

00577 1  
2y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETERMINACION POLAROGRAFICA DE  
VITAMINA B<sub>12</sub> EN PREPARADOS  
MULTIVITAMINICOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(QUIMICA ANALITICA)

P R E S E N T A :

ENEDINA BENITEZ LOPEZ

México, D. F.

TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN

1991



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 está 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.

## INDICE

I.-INTRODUCCION .....	1
1.-Antecedentes .....	1
2.-Objetivo.....	4
II.-GENERALIDADES.	
1.-Estructura y propiedades de la vitamina B <sub>12</sub> .....	5
1.1.-Estructura de la vitamina B <sub>12</sub> .....	5
1.2.-Propiedades de la vitamina B <sub>12</sub> .....	6
1.2.1.- Propiedades físicas.....	6
1.2.2.- Propiedades fisicoquímicas.....	8
2.- Estructura y propiedades de otras vitaminas del complejo B.	
2.1.-Tiamina.....	10
2.2.-Riboflavina.....	11
2.3.-Nicotinamida.....	13
2.4.-Piridoxina.....	14
3.- Métodos de determinación de vitamina B <sub>12</sub>	
3.1.- Metodos microbiológicos.....	15
3.2.-Métodos espectrofotométricos.....	16
3.3.-Métodos cromatográficos.....	18
3.3.1.-Cromatografía en capa delgada.....	18
3.3.2.-Cromatografía de líquidos de alta presión.....	18
3.4.- Métodos electroquímicos.....	18
III.-TRABAJO EXPERIMENTAL.	
1.- Determinación polarográfica de la vitamina B <sub>12</sub> .....	
1.1.-En medio K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1M.....	20
1.1.1.-Polarografía clásica .....	20
1.1.2.-Polarografía diferencial de impulsos....	27
1.2.-En medio K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1 M.+ KCN 0.01 M.....	32

1.2.1.-Polarografía clásica.....	32
1.2.2.-Polarografía diferencial de impulsos....	35
1.3.- En medio fosfato 0.4 M, pH=6.9.....	44.
1.3.1.- Polarografía clásica.....	44
1.3.1.1.-Dominio de electroactividad.....	44.
1.3.1.2.-En medio citrato a pH =6.9.....	44
1.3.1.3.-Tipo de máximo .....	44.
1.3.1.3.1.-Máximo de primera clase.....	44
1.3.1.3.2.-Máximo de segunda clase .....	44
1.3.1.3.3.-Máximo catalítico.....	45
1.3.2.- Polarografía diferencial de impulsos....	51.
1.3.3.-Relación de la altura de pico con la concentración.....	51
1.3.4.- Datos estadísticos.....	51
1.4.- Discusión.....	55
1.4.1.-Resultados.....	55
1.4.2.-Limitaciones y conveniencias de cada medio.	
1.4.2.1.-En medio sulfato de potasio 0.1 M.....	55
1.4.2.2.-En medio $K_2SO_4$ 0.1 M + KCN 0.01 M.....	56
1.4.2.3.-En disolución amortiguadora de fosfatos 0.4 M pH=6.9.....	57
2.- Determinación polarográfica de otras vitaminas del complejo B.....	58
2.1.-En medio $K_2SO_4$ 0.1 M.....	58
2.2.-En medio fosfato 0.4 M ,pH = 6.9.....	68
2.3.-Tabla de valores de $E_{1/2}$ y $E_p$ de las diferentes vitaminas del complejo B.....	78
2.4.-Métodos electroquímicos propuestos en la literatura para las vitaminas del complejo B.....	79
2.5.-Conclusiones.....	81

3.- Separación cromatográfica de la vitamina B <sub>12</sub>	
3.1.-Introducción.....	82
3.2.-Lote piloto.....	82
3.3.-Técnica.....	83
3.3.1.-Reactivos.....	83
3.3.2.-Preparación de la resina.....	84
3.3.3.-Proceso de separación.....	84
3.3.4.-Bases teóricas de la técnica de separación.....	87
3.3.5.-Estudios sobre el eluyente.....	89
3.3.6.-Comprobación de la efectividad de la separación.....	92
4.-Determinación polarográfica de la vitamina B <sub>12</sub>	
4.1.-Base teórica.....	93
4.2.-Condiciones de trabajo.....	93
4.3.-Técnica experimental.....	94
4.3.1.- Reactivo.....	94
4.3.2.- Técnica.....	94
4.4.-Estudio de la interferencia de la matriz en la curva polarográfica .....	98
4.5.-Estudio de la efectividad de la separación.....	103.
4.6.-Discusión.....	104
5.-Aplicación analítica.....	109
5.1.-Aplicación a muestras comerciales.....	109
5.1.1.-Determinación en VITAFORTE.....	109
5.1.2.-Determinación en IBEROL.....	112
6.- Discusión.....	115

#### IV.-ANEXOS

Métodos analíticos utilizados para la determinación de vitamina B<sub>12</sub> en el presente trabajo.

##### Anexo 1

1.-Método de separación.....	116
1.1.-Cromatografía de intercambio iónico.....	116
A)Hinchamiento.....	118
B)Absorción.....	119
c)Intercambio iónico.....	123
1.2.-Cromatografía por absorción líquido- sólido.....	127
1.2.1.-Conceptos generales.....	127
1.2.2.-Clasificación.....	127
1.2.3.-Teoría del equilibrio.....	128
1.2.4.-Parámetros que influyen en el valor de K.....	129
1.2.5.-Adsorbente.....	130
1.2.6.-Fase móvil.....	131
1.2.7.-Migración de banda y estructura molecular.....	132
1.3.- Columnas de intercambio.....	133
1.3.1.-Características de las columnas.....	133
1.3.2.-Modalidades de uso de las columnas.....	134
A) Permutación.....	134
Eficiencia de una columna.....	134
B) Resolución.....	137

##### Anexo 2

2.-Métodos de cuantificación.....	140
2.1.-Polarografía clásica.....	140
2.1.1.-Introducción.....	140
2.1.2.-Conceptos generales.....	143

A)Capacitancia y corriente faradáica....	143
B)Corriente límite de difusión.....	145
C)Leyes de difusión estacionaria.....	147
D)Ecuaciones de las curvas intensidad- potencial.....	150
E)Cinética de las reacciones al electrodo.....	151
F)Corriente límite controlada por adsorción.....	155
2.1.3.-Máximo polarográfico.....	161
2.1.3.1.-Máximo de primera clase.....	161
2.1.3.2.-Máximo de segunda clase.....	161
2.1.3.3.-Otras clases de máximo.....	162
2.1.3.4.-Propiedades de la corriente catalítica.....	164
2.1.4.-Procesos de electrodo y su naturaleza..	167
A)Reversibilidad electroquímica y química.....	168
B)Clasificación de reacciones.....	170
C)Adsorción, formación de película y otros fenómenos de superficie.....	174
2.1.5.-Características analíticas del método..	176
2.2.-Polarografía normal de impulsos.....	179
2.3.-Polarografía diferencial de impulsos.....	184
2.3.1.-Características analíticas del método..	188
 Bibliografía .....	 190

## I INTRODUCCION.

### 1.- Antecedentes.

La determinación de vitamina  $B_{12}$  en compuestos multivitamínicos presenta considerables problemas analíticos debido al nivel de concentración tan bajo en que se encuentra en relación a otras vitaminas tales como : tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina.

Los métodos más usados para la determinación de la vitamina  $B_{12}$  son :

a) el microbiológico (método oficial recomendado por la U.S.P. XXII) en el que se usan *Lactobacillus Leichmanni*. En este método se mide espectrofotométricamente la turbidez de los cultivos (1)

b) el fisicoquímico que emplea una determinación espectrofotométrica en la región del visible en medio cianuro.

De acuerdo con J. Van Melle (2) este último método es más rápido y más preciso que el microbiológico en la determinación de la vitamina  $B_{12}$  presente en extractos de hígado. Para evitar las posibles interferencias de sustancias coloridas se recomienda una previa separación de la vitamina  $B_{12}$ .

Sin embargo, debido a que la vitamina  $B_{12}$  presenta propiedades óxido-reductoras y es una especie electroactiva al electrodo de gota de mercurio, los métodos electroquímicos presentan una alternativa interesante para su cuantificación.

En relación a la aplicación de métodos electroquímicos en la determinación de la vitamina  $B_{12}$  hay pocos trabajos

publicados en la literatura con fines analíticos. La mayoría de ellos se orientan al estudio del comportamiento electroquímico de la vitamina B<sub>12</sub> en diferentes medios y con diferentes electrodos. K.H. Fantes et al. (3) informan la presencia de una onda catalítica con un E 1/2 de -1.53 v/ESC en disoluciones neutras la cual está perturbada por un máximo de corriente. El valor del potencial de 1/2 onda y la altura dependen del pH de la disolución. Asimismo, encuentran una relación lineal entre la concentración de la vitamina y la altura del máximo en un intervalo de concentración comprendido entre 0.005 y 0.02 µg/ml en disoluciones amortiguadoras de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0.025 M a pH 7.4. Diehl y colaboradores (4) investigaron el comportamiento de la vitamina B<sub>12</sub> al electrodo de gota de mercurio en disoluciones básicas de cianuro. Observaron una sola onda en medio cianuro de potasio 0.1M. Esta onda implica un intercambio de dos electrones, de cianocobal(III)amina a cianocobal(I)amina y presenta un E 1/2 de -1.33v/ESC. El grado de oxidación del cobalto pasa de 3 a 1.

Jaselskis y Diehl (5) observaron el comportamiento polarográfico de las vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>12</sub><sup>a</sup> ( nota 1 ) y B<sub>12</sub><sup>r</sup> en disoluciones 0.1 M de sulfato de potasio, y se obtuvieron los siguientes valores de potencial de 1/2 onda.

vitamina	E 1/2 v/E.S.C.
B <sub>12</sub>	-1.11
B <sub>12</sub> <sup>r</sup>	-0.04(anódico)-0.95, -1.55
B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	-0.06                      -1.02

R.I. Birke, G.A. Brydon y M.F. Boyle (6) aplicaron las técnicas de polarografía, voltamperometría cíclica y potenciometría para el estudio de las vitaminas B<sub>12</sub><sup>a</sup> y B<sub>12</sub><sup>r</sup> en medio de sulfato de sodio ( a diferentes valores de

pH) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.43). Afirman que en medio sulfato de sodio 1M el polarograma de la vitamina  $\text{B}_{12}^a$  presenta dos ondas catódicas correspondientes cada una al intercambio de un electrón y una onda catalítica de hidrógeno a un potencial más negativo que -1.3 v/E.S.C. La primera onda que aparece a un potencial entre 0.04 y -0.4 v/ESC corresponde a la reducción de  $\text{B}_{12}^a$  a  $\text{B}_{12}^r$  (Nota 1) y la segunda onda corresponde a la reducción de  $\text{B}_{12}^r$  (Co II) a  $\text{B}_{12}^s$  (Co I). El E 1/2 de esta segunda onda varía en función del pH hasta un valor aproximado de 5.5 a partir del cual permanece constante. Birke et al. reportan un valor de E 1/2 de -0.884 + 0.002 v/ESC para esta onda, a diferencia de Jaselskis y Diehl que reportan un E 1/2 de -1.02 v/ESC y de Hogenkamp y Holmes (7) que encuentran un valor de -1.07 v/ESC en medio NaCl 0.02 M a pH 7.1.

Por otra parte R.L. Birke y S. Venkatesan (8) realizaron recientemente un estudio polarográfico de la vitamina  $\text{B}_{12}^a$  en medio ácido con el objeto de detallar más el mecanismo de electroreducción polarográfico de la vitamina  $\text{B}_{12}^a$ . Asimismo se ha estudiado el mecanismo con electrodos de oro y carbón vítreo sobre un amplio intervalo de pH (9). La naturaleza de la adsorción de las vitaminas  $\text{B}_{12}^a$  y  $\text{B}_{12}^r$  en el mercurio se ha investigado por voltamperometría cíclica, cronopotenciometría y medidas diferenciales de la doble capa (10)

La oxidación en presencia de aire de una disolución de vitamina  $\text{B}_{12}^r$  produce la vitamina  $\text{B}_{12}^a$ .

Nota 1: Ver página 8 para aclaración de la simbología.

## 2.-Objetivo.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar un método de determinación de vitamina B<sub>12</sub> en preparados multivitamínicos. Por su sensibilidad y selectividad, debido a que el nivel de concentración de la vitamina B<sub>12</sub> en los jarabes es de 10<sup>-6</sup>M se seleccionó la técnica voltamperométrica de polarografía diferencial de impulsos para la realización del presente estudio.

Por otra parte, cabe señalar que la exactitud del método se ve afectada por la presencia de otras sustancias (principalmente por otras vitaminas del complejo B tales como tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina) que se reducen en un intervalo de potencial cercano al de la vitamina B<sub>12</sub> y que se encuentran en mucho mayor concentración. Por tanto, es de suma importancia la separación de la vitamina B<sub>12</sub> de las vitaminas que la acompañan en estos productos farmacéuticos, antes de la determinación. La técnica de separación que se utilizó fue la de cromatografía de intercambio iónico en columna.

## II.-GENERALIDADES.

### 1.-Estructura y propiedades de la vitamina B<sub>12</sub> (11).

#### 1.1.-Estructura de la vitamina B<sub>12</sub>.

La vitamina B<sub>12</sub> es un compuesto de coordinación del cobalto. También recibe el nombre de cianocobalamina.

El anillo principal consiste de cuatro núcleos pirrólicos unidos a un macroanillo con tres puentes de carbono y seis dobles ligaduras conjugadas. El cobalto se encuentra en el mismo plano que los nitrógenos de los pirroles. A este núcleo se le llama corrin (figura 1)

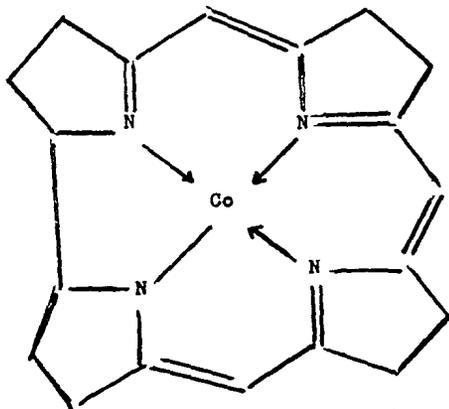


Figura 1 Núcleo corrin

A los derivados de este núcleo se les llama corrinoides.

A este núcleo están unidas siete cadenas amídicas que son las que le confieren solubilidad en disolventes próticos y disolventes apróticos dipolares. Cuatro cadenas son grupos

propionamido que se encuentran en el plano inferior del núcleo corrin y tres cadenas son agrupamientos acetamido que están orientadas hacia arriba del núcleo corrin. A un agrupamiento propionamido está unido un 1 amino propanol 2 cuyo OH está esterificado con la 3 fosforibofuranosa (figura 2).

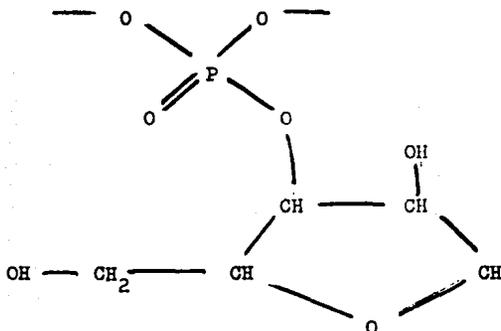


Figura 2 Fosforibofuranosa.

A todo este compuesto se le llama cobamida. La cobalamina es la 5,6 dimetilbenzimidazolil cobamida y con el agrupamiento CN<sup>-</sup> es la cianocobalamina. Un N del imidazol está unido al cobalto por un enlace coordinado. (figura 3)

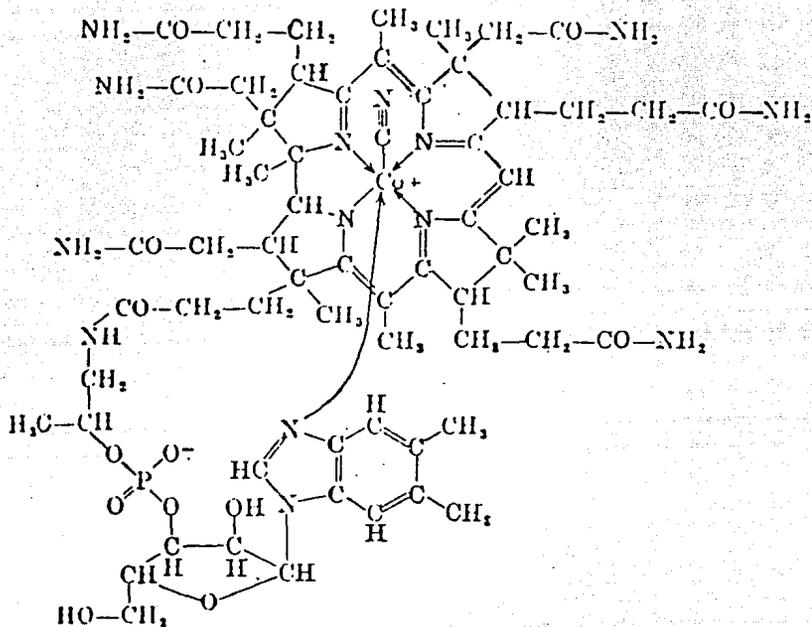
## 1.2.-Propiedades de la vitamina B<sub>12</sub>

### 1.2.1.-Propiedades físicas (12)

Se presenta en forma de cristales higroscópicos de color rojo oscuro. Cuando se expone al aire puede absorber hasta 12 % de agua. Es inodora e insípida. Sus disoluciones acuosas son neutras. Su estabilidad máxima en disolución es a un pH de 4.5 a 5.0. Es soluble en agua, insoluble en acetona, cloroformo y eter.

# Vitamina B<sub>12</sub>

CIANOCOBALAMINA



Fórmula : C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P

P.M.: 1355,40

Figura 3

### 1.2.2.-Propiedades fisicoquímicas.

Existen diversas formas de la vitamina que tienen la llamada estructura de Cobal(III) amina en la que el átomo central de cobalto se encuentra con grado de oxidación III+ (nota 2) . Tal es el caso de la acuocobal(III)amina, que se ha designado como vitamina B<sub>12</sub><sup>a</sup>, y de la hidroxocobal(III)amina. En estos compuestos el agua y el OH<sup>-</sup>, se encuentran en la misma posición que el radical CN<sup>-</sup>. Se ha demostrado (13) que a valores de pH superiores a 8 predomina la forma hidroxido de la vitamina B<sub>12</sub><sup>a</sup> sobre la forma acuosa (pK = 7.8).

Por otra parte la acuocobalamina puede existir también en los grados de oxidación II+ (B<sub>12</sub><sup>r</sup> Cobal(II)amina) y I+ (B<sub>12</sub><sup>s</sup> Cobal(I)amina). Lexa y Saveant (14) proponen el siguiente diagrama E-pH para las diferentes formas en que puede existir la acuocobalamina. (figura 4)

Nota 2.-Mediante un estudio (15) del comportamiento de la vitamina B<sub>12</sub> en un campo magnético se determinó que la molécula es diamagnética, es decir que el cobalto se encuentra con grado de oxidación III+.

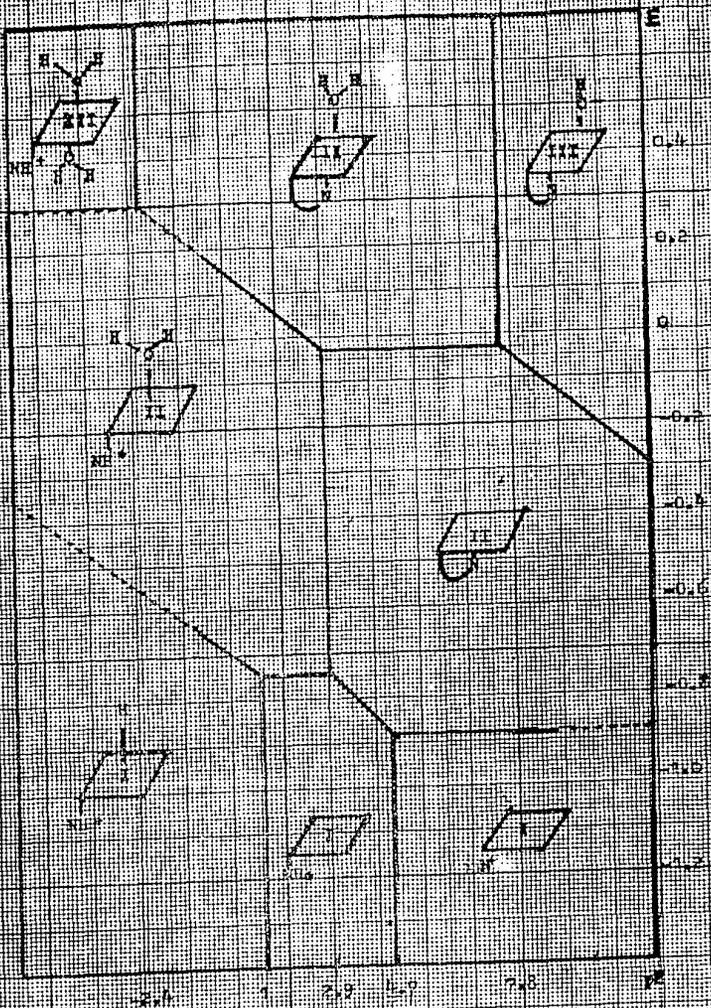


Diagrama potencoii pH. Estabilizării terenului de la  
 fundația damului.

Figure 4

## 2.- Estructura y propiedades de otras vitaminas del complejo B.

Dado que, en los preparados farmacéuticos, la vitamina B<sub>12</sub> va acompañada de otras vitaminas del complejo B, se considera de interés presentar sus estructuras y propiedades más importantes.

### 2.1.- Tiamina o vitamina B<sub>1</sub>

El clorhidrato de tiamina se presenta en forma de placas blancas monoclinicas, agrupadas en forma de rosetas. Tiene un olor ligero a tiazol y sabor amargo. Se descompone a 248°C. Es soluble en agua y glicerol, poco soluble en etanol y prácticamente insoluble en eter, benceno, hexano y cloroformo(12). Tiene una masa molecular de 337.28 (Fig.5)

En los jarabes generalmente se encuentra a una concentración de 20 mg en 100 ml. ( $5.9 \times 10^{-4} M$ )

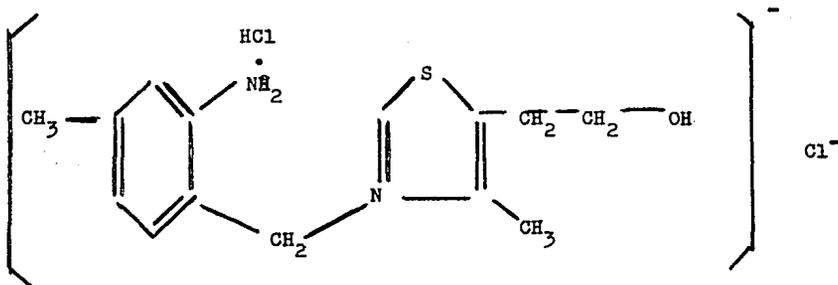


Figura 5

Para la determinación de la tiamina se han desarrollado diversos métodos polarográficos. Con este fin en la literatura se informa del uso de medios ácidos

principalmente (21), en KCl 0.1M (  $E_{1/2} = -1.25$  v/ESC ). Con pequeñas cantidades de vitamina en  $NH_4Cl$ , ácido bórico-cloruro de potasio y solución tamponada de fosfatos pH=5.89 se observa una onda catalítica con un máximo a  $-1.7$  v/E.S.C..R. Pleticha (22) desarrolló un método de determinación indirecto de esta vitamina en productos farmacéuticos basada en la formación de un precipitado rojo por la vitamina  $B_1$  con el anión complejo  $BiI_4^-$ . Se observa una onda anódica debida a los iones yoduro que es proporcional a la concentración de la vitamina  $B_1$ .

P.P. Söderhjelm y J.Lindquist (16) propusieron un método de determinación de tiamina usando voltamperometría de barrido lineal con electrodo de pasta de carbón en medio de solución amortiguadora 0.1 de fosfato (pH=11.7). La corriente de pico presenta linealidad con la concentración en el intervalo de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M. Se observa que esta vitamina es inestable en medios básicos.

## 2.2.- Riboflavina o vitamina $B_2$ .

Se presenta en forma de agujas naranjas. Se descompone de 278 a  $282^{\circ}$  C. (12) Es insoluble en agua, alcohol, eter, cloroformo, acetona, benceno, ligeramente soluble en ciclohexanol, acetato de amilo, alcohol bencílico y fenol, muy soluble en álcalis diluidos con descomposición. Su masa molecular es de 376.36 (Fig. 6).

El comportamiento electroquímico de la riboflavina ha sido estudiado extensamente. Esta vitamina presenta un sistema redox reversible cuyo potencial se desplaza a valores más negativos al aumentar el pH (17). Algunos valores de  $E_{1/2}$  típicos respecto al electrodo de calomel saturado son (23):

pH	5.8	7.2	9.0	0.1 M KCl
E 1/2	-0.41	-0.47	-0.54	-0.35

En disolución ácida aparece una preonda característica en el polarograma, la cual se forma por la adsorción de la forma reducida de la riboflavina (17)..

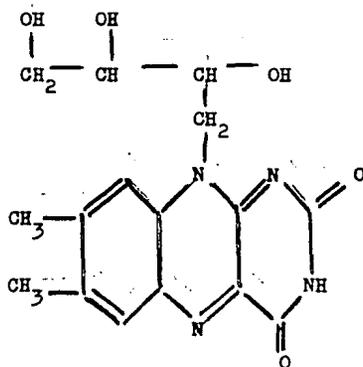


Figura 6

Esta vitamina es inestable en medio básico y el pH óptimo recomendado para la determinación es de 7(24).La voltamperometría de barrido lineal con un electrodo de pasta de carbón también se ha utilizado para la determinación de la riboflavina.La reducción se hace en medio ácido ( $H_2SO_4$  0.5 M, HCl 0.1 M, HCl 0.01 M) (17)

En polarografía clásica la altura de la onda presenta una relación lineal con la concentración en un intervalo de  $3 \times 10^{-6} M$  a  $1.5 \times 10^{-4} M$  en medio fosfato 0.1 M a pH 7.2. En polarografía diferencial de impulsos se pueden hacer determinaciones hasta una concentración de  $2.7 \times 10^{-6} M$  en el mismo medio fosfato.

En los jarabes se encuentra generalmente en una concentración de 20 mg en 100 ml. ( $5.3 \times 10^{-4} M.$ ).

### 2.3.- Nicotinamida

Se presenta en forma de agujas de color blanco. Tiene un punto de fusión de 128 a 131°C. Es soluble en agua, alcohol y glicerol (12) (Figura 7).

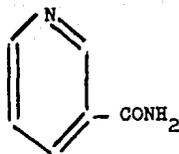


Figura 7

Electroquímicamente la reducción de la nicotinamida corresponde a un cambio de dos electrones y la onda está bien definida en disoluciones amortiguadoras de pH 8 o mayor. I.M. Kolthoff y J.J. Lingane (24) encontraron que el valor de  $E_{1/2}$  es de -1.75 v/ESC en NaOH 0.1 N. Otros autores informan valores de  $E_{1/2}$  de -1.82 v/ESC en NaOH 0.1 M, -1.65 v/ESC en acetato de sodio (pH=7.5), -1.67 v/ESC en citrato de sodio 0.1 M (pH=7.9), -1.4 v/ESC en bicarbonato de sodio 0.1 M (pH=9.2) y -1.56 v/ESC en borato de sodio 0.1 M (21). Se observa que el  $E_{1/2}$  varía con el pH y también con la naturaleza de la disolución amortiguadora. En medio neutro y ácido se ha observado una interferencia debido a una onda de hidrógeno.

En polarografía clásica la altura de la onda es linealmente dependiente de la concentración en un intervalo de  $8 \times 10^{-6}$  M a  $8 \times 10^{-4}$  M en LiOH 0.1 M (17).

En polarografía diferencial de impulsos se han determinado

concentraciones hasta de  $8 \times 10^{-7} M$  a  $8 \times 10^{-6} M$ .

En los jarabes se encuentra generalmente en una concentración de 100 mg. en 100 ml. ( $8.18 \times 10^{-3} M$ ).

#### 2.4.- Piridoxina o vitamina B6.

Se presenta en forma de placas o cilindros gruesos birefringentes(12). Se descompone de 205 a  $212^{\circ}C$ . Es soluble en agua y en propilenglicol, poco soluble en alcohol, insoluble en eter y clororformo. Su masa molecular es de 205.64 (Figura 8)

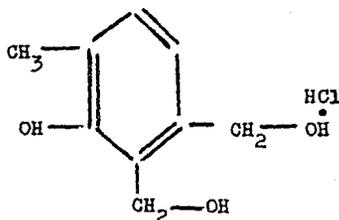


Figura 8

Para la determinación de piridoxina en preparados farmacéuticos se ha usado la onda polarográfica en disolución amortiguadora de amoniaco pH 8.6 -8.7. El método empleado es la voltametría anódica (20) con electrodo de pasta de carbono. El potencial de pico es de  $-0.60 v/ESC$  y el  $E_{1/2}$  es de  $-0.535 v/ESC$ .

En los jarabes se encuentra generalmente a una concentración de 20 mg. en 100 ml. ( $9.7 \times 10^{-4} M$ ).

### 3.-Métodos de determinación de vitamina B<sub>12</sub>.

#### 3.1.-Métodos microbiológicos (11).

Consisten en hacer cultivos de diferentes microorganismos en presencia de cantidades conocidas de vitamina B<sub>12</sub> y al mismo tiempo hacer un cultivo en presencia de la disolución problema. La vitamina B<sub>12</sub> favorece el crecimiento de los microorganismos y su actividad se determina midiendo la turbidez de los cultivos en un espectrofotómetro o nefelómetro. Los microorganismos empleados en estas determinaciones son los siguientes :

a) Ochromonas-malhamensis

Sensibilidad 1 pg ( 10<sup>-12</sup>g)

b) Euglena-gracilis

Sensibilidad 1 pg

c) Lactobacillus-leichmanni

Sensibilidad 10 pg

La especificidad de estos métodos microbiológicos tiene diferencias bien marcadas. La más específica es la prueba del Ochromonas ya que esta prueba solamente la da la benzimidazol-cobalamina, la cual posee efecto terapéutico en la anemia perniciosa. El crecimiento de los microorganismos puede inhibirse únicamente por la presencia de grandes dosis de metionina. Por el contrario la prueba de la Euglena gracilis da resultados positivos con la adenina-cobalamina que es clínicamente inactiva y la prueba del Lactobacillus leichmanni la da también la hipoxantina-cobalamina y desoxirribosido que son clínicamente inactivos.

La desventaja de los métodos microbiológicos es la de necesitar uno o varios días para su realización .Además el

mantenimiento de las cepas de microorganismos necesarios. .  
La prueba del Ochromonas necesita de 5 a 7 días de incubación, la de la Euglena necesita de 8 a 10 días de incubación y la del Lactobacillus necesita 24 horas.

### 3.2 Método espectrofotométrico. (11)

Este método se basa en medir la absorción de la cianocobalamina en disolución acuosa. La curva de absorción presenta los siguientes máximos. ( Figura 9 ).

$$\lambda = 278 \text{ nm}$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$$

$$\lambda = 361 \text{ nm}$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 207$$

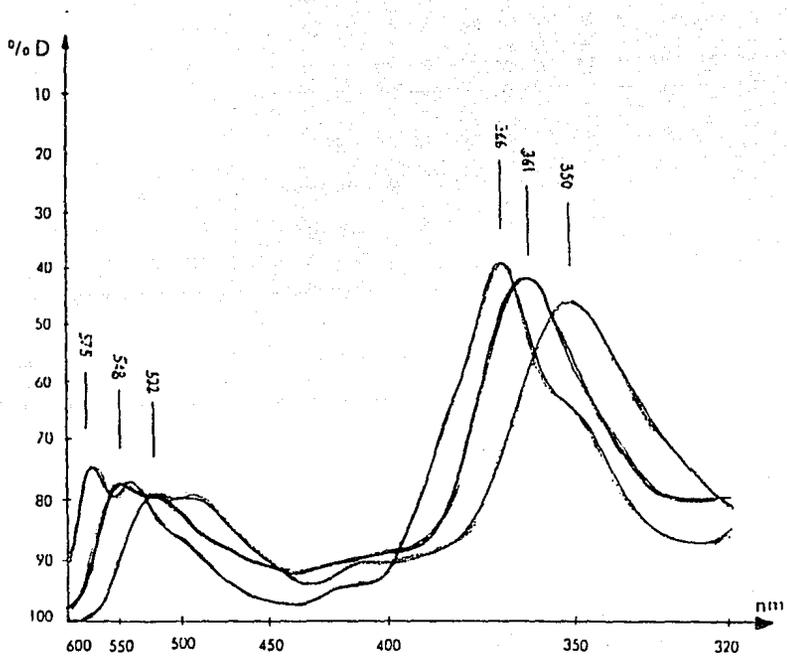
$$\lambda = 548 \text{ nm}$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 63$$

Todas las cobalaminas muestran un espectro de absorción semejante presentando solamente ligeras desviaciones en la longitud de onda del máximo. La acuohidroxicobalamina tiene su máximo de absorción en  $\lambda = 351 \text{ nm}$ .

Una prueba de pureza de la cianocobalamina consiste en determinar la relación  $E_{351} / E_{361}$  que debe dar entre 0.65 y 0.57. La sensibilidad de éste método es de 1 mg en 100 ml ( $10^{-5} \text{ M}$ ).

El método espectrofotométrico es conveniente para la dosificación en preparaciones farmacéuticas (soluciones inyectables o gotas) No es conveniente para la realización de pruebas de estabilidad de productos en climas tropicales porque además de la formación de acuocobalamina que posee la misma actividad que la cianocobalamina, se forman otros productos de descomposición que no se pueden distinguir de la cianocobalamina porque su espectro en la región ultravioleta es semejante al de la cianocobalamina, y estos compuestos carecen de actividad.



Curvas de absorbancia de :

- acetato de acuocobalamina
- cianocobalamina
- dicianocobalamina

a una concentración de  $1.3 \times 10^{-5}$  M

Figura 9

### 3.3 Métodos cromatográficos (11)

#### 3.3.1.-Cromatografía en capa delgada.

La cromatografía en capa delgada se puede usar para diferenciar la acuocobalamina de la cianocobalamina.

En una placa de sílica gel G activada se colocan 5 a 10 µg de muestra y se revela con mezcla etanol-agua 1:1. La acuocobalamina permanece en el lugar de la aplicación y la cianocobalamina sube hasta la mitad de la placa.

#### 3.3.2.-Cromatografía de líquidos de alta resolución (18)

Este método es conveniente para hacer la determinación de vitamina B<sub>12</sub> y otras vitaminas solubles en agua. Se prepara una solución que tenga 200 µg en 1.5 ml. y se inyectan 40 µl. Se emplea una columna de Vertex Li Chrosorb R-P 18,5 µm, de 25 cm por 4.0 mm. Como fase móvil se usa agua y metanol 1:1. Por este método se pueden determinar concentraciones de  $10^{-4}$  M.

### 3.4.-Métodos electroquímicos. ( 17 )

La mayoría de las vitaminas pueden ser determinadas por polarografía. En tratados sobre ensayos de vitaminas, se mencionan algunas técnicas polarográficas, especialmente para vitaminas acuosolubles. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones son para preparaciones farmacéuticas en las cuales las vitaminas están en alta concentración. Una limitación de la polarografía "dc" es la baja sensibilidad. El método generalmente es aplicable a un intervalo de concentraciones de  $10^{-5}$  M a  $2 \times 10^{-3}$  M. Los análisis de soluciones  $10^{-6}$  M se pueden realizar solamente en condiciones favorables y en ausencia de sustancias que interfieran. Para obtener resultados precisos es conveniente que las ondas tengan la forma de escalones fácilmente medibles lo cual ocurre a concentraciones de  $10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M.

Sin embargo, el límite inferior puede extenderse usando otros métodos voltamperométricos.

La aplicación de la técnica de impulsos a los métodos polarográficos permite determinar concentraciones de  $10^{-8}M$  en especies que se reducen en forma reversible y concentraciones de  $5 \times 10^{-8}M$  en especies que se reducen en forma irreversible.

El método polarográfico es selectivo, puesto que las ondas se observan en potenciales definidos. En polarografía dc una diferencia de  $250/n$  mv entre dos potenciales de media onda puede ser suficiente para permitir la medida de la altura de la onda correspondiente si la relación de concentraciones no es menos de 10:1. La técnica de polarografía diferencial de impulsos es más eficiente porque da picos que corresponden fielmente a un polarograma dc. Esto permite obtener la máxima resolución entre ondas cercanas. Una diferencia de 40 mv entre los potenciales de dos picos es suficiente para que la altura de los picos pueda medirse, aún si la relación de concentraciones es de  $10^4:1$

### III.- TRABAJO EXPERIMENTAL.

#### 1.- Determinación polarográfica de la vitamina B<sub>12</sub>.

Como se señala en la introducción del presente trabajo, el comportamiento electroquímico de la vitamina B<sub>12</sub> ha sido estudiado en muy diversos medios acuosos. Con el objeto de definir el medio más adecuado para la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> contenida en los preparados multivitamínicos, con base en la información de la literatura, se prepararon disoluciones de esta vitamina en los siguientes medios:

sulfato de potasio 0.1 M (pH = 6.0)

sulfato de potasio 0.1 M + KCN · 0.01M (pH=10.6)

y solución amortiguadora de fosfatos 0.4 M pH=6.9

Las experiencias polarográficas se realizaron en un polarógrafo P.A.R. modelo 174-A. Como electrodo de referencia se usó un electrodo de calomel saturado de KCl y como electrodo auxiliar un alambre de platino.

Para la polarografía diferencial de impulsos se usó:  $\Delta E = 25$  mv, velocidad de barrido 10 mv/seg. y tiempo de caída de la gota 0.5 seg.

#### 1.1 Medio de sulfato de potasio 0.1 M.

##### 1.1.1.-Polarografía clásica:

El dominio de electroactividad de una disolución que contiene sulfato de potasio 0.1 M como electrolito soporte es de 2.2 v ( de 0.26 a -1.94 v/ESC), (figura 1) a una sensibilidad de 10  $\mu A$ ,  $i = 0.5 \mu A$ .

El polarograma de una disolución de cianocobalamina  $10^{-3}$  M en sulfato de potasio 0.1 M, (pH=6) muestra una primera onda con un E 1/2 de -1.08 v/ESC y una segunda onda con un valor de potencial de -1.6 v/ESC aproximadamente. (figura 2).

De acuerdo con H.P.C. Hogenkamp y S. Holmes (7) el primer potencial de media onda está determinado por las propiedades nucleofílicas del ligante superior en las cobalaminas. Un incremento en el carácter nucleofílico conduce a un desplazamiento de la onda polarográfica hacia potenciales más anódicos. Cuando el carácter nucleofílico es muy fuerte, como en el caso de  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CN}^-$  o  $\text{CH}_3^-$ , la onda polarográfica representa la reducción mediante dos electrones. En el caso de la acuocobalamina es posible observar dos ondas, cada una correspondiente a un intercambio de un electrón.

Para una disolución de acuocobalamina en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1 M, Birke et al. (6) observaron tres ondas. Atribuyen la primera onda de reducción  $E_{1/2} = -0.4$  v/ESC, con una altura de  $0.86 \mu\text{A}$ , al paso de acuocobalamina III a acuocobalamina II. La segunda onda,  $E_{1/2} = -0.95$  v/ESC, con una altura de  $1.17 \mu\text{A}$ , al paso de la acuocobalamina II a acuocobalamina I y la tercera onda,  $E_{1/2} = -1.55$  v/ESC, a una reducción catalítica de hidrógeno. (Anexo II, p.161). La reacción que se efectúa es la reducción de  $\text{H}^+$  a  $\text{H}_2$  en donde la vitamina  $\text{B}_{12}$  actúa como catalizador.

Por otra parte, Jaselskis y Diehl (5) reportan para la acuocobalamina un valor de  $E_{1/2} = -1.02$  v/ESC en medio de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.1 M para la segunda onda. Además cabe señalar que en la literatura se atribuye un fenómeno de adsorción (6) de la vitamina  $\text{B}_{12}$  sobre la superficie del mercurio que causa una depresión de la onda. Esto permite explicar las diferencias de altura observadas entre las dos primeras ondas.

Experimentalmente en la cianocobalamina se observó la onda con  $E_{1/2} = -1.08$  v/ESC que corresponde a la reducción de Cobal(III)amina a Cobal(I)amina (Figura 2) y el máximo a

-1.6 v/ESC.

En el caso de la cianocobalamina, el estudio de la variación de la corriente límite en función de la altura y de la raíz cuadrada de la altura de la columna de mercurio ( tabla 1) y gráficas 1(a) y 1(b) respectivamente, nos da en el caso de  $i=f(h)$  una línea recta de pendiente positiva ( $r = 0.9984$ ) que de acuerdo con Bond (Figura 9) nos permite establecer que el proceso electroquímico que origina la onda de  $E_{1/2} = -1.08\text{v/ESC}$  en una disolución de concentración  $10^{-3}\text{M}$  es de adsorción.

