

# Determinación espectrofotométrica y por absorción atómica de selenio en materia vegetal mediante extracción del piazoselenol (selenio (IV)-orto-fenilendiamina) en n-hexano

por J. Aznárez, J. R. Castillo, A. Bonilla y J. L. Tejedor

Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de Zaragoza

Recibido el 23-XII-1980

## ABSTRACT

AZNÁREZ, J., CASTILLO, J. R., BONILLA, A. and TEJEDOR, J. L., 1980. — Spectrophotometric and atomic absorption determination of selenium in plants by extraction of piazselenol (Se(IV)-O-Phenylendiamine) into N-hexane, *An. Aula Dei*, 15 (1-2): 194-203.

Recently it has been shown the intervention of selenium in some biochemical processes. Therefore its determination in biological material at trace level presents increasing interest. Two new methods for selenium determination are proposed. Both methods are based on forming and separating by extraction of the piazselenol (Se(IV)-o-phenylendiamine) into n-hexane, obtaining recovery yields higher than 97%. The use of n-hexane as solvent in front of benzene or toluene, presents the advantages of its less toxicity, ultraviolet transparency where the piazselenol absorbs and the possibility of direct nebulizing in flame atomic absorption, yielding better sensitivity and selectivity in the determination.

Both spectrophotometric and flame atomic absorption methods have been applied to selenium determination in alfalfa (0,5 ppm) and hay-meadow (0,7 ppm of selenium) with variation coefficients for ten determinations of 2,9 and 6% respectively.

## INTRODUCCION

La determinación del selenio en plantas y suelos cultivables es de creciente interés, pues además de la conocida acumulación de selenio en determinadas especies vegetales a concentraciones superiores a los límites de toxicidad en animales herbívoros (del orden de  $5 \mu\text{g/g}$  sobre

materia seca), estudios posteriores (DYE y BRETTHANER, 1963) han demostrado la acción beneficiosa de la presencia de selenio a bajos niveles en la dieta alimenticia animal y la importancia de su determinación en sangre y plasma humanos (KURAHASHI *et al.*, 1980). DICKSON y TAPPEL han señalado la acción del selenio como catalizador de reacciones de formación y rotura de puentes disulfuro ( $-S-S-$ ) en las cadenas proteínicas.

De lo expuesto se deduce la conveniencia de disponer de un método rápido, preciso y libre de interferencias para la determinación de selenio a nivel de trazas.

Para la determinación espectrofotométrica y separación previa de selenio se han propuesto diferentes reactivos y disolventes, tales como: orto-diaminas aromáticas en benceno o tolueno (TERADA y DOBA, 1975), dietil-ditio-carbamato sódico (WERNER y PAUL, 1975), etil-xantogenato potásico (ACKY, 1971), mercapto-benzotiazoles (REMANEMKAS y SULUYER, 1969), bismutíoles (BUSSEV, 1973) y mercapto-benzooxazoles (CRESSER y WEST, 1968).

En todos los métodos citados es preciso un cuidadoso control del pH de la solución tanto para la formación del compuesto selenio (IV)-reactivo como en el proceso de extracción, estando la determinación sometida a numerosas interferencias.

En el presente trabajo se estudia la formación del compuesto selenio (IV)-orto-fenilendiamina y su extracción en n-hexano para su aplicación a la determinación de selenio por absorción atómica mediante nebulización directa del extracto orgánico, ya que este disolvente proporciona buenas características a la llama y tiene una toxicidad despreciable frente a benceno o tolueno utilizados frecuentemente como disolventes para la extracción del piazoselenol. Simultáneamente, el n-hexano no presenta absorción molecular en la zona ultravioleta a diferencia del benceno y tolueno y en consecuencia podía ser favorable para la determinación de selenio por espectrofotometría de absorción molecular, puesto que el piazoselenol absorbe también en la zona ultravioleta.

## INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

Para la realización del trabajo se han utilizado:

- Espectrofotómetro de absorción molecular uv-visible Pye-Unicam SP 8-100, con cubetas de cuarzo o sílice de 1 cm de paso óptico.

