ФІЗИКА І ХІМІЯ ТВЕРДОГО ТІЛА
Т. 11, № 1 (2010) С. 185-194

PHYSICS AND CHEMISTRY OF SOLID STATE
V. 11, № 1 (2010) P. 185-194

УДК 541.65

ISSN 1729-4428

А.О. Шийчук, Г.О. Сіренко

Спектральні зміни барвників катйонний синій 41 та метиленовий синій під час їх взаємодії із карбоксиметилцелюлозою

Прикарапатський Національний університет імені Василя Стефаника,
вул. Шевченка, 57, м. Івано-Франківськ, 76000, Україна

За допомогою спектрофотометричного методу аналізу та застосуванням математичної обробки спектрів досліджено взаємодію барвників катйонний синій 41 та метиленовий синій із карбоксиметилцелюлозою. Виявлено суттєві зміни в спектрах систем згаданих речовин порівняно із спектрами чистих барвників. Показано можливість застосування даного явища із аналітичною метою.

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

Стаття поступила до редакції 22.08.2009; прийнята до друку 15.12.2009.

Вступ

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

Взаємодія катйонних барвників з полійонами відбивається на спектрах поглинання. Такий ефект пояснюють утворенням аґреґатів барвника внаслідок його підвищеної локальної концентрації, оскільки подібне явище (метахромізм) спостерігається також в концентрованих водних розчинах барвника. Присутність молекул полійону в розчині веде до скупчення молекул барвника біля полімерних молекул, яке спричиняє взаємодію їх молекулярних орбіталей і, відповідно – зміну енергетичних характеристик електронних переходів. Явище спостерігається вже при концентраціях барвника, менших від 10^{-5} М, хоча для чистого розчину барвника в тих же концентраціях метахромізм не проявляється. Підвищена схильність катйонних барвників до метахромізму під час взаємодії з полійонами пояснюється зменшенням електростатичного відштовхування між молекулами барвника внаслідок частинної нейтралізації з протийонами, носіями яких є полімер, внаслідок чого молекули барвника опиняються в умовах, сприятливих для π-електронних взаємодій [3].

Для більшости катйонних барвників у присутности поліанйонів максимум в спектрі поглинання зсувається в ділянку коротших хвиль, у той же час поглинання на характерних для чистого барвника довжинах хвиль спадає. Нові смуги поглинання відносять до димерів, тримерів і вищих аґреґатів, 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 опиняється на значній відстані одна від одної. На основі цього ефекту був розроблений спектроскопічний метод визначення кількости анйонних 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 кількости анйонних місць в ДНК [6,7], поліакриловій [8] і поліметакриловій [9] кислотах.

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

Катйонні барвники на сучасну пору застосовуються у різних галузях біології. Забарвлення мікроорґанізмів, у поєднанні з

флюоресцентною мікроскопією, утворює потужний метод для дослідження будови клітин і тканин, а також для діагностики таких хвороб як сухоти (tuberculosis), обкладниця (diphteria), болотна пропасниця (malaria) та ін [12].

Нуклеїнові кислоти мають сильний кислотний характер завдяки фосфатним складовим (pK ~ 2), в той час як білки є менш кислотними (pK ~ 5) завдяки карбоксильним ґрупам. 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), метиленовий синій (Methylene Blue) тощо 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 конфіґурації 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]. Барвники етидіум бромід (Ethidium Bromide) і пропідіум йодид (Propidium Iodide) можуть бути використані для ідентифікації різних ДНК [15], а також для виявлення ДНК в гелях [16]. Акридиновий оранжевий (Acridine Orange) [17] і родамінові барвники (Rhodamines) [18] використовуються для дослідження орґанел клітин.

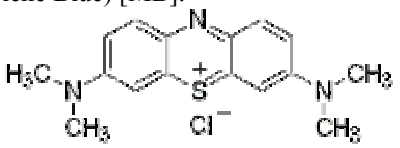
Барвник катйонний синій 41 використовується для фарбування акрилових, деяких поліамідних і поліестерових волокон, віскози, вати і вовни, а також у біології для забарвлення і подальшої ідентифікації пташиних лейкоцитів [19], клітин крові і клітин кісткового мозку [20].

