

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С ИОНАМИ КОБАЛЬТА И КАТЕХИНОМ

Федотова Е.В., Пастон С.В.

Санкт-Петербургский государственный университет

ул. Ульяновская, д. 1-3, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ; e-mail: st077318@student.spbu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0617

Аннотация. В работе изучается структура человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в водных растворах в присутствии катехина при постоянном молярном соотношении $[ЧСА]:[Cat]=1:10$ и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах $[Co^{2+}]:[ЧСА]$ от 0 до 100. Исследование вторичной структуры белка проводится методом ИК Фурье спектроскопии с деконволюцией полосы Амид I. Изменения в третичной структуре белка фиксируются по спектрам УФ поглощения и флуоресценции. Обнаружено, что при соотношениях концентраций $[ЧСА]:[Co^{2+}]$ до 1:100 не происходит нарушений в глобулярной структуре белка. Наблюдается снижение количества α -спиралей и увеличение содержания β -слоев в структуре белка с ростом концентрации катионов кобальта. При взаимодействии ЧСА с катехином наблюдаются спектральные изменения, свидетельствующие об образовании комплекса. Предположительно, комплексообразование приводит к тушению флуоресценции обоих соединений. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение его третичной структуры, так и непосредственное связывание катехина и катионов кобальта с ЧСА вблизи ароматических аминокислотных остатков. Величина дзета-потенциала частиц белка в растворе, определяемая плотностью отрицательного заряда на ЧСА, снижается с ростом концентрации $CoCl_2$ в растворе, приближаясь к 0 при $[Co^{2+}]:[ЧСА]=100$. Катехин не препятствует комплексообразованию ЧСА с Co^{2+} .

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, ионы металлов, катехин, комплексообразование, вторичная структура белка, собственная флуоресценция белка.

Ионы металлов широко распространены в природе и могут проникать в организм человека через воздух, почву, пищу и многими другими путями. Из-за того, что ионы металлов не могут разлагаться в окружающей среде, низкие концентрации ионов металлов могут накапливаться по пищевой цепочке, а затем становиться высокотоксичными для живых организмов [1]. При попадании в кровь, ионы металлов связываются с анионными группами белков плазмы, в том числе с сывороточным альбумином человека (ЧСА). Также они могут образовывать координационные связи с сульфгидрильными группами. Таким образом, путем присоединения к сывороточным белкам или путем изменения их конформации, ионы металлов способны конкурировать с экзогенными веществами за связывание с сывороточными белками [2]. Кроме того, существуют данные о том, что взаимодействие ионов переходных металлов с белками может провоцировать образование гидрофобных агрегатов, являющихся предшественниками амилоидов. Эти процессы инициируют развитие целого ряда конформационных болезней, в частности, нейродегенеративных патологий (например, болезнью Альцгеймера, Паркинсона, прионных болезней) [3,4].

Катехины – полифенолы растительного происхождения, присутствующие в повседневном рационе человека. Они обладают множеством полезных для организма свойств, в частности, проявляют антиоксидантную активность [5]. Молекулы катехинов могут участвовать в образовании координационной связи, являясь донором электронов для ионов переходных металлов, а также, благодаря своим восстановительным свойствам, менять степень окисления иона. Недавно появились исследования, обнаруживающие способность полифенолов ингибировать агрегацию амилина и альбумина, и даже вызывать разрушение уже образовавшихся фибрилл [6-8]. Эти весьма обнадеживающие результаты позволяют рассматривать полифенолы как основу для создания препаратов для профилактики и лечения конформационных болезней. В данной работе исследуется структура сывороточного альбумина человека при взаимодействии с ионами кобальта (II) и катехином.

Для исследования вторичной структуры белка широко используется метод ИК Фурье спектроскопии [9,10]. Наиболее чувствительной к различным формам вторичной структуры белка спектральной областью является полоса Амид I ($1700-1600\text{ см}^{-1}$), которая почти полностью обусловлена колебаниями C = O пептидных связей. Количественная оценка вторичной структуры белка основана на предположении, что любой белок может рассматриваться как линейная сумма нескольких элементов вторичной структуры, каждый из которых вносит свой вклад в определённом диапазоне волновых чисел в колебания пептидной связи. Разложение полосы Амид I на составляющие гауссовы контуры позволяет оценить содержание в данном белке различных элементов вторичной структуры [11]. В данной работе ИК спектры растворов альбумина регистрировали на приставке НПВО ИК Фурье спектрометра Nicolet 8700 (Thermo Scientific) с разрешением 2 см^{-1} . Анализ спектров проводился с помощью программы Origin Pro.

Информацию о состоянии третичной структуры белка даёт исследование спектров поглощения и собственной флуоресценции белка. Поглощение в ближнем УФ диапазоне ЧСА обусловлено, в основном, ароматическими аминокислотными остатками Trp (1), Tyr (18) и Phe (31), флуоресцирует в основном Trp [12,13].