Tabla 1 :

Altura del bulbo en cm.		Corriente límite en $\mu\text{A}$
h	$h^{1/2}$	
100	10	3.49
95	9.74	3.39
90	9.48	3.29
85	9.21	3.21
80	8.94	3.13
75	8.66	3.05
70	8.36	2.98
65	8.06	2.90
60	7.74	2.82
55	7.41	2.75
50	7.07	2.68



Cianocobalamina  $10^{-3}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M  
Sensibilidad  $10 \mu A$

$\mu A$

6.0

5.0

4.0

3.0

2.0

1.0

0

-1.0

Onda catalítica

$Co^{III} \rightarrow Co^{II}$

Figura 2

-0.4

-0.6

-0.8

-1.0

-1.2

-1.4

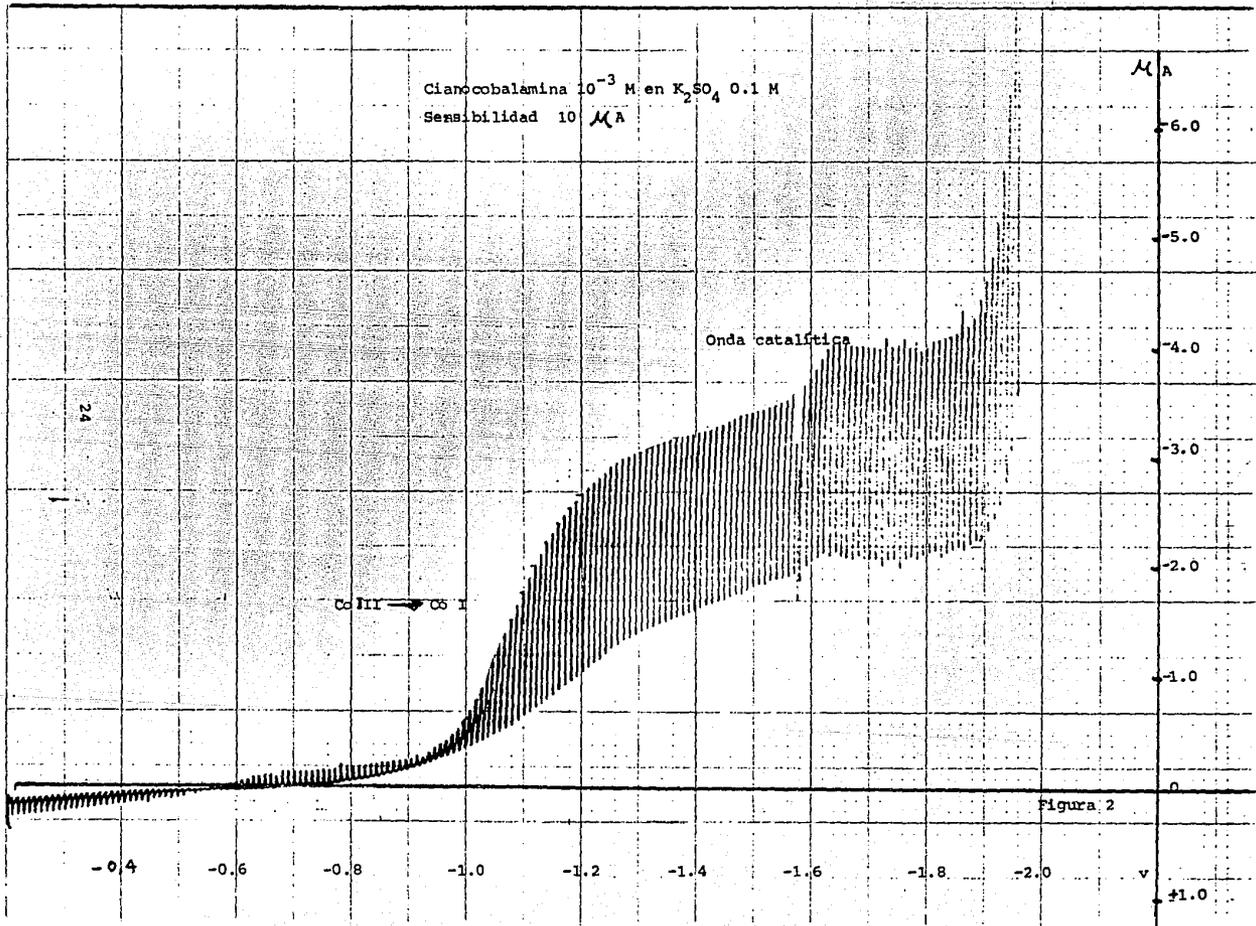
-1.6

-1.8

-2.0

v

24



Determinación del tipo de corriente de la  
primera onda de reducción ( $E_{1/2} = -1.08 \text{ v/ESC}$ )  
de la cianocobalmina en medio  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.1 M

$i$   $\mu\text{A}$

$$i = f(h)$$

$$r = 0.9984$$

3.5

3.0

2.5

2.0

10

20

30

40

50

60

70

80

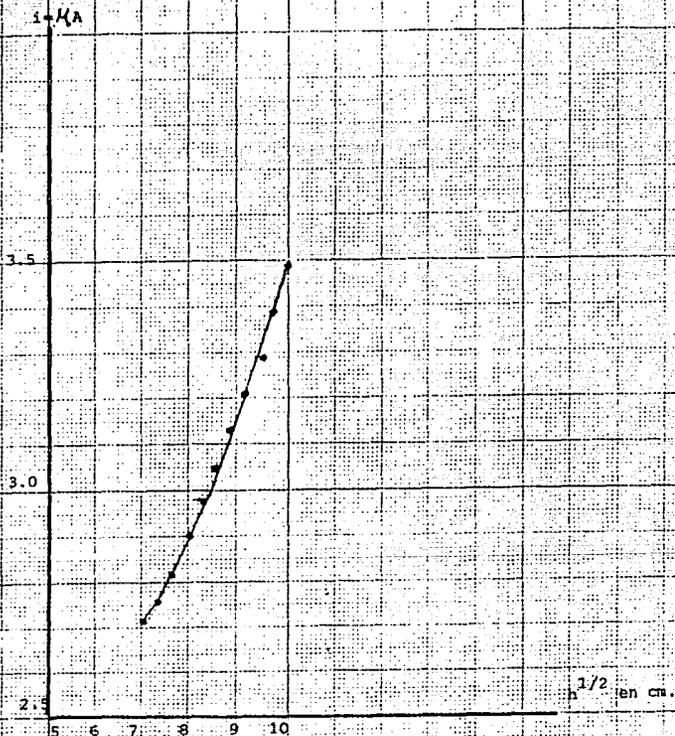
90

100

$h$  en  $\text{cm}$

Gráfica 1a

Determinación del tipo de corriente de la  
 primera onda de reducción ( $E_{1/2} = -1.08 \text{ v/ESC}$ )  
 de la etanocobalamina en medio  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.1 M  
 $i = f(h^{1/2})$



Gráfica 1b.

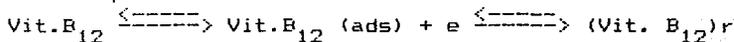
### 1.1.2.-Polarografía diferencial de impulsos.

Por esta técnica se constata que una disolución de cianocobalamina  $10^{-3}$  M ( pH = 6) presenta dos picos , un pico mayor  $E_{p_1}$  en  $-1.15$  v/ESC y un pico menor de  $E_{p_2} = -1.59$  v/ ESC ( Figura 3a ).

A medida que se diluye la disolución de cianocobalamina de  $10^{-4}$  M a  $10^{-6}$  M se observan los siguientes picos: uno menor de  $E_{p_1} = -0.90$  v/ESC y uno mayor de  $E_{p_2} = -1.35$  v/ESC, los cuales aparentemente disminuyen a medida que disminuye la concentración ( Figura 3 b,c,y d.). Además , en la disolución  $10^{-4}$  M de cianocobalamina se observa claramente un pico a  $E_p = -0.3$  v/ ESC que en las disoluciones más diluidas se vuelve muy pequeño y aparece entre  $0 < E_{1/2} < -0.3$  v/ ESC. Este desplazamiento de los picos y modificación de los tamaños como consecuencia de la dilución se puede deber a que la forma ciano de la vitamina B<sub>12</sub> ha sido sustituida por la forma acuó. En un estudio realizado mediante la técnica de polarografía clásica por Birke et al. ( 6 ) informan un valor de  $E_{1/2}$  para una disolución de acuocobalamina  $6.54 \times 10^{-4}$  M en  $Na_2SO_4$  1.0 M de  $-0.88$ v/ESC independiente del pH para valores mayores a 5.5 ( correspondiente a la reacción :  $B_{12}^s \rightleftharpoons B_{12}^r + e^-$  ) y un  $E_{1/2}$  más negativo de  $-1.30$  v/ESC correspondiente a la onda catalítica de hidrógeno.

Por otra parte H.P.C. Hogenkamp y S.Holmes (7) establecen que a valores de pH elevados ( en los cuales la especie predominante es la hidroxocobalamina ), el polarograma de una disolución de cianocobalamina es idéntico al de una disolución de acuocobalamina, lo que sugiere que a pH 13.5 el ión cianuro es desplazado por el ión hidróxido de manera cuantitativa.

El estudio de la variación de la altura de pico en potencial  $E = -1.54$  v/ESC en función de la concentración de la cianocobalamina dentro del intervalo de concentración de  $10^{-5}$  M a  $9 \times 10^{-5}$  M (Figura 4) permite observar que la altura del pico aumenta linealmente con la concentración entre  $3 \times 10^{-5}$  y  $7 \times 10^{-5}$  M (Gráfica 2), A concentraciones mayores la altura del pico no aumenta. En tanto que el pico en potencial de  $-1.08$  v/ESC va disminuyendo de altura hasta  $7 \times 10^{-5}$  M y después vuelve a aumentar. Se observa también que a medida que aumenta la concentración de vitamina  $B_{12}$  el pico se desplaza hacia valores de potencial más negativos ( de  $-1.04$  a  $-1.08$  v/ESC ) (Figura 4 ). De acuerdo con las observaciones, la información en la literatura (6) y tomando en consideración que se ha comprobado por polarografía clásica que esta señal de reducción de la vitamina con  $E_{1/2} = -1.08$  v/ESC está determinada por adsorción, se puede establecer que la reacción que ocurre al electrodo es:



Cianocobalamina en  $K_2SO_4$  0.1 M.

Concentración M	Sensibilidad $\mu A$
• a) $10^{-3}$	20
• b) $10^{-4}$	5
• c) $10^{-5}$	5
• d) $10^{-6}$	5
• e) $10^{-7}$	5

29

2  $\mu A$

0.5  $\mu A$

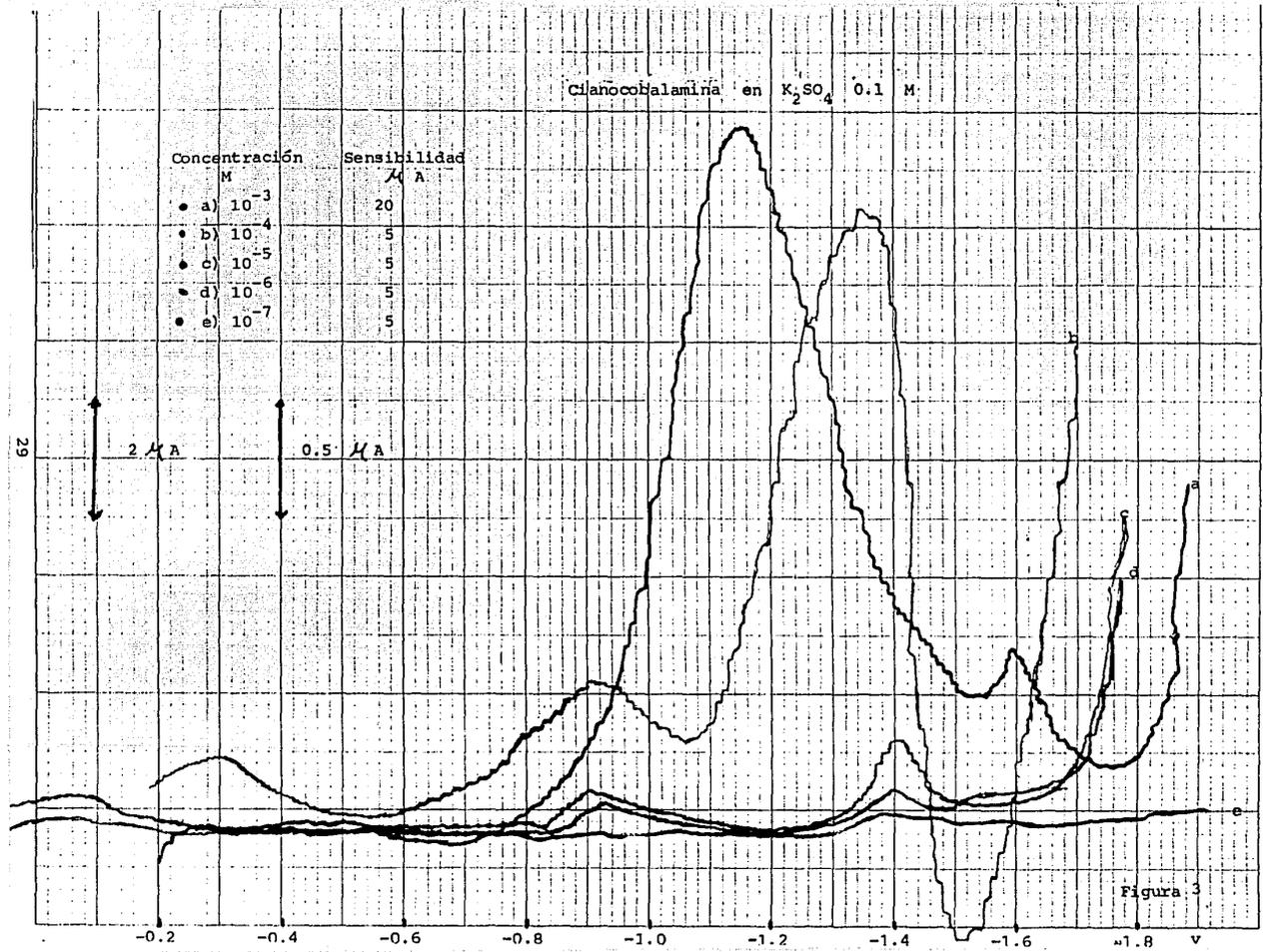
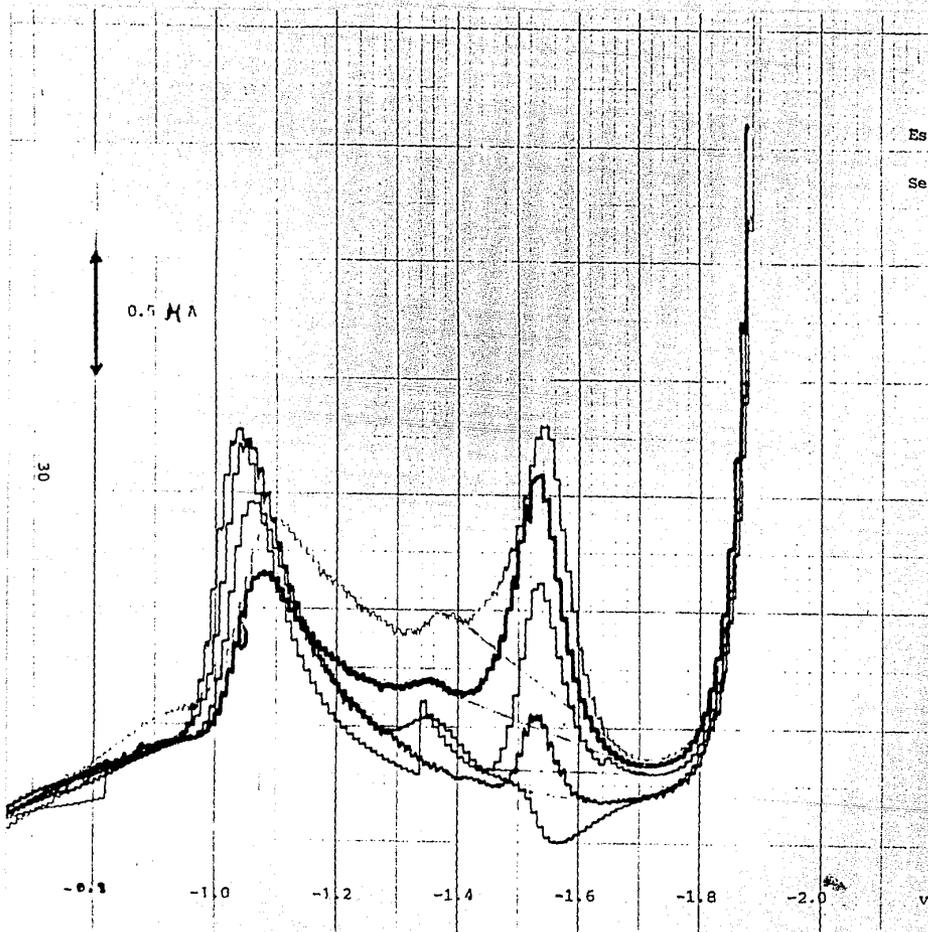


Figura 3



Escala de cianocobalamina en  
 $K_2SO_4$  0.1 M  
 Sensibilidad 5  $\mu A$

cianocobalamina	$i_p$ ( $\mu A$ )
$\bullet$ $10^{-5}$ M	
$\bullet$ $3 \times 10^{-5}$ M	0.33
$\bullet$ $5 \times 10^{-5}$ M	0.79
$\bullet$ $7 \times 10^{-5}$ M	1.08
$\bullet$ $9 \times 10^{-5}$ M	1.106

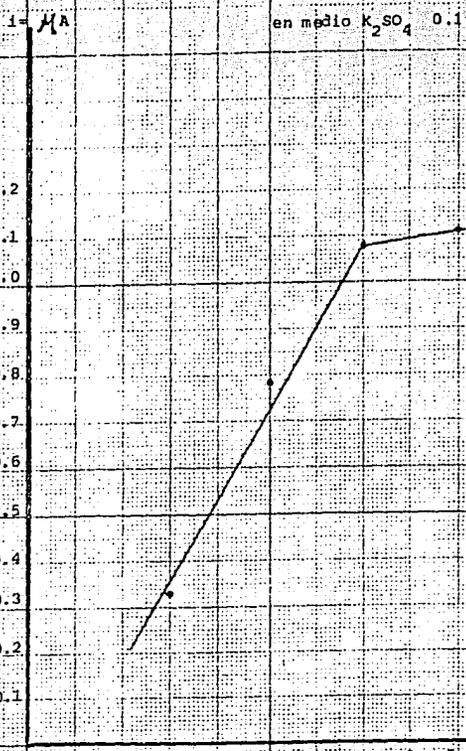
Figura 4

Escala de cianocobalamina  $10^{-5}$  M  
en medio  $K_2SO_4$  0.1 M.  $E_p = -1.54$  v/ESC

$i^a$   $\mu A$

1.2  
1.1  
1.0  
0.9  
0.8  
0.7  
0.6  
0.5  
0.4  
0.3  
0.2  
0.1

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  $\times 10^{-5}$  M



Gráfica 2

## 1.2 Medio de sulfato de potasio 0.1 M + KCN 0.01 M

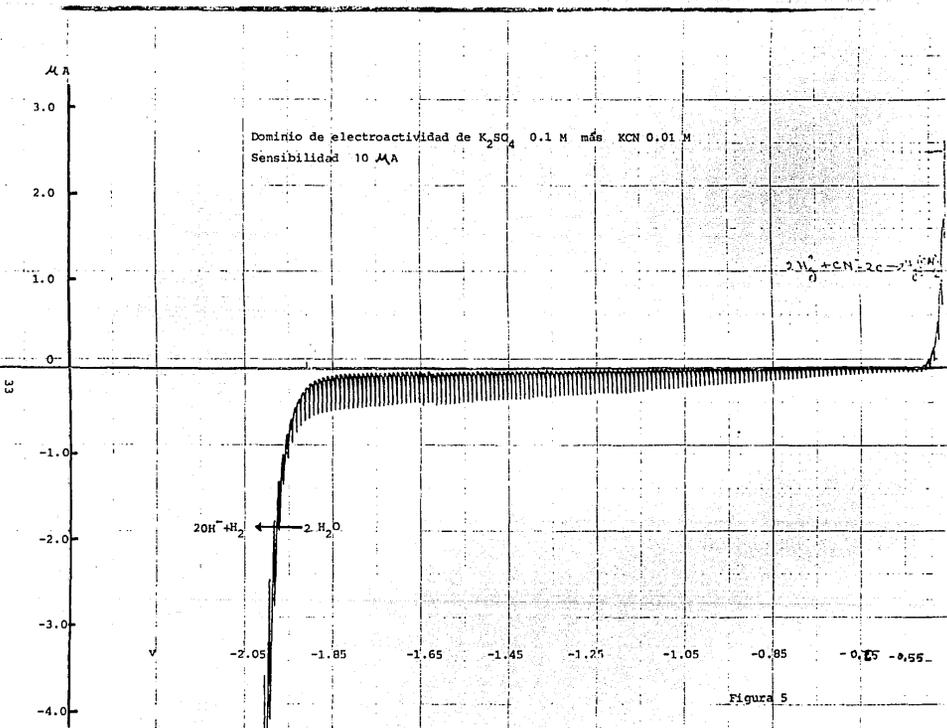
### 1.2.1. Polarografía clásica.

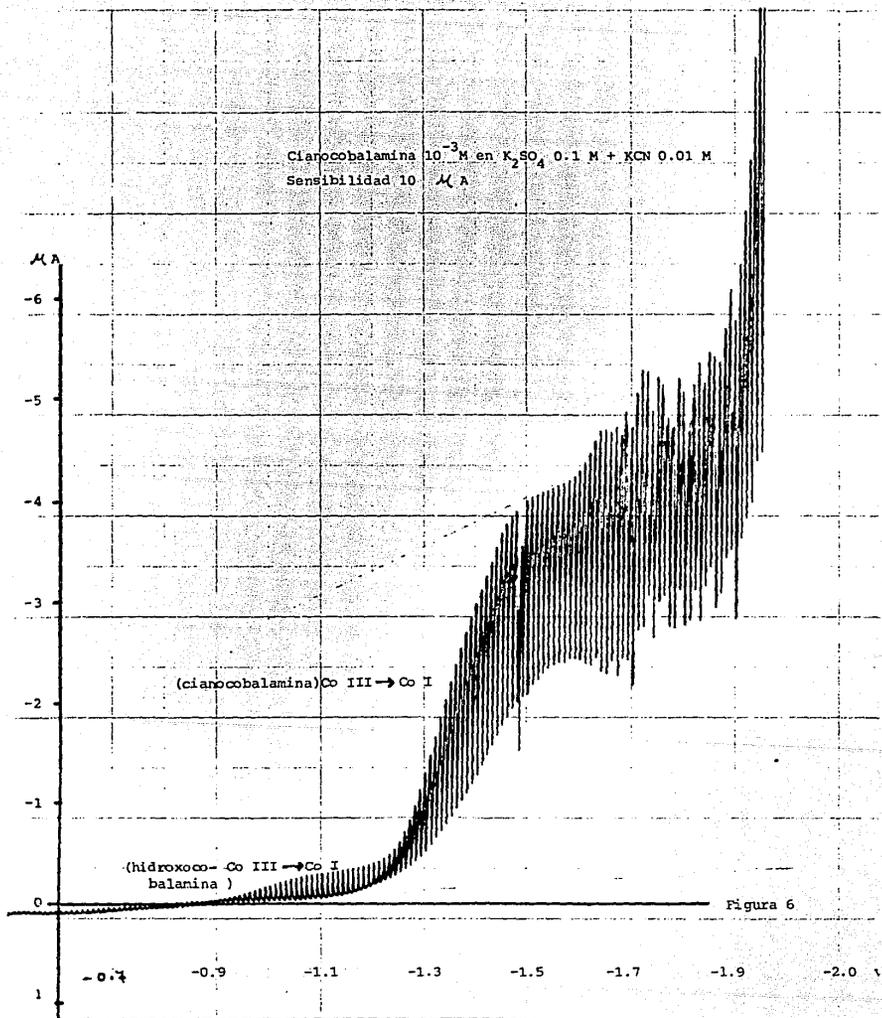
El dominio de electroactividad de una disolución 0.1 M de sulfato de potasio con cianuro de potasio 0.01 M (pH=10.6) como electrolito soporte es de 1.46 v (-0.47 v/ESC a -1.93 v/ESC ) a una sensibilidad de 10  $\mu$ A ,  $i = 0.5 \mu$ A. (Figura 5 ).

El polarograma de una disolución de cianocobalamina  $10^{-3}$  M en este medio (pH = 10.6) muestra una primera onda, no bien definida, con un E 1/2 de -0.95 v/ESC y una segunda onda con un E 1/2 de -1.38 v/ESC ( Fig. 6 ).

De acuerdo con Hogenkamp y Holmes ( 7) en presencia de KCN 0.01 M, la onda correspondiente al intercambio de dos electrones de la cianocobalamina se sitúa entre -1.14 y -1.33 v/ESC en tanto que en medios más básicos se puede desplazar hasta -1.07 v/ESC. Dado que en este trabajo se usó la vitamina B<sub>12</sub> en su forma ciano y de acuerdo con la discusión presentada en el inciso 1.1 , es posible establecer que en ese medio una parte de la vitamina B<sub>12</sub> se encuentra en la forma hidroxilada y otra en la forma ciano.

Como ya se mencionó, Jaselskis y Diehl (5) establecen que en medios básicos, en los cuales predomina la forma hidroxilada (acuocobalamina  $pK_1 = 2.9$  y  $pK_2 = 7.8$ ), el polarograma obtenido para esta forma es idéntico al de la cianocobalamina. De hecho Hogenkamp y Holmes (7) también encontraron para la acuocobalamina a pH 12.4 un E 1/2 de -1.07 v/ESC con un intercambio de dos electrones. Por consiguiente, en el medio KCN 0.01 M se piensa que la primera onda puede ser debida a la reducción de la forma hidroxilada con un intercambio de 2 e<sup>-</sup> y la segunda onda a la reducción de la forma ciano también con un intercambio de 2 e<sup>-</sup>.





### 1.2.2. Polarografía diferencial de impulsos

Mediante esta técnica se observan en el polarograma de una disolución de cianocobalamina  $10^{-3}M$  en medio KCN  $10^{-2}M$  dos picos :uno menor a  $Ep_1$  de  $-0.95$  v/ESC y otro mayor a  $Ep_2$  de  $-1.42$  v/ESC. (Figura 7 )

A medida que se diluye una disolución de cianocobalamina de  $4 \times 10^{-4}M$  a  $1.8 \times 10^{-4}M$  se comienza a observar la definición de un tercer pico, el cual aparece a potenciales más catódicos que  $-1.42$  v/ESC. En la solución  $10^{-4}$  este pico está perfectamente definido con un  $Ep_3 = -1.54$  v /ESC. En todo este intervalo de concentraciones la altura del primer pico varía muy poco, en tanto que la del segundo pico varía marcadamente.

Si se continúa diluyendo, variando la concentración entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}M$  (Figura 8), se observa que para una concentración de  $5 \times 10^{-5}M$  el segundo pico desaparece, y solo se observa el tercer pico, el cual va disminuyendo de tamaño y se puede observar hasta una concentración de  $2 \times 10^{-5}M$ . La solución de  $10^{-5}M$  muestra un pico muy ancho con un  $Ep_1 = -1.0$  v/ESC. En todo este intervalo el primer pico continúa disminuyendo de tamaño.

Las gráficas de  $I_p = f$  (concentración cianocobalamina ) correspondientes a los picos  $Ep_2 = -1.42$  v/ ESC (Figura 7) y  $Ep_3 = -1.5$  v/ESC (Figura 8 ) se muestran en las gráficas 3 y 4 respectivamente .

Tabla 2:  $Ep_2 = -1.42$  v/ESC

Concentración de cianocobalamina	Corriente en $\mu A$
$10^{-4} M$	1.14
$1.8 \times 10^{-4}$	2.26
$2.5 \times 10^{-4}$	3.39

$3.0 \times 10^{-4}$	4.12
$3.5 \times 10^{-4}$	4.80
$4.0 \times 10^{-4}$	5.28

Tabla 3 :  $E_{p_2} = -1.54 \text{ v/ESC}$

$2 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.236
$3 \times 10^{-5}$	0.748
$4 \times 10^{-5}$	0.906
$5 \times 10^{-5}$	1.024
$10^{-4}$	1.18

De la gráfica 3 podemos deducir que la altura del pico es linealmente proporcional a la concentración ( $r = 0.998$ ), lo cual nos indica que el proceso de reducción a un potencial de  $E_{p_2} = -1.42 \text{ v/ESC}$  está controlado por difusión (Figura 9). De la gráfica 4 deducimos que la curva  $i=f(\text{concentración vitamina})$  a un potencial  $E_{p_3} = -1.54 \text{ v/ESC}$  no obedece a un proceso de difusión ( $r = 0.7997$ ) (Figura 9), probablemente se debe a un proceso de adsorción según la literatura. (25).

El comportamiento electroquímico de la cianocobalamina en medio KCN  $0.01\text{M}$  se puede explicar de la forma siguiente:

En medios relativamente concentrados de vitamina  $c > 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$  se observan dos picos, el primero debido posiblemente a la reducción de la forma hidroxí con un intercambio de dos electrones (7) y el segundo debido a la reducción de la forma ciano también con un intercambio de dos electrones. La variación irregular de la altura del primer pico en función de la concentración de cianocobalamina se puede deber a que :

- a) es un proceso de reducción determinado por adsorción y
- b) la cinética de la conversión de la forma ciano

a la forma hidroxí no es muy rápida.

Por otra parte en los medios más diluidos  $2 \times 10^{-5} < c < 10^{-4}$  en los cuales se define la aparición de un tercer pico, se puede pensar que el segundo pico con un  $E_{p2} = -1.42$  es debido a la reducción normal de la cianocobalamina, con un intercambio de dos electrones a cianocobalamina reducida en solución. El pico a un potencial más negativo, que aparece a bajas concentraciones se puede deber a la reducción de la cianocobalamina adsorbida. Es decir se considera la posibilidad de una adsorción del reaccionante y la reducción de la cianocobalamina adsorbida a un potencial más negativo. A medida que aumenta la concentración se observa un segundo pico con un potencial más positivo que es el de la reducción normal de la cianocobalamina en solución controlado por difusión.

De acuerdo con A.M. Bond (25), cuando la concentración de oxidante aumenta, se alcanza un punto en el cual se forma suficiente de Ox (ads) para que cubra toda la superficie de la gota y el exceso de oxidante permanece en la solución. Como se necesita más energía para reducir Ox (ads) a Red disuelto que Ox disuelto a Red disuelto, la reducción del exceso de Ox producirá la onda normal de reducción a potenciales más positivos.

Si se representa gráficamente la corriente total en función de la concentración total de cianocobalamina tenemos los siguientes datos:

Tabla 4 :

Concentración total de cianocobalamina	$\mu A$
$10^{-4}$ M	$1.14 + 0.98 = 2.12$
$1.8 \times 10^{-4}$ M	$2.26 + 0.98 = 3.24$

$2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3.39 + 1.30 = 4.69$
$3.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4.12 + 1.57 = 5.69$
$3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4.8 + 1.97 = 6.77$
$4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	$5.28 + 2.36 = 7.64$

$I_p = f$  ( concentración total de cianocobalamina )  
 (Figura 7 ) ( Gráfica 5 )

De esta última gráfica ( $r=0.9868$ ) se observa que la altura total de las dos curvas  $E_{p_2} = 1.42 \text{ v/ESC}$  y  $E_{p_3} = 1.54 \text{ v/ESC}$  corresponde a la reducción total de la cianocobalamina que alcanza el electrodo vía difusión ( $I_p$  es proporcional a la concentración de cianocobalamina ).

Cianocobalamina  $10^{-4}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M + KCN 0.01 M  
 Sensibilidad  $10 \mu A$

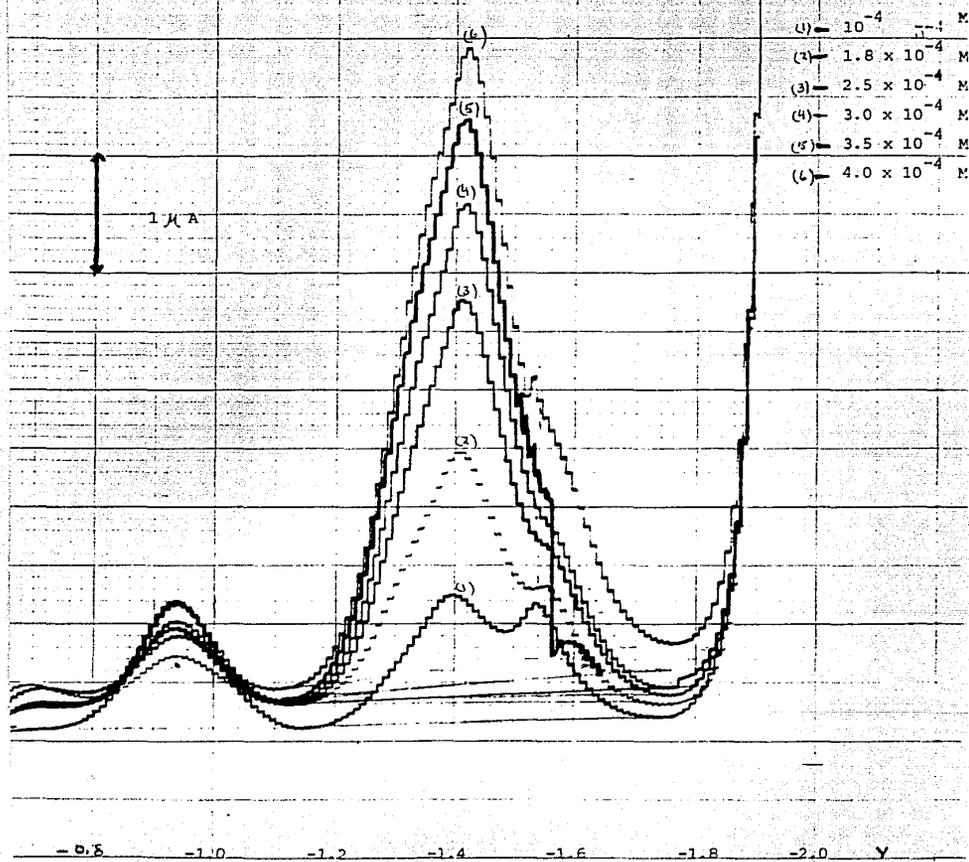


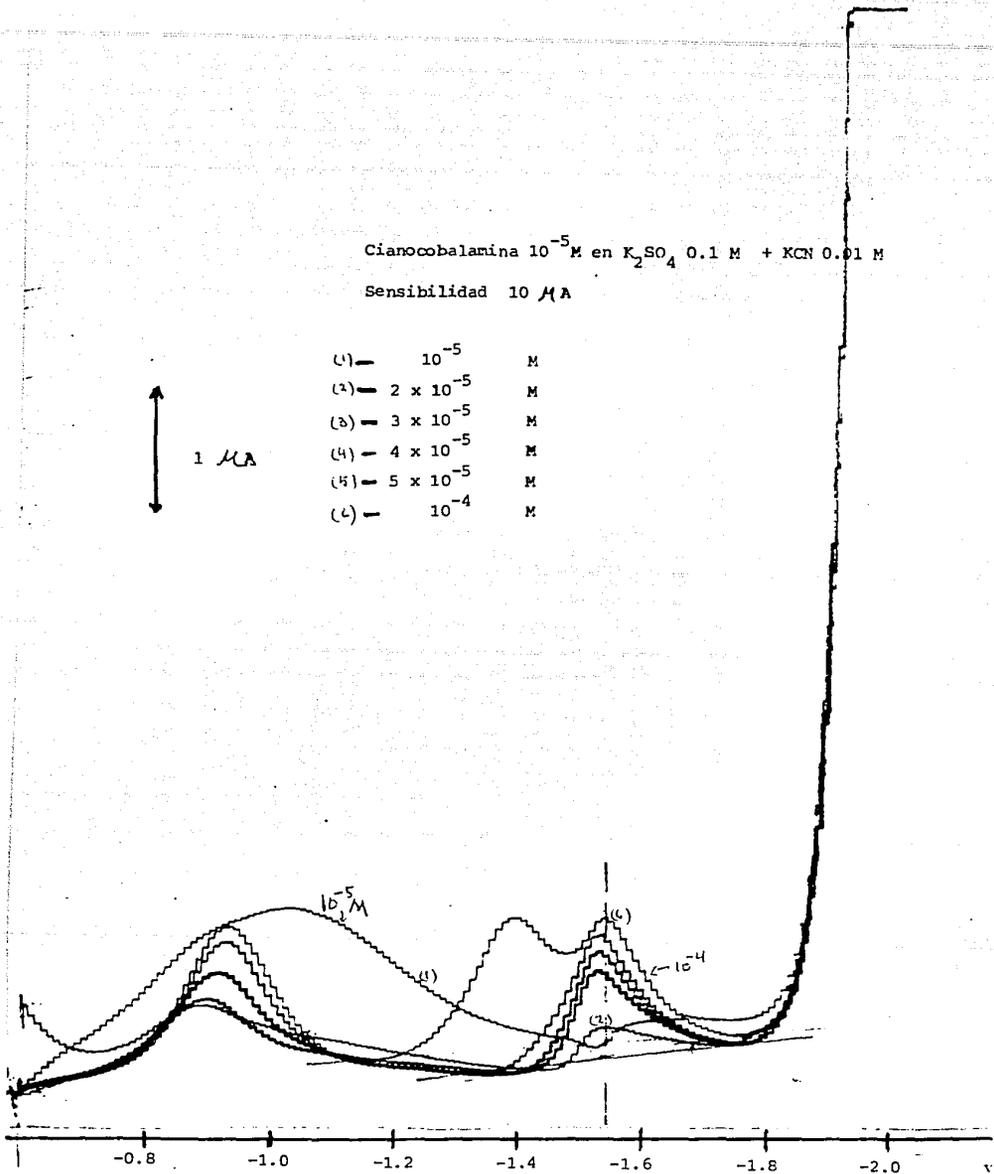
Figura 7

Cianocobalamina  $10^{-5}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M + KCN 0.01 M

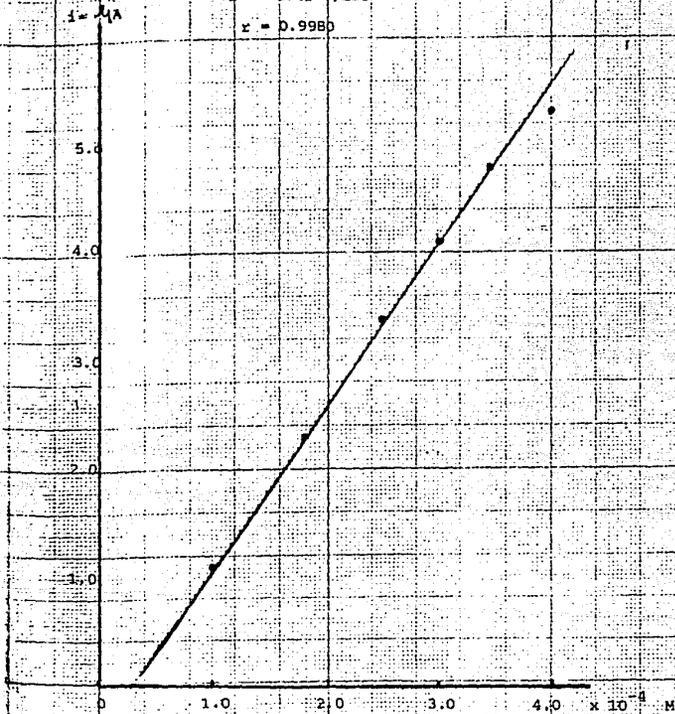
Sensibilidad 10  $\mu$ A

- |       |                    |   |
|-------|--------------------|---|
| (1) — | $10^{-5}$          | M |
| (2) — | $2 \times 10^{-5}$ | M |
| (3) — | $3 \times 10^{-5}$ | M |
| (4) — | $4 \times 10^{-5}$ | M |
| (5) — | $5 \times 10^{-5}$ | M |
| (6) — | $10^{-4}$          | M |

↑  
1  $\mu$ A  
↓

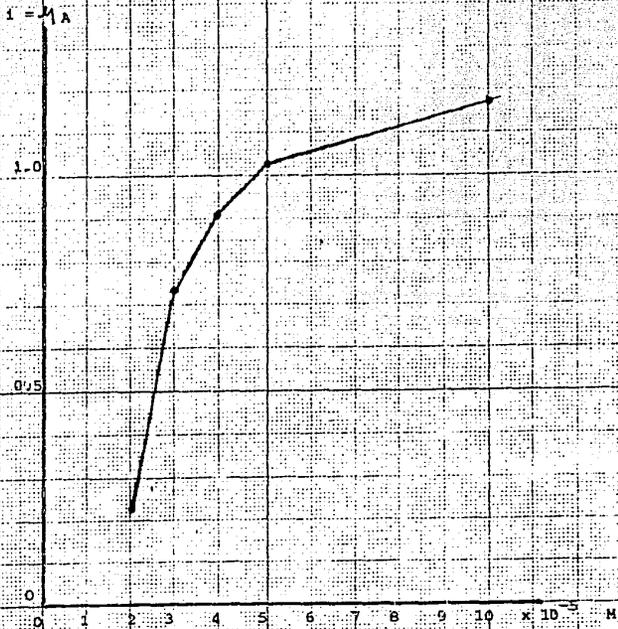


Escala de cianocobalamina  $10^{-4}$  M en  
medio:  $K_2SO_4$  0.1 M + KCN 0.01 M  
 $E = -1.42 + i/ESC$   
 $r = 0.9980$



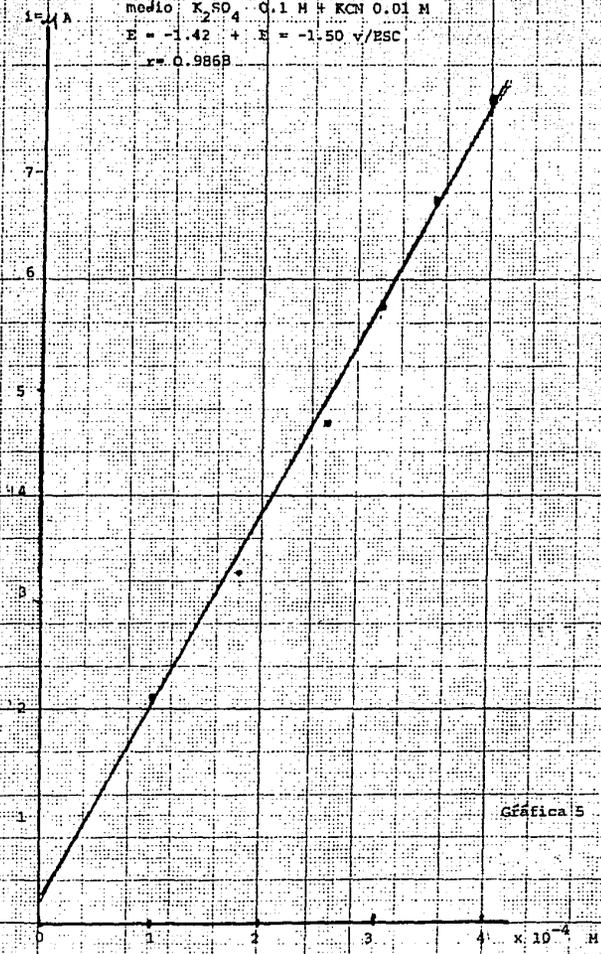
Gráfica 3

Escala de cianocobalamina  $10^{-4}$  M en  
medio  $K_2SO_4$  0.1 M + KCN 0.01 M  
 $E = -1.50$  v/ESC



Gráfica 4

Escala de cianocobalamina total en  
medio  $K_2SO_4$   $0.1 M$  +  $KCN$   $0.01 M$   
 $E = -1.42 + E = -1.50 v/ESC$   
 $r = 0.9868$



Gráfica 5

### 1.3 Medio de disolución amortiguadora de fosfatos 0.4 M , pH=6.9.

#### 1.3.1.--Polarografía clásica.

1.3.1.1.- El dominio de electroactividad de una disolución amortiguadora de fosfato pH=6.9 a una concentración 0.4 M es de 1.98 v/ESC ( de 0.18 a -1.80 v/ESC ) a una sensibilidad de 10  $\mu$ A,  $i = 0.5 \mu$ A. ( Figura 9 ).

