Methods and objects of chemical analysis, 2015, Vol. 10, No. 2, 67-72

Colorimetric Determination of Albumin in Micellar Extraction System Mo(VI) – Bromopyrogallol Red – Triton X-100

M.V. Rohoza*, S.A. Kulichenko

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Department of Analytical Chemistry 64, Volodymyrska Street, Kyiv, 01033, Ukraine; *e-mail: rogozamar@gmail.com

Recieved: June 19, 2015; Accepted: July 13, 2015

The possibility of quantitative colorimetric determination of cetylpyridinium chloride and albumin in water-micellar system Mo(VI) – bromopyrogallol red – Triton X-100 was investigated using different ways of analytical signal detection. The effect nature for metrological characteristics of calibration dependence of cationic substrate determination was established in a variety of experimental conditions such as different nonionic surfactants concentration, ratio of reacting components and ways of receiving of colorimetric signal. The best sensitivity of albumin determination was observed using webcam for signal registration of the dilute micellar phases and formed micellar phases without their separation. The colorimetric method with previous micellar-extraction in Triton X-100 for protein determination in urine was developed. The accuracy of method was tested on reaction of protein with coomassie brilliant blue by independent laboratory.

Keywords: fmicellar extraction, RGB–colorimetry, bromopyrogallol red, albumin, Triton X-100

Кольорометричне визначення альбуміну у міцелярно-екстракційній системі Mo(VI) – Бромпірогалоловий червоний – Triton X-100

М.В. Рогоза*, С.А. Куліченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра аналітичної хімії, вул. Льва Толстого, 12, Київ, 01033, Україна, *e-mail: rogozamar@gmail.com

Надійшла: 19 червня 2015 г; Прийнята до друку: 13 липня 2015 г

Досліджено можливість поєднання міцелярної екстракції з методом цифрової кольорометрії. Показано, що взаємодія комплексу Mo(VI) – бромпірогалоловий червоний – Triton X-100 з великими органічними катіонами, цетилпіридиній хлоридом й альбуміном, характеризується високою чутливістю реакції та її контрастністю ($\Delta\lambda$ >100 нм). Встановлено, що при концентраційному співвідношенні Mo:БПЧ=2:4 та невисокому вмісті препарату Triton X-100 ($C_{НПАР}$= 0.5%) реалізується найкраща чутливість визначення органічного катіону. Процедура попереднього міцелярно-екстракційного концентрування сприяє зниженню межі виявлення білку в 2 рази у порівнянні з кольорометрією вихідних міцелярних розчинів. Реєстрацію кольорометричного сигналу краще здійснювати веб-камерою збоку розведених міцелярних фаз (МВ=0.9 мг/л) та виділених міцелярних фаз без їх відокремлення (МВ=1.4 мг/л). На основі отриманих даних розроблено методику кольорометричного визначення білку у сечі на рівні його природнього вмісту з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням в міцелярну фазу Triton X-100 із застосування для аналізу малих об'ємів проби – 1 мл. Правильність отриманих результатів перевіряли незалежною лабораторією за реакцією, що ґрунтується на взаємодії білку з кумасі діамантовим синім.

Ключові слова: міцелярна екстракція, RGB–кольорометрія, бромпірогалоловий червоний, альбумін, Triton X-100

Міцелярна екстракція фазами неіонних поверхнево-активних речовин (НПАР) є зручним та ефективним методом концентрування мікрокомпонентів, що інтенсивно розвивається останнім часом [1]. *П*ерспективність міцелярно-екстракційного концентрування зумовлена підвищенням, у порівнянні з рідино-рідинною екстракцією, вибірковості методу та коефіцієнтів концентрування при використанні для аналізу невеликих об'ємів проби.

Визначення білку у сечі є обов´язковим елементом при діагностиці низки захворювань нирок і сечовивідних шляхів. Однак, при визначенні білку у сечі здорової людини на природному

© M.V. Rohoza, S.A. Kulichenko

рівні класичні методи аналізу не забезпечують достатньої чутливості й потребують попереднього концентрування. Раціональною альтернативою традиційним гібридним методикам визначення білків виступають міцелярні та міцелярно-екстракційні системи на основі НПАР, які є ефективними середовищами для проведення аналітичних реакцій і добре поєднуються з фізіологічними рідинами. До переваг міцелярних систем слід віднести, легкість їх комбінації з різними методами аналізу [2–4]. Це зумовлює перспективне застосування міцелярних систем неіонних ПАР для концентрування та визначення білкових субстратів при аналізі фізіологічних рідин.

