

Исследование взаимодействия кадмия и свинца с сывороточным альбумином человека в зависимости от pH его водных растворов

Л. А. Фаминская¹, И. С. Круликовский², Н. В. Кулешова², В. Т. Демарин¹,
О. Е. Абрамова², В. Ф. Урьяш¹

¹Научно-исследовательский институт химии Нижегородского государственного университета
им. Н.И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, Россия

Получена редакцией 03 августа 2011 г.

Изучено взаимодействие сывороточного альбумина человека (САЧ) с ионами токсичных тяжелых металлов кадмия и свинца. Показано влияние указанных металлов на оптическую плотность и изоэлектрическую точку водных растворов САЧ в зависимости от их pH. Сорбцию свинца и кадмия проводили в условиях, моделирующих процессы, протекающие в желудочно-кишечном тракте человека. Определено количество кадмия и свинца, сорбированное белком, в зависимости от pH и содержания металлов в исходных растворах.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, кадмий, свинец, изоэлектрические кривые, взаимодействие

ВВЕДЕНИЕ

Неудовлетворительное состояние окружающей среды, связанное с загрязнением экосистем тяжелыми металлами – отходами промышленности и транспорта, с каждым годом увеличивает риск попадания их в организм человека по пищевым цепям, с водой и воздухом. Тяжелые металлы, взаимодействуя с клетками живого организма, накапливаются в органах и тканях, приводя к серьезным нарушениям процессов обмена веществ и жизненно важных функций организма. Накопление кадмия в организме человека вызывает необратимые повреждения почечных канальцев, остеопороз, анемию, эмфизему. Особенно опасен кадмий для людей с дефицитом железа, кальция, цинка. Свинец повреждает центральную нервную систему, сосуды, нарушает репродуктивную и кроветворную функции [1]. Поэтому проблема выведения указанных металлов является актуальной и неотложной задачей.

Цель настоящего исследования – изучить взаимодействие кадмия и свинца с сывороточным альбумином человека (САЧ) в водном растворе в зависимости от pH. Известно [2], что САЧ является транспортным белком и способен взаимодействовать с металлами [3]. Связывание белков с металлами носит сложный физико-химический характер и включает физическую адсорбцию, ионный обмен, комплексообразование, электростатическое и Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие, ковалентные связи или комбинацию этих процессов. Потенциальными местами присоединения металлов к белку являются способные к ионизации карбоксильные, имидазольные, фенольные, сульфгидрильные группы, поэтому важным фактором, определяющим характер процесса взаимодействия, является значение pH исследуемых растворов [4].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали САЧ, полученный из сыворотки плацен-

тарной крови человека в Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Препарат подвергался тщательной очистке и лиофильному высушиванию. В воздушно-сухом состоянии имел молекулярную массу около 65000, содержал 4.5 мас.% воды и 0.67 мас.% ионов натрия. В качестве источника кадмия использовали $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ квалификации «хч» (ГОСТ 4456-75), а свинца — $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ квалификации «осч» (ГОСТ 4236-77). Для создания необходимого значения pH среды применяли 0.25 М водный раствор соляной кислоты и 10% раствор аммиака. Дистиллированная вода имела pH 6.5. Для определения pH использовали pH-метр марки pH-121. Изоэлектрическую точку САЧ (pI/) и САЧ, содержащего катионы кадмия и свинца (pI//), определяли на фотоколориметре КФК-2МП по зависимости оптической плотности (А) растворов белка в воде и в присутствии солей кадмия и свинца от их pH (изоэлектрическая кривая) при $\lambda = 490$ нм и толщине поглощающего слоя 3 см.

Параметры модельных растворов для изучения взаимодействия САЧ с кадмием и свинцом (pH, время и интенсивность перемешивания) были выбраны на основании разработанной ранее методики [5] аналогично процессам, протекающим в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека. Для приготовления растворов к 30 мл дистиллированной воды при перемешивании добавляли 0.4 г САЧ (pH 4.2) и, соответственно 0.015 г (0.030 г) $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (pH 3.7). Для создания кислотности раствора 3.5 (как в желудке человека) требовалось 0.55 мл 0.25 М раствора HCl, а pH 8.5 (как в кишечнике человека) моделировали с помощью 10% раствора аммиака в количестве 0.09 мл. Время перемешивания растворов на каждой стадии составляло три часа.

