



$\text{Ca}^{2+}$  și compușii biologici, cu care se asociază, să fie neglijabilă, trebuie să se calculeze cantitatea de TMM care adăugată unei probe să nu asocieze mai mult de 2% din calciul ionic prezent în aceasta.

$$\text{Din (1) rezultă: } [\text{Ca}^{2+}] = [\text{Ca}^{2+}_{\text{total}}] - [\text{TMMCa}^+] \quad (4)$$

$$[\text{TMM}^-] = [\text{TMM}^-_{\text{total}}] - [\text{TMMCa}^+] \quad (5)$$

$$\text{Punem condiția: } [\text{TMMCa}^+] = \frac{2}{100} [\text{Ca}^{2+}_{\text{total}}] \quad (6)$$

Înlocuind  $[\text{TMMCa}^+]$  din (4) și (5) cu (6), apoi înlocuind  $[\text{Ca}^{2+}]$  și  $[\text{TMM}^-]$  din ecuațiile obținute și  $[\text{TMMCa}^+]$  din (6) în (2) și dînd valoarea  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{total}}] = 10^{-3}$  M, după simplificări rezultă:

$$[\text{TMM}^-_{\text{total}}] = 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad (7)$$

La această concentrație de indicator se ajunge dacă, de exemplu, la 5 ml probă se adaugă 0,2 ml soluție TMM 30 mg $\%$ . Un gram de TMM este suficient pentru a analiza în acest fel 15 000 de probe.

Pentru ca erorile de măsurare ale volumelor de probe și indicator să nu afecteze rezultatele, citirea extincției E se face la două lungimi de undă: 1 și 2. Se calculează apoi rapoartele  $R_p = \frac{E_1}{E_2}$  (8)

Acestea se reprezintă grafic în funcție de activitățile corespunzătoare ale calciului ionic, obținînd astfel curba de etalonare. Înlocuind valorile  $R_p$  cu  $R_c = R_p - R_m$ , unde  $R_m$  este raportul extincțiilor soluției lipsită de calciu, se plasează punctul de plecare al curbei în originea axelor de coordonate.

După cum va rezulta și din curbele de absorbție optică ale soluțiilor de indicator (fig. nr. 1), în extincția măsurată la o anumită lungime de undă participă ambele forme colorate ale acestuia.

$$E = (A_{\text{TMMCa}^+}) \cdot [\text{TMMCa}^+] + (A_{\text{TMM}^-}) \cdot [\text{TMM}^-] \quad (9)$$

unde factorii A sînt absorbțiile optice molare ale celor două forme. Împărțind (9) prin  $[\text{TMM}^-]$  și înlocuind în (3) rezultă, pentru cele două lungimi de undă:

$$R_p = \frac{(K \cdot A^1_{\text{TMMCa}^+}) \cdot (a_{\text{Ca}^{2+}}) + (A^1_{\text{TMM}^-})}{(K \cdot A^2_{\text{TMMCa}^+}) \cdot (a_{\text{Ca}^{2+}}) + (A^2_{\text{TMM}^-})} \quad (10)$$

Se vede că  $R_p$  este o funcție neliniară de  $a_{\text{Ca}^{2+}}$  ceea ce face ca curbele de etalonare să fie neliniare pe întreg domeniul de concentrație.

Activitățile calciului au fost calculate cu o formulă rezultată din teoria Debye-Hückel:

$$\log(a_{\text{Ca}^{2+}}) = \log[\text{Ca}^{2+}] - \frac{2,04\sqrt{I}}{1 + 1,97\sqrt{I}} \quad (11)$$

### Partea experimentală. Rezultate și discuții

Întrucît TMM nu se comercializează, noi l-am sintetizat pornind de la 50 de grame de cafeină [9, 10]. Aceasta a fost oxidată cu hipoclorit de sodiu după care prin tratare cu clorura stanoasă s-a obținut tetrametil

aloxantină. TMM a rezultat prin tratarea acesteia cu carbonat de amoniu. După mai multe recristalizări ale TMM din soluții concentrate de clorură de amoniu au fost obținute circa 2 grame de substanță uscată. Ca substanță de comparație ne-am folosit de TMM livrat ca mostră de laboratoarele CALBIOCHEM, SAN DIEGO, CALIFORNIA, 92112, U.S.A. În tabelul de mai jos sînt prezentate rezultatele analizei elementare ale celor doi indicatori:

Elementul	TMM (teoretic)	TMM (CALBIOCHEM.)	TMM (I.M.F. Tg. Mureș)
C %	42,3	42,9	41,9
N %	24,7	24,4	23,5
H %	4,7	5,2	5,0

Analiza spectrofotometrică a indicatorilor a constat în trasarea la un spectrofotometru Specord UV VIS a curbelor de absorbție optică ale soluțiilor de indicatori (curbele 1 și 1'), ale soluțiilor conținând fiecare indicator și 10 mg<sup>10</sup>Ca<sup>2+</sup> (curbele 2 și 2'), respectiv 400 mg<sup>10</sup>Ca<sup>2+</sup> (curbele 3 și 3'; fig. nr. 1).

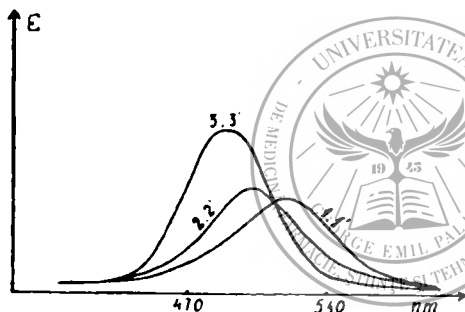


Fig. nr. 1

Din figură rezultă că curbele corespunzătoare celor doi indicatori se suprapun.

Pentru a obține curba de etalonare s-a folosit o serie de soluții standard de CaCl<sub>2</sub> de concentrații cunoscute ale căror activități au fost calculate cu formula (11). Ca indicator s-a folosit TMM sintetizat de noi.

La 5 ml soluție standard au fost adăugați 0,2 ml soluție TMM 30 mg<sup>10</sup>. Extincțiile au fost măsurate la un spectrofotometru VSU2-P în cuve de 1 cm. Cele două lungimi de undă au fost: 470, respectiv 540 nm. S-au ales astfel deoarece maximele de absorbție optică ale celor două forme colorate ale TMM sînt apropiate. Valorile R<sub>c</sub> au fost reprezentate grafic în funcție de activitatea calciului (fig. nr. 2).

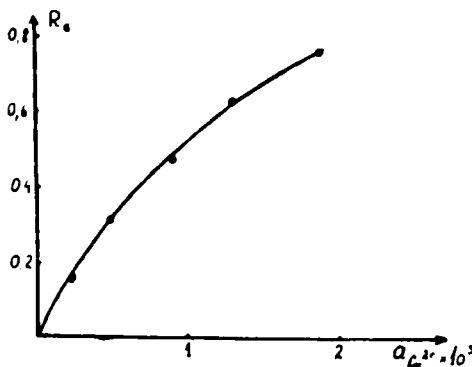


Fig. nr. 2

În figura 3 se vede că TMM nu este un indicator acido-bazic, cel puțin în intervalul de  $\text{pH} = 5-9$ . Pentru aceasta au fost folosite soluții, având aceiași activitate a calciului ionic, însă valori ale  $\text{pH}$ -ului diferite. În această figură apare și comportarea murexidului față de aceeași soluții.

Răspunsul TMM la alți ioni metalici ca  $\text{Mg}^{2+}$  și  $\text{Na}^+$  apare ilustrat în figura nr. 4. Se vede că dacă  $\text{Mg}^{2+}$  se găsește în concentrații comparabile cu cele ale calciului, el nu deranjează dozarea spectrofotometrică a calciului ionic cu TMM. La aceeași concluzie se ajunge în ce privește  $\text{Na}^+$ . Uneori, mai ales în lichidele biologice,  $\text{Na}^+$ , se găsește în concentrații incomparabil mai mari, decât cele ale calciului.

În aceste situații, pentru ca efectul  $\text{Na}^+$  asupra răspunsului indicatorului să nu influențeze rezultatele, la obținerea curbei de etalonare se folosesc soluții standard, conținând  $\text{NaCl}$  în aceeași concentrație cu cea a probei. Dacă concentrația  $\text{NaCl}$  variază mult de la o probă la alta, concentrația calciului ionic se calculează cu formula (11).

