

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología de Valencia
(Prof. J. García-Blanco)

Determinación fotométrica del cobre mediante la Difeniltiocarbazona

por F. ROYO MINUE

(Recibido para publicar el día 6 de Junio de 1947)

En publicaciones anteriores (1 y 2) expusimos un método para la determinación fotométrica del cinc mediante la difeniltiocarbazona. La operación previa del método consiste en la adición de cianuro potásico que inhibe la reacción del cobre, cobalto y níquel con la ditizona, mientras que los restantes cationes pasan a la solución de ditizona en tetracloruro de carbono, dando combinaciones coloreadas. El cobre, cobalto y níquel quedan en la fase acuosa en forma de cianuro de cobre y los complejos de cobaltocianuro y níquel o cianuro respectivamente. Puesto que el cianuro de cobre se descompone fácilmente en solución ácida y los complejos, tanto el de cobalto como el de níquel, requieren ácido sulfúrico concentrado y caliente, la determinación del cobre en esta solución parecía ofrecerse espontáneamente y sin dificultades.

Pero aparte de que en estas condiciones los resultados son muy irregulares, el método nos interesaba especialmente para su aplicación en tejidos animales en los que normalmente la cantidad de cinc presente es considerablemente superior a la de cobre, y la previa eliminación de aquél, exigiendo cantidades considerables y repetidas de solución de ditizona, había de acentuar todavía la irregularidad de los resultados a la vez que hacer el método tedioso y lento. Su técnica, pues, había de ser tal que permitiera la determinación directa del cobre en presencia de grandes cantidades de cinc. Y ello se ha conseguido con el método que exponemos a continuación.

FUNDAMENTO

A. Si se agita la solución de ditizona en tetracloruro de carbono con una solución acuosa débilmente ácida de diversos cationes, entre ellos el cobre, se combina preferentemente con éste y el exceso de ditizona, hasta agotarse, con los restantes.

B. Si la capa inferior de tetracloruro de carbono que contiene disueltas las diversas combinaciones de ditizona, se trata con agua fuertemente acidulada, todas las combinaciones se descomponen salvo la de cobre que es la más estable.

No puede operarse directamente en solución fuertemente ácida para evitar el tratamiento posterior con agua acidulada, porque en estas condiciones, la reacción con el cobre es muy lenta e irregular.

De los distintos cationes que reaccionan con la ditizona, sólo el cobalto se comporta de un modo semejante al cobre por lo que su exclusión previa es obligada mediante el cianuro potásico. Otros dos cationes, mercurio y bismuto, dan combinaciones resistentes a los ácidos, pero su reacción en las condiciones establecidas en el método es débil y la perturbación que provocan se examinará en la parte experimental.

REACTIVOS

Solución de 0,015 grs. de difeniltiocarbazona en 50 c. c. de tetracloruro de carbono.

Esta solución se prepara y purifica según se indicó en un trabajo anterior (1). Se conserva en frasco topacio y bajo una capa de la mezcla siguiente:

Dos partes de solución de bisulfito sódico al 10 %, una parte de fosfato disódico al 5 % y una parte de metanol. Es utilizable durante ocho a diez días.

Solución de amoníaco 3N.

Solución de amoníaco 0,5N.

Solución de sulfúrico N.

Solución de sulfúrico N/6.

Solución saturada de fosfato monopotásico.

Solución saturada de fosfato disódico.
Solución de cianuro potásico al 0,5 %.

Las soluciones de fosfatos se conservan mediante la adición de unas gotas de tetracloruro de carbono.

Los reactivos deben ser purísimos P. A. y en todo caso exentos de cobre.

