

МЕТОДИ

УДК 543.068:577.112.82

ТВЕРДОФАЗНО-ЕКСТРАКЦІЙНЕ КОНЦЕНТРУВАННЯ БСА

В. А. ХАЛАФ¹, О. А. ВАСИЛЬЧЕНКО², В. М. ЛЕВЧИК¹, Г. М. ЗАЙЦЕВА¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: khalaf@univ.kiev.ua;

²Національний авіаційний університет, Київ, Україна

Досліджено можливість застосування кремнезему, модифікованого поліоксидетильованим ізооктилфенолом ($\text{SiO}_2\text{-ТХ}$), як адсорбенту для твердофазно-екстракційного концентрування бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Показано, що з водних розчинів відбувається ефективне вилучення БСА (до 96%) на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ у вигляді іонного асоціату з катіонними (при рН 8,0) і аніонними (при рН 1,5) поверхнево-активними речовинами.

Ключові слова: бичачий сироватковий альбумін, твердофазна екстракція, іонний асоціат, поверхнево-активні речовини.

Першою ознакою патології нирок є мікроальбумінурія – виведення альбуміну з сечею із перевищенням нормального значення (30 мг/добу) [1]. На цьому базується рання діагностика діабетичної нефропатії (ДН) – специфічного захворювання нирок, що розвивається на тлі цукрового діабету (ЦД). Небезпека цієї хвороби полягає в поступовому прогресуванні до необоротних патологічних змін нирок на пізніх стадіях діабетичної нефропатії. Проблема виявлення мікрокількості альбуміну в сечі є актуальною внаслідок прогресуючого поширення цукрового діабету і діабетичного ураження нирок.

На сьогодні все частіше для визначення протеїну використовують спектрофлуориметрію [2,3], імунонефелометрію [4], високоефективну рідинну хроматографію з післяколонковою дериватизацією і флуоресцентним детектуванням [5,6], синхронну флуоресцентну спектроскопію [7], проточно-інжекційний хемілюмінесцентний аналіз [8], резонансне світлорозсіювання [9]. Розроблені також імуносенсори [10,11], тест-системи [12]. Однак через відсутність дорогого обладнання, вищеназвані методи не мають розповсюдження у клінічній практиці. Це обмежує масову профілактичну діагностику, особливо на ранніх стадіях розвитку захворювання. Тому для визначення протеїну в сечі поширеними залишаються спектрофотометричні методи

[13]. Для підвищення чутливості фотометричних методів визначення протеїну застосовують його попереднє концентрування методами твердофазної (ТФЕ) [14] та мембранної екстракції [15].

Відомо, що в залежності від кислотності розчину пептидний зв'язок протеїну знаходиться у кето- та енольній формах, а через дисоціацію вільних карбоксильних груп чи протонізацію аміногруп поліпептиди змінюють заряд макромолекули під час зміни кислотності розчину. Заряджені макромолекули здатні утворювати іонні асоціати (ІА) з іоногенними поверхнево-активними речовинами [16], що використовується для їхнього подальшого визначення, наприклад, методом резонансного світлорозсіювання.

Раніше показано [17], що кремнезем, модифікований поліоксидетильованим ізооктилфенолом ($\text{SiO}_2\text{-ТХ}$), є ефективним адсорбентом для ТФЕ ІА – речовин середньої полярності. Можна припустити, що ІА поліпептиду з поверхнево-активною речовиною (ПАР) також буде специфічно вилучатися на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$, що дозволить підвищити чутливість та надійність його наступного спектрофотометричного визначення.

Мета роботи полягала у дослідженні впливу рН на процес концентрування БСА на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ у присутності ПАР різної природи.

