lo suficientemente fijo como para prevenir su reacción con el 0,-0' Dihidroxiazobenceno. Tampoco se encontró Magnesio en el ácido tricloroacético, resultado de la precipitación de proteínas - al ser calcinadas Tabla 14. Para el suero de oveja tenemos que calcinación preliminar o precipitación preliminar de proteínas son innecesarias. En el - procedimiento recomendado, la proteína es precipitada por el alcohol que se agrega, pero este precipitado de nuevo no lleva Magnesio.

Determinación de Magnesio con compuestos 0,-0' Di-hidroxi azo (24)

Reactivos:

Se prepararon los siguientes compuestos: - B-1.- 1-(2' - hidroxí-1'-azocenceno, al través de B-1 1-(2'- hidroxí-1'azonaftil)-2- hidroxí-5- fenilbenceno; según Diehl y Ellingboe (25, 26). El compuesto B-2 1-(2'- hidroxí-1'-azobenceno)-2- hidroxibenceno se preparó fundiendo 0-nitrofenol con hidróxido de potasio (27).

El Ericromo Negro T, fue purificado tal como Diehl y Lindstrom (28). La Calmagita (29), se obtuvo de la Compañía Química G. Frederick Smith.- de Columbus, Ohio; con una pureza de 85% siendo las impurezas sales inorgánicas mas bien que compuestos azo.

El buffer de pH 11.4 se preparó al neutralizar parcialmente 670 ml. de etilendiamina anhidra-redestilada, 200 ml. de agua, y 120 ml. de Acido - Clorhídrico 2N. El buffer de pH 10 se preparó de hidróxido de amonio y cloruro de amonio como se describe por Diehl y Smith (30).

Toda el agua que se usó fue destilada y desionizada al pasarla a través de una resina Amberlite MB-1 para intercambio de iones.

Aparatos:

Los espectros se obtuvieron en un espectrofluorómetro Beckman Modelo G, instrumento que hace

posible precisar la excitación y la luz fluorescente. El instrumento fue equipado con una lámpara de xenon como la fuente y un fotomultiplicador como detector.

Método.- Se prepararon soluciones de reserva de cada uno de los compuestos azo, unas cuantas horas antes de usarlos. Se usaron pequeñas cantidades de alcohol y de hidróxido de potasio para facilitar la solución. Las soluciones en las cuales los espectros se corrieron fueron preparadas de soluciones de reserva de compuestos azo, Cloruro de Potasio y el Buffer. Cada solución se hizo 2×10^{-5} M. en el compuesto azo, 10^{-4} M. en Magnesio o Calcio si así se deseaba, y, 0.1 M. en el Cloruro de Potasio; y cada uno contenía 1 ml. de buffer por 50 ml. de solución. Las soluciones de reserva de compuestos azo, cloruro de potasio, y el buffer, se hicieron 2×10^{-5} M. en el compuesto azo, 10^{-4} M. en el magnesio o calcio si así se deseaba, y 0.1 M. en el cloruro de potasio; y cada uno contenía 1 ml. de buffer por 50 ml. de solución. Excepto en el caso de 1-(2'- Carboxi-1-azobenceno)-2-hidroxinaftaleno, el alcohol contenido no excedió del 1%. El pH de cada una de las soluciones fue comprobado y se encontró dentro del valor reportado de 0.05.

Resultados.- El B-1, 1-(2'- hidroxí-1'-azobenceno)-2- hidroxinaftaleno muestra moderada fluorescencia a alrededor de 412 μ . Su derivado de magnesio es apreciablemente fluorescente a 578 μ , pero el 1-(2' - hidroxí-1'-azobenceno)-2-hidroxinaftaleno no fluoresce a esta longitud de onda. La intensidad de fluorescencia del derivado de magne-

sio es un poco mayor a un pH de 11.4 que a uno de 10.2 Tabla (15).

El B-2, 1-(2'-hidroxi-1'azobenceno)-2-hidroxibenceno en si mismo no muestra fluorescencia significativa, el derivado de mangesio exhibe fluorescencia moderada a 580 $m\mu$, siendo la intensidad casi la misma a un pH de 11.4 que a uno de 10.2 Tabla (15).

El B-3, 1-(2 - hidroxi-1 azobenceno)-2,4-dihidroxiazobenceno no muestra fluorescencia por si mismo. El derivado de magnesio fluoresce alrededor de 558 $m\mu$, siendo la intensidad menor a un pH de 10.2 que a uno de 11.4.

El B-7, 1-(2 -hidroxi-1 azonaftil)-2-hidroxi-5-fenilbenceno es fluoréscente a 412 $m\mu$. A un pH de 11.4 hay muy poca fluorescencia, característica de la presencia de calcio o magnesio, pero reposando durante un día la fluorescencia se desarrolla a 540 $m\mu$. A un pH de 10.2, las soluciones de derivados de calcio o de magnesio recién preparadas no muestran fluorescencia, excepto la del compuesto mismo; reposando durante la noche se forma un precipitado.

La Calmagita Acido 1-(2 -hidroxi-5-metil-1-azobenceno-2-naftol-4-sulfónico exhibe su máxima fluorescencia ya sea a 424 ó 440 $m\mu$, dependiendo de la longitud de onda de excitación. El derivado de magnesio exhibe una débil fluorescencia, teniendo su máxima intensidad a 595 $m\mu$, siendo la intensidad casi la misma a un pH de 10.2 que de 11.4. En presencia de calcio hubo muy poca fluorescencia.

El B-4, 1-(2-Carboxi-1-azobenceno)-2-hidroxinaftaleno y el B-5, 1-(2-Carboxi-1-azobenceno)-2-hidroxi-5-metilbenceno, solos y en presencia de magnesio o de calcio no mostraron fluorescencia ni a pH de 10.2 ó de 11.4.

El B-6, 1-(2-4-Dihidroxi-1-azobenceno)-2-hidroxi-5-fenilbenceno es en si mismo moderadamente fluorescente a 404 $m\mu$. A un pH de 11.4 los derivados de calcio y magnesio fluorescen a 548 $m\mu$, cambiando la fluorescencia con el tiempo. A un pH de 10.2 el derivado de magnesio fluoresce a 580 $m\mu$, siendo la fluorescencia más débil a un pH de 10.2 que a uno de 11.4 y estable después de un período de varias horas.

El Eriocromo Negro T. Acido 1-(Hidroxi-2-azonaftil)-2-nitro-2-naftol-4-sulfónico no muestra fluorescencia significativa sólo en presencia de calcio y magnesio.

Los derivados de magnesio del Eriocromo Negro T y de los compuestos que poseen un grupo carboxilo y uno hidroxilo (B-4 y B-5) no mostraron fluorescencia. Parece que la intensidad de la fluorescencia de los derivados de magnesio disminuye con el aumento en la complejidad del compuesto azo padre (el que lo origina). Los derivados de calcio muestran poca o ninguna fluorescencia.

La mayoría de los compuestos azo muestran en si mismos fluorescencia en la vecindad de 410 $m\mu$, pero poca o ninguna en la región de los 500 a 600 $m\mu$, donde la fluorescencia de los derivados de magnesio tiene lugar. Cuando la fluorescencia de

Los compuestos azo sólo es observada a su máxima-longitud de onda, el punto máximo de los espectros de excitación y fluorescencia ocurre aproximadamente a las mismas longitudes de onda pertenecientes al derivado de magnesio.

Los datos de longitud de onda e intensidad-presentados son tal como fueron observados con los instrumentos descritos. Los datos reflejan además-de las propiedades de los compuestos estudiados, - ciertas variables instrumentales. La intensidad de la fuente y la sensibilidad del detector varían con la longitud de onda.