У клініко-діагностичних лабораторіях при визначенні загального вмісту альбумінів у сечі переважно використовують спектрофотометричні методики, що ґрунтуються на взаємодії аніонів барвників з катіонними формами білку [5]. Крім спектрофотометрії, також застосовують хроматографічні та електрохімічні методи [6] із застосуванням процедури попереднього концентрування. Враховуючи лабільність білкових субстратів, перевагу надають низькотемпературним методам концентрування з незначною денатуруючою дією. Однак, за чутливістю та вибірковістю, наявні методики не забезпечують можливості надійного визначення білкових субстратів у складних біологічних матрицях.

З розвитком цифрових технологій та комп´ютерних програм обробки зображень цифрова кольорометрія (КМ), у порівнянні із спектрофотометрією (СФ), зарекомендувала себе як раціональний і конкурентоспроможний метод аналізу [7]. Кольорометрія міцелярних систем дозволяє створювати нові гібридні методики, які характеризуються підвищеними метрологічними характеристиками з можливістю одночасного аналізу декількох проб.

У кислих водних розчинах, при pH нижче ізоелектричної точки, білки існують у вигляді великих органічних катіонів (Cat^+). Для таких катіонів, особливо для катіонних ПАР, у літературі запропоновано широкий спектр аналітичних систем. Найбільш цікавими для кольорометрії є системи типу іон металу – органічний реагент – великий катіон, які характеризуються максимальною контрастністю. Аналіз даних літератури показав, що взаємодія великих органічних катіонів, зокрема катіонних ПАР, з комплексами Mo(VI) – бромпірогалоловий червоний (БПЧ) при контрастній реакції ($\Delta\lambda$ >100 нм) проявляють високу чутливість [8, 9]. У зв'язку з цим, метою роботи була розробка умов реєстрації кольорометричного сигналу білків у кислих розчинах Mo(VI)–БПЧ–НПАР.

Експериментальна частина

Об'єкти та методи дослідження. Як основну неіонну ПАР у роботі використали препарат Triton X-100 ("Merck", вміст основної речовини > 98.5 %), який являє собою поліоксиетильне похідне ізооктилфенолу із середнім ступенем оксиетилювання ≈ 9.7. Вибір був зумовлений хорошою розчинністю його у воді, низьким значенням критичної концентрації міцелоутворення та високою солюбілізаційною ємністю. Розчин саліцилової кислоти, бромпірогалолового червоного "ч.д.а" та цетилпіридиній хлориду (ЦПХ) ("Merck", вміст основної речовини > 99 %) готували розчиненням відповідних точних наважок у дистильованій воді. Розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з концентрацією 0.1 г/л готували розчиненням точної наважки у 1% розчині Triton X-100. Розчин молібдену готували розчиненням молібдату натрію "ч.д.а" у дистильованій воді.

Кислотність розчинів контролювали за допомогою pHметра «pH340» зі скляним електродом ЭСЛ–43-07. Спектри поглинання розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ46.

Реєстрація кольорометричного сигналу. Детектування кольорометричного сигналу міцелярних систем здійснювали за допомогою сканера "CanoScan LiDE 60" та веб-камери "Logitech C525 HD" з використанням білого фотобоксу для макрозйомки. Кількісну оцінку інтенсивності R-, G-, B- каналів відсканованих / сфотографованих міцелярних систем проводили у графічному редакторі Adobe Photoshop 7.0: на отриманому зображенні виділяли область забарвленого міцелярного розчину чи фази і розраховували середнє значення інтенсивності R-, G-, B- каналів (команда "Image–Histogram").

