

УДК 541.65

А.О. Шийчук, Г.О. Сіренко

Спектральні зміни барвника катйонний синій 41 під час взаємодії із карбоксиметилцелюлозою

*Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
вул. Шевченка, 57, м. Івано-Франківськ, 76025, Україна*

За допомогою спектрофотометричних методів аналізу та із застосуванням математичної обробки спектрів досліджено взаємодію барвника катйонний синій 41 і карбоксиметилцелюлози. Виявлено помітні зміни в спектрі системи згаданих речовин порівняно із спектром чистого барвника. Виявлено можливість застосування даного явища із аналітичною метою.

Ключові слова: катйонний синій 41, карбоксиметилцелюлоза, спектральні зміни, міжмолекулярні комплекси, катйонні барвники, диференціювання.

A.O. Shyichuk, H.O. Sirenko

Alternations in Spectra of Basic Blue 41 Dye Due to Interactions between the Dye and Carboxymethyl Cellulose

*Vasyl Stefanyk' Precarpathian National University,
57, Shevchenko Str., Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine*

Interactions between cationic dye Basic Blue 41 and carboxymethyl cellulose have been studied via spectrophotometry. The mathematical refinement of spectras has been used. Relating to the spectra of pure dye noticeable changes in spectras of Basic Blue 41-carboxymethyl cellulose system have been found. A possibility of analytical use of the phenomenon has been found.

Key words: Basic Blue 41, carboxymethyl cellulose, Spectral Changes, intermolecular complexes, cationic dyes, differentiation.

Стаття поступила до редакції 01.10.2009; прийнята до друку 01.11.2009.

Вступ

Взаємодії між барвниками і полііонами вивчають протягом тривалого часу, особливо завдяки інтересу барвникової промисловости до цього явища. Такі взаємодії також важливі для біологічних досліджень [1, 2].

Взаємодія катйонних барвників з полііонами відбивається на спектрі поглинання (метахромізм). Такий ефект пояснюють утворенням агрегатів барвника внаслідок його підвищеної локальної концентрації. Це явище також спостерігається в концентрованих водних розчинах барвника. Присутність молекул полііону в розчині веде до скупчення молекул

барвника біля полімерних молекул, яке спричиняє метахромізм. Явище спостерігається уже при концентраціях барвника, менших від 10^{-5} М, хоча в тих же умовах метахромізм не виявлений для чистого розчину барвника. Підвищена схильність катйонних барвників до метахромізму під час взаємодії з полііонами пояснюється зменшенням електростатичного відштовхування між молекулами барвника внаслідок частинної нейтралізації з протііонами, носіями яких є полімер, внаслідок чого молекули барвника опиняються в умовах, сприятливих для π -електронних взаємодій [3].

Для більшості катйонних барвників у присутности поліаніонів максимум в спектрі

поглинання зсувається в ділянку коротких хвиль, у той же час поглинання на характерних для чистого барвника довжинах хвиль спадає. Нові смуги поглинання відносять до димерів, тримерів і вищих агрегатів, які утворюються при збільшенні локальної концентрації барвника. З іншого боку, при перевищенні певної концентрації полімеру, максимум зміщується в довгохвильову ділянку спектру. Іноді такий комплекс може поглинати в ділянці хвиль, до 10 нм довших відносно максимуму «чистого» водного розчину барвника. Такий ефект пояснюється розподіленням молекул барвника вздовж надлишкових ланцюгів полімеру, внаслідок чого ці молекули опиняються на значній відстані одна від одної. На основі цього ефекту був розроблений спектроскопічний метод визначення кількості аніонних місць у полістиренсульфонаті натрію шляхом титрування з катйонними барвниками (акридиновий оранжевий (Acridine Orange) і Піронін G (Pyronine G)) [4, 5]. Схожий метод був застосований для оцінки кількості аніонних місць в ДНК [6, 7], поліакрилової [8] і поліметакрилової [9] кислотах.

Використання барвників у біологічній практиці відносять до кінця XIX ст. У той же час катйонні та аніонні барвники (метиленовий синій (Methylene Blue), метиловий зелений (Methyl Green), еозин (Eosine)), були застосовані для ідентифікації різних ділянок тканин тваринних організмів [10]. Тест датського лікаря Грама (H.Ch. Gram), впроваджений в 1884 році, ґрунтується на тому, що барвник кристалічний фіолетовий (Crystal Violet) незворотно фарбує певні бактерії, залишаючи незабарвленими інші. За цією ознакою мікроорганізми класифікують на грампозитивні і грамнегативні [11].

Катйонні барвники на сучасну пору застосовуються у різних галузях біології. Забарвлення мікроорганізмів, у поєднанні з флюоресцентною мікроскопією, утворює потужний метод для дослідження будови клітин і тканин, а також для діагностики таких хвороб як сухоти (tuberculosis), обкладниця (diphtheria), болотна пропасниця (malaria) та ін. [12].

Нуклеїнові кислоти мають сильний кислотний характер завдяки фосфатним складовим ($pK \sim 2$), в той час як білки є менш кислотними ($pK \sim 5$) завдяки карбоксильним групам. Таким чином, в межах pH 2-5 тільки нуклеїнові кислоти будуть йонізуватись і поводити себе як полійони, тому катйонні барвники, наприклад, профлавін (Proflavine), акридиновий оранжевий (Acridine Orange), і метиленовий синій (Methylene Blue), часто застосовують для забарвлення нуклеїнових кислот у таких умовах з метою відрізнення їх від білків.

