

Г. А. ПАНОСЯН

## МУРЕКСИДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ДВУВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

(Фотоэлектроколориметрический метод)

Шварценбах и Гислинг [4] исследовали свойства окрашенного комплекса мурексиды (пурпурата аммония) с кальцием в водном растворе. Было показано, что пурпурат аммония в водном растворе образует с кальцием при рН 6 стабильный комплекс оранжевого цвета. В щелочной среде этот комплекс мало устойчив и имеет окраску от фиолетово-красной до оранжевой. В дальнейшем Остертаг и Ринк [5, 6] употребили аммоний пурпурат для определения макроколичеств кальция. Ими было показано, что чувствительность колориметрической реакции сильно увеличивается при значительно больших рН, чем рН 6 (при рН 6 комплекс наиболее стабилен), что делает возможным применение этого метода для малых количеств кальция.

Уиллямсом и Мозером [7] был использован раствор пурпурата аммония в 70% спирте, который оказался более стабильным, чем водный раствор. Они более подробно исследовали зависимость стабильности и окрашиваемости кальций-мурексидного комплекса от рН и нашли, что самая большая разница между абсорбционными спектрами свободного от кальция мурексиды и мурексиды, содержащего кальций, имеется при рН 11,3. Ими также было показано, что наибольшая поглощаемость света имеется при 506 микрон.

Г. Г. Каранович [2] предложил более простую модификацию мурексидного метода. Он применил насыщенный водный раствор мурексиды и едкий натр, и развившуюся после перемешивания с исследуемым материалом окраску сравнивал с окрасками эталонных растворов, содержащих известные количества кальция. Этим методом можно определить около 2 гамм кальция в 5 мл раствора.

Имеющаяся отечественная фотоэлектроколориметрическая аппаратура делает возможным более точное и объективное измерение небольших количеств кальция в небольших количествах исследуемого материала, что очень важно для биохимического исследования.

Поэтому мы задались целью, используя известные свойства кальций-мурексидного комплекса, применить их для фотоэлектроколориметрического метода определения малых количеств кальция в биологическом материале. Нами был использован широко распространенный в Советском Союзе фотоэлектрокалориметр типа ФЭК—М (С. А. Балахановский и И. С. Балахановский [1]).

**Принцип метода.** Количество кальция определяется по степени изменения окрашиваемости мурексида, которая зависит от количества образованного кальций-мурексидного комплекса. Кальций в исследуемом материале определяется по построенной нижеследующим образом калибровочной кривой.

**Реактивы.** 1). Раствор хлористого кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), содержащий 100 гамма  $\text{CaCl}_2$  или 36 гамма Са в 1 мл; 2) Раствор мурексида: 40 мг мурексида растворяется в 75 мл воды и доводится до 250 мл этиловым спиртом. 3) Раствор карбоната ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 0,1 М раствор карбоната натрия разбавляется перед опытом в два раза (рН 11, 3).

**Построение калибровочной кривой.** В две кюветы, имеющие емкость 5 мл (толщина кюветы 10 мм), вводится по 2 мл раствора мурексида, 1 мл карбонатного раствора. В обе кюветы приливается такое количество дистиллированной воды, чтобы объем всей смеси после добавления в правую кювету 0,1—0,2—0,3...1,0 мл раствора  $\text{CaCl}_2$ , в левую соответствующее количество дистиллированной воды, был равен 5 мл.

