

## Uticaj metalnih jona i natrijum-dodecilsulfata na biuretsku reakciju

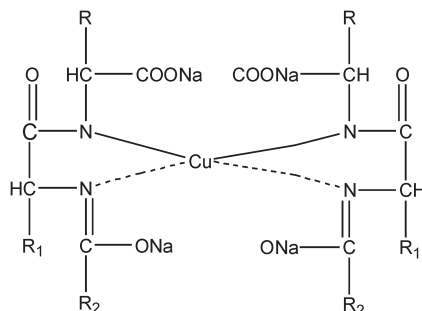
Ispitivan je uticaj metalnih jona  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i deterđenta natrijum-dodecilsulfata (Sodium Dodecylsulfate – SDS) na osetljivost biuretske reakcije. Biuretska reakcija je kvantitativna metoda kojom se određuje koncentracija proteina u rastvoru ili smeši. To je osetljiva reakcija za koju se predpostavlja da je ometaju strani joni. Ispitivanje osetljivosti je proveravano dodavanjem navedenih metalnih jona i deterđenta SDS-a (u opsegu koncentracija od 1 do 10 mg/mL) u rastvor albumina i biuretskog reagensa, u baznoj sredini. Biuretski reagens se sastoji od bakarsulfata-pentahidrata, kalijum-natrijum-tartarata, natrijum-hidroksida i kalijum-jodida. Pretpostavljeno je da će svi navedeni joni i deterđent uticati na osetljivost biuretske reakcije. Utvrđeno je da joni kalcijuma i kobalta ometaju određivanje koncentracije proteina biuretskom reakcijom. Prisustvo jona cinka smanjuje osetljivost ali ne utiče na tačnost metode dok SDS se taloži u prisustvu kalijumovih jona iz biureta i ometa merenje apsorbance i utiče na tačnost metode.

### Uvod

Albumini su najzastupljeniji proteini krvne plazme koji se sastoje od jednog polipeptidnog lanca sa molekulskom masom oko 66000. Imaju dve značajne funkcije u organizmu: transport malih molekula putem krvi – slobodne masne kiseline, bilirubin, rastvorljive lekove (aspirin, digitalis, barbiturate i dr) i stvaranje onkotskog pritiska, a to je pojava uvlačenja krvi u kapilare (Mihajlović 2000).

Biuretska reakcija je reakcija u kojoj se bakar iz biuretskog reagensa u alkalnoj sredini vezuje za pe-

ptidne veze proteina i stvara kompleks bakra ljubičaste boje. Intenzitet boje nastalog kompleksa zavisi od količine prisutnih peptidnih veza u proteinu.



Slika 1. Struktura kompleksa bakra sa albuminom (Mihajlović 2000)

Figure 1. Structure complex of copper with albumen (Mihajlović 2000)

**Cilj** ovog rada je da se ispita uticaj  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  jona i deterđenta natrijum-dodecilsulfata na osetljivost biuretske reakcije i njihov značaj pri određivanju koncentracije proteina.

### Materijal i metode

**Hemikalije:** kalijum-jodid, natrijum-hidroksid, natrijum-kalijum-tartarat, bakar (II)-sulfatpenta-hidrat, kalcijum-hlorid, kobalt-hlorid, cink-hlorid, natrijum-dodecilsulfat (SDS) i goveđi protein BSA. Sve hemikalije su bile *pro analysi* kvaliteta.

**Pravljenje rastvora.** Napravljen je biuretski reagens rastvaranjem 0.75 g bakar (II)-sulfatpenta-hidrata, 3 g natrijum-kalijum-tartarata, 15 g natrijum-hidroksida i 0.5 g kalijum-jodida u 250 mL destilovane vode. Rastvor albumina (BSA – goveđeg

Dušan Ružić (1990), *Atenica, Ulica 8. br 8. učenik 3. razreda Gimnazije u Čačku*

*MENTOR: dr Nenad Milosavić, IHTM, Beograd*

proteina) je pripremljen rastvaranjem 50 mg tog proteina u 5 mL destilovane vode, dobijeni rastvor je imao koncentraciju 10 mg/mL.