Акридиновий оранжевий (Acridine Orange) також може бути використаний для дослідження змін конфігурації ДНК під час гелевого

електрофорезу [13]. Піронін (Pyronine) і метиловий зелений (Methyl Green) використовуються для розрізнення ДНК і РНК. Перший селективно фарбує РНК, а другий – ДНК [14]. Етидіум бромід (Ethidium Bromide) і пропідіум йодид (Propidium Iodide) – ще два барвники, які можуть бути використані для ідентифікації різних ДНК [15], а також для виявлення її в гелях [16]. Акридиновий оранжевий (Acridine Orange) [17] і барвники групи «родаміни» (Rhodamines) [18] використовуються для дослідження органел клітин.

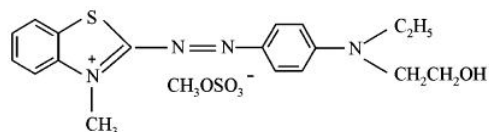
Барвник катйонний синій 41 використовується для фарбування акрилових, деяких поліамідних і поліестерових матеріалів, віскози, вати і вовни, а також в біології для забарвлення і подальшої ідентифікації пташиних лейкоцитів [19], а також крові і клітин кісткового мозку [20].

Дана робота присвячена дослідженню взаємодій азобарвника катйонного синього 41 та карбоксиметилцелюлози, яка є поліаніоном.

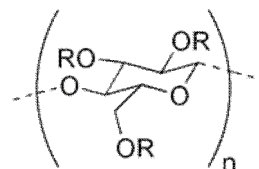
I. Експериментальна частина

У якості об'єктів дослідження використані:

- азобарвник катйонний синій 41 (C.I. Basic Blue 41, BB41):



- карбоксиметилцелюлоза (КМЦ):



Для дослідження взаємодії барвника BB41 із КМЦ готували серію розчинів у мірних колбах на 100 мл, у які піпеткою вносили 50 мл 10^{-4} М розчину барвника і різні кількості розчину КМЦ ($4,5 \cdot 10^{-4}$ моль-мономера/л) з бюретки. У табл. наведені ці кількості розчину КМЦ і відповідні їм співвідношення КМЦ:BB41 (молярна концентрація мономера КМЦ, що віднесена до молярної концентрації BB41). Після додавання необхідних кількостей реагентів колби доводили до мітки дистильованою водою і витримували один день для досягнення рівноважного стану.

Квантово-механічне моделювання, яке полягало в оптимізації геометрії молекули барвника, здійснювали за допомогою програми Gaussian 03 E.01 [21] методом B3LYP [22, 23] із базовими параметрами 6-31+g(d,p). Моделювана молекула розміщувалась в уявному розчиннику, створеному методом РСМ [24].

Таблиця

Склад досліджуваних розчинів (система КМЦ-ВВ41) і відповідне їм співвідношення компонентів

Об'єм розчину КМЦ, мл	Співвідношення КМЦ:ВВ41
0	0,0
1	0,1
2	0,2
5	0,5
7	0,7
10	1,0
15	1,5
17	1,7
20	2,0
22	2,2
25	2,5
30	3,0
32	3,2
35	3,5

Спектри поглинання досліджуваних розчинів записувались на спектрофотометрі Hitachi у координатах $D = f(\lambda)$, де D – оптична густина розчину і λ – довжина хвилі, в кварцевій кюветі товщиною 1,00 см, діапазон довжин хвиль 200-800 нм, крок довжини хвилі 1 нм. Математична обробка спектру, яка полягала в вирівнюванні даних методом Савіцького-Голая [25] за тринадцятьма точками і згладжуванні-диференціюванні (похідна другого порядку) за тринадцятьма точками, проводилась за допомогою програми Origin 5 [26].

Експериментальні та розраховані дані піддавали апроксимації аналітичними функціями, частіше поліномами k -го порядку:

$$y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + \dots + b_i x^i + \dots + b_k x^k \quad (1)$$

Адекватність рівняння доводили:

- за коефіцієнтом апроксимації:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{ad}}{SS_{\text{від}}}, (0 \leq R^2 \leq 1) \quad (2)$$

де SS_{ad} – сума (численик) в дисперсії адекватності:

$$SS_{ad} = \frac{SS_{\text{ад}}}{f_{\text{ад}}} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - m} \quad (3)$$

де $f_{\text{ад}} = (n - m)$ – число ступенів вільності при розрахунку дисперсії адекватності;
 m – число коефіцієнтів, включаючи b_0 , рівняння, що перевіряється на адекватність;
 n – число експериментальних точок;
 \hat{y}_i – значення y_i , розраховане за рівнянням (1) для i -точки;
 y_i – експериментальні дані в i -точці;
 $SS_{\text{ад}}$ – сума (численик) в дисперсії відновлення:

$$S_{\text{від}}^2 = \frac{SS_{\text{від}}}{f_{\text{від}}} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n - 1} \quad (4)$$

де \bar{y}_i – середнє арифметичне значення n результатів;

$f_{\text{від}} = (n - 1)$ – число ступенів вільності при розрахунку дисперсії відновлення;

- за кореляційним співвідношенням:

$$R = \sqrt{1 - \frac{S_{\text{ад}}^2}{S_{\text{від}}^2}}, (0 \leq R \leq 1) \quad (5)$$

Для визначення на кривих залежностей $y = f(x)$ лінійних ділянок, вибирали для апроксимації поліномами першого порядку:

$$y = b_0 + b_1x \quad (6)$$

При $n \geq 5$ точок, адекватність (6) перевіряли за коефіцієнтом кореляції ($0 \leq |r_{x,y}| \leq 1$), його значущість визначали за z -функцією перетворення Фішера.