Прикрыв кюветы крышкой, несколько раз взбалтывать содержимое кювет и поставить их в колориметр. Барабан необходимо установить на нулевую точку (в качестве нулевой точки применялась экстинкция на левой шкале барабана, равная 0,050, но не 0,000, так как очень небольшая разница в толщине кювет или в количествах мурексида и воды может вывести нулевую точку за пределы шкалы), стрелка гальванометра при помощи рукоятки грубой и тонкой настройки клина доводится до нуля (необходимо точно следить за положением стрелки гальванометра, так как небольшие отклонения стрелки гальванометра сильно отражаются на показаниях шкалы). Установление на нулевую точку необходимо производить через 1 мин. после взбалтывания содержимого кювет, чтобы появляющиеся при взбалтывании пузырьки воздуха не мешали определению. Затем кюветы необходимо вынуть из гнезд фотоэлектроколориметра, в правую кювету добавить 0,1—0,2—0,3 .....1,0 мл раствора хлористого кальция, содержащего 3,6—7,2—10,8 ...36 гамма Са, а в левую соответствующее количество дистиллированной воды. Затем кюветы необходимо прикрыть крышкой, взбалтать и поместить их в гнезда фотоэлектроколориметра и через 1 мин. определить степень отклонения вращением рукоятки барабана до тех пор, пока стрелка гальванометра не установится на нуле. Затем из полученного показания необходимо вычесть 0,050 (нулевая точка). Разница даст степень поглощения данным количеством кальция при данном рН и в данном объеме. Данные по получению калибровочной кривой и калибровочная кривая (с пересчетом на кальций) приведены в табл. 1 и рис. 1.

Таким образом, данным методом можно определить около 1—1,5 гамма Са в одном мл исследуемого раствора. При этом он очень прост, требует мало времени (анализ можно провести за 4—5 мин.), и что очень ценно, можно довольствоваться малым количеством исследуемого материала (0,1—1,0 мл).

Таблица 1

Получение калибровочной кривой для  $\text{CaCl}_2$ 

		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
		правая	левая																
Нач. объем воды*		1,9		1,8		1,7		1,6		1,5		1,4		1,3		1,0		0,5	
Добавле- ние (в мл)	воды	— 0,1		— 0,2		— 0,3		— 0,4		— 0,5		— 0,6		— 0,7		— 1,0		— 1,5	
	$\text{CaCl}_2$	0,1		— 0,2		— 0,3		— 0,4		— 0,5		— 0,6		— 0,7		— 1,0		— 1,5	
Экстинкция		0,023		0,043		0,062		0,093		0,118		0,142		0,162		0,231		0,311	

\* Плюс 2 мл раствора мурексида и 1 мл карбоната натрия.

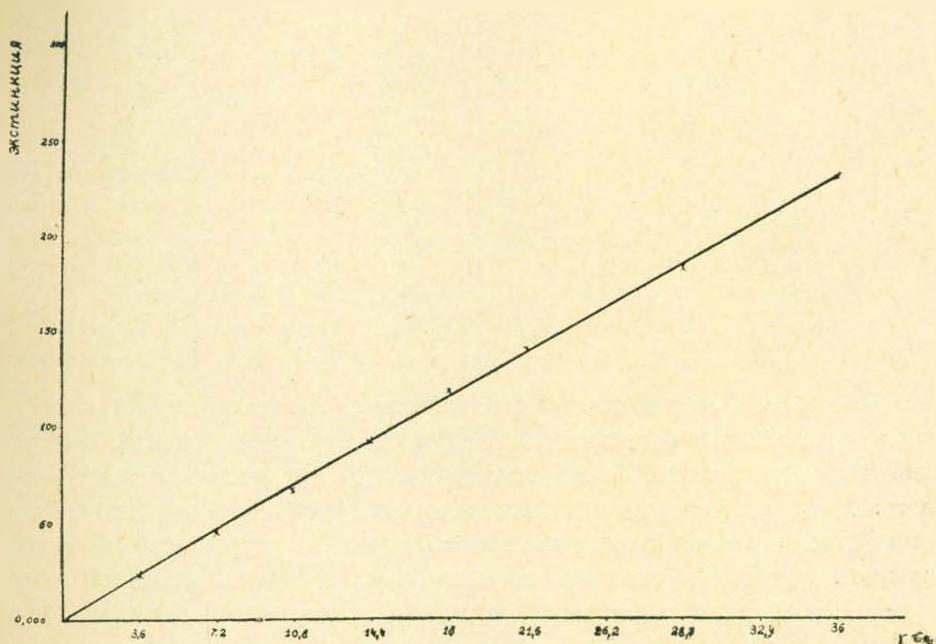


Рис. 1. Калибровочная кривая для Ca в карбонатном растворе.