Для выделения кадмий- и свинецсодержащего САЧ из водного раствора применяли изоэлектрическое осаждение ацетоном [6], неограниченно смешивающимся с водой. В результате этого снижалась гидратация и растворимость белка (минимальная в изоэлектрической точке), и при достаточно высокой концентрации растворителя происходило его осаждение. В работе для достижения указанных условий к водному раствору белка объемом 30 мл с pH 8.5 при перемешивании добавляли 1 мл 0.25 М HCl, а с pH 3.5 — 0.04 мл 10% раствора NH_4OH , доводя pH этих растворов до 5.3–5.4 и затем 50 мл ацетона. Выпавшую в осадок белковую фракцию отделяли от

раствора на воронке Бюхнера при пониженном давлении и сушили при температуре 600°C 2 ч до постоянной массы.

Содержание кадмия и свинца в сухом остатке САЧ определяли методом атомно-абсорбционного спектрального анализа [7] на спектрометре производства фирмы “Perkin-Elmer” (модель 603) по методике, описанной в [5, 8–11]. Погрешность определения массы тяжелого металла составляла 10%.

Для определения содержания ионов кадмия и свинца в фильтрате (их остаток, не связанный с белком) применяли инверсионный вольтамперометрический анализ, основанный на электрохимическом концентрировании элементов на поверхности рабочего электрода. Все измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе «Экотест-ВА-95», позволяющем определять концентрацию ионов кадмия и свинца в водных растворах в диапазоне от 0.3 до 200 $\text{мкг}^{-1} \text{л}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 (кривая 1) изоэлектрическая кривая водного раствора САЧ (содержание САЧ 0.0133 г·мл⁻¹) представлена как зависимость А от pH. По кривой определена изоэлектрическая точка белка pI/ = 4.4. Известно, что в изоэлектрической точке макромолекула САЧ электронейтральна, представляет собой компактную глобулу, а раствор белка имеет максимальную А. Наименьшей оптической плотностью, делающей активные центры молекулы САЧ наиболее доступными, обладают растворы с pH около 3.5 (молекулы положительно заряжены). При введении в водный раствор САЧ солей свинца и кадмия в количестве 0.0300 г (рис. 1, кривые 2 и 3) оптическая плотность растворов увеличивается, изменяется форма изоэлектрических кривых, а pI// смещается до значения pH 5.3, что свидетельствует о взаимодействии САЧ со свинцом и кадмием, и, следовательно, об изменении строения и свойств макромолекулы белка. Именно в изоэлектрической точке достигалось наиболее полное высаживание САЧ, содержащего свинец и кадмий, ацетоном (табл. 1).

В табл. 1 представлены результаты атомно-абсорбционного определения содержания кадмия в САЧ после высаживания его ацетоном из водного раствора в присутствии соли кадмия в кислой среде (pH 3.5, опыт 1) и в процессе кислотно-щелочной обработки белка (pH 3.5 и pH 8.5, опыты 2 и 4), а также содержание кадмия в

Таблица 1. Содержание кадмия в САЧ.

№	САЧ			Cd ²⁺			В фильтрате, г
	Введенный, г	Высаженный		Введенный, г	Сорбированный		
		г	% от введенного		г	% от введенного	
1	0.4001	0.3620	90.5	0.0067	0.0056	83.6	0.0015
2	0.4043	0.3663	90.6	0.0065	0.0035	54.0	—
3	0.4007	0.3759	93.8	0.0140	0.0093	66.4	0.0055
4	0.4004	0.4204	105.0	0.0444	0.0252	56.8	—