II. Результати та обговорення

За [10-17] більшість барвників, які використовують у дослідженнях на сьогодні часто є представниками тіазинових барвників, які належать до гомологічного ряду барвника Methylene Blue. Барвник катйонний синій 41 є представником іншого класу, ніж метиленовий синій та його часто згадувані в літературі гомологи, а саме – азобарвником. Крім того, як показали результати квантово-механічних досліджень, на відміну від багатьох барвників, структура катйонного синього 41 не є плоскою. Даний барвник поглинає у ділянці 550-650 нм і має синє забарвлення. Концентровані розчини ВВ41 мають синьо-фіолетове забарвлення. Такий метахромізм означає, що цей барвник змінює колір залежно від концентрації, а отже, може змінювати колір при взаємодії з поліаніонами.

Спектр чистого барвника, а також спектри системи КМЦ-ВВ41 (співвідношення компонентів згідно табл.) подані на рис. 1. Стрілками вказано напрямок зміни максимумів у міру зростання співвідношення КМЦ:ВВ41, тобто із збільшенням кількості КМЦ у системі. Згадане співвідношення визначається як частка молярної концентрації мономера КМЦ і молярної концентрації барвника, тобто є мольним співвідношенням мономер КМЦ: барвник.

Як видно з рис. 1, широкий максимум у ділянці 570-640 нм, який належить чистому барвнику, спадає, натомість з'являється новий максимум при довжині хвилі 517 нм, який зростає із збільшенням співвідношення КМЦ:ВВ41.

Так як у згаданому широкому максимумі важко визначити точне положення складових максимумів та їх кількість, було застосовано математичну обробку, яку буде описано нижче. За її результатами знайдено, що максимумів є два і їх довжини хвиль складають 575 та 620 нм.

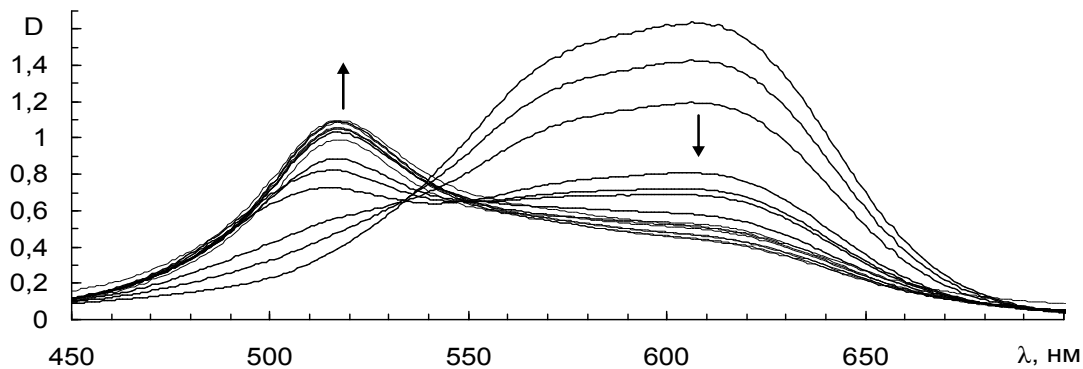


Рис. 1. Спектри поглинання системи ВВ41-КМЦ.

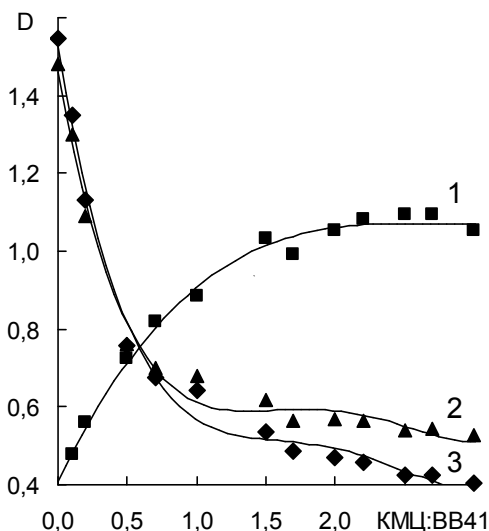


Рис. 2. Залежність оптичної густини D від співвідношення КМЦ:ВВ41 за довжинами хвиль 517 (1), 575 (2) і 620 (3) нм.

У спектрах системи КМЦ-ВВ41 є ізосбестична точка (isosbestic point*) та насичення в залежностях $D(\lambda_i) = \varphi(\text{КМЦ:ВВ41})$ при довжинах хвиль 517, 575 і 620 нм від кількості КМЦ. За [3-5] можна зробити висновок, що ВВ41 утворює із КМЦ певний комплекс, котрий перебуває у рівновазі із вільним барвником і поглинає при 517 нм.

Для отримання конкретних кількісних даних щодо характеру змін максимумів у спектрах (рис. 1) були побудовані залежності оптичних густин від співвідношення КМЦ:ВВ41 для довжин хвиль 517, 575 та 620 нм (рис. 2). На рис. 2 апроксимаційні поліноми мають вигляд:

• для $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм})$: $y = 0,0333x^3 - 0,2728x^2 + 0,7391x + 0,4076$, $R^2 = 0,9926$ (крива 1); (7)

• для $D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$: $y = 0,0665x^4 - 0,5473x^3 + 1,5906x^2 - 1,9596x + 1,461$, $R^2 = 0,9902$ (крива 2); (8)

• для $D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$: $y = 0,0689x^4 - 0,566x^3 + 1,657x^2 - 2,117x + 1,5244$, $R^2 = 0,993$ (крива 3); (9)

де $y \equiv D(\lambda_i)$, $x \equiv \text{КМЦ:ВВ41}$.