**Специфичность метода.** Уиллиамс и Мозер [7] показали, что при использовании боратного буфера и  $\text{NaOH}$  максимальные концентрации натрия, калия, магния и бария, не вызывающие какого-либо изменения в характере калибровочной кривой, были соответственно 300, 500, 5—10,5 мг/литр. По данным Н. Г. Фесенко [3], медь и цинк мешают определению кальция, однако подобное действие названных катионов он рассматривает в связи с титрацией трилоном Б. Что же касается магния, то, по данным Фесенко, он не мешает определению, если его количество менее 50 мг/литр, то есть 50 гамма в 1 мл, однако Фесенко признает, что  $\text{Mg}$  может влиять на результат. Для применения данного метода в биохимической практике большое значение имеет специфичность метода, то

есть обладает ли подобной реакцией только кальций, или эта реакция присуща также другим катионам, так как биологические жидкости или экстракты, которые являются предметом биохимического исследования, представляют собой смесь самых различных веществ.

Для проверки специфичности реакции нами был исследован ряд одновалентных, двухвалентных и трехвалентных катионов. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2  
Экстинкция различных веществ

Вещество	Количество			
	10γ	100γ	1 мгр	10 мгр
NaCl	—	0	0	0
KCl	—	0	0	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	0	0	0,047
CaCl <sub>2</sub>	0,023	0,231	—	—
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,030	0,289	—	—
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	—	0,252	—	—
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,055	0,547	—	—
CdCl <sub>2</sub> ·2,5H <sub>2</sub> O	—	0,240	—	—
BaCl <sub>2</sub>	—	0	0	помутнение
ZnCl <sub>2</sub>	0,190	0,630	—	—
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,050	0,570	—	—
NiCl <sub>2</sub>	0,096	0,770	—	—
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	—	0	0	—
HgSO <sub>4</sub>	—	0	0	—
MnSO <sub>4</sub>	—	0,113?	—	—
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	—	0,000	0,013	0,017
FeCl <sub>3</sub>	—	0	0	—

Из таблицы видно, что из одновалентных катионов натрий, калий и аммоний в сто раз больших концентрациях не дают никакой цветной реакции с мурексидом. То же самое относится и к трехвалентному железу и алюминию. Из двухвалентных катионов барий, стронций и ртуть также не дают какой-либо видимой цветной реакции с мурексидом. В то время как магний, медь, кадмий, цинк, кобальт, никель и марганец образуют с мурексидом окрашенный комплекс, причем эти катионы дают более выраженную реакцию, чем кальций (рис. 2). Как видно из рисунка, мурексидным методом можно определить не только кальций, но и магний, медь, кадмий, цинк, кобальт и никель, для этого необходимо построить соответствующие калибровочные кривые. Таким образом, комплексообразование мурексида с кальцием не является специфической реакцией. Отсутствие специфичности несколько затрудняет применение данного метода. Для биохимического анализа особенно нежелательным является реакция мурексида с магнием, так как именно магний находится в таких количествах в животных и растительных организмах, которые могут мешать определению кальция, в то время как все остальные катионы находятся в биологическом материале в значительно меньших количествах и не могут служить помехой для определения кальция.