Дана робота присвячена дослідженню взаємодій двох катйонних барвників – азобарвника катйонного синього 41 та тіазинового барвника метиленового синього – із поліанйонами карбоксиметилцелюлози.

I. Експериментальна частина

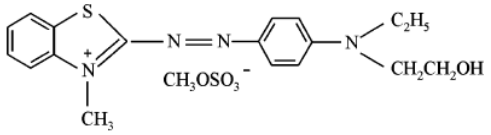
У якости об'єктів дослідження використані:

● тіазиновий барвник метиленовий синій (Methylene Blue) [MB]:



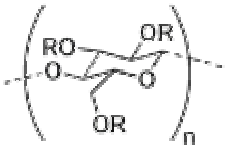
(1)

● азобарвник катйонний синій 41 (C.I. Basic Blue 41) [BB41]:



(2)

● карбоксиметилцелюлоза [КМЦ]:



(3)

Для дослідження взаємодії барвників із КМЦ готували серію розчинів у мірних колбах на 100 мл, у які піпеткою вносили 50 мл розчину барвника (остаточна концентрація BB41 в системі складала $5 \cdot 10^{-5}$ М, а концентрація МВ – $6 \cdot 10^{-5}$ М) і різні кількости розчину КМЦ ($4{,}5 \cdot 10^{-4}$ моль-мономера/л) з бюретки, приведені у табл. 1 і табл. 2 разом із відповідним їм співвідношеннями КМЦ:МВ і КМЦ:BB41 (молярна концентрація мономера КМЦ, що віднесена до молярної концентрації барвника). Після додавання необхідних кількостей реаґентів колби доводили до мітки дистильованою водою і витримували один день для досягнення рівноваґового стану.

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

Спектри поглинання досліджуваних розчинів записувались на спектрофотометрі Hitachi у координатах D = f (λ), 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-Ґолая [25] за тринадцятьма точками і згладжуванні-диференціюванні (похідна другого порядку) за тринадцятьма точками, проводилась за допомогою проґрами Origin 5 [26].

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

$$y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + \ldots + b_ix^i + \ldots + b_kx^k. \qquad (4)$$

Адекватність рівняння доводили:

● за коефіцієнтом апроксимації:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{ад}}{SS_{від}}, (0 \le R^2 \le 1), \qquad (5)$$

де $SS_{ад}$ – сума в дисперсії адекватности:

$$S^2_{ад} = \frac{SS_{ад}}{f_{ад}} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y}_i)^2}{n-m}, \qquad (6)$$

де $f_{ад} = (n - m)$ – число ступенів вільности при розрахунку дисперсії адекватности; m – число коефіцієнтів, включаючи b_0, рівняння, що перевіряється на адекватність; n – число експериментальних точок; $\bar{y}_i$ – значення y_i, розраховане за рівнянням (4) для і-точки; y_i – експериментальні дані в і-точці; $SS_{від}$ – сума в дисперсії відновлення:

$$S^2_{від} = \frac{SS_{від}}{f_{від}} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}{n-1}, \qquad (7)$$

де □ – середнє арифметичне значення n результатів;
$f_{від} = (n – 1)$ число ступенів вільности при розрахунку дисперсії відновлення;

● за кореляційним співвідношенням:

$$R = \sqrt{1 - \frac{S^2_{ад}}{S^2_{від}}}, (0 \le R \le 1). \quad (8)$$

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

$$y = b_0 + b_1 x \quad (9)$$

При $n \ge 5$ точок, адекватність (9) перевіряли за коефіцієнтом кореляції ($0 \le |r_{x,y}| \le 1$), його значущість визначали за z-функцією перетворення Фішера.