Un proyecto por el cual las curvas observadas pueden ser compensadas por estas variables ha sido descrito por White y otros (31) pero desde el punto de vista analítico estas correcciones no tienen razón de ser y por lo tanto no se aplicaron.

De los compuestos estudiados los compuestos B-2 y B-3 son los mejores candidatos como reactivos fluorométricos para el magnesio. La relación-de la intensidad de fluorescencia de los derivados de magnesio a la de los derivados de calcio es mayor para el B-3 que para el B-2, pero la intensidad y por lo tanto la sensibilidad es solo la mitad de grande. Hay una mayor diferencia entre la formación respectiva de constantes para B-2 que para B-3.

Por estas razones el B-2 ha sido objeto de una investigación, determinando los detalles para su uso por la determinación fluorométrica y espectrofotométrica de magnesio.

Determinación de Indio con Saliciliden-Orto-Aminofenol (1)

Reactivos:

a) Saliciliden-Orto-Aminofenol.- Se preparó por condensación de Salicilaldehído y Orto-Aminofenol en 95% de Etanol.

b) Indio.- La solución de Indio se preparó disolviendo 0.6 g. de Indio metálico en HNO_3 concentrado y diluyendo a 1 litro, la solución obtenida de Indio, tiene una concentración de $5.09 \pm 0.03 \times 10^{-3}$ M.

Método.- En el orden establecido de pH óptimo para la quelación de In (III) se prepararon soluciones con contenido de 1.00×10^{-4} M. de Saliciliden-Orto-Aminofenol, de Indio 1.00×10^{-4} M. de KCl 0.1 M. y de Etanol al 3%. El pH de la solución se ajustó con Acetato de Sodio 2M. con una micropipeta. Los espectros ultravioleta y visible de absorción se registraron 48, 72 y 96 horas después de la preparación. Estos datos se presentan en la tabla (16).

En general los resultados del espectro de fluorescencia no fueron los esperados; únicamente los quelatos presentan fluorescencia. La luz ultravioleta inhibe la quelación y destruye los quelatos después de su formación, causando que la relación molar sea ligeramente baja.

Determinación de Uranio. (32)

Reactivos:

Todos los reactivos utilizados fueron de - grado analítico.

a) Fundente.- Se prepara una mezcla que con tenga 20% de Fluoruro de Sodio y 80% de Carbonato- de Sodio.

b) Solución de Acetato de Etilo.

c) Acido Nítrico 10% V/V.

d) Solución de Nitrato de Aluminio.- Se di-
suelve 1 kg. de Nitrato de Aluminio $Al(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$
en 500 ml. de agua destilada; por calentamiento.

e) Solución tetra-sódica del ácido etilen--
diamino-tetracético.- Se disuelven 25 g. de EDTA,-
por adición lenta de 134 ml. de solución 1M. de -
NaOH y se diluye a 250 ml. con agua destilada.

f) Solución de Nitrato de Aluminio-EDTA - -
(1+3V/V).- Se agregan 25 g. de EDTA a 75 g. de Ni-
trato de Aluminio, y se ajusta el pH entre 1.4 y -
1.7. El máximo cambio en el volumen al ajustar el-
pH, no debe exceder al 5%. Esta mezcla debe ser de
reciente preparación al usarse. Ver Tabla No. 17.

Método:

Se pesa una muestra de 1 g. de Nitrato de -
Sodio se transfiere a un matraz pyrex de 20 ml. y-

se disuelve con 2.5 ml. de Acido Nitrico al 10% - V/V. Se transfiere la solución a un embudo de separación de 60 ml. Se agregan 15 ml. de solución de Nitrato de Aluminio al matraz y se pasan al embudo, se tapa y se agita durante dos minutos, permitiendo la separación de las capas y desaguando la fase acuosa. Se lava la fase orgánica durante un minuto con solución de EDTA-Nitrato de Aluminio, se desecha el lavado y se repite esta operación 3 o más veces; finalmente se filtra el extracto al través de un papel doble de filtro Whatman No. 41, en un matraz seco y limpio, de 10 ml. Se transfiere con pipeta una alícuota de 5 ml. del filtrado orgánico del extracto, a otro matraz seco y limpio de 10 ml. que contenga 0.5 ml. de Acido Nítrico. Se pone el matraz en un baño de agua y se evapora a sequedad. Se agregan 0.5 ml. de Acido Nítrico y se calienta el matraz en baño de agua. Se transfiere la solución a un vaso calibrado de 1 ml. Se limpia el matraz con algunas gotas de Acido Nítrico. Se pasa al frasco y se afora. Se transfiere con pipeta 0.1 ml. de esta solución a una cápsula de platino. Se evapora con lámpara infrarroja. Cuando se seque la cápsula de platino, se aumenta la temperatura a 850°C por un minuto, y se enfría. Se agregan con espátula 0.5 g. del fundente a la cápsula y se coloca en una mufla a 850°C por espacio de dos minutos. Se coloca la cápsula en un desecador y se enfría durante 10 minutos, se mide la fluorescencia de los discos en el fluorómetro. Ver Tabla No. 18.

Tabla No. 1

Absorbancia de Aluminio-Salicilideno-o-Aminofenol-
a 405 m μ como una funci3n de pH y tiempo.

Absorbancia

pH	48 h	72 h	96 h
2.70	0.000	0.010	0.018
4.00	0.110	0.145	0.173
4.50	0.275	0.347	0.406
5.00	0.920	0.965	0.965
5.50	1.140	1.168	1.192
6.00	1.005	1.070	1.080

TABLA No. 2
Efectos de otros elementos

Elemento	Cantidad mg	Error, div. esc.		Observaciones
		Testigo	0.5 Be	
		<u>+0.2</u>	<u>+0.3</u>	Testigo 13.1; 0.5 Be standard 94.1 0.00617 /div.esc.
Th	0.010	+34.7	<u>+33</u>	Fluorescente; 0.29 /div.esc.
Y	0.010	+11	...	Fluorescente; 0.91 /div.esc.
Zr	0.10	+36.8	+29.4	Fluorescente; 2.7 /div.esc.
Sc	0.13	+16.6	+ 6.1	Fluorescente; 7.6 /div.esc.
La	0.10	+ 9.4	...	Fluorescente; 10.6 /div.esc.
Li	10	+ 6.0	- 2.0	Fluorescente; 1700 /div.esc.
Ca	10	+ 3.6	-17.1	Turbio; fluorescencia no visible.
	10	+ 0.7	- 0.3	No turbio
Al	10	+ 1.4	-25.2	Muy baja turbiedad
	10	+ 0.7	-70.8	Turbio
Si	1	- 0.1	- 0.7	No turbio; silicato agregado después del alcali.
	1	- 0.2	-61.0	Poco notable floculos de ácido silfsico.
	1	0.0	- 3.6	Acido silfsico deshidratado con 72% de HC10_4 pero conservado en la solución fluorescente.
Fe	0.5	- 2.2	-13.7	Trietanolamina agregada.
	0.5	- 7.5	-66.3	Trietanolamina no agregada.
Ba	1	0.0	+ 2.2	
Sr	1	0.0	+ 1.8	
Ge	1	0.0	0.0	Acido germánico precipitado con HC10_4

Cu	1	- 1.3	- 9.7	Color azulado
Co	1	+ 0.3	- 1.4	Color rosa insignificante antes de adición de Morina.
Ni	1	- 0.2	- 2.5	Color verde insignificante antes de adición de Morina.
Mn	1	+ 2.2	+ 1.9	
Tl	1	+ 1.9	+ 1.0	
Mo	1	- 1.1	- 4.8	Color azul producido sobre adición de estanito.
W	1	0.0	0.0	Tungstato adicionado después del alcali.
Sn	1	- 0.4	-13.7	Ligeramente turbio
Sb	1	- 1.3	-17.6	Turbio
V	1	- 1.0	- 7.0	Color no visible
Cr	1	- 1.4	-69.7	Color de amarillo a verde sobre adición de estanito.
Ti	1	- 5.4	-47.8	Muy turbio
Ce	1	- 7.9	-55.0	Morina oxidada.
Pr	0.83	- 8.3	-39.1	
Nd	0.86	- 6.8	-32.5	Fluorescencia de Be azul verde
Sm	0.86	- 7.3	-35.5	apagado
U	1	-11.5	-74.7	Color café amarillento y precipitado de $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$.
F	30	+ 0.6	- 0.7	Agregado como 0.05 ml. de HF 48%
P	10	+ 0.1	- 1.9	Como ortofosfato.
P	1	0.0	- 3.0	Como pirofosfato.
P	5	- 0.1	-13.6	Como pirofosfato.
N	10	- 0.6	- 0.1	Como nitrato.