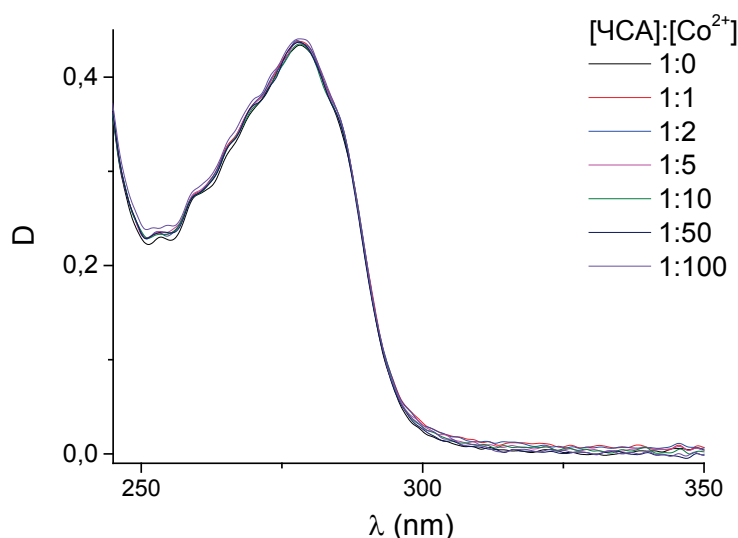


Рисунок 1. Спектры поглощения двухкомпонентных систем ЧСА с Co^{2+} . Соотношения соединений указаны на рисунке

Спектральные параметры ароматических аминокислот весьма чувствительны к их ближайшему окружению, и увеличение контактов с полярными молекулами воды вследствие нарушения глобулярной структуры приводит к заметному изменению спектров поглощения и флуоресценции ЧСА [12,14]. Спектры поглощения растворов белка регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия), спектры флуоресценции на приборе HITACHI F-7100 под 90° . Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см, измерения проводили при температуре 20-22°C.

Для характеристики поверхностного заряда белковых частиц применяли метод дзета-потенциала. Измерения проводили с помощью лазерного анализатора размера частиц SZ100 (Horiba Jobin Yvon) в термостатируемой камере при 25°C, использовали лазер с длиной волны 532 нм, мощностью 10 мВт.

В работе были проведены исследования структурных параметров ЧСА в водных растворах с катехином при постоянном соотношении $[\text{CCA}]:[\text{Cat}]=1:10$ и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах $[\text{Co}^{2+}]:[\text{CCA}]$ от 0 до 100.

На рисунке 1 показаны спектры УФ поглощения белка при различных концентрациях CoCl_2 в растворе, измеренные через 1 час после приготовления. Измерение, проведенное через 1 сутки после приготовления, дало тот же результат. Из спектров растворов был вычтен спектр соответствующего растворителя (водного раствора CoCl_2 той же концентрации). Видно, что спектр поглощения белка существенно не изменяется при соотношении $[\text{CCA}]:[\text{Co}^{2+}]$ до 1:100.

Спектр флуоресценции ЧСА в водном растворе показан на рисунке 2. Возбуждение проводилось при $\lambda = 278$ нм – в максимуме поглощения белка, при этом происходит возбуждение аминокислотных остатков Туг и Тгр, однако, в спектре флуоресценции белка присутствует только флуоресценция Тгр из-за переноса возбуждения с Туг на Тгр [12,13]. Максимум в спектре флуоресценции HSA наблюдается при $\lambda = 342$ нм. Регистрируя флуоресценцию на этой длине волны, мы получили спектр возбуждения водного раствора ЧСА (рис. 3).

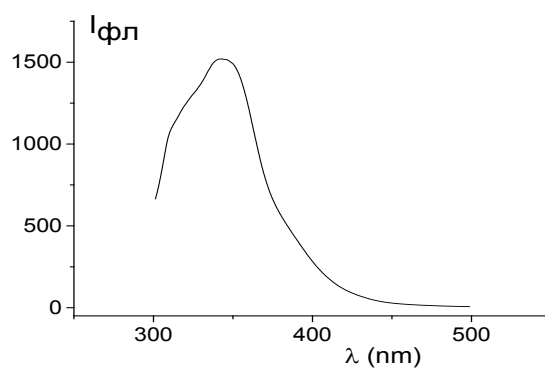


Рисунок 2. Спектр испускания ЧСА в водном растворе при возбуждении на 278 нм.

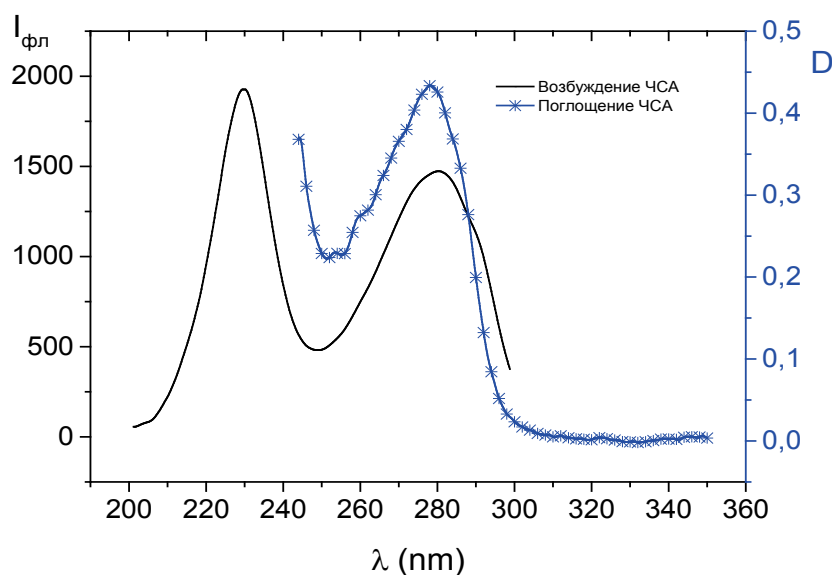


Рисунок 3. Спектр поглощения и возбуждения ЧСА в водном растворе

Сравнивая спектр возбуждения со спектром поглощения белка (рис. 3), а также со спектрами поглощения ароматических аминокислот [12], можно видеть, что длинноволновая полоса в спектре возбуждения соответствует $\lambda_{\text{max}} = 278$ нм в спектре поглощения ЧСА. Однако, в спектре возбуждения имеется и коротковолновая полоса при $\lambda = 230$ нм, возможно, она соответствует переходам в Туг и Тгр на более высокие электронные уровни, кроме того, в цистеине есть интенсивный переход при $\lambda = 230$ нм.