II. Результати і обговорення

1. Взаємодія КМЦ та МВ

Спектри системи КМЦ-МВ подані на рис. 1. По

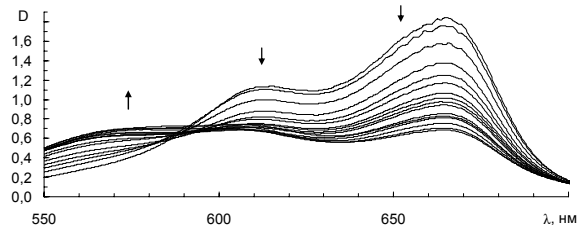


Рис. 1. Спектри системи КМЦ-МВ.

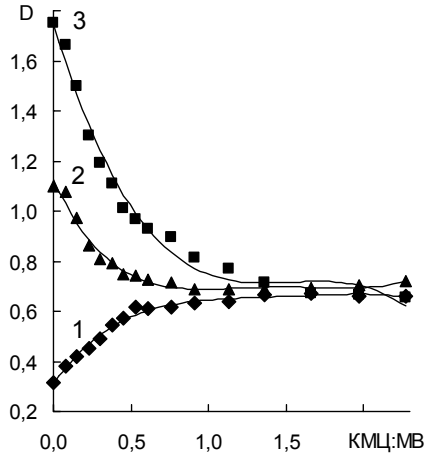


Рис. 2. Залежність оптичної густини при довжинах хвиль 565 (1), 608 (2) і 670 (3) нм від мольного співвідношення мономера КМЦ та МВ.

осі абсцис відкладено довжину хвилі в нанометрах, а по осі ординат відкладено оптичну густину системи на даній довжині хвилі. Стрілками вказано напрямок зміни максимумів поглинання в міру зростання співвідношення мольних часток мономера КМЦ та барвника метиленового синього (табл. 1).

Максимум при 565 нм повністю відсутній у спектрі чистого барвника і зростає в міру збільшення кількости КМЦ. З цього можна зробити висновок про утворення нової речовини, так як такий максимум відсутній у спектрі чистого розчину КМЦ, який є безбарвним. За [3-5] робимо висновок про утворення деякого комплексу, в який входять КМЦ і МВ.

Спектри характеризуються ізосбестичною точкою* [27]. Тобто, всі вони проходять через доволі вузький окіл певної точки в ділянці 590 нм. Такий характер спектрів свідчить, що барвник, який поглинає при довжинах хвиль 670 і 608 нм, та його комплекс із КМЦ, який поглинає при 565 нм, перебувають у динамічній рівновазі і її положення залежить від кількости КМЦ.

Щоб отримати більше інформації з даних спектрів, було побудовано залежности поглинання при довжинах хвиль 565, 608 та 670 нм від співвідношення КМЦ:МВ, подані на рис. 2. Апроксимаційні поліноми для кривих 1-3 (рис. 2) мають вигляд:

● для D (λ_{11} = 565 нм): $y = -0{,}0663x^4 + 0{,}3954x^3 - 0{,}8775x^2 + 0{,}8831x + 0{,}3103$ $R^2 = 0{,}9868$ (лінія 1); (10)

● для D (λ_{12} = 608 нм): $y = 0{,}1261x^4 - 0{,}7281x^3 + 1{,}5224x^2 - 1{,}3568x + 1{,}1251$ $R^2 = 0{,}9819$ (лінія 2); (11)

● для D (λ_{13} = 670 нм): $y = -0{,}2946x^3 + 1{,}36x^2 - 2{,}0658x + 1{,}7478$, $R^2 = 0{,}9859$ (лінія 3), (12)

де $y \equiv D(\lambda_{1i})$, $x \equiv$ КМЦ:МВ.