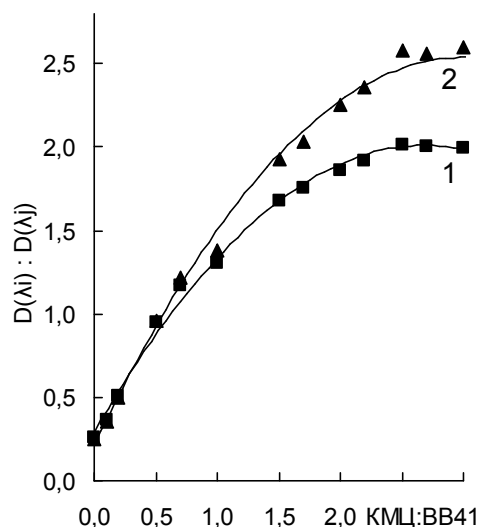


Рис. 3. Залежність співвідношення значень оптичних густин максимумів: $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ (1) та $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

Як видно з рис. 2, поглинання при 517 нм рівномірно зростає, а поглинання при 575 і 620 нм рівномірно спадає в діапазоні співвідношення КМЦ:ВВ41 від 0 до 0,5. При співвідношенні (КМЦ:ВВ41) > 0,5 криві змінюють тренд, і виходять на певне насичення.

Для отримання додаткових даних за результатами спектральної аналізи будують залежності співвідношень оптичних густин на певних довжинах хвиль від необхідного кількісного параметру. На рис. 3 зображені графіки залежності часток $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ та $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ від співвідношення КМЦ:ВВ41. На рис. 3 апроксимаційні поліноми мають вигляд:

• для $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$: $y = -0,2389x^2 + 1,2826x + 0,2895$, $R^2 = 0,9952$ (крива 1) (10)

• для $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$: $y = -0,2586x^2 + 1,5523x + 0,2089$, $R^2 = 0,9927$ (крива 2) (11)

де $y \equiv D(\lambda_i) : D(\lambda_j)$, $x \equiv \text{КМЦ:ВВ41}$.

*In spectroscopy, an **isosbestic point** is a specific wavelength at which two chemical species have the same molar absorptivity (ϵ) or (more generally) are linearly related [27]. (Ізосбестична точка – у спектроскопії так називають певну довжину хвилі, при якій дві хімічні речовини мають однакову молярну адсорбцію).

Як і в залежностях значень оптичних густин максимумів від кількості КМЦ (рис. 2), тут спостерігається лінійна ділянка в межах співвідношення КМЦ:ВВ41 від 0 до 0,5. Є також певний злам в околі (КМЦ:ВВ41) = 0,5, але у цій залежності він досить незначний, тому можна вважати, що в цьому випадку лінійна ділянка простягається приблизно до точки КМЦ:ВВ41 = 2,5, що якісно відрізняє цю залежність від залежності оптичної густини відносно співвідношення КМЦ:ВВ41.

На рис. 4 зображені залежності співвідношень $D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ та $D(\lambda_3 = 620 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ від співвідношення КМЦ:ВВ41, тобто співвідношень оптичних густин максимумів самого барвника. Ці залежності є лінійними майже у всьому діапазоні співвідношення КМЦ:ВВ41. Коефіцієнт апроксимації R^2 для даних кривих при апроксимації методом найменших квадратів складає 0,98-0,99. Це якісно відрізняє їх від всіх попередніх залежностей.

На рис. 4 апроксимаційні поліноми мають вигляд:

$$\bullet \text{ для } D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм}): y = 0,1211x + 0,9528, R^2 = 0,9895 \text{ (крива 1);} \quad (12)$$

$$\bullet \text{ для } D(\lambda_3 = 620 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}): y = -0,096x + 1,0376, R^2 = 0,9783 \text{ (крива 2),} \quad (13)$$

де $y \equiv D(\lambda_i) : D(\lambda_j)$, $x \equiv \text{КМЦ:ВВ41}$.

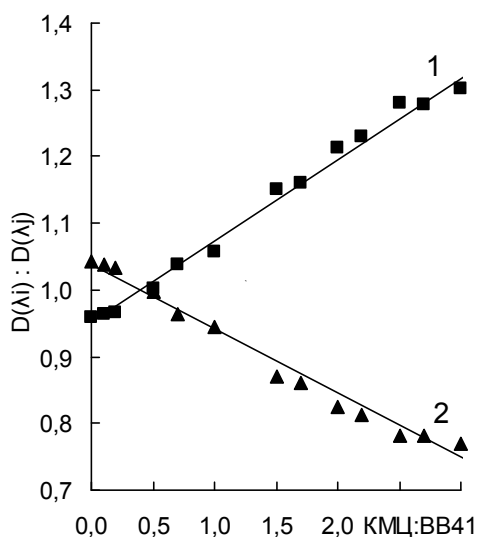


Рис. 4. Залежність співвідношення значень оптичних густин максимумів: $D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ (1) та $D(\lambda_3 = 620 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

Таким чином, із математично необробленого спектру системи КМЦ-ВВ41 можна отримати ряд кількісних показників, які залежать від концентрації КМЦ в системі. Тому, барвник катйонний синій 41 також можливо використати для кількісної аналізи КМЦ.

Якщо застосовувати катйонний синій 41 з аналітичною метою, то можна використати як звичайне вимірювання оптичної густини при відомих довжинах хвиль (517, 575 або 620 нм), або використовувати співвідношення оптичних густин $D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$. В обох випадках потрібно застосовувати метод калібрувального графіка. Перший спосіб є простішим, так як достатньо виміряти оптичну густину, а другий спосіб є кращим у зв'язку з помітно широкими межами співвідношень КМЦ:ВВ41, у яких можливо застосувати такий метод аналітичного визначення. У даному випадку співвідношення оптичних густин, в які входить $D(\lambda_1 = 517 \text{ нм})$ не розглядаються, так як в їхніх залежностях від кількості КМЦ лінійна ділянка є такою ж за протяжністю, як і в звичайних залежностях оптичних густин максимумів.