Debido a que la concentración de vitamina B<sub>12</sub> en los jarabes multivitamínicos es del orden de  $10^{-6}$  M ,se experimentó con una disolución  $10^{-6}$  M de cianocobalamina.

El polarograma de una disolución de cianocobalamina  $10^{-6}$  M a una sensibilidad de 10  $\mu$ A presenta un máximo en  $E = -1.58$  v/ESC (figura 10 )Según la literatura ( 14 ) este máximo corresponde a la reducción catalítica de  $H^+$ .

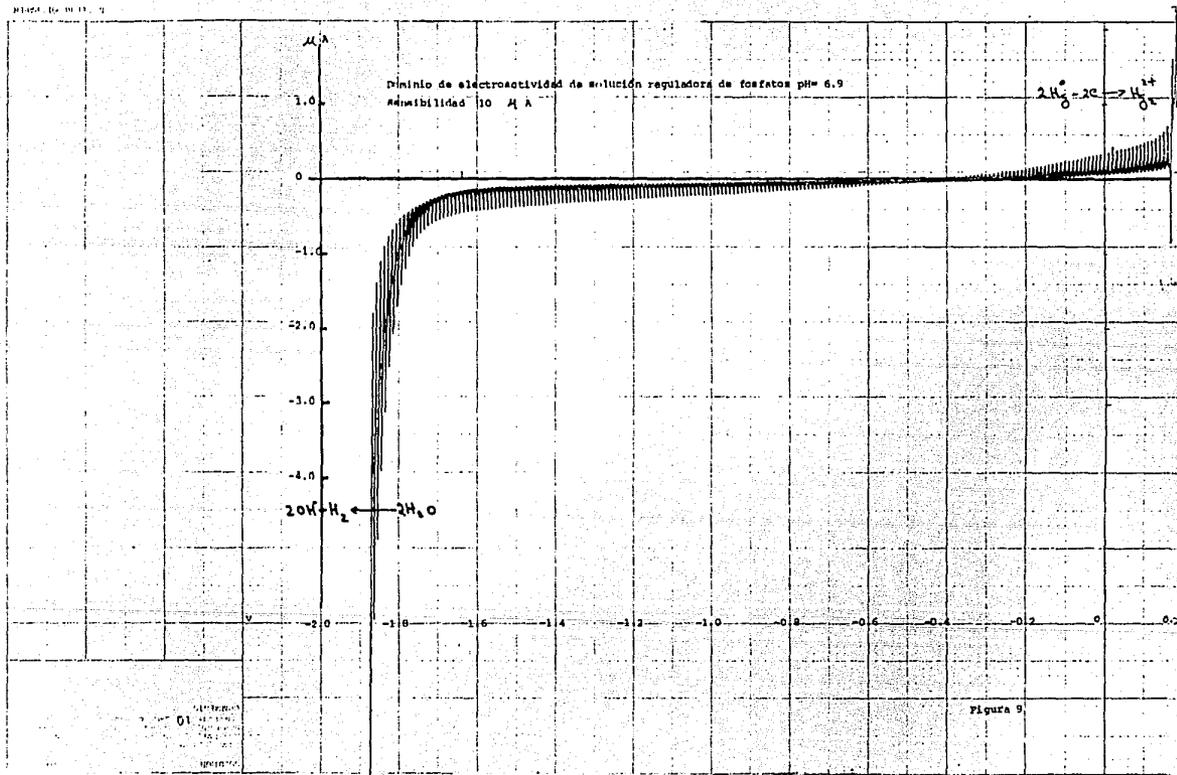
1.3.1.2.-La misma experiencia se realizó con una disolución de cianocobalamina  $10^{-6}$  M en una disolución amortiguadora de citratos a pH = 6.9 y se obtuvo el máximo en el mismo potencial  $E = -1.58$  v/ESC (Figura 10 a )

#### 1.3.1.3.-Tipo de máximo.

1.3.1.3.1.-Para investigar el tipo de máximo,a una disolución de cianocobalamina  $10^{-4}$  M en disolución amortiguadora de fosfatos 0.4 M ,pH = 6.9 , se le adicionó un tensoactivo, tritón al 1 % ( 5 gotas ) y se desarrolló el polarograma. (Figura 10 b).El máximo no se eliminó ,por lo tanto el máximo no es de primera clase(26).

1.3.1.3.2.--También se experimentó con una disolución de cianocobalamina  $10^{-4}$  en solución amortiguadora de fosfatos a pH = 6.9 bajando el bulbo del mercurio para corroborar si se elimina el máximo.El máximo no se eliminó (Figura 10c ) por lo tanto no es de segunda clase (26).

1.3.1.3.3.--Del comportamiento electroquímico de la cianocobalamina en solución amortiguadora de fosfatos a pH = 6.9 y de acuerdo con la literatura (14) se deduce que el máximo a potencial  $E = -1.58$  se debe a la reducción catalítica del  $H^+$ . (Anexo II p 161 ).



Cianocobalamina  $10^{-6}$  M en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.9  
Sensibilidad 10  $\mu$ A

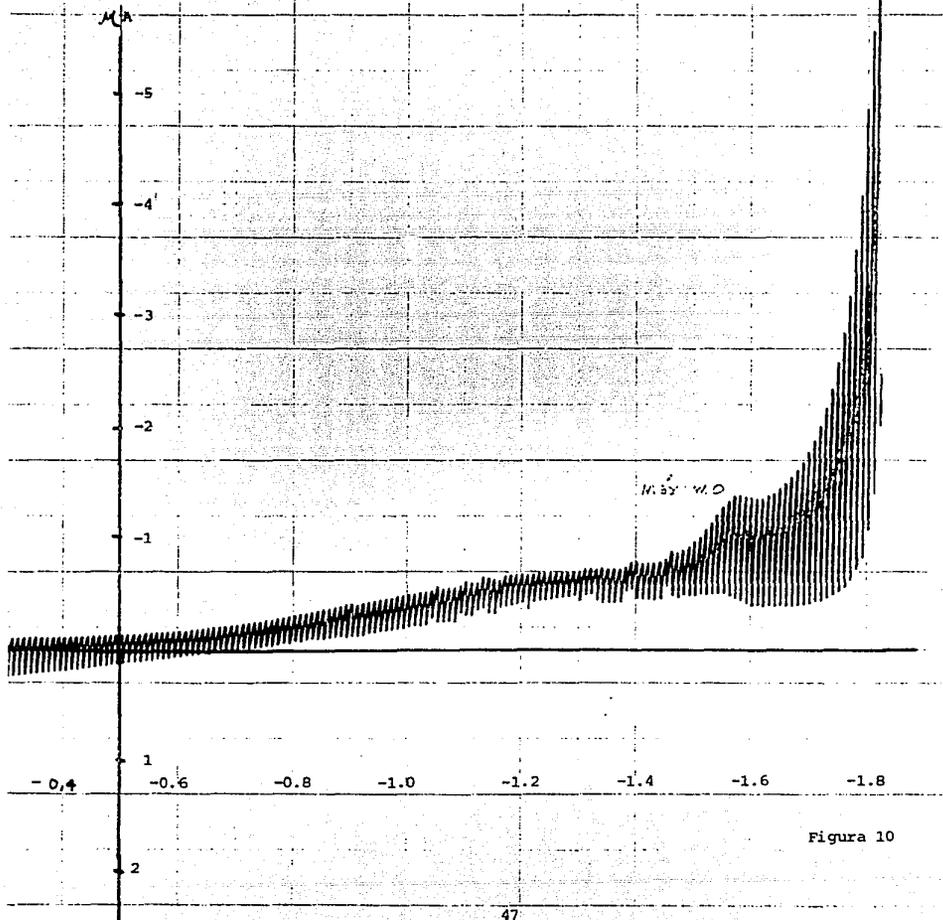
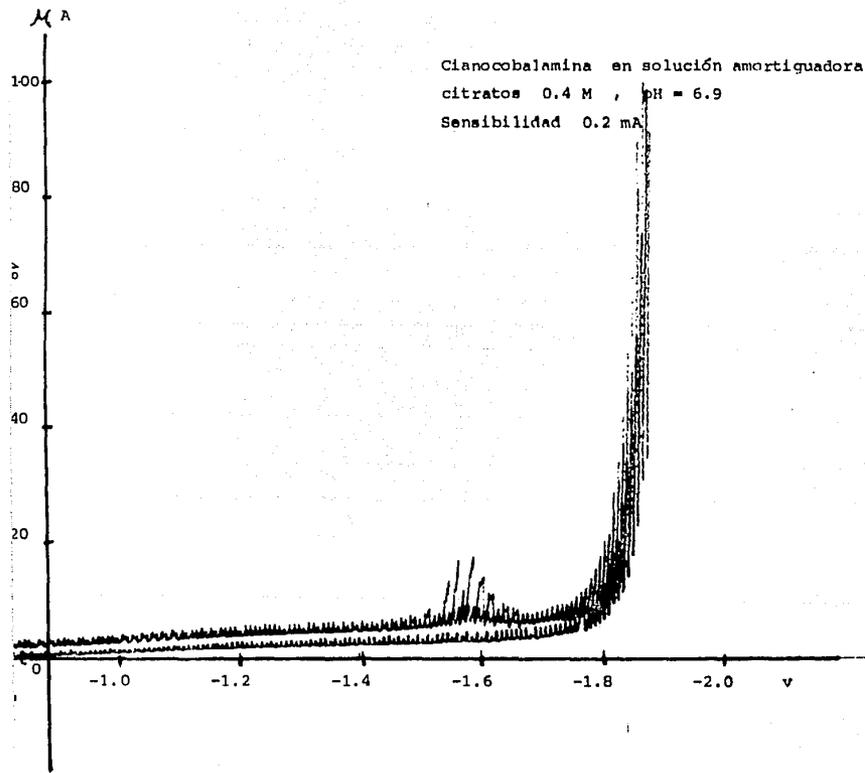


Figura 10



- Electrolito soporte
- Cianocobalamina  $1.5 \times 10^{-6} M$
- Cianocobalamina  $3.0 \times 10^{-6} M$

Figura 10 a

Cianocobalamina  $10^{-4}$  M en disolución amortiguadora de fosfatos 0.4 M, pH=6.9

con Tritón

Sensibilidad 1 mA

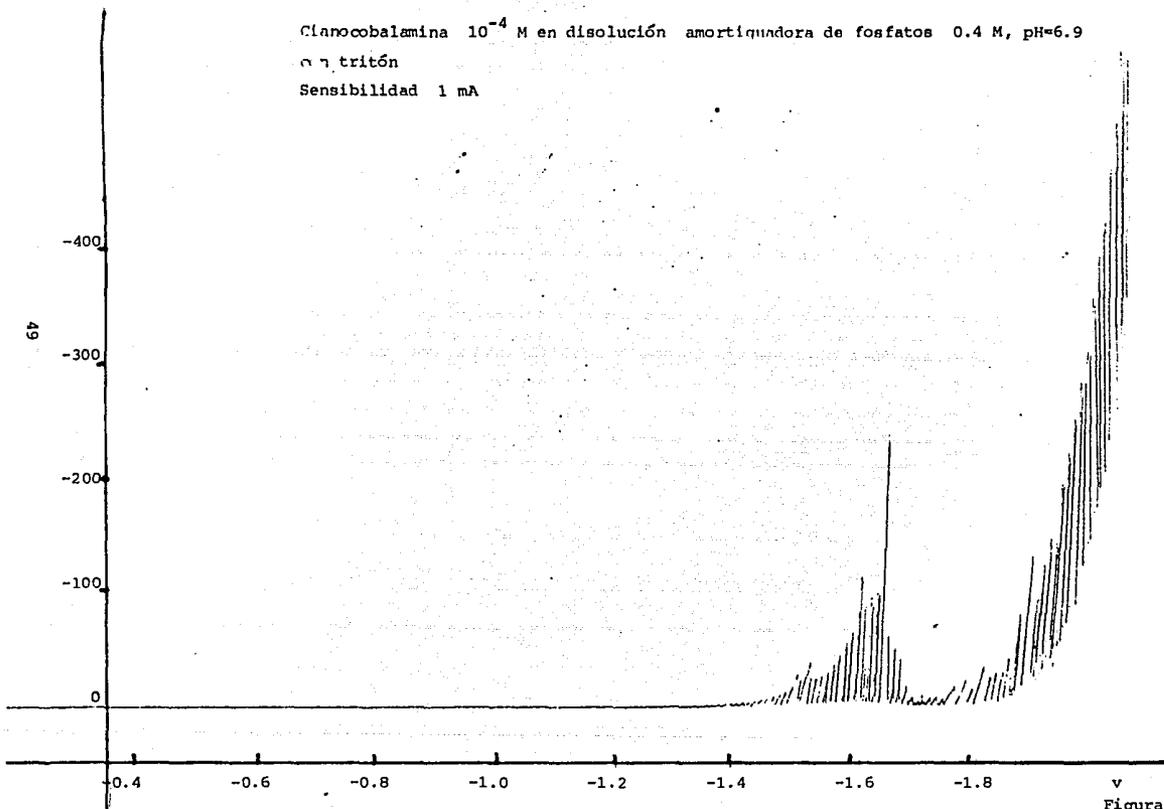
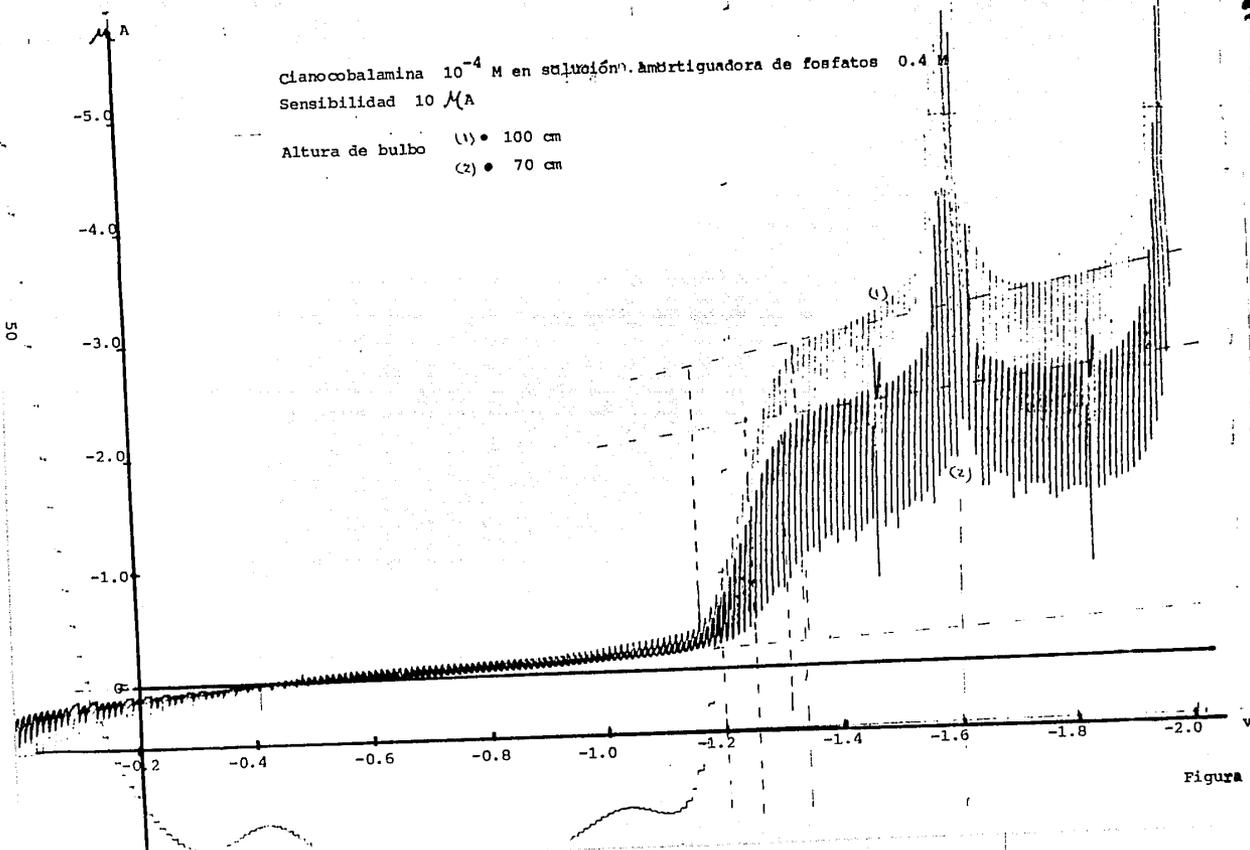


Figura 10 b

Cianocobalamina  $10^{-4}$  M en solución. Amortiguadora de fosfatos 0.4 M  
Sensibilidad 10  $\mu$ A

Altura de bulbo (1) • 100 cm  
(2) • 70 cm



Figura

### 1.3.2.-Polarografía diferencial de impulsos.-

Por esta técnica la solución  $10^{-6}$  M de cianocobalamina, a una sensibilidad de  $10 \mu\text{A}$ , presenta un pico en  $E_p = -1.54 \text{ v/ESC}$  (figura 11), que corresponde a la onda catalítica de reducción del  $\text{H}^+$ .

### 1.3.3.-Relación de la altura de pico con la concentración :

Al hacer una escala de cianocobalamina de  $1.5 \times 10^{-6}$  a  $7.5 \times 10^{-6}$  M a una sensibilidad de  $20 \mu\text{A}$ , se encontró que la altura del pico en  $-1.54 \text{ v/ESC}$  es proporcional a la concentración de cianocobalamina. (figura 12, gráfica 6,  $r=0.9996$ ). De esto se deduce que esta técnica se puede aplicar para la valoración de la cianocobalamina.

Tabla 5:

Concentración de cianocobalamina	$\mu\text{A}$
$1.5 \times 10^{-6}$ M	2.27
$3.0 \times 10^{-6}$ M	4.62
$4.5 \times 10^{-6}$ M	7.29
$6.0 \times 10^{-6}$ M	9.64
$7.5 \times 10^{-6}$ M	12.39

1.3.4.-Debido que esta técnica resultó ser la más conveniente para hacer una determinación cuantitativa a una concentración  $10^{-6}$  M, se hicieron cuatro calibraciones con la misma muestra y se calculó el coeficiente de correlación de los datos obtenidos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 0.9998, 0.9995, 0.9996 y 0.9999.

Esto implica que esta técnica es confiable para aplicarla a la determinación cuantitativa de cianocobalamina a una concentración de  $10^{-6}$  M.

Cianocobalamina  $10^{-6}$  M en solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.9  
Sensibilidad  $10 \mu A$

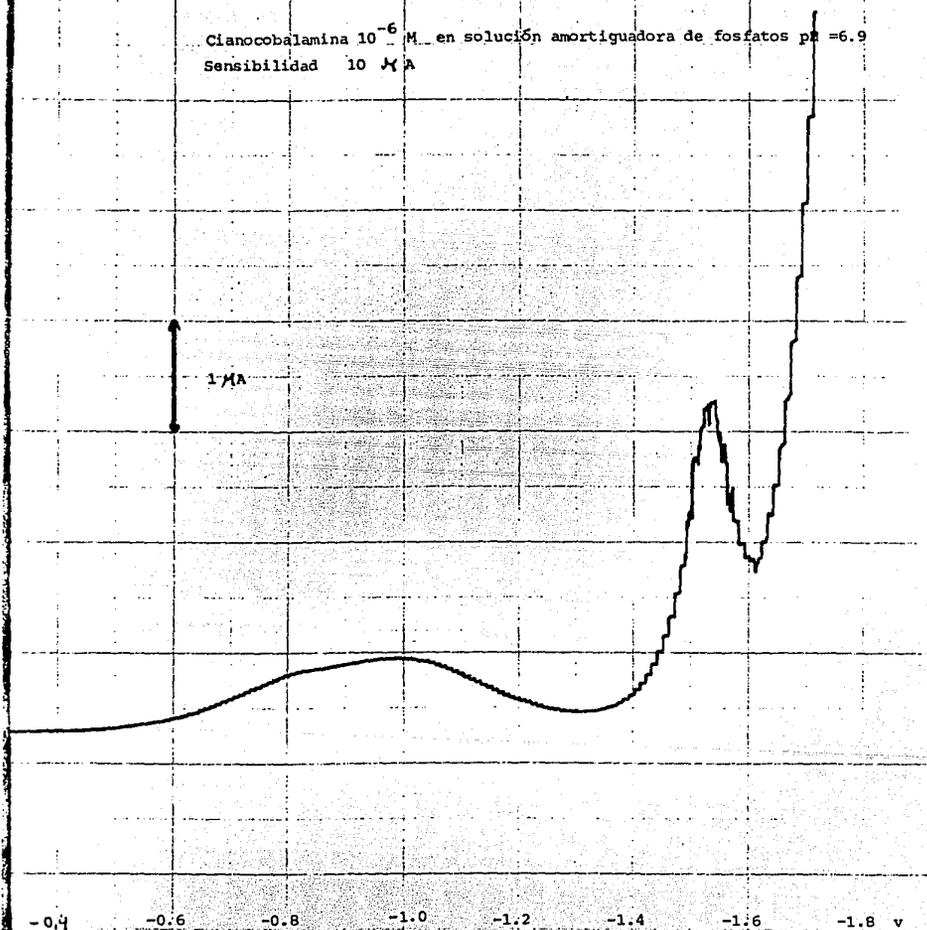
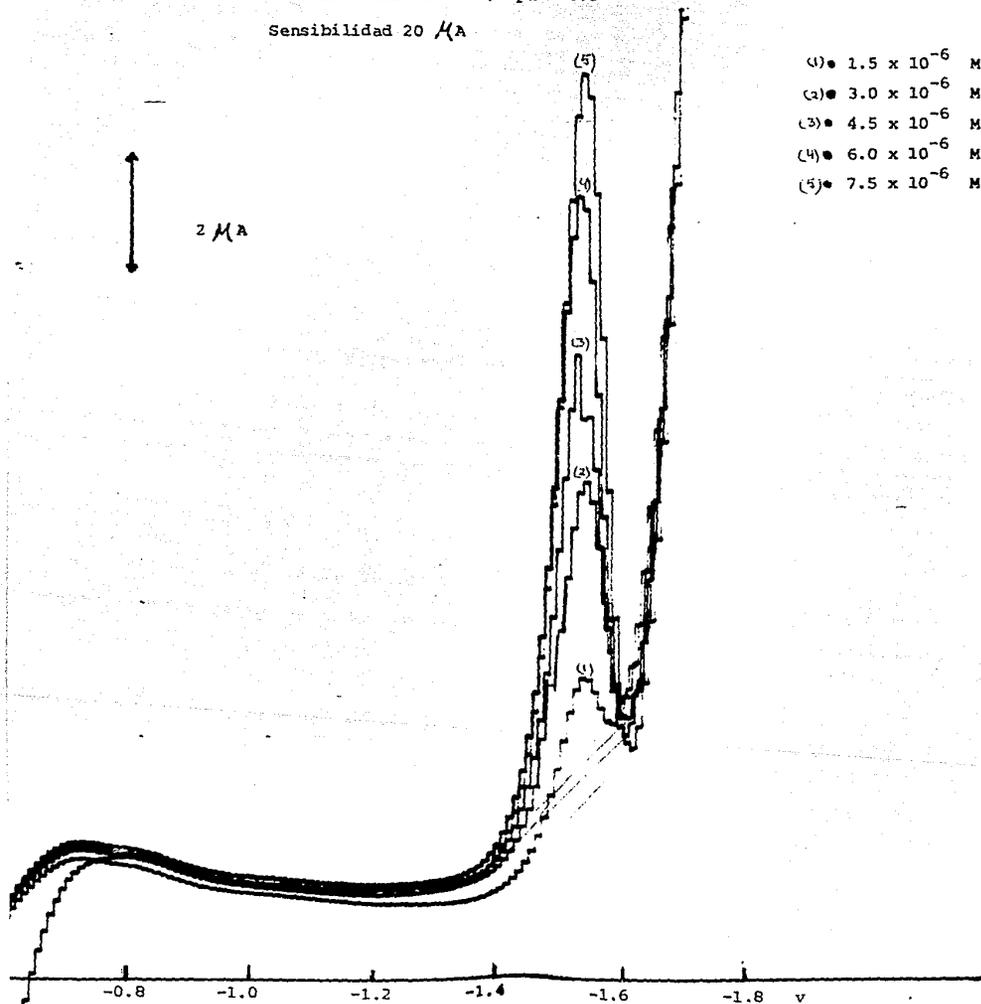


Figura 11

Escala de cianocobalamina en disolución amortiguadora

de fosfatos 0.4 M , pH = 6.9

Sensibilidad 20  $\mu$ A



- (1)  $\bullet$   $1.5 \times 10^{-6}$  M
- (2)  $\bullet$   $3.0 \times 10^{-6}$  M
- (3)  $\bullet$   $4.5 \times 10^{-6}$  M
- (4)  $\bullet$   $6.0 \times 10^{-6}$  M
- (5)  $\bullet$   $7.5 \times 10^{-6}$  M

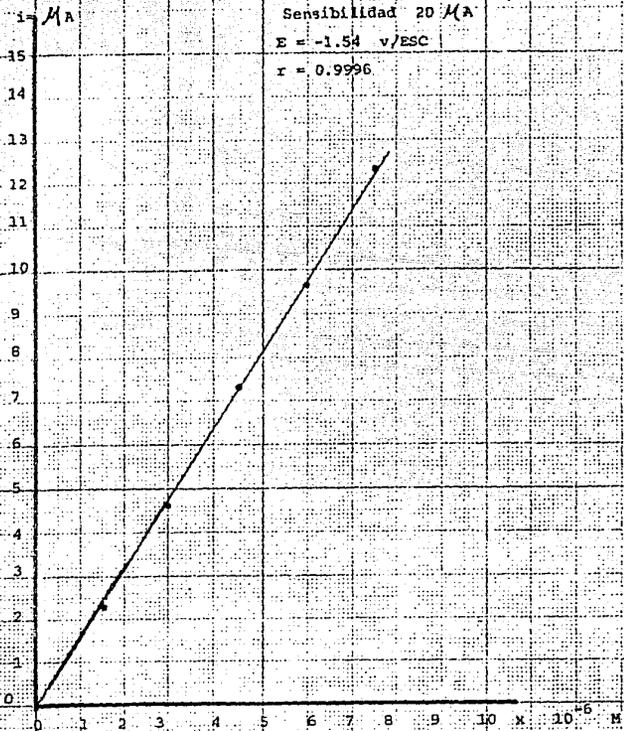
Altura de pico de onda catalítica

$i = f$  (cianocobalamina)

Sensibilidad 20  $\mu$ A

$E = -1.54$  v/ESC

$r = 0.9996$



Gráfica 6

#### 1.4.-Discusión

1.4.1.-Los resultados obtenidos se apoyan principalmente en dos aseveraciones (conclusiones de trabajos de numerosos autores anteriores) relacionadas con el comportamiento electroquímico de la cianocobalamina:

1.- En disoluciones acuosas muy diluidas de cianocobalamina el grupo  $CN^-$  está sustituido por el grupo  $H_2O$  formando la acuocobalamina. El polarograma de la acuocobalamina es distinto al de la cianocobalamina, presenta dos ondas y cada una corresponde al intercambio de un electrón. El polarograma de la cianocobalamina presenta una sola onda que corresponde al intercambio de dos electrones.

2.- Tanto la cianocobalamina como la acuocobalamina son parcialmente adsorbidas en el electrodo y su comportamiento electroquímico está influenciado por este hecho.

Este comportamiento de la cianocobalamina impide que una reacción de reducción de la cianocobalamina sea la conveniente para hacer una determinación cuantitativa, máxime a concentraciones tan bajas como  $10^{-6}M$ .

1.4.2.- De los resultados obtenidos con la experimentación en los tres medios se van a discutir las limitaciones y conveniencias de cada uno de ellos para hacer una determinación cuantitativa en una muestra de concentración  $10^{-6}M$  en cianocobalamina.

1.4.2.1.-En medio sulfato de potasio 0.1 M se encontró:

A) La polarografía clásica es poco sensible para los fines perseguidos.

B) La polarografía diferencial de impulsos presenta falta de reproducibilidad en los polarogramas de acuerdo con las siguientes observaciones:

a) Al variar la concentración de muestra de  $10^{-3}M$  a  $10^{-7}M$

se obtienen picos a potenciales muy distintos, aún a la misma concentración el polarograma varía con el tiempo de preparación de la muestra. (Figura 3 )

b) Hay posibilidad de que la cianocobalamina se transforme en acuocobalamina por la dilución y se obtengan polarogramas distintos a los de la cianocobalamina.

c) Al aumentar la concentración de cianocobalamina en una misma muestra de  $3 \times 10^{-5} M$  a  $7 \times 10^{-5} M$  se encontró linealidad entre la altura de pico y la concentración (Figura 4, Gráfica 2 ) Sin embargo, la sensibilidad de la técnica en este medio no permite la determinación de cianocobalamina por debajo de  $3 \times 10^{-5} M$ .

De lo expuesto anteriormente se concluye que en este medio no es posible efectuar una determinación cuantitativa de la cianocobalamina a nivel de  $10^{-6} M$  que es la concentración en la muestra.

1.4.2.2.-En medio sulfato de potasio 0.1 M más KCN 0.01 M:

A) En polarografía clásica se encontró la posibilidad de que parte de la cianocobalamina se transforme a hidroxocobalamina (ya que el  $pH = 10.6$ ) la cual presenta una onda a un potencial  $E_{1/2} = -0.95 \text{ v/ESC}$  que es distinto al de la cianocobalamina de  $E_{1/2} = -1.42 \text{ v/ESC}$

B) En polarografía diferencial de impulsos se encontró que un pico en  $E_p = -1.42 \text{ v/ESC}$  está controlado por difusión y hay linealidad entre la altura de pico y la concentración entre  $10^{-4} M$  y  $4 \times 10^{-4} M$  (Figura 7 , Gráfica 3  $R=0.9996$  ). Sin embargo, a concentraciones menores a  $10^{-4} M$  se encuentra un pico con un  $E_p = -1.54 \text{ v/ESC}$  que está determinado por la reducción de cianocobalamina que está adsorbida en el electrodo. (25)

Para hacer una determinación cuantitativa por esta técnica

sería necesario sumar las corrientes de los dos picos. Por otra parte la cantidad mínima detectable por esta técnica es mayor a la requerida.

Por lo tanto, el medio con KCN 0.01 M no es conveniente para determinación cuantitativa al nivel de concentración que buscamos.

1.4.2.3.-En solución amortiguadora de fosfatos 0.4 M pH=6.9

A) En polarografía clásica una disolución  $10^{-6}$  M de cianocobalamina en este medio presenta un máximo a un potencial de  $E_{\text{max}} = -1.58$  V/ESC que si es reproducible. Al hacer investigación del tipo de máximo se encontró que este máximo no es de primera clase ni de segunda clase, por lo tanto se deduce que es un máximo catalítico que corresponde a la reducción catalítica de  $H^+$ , lo cual está de acuerdo con la literatura ( 14 ).

Para comprobar que el máximo era causado por la cianocobalamina y no por los iones fosfato, se hizo una determinación en disolución de citratos, pH=6.9, y se obtuvo el máximo en la misma posición lo cual demostró que es ocasionado por la cianocobalamina y que la concentración de  $H^+$  es muy importante para la formación del máximo.

B) En polarografía diferencial de impulsos la misma muestra presenta un pico a  $E_p = -1.54$  V/ESC. La altura de este pico presenta linealidad con la concentración de la solución en un intervalo de  $1.5 \times 10^{-6}$  M a  $7.5 \times 10^{-6}$  M (Figura 12, Gráfica 6,  $r = 0.9996$  ).

Dado que esta técnica por su precisión y su límite de detección es la técnica conveniente para hacer la determinación cuantitativa será la que se ensaye para la determinación de cianocobalamina en preparados multivitamínicos.

## 2.- Determinación polarográfica de otras vitaminas del complejo B

Para la realización de este estudio se consideraron las diferentes vitaminas del complejo B a una concentración según la siguiente fórmula patrón:

Vitamina	Concentración en mg. por 100 ml.	M
Tiamina	20	$5.9 \times 10^{-4}$
Riboflavina	20	$5.3 \times 10^{-4}$
Piridoxina	20	$9.7 \times 10^{-4}$
Nicotinamida	100	$8.2 \times 10^{-3}$
Cianocobalamina	100 mcg	$7.4 \times 10^{-7}$

En todas las experiencias se empleo un  $\Delta E = 25$  mv, velocidad de barrido de 10 mv / seg. y un tiempo de goteo de 0.5 seg.

### 2.1.- En medio sulfato de potasio 0.1 M

#### 2.1.1.- Tiamina.

La tiamina a una concentración de  $5.9 \times 10^{-4}$  M en polarografía clásica muestra una onda en un  $E_{1/2} = -1.26$  v/ESC a una sensibilidad de 10  $\mu A$  ( Figura 13 )

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico grande en un  $E_p = -1.28$  v/ESC y un pico pequeño en un  $E_p = -1.67$  v/ESC a una sensibilidad de 20  $\mu A$  ( Figura 14 ).

#### 2.1.2.- Riboflavina

La riboflavina a una concentración de  $5.3 \times 10^{-4}$  M en polarografía clásica muestra una onda en un  $E_{1/2} = -0.42$  v/ESC a una sensibilidad de 20  $\mu A$ . ( Figura 15 )

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico grande con un  $E_p = -0.45$  v/ESC y uno

pequeño con un  $E_p = -1.28$  v/ESC a una sensibilidad de  $50 \mu A$ .  
(Figura 16 )

### 2.1.3.-Piridoxina.

-La piridoxina a una concentración de  $9.7 \times 10^{-4} M$  en polarografía clásica presenta un máximo a un potencial de  $-1.52$  v/ESC a una sensibilidad de  $50 \mu A$ . (Figura 17 )  
A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico en un  $E_p = -1.50$  v/ESC a la misma sensibilidad. ( Figura 18 )

### 2.1.4.-Nicotinamida.

La nicotinamida a una concentración de  $8.1 \times 10^{-3} M$  en polarografía clásica muestra una onda con un  $E_{1/2} = -1.62$  v/ESC a una sensibilidad de  $10 \mu A$  (Figura 19 ).  
A la misma concentración y sensibilidad en polarografía diferencial de impulsos muestra un pico pequeño en un  $E_p = -1.05$  v/ESC y uno grande con un  $E_p = -1.63$  v/ESC. (Figura 20).

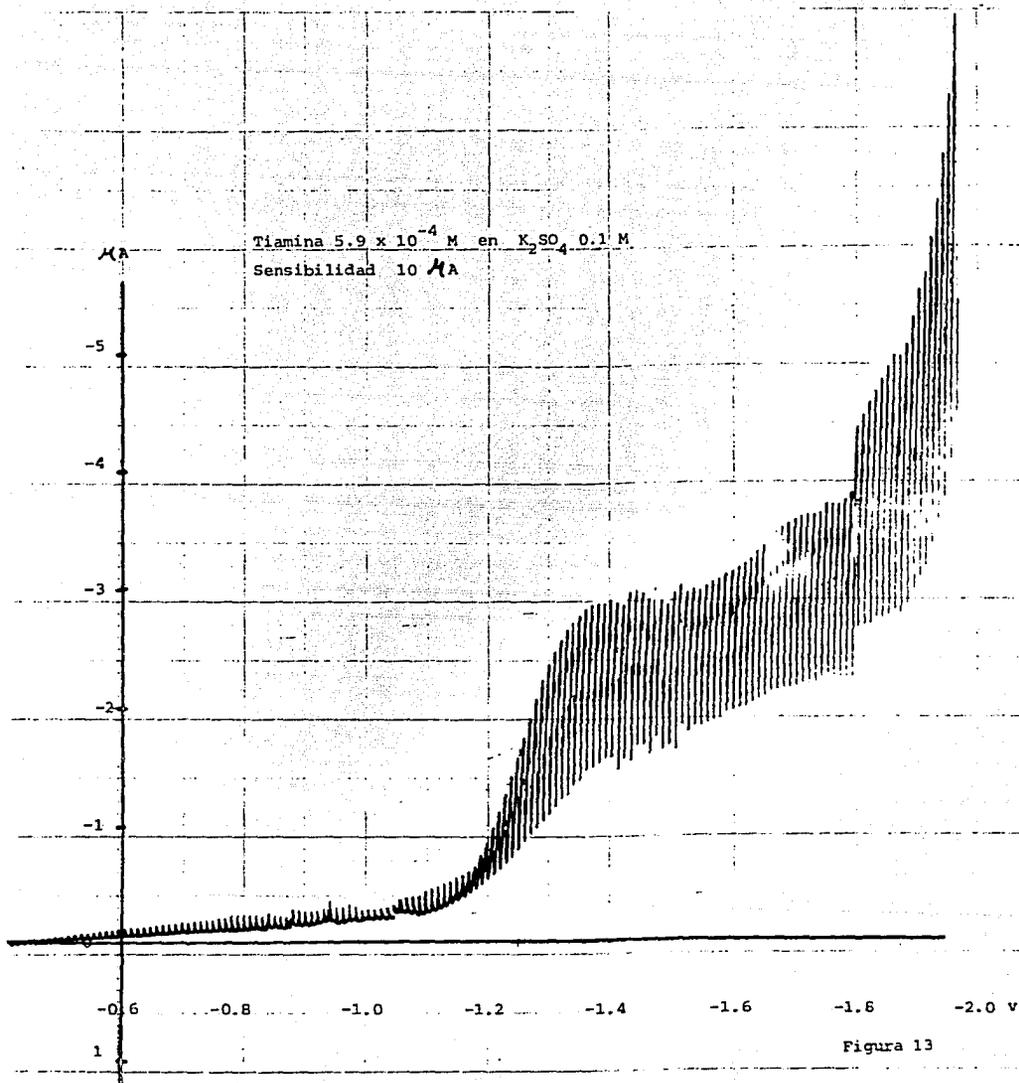


Figura 13

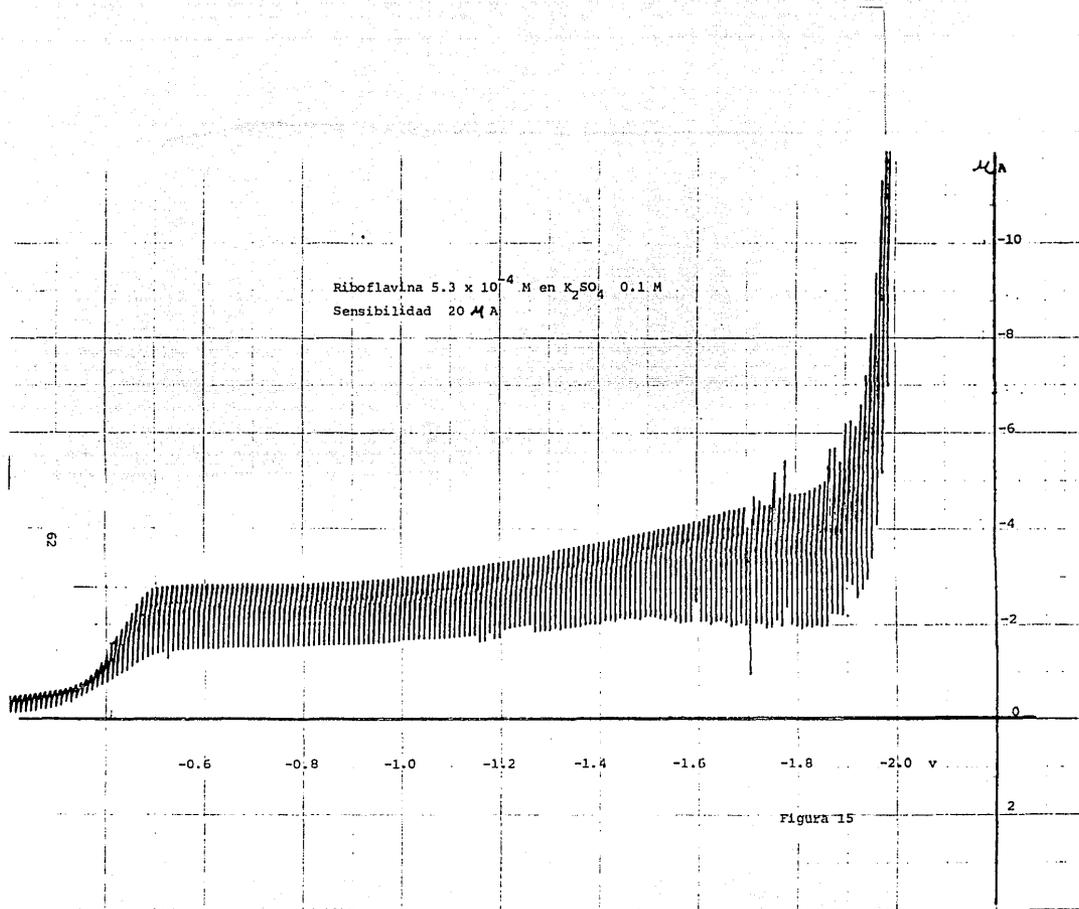
Tiamina  $5.9 \times 10^{-4}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M

Sensibilidad 20  $\mu$ A

2  $\mu$ A

-0.6      -0.8      -1.0      -1.2      -1.4      -1.6      -1.8      -2.0v

Figura 14



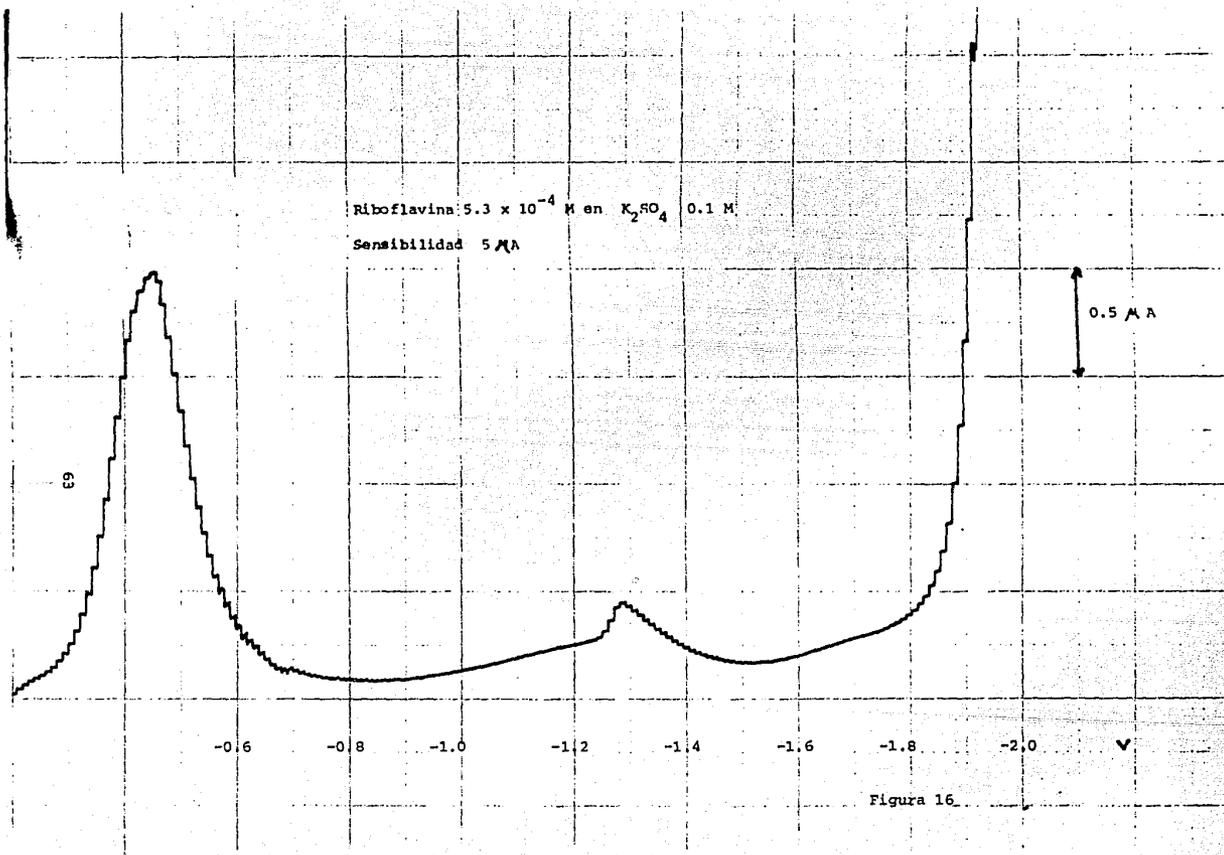


Figura 16.

