

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ БІЛКА АЛЬБУМІНУ ЛЮДСЬКОГО З АЗОБАРВНИКОМ ТРОПЕОЛІНОМ О

М. Бойко^{1,2}, О. Коркуна¹, М. Ридчук², Т. Врублевська¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Кирила і Мефодія, 6, Львів 79005, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок
вул. Донецька, 11, Львів 79019, Україна
e-mail: boiko_maria@ukr.net

Вивчено взаємодію білка альбуміну людського з кислотним моноазобарвником тропеоліном О (ТрО). Встановлено оптимальні умови утворення сполуки альбуміну з ТрО: рН=4,0 на фоні 0,07 М ацетатного буферного розчину, час утворення – 20 хв (t=20°C); рН=9,0 на фоні 0,03 М розчину натрій тетраборату; час утворення – 15 хв (t=20°C) за наявності 35-кратного надлишку реагента в обох випадках. Розроблено спектрофотометричну методику визначення альбуміну за зменшенням максимуму поглинання нез'язаного барвника при $\lambda_{\max}=385$ нм (рН=4,0) та $\lambda_{\max}=430$ нм (рН=9,0). Межі лінійності: 10–150 мкг/мл при рН=4,0 і 10–100 мкг/мл при рН=9,0 відповідно. Досліджено селективність спектрофотометричного визначення альбуміну в присутності амінокислот і казеїну. Розроблені методики успішно апробовані.

Ключові слова: альбумін людський, тропеолін О, спектрофотометрія, супрамолекулярна взаємодія.

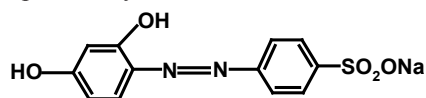
Кількісне визначення протеїнів у людських рідинах давно є одним із важливих клінічних тестів; неінвазивний тест на білок у сечі є поширеним рутинним тестом, що використовується в багатьох установах для легкого діагностування захворювань нирок.

Спектрофотометрія – один із традиційних методів кількісного аналізу білків. Як реагенти у спектрофотометричних методиках використовують барвники, комплекси металів з органічними лігандами. Проте розроблені методики є складними і практично неселективними.

Серед методів визначення альбуміну найчутливішими є електрофоретичні [5], а також спектрофотометричні [8, 12–14, 16, 18, 27, 32, 34, 36] та флуориметричні [10, 15, 17, 29–31, 33, 35]. Однак електрофоретичні методи не є достатньо простими й експресними, а більшості спектрофотометричних методик визначення білків властиві певні недоліки: 1) не досліджено або не вказується вплив сторонніх компонентів; 2) невисока селективність щодо інших білків і амінокислот; 3) складна процедура проведення експерименту: використання органічних розчинників, нагрівання, центрифугування, внаслідок чого зростає тривалість аналізу та похибка визначення. Тому пошук простих, чутливих, селективних і доступних методик визначення альбуміну є актуальним.

Серед кислотних моноазобарвників для визначення альбуміну використовують тропеолін ОО-ІІ [9, 23, 25] та оранжевий Ж [11], які утворюють супрамолекулярні сполуки і дають змогу визначати мікрограмові кількості білка. Однак даних щодо вивчення селективності таких реакцій у присутності амінокислот і білків немає. Застосування кислотного азобарвника тропеоліну О як спектрофотометричного реагента відоме лише для визначення іонів Pd(ІІ) [26, 28] та Os(ІV) [2]. Однак варто зазначити, що тропеолін О є доступним і дешевим аналітичним реактивом.

Тропеолін О (натрієва сіль 2',4'-диоксиазобензолсульфо кислоти, кислотний жовтий, кислотний оранжевий 6) – найпростіший представник моноазобарвників тропеолінового ряду. Структурна формула тропеоліну О:



Це – оранжево-червоний порошок, розчинний у воді (0,2 г/100 г води), в спирті. Інтервал переходу забарвлення перебуває в межах рН=11,1 (жовтий) до рН=12,7 (червоно-бурий). $pK_{HL}=11,8$ [1, 3, 6, 7]. При рН=11,1 максимум поглинання барвника перебуває в діапазоні довжин хвиль 420–440 нм ($\epsilon_{\lambda}=3,3 \times 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹), при рН=12,7 – 475–495 нм ($\epsilon_{\lambda}=2,2 \times 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹). У кислотній ділянці при рН=3,5 максимум поглинання барвника спостерігається при 380 нм, де ТрО має жовте забарвлення [26].

У цій роботі ми представляємо результати досліджень взаємодії альбуміну людського з тропеоліном О для розробки нових селективних і чутливих спектрофотометричних методик визначення цього білка.

Експериментальна частина

Реагенти й апаратура

Усі водні розчини, які використовувались у роботі, готували на дистилляті.

Розчини альбуміну людського готували розчиненням точної наважки реактиву «Альбумин лиоф. (из человеческой сыворотки)» фірми «Реанал» (Будапешт, Угорщина), у дистильованій воді.

Розчини тропеоліну О готували розчиненням точної наважки реактиву фірми «Синбіас», кваліфікації «ч.д.а.», бромкрезолового зеленого готували розчиненням точної наважки реактиву кваліфікації «ч.д.а.» у дистильованій воді.

У роботі використовували розчини НСl (перегн.) і NaOH кваліфікації «хч» та СН₃СООН (льод.) кваліфікації «ч.д.а.». Розчини солей натрій хлориду, калій йодиду, амоній сульфату, натрій азиду, натрій тетраборату, натрій цитрату, натрій тартрату, купрум сульфату, цинку хлориду готували з відповідних реагентів кваліфікації «ч.д.а.»; розчини натрій гідрофосфату, натрій дигідрофосфату, натрій ацетату – з реактивів марки «хч». Розчини амінокислот метіоніну, лізину, треоніну, гістидину, триптофану, аргініну, лейцину, ізолейцину, валіну, фенілаланіну готували з відповідних реагентів фірми «Реахим» кваліфікації «хч».

Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі Specord M-40 (“Carl Zeiss Jena”, Німеччина), скануючому спектрофотометрі CARY.WIN – UV-VIS-50 (Varian, США) в кюветах $l=1$ см. Значення рН вимірювали рН-метром рН-150 М (РУП «Гомельський завод измерительных приборов», Білорусь) з аргентум хлоридним електродом порівняння.

Необхідне значення кислотності середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти і натрій гідроксиду.

Результати і їхнє обговорення

Електронні спектри поглинання розчинів тропеоліну О і розчинів сполуки ТрО з альбуміном у кислому та лужному середовищі представлені на рис. 1 (А, Б) відповідно.