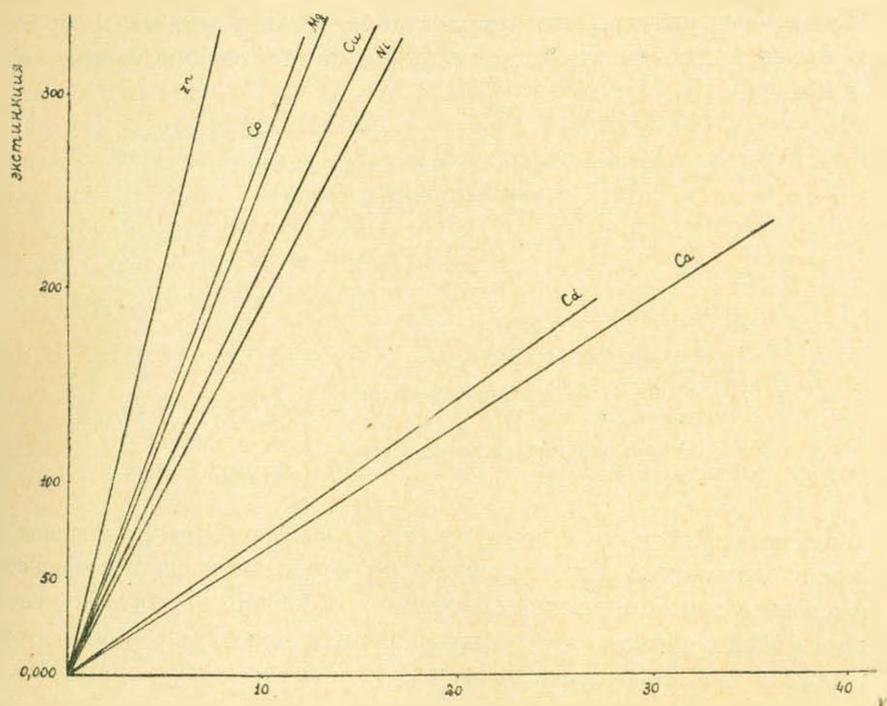


Рис. 2. Калибровочные кривые для двухвалентных катионов.

Н. Г. Фесенко [3] отрицает образование комплекса магний-мурексид. В наших же опытах данный комплекс образуется. Фесенко применял в своих опытах водный раствор мурексида, тогда как мы применяли спиртовой раствор. Можно было предположить, что причина расхождения наших данных заключается в растворе мурексида. Для решения этого вопроса мы поставили несколько опытов с водным раствором мурексида. Данные приводятся в табл. 3.

Таблица 3  
Зависимость экстинкции от характера раствора мурексида

	М у р е к с и д	
	спиртовой раствор	водный раствор
CaCl <sub>2</sub> (100γ)	0,240 0,244	0,173 0,170
MgCl <sub>2</sub> (100γ)	0,283 0,287	0,075 0,079

Данные табл. 3 показывают, что при употреблении водного раствора мурексида реакция окрашивания уменьшается для Ca на 30%, а для Mg на 73%, то есть почти в 2,5 раза. Таким образом, применение водного раствора мурексида в очень большой степени маскирует или замедляет комплексообразование с магнием.

Необходимо указать, что комплексообразование магния с мурексидом в большей степени зависит от pH, чем комплексообразование кальция (табл. 4).

Таблица 4  
Зависимость комплексообразования кальция и магния от pH среды

	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>
pH 7 (смесь без буфера) . . . . .	0,053	0
pH 8,5 (боратный буфер) . . . . .	0,171	0
pH меньше 11,3 (десятидневный карбонатный раствор) . . . . .	0,218	0,170
pH 11,3 (свежеприготовленный карбонатный раствор) . . . . .	0,240	0,285

Можно возразить, что, применяя спиртовой и водный растворы, мы создаем неодинаковую реакцию среды, что в конечном счете сказывается на чувствительности мурексидной реакции. Конечно, резкого изменения реакции среды в данном случае быть не может, что и было нами проверено. Однако, чтобы проверить возможность влияния небольшого изменения pH при использовании водного раствора мурексида, степень которого мы не в состоянии были определить из-за незначительного изменения (что, например, наблюдается при использовании относительно старого карбонатного раствора, когда реакция для кальция и в значительной большей степени для магния изменяется), мы использовали разные количества карбонатного раствора, предполагая, что с увеличением количества карбонатного буфера небольшие изменения pH, если даже они могут иметь место, должны быть сведены на нет. Эти данные приведены в табл. 5.