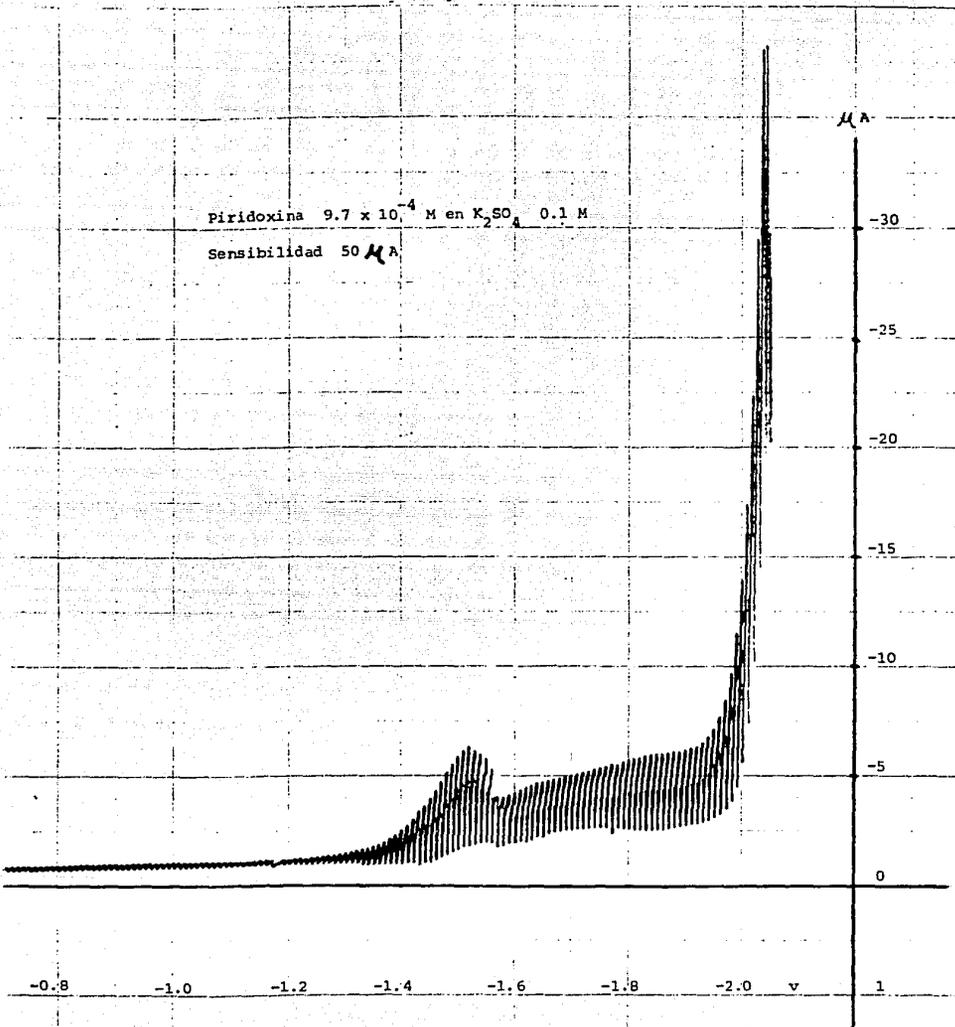


Figura 17

Piridoxina  $9.7 \times 10^{-4}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M  
Sensibilidad 50  $\mu$ A

5  $\mu$ A

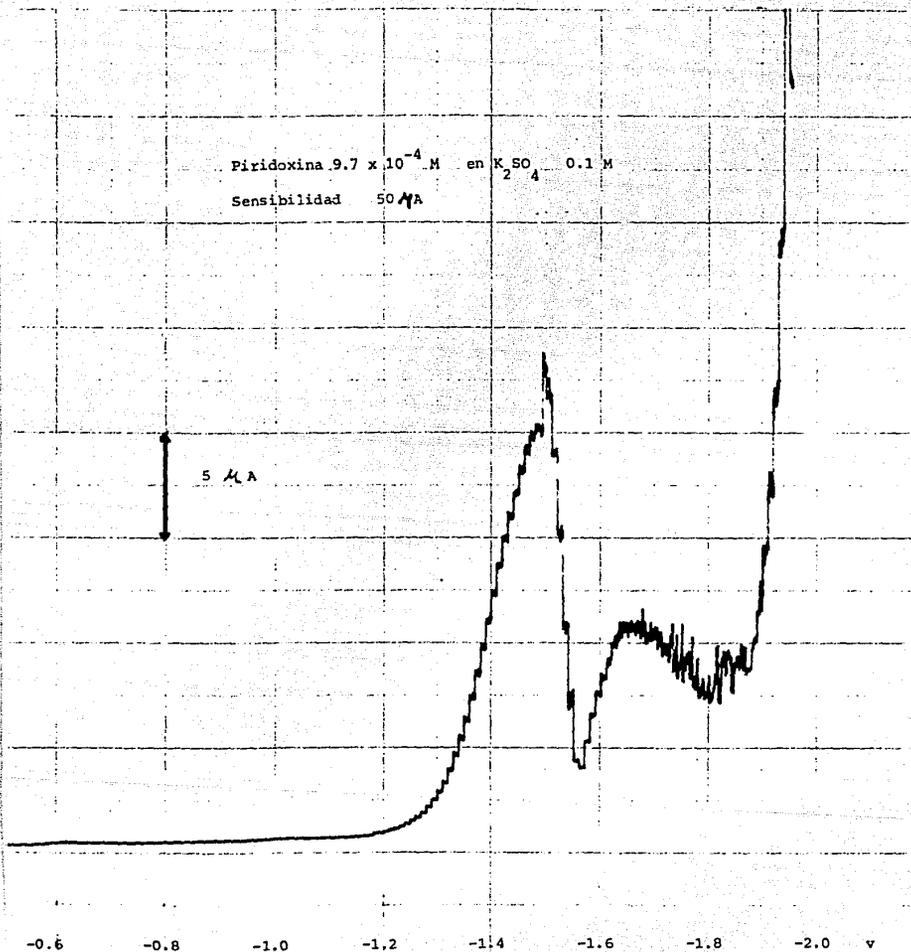


Figura 18

Nicotinamida  $8.1 \times 10^{-3}$  M en  $K_2SO_4$  0.1 M  
Sensibilidad  $10 \mu A$

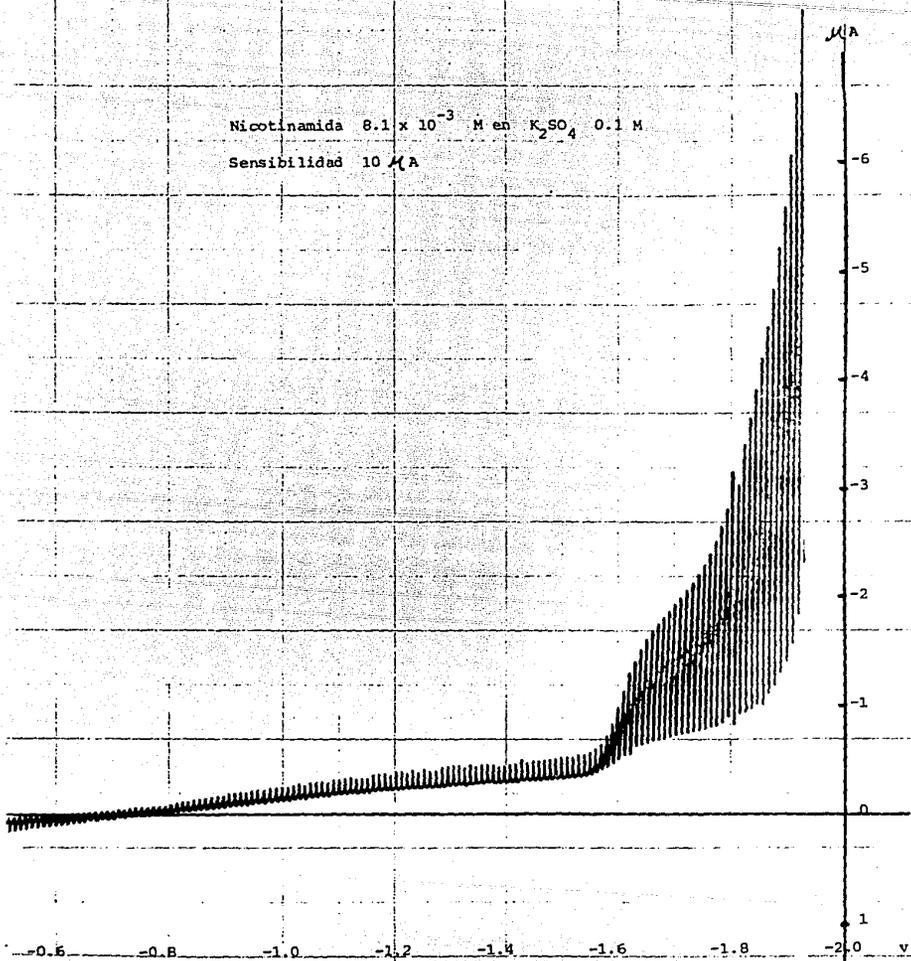


Figura 19

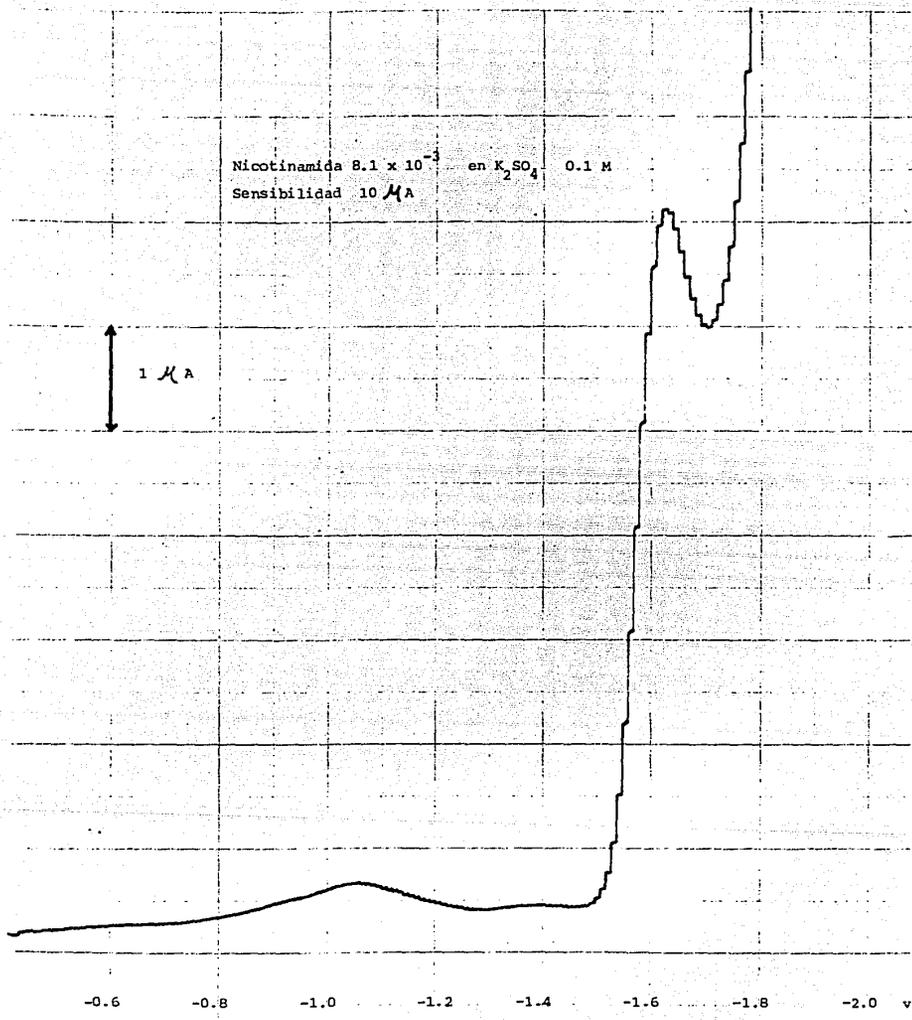


Figura 20

## 2.2 En medio fosfato 0.4 M tamponado a pH = 6.9

### 2.2.1. Tiamina.

La tiamina a una concentración de  $5.9 \times 10^{-4}$  en polarografía clásica presenta una onda con un  $E_{1/2} = -1.76$  v/ESC, que corresponde al intercambio de un electrón, y un máximo en un  $E_{\max} = -1.95$  v/ESC a una sensibilidad de 2 mA. (Figura 21).

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico con un  $E_p = -1.88$  v/ESC, con una deformación en  $-1.74$  v/ESC, a una sensibilidad de 5 mA. ( Figura 22 )

### 2.2.2. Riboflavina

La riboflavina a una concentración de  $1.25 \times 10^{-4}$  en polarografía clásica presenta una onda con un potencial de  $E_{1/2} = -0.57$  v/ESC, que corresponde al intercambio de un electrón a una sensibilidad de  $10 \mu A$  ( Figura 23 ).

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico grande con un  $E_p = -0.58$  v/ESC y un pico pequeño con un  $E_p = -1.28$  v/ESC a una sensibilidad de  $10 \mu A$  ( Figura 24 )

### 2.2.3. Piridoxina

La piridoxina a una concentración de  $9.7 \times 10^{-4} M$  en polarografía clásica presenta una onda en  $-1.6$  v/ESC a una sensibilidad de  $10 \mu A$  (Figura 25 ).

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico en  $E_p = -1.6$  v/ESC a la misma sensibilidad ( Figura 26 )

### 2.2.4. Nicotinamida

La nicotinamida a una concentración de  $8.1 \times 10^{-3} M$  presenta un máximo a un potencial de  $E_{\max} = -1.76$  v/ESC con polarografía clásica a una sensibilidad de  $500 \mu A$  .

( Figura 27 ).

A la misma concentración en polarografía diferencial de impulsos presenta un pico con un  $E_p = -1.76 \text{ v/ESC}$  a una sensibilidad de 2 mA ( Figura 28 )

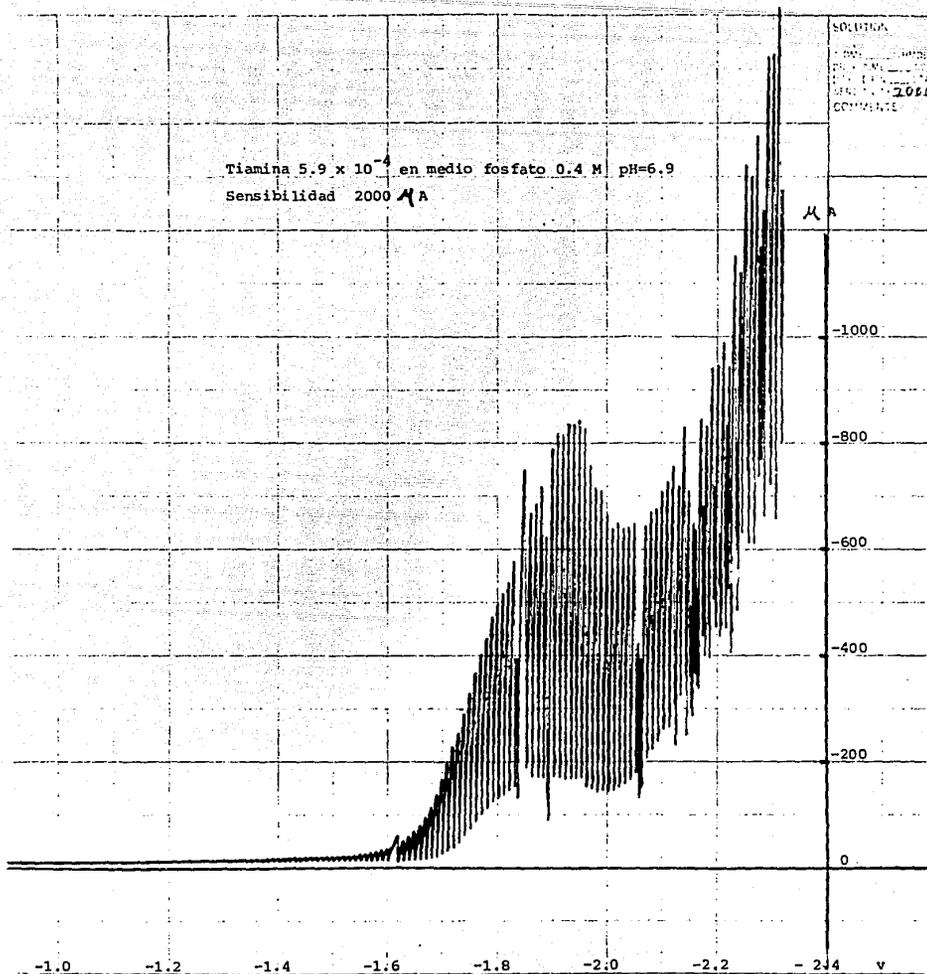


Figura 21

Tiamina  $5.9 \times 10^{-4}$  M. en medio fosfato 0.4 M pH=6.9  
Sensibilidad  $5000 \mu\text{A}$

500  $\mu\text{A}$

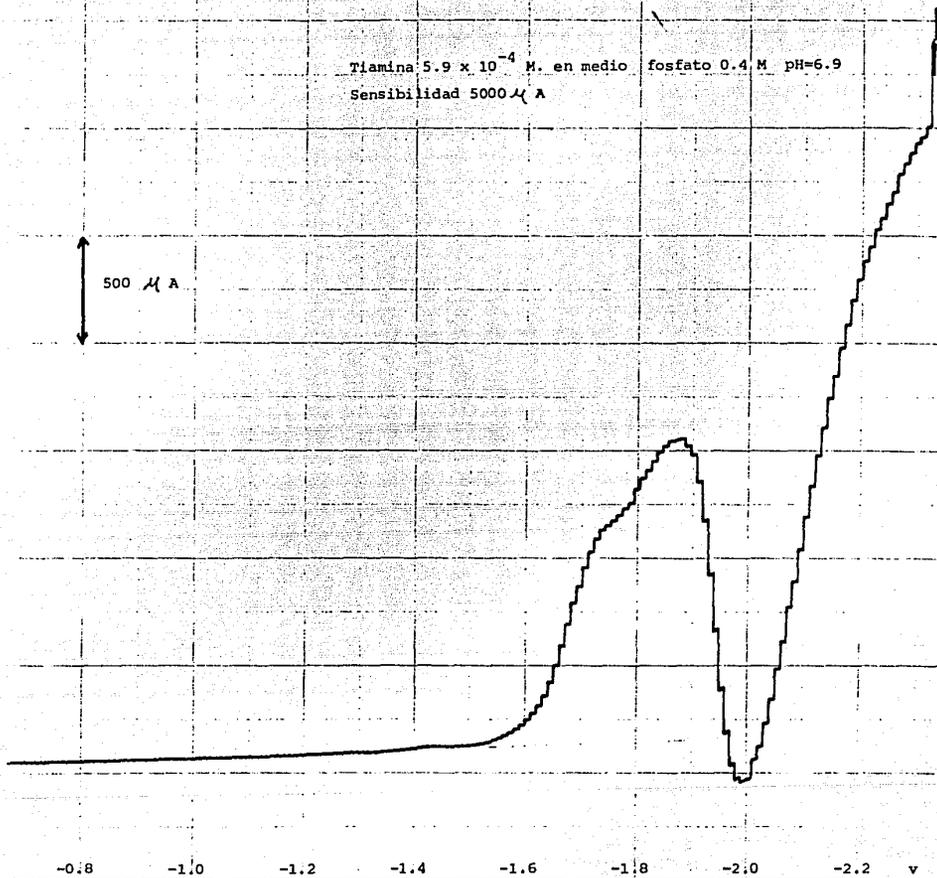


Figura 22

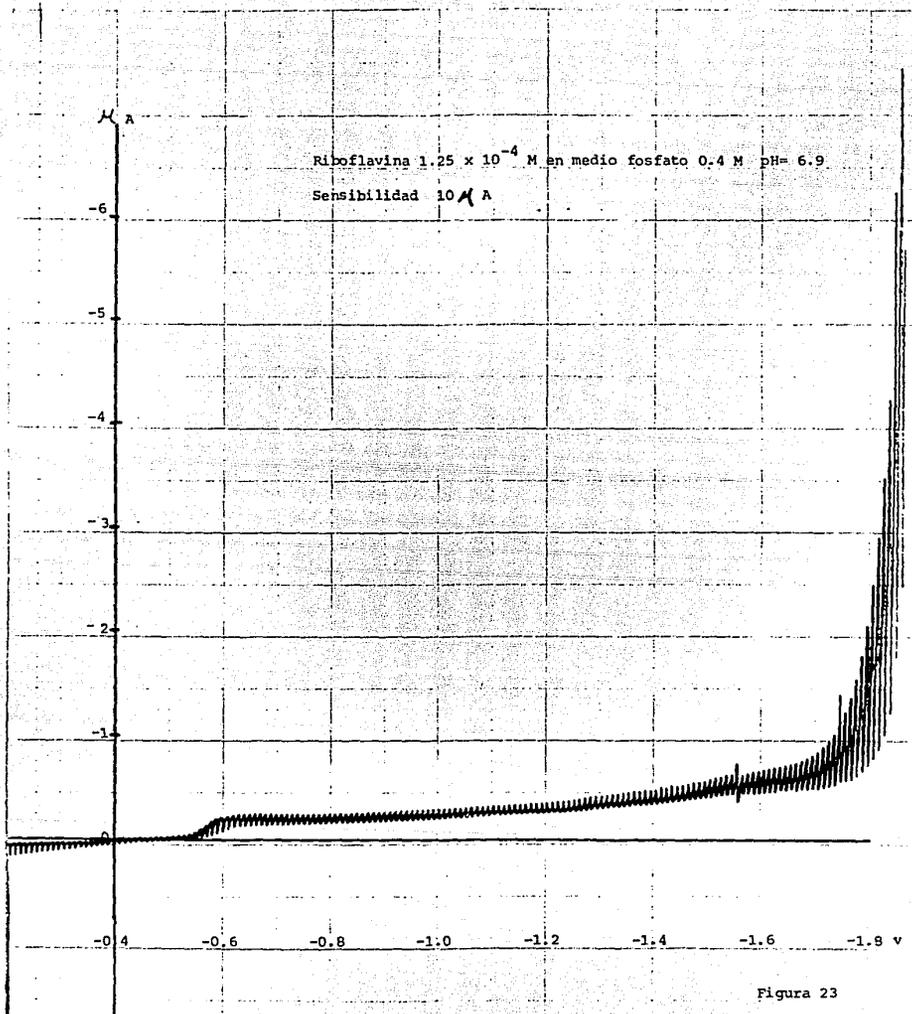


Figura 23

Riboflavina  $1.25 \times 10^{-4}$  M en medio fosfato 0.4 M pH=6.9  
Sensibilidad  $10 \mu A$

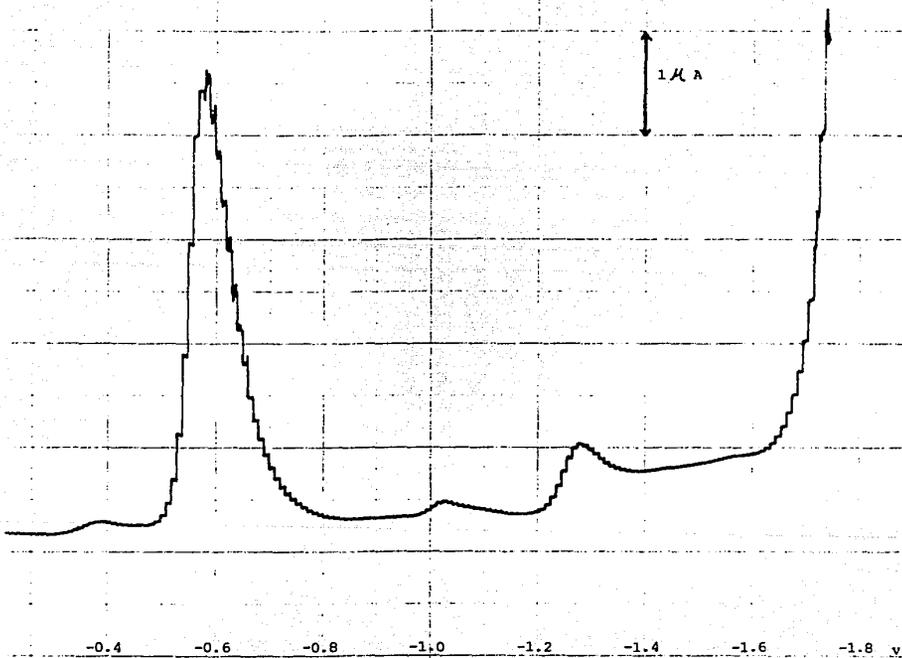


Figura 24





Nicotinamida  $8.1 \times 10^{-3}$  M en medio fosfato 0.4 M pH = 6.9  
Sensibilidad 500  $\mu$ A

76

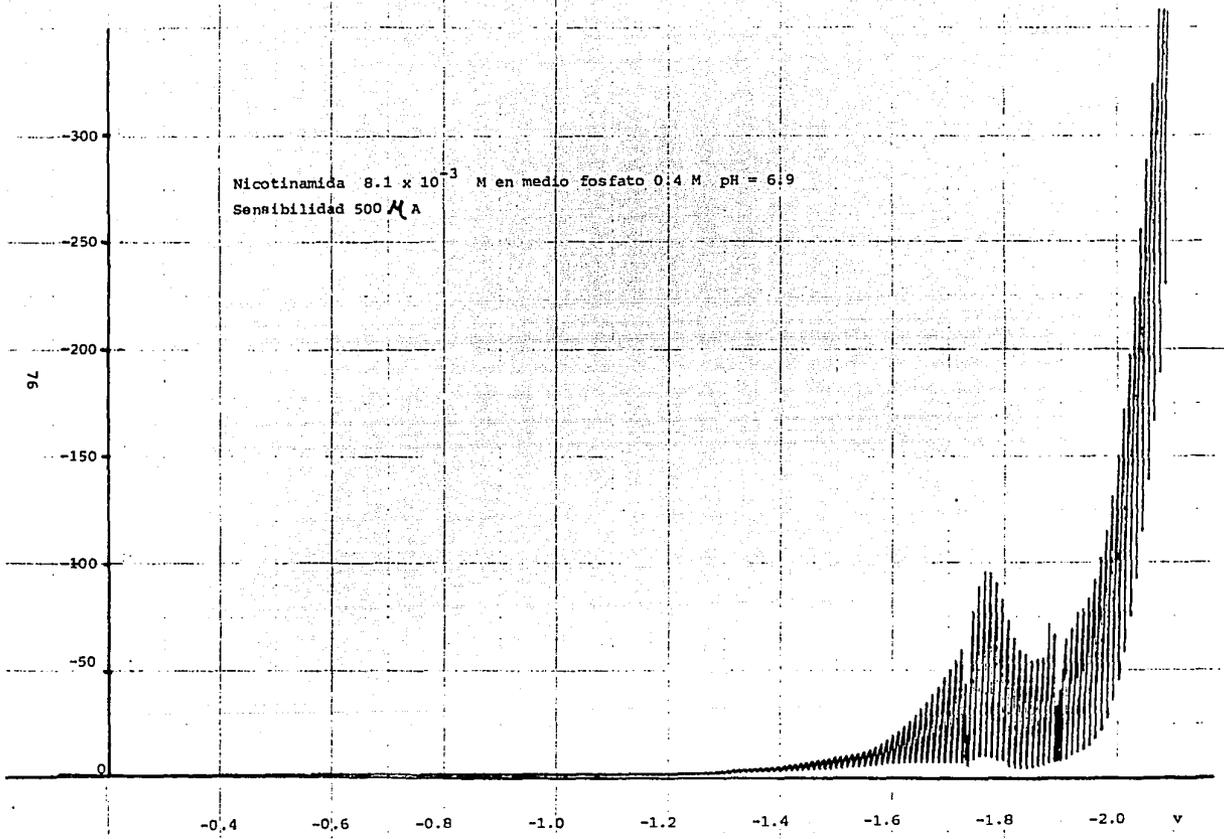


Figura 27

Nicotinamida  $8.1 \times 10^{-3}$  M en medio fosfato 0.4 M pH=6.9  
Sensibilidad 2 mA

200  $\mu$  A

$\mu$

-0.4

-0.6

-0.8

-1.0

-1.2

-1.4

-1.6

-1.8

-2.0

V

Figura 28

2.3 Tabla de valores de  $E_{1/2}$  y  $E_p$  de las diferentes vitaminas del complejo B.

2.3.1. En medio de sulfato de potasio 0.1 M.

Polarografía clásica.

Vitamina	$E_{1/2}$	Sensibilidad
Tiamina	-1.26 v/ESC	10 $\mu$ A
Riboflavina	-0.42 "	20 "
Piridoxina	-1.52 " máximo	50 "
Nicotinamida	-1.62 "	10 "

Polarografía diferencial de impulsos.

$E_p$

Tiamina	-1.28 y -1.67 v/ESC	20 $\mu$ A
Riboflavina	-0.45 y -1.28 "	50 "
Piridoxina	-1.50 "	50 "
Nicotinamida	-1.05 y -1.63 "	10 "

2.3.2-En medio de fosfato 0.4 M tamponado a pH = 6.9

Polarografía clásica.

Vitamina	$E_{1/2}$	Sensibilidad
Tiamina	-1.76 v/ESC -1.95 max.	2 mA
Riboflavina	-0.57 "	10 $\mu$ A
Piridoxina	-1.6 "	10 "
Nicotinamida	-1.76 " max.	500 $\mu$ A

Polarografía diferencial de impulsos.

Vitamina	$E_p$ v/ESC	Sensibilidad	Altura de pico $\mu$ A
Tiamina	-1.88	5 mA	1400
Riboflavina	-0.58	10 $\mu$ A	18.2
Piridoxina	-1.60	10 $\mu$ A	1.3
Nicotinamida	-1.76	2 mA	400
Cianocobalamina	-1.53	10 $\mu$ A	2.3

## 2.4.-Métodos electroquímicos propuestos en la literatura para la determinación de: tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina.

### 2.4.1.-Tiamina.

Según la literatura (16) se han desarrollado muchos métodos polarográficos para el ensayo de la tiamina. Probablemente el más usado es la oxidación anódica con el electrodo de gota de mercurio en el cual se forma una sal de mercurio y tiene un E 1/2 de  $-0.40$  v/ESC. El límite de detección por este método es de  $20$  mg/l.

### 2.4.2.-Riboflavina.

Según la literatura la riboflavina se puede valorar (17) por polarografía clásica haciendo una curva de calibración de  $1$  a  $50$  ppm. La corriente controlada por difusión es proporcional a la concentración.

En disoluciones muy diluidas la riboflavina se adsorbe en el electrodo.

En muestras comerciales se puede emplear el método de adiciones estandar y hacer la determinación por la técnica de polarografía diferencial de impulsos.

### 2.4.3.-Nicotinamida.-

Según la literatura la reducción de nicotinamida (17) corresponde a un intercambio de dos electrones y la onda está bien definida en disoluciones amortiguadas de pH  $8$  o mayor. El potencial de  $1/2$  onda es de  $-1.75$  v/ESC. Se usa como electrolito soporte hidróxido de litio  $0.1$  M. La nicotinamida se puede valorar por polarografía DC. Se prepara una curva de calibración de  $1$  a  $100$  ppm en hidróxido de litio  $0.1$  M. La altura de la onda controlada por difusión es proporcional a la concentración. Por polarografía diferencial de impulsos se pueden valorar

cantidades de 0.1 a 1 ppm

#### 2.4.4.-Piridoxina.-

Según la literatura (20) para la determinación de piridoxina en preparaciones farmacéuticas se ha usado la onda polarográfica en disolución amortiguadora de amoniaco pH = 8.6-8.7. El potencial de 1/2 onda está muy cerca de la barrera.

Otro método que se ha usado es la voltametría anódica con electrodo de pasta de carbón. Las mediciones voltamétricas fueron realizadas con un polarógrafo convencional de tres electrodos. Velocidad de barrido de  $0.6 \text{ v min}^{-1}$ . El electrodo indicador es el electrodo de pasta de carbón, el electrodo de referencia es el electrodo saturado de calomel y un electrodo de platino como electrodo auxiliar. El potencial de pico es de  $0.6 \text{ v/ESC}$ . En una escala de concentraciones de  $10^{-6} \text{ M}$  a  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  se encontró linealidad en la corriente de pico. Otras vitaminas del complejo B: tiamina, riboflavina y nicotinamida no son oxidables en el electrodo de pasta de carbón a valores de pH menores de 10.5 y no interfieren en la determinación de piridoxina.

## 2.5.-Conclusiones .-

Al hacer un resumen de los datos obtenidos por la técnica de polarografía diferencial de impulsos ( $\Delta E$ ), el cálculo de  $n$  y del factor de interferencia obtenemos los siguientes datos:

Vitamina	$n$	$\Delta E$ (con respecto a la cianocobalamina)	Factor de interferencia
Tiamina	1	0.340 v	1 / 790
Riboflavina	1	0.960 v	1/ 710
Piridoxina	1	0.060 v	1/1310
Nicotinamida	2	0.220 v	1/ 11000

De acuerdo con el valor de  $\Delta E$  ninguna de las vitaminas tiene un  $\Delta E$  menor de 40 mv ,con respecto a la cianocobalamina, que es el poder de resolución del método para picos de igual altura (33).Sin embargo, la tiamina y la nicotinamida presentan una gran diferencia de altura con respecto a la cianocobalamina : el pico de la tiamina es 616 veces más alto que el de la cianocobalamina y el pico de la nicotinamida es 176 veces más alto .

El factor de interferencia en el caso de la tiamina, riboflavina y piridoxina está dentro del límite que es 1/10000 (33).En el caso de la nicotinamida el valor del factor de interferencia es de 1/11000,valor fuera del límite aceptado.

De lo anterior se deduce que es imprescindible la separación de la cianocobalamina de las otras vitaminas para su determinación.

### 3.-Separación cromatográfica de la vitamina B<sub>12</sub>..

#### 3.1.-Introducción.

En primer lugar se estudió la reducción polarográfica de las vitaminas :tiamina,riboflavina ,piridoxina y nicotinamida en el medio fosfato 0.4 M pH 6.9,obteniéndose los resultados reportados en el capítulo anterior.De las experiencias realizadas se concluyó que para eliminar las interferencias es necesario aplicar un método de separación. El método seleccionado es el de cromatografía en columna en el que la separación se hace por absorción.

El método empleado para la separación es el método mencionado en la obra "Vitamin Bestimmungen " de Rolf Stroheker ,E.Merck AG Darmstadt,p 155. y que fue publicado en el Journal of American Pharmaceutical Association 45,26 (1956) P.J. Van Melle , con el nombre "A Chemical Method for Vitamin B<sub>12</sub> Concentration in Liver Inyection "

#### 3.2.-Lote piloto.

Para experimentar la técnica de separación se preparó un lote piloto de multivitamínicos de composición conocida con el objeto de estudiar la efectividad del procedimiento. La fórmula del lote piloto es la siguiente :

Vitamina	concentración en mg/100 ml
Tiamina	20
Riboflavina	20
Piridoxina	20
Nicotinamida	100
Cianocobalamina	100 mcg.

### 3.3.- Técnica.

La técnica empleada se basa en pasar la muestra de multivitámicos a través de la columna. Todas las vitaminas quedan absorbidas en la parte superior de la columna. Se baja el pH y se pasa acetona al 85 %. En la acetona se disuelven la tiamina, riboflavina, piridoxina y nicotinamida y salen en el efuyente. La cianocobalamina queda en la columna porque es insoluble en acetona.

Posteriormente se extrae la cianocobalamina con tetrahydrofurano al 60 % en medio ácido.

#### 3.3.1.- Reactivos :

- a) Resina carboxilica Amberlita CG 50 tipo 1 de Rohm & Haas  
Tipo catiónico.
- b) Hidróxido de sodio 1 N.
- c) Disolución amortiguadora pH =4.- Se pesan 73.08 g. de ácido cítrico y 44.65 g. de citrato de sodio. Se diluye a un litro y se ajusta el pH a 4.0.
- d) Acido sulfúrico 0.1 N.
- e) Acetona al 85 %.
- f) Tetrahydrofurano al 60% en medio ácido.- a 60 ml de tetrahydrofurano se adicionan 10 ml. de ácido sulfúrico 1 N y se completa a 100 ml. con agua.
- g) Disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.9.- Se disuelven 136.09g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 174.18 g. de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , se afora a 1 l con agua destilada. Se ajusta el pH a 6.9.
- h) Disolución madre de vitaminas del complejo B.-Se pesan con exactitud 200 mg de piridoxina, 200 mg de tiamina, 200 mg g de riboflavina y 1000 mg. de nicotinamida.  
Se disuelven en agua y se aforan a 1 l.
- i) Disolución madre de cianocobalamina  $10^{-4}$  M.-135 mg. de cianocobalamina al 100 % o cantidad equivalente, se disuelven

en agua y se afora a 100 ml.

j) Mezcla patrón de vitaminas.- A 100 ml. de solución de complejo B se adiciona 0.75 ml. de cianocobalamina  $10^{-4}$  M.

### 3.3.2.-Preparación de la resina.-

50 g de la resina Amberlita CG-50 se agitan con agua y la mezcla se deja reposar toda la noche. El agua se decanta y se adiciona más agua a la resina, se agita y se deja reposar. Esta operación se repite hasta que el agua sobrenadante está clara. Después que se ha decantado el último lavado se adiciona NaOH 1 N y se deja reposar media hora. Se decanta la NaOH y se lava la resina con agua repetidas veces, hasta que el agua tenga reacción neutra. Se decanta el agua y se adiciona a la resina disolución amortiguadora de citratos pH = 4.0, se deja reposar y se pasa la suspensión a la columna cromatográfica, se deja asentar de manera de tener una columna de 10 cm de altura. Se deja gotear la disolución hasta que el líquido tenga 2 mm. sobre la superficie de la resina.

### 3.3.3.-Proceso de separación.

A 100 ml de la mezcla patrón de vitaminas se adicionan 5 ml de disolución amortiguadora de citratos pH = 4.0. La disolución se pasa a través de la columna a una velocidad de 1 ml por min. En la parte superior de la columna quedan las vitaminas: cianocobalamina, tiamina, riboflavina, piridoxina y nicotinamida. Una vez que toda la muestra ha pasado por la columna se adiciona  $H_2SO_4$  0.1 N ( 3 porciones de 20 ml cada una ). Se secan las paredes y la superficie de la columna con papel absorbente y se pasa por la columna acetona al 85 % hasta que salen la tiamina, riboflavina, piridoxina y nicotinamida lo cual se conoce porque desaparece el color amarillo de la columna. Se vuelven a

secar las paredes de la columna con papel y se pasan dos porciones de 20 ml. de  $H_2SO_4$  0.1 N. Enseguida se procede a la elución de la vitamina  $B_{12}$  que quedó en la parte superior de la columna. Se adiciona tetrahydrofurano al 60 % .Con las primeras porciones de tetrahydrofurano se forma un anillo rosa de cianocobalamina que va descendiendo a través de la columna ( Figura 29 ).El efluente se recibe en un matríz volumétrico de 10 ml.El contenido de este matríz se transfiere a un matríz volumétrico de 50 ml,se adicionan 20 ml. de disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.9 y se completa al aforo con agua.Con esta disolución se hace la determinación polarográfica de la vitamina  $B_{12}$ .

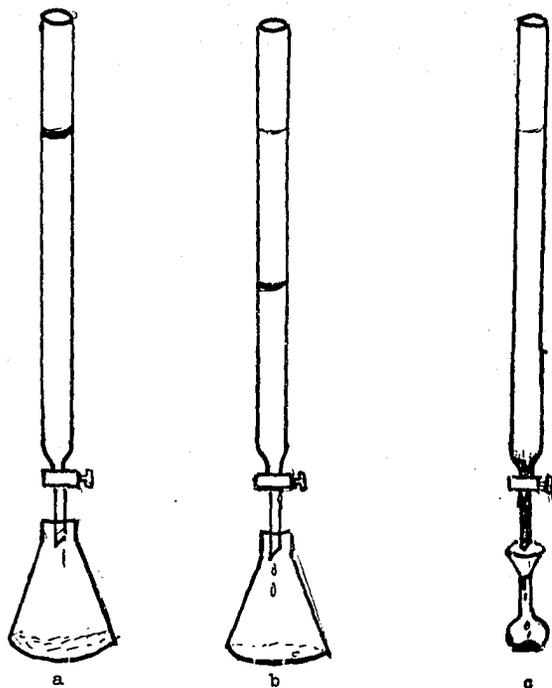


Figura 29

Separación de vitamina B<sub>12</sub> por cromatografía en columna.

- a) La vitamina B<sub>12</sub> queda en la parte superior
- b) Elución de la vitamina B<sub>12</sub> con tetrahidrofurano-ácido sulfúrico.
- c) Recolección de la vitamina B<sub>12</sub> en matraz aforado de 10 ml.

### 3.3.4.-Bases teóricas de la técnica de separación.-

La resina que se emplea para la separación es una resina carboxílica .

Si se busca en las fórmulas de la vitaminas presentes los grupos funcionales que pueden interactuar con el grupo funcional de la resina -COOH se encuentra lo siguiente :

La cianocobalamina tiene tres agrupamientos acetamido y tres agrupamientos propionamido.

La tiamina tiene un agrupamiento  $\text{OH}^-$ .

La piridoxina tiene tres agrupamientos  $\text{OH}^-$ .