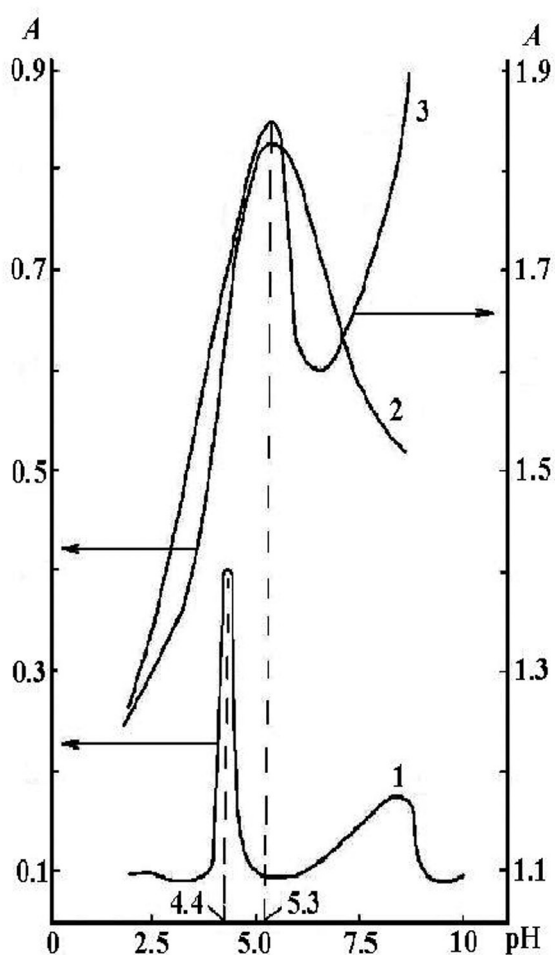


Рис. 1. Изоэлектрические кривые САЧ в водном растворе (1), в присутствии солей свинца (2) и кадмия (3). Изоэлектрическая точка для (1) рН 4.4, для (2) и (3) рН 5.3.

фильтрате (опыты 1 и 3), определенное методом инверсионной вольтамперометрии. Как видно из табл. 1, САЧ высаживается из водного раствора соли кадмия ацетоном при рН 5.3 (изоэлектрическая точка) достаточно полно (около 90 мас.%). При этом в кислой среде (опыт 1) при одинаковом исходном содержании кадмия в растворе САЧ сорбирует его в 1.5 раза больше, чем при двухстадийной обработке (кислая и щелочная среда, опыт 2). Как видно из рис. 1 (кривые 1 и 3), при рН>(рI' и рI'') оптическая плотность раствора белка и белка, содержащего Cd, увеличивается, молекулы САЧ сворачиваются в плотные глобулы и становятся менее доступны для кадмия. При увеличении содержания кадмия в растворе количество сорбированного металла увеличивается, но не превышает в среднем 60 мас. % от исходного (опыты 2–4). Суммирование содержания кадмия в фильтрате, определенное методом инверсионной вольтамперометрии, с содержанием его в САЧ практически совпадает с массой кадмия, введенного в раствор.

Несколько другая картина наблюдается при проведении сорбции белком свинца из раствора его соли в кислой среде (табл. 2). Выявлено, что САЧ более эффективно связывает свинец, чем кадмий при одной и той же исходной концентрации раствора соли. Кроме того, количество сорбированного свинца увеличивается с ростом концентрации исходного раствора соли, достигая 96 мас.%.

Для подтверждения того, что в условиях эксперимента кадмий и свинец взаимодействуют с белком в растворе в виде ионов, были построены распределительные диаграммы состояния комплексов кадмия и свинца с гидроксо- и хлори-

Таблица 2. Содержание свинца в САЧ.

№	САЧ			Pb ²⁺			В фильтрате, г
	Введенный, г	Высаженный		Введенный, г	Сорбированный		
		г	% от введенного		г	% от введенного	
1	0.4010	0.3436	85.6	0.0096	0.0072	75.0	0.0015
2	0.4008	0.3520	87.8	0.0195	0.0146	75.0	0.0050
3	0.4032	0.3493	86.6	0.0185	0.0148	80.0	—
4	0.3997	0.3656	91.5	0.0125	0.0112	89.6	—
5	0.4057	0.4452	94.3	0.0651	0.0626	96.0	—

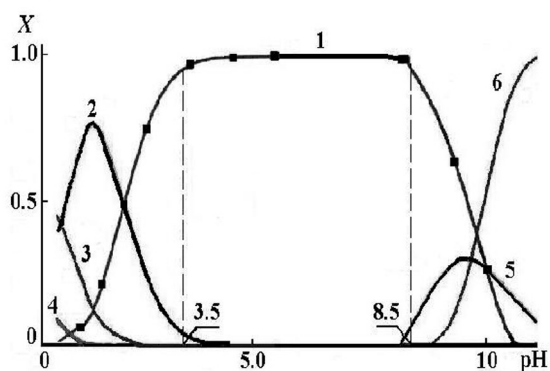


Рис. 2. Распределительная диаграмма комплексов кадмия в зависимости от кислотности раствора: 1 – Cd²⁺, 2 – CdCl⁺, 3 – CdCl₂, 4 – CdCl₃⁻, 5 – CdOH⁺, 6 – Cd(OH)₂.