Присутствие ионов Co^{2+} не оказывает существенного влияния на спектры флуоресценции белка при возбуждении на $\lambda = 278$ нм (рис. 4а) и $\lambda = 230$ нм (рис. 4б). Видно, что при большей энергии квантов возбуждения более чётко разрешается дополнительная коротковолновая полоса в спектре испускания. Можно было ожидать, что двухвалентный ион при сближении с флуорофором будет тушить флуоресценцию, однако, в изученных системах этого не наблюдается. Можно сделать вывод, что в окружение Тгр не попала ни вода, ни ионы Co^{2+} , следовательно, третичная структура белка осталась ненарушенной.

Результаты исследования ИК спектров ЧСА в присутствии CoCl_2 приведены в таблице 1. На рисунке 5 показан пример разложения полосы Амид I на составляющие гауссовы контуры, отвечающие колебаниям пептидных групп, входящих в различные формы вторичной структуры белка. С ростом содержания ионов Co^{2+} наблюдаются изменения во вторичной структуре HSA: снижение количества α -спиральных участков и рост β -слоёв. Поскольку в третичной структуре белка в этих системах значительных изменений не обнаружено, то можно предположить, что увеличение количества β -слоёв происходит за счет образования межмолекулярных β -структур, т.е. происходит агрегация белковых молекул. Отметим, что способ приготовления образцов для измерения ИК спектров (высушивание капли раствора белка на кристалле НПВО) мог способствовать дополнительной агрегации белка [9]. Этим также может объясняться низкое значение количества α -спиралей и

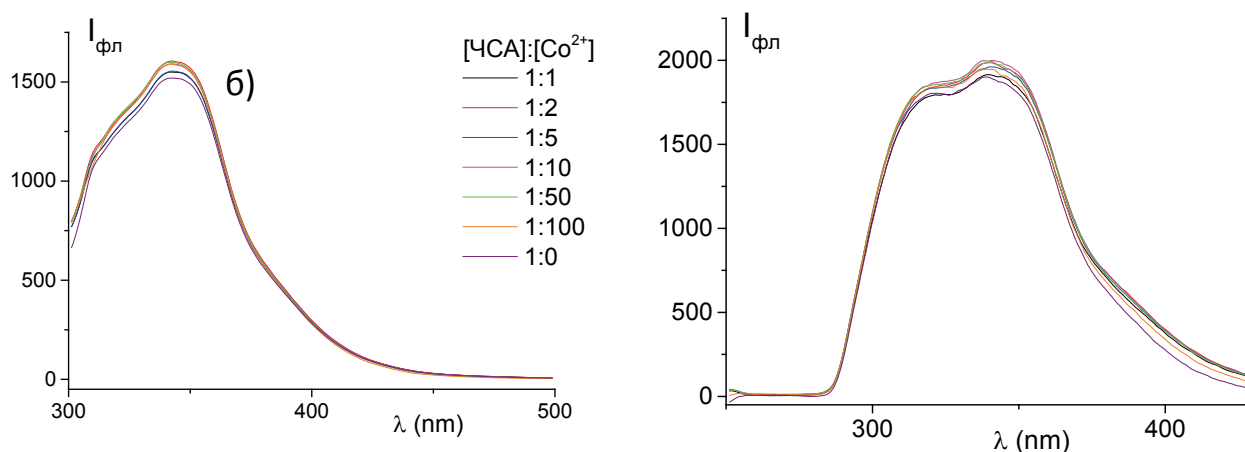


Рисунок 4. Спектр испускания ЧСА в растворах CoCl_2 при возбуждении (а) на 278 нм, (б) на 230 нм

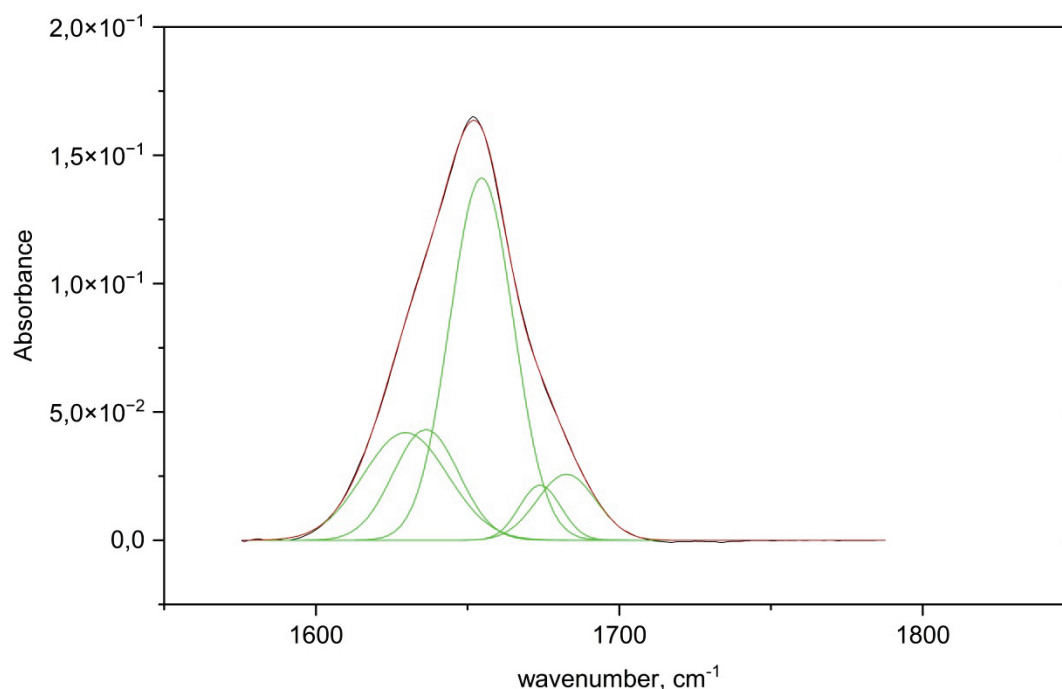
Таблица 1. Параметры вторичной структуры ЧСА в присутствии Co^{2+} по данным ИК спектроскопии