- Espectrofotómetro de absorción atómica Pye-Unicam SP-90, con lámpara de cátodo hueco de selenio Whestinghouse.
- pHmetro Orion Research Ionanalyzer Microprocessor 901.
- Agitador mecánico Kotterman.
- Solución patrón de selenio (IV) conteniendo  $1.000 \mu\text{g/ml}$  de Se, preparada a partir de selenio elemental (Merck, calidad R.A.) con agua regia. Una vez disuelto totalmente el selenio se añaden 5 ml de HCl concentrado y se lleva a ebullición durante 10 minutos para garantizar el estado de selenio (IV). Las soluciones más diluidas de selenio se preparan en el momento de su uso por dilución con agua bidestilada.
- Solución de orto-fenilendiamina (OFD) (Merck, calidad R.A.) al 0,35% (m/V) en solución de HCl al 5% (V/V).
- Soluciones tampón de HCl-KCl y de HAc-NaAc.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Estudio espectrofotométrico del piazoselenol en fase acuosa

En fase acuosa selenio (IV) y OFD forman un compuesto (piazoselenol) incoloro, con el máximo de absorción a 322 nm. La reacción de formación depende del pH de la solución y es algo lenta a la temperatura ambiente. Calentando a 50-60 °C, la reacción se completa en un intervalo de 15-20 minutos. En la figura 1 se observa la influencia del pH de la solución sobre la formación del piazoselenol. Los resultados se han obtenido midiendo la absorbancia a 322 nm frente a un blanco de referencia de reactivo en ausencia de selenio, con el siguiente procedimiento: se mezcla 1 ml de solución conteniendo  $25 \mu\text{g/ml}$  de selenio (IV) con 1 ml de solución de OFD y 10 ml de la solución tampón adecuada al pH en estudio (pH entre 0,5 y 5,0). Se calienta a 50-60 °C durante 20 minutos. Se deja enfriar y se diluye finalmente con agua destilada a 25 ml en matraz aforado.

El intervalo óptimo de pH para la formación del piazoselenol (Se (IV)-OFD) está comprendido entre 1 y 2,5.

El valor de la absortividad molar a 322 nm resulta ser de  $1,45 \times 10^4$  l/mol. cm. La composición del compuesto formado es de 1:1 de Se a OFD, como se observa en la figura 2, por el método de las variaciones continuas. La constante de formación del piazoselenol es de  $10^{7,3}$  (método de Job),  $10^{7,1}$  (métodos de Budesinsky y Langmyhr), a pH = 1,50 y fuerza iónica 0,1 M.

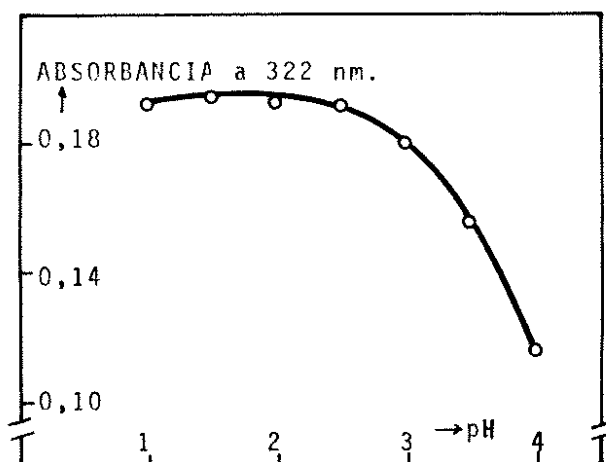


FIG. 1. Influencia del pH de la solución sobre la formación de piazoselenol.

La ley de Beer se cumple hasta una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  de selenio (IV). La sensibilidad Sandell es de  $0,0054 \mu\text{g/cm}^2$  de Se en fase acuosa.

Sin embargo, en la determinación interfieren numerosas sustancias, por lo que el método expuesto es de limitada aplicación.

### Extracción del piazoselenol a n-hexano.

Se ha estudiado la extracción del piazoselenol en n-hexano, en orden a mejorar la selectividad y la sensibilidad de la determinación espectrofotométrica del selenio y a su posterior utilización en absorción atómica, por nebulización directa del extracto en n-hexano. Para ello se ha extraído el piazoselenol formado en fase acuosa por el procedimiento anterior, mediante agitación mecánica durante cinco minutos, con 10 ml de n-hexano, en embudos de separación de 100 ml de capacidad. Una vez separadas las fases, la fase orgánica se deseca con 1 g aproximadamente de sulfato sódico anhidro.