Як ми бачимо із рис. 2, поглинання при довжинах хвиль 670 і 608 нм майже лінійно спадає, а поглинання при 565 нм майже лінійно зростає до певної точки, яка відповідає співвідношенню (КМЦ:МВ) = 0,53. При подальшому зростанні співвідношення КМЦ:МВ поглинання для довжин хвиль 608 і 670 нм також змінюється досить лінійно, але з помітно іншим кутовим коефіцієнтом, тобто в залежностях має місце насичення. За [4-5] робимо припущення про те, що весь барвник витрачається на комплексоутворення і наступне додавання КМЦ майже не призводить до збільшення кількости комплексу.

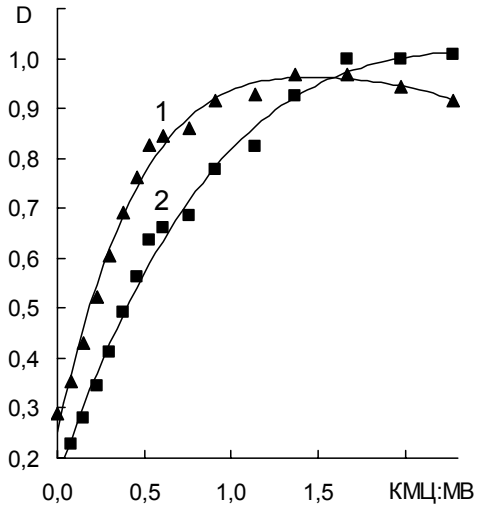


Рис. 3. Залежність співвідношення значень оптичних густин D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{12} = 608 нм) (1) та D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{13} = 670 нм) (2).

Із спектрів системи можна отримати ще декілька кількісних показників. Як виявилось, співвідношення оптичних густин при різних довжинах хвиль також

Таблиця 1

Склад досліджуваних розчинів для системи КМЦ-МВ і відповідне їм співвідношення компонентів

Об'єм розчину КМЦ, мл	Співвідношення КМЦ:МВ
0	0
1	0,076
2	0,152
3	0,227
4	0,303
5	0,379
6	0,455
7	0,530
8	0,606
10	0,758
12	0,909
15	1,136
18	1,364
22	1,667
26	1,970
30	2,273

Таблиця 2

Склад досліджуваних розчинів для системи 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

залежать від кількости КМЦ в системі. Наприклад, можна розділити значення оптичної густини при довжині хвилі 565 нм на значення оптичних густин при довжинах хвиль 608 та 670 нм. Залежності цих співвідношень від співвідношення КМЦ:МВ подано на рис. 3. Апроксимаційні поліноми для кривих 1, 2 (рис. 3) мають вигляд:

● для [D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{12} = 608 нм)]: $y = -0{,}071x^4 + 0{,}4864x^3 - 1{,}3008x^2 + 1{,}5686x + 0{,}2531$, $R^2 = 0{,}9907$ (лінія 1); (13)

● для [D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{13} = 670 нм)]: $y = 0{,}0558x^3 - 0{,}405x^2 + 1{,}0077x + 0{,}1601$, $R^2 = 0{,}9927$ (лінія 2), (14)

де $y \equiv D(\lambda_{1i}) : D(\lambda_{1j})$, $x \equiv$ КМЦ:МВ.

Як бачимо з рис. 3, залежности згаданих вище часток від кількости КМЦ майже не відрізняються від залежности оптичної густини системи при довжині хвилі 565 нм. На перший погляд відрізняється хіба що кутовий коефіцієнт, але кут зламу графіка десь такий же, як і в згаданій залежности D (λ_{11} = 565 нм) від співвідношення КМЦ:МВ. З цього витікає висновок про недоцільність використання співвідношень D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{12} = 608 нм) та D (λ_{11} = 565 нм) : D (λ_{13} = 670 нм).

Дещо цікавіша картинка спостерігається, якщо побудувати залежности часток D (λ_{13} = 670 нм) : D (λ_{12} = 608 нм) та D (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм) від співвідношення КМЦ:МВ, які подані на рис. 4.

