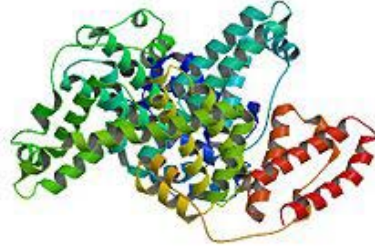


## Turbidymetryczne oznaczanie albuminy metodą Extona

Albumina jest głównym białkiem surowicy krwi, produkowanym w wątrobie.



Budowa przestrzenna surowiczej albuminy wołowej (BSA).

Związek ten spełnia w organizmie wiele ważnych funkcji, takich jak:

- utrzymanie prawidłowego ciśnienia koloidoosmotycznego osocza, zapobiegając przepływowi osocza do tkanek (czyli obrzękom),
- wiązanie i transport związków egzogennych i endogennych – na przykład hormonów (tyroksyna, trójiodotyronina, kortyzol), leków (antybiotyków, barbituranów), kwasów tłuszczowych, lipidów i barwników żółciowych (bilirubina), witamin. Ponadto może wiązać kationy różnych metali jak  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  i w tej formie powodować ich przemieszczanie się w organizmie,
- działanie przeciwutleniające – związane z obecnością w albuminie wolnej grupy tiolowej (-SH),
- działanie buforujące – albumina wchodzi w skład układu buforowego krwi,
- działanie przeciwzapalne – hamuje wytwarzanie leukotrienów przez neutrofile i płytki krwi oraz obniża wrażliwość neutrofile na działanie cytokin zapalnych.
- wpływ na przepuszczalność naczyń włosowatych,
- funkcja odżywcza – jest wychwytywana przez komórki śródbłonna gdzie ulega degradacji do wolnych aminokwasów, które następnie wracają do krążenia i są substratem do syntezy białka przez komórki,
- działanie przeciwzkrzepowe – aktywuje antytrombinę III i hamuje agregację płytek krwi.

Obniżenie stężenia albuminy w surowicy ma zatem duże znaczenie diagnostyczne.

Albumina jest rozpuszczalna w wodzie oraz w wodnych roztworach zasad i kwasów. O rozpuszczalności białka w wodzie decydują siły działające pomiędzy grupami polarnymi cząsteczek białka a dipolami wody. Dodanie do roztworu białka soli metali lekkich zmniejsza

jego rozpuszczalność ponieważ sól eliminuje warstwę hydratacyjną opłaszczającą białko, odciągając dipole wody. Na skutek utraty płaszczki wodnego białko wytrąca się z roztworu ale jego struktura przestrzenna nie zostaje naruszona. Ten proces nazywany jest wysalaniem i jest procesem odwracalnym (koagulacja odwracalna).

Nieodwracalnym procesem wytrącania białka jest denaturacja (koagulacja nieodwracalna). W trakcie denaturacji białko zmienia swoją strukturę przestrzenną i pierwotne właściwości. Czynniki powodującymi denaturację białka są wysoka temperatura, sole metali ciężkich (np. sole miedzi, rtęci, baru, kadmu, ołowiu), stężone kwasy i zasady, etanol.

Trwale zawiesiny i koloidy wykazują szczególne właściwości optyczne. Wiązka promieniowania padającego na roztwór mętny zostaje częściowo przepuszczona. Reszta promieniowania ulega absorpcji i rozproszeniu (zjawisko Tyndalla) przez cząstki zawiesiny. Promieniowanie transmitowane, czyli przechodzące przez roztwór mętny jest więc osłabione.

$$I_t = I_0 - I_r - I_{abs}.$$

W metodzie turbidymetrycznej wyznacza się stężenie zawiesiny lub koloidu na podstawie badania zależności między natężeniem światła padającego  $I_0$ , a natężeniem światła przechodzącego  $I_t$  przez roztwór mętny.

$$T = \log \frac{I_0}{I_t} = K l c$$

T- turbidancja, K – stała zależna od rodzaju zawiesiny c – stężenie, l – grubość warstwy próbki.