MATERIAL

El material se reduce a embudos de separación de forma oval o esférica de unos cien c. c. de capacidad, tubos de ensayo y pequeños embudos para filtrar. Todo él debe estar cuidadosamente limpio, enjuagado con agua bidestilada y seco. Inmediatamente después de su uso, se enjuagarán los embudos de separación 2-3 veces con agua bidestilada y se limpiará el extremo inferior del tubo de salida introduciéndolo en un tubo de ensayo con tetracloruro de carbono para eliminar los residuos que en él dejan, al evaporarse, las últimas gotas de solución de ditizona combinada o no. Guardados al abrigo del polvo quedan así dispuestos para su uso inmediato. Después de usados durante varios días se deben limpiar a fondo según cualquiera de los métodos empleados para el material de vidrio de laboratorio, enjuagando finalmente con agua bidestilada.

METODO

De la solución a investigar, ligeramente alcalinizada con amoníaco y centrifugada o filtrada, se toma con una pipeta un volumen, no superior a 3 c. c., que contenga una cantidad de cobre comprendida entre 0,0005 mg. y 0,0100 mg., se vierte en un embudo separador, se completa con agua bidestilada hasta 3 c. c. y se agrega 0,5 c. c. de cianuro potásico al 0,5 %; se agita un poco y se acidula con ácido sulfúrico normal; una gota de solución extraída con una fina varilla de vidrio debe dar con el papel indicador de Ph, una acidez = 3. Se agita un poco y se agrega amoníaco 0,5N. hasta que la acidez sea débil: Ph entre 5 y 7. Es indispensable evitar una excesiva alcalinización. Se agrega 0,5 c. c. de solución de fosfato monopotásico y el fosfato disódico necesario, bastan pocas décimas para que

el pH., examinado como se ha dicho antes, sea 6 a 6,5. Se agregan 5 c. c. de solución de ditizona diluída (un volumen de solución madre de ditizona y 3 volúmenes de tetracloruro de carbono) y se agita el embudo por rotación suavemente y con frecuentes intervalos de reposo, durante 30 minutos. Hasta ocho o nueve determinaciones simultáneas pueden efectuarse en el mismo tiempo, agitando sucesivamente los embudos de separación por pares y durante medio a un minuto cada vez. El tiempo antes indicado es suficiente para neutralizar cualquier irregularidad en la agitación.

Se añade 1 c. c. de sulfúrico normal y se agita, esta vez con cierta intensidad, del modo antes descrito durante 10 a 12 minutos. Si además de cobre existen otros cationes (cinc, estaño, plomo, cadmio, etc.), en cantidad considerable con relación al cobre, la ditizona, que había tomado color rojo intenso, se oscurece rápidamente recuperando el color verde primitivo si la cantidad de cobre no es grande.

Se pasa la capa inferior coloreada a otro embudo de separación, se agregan 3 c. c. de sulfúrico N/6 y se agita como anteriormente 10 a 12 minutos. Se lava el extremo inferior del tubo de salida del embudo de separación, con un poco de agua bidestilada y se pasa la capa inferior de tetracloruro a un tercer embudo de separación, en donde se elimina el exceso de ditizona libre, añadiendo 5 c. c. de agua bidestilada, dos gotas de amoníaco 3N. y agitando durante 3 a 5 minutos.

Se vierte la capa inferior sobre un pequeño filtro de papel recogiendo el filtrado en un tubo de ensayo. El color es estable y en tubo cerrado y al abrigo de luz intensa la lectura en el fotómetro puede diferirse, si es necesario, varias horas.

FOTOMETRIA DEL COBRE

Filtro. El color rojo púrpura de la combinación ditizona-cobre presenta su máxima absorción con el filtro 530 del fotómetro Leifo. Este es el filtro que empleamos; el espesor de capa es normalmente 10 m. m. oscilando entre 5 y 15 m. m.

Testigos. Simultáneamente a la determinación problema hay que efectuar una determinación en blanco y otra patrón con cantidad conocida de cobre. Esta última es también indispensable por las oscilaciones de sensibilidad de la ditizona es-

pontáneas unas y provocadas otras en el transcurso de las operaciones.

