

ченості, можна сказати, що невизначеність, зумовлена прободіготовкою, у відлагодженій методиці має бути істотно меншою за невизначеність вимірювань.

Розглядаючи для конкретності такі процедури прободіготовки зразків для РСФА, як механічне подрібнення й шліфування поверхні, можемо відзначити, що невизначеність, зумовлена зазначеними процедурами, для відлагодженої методики має бути досить малою порівняно з невизначеністю результатів аналізу, тому нею завдяки цьому нехтуємо.

Однак у загальному випадку (наприклад, у разі розробки методики визначення хімічного складу матеріалів методом РСФА) невизначеність, пов'язану з прободіготовкою, слід розраховувати на основі оцінки відтворюваності вимірювань інтенсивності для серії з 10–15 паралельних проб і розрахунку середньоквадратичного відхилення.

Насамкінець, невизначеність спектрометра оцінимо за даними перевірки приладу.

У нашому випадку межа абсолютної похибки для надійної ймовірності 0.95 становить 0.18 %. Оскільки вид розподілу в перевірочному документі не зазначено, розраховуємо невизначеність спектрометра як  $u_d = 0.18/2 = 0.09$  0.18/2=0.09 [5].

Тепер можемо розрахувати комбіновану невизначеність звичайним чином як корінь квадратний із суми квадратів невизначеностей:

$$u_c = \sqrt{u(C)^2 + u_0^2 + u_d^2} = \sqrt{2.08^2 + 0.05^2 + 0.09^2} \approx 2.081$$

Тоді результат вимірювання вмісту мангану в зразку феромангану подамо у вигляді 88.3; 2.08.

Розширену невизначеність обчислимо, використовуючи коефіцієнт покриття 2:

$$U_r = 2.081 \times 2 = 4.16$$

УДК 543.2, 542.61, 611.185.1

Результат розрахунку розширеної невизначеності вмісту мангану в досліджуваному зразку подамо у вигляді  $(88.30 \pm 4.16)\%$ ,  $P = 0.95$ .

Аналогічно, скориставшись відомими формулами методу найменших квадратів для розрахунку дисперсій і коваріацій, можна одержати оцінку невизначеності для квадратичної регресійної моделі (2).

Порядок оцінювання невизначеності в рамках лінійної моделі множинної регресії (3) відповідно до документу [6] подано в роботі [2].

Оскільки невизначеність розраховують як дисперсію досить великої кількості (більше 10) вимірювань, то застосування поняття невизначеності для подання результатів РСФА має практичний сенс у випадку виконання акредитаційних випробувань або атестації методик. Проте у випадку виконання поточних оперативних аналітичних вимірювань (наприклад, у заводських лабораторіях), коли з міркувань доцільності або вимушено реально допустиму кількість вимірювань обмежено, звичайний стандартний спосіб подання результатів вимірювань варто залишити без змін.

1. Кадис Р.Л. Оценивание неопределенности в аналитических измерениях. От Руководства ISO к Руководству ЕВРАХИМ/СИТАК: от общего к частному и обратно // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2002. – Т. 68, № 6. – С. 52–60. 2. Ціделко В.Д., Яремчук Н.А. Невизначеність вимірювання. Обробка даних і подання результату вимірювання: Монографія. – К., 2002. 3. ANSI/NCCL Z540-2-1997 U.S. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. – National Conference of Standards Laboratories. 4. ENV 13005:1999 Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. – European Committee for Standardization. 5. EUROCHEM/CITAK Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement: Second edition. – 2000. 6. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement: First Edition. – ISO, Switzerland, 1993.

Надійшла до редакції 07.05.07

Т. Костюк, асп.,  
С. Куліченко, канд. хім. наук

## НИЗКОТЕМПЕРАТУРНА МІЦЕЛЯРНА ЕКСТРАКЦІЯ ДЛЯ КОНЦЕНТРУВАННЯ БІОМОЛЕКУЛ

*Досліджено вплив природи та концентрації неіонних ПАР, кислотності, різних добавок на параметри фазоутворення в розчинах при температурі помутніння. Досліджена можливість вилучення альбуміну в міцелярні фази неіонних ПАР Triton X-100 та Акуро LF1. Показано, що природа ПАР і кислотність середовища є основними факторами регулювання процесу екстракції.*