Методика експерименту. В основі міцелярно-екстракційного концентрування лежить явище фазового розшарування у водних розчинах поліоксиетильованих НПАР при температурі помутніння. Розчинність неіонних ПАР у воді зумовлена утворенням водневих зв'язків між атомами кисню поліоксиетиленового ланцюга та молекулами води. При нагріванні вище температури помутніння ці зв'язки руйнуються і в системі спостерігається фазове розшарування з утворенням міцелярних макрофаз [10]. Для міцелярно-екстракційного визначення лабільних субстратів у роботі використали модифікуючу гідротропну добавку саліцилової кислоти, яка здатна зменшувати температуру фазоутворення. Умовою використання саліцилової кислоти є її присутність в системі у молекулярній формі [11]. Використання гідротропу при концентрації 0.01 моль/л і pH=1 забезпечувало зручні показники температури помутніння (~30^0C) і збереження нативної природи білкового субстрату.

Кольорометричне та спектрофотометричне визначення органічних катіонів у системі

Mo(VI)–БПЧ–НПАР. В калібровані пробірки об'ємом 10 мл вносили 0.2 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину молібдату натрію, 0.4 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину БПЧ, різну кількість $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчинів ЦПХ або 0.1 г/л БСА, 1,3 – 2.5 мл 4%-ного розчину Triton X-100, 1.0 мл 0.1 моль/л розчину саліцилової кислоти, доводили об'єм до 10 мл дистильованою водою та перемішували. В отриманих розчинах встановлювали pH=1 сульфатною кислотою. Для реєстрації кольору міцелярних систем відбирали 1.0 мл аліквоти, поміщали у віалу і проводили зйомку кольорометричного сигналу до фазоутворення та після проведення міцелярно-екстракційного концентрування; вимірювання світлопоглинання міцелярних розчинів здійснювали у кюветі з *l*=1.0 см. Розчин порівняння містив всі компоненти, окрім визначуваного. Міцелярну екстракцію проводили незначним нагріванням (~30 ^{0}C) вихідних міцелярних розчинів у водяній бані. Отримані у каліброваних пробірках міцелярні фази, об´ємом ~ 0,15 мл, розбавляють водою до 0,5 мл і вимірюють кольорометричний сигнал.

У роботі дослідили метрологічні показники кольорометричного сигналу білку за різних способів його детектування (рис.1). Оцінювали колір вихідних міцелярних розчинів Mo(VI)–БПЧ–НПАР–Cat^+ (I); виділених міцелярних фаз без їх відокремлення (II); відокремлених міцелярних фаз (III) та міцелярних розчинів, отриманих розведенням міцелярних фаз, утворених з об'єму 9.0 мл і розведених до 0.5 мл (IV). Зйомку аналітичного сигналу проводили:

1. скануванням міцелярних систем I – IV знизу;
2. фотографуванням міцелярних систем I – IV веб-камерою збоку;
3. фотографуванням міцелярних систем I, III та IV веб-камерою зверху;
4. вимірюванням світлопоглинання вихідних міцелярних розчинів (I).

У роботі систематично дослідили якість апроксимації градуювальних залежностей кольорометричного та спектрофотометричного визначення органічних катіонів у системі Mo(VI)–БПЧ–НПАР за допомогою рекомендованих у літературі [12–13] рівнянь: $y=a+b \cdot C$, $y=a+b \cdot lgC$, $lg(y)=a+b \cdot lgC$, $y=Y_0+A \cdot exp(-C/t)$, де y – інтенсивність певного каналу кольору або оптична густина; a, b, Y_0, A, t – параметри регресії, C–концентрація визначуваного компонента. Останню залежність зазвичай лінеаризують у допоміжних координатах $lnA/(Y-Y_0)$ від C/t.

Аналіз якості досліджених градуювальних залежностей та оцінка відповідних похибок показали доцільність застосування для визначення органічних катіонів експоненціальної залежності. Отримані у роботі рівняння характеризувались прийнятно високими коефіцієнтами лінійної кореляції (r^2>0,99) у допоміжних координатах.

Результати дослідження та їх обговорення

Система Mo(VI)–БПЧ–НПАР була використана у роботі для розробки умов визначення органічних катіонів та БСА. За відсутності КПАР у слабко кислих розчинах (pH 3–5) молібден взаємодіє з БПЧ, утворюючи два комплекси із співвідношенням компонентів Mo:БПЧ=1:1 та 1:2 (λ_{max}=480 нм). Модифікуюча дія катіонних ПАР та їх суміші з неіонними ПАР на спектри поглинання БПЧ та його комплексів з металами наразі детально вивчена [14 –16]. При введенні в таку систему гідрофобних органічних катіонів та БСА зазвичай спостерігається батохромний зсув максимуму поглинання з одночасним підсиленням його інтенсивності. При цьому досягається максимальна контрастність реакції із зсувом комплексоутворення в більш кислу область.