TABLA No. 3

Efecto del Pirofosfato en la extracción de Be con Acetilacetona.

	Condiciones	
1.- 0.5 ml. 85% H_3PO_4 (0.52 g. P_2O_5)	Sin ebullición.	
	Primera extracción con acetilacetona	83.9
	Segunda extracción	7.6
	Solución acuosa después de la extracción	<u>8.3</u>
	Balance de material	99.8
2.- 0.5 ml. H_3PO_4 85%	Hervido 15 minutos con 30 ml. de H_2O y 2 ml. de $HClO_4$ 72%.	
	Primera extracción con acetilacetona	99.0
	Segunda extracción	0.8
	Solución acuosa después de la extracción	<u>0.3</u>
	Balance de material	100.1
3.- 0.5 g. de $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ (0.16 g. P_2O_5)	Extracción regular	
	Primera extracción con acetilacetona	0.9
4.- 0.5 g. $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$	Hervido por 15 min. con 30 ml. de H_2O y 2 ml. de $HClO_4$ 72% o HCl conc.	
	Primera extracción con acetilacetona	99.9
	Segunda extracción con acetilacetona	0.4
	Solución acuosa después de la extracción	<u>0.0</u>
	Balance de material	100.3

5.- Cenizas de hueso; 1 gramo	Disuelto en HClO_4 y evaporada hasta bajo volumen. Hervido - 15 min. con H_2O pero sin ácido adicional.	
	Primera extracción con acetil-acetona.	31.2
6.- No. 5 excepto 2 ml. de HClO_4 72% agregando H_2O antes de la ebullición.	Primera extracción con acetil-acetona	99.6
7.- 0.2 g. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fundido con 2 g. de Na_2SO_4 y 1ml. de H_2SO_4 . Hervido 15 min. con - 1 ml. de H_2SO_4 y 30 ml. de H_2O	
	Primera extracción con acetil-acetona	52.9
	Segunda extracción con acetil-acetona	9.3
	Solución acuosa después de la extracción	<u>38.8</u>
	Balance de material	101.0
8.- No. 7, hervido con 2 ml. de HCl concentrado o HClO_4 y 30 ml. de H_2O	Primera extracción con acetil-acetona	99.2
	Segunda extracción con acetil-acetona	0.8
	Solución acuosa después de la extracción	<u>0.0</u>
	Balance de material	100.0

		71
9.- No. 7. No hirviendo con ácido después de la fusión.	Primera extracción con acetil-acetona	10.6
	Segunda extracción con acetil-acetona	1.4
	Solución acuosa después de la extracción	<u>88.3</u>
	Balance de material	100.3

TABLA No. 4

Distribución del Be en fracciones obtenidas en análisis de hueso y orina.

	Fracción	Recuperación, %	
		$10^{-4} \gamma$	2.5γ
Cenizas de hueso, 1 g.	Procedimiento de extracción directa		
	Primera extracción con acetilacetona	99.6	99.5
	Segunda extracción con acetilacetona	0.6	0.5
	Solución acuosa después de extracción	<u>0.0</u>	<u>0.0</u>
	Balance de materia	100.2	100.0
Cenizas de hueso, 10 g.	Principalmente CaSO_4 precipitado (14 gramos)	0.1	0.1
	Filtrado hasta precipitación $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$	0.3	0.4
	Segunda precipitación CaSO_4	0.04	0.03
	Primera extracción con acetilacetona	99.2	98.4
	Segunda extracción con acetilacetona	0.6	1.0
	Solución acuosa después de la extrac ción	<u>0.03</u>	<u>0.3</u>
	Balance de materia	100.3.2-100.0	
1500 ml. orina	Filtrado de la precipitación Ca_3 $(\text{PO}_4)_2$	0.2	0.3
	Precipitado perdido si sobrenada al decantar	4.1	4.5 ^a
	CaSO_4 precipitado	0.07	0.08
	Primera extracción con acetilacetona	93.8	93.1
	Segunda extracción con acetilacetona	2.3	1.6
	Solución acuosa después de la extrac ción	<u>0.03</u>	<u>0.3</u>
	Balance de material	100.6	99.8

^a Solución reposada solamente 30 min. y decantada en caliente

TABLA No. 5

COMPOSICION DE MEZCLAS USADAS PARA EL ESTUDIO DE LA REACCION Be-Mo

No. de Series	No. de Soluciones	Be _o	Mo
1	10	4.435×10^{-4}	De 2.366×10^{-8} a 2.366×10^{-5}
2	12	2.251×10^{-5}	de 5.915×10^{-7} a 5.915×10^{-5}
3	21	de 2.251×10^{-8} a 2.218×10^{-3}	2.366×10^{-5}
4a	7	4.435×10^{-4}	de 0 a 1.183×10^{-8}
4b	7	4.435×10^{-4}	de 0 a 7.098×10^{-9}
4c	2	4.435×10^{-4}	2.366×10^{-9} 1.183×10^{-8}
5a	11	de 0 a 4.435×10^{-4}	7.098×10^{-9}
5b	11	de 0 a 4.435×10^{-4}	1.183×10^{-8}

TABLA No. 6
 FLUORESCENCIA DE TESTIGOS Y MUESTRAS E INDICE DE SENSIBILIDAD
 COMO FUNCIONES DEL pH.

pH Calculado	Fluorescencia, μa .		ΔF	ΔF F Testigo
	Testigo	Muestra		
11.0 ^a	0.042	0.047	0.005	0.12
11.5 ^a	0.045	0.052	0.007	0.16
12.0 ^a	0.043	0.051	0.008	0.19
12.6 ^a	0.044	0.052	0.008	0.18
13.0	0.036	0.044	0.008	0.22
13.0	0.036	0.045	0.007	0.19
13.3 ^b	0.028	0.034	0.006	0.21
13.5 ^b	0.023	0.026	0.003	0.13
13.6 ^b	0.019	0.022	0.003	0.14
13.7 ^b	0.017	0.017	0	...
13.8 ^b	0.015	0.016	0.001	0.07
13.9 ^b	0.013	0.013	0	...

(a) Morina conc. 2.058×10^{-5}

(b) Morina conc. 3.549×10^{-8}

TABLA No. 7

RECUPERACION DE BERILIO DE LA ORINA.