El máximo del espectro de absorción del piazoselenol en n-hexano aparece a 329 nm. En la figura 3 se observa que el intervalo óptimo de pH para la extracción está comprendido entre 1,0 y 2,5, que coincide, como era previsible, con el de formación del piazoselenol. Se ha comprobado que en las condiciones empleadas, el rendimiento de la extracción de  $10 \mu\text{g}$  totales de selenio era superior al 96%, empleando tampón de HCl-KCl de pH 1,0 a 2,5.

En n-hexano como disolvente, el coeficiente de extinción molar o absorptividad molar a 329 nm es de  $1,50 \times 10^4 \text{ l/mol. cm}$ . La solución es estable y la absorbancia se mantiene constante durante más de 24 horas a la temperatura ambiente. La ley de Beer se cumple hasta

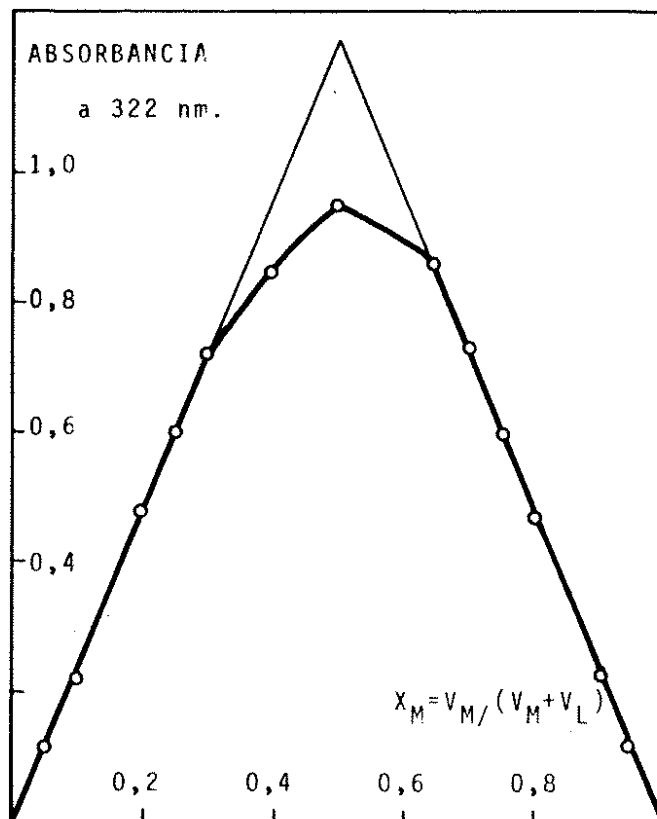


FIG. 2. Estequiometría del compuesto formado.

concentraciones de  $12 \mu\text{g/ml}$  de selenio en fase orgánica. La sensibilidad Sandell es de  $0,0052 \mu\text{g/cm}^2$  de selenio en *n*-hexano. La precisión de la determinación de  $5 \mu\text{g}$  de selenio es de  $\pm 1,5\%$ , como se deduce de los resultados de 10 determinaciones repetidas.

Se han estudiado las interferencias de: Fe, Al, Bi, Mn, Cu, Ca, Ba, Zn, Cd, Hg, Sn, Na, K,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y AEDT, en las concentraciones máximas indicadas en el cuadro 1, habiendo encontrado dificultades solamente con el Fe(III) y los oxidantes fuertes, concretamente con el exceso de agua regia no debidamente eliminada en el tratamiento de ataque de la muestra.

Experimentalmente se demuestra que la interferencia del Fe(III) y de los oxidantes fuertes se puede evitar por adición de 10 ml de solución  $0,1 \text{ M}$  de AEDT y/o de 5 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina al  $1\%$  (m/V), antes de añadir la solución de OFD.