Як модельну катіонну ПАР у роботі використали цетилпіридиній хлорид. В залежності від кислотності розчину та концентраційних співвідношень, склад утворених трикомпонентних комплексів змінюється від Mo:БПЧ:КПАР=1:1:2 до 1:2:4. Координація органічного катіону реалізується, як по сульфогрупі БПЧ, так і по оксигрупі реагенту, не задіяній на комплексоутворення з металом. Присутність у розчинах НПАР забезпечує однорідність їх колоїдно-хімічного стану та модифікує аналітичний сигнал, а при проведенні міцелярної екстракції дає міцелярні макрофази, які виконують функцію колектора.

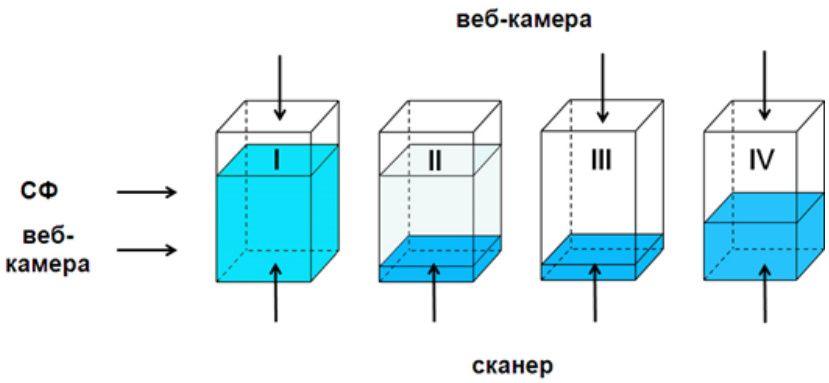


Рис. 1. Реєстрація кольору міцелярних систем: I – міцелярних розчинів, II – виділених міцелярних фаз без відокремлення; III – відокремлених міцелярних фаз, IV – розведених міцелярних фаз.

Введення Triton X-100 у розчини Mo(VI)–БПЧ слабко впливає на характер спектрів поглинання комплексу. З іншого боку, додавання у систему ЦПХ супроводжується зсувом максимуму поглинання в довгохвильову область спектра (λ_{max} 620 нм), що зазвичай пояснюють утворенням чотирьохкомпонентної комплексної сполуки Mo(VI)–БПЧ–ЦПХ–НПАР, рис.2.

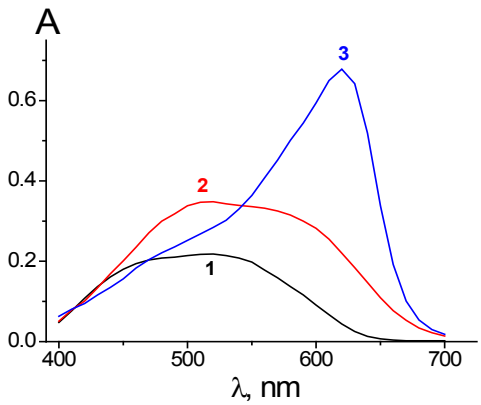


Рис. 2. Спектри поглинання водних розчинів БПЧ (1), Mo(VI)–БПЧ (2) та Mo(VI)-БПЧ-ЦПХ (3) у присутності Triton X-100. $C_{Mo}=2\cdot10^{-5}$ моль/л, $C_{БПЧ}=4\cdot10^{-5}$ моль/л, $C_{ЦПХ}=2\cdot10^{-5}$ моль/л, $C_{НПАР}$=1%, C_{H2Sal}=0.01 моль/л, pH=1, *l* = 1.0 см