[ЧСА]:[Co^{2+}]	α -спирали, $\pm 4\%$	β - листы, $\pm 4\%$	β - повороты, ± 4
1:0	51	36	14
1:0,5	49	51	0
1:1	50	42	6
1:1,5	44	46	11
1:3	44	51	6
1:5	41	44	8
1:10	28	63	9

большое содержание β -слоёв в образце ЧСА без добавок (таблица 1). По данным рентгеноструктурного анализа, структура ЧСА содержит 67% α -спиралей и не содержит β -слоёв [13], ранее методом ИК спектроскопии НПВО жидких растворов ЧСА были получены значения 55% α -спиралей и 25% β -слоёв [14].

Рассмотрим результаты исследования структуры сывороточного альбумина в растворах, содержащих ионы кобальта и катехин. Спектр УФ поглощения катехина перекрывается со спектром ЧСА, что затрудняет интерпретацию спектров их комплексов. Мы будем рассматривать разностные спектры поглощения белка в многокомпонентных системах: из спектра раствора ЧСА с катехином и CoCl_2 будем вычитать спектр раствора катехина с CoCl_2 той же концентрации. Если взаимодействие отсутствует, то полученный разностный спектр будет совпадать со спектром ЧСА в водном растворе без добавок.

Разностные спектры УФ поглощения растворов ЧСА с катехином при постоянном соотношении $[\text{ЧСА}]:[\text{Cat}]=1:10$ и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$ от 0 до 100 показаны на рисунке 6. По сравнению со спектром ЧСА в отсутствие добавок, наблюдается снижение интенсивности поглощения в системах, содержащих катехин и кобальт, причем немонотонное с ростом концентрации катионов (рис. 7). Отличие разностных спектров от спектра HSA в водном растворе без добавок свидетельствует о взаимодействии компонентов, причем ионы Co^{2+} играют важную роль в этом взаимодействии. Наблюдаемые спектральные изменения могут свидетельствовать об изменении полярности окружения ароматических



Fitting Results

Peak Index	Peak Type	Area Intg	FWHM	Max Height	Center Grvty	Area IntgP
1	Gaussian	1,46692	32,86607	0,04193	1629,53668	19,96245
2	Gaussian	1,17053	25,53666	0,04306	1636,30427	15,92911
3	Gaussian	3,71319	24,72367	0,14109	1654,6332	50,53079
4	Gaussian	0,36944	16,19417	0,02143	1673,90938	5,02747
5	Gaussian	0,6283	22,94962	0,02572	1682,58748	8,55017

Рисунок 5. Разложение полосы Амид I ЧСА

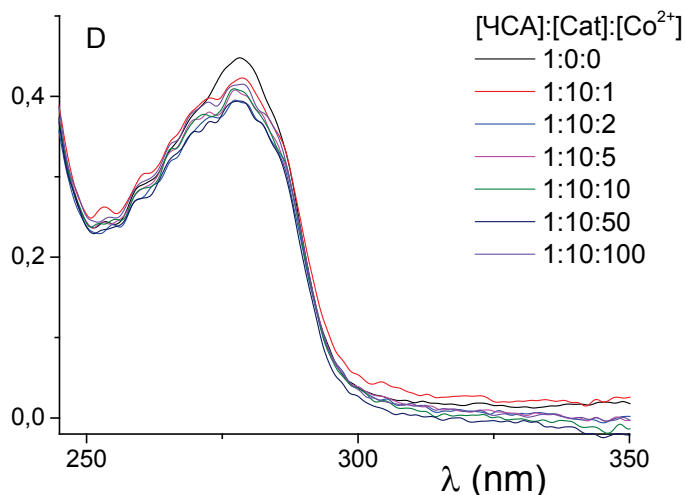


Рисунок 6. Разностные спектры УФ поглощения растворов ЧСА, содержащих катехин и CoCl_2 , соотношения компонентов указаны на рисунке

аминокислот белка (то есть о нарушении глобулярной третичной структуры), либо о том, что молекула катехина взаимодействует с HSA в непосредственной близости от хромофоров.