Повернемось до згаданої вище математичної обробки спектрів. На початковому етапі досліджень було помічено, що в спектрі барвника катйонний синій 41 є один максимум, який є розширеним. Було припущено, що він складається з кількох максимумів, які є близькими за довжиною хвилі і накладаються один на одного. Тому, перш за все, необхідно визначити положення та кількості максимумів, для чого було застосовано метод диференціювання.

Всі математичні обробки виконувались у програмі Origin 5. Від спектрів були взяті другі похідні численними методами. Виявилось, що пряме диференціювання спектрів не є ефективним: замість бажаного диференційованого спектру утворювався спектр із суцільних спектральних «шумів». Слід зазначити, що після того, як попередні досліди показали наявність «шумності» спектрів, дані спектри було отримано в наступний спосіб. Знімали 10 спектрів з кожного зразка, при цьому щоразу оновлювали розчин у кюветі (10 різних проб з кожного з робочих розчинів), а потім з отриманих спектрів визначали середнє арифметичне оптичних густин у кожній точці. Такий спосіб теж виявився малоефективним, тому довелося застосувати ще й математичне вирівнювання спектрів методом Савіцького-Голая. Із доступних у програмі методів він виявився найкращим, так як, в утвореному після вирівнювання спектрі, висоти максимумів чітко збігались із висотами максимумів у вихідному спектрі (при застосуванні інших методів максимуми виявлялись значно нижчими). Після вирівнювання, до спектрів застосовували процедуру згладжування-диференціювання за похідною другого порядку. У результаті утворювались диференційовані спектри, частина з яких представлена на рис. 5, де звичайні спектри показані ризикованою лінією, а відповідні їм диференційовані – суцільною.

За диференційованими спектрами було визначено положення максимумів. Як видно з рис. 5, диференційовані спектри дозволяють визначити положення максимумів з високою точністю та надійністю.

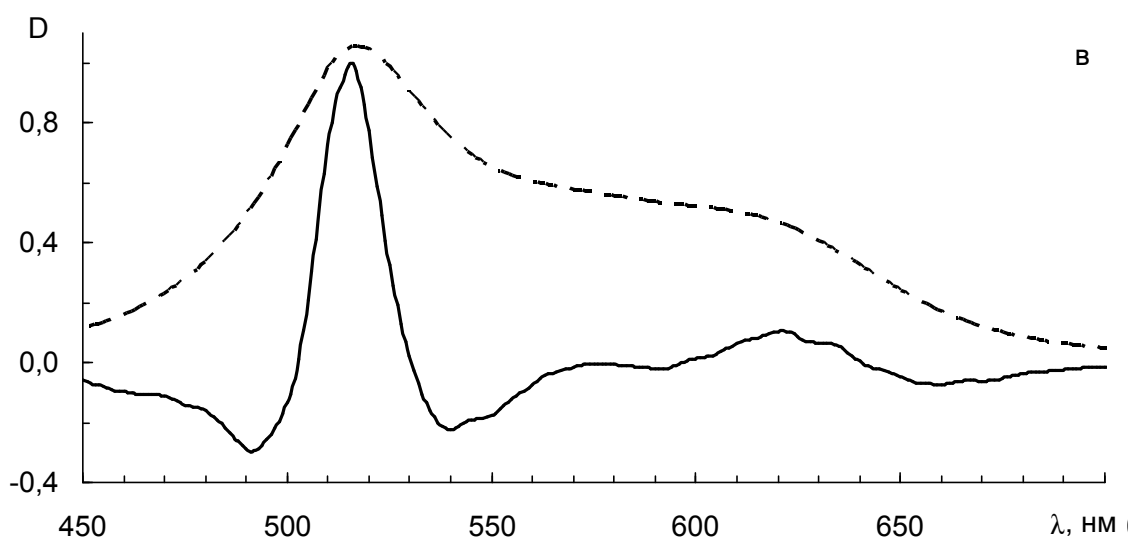
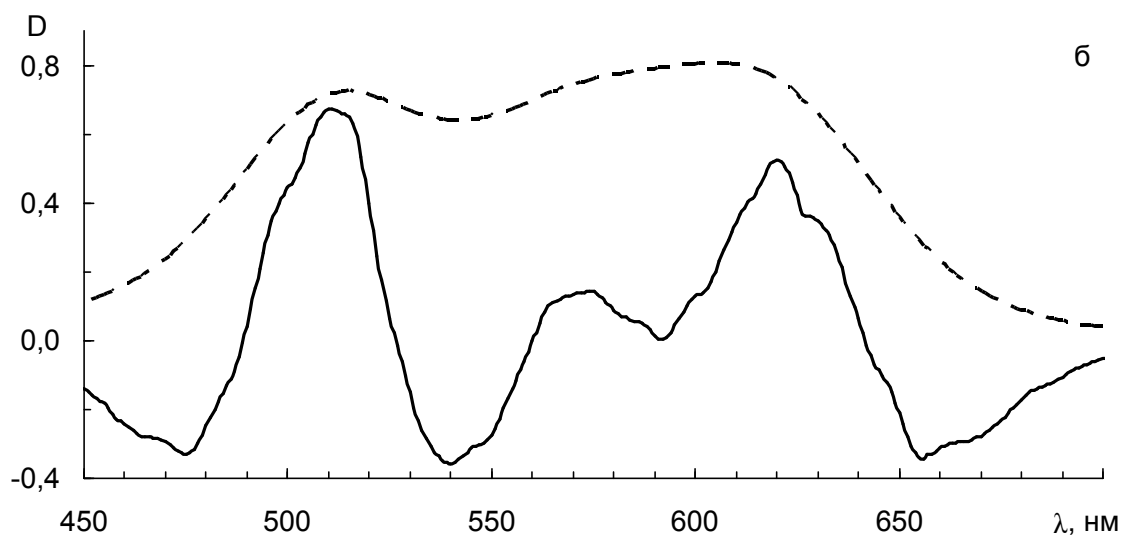
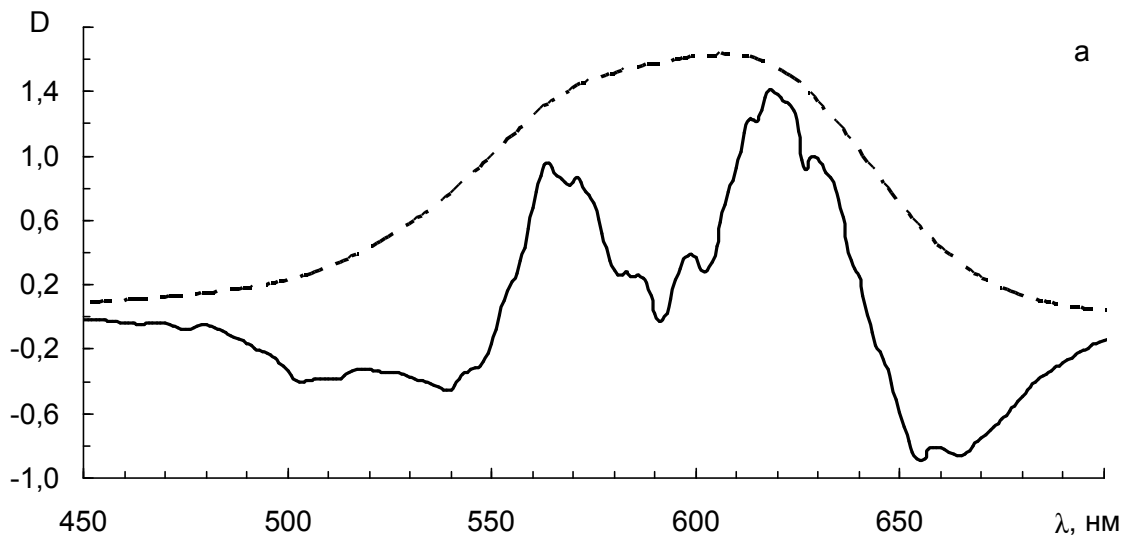