La riboflavina tiene tres agrupamientos  $\text{OH}^-$ .

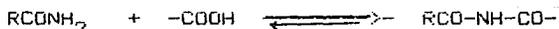
La nicotinamida tiene un agrupamiento amido.

A pH 4 las vitaminas que tienen el agrupamiento  $\text{OH}^-$ :

tiamina, riboflavina y piridoxina reaccionan con el -COOH de la resina formando esteres:



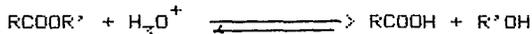
La nicotinamida y la cianocobalamina forman la imidas correspondientes al reaccionar con el -COOH.



Estos compuestos quedan absorbidos en la parte superior de la columna.

Al adicionar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N se baja el pH a 1 y los compuestos formados se hidrolizan por la presencia de  $\text{H}^+$  a más alta concentración.

(34) Los esteres en medio ácido sufren la sustitución nucleofílica característica de los derivados de ácidos carboxílicos. El ataque ocurre en el carbono carbonilo deficiente en electrones y tiene como resultado el reemplazo del grupo -OR por el grupo -OH



Las imidas también se hidrolizan y generan las amidas y el carboxilo.

El siguiente paso es adicionar acetona al 85 %. Por efecto de solubilidad la tiamina, riboflavina y piridoxina emigran con la acetona.

La cianocobalamina es insoluble en acetona.

Se vuelve a bajar el pH que probablemente subió con la acetona y finalmente se eluye la cianocobalamina con tetrahidrofurano al 60 % en medio ácido 0.1 N

En esta forma se ha separado la cianocobalamina de las otras vitaminas del complejo B.

### 3.3.5.-Estudios sobre el eluyente.

La técnica original establece que la elución se puede hacer con dioxano al 60% en medio ácido o tetrahydrofurano al 60% en medio ácido.

Como la determinación en el efluente se va a hacer por polarografía, se hicieron experiencias polarográficas con dioxano y tetrahydrofurano al 60% en medio ácido. Se encontró que el más conveniente es el tetrahydrofurano (Figuras 30 y 31).

El polarograma del electrolito soporte (solución reguladora  $\text{pH}=6.9$ ) con 12% de tetrahydrofurano, a una sensibilidad de  $10 \mu\text{A}$ , tiene un dominio de electroactividad de 0.3 a  $-1.9\text{v/ESC}$  y presenta una onda con un  $E_{1/2}=-1.35 \text{ v/ESC}$  que probablemente se debe al estabilizador (hidroxitolueno butilado 0.025%).

A pesar de que la concentración de tetrahydrofurano es relativamente alta en comparación con la de vitamina  $\text{B}_{12}$ , la altura del pico no es demasiado importante, por consiguiente esta interferencia se controla si tanto los patrones como las muestras contienen la misma cantidad de tetrahydrofurano.

En cambio el polarograma de dioxano al 12% en electrolito soporte presenta una onda con un  $E_{1/2} = -0.1 \text{ v/ESC}$  y una altura aproximada de  $2 \mu\text{A}$ .

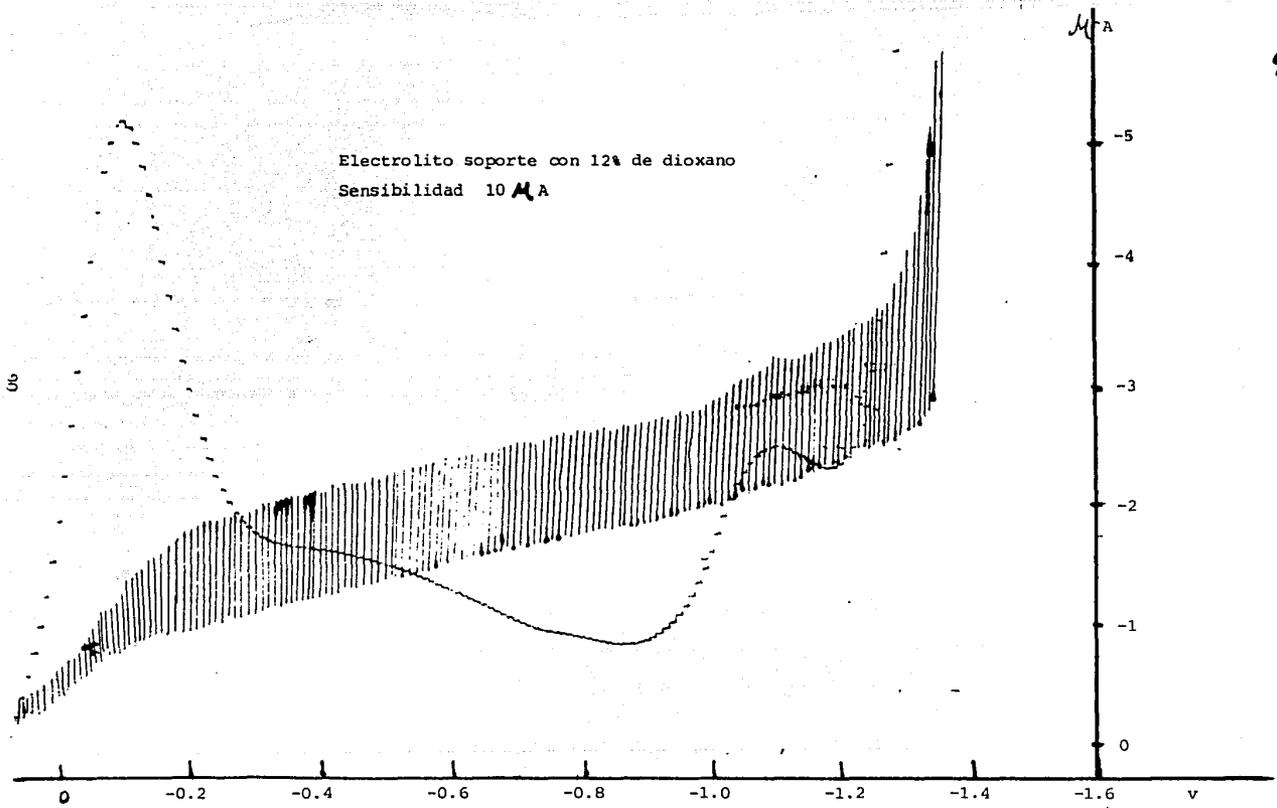


Figura 30

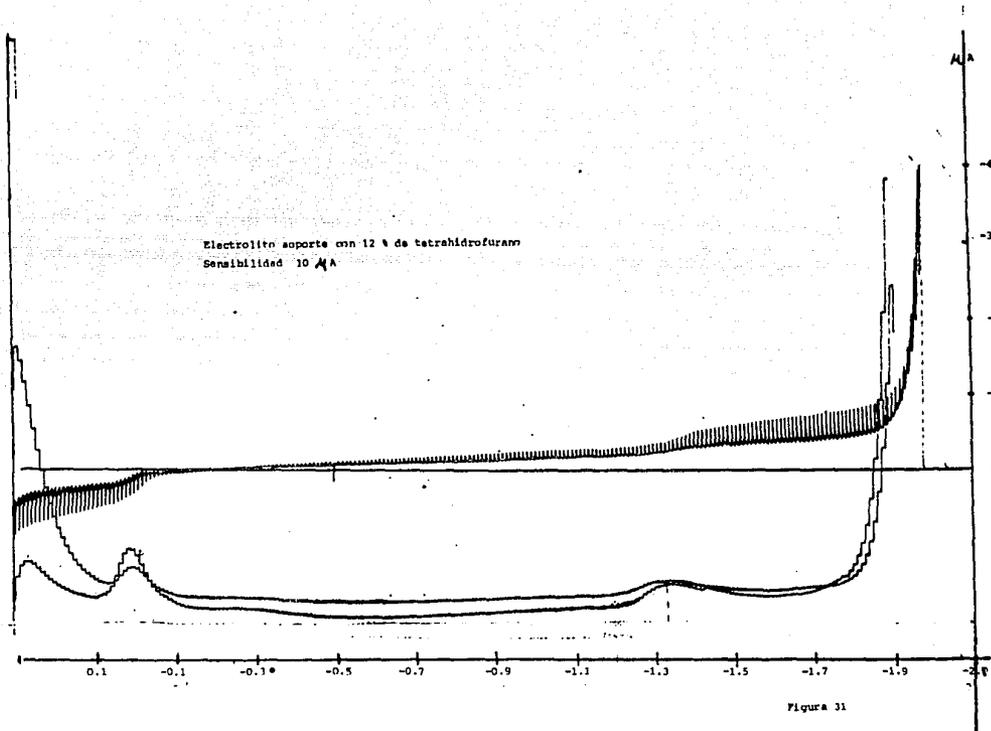


Figura 31

### 3.3.6.-Comprobación de la efectividad de la separación.

Para comprobar si la extracción es cuantitativa se empleó el método espectrofotométrico y el método polarográfico.

3.3.6.1.-Método espectrofotométrico.-Se pasaron 100 ml de lote piloto por la columna y siguiendo la técnica mencionada se recogieron 10 ml del eluyente con la vitamina B<sub>12</sub>.

Esta muestra se comparó en el espectrofotómetro en  $\lambda = 548$  nm con un estandar preparado con 0.75 ml de cianocobalamina  $10^{-4}$  M en 10 ml de solución ácida de tetrahidrofurano a 60% empleando como blanco solución de tetrahidrofurano.

Las lecturas obtenidas fueron las siguientes :

absorción estandar      0.048

absorción problema      0.050

Como se puede apreciar por este método hay un error relativo de 4 % debido a que la concentración es muy baja ( $10^{-6}$ M) para la sensibilidad de la técnica.

3.3.6.2.-La comprobación por el método polarográfico se tratará cuando se discuta la determinación polarográfica.

#### 4.- Determinación polarográfica de la vitamina B<sub>12</sub> separada por cromatografía de absorción.

##### 4.1.-Base teórica.-

Como ya se mencionó en el inciso 1.3.3 el polarograma en polarografía diferencial de impulsos presenta un máximo a un  $E_{\text{max}} = -1.53$  v/ESC que corresponde a una onda catalítica (14). La reacción que se lleva a cabo es la reducción de  $H^+$  a  $H_2$  en donde la vitamina B<sub>12</sub> actúa como catalizador. Según la teoría de Heyrousky (26) estos catalizadores son sustancias adsorbibles del tipo BH, con un  $H^+$  lábil que facilita la reacción de molarización:



Según esta teoría las reacciones que se llevan a cabo son:



El átomo de H separado reacciona más fácilmente con el H lábil del catalizador que con los iones hidrónio, y esta reacción disminuye la sobretensión necesaria para la reacción.

La determinación de Vitamina B<sub>12</sub> por polarografía diferencial de impulsos se realizó empleando el método de adiciones estandar, usando como estandar una disolución de cianocobalamina  $10^{-4}$  M.

##### 4.2.-Condiciones de trabajo.-

Las experiencias polarográficas se realizaron en un polarógrafo P.A.R. modelo 174-A. Como electrodo de referencia se usó un electrodo de calomel saturado de KCl y como electrodo auxiliar un alambre de platino.

Condiciones experimentales recomendadas para la polarografía diferencial de impulsos de la vitamina B<sub>12</sub>.

Ep (v)	Δ E (mv)	Velocidad de barrido	Tiempo de caída de gota
-1.53	25	10 mv/s	0.5 s

#### 4.3.-Técnica experimental.-

##### 4.3.1.- Reactivo.-

Disolución patrón de cianocobalamina  $10^{-4}$ M.

135.5 mg de cianocobalamina al 100 % o cantidad equivalente se disuelven en agua y se completa a 100 ml.

##### 4.3.2.-Técnica.-

El efluente obtenido de la separación cromatográfica se transfiere a matríz volumétrico de 50 ml, se adicionan 20 ml de disolución amortiguadora pH=6.9 y se completa el volumen con agua. Esta disolución se pasa a la cubeta del polarógrafo, se burbujea N<sub>2</sub> durante 15 minutos y se traza el polarograma en las condiciones mencionadas.

Una vez obtenido el polarograma de la disolución problema se adicionan 0.75 ml de la disolución de cianocobalamina  $10^{-4}$ M, se burbujea N<sub>2</sub> durante 5 minutos y se traza el polarograma sobre la misma hoja. Se vuelve a adicionar 0.75 ml de cianocobalamina  $10^{-4}$ M y se repite el trazo del polarograma. Opcionalmente se puede hacer una tercera adición y obtener un tercer polarograma.

En el polarograma se determina la intensidad de corriente del pico para cada concentración y se representa graficamente  $i = f | \text{cianocobalamina} |$ .

De la gráfica se deduce la cantidad de cianocobalamina presente en el problema.

En la experiencia realizada con un lote piloto se encontraron los siguientes resultados : (Figura 32 , gráfica

7).

cianocobalamina	i en $\mu A$
$1.5 \times 10^{-6} M$	3.52
$3.0 \times 10^{-6} M$	5.15
$4.5 \times 10^{-6} M$	6.90

De la gráfica deducimos que la concentración de cianocobalamina en la disolución extraída del lote piloto es de  $1.53 \times 10^{-6} M$  en los 50 ml.

Si se considera que esta cantidad existía en 100 ml de muestra original, la concentración en la muestra es de  $0.76 \times 10^{-6} M$ . El error relativo es de 2.9 %. Si se compara este error con el error obtenido en la valoración espectrofotométrica que fué de 4 % se deduce que la técnica polarográfica tiene menos error.

Para comprobar estadísticamente la confiabilidad del método se repitió la extracción con el mismo lote cinco veces y se hizo la determinación polarográfica. Con los resultados se calculó la desviación estandar y el límite de confiabilidad encontrándose los siguientes valores:

Concentración de cianocobalamina:

$1.45 \times 10^{-6} M$
$1.53 \times 10^{-6} M$
$1.46 \times 10^{-6} M$
$1.50 \times 10^{-6} M$
$1.25 \times 10^{-6} M$

Concentración promedio :  $1.438 \times 10^{-6} M$  con  $\sigma = 0.1 \times 10^{-6} M$

Esta concentración calculada en  $\mu g$  de cianocobalamina equivale a  $97.4 \pm 5 \mu g$  de cianocobalamina en 100 ml.

Determinación de cianocobalamina en lote piloto.

Sensibilidad  $10 \mu A$

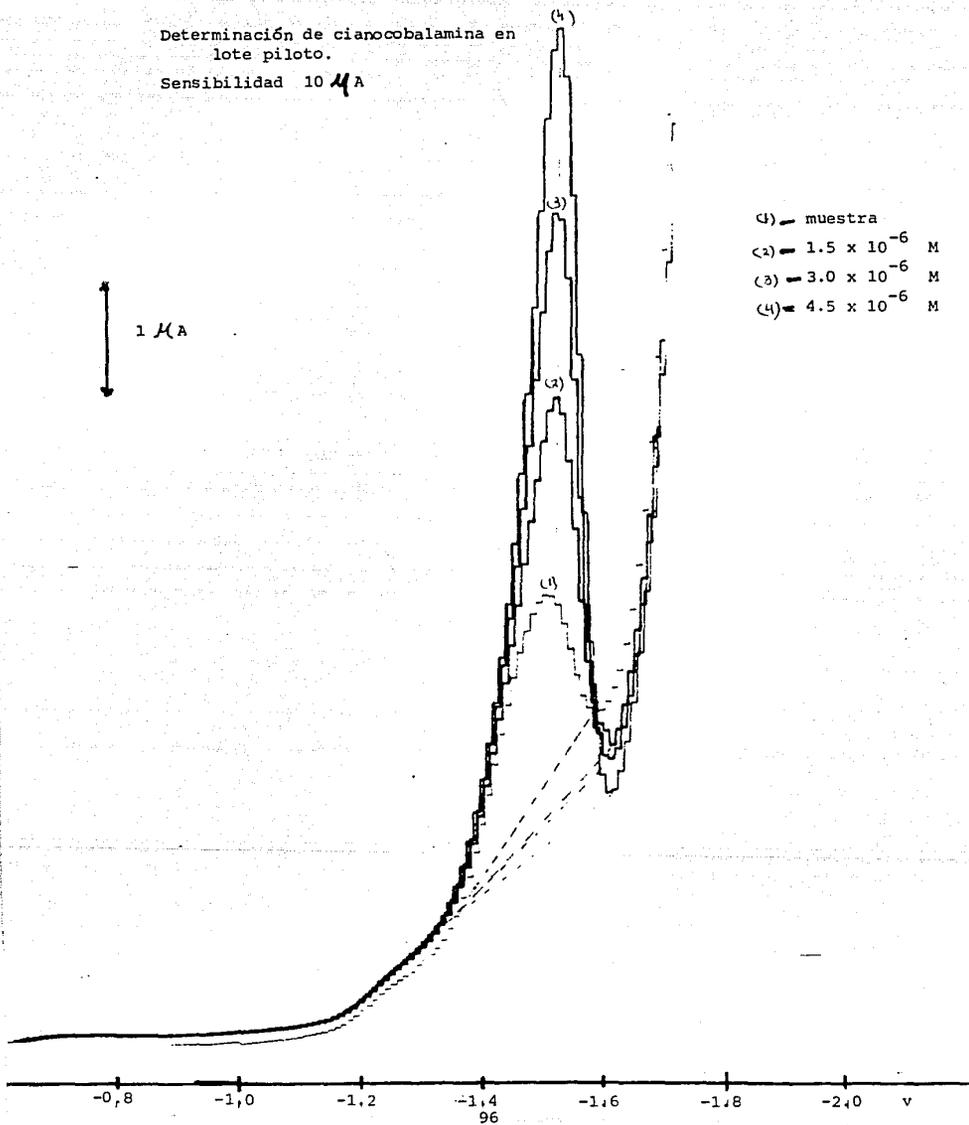
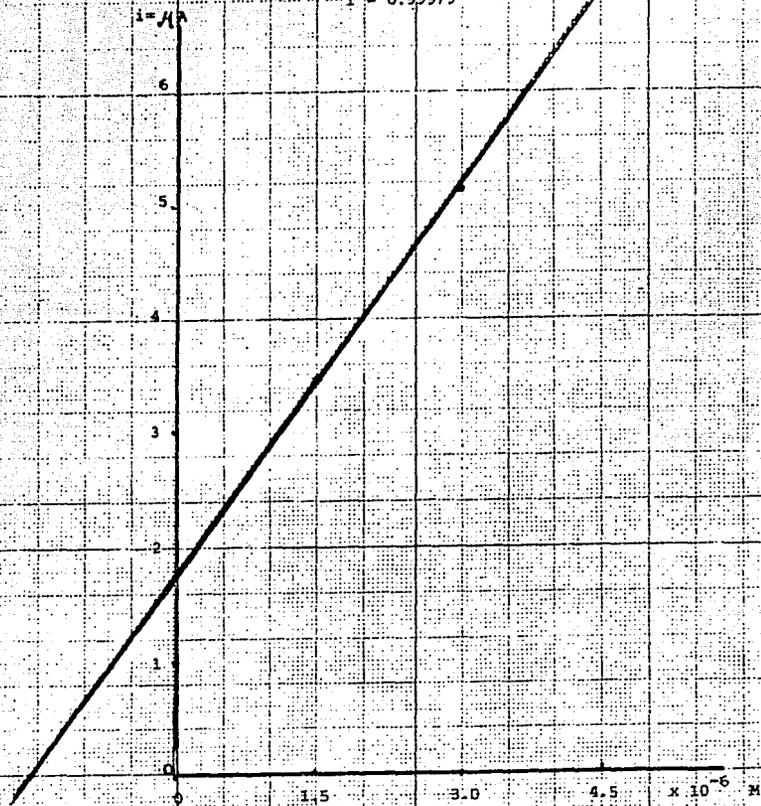


Figura 32

Cianocobalamina en lote piloto

Sensibilidad 10  $\mu$ A

$r = 0.99979$



Gráfica 7

#### 4.4.-Estudio de la interferencia de la matriz en la curva polarográfica.

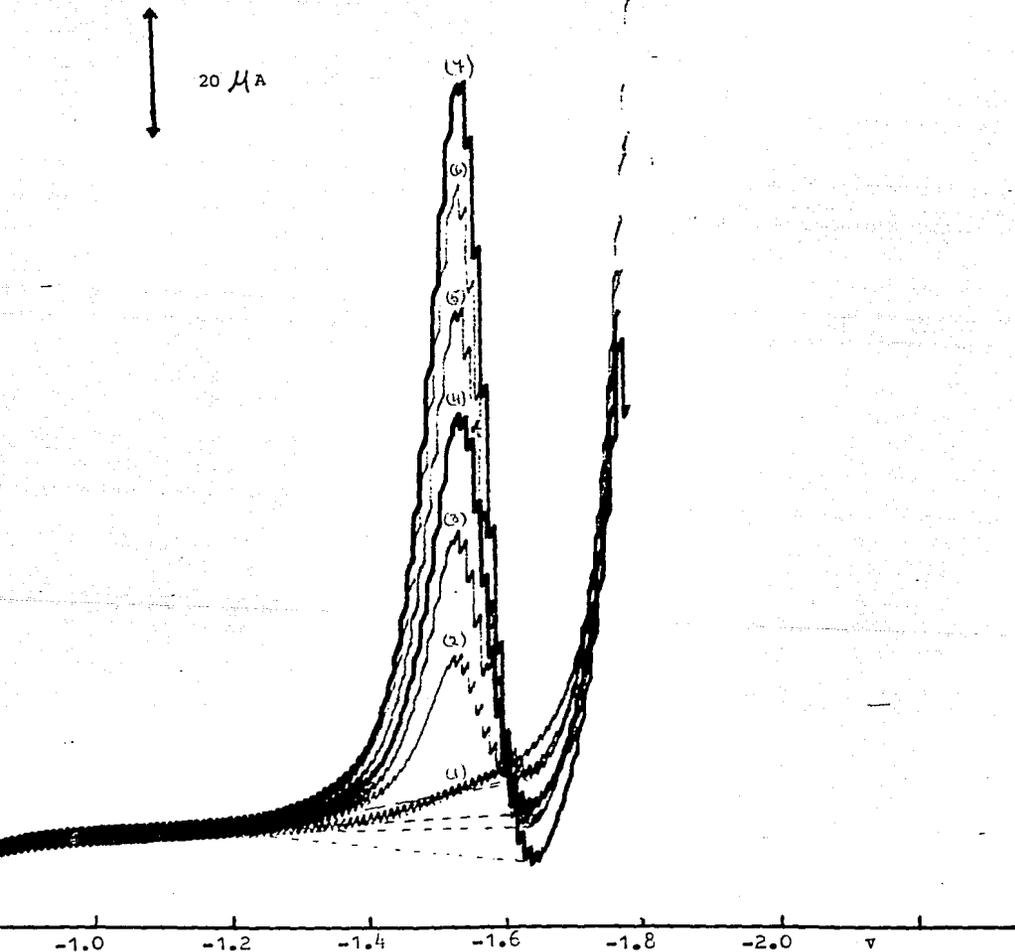
Para corroborar que la presencia de THF no interfiere en la determinación polarográfica de la cianocobalamina se hizo la escala de cianocobalamina en electrolito soporte sin THF y en el electrolito soporte con 12% de THF (Figuras 33 y 34, gráficas 8 y 9 )

Al comparar las gráficas de los polarogramas y hacer la correlación lineal se encuentra para el polarograma sin THF un  $r = 0.9991$  y para el polarograma con THF un  $r = 0.9989$ . Si se comparan las lecturas se encuentra que el polarograma con THF da lecturas más bajas que el polarograma sin THF, aunque la relación se mantiene constante en las lecturas.

Si se emplea en método de adiciones estandar el error por la presencia de THF se elimina porque la misma matriz está en el problema y el estandar.

Cianocobalamina  $10^{-6}$  M en  
 solución reguladora pH 6.9  
 sin THF  
 Sensibilidad 200  $\mu$ A

- (1) • electrolito soporte sin THF  
 (2) •  $1.5 \times 10^{-6}$  M 20.3  $\mu$ A  
 (3) •  $3.0 \times 10^{-6}$  M 40.7  $\mu$ A  
 (4) •  $4.5 \times 10^{-6}$  M 61.9  $\mu$ A  
 (5) •  $6.0 \times 10^{-6}$  M 79.2  $\mu$ A  
 (6) •  $7.5 \times 10^{-6}$  M 98.8  $\mu$ A  
 (7) •  $9.0 \times 10^{-6}$  M 118.4  $\mu$ A



$i = \mu A$

Escales de cianocobalamina  $10^{-6}$  M  
en solución amortiguadora de fosfatos  
0.4 M pH = 6.9 sin THF  
Sensibilidad 200 A  
 $r = 0.9991$

150

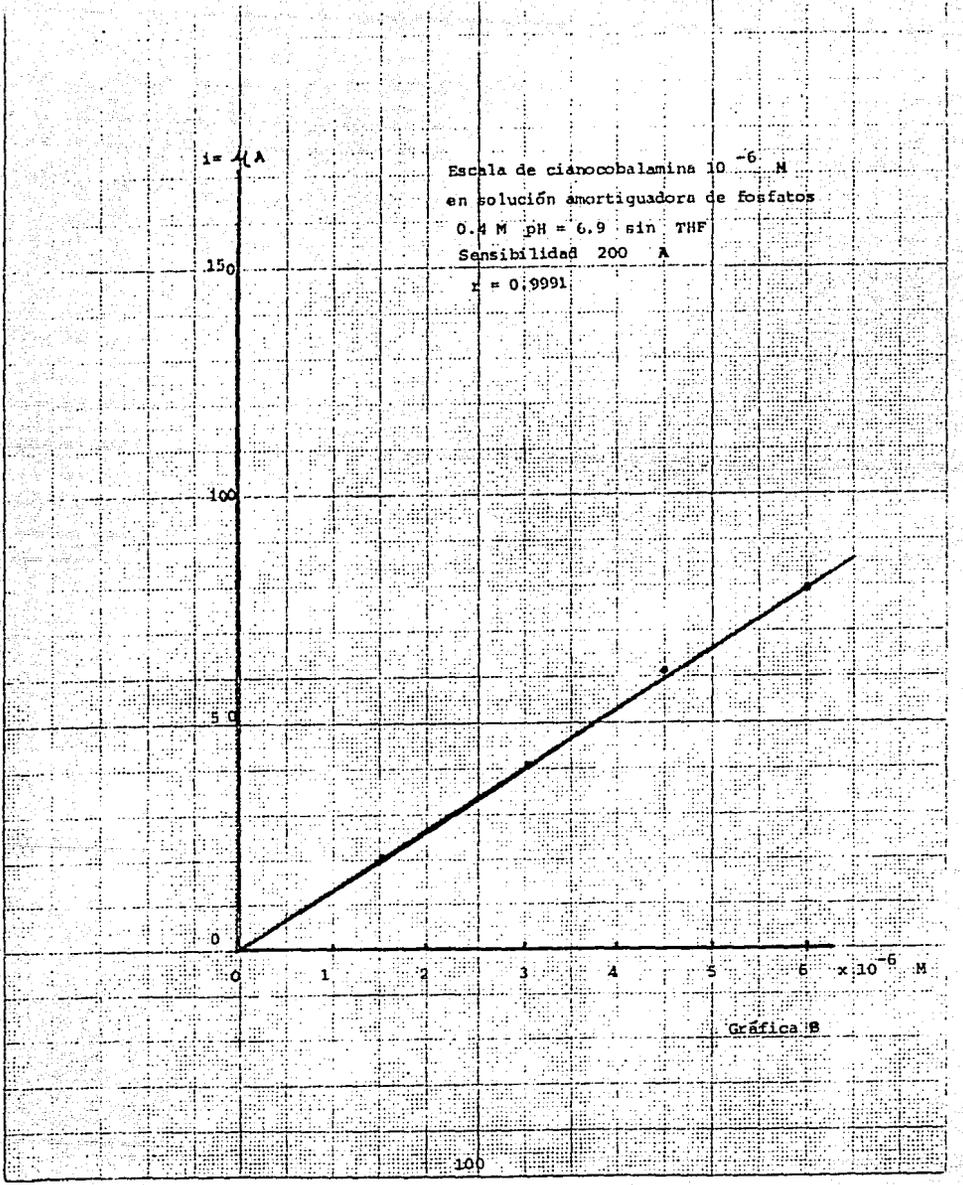
100

50

0

0 1 2 3 4 5 6  $\times 10^{-6}$  M

Gráfica B



Cianocobalamina  $10^{-6}$  M en  
 solución reguladora pH 6.9  
 con 12 % THF  
 Sensibilidad  $100 \mu A$



10  $\mu A$

- (1) • Electrolito soporte
- (2) • Electrolito soporte más THF
- (3) •  $1.5 \times 10^{-6}$  M 17.2  $\mu A$
- (4) •  $3.0 \times 10^{-6}$  M 36  $\mu A$
- (5) •  $4.5 \times 10^{-6}$  M 58  $\mu A$
- (6) •  $6.0 \times 10^{-6}$  M 75  $\mu A$

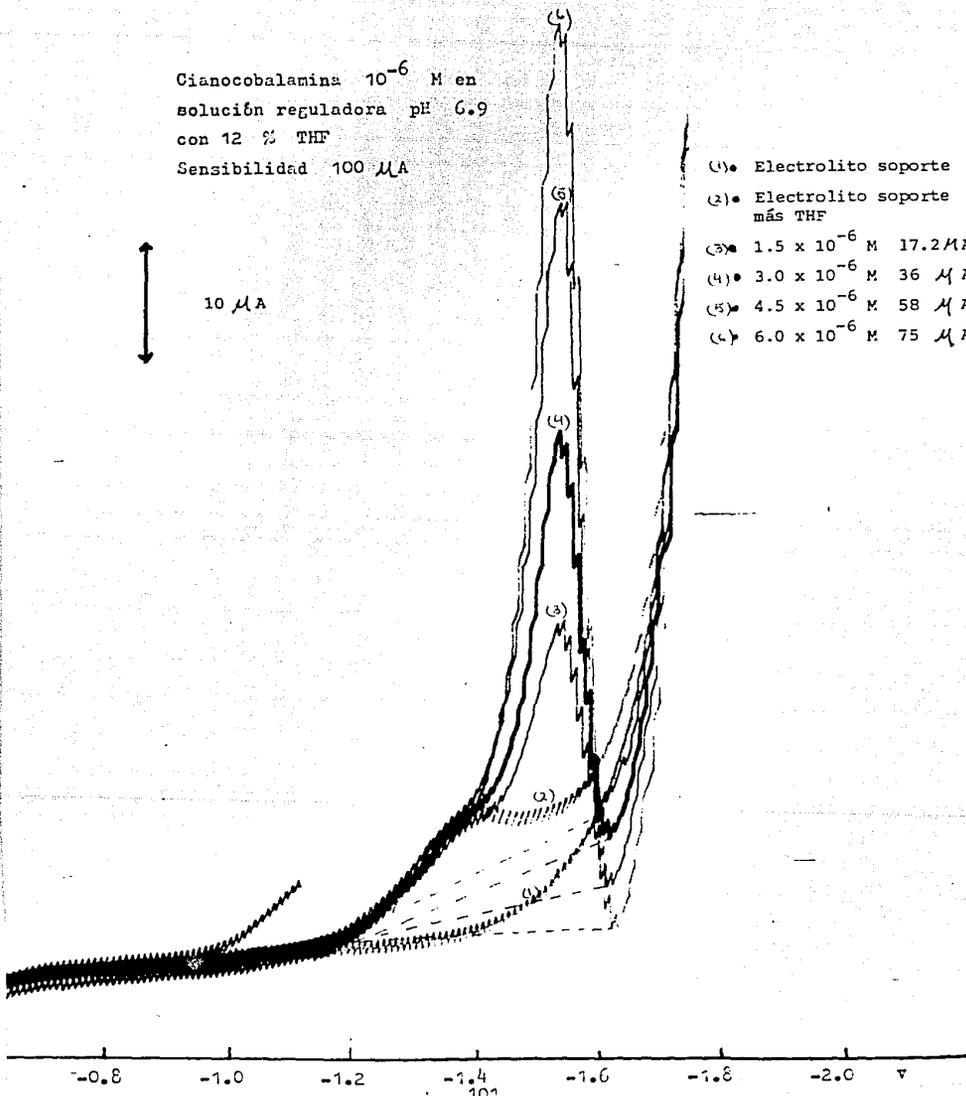


Figura 34

$i = \mu A$

150

100

50

0

Escala de cianocobalamina  $10^{-6}$  M  
en solución amortiguadora de fosfatos

0.4 M pH = 6.9 con 12 % THF

Sensibilidad 100  $\mu A$

$r = 0.9989$

0 1 2 3 4 5 6  $\times 10^{-6}$  M

Gráfica 9

#### 4.5.-Estudio de la efectividad de la separación.

Para comprobar la efectividad de la separación se pasó una disolución de cianocobalamina 100 mcg en 100 ml a través de la columna siguiendo la técnica ya descrita. Con el efluente se hizo la determinación polarográfica por el método de adiciones estandar.

Al mismo tiempo se hizo otra determinación polarográfica usando la misma cantidad de cianocobalamina sin pasarla por la columna. Se compararon los resultados. (Figuras 35 y 36) (Gráficas 10 y 11).

Resultados :

Escala de cianocobalamina sin cromatografiar.

Sensibilida 10  $\mu$ A.

Cianocobalamina	$i = \mu$ A
$1.5 \times 10^{-6}$	3.05
$3.0 \times 10^{-6}$	4.66
$4.5 \times 10^{-6}$	6.43

Escala de cianocobalamina cromatografiada.

Sensibilidad 10  $\mu$ A

Cianocobalamina	$i = \mu$ A
$1.5 \times 10^{-6}$	3.72
$3.0 \times 10^{-6}$	5.62
$4.5 \times 10^{-6}$ M	7.58

Resultado :

Cianocobalamina sin cromatografiar:  $1.5 \times 10^{-6}$  M  
Cianocobalamina cromatografiada :  $1.46 \times 10^{-6}$  M

Cada experiencia se repitió cinco veces y se obtuvieron los siguientes resultados:

Cianocobalamina sin cromatografiar :

Concentración de cianocobalamina:  $1.45 \times 10^{-6}$  M

$\sigma = 0.1 \times 10^{-6}$  M

Error relativo = 1.8 %

Cianocobalamina cromatografiada :

Concentración de cianocobalamina :  $1.438 \times 10^{-6}$  M

$\sigma = 0.1 \times 10^{-6}$  M

Error relativo = 2.6 %

De los resultados obtenidos se deduce que la separación cromatográfica influye aproximadamente con 1 % de error en la determinación.

#### 4.6.-Discusión.-

El error relativo encontrado en esta técnica fué de 2.6 % Si se tiene en cuenta que el límite de tolerancia para el contenido de cianocobalamina en preparados farmacéuticos es de + 10 % se deduce que el error de 2.6 % encontrado está comprendido dentro de los límites aceptados, por lo tanto la técnica si puede ser efectiva para aplicarla a un proceso intermedio de fabricación..

Determinación de cianocobalamina  
sin cromatografiar.  
Sensibilidad 10  $\mu$ A

1  $\mu$ A

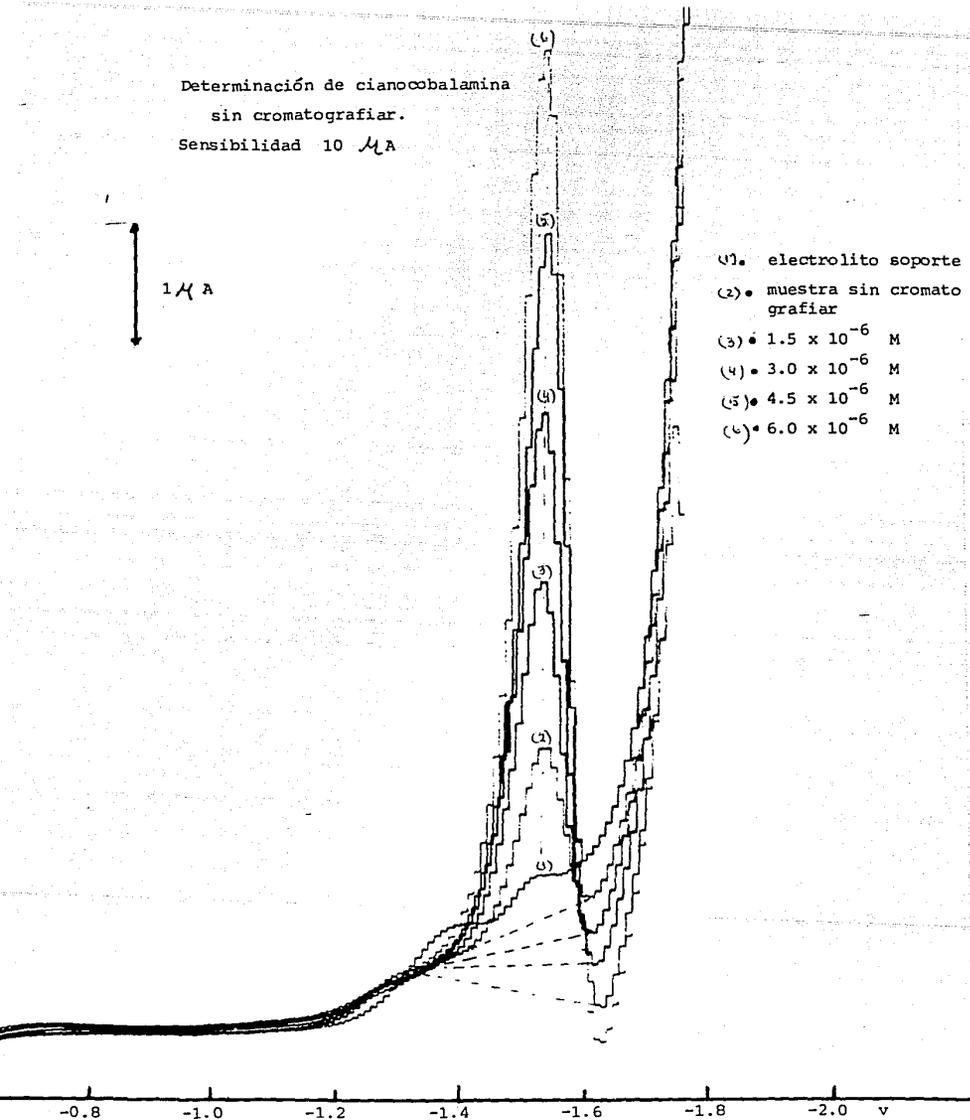
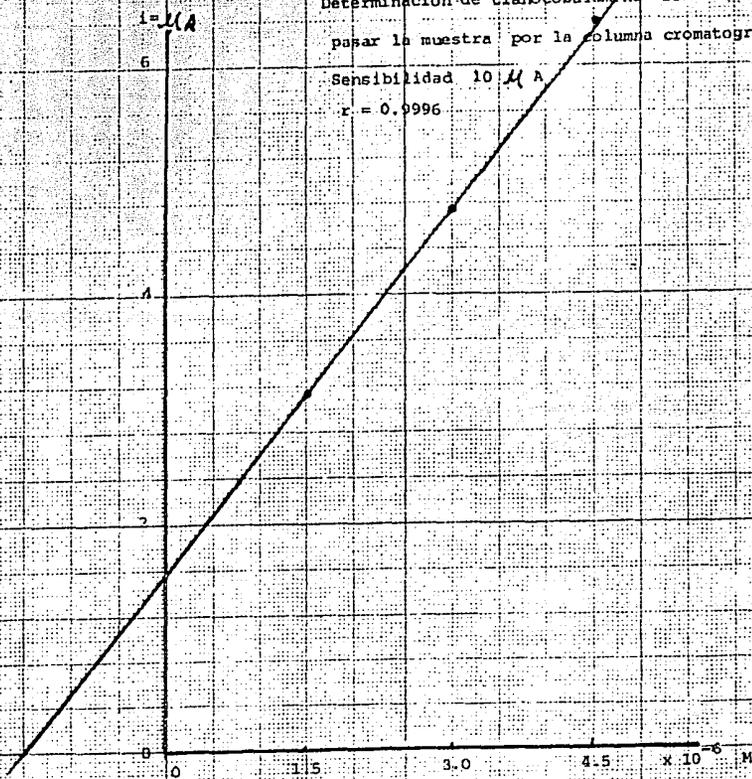


Figura 35

Determinación de cianocobalamina sin  
pasar la muestra por la columna cromatográfica.