Апроксимаційні поліноми для кривих 1, 2 (рис. 4) мають вигляд:

● для [D (λ_{13} = 670 нм) : D (λ_{12} = 608 нм)]: $y = -0{,}3186x + 1{,}5315$, $R^2 = 0{,}9444$ (лінія 1); (15)

● для [D (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм)]: $y = 0{,}2228x + 0{,}6311$, $R^2 = 0{,}9873$ (лінія 2), (16)

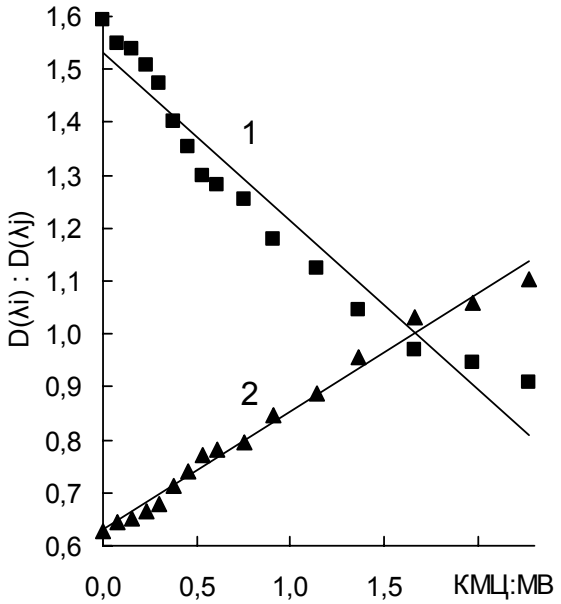


Рис. 4. Залежність співвідношення значень оптичних густин D (λ_{13} = 670 нм) : D (λ_{12} = 608 нм) (1) та D (λ_{12} = 608 нм): D (λ_{13} = 670 нм) (2).

де $y \equiv D(\lambda_{1i}) : D(\lambda_{1j})$, $x \equiv$ КМЦ:МВ.

Лінійна ділянка в таких графіках триває в межах співвідношення КМЦ:МВ від 0 до 1,65, тобто є помітно протяжнішою від лінійних ділянок всіх попередніх графіків, де вона тривала в межах співвідношення КМЦ:МВ від 0 до 0,53.

Наявність лінійних ділянок у згаданих вище графіках означає, що є низка параметрів, які лінійно

змінюються від співвідношення КМЦ:МВ, тобто від кількости КМЦ. Така властивість даної системи означає, що є можливість застосування описаного явища для кількісного визначення КМЦ методом калібрувального графіка.

Для такої задачі дуже перспективним виявляються застосування співвідношеннь власних максимумів поглинання барвника, D (λ_{13} = 670 нм) : D (λ_{12} = 608 нм) та D (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм), так як лінійна ділянка у їх залежностях від співвідношення КМЦ:МВ є найпротяжнішою (рис. 4).

У випадку застосування даного явища для кількісного аналізу КМЦ необов'язково застосовувати запис повного спектру. Проведені дослідження дали чіткі результати щодо положення максимумів, а отже можна просто міряти поглинання на трьох, двох, або і на одній довжині хвилі (565, 608, 670 нм). Таке спрощення не повинно відбиватись на результатах, натомість дозволяє використовувати простішу і, відповідно, більш доступну апаратуру, як наприклад, «Spekol-11», який дозволяє отримувати значення оптичної густини з точністю до третього знака після коми.

2. Взаємодія КМЦ та ВВ41

За [10-17] на сьогодні у дослідженнях найбільш часто використовують тіазинові барвники (до яких належить також барвник метиленовий синій). Натомість барвник катйонний синій 41 є представником іншого класу, а саме – азобарвником. Як показали результати квантово-механічного моделювання, на відміну від багатьох барвників, структура катйонного синього 41 не є плоскою. В розведених розчинах даний барвник поглинає у ділянці 550-650 нм і має синє забарвлення, тоді як концентровані розчини ВВ41 мають синьо-фіолетове забарвлення. Концентраційні зміни забарсвлення наводять на думку, що цей барвник може змінювати колір також при взаємодії з поліанйонами.