Спектры флуоресценции ЧСА, катехина и раствора, содержащего альбумин и катехин в тех же концентрациях при возбуждении в максимуме поглощения белка (278 нм), показаны на рисунке 8. Если сравнить результат вычитания из спектра флуоресценции комплекса спектра катехина со спектром испускания ЧСА, то заметно существенное снижение интенсивности флуоресценции белка в присутствии катехина. Это говорит о формировании комплекса альбумина с катехином. Причем, поскольку оба соединения флуоресцируют, и спектры их испускания перекрываются, то трудно сказать, какое соединение выступает тушителем. В спектрах возбуждения белка и катехина (рис. 9) присутствуют две полосы: 278 нм и коротковолновая в окрестности 230 нм. Видно, что при используемом соотношении концентраций при $\lambda_{\text{возб}} = 278$ нм эффективнее возбуждается белок, а при возбуждении на более коротковолновой полосе эффективнее возбуждается катехин. Рассмотрим спектры испускания этих растворов при возбуждении на коротковолновой полосе (рис. 10).

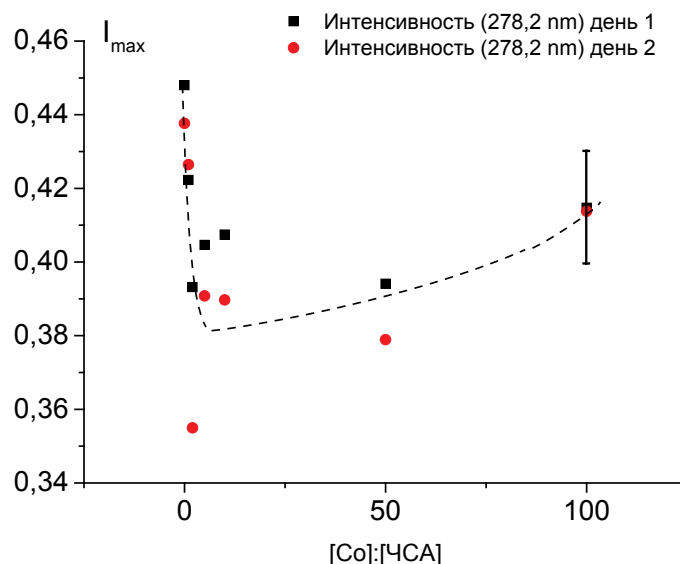


Рисунок 7. Зависимость интенсивности в максимуме разностного спектра УФ поглощения от молярного отношения $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$

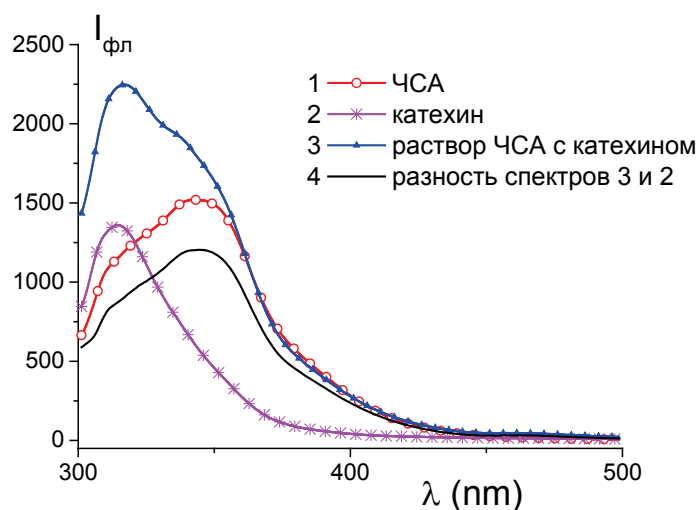


Рисунок 8. Спектры флуоресценции водных растворов ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином, возбуждение на 278 нм

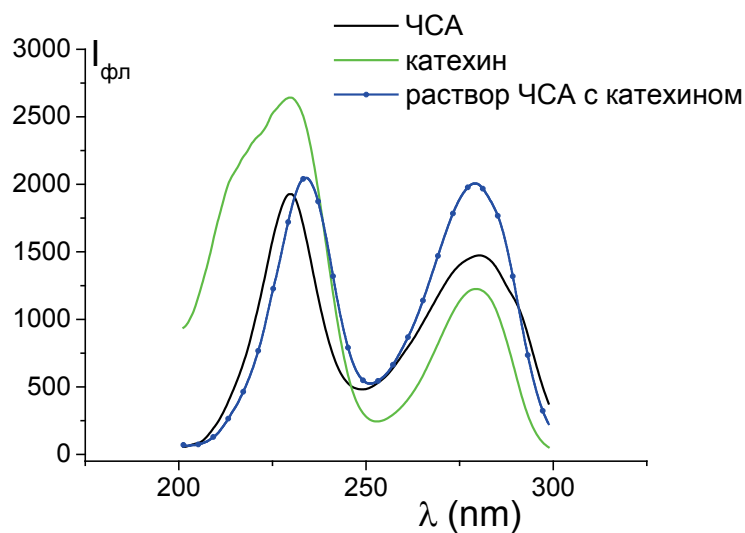


Рисунок 9. Спектры возбуждения водных растворов ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином

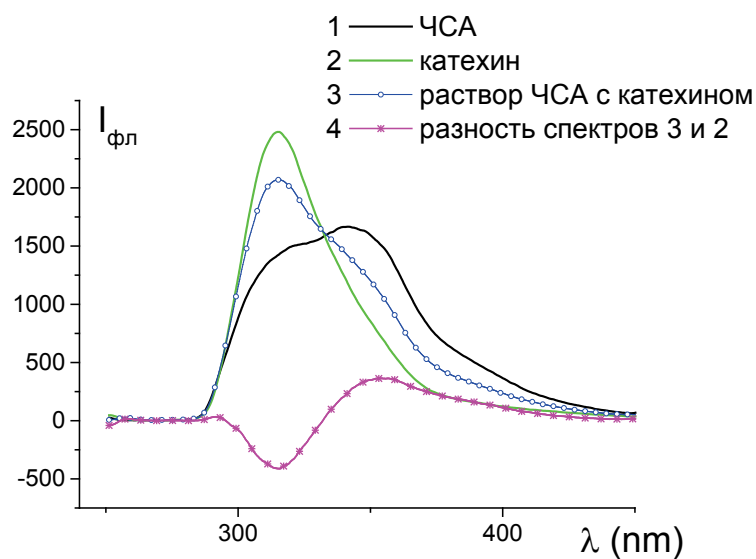


Рисунок 10. Спектры флуоресценции ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином при возбуждении на длинах волн в окрестности 230 нм

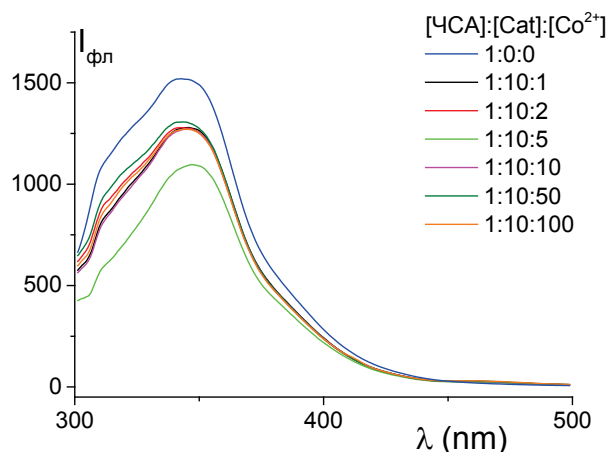


Рисунок 11. Разностные спектры флуоресценции растворов ЧСА, содержащих катехин и CoCl_2 , соотношения компонентов указаны на рисунке

Видно, что интенсивность флуоресценции комплекса ниже интенсивности флуоресценции катехина (в максимуме полосы испускания катехина), и также ниже интенсивности флуоресценции белка (в максимуме полосы испускания белка). При попытке построить разностный спектр испускания ЧСА в комплексе получаем отрицательную интенсивность на полосе испускания катехина. Можно предположить, что в комплексе происходит взаимное тушение флуоресценции и белка, и катехина.

Спектры флуоресценции растворов ЧСА, содержащих катехин и ионы кобальта, при $\lambda_{\text{возб}} = 278 \text{ нм}$, приведены на рисунке 11. В этих системах интенсивность испускания альбумина снижается по сравнению с его флуоресценцией в водном растворе (рис. 12а), а также наблюдается смещение λ_{max} в длинноволновую область (рис. 12б). Оба эти фактора указывают на нарушение третичной структуры белка. На рисунке 13 показаны спектры испускания растворов ЧСА, содержащих катехин и ионы кобальта, при $\lambda_{\text{возб}}$ в окрестности 230 нм (в максимуме коротковолновой полосы спектра возбуждения каждого раствора), на рисунке 14 показаны разностные спектры флуоресценции альбумина в этих системах. Здесь, аналогично ранее рассмотренным системам, содержащим ЧСА с катехином, наблюдается отрицательная полоса, показывающая значительное тушение флуоресценции в комплексе. Можно предположить, что мы наблюдаем суммарный эффект тушения флуоресценции катехина вследствие комплексообразования с белком, и флуоресценции белка. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение третичной структуры, так и непосредственное взаимодействие с катехином и катионами кобальта. Отметим, что ионы Co^{2+} слабо влияют на флуоресценцию катехина.

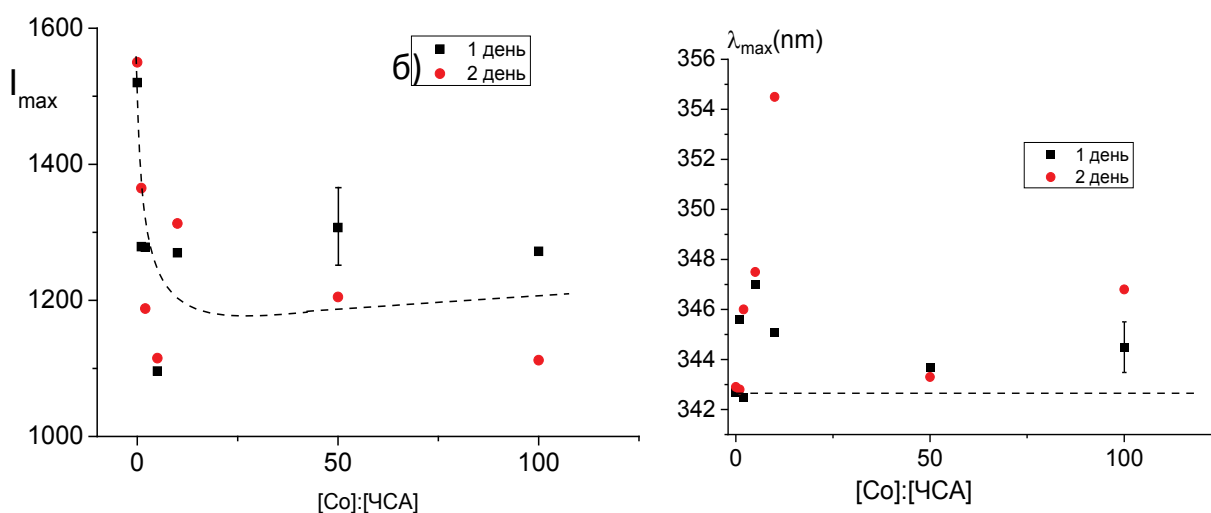


Рисунок 12. Зависимость интенсивности (а) и длины волны максимума (б) флуоресценции ЧСА в растворах с катехином и CoCl_2 от молярного отношения $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$