Sensibilidad 10  $\mu$  A

$r = 0.9996$



Gráfica 10

Determinación de cianocobalamina  
cromatografiada.  
Sensibilidad 10  $\mu$ A

1  $\mu$ A

- (1) • electrolito soporte
- (2) • muestra cromatografiada
- (3) •  $1.5 \times 10^{-6}$  M
- (4) •  $3.0 \times 10^{-6}$  M
- (5) •  $4.5 \times 10^{-6}$  M

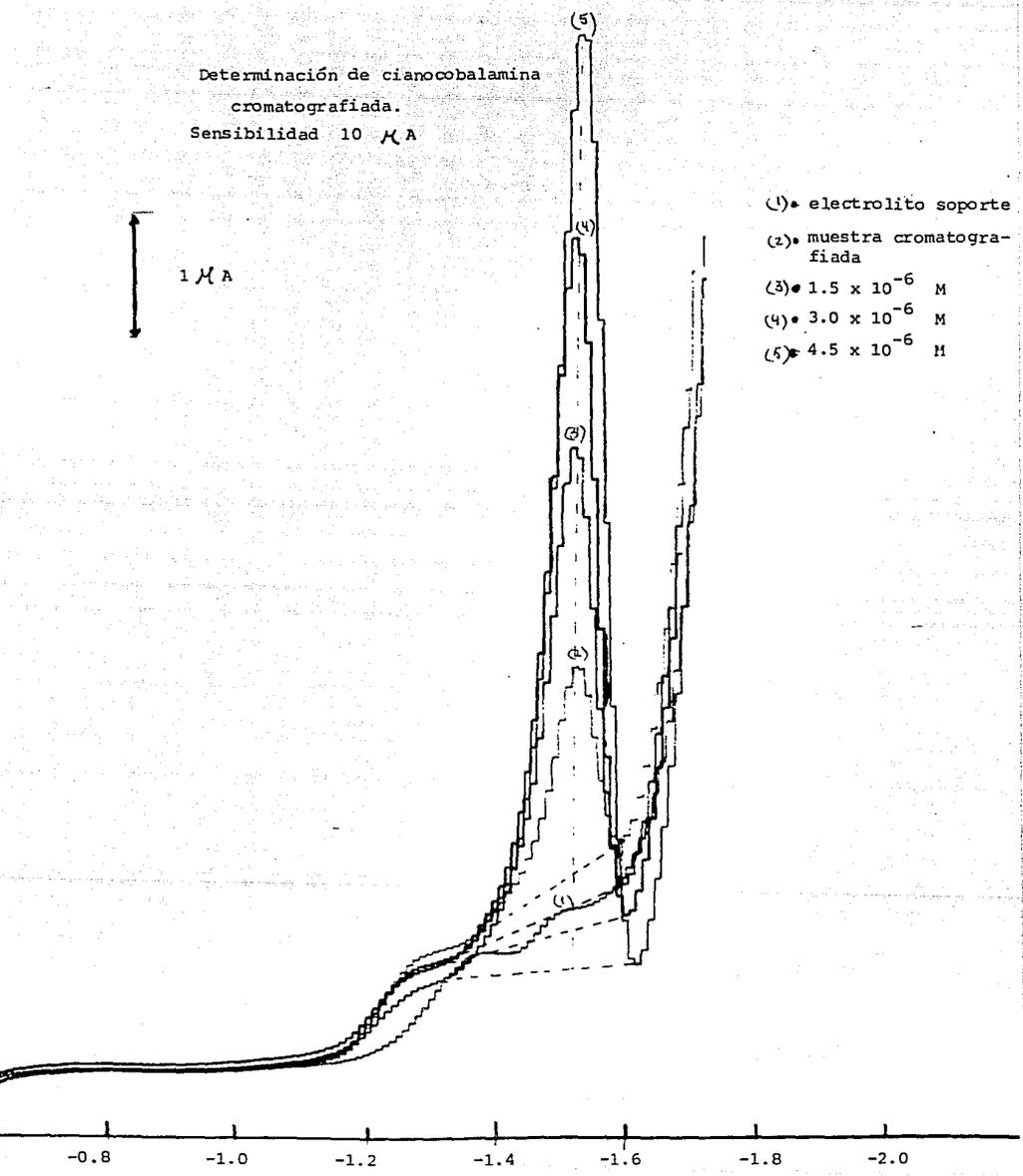
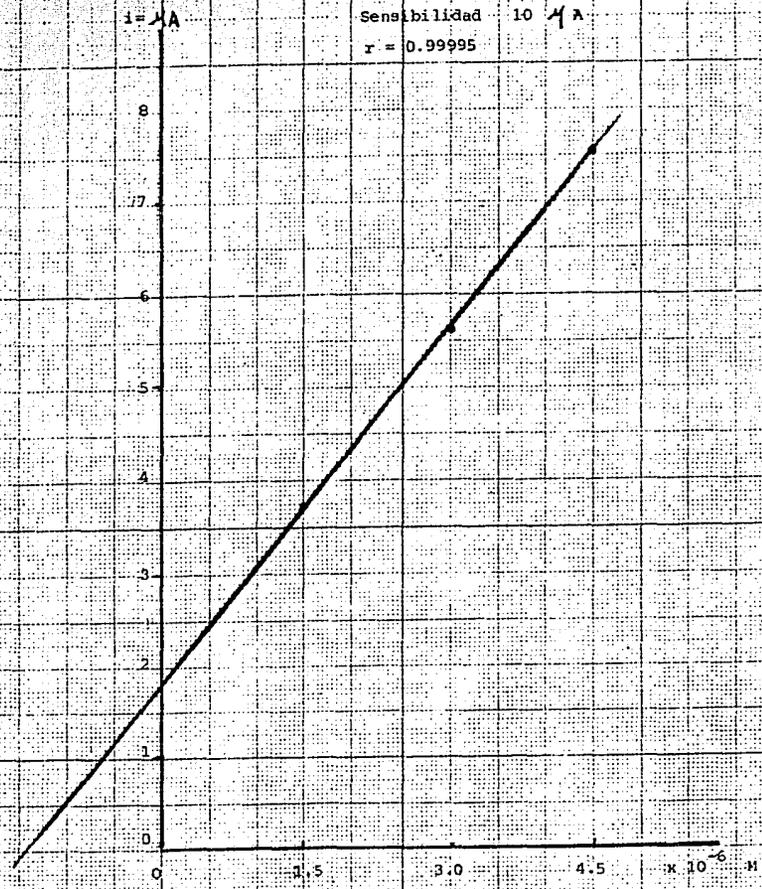


Figura 36

Determinación de cianocobalamina pasando la muestra por la columna cromatográfica.

Sensibilidad 10  $\mu$ A

$r = 0.99995$



Gráfica 11

## 5.- Aplicación analítica.

### 5.1.-Aplicación a muestras comerciales.

El procedimiento experimentado en el lote piloto se aplicó a muestras reales de preparados multivitamínicos con dos productos comerciales .

5.1.1.-Una de las muestras fué el VITAFORTE cuya fórmula es la siguiente:

Vitamina B <sub>12</sub>	200µg
Mononitrato de tiamina	100 mg
Riboflavina	30 mg
Clorhidrato de piridoxina..	35 mg
Peptonato de hierro equivalente a	54 mg de Fe
c.b.p.	100 ml.

Como este preparado tiene 200 µg de vitamina B<sub>12</sub> en 100 ml, se tomaron 50 ml de muestra para hacer la separación cromatográfica. Se siguió la misma técnica del lote piloto y se encontraron los siguientes resultados, a una sensibilidad de 20 µA (Figura 37 , Gráfica 12 )

cianocobalamina	i=µA
1.5 × 10 <sup>-6</sup> M	2.82
3.0 × 10 <sup>-6</sup>	4.22

Haciendo la gráfica se encuentra una concentración de 1.45 × 10<sup>-6</sup> M en la muestra polarografiada. Como se tomaron 50 ml de muestra original y la muestra polarografiada fué de 50 ml, la concentración de vitamina B<sub>12</sub> en el Vitaforte es de 1.45 × 10<sup>-6</sup> M. que corresponde a 196.5 µg en 100 ml.. El error relativo es 1.7 % y está de acuerdo con la tolerancia aceptada por la Farmacopea que es de ±10 %.

Determinación de cianocobalamina  
en Vitaforte

Sensibilidad  $20 \mu A$

(1) • Electrolito  
soporte

(2) • Vitaforte

(3) •  $1.5 \times 10^{-6}$  M

(4) •  $3.0 \times 10^{-6}$  M

(5) •  $4.5 \times 10^{-6}$  M

↑  
2  $\mu A$   
↓

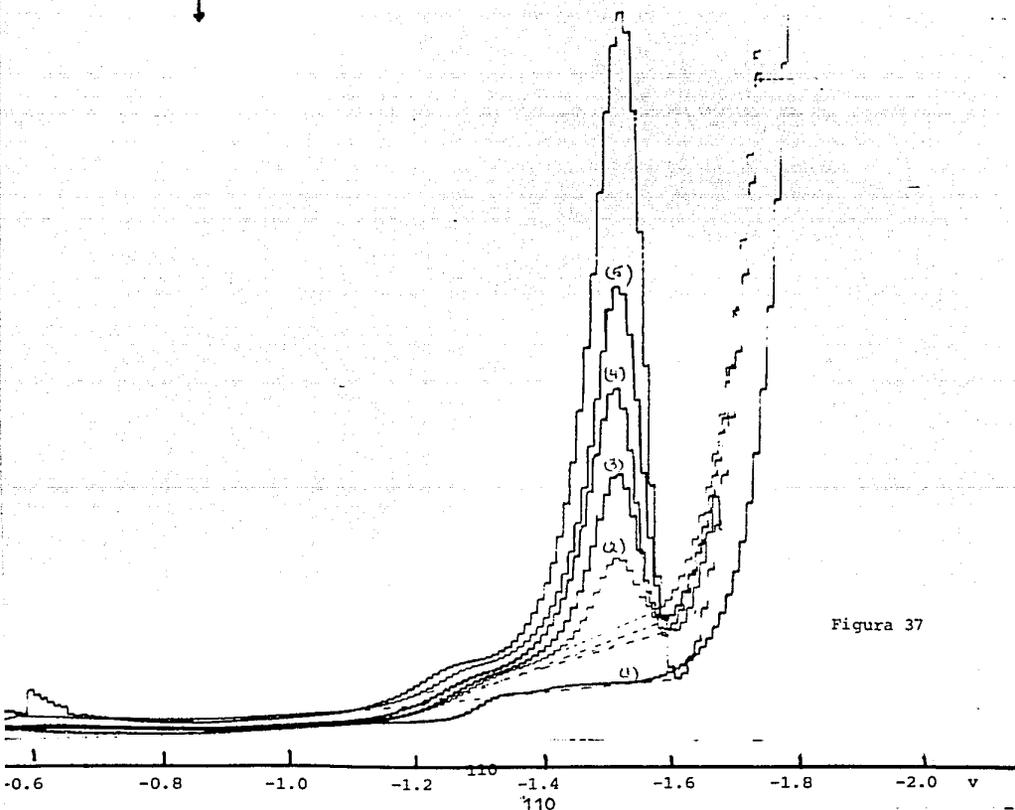
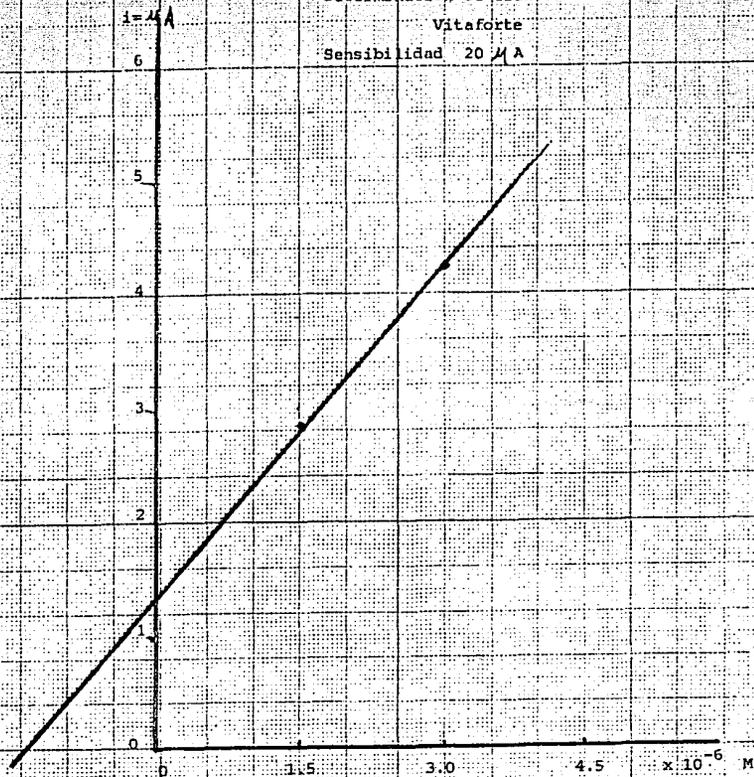


Figura 37

Determinación de cianocobalamina en  
Vitaforte  
Sensibilidad 20  $\mu$ A



Gráfica 12

5.1.2.-El otro producto comercial es el IBEROL cuya fórmula es :

Sulfato ferroso	
equivalente a	525 mg de Fe
Acido ascórbico	2.5 g
Vitamina B <sup>12</sup>	125 µg
Clorhidrato de tiamina	30 mg
Riboflavina	30 mg
Nicotinamida	150 mg
Clorhidrato de piridoxina	25 mg
D Pantenol	50 mg
c.b.p.	100 ml.

El volumen necesario de muestra para la separación es de 80 ml.

Resultados a una sensibilidad de 20 µA (Figura 38 ,Gráfica 13 )

cianocobalamina	i=µA
$1.5 \times 10^{-6} M$	4.15
$3.0 \times 10^{-6} M$	6.19

Haciendo la gráfica se encuentra una concentración de  $1.5 \times 10^{-6} M$  de vitamina B<sub>12</sub> en la muestra polarografiada.

La concentración en la muestra original es de  $0.93 \times 10^{-6} M$  que corresponde a 126 µg de vitamina B<sub>12</sub> en 100 ml.

El error relativo es de 1 % y está dentro de la tolerancia aceptada por la Farmacopea.

En las muestras comerciales no se repitió la determinación varias veces para realizar cálculos estadísticos porque las muestras comerciales son de 100 ml y alcanzan solamente para una determinación. Los cálculos estadísticos solamente tienen valor si se efectúan sobre la misma muestra varias determinaciones.

Determinación de cianocobalamina en Iberol  
Sensibilidad 20  $\mu$ A

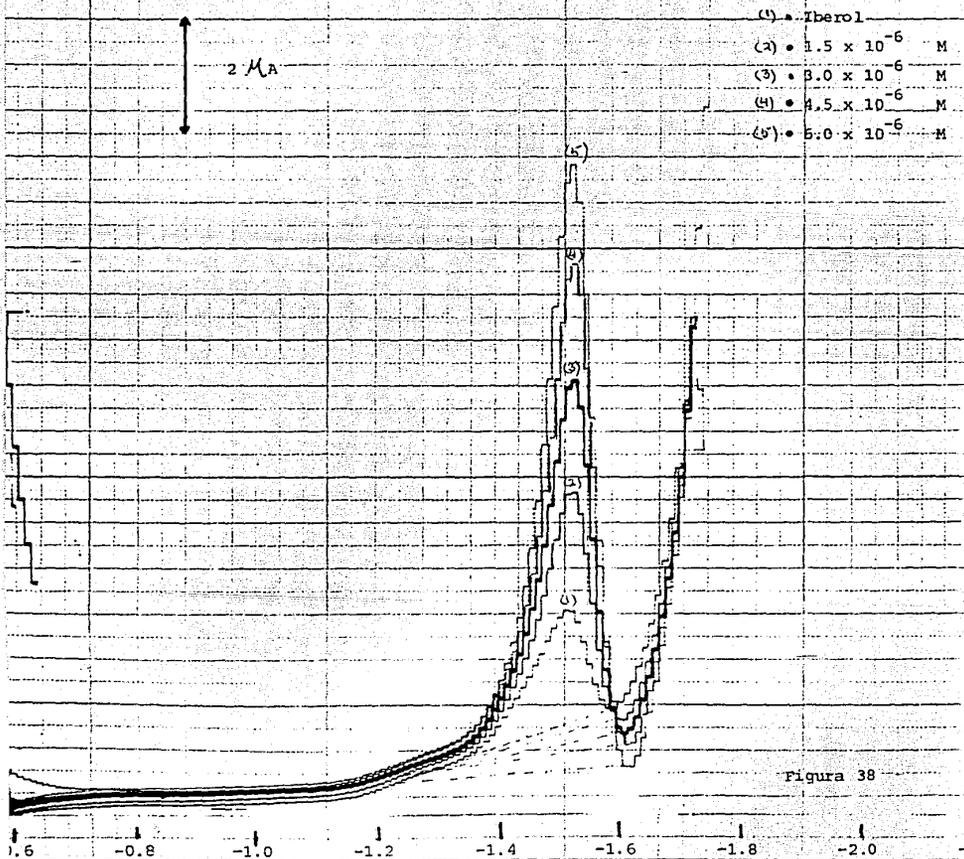


Figura 38

$i_a$   $\mu A$

6

5

4

3

2

1

0

0

1.5

3.0

4.5

$\times 10^{-6} M$

Determinación de cianocobalamina en Iberol

Sensibilidad 20  $\mu A$

Gráfica 13

## 6.- Discusión .-

Una de las normas de Control de Calidad es el Control de Proceso durante la fabricación de un producto.

En la fabricación de productos farmacéuticos el Control de Proceso incluye al Control Químico del producto intermedio antes de envasar.

En el caso de preparados multivitamínicos en forma de jarabes conteniendo cianocobalamina ,el análisis microbiológico requiere de varios días para su realización por el método oficial que es el método microbiológico.

La necesidad de esperar varios días con el equipo ocupado con un producto representa para la empresa un aumento en los costos de ese producto.

El método polarográfico que se ha ensayado en este trabajo resulta ser un método ideal para ahorrar tiempo en la fabricación de productos conteniendo cianocobalamina con una concentración del orden de  $10^{-6}$  M.

El método polarográfico se puede realizar máximo en cuatro horas ,incluyendo la separación cromatográfica ,teniendo el equipo y reactivos ya preparados.

Aunque el método oficial para el control de la cianocobalamina es el método microbiológico y tiene que realizarse en el producto terminado para su aprobación definitiva es una ventaja tener la seguridad de que el lote está correcto con el análisis de producto intermedio en corto tiempo y poder proceder al envasado.

#### IV.- ANEXOS.

#### Métodos analíticos utilizados para la determinación de vitamina B<sub>12</sub> en el presente trabajo. Consideraciones teórico prácticas.

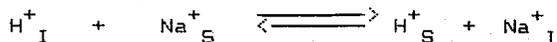
##### 1.-Anexo 1: Método de separación.

##### 1.1.Cromatografía de intercambio iónico ( 30 )

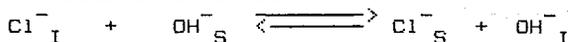
La cromatografía de intercambio iónico se realiza utilizando sólidos insolubles que contienen iones que pueden intercambiarse con otros provenientes de una disolución.

Estos intercambiadores se clasifican en dos categorías:

intercambiadores catiónicos



e intercambiadores aniónicos



El intercambiador está constituido por una red cristalina macromolecular que lleva cargas fijas positivas o negativas denominadas ionógenos fijos. Las cargas de estos ionógenos son neutralizadas por las de iones "libres" dentro de los poros de la red llamados contra-iones. Estos contraiones son los que pueden ser reemplazados por otros en la reacción de intercambio.

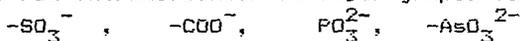
El número total de cargas que suman los contraiones, que es igual al número de cargas fijas en la red, constituye la capacidad científica de intercambio del intercambiador. Es una magnitud constante, característica del intercambiador e independiente de la naturaleza del contraión.

El intercambio iónico no es un proceso químico sino físico, siendo las fuerzas que lo determinan de carácter físico, principalmente electrostáticas.

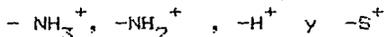
Ademas del intercambio entre los iones se observa que una

parte del disolvente y los iones contenidos en este penetran en los poros del intercambiador. Este fenómeno de absorción provoca un aumento en el tamaño del intercambiador, el hinchamiento. A causa de la absorción del electrolito, el número de contraiones dentro del intercambiador es superior a la capacidad de intercambio. Este exceso debe compensarse con un número equivalente de iones de carga opuesta llamados co-iones. Un intercambiador puede ser más o menos selectivo, es decir tener afinidades más o menos diferentes para diversos iones. Los factores que principalmente influyen en la selectividad de los intercambiadores son la carga, el tamaño del contraión, la estructura y naturaleza del intercambiador. Los intercambiadores más importantes son las resinas. Están constituidas por una red macromolecular tridimensional, formada generalmente por cadenas de poliestireno unidas a través de "puentes" de divinilbenceno por un proceso de copolimerización. El porcentaje de divinilbenceno determina el grado de entrecruzamiento y éste determina el tamaño de los poros cuyo diámetro varía entre  $1 \text{ \AA}^0$  y más de  $100 \text{ \AA}^0$ .

En la red macromolecular se fijan grupos funcionales como:



para las resinas catiónicas y



para las resinas aniónicas.

Las resinas de intercambio iónico se presentan en forma de partículas esféricas cuyo diámetro varía entre 0.1 y 1 mm. En el estudio del equilibrio entre un intercambiador y una disolución es preciso distinguir tres fenómenos fundamentales:

- A) el hinchamiento
- B) la absorción
- C) el intercambio iónico

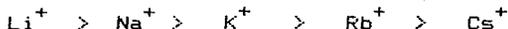
A) Hinchamiento :

Cuando una resina intercambiadora se pone en contacto con agua, ésta penetra en los poros de la resina cuyos grupos ionógenos tienden a rodearse de varias moléculas de agua. A raíz de este fenómeno de solvatación, un monómero tendería a disolverse, pero como estamos en presencia de una red macromolecular insoluble, el intercambiador no se disuelve y solamente aumenta de volumen hasta que alcance un equilibrio entre dos grupos de fuerza opuestas : las que ejercen las moléculas de agua sobre la red macromolecular y las fuerzas elásticas de la propia red. (nota 3) Los factores que influyen en el hinchamiento son :

- a) Naturaleza del disolvente. - Los disolventes polares provocan mayor hinchamiento que los no polares
- b) Grado de entrecruzamiento. - Las resinas con mayor grado de entrecruzamiento tienen un hinchamiento menor.
- c) Naturaleza de los grupos ionógenos. - Entre más afinidad tengan estos grupos por el disolvente mayor será el hinchamiento.
- d) Capacidad de intercambio.

Nota 3. - Presión de hinchamiento : La disolución interior de la resina está sometida a las fuerzas elásticas de la red macromolecular, se genera en ella una presión llamada presión de hinchamiento. Esta presión impide la penetración de más agua dentro de la resina. La presión de hinchamiento depende de los mismos factores que el hinchamiento.

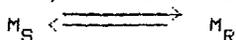
e) Naturaleza del contraión.- Los factores determinantes son el tamaño y la tendencia a la solvatación del contraión. La secuencia de hinchamiento con los iones alcalinos es la siguiente :



f) Concentración de la disolución.- Si la resina se encuentra en una disolución de electrolito en vez de agua pura, el hinchamiento disminuye a medida que aumenta la concentración de la disolución. Esto se debe a la diferencia de presión osmótica .

#### B) Absorción.-

Absorción de compuestos moleculares .- En ausencia de reacciones químicas, un soluto molecular M se distribuye entre la disolución y la resina según el equilibrio



caracterizado por el coeficiente de reparto

$$P = \frac{M_R}{M_S}$$

donde  $M_R$  y  $M_S$  representan las concentraciones de M en la resina y en la disolución respectivamente. En ausencia de otro tipo de interacciones las concentraciones de M en la disolución interior y en la disolución exterior deberían ser idénticas (  $P=1$  ). Pero como los iones fijos y los contraiones están solvatados la cantidad de agua disponible para disolver M en la resina es inferior a la cantidad total de agua presente en ésta. Por lo tanto el coeficiente de reparto es menor a 1. Sin embargo, esta situación sencilla se encuentra raras veces y se tienen que tomar en cuenta otros factores:

a) La interacción con los contraiones: Ciertas moléculas como los alcoholes alifáticos son más solubles en disoluciones

ácidas que en agua pura. Por lo tanto, un compuesto de ese tipo es más soluble en la disolución interior de una resina catiónica de forma  $H^+$  que en agua pura y su coeficiente de reparto entre el agua y la resina será mayor que 1. Por otra parte, si el soluto molecular puede formar complejos con los contra-iones, penetrará mucho más adentro de la resina.

b) Las interacciones de la red: Si el soluto molecular presenta interacciones de tipo dipolo-dipolo o London con la red macromolecular favorece su penetración en la resina.

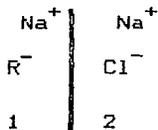
c) La presión de hinchamiento: entre mayor es la presión de hinchamiento más fuerte es la tendencia de la resina a excluir el soluto.

d) La concentración de la disolución: cuando aumenta la concentración de la disolución, la cantidad absorbida aumenta, pero el coeficiente de reparto tiende a disminuir por efecto de saturación de la resina.

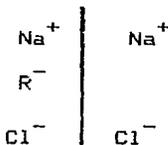
En general, podemos decir que el fenómeno de absorción de solutos moleculares es bastante complejo y no ha recibido un tratamiento teórico cuantitativo satisfactorio.

Absorción de electrolitos fuertes: Para explicar el comportamiento de la absorción de electrolitos fuertes Donnan (27) propuso un modelo comparando la interfase de intercambio con una membrana semipermeable.

Supongamos una membrana que tiene la sal  $NaR$  de un lado, esta membrana es impermeable al anión  $R$  y la sal  $NaCl$  está del otro lado de la membrana



(a)



(b)

El NaCl se difunde de 2 a 1 de tal manera que el estado de equilibrio se alcanza como se ve en la figura b.

Este modelo se puede extender al caso de un electrolito que no tiene un ión común en el cual NaR está de un lado de la membrana y del otro lado está KCl. KCl se difunde al otro lado de la membrana pero NaCl también atraviesa la membrana en dirección opuesta.



En el estado de equilibrio resulta que el anión que no se puede difundir a través de la membrana, aparentemente atrae al catión de un electrolito diferente cuyo anión está desplazado aparentemente en el mismo grado. Este modelo se puede aplicar al intercambio iónico si la interfase entre la resina y la fase acuosa se considera como una membrana y la resina o su ión fijo se considera como el ión que no se puede difundir. El contra-ión de la resina se mueve libremente. Por lo tanto si el intercambiador está rodeado de un electrolito que contiene un ión común o no común, el equilibrio se establecerá de acuerdo con el concepto de Donnan y se puede tratar de acuerdo con los principios de la teoría de la membrana. Como en una migración en sentidos opuestos de carga de signos opuestos, se establece una diferencia de potencial entre las dos fases.

Reglas cualitativas.-

a) Mientras más bajo es el potencial de Donnan menor es la

fuerza de exclusión y más elevada la absorción del electrolito.

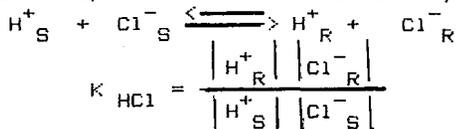
b) El potencial disminuye cuando decrece la diferencia de concentración entre la disolución y el interior de la resina, por lo tanto la absorción será mayor cuanto menor es la capacidad de la resina y su grado de entrecruzamiento.

c) La absorción crece con la concentración de la disolución.

Tratamiento cuantitativo.-(30)

Consideremos un sistema que consiste en una resina de intercambio iónico sumergida en una disolución de un electrolito fuerte con un ión común con la resina. Supongamos una resina sulfónica sumergida en HCl. Además del hinchamiento ocurre otro fenómeno importante: una cantidad apreciable de HCl se difunde en la disolución interior de la resina. Como no había  $\text{Cl}^-$  en el interior de la resina, habrá una tendencia de este ión a difundirse de la disolución externa a la interna. Por otra parte la disolución interna de ácido sulfónico está concentrada, por lo tanto los iones  $\text{H}^+$  no tienen tendencia a difundirse de la disolución exterior a la disolución interior. La necesidad de electroneutralidad requiere que el  $\text{H}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  emigren dentro de la resina en igual cantidad. El resultado final es que una pequeña cantidad de  $\text{Cl}^-$  se difunde en la disolución interior arrastrando una cantidad igual de iones  $\text{H}^+$  a pesar del gradiente de concentraciones.

El equilibrio de reparto entre la disolución y la resina será:



si  $C_S$  es la concentración de HCl en la solución,  $C_R$  su

concentración en la resina y  $C_I$  la capacidad de la resina

ya que 
$$\begin{aligned} C_S &= \left[ H^+ \right]_S = \left[ Cl^- \right]_S \\ \left[ H^+ \right]_R &= C_I + C_R \\ C_R &= \left[ H^+ \right]_R - C_I = \left[ Cl^- \right]_R \end{aligned}$$

$$K_{HCl} = \frac{(C_I + C_R)(C_I + C_R - C_I)}{C_S^2}$$

$$K_{HCl} = \frac{C_R(C_R + C_I)}{C_S^2}$$

Si  $P$  es el coeficiente de reparto de HCl entre la resina y la disolución

$$P = \frac{C_R}{C_S} \quad K_{HCl} = P \left( P + \frac{C_I}{C_S} \right)$$

De las expresiones anteriores se deduce que cuando  $C_S$  aumenta o  $C_I$  disminuye, tanto  $C_R$  como  $P$  aumentan.

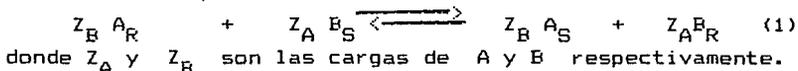
Absorción de electrolitos débiles .-

Los electrolitos débiles se comportan como solutos moleculares. Su absorción depende en gran manera de las condiciones experimentales (pH, presencia de complejantes, etc.)

Para las resinas no ionizadas (complejantes) la absorción de electrolitos fuertes, electrolitos débiles y solutos moleculares es muy semejante.

### C) Equilibrio de intercambio iónico .

Cuando una resina intercambiadora en forma A se pone en contacto con una disolución que contiene contra-iones B, se establece el equilibrio:



Este equilibrio está desplazado en un sentido u otro según la afinidad relativa de la resina por A o por B. Las causas que determinan la afinidad de una resina por un ión y la descripción de los equilibrios entre una resina y una disolución acuosa se considerarán a continuación.

Los factores que determinan la afinidad son:

a) La carga del contra-ión.- Las resinas tienen mayor afinidad por los iones de carga elevada. A este fenómeno se le llama electroselectividad. La electroselectividad aumenta por dilución de la disolución y aumento de la capacidad de la resina. La electroselectividad puede explicarse por el potencial de Donnan.

b) El tamaño del contra-ión solvatado.- La resina tiene más afinidad por un contra-ión hidratado de volumen más pequeño.

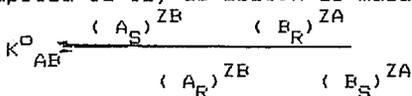
c) Las interacciones entre el contra-ión y los grupos ionógenos o la red macromolecular.- La resina tiene mayor afinidad por un contra-ión que tiene mayores interacciones con los grupos ionógenos o la red.

d) Las interacciones entre el contra-ión y el co-ión.- La existencia de interacciones entre el contra-ión y el co-ión disminuye la afinidad de la resina por el contra-ión considerado.

Aspecto cuantitativo.-

Constante de intercambio.-

Si se aplica la ley de acción de masas al equilibrio (1)



donde  $K_{AB}^D$  depende únicamente de la temperatura y presión.

Para iones de la misma carga:

$$K_{AB}^{\circ} = \frac{(A_S) (B_R)}{(A_R) (B_S)}$$

mientras más se aleja el valor  $K_{AB}^{\circ}$  de la unidad más

diferentes son los coeficientes de reparto de A y B y más diferentes las afinidades de la resina por ellos.

Para iones de cargas distintas el valor límite es :

$$\frac{C_I}{C_S} \text{ ZA-ZB}$$

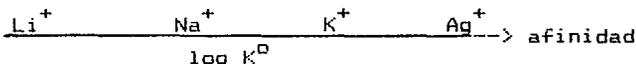
dependiente de la concentración de la disolución ( $C_S$ .)

Para iones de la misma carga , la constante  $K_{AB}$  constituye una medida de la diferencia de afinidad.

Conociendo las constantes de intercambio de dos iones A y B con un tercero, se puede deducir la constante de intercambio AB :

$$K_{AB}^{\circ} = K_{AC}^{\circ} \cdot K_{CB}^{\circ}$$

Pasando a logaritmos se pueden construir escalas de afinidad para cada resina. Se colocan los iones de la misma carga en la misma escala



#### Constante aparente de intercambio.-

En la práctica se miden generalmente concentraciones y no actividades, por lo tanto es más cómodo usar la constante aparente

$$K_{AB} = \frac{|A_S| \quad |B_R|}{|A_R| \quad |B_S|} \quad K_{AB} = \frac{P_B}{P_A}$$

La  $K_{AB}$  depende mucho de las condiciones experimentales.

Los factores que influyen en la constante aparente son :

- a) La composición iónica de la resina.
- b) La concentración de la disolución.
- c) Grado de entrecruzamiento de la resina.
- d) Capacidad de intercambio.

## 1.2.-Cromatografía por adsorción líquido sólido. (28)

### 1.2.1.--Conceptos generales.

La cromatografía líquido-sólido incluye una fase móvil líquida y un sólido poroso finamente dividido (el adsorbente) como fase estacionaria.

La fase estacionaria debe tener una gran área de superficie específica, por ejemplo de 50 a 1000 m<sup>2</sup>/g.

El equilibrio que controla la separación está basado en la distribución de las moléculas de muestra entre la fase líquida y la superficie del adsorbente.

La cromatografía líquido sólido es útil para la separación de compuestos insolubles en agua y poco polares como lípidos y esteroides pero también es ampliamente usada para compuestos polares.

La selectividad de la separación es muy pronunciada con relación al tipo de compuesto, mientras que la selectividad en relación al peso molecular del compuesto es muy reducida.

### 1.2.2.-- Clasificación.--

Existen dos procedimientos básicos en cromatografía líquido-sólido:

A) La cromatografía en columna y.

B) La cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada es similar a la cromatografía en papel.

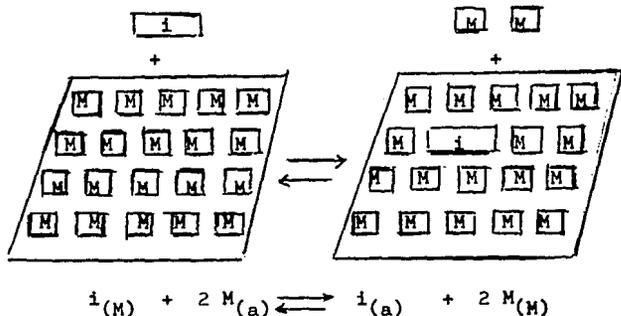
La cromatografía en columna fue la primera forma práctica de cromatografía. Fue introducida por Tswett en 1905 y redescubierta por Kuhn y Lederer en 1931. Siguió un período explosivo de crecimiento y fue usada para separar todo tipo de muestras. A mediados de los 50's su relativa popularidad declinó por la competencia con la cromatografía líquido-líquido, intercambio iónico y cromatografía líquido-gas.

### 1.2.3.--Teoría del equilibrio.--

En todos los sistemas de sólido-líquido la superficie del adsorbente está cubierta completamente por una capa de moléculas adsorbidas de soluto  $i$  o de fase móvil  $M$ . El equilibrio es el siguiente :



La molécula de soluto inicialmente presente en la fase móvil  $i_{(m)}$  se adsorbe desplazando  $n$  moléculas de fase móvil de la superficie del adsorbente. El resultado de este mecanismo es una molécula de soluto  $i_{(a)}$  adsorbida en la superficie del adsorbente y  $n$  moléculas de fase móvil  $M_{(m)}$  que son puestas en libertad. El número de moléculas  $n$  es determinado por el tamaño de las moléculas de soluto y de fase móvil. Este proceso está ilustrado en la figura 1.



Representación hipotética del equilibrio entre moléculas de soluto ( $i$ ) y moléculas de fase móvil ( $M$ ) en LSC.

Figura 1

El equilibrio de adsorción se puede expresar en una forma muy distinta si consideramos que la monocapa de  $M$  adsorbida constituye una fase líquida distinta adyacente a la

superficie del adsorbente. En este caso el equilibrio se puede expresar :



En otras palabras, el soluto  $i$  se distribuye en dos fases líquidas distintas: el disolvente como tal y la monocapa de disolvente adsorbida.  $K_x$  será la constante de distribución de concentraciones.

$$K_x = \frac{\text{fracción molar de } i \text{ en la monocapa}}{\text{fracción molar de } i \text{ en el disolvente}}$$

como el líquido  $M$  constituye las dos fases

$K_x = K^0 =$  constante de distribución de concentraciones molares.

Si la expresión de  $K$  la definimos en términos de la concentración de  $i$  en la fase total del adsorbente tendremos

$$K' = \frac{\text{moles de } i / \text{gramos de adsorbente}}{\text{moles de } i / \text{mililitros de disolvente}}$$

#### 1.2.4.- Parámetros que influyen en el valor de $K'$

La ecuación 3 nos da los diferentes parámetros que influyen en el valor de  $K'$

$$\log K' = \log V_a + \alpha' (S^0 - A_i \epsilon^0) \quad (3)$$

en donde :

$V_a$  = cantidad de fase móvil adsorbida por unidad de peso de adsorbente ml/g

$\alpha'$  = actividad del adsorbente

$\epsilon^0$  = fuerza de la fase móvil

$S^0$  = energía de adsorción de  $i$  en una superficie de adsorbente estandar cuando está disuelto en una fase móvil estandar.

$A_i$  = área molecular del soluto  $i$ .

Los términos  $V_a$  y  $\alpha'$  representan propiedades características

del adsorbente, variables según el tipo, área de superficie y contenido de agua. Estos dos parámetros son independientes de la naturaleza del soluto y de la fase móvil.

$\alpha'$  la actividad del adsorbente mide la habilidad por unidad de adsorbente para fijar moléculas adsorbidas.

$\epsilon^0$  es la energía de adsorción de la fase móvil por unidad de área de un adsorbente estandar.

#### 1.2.5. - Adsorbente. -

El efecto del adsorbente en separaciones por cromatografía líquido sólido está determinado por varias propiedades del adsorbente, en primer lugar tipo químico, área de superficie y contenido de agua.

Tipo químico se refiere a la composición del adsorbente, por ejemplo: sílica o alúmina.

Las diferencias en el tipo químico implican diferencias en los grupos funcionales superficiales y en los tipos de interacciones intermoleculares entre el adsorbente y las moléculas adsorbidas. Esto a su vez influye en la migración relativa de dos solutos como función del tipo de adsorbente. Entonces  $S^0$  y  $\epsilon^0$  varían con el tipo de adsorbente.

Los adsorbentes se puede dividir en:

adsorbentes polares como sílica y alúmina y

adsorbentes no polares como carbón y sílica dehidroxilada.

Los adsorbentes polares actúan con las moléculas adsorbidas por fuerzas específicas tales como atracción electrostática y enlace de H.

La energía de adsorción, la retención cromatográfica y la fuerza del disolvente aumentan con la polaridad del adsorbente.

Los adsorbentes polares pueden clasificarse en ácidos y básicos, por ejemplo: sílica es ligeramente ácido por sus

grupos Si-OH en la superficie y alúmina es fuertemente básica por sus grupos  $O^{2-}$  en la superficie.

El área superficial de un adsorbente afecta el valor de  $V_a$  pero tiene poco efecto en otros parámetros. Aumentará el valor de  $K$  para todos los solutos.

El contenido de agua disminuye los valores de  $K$  y disminuye la selectividad.

#### 1.2.6.- Fase móvil.-

Generalmente se selecciona la fase móvil de tal manera que dé valores de  $K'$  para el soluto entre 1 y 20.

Los solventes llamados fuertes dan valores de  $K'$  pequeños, mientras que los solventes débiles dan valores de  $K'$  grandes.

La fuerza del solvente se representa por  $\epsilon^0$ . Una serie elutrópica es una serie de disolventes ordenados con valores de  $\epsilon^0$  crecientes. El orden de fuerza relativa de los disolventes es el mismo para todos los adsorbentes polares. La fuerza del solvente está determinada por la fuerza con que las moléculas del solvente son adsorbidas en la superficie del adsorbente. Consecuentemente, para adsorbentes polares  $\epsilon^0$  aumenta con la polaridad del solvente. En adsorbentes no polares como el carbón la fuerza del solvente es mayor en los no polares. La fuerza del solvente aumenta con el tamaño de la molécula del solvente y es mayor para solventes aromáticos.

La fuerza de un disolvente formado por la mezcla de A y B cambia desde la fuerza de A hasta la de B de acuerdo con la proporción de B en la mezcla.

El papel más importante de la fase móvil es controlar los valores de  $K'$ , pero también puede usarse para variar la selectividad de la separación (valores de  $\alpha$ ).

Cuando se cambia la composición de un disolvente es

importante mantener la fuerza constante de tal manera que el valor de  $K'$  no cambie. Disolventes de la misma fuerza que pueden ser intercambiados reciben el nombre de equielutrópicos.

#### 7.- Migración de banda y estructura molecular.-

Ya se ha anotado que la velocidad de migración de una fase móvil en adsorbentes polares disminuye al aumentar la polaridad del compuesto que emigra.

Los hidrocarburos saturados son los primeros compuestos en ser eluidos y ácidos y bases se eluyen al final.

El orden de separación relativa de muestras está determinado por el parámetro  $S^0$ , que es la energía de adsorción de  $i$  en un sistema estandar de adsorción. El tamaño de la molécula también influye, moléculas grandes emigran más rápidamente.

Homólogos superiores son retenidos menos fuerte en adsorbentes polares. Solutos polifuncionales son retenidos más fuertemente que los monofuncionales. Sin embargo los valores de  $S^0$  de solutos polifuncionales son generalmente menores a los calculados por la adsorción localizada.

La cromatografía sólido-líquido es única en su efectividad para separar isómeros.

### 1.3.- Columnas de intercambio. (30)

Una columna de intercambio iónico está constituida por un empaque de granos de resina en un tubo cilíndrico, en la extremidad de la cual se inyecta la disolución por tratar. La disolución inyectada se llama influente y la disolución recuperada a la salida de la columna se llama efluente. ( Figura 2 ).

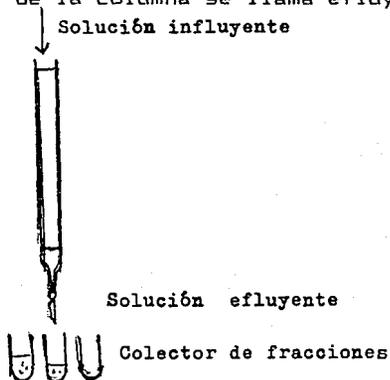


Figura 2

#### 1.3.1.- Características de las columnas :

- La naturaleza de la resina.-Según el problema se elige la naturaleza química de la resina y su grado de entrecruzamiento..
- La cantidad de resina .-Una columna que tiene una masa  $m$  y una capacidad  $C_I$  puede intercambiar un total de  $mC_I$  miliequivalentes.
- El volumen intersticial por lo regular es del orden de 30 a 40 % del volumen total de la columna.
- Características geométricas: una columna larga es más eficiente que una corta. Las columnas de laboratorio generalmente tienen una relación longitud / diámetro del

orden de 10.

e) El caudal de disolución es el volumen de disolución que escurre por unidad de tiempo y de superficie de sección de la columna. Se usan comunmente caudales de  $10 \text{ a } 200 \text{ ml h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ .

### 1.3.2.- Modalidades de uso de las columnas

Existen dos modalidades :

A ) Permutación y

B ) Resolución.

La permutación puede ser :

a) Permutación simple.

b) Analisis frontal.

a) La permutación simple consiste en poner en contacto la resina con el influyente hasta que se alcanza el equilibrio. Si el influyente contiene un soluto intercambiable con el contra-ión de la resina, el intercambio se realiza hasta que toda la resina de la columna se encuentre en equilibrio con la disolución influyente. La cantidad de soluto fijada en la resina depende del reparto y le corresponde un volumen de disolución llamado volumen de retención.

b) Analisis frontal.

El analisis frontal consiste en que el influyente tiene varios solutos y cada uno se fija en proporción diferente. La disolución efluyente tiene composición variable , primero sale el ión menos retenido y al final el que se fijó más en la resina.

### Eficiencia de una columna

Puesto que los equilibrios no se establecen instantáneamente y como la disolución tiene una velocidad finita de escurrimiento, en ningún punto de la columna se alcanza el

equilibrio de intercambio y las cantidades intercambiadas son inferiores a las teóricas.

Para el establecimiento de las leyes de funcionamiento de una columna comparamos su funcionamiento con el de una columna teórica, operando en condiciones de equilibrio entre la resina y la disolución. Tal columna estaría constituida por platos superpuestos que tienen cada uno una masa  $m$  de resina seca. La disolución llega a un plato dado en porciones  $\Delta V_1$ , se espera el tiempo necesario para el establecimiento del equilibrio y luego cada porción  $\Delta V_1$  se separa del plato correspondiente y se lleva al plato inmediato inferior.