Practic se procedează astfel: se ia volumul dorit de probă la care se adaugă cantitatea de indicator corespunzătoare raportului 5 ml probă/0,2 ml indicator. Se măsoară extincțiile la 470 și 540 nm în cuve de capacitate convenabilă, folosind drept martor soluția necunoscută la care în locul indicatorului se adaugă apă. Se calculează valoarea  $R_c$  care se transformă cu ajutorul curbei de etalonare în activitate a calciului. Forța ionică se calculează pe baza concentrației  $\text{NaCl}$  din probă care la rîndul ei se poate afla folosind o metodă titrimetrică uzuală. Introducînd în formula (11) activitatea calciului și forța ionică se află concentrația calciului ionic.

Un mijloc mai practic de trecere de la activitate la concentrația calciului ionic l-ar putea constitui o nomogramă bazată pe formula (11).

În concluzie, lucrarea, care reprezintă o primă etapă în elaborarea unei tehnici de determinare a calciului ionic în lichide biologice, stabilește raportul dintre cantitatea de probă și cea de TMM, astfel încît indi-

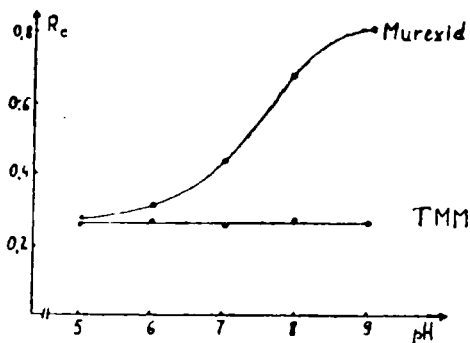


Fig. nr. 3

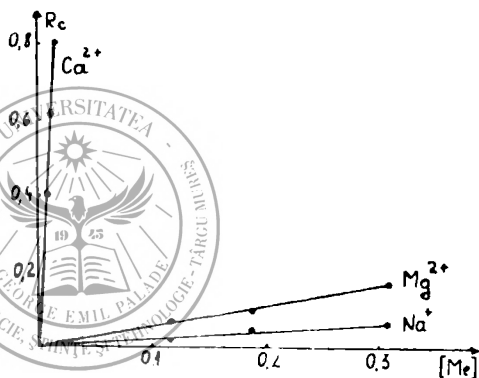


Fig. nr. 4

catorul să nu perturbe sensibil echilibrul chimic la care participă ionii de calciu. Evaluarea efectului pH-ului și a altor cationi asupra TMM sintetizat de autori, arată că acesta nu este un indicator acidobazic, iar  $\text{Na}^+$  și  $\text{Mg}^{2+}$  în concentrații mici nu deranjează determinarea calciului ionic.

### Bibliografie

1. Raaflaub J.: Z. Physiol. Chem. (1951), 288, 228; 2. Lumb G. A.: Clin. Chim. Acta (1963), 8, 33; 3. Raaflaub J.: Z. Physiol. Chem. (1962), 328, 198; 4. Cham B. E.: Clin. Chim. Acta (1972), 37, 5; 5. Putman J. M.: Clin. Chim. Acta (1972), 37, 33; 6. Robertson W. G.: Clin. Chim. Acta (1969), 24, 149; 7. French T., Cham B. E., Cross R. B.: Lab. Pract. (1972), 21, 333; 8. Cope A. C., Heyl D., Peck D., Eide C., Arroyo A.: J. Amer. Chem. Soc. (1941), 63, 356; 9. French T. J., Cham B. E., Cross R. B.: Lab. Pract., (1971), 20, 424.

Sosit la redacție: 24 ianuarie 1981

Șt. Hobai, T. Goina, M. Rocsin, Maria Făgărășan, Eugenia Goina, Ana Iazigin

### A METHOD OF DIRECT ASSAY OF IONIC CALCIUM WITH TETRAMETHYL-MUREXIDE

The paper presents the results of the first stage of creating a technique for the direct assay of ionic calcium in biological liquids.

After presenting some data on the purity of tetramethyl-murexide (TMM) synthesized by the authors, the calculation is shown, by which the ratio between the sample quantity and that of TMM is established in such a way that the indicator might not interfere considerably with the chemical equilibriums in which the calcium ion participate. It has been found that to 5 ml of solution with a calcium concentration near the values in biological liquids 0.2 ml solution of TMM 30 mg % can be added. The assessment of the pH effect and of other cations upon TMM shows that this is not an acid-base indicator in the pH interval: 5—9, and  $\text{Na}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in low concentrations do not interfere.