### Determinación de selenio por absorción atómica

La determinación de selenio por absorción atómica presenta dificultades por dos razones principalmente. En primer lugar las líneas de

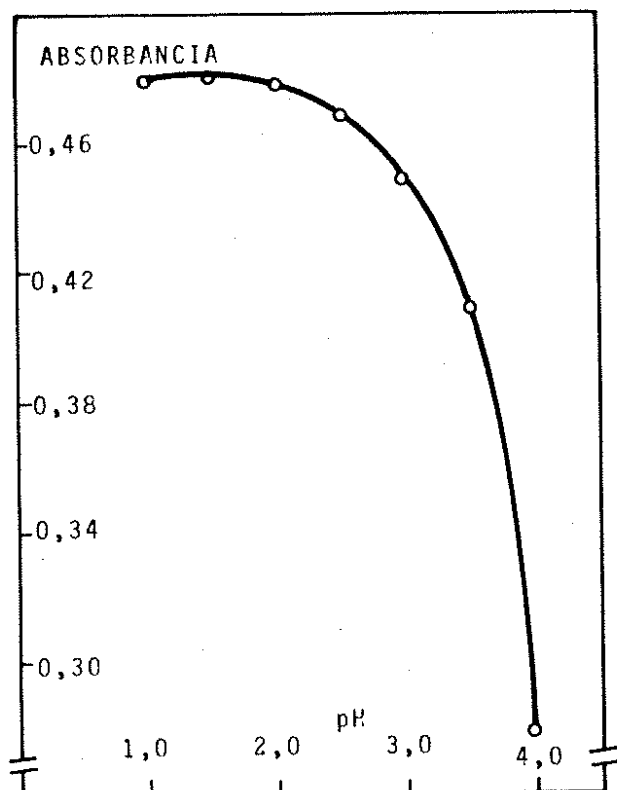


FIG. 3. Relación del pH con el rendimiento de extracción.

resonancia del selenio corresponden a las longitudes de onda de 196,0, 206,2, 203,9 y 207,0 nm que están próximos al límite de ultravioleta de vacío, por lo que es recomendable emplear llamas apantalladas con nitrógeno o argón, así como el empleo de llamas de hidrógeno-aire. No obstante, CHAKRABARTI (1968) ha señalado que si no se emplea apantallamiento de gas inerte la llama de hidrógeno-aire proporciona peores resultados tanto en sensibilidad como en precisión que la llama de acetileno-aire en la determinación de selenio. La segunda causa de pérdida de sensibilidad es la tendencia a formar óxidos en la llama por parte del selenio, lo que puede evitarse, en parte, mediante el uso de llamas reductoras no estequiométricas y el apantallamiento citado anteriormente.

La nebulización directa del extracto de selenio en n-hexano proporciona una concentración previa del selenio, la eliminación de numerosas interferencias y un carácter reductor a la llama, dando lugar a un aumento de la sensibilidad y precisión del método.

En el cuadro 2 se resumen los resultados finales de diez determinaciones de soluciones de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de selenio en fase acuosa como piazoselenol en fase de n-hexano después de optimizar los parámetros instrumentales.

CUADRO 1. — Interferencias estudiadas en la determinación de selenio.

Interferencia estudiada	Compuesto usado	Concentraciones interferencias $\mu\text{g/ml}$	Selenio puesto $\mu\text{g}$	Selenio hallado $\mu\text{g}$	Error %
Fe(III)	Fe	1.000	5,50	5,40	1,8
Al(III)	Al	1.000	5,50	5,50	0,0
Bi(III)	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1.000	5,50	5,45	0,9
Mn(II)	MnSO <sub>4</sub>	1.000	5,50	5,50	0,0
Ca(II)	CaCO <sub>3</sub>	1.000	5,50	5,45	0,9
Ba(II)	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.000	5,50	5,40	1,8
Cu(II)	Cu	1.000	5,50	5,60	1,8
Zn(II)	ZnO	1.000	5,50	5,40	1,8
Cd(II)	CdSO <sub>4</sub>	1.000	5,50	5,65	2,7
Hg(II)	Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.000	5,50	5,30	3,6
Sn(IV)	Sn	1.000	5,50	5,30	3,6
Na(I)	NaCl	1.000	5,50	5,50	0,0
K(I)	KCl	1.000	5,50	5,45	0,9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> Cl	1.000	5,50	5,50	0,0
Cl <sup>-</sup>	HCl	0,1 M.	5,50	5,50	0,0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HNO <sub>3</sub>	0,1 M.	5,50	5,45	0,9
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HClO <sub>4</sub>	0,1 M.	5,50	5,50	0,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 M.	5,50	5,40	1,8
AEDT	Na <sub>2</sub> AEDT	0,1 M.	5,50	5,45	0,9

CUADRO 2. — Resultados de 10 determinaciones de selenio.