Da bi se ispitao uticaj ovih jona na osetljivost biuretske reakcije bilo je potrebno napraviti standardnu seriju rastvora u kojima se nalaze samo albumin i biuret. Od već napravljenog rastvora BSA razblaživanjem su napravljeni rastvori koncentracija od 1 do 9 mg/mL, sa korakom razblaženja od 1 mg/mL. Rastvorima proteina zapremine 0.5 mL je dodato po 2.5 mL rastvora biuretskog reagensa čime je dobijena standardna serija rastvora (slika 2).

Pomešano je po 0.25 mL rastvora albumina koncentracije 10 mg/mL, 0.25 mL rastvora kalcijum-hlorida i 2.5 mL biuretskog reagensa, pri čemu su koncentracije kalcijuma posle mešanja bile u opsegu od 1 do 10 mg/mL.

Merene su apsorbance i dijagram zavisnosti apsorbance u odnosu na koncentraciju kalcijuma prikazan je na slici 3.

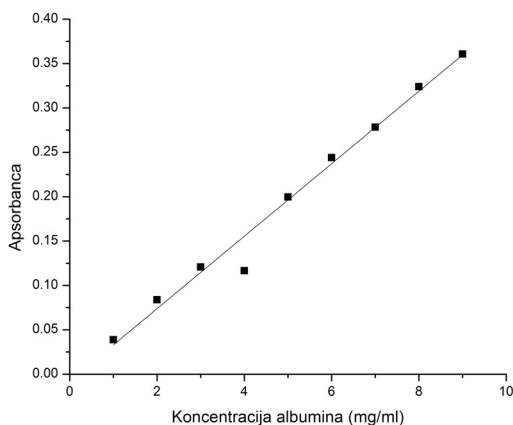
Napravljeni su rastvori kobalt-hlorida i cink-hlorida istih koncentracija kao i kalcijum-hlorida. Dobijeni dijagrami posle merenja apsorbanci prikazani su na slikama 4 i 5.

Pored ovih metalnih jona, utvrđivan je uticaj deterđenta SDS, koji je dodat rastvoru albumina i biureta u istim koncentracijama kao i ispitivani metalni joni. Zavisnost apsorbance od koncentracije SDS-a, predstavljena je na slici 6.

## Rezultati i diskusija

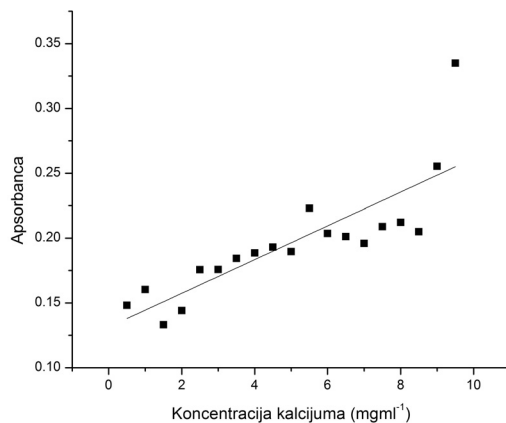
Zavisnost apsorbance od koncentracije albumina prikazana je na slici 2. Zavisnost je linearna, izuzev tačke u kojoj je koncentracija albumina 4 mg/mL. U toj tački je odstupanje od linearne zavisnosti, koje se može smatrati eksperimentalnom greškom.

U rastvore u koje je dodat jon kalcijuma, došlo je do taloženja kalcijum-hidroksida, zbog bazne sredine. Nastali talog u rastvoru ometa merenje, jer rastvori koji se snimaju na spektrofotometru ne smeju imati nikakvo zamućenje niti talog. Na osnovu zavisnosti apsorbance od koncentracije kalcijuma (slika 3), zaključuje se da jon kalcijuma ometa merenje apsorbance i određivanje koncentracije proteina i da njegovo prisustvo u rastvorim u kojima se biuretskom metodom određuje koncentracija proteina, mora biti u vrlo malim koncentracijama, manjim od 1 mg/mL.