*The influence of nature and concentration of the nonionic surfactants, acidity and introduction of different additives on parameter of the phase separation at the cloud point temperature was investigated. The possibility of the extraction of albumin into micellar-rich phases of the nonionic surfactants was shown. The nature of surfactants and the acidity of the medium are the base factors for the regulation of the micelle extraction processes was indicated.*

**Вступ.** Останнім часом все більший інтерес викликає міцелярно-екстракційне концентрування органічних речовин для подальшого визначення фізичними та фізико-хімічними методами [5–7; 12]. У першу чергу, це зумовлено вимогами до створення простих, експресних та чутливих методик визначення мікрокількостей органічних сполук, у тому числі білкової природи, в об'єктах навколишнього середовища та біологічних рідинах. Незважаючи на інтенсивний розвиток фізико-хімічних методів аналізу, визначення органічних сполук в об'єктах зі складним фоновим складом залишається нетривіальним завданням. Так, у клінічному аналізі традиційні лабораторно-діагностичні методи часто не вирішують проблему визначення білка в сечі на рівні норми та при початкових патологічних станах [2; 10]. Тому проблема розробки ефективних методів концентрування біологічних молекул залишається актуальним.

Міцелярна екстракція є ефективним прийомом концентрування, очищення та розділення компонентів біологічних рідин, у тому числі й протеїнів; чутливим, точним і експресним методом розділення гідрофобних і гідрофільних біоматеріалів при аналізі великої кількості зразків [11]. Ряд методик біохімічної очистки протеїнів з використанням міцелярної екстракції фазами НПАР прийняті як стандартні [13; 14]. Трициклова методика міцелярно-екстракційного розділення з використанням Triton X-100 була використана для вилучення ( $R > 99\%$ ) ендотоксину з препаратів протеїну. Методика не втрачає ефективності при роботі з великими кількостями протеїну (в інтервалі 200–500 мг) [15]. У деяких випадках міцелярна екстракція фазами НПАР виступає альтернативою хроматографічному методу очистки та розділення рослинних протеїнів. Так, додатки НПАР перешкоджають взаємодії фенолів з ферментом, що аналізують, унаслідок якої можуть змінитися характеристики

ки препарату. Крім того, у таких системах нівелюється вплив хлорофілу при аналізі активності ензиму, а також потенційна зміна активності ензиму під час розділення традиційними методами [19].

Основною перевагою міцелярно-екстракційних систем є їхня селективність до певних класів органічних сполук, яку додатково можна регулювати, змінюючи властивості додатків споріднених лігандів і водорозчинних полімерних модифікаторів [16; 17]. Недоліком класичних варіантів міцелярної екстракції часто є висока температура фазового розділення та необхідність використання для її зниження сторонніх речовин, що не завжди є бажаним.

Таким чином, для концентрування біоматеріалів необхідні ПАР, які мають відповідати ряду вимог. Так, розчини ПАР повинні мати низьку температуру помутніння, що дає можливість проводити розділення при кімнатній температурі. Препарати ПАР також мають забезпечувати екстракційну селективність щодо певних груп біологічних матеріалів. І нарешті, у системі ліганд-ПАР неіонні ПАР мають забезпечувати спорідненість щодо гідрофільних протеїнів, які не вилучаються в міцелярні фази без додавання відповідних ко-лігандів.

Найдоцільнішим використанням НПАР-систем з низькою температурою помутніння вбачається для концентрування сполук білкової природи. Вони нестійкі за підвищених температур, що обмежує можливості застосування класичної міцелярної екстракції. Крім того, білки чутливі до дії більшості гідротропних модифікаторів, які зазвичай використовують з метою зниження температури помутніння розчинів НПАР (фенол, електроліти). Тому метою роботи був пошук оптимальних міцелярно-екстракційних систем для концентрування білків фазами неіонних ПАР зі зниженою температурою помутніння.

**Реагенти й апаратура.** У роботі використовували неіонні ПАР різного типу: поліоксидетильовані алкілфеноли – Triton X-100, ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10; поліоксидетильовані етери сорбітану – Tween 20, Tween 21, Tween 61, Tween 65, Tween 85; неіонну ПАР Акуро LF1 – натрію карбоксилат каприлполігліколевого ефіру із загальною формулою  $R(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OCH}_2\text{COOH}$  з  $R=\text{C}_8$  та  $n=5$ ; модифікатор блокополімер Ніюноген 1000. Препарати Triton X-100, Tween 20, Tween 21, Tween 61, Tween 65, Tween 85 були фірми "Merck" із вмістом основної речовини > 99 %, Акуро LF1 – фірми KaoChemicals із вмістом основної речовини 88,5 %.