Рис. 5. Звичайні (- - -) і диференційовані (—) спектри систем із співвідношенням КМЦ:ВВ41, рівним 0,0 (а); 0,5 (б); 2,0 (в).

Зазначимо, що поняття оптичної густини (D) у диференційованих спектрах не застосовується, так як диференційований спектр є побудовою значень другої або більш високого порядку похідної від початкового спектру відносно довжини хвилі. Тому назвемо висоту максимуму у диференційованому спектрі сигналом (S).

Визначення висоти максимуму являє собою певне окреме завдання. Якщо у звичайному спектрі оптична густина – це висота максимуму від нуля, то у диференційованих спектрах вона визначається від нижніх точок кривої, яка являє собою максимум. Таких точок є дві, зліва і справа, і їх численні значення часто відрізняються. У випадку з сигналом S ($\lambda_1 = 517$ нм) простіше, бо можна отримати значення з обох нижніх точок і взяти їх середнє арифметичне. Натомість із сигналами S ($\lambda_2 = 575$ нм) та S ($\lambda_3 = 620$ нм) нижня точка, яка знаходиться між ними, не може бути використана, так як знаходиться явно зависоко, вочевидь, внаслідок накладання максимумів. Тут можна було би піти далі і застосувати більш високе розділення за допомогою похідних вищих парних порядків – четвертого, шостого тощо, так як вони, на відміну від похідних непарних порядків, мають вигляд, подібний до недиференційованого спектру. Похідні непарних порядків не є придатними для аналізу спектрів. Практика показала, що «шумність» спектру все ж дається взяти, і диференціювання, починаючи з похідної четвертого порядку, утворює спектр, який складається практично із «шумів». Тому, значення сигналу S ($\lambda_2 = 575$ нм) визначалось за лівою нижньою точкою, а сигналу S ($\lambda_3 = 620$ нм) – за правою.

Залежності значень сигналів S при довжинах хвиль 517, 575 і 620 нм від співвідношення КМЦ:ВВ41 приведені на рис. 6. Апроксимаційні поліноми мають вигляд:

$$\bullet \text{ для } S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}): y = 9 \cdot 10^{-6} x^3 - 0,0007x^2 + 0,0031x - 7E-05, R^2 = 0,9968 \text{ (крива 1);} \quad (14)$$

$$\bullet \text{ для } S(\lambda_2 = 575 \text{ нм}): y = -7 \cdot 10^{-5} x^5 + 0,0007x^4 - 0,0024x^3 + 0,0041x^2 - 0,003x + 0,0014, R^2 = 0,9839 \text{ (крива 2);} \quad (15)$$

$$\bullet \text{ для } S(\lambda_3 = 620 \text{ нм}): y = -3 \cdot 10^{-5} x^5 + 0,0004x^4 - 0,0017x^3 + 0,0035x^2 - 0,0038x + 0,0023, R^2 = 0,9959 \text{ (крива 3),} \quad (16)$$

де $y \equiv S(\lambda_i)$, $x \equiv \text{КМЦ:ВВ41}$.