MUESTRA (ml.)	TOMADOS, g	RECUPERADO, g
200	5.0, 5.0	4.7, 4.8
100	1.0	1.0
100	0.10	0.103 ± 0.009^a
100	0.020	0.021 ± 0.004^b
1000	TOMA LIBRE DE Be (4300 ± 65 cpm)	4224 ± 65 cpm

^a DESVIACION STANDARD (9 variables)

^b DESVIACION STANDARD (7 variables)

TABLA No. 8

ANALISIS FLUOROMETRICO DE SUERO SANGUINEO

MUESTRA	<u>CALCIO ANALIZADO (mg./100 ml.)</u>	
	METODO PRESENTE ^a	RESULTADOS CLINICOS ^b
1	10.4 ± 0.1	10.4
2	9.4 ± 0.05	9.4
3	9.3 ± 0.1	9.4
4	9.4 ± 0.05	9.4
5	9.3 ± 0.1	9.2
6	10.3 ± 0.1	10.2
7	8.8 ± 0.0	8.8
8	9.9 ± 0.1	10.0
9	10.5 ± 0.1	10.6*
10	11.5 ± 0.1	11.6
11	11.5 ± 0.1	11.6
12	7.9 ± 0.1	7.8
13	9.7 ± 0.05	9.8
14	8.8 ± 0.0	8.8
15	9.2 ± 0.1	9.1 ^c
16	11.7 ± 0.2	11.9 ^d

^a LOS ANALISIS FLUOROMETRICOS FUERON HECHOS USANDO MUESTRAS DE 20 L. DE SUERO SANGUINEO. LOS DATOS PRESENTADOS SON PARA UN MINIMO DE TRES DETERMINACIONES EN CADA MUESTRA. LA PRESI--CION ES REPORTADA COMO DESVIACION STANDARD.

^b LOS RESULTADOS CLINICOS FUERON OBTENIDOS PCR FLAMOMETRIA--LCS DATOS PRESENTADOS SON PROMEDIO DE ALGUNAS DETERMINACIONES EN CADA MUESTRA.

^c VALOR FIJO 9.1 mg/100 ml.; RANGO ACEPTABLE 11.5 A 12.3 mg/100 ml.

^d VALOR FIJO 11.9 mg/100 ml.; RANGO ACEPTABLE 11.5 A 12.e - mg/100 ml.

TABLA No. 9

Comparaciones de valores para Cadmio después de la Separación^a
del intercambio de iones.

	Cadmio tomado (std) (μg)	Cadmio encontrado ^b (mix) (μg)	% Recuperación
1	0.120	0.118	98
2	0.560	0.568 ^c	99
3	0.560	0.561 ^c	100
4	0.560	0.561 ^c	100
5	0.560	0.588 ^c	105
6	0.560	0.588 ^c	105
7	1.120	1.09	98

^aLas muestras estandar se supusieron con 100% de recuperación, las mezclas fueron comparadas con los estandares y el % de recuperación fue calculado de la comparación de los resultados.

^bLa medición de fluorescencia de Cd^{2+} de mezclas es comparada a la fluorescencia de Cd^{2+} de standards corregidos por testigos de fluorescencia de Calceina. Los estandares de Cadmio y mezclas fueron preparados por dilución después del intercambio de iones de 5×10^{-6} M Cd^{2+} .

Calceina: 1 ml. de 2×10^{-4} M agregado a cada solución de Cd^{2+}
em = 520, ex = 490.

^cLa cantidad de Cadmio encontrada en las corridas 2-6 producen las siguientes estadísticas: $\bar{x} = 0.573$, $\sigma = 0.013$ y % de desviación relativa = 2.3%.

TABLA No. 10

Absorbancia de Galio-Salicilideno-o-Aminofenol
a 408 m μ como una función de pH y tiempo

Absorbancia

pH	24 h	72 h	96 h
2.15	0.000	0.013	0.013
3.05	0.050	0.058	0.058
3.60	0.520	0.520	0.520
4.00	0.990	0.990	0.980
4.40	1.040	1.052	1.030
5.00	0.985	1.050	1.023

TABLA No. 11

Fluorescencia de Magnesio-0,0'-dihidroxi azobenceno
 Afectado por la Presencia de Varios Alcoholes.

Vol. alcohol en 50	Alcohol Metílico	Alcohol Etilico	Alcohol Isopropilico	Alcohol Butílico + Alcohol Etilico	Alcohol Isoamílico + Alcohol Etilico
35	83.5	85	73.5		79(15 + 20) ^b
30	90	73	73	70.5(15 + 15) ^a	70.5(10 + 20)
				71.5(10 + 20)	73(5 + 25)
25	65.5	65.5	61.5	64(5 + 20)	
20	55	56.5	54.5		
15	40.5	45	46.5		
10		36			
5		29.5			
0		22.5			

^a Volumen de alcohol butílico mas volumen de alcohol etílico.

^b Volumen de alcohol isoamílico mas volumen de alcohol etílico.



TABLA No. 12

Determinación Fluorométrica de Magnesio en Presencia de Varios Iones Metálicos

Mg tomado, μg	Interferencia	Mg encontrado	Diferencia μg
20	1 mg. Be	19.2	-0.8
20	10 mg. Sr	20.4	+0.4
20	0.1 mg. Mn	14.0	-6.0
20	1 mg. Al ^a	21.6	+1.6
20	0.1 mg. Al ^a	20.6	+0.6
20	1 mg. Cu ^a	19.1	-0.9
20	1 mg. Zn ^a	19.7	-0.3
20	1 mg. Fe ^a	19.9	-0.1
20	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{NaCl}$ ^b	20.0	0.0

^a Tratamiento apropiado para la interferencia aplicada de acuerdo con el - procedimiento recomendado.

^b Cantidad equivalente a 8 mg de mezclas de fusión usada en análisis de - las muestras N.B.C.

TABLA No. 13

Determinación Espectrofotométrica de Magnesio en
Presencia de Varias Sustancias Interferentes

Mg tomado, μg	Interferencia Sumada	Mg encontrado, μg	Diferencia, μg
100	nada	99.0	-1.0
100	nada	98.2	-1.8
100	0.1 mg Zn ^a	97.7	-2.3
100	0.1 mg Cu ^a	98.2	-1.8
100	1.0 mg Sr	99.0	-1.0
100	1.0 mg Be	97.5	-2.5
100	10 mg Ba	97.7	-2.3
100	15 mg Li	97.5	-2.5
100	10 mg Mn	81.5	-18.5
100	10 mg KH ₂ PO ₄	94.2	-5.8
100	2 μg Mn	94.5	-5.5
80	1 mg Fe ^a	86.0	+6.0
20	0.25 mg Fe ^a	21.0	+1.0

^a Tratamiento apropiado para la interferencia aplicada de acuerdo al procedimiento para análisis de agua.

Determinación Fluorométrica de Magnesio
en Suero después de Varios Tratamientos

Tratamiento de Suero

Con ácido tricloroacético en alcohol isopropílico		Con ácido tricloroacético Ceniza en alcohol isopropílico húmeda		Con ácido tricloroacético en alcohol precipitado, ceniza húmeda.
µg. Mg/ml.	No tratado µg. Mg/ml	µg. Mg/ml.	µg. Mg/ml	µg. Mg/ml.
26.3, 25.6	26.3, 26.3	32.5, 24.7	25.0, 23.0	0.34
31.1, 32.5	31.6, 31.6	23.0, 19.0	21.0, 29.0	0.00
15.8, 15.8	14.1, 16.0			
18.0, 18.0	14.8, 18.2			
12.4, 14.1	15.3, 15.3			
17.2	17.2			
37.6	37.6			
26.8	26.8			
22.8	22.1			
22.1	21.5			

^a Ceniza húmeda hecha con una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico.

^b Precipitado lavado cinco veces con una mezcla de ácido tricloroacético y alcohol isopropílico antes de la ceniza húmeda.