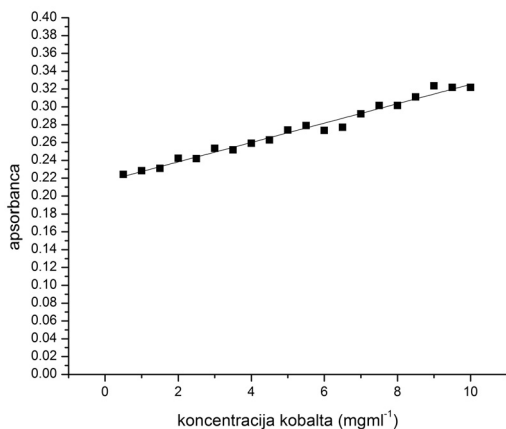
Slika 2. Zavisnost apsorbance od koncentracije albumina – standardna serija

Figure 2. Dependence of apsorbance upon concentration of albumen – standard series



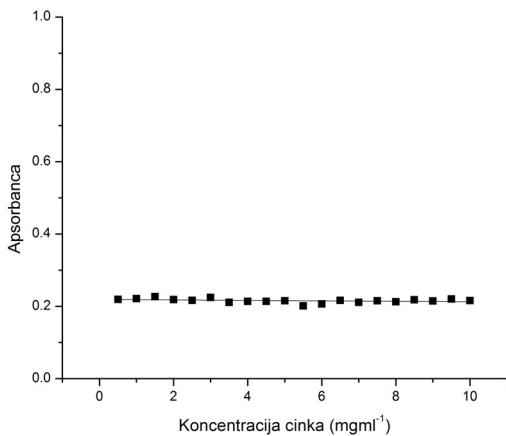
Slika 3. Zavisnost apsorbance od koncentracije kalcijum (II) hlorida

Figure 3. Dependence of apsorbance upon concentration of calcium (II) chloride



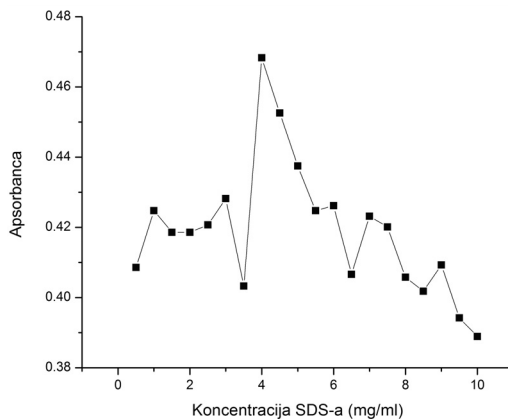
Slika 4.  
Zavisnost apsorbance od koncentracije kobalt (II) hlorida

Figure 4.  
Dependence of absorbance upon concentration of cobalt (II) chloride



Slika 5.  
Zavisnost apsorbance od koncentracije cink (II) hlorida

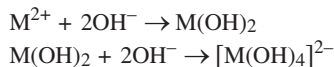
Figure 5.  
Dependence of absorbance upon concentration of zinc (II) chloride



Slika 6.  
Zavisnost apsorbance od koncentracije SDS-a

Figure 6.  
Dependence of absorbance upon concentration of SDS

Karakteristika metalnih jona kobalta i cinka je da se njihovi talozi mogu rastvoriti u višku  $\text{OH}^-$  jona i nagraditi rastvorne kompleksne soli, prema sledećim reakcijama (Filipović, Lipanović 1987):



Na osnovu zavisnosti apsorbance od koncentracije kobalta, može se zaključiti da prisustvo kobalta ometa određivanje proteina jer sa porastom koncentracije kobalta dolazi do porasta apsorbance.

Deterdžent natrijum-dodecilsulfat precipitira u rastvoru biureta, zato što u biuretu postoji kalijum-jodid koji izreaguje sa natrijum-dodecilsulfatom do kalium-dodecilsulfata, koji je talog. Nastali talog ometa merenje apsorbance, kao što je i slučaj sa kalcijumom, što utiče na tačnost metode.

Na osnovu zavisnosti apsorbance od koncentracije cinka, može se zaključiti da prisustvo cinka smanjuje osetljivost metode pošto dolazi do smanjenja apsorbance, ali da ne utiče na tačnost metode.

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani joni imaju uticaja na biuretsku metodu. Joni kalcijuma i kobalta ometaju određivanje kon-

centracije proteina biuretskom reakcijom, pri čemu je primećeno da joni  $\text{Ca}^{2+}$  moraju biti u vrlo maloj koncentraciji u ispitivanom rastvoru, manjoj od 1 mg/mL, da ne bi došlo do precipitacije veće količine kalcijum-hidroksida. Prisustvo jona cinka smanjuje osetljivost ali ne utiče na tačnost metode, dok SDS precipitira u prisustvu kalijumovih jona iz biureta i utiče na tačnost metode. Međutim, ispitivanjem uticaja jona kobalta i cinka došlo se do zanimljivih zaključaka. Naime, ovi prelazni metali poseduju sposobnost da kompleksiraju u baznoj sredini i grade komplekse (određenih konstanti stabilnosti) koji daju različita obojenja u rastvoru. U tom slučaju se pouzdana ne zna da li se prvo vezao za albumin bakar iz biuretskog reagensa ili neki od ispitivanih jona.