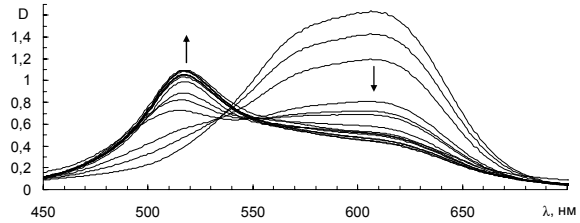


Рис. 5. Спектри поглинання системи ВВ41-КМЦ.

Спектр чистого барвника, а також спектри системи КМЦ-ВВ41 (співвідношення компонентів згідно табл. 2) подані на рис. 5. Стрілками вказано напрямок зміни максимумів у міру зростання співвідношення КМЦ:ВВ41, тобто із збільшенням кількости 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. 5, 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.

У спектрах системи КМЦ-ВВ41 є ізосбестична точка (isosbestic point) та насичення в залежностях D (λ_{2i}) = φ (КМЦ:ВВ41) при довжинах хвиль 517, 575 і 620 нм від кількости 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.5) були побудовані залежности оптичних густин від співвідношення КМЦ:ВВ41 для довжин хвиль 517, 575 та 620 нм (рис. 6). На рис. 6 апроксимаційні поліноми для кривих 1-3 мають вигляд:

● для D (λ_{21} = 517 нм): $y = 0{,}0333x^3 - 0{,}2728x^2 + 0{,}7391x + 0{,}4076$, $R^2 = 0{,}9926$ (крива 1); (17)

● для D (λ_{22} = 575 нм): $y = 0{,}0665x^4 - 0{,}5473x^3 + 1{,}5906x^2 - 1{,}9596x + 1{,}461$, $R^2 = 0{,}9902$ (крива 2); (18)

● для D (λ_{23} = 620 нм): $y = 0{,}0689x^4 - 0{,}566x^3 + 1{,}657x^2 - 2{,}117x + 1{,}5244$, $R^2 = 0{,}9930$ (крива 3), (19)

де y ≡ D (λ_{2i}), x ≡ КМЦ:ВВ41.

Як видно з рис. 6, 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

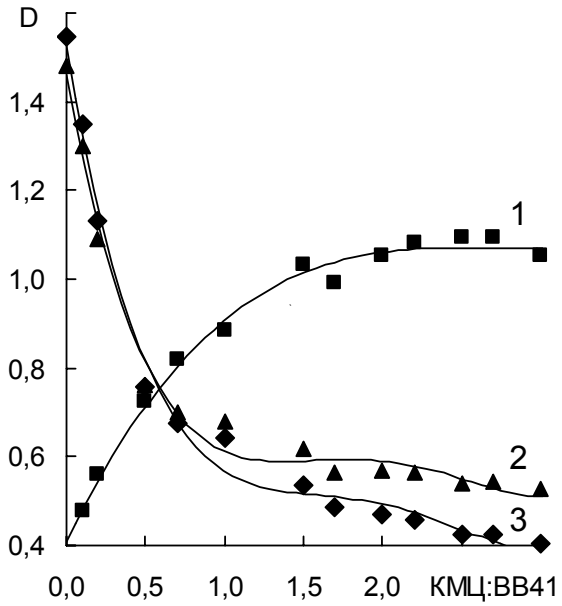


Рис. 6. Залежність оптичної густини D від співвідношення КМЦ:ВВ41 за довжинами хвиль 517 (1), 575 (2) і 620 (3) нм.

на певне насичення.