TABLA No. 15

Fluorescencia de ciertos Azo compuestos solos y en presencia de Magnesio y Calcio

Compuesto	Compuesto			Compuesto + Magnesio			Compuesto + Calcio			Relación de Inten- sidades Mg/Ca
	Max. Ex., ^a m μ	Max. Fl., ^b m μ	Intensidad Relativa	Max. Ex., ^a m μ	Max. Fl., ^b m μ	Intensidad Relativa	Max. Ex., ^a m μ	Max. Fl., ^b m μ	Intensidad Relativa	
B-1	328	412	0.5	480	578	0.04	480	578	0.006	6.7
B-2	d	468	580	0.22	468	580	0.013	17
B-3	d	466	558	0.13	466	558	0.002	60
B-6 ^e	288	404	0.2	428	548	0.12	428	548	0.06	2
B-6 ^f				402	520	0.82	402	515	1.62	0.5
B-6 ^g				472	580	0.04	472	580	0.002	20
B-7	290	412	2.8
	360	424	1.0	520	596	0.04	520	596	0.003	13.5

TABLA No. 16

Absorbancia de Indio-Salicilicideno-o-Aminofenol a 408 $m\mu$ como una función de pH y Tiempo.

Absorbancia

pH	24 h	48 h	72 h	96 h
4.05	0.050		0.127	
4.45	0.069		0.182	
4.78	0.148		0.237	
5.00	0.345	0.375	0.400	0.435
5.20	0.142		0.217	
5.42	0.116		0.182	
5.60	0.103		0.170	
5.82	0.107		0.181	

TABLA No. 17

SEPARACION DE TORIO CON SOLUCION LAVADORA DE EDTA - NITRATO DE ALUMINIO (1 + 3 V/V) (pH 1.5)

EXPRESADO COMO TORIO, g

CANTIDAD INICIAL DE TORIO EN FASE ACUOSA	0.478
TORIO EXTRAIDO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE Et.	0.248
TORIO SEPARADO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETI-	
LO DESPUES DEL PRIMER LAVADO	0.035
DESPUES DEL SEGUNDO LAVADO	0.004
DESPUES DEL TERCER LAVADO	NADA

TABLA No. 18

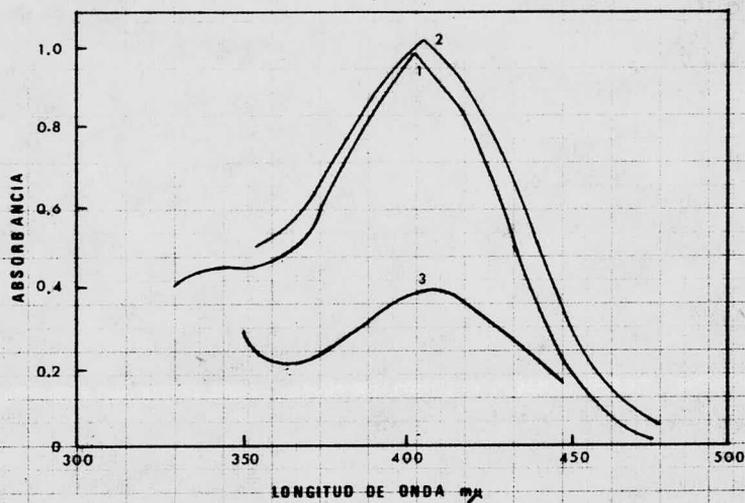
RECUPERACION DEL URANIO AÑADIDO A LA MUESTRA DE NITRATO DE TORIO.

URANIO AÑADIDO, g	URANIO ENCONTRADO, g	INTERVALO
NADA	0.04, 0.06, 0.06, 0.05, 0.06 ^a	0.05±0.01
0.1	0.10, 0.11, 0.10, 0.11, 0.11 ^b	0.105±0.005
1.0	1.01, 1.05, 0.98, 1.00, 1.05 1.02, 0.95, 1.03, 1.01, 1.00 1.05, 1.01, 0.98 ^b	1.01±0.02

^a VALORES OBTENIDOS DESPUES DE LA CORRECCION CON EL TESTIGO

^b VALORES OBTENIDOS DESPUES DE LA CORRECCION CON LA MUESTRA TESTIGO.

GRAFICA No.1



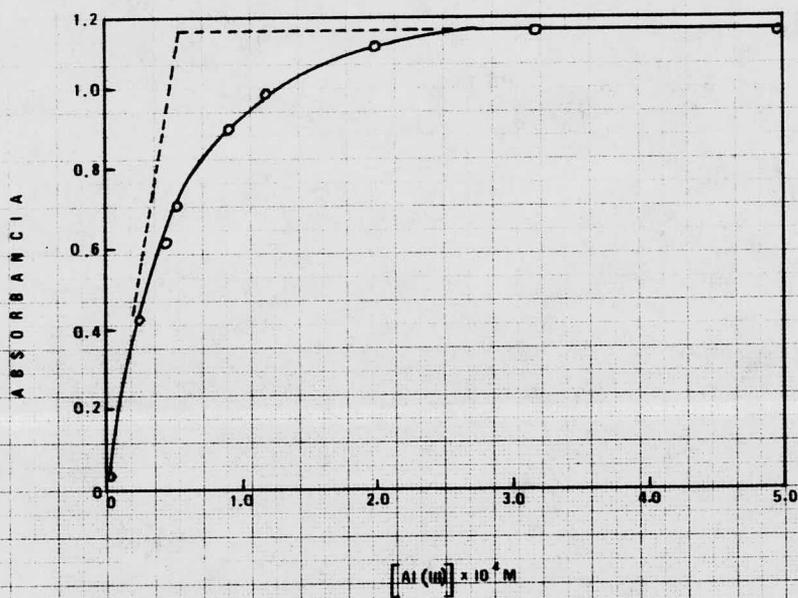
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LOS QUÉLATOS DE SAUCÍLIDENO-O-AMINDFENOL
DE ALUMINIO GALIO E INDIO, $SAF \cdot 10^{-4} M$, $METAL \cdot 10^{-4} M$.

Curva 1.- Al (III), pH = 5.0

Curva 2.- Ga (III), pH = 4.5

Curva 3.- In (III), pH = 5.0

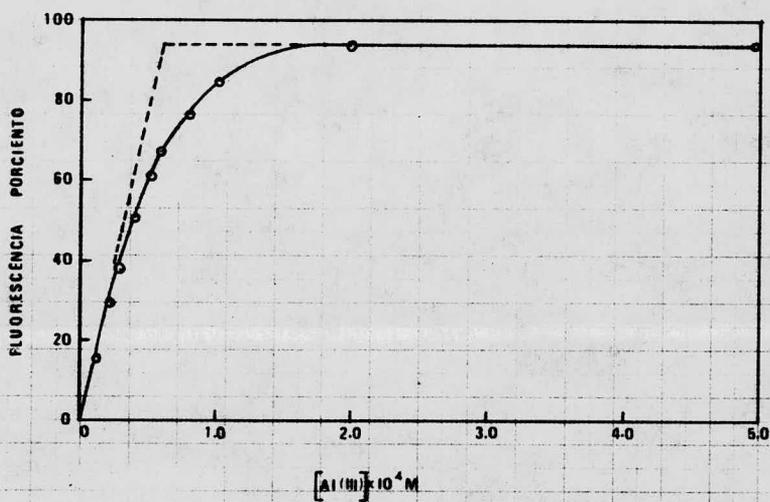
GRAFICA No.2



RELACION ESPECTROFOTOMETRICA MOLAR DE ALUMINIO-SALICILICO-O-AMINOFENOL

SAP $1 \times 10^{-4} M$, pH=5.405 m μ (96 hs despues de preparado).