Матеріали і методи

У роботі використовували БСА (Merck, Німеччина), стандартний розчин якого (0,5 мг/мл) готували на деіонізованій воді. Розчини необхідної концентрації одержували шляхом розведення стандартного розчину. Розчини Na_2CO_3 (0,1 М), NaOH (0,1 М), ПАР (10^{-3} М): цетилтриметиламоній бромід (ЦТМАБ), тетрадецилпіридиній бромід (ТДПБ), додецилбензилдиметиламоній хлорид (ДДБДМАХ), додецилсульфату натрію (ДДС), октадецилпіридиній бромід (ОДПБ), гексадецилсульфату натрію (ГДС) готували шляхом розчинення наважок сполук у дистильованій воді. ОДПБ, ТДПБ, ДДС синтезували і очищали за методом [18], інші використані ПАР (Merck, Німеччина) мали чистоту 99,0%. Розчин 0,1 М HCl готували з фіксааналу. Необхідну кислотність створювали за допомогою розчинів NaOH і HCl , контролюючи значення рН на іономері «I-160 М».

Адсорбент для ТФЕ. $\text{SiO}_2\text{-TX}$ синтезували за методикою [19], як носій використовували Силохром С-120 (Ставрополь) з питомою площею поверхні $120 \text{ м}^2/\text{г}$. Згідно з даними роботи [19], поверхня $\text{SiO}_2\text{-TX}$ є біфункціональною і містить гідрофільні (поліоксиетильні і діольні) та гідрофобні (ізооктилфенольні) групи в концентрації 250 та 25 мкмоль/г відповідно.

Під час вивчення сорбційних характеристик $\text{SiO}_2\text{-TX}$ в статичних умовах до наважки сорбенту (0,1 г) додавали 25,0 мл розчину БСА (0,05–0,15 мг/мл) з фіксованим значенням рН і перемішували на магнітній мішалці протягом 10–40 хв до встановлення сорбційної рівноваги. Тверду фазу відділяли фільтруванням, а вміст БСА у фільтраті визначали фотометрично за методом Лоурі [20]. Попередньо показано, що використані концентрації ПАР не впливають на аналітичний сигнал БСА в реакції Лоурі. Ступінь вилучення БСА з розчину у присутності різних ПАР вивчали в діапазоні рН від 2,0 до 8,0. Вищі значення рН не розглядалися у зв'язку із можливим руйнуванням кремнеземної матриці. Світлопоглинання розчинів вимірювали за допомогою КФК-2.

Результати та обговорення

Відомо, що в біологічних рідинах за фізіологічних значень рН (6,8–7,4) протеїн є амфііоном, тобто містить одночасно як позитивні, так і негативні заряди. Ізоелектрична точка (рІ) БАС дорівнює 4,9. Це означає, що при такому значенні рН концентрація заряджених груп мала, й їхні заряди взаємно компенсовані. В інтервалі рН 6,8–7,4, за раху-

нок дисоціації карбоксильних груп, БСА заряджений негативно. У разі $\text{pH} < \text{pI}$ протеїнова молекула має позитивний заряд за рахунок протонування аміногруп. Таким чином, БСА завжди містить заряджені групи, проте їхня кількість та тип залежать від кислотності розчину. Тому БСА може утворювати іонні асоціати з аніонними (АПАР) та катіонними (КПАР) поверхнево-активними речовинами в широкому інтервалі рН. Відповідно до цього вивчалася спроможність БСА утворювати ІА з КПАР та АПАР при рН від 2,0 до 8,0. Ефективність утворення ІА визначали за повнотою їхнього вилучення на $\text{SiO}_2\text{-TX}$ (припускали, що екстракція гідрофобного ІА не залежить від рН).

Встановлено, що під час вилучення БСА на $\text{SiO}_2\text{-TX}$ у статичних умовах сорбційна рівновага встановлюється протягом декількох хвилин. Найшвидше цей процес проходить у присутності ОДПБ: за 1 хв відбувається 50% вилучення протеїну, а через 5 хв – 80%. Сорбційна рівновага на $\text{SiO}_2\text{-TX}$ у присутності ЦТМАБ досягається за 10 хв. Для АПАР сорбційна рівновага досягається за такий самий проміжок часу.