Na osnovu zavisnosti apsorbance od koncentracije kobalt (II) hlorida (slika 4) pretpostavlja se da je kobalt izmenio celokupan bakar koji se vezao za protein, što bi moglo da znači da kobalt može da se koristi za određivanje mikrokoličina bakra u nekom proteinu biuretskom reakcijom. Dalja istraživanja bi mogla da idu u tom smeru, tj. da se ispitaju pretpostavljena svojstva kobalta u biuretskoj reakciji.

**Zahvalnost.** Autor se zahvaljuje dr Nenadu Milosaviću, naučnom radniku na IHTM-u u Beogradu, na svesrdnoj pomoći pri realizaciji ovog rada.

---

## Literatura

Džamić M. 1989. *Biohemija*. Beograd: Naučna knjiga

Džamić M. 1982. *Praktikum iz biohemije*. Beograd: Naučna knjiga

Filipović L., Lipanović S. 1987. *Opća i anorganska kemija II*. Zagreb: Školska knjiga

---

Dušan Ružić

## Influence of Metal Ions and Sodium-Dodecylsulfate on Biuret Reaction

The topic of this work is the examination of influences of metal ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and detergent sodium-dodecylsulfate (SDS) on the biuret reaction. Biuret reaction is used to determine the concentration of proteins in solution.

Solution of biuret is prepared by mixing  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  (potassium-sodium tartarate),  $\text{NaOH}$  and  $\text{KI}$ . Biuret reaction is a specific reaction where  $\text{Cu}^{2+}$  ions from biuret solution react with peptide bonds in alkalinity. The intensity of the colour produced in the biuret reaction is proportional to the number of peptide bonds participating in a reaction.

For this research the following is used:

1. Biuret solution (3 g  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , 0.75 g  $\text{CuSO}_4$ , 15 g  $\text{NaOH}$  and 0.5 g  $\text{KI}$  in 250 mL distilled water)
2. Albumen BSA (10 mg/mL)
3.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  (solutions,  $c = 1-10$  mg/mL).

First, standard series of solutions (10 solutions) with albumen and biuret (0.5 mL BSA,  $c = 10$  mg/mL and 2.5 mL biuret solution) are made. The dependence of absorbance upon concentration of albumen was linear.

For investigating the influence of metal ions, solutions of  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  and SDS with concentration 1-10 mg/mL were made. They were mixed in the following order – 0.25 mL albumen ( $c = 10$  mg/mL) + 0.25 mL of some ion (different concentration) + 2.5 mL biuret. After making these solutions, their absorbance was determined at 540 nm. For that measurements, I used a spectrometer and obtained the following results:

$\text{Ca}^{2+}$  ion obstruct biuret reaction because of the precipitating in  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (alkalinity  $\text{pH} = 13.96$ ), which must not exist in solutions during the spectrometrical measurements.  $\text{Co}^{2+}$  ion is a metal which  $\text{Co}(\text{OH})_2$  can react with  $\text{OH}^-$  ion from biuret and then we have its complex in the solution  $[\text{Co}(\text{OH})_4]^{2-}$ . The complex cannot obstruct measurements, for it is clear in the solution, but  $\text{Co}^{2+}$  obstructs determining concentration of proteins.  $\text{Zn}^{2+}$  ion influences sensitivity of biuret reactions.

Detergent SDS was precipitated with  $\text{K}^+$  ions from the biuret solution and that potassium-dodecylsulfate is a compound that also obstructs biuret reactions (it is slop).

Based on the measurements, I cannot make precise results. I may consider that  $\text{Co}^{2+}$  ions changed all  $\text{Cu}^{2+}$  ions in albumen, which can be used for determining  $\text{Cu}^{2+}$  in albumen, and also as a new method if proven. For some future investigations in this field research of deeper influence of  $\text{Co}^{2+}$  ion in biuret reaction and maybe some other metal ions must be done. 