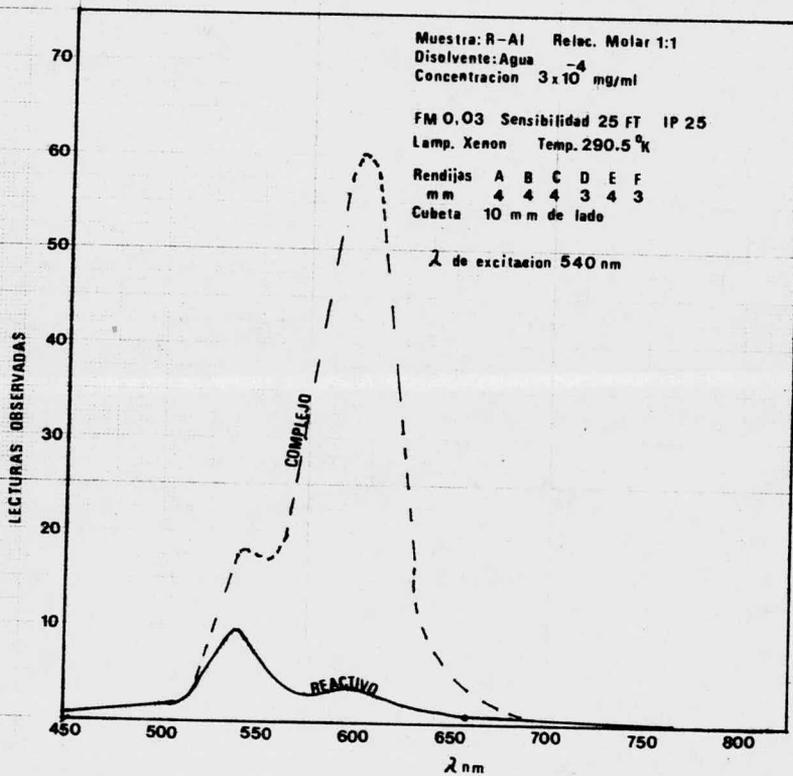
GRAFICA No.3



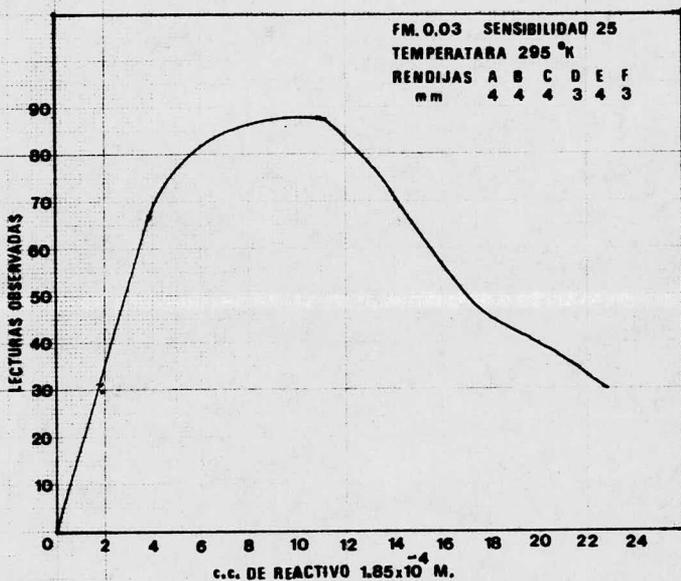
RELACION FLUORESCENCIA MOLAR DE ALUMINIO-SALICILIDENO-O-AMINOFENOL.

SAP $1 \times 10^{-4} M$; pH = 5; 507 μ (96 hs después de preparado)