Як видно зі спектрів абсорбції, максимальне світлопоглинання барвника спостерігається при 385 нм у кислому та при 430 нм у лужному середовищі. На спектрі сполуки при різних рН проявляється смуга поглинання від незв’язаного тропеоліну О, це свідчить

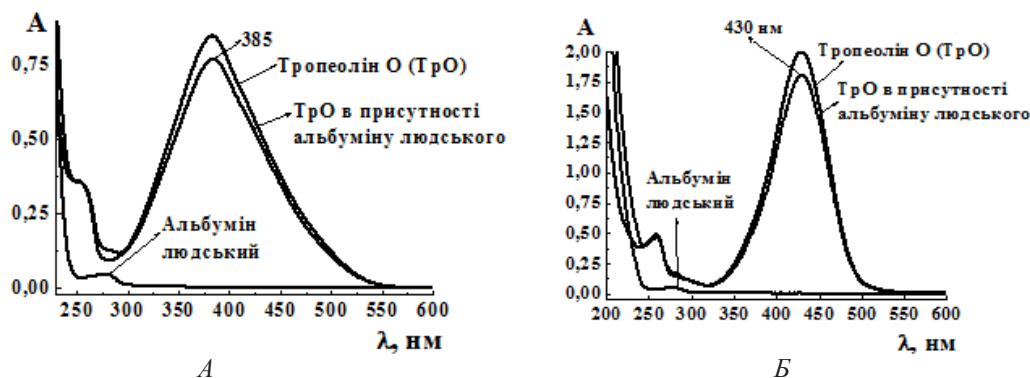


Рис. 1. Електронні спектри поглинання розчинів тропеоліну О ($C_{\text{TrO}}=5 \cdot 10^{-5}$ М) і розчинів тропеоліну О в присутності альбуміну людського ($C_{\text{блва}}=100$ мкг/мл): а – $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $l=1$ см; б – $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $l=1$ см.

про те, що барвник входить усередину глобули білка, і внаслідок цього екрануються його хромофорні групи. Такий тип взаємодії характерний для макромолекулярної сполуки – «господаря» з молекулою «гостя», наприклад, з молекулою барвника. Згідно з літературними даними [9, 11, 19, 20, 22, 24, 25], при взаємодії такого типу утворюються супрамолекулярні комплексні сполуки.

Тому для спектрофотометричних досліджень можна використовувати вимірювання зменшення інтенсивності світлопоглинання барвника (ΔA) при його взаємодії з альбуміном при λ_{max} тропеоліну О в кислій і лужній ділянках спектра, а саме при 385 нм і 430 нм відповідно. Для визначення оптичної густини розчинів у подальших дослідженнях використовували товщину поглинального шару $l=1$ см.

Вплив природи буферних систем і кислотності середовища. З метою створення стабільних умов для реакції комплексоутворення, підтримання оптимального значення рН середовища та для підвищення експресності методики визначення альбуміну людського з тропеоліном О потрібно було підібрати відповідну буферну суміш. Тому ми дослідили вплив природи та концентрації буферних розчинів у широкому інтервалі рН середовища на вихід сполук альбуміну з ТрО. Результати представлено на рис. 2.

На рис. 3 представлено результати досліджень впливу кислотності середовища у присутності деяких буферних систем при оптимальних концентраціях на взаємодію альбуміну людського з тропеоліном О.

Як видно з рис. 2, 3, максимальний вихід сполуки спостерігається на фоні 0,07 М ацетатної буферної суміші при рН=4,0, та на фоні 0,01 М натрій тетраборату при рН=9,0. Тому для подальших досліджень було обрано ці буферні розчини. Крім цього,

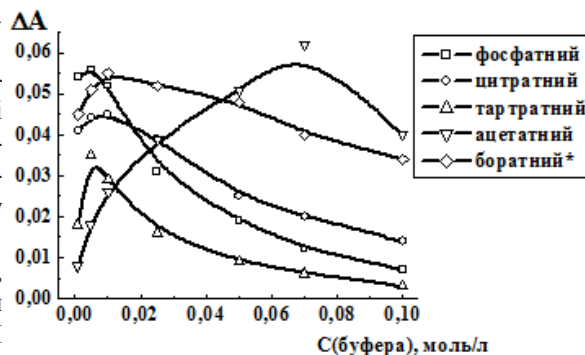


Рис. 2. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну людського від концентрації буферних систем. $C_{\text{блва}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{TrO}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см; рН=4,0; $\lambda=385$ нм (*рН=9,0; $\lambda=430$ нм).

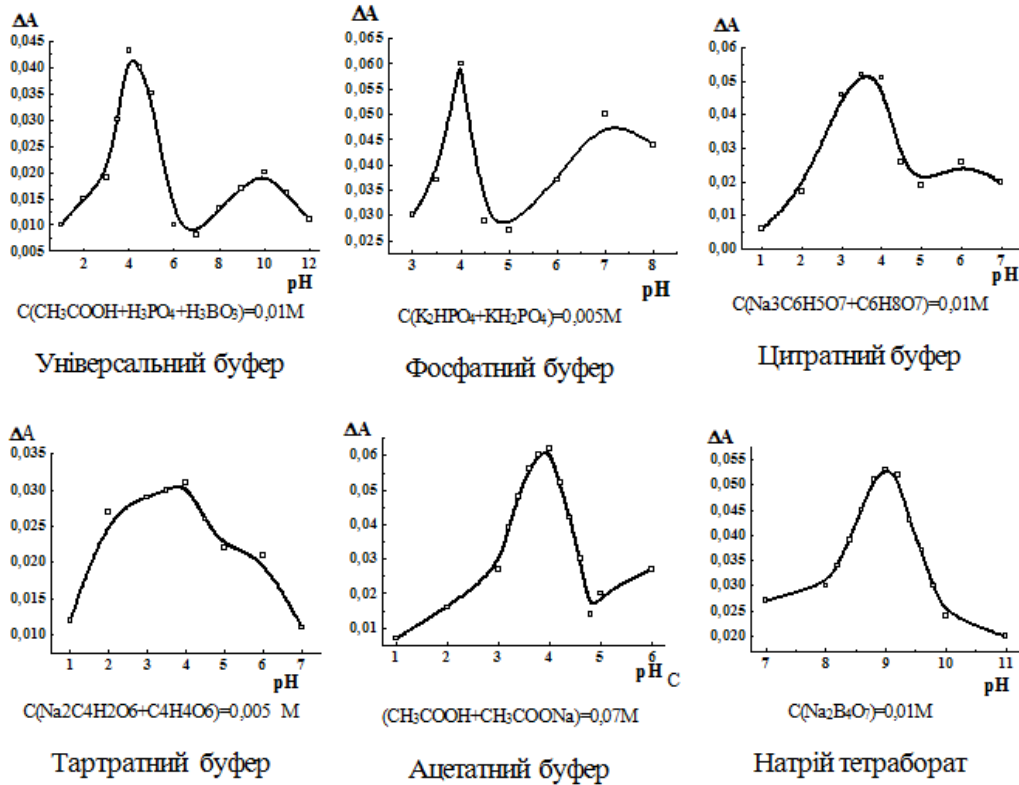


Рис. 3. Вплив природи буферних систем і кислотності середовища на утворення сполуки ТрО з альбуміном. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $t=1$ см.