Como el color de la reacción sigue la ley LAMBERT-BIER existe proporcionalidad, para un mismo espesor de capa, entre los valores de absorción y las cantidades de cobre presentes, por lo que el cálculo se reduce a una sencilla proporción :

Valores correspondientes a lecturas con 10 mm. de espesor de capa.

$$\frac{\text{Blanco} \quad \text{Patrón 3 gamas Cu.} \quad \text{Próxima}}{0,37 \quad 1,12 \quad 0,82}$$

$$\frac{1,12-0,37}{3} = \frac{0,82-0,37}{x} \quad x = \frac{1,35}{0,75} = 1,80$$

EXAMEN DEL METODO

Error. — A continuación exponemos los resultados y desviaciones obtenidos en determinaciones efectuadas sobre soluciones de sulfato de cobre que contenían cantidades comprendidas entre 0,5 y 8,0 gamas de ion cobre :

Cobre puesto (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencia por %
0,50	0,53	+ 6
0,50	0,51	+ 2
0,50	0,47	- 6
1,00	0,93	- 7
1,00	1,05	+ 5
1,00	0,90	-10
1,00		+ 1
2,00	1,92	- 4
3,00	3,00	0
3,00	2,87	- 4
3,00	3,15	+ 5
3,00	2,82	- 6
4,00	3,80	- 5
4,00	4,25	+ 6
4,00	3,96	- 1
4,00	4,40	+10
8,00	8,25	+ 3
8,00	8,32	+ 4

De los datos que se consignan en la columna diferencias por % se desprende que el valor promedio de cobre hallado en

esta serie corresponde con el realmente presente con una diferencia de $-0,06$ por % siendo $\pm 4,7$ la desviación promedio de la serie y $\pm 3,97$ el probable error de una determinación.

ESPECIFICIDAD

Orientado el método para su aplicación en material biológico, el primer catión cuya influencia en los resultados interesa observar es el cinc, ya que éste es, de los que reaccionan con la ditizona, el que más abunda en los tejidos aniles. Examinaremos después el cobalto, cuyo efecto hemos de suponer a priori insignificante o nulo, puesto que su concentración en los tejidos es muy inferior a la del cobre. Por extensión y con interés puramente analítico estudiaremos el efecto de diversos metales, que por ser comunes, pueden encontrarse contaminando los reactivos y soluciones.

Influencia del cinc.

En la tabla siguiente se exponen los resultados obtenidos sobre cantidades diversas de cobre en presencia de cantidades de cinc que varían entre 20 y 100 gamas :

Cinc (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencias %	Desviaciones respecto al promedio
20,	0,50	0,55	+ 10,0	+ 2,7
20	1,00	1,11	+ 11,0	+ 3,7
30	3,00	3,35	+ 11,6	+ 4,3
50	5,00	5,40	+ 8,0	+ 0,7
10	0,50	0,52	+ 4,0	- 3,3
10	33,00	3,20	+ 6,6	- 0,7
10	5,00	5,30	+ 6,0	- 1,3
100	2,00	2,13	+ 6,5	- 0,8
100	4,00	4,30	+ 7,5	+ 0,2
100	8,00	9,04	+ 13,0	+ 5,7
100	2,00	2,02	+ 1,0	- 6,3
100	4,00	4,40	+ 10,0	+ 2,7
100	2,00	2,17	+ 8,5	+ 1,2
100	4,00	4,00	0,0	- 7,3
100	8,00	8,50	+ 6,2	- 1,1
			10 9,9 : 15	41,3 : 15
			7,3	2,7

El valor medio de cobre hallado en esta serie es 7,3 % mayor que el real, siendo la desviación prometida de este valor $\pm 2,7$ y el probable error de una determinación $\pm 2,28$.

Es decir, que la presencia de cantidades de cinc hasta 50 veces superiores a la de cobre determina una elevación en el resultado de una determinación de 7,3 $\pm 2,28$ por % siendo 2,28 el probable error.

Influencia del cobalto.

Aunque el cobalto se encuentra en los tejidos en cantidades muy pequeñas con relación a las del cobre y su influencia por tanto ha de ser despreciable, hemos querido observar el efecto que producen en los resultados la presencia de cantidades elevadas del mismo.