Таблица 5  
Зависимость экстинкции от количества карбоната

	Карбонатный раствор (в мл)	Мурексид	
		спиртовой раствор	водный раствор
CaCl <sub>2</sub> (100%)	0,5	0,241	0,170
	1,0	0,242	0,173
	1,0	—	0,170
	2,0	0,230	0,153
	2,0	0,249	0,154
MgCl <sub>2</sub> (100%)	0,5	0,260	—
	0,5	0,262	—
	1,0	0,287	0,075
	1,0	0,283	0,079
	2,0	0,254	0,077

Из табл. 5 видно, что уменьшение реакции при использовании водного раствора мурексида не зависит от изменения pH среды.

Таким образом, использование спиртового раствора повышает чувствительность данного метода, в особенности к магнию.

Далее, причина отсутствия комплексообразования с магнием в опытах Фесенко может заключаться в применении им едкого натра, так как водный раствор мурексида в среде с карбонатом еще способен, правда, в меньшей степени, образовывать комплекс с магнием.

Для выяснения данного вопроса мы получили калибровочные кривые для  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$ , используя вместо карбонатного буфера 1 нормальный раствор едкого натра (рис. 3). Оказалось, что в этом случае

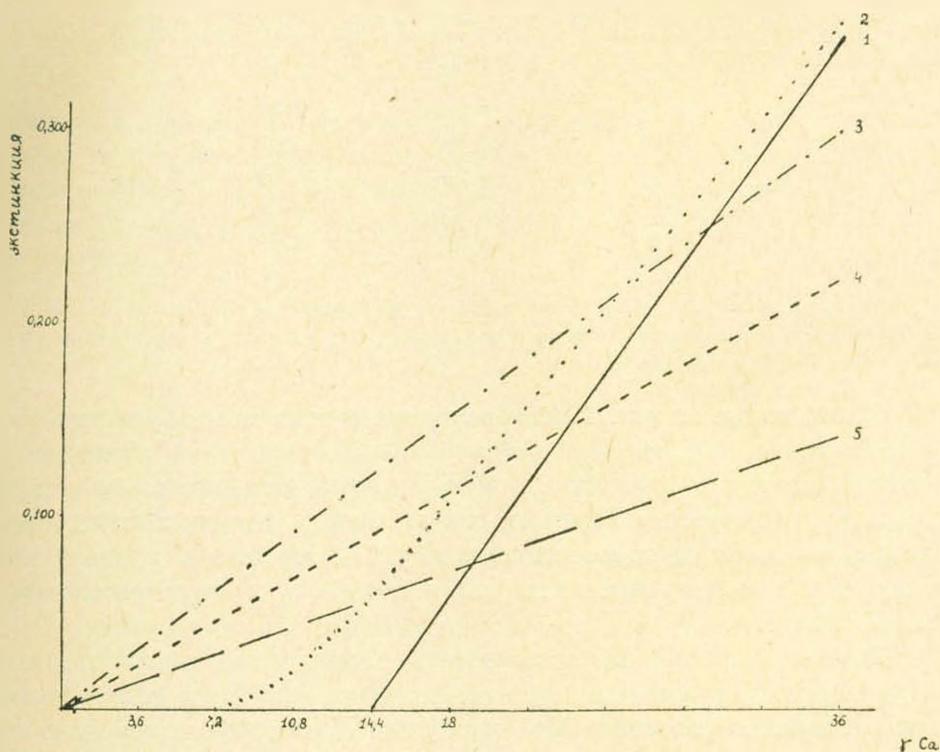


Рис. 3 Калибровочные кривые для Ca в 1N NaOH. 1) 0,05 мл NaOH, 2) 0,1 мл, 3) 0,5 мл, 4) 1,0 мл, 5) 1,5 мл.