Вибір Triton X-100 був зумовлений доброю розчинністю у воді, відносно швидким формуванням фази при відносно невисокій температурі помутніння, компактністю, в'язкістю та нейтральністю утворюваних ним фаз. Препарати Tween 20, Tween 21, Tween 61, Tween 65, Tween 85, Ніюноген 1000, ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10 були використані як добавки з метою зниження температури помутніння розчинів Triton X-100.

Препарат Акуро LF1 обрали завдяки низьким значенням температури помутніння (37–38 °С) і наявності у молекулі карбоксильної групи, яка потенційно може виконувати роль ко-ліганду при міцелярній екстракції білкової молекули.

Вихідні робочі розчини Triton X-100, ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10, Tween 20, Акуро LF1 готували розчиненням точної наважки препаратів у дистильованій воді. Робочі розчини Ніюноген 1000, Tween 21, Tween 61, Tween 65, Tween 85 готували шляхом емульгування у 2 %-му розчині Тритон X-100. Досліджено вплив природи та концентрації неіонних ПАР, кислотності, різних добавок на параметри фазоутворення в розчинах при температурі помутніння. Досліджена можливість вилучення альбуміну в міцелярні фази неіонних ПАР Triton X-100 та Акуро LF1. Показано, що природа ПАР і кисло-

тність середовища є основними факторами регулювання процесу екстракції.

Робочий розчин білка (альбуміну) і біуретовий реактив готували, як описано в роботі [3]. Вміст білка визначали фотометричним методом за біуретовою реакцією [4]. Попередньо встановлено, що компоненти досліджених міцелярно-екстракційних систем на аналітичний сигнал білка в біуретовій реакції не впливають.

Світлопоглинання розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра КФК-3; кислотність розчинів контролювали за допомогою рН-метра "рН-340".

**Методика експерименту.** Міцелярну екстракцію білків і визначення параметрів фазоутворення (температури помутніння,  $T_n$ , °С та об'єму міцелярної фази,  $V_{м.ф.}$ , мл) проводили за загальною методикою, наведеною у роботі [9]. На основі даних спектрофотометричного аналізу визначали ступінь вилучення білка ( $R$ , %) у міцелярну фазу неіонних ПАР.

**Результати та їх обговорення.** У роботі досліджено вплив основних факторів на ступінь вилучення альбуміну в міцелярну фазу неіонних ПАР різних типів. Вивчено вплив природи та концентрації НПАР, кислотності розчинів, вмісту білка як на параметри фазоутворення, так і на ступінь вилучення субстрату.

Так, водні розчини НПАР ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10, Tween 20 характеризувалися високими значеннями температури помутніння (>75 °С), що є небажаним при концентруванні білків. Крім цього, ступінь вилучення білка в міцелярну фазу в широкому інтервалі рН не перевищив 15 %. Тому в подальшій роботі препарати НПАР ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10, Tween 20 як самостійні екстрагенти не використовували.

Препарат Triton X-100 характеризувався нижчими значеннями температури помутніння (68 °С для 2 %-вих розчинів), але вміст білка в міцелярній фазі був також невеликим ( $R=0$  при рН=7,8 і  $R_{\max}=18\%$  при рН=4,5). Знизити температуру помутніння до 36 °С зі збереженням явища фазоутворення вдалося при застосуванні системи Triton X-100 – Ніюноген 1000 ( $C_{\text{ТХ-100}}=C_{\text{Ніюноген}}=2\%$ ,  $V_{м.ф.}=0,6$  мл). Проте і для цієї системи спостерігали незначне вилучення білка в міцелярну фазу ( $R_{\max}=18\%$  при рН=2,0).

Використанням як добавки до розчину Triton X-100 препарату Tween 85 вдалося знизити температуру помутніння до 45 °С. Міцелярна фаза, яка при цьому утворювалася, мала киселеподібну консистенцію, значний об'єм і погано відокремлювалася. Унаслідок цього система Triton X-100 – Tween 85 була невдалою для використання з метою концентрування. Препарати Tween 21, Tween 61, Tween 65 у воді та в розчинах Triton X-100 розчинити й заемульгувати не вдалося, тому як добавки вони також виявилися непридатними. При використанні добавок препаратів Tween 20, ОП-7, ОП-10, Неонол АФ<sub>9</sub>-10 температура помутніння зростала до 90 °С, фазоутворення не відбувалося. Додавання білка та зміна кислотності на параметри фазоутворення не впливали. Через відсутність міцелярної фази екстракція не відбувалася, тому подальше дослідження даних систем НПАР не проводилося.