Cuando la columna real y la columna teórica dan resultados idénticos, puede decirse que son equivalentes. Si  $l$  es la longitud de la columna y  $N$  el número de platos de la columna equivalente,  $h = l/N$  es la altura del plato teórico equivalente. Cada plato tiene una masa  $\Delta m = m_0/N$  de resina seca y un volumen de disolución  $\Delta V_1 = V_1/N$ . El funcionamiento de la columna real se acerca más a las condiciones de equilibrio cuanto mayor sea  $N$  y menor sea  $h$ .

Permutación de iones :

Principio:

Si se inyecta una disolución de un ión  $B$  intercambiable con  $A$  en una columna en forma de  $A$ , se produce un intercambio entre  $A$  y  $B$



$$K_{AB} = \frac{\begin{array}{|c|c|} \hline A_S & B_R \\ \hline \end{array}}{\begin{array}{|c|c|} \hline A_R & B_S \\ \hline \end{array}}$$

Imaginemos el funcionamiento de una columna teórica equivalente. La primera fracción de disolución de volumen  $V_1$

se pone en equilibrio con la resina del primer plato de masa  $\Delta m$ . Las proporciones de A y B en la resina, inicialmente igual a 1 y 0, son  $1-y_1$  y  $y_1$  después del intercambio, en tanto que en la disolución son respectivamente  $1-x_1$  y  $x_1$  de donde

$$K_{AB} = \frac{y_1 (1-x_1)}{(1-y_1) x_1}$$

Después de pasar esta misma porción de disolución al segundo plato, las porciones de A y B cambian a  $1-y_2$  y  $y_2$  en la resina y a  $1-x_2$  y  $x_2$  en la disolución.

$$x_2 < x_1 \quad 1-x_2 > 1-x_1$$

La disolución se enriquece en A y se empobrece en B.

A medida que la disolución avanza por la columna, las porciones de la cabeza se enriquecen en A hasta completa desaparición de B, en tanto que las porciones de la cola llegan a contener únicamente B.

La repartición de A y B en la columna se muestra en la figura 3 :

En la zona inferior existe únicamente A y en la zona superior únicamente B. La zona intermedia donde se hace la permutación, la coexistencia de A y B se llama frente de permutación. Cuando el frente llega a la extremidad inferior de la columna, los iones B aparecen en la disolución efluyente y se ha llegado al umbral de saturación. El volumen correspondiente se denomina volumen de retención eficaz.

Si  $K_{AB} > 1$  el frente de permutación progresa uniformemente en la columna y conserva su longitud constante.

Si...  $K_{AB} < 1$  el frente de permutación se despliega a medida que progresa en la columna.

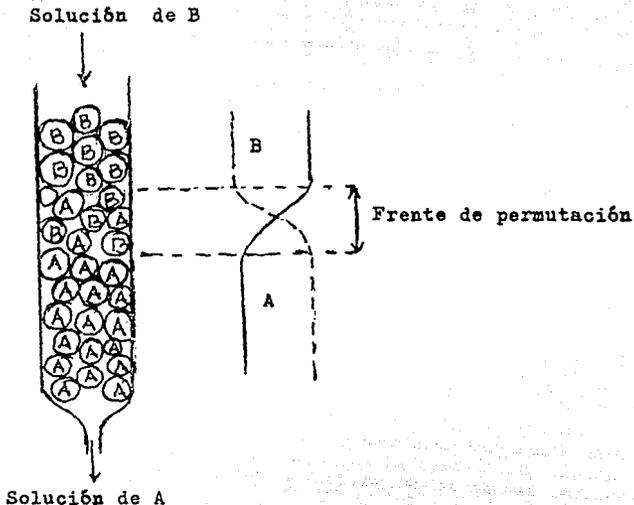


Figura 3

**B) Resolución.-**

Para separar compuestos de comportamientos muy semejante frente a la resina, el simple equilibrio no es suficiente y es necesario multiplicar las operaciones. En una columna esto se logra mediante una técnica de resolución que requiere una cantidad de resina muy superior a la necesaria para fijar los compuestos.

La técnica de resolución es la siguiente: se coloca la mezcla en la parte superior de la columna y se desplaza por medio de una disolución conveniente. Así se establece a lo largo de la columna una sucesión de equilibrios de intercambio y cada uno progresa a velocidad diferente. Después de un tiempo cada soluto se encuentra en una zona diferente y pueden ser separados en una fracción del efluente.

La resolución puede ser :

a) por elución .

b) por desplazamiento

a) La técnica de resolución por elución se emplea con fines analíticos, se aplica a cantidades de mezcla pequeñas y cuando se requiere un rendimiento de separación de 100 %.

Principio:

En la parte superior de la columna se fija una pequeña cantidad de mezcla, por ejemplo  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y se inyecta una disolución que tiene el mismo catión que contenía la resina, por ejemplo  $\text{H}^+$ . Los iones  $\text{H}^+$  permutan con los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , los cuales se desplazan con la disolución. Cuando ésta se encuentra de nuevo con resina en forma  $\text{H}^+$ , los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se fijan otra vez y el proceso se reinicia. Puesto que la resina tiene mayor afinidad por  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  que por  $\text{H}^+$ , la zona de permutación crece a medida que se desplaza la columna y la mezcla se diluye. Cuanto más grande es la columna, tanto más importante es la dilución de la mezcla. Como la resina tiene mayor afinidad por  $\text{K}^+$  que por  $\text{Na}^+$ , éste último se desplaza más rápidamente en la columna que  $\text{K}^+$  y después de cierto tiempo los dos iones se encuentran en zonas diferentes.

b) Resolución por desplazamiento.

La resolución por desplazamiento se emplea para hacer separaciones con fines preparativos, en este caso el influyente tiene mayor afinidad por la resina que la muestra.

Principio:

Se fija una cantidad importante de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en la parte superior de la columna en forma  $\text{H}^+$ . La mezcla ocupa en la columna una banda de longitud  $l_0$ . En el transcurso de la

fijación se ha producido un análisis frontal y la cabeza de la banda está enriquecida en  $\text{Na}^+$ . Si se inyecta en la columna una disolución de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales tienen mayor afinidad por la resina que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , éstos desplazan la mezcla  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de la resina, y en el interior de la banda previamente considerada, se produce un análisis frontal inverso enriqueciéndose la cola en  $\text{K}^+$ . El análisis frontal debido al desplazamiento de  $\text{H}^+$  por la mezcla sigue en el transcurso de la operación. Por tanto a medida que la banda progresa, su cabeza se enriquece en  $\text{Na}^+$  y su cola en  $\text{K}^+$ . Después de cierto tiempo si la columna es lo suficientemente larga, la banda se divide en dos partes: una banda de  $\text{Na}^+$  en la cabeza y una banda de  $\text{K}^+$  en la cola y entre las dos un frente de permutación muy estrecho.

## Anexo 2

### 2.- Métodos de cuantificación.-

#### 2.1 .-Polarografía clásica .-

##### 2.1.1.- Introducción (24)

La polarografía de corriente directa (cd) o polarografía clásica es un método electroquímico que fué desarrollado por J. Heyrovsky en 1922.

Este método está basado en la electrólisis de una fracción diminuta de una disolución, mediante el uso de una celda que consiste de un microelectrodo goteante de mercurio y otro no polarizable que cierra el circuito. El nombre de esta técnica sugiere su dependencia explícita de la polarización de concentración producida en el microelectrodo. Consiste en aplicar a través de la celda un potencial conocido y constantemente creciente, y en medir la corriente de electrólisis que resulta.

Lo sobresaliente del método es que produce:

- a) Una corriente de electrólisis límite que es directamente proporcional a la especie electrolizable y
- b) Un potencial de media onda, el potencial en el que la corriente ha alcanzado la mitad de su valor límite, que es característico de cada especie. (19)

La corriente que circula en el electrodo de mercurio se mide en función del potencial aplicado. El potencial y la corriente se pueden medir instrumentalmente, obteniéndose curvas del tipo intensidad-potencial conocidas comúnmente como polarogramas. En presencia de sustancias electroactivas, especies que se oxidan o se reducen en el electrodo de mercurio, se observa un incremento de corriente catódica, ( de reducción, por convenio negativa ) o anódica, (de oxidación, por convenio positiva) sobre un intervalo de

potencial dado en la curva intensidad-potencial.

Posteriormente se alcanza una zona donde la corriente se hace independiente del potencial y tiene un valor límite (meseta).

Las características importantes del polarograma se pueden ver en la figura 4

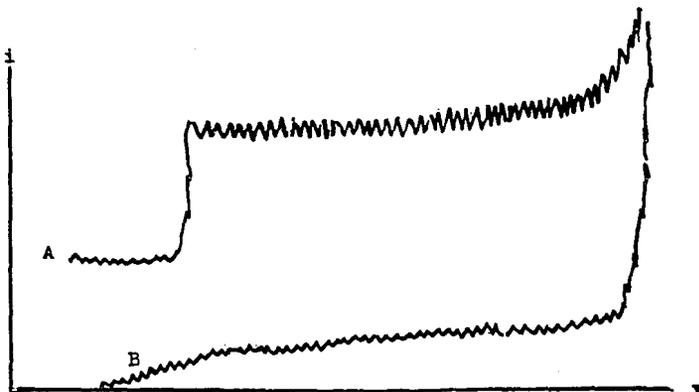


Figura 4

En esta figura la curva B muestra las características de una disolución de KCl 0.1 M en ausencia de especies electroactivas. La corriente es muy pequeña hasta que se alcanza el potencial donde es reducido el disolvente o electrolito soporte. La curva A en la misma figura es el polarograma de la misma disolución adicionada de  $\text{Cd}^{+2}$  M. La curva A es similar a la B hasta que se alcanza el potencial en el que se reduce el  $\text{Cd}^{+2}$ . La corriente se eleva muy rápidamente con el potencial hasta que el  $\text{Cd}^{+2}$  se reduce tan rápidamente como alcanza la superficie del electrodo. En este punto la corriente está limitada por la velocidad de

llegada al electrodo de la especie electroactiva y la curva intensidad-potencial se mantiene en el mismo nivel.

La polarografía es un proceso de estado pseudoestacionario en el que la disolución en la vecindad del electrodo se agita cuando la gota de mercurio cae. La gota que sigue crece en un medio casi idéntico al de su predecesora. La corriente límite es constante en la meseta de la onda y no disminuye debido a agotamiento de los reactivos en la vecindad del electrodo como sucedería en un electrodo fijo en una disolución sin agitar.

La corriente límite puede estar controlada por:

- a) difusión , cuando la difusión causada por un gradiente de concentración que se establece entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución determina la velocidad.
- b) la cinética, cuando una reacción química o electroquímica acoplada limita la velocidad,
- c) adsorción , cuando los procesos de adsorción controlan la velocidad.

La diferencia entre la corriente límite y la corriente residual (corriente que circula en ausencia de especie electroactiva de interés) se llama altura de onda y generalmente depende de la concentración de la sustancia electroactiva en disolución. La mayoría de las aplicaciones analíticas se basan en el incremento de la altura de la onda con la concentración.

Otro parámetro importante es el potencial de media onda,  $E_{1/2}$  , que es el potencial sobre la curva polarográfica en el cual la corriente llega a la mitad de su valor límite.  $E_{1/2}$  es en sistemas sencillos independiente de la concentración de las especies electroactivas, su valor es una característica del sistema redox involucrado en un medio

dato. Por lo tanto es un parámetro que se utiliza para caracterizar cualitativamente a las sustancias. (Figura 5)

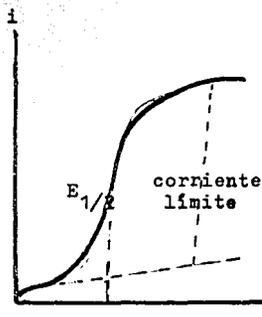


Diagrama esquemático de un polarograma dc.

Figura 5

### 2.1.2 Conceptos generales.

#### A) Capacitancia y corriente faradéica.

La corriente total observada en un proceso electroquímico es el resultado de dos fenómenos diferentes en el electrodo.

El primero es la corriente faradéica, la cual se origina como resultado de la transferencia de electrones a través de la interfase electrodo-disolución.

El segundo es la corriente capacitiva que se establece porque la interfase electrodo-disolución tiene características capacitivas. La corriente capacitiva resulta de un cambio en el potencial del electrodo o un cambio en el tamaño del electrodo. Ya que el potencial permanece virtualmente constante durante la vida de la gota, la corriente capacitiva en polarografía es el resultado de un cambio en el área de la gota. A medida que la gota cae, una nueva superficie del mercurio es expuesta a la disolución y la

corriente debe fluír a cargar esta nueva superficie al potencial dictado por el electrodo y las condiciones de la disolución.

Esta corriente capacitiva puede ser anódica o catódica dependiendo del potencial del electrodo con respecto al potencial de corriente nula. A potenciales anódicos al punto de corriente nula la mayoría de los aniones son adsorbidos en la superficie del electrodo y la adsorción de estos aniones tiene como resultado un exceso de carga negativa del lado de la disolución en la interfase. Esta carga negativa induce una carga positiva en el electrodo. Por lo tanto la corriente anódica debe fluír para cargar la interfase electrodo-disolución. A medida que el potencial disminuye la cantidad de aniones adsorbidos disminuye. Al potencial donde no hay exceso de aniones o cationes en la superficie del electrodo, no se requiere corriente para cargar la doble capa. Este es el potencial de carga nula. A potenciales más negativos que el  $E_{max}$ , que es el potencial de corriente nula, se requiere una corriente negativa para cargar la doble capa. La corriente capacitiva  $i_c$  resulta del crecimiento de la gota de mercurio y es directamente proporcional a la velocidad de variación del área de la gota  $dA / dt$  y está dada por :

$$i_c = C_d (E_{max} - E) \frac{dA}{dt} \quad (1)$$

en donde  $E_{max}$  = potencial de corriente nula

$C_d$  = capacidad diferencial

$E$  = potencial del electrodo

El cambio en el área de la gota es muy grande al principio de una nueva gota, por lo tanto  $i_c$  brinca bruscamente al comenzar la gota. A medida que la gota crece  $dA / dt$  decrece e  $i_c$  disminuye. La variación de  $i_c$  con la edad de

la gota está dada por :

$$i_c = 0.00569 C_d (E_{max} - E) m^{2/3} t^{-1/3} \quad (2)$$

en donde  $m$  es la velocidad del fluido del mercurio en mg/seg y  $t$  es el tiempo desde que empieza a crecer la gota. La corriente faradéica, a diferencia de la corriente capacitiva, aumenta con el tiempo durante la vida de la gota, a menos que se presente adsorción.

El efecto del crecimiento en la corriente faradéica es doble:

- 1.- Nueva área del electrodo está expuesta a la disolución.
- 2.- El espesor de la capa de disolución que rodea a la gota disminuye porque la gota se expande.

La corriente faradéica instantánea en cualquier tiempo durante la vida de la gota está dada por la ecuación de Ilkovic:

$$i_d = 607 n D^{1/2} C m^{2/3} t^{1/6} \quad (3)$$

en donde  $i_d$  es la corriente media.

La ecuación de la corriente máxima no predice las corrientes instantáneas durante la vida de la gota con el grado deseado. Sin embargo, la ecuación de corriente media es válida para la mayoría del trabajo polarográfico.

#### B) Corriente límite de difusión.-

Cuando a un electrodo se le impone un potencial tal que produce una reacción electroquímica que consume una sustancia electroactiva en la superficie del electrodo, esta reacción se detendría en cuanto la sustancia electrolizada desapareciera de la superficie del electrodo si no intervinieran fenómenos de transporte, que traen la sustancia electrolizada del seno de la disolución hacia el electrodo.

El transporte de materia puede ser de tres tipos:

1) Convección :las especies se desplazan bajo la influencia de factores tales como :diferencia de temperatura,densidad, vibración , etc. o bien por agitación. La agitación homogeneiza la disolución salvo en la proximidad inmediata del electrodo (capa de difusión )

2) Difusión :En el transcurso de la electrólisis las reacciones electroquímicas en los electrodos provocan una variación de la concentración de las especies electrolizadas en la vecindad del electrodo.Resulta la existencia de un gradiente de concentración entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución y los solutos difunden de los medios más concentrados hacia los más diluidos.La difusión se produce en la vecindad del electrodo y afecta solamente parte de la disolución.Cuando el transporte de los solutos se hace independiente del tiempo,es decir ,a convección constante,esto recibe el nombre de régimen de difusión estacionario o régimen de difusión correctiva.

3.-Migración : Al aplicar una diferencia de potencial que crea un campo electrico entre los dos electrodos se origina un movimiento de carga en la disolución.Este tipo de transporte concierne a los cuerpos electrolizados si son iónicos y si tienen número de transporte suficientemente importante.Para eliminar este tipo de transporte de los iones electrolizados basta volver despreciable su número de transporte ,que está determinado por :

$$t_i = \frac{\lambda_j Z_j C_j}{\sum_i \lambda_i Z_i C_i} \quad (4)$$

donde:

$\lambda$  = conductividad equivalente

$Z$  = carga del ión

$C_i$  = concentración molar de los iones presentes en

disolución.

Basta con que la concentración del ión erlectrolizado sea despreciable con respecto a los demás iones que no participan en la electrólisis ( $C_j$  sea despreciable frente a  $\Sigma C_i$ ). En la práctica esto se logra añadiendo un electrolito indiferente que recibe el nombre de electrolito soporte.

En consecuencia la adición de un electrolito indiferente da como resultado que casi la totalidad de la corriente de electrólisis se debe al transporte por difusión de los iones. Cuando la velocidad de difusión es menor que la velocidad propia de la reacción electroquímica, la sustancia se consume a medida que llega al electrodo y la intensidad de la corriente de electrolisis corresponde a la velocidad de llegada. En condiciones determinadas, la velocidad de difusión alcanza su valor máximo, al cual corresponde una intensidad máxima llamada corriente límite de difusión.

### C) Leyes de difusión estacionaria.

En el curso de una electrólisis las concentraciones de las sustancias que participan varían en función de la distancia al electrodo, desde la superficie hasta el fin de la capa de difusión. En régimen estacionario esta variación es independiente del tiempo. En estas condiciones la intensidad de la corriente observada corresponde al flujo de sustancias electrolizadas que llegan hacia el electrodo. Si se designa por  $\rho$  este flujo, expresado en moles por segundo por  $\text{cm}^2$  la ley de Faraday puede escribirse:

$$i = \pm n F A \rho \quad (5)$$

donde :

$i$  = intensidad de corriente en ampers

$n$  = número de electrones que interfieren por ión o

molécula gramo de sustancia electrolizada.

A = área del electrodo en  $\text{cm}^2$

F = Faraday ( 96487 coulombs  $\text{mol}^{-1}$  )

Las leyes de Fick rigen los procesos de difusión.

Según la primera ley, el flujo de difusión de un soluto es proporcional a su gradiente de concentración a la superficie del electrodo.

Llamando x a la abscisa a partir del electrodo, la ley de Fick se define por:

$$j = D \frac{dC}{dx} \quad (6) \quad x=0$$

donde D es el coeficiente de difusión expresado en  $\text{cm}^2/\text{s}$

C = concentración en  $\text{mol}/\text{cm}^3$

o sea :

$$i = \pm n F A D \frac{dC}{dx} \quad x=0 = \pm n d ( C - C_{x=0} )$$

donde

$$d = \frac{F A D}{\delta}$$

y

$$\frac{dC}{dx} \quad x=0 = \frac{C - C_{x=0}}{\delta}$$

donde:

$\delta$  = espesor de la capa de difusión

d = constante de difusión

C = concentración de especies electroactivas en la disolución (  $\text{mol} / \text{cm}^3$  )

$C_{x=0}$  = concentración de especies electroactivas a la superficie del electrodo (  $\text{mol} / \text{cm}^3$  ).

Cuando se utiliza un electrodo esférico en expansión, en una

disolución sin agitación, el coeficiente de proporcionalidad se expresa por la ecuación de Ilkovic :

$$d = 708 m^{2/3} t^{1/6} D^{1/2} \quad (7)$$

donde

$m$  = flujo de mercurio en  $mg / s$

$t$  = tiempo de goteo

por lo tanto

$$i = \pm 708 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} (C - C_{x=0}) \quad (8)$$

$$C_{x=0} = C_s \pm i / nd$$

el signo + corresponde al caso de una sustancia consumida durante la reacción de reducción ( $i < 0$ ) o producida durante una reacción de oxidación ( $i > 0$ ), el signo - corresponde al caso de una sustancia consumida durante una reacción de oxidación o producida durante una reacción de reducción.

$$\text{Cuando } C_{x=0} \rightarrow 0 \quad i = i_d$$

y se tiene:

$$i_d = \pm 708 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (9)$$

si se emplean corrientes medias en lugar de corrientes máximas el coeficiente numérico 708 se reemplaza por 607. Estas ecuaciones indican una dependencia lineal de  $i_d$  con la concentración y desde el punto de vista analítico éste es uno de los resultados más importantes.

Las ecuaciones también indican una dependencia lineal de  $i_d$  sobre  $n$ ,  $D$  y las características del capilar  $m$  y  $t$ .

La dependencia lineal entre la corriente y la concentración y entre la intensidad de corriente y la raíz cuadrada de la altura de la columna de Hg ( $h$ ) son criterios que comunmente se utilizan en trabajos analíticos para determinar si la corriente está determinada por difusión ya

que :

$$t \propto l/h \quad y \quad m \propto h$$

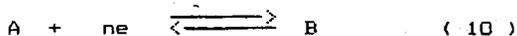
$$i_d \propto m^{2/3} \quad y \quad t^{1/6} \propto h^{1/2}$$

En consecuencia, si la corriente límite está controlada por difusión, una gráfica de  $i_d$  vs  $h^{1/2}$  debe ser lineal pasando por el origen.

#### D) Ecuaciones de las curvas intensidad-potencial.

Para un proceso de electrodo reversible la forma de la curva  $i$ - $E$  a cualquier potencial se puede derivar por combinación de las ecuaciones de Nernst e Ilkovic.

Si solo A se reduce electroquímicamente a B de manera reversible :



entonces

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{A_{x=0}}{B_{x=0}} \quad (11)$$

ya que

$$A_{x=0} = A_s + \frac{i}{n d_A} = \frac{i - i_{dA}}{n d_A}$$

$$y \quad B_{x=0} = - \frac{i}{n d_B} \quad (B_s = 0)$$

sustituyendo en (11) y reorganizando :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_{dA} - i}{i} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{d_B}{d_A} \quad (12)$$

como generalmente  $d_B = d_A$  la ecuación 12 puede escribirse de la siguiente manera:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (13)$$

cuando  $i = i_d / 2$   $E = E_{1/2}$   
 de tal manera que  $E_{1/2} = E_0$

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (14)$$

que es la ecuación para una onda de reducción.

A partir de la ecuación 14 se observa que una gráfica de

$$E = f \left( \log \frac{i_d - i}{i} \right)$$

debe ser una línea recta con pendiente  $2.3 RT / nF$

Cuando  $i = i_d / 2$ ,  $\log i_d - i / i = 0$  y  $E = E_{1/2}$   
 por lo que una gráfica de ese tipo se usa frecuentemente  
 para evaluar la reversibilidad de un proceso o para calcular  
 $E_{1/2}$  o  $n$ .

Ecuación para una onda de oxidación o sea un reductor solo:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i}{i_{dr} - i} \quad (15)$$

Ecuación para la mezcla de un oxidante y un reductor  
 conjugados:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i - i_{ox}}{i_{dr} - i} \quad (16)$$

### E) Cinética de las reacciones al electrodo. (29)

La velocidad de reacción es una función determinada por el potencial. Para una determinada reacción al electrodo, la corriente no fluye en determinados potenciales y en otros solamente en determinado grado.

Experimentalmente se ha demostrado que la mayoría de las velocidades de reacción en fase disolución varían con la temperatura en una forma constante. Casi siempre  $\ln K$  es lineal con  $1/T$ .

Arrhenius propuso la siguiente expresión:

$$k = A e^{-E_A / R T} \quad (17)$$

donde

$E_A$  = energía de activación.

$A$  = factor de frecuencia

Se han construído muchas teorías con el objeto de conocer los factores que controlan la velocidad de reacción. Una de estas teorías es la teoría del Complejo Activado. Esta teoría supone que las reacciones proceden a través de un complejo activado como se muestra en la figura (6)

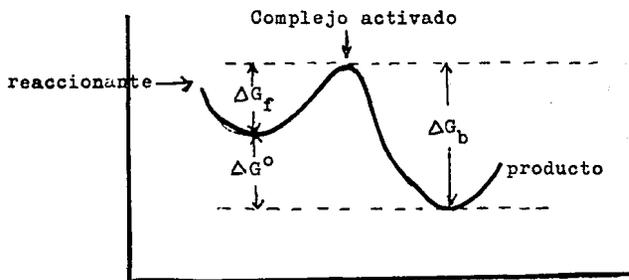


Figura 6

Cambios de la energía libre durante la reacción.

El cambio de la energía libre va de la energía de los reaccionantes a la energía libre del complejo y es  $\Delta G_f$  mientras que la energía del complejo es mayor que la del producto por  $\Delta G_b$ . La expresión matemática para calcular el

valor de  $k$  es:

$$k = K \frac{\alpha T}{h} e^{-\Delta G / RT} \quad (18)$$

en donde  $K$  es el coeficiente de transmisión y puede tener un valor de 0 a 1,  $\alpha$  y  $h$  son las constantes de Boltzman y Plank. Esta ecuación nos dice que en un sistema en equilibrio la constante de proporcionalidad está determinada por la temperatura y no depende de la concentración de reaccionantes o productos.

#### Reacciones al electrodo.-

En una reacción al electrodo, el equilibrio está caracterizado por la ecuación de Nernst:

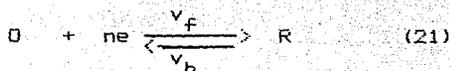
$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (19)$$

en donde  $C_O$  y  $C_R$  son las concentraciones en disolución y  $E_0$  el potencial normal.

La expresión que relaciona la velocidad de reacción al electrodo y la corriente es:

$$v = \frac{i}{nFA} \quad (20)$$

Supongamos la reacción:



se puede desplazar hacia la derecha o hacia la izquierda. La velocidad de izquierda a derecha  $v_f$  es proporcional a la concentración de  $O$  en la superficie. Si expresamos la concentración a una distancia  $x$  de la superficie y al tiempo  $t$  como  $C_O(x,t)$  entonces la concentración en la superficie es  $C_O(0,t)$ . La constante de proporcionalidad será  $k_f$

$$v_f = k_f C_O (o, t) = \frac{i}{n F A} \quad (22)$$

como la reacción hacia la derecha es una reducción habrá una corriente catódica  $i_c$  proporcional a  $v_f$ .

En la misma forma

$$v_b = k_b C_R (o, t) = \frac{i_a}{n F A} \quad (23)$$

en donde  $i_a$  es el componente anódico de la corriente total. Entonces la velocidad de reacción neta es :

$$v_{net.} = v_f - v_b = k_f C_O (o, t) - k_b C_R (o, t) = \frac{i}{n F A}$$

$$i = i_c - i_a = n F A (k_f C_O (o, t) - k_b C_R (o, t)) \quad (24)$$

La velocidad de reacción en sistemas heterogéneos se refiere a unidad de área interfacial y por lo tanto se mide en moles  $\text{seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . En una reacción redox heterogénea la cinética está fuertemente influenciada por la diferencia de potencial interfacial. En reacciones al electrodo, la diferencia de potencial puede ser controlada y podemos decir la forma en que  $k_f$  y  $k_b$  dependen de la diferencia de potencial según las siguientes expresiones:

$$k_f = k^0 e^{-\alpha n f (E - E_0)} \quad (25)$$

$$k_b = k^0 e^{+(1-\alpha) n f (E - E_0)} \quad (26)$$

$$f = \frac{E}{RT}$$

$k^0$  = constante estandar de proporcionalidad, es el valor de  $k_f$  y  $k_b$  cuando  $E = E_0$

$\alpha$  = coeficiente de transferencia

El valor  $k^0$  es simplemente un parámetro que nos indica la facilidad cinética del par redox.

Sustituyendo los valores de  $k_f$  y  $k_b$  tenemos la expresión completa corriente-potencial

$$i = n F A k_o C_o (o, t) e^{-\alpha n f (E - E_o)} - C_R(o, t) e^{(1-\alpha) n f (E - E_o)} \quad (27)$$

Aunque la corriente neta al equilibrio es 0, existe una corriente faradéica que se denomina corriente de intercambio electrónico  $i_o$  cuya magnitud es :

$$i_o = n F A k_o C_o e^{-\alpha n f (E_q - E_o)} \quad (28)$$

$i_o$  representa la corriente anódica o de reducción cuando la corriente global es igual a 0. Si  $i_o$  es muy grande significa que A se transforma en B muy rápido.

#### F.- Corriente límite controlada por adsorción (26)

El electrodo de Hg es capaz de adsorber de una disolución determinados componentes o los productos de su despolarización. La adsorción es causada por fuerzas en la superficie del electrodo. Generalmente sólo se forma una capa monomolecular. Las partículas de material disuelto pueden quedar adheridas al electrodo en su superficie por fuerzas físicas, químicas o eléctricas. Las fuerzas físicas que ocasionan adsorción son fuerzas capilares. Si el material disuelto tiene afinidad específica por la superficie del electrodo serán fuerzas químicas las que lo unan a la superficie. Si son iones adsorbidos en la superficie cargada están unidos por cargas electrostáticas. La adsorción está caracterizada como cualquier reacción por su calor de adsorción. La cantidad adsorbida a determinada temperatura depende de la concentración de la solución y disminuye cuando aumenta la temperatura.

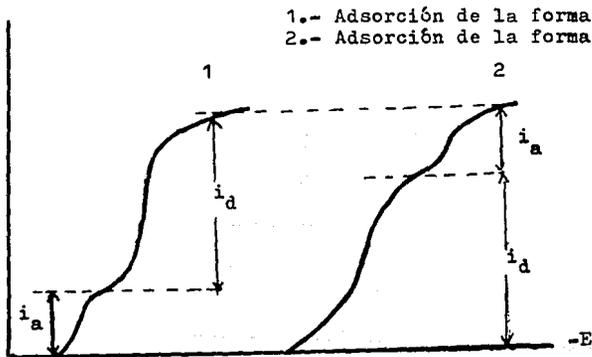
En el electrodo, la adsorción modifica no solamente la corriente capacitiva sino también la corriente faradéica. Hay dos tipos de influencia en la corriente polarográfica ocasionados por adsorción :

1) Una de las formas del sistema, la oxidada o la reducida, se adsorbe. En este caso se forma en la curva polarográfica un escalón de adsorción llamado onda de adsorción. La materia adsorbida puede ser el despolarizador o los productos de su transformación.

2) La materia adsorbida no es el despolarizador, pero puede influir (desplazar o deformar) en la onda del despolarizador.

La corriente polarográfica puede ser influenciada por la adsorción de material electroactivo en los siguientes casos:

a) Adsorción del despolarizador.- Consideremos el caso de una reducción reversible en el que la forma oxidada reaccionante se adsorbe en el electrodo y la forma reducida no es activa (para adsorberse) En este caso la reducción de la molécula adsorbida necesita una cantidad de energía mayor que la reducción de la molécula libre, por lo tanto la reducción de la molécula adsorbida tiene lugar a potenciales más negativos que la molécula libre. Figura ( 7 )



1.- Adsorción de la forma reducida.  
2.- Adsorción de la forma oxidada.

Adsorción en una reducción.

Figura 7

Si la corriente de difusión  $i_d < i_a$  se obtiene un escalón en un potencial más negativo al estandar  $E_0$  y representa la adsorción del despolarizador .

Si  $i_d > i_a$  se obtienen dos escalones , uno en el potencial estandar y uno a potencial más positivo.

La forma oxidada raras veces es adsorbida.

Si el escalón aparece a potenciales más positivos que el potencial estandar se debe a la adsorción de la forma reducida del despolarizador.

b ) Adsorción de los productos de la despolarización : si suponemos que en la solución existe la forma oxidada que no es adsorbible y solamente se puede adsorber el producto de su transformación química o sea la forma reducida.

Es facil comprender que la reducción de las partículas adsorbidas en el electrodo necesitan menos energía que la reducción de moléculas libres. Por este motivo aparece el escalón que corresponde a la adsorción de la forma reducida a potenciales más positivos que los potenciales de la reducción de la molécula libre.

La fórmula que nos da la corriente de adsorción es la siguiente : (25)

$$i_a = nFz \quad 0.85 \text{ m}^{2/3} \quad t_1^{-1/3} \quad (29)$$

donde  $z$  es el número máximo de moles que pueden ser adsorbidas en la superficie del electrodo

y  $0.85 \text{ m}^{2/3} t^{-1/3}$  es la superficie de la gota

Esta fórmula demuestra que la intensidad de la corriente de adsorción es independiente de la concentración.

De la ecuación (29) deducimos que :

$$i_a = k h$$

Si expresamos  $m_1$  y  $t_1$  en función de la altura del recipiente de mercurio  $h$  , la altura de la onda de

adsorción es proporcional a la altura del recipiente de mercurio.

Consideremos el proceso en el electrodo : (Figura B)

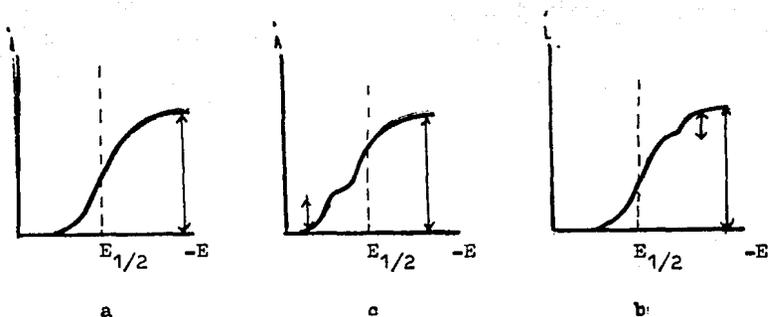
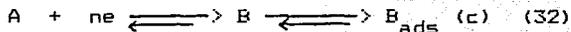
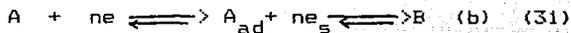


Figura B

En la ecuación (b) la adsorción de A disminuye la energía libre del sistema y la reducción de A (ads) es más difícil que en ausencia de adsorción. Consecuentemente, el valor de  $E_{1/2}$  de la onda controlada por adsorción de la especie electroactiva es más negativa que la onda normal. Por el contrario la adsorción del producto hace más fácil la reducción y el valor de  $E_{1/2}$  para (c) es más positivo que

para  $E_{1/2}$  de la onda normal.

Considerando la ecuación (c) a bajas concentraciones de A habría una sola onda, cuya corriente límite será controlada por difusión, proporcional a la concentración de A y a  $h^{1/2}$  y gobernada por la ecuación de Ilkovic.

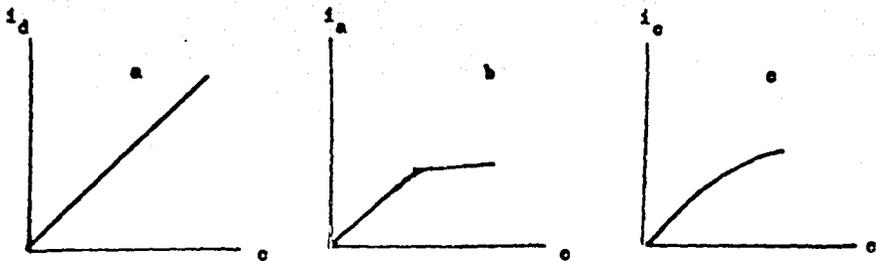
Cuando la concentración de A aumenta, se alcanzará un punto en el cual se formará suficiente B (ads) que cubra toda la superficie de la gota y el exceso de B se disuelva en la solución. Como es más difícil reducir A a B disuelto que A a B (ads), la reducción del exceso de A producirá una segunda onda a potencial más negativo. La onda original formada a baja concentración ya no está controlada por difusión sino por adsorción y su corriente límite será independiente de la concentración de A a la misma concentración a la que es observada la segunda onda normal.

La altura total de las dos ondas corresponde a la reducción total de A que alcanza al electrodo vía difusión y por lo tanto controlada por difusión y proporcional a A y  $h^{1/2}$ .

Ninguna de las dos ondas son controladas por difusión aisladamente.

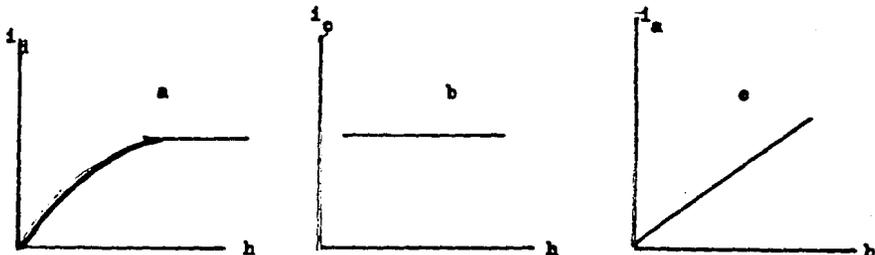
La dependencia de la corriente con la altura del mercurio y la independencia de la concentración son dos criterios importantes para identificar una corriente de adsorción.

En la figura 9 se ven las características de las diferentes clases de corriente límite con respecto a la concentración y a la altura del mercurio (25).



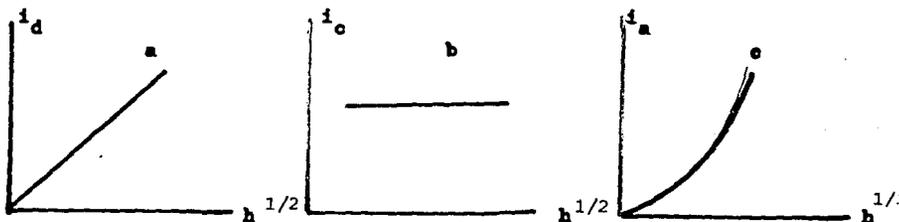
$i = f(\text{concentración})$

- a) Corriente límite controlada por difusión y cineticamente.
- b) Corriente límite controlada por adsorción.
- c) Corriente límite controlada catalíticamente.



$i = f(h)$

- a) corriente límite controlada por difusión.
- b) corriente límite controlada cineticamente.
- c) corriente límite controlada por adsorción.



$i = f(h^{1/2})$

- a) corriente límite controlada por difusión.
- b) corriente límite controlada cineticamente.
- c) corriente límite controlada por adsorción.

Figura 9

### 2.1.3.-Máximo polarográfico (26)

En las curvas polarográficas se pueden observar máximos de distintas formas en las que la corriente límite sube y después vuelve a descender.

En algunos casos la formación del máximo depende del mecanismo en la reacción al electrodo. En este caso se denomina máximo de primera clase.

Más frecuentemente se puede deber el máximo a un aumento en el transporte del despolarizador hacia el electrodo ocasionando una corriente en la solución. Estos máximos que son reproducibles se llaman máximos de corriente y se denominan máximos de segunda clase.

#### 2.1.3.1.-Máximo de primera clase.-

El máximo de primera clase se observa en la parte ascendente de la curva polarográfica, son puntiagudos y se originan por usar electrolitos diluidos. En disoluciones diluidas de electrolito, la gota de Hg antes de llegar al potencial de punto nulo es un poco mayor y eso origina el máximo. Se originan por corriente de difusión en disoluciones de electrolito más diluidas de 1 M cuando la relación de concentraciones del despolarizador y electrolito es de 1:1 a 1:100. Se pueden eliminar con materiales tensoactivos, por ejemplo: gelatina.

#### 2.1.3.2.-Máximo de segunda clase.-

El máximo de segunda clase se encuentra en disoluciones concentradas y se observa cuando la velocidad de flujo del Hg es alta. Se forman en la corriente límite, son redondos y no vuelven a descender hasta la corriente límite. Los máximos de segunda clase aparecen en corrientes de difusión tanto anódicas como catódicas cuando la

concentración del electrolito soporte es mayor de 0.1 M. Se distingue del máximo de primera clase en que la curva no desciende hasta la corriente límite como en el máximo de primera clase.

Para el máximo de segunda clase la velocidad de flujo del mercurio a partir del capilar es determinante. Se forman cuando la velocidad es mayor de 2 cm / seg. Si aumenta la velocidad de fluido del mercurio, aumenta la fuerza de la corriente del máximo linealmente. Disminuyendo la velocidad de fluido bajando el recipiente del Hg se puede eliminar un máximo de segunda clase. A una velocidad de fluido y de tiempo de goteo constante, la intensidad de la corriente del máximo de segunda clase es proporcional a la concentración del despolarizador.

#### 2.1.3.3.-Otras clases de máximos .-

En polarografía podemos encontrar diferentes formas de curvas que a primera vista las podríamos catalogar como máximo de primera o de segunda clase. Sin embargo haciendo una investigación más profunda encontramos que tienen otro origen. Frecuentemente son máximos catalíticos. Algunas veces se ve la formación de burbujas de  $H_2$ .

Estos máximos no pueden ser eliminados por la presencia de tensoactivos y la altura del bulbo de Hg no tiene ningún efecto en ellos.

La causa de este máximo se debe buscar en el mecanismo del proceso en el electrodo.

Corriente catalítica de hidrógeno.

La alta sobretensión que se observa en el electrodo de mercurio por la separación de hidrógeno, es disminuida por la presencia de ciertas sustancias que aceleran esta separación. La acción catalítica se manifiesta en un

desplazamiento del potencial de reducción de los iones  $H^+$  hacia potenciales más positivos, que por regla general ocasionan la formación de una onda catalítica de hidrógeno. La fuerza de la corriente límite catalítica de hidrógeno aumenta con la concentración del catalizador hasta cierto límite en forma no lineal y depende de la concentración de  $H^+$ . La corriente catalítica es mayor que la corriente de difusión del catalizador, pero no es mayor que la corriente de difusión del donador de protones. Cuando se originan corrientes catalíticas de  $H_2$  en muchos casos se puede observar con el microscopio la formación de burbujas de  $H_2$  en la cercanía del electrodo.

Las sustancias que disminuyen la sobretensión del  $H_2$  se pueden clasificar en dos grupos:

- a) Despolarizadores que después de su reacción forman centros activos en la superficie del electrodo.
- b) Ciertos materiales que tienen en su constitución grupos donadores de protones y son adsorbidos en el electrodo.

Al primer grupo pertenecen las sales de platino.

Las sales de platino en solución clorhídrica originan una onda catalítica en un potencial aproximadamente a 250 mv del potencial normal de reducción del  $H^+$ .

La altura de la onda aumenta con la concentración de la sal y en presencia de una cantidad fija de sal la corriente aumenta con la concentración del ácido hasta un límite.

El efecto catalítico actúa sobre el metal solo, que es reducido a potenciales más positivos que el mercurio del electrodo.

Al segundo grupo de catalizadores pertenecen diferentes sustancias orgánicas que en pequeña concentración desvían el potencial de reducción de los iones  $H^+$  a potenciales más

positivos y se origina una onda catalítica de  $H_2$ .

