

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.2:543.42

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2022.2.46>**О. И. Лазовская¹, В. Н. Леонтьев¹, Н. Н. Крук¹, В. В. Сенчук²**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

¹Белорусский государственный технологический университет,
г. Минск, Республика Беларусь,²СП ООО «Фармлэнд», г. Минск, Республика Беларусь

Целью настоящего исследования является разработка методического подхода к спектрофлуориметрическому определению билирубина в лекарственных препаратах (ЛП) альбумина человека. Наличие полосы испускания с максимумом при длине волны 520 нм в спектре флуоресценции свидетельствует о присутствии билирубина в ЛП «Альбуфарм, раствор для инфузий 200 мг/мл» (СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь). Для расчета концентрации билирубина использован модифицированный нами метод стандартных добавок. Показано, что последовательное внесение добавок билирубина в разбавленный в 10 и 20 раз ЛП «Альбуфарм» приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, обусловленному исключительно возрастанием концентрации свободного билирубина, а не связанного с альбумином, так как установлено, что процесс связывания является медленным. С учетом квантовых выходов флуоресценции свободного и связанного билирубина предложена формула для расчета интенсивности флуоресценции связанного билирубина. Получены графики линейной зависимости интенсивности флуоресценции связанного билирубина от концентрации добавленного билирубина в разбавленном в 10 и 20 раз ЛП «Альбуфарм». Концентрация билирубина в ЛП «Альбуфарм» составила $5,26 \pm 0,04$ мкМ, или $0,0154 \pm 0,0001$ мг/г альбумина. Исходя из литературных данных по содержанию связанного с альбумином билирубина в плазме крови здорового человека (в среднем 0,11 мг/г альбумина), можно сделать вывод, что применяемая технология очистки альбумина обеспечивает значительное снижение содержания билирубина.

Ключевые слова: лекарственный препарат альбумина человека, билирубин, количественное определение, флуоресцентная спектроскопия, модифицированный метод стандартных добавок.

ВВЕДЕНИЕ

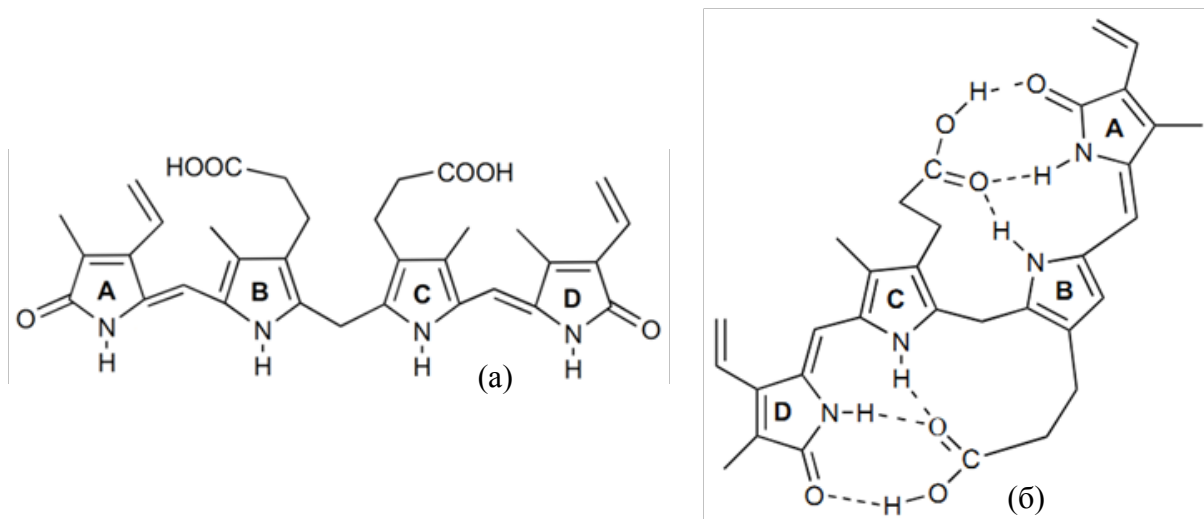
Сывороточный альбумин человека представляет собой глобулярный белок плазмы крови с молекулярной массой 66,5 кДа. Молекула альбумина образована одной полипептидной цепью, состоящей из 585 аминокислотных остатков, и включает три гомологичных домена (I, II и III), каждый из которых делится на два субдомена (А и В). Около 68% аминокислотных остатков уложены в α -спирали. Стабильность конформации белковой молекулы обеспечивают 17 дисульфидных связей [1]. Такая структурная организация альбумина придает отдельным его участкам значительную подвижность и обуславливает способность к обратимому связыванию

низкомолекулярных веществ для последующего их транспорта по кровяному руслу к органам детоксикации и биотрансформации. Нарушение транспортной функции при патогенезе различных заболеваний приводит к накоплению в организме токсичных метаболитов и развитию эндогенной интоксикации [2]. Для лечения интоксикационного синдрома в медицинской практике применяют лекарственные препараты (ЛП) альбумина человека. При этом эффективность детоксикационной терапии существенным образом зависит от связывающей способности альбумина донорской плазмы [3].