вибрані буфери володіють достатньою ємністю в оптимальному для утворення комплексу інтервалі рН середовища, а саме при рН=4–6 та рН=8–10 відповідно.

Дослідження часу утворення та зберігання. Для встановлення оптимальних умов комплексоутворення ми дослідили вплив часу взаємодії на вихід комплексної сполуки альбуміну людського з тропеоліном О та часу її зберігання. Результати наведені на рис. 4 та 5.

Як видно з рис. 4, максимальний вихід сполуки спостерігається через 20 хв ($t=20^\circ\text{C}$) після змішування реагентів у присутності ацетатного буферу і залишається без змін упродовж 2 год. У присутності натрій тетраборату максимальний вихід сполуки спостерігається через 15 хв після змішування розчинів і залишається стабільним упродовж 1,5 год.

Дослідження тривалості зберігання комплексної сполуки альбуміну з тропеоліном О в часі (рис. 5) показують, що протягом перших 4-х годин спостерігається незначне зменшення оптичної густини розчину комплексу, проте з часом (до трьох діб) відбувається стабілізація інтенсивності світлопоглинання розчину. Після цього відбувається повільне руйнування комплексу.

Порядок змішування реагентів часто має значний вплив на максимальний вихід комплексних сполук. Тому нами досліджувався вплив порядку змішування реагентів на максимальний вихід сполуки альбуміну людського з тропеоліном О.

Як показали результати досліджень, наведені в табл. 1, максимальна різниця світлопоглинання в присутності альбуміну спостерігається при введенні розчину білка у розчин буферу, а потім додаванні реагента (№1). Це можна пояснити взаємодією тільки

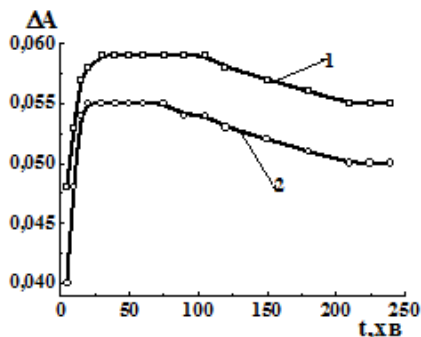


Рис. 4. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від часу утворення. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см. 1) $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 2) $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $\lambda=430$ нм.

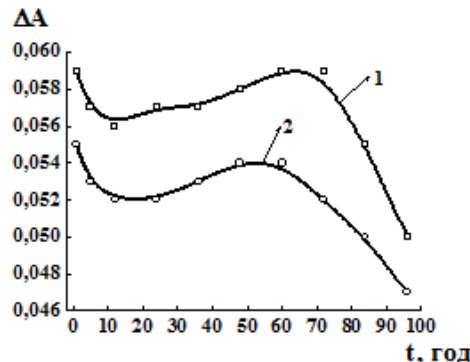


Рис. 5. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від часу зберігання. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см. 1) $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 2) $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $\lambda=430$ нм.

певних форм білка з барвником, які існують лише при конкретному значенні рН. Якщо в реакційне середовище спочатку вводять барвник і білок, то спостерігається послаблення взаємодії, оскільки рН середовища реакційної суміші відрізняється від оптимального для взаємодії між тропеоліном О і альбуміном. Аналогічна залежність спостерігається при використанні як ацетатного буфера, так і тетраборату натрію.

Таблиця 1

Вплив порядку змішування реагентів на утворення комплексної сполуки альбуміну людського з ТрО. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М

№	Порядок змішування реагентів	ΔA^1	ΔA^2
1	[(Буфер _p + ТрО _p + Альбумін _p) рН] t	0,067	0,055
2	[(Буфер _p + Альбумін _p + ТрО _p) рН] t	0,065	0,051
3	[(ТрО _p + Буфер _p + Альбумін _p) рН] t	0,067	0,052
4	[(Альбумін _p + Буфер _p + ТрО _p) рН] t	0,050	0,038
5	[(ТрО _p + Альбумін _p + Буфер _p) рН] t	0,021	0,034
6	[(Альбумін _p + ТрО _p + Буфер _p) рН] t	0,032	0,028

Примітка. Буфер_p, Альбумін_p, ТрО_p – аліквоти розчинів ацетатного буфера, альбуміну людського, ТрО відповідно; t^o – час стояння розчинів після зливання реагентів, хв; ¹ $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,00; t=20 хв; l=1 см; $\lambda=385$ нм; ² $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,00; t=15 хв; l=1 см; $\lambda=430$ нм.

Вплив природи і концентрації фонового електроліту й консерванта. Оскільки визначати білки доводиться переважно в біологічних об'єктах, зокрема в сироватці крові, де вони перебувають у розчинах електролітів, було проведено дослідження впливу йонної сили та природи аніонів на комплексоутворення альбуміну з ТрО у присутності натрій хлориду й амоній сульфату. Дані досліджень наведено на рис. 6, 7.

Як видно з рис. 6, присутність NaCl у сумісній присутності з буферними розчинами (криві 2, 3) незначно знижує вихід комплексної сполуки альбуміну з ТрО порівняно зі самими буферами, тому в подальших дослідженнях натрій хлорид не використовували. Однак із кривою 1 видно, що без фонового електроліту, а саме при мізерних концентраціях

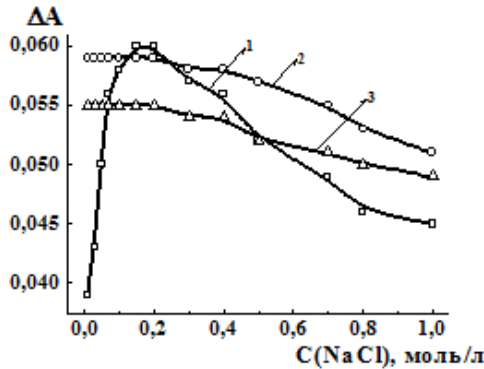


Рис. 6. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від концентрації NaCl. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см 1) рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 2) $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 3) $C_{\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $\lambda=430$ нм.