Встановлено, що за відсутності ПАР протеїн на $\text{SiO}_2\text{-TX}$ практично не вилучається. Збільшення значення рН призводить до незначного (до 15%) зростання адсорбції БСА. Введення в розчин КПАР значно підвищує

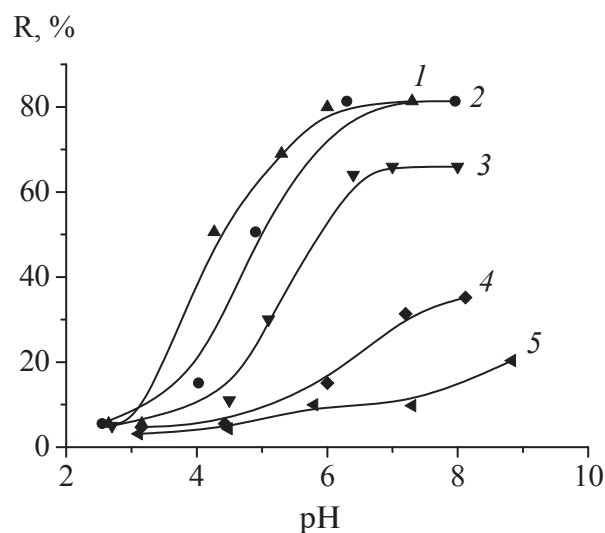


Рис. 1. Залежність ступеня вилучення (R , %) БСА на $\text{SiO}_2\text{-TX}$ від кислотності водної суспензії у присутності (1–4) і за відсутності (5) КПАР: 1 – ОДПБ, 2 – ЦТМАБ, 3 – ДДБДМАХ, 4 – ТДПБ. ($m(\text{SiO}_2\text{-TX}) = 0,1 \text{ г}$, $V_{\text{розчину}} = 25,0 \text{ мл}$, $C_{\text{БСА}} = 100 \text{ мкг/мл}$, $C_{\text{ПАР}} = 8 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $\tau = 15 \text{ хв}$)

ступінь вилучення БСА на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$, рис. 1. Крім того, характер його збільшення залежить від природи КПАР: у присутності ОДПБ чи ЦТМАБ ступінь вилучення сягає 80%, з ДДБДМАХ – до 60%, а з ТДПБ лише 30%. Таким чином, введення КПАР у розчин аналіту підвищує ступінь його вилучення на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ у 2–12 разів.

У разі сталого значення рН ступінь вилучення БСА з розчину на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ у межах одного класу ПАР корелює зі збільшенням числа метиленових груп в їхньому аліфатичному радикалі. Так, ступінь вилучення БСА з КПАР піридинової природи вища для сполуки із 17 метиленовими групами (ОДПБ), ніж із 13 – ТДПБ, рис. 1. Подібна тенденція прослідковується і для КПАР непіридинової природи: довголанцюговий ЦТМАБ (15 метиленових груп) виявляється більш ефективним за коротколанцюговий ДДБДМАХ (11 метиленових груп), рис. 1. Такий ефект можна пов'язати зі зростанням афінності (коефіцієнта розподілу) асоціату до імобілізованого шару ТФЕ внаслідок збільшення числа метиленових фрагментів і міцності асоціату БСА за подовження вуглеводневого радикала КПАР. Різні кути нахилу кривих вилучення асоціатів ПАР з БСА, що зменшуються в ряду ОДПБ > ЦТМАБ > ДДБДМАХ >> ТДПБ, свідчать про різну міцність утворених асоціатів. Максимальні значення ступеня вилучення (R, %) для різних КПАР в інтервалі рН 6,0–8,0 вказують на те, що коефіцієнти розподілу ІА між $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ та водним розчином знижуються в ряду: ОДПБ > ЦТМАБ > ДДБДМАХ.