В соответствии с требованиями фармакопейных статей ФС.3.3.2.0006.18 «Альбумин человека» [4] и 01/2013:0255 «Human

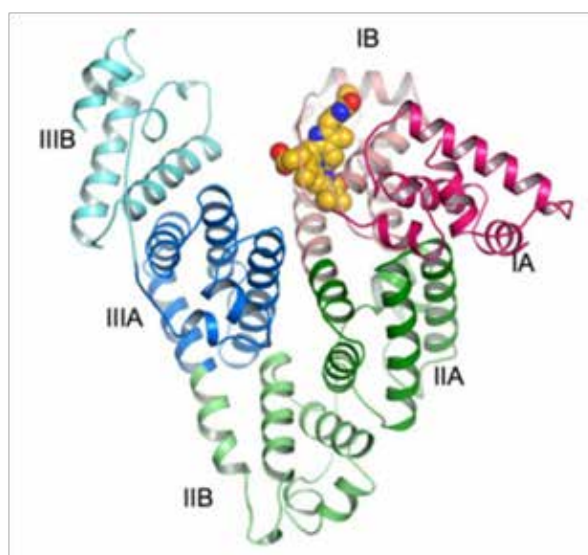
Albumin Solution» [5] при получении ЛП альбумина человека нормируют предельное содержание гемовых пигментов, а не продукта их метаболизма – билирубина (рисунок 1, а), который, как известно [6], обладает наибольшим сродством к альбумину (константа связывания $K_b = 9,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) среди эндогенных метаболитов. Физиологическое значение связывания билирубина обусловлено его низкой растворимостью в водных средах в результате образования

внутримолекулярных водородных связей (рисунок 1, б) и токсичностью в свободном состоянии [7]. Авторами работ [8, 9] установлено, что билирубин предпочтительно связывается с аминокислотными остатками альбумина из субдомена IB (рисунок 2): с Leu115, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157 и Tyr161 за счет гидрофобных взаимодействий, с Tyr138 и Tyr161 за счет водородных связей и с Arg117, Arg186 и Lys190 за счет ионных взаимодействий.



Линейная структура (а) и структура с внутримолекулярными водородными связями (б).

Рисунок 1. – Структурная формула билирубина [10]



Субдомены альбумина обозначены как IA (1–105 аминокислотные остатки), IB (106–195); IIA (196–297), IIB (298–383); IIIA (384–497), IIIB (498–585) [11]. Билирубин представлен пространственной моделью, в которой желтым цветом показаны атомы углерода, красным – атомы кислорода, синим – атомы азота.

Рисунок 2. – Третичная структура альбумина, связанного с билирубином [8]

Следовательно, при получении ЛП альбумина человека актуальной задачей становится оценка эффективности его очистки от билирубина. Поскольку билирубин в белковой среде обладает выраженными флуоресцентными свойствами [12], а флуоресцентная спектроскопия, как известно [13], характеризуется высокой чувствительностью, то разработка методического подхода к спектрофлуориметрическому определению билирубина в ЛП альбумина человека является целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали билирубин (Carl Roth, Германия; CAS No. 635-65-4, $M = 584$ г/моль), ЛП «Альбуфарм, раствор для инфузий 200 мг/мл» (СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь) (далее – ЛП «Альбуфарм»), диметилсульфоксид (Димексид-Белмед, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и воду очищенную.

Раствор билирубина (3,4 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Концентрацию билирубина определяли спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения $63\,400\text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при длине волны 458 нм [14]. Применяли только свежеприготовленный раствор.

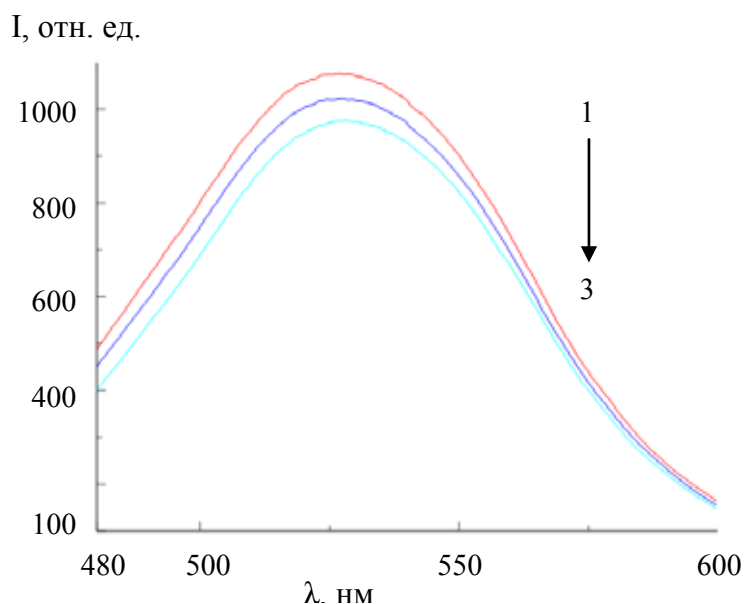
Билирубин в белковой среде характеризуется полосой флуоресценции с $\lambda_{\text{max}} = 520$ нм [12]. Квантовый выход флуоресценции билирубина существенно зависит от микроокружения: в водном растворе величина квантового выхода составляет $1,0 \cdot 10^{-4}$ [15], а при связывании с альбумином наблюдается более чем десятикратное увеличение квантового выхода флуоресценции в среднем до $1,4 \cdot 10^{-3}$ [15–18].