Fase nebulizada	Sensibilidad $\mu\text{g/ml Se}$	Límite detección $\mu\text{g/ml Se}$	Coficiente variación %
Fase acuosa Se(IV)	2,03	0,49	$\pm 2,5$
Fase n-hexano piazoselenol	0,10	0,03	$\pm 2,0$

### Aplicación de ambos métodos a la determinación de selenio en materia vegetal

Se han aplicado ambos métodos a la determinación de selenio en muestras de alfalfa y heno de prado suministradas por la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza (C.S.I.C.).

Aplicando el método de adición patrón o estándar y estudiando los rendimientos de recuperación del selenio añadido, se observó ya en las primeras experiencias que no era posible utilizar el sistema de mineralización por calcinación a baja temperatura (500 °C aproximadamente), pues se produce una notable pérdida de selenio por volatilización, con rendimientos de recuperación del orden del 25-35%. Por consiguiente,

la destrucción de materia orgánica se ha realizado por ataque ácido oxidante mediante mezcla de ácidos nítrico y perclórico.

El procedimiento seguido para la determinación es el siguiente: a muestras de alfalfa o de heno de prado, desecadas según normas establecidas y pesadas exactamente (del orden de 3 g), se añaden 30 ml de ácido nítrico fumante, calentando en baño de arena a 130 °C hasta casi sequedad. Se deja enfriar y se añaden 5 ml de ácido perclórico, calentando seguidamente en baño de arena a 160 °C aproximadamente durante hora y media. Se deja enfriar y se agregan 3 ml de ácido clorhídrico concentrado y se calienta a 100 °C durante 20 minutos, con objeto de reducir a Se (IV) el posible Se (VI) formado durante el ataque. Una vez frío a la temperatura ambiente mediante solución de NaOH se lleva la solución a pH entre 1 y 3, con objeto de eliminar el gran exceso de ácido libre. En embudos de separación de 100 ml de capacidad, a la solución resultante anterior se añaden 10 ml de solución de AEDT 0,1 M, 5 ml de solución al 1% de clorhidrato de hidroxilamina, 1 ml de solución de OFD y 10 ml de solución tampón de HCl-KCl de pH = 1,6. Se calienta a 50 °C durante 20 minutos. Se añaden 5 ml de n-hexano y se agita mecánicamente durante 5 minutos. Separadas las fases, la fase orgánica se deseca con 1 g de sulfato sódico anhidro. Se mide la absorbancia del extracto orgánico a 329 nm frente a blanco de reactivo. Por nebulización directa del extracto de n-hexano se efectúa la determinación del selenio por absorción atómica.

CUADRO. 3. — *Determinación de Se en muestras de alfalfa y heno de prado.*

Muestra	Espectrofotometría UV-VIS			Absorción atómica		
	Selenio encontrado ppm	Selenio añadido µg Se	% recuperado	Selenio encontrado ppm	Selenio añadido µg Se	% recuperado
Alfalfa-1	0,53 ± 0,02	0,5	96,7	0,50 ± 0,03	1,0	97
Alfalfa-2	0,49 ± 0,01	0,5	97,9	0,50 ± 0,03	1,0	98
Alfalfa-3	0,50 ± 0,01	0,5	98,0	0,52 ± 0,03	1,0	97
Heno-1	0,67 ± 0,02	0,5	97,6	0,71 ± 0,03	1,0	98
Heno-2	0,68 ± 0,02	0,5	97,2	0,70 ± 0,03	1,0	97
Heno-3	0,64 ± 0,02	0,5	98,1	0,66 ± 0,03	1,0	97

En el cuadro 3 se resumen los resultados obtenidos (valor medio ± ± desviación estándar para 10 determinaciones de cada muestra), así como los rendimientos de recuperación de selenio añadido como adición patrón, al objeto de estudiar la posible pérdida de selenio en el proceso de disolución o ataque de la muestra. Los resultados obtenidos concuerdan con los presentados por PINTA (1975).