Досліджено вплив концентраційного співвідношення Mo(VI):БПЧ на метрологічні характеристики КМ та СФ визначення ЦПХ. Порівняли межу виявлення – МВ; значення коефіцієнтів лінійної кореляції – r^2 і лінійний діапазон градуювальних залежностей визначення модельного органічного катіону. Встановлено, що найбільш чутливим до зміни концентрації ЦПХ у системі Mo(VI)–БПЧ–НПАР виявився R–канал кольору. Дані табл. 1 показують, що найменше значення межі виявлення ЦПХ реалізується при співвідношенні Mo(VI):БПЧ=2:4. Примітно, що за таких умов чутливість кольорометрії в ~2,5 рази вище, у порівнянні зі спектрофотометрією. Таке співвідношення Mo:БПЧ використали надалі у роботі для кольорометричного визначення БСА у фізіологічних рідинах.

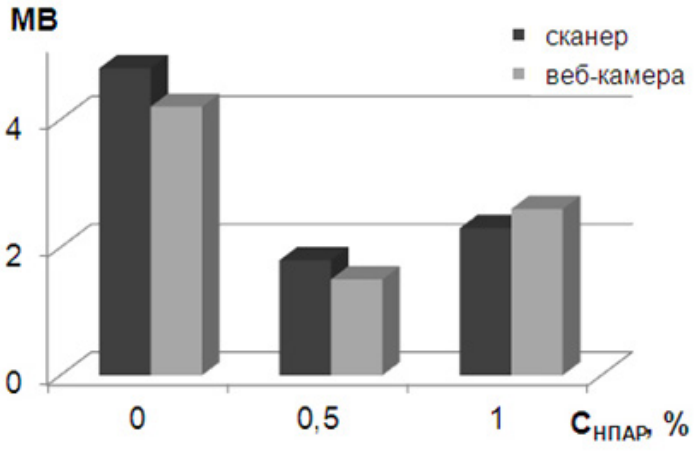
Встановлено, що при визначенні альбуміну у запропонованій системі Mo(VI)–БПЧ–НПАР концентрація Triton X-100 значно впливає на чутливість кольорометричного визначення мікрокомпоненту. Відповідно до рис.3, за повної відсутності НПАР межа виявлення БСА значно збільшується, що, на нашу думку, викликане неоднорідністю колоїдно-хімічного стану системи. При завеликому вмісті Triton X-100 ($C_{НПАР}$=1%) відбувається розбавлення кольороутворюючого комплексу у міцелах, що також негативно позначується на чутливості методики. Тому у роботі використали компромісну концентрацію НПАР ($C_{НПАР}$=0.5%), для якої були отримані задовільні метрологічні показники.

Таблиця 1. Метрологічні характеристики градуювальних залежностей кольорометричного та спектрофотометричного визначення ЦПХ у системі Mo(VI)–БПЧ–НПАР. $C_{НПАР}$=1%, $C_{H2Sal}=1\cdot10^{-2}$ моль/л, pH=1, n = 8.

$(C_{Mo}:C_{БПЧ})\cdot10^{-5}$ моль/л	Метод	r^2	МВ, мг/л	Лінійність ГГ, мг/л
1:2	СФ	0.980	1.9	–
	КМ	0.998	0.9	–
2:2	СФ	0.970	1.6	5.3 – 7.2
	КМ	0.980	1.1	3.7 – 7.2
2:4	СФ	0.989	0.5	1.7 – 14
	КМ	0.998	0.2	0.7 – 14
2:6	СФ	0.991	0.9	3.0 – 22
	КМ	0.998	0.4	1.3 – 22
4:8	СФ	0.986	2.0	6.7 – 29
	КМ	0.993	1.4	4.7 – 29

"–" - малий інтервал лінійності градуювального графіку (ГГ)

Рис. 3. Вплив концентрації Triton X-100 на межу виявлення БСА у системі Mo(VI)–БПЧ–НПАР. $C_{Mo}=2\cdot10^{-5}$ моль/л, $C_{БПЧ}=4\cdot10^{-5}$ моль/л, C_{H2Sal}=0.01 моль/л, pH=1; n=8, зйомка №1 і №2 вихідних міцелярних розчинів.