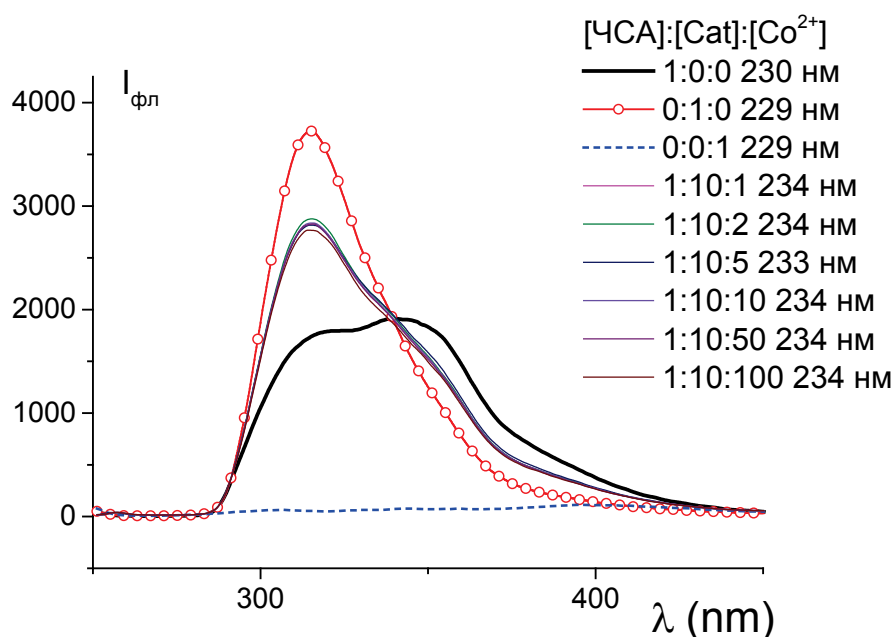


Рисунок 13. Спектры флуоресценции катехина (красная линия), ЧСА (черная) и их комплексов с добавлением разных концентраций кобальта. Длины волн возбуждения указаны в подписи на рисунке

Связывание белка с ионами Co^{2+} отчетливо проявляется при измерении дзета-потенциала частиц белка в растворах CoCl_2 (рис. 15). Его значение резко растёт (уменьшается по модулю), приближаясь к 0 при $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}] = 100$. В трехкомпонентных растворах с катехином значения дзета-потенциала существенно не отличаются от значений в растворах альбумина с CoCl_2 . Снижение поверхностного заряда белка способствует его агрегации.

По результатам, полученным в работе, можно сделать следующие выводы. В водных растворах человеческого сывороточного альбумина при соотношениях концентраций $[\text{ЧСА}]:[\text{Co}^{2+}]$ до 1:100 не наблюдается нарушений в третичной структуре белка. Наблюдается снижение количества α -спиралей и увеличение содержания β -слоев в структуре белка с ростом концентрации катионов кобальта. При взаимодействии ЧСА с катехином наблюдаются спектральные изменения, свидетельствующие об образовании комплекса. Предположительно, комплексообразование приводит к тушению флуоресценции обоих соединений. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение его третичной структуры, так и непосредственное связывание катехина и катионов кобальта с ЧСА вблизи ароматических аминокислотных остатков. Плотность отрицательного заряда на молекулах ЧСА снижается с ростом концентрации CoCl_2 в растворе, приближаясь к 0 при $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}] = 100$. Катехин не препятствует комплексообразованию ЧСА с Co^{2+} .

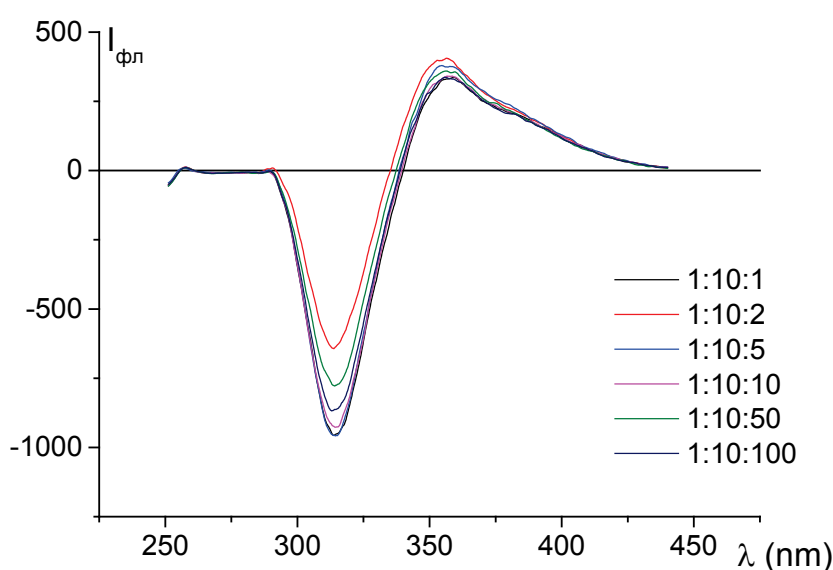


Рисунок 14. Разностные спектры флуоресценции ЧСА в растворах с разными концентрациями CoCl_2 и постоянной концентрацией катехина