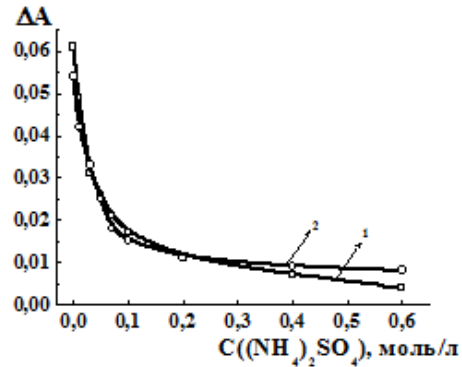


Рис. 7. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см. 1) $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 2) $C_{\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $\lambda=430$ нм.

NaCl, утворення сполуки практично не відбувається. Це може бути пов'язане з електростатичною взаємодією іонів Na^+ і Cl^- з функціональними групами білка.

Дослідження впливу амоній сульфату велось з метою можливого розділення альбуміну та глобуліну в досліджуваних об'єктах, оскільки його осаджують насиченим розчином амоній сульфату. Ці білки є водорозчинними і мають подібні властивості, а отже, можуть однаковою мірою зв'язувати досліджуваний барвник. Однак, як показали результати досліджень (рис. 7), навіть незначний вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ пригнічує комплексоутворення альбуміну з тропеоліном О, що може бути пов'язане зі зміною орієнтації амінокислотних залишків унаслідок електростатичної взаємодії з іонами електроліту, а це, у свою чергу, призводить до послаблення аналогічної взаємодії з тропеоліном О.

Розчини білків як біологічно активні субстрати є поживним середовищем для бактерій, тому для тривалого їх зберігання в розчини дуже часто додають консерванти, такі як натрій азид, етиленгліколь, ЕДТА, фенолметилсальбонілфторид. Для дослідження можливого їх впливу на нашу систему ми вибрали натрій азид як найбільш доступний і ефективний консервант. Результати дослідження впливу натрій азиду на перебіг реакції альбуміну людського з тропеоліном О наведено на рис. 8.

Як видно з рис. 8, $5 \cdot 10^{-6}$ М натрій азид не впливає на максимальний вихід сполуки, а при більшій концентрації – перешкоджає утворенню сполуки. Однак така мала кількість азиду дає змогу зберігати розчини білка стабільними впродовж кількох днів, що достатньо для проведення аналізу.

Дослідження впливу концентрації барвника. Для встановлення оптимальних умов взаємодії тропеоліну О з альбуміном людським ми досліджували залежність виходу сполуки від надлишку барвника. Результати наведені на рис. 9.

Як видно з рис. 9, $5 \cdot 10^{-5}$ М є оптимальною концентрацією тропеоліну О, що становить 35-кратний надлишок, якщо вважати, що молярна маса білка ~ 68 кДа. Очевидно, така велика кількість барвника необхідна для зміщення рівноваги в бік утворення супрамолекулярної сполуки.

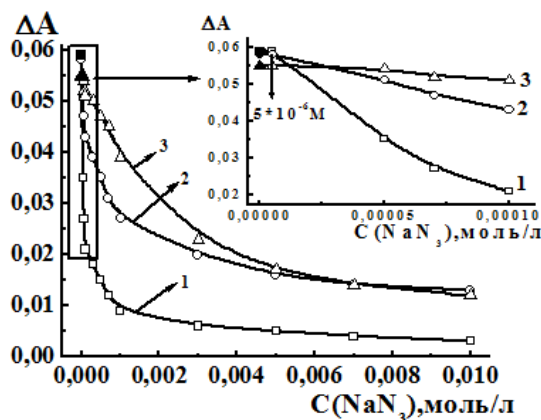


Рис. 8. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від концентрації NaN_3 ; $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см. 1) без буфера: рН=4,0; $\lambda=385$ нм; ■ – без натрій азиду; 2) $\text{C}_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; ● – без натрій азиду; 3) $\text{C}_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; ▲ – без натрій азиду.

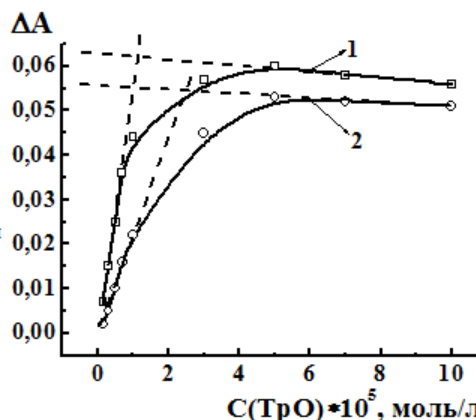


Рис. 9. Залежність зменшення інтенсивності світлопоглинання тропеоліну О в присутності альбуміну від концентрації барвника. $C_{\text{білка}}=100$ мкг/мл; $C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5}$ М; $l=1$ см. 1) $\text{C}_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07$ М; рН=4,0; $\lambda=385$ нм; 2) $\text{C}_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,01$ М; рН=9,0; $\lambda=430$ нм.

Спектрофотометричні характеристики досліджуваної комплексної сполуки наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Спектрофотометричні характеристики визначення альбуміну людського з ТрО

Комплекс	λ , нм	рН _{опт}	$t_{\text{ув.}}$, хв
Альбумін людський – ТрО	385	3,5–4,5	20
Альбумін людський – ТрО	430	8,5–9,5	15

Вивчення селективності взаємодії тропеоліну О із альбуміном людським у присутності деяких амінокислот і казеїну. Оскільки альбумін переважно визначають у складних об'єктах в присутності інших білків, амінокислот, які мають подібні хіміко-аналітичні властивості, то важливим завданням при розробці спектрофотометричної методики визначення альбуміну є дослідження їхнього впливу для можливості врахування його при аналізі конкретних об'єктів. Тому було досліджено вплив ряду амінокислот на можливість визначення альбуміну з тропеоліном О. Заважаючий вплив сторонніх компонентів перевіряли до концентраційного (молярного) співвідношення альбумін : амінокислота, коли відхилення у значенні величини оптичної густини в присутності сторонньої речовини починало перевищувати 10%.

Результати вибіркової спектрофотометричного визначення альбуміну з тропеоліном О наведено у табл. 3.