Під час використання АПАР характер зміни вилучення БСА інший і не залежить від довжини вуглеводневого радикала: ІА протеїну з ГДС (15 метиленових груп) вилучається гірше, ніж ІА з ДДС (11 метиленових груп), рис. 2. Вилучення БСА на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ відбувається повніше у присутності КПАР в лужному середовищі, а у присутності АПАР – в кислому. Наприклад, максимальне вилучення БСА (90%) ми спостерігали при рН < 1,5 у присутності ДДС і коефіцієнти розподілу за цих умов склали $(0,14\text{--}1,8) \cdot 10^3$ мл/г.

Десорбцію ІА альбуміну з ДДС здійснювали лужними водно-органічними розчинами. Показано, що ІА кількісно

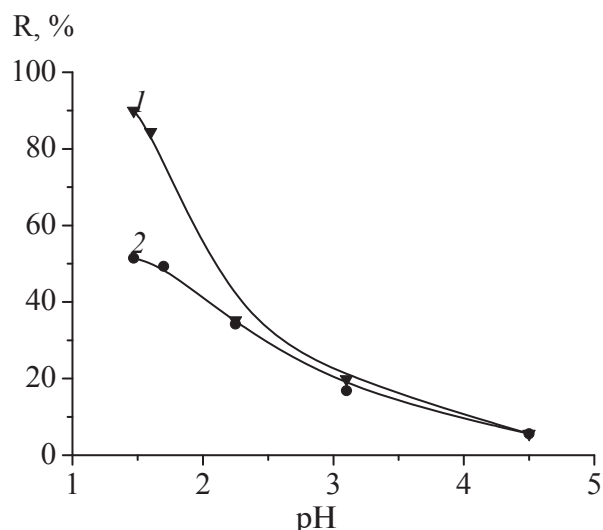


Рис. 2. Залежність ступеня вилучення (R, %) БСА на $\text{SiO}_2\text{-ТХ}$ від значення рН суспензії у присутності: 1 – ДДС, 2 – ГДС. ($m(\text{SiO}_2\text{-ТХ}) = 0,1$ г, $V_{\text{розчину}} = 25,0$ мл, $C_{\text{БСА}} = 100$ мкг/мл, $C_{\text{ПАР}} = 8 \cdot 10^{-5}$ М, $\tau = 15$ хв)

елююється в 1–4 мл суміші 0,5 М розчину гідроксиду натрію і ацетонітрилу (3 : 7), а елюат придатний для безпосереднього фотометричного визначення БСА методом Лоурі.

Таким чином, для твердофазно-екстракційного концентрування альбуміну з водних розчинів запропоновано кремнезем, модифікований поліоксietильованим ізооктилфенолом ($\text{SiO}_2\text{-ТХ}$). Встановлено, що ефективне вилучення БСА сорбентом спостерігається у присутності аніонних/катионних ПАР. За відповідності до оптимальних умов вилучення: $\tau = 15$ хв, рН 1,5–2 для ДДС і рН 6–8 для ОДПБ та ЦТМАБ, запропонований адсорбент можна використати для ефективного концентрування БСА з водних розчинів з наступним фотометричним визначенням його вмісту у водно-органічному елюаті. Коефіцієнти розподілу (D_g) БСА між адсорбентом і рідкою фазою за цих умов складають $(0,14\text{--}1,80) \cdot 10^3$ мл/г. Вивчено умови десорбції ІА протеїну з ДДС слабколужними водно-органічними розчинами. Оптимальним елюентом є суміш розчинів 0,5 М гідроксиду натрію і ацетонітрилу у співвідношенні 3 : 7.