имеется большая зависимость между количеством NaOH и формой калибровочной кривой. При малых количествах NaOH (0,05 мл) количества Ca до 10 гамма совершенно не дают реакции, в то время как 36 гамма дает экстинкцию большую, чем при использовании карбонатного раствора. С увеличением количества NaOH малые количества Ca постепенно начинают проявляться, однако, экстинкция при больших концентрациях Ca заметно уменьшается. Интересно отметить, что Mg совершенно не дает цветной реакции с мурексидом, если в среде имеется не карбонат, а NaOH как в больших, так и в малых количествах. В этом случае наши результаты полностью совпадают с результатами Фесенко. Необходимо только отметить, что категорическое утверждение Фесенко о том, что Mg не образует комплекса с мурексидом неверно, так как при соответствующем

ших условиях (карбонатный буфер) такое комплексообразование имеет место. Угнетающее действие NaOH на комплексообразование магнием и другими катионами (табл. 6) не совсем ясно, так как в данном случае оно, по всей вероятности, не зависит от изменения pH.

Таблица 6  
Влияние NaOH (0,1 мл 1N) на экстинкцию

Вещество (100γ)	Карбонатный раствор	NaOH (0,1 мл)
CuSO <sub>4</sub>	0,557	0,496
ZnCl <sub>2</sub>	0,630	0,389
CdCl <sub>2</sub>	0,240	0,035
CaCl <sub>2</sub>	0,240	0,356
MgCl <sub>2</sub>	0,283	0,000
NiCl <sub>2</sub>	0,770	0,945*

\* При использовании карбоната реакция заканчивается на первой же минуте — тогда как при использовании NaOH реакция очень замедлена, и экстинкция достигает максимума только через 15 мин.

Приведенные на рис. 3 калибровочные кривые могут быть использованы для количественного определения Ca в исследуемом материале. В зависимости от того, сколько Ca имеется в последнем, можно выбрать ту или иную калибровочную кривую, или же в смесь наряду с исследуемым материалом добавить точное количество (10—15γ) кальция и уже потом, измерив экстинкцию, определить количество Ca в исследуемом материале по разнице.

Возможно ли, однако, использовать данный метод для определения Ca в растворе, где имеется Mg, если применяя NaOH, мы можем исключить комплексообразование Mg—мурексида? Возможно, если Mg не мешает комплексообразованию Ca-мурексида, независимо от того, образует ли он сам комплекс с мурексидом или нет. Даже более того, данным методом можно определить не только Ca, но и Mg, для этого необходимо определить экстинкцию раствора, где имеется и Ca и Mg в карбонатном буфере, а затем в NaOH. Первое определение даст количество Ca плюс Mg, второе — количество Ca, а разница — количество Mg. Из табл. 7 видно, что такое раздельное определение Ca и Mg в смеси возможно, однако, к сожалению, оно не очень точное, и ошибка увеличивается с увеличением количества обоих компонентов.

При использовании карбонатного буфера получаются заниженные результаты, то есть Ca и Mg как бы «мешают» друг другу, а при использовании NaOH получаются несколько завышенные результаты, то есть происходит как бы «демаскировка» Mg-мурексидного комплекса. В итоге получается ошибка около 10—15%. Так как этот метод очень прост и не требует много времени, то он может быть рекомендован для некоторых

Таблица 7

## Определение Ca и Mg в смеси

	Компоненты	Найдено	Должно быть	Отклонение
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub> (30γ) — MgCl <sub>2</sub> (70γ)	0,223	0,244	-0,021
	CaCl <sub>2</sub> (50γ) — MgCl <sub>2</sub> (50γ)	0,222	0,240	-0,018
	CaCl <sub>2</sub> (50γ) — MgCl <sub>2</sub> (50γ)	0,220	0,240	-0,020
NaOH	CaCl <sub>2</sub> (50γ) — MgCl <sub>2</sub> (50γ)	0,120	0,112	+0,008
	CaCl <sub>2</sub> (50γ) — MgCl <sub>2</sub> (50γ)	0,118	0,112	+0,006
	CaCl <sub>2</sub> (70γ) — MgCl <sub>2</sub> (30γ)	0,211	0,193	+0,018
	CaCl <sub>2</sub> (100γ) — MgCl <sub>2</sub> (10γ)	0,352	0,350	+0,002
	CaCl <sub>2</sub> (100γ) — MgCl <sub>2</sub> (30γ)	0,376	0,350	+0,026

серийных исследований, где подобная ошибка допустима. Конечно, эти ошибки могут быть устранены при помощи соответствующих подсчетов отклонений от истинного количества Ca и Mg. Однако для подобных расчетов необходимы специальные исследования и построение соответствующих кривых.