A pesar de la mayor sensibilidad conseguida por el método de absorción atómica propuesto, resulta todavía insuficiente para el análisis de plantas con tan bajo contenido en selenio, como lo indican los valores del coeficiente de variación encontrados (del orden del 6%).

## CONCLUSIONES

Se ha encontrado una notable pérdida de selenio en la destrucción de materia orgánica vegetal por calcinación, aun a baja temperatura (inferior a 500 °C). Es por ello necesario proceder a la mineralización mediante ataque ácido (mezcla de ácidos nítrico y perclórico). La extracción del piazoselenol formado entre el Se (IV) y la OFD mejora la sensibilidad y la selectividad tanto de la determinación por absorción molecular en el ultravioleta como por absorción atómica. El tanto por ciento de recuperación de 0,5-1,0  $\mu\text{g}$  de selenio añadidos a las muestras como adición patrón ha sido superior al 97%.

Los resultados obtenidos para diferentes muestras de alfalfa y heno de prado coinciden con los publicados.

## RESUMEN

Ultimamente se ha demostrado la intervención del selenio en algunos procesos bioquímicos. Como consecuencia se ha incrementado el interés por la determinación de selenio en material biológico a nivel de trazas. En el presente trabajo se proponen dos nuevos métodos de determinación de selenio. Ambos métodos están basados en la formación y separación por extracción del piazoselenol (Se(IV)-o-fenilendiamina) en n-hexano, obteniendo rendimientos de recuperación superiores al 97%. El uso de n-hexano frente al benceno o tolueno presenta las ventajas de su menor toxicidad, su transparencia en la región ultravioleta donde absorbe el piazoselenol y la posibilidad de su nebulización directa en absorción atómica de llama, dando lugar a un incremento de la sensibilidad y de la selectividad al eliminar numerosas interferencias gracias al proceso de extracción.

Ambos métodos se han aplicado a la determinación de selenio en muestras de alfalfa (0,5 ppm de Se) y de heno de prado (0,7 ppm de Se), con coeficientes de variación para 10 determinaciones de cada muestra, de 2,9 y 6% respectivamente.

## REFERENCIAS

ACKY, K.

- 1971 Determinación espectrofotométrica de selenio con 3,3'-diaminobencidina en tolueno, *Splen. Sci.*, **6** (3): 455-8.

BUSSEV, M. S.

- 1973 Separación de selenio y telurio con 5-mercapto-3-(2-naftil)-1,3,4-tiodiazolin-2-iona, *Zh. Analit. Khim.*, **28**: 1.360-4.

CRESSER, M. S. and WEST, T. S.

- 1968 Studies in Analytical Chemistry of Selenium: Absorptiometric determination with 2-mercaptobenzoic Acid, *The Analyst*, **93**: 595-610.

CHAKRABARTI, C. L.

- 1968 The Atomic Absorption Spectroscopy of Selenium, *An. Chim. Acta*, **42**: 379-87.

DYE, W. B. and BRETTHANER, T.

- 1963 Fluorometric determination of Selenium in Plants and Animals with 3,3'-diaminobenzidine, *Anal. Chem.*, **35**: 1.687-91.

KURAHASHI, K., INOVE, S., YONEKURA, S., SHIMOISHI, Y. and TOEI, K.

- 1980 Determination of Selenium in Human Blood by Gas Chromatography with Electron-capture Detection, *The Analyst*, **105**: 690-5.

PINTA, M.

- 1975 Etalons vegetaux pour l'analyse foliare, *Analisis*, **3**: 345-51.  
1975 Methods de reference pour la determination des elements mineraux dans les vegetaux, *Reviews of the Hungarian Academy of Sciences*, **143**: 148-9.

RAMANENKAS, R. and SULUYENS, A.

- 1969 Determinación de selenio por espectroscopia UV-vis. con 2-mercaptobenzotiazol en cloroformo, *Khim. Technol.*, **10**: 25-9.

TERADA, K. and DOBA, T.

- 1975 Separation and determination of Selenium in Rocks, marine sediments and plankton, *Talanta*, **22**: 41-6.

WARNER, D. A. and PAUL, J.

- 1975 Determinación espectrofotométrica de selenio con dietilditiocarbamato en cloroformo, *Mikrochem. J.*, **20**: 292-5.