ТВЕРДОФАЗНО-ЭКСТРАКЦИОННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БСА

*В. А. Халаф¹, О. А. Васильченко²,
В. М. Левчик¹, Г. Н. Зайцева¹*

¹Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: khalaf@univ.kiev.ua;

²Национальный авиационный
университет, Киев, Украина;

Рассмотрена возможность использования кремнезема, модифицированного полиоксиэтилированным изооктилфенолом (SiO₂-TX), в качестве эффективного адсорбента для твердофазно-экстракционного концентрирования бычьего сывороточного альбумина (БСА). Показано, что из водных растворов происходит эффективное извлечение БСА (до 96%) на SiO₂-TX в виде ионного ассоциата с катионными (при pH = 8) и анионными (при pH = 1,5) поверхностно-активными веществами.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, твердофазная экстракция, ионный ассоциат, поверхностно-активные вещества.

SOLID PHASE EXTRACTION OF BSA

*V. A. Khalaf¹, O. A. Vasylchenko²,
V. M. Levchik¹, G. M. Zaitseva¹*

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: khalaf@univ.kiev.ua;

²National Aviation University, Kyiv, Ukraine;

Summary

Silica with immobilized polyoxyethyleneisooctylphenol (SiO₂-TX) was investigated as an adsorbent for solid phase extraction of bovine serum albumin (BSA). It was shown that efficient BSA extraction (up to 96%) takes place on SiO₂-TX from water solution in the form of its ionic associates with cationic (at pH = 8) and anionic (at pH = 1.5) surfactants.

Key words: bovine serum albumin, solid phase extraction, ionic associate, surfactants.

1. Zhao L., Lin J.-M., Li Z. // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – **541**. – P. 199–207.
2. Jiang C., Luo L. // *Anal. Lett.* – 2004. – **37**. – P. 1129–1137.
3. Luo L. // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – **506**. – P. 171–175.
4. Bakker A. J. // *Clin. Chem.* – 1988. – **34**. – P. 82–86.
5. Ishida J., Abe K., Nakamura M., Yamaguchi M. // *Biol. Pharm. Bull.* – 1996. – **19**. – P. 1391–1395.
6. Cui F.-L., Qin L.-X., Li F., Luo H.-X. // *J. Mol. Mod.* – 2008. – **14**. – P. 1111–1117.
7. Cui F.-L., Qin L.-X., Hao E.-J. et al. // *Spectrosc. Spectral. Anal.* – 2008. – **28**. – P. 1596–1599.
8. Huang C.-B., Zhang K., Liu X.-L., Wang S.-F. // *Luminesc.* – 2007. – **22**. – P. 393–400.
9. Gao D., He N., Tian Y. et al. // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. & Biomol. Spectroscopy.* – 2007. – **68**, N 3. – P. 573–577.
10. Navrátilová I., Skládal P. // *Supramol. Chem.* – 2003. – **15**. – P. 109–115.
11. Sakti S. P., Hauptmann P., Zimmermann B. et al. // *Sens. Actuat. B.* – 2001. – **78**. – P. 257–262.
12. Yoshimoto K., Kaneko E., Yotsuyanagi T. // *Bunseki Kagaku.* – 2000. – **49**. – P. 363–367.
13. Kanchana W.-I., Sakai T., Teshima N. et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – **604**. – P. 139–146.
14. Tsukagoshi K., Sawanoi K., Nakajima R. // *J. Chromatogr. B.: Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* – 2006. – **833**. – P. 174–178.
15. Yang B., Zhang F., Tian H., Guan Y. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – **1117**. – P. 214–218.
16. Liu R., Yang J., Sun C. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – **377**. – P. 375–379.
17. Халаф В. А., Турчин В. О., Гринько А. П., Зайцев В. Н. // *Журн. аналит. хим.* – 2009. – **64**, № 2. – С. 110–114.
18. Савин С. Б., Чернова Р. К., Штыков С. Н. *Поверхностно-активные вещества.* – М., 1991. – 251 с.
19. Зайцев В. Н., Халаф В. А., Зайцева Г. Н., Алексеев С. А. // *Укр. хим. журн.* – 2005. – **71**, № 9. – С. 59–64.
20. Hartree E. F. // *Anal. Biochem.* – 1972. – **48**. – P. 422–427.

Отримано 09.02.2011