Як видно з даних таблиці, вплив амінокислот є досить значним, у кислому середовищі заважають уже співмірні їхні кількості, найбільш заважаючий вплив проявляють триптофан, ізолейцин, валін, фенілаланін. У лужному середовищі вплив амінокислот є ще більшим – дуже заважають триптофан, метіонін, лізин, лейцин, фенілаланін.

Таблиця 3

Селективність спектрофотометричного визначення альбуміну з ТрО при допустимих співвідношеннях сторонніх компонентів. $C_{\text{білка}} = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$; $C_{\text{ТрО}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $l = 1 \text{ см}$:
 1) $C_{\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}} = 0,07 \text{ М}$; $\text{pH} = 4,00$; $l = 385 \text{ нм}$; 2) $C_{\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7} = 0,01 \text{ М}$; $\text{pH} = 9,00$; $l = 430 \text{ нм}$

Заважаючий компонент	$C_{\text{білок}} : C_{\text{к-та}^?}$ (1)	Вплив на $\Delta A_{\text{барвника}}$	$C_{\text{білок}} : C_{\text{к-та}^?}$ (2)	Вплив на $\Delta A_{\text{барвника}}$
– Фенілаланін	1 : 1	Збільшує	1 : 0,5	Збільшує
Лізин	1 : 1	Збільшує	1 : 0,5	Збільшує
Треонін	1 : 3	Зменшує	1 : 1	Зменшує
Лейцин	1 : 3	Зменшує	1 : 0,5	Зменшує
Ізолейцин	1 : 1	Зменшує	1 : 1	Зменшує
Валін	1 : 1	Зменшує	1 : 1	Зменшує
Гістидин	1 : 5	Збільшує	1 : 1	Зменшує
Триптофан	1 : 1	Збільшує	1 : 0,1	Зменшує
Метіонін	1 : 3	Збільшує	1 : 0,5	Зменшує
Аргінін	1 : 5	Зменшує	1 : 1	Збільшує
Казеїн	–	–	1 : <0,05	Заважає

Примітка. Позначка «–» – не досліджували.

Якщо проаналізувати вплив амінокислот на взаємодію тропеоліну О з альбуміном, виходячи з їхнього хімічного складу та будови, то видно, що неароматичні амінокислоти монокарбонової групи (лейцин, ізолейцин, валін) та оксиамінокислоти (треонін) незалежно від кислотності середовища, а також група гетероциклічних амінокислот (гістидин і триптофан), а також тіамінокислот (метіонін) у лужному середовищі й аргінін (похідне орнітину, належить до групи діамінокислот) в кислому середовищі збільшували поглинання в системі барвник – білок. Очевидно, що сполуки даних амінокислот з тропеоліном О не впливають на характер хромофорних груп барвника, але, крім того, конкурують із білком при утворенні супрамолекулярної сполуки. Натомість діамінокислоти (лізин) і ароматична монокарбонова амінокислота фенілаланін незалежно від рН-середовища, як і гетероциклічні амінокислоти (гістидин і триптофан) та тіамінокислоти (метіонін) у кислому середовищі й аргінін у лужному середовищі зменшували поглинання в системі барвник – білок. Такий ефект, очевидно, можна пояснити тим, що ці амінокислоти утворюють також сполуки з барвником, у яких міняється характер хромофорних груп барвника, що відповідно збільшує різницю у поглинанні барвника.

Значний заважаючий вплив амінокислот як у кислому, так і в лужному середовищі можна пояснити, виходячи з механізму взаємодії азобарвників, які містять сульфогрупу, та білків із бічними первинними та вторинними аміногрупами. Взаємодія між такими сполуками відбувається через утворення водневих зв'язків між киснем сульфогрупи барвника та гідрогеном аміногруп білка [23], причому із однією сульфогрупою може зв'язуватися дві сусідні аміногрупи одного залишку амінокислоти [21]. Слід зазначити, що як у слабкокислому, так і у слаболужному середовищі сульфогрупа барвника перебуває в дисоційованому стані, тобто має аніонний характер. Із цього випливає, що характер взаємодії в обох середовищах подібний, за винятком того, що в кислому середовищі дисоційована сульфогрупа екранована іонами гідроксонію, а в слаболужному – переважно молекулами води. Тому утворення зв'язків у кислому середовищі потребує руйнування міцнішої сольватної оболонки, на відміну від лужного середовища, а це призводить до того, що в лужному середовищі вільній амінокислоті буде легше утворити сполуку з барвником, аніж стерично утрудненому білку. Вищесказане пояснює встановлену експериментально вищу селективність взаємодії тропеоліну О з альбуміном у присутності амінокислот у кислому середовищі.

Вплив казеїну ми досліджували у лужному середовищі, оскільки у кислому він нерозчинний. Як виявилось, у його присутності зв'язування тропеоліну О альбуміном практично не відбувалось.

Дослідження можливості маскуваня амінокислот при взаємодії альбуміну людського із тропеоліном О. Оскільки за результатами попередніх досліджень заважаючий вплив амінокислот є значним, то виникла необхідність пошуку маскуючих агентів для його нівелювання. Як відомо з літератури, амінокислоти взаємодіють з іонами перехідних металів [5]. Оскільки **Zn(II) є представником d-елементів, а його солі є нетоксичними, недорогими і доступними реагентами**, ми дослідили вплив іонів Zn(II) на взаємодію альбуміну з ТрО та на їхню взаємодію у присутності лізину. Результати маскуваня наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Вибірковість взаємодії альбуміну з ТрО в присутності лізину та іонів Zn(II).

$C_{\text{білка}} = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $C_{\text{ТрО}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}} = 0,07 \text{ M}$; $\text{pH} = 4,00$; $\lambda = 385 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$

№	Порядок змішування	A
1	Буфер+ТрО	0,971
2	Буфер+ ТрО +Альбумін	0,926
3	Буфер +ТрО +Zn(II)	0,930
4	Буфер+ ТрО +Альбумін+ Zn(II)	0,956
5	Буфер +Альбумін+Амінокислота +ТрО	0,923
6	Буфер+Альбумін+Амінокислота+ ТрО + Zn(II) (1:3:3)*	0,920
7	Буфер+Альбумін+ Амінокислота +Zn(II) +ТрО (1:3:3)*	0,957
8	Буфер+Альбумін+Амінокислота+ ТрО+ Zn(II) (1:3:4,5)*	0,956
9	Буфер+Альбумін+ Амінокислота+ Zn(II) +ТрО (1:3:4,5)*	0,910

Примітка. * Співвідношення білок : амінокислота : Zn(II).