Показано, що з огляду на чутливість визначення, не менш важливим є спосіб реєстрації аналітичного сигналу, рис.1. Так, при зйомці сигналу сканером та веб-камерою збоку, спостерігається покращення метрологічних характеристик градуювальних залежностей визначення БСА при одночасному детектуванні кольору усіх проб, тобто, – на одному зображенні (табл.2). Примітно, що кольорометрія вихідних міцелярних розчинів характеризується низькою межею виявлення, а збільшення чутливості при проведенні міцелярної екстракції та відокремленні міцелярних фаз не відповідає коефіцієнтам концентрування. Найкраща чутливість спостерігається при зйомці сигналу способом №2 (фотографування веб-камерою збоку) розбавлених міцелярних фаз та виділених міцелярних фаз без їх відокремлення. Важливо, що скорочення інтервалу визначення БСА з 60 до 30 мг/л призводить до покращення метрологічних характеристик градуювальної залежності і відповідного зменшення межі виявлення альбуміну.

На основі отриманих даних були запропоновані умови кольорометричного визначення альбуміну у сечі. Вибір досліджуваного об'єкту зумовлений спорідненістю міцелярних фаз до фізіологічних рідин та відсутністю у складі сечі великих органічних катіонів, окрім білків, й інших компонентів, що здатні впливати на забарвленість комплексу Mo(VI)–БПЧ–Triton X-100.

Таблиця 2. Межа виявлення та показник лінійності градуювальних залежностей визначення БСА у міцелярно-екстракційній системі Mo(VI)–БПЧ–Triton X-100 при різних способах зйомки сигналу. C_{Mo}= 2·10^{-5} моль/л, $C_{БПЧ}$ = 4·10^{-5} моль/л, $C_{НПАР}$= 0.5%, C_{H2Sal}= 1·10^{-2} моль/л, pH=1, n=8.

Спосіб зйомки сигналу	Міцелярні системи							
	I		II		III		IV	
	МВ, мг/л	r^2	МВ, мг/л	r^2	МВ, мг/л	r^2	МВ, мг/л	r^2
1	2.2	0.992	3.7	0.965	3.0	0.992	2.0	0.998
2	2.2	0.998	1.4	0.996	3.0	0.991	0.9	0.999
3	2.6	0.989	–		3.7	0.965	4.6	0.923
4	4.0	0.972	–		–		–	

Методика кольорометричного визначення БСА у сечі. В калібровані пробірки об'ємом 10 мл вносили 0.2 мл 1·10^{-3} моль/л розчину молібдату натрію, 0.4 мл 1·10^{-3} моль/л розчину БПЧ, 5 мл проби відфільтрованої сечі, 1.25 мл 4%-ного розчину Triton X-100, 1.0 мл 0.1 моль/л розчину саліцилової кислоти, доводили об'єм до 10 мл дистильованою водою та перемішували. В отриманих розчинах встановлювали pH=1 сульфатною кислотою. Кольорометричні вимірювання системи та побудову градуювального графіку проводили за наведеною вище методикою способом реєстрації сигналу №2. Визначення вмісту білку у сечі здійснювали методом добавок шляхом введення у систему відповідних кількостей стандартизованого розчину альбуміну. Правильність отриманих результатів перевіряли арбітражною методикою з кумасі діамантовим синім [17].

Дані таблиці 3 показують хорошу правильність розробленої гібридної методики і більшу її чутливість у порівнянні з відомими у літературі спектрофотометричними методиками визначення альбуміну в сечі. Примітною є тотожність результатів визначення вмісту білку за допомогою градуювального графіка та за методом добавок, що свідчить про відсутність матричних ефектів.

Таблиця 3. Результати кольорометричного визначення БСА у сечі в системі Mo(VI)–БПЧ–Triton X-100. $C_{БПЧ}$= 4·10^{-5} моль/л; C_{H2Sal}=1·10^{-2} моль/л; C_{Mo}= 2·10^{5} моль/л; $C_{НПАР}$= 0.5 %; pH=1; n=3, P=0.95.