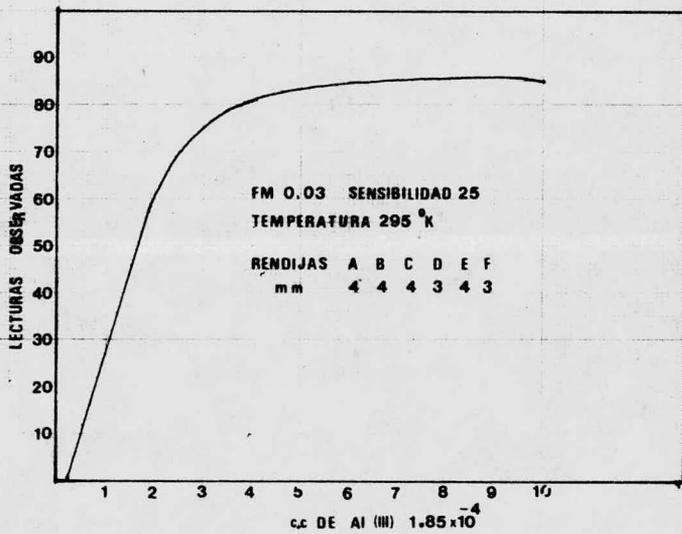
GRAFICA No.4



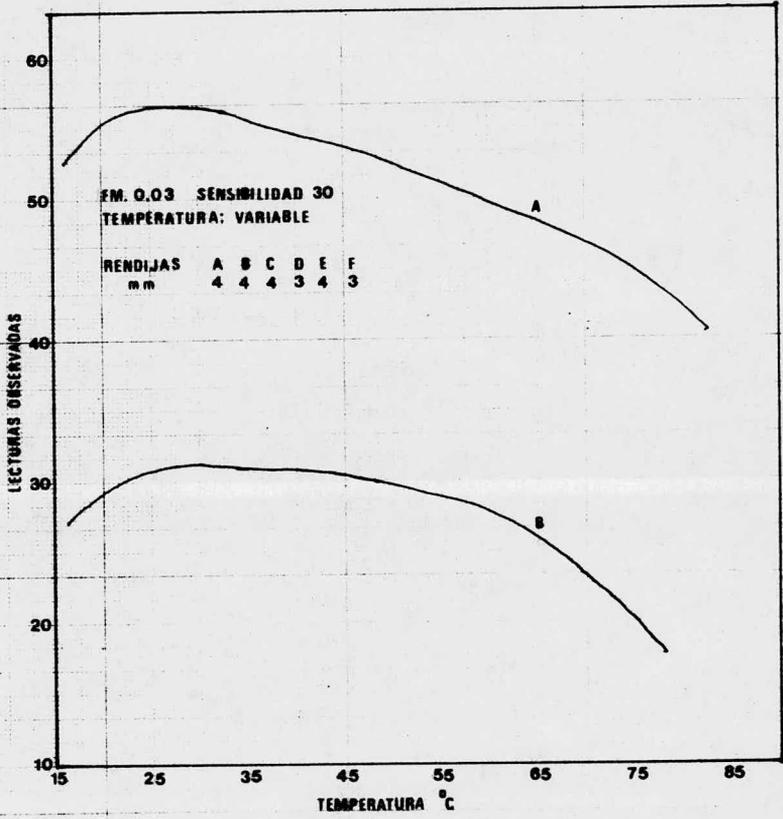
GRAFICA No. 5

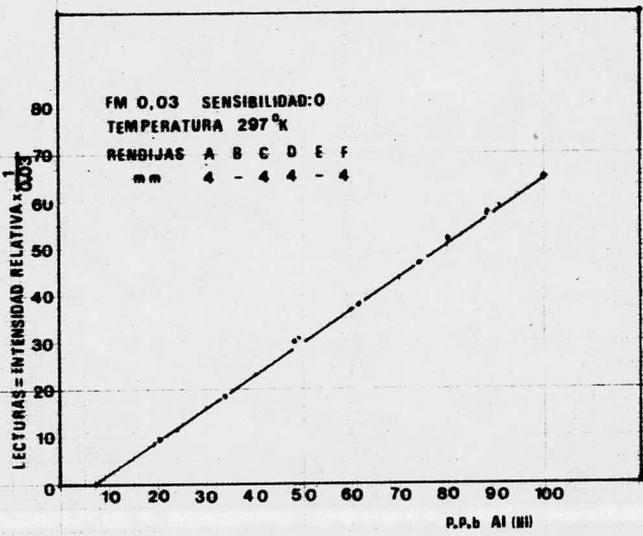


GRAFICA No. 6



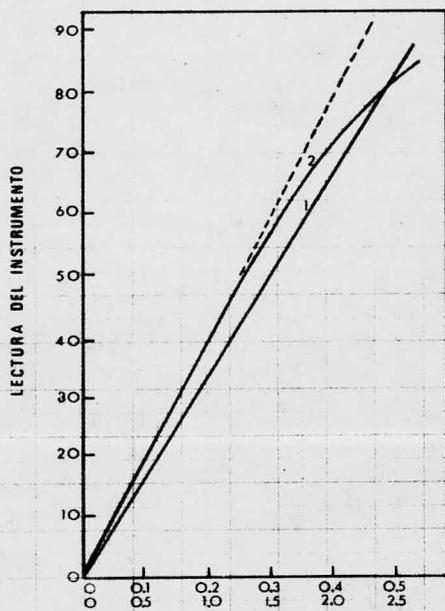
GRAFICA No. 7





GRAFICA No. 8

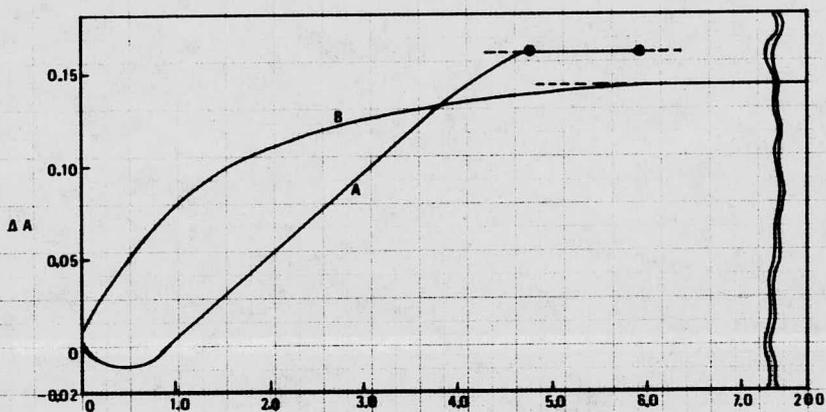
GRAFICA No. 9



RELACION ENTRE FLUORESCENCIA Y CONCENTRACION
DE BERILIO

1-Be 0.57; 2-0.25

GRAFICA No.10

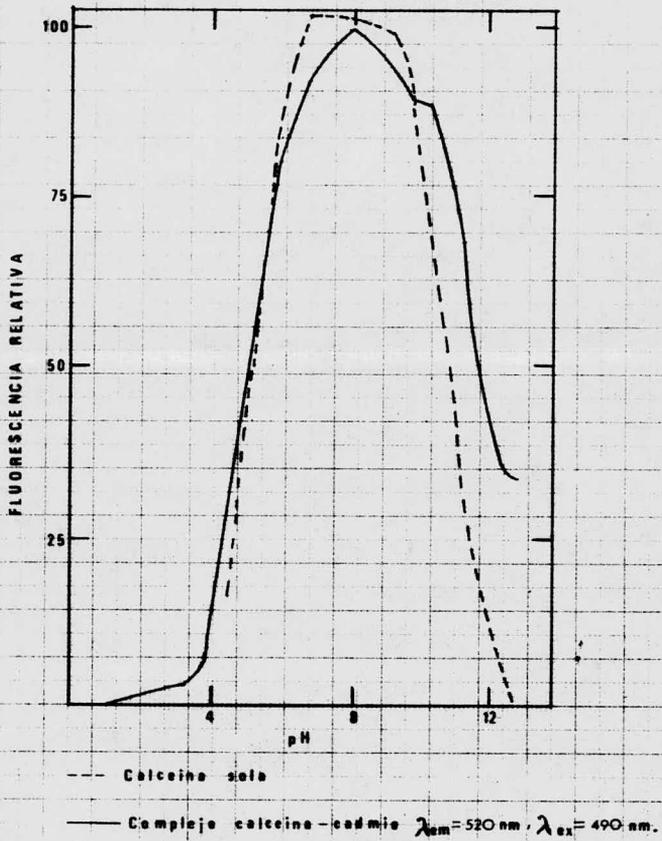


DIFERENCIA DE ABSORBANCIA PARA TESTIGOS A 443 nm.

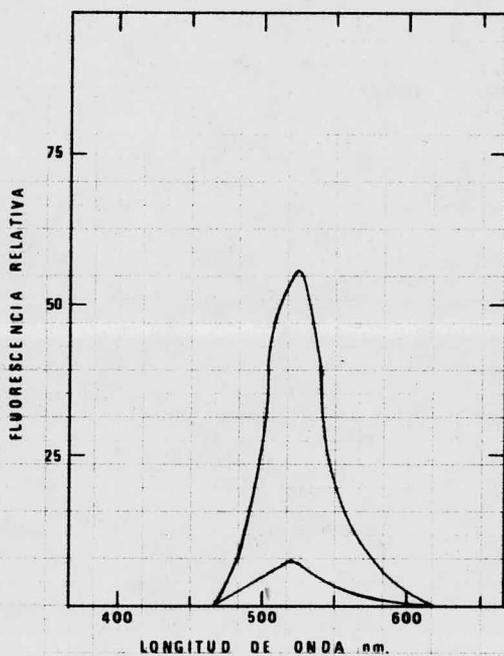
Curva A series 2 ($Bc_0 = 2.251 \times 10^{-3} M$)

Curva B series 3 ($M = 2.346 \times 10^{-6} M$)

GRAFICA No.11



GRAFICA No.12

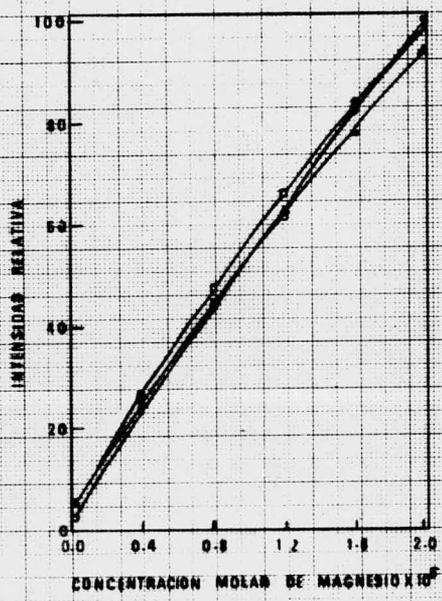


CAMBIOS EN FLUORESCENCIA A pH 13.3

Curva superior: Complejo calceína—cadmio.

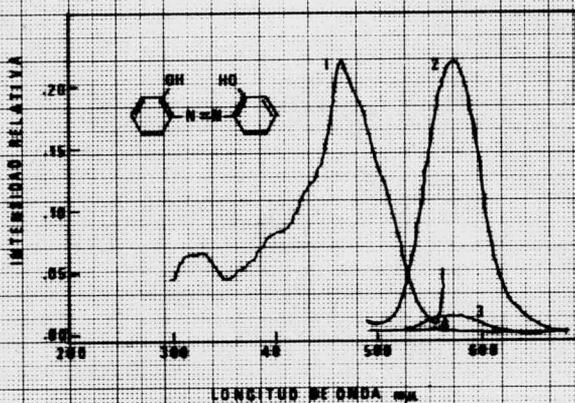
Curva inferior: Calceína sola. Calceína: 2×10^{-6} M. Cd: 1×10^{-7} M.