Як видно з даних табл. 4, іони цинку(II) заважають комплексоутворенню ТрО з альбуміном, оскільки він взаємодіє як з білком, так і з барвником, бо, порівнюючи світлопоглинання в системах №1 і 3, видно, що Zn(II) взаємодіє з реагентом, однак максимум світлопоглинання цієї сполуки лежить в іншій ділянці спектра, тому оптична густина в системі №3 знижується. Якщо ж порівнювати його вплив у системі №4, то разом із білком він мав би зменшувати світлопоглинання, натомість світлопоглинання розчину зростає порівняно зі системами №3 та 2. Це свідчить про те, що іони Zn(II) взаємодіють також і з білком. У присутності лізину, який також зв'язує барвник, іони цинку(II) поведуть себе як маскуючі агенти (система №6), бо більш ефективно взаємодіють з амінокислотою, аніж із білком, причому ефективність маскуваня є вищою, коли спочатку додавати реагент, а пізніше розчин цинку (II). Як показали результати досліджень, співвідношення між кількістю амінокислоти і Zn(II) має бути 1:1.

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення альбуміну людського з ТрО наведено в табл. 5. Нами встановлено, що величина аналітичного сигналу спектрофотометричного визначення білка з цим барвником лінійно залежить від концентрації альбуміну в розчині на фоні ацетатного буфера та натрій тетраборату.

Таблиця 5

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення альбуміну людського з тропеоліном О (n=5, P=0,95); $C_{\text{ТрО}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$

№	pH	λ , nm	Лінійність $C_{\text{білка}}$, мкг/мл	Рівняння графіка, $C_{\text{білка}}$, мкг/мл	$C_{\text{Нр}}$ мкг/мл	Коефіцієнт кореляції, R
1	4,0	385	10,0–150,0	$\Delta A = 0,006 + 6,165 \cdot 10^{-4} \times C$	8,9	0,9971
2	9,0	430	10,0–100,0	$\Delta A = 0,007 + 4,495 \cdot 10^{-4} \times C$	7,7	0,9972

Отже, розроблена нами методика спектрофотометричного визначення альбуміну з тропеоліном О характеризується широкими межами лінійності. Ця методика може бути використана для визначення вмісту альбуміну в реальних об'єктах.

Методика визначення альбуміну людського з тропеоліном О у кислому середовищі

У мірну колбу ємністю 25 мл вносять 1,4 мл 1,25 М ацетатного буферного розчину з рН=4,0, додають аликвотну частину досліджуваного розчину альбуміну людського в межах 10–150 мкг/мл у кінцевому об'ємі та 1 мл $1,25 \cdot 10^{-3}$ М тропеоліну О. Перевіряють кислотність середовища розчину на рН-метрі, підводять розчин у колбі до мітки дистильованою водою і перемішують. Вимірювання різниці інтенсивностей світлопоглинання проводять через 20 хв після зливання розчинів при $\lambda=385$ нм, $l=1$ см. Концентрацію альбуміну знаходять за градуйованим графіком або методом порівняння.

Методика визначення альбуміну людського з ТрО в лужному середовищі

У мірну колбу ємністю 25 мл вносять 2,5 мл 0,1 М розчину натрій тетраборату з рН=9,0, додають аликвотну частину досліджуваного розчину альбуміну людського в межах 10–100 мкг/мл у кінцевому об'ємі та 1 мл $1,25 \cdot 10^{-3}$ М тропеоліну О. Перевіряють кислотність середовища розчину на рН-метрі, підводять розчин у колбі до мітки дистильованою водою і перемішують. Вимірювання різниці інтенсивностей світлопоглинання проводять через 15 хв після зливання розчинів при $\lambda=430$ нм, $l=1$ см. Концентрацію альбуміну знаходять за градуйованим графіком або методом порівняння.

Апробація методик визначення альбуміну з тропеоліном О в модельних розчинах.

Правильність спектрофотометричних методик визначення альбуміну людського та казеїну з тропеоліном О перевіряли на модельних розчинах різного складу способом «введено-знайдено». Результати наведено у табл. 6.

Таблиця 6

Правильність спектрофотометричного визначення білків з ТрО
у модельних розчинах ($P=0,95$, $n=5$)

Система	Введено білка, мкг	Знайдено білка, $\bar{x} \pm (S \cdot t_a) / \sqrt{n}$, мкг	Відносна похибка, %
Альбумін –ТрО (рН=4,0; $\lambda=385$ нм; $l=1$ см; $C_{CH_3COONa+CH_3COOH}=0,07$ М)	200,0	197,4 \pm 4,9	2,5
Альбумін –ТрО (рН=9,0; $\lambda=430$ нм; $l=1$ см; $C_{Na_2B_4O_7}=0,01$ М)	100,0	95,4 \pm 2,4	2,4

Як видно з даних табл. 6, одержані дані корелюють з істинним вмістом білків у модельних розчинах.

Отже, розроблена нами методика спектрофотометричного визначення альбуміну людського з тропеоліном О характеризується широкими межами лінійності, достатньою чутливістю, відтворюваністю й експресністю і за своїми метрологічними характеристиками не поступається багатьом відомим спектрофотометричним методикам визначення альбуміну.

Визначення альбуміну з тропеоліном О в сироватці крові. На основі розробленої спектрофотометричної методики визначення альбуміну з тропеоліном О було визначено вміст досліджуваного білка в складному об'єкті – сироватці крові, одержаної в клініко-діагностичній лабораторії Львівської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги.

Методика приготування сироватки крові

Для отримання сироватки у хворих натщесерце відбирали 1 мл венозної крові, яку поміщали в суху стерильну пробірку. Пробірку з кров'ю витримували у термостаті

при 37°C упродовж 30 хв. Згусток відокремлювали від стінок пробірки, сироватку крові відділяли центрифугуванням упродовж 10 хв при 3000 об/хв і переносили у чисту пробірку. Зберігали сироватку при +4°C впродовж 48 годин без додавання консервантів [4].

Для проведення визначення альбуміну в сироватці крові її попередньо розводили фізрозчином (0,9% NaCl) у 400 разів. Результати визначення способом градувального графіка наведено у табл. 7.

Як видно з даних табл. 7, присутні в сироватці крові супутні білки не взаємодіють з тропеоліном О і не впливають на проведення аналізу. Одержані дані добре корелюють з результатами визначення з використанням стандартної спектрофотометричної методики з бромкрезоловим зеленим [4] і не перевищують похибки фотометричного визначення.