### **Zasada metody**

**Białko** (BSA - bovine serum albumin) w analizowanej próbce ulega wytrąceniu pod wpływem mieszaniny kwasu 5-sulfosalicylowego (odczynnik Extona). Stopień zmętnienia roztworu jest wprost proporcjonalny do stężenia białka, które określa się spektrofotometrycznie poprzez pomiar turbidancji przy  $\lambda=445$  nm.

### **Sprzęt**

Spektrofotometr VIS - Semco S91E (Emco)/ Spektrofotometr UV-VIS Spekol 11.

Pipety automatyczne.

## Odczynniki

Roztwór NaCl o stężeniu 0,15 mol/L.

Roztwór wzorcowy BSA: 1 mg/mL w 0,15 mol/L NaCl.

Odczynnik Extona - 10% (w/v) roztwór kwasu 5-sulfosalicylowego.

## Wykonanie ćwiczenia

1. W kolbkach o pojemności 10 mL przygotować **serię roztworów wzorcowych** według poniższej tabeli:

Numer roztworu	Roztwór wzorcowy BSA	Roztwór NaCl 0,15 mol/L	Odczynnik Extona
1	200 $\mu$ L	4,8 mL	5,0 mL
2	400 $\mu$ L	4,6 mL	5,0 mL
3	600 $\mu$ L	4,4 mL	5,0 mL
4	800 $\mu$ L	4,2 mL	5,0 mL
5	1000 $\mu$ L	4,0 mL	5,0 mL
<b>0-odnośnik</b>	-	5,0 mL	5,0 mL

Podane w tabeli roztwory odczynników dodawać w kolejności: roztwór wzorcowy, roztwór NaCl a na końcu roztwór odczynnika Extona. Zawartość każdej kolbki dokładnie wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej przez 4-10 min. Następnie zmierzyć turbidancję zawiesin w kuwetach o długości drogi 1 cm przemytych odpowiednim roztworem wzorcowym przy  $\lambda=445$  nm wobec odnośnika. Przed pomiarem zawartość kolbki dobrze wymieszać.

2. Otrzymaną w kolbie o pojemności 10,0 mL **próbkę badaną** w roztworze soli fizjologicznej uzupełnić do kreski odczynnikiem Extona, dokładnie wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej przez 4-10 min. Zmierzyć wartość turbidancji przy  $\lambda=445$  nm wobec odnośnika.
3. Sporządzić w programie Excel wykres zależności  $T_{445}$  od stężenia albuminy [mg/mL] i wyznaczyć następujące parametry:
  - równanie krzywej kalibracyjnej
  - współczynnik korelacji  $r$
  - współczynnik determinacji  $r^2$

4. Na podstawie otrzymanego równania krzywej kalibracyjnej obliczyć stężenie albuminy w badanej próbce.
5. Obliczyć błąd bezwzględny i błąd względny pomiaru próby badanej

**Błąd bezwzględny ( $E_{\text{bez}}$ )** - bezwzględna wartość różnicy między wartością prawdziwą ( $x$ ) a wartością otrzymanego wyniku ( $x_i$ ).

$$E_{\text{bez}} = |x - x_i|$$

**Błąd względny ( $E_{\text{wzgl}}$ )**, iloraz błędu bezwzględnego ( $E_{\text{bez}}$ ) i wartości prawdziwej ( $x$ ).

$$E_{\text{wzgl}} = \frac{E_{\text{bez}}}{x} \cdot 100 [\%]$$

Błąd względny jest wartością niemianowaną. Wyrażony w procentach ułatwia porównanie wielkości błędów pomiędzy sobą.

### **Literatura**

1. Biochemia kliniczna pod redakcją Jolanty Zuchwały-Jagiello, Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Wrocław 2017.
2. Chemia analityczna tom II, pod redakcją Ryszarda Kocjana, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.