Для отримання додаткових даних за результатами спектральної аналізи побудовано залежності співвідношень оптичних густин на певних довжинах хвиль від необхідного кількісного параметру. На рис. 7 зображені графіки залежності часток D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) та D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) від співвідношення КМЦ:ВВ41. На рис. 7 апроксимаційні поліноми для

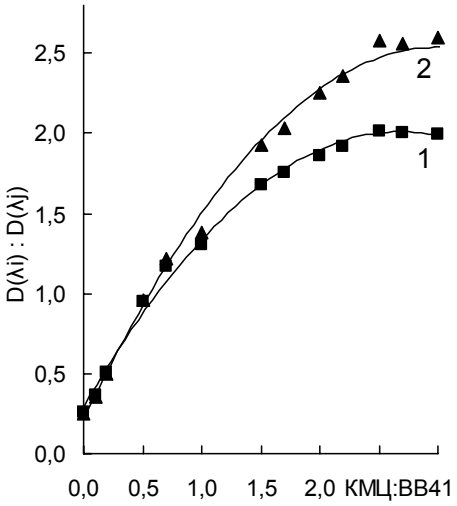


Рис. 7. Залежність співвідношення значень оптичних густин максимумів: D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) (1) та D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

кривих 1, 2 мають вигляд:

● для D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{22} = 575 нм): $y = -0{,}2389x^2 + 1{,}2826x + 0{,}2895$, $R^2 = 0{,}9952$ (крива 1); (20)

● для D (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{23} = 620 нм): $y = -0{,}2586x^2 + 1{,}5523x + 0{,}2089$, $R^2 = 0{,}9927$ (крива 2), (21)

де $y \equiv D(\lambda_{2i}) : D(\lambda_{2j})$, $x \equiv$ КМЦ:ВВ41.

Як і в залежностях значень оптичних густин максимумів від кількости КМЦ (рис. 6), 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 залежности 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 залежности оптичної густини відносно співвідношення КМЦ:ВВ41.

На рис. 8 зображені залежности співвідношень D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) та D (λ_{23} = 620 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) від співвідношення КМЦ:ВВ41. Ці залежності є лінійними майже у всьому діапазоні співвідношення КМЦ:ВВ41. Коефіцієнт апроксимації R^2 для даних кривих складає 0,98-0,99. Це якісно відрізняє їх від всіх попередніх залежностей.

На рис. 8 апроксимаційні поліноми для кривих 1, 2 мають вигляд:

● для D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм): $y = 0{,}1211x + 0{,}9528$, $R^2 = 0{,}9895$ (крива 1); (22)

● для D (λ_{23} = 620 нм) : D (λ_{22} = 575 нм): $y = -0{,}096x + 1{,}0376$, $R^2 = 0{,}9783$ (крива 2), (23)

де $y \equiv D(\lambda_{2i}) : D(\lambda_{2j})$, $x \equiv$ 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 (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 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 більш широкими межами співвідношень КМЦ:ВВ41, у яких можливо застосувати такий метод аналітичного визначення. У даному випадку співвідношення оптичних густин, в які входить D (λ_{21} = 517 нм) не розглядаються, так як в їхніх залежностях від кількости 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,

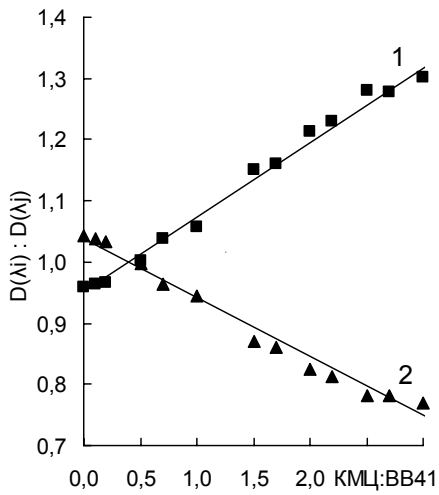


Рис. 8. Залежність співвідношення значень оптичних густин максимумів: D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) (1) та D (λ_{23} = 620 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

перш за все, необхідно визначити положення та кількости максимумів, для чого було застосовано метод диференціювання.