Таблиця 7

Результати спектрофотометричного визначення альбуміну людського з ТрО у сироватці крові. $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07 \text{ M}$; $\text{pH}=4,0$; $l=1 \text{ см}$; $\lambda=385 \text{ нм}$; $n=3$; $P=0,95$

Сироватка	$C_{\text{білка}}$ МГ/МЛ	$C^1_{\text{альбуміну}}$ МГ/МЛ	$C^2_{\text{альбуміну}}$ МГ/МЛ	$C^3_{\text{альбуміну}}$ МГ/МЛ	Відносна похибка, %
1	85,0±2,7	40	40,6±2,0	40,8±1,2	3,6
2	95,0±3,1	50	50,4±2,3	50,5±1,7	3,3

Примітка. 1 – Дані лабораторії ; 2 – вміст альбуміну визначали за стандартною спектрофотометричною методикою з бромкрезоловим зеленим [4]; 3 – вміст альбуміну визначали за розробленою спектрофотометричною методикою з тропеоліном О.

Вивчено взаємодію білка альбуміну людського з азобарвником тропеоліном О. На основі експериментальних даних встановлено, що альбумін людський утворює супрамолекулярну сполуку з ТрО в кислому та лужному середовищі, причому зменшення інтенсивності поглинання непрореагованого барвника пропорційне до кількості білка в обох ділянках кислотності. Дані результати лягли в основу розробленої спектрофотометричної методики визначення альбуміну з тропеоліном О. Розраховано метрологічні характеристики визначення білка з азобарвником. Інтервал визначуваних концентрацій для системи альбумін людський – тропеолін О ($C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{CH}_3\text{COONa}+\text{CH}_3\text{COOH}}=0,07 \text{ M}$; $\text{pH}=4,0$; $\lambda=385 \text{ нм}$): 10–150 мкг/мл ($C_{\text{мін}}=8,9 \text{ мкг/мл}$); альбумін людський – тропеолін О ($C_{\text{ТрО}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7}=0,01 \text{ M}$; $\text{pH}=9,0$; $\lambda=430 \text{ нм}$): 10–100 мкг/мл ($C_{\text{мін}}=7,7 \text{ мкг/мл}$). Досліджено селективність спектрофотометричного визначення альбуміну з тропеоліном О у присутності амінокислот та в сумісній присутності з казеїном, встановлено, що амінокислоти і казеїн заважають визначенню альбуміну практично у співмірних кількостях. Перевірено правильність спектрофотометричної методики визначення альбуміну ($S_r=0,024 - 0,025$) з тропеоліном О у модельних розчинах. На основі розробленої методики було визначено вміст альбуміну в реальному об'єкті – сироватці крові людини ($S_r=0,033 - 0,036$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бишоп Э. Индикаторы. М.: Мир, 1976. Т. 1. 494 с.
2. Бонішко О. С., Полько М. В., Коркуна О. Я., Врублевська Т. Я. Спектрофотометричне дослідження взаємодії іонів осмію (IV) з тропеоліном О // Вісн. Харків. ун-ту. 2007. №770. Сер. хім. Вип. 15(38). С. 70–75.
3. Венкатараман К. Химия синтетических красителей. Л.: Госхимиздат, 1974. Т. 3. С. 1952–2009.
4. Горячковский А. М. Клиническая биохимия. Одесса: Астропринт, 1998. 645 с.
5. Дарбре А. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989. 621 с.
6. Краткая химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1967. Т. 5. 592 с.

7. Хольцбехер З., Дивини Л., Крал М. и др. Органические реагенты в неорганическом анализе / Под ред. З.З. Высоцкого. М.: Мир, 1979. 752 с.
8. Cao Q., Li Z., Wang J., Li C. Spectrophotometric study on the interaction of azocarmine B with serum albumin and its analytical applications // Fenxi Huaxue. 2002. No 30. P. 222–226.
9. Colenbrander V. F., Martin T. G. Orange G Dye Binding for Determination of Protein of Sow's Milk // J. Dairy Sci. Technical Notes. 1966. Vol. 54. No 4. P. 531–533.
10. Cui F., Zhang Q., Yao X. et al. The investigation of the interaction between 5-Iodouracil and human serum albumin by spectroscopic and modeling methods and determination of protein by synchronous fluorescence technique // Pesticide Biochem. Physiol. 2008. Vol. 90. No 2. P. 126–134.
11. Douhal A., Sanz M., Tormo L. Femtochemistry of orange II in solution and in chemical and biological nanocavities // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. No 52. P.18807–18812.
12. Hu Q., Liu S., Fan L. Fading reaction of chrome blue SE by proteins and their analytical application // Fenxi Huaxue. 2002. Vol. 30. No 1. P. 42–45.
13. Hu Q. L., Zhao F. L., Li K. A. Spectrophotometric study on the interaction between Arsenazo M and proteins // Chinese Chemical Letters. 2002. Vol. 13. No 1. P. 71–72.
14. Hu Q., Wang C., Li Q. Spectrophotometric determination of protein by using Cu(II)-nitrosulphophenol S complex as a spectral probe // Chem. J. Internet. 2006. Vol.8. No 3. P. 5–11.
15. Huang C. Z., Li Y. F., Hu X. L., Li N. B. Review. Resonance light scattering technique used for biochemical and pharmaceutical analysis // Analytica Chimica Acta. 2003. Vol. 500. No 1. P. 105–117.
16. Isoe J., Kaneko E. A new spectrophotometric method for determination of urinary protein using erythrosin B // Chemistry Letters. 2006. Vol. 35. No 8. P. 922–923.
17. Lee S. H., Li M. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile Blue fluorescence // Bulletin of the Korean Chemical Society. 2003. Vol. 24. No 1. P. 45–48.
18. Liu D., Li S., Zhao S. Spectrophotometric determination of protein by using barium(II) chlorophosphonazo III complex as spectral probe // Fenxi Huaxue. 2004. Vol. 32. No 2. P. 187–190.
19. Liu S., Yang R., Liu Q. Resonance Rayleigh Method for the Determination of Proteins with Orange G // Analytical Sci. 2001. Vol. 17. P. 243–247.
20. Moran E. T., Jr., Jensen L. S., McGinnis J. Dye Binding by Soybean and Fish Meal as an Index of Quality // J. Nutrition. 1963. Vol. 79. P. 239–244.
21. Ojala W. H., Gleason W. B., Richardson T. I., Lovrien R. E. Interactions between sulfonated azo dyes and biomolecules: orange G/adenine and orange G/cytosine salts // Acta Crystallographica. 1994. Vol. 50. No 10. P. 1615–1620.
22. Outen G. E., Tilley J. M., Wilson R. F. Estimation of protein in dried herbage using the dye-stuff Orange G // J. Sci. Food and Agriculture. 1966. Vol. 17. No 7. P.285–286.
23. Patel A. B., Srivastava S., Phadke R. S. Interaction of 7-Hydroxy-8-(phenyl-azo)1,3-naphthalenedisulfonate with Bovine Plasma Albumin. Spectroscopic Studies // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. No 31. P. 21755–21762.
24. Perl I. M., Szakacs M. P. Stoichiometric Dye-binding Procedure for the Determination of the Reactive Lysine Content of Soya Bean Protein // Food Chem. 1985. No 16. P. 163–174.
25. Pomeranz Y. Evaluation of factors affecting the determination of nitrogen in soya products by the biuret and Orange-G dye-binding methods // J. Food Sci. 1965. Vol. 30. No 5. P. 307–311.
26. Saxena K. K., Dey A. K. Specific colorimetric reagents for the determination of palladium (II) // Analytical Chem. 1968. Vol. 40. No 8. P. 1280–1285.