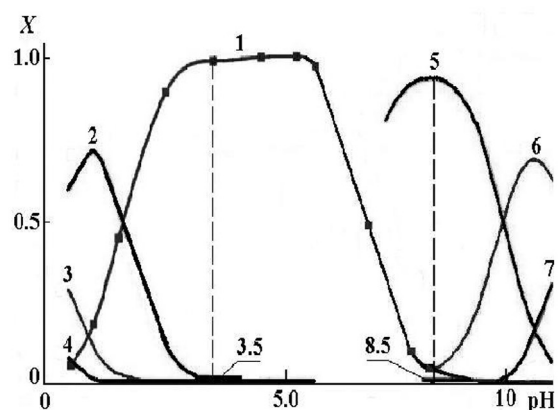


Рис. 3. Распределительная диаграмма комплексов свинца в зависимости от кислотности раствора: 1 – Pb²⁺, 2 – PbCl⁺, 3 – PbCl₂, 4 – PbCl₃⁻, 5 – PbOH⁺, 6 – Pb(OH)₂, 7 – Pb(OH)₃.

диолами (рис. 2 и 3) [9]. Из анализа диаграммы состояния кадмия в растворе видно, что при pH 3.5 мольная доля ионов кадмия (Cd²⁺) в растворе (X) составляет 0.95, а при pH 8.5 X = 1.0, т.е. практически весь кадмий в условиях эксперимента присутствует в виде двухвалентных катионов.

Как видно из характера распределительных диаграмм, для аналогичных комплексов свинца в растворах (рис. 3) при pH 3.5 около 98% свинца находится в виде двухвалентных катионов и около 2% — в виде одновалентного хлоридного комплекса. В растворе при pH 8.5

в результате гидролиза соли около 95% свинца находится в виде одновалентного гидроксикомплекса и в виде двухвалентного катиона свинца и гидроксида свинца (около 2.5%). Поэтому при исследовании взаимодействия САЧ со свинцом ограничились изучением лишь кислотной стадии процесса (табл. 2, рис. 4). Как видно из рис. 4, САЧ активнее взаимодействует с изученными металлами в кислой среде (кривая 1), что соответствует наименьшей плотности клубка макромолекулы САЧ и наибольшей доступности ее активных центров в данной области pH растворов белка (рис. 1). При этом количество свинца и кадмия, сорбированных САЧ, пропорционально

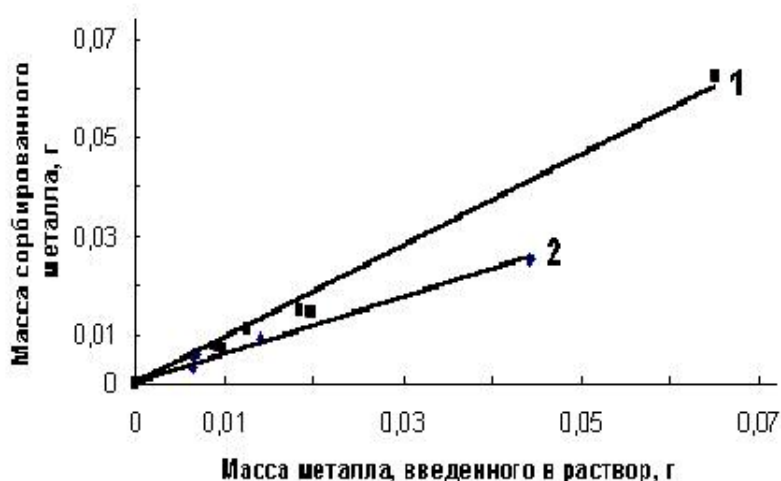


Рис. 4. Зависимость количества сорбированного свинца и кадмия в кислой среде (кривая 1) и кадмия при двухстадийной обработке белка (кривая 2) от содержания металлов в исходном растворе САЧ. Аппроксимационные уравнения: $1 - y = 0.9297x$ ($R^2 = 0.9897$); $2 - y = 0.5808x$ ($R^2 = 0.9878$).

исходной концентрации металлов в растворе, достигая для свинца 90%, а для кадмия 83% при рН 3.5 и 60% при рН 8.5.

ВЫВОДЫ

Проанализированы изоэлектрические кривые, определены изоэлектрические точки водных растворов САЧ ($pI=4.4$) и водных растворов САЧ в присутствии солей свинца и кадмия ($pI=5.3$).

Проведена сорбция свинца и кадмия САЧ в условиях, моделирующих процесс пищеварения в желудке и кишечнике.

Определены количества свинца и кадмия, сорбированные САЧ, в зависимости от рН среды и количества металлов в исходном растворе. Показано, что взаимодействие тяжелых металлов с САЧ идет преимущественно в желудке (рН 3.5).