## Выводы

Разработан фотоэлектроколориметрический метод количественного определения кальция с использованием мурексида (пурпурата аммония). Данным методом можно определить от 1 до 50 γ Ca в одном мл исследуемого материала, причем достаточно иметь всего 0,1—1,0 мл раствора. Метод очень прост, требует мало времени и очень удобен для серийных исследований.

Подобраны условия, при которых данный метод может быть использован для количественного определения цинка, меди, кобальта, никеля, кадмия и магния. Само собой разумеется, что исследуемый материал должен содержать какой-нибудь один из вышеназванных катионов, либо они должны быть разделены другими химическими методами.

Данным методом возможно прямое определение Ca и Mg в одной навеске без предварительного разделения.

Мурексидный фотоэлектроколориметрический метод определения кальция и вышеперечисленных двухвалентных катионов рекомендуется для аналитических, биохимических, гидрохимических, агрохимических и других исследований.

## Գ. 2 ՓՈՏՈՆՅԱՆ

ԿԱԼՑՖՈՒՄԻ ԵՎ ՄԻ ՔԱՆԵ ԱՅԼ ԵՐԿՎԱԼԵՆՏ ԿԱՏԻՈՆՆԵՐԻ ՈՐՈՇՄԱՆ  
ՄՈՒՐԵՔՍԻԳԱՅԻՆ ՄԵԹՈԴ

(Ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրիկ մեթոդ)

## Ա մ փ ո փ ու մ

Կալցիումի քանակական որոշման համար մշակված է ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրիկ մեթոդ մոլբեքսիդի (ամոնիում պոպուրատ) օգտագործման հետ միասին: Այս մեթոդով կարելի է որոշել 1-ից մինչև 50  $\gamma$  կալցիումի, ընդ որում բավական է անհնար ընդամենը 0,1-ից մինչև 1 մլ հետազոտվող նյութի լուծույթ, Տվյալ մեթոդը շատ պարզ է, պահանջում է կարճ ժամանակ և շատ հարմար է սերիական հետազոտությունների համար:

Այս մեթոդը որոշ պայմանների առկալու թյամբ կարելի է օգտագործել նաև Zn, Cu, Co, Ni, Cd և Mg քանակական որոշումների համար: Ինքնրասինքյան հասկանալի է, որ հետազոտվող նյութը պետք է պարունակի վերոհիշյալ կատիոններից որևէ մեկը, կամ նրանք այլ քիմիական մեթոդներով պետք է բաժանվեն մեկը մյուսից:

Տվյալ մեթոդով կարելի է որոշել կալցիումը և մագնեզիումը մեկ նմուշով, առանց նրանց նախնական բաժանման: Կալցիումի և վերոհիշյալ երկվալենտ կատիոնների մոլբեքսիդային ֆոտոէլեկտրամետրիկ մեթոդը հնարավոր է կիրառել անալիտիկ, քիսքիմիական, հիպոքիմիական, ագրոքիմիական և այլ հետազոտությունների ժամանակ:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Балаховский С. А. и Балаховский Н. С. Методы химического анализа крови, 1953.
2. Каранович Г. Г. Труды Всесоюзного научно-исследовательского института химических реактивов, вып. 21. Госхимиздат, стр. 48, 1956.
3. Фесенко Н. Г. Заводская лаборатория, т. XX, 6, стр. 681, 1954.
4. Schwarzenbach G., Gysling H. Helv. Chim. Acta 32, 1314, 1919.
5. Ostertag H., Rinck M. Comp. Rend. 251, № 23, 1304, 1950.
6. Ostertag H., Rinck M. Chim. anal. 34, 108, 1952.
7. Williams M., Moser J. Anal. Chem. 25, 9, 1414, 1953.