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре FP-8500 (Jasco, Япония) в диапазоне длин волн 480–600 нм при $\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм (ширина щелей 5,0 нм).

Статистический анализ полученных результатов выполняли согласно [19] с помощью программы Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие полосы испускания с максимумом при длине волны 520 нм в спектре флуоресценции (рисунок 3, спектр 1) свидетельствует о присутствии связанного с белком билирубина в ЛП «Альбуфарм». Последовательное внесение раствора билирубина в диметилсульфоксиде в ЛП «Альбуфарм» для расчета концентрации билирубина $C_{\text{БР}}$ методом стандартных добавок [20] привело не к предполагаемому увеличению анали-



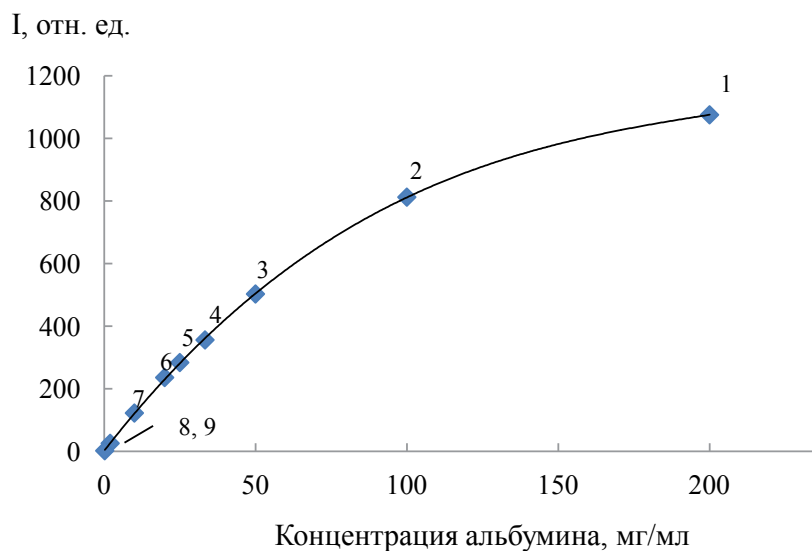
1 – 0 мкМ; 2 – 1,1 мкМ; 3 – 2,3 мкМ.

Рисунок 3. – Спектры флуоресценции билирубина в ЛП «Альбуфарм» при добавлении раствора билирубина в диметилсульфоксиде

тического сигнала, а к концентрационному тушению флуоресценции билирубина (рисунок 3, спектры 2 и 3).

Для определения области концентраций билирубина, в которой отсутствует тушение флуоресценции, ЛП «Альбуфарм» разбавляли водой очищенной в 2, 4, 6, 8,

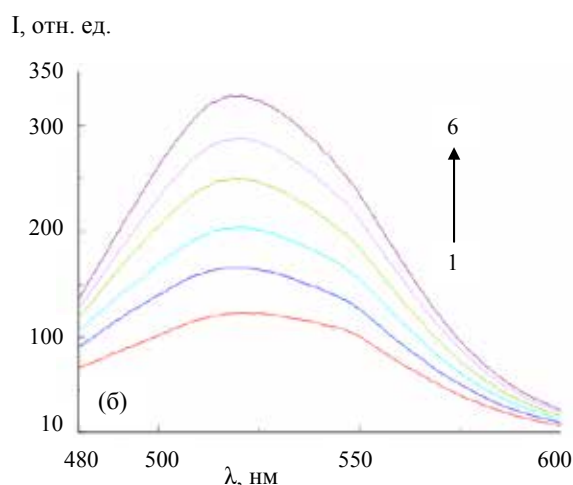
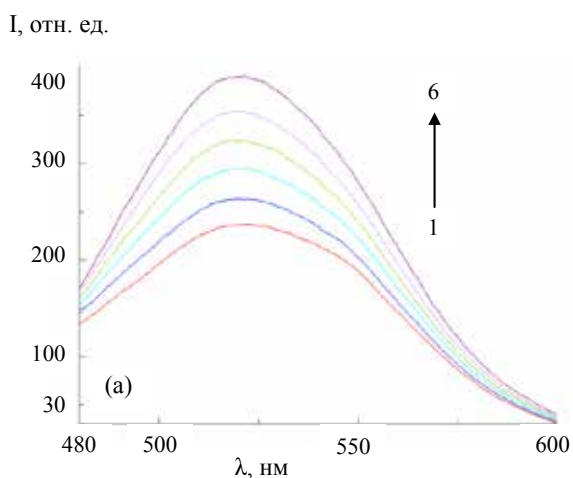
10, 20, 100 и 1000 раз. Как видно из рисунка 4, для разбавленного в 8–1000 раз ЛП «Альбуфарм», то есть для диапазона от $C_{БР}/8$ (25 мг/мл альбумина) до $C_{БР}/1000$ (0,2 мг/мл альбумина), характерна линейная зависимость интенсивности флуоресценции билирубина.