Cobalto (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencias %
1	0,50	0,52	+ 4
15	0,50	0,51	+ 2
2	1,00	1,01	+ 1
6	3,00	3,04	+ 1
25	5,00	5,50	+ 10

La elevación promedio ha sido de 3,6 %.

El níquel se comporta de un modo análogo.

Influencia del plomo y cinc.

Plomo (gamas)	Cinc (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencia %
20	8	0,50	0,47	— 6
20	8	1,00	1,08	+ 8
30	8	3,00	3,13	+ 4,3
50	8	5,00	5,26	+ 5,2

La elevación promedio ha sido de 2,8 %.

Influencia del estaño.

Estaño (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencia %
20	0,50	0,46	— 8
20	1,00	0,98	— 2
20	1,00	0,92	— 8
30	3,00	2,90	— 3,3
30	3,00	2,87	— 4,3
50	5,00	4,84	— 3,2

El estaño provoca una reducción promedio en los resultados de 4,8 %.

Influencia del cadmio.

Cadmio (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencia por %
50	1,00	0,95	— 5
50	2,00	1,92	— 4
60	3,00	3,04	+ 1
120	5,00	4,70	— 6

Se comporta, pues de modo semejante al estaño, siendo — 3,5 % el valor promedio.

La plata actúa de forma análoga.

Influencia del mercurio y bismuto.

Estos cationes son los que provocan mayor alteración en los resultados como se observa en las determinaciones siguientes:

Mercurio (gamas)	Cobre presente (gamas)	Cobre hallado (gamas)	Diferencia por %
20	1,00	1,04	+ 4
30	3,00	3,50	+ 16,6
20	2,00	3,33	+ 16,0
20	1,00	1,12	+ 12,0

Con el bismuto se obtienen resultados semejantes.

Respecto a otros metales como el titanio, molibdeno y vanadio que han sido hallados ocasionalmente en material biológico, su propia rareza permite excluirlos de toda consideración.

El método une a su simplicidad la posibilidad del trabajo en serie, lo que no es posible con el método de HINSBERG (3), que aunque de sensibilidad análoga es considerablemente más complejo. Seis a ocho determinaciones simultáneas pueden realizarse por un solo operador en unas cuatro horas de trabajo.

Resumen

Se describe un método para la determinación directa del cobre en presencia de otros cationes mediante la difeniltiocarbazona.

El método permite determinar cantidades de cobre comprendidas entre 0,0005 mg. y 0,0080 mg. en un volumen de solución de unos tres c. c., con una desviación promedia de $\pm 4,7$ % y un probable error de $\pm 3,97$ %.

Se examina la perturbación provocada en los resultados por la presencia de cinc, cobalto, níquel, estaño, plomo, cadmio, mercurio y bismuto en cantidades de 10 a 50 veces superiores a las de cobre. Salvo estos dos últimos, la variación de los resultados provocada por los restantes es, en el caso más desfavorable, de $7,3 \pm 2,28$ %.

El método se presta a su aplicación en serie, siendo adecuado para la investigación del cobre en material biológico.

Summary

A method is described for the direct determination of copper in the presence of other cations by means of diphenylthiocarbazone.

The method permits the determination of quantities of copper comprised between 0,0005 mg and 0,0080 mg in a volume of solution of about three cubic centimeters, with an average deviation of $\pm 4,7$ % and a likely error of $\pm 3,97$ %.

An examination is made of the disturbance provoked in results by the presence of zinc, cobalt, nickel, tin, lead, cadmium, mercury, and bismuth, in quantities 10 to 50 times superior to that of the copper. With the exception of the last two, the variation of results provoked by the others is, in the most unfavourable case, $7,3 \pm 2,28$ %.

The method is suitable for serial application in the investigation of the copper in biological material.

Bibliografía

1. ROYO MINUE (F.): Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas III 380 (1944).
2. ROYO MINUE (F.): Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas V. 239 (1945).
3. HINSBERG und GOCKEL: Biochem. Z. 289. 57 (1936).