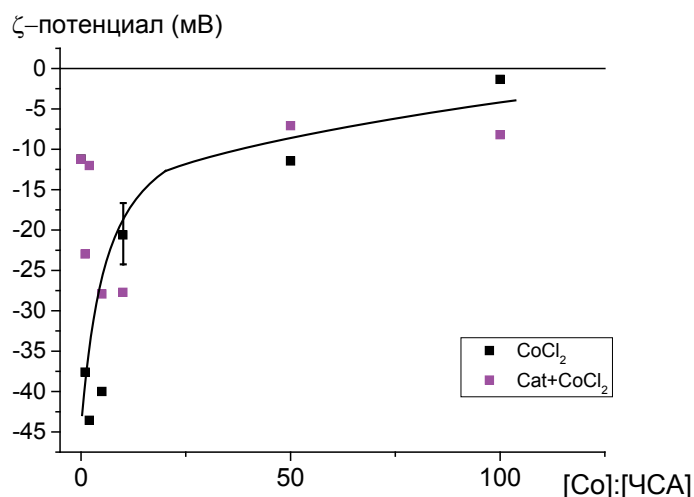


Рисунок 15. Дзета потенциал частиц белка в растворах, содержащих катехин и CoCl_2

Благодарности. Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

Список литературы / References:

1. Iqbal M., Saeed A., Zafar S.I., Hazard J. FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of Cd^{2+} and Pb^{2+} removal by mango peel waste. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, vol. 164, iss. 1, pp. 161-171, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.141.
2. Mijun P., Shuyun S., Yuping Z. Influence of Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} on (+)-catechin binding to bovine serum albumin studied by fluorescence spectroscopic methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, vol. 85, iss. 1, pp. 190-197, doi: 10.1016/j.saa.2011.09.059.
3. Porter M.R., Kochi A., Karty J.A., Lim M.H., Zaleski J.M. Chelation-Induced Diradical Formation as an Approach to Modulation of the Amyloid- β Aggregation Pathway. *Chem. Sci.*, 2015, vol. 6, pp. 1018-1026, doi: 10.1039/C4SC01979B.
4. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M., Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell Biochem.*, 2010, vol. 345, pp. 91-104, doi: 10.1007/s11010-010-0563-x.
5. Grzesik M., Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, 2018, vol. 241, pp. 480-492, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
6. Chaari A., Abdellatif B., Nabi F., Khan R.H. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit's polyphenols as potential inhibitors for human amylin fibril formation and toxicity in type 2 diabetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 1794-1808, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.080.
7. Prasanna G., Jing P. Polyphenol binding disassembles glycation-modified bovine serum albumin amyloid fibrils. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, vol. 246, p. 119001, doi: 10.1016/j.saa.2020.119001.
8. Prasanna G., Jing P. Polyphenols redirects the self-assembly of serum albumin into hybrid nanostructures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 3932-3942, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.005.
9. Polyanychko A.M., Romanov N.R., Starkova T.Yu. Kostyleva E.I., Chikhirzhina E.V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell and Tissue Biology*, 2014, vol. 8, pp. 352-358, doi: 10.1134/S1990519X14040087.
10. Abrosimova K.V., Shulenina O.V., Paston S.V. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series*, 2016, vol. 769, p. 012016, doi: 10.1088/1742-6596/769/1/012016.
11. Kong J., Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, vol. 39, pp. 549-559, doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
12. Cantor C.R., Schimmel P.R. *Biophysical Chemistry. Part 2*. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980, 496 p.
13. Peters T.Jr. *All About Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Elsevier Inc., 1995, 432 p.
14. Tankovskaia S.A., Abrosimova K.V., Paston S.V. Spectral demonstration of structural transitions in albumins. *Journal of Molecular Structure*, 2018, vol. 1171, pp. 243-252, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.05.100.

INTERACTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN WITH COBALT IONS AND CATECHIN

Fedotova E.V., Paston S.V.

St. Petersburg State University

Peterhof, Ulyanovskaya str., 1–3, St. Petersburg, 198504, Russia; e-mail: st077318@student.spbu.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0617

Abstract. The structure of human serum albumin (HSA) in aqueous solutions in the presence of catechin at a constant molar ratio $[HSA]:[Cat]=1:10$ and varying the concentration of cobalt ions within $[Co^{2+}]:[HSA]$ from 0 to 100 is studied in this work. The study of the secondary structure of the protein is carried out by FTIR spectroscopy with deconvolution of the Amide I band. Changes in the tertiary structure of the protein are recorded by UV absorption and fluorescence spectra. It was found that at concentration ratios of $[HSA]:[Co^{2+}]$ up to 1:100, there are no disturbances in the globular structure of the protein. There are a decrease in the number of α -helices and a growth in the content of β -layers in the protein structure with an increase in the concentration of cobalt cations. When HSA interacts with catechin, spectral changes are observed, indicating the formation of a complex. Presumably, complex formation leads to quenching of the fluorescence of both compounds. The cause of protein fluorescence quenching can be either a violation of its tertiary structure or the direct binding of catechin and cobalt cations to HSA near aromatic amino acid residues. The value of the zeta potential of protein particles in solution, determined by the negative charge density on HSA, decreases with increasing concentration of $CoCl_2$ in solution, approaching 0 at $[Co^{2+}]:[HSA]=100$. Catechin does not hinder from the complex formation of HSA with Co^{2+} .

Key words: *human serum albumin, metal ions, catechin, complexation, protein secondary structure, protein intrinsic fluorescence.*