Відмінний від описаного в літературі [1; 8; 9] характер фазових процесів, спостерігали для препарату НПАР Акуро LF1. Було встановлено, що розчини препарату НПАР Акуро LF1 характеризуються низькими значеннями температури помутніння (37–38 °С) та, на відміну від нейтральних алкілфенольних НПАР, кислою реакцією середовища в межах рН 2,6–3,6. Результати рН-метричного титрування підтвердили кислотний характер Акуро LF1 (рис. 1). Параметри фазоутворення в розчинах Акуро LF1 залежали від кислотності: помутніння та формування міцелярної фази відбувалося при

pH<3,5. Міцелярна фаза у розчинах Акуро LF1 з концентрацією <1 % не формувалася в широкому інтервалі pH. Від концентрації НПАР Акуро LF1 у розчині температура помутніння практично не залежала (рис. 2, кр. 1).

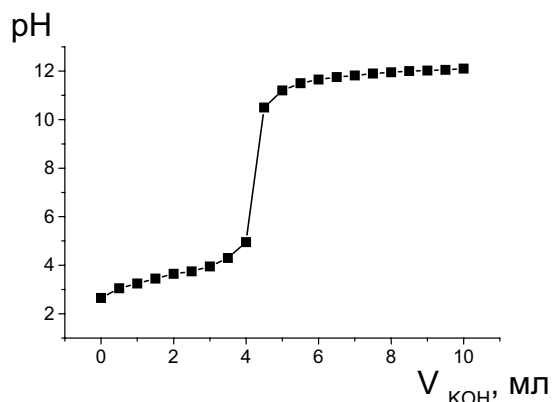


Рис. 1. pH-метричне титрування 10 мл 1 % (0,025 моль/л) розчину Акуро LF1 0,050 моль/л розчином КОН

Додавання білка змінювало параметри фазоутворення в розчинах Акуро LF1. Такі зміни не спостерігались при застосуванні інших типів НПАР. Так, уведення 0,5 % білка викликало значне зниження температури помутніння. Доведено, що зі зниженням концентрації Акуро LF1 знижувалася температура помутніння системи НПАР – білок (рис. 2, кр. 3). Фазоутворення спостерігалось при застосуванні 0,5 %-вих розчинів Акуро LF1 і при pH ≤ 5,5. Міцелярна фаза в чистих розчинах Акуро LF1 при pH 3,5÷5,5 не утворювалася. Також порівняно з чистими розчинами НПАР формування фази у присутності білка відбувалось швидше. Утворювана при цьому фаза добре відокремлювалася центрифугуванням.

Досліджено залежність ступеня вилучення білка в міцелярну фазу Акуро LF1 від концентрації НПАР:  $R_{max}=88\%$  при застосуванні 0,5 %-го розчину Акуро LF1. Таким чином, оптимальними для концентрування виявились 0,5 %-ві розчини препарату Акуро LF1, фазоутворення в яких за відсутності білка не відбувалось.

Показано, що залежність ступеня вилучення білка в міцелярну фазу Акуро LF1 від кислотності характеризується наявністю екстремумів. Так, найвищий ступінь вилучення білка в міцелярну фазу ( $R=91\%$ ) фіксували при застосуванні 0,5 %-го розчину Акуро LF1 та pH системи 4,5 ( $T_p=17\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_{m.f.}=0,6$  мл). При pH=3,0 вміст білка в міцелярній фазі Акуро LF1 виявився дещо нижчим ( $R=88\%$ ). При pH≥5,5 фазоутворення не спостерігали.

Максимальний ступінь вилучення аналіту в міцелярну фазу ( $R>98\%$ ) спостерігали при концентрації білка  $0,1\pm 0,3\%$  та pH системи 4,5. При цьому  $T_p=17\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_{m.f.}=0,6\pm 0,7$  мл. При збільшенні концентрації білка ступінь вилучення його в міцелярну фазу Акуро LF1 незначно знижувався.