27. Schosinsky K. H., Vargas M., Esquivel A. L., Chavarria M. A. Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye binding with use of bromphenol blue // *Clinical Chem.* 1987. Vol. 33. No 2. P. 223–226.
28. Seth R. L., Dey A. K. Studies on some soluble palladium (II) chelates in aqueous solution. Part II. Chelate formation between palladium (II) and p – benzylsulphonic acid azoresorcein (sodium salt) (Tropeolin O) // *J. Indian Chem. Society.* 1963. Vol. 40. No 9. P. 794–796.
29. Starczewska B., Jasińska A. Analytical application of the reactions of amitriptyline with eriochrome cyanine R and pyrocatechol violet // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 2003. Vol. 60. No 6. P. 417–423.
30. Sun S., Ma H., Chen X. et al. Fluorimetric determination of proteins using 4-chloro(2-hydroxylophenylazo)rhodanine–Ti(IV) complex as a spectral probe // *Luminescence.* 2008. Vol. 235. P. 333–337.
31. Tang Y.-J., Chen Y., Chen Z. et al. Adsorption of a protein–porphyrin complex at a liquid–liquid interface studied by total internal reflection synchronous fluorescence spectroscopy // *Analytica Chimica Acta.* 2008. Vol. 61. No 4. P. 71–76.
32. Wei Q., Li Y., Yu H., Li L., Du B. Spectrophotometric studies on the interaction of carboxyazo I Tb(III) complex with protein and its application // *Fenxi Huaxue.* 2005. Vol. 33. No 8. P. 1175–1178.
33. Wu X., Zheng J., Guo C. Y. et al. Determination of albumins by its quenching effect on the fluorescence of Tb³⁺-oxolinic acid complex in presence of sodium dodecyl sulphate // *J. Luminescence.* 2007. Vol. 126. No 1. P. 171–176.
34. Yamaguchi T., Amano E., Kamino S. et al. Spectrophotometric determination of urinary protein with o-sulfophenylfluorone-metal complex // *Analytical Sci.* 2005. No 21. P. 1237–1240.
35. Zhang Y. Z., Zhou B., Zhang X.-P. et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods // *J. Hazardous Materials.* 2009. Vol. 163. No 2-3. P. 1345–1352.
36. Zhao S., Liu D., Li S. Determination of proteins using the p-acetylchlorophosphonazo barium(II) complex as a spectroprobe // *Analytical Sci.* 2003. No 19. P. 1173–1176.

Стаття: надійшла до редакції 01.11.11

прийнята до друку 10.11.11

SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF PROTEIN HUMAN ALBUMIN INTERACTION WITH AZO DYE TROPAEOLIN O

M. Boiko^{1,2}, O. Korkuna¹, M. Rydchuk², T. Vrublevska¹

¹Ivan Franko National University of Lviv
6, Kyrylo and Mefodiy St., Lviv 79005, Ukraine

²State Scientific Research Control Institute
of Veterinary Preparations and Fodder Additives
11, Donetska St., Lviv 79019, Ukraine

e-mail: boiko_maria@ukr.net

The interaction of the protein human albumin with the acidic monoazo dye Tropeolin O has been studied. The optimum conditions of the formation of albumin-TrO

have been established: pH=4.0 on a background of 0.07 M acetate buffer solution, the formation time – 20 min ($t=20^{\circ}\text{C}$); pH=9.0 on a background of 0.03 M sodium tetraborate solution, the formation time – 15 min ($t=20^{\circ}\text{C}$) at the presence of 35-fold excess of the reagent in both cases. The spectrophotometric method of albumin determination due to the decrease of the absorbance maximum of unreacted dye at $\lambda_{\text{max}}=385$ nm (pH=4.0) and $\lambda_{\text{max}}=430$ nm (pH=9.0) has been elaborated. The linear range is: 10–150 $\mu\text{g/ml}$ at pH=4.0 and 10–100 $\mu\text{g/ml}$ at pH=9.0 accordingly. The selectivity of the spectrophotometric determination of albumin in the presence of amino acid and casein has been investigated. The elaborated methods are successfully approved.

Keywords: human albumin, Tropaeolin O, spectrophotometry, supramolecular interaction.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО С АЗОКРАСИТЕЛЕМ ТРОПЕОЛИНОМ О

М. Бойко^{1,2}, О. Коркуна¹, М. Ридчук², Т. Врублевская¹

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Кирилла и Мефодия, 6, Львов 79005, Украина

²Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, Львов 79019, Украина
e-mail: boiko_maria@uk.net

Изучено взаимодействие белка альбумина человеческого с кислотным моноазокрасителем тропеолином О (ТрО). Установлены оптимальные условия образования соединения альбумина с ТрО: pH=4,0 на фоне 0,07 М ацетатного буферного раствора, время образования – 20 мин ($t=20^{\circ}\text{C}$); pH=9,0 на фоне 0,03 М раствора натрия тетрабората; время образования – 15 мин ($t=20^{\circ}\text{C}$) при наличии 35-кратного избытка реагента в обоих случаях. Разработана спектрофотометрическая методика определения альбумина по уменьшению максимума поглощения несвязанного красителя при $\lambda_{\text{max}}=385$ нм (pH=4,0) и $\lambda_{\text{max}}=430$ нм (pH=9,0). Пределы линейности: 10–150 мкг/мл при pH=4,0 и 10–100 мкг/мл при pH=9,0 соответственно. Исследована селективность спектрофотометрического определения альбумина в присутствии аминокислот и казеина. Разработанные методики успешно апробированы.

Ключевые слова: альбумин человеческий, тропеолин О, спектрофотометрия, супрамолекулярное взаимодействие.