1 – 200 мг/мл; 2 – 100 мг/мл ($C_{БР}/2$); 3 – 50 мг/мл ($C_{БР}/4$); 4 – 33 мг/мл ($C_{БР}/6$); 5 – 25 мг/мл ($C_{БР}/8$); 6 – 20 мг/мл ($C_{БР}/10$); 7 – 10 мг/мл ($C_{БР}/20$); 8 – 2 мг/мл ($C_{БР}/100$); 9 – 0,2 мг/мл ($C_{БР}/1000$).
Рисунок 4. – Зависимость интенсивности флуоресценции билирубина от концентрации альбумина в ЛП «Альбуфарм»

При внесении раствора билирубина в диметилсульфоксиде в разбавленный в 10 и 20 раз ЛП «Альбуфарм» наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции (рисунок 5), обусловленное исключительно возрастанием концентрации добавленного (свободного) билирубина, а не

связанного с альбумином, так как установлено, что кинетика связывания билирубина с белком очень медленная (рисунок 6). Наличие в белковой среде билирубина в двух формах (свободный и связанный), имеющих разные величины аналитического сигнала, не позволяет непосредственно



1 – 0 мкМ; 2 – 1,1 мкМ; 3 – 2,3 мкМ; 4 – 3,4 мкМ; 5 – 4,5 мкМ; 6 – 5,7 мкМ.
Рисунок 5. – Спектры флуоресценции билирубина в разбавленном в 10 (а) и 20 (б) раз ЛП «Альбуфарм» при добавлении раствора билирубина в диметилсульфоксиде

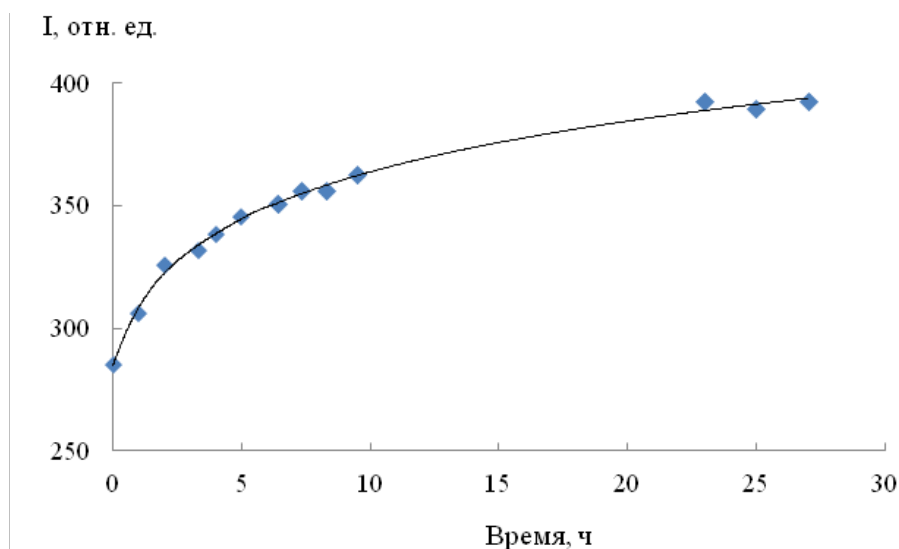


Рисунок 6. — Кинетика связывания добавленного билирубина (2,3 мкМ) с альбумином в разбавленном в 10 раз ЛП «Альбуфарм»

использовать метод стандартных добавок для расчета концентрации билирубина в ЛП «Альбуфарм». Чтобы устранить различия в значениях интенсивности флуоресценции свободного и связанного билирубина, нами предложена модификация метода стандартных добавок.

Известно [21], что для разбавленных растворов между интенсивностью флуоресценции I и квантовым выходом флуоресценции ϕ существует отношение:

$$I = 2,303 \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot C \cdot d \cdot \phi, \quad (1)$$

где I_0 — интенсивность возбуждающего излучения;

ϵ — молярный коэффициент поглощения;

C — молярная концентрация раствора;

d — толщина слоя раствора.