Високий вміст білка в міцелярній фазі неіонної ПАР Акуро LF1 указує на можливість перебігу процесів комплексоутворення між білком і НПАР, унаслідок чого відбувається вилучення білка в міцелярну фазу НПАР Акуро (НПАР Акуро LF1 виступає у ролі ко-ліганда).

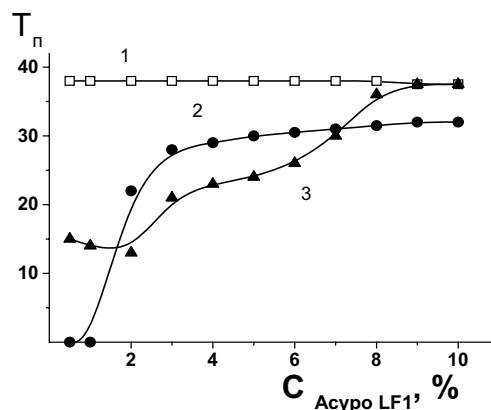


Рис. 2. Залежність температури помутніння від концентрації НПАР Акуро LF1 у чистих її розчинах (крива 1), при pH = 2 (крива 2) та у присутності 0,5 % білка (крива 3)

**Висновки.** Показано можливість концентрування білка фазами неіонних ПАР Triton X-100 та Акуро LF1. Низький вміст аналіту в міцелярній фазі алкілфенольних НПАР показав (підтвердив) необхідність застосування для екстракції білка фазами даних НПАР певних ко-лігандів. Високий вміст білка в міцелярній фазі НПАР Акуро LF1 пояснюється ко-лігандовою природою самої НПАР.

1. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение / Под. ред. Абрамзона А.А. – Л., 1988. 2. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск, 1982. 3. Корстелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – М., 1962. 4. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу "Біоаналітика" для студентів-магістрів хімічного факультету кафедри аналітичної хімії / Упоряд. доц. О.Ю. Наджафова. – К., 2006. 5. Методы анализа органических соединений. – М., 1981. 6. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. – М., 1981. 7. Паперно Т.Я., Поздняков В.П., Смирнова А.А. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии. – М., 1977. 8. Саввин С.Б., Чернова Р.К., Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества – М., 1991. 9. Сухан В.В., Куличенко С.А., Девятка В.В. Фазовое разделение растворов неионогенного ПАВ при температуре помутнения для целей концентрирования // Укр. хим. журн. – 1995. – Т. 61, № 7. – С. 34-38. 10. Хашев Р., Шейх Д. Очерки по патологической биохимии. – М., 1981. 11. Akita S., Takeuchi H. Cloud-point extraction of organic compounds from aqueous solutions with nonionic surfactant // Sep. Sci. Technol. – 1995. – Vol. 30, № 5. – P. 833-846. 12. Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo E., Moreno-Cordero B. et al. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis // J. Chromatography A. – 2000. – Vol. 902, № 1. – P. 251-265. 13. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution // J. Biol. Chem. – 1981. – Vol. 256, № 10. – P. 1604-1607. 14. Justice J.M., Murtagh J.J., Moss J., Vaughan M. Hydrophobicity and subunit interactions of rod outer segment proteins investigated using Triton X-114 phase partitioning // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, № 30. – P. 17970-17976. 15. Liu S., Tobias R, McClure S. et al. Removal of Endotoxin from Recombinant Protein Preparations // Clin. Biochem. – 1997. – Vol. 30, № 6. – P. 455-463. 16. Saitoh T., Hinze W.L. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of protein using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separations (cloud point extractions) // Anal. Chem. – 1991. – Vol. 63, № 21. – P. 2520-2525. 17. Saitoh T., Hinze W.L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins // Talanta. – 1995. – Vol. 42, № 1. – P. 119-127. 18. Saitoh T., Tani H., Kamidate T., Watanabe H. Phase separation in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants for protein separation // Trends Anal. Chem. – 1995. – Vol. 14, № 5. – P. 213-217. 19. Stangl G., Weller M.G., Niessner R. Increased sensitivity and selectivity of an enzyme-linked immunosorbent Assay for the determination of atrazine by use of nonionic surfactant // Fresenius J. Anal. Chem. – 1995. – Vol. 351, № 2-3. – P. 301-304. 20. Quina F.H., Hinze W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach // Ind.Eng.Chem.Res. – 1999. – Vol. 38, № 11. – P. 4150-4168