ЛИТЕРАТУРА

1. Эмит, Лав., Бабу, К.Р. Трофический перенос микроэлементов и влияние на здоровье человека. В кн.: *Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация*, ред. Прасад, М.Н.В., Саджван, К.С. и Найду, Р., М.: Физматлит, 2009, 737–772.
2. Овчинников, Ю.А., *Биоорганическая химия*, М.: Просвещение, 1987, 815 с.
3. Ландау, М.А., *Молекулярная природа отдельных физиологических процессов*, 1985, М.: Наука, 260 с.
4. Бреслоу, Е., Комплексы металлов с белками. В кн.: *Неорганическая биохимия*, ред. Эйхгорн, Г., М.: Мир, 1978, т. 1, с. 274–299.
5. Степанова, Е.А., *Сорбция свинца и кадмия биологически активными добавками к пище из растительного сырья в биопрофилактике загрязнения среды обитания человека тяжелыми металлами*. Дис...канд. биол. наук. Н. Новгород: ННГУ, 2006, 135 с.
6. Якубке, Х-Д., *Аминокислоты, пептиды, белки*, 1985, М.: Мир, 348 с.
7. Прайс, В., *Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия*, 1976, М.: Мир, 335 с.
8. Урьяш, В.Ф., Груздева, А.Е., Плетнева, Н.Б., Маслова В.А., Потемкина, Е.В., Демарин, В.Т., Изучение процесса сорбции свинца и кадмия рядом продуктов из растительного сырья. В сб. науч. труд. «Химия, технология и промышленная экология неорганических соединений», Пермь: ПГУ, 1999, № 2, 56–59.
9. Урьяш, В.Ф., Степанова, Е.А., Гришатова, Н.В., Груздева, А.Е., Кулешова, Н.В., Безруков, М.Е., Исследование процесса сорбции тяжелых металлов пищевыми добавками «Биофит». *Вестн. Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология*. Н.Новгород: ННГУ, 2004, № 3(5), 85–91.
10. Степанова, Е.А., Урьяш, В.Ф., Силкин, А.А., Логинов, В.В., Груздева, А.Е., Гришатова, Н.В., Туманова, А.Н., Исследование сорбции и выведения свинца биологически активными добавками к пище в опытах *in vitro* и *in vivo*. *Поволжский экол. журн.*, 2005, № 1, 71–75.

11. Урьяш, В.Ф., Степанова, Е.А., Гришатова, Н.В., Груздева, А.Е., Демарин, В.Т., Туманова, А.Н., Влияние степени дисперсности пищевых добавок на совместную сорбцию свинца и кадмия. *Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского*, 2009, № 5, 113–117.
12. Мейтис, Л., *Введение в курс химического равновесия и кинетики*, 1984, М.: Мир, с. 175–179.

Investigation of cadmium and lead interaction with human serum albumin depending on pH of water solutions

L. A. Faminskaya¹, I. S. Krulikovskiy², N. V. Kuleshova², V. T. Demarin¹,
O. E. Abramova² and V. F. Uryash¹

¹Research Institute of Chemistry, Nizhny Novgorod State University, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

²Nizhny Novgorod State University, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

The interaction of human serum albumin (HSA) with toxically heavy metals cadmium and lead was studied. The influence these metals on optical density and isoelectrical point of the water solutions HSA as function of pH was received. The sorption of cadmium and lead was carried out on conditions which coincide with processes in the intestines and stomach of man. The contents of cadmium and lead in the HSA were determined as functions of the concentration of initial solutions and its pH.

Keywords: human serum albumin, cadmium, lead, isoelectrical curves, interaction, sorption.

Урьяш Владимир Файвишевич, профессор кафедры экологии биофака Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, д.х.н., главный. научн. сотр. лаб. химической термодинамики Научно-исследовательского института химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Область научных интересов: экология человека, энтеросорбция, биологически активные вещества, физико-химический анализ, термодинамика.

Фаминская Лариса Алексеевна, к.х.н., ст. научн. сотр. лаб. химической термодинамики Научно-исследовательского института химии Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Область научных интересов: энтеросорбция, биологически активные вещества, физико-химический анализ, термодинамика.

Кулешова Надежда Вячеславовна, к.х.н., доцент каф. аналитической химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Область научных интересов: ионометрия, проточно-инжекционный анализ, биологически активные вещества, фармпрепараты.

Демарин Виталий Тихонович, к.х.н., ст. научн. сотр. лаб. спектроскопии Научно-исследовательского института химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Область научных интересов: спектральный анализ, биологически активные вещества.

Круликовский Игорь Станиславович, магистрант кафедры экологии биофака Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Область научных интересов: экология человека, энтеросорбция, биологически активные вещества.

Абрамова Ольга Евгеньевна, студентка 4 курса д/о кафедры экологии биофака Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Область научных интересов: экология человека, энтеросорбция, биологически активные вещества.