GRAFICA No. 13



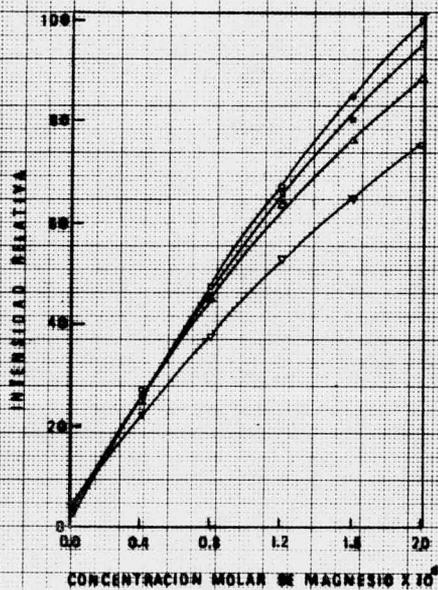
CURVAS DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE MAGNESIO EN PRESENCIA DE CALCIO USANDO AGUA COMO SOLVENTE

GRAFICA No. 14



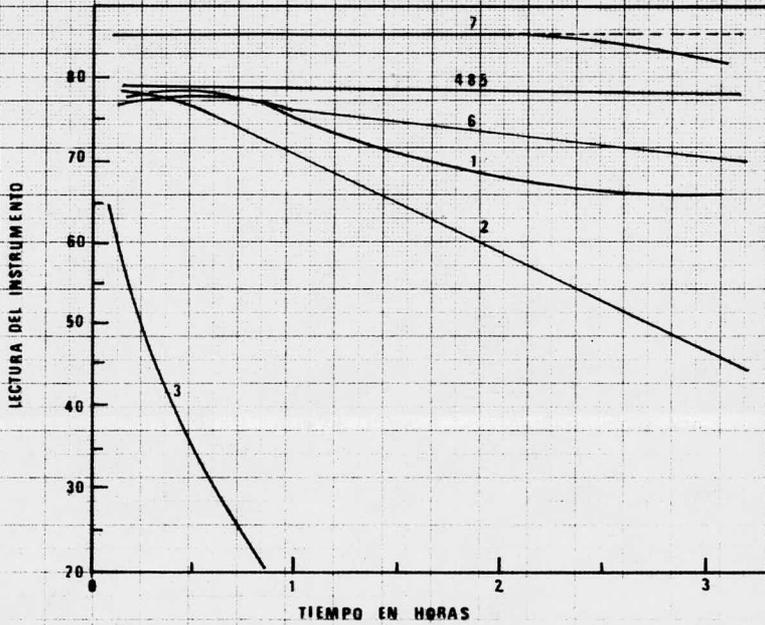
ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE SOLUCION $2 \times 10^{-5} M$
 DE O_2 DIHIDROXIAZOBENCENO EN HCl $0.1 N$ A PH 11.8

GRAFICA No. 15



CURVAS DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION
FLUOROMETRICA DE MAGNESIO EN PRESENCIA DE CAL
CIO USANDO ALCOHOL ISOAMILICO COMO SOLVENTE.

GRAFICA No. 16



EFECTO CATALITICO DEL COBRE EN LA OXIDACION DE LA MORINA POR EL AIRE

C O N C L U S I O N E S

La Fluorescencia como técnica de análisis, es el más sensitivo de todas los métodos espectrofotométricos, con una sensibilidad mil veces mayor que la de los otros métodos.

La sensibilidad de los métodos fluorescentes puede detectar concentraciones tan bajas como una parte en diez billones; por lo cual se tomó en consideración para nuestro estudio, es decir por la posibilidad de detectar con exactitud trazas de algunos compuestos.

Para efectuar los análisis fluorométricos se requiere que los analistas tengan cierta habilidad para manipular las sustancias que intervienen en las determinaciones, porque se ha visto que el medio ambiente es una de las principales desventajas de éste método.

Tomando como ejemplo la temperatura, al efectuar la lectura en el fluorometro, si esta no se encuentra dentro del intervalo específico señalado por la técnica, obtendremos lecturas erróneas, lo cual nos conduce a un cálculo inexacto de la concentración. De igual manera se debe tomar en cuenta el pH y la presencia de iones extraños.

La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de las especies sólo en soluciones diluídas sobre una región muy limitada. En concentraciones muy reducidas (inferiores a 10^{-4} M); la eficiencia de fluorescencia, es decir,

la proporción de fluorescencia con la radiación absorbida, de la mayoría de las sustancias fluorescentes, es constante con la concentración y casi igual a uno. En esta región, la intensidad de fluorescencia será una medida de la concentración.

Las bases para el fenómeno de la fluorescencia son primeramente la excitación de las especies, a un nivel electrónico superior, mediante radiación electromagnética, seguida de una pérdida de parte de la energía suplementaria por medio de colisiones, y a continuación radiación después de un período muy corto de menos energía a la que fue absorbida. Las especies fluorescentes deben ser expuestas a la radiación que promoverá las transiciones electrónicas antes de que la fluorescencia pueda registrarse. Puesto que esta radiación ocurre frecuentemente en la región ultravioleta, existe una posibilidad definida de promover reacciones fotoquímicas indeseables.

B I B L I O G R A F I A

- (1).- Saylor J.H.; Anal. Chim. Acta. 30 (1964) - 427-433.
- (2).- Berg R; Z. Anal. Chem; 71 (1927) 369.
- (3).- F. Capitan, M. R. y E. Alvarez, M., Julio-- Agosto Afinidad 1973.
- (4).- Bonner, J.F., Jr., U.S. Atomic Energy Comm. Rept. UR-111 (April 1950).
- (5).- Blaedel, W.J., Knight, H.T., Anal. Chem. 26, 741 (1954).
- (6).- Welford, G., Harley, J., Am. Ind. Hyg. - - Assoc. Quart. 13, 4(1952).
- (7).- Fletcher, M.H., Anal. Chem. 37, 550 (1965).
- (8).- Milkey, R.G., Fletcher, M.H., J. Am. Chem.- Soc. 79, 5425 (1957).
- (9).- Fletcher, M.H., Anal. Chem. 35, 288 (1963).
- (10).- Fletcher, M.H., Anal. Chem. 35, 278 (1963).
- (11).- B. Budesinsky And T. S. West., Talanta, - - 1969, Vol. 16 pp 399 to 406.
- (12).- B.L. Kepner and D.M. Hercules., Analytical- Chemistry Vol. 35, No. 9, August 1963 pp - 1238 to 1240.

- (13).- Phillips, Robert E, G.K. Turner Associates, Palo Alto Calif., Private Communication, 1963.
- (14).- Hefley, A.J. and Jaselskis, B. Anal. Chem. Vol. 46, No. 13 Nov., 1974.
- (15).- R.E. Phillips and F.R. Elevich, "Manual of-Fluorometric Chemical Procedures", G.K. Turner Associates, Palo Alto Calif., 1966.
- (16).- K.A. Kraus and C.E. Moore. J. Amer. Chem. - Soc., 75 1460(1953).
- (17).- E.A. Bozhevol'nov and S.U. Kreingold, Zh. - Anal. Khim 17, 291 (1962), J. Anal. Chem., - USSR, 17, 294 (1962).
- (18).- H. Diehl, "Calcein, Calmegite and O, O'-Di-hydroxyazobencene. Titrimetric, Colorime- - tric and Fluorometric Reagents for Calcium- and Magnesium, "G.F. Smith Company, Colum- - bus, Ohio, 1964.
- (19).- E. Gastingen, Z. Anal. Chem. 126 (1943) 373.
- (20).- J.W. Ledbetter, Ph: D. Thesis, Duke Univer- sity, 1962.
- (21).- Diehl, H. Olsen, R. Anal. Chem. Vol. 35, 9, (1963), 1144-1154.
- (22).- Willstätter, R., Benz., M., Ber, Deut. Chem. Ges. 39, 3492 (1905).