При условии, что I_0 , ϵ , C и d являются постоянными, соотношение между характеристиками флуоресценции свободного и связанного билирубина примет вид:

$$\frac{I_{\text{своб}}}{I_{\text{связ}}} = \frac{\phi_{\text{своб}}}{\phi_{\text{связ}}}, \quad (2)$$

где $I_{\text{своб}}$ и $I_{\text{связ}}$ — интенсивность флуоресценции свободного и связанного билирубина;

$\phi_{\text{своб}}$ и $\phi_{\text{связ}}$ — квантовый выход флуоресценции свободного и связанного билирубина.

Из уравнения (2) с учетом значений квантовых выходов флуоресценции получили выражение для расчета интенсивности флуоресценции связанного билирубина:

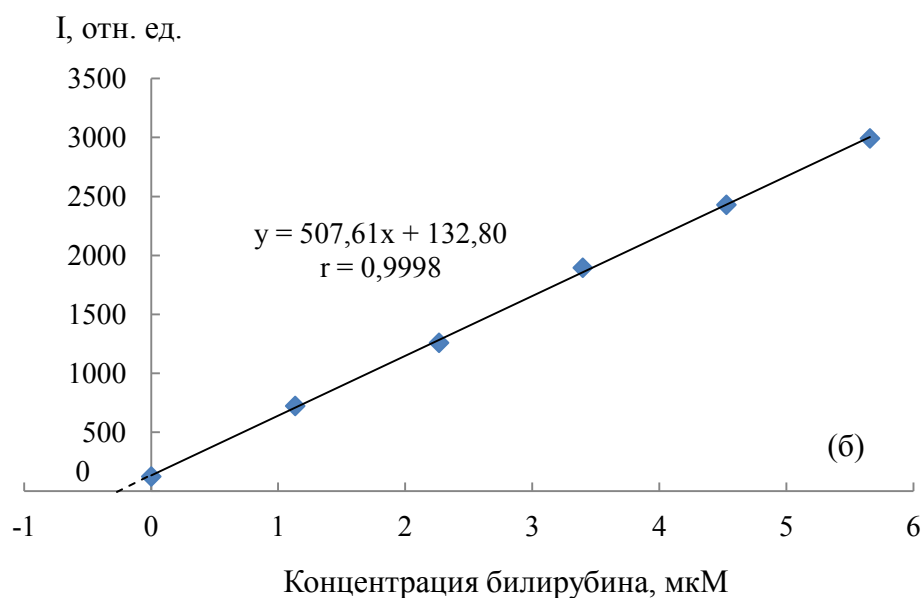
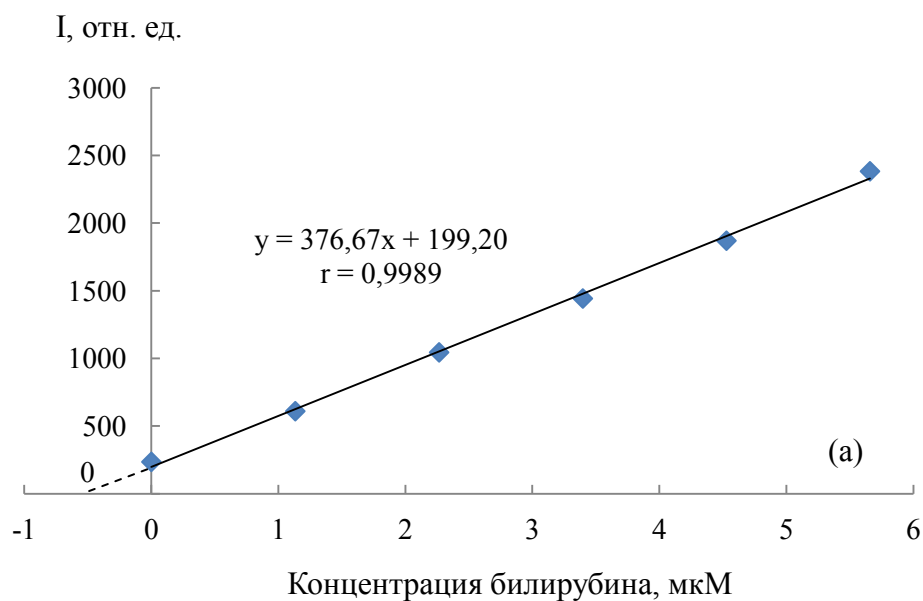
$$I_{\text{связ}} = I_{\text{своб}} \cdot \frac{\phi_{\text{связ}}}{\phi_{\text{своб}}} \Rightarrow I_{\text{связ}} = I_{\text{своб}} \cdot \frac{1,4 \cdot 10^{-3}}{10^{-4}} \Rightarrow I_{\text{связ}} = 14 \cdot I_{\text{своб}}, \quad (3)$$

Преобразуя экспериментально полученные значения интенсивности флуоресценции свободного билирубина с помощью выражения (3), строили графики линейной зависимости интенсивности флуоресценции связанного билирубина от концентрации добавленного билирубина в разбавленном ЛП «Альбуфарм» с последующей экстраполяцией до пересечения с осью абсцисс (рисунок 7). Отрезок, отсекаемый этой прямой на оси абсцисс, равен

концентрации билирубина в ЛП «Альбуфарм» с учетом соответствующих разведений (таблица 1).