Закономірності загалом такі, як й на рис. 2, але є певні відмінності. Принциповою відмінністю є те, що сигнал S ($\lambda_1 = 517$ нм) зростає лінійно до значення співвідношення (КМЦ:ВВ41)=1,5 і спадає в діапазоні, коли згадане співвідношення є більшим, ніж 2,5. Ймовірно, тут має місце описане в літературі явище, коли, при збільшенні кількості полімеру, молекули барвника розподіляються вздовж його ланцюгів, а локальне зростання концентрації стає меншим і комплекс частково руйнується.

На рис. 7 зображено залежності співвідношень сигналів $S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ та $S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ (аналогічно до співвідношень оптичних густин) від співвідношення КМЦ:ВВ41. Апроксимаційні поліноми мають вигляд:

$$\bullet \text{ для } S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : S(\lambda_2 = 575 \text{ нм}): y = 0,09x^3 - 1,3778x^2 + 5,5252x - 0,3946, R^2 = 0,9918 \text{ (крива 1);} \quad (17)$$

$$\bullet \text{ для } S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : S(\lambda_3 = 620 \text{ нм}): y = -0,8374x^3 + 3,3837x^2 + 0,4249x + 0,0299, R^2 = 0,987 \text{ (крива 2),} \quad (18)$$

де $y \equiv S(\lambda_i) : S(\lambda_j)$, $x \equiv \text{КМЦ:ВВ41}$.

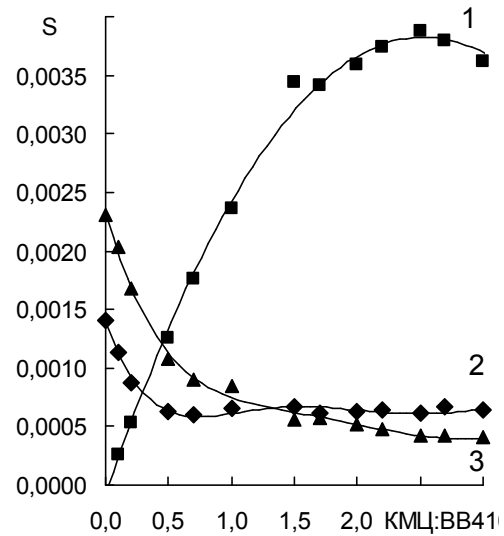


Рис. 6. Залежність значення сигналу S від співвідношення КМЦ:ВВ41 для довжин хвиль 517 (1), 575 (2) і 620 (3) нм.

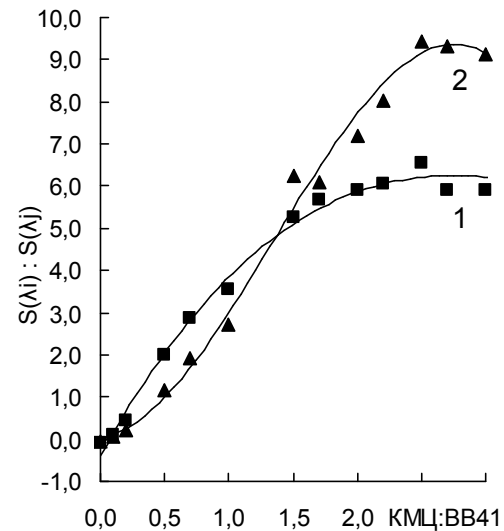


Рис. 7. Залежність співвідношення сигналів $S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ (1) та $S(\lambda_1 = 517 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

З точки зору застосування цих даних з аналітичною метою, диференціювання спектрів не є зручним. Як видно із рис. 6 і 7, протяжність лінійних ділянок кривих $S(\lambda_i) = f(\text{КМЦ:ВВ41})$ та $[S(\lambda_i) : S(\lambda_j)] = \psi(\text{КМЦ:ВВ41})$ не є радикально більшою від протяжності лінійних ділянок у схожих графіках, побудованих на основі звичайних спектрів. Більше того, співвідношення $D(\lambda_2 = 575 \text{ нм}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ нм})$ та $D(\lambda_3 = 620 \text{ нм}) : D(\lambda_2 = 575 \text{ нм})$ є навіть зручнішими. Натомість, диференціювання дає цінну інформацію щодо положення максимумів.

Таким чином, можна зробити висновки щодо застосування барвника ВВ41 з аналітичною

метою. З того, що КМЦ не є сильноокислим полімером, а також з літературних даних, витікає, що барвник BB41 можна застосовувати для аналізу КМЦ та інших поліаніонів. У такому разі вигідно застосувати запис спектрів один раз і дослідити їх за допомогою диференціювання, що дає вихідну інформацію про кількість максимумів та їх положення. Надалі можна застосовувати простіші прилади, тобто отримувати значення оптичної густини лише для кількох довжин хвиль і, залежно від ситуації, використовувати або безпосередньо оптичну густину, або співвідношення оптичних густин.

Висновки

1. Виникнення нового максимуму під час взаємодії КМЦ з барвником BB41 можна пояснити утворенням тримерів і вищих агрегатів барвника, так як димери вже присутні в розчині, що підтверджено наявністю максимуму $D(\lambda_2 = 575 \text{ nm})$. Утворенню тримерів сприяє збільшення локальної концентрації барвника в околі полімерного ланцюга КМЦ або всередині статистичних клубків.

2. Ймовірно, агрегація барвника, часткова компенсація зарядів з аніонними групами КМЦ, чи якісь інші взаємодії викликають зміни у спектрі системи КМЦ-BB41. На користь утворення агрегатів говорить наступне: найпротяжнішою лінійною ділянкою характеризується залежність не оптичної густини від кількості КМЦ і не співвідношення максимумів барвника і його комплексу з КМЦ, а залежність співвідношення максимумів самого барвника (коефіцієнт апроксимації R^2 дорівнює 0,98-0,99).