Кольорометрія (IV)			Арбітражний метод
Введено, мг/л	Знайдено, мг/л	Sr, %	
0	2.5 ± 0.2	4.7	(2.4 ± 0.1) Sr=2.3%
5	7.6 ± 0.3	2.0	
10	12.5 ± 0.3	1.2	

Висновки

Розроблено оптимізовані умови отримання рідких низькотемпературних міцелярних фаз Triton X-100, модифікованих саліциловою кислотою. Показана доцільність їх застосування для концентрування лабільних білкових субстратів. Встановлено, що при введенні БСА та цетилпіридиній хлориду в спектрах поглинання розчинів Mo(VI)–БПЧ–НПАР спостерігаються потенційно цікаві для кольорометрії батохромні та гіперхромні ефекти. Розроблено методику кольорометричного визначення альбуміну з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу Triton X-100. Поєднання міцелярної екстракції з кольорометричним детектуванням забезпечило покращення метрологічних характеристик розробленої гібридної методики (МВ=0.9 мг/л) та дозволило запропонувати умови визначення білку в сечі на рівні його природного вмісту.

Література

1. Bezerra M., Arruda M., Ferreira S. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques. *J. Appl. Spectrosc.* 2005, 40 (1). P. 269–299.
2. Evangelos P., Dimosthenis G., Miltiades I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *Trends Anal. Chem*. 2005, 24 (5). P. 426–436.
3. Shariati S., Yamini Y. Cloud point extraction and simultaneous determination of zirconium and hafnium using ICP–OES. *J. Colloid Interface Sci*. 2006, 298 (1). P. 419425.
4. Doroschuk V.O., Lelyushok S.O., Ishchenko V.B. Flame atomic absorption determination of manganese (II) in natural water after cloud point extraction. *Talanta*. 2004, 64 (4). P. 853–856.
5. Новоселова О.В., Пятигорская М.Б., Михайлов Ю.Е. Клинические аспекты выявления и оценки протеинурии, Справочник заведующего КДЛ, № 1, 2007. С. 18–24.
6. Buch A., Glavin D., Sternberg R. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry. *Meteorit. Planet. Sci*. 2006, 54 (15). P. 1592–1599.
7. Химченко С.В., Экспериандова Л.П. Цветометрия в инструментальном и визуальном тест–анализе. 2014.
8. Mustafin D., Kostromina N., Suvanova O., Gribov L. Reaction of bromopyrogallol red with cetylpyridinium chloride. *Theor. Exp. Chem*. 1984, 20 (1). P. 19–23.
9. Gambarov D., Khalilova F., Nagiev Kh. Spectrophotometric determination of molybdenum (VI) with bromopyrogallol red in the presence of Triton X-114. *Anal. Chem. 2006, 61 (7).* P. 638–640.
10. Куличенко С.А., Дорощук В.А. Мицеллярно-экстракционное концентрирование свинца фазами неионных ПАВ при температуре помутнения. Химия *и* технология воды. 2002, 24 (3). С. 248-256.
11. Куличенко С.А., Федорчук О.И., Дорощук В.А. Влияние природы, структуры и гидрофобности индуцирующих добавок на температуру помутнения водных растворов неионного ПАВ Triton X-100. Доп. НАН України. 2008., №8. С. 131–138.
12. Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Снежко Д.В., Житняковская Я.А., Бондаренко Я.А., Островская В.М. О применении портативного фотометра для регистрации цвета сорбентов в химическом анализе. *Вісник Харків. ун-ту*. 2010,19 (42). С. 7–8.
13. Апяри В.В., Дмитриенко С.Г. Применение цифрового фотоаппарата и компьютерной обработки данных для определения органических веществ с использованием диазотированного пенополиуретана. *Журн. аналит. хим*. 2008, 63 (6). С. 581–588.
14. Мамедова А.М. Аналитические аспекты использования цветометрических характеристик пирогаллолового красного и бромпирогаллолового красного и их комплексов с ионами металлов: Автореф. *дис. канд.* хим. *наук*: 02.00.02, МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва, 2005.
15. Nemcova I., Hrachovska J., Mikova J. Spectrophotometric study of reaction of bromopyrogallol red with cationogenic tensides: determination of antimony. *Microchem. J.* 2014, 30 (1). P. 39.
16. Иванов В.М., Мамедова А.М. Тригидроксифлуороны как аналитические реагенты. *Журн. аналит. хим*. 2006, 60 (11). С. 1128-1151.
17. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. Пер. с англ. Под ред. Н.Е. Кондратьевой и Л.В. Калакуцкого, Москва: МИР, 1984. С. 360.