Результаты статистической обработки параметров линейной зависимости для количественного определения билирубина в разбавленном в 10 и 20 раз ЛП «Альбуфарм» представлены в таблицах 2 и 3.

Таким образом, концентрация билирубина в ЛП «Альбуфарм» составила $5,26 \pm 0,04$ мкМ, или $0,0154 \pm 0,0001$ мг/г



(а) – разведение в 10 раз; (б) – разведение в 20 раз.
Рисунок 7. – Градуировочные графики для определения концентрации билирубина в ЛП «Альбуфарм»

Таблица 1. – Результаты количественного определения билирубина в ЛП «Альбуфарм»

Кратность разведения ЛП	Концентрация билирубина, мкМ	
	в разбавленном ЛП	в ЛП
10	0,5288	5,29
20	0,2616	5,23

альбумина. Известно, что в плазме крови здорового человека содержится $42,0 \pm 3,5$ г/л альбумина [22] и 2–7 мг/л связанного с ним билирубина [23], то есть в среднем 1 г альбумина удерживает 0,11 мг билирубина. Следовательно, используе-

мая технология получения ЛП «Альбуфарм» позволяет в 7 раз снизить содержание билирубина и создать свободные центры связывания на альбумине донорской плазмы для применения в детоксикационной терапии.

Таблица 2. – Результаты статистической обработки параметров линейной зависимости вида $y = bx + a$ для разбавленного в 10 раз ЛП «Альбуфарм»

Показатель		Значение
Число степеней свободы ν		4
Угловой коэффициент линейной зависимости b		376,67
Свободный член линейной зависимости a		199,20
Критерий Стьюдента t (95%, ν)		2,7764
Полуширина доверительного интервала углового коэффициента Δ_b		24,37
Полуширина доверительного интервала свободного члена Δ_a		83,51
Остаточная дисперсия S_0^2		1726,01
Коэффициент корреляции r		0,9989
Критерии приемлемости		
Требования	Полученные значения	Вывод
$b > \Delta_b$	$376,67 > 24,37$	Выполняется
$a > \Delta_a$	$199,20 > 83,51$	Выполняется
$r \geq 0,99$	$0,9989 \geq 0,99$	Выполняется

Таблица 3. – Результаты статистической обработки параметров линейной зависимости вида $y = bx + a$ для разбавленного в 20 раз ЛП «Альбуфарм»

Показатель		Значение
Число степеней свободы ν		4
Угловой коэффициент линейной зависимости b		507,61
Свободный член линейной зависимости a		132,80
Критерий Стьюдента t (95%, ν)		2,7764
Полуширина доверительного интервала углового коэффициента Δ_b		14,57
Полуширина доверительного интервала свободного члена Δ_a		49,93
Остаточная дисперсия S_0^2		617,07
Коэффициент корреляции r		0,9998
Критерии приемлемости		
Требования	Полученные значения	Вывод
$b > \Delta_b$	$507,61 > 14,57$	Выполняется
$a > \Delta_a$	$132,80 > 49,93$	Выполняется
$r \geq 0,99$	$0,9998 \geq 0,99$	Выполняется

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан методический подход к спектрофлуориметрическому определению билирубина в ЛП альбумина человека. Показано, что наличие в белковой среде билирубина в двух формах (свободный и связанный), имеющих разные значения интенсивности флуоресценции, не позволяет непосредственно использовать метод стандартных добавок для расчета остаточного содержания билирубина в ЛП «Альбуфарм». Предлагаемая модификация метода стандартных добавок устраняет различия в значениях интенсивности флуоресценции свободного и связанного билирубина и полностью исключает необходимость длительного и трудоемкого процесса регистрации кинетики связывания добавляемого билирубина с альбумином.

SUMMARY

O. I. Lazovskaya, V. N. Leontiev,
M. M. Kruk, V. V. Senchuk
ASSAY OF BILIRUBIN IN
HUMAN ALBUMIN MEDICINAL
PREPARATIONS WITH FLUORESCENCE
SPECTROSCOPY METHOD