El efecto catalítico de esta clase se origina por la presencia de proteínas, algunos alcaloides así como piridina y sus derivados y quinina.

#### 2.1.3.4.-Propiedades de la corriente catalítica.-

La corriente límite de la reducción catalítica de  $H^+$  por regla general es independiente del potencial, pero en la mayoría de los casos forma máximos. La corriente puede ser independiente de la altura del bulbo del mercurio o aumentar si se baja la columna de mercurio. Si se aumenta la concentración del catalizador, la altura de la onda catalítica llega a un límite.

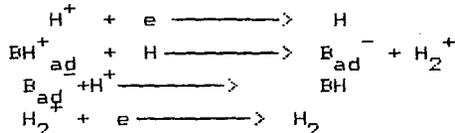
Los grupos catalíticos activos son los grupos que tienen N que puede fijar un protón en el par de electrones y formar  $NH^+$ .

El mecanismo de la reducción catalítica de  $H^+$  ha sido explicado por varias teorías emitidas por diferentes autores. Una de estas teorías es la teoría de Heyrovsky.

Heyrovsky supone que los catalizadores son sustancias adsorbibles del tipo  $BH$ , con un  $H^+$  lábil, que facilita la reacción de molarización



Según esta teoría las reacciones que se llevan a cabo son :



El átomo de H separado reacciona más fácilmente con el H lábil del catalizador que con los iones hidronio, y esta reacción disminuye la sobretensión necesaria para la reacción.

El anión B adsorbido reacciona rápidamente con el ión hidronio o con otro donador de  $H^+$  de la solución reguladora y regenera el catalizador. El catalizador sirve únicamente como portador de protones y no reacciona directamente con los electrones. En disoluciones no amortiguadas el catalizador puede ser regenerado por reacción con el agua.

En las ondas catalíticas irreversibles la corriente si depende del potencial y muestra un máximo. Majranowsky explica la formación de este máximo con el mismo esquema de reacciones. La reacción química tiene lugar en la superficie del electrodo, que tiene adsorbido al catalizador. La corriente se puede deber por una parte a la reacción en las cercanías del electrodo y por otra parte a la reacción en la superficie del electrodo. La parte de la corriente que es determinada por la reacción en la superficie aumenta al aumentar la adsorción de la parte no activa del catalizador. La adsorción total del catalizador depende de la adsorción de su forma básica y su forma ácida que se encuentran en equilibrio. La actividad de la forma básica es en soluciones neutras y ácidas mayor que la de la forma ácida.

En la superficie cargada negativamente la adsorción de la forma ácida del catalizador (catión) cambia muy poco con el potencial, en comparación con la forma básica. Por este motivo el cambio de potencial de adsorción del catalizador estará determinado por el cambio de adsorción de la forma básica.

La cantidad adsorbida también depende de la relación de las dos formas, es decir del pH de la solución.

En el caso de adsorción de un catalizador el máximo se puede representar por:

$$E = E_{1/2} - \frac{RT}{\alpha F} \ln \frac{i^0}{i_1^0 - i^0}$$

esta ecuación expresa la dependencia de la corriente del

potencial, que se puede medir, cuando no sucede liberación de catalizador.

El cambio de corriente que depende del potencial por la disminución de catalizador adsorbido se representa por la siguiente expresión:

$$\frac{i}{i_0} = e^{-\alpha E'}^2$$

en la que

$$\alpha = C v - C_{sat} / 2KT T_m$$

$C v$  = capacidad específica de la doble capa sin tensoactivos.

$C_{sat}$  = su valor estando totalmente recubierta

$T_m$  = cantidad máxima adsorbida

$E'$  = potencial de máxima adsorción

#### 2.1.4.-Procesos de electrodo y su naturaleza. (25)

Un polarograma es el resultado de un proceso de electrodo que ocurre cuando un potencial se aplica a una celda. La curva resultante ( por ejemplo  $i-E$  ) generalmente, es susceptible de describirse desde un punto de vista cinético. La aplicación de un potencial necesariamente perturba al sistema en estudio porque el sistema cambia en respuesta a una variación de energía libre del estado A al estado B via una oxidación o una reducción.

Si las constantes de velocidad asociadas con el proceso electrodo son suficientemente elevadas, o bien, la perturbación se aplica de manera muy lenta, el sistema puede mantener su estado de equilibrio dentro de los límites del error experimental del método de medida utilizado para estudiar al sistema.

Un proceso es termodinámicamente reversible cuando un cambio infinitesimal en la dirección de la fuerza motriz da lugar a que la dirección del proceso se invierta. Todos los procesos y reacciones a un electrodo ocurren a una velocidad finita, por lo tanto, no proceden con una "rigurosa" reversibilidad termodinámica

Por tanto cuando un proceso de electrodo que obedece la ley de Nernst se define como reversible, en realidad se está

haciendo uso de una definición práctica de reversibilidad. De hecho, las descripciones más útiles de un proceso de electrodo son aquellas formuladas en términos de ecuaciones cinéticas. Es por ello que algunos autores prefieren definir a los sistemas electroquímicos usando parámetros cinéticos como sistemas rápidos o lentos.

A) Reversibilidad electroquímica y química.

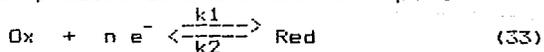
De la manera más general, un proceso electroódico consiste de:

- a) una etapa de transferencia de carga ( cinética heterogénea )
- b) las reacciones químicas acopladas a esa etapa de transferencia de carga ( cinética homogénea ) y
- c) difusión

Adicionalmente, es frecuente la consideración de reacciones de superficie tal como la adsorción. Por tanto la discusión de reversibilidad debe hacerse tanto en términos de la(s) etapa(s) de transferencia de carga como de la(s) etapa(s) química(s).

Reversibilidad electroquímica.

Considerese un proceso de electrodo tal que :



en el cual solo ocurre un proceso de transferencia de carga  
Por definición , este proceso de electrodo es

electroquímicamente reversible si el trayecto que conecta a los dos estados es termodinámicamente reversible y la velocidad de transferencia del electrón en ambas direcciones es suficientemente rápida para que en todos los puntos a lo largo del trayecto, el sistema esté en equilibrio, es decir,  $k_1 = k_2$ , donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes de velocidad heterogéneas ( $\text{cm seg}^{-1}$ ) que describen las velocidades de las reacciones directa e inversa, respectivamente. Si  $k_1 \neq k_2$  la cinética del proceso de transferencia al electrodo da lugar a que los caminos de reducción y oxidación no sean equivalentes, y que deban ser definidos mediante consideraciones cinéticas. La velocidad de un proceso de electrodo puede ser descrita mediante la ecuación cinética propuesta por Butler (31) y en términos de modelos basados en curvas de energía de potencial, teoría del estado de transición o teoría de la velocidad absoluta. (ver 2.1.1, página 55)

### Reversibilidad química

El concepto de reversibilidad química surge cuando una reacción química homogénea antecede o se presenta después de la etapa de transferencia de carga, (por ejemplo, cuando el producto de la etapa de transferencia electrónica reacciona con el disolvente o cuando se forma

una especie electroactiva a partir de una no electroactiva).

#### B.-Clasificación de las reacciones.

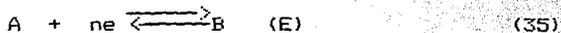
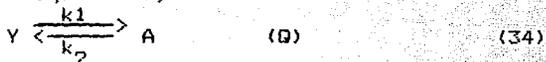
Para el caso de sistemas totalmente reversibles, aquellos en los cuales todos los equilibrios (transferencia de electrón y químicos) se establecen instantáneamente, los valores de  $E_{1/2}$  (ver 2.1.1, página 142) son prácticamente iguales a los potenciales normales de oxidación-reducción globales determinados potenciométricamente. En consecuencia los potenciales de media onda, en polarografía de c.d. y en algunas otras técnicas polarográficas modernas, son función de las constantes de equilibrio de las posibles reacciones químicas asociadas y los  $E_0$  de la etapa de transferencia de carga. Sin embargo, cuando la etapa de transferencia de carga, la reacción química o ambas se consideran como no reversibles, el dominio en el tiempo de cada técnica polarográfica se vuelve importante.

La posibilidad de que se presenten diversos patrones de reacciones posibles conduce a una clasificación de éstas. A una etapa de transferencia de electrones se le representa por  $E$ , y a una etapa química por  $Q$ . Las especies simbolizadas por  $A$  o  $B$  se asumen electroactivas y las simbolizadas por  $Y$  o  $Z$  como no electroactivas. Los procesos se asumen como de reducción aunque los mismos razonamientos

se aplican al caso de oxidaciones.

### Reacción OE

Significa que una reacción química precede a una reacción electroquímica, o sea:



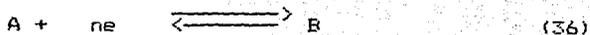
la especie electroactiva A se genera por una reacción química.

En la superficie del electrodo, solo se reduce A. Esto perturba el equilibrio en la superficie del electrodo y se forma más de A. La cantidad de A reducida y, por tanto, la corriente que fluye por la celda son funciones de la constante de velocidad química  $k_1$ . En polarografía de "cd" se dice que la magnitud de la corriente límite de difusión está controlada cinéticamente.

Debido al bajo valor de las corrientes cinéticas en relación a las corrientes límites debidas a la difusión, la sensibilidad de este tipo de proceso electroquímico es baja. De ahí, su limitada utilidad analítica. Además, debido a que la corriente cinética está controlada por la velocidad de un paso químico, es extremadamente sensible a los cambios en las condiciones del medio.

## Reacción EQ

Es del tipo :



Es un tipo de mecanismo muy común en electroquímica en el cual la especie producto de la reacción electroquímica reacciona para producir una especie no electroactiva. Las reacciones químicas más frecuentes son de protonación, dimerización o de solvólisis.

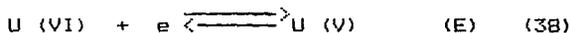
En polarografía de c.d., la presencia de reacciones químicas posteriores a la reacción electroquímica no tiene ningún efecto en la corriente límite; ésta sigue siendo de difusión con el valor esperado para la etapa de  $A + ne \xrightleftharpoons{\hspace{1cm}} R$

Sin embargo, la posición de la onda es función de la constante de velocidad  $k_1$ . Es por ello que en ésta y otras técnicas analíticas (tales como polarografía de c.a. y voltamperometría de barrido lineal) es importante controlar el factor tiempo del experimento. Así por ejemplo, si se trabaja con tiempos de caída de gotas cortos, la reacción química subsecuente a la reacción electroquímica puede llegar a eliminarse parcial o completamente; si se trabaja con tiempos de caída de gotas largos se puede dar tiempo a que el equilibrio se establezca observándose una

reversibilidad química completa.

Dentro de la clasificación de reacciones de tipo EQ se incluyen también los llamados mecanismos regenerativos tales como de dismutación, catalíticos, etc. En este tipo de procesos electroquímicos la especie de partida se regenera mediante una reacción química posterior a la etapa de transferencia de carga inicial (c'). Por tanto, la especie electroactiva se reduce más de una vez y la corriente límite es mayor que el valor de la corriente debida únicamente a la difusión. El incremento en el valor de la corriente límite es función de la constante de velocidad de la etapa c'.

Ejemplo de mecanismo de dismutación



En este caso, dependiendo del valor de k se puede observar:

- a) una onda de altura correspondiente a la transferencia de un electrón (si la etapa c' es muy lenta)
- b) una onda de altura correspondiente a la transferencia de 2 electrones (si la etapa c' es muy rápida) o
- c) una onda de altura intermedia respecto a las anteriores.

Ejemplo de mecanismo catalítico:



En este caso el producto B de la reacción electroquímica reacciona con una sustancia Z no electroactiva para regenerar A. Si la etapa C' es rápida se pueden observar incrementos importantes de la corriente límite aún para valores de concentración de A muy bajos.

Otros tipos de patrones.

Muchos otros patrones de reacciones son posibles. Además se pueden presentar variaciones en los patrones arriba descritos dependiendo de la reversibilidad e irreversibilidad de las reacciones de transferencia de electrones y química(s). Así por ejemplo, para el caso EQ se pueden presentar cuatro subcasos que implican reacciones reversibles (R) o irreversibles (I): RR, RI, IR, e II.

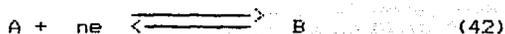
(C) Adsorción, formación de película y otros fenómenos de superficie.

Dado que el proceso electroquímico ocurre en la interfase electrodo solución, para una descripción completa de dicho proceso, es necesario también considerar la presencia de fenómenos de superficie tales como adsorción o formación de películas (principalmente de productos insolubles). Los fenómenos de adsorción o formación de películas pueden influir sobre la corriente faradéica de diversas formas:

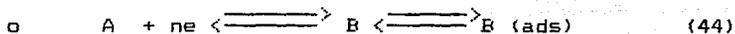
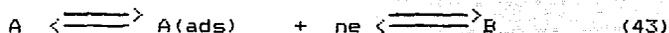
(a) Si la especie electroactiva o el producto de la reacción electroquímica se adsorbe, se observa una onda separada. Además, se pueden observar otras irregularidades en la zona de la corriente límite tales como máximos o mínimos.

(b) Si algún otro componente de la disolución se adsorbe es posible observar un desplazamiento, deformación o rompimiento de la onda.

Considerando el proceso electroquímico



se pueden presentar dos situaciones:



Cuando es la forma oxidada (reducción reversible) la que se adsorbe, se obtiene la siguiente ecuación basada en la isoterma de Langmuir en el momento en el cual la gota se encuentra totalmente recubierta. (32)

$$i_a = nFz \frac{2}{3} 0.85 m^{2/3} t^{-1/3} \quad (45)$$

de donde

$$i_a = \text{cte} \times h \quad (46)$$

Por tanto, dos criterios importantes para establecer si una corriente es de adsorción, son la dependencia sencilla de la altura de la columna de mercurio y la independencia con respecto a la concentración.

La figura 9 resume las características de los diferentes tipos de corriente límite con respecto a la dependencia con la altura de la columna de mercurio y la concentración.

### 2.1.5.-Características analíticas del método.-

#### A) Selectividad :

Para poder determinar la concentración de una sustancia en una mezcla, es necesario que su meseta de difusión esté bien definida. Se puede estimar que los  $E_{1/2}$  de las demás sustancias electroactivas presentes deben diferir por lo menos  $250/n$  mV de el  $E_{1/2}$  de la sustancia que se desea determinar (cuando el valor de las concentraciones es del mismo orden de magnitud). Cuando esta condición no se verifica es posible recurrir a medios químicos ( acción del pH, formación de complejos ) para aumentar la selectividad.

#### B.- Sensibilidad.

La sensibilidad del método no está limitada por el aparato de medida. Se dispone de miliamperímetros que permiten medir con buena precisión corrientes débiles. La limitación de la sensibilidad se debe por tanto a :

- a) Variación periódica de la corriente debida al crecimiento y a la caída de las gotas. Un circuito de amortiguación puede disminuir este efecto.
- b) La existencia de corriente residual que se debe a :
  - a ) Fenómenos electroquímicos.

-Presencia de impurezas electroactivas que puedan eliminarse por burbujeo de gas inerte y por purificación de electrolitos, etc.

-Presencia de impurezas no electroactivas con aparición de máximos ( las curvas de intensidad-potencial obtenidas con electrodos de gotas de mercurio presentan frecuentemente notables anomalías designadas con el nombre de "máximos polarográficos"; que generalmente se suprimen por adición de cantidades pequeñas de sustancias que sean adsorbidas en la superficie del electrodo). Su adsorción sobre el electrodo influye sobre todo en la reproducibilidad.

### β) Fenómenos físicos.

Dos tipos de procesos diferentes ocurren en los electrodos, uno incluye aquellos procesos en los cuales existe una transferencia de electrones a través de la interfase electrodo-solución, es decir, ocurre una oxidación o una reducción, y dado que obedecen la ley de Faraday se denominan procesos faradáicos (fenómenos electroquímicos). La magnitud de la corriente faradáica depende entre otros factores de: el mecanismo al electrodo o proceso de transferencia de masa, la técnica empleada, si la velocidad de electrólisis está controlada por difusión, la transferencia de electrones, la cinética química, fenómenos de adsorción, etc. Otro tipo son los procesos donde no hay transferencia de electrones (procesos no faradáicos) y por lo tanto no dependen de la presencia de sustancias electroactivas en solución. En consecuencia la corriente total que fluye por la celda puede considerarse como la suma de estas dos contribuciones y puede ser expresada por:

$$i_T = i_F + i_{no F} \quad (47)$$

La componente no faradáica generalmente más importante es la debida a la corriente de carga que se origina como consecuencia de la carga y descarga del condensador que se forma en la superficie de la gota (corriente capacitiva).

La corriente capacitiva depende principalmente de la naturaleza del electrodo, de la composición de la disolución y del potencial del electrodo.

Para un electrodo de área A, que crece con el tiempo t, la carga q requerida para llevar la doble capa a un potencial E está dada por (48) :

$$q = C_F^2(E) A (E - E_m) \quad (48)$$

donde  $C_F^2(E)$  es la capacidad de la doble capa por unidad de área y  $E_m$  es el potencial de carga nula ( $q=0$ ).

Durante la vida de la gota de mercurio la variación del potencial en polarografía clásica es tan pequeña que se puede considerar constante. Dado que  $i = dq/dt$ , el valor de la corriente de carga al tiempo t es :

$$i_C = C_F^2(E) \frac{dA}{dt} (E - E_m) \quad (49)$$

La corriente capacitiva es importante al inicio de la formación de una nueva gota, es débil y varía poco al final de la vida de la gota. Puede ser creciente o decreciente según el valor de E respecto a  $E_m$ . La variación de la corriente capacitiva en función del tiempo se expresa por la ecuación (50)

$$i_C = 2/3 (0.85) (E - E_m) C_m^{2/3} t^{-1/3} \quad (50)$$

si E se expresa en volts, C' en  $F\text{ cm}^{-2}$ , m en  $g\text{ s}^{-1}$ , t en s,  $i_C$  se obtiene en ampers.

Conclusiones :

1) Para concentraciones pequeñas de especies electroactivas la corriente capacitiva es responsable de la limitación de la cantidad mínima detectable ya que puede llegar a ser mayor que la corriente faradaica y enmascarar completamente el parámetro  $i_F$ . Por consiguiente las nuevas técnicas polarográficas han surgido para eliminar o reducir al mínimo posible la corriente capacitiva.

2) La polarografía clásica se utiliza en una gama de concentraciones de  $5 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-2}$  M con desviaciones tipo de 2 a 3 %.

### 2.2.-Polarografía normal de impulsos.

Durante los últimos 30 años han surgido otras técnicas polarográficas que presentan ventajas teórico-prácticas respecto a la polarografía clásica. Entre estas ventajas podemos mencionar las siguientes :

- a) Determinaciones analíticas más rápidas y exactas.
- b) Mayor sensibilidad , las técnicas polarográficas modernas permiten tener una respuesta lineal entre la concentración y corriente de  $10^{-8}$  a  $10^{-2}$  M.
- c) Permiten obtener una mayor información acerca de los procesos de electrodo y su naturaleza.

Como la técnica empleada en esta investigación es la polarografía diferencial de impulsos se hará una reseña de los principios teóricos que rigen esta técnica.

En polarografía de corriente directa se aplica un barrido de potencial variable continuamente a la celda y se mide la corriente resultante. En polarografía normal de impulsos al mismo tiempo que se mantiene un potencial inicial durante el crecimiento de la gota de mercurio, se superpone, en forma periódica un potencial, en intervalos cortos de tiempo (impulso). A cada gota que cae (bajo el efecto de un martillo) se le aplica un impulso ligeramente más alto y cuya magnitud está gobernada por la velocidad de barrido. El impulso se aplica al final de la vida de la gota donde se asume que la corriente capacitiva decae prácticamente a 0. Por consiguiente el polarograma es una gráfica de la corriente faradéica producida por el impulso contra el potencial

aplicado. Figura 10

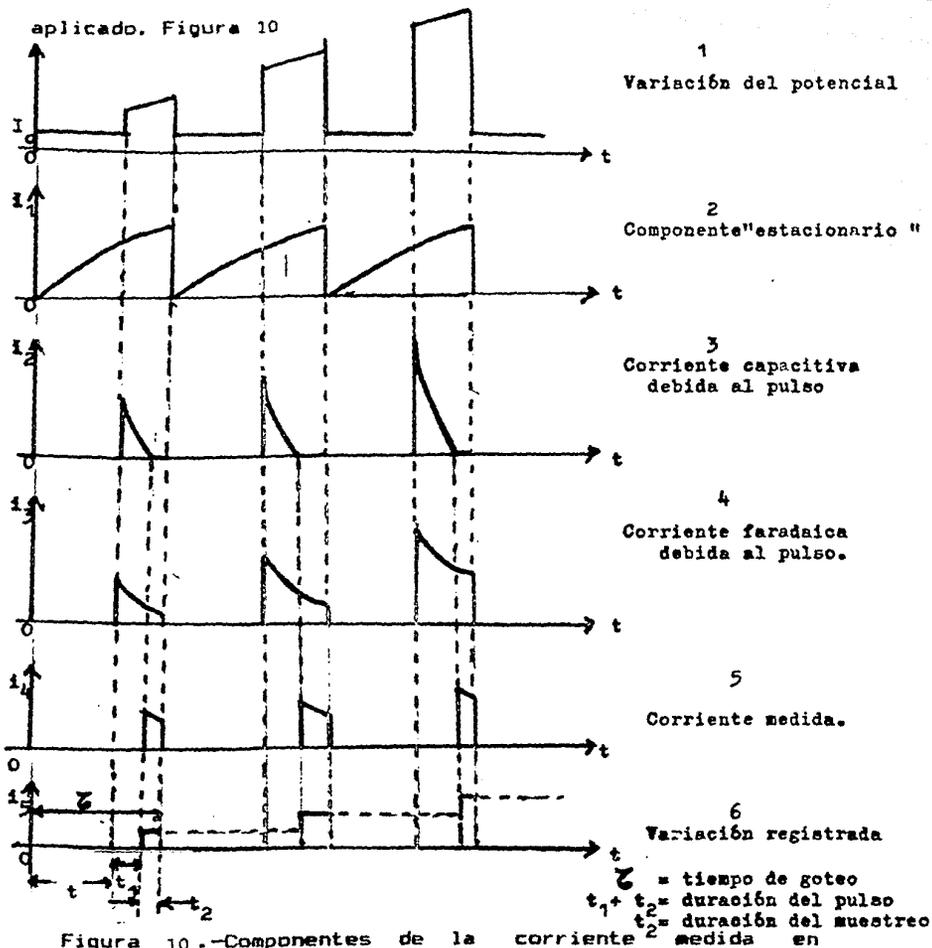


Figura 10.-Componentes de la corriente en polarografía normal de pulsos.

Los impulsos de potencial se llevan de un potencial inicial  $E_i$ , donde no fluye corriente faradéica, a un potencial de impulso  $E_p$ . El potencial entre impulsos regresa siempre a su valor inicial. Como el área del electrodo cambia continuamente los impulsos se aplican siempre a un tiempo fijo en la vida de la gota, manteniéndose un área de electrodo constante.

El potencial inicial es un parámetro experimental el cual usualmente se selecciona en la base de la onda polarográfica. Al principio  $E_i$  y  $E_p$  tienen el mismo valor, posteriormente  $E_p$  crece y eventualmente alcanza un valor en el cual la reacción faradéica de interés ocurre. Una vez que el potencial de reacción se alcanza la corriente se incrementa con el potencial hasta que la reacción de electrodo llega a estar limitada por la difusión de la especie electroactiva. Debido a que el impulso del potencial se aplica durante un período corto la capa de difusión no se extiende en la disolución y, por tanto, la polarografía de impulsos produce corrientes más grandes que la polarografía clásica para concentraciones analíticas equivalentes.

Para entender como la polarografía de impulsos se utiliza para minimizar la medida de la corriente capacitiva consideremos un electrodo que se mantiene a un potencial en el cual no ocurre reacción faradéica. En este caso, la única corriente que circula en un electrodo de gota de mercurio se debe al incremento de la capacitancia de la doble capa conforme la gota de mercurio crece. Al final de la vida de la gota, cuando la velocidad de crecimiento es mínima, esta corriente residual es pequeña.

Si se aplica un impulso al electrodo, de tal manera que el potencial se incrementa repentinamente a un nuevo valor en el cual no ocurre aún reacción faradéica, la corriente fluye

para cargar la doble capa al nuevo potencial. Asumiendo el modelo de un capacitor ideal, la corriente de carga debida a la aplicación del impulso tiene un valor máximo inmediatamente después de la aplicación del impulso y decae exponencialmente con el tiempo.

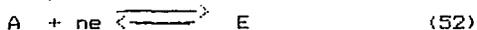
$$i_c = \frac{E}{R} e^{-t / RC} \quad (51)$$

R = resistencia de la disolución.

C = capacidad de la doble capa

Si el potencial del impulso se sitúa sobre un punto correspondiente a la parte que aumenta de la onda polarográfica, la magnitud de la corriente faradaica depende de la cinética de transferencia u otros pasos determinantes de la velocidad del proceso del electrodo. Inicialmente hay un gran salto de corriente y posteriormente la corriente decae en función del tiempo de manera similar a un experimento de electrólisis a potencial controlado. Debido a que la corriente faradaica de impulso decae a más baja velocidad que la corriente de cargado, las medidas de corriente cerca del fin de la duración del impulso proveen una muy substancial discriminación de la corriente de cargado. En polarografía normal de impulsos las relaciones intensidad potencial son relativamente simples y similares al caso de la polarografía clásica.

Si se escoge un potencial inicial antes del crecimiento de la onda polarográfica, esto es donde la corriente faradaica puede considerarse prácticamente nula, la curva intensidad-potencial para el proceso de reducción reversible



está dada por la expresión 53

$$i = -nFCA \frac{D}{\pi t_m} \frac{1}{1 + P} \quad (53)$$

donde  $P = \exp ( nF/RT ) ( E - E_{1/2} )$  y

$t_m$  = el intervalo de tiempo entre la aplicación y la corriente medida o tiempo de muestreo .

Como el potencial del impulso llega a ser más negativo que  $E_{1/2}$  ,P se aproxima a cero ; así que la corriente límite  $i_1$  está dada por la ecuación de Cottrell :

$$i_1 = - n FCA \frac{D}{\pi t_m} \quad (54)$$

La ecuación de la curva  $i-E$  para el caso reversible se puede representar de forma análoga a la ecuación Heyrovsky-Ilkovic para polarografía clásica :

$$E = E_{1/2} + 2.303 \frac{RT}{nF} \log \frac{i_d - i}{i} \quad (55)$$

La ecuación de Ilkovic como la relación de Cottrell se aplica tanto a procesos reversibles e irreversibles. Si se divide la ecuación de Cottrell por la ecuación de Ilkovic se obtiene :

$$\frac{i_1 \text{ (polarografía de impulsos)}}{i_d \text{ (polarografía clásica)}} = \frac{t^{1/6}}{7/3 t_m^{1/2}} \quad (56)$$

donde  $t$  es el tiempo de gota que transcurre para obtener la corriente controlada por difusión en polarografía clásica y  $t_m$  es la duración del impulso como se definió anteriormente. Si se sustituyen valores usuales para  $t$  y  $t_m$  , la relación  $i_1$  (polarografía de impulsos) /  $i_d$  (polarografía clásica) está en el intervalo de 6 a 7. Esta relación indica el incremento de sensibilidad que se puede obtener con la polarografía normal de impulsos, sobre la polarografía clásica.

Las gráficas de  $E$  contra  $\log \frac{i_d - i}{i}$  deben ser rectas con pendientes  $2.303 RT/nF$ .

## Conclusiones

1) Comparando con la polarografía clásica la más notable diferencia es que la corriente faradéica que resulta de la aplicación del impulso decrece con el tiempo, mientras que en polarografía clásica se incrementa. Este decremento es el resultado de la aplicación del impulso de potencial al final de la vida de la gota, donde la velocidad de cambio en el área del electrodo es pequeña. Las propiedades de difusión de este electrodo son como las de un electrodo estacionario: la corriente decrece con  $t^{1/2}$  en lugar de incrementarse con  $t^{1/6}$  como sucede en polarografía clásica. Sin embargo la corriente capacitiva ( $i_c$ ) decae rápidamente.

Tomando la medida de la corriente hacia el final de la aplicación del impulso se alcanza una minimización del efecto de la corriente capacitiva y se mide de esta manera únicamente la corriente faradéica que es la de interés.

2) El límite de detección se encuentra alrededor de  $10^{-7} M$ , ya sea la reacción reversible o irreversible. Para la cuantificación de sustancias orgánicas da excelentes resultados.

### 2.3. Polarografía diferencial de impulsos.

En polarografía diferencial de impulsos se superponen impulsos de potencial  $\Delta E$  de valor constante durante 30 a 80 ms al barrido lento de potencial, variación del tipo que se utiliza en polarografía clásica. La componente "estacionaria" de la corriente total se filtra y se elimina y se registra únicamente la variación de la intensidad  $\Delta i$  entre dos puntos consecutivos. La corriente que fluye ( $i$ ) se mide a un tiempo  $t$  de la vida de cada gota y a un tiempo  $t_m$  después de la aplicación del impulso. La diferencia entre estas dos corrientes  $i_2 - i_1$  es el parámetro que se grafica. La

magnitud de la señal obtenida depende, de manera importante, de la amplitud del impulso, así como del sistema completo. En polarografía diferencial de impulsos se obtiene una curva con forma de pico cuando la perturbación (amplitud del impulso) es suficientemente pequeña y el máximo de pico se encuentra cerca de  $E_{1/2}$ .

Si la relación  $i$ - $E$  de polarografía reversible:

$$E = E_{1/2} + \frac{2.303 RT}{nF} \log \frac{i_1 - i}{i} \quad (57)$$

se diferencia y se sustituye la ecuación de Cottrell para la corriente límite controlada por difusión se obtiene la siguiente expresión:

$$\Delta i = \frac{n^2 F^2}{RT} AC (-\Delta E) \frac{D}{\pi t_m} \frac{P}{(1+P)^2} \quad (58)$$

donde  $P = \exp(nF/RT)(E - E_{1/2} + \Delta E/2)$

$\Delta i$  es la corriente diferencial de impulso y

$\Delta E$  es la amplitud del impulso.

Esta ecuación es válida únicamente para casos de amplitud pequeña porque un método diferencial se aproxima mediante la derivada.

Una solución válida para todos los valores de  $\Delta E$ , es:

$$\Delta i = -nFCA \frac{D}{\pi t_m} \cdot \frac{P_A \sigma^2 - P_A}{\sigma + P_A \sigma^2 + P_A + P_A^2 \sigma} \quad (59)$$

donde:

$$P_A = \exp \frac{nF}{RT} \left( \frac{E_1 + E_2}{2} - E_{1/2} \right)$$

$$\sigma = \exp \frac{nF}{RT} \left( \frac{E_2 - E_1}{2} \right)$$

$E_2 - E_1 = \Delta E$ , la amplitud del impulso

$E_2$  = el potencial en el cual la corriente  $i_2$  se

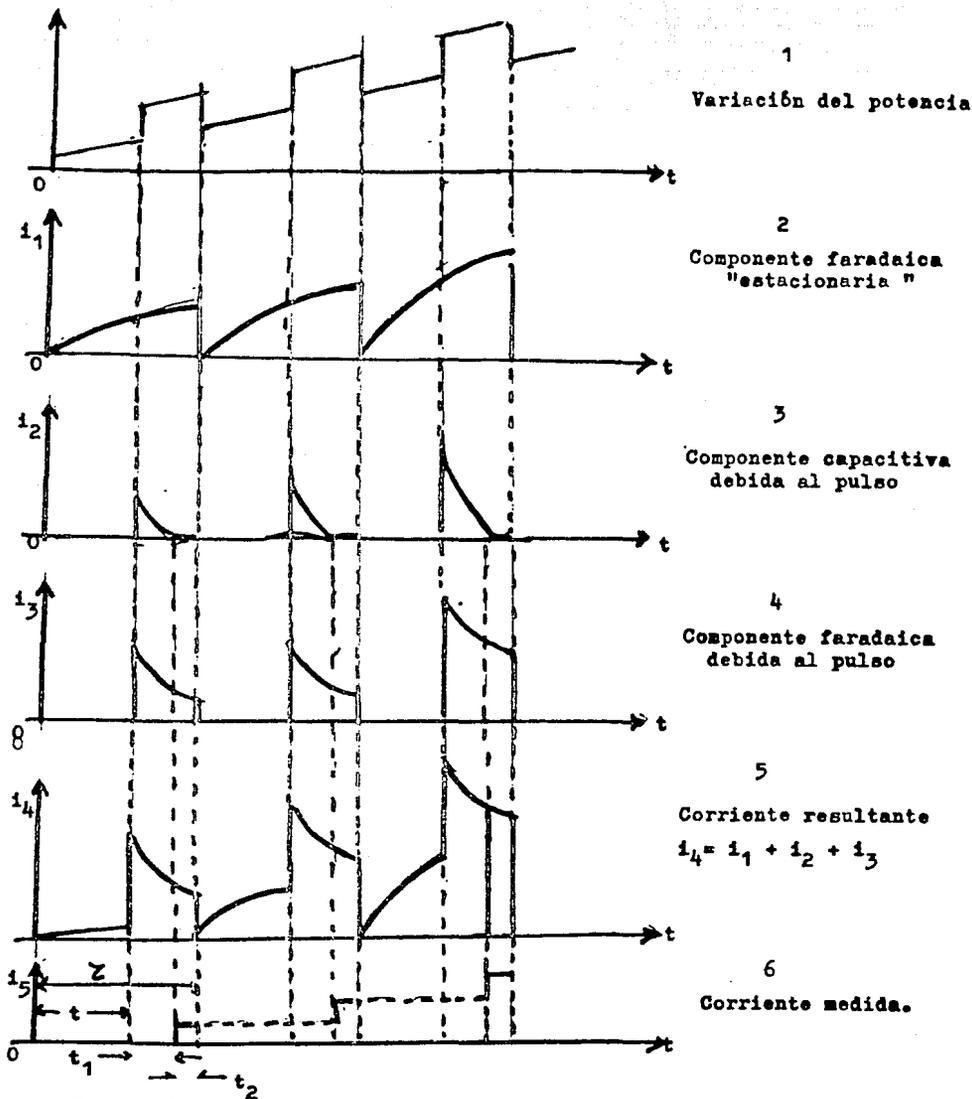


Figura 11. -Componentes de la corriente medida en polarografía diferencial de pulsos.

mide, después de la aplicación del impulso.

$E_1$  = potencial en el cual la corriente  $i_1$  se mide, en ausencia del impulso.

Para la reducción  $\Delta E$  debe ser negativo, pero en la práctica, erróneamente, el signo se omite frecuentemente.

Cuando  $\Delta i$  es máximo  $P_A$  es igual a 1 ( $P_A=1$ ), por lo tanto la expresión para el pico o corriente máxima  $\Delta i_{\max}$  viene dada por:

$$\Delta i_{\max} = -nFCA \frac{D}{\pi t_m} \frac{\sigma - 1}{\sigma + 1} \quad (60)$$

Si  $-\Delta E/2$  es más pequeño que  $RT/nF$  esta ecuación se simplifica. Para el caso de amplitud pequeña:

$$(\Delta i)_{\max} = - \left( n^2 F^2 / 4RT \right) AC (-\Delta E) - D / \pi t_m$$

Cuando  $-\Delta E/2$  llega a ser muy grande con respecto a  $RT/nF$ ,  $(\sigma - 1) / (\sigma + 1)$  se aproxima a la unidad y  $(\Delta i)_{\max}$  es simplemente la expresión de Cottrell.

En la ecuación 55 es evidente que el mayor de los valores  $-\Delta E$  corresponde al mayor de los valores de  $(\Delta i)_{\max}$ . Es obvio que al incrementarse el ancho del pico decrece la resolución, lo cual es indeseable. La anchura media del pico se define como el ancho del pico (mV) al punto donde la corriente del pico es la mitad de su altura máxima. La derivada de un polarograma de CD o de la onda diferencial de impulso de amplitud pequeña para sistemas reversibles tiene un ancho medio ( $W_{1/2}$ ) de  $3.52 RT / nF$ , lo que da un valor de  $90.4 / n$  mV a  $25^\circ \text{C}$ . Para valores mayores de  $-\Delta E$ ,  $W_{1/2} \rightarrow -\Delta E$ .

Comunmente se utilizan valores de  $\Delta E$  entre 10 y 100 mV, obteniéndose así valores de  $(\Delta i)_{\max}$  convenientemente grandes y de una resolución adecuada. De la ecuación anterior, se deduce que el potencial del pico ( $E_{\text{pico}}$ ) está

dado por :

$$E_{\text{pico}} = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (61)$$

La ecuación 58 muestra que  $(\Delta i)_{\text{max}}$  es una función lineal de la concentración, lo cual es cierto para el caso de un sistema reversible.

En polarografía diferencial de impulsos la comparación de los valores del ancho medio teórico y experimental provee, probablemente, el más simple criterio para determinar la reversibilidad de un proceso.

### 2.3.1. Características analíticas del método.

#### A.- Selectividad .

Las características de selectividad dependen de la amplitud del impulso que se utiliza. Entre más pequeño sea el impulso mejor es la resolución pero la sensibilidad disminuye.

Cuando se utilizan impulsos de amplitud de 35 mV, es suficiente con que los  $E_{1/2}$  difieran por lo menos 50 mV para poder identificar dos picos de la misma altura. Con impulsos de 7 mV de amplitud la selectividad mejora y pueden identificarse ondas que difieren tan solo 30 mV, pero la sensibilidad disminuye en un factor de alrededor de 5.

#### B.- Sensibilidad .-

La sensibilidad en polarografía diferencial de impulsos está limitada por las mismas corrientes parásitas existentes en polarografía normal de impulsos; sin embargo, el orden de magnitud de éstas es menor. De hecho, todas estas corrientes son despreciables debido a que contrariamente al caso de la polarografía normal de impulsos (donde los impulsos tienen una gran amplitud), en esta técnica la amplitud de los impulsos es pequeña, entre 7 y 35 mV.

### Conclusiones.

1) Los métodos impulsionales que se emplean en química analítica son relativos a los métodos de corriente directa y no se espera que sean fuertemente dependientes de las cinéticas de electrodo. Esto implica que la polarografía tenga una alta sensibilidad para sistemas electroquímicamente reversibles y define con mucha facilidad picos para concentraciones tan bajas como 5 ppb o aún menores.

2) Para los sistemas reversibles el límite de detección es del orden de  $10^{-8}$  M y para los sistemas irreversibles de  $5 \times 10^{-8}$  M.

#### BIBLIOGRAFIA.

- (1) USP XXII (United States Pharmacopea )
- (2) "A chemical method for vitamin B<sub>12</sub> concentration in liver injection "Journal of the American Pharmaceutical Association, 45 ,26 (1956 ) P.J. Van Melle.
- (3) K.H. Fantes et al. Proc. Royal Soc 136 B,592 (1950).
- (4) "Polarographic behaviour of vitamin B<sub>12</sub> in potassium cyanide supporting electrolite " Diehl , Morrison , Sealock. Experientia 7 (1950 )60.
- (5) "The polarography of vitamin B<sub>12r</sub> y B<sub>12a</sub>", Jaselskis, Diehl. Journal of the American Chemical Society 76(1954)4345
- (6) " On the disproportionation of vitamin B<sub>12r</sub> and the voltametry of vitamin B<sub>12</sub> compounds" Birke, Brydon, Boyle. Journal of Electroanalytical Chemistry Interfacial Electrochemistry, 52, 237 (1974 )
- (7) "Polarography of cobalamines and cobinamides" Hogenkamp Holmes. Biochemistry 9, 1886 (1970)
- (8) "The polarography of vitamin B<sub>12</sub> in acidic media" Birke, Venkatesen. Journal of Electrochemical Soc: Electrochemical Science and Technology 128 (5), 984 (1981)
- (9) "Redox and acid-base equilibria en the B<sub>12a</sub>/B<sub>12r</sub> system " Lexa, Saveant, Zicker. Journal of the American Chemical Society 98:8(1977) 2786-90
- (10) "Electrochemical investigation of surface phenomena at a mercury electrode in vitamin B<sub>12a</sub> solution" Schmidt, Swofford . Analytical Chemistry 51, 2026 (1979)
- (11) "Vitamin Bestimmungen" Rolf Strohecker, Verlag Chemie 1963.

- (12) Index Merk
- (13) "Electrochemistry of vitamin B<sub>12</sub>. Kinetics and mechanism in B<sub>12</sub><sup>a</sup>-B<sub>12</sub><sup>r</sup> oxido reduction" Tasconi, Lexa, Savaent. Journal of the American Chemical Soc. 101, 467 (1979).
- (14) "Polarographic Catalytic Hydrogen Waves in Aquocobalamin and Methylcobalamin Solutions" Anal. Chem. 1984, 56 (1716-1722).
- (15) "The magnetic susceptibility of vitamin B<sub>12</sub>" Diehl, Haar, Sealock. Journal of the American Chemical Soc. 72 (1950) 5312.
- (16) "Electrochemical assay of thiamine, riboflavin, pyridoxine, nicotinamide and ascorbic acid in pharmaceutical preparations" Söderhjelm. Acta Pharmaceutical Suec. 1976, 13 (3) 201-12.
- (17) "Application of differential pulse polarography to the assay of vitamins" Linddquist, Farrohat, Analyst 100 (1975) 377-385.
- (18) "High-performance liquid chromatography of water soluble vitamins" Amin Monir. J. Chromatog. 1987, 390 (2) 448-53
- (19) "Instrumentación Química" H.A. Strobel, 1979. Editorial Limusa.
- (20) "Voltametric determination of pyridoxine by use of carbon paste electrode" Söderhjelm, Lindquist. Analyst 100 (1975) 349-354.
- (21) "The Principles and Applications of Polarography" G.W.C. Milner.
- (22) R. Pleticha. Analytical Chemistry 24 (1952) 916
- (23) J.J. Lingane, G.L. Davis, Journal of Biological Chemistry 137, (1941) 567
- (24) "Polarography" J.M. Kolthoff, J. J. Lingane Interscience Pub. Inc. New York 1952

- (25) "Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry"  
A.M. Bond.
- (26) "Grundlagen der Polarographie "Jaroslav Heyrousky.
- (27) "Ion Exchange in Analytical Chemistry" Rieman and  
Walton.
- (28) "An Introduction to Separation Science"  
Karger , Snyder . John Wiley.
- (29) "Electrochemical Methods"  
A.J. Bard, L.R. Faulkner, John Wiley.
- (30) "Introducción al Intercambio Iónico"  
Dr. Helmut Pitsch K.1975
- (31) J.A.V. Butler Trans. Faraday Soc.19,729 (1924)  
28, 379 (1932)
- (32) "Instrumentación Química " H.A. Strobel,Ed. Limusa.
- (33) "La Polarographie en Agronomie et en Biologie "  
Paul Nanginot,1970
- (34) "Química Orgánica " Morrison Boyd