3. Залежність співвідношення $D(\lambda_2 = 575 \text{ nm}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ nm})$ від співвідношення

КМЦ:BB41 є лінійною майже на всій числовій вісі довжин хвиль, при чому на цій кривій не спостерігається насичення, яке було присутнє на інших залежностях.

4. Співвідношення $D(\lambda_2 = 575 \text{ nm}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ nm})$ зростає в міру збільшення співвідношення КМЦ:BB41, при цьому, при малому останньому, перше співвідношення було меншим від одиниці, а потім зростає і перевищує одиницю. Тобто, при малому співвідношенні КМЦ:BB41, ймовірно, було більше мономера, тому максимум при 620 nm був вищим від максимуму при 575 nm, $[D(\lambda_2 = 575 \text{ nm}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ nm})] < 1$, а в міру зростання співвідношення КМЦ:BB41 димерів стало більше, ніж мономерів.

5. При перевищенні співвідношенням КМЦ:BB41 певного значення, максимум при 517 nm припиняє зростати, а максимуми при 575 і 620 nm знижуються значно повільніше в ділянці співвідношення КМЦ:BB41 від 2 до 3, ніж в ділянці співвідношення КМЦ:BB41 від 0 до 1. Якщо припустити, що комплекс КМЦ з барвником є, фактично, тримером барвника, то виходить, що при перевищенні кількості КМЦ певного значення відносно кількості барвника, кількість тримерів зростає дуже повільно, а кількість мономерів зменшується швидше на користь димерів і тримерів, відповідно співвідношення димер : мономер $D(\lambda_2 = 575 \text{ nm}) : D(\lambda_3 = 620 \text{ nm})$ зростатиме, хоча абсолютні значення поглинання змінюються малопомітно. У міру подальшого зростання кількості КМЦ спостерігається явище зворотнього метахромізму: молекули барвника будуть розподілятися між молекулами полімеру, локальна концентрація барвника падатиме, внаслідок чого будуть утворюватись його мономери, поглинання на 517 nm падатиме.

Література

1. **Miguel G. Neumann, Marcio J. Tiera**, The Use of Basic Dyes as Photochemical Probes // *Química Nova*, 16 (4), 1993, 280-287.
2. **Lerman L.S.** // *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 18.
3. **Lerman L.** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1963, 49, 94.
4. **Vitagliano V., Constantino L.** // *J. Phys. Chem.*, 1970, 74, 197.
5. **Vitagliano V., Constantino L., Zagar A.** // *J. Phys. Chem.*, 1973, 77, 204.
6. **Bradley D.F., Falsenfeld G.** // *Nature*, 1959, 184, 1920.
7. **Constantino L., Liquori A.M., Vitagliano V.** // *Biopolymers*, 1964, 2, 1.
8. **Vitagliano V.** // *Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry*, E. Wyn Jones (Ed.), D. Riedel, Dordrecht, 1975, 437-466.
9. **Barone G., Crescenzi V., Quadrifoglio F., Vitagliano V.** // *Ric. Sci.*, 1966, 36, 503.
10. **Gurr E., Anaud N., Unni M.K., Aynagar N.R.**, Applications of Synthetic Dyes to Biological Problems // *The Chemistry of Synthetic Dyes*, K. Venkataraman (Ed.), Vol. VII, Academic Press, New York, 1974, 277-351.
11. **Hugo W.B., Russel A.D.** // *Pharmaceutical Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977, 5.
12. **Kawamoto F.** // *Lancet*, 1991, 337, 200.
13. **Bustamante C.** // *Ann. Rev. Biophys., Biophys. Chem.*, 1991, 20, 415.

14. **Rosenkrans H.S., Bendich A.** // Biophys. Biochim. Cytol., 1958, 4, 663.
15. **Paoletti C., Le Pecq J.-B.** // Methods Enzymol., 1971, 21-D, 255.
16. **Guttman A., Cooke N.**, Anal. Chem., 1991, 63, 2028.
17. **Lynch R.M., Fogarty K.E., Fay F.S.** // J. Cell. Biol., 1991, 112, 385.
18. **Ratinaud M.H., Leprat P., Julien R.** // Cytometry, 1988, 9, 206.
19. **L. Kass, G.L. Harrison, C. Lindheimer** // Biotech. Histochem. 77 (2002) 201.
20. **L. Kass** // Histotechnology 11 (1988) 10.
21. <http://www.gaussian.com>.
22. **A. D. Becke** "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior". Phys. Rev. A 38: 3098–3100. doi:10.1103 // PhysRevA.38.3098.
23. **Chengteh Lee, Weitao Yang, Robert G. Parr.** "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". Phys. Rev. B 37: 785. doi:10.1103/PhysRevB.37.785.
24. **Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cancès, E.** The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM Volume: 464, Issue: 1-3, May 18, 1999, pp. 211-226
25. **A. Savitzky, Marcel J.E. Golay,** Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures // Analytical Chemistry 1964, 36, 1627–1639.
26. www.originlab.com.
27. **John W. Moore, Ralph G. Pearson, Arthur Atwater Frost,** "Kinetics and Mechanism". Contributor John W. Moore, Ralph G. Pearson. Edition: 3, illustrated, revised // John Wiley and Sons, 1981, ISBN 0471035580, 9780471035589

Шийчук А.О. – магістрант катедри теоретичної та прикладної хемії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Сіренко Г.О. – доктор технічних наук, професор, завідувач катедри теоретичної та прикладної хемії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Рецензент

Мідак Л.Я. – кандидат хімічних наук, доцент катедри теоретичної та прикладної хемії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.