The purpose of this research is to develop a methodological approach to spectrofluorimetric determination of bilirubin in human albumin medicinal preparations. The emission band maximum at 520 nm wavelength in the fluorescence spectrum indicates the presence of bilirubin in the medicinal preparation "Albupharm, solution for infusions of 200 mg/ml" (JV Pharmland LLC, Republic of Belarus). We used a modified method of standard additions to calculate bilirubin concen-

tration. It has been shown that sequential addition of bilirubin to a medicinal preparation "Albupharm", diluted 10 and 20 times, leads to an increase in fluorescence intensity due to an increase in the concentration of free bilirubin only, but not bound to albumin, since the binding process was found to be slow. Taking into account the fluorescence quantum yields of free and bound bilirubin a formula for calculating fluorescence intensity of the bound bilirubin has been proposed. Graphs of linear dependence of fluorescence intensity of bound bilirubin on the concentration of added bilirubin in a 10 and 20 times diluted medicinal preparation "Albupharm" were obtained. The concentration of bilirubin in a medicinal preparation "Albupharm" was $5,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$, or $0,0154 \pm 0,0001 \text{ mg/g}$ of albumin. Based on the literature data on the content of albumin-bound bilirubin in blood plasma of a healthy person (average $0,11 \text{ mg/g}$ albumin), we can conclude that albumin purification technology used provides a significant decrease in bilirubin content.

Keywords: human albumin medicinal preparation, bilirubin, quantitative determination, fluorescence spectroscopy, modified standard additions method.

ЛИТЕРАТУРА

1. Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali [et al.] // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2012. – Vol. 33, N 3. – P. 209–290.
2. Андреева, О. Л. Изменения свойств связывающих центров сывороточного альбумина в оценке состояния организма при патологии : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.04 / О. Л. Андреева. – Екатеринбург, 2003. – 226 л.
3. Способ получения высокоэффективного человеческого альбумина для применения в детоксикационной терапии : пат. RU 2424822 / М. Коста Рьерола, П. Ристоль Дебарт, Х. И. Хоркера Ньето. – Опубл. 27.07.2011.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 4 т.: введ. в действие с 1 дек. 2018 г. приказом М-ва здравоохранения РФ от 31.10.2018 г. № 749 / М-во здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2018. – Т. 4. – 1833 с.
5. European Pharmacopoeia: in 3 vol. – Strasbourg: Council of Europe, 2019. – Vol. 2. – 1320 p.
6. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? / A. Varshney [et al.] // *Chirality*. – 2010. – Vol. 22, N 1. – P. 77–87.
7. Valaskova, P. Metabolism of bilirubin and its biological properties / P. Valaskova, L. Muchova // *Klinicka Biochemie a Metabolismus*. – 2016. – Vol. 24, N 4. – P. 198–202.
8. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXa / P. A. Zunszain [et al.] // *J. of Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 381, N 2. – P. 394–406.
9. Сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека: возможность влияния на них мутаций, вызванных радиацией / В. В. Побойнев [и др.] // *Изв. Нац. акад. наук Беларуси. Серия медицинских наук*. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 46–57.
10. Vitek, L. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects / L. Vitek, J. D. Ostrow // *Current Pharmaceutical Des.* – 2009. – Vol. 15, N 25. – P. 2869–2883.
11. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin / S. Al-Harathi [et al.] // *J. of Inorganic Biochemistry*. – 2019. – Vol. 198. – P. 1–15.
12. Defreese, J. D. Properties and determination of serum bilirubin / J. D. Defreese, T. S. Wang // *Crit. Reviews in Clinical Lab. Sciences*. – 1984. – Vol. 19, N 4. – P. 267–296.
13. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. – New York: Springer, 2006. – 954 p.
14. Bilirubin: in 2 vol. / ed.: K. P. M. Heirwegh, S. B. Brown. – Boca Raton: CRC Press, 1982. – Vol. 1 : Chemistry. – 166 p.
15. Amin, S. B. Newborn jaundice technologies: unbound bilirubin and bilirubin binding capacity in neonates / S. B. Amin, A. A. Lamola // *Seminars in Perinatology*. – 2011. – Vol. 35, N 3. – P. 134–140.
16. Fluorometric study of the partition of bilirubin among blood components: basis for rapid microassays of bilirubin and bilirubin binding capacity in whole blood / A. A. Lamola [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1979. – Vol. 100, N 1. – P. 25–42.
17. Chen, R. F. Fluorescence stopped-flow study of relaxation processes in the binding of bilirubin to serum albumins / R. F. Chen // *Arch. of Biochemistry and Biophysics*. – 1974. – Vol. 160, N 1. – P. 106–112.
18. Greene, B. I. Picosecond primary photoprocesses of bilirubin bound to human serum albumin / B. I. Greene, A. A. Lamola, C. V. Shank // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of the USA*. – 1981. – Vol. 78, N 4. – P. 2008–2012.
19. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т.: введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении ; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.
20. Жебентяев, А. И. Аналитическая химия. Химические методы анализа: учеб. пособие для студентов вузов по фармацевт. и хим. специальностям / А. И. Жебентяев, А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – Минск: Новое знание; Москва: ИНФРА-М, 2020. – 542 с.

21. Бёккер, Ю. Спектроскопия / Ю. Бёккер. – Москва: Техносфера, 2009. – 528 с.

22. Albumin–drug interaction and its clinical implication / K. Yamasaki [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta–General Subjects*. – 2013. – Vol. 1830, N 12. – P. 5435–5443.

23. Ngashangva, L. Development of new methods for determination of bilirubin / L. Ngashangva, V. Bachu, P. Goswami // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – Vol. 162. – P. 272–285.

REFERENCES

1. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*. 2012;33(3):209–90. doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002

2. Andreeva OL. Changes in the properties of binding centers of serum albumin in assessing the state of the organism in pathology [dissertatsiia]. Ekaterinburg, RF; 2003. 226 l. (In Russ.)

3. Kosta R'erola M, Ristol' Debart P, Khorkera N'eto KhI, izobretateli; GRIFOLZ, patentoobladatel'. Method for obtaining highly effective human albumin for use in detoxification therapy. RU 2424822. 2011 Iiul' 27. (In Russ.)

4. Ministerstvo zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii. State Pharmacopoeia of the Russian Federation: v 4 t. T. 4. Moskva, RF; 2018. 1833 s. (In Russ.)

5. European Pharmacopoeia: in 3 vol. Strasbourg, Frantsiia: Council of Europe; 2019. Vol 2. 1320 p

6. Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan M, Subbarao N, Khan RH. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality*. 2010;22(1):77–87. doi: 10.1002/chir.20709

7. Valaskova P, Muchova L. Metabolism of bilirubin and its biological properties. *Klinicka Biochemie a Metabolismus*. 2016;24(4):198–202

8. Zunszain PA, Chuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX α . *J Mol Biol*. 2008;381(2):394–406. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.016

9. Poboinev VV, Khrustalev VV, Stozharov AN, Khrustaleva TA. Binding sites of bilirubin by human serum albumin: the possibility of affecting them by radiation-induced mutations. *Izv Nats akad nauk Belarusi. Serii meditsinskikh nauk*. 2021;18(1):46–57. doi: 10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57. (In Russ.)

10. Vitek L, Ostrow JD. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr Pharm Des*. 2009;15(25):2869–83. doi: 10.2174/138161209789058237

11. Al-Harathi S, Lachowicz JI, Nowakowski ME, Jaremkowski M, Jaremkowski Ł. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. *J Inorg*

Biochem. 2019;198:1–15. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110716

12. Defreese JD, Wang TS. Properties and determination of serum bilirubin. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1984;19(4):267–96. doi: 10.3109/10408368409165765

13. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, USA: Springer; 2006. 954 p

14. Heirwegh KPM, Brown SB, editors. Bilirubin: in 2 vol. Boca Raton, USA: CRC Press; 1982. Vol. 1, Chemistry. 166 p

15. Amin SB, Lamola AA. Newborn jaundice technologies: unbound bilirubin and bilirubin binding capacity in neonates. *Semin Perinatol*. 2011;35(3):134–40. doi: 10.1053/j.semperi.2011.02.007

16. Lamola AA, Eisinger J, Blumberg WE, Patel SC, Flores J. Fluorometric study of the partition of bilirubin among blood components: basis for rapid microassays of bilirubin and bilirubin binding capacity in whole blood. *Anal Biochem*. 1979;100(1):25–42. doi: 10.1016/0003-2697(79)90105-2

17. Chen RF. Fluorescence stopped-flow study of relaxation processes in the binding of bilirubin to serum albumins. *Arch Biochem Biophys*. 1974;160(1):106–12. doi: 10.1016/s0003-9861(74)80014-7

18. Greene BI, Lamola AA, Shank CV. Picosecond primary photoprocesses of bilirubin bound to human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(4):2008–12. doi: 10.1073/pnas.78.4.2008

19. Ministerstvo zdravookhraneniia Respubliki Belarus', Tsentral'nyy ekspertiz i ispytaniy v zdravookhraneni. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: v 2 t. T. 1, General methods of quality control of medicines. Sheriakov AA, redactor. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. 1220 s. (In Russ.)

20. Zhebentiaev AI, Zhernosek AK, Talut' IE. Analytical chemistry. Chemical methods of analysis: ucheb posobie dlia studentov vuzov po farmatsevt i khim spetsial'nostiam. Minsk, RB: Novoe znanie; Moskva, RF: INFRA-M; 2020. 542 s. (In Russ.)

21. Bekker Iu. Spectroscopy. Moskva, RF: Tekhnosfera; 2009. 528 s. (In Russ.)

22. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5435–43. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005

23. Ngashangva L, Bachu V, Goswami P. Development of new methods for determination of bilirubin. *J. Pharm Biomed Anal*. 2019;162:272–85. doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.034

Адрес для корреспонденции:

220006, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Свердлова, 13 а,
УО «Белорусский государственный
технологический университет»,
тел.: +375 17 327 28 03,
e-mail: leontiev@belstu.by,
Леонтьев В. Н.

Поступила 20.04.2022 г.