Всі математичні обробки виконувались у програмі Origin 5. Від спектрів були взяті другі похідні численими методами. Виявилось, що пряме диференціювання спектрів не є ефективним, оскільки замість бажаного диференційованого спектру утворюється спектр із

суцільних спектральних «шумів». Для зменшення шумів була здійснена багаторазова реєстрація спектрів, а саме – записано по 10 спектрів з кожного зразка (при цьому щоразу оновлювали розчин у кюветі), а потім з отриманих спектрів визначали середнє арифметичне оптичних густин при кожній довжині хвилі. Такий спосіб виявився теж недостатньо ефективним, і тому довелось застосувати ще й математичне вирівнювання спектрів. Із доступних у програмному пакті методів найкращим виявився метод Савіцького-Ґолая – в утвореному після вирівнювання спектрі висоти максимумів чітко збігались із висотами максимумів у вихідному спектрі, тоді як при застосуванні інших методів максимуми виявлялись значно нижчими. Після вирівнювання до спектрів застосовували процедуру згладжування-диференціювання за похідною другого порядку. У результаті отримано диференційовані спектри,

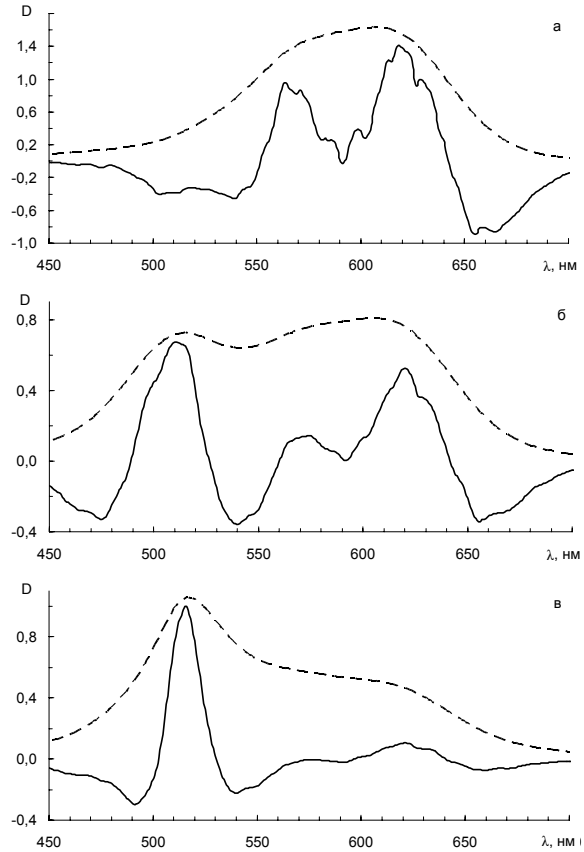


Рис. 9. Звичайні (- - -) і диференційовані (—) спектри систем із співвідношенням КМЦ:ВВ41, рівним 0,0 (а); 0,5 (б); 2,0 (в).

частина з яких представлена на рис. 9, де звичайні спектри показані рискованою лінією, а відповідні їм диференційовані – суцільною.

За диференційованими спектрами було визначено положення максимумів. Як видно з рис. 9, диференційовані спектри дозволяють визначити положення максимумів з високою точністю та надійністю.

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

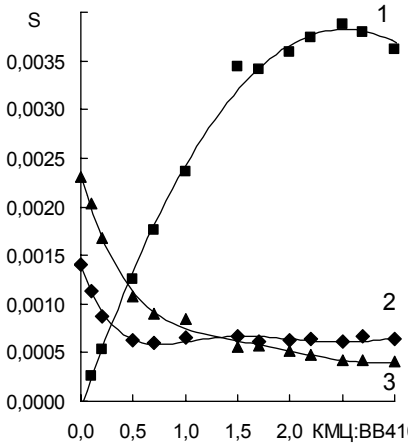


Рис. 10. Залежність значення сиґналу S від співвідношення КМЦ:ВВ41 для довжин хвиль 517 (1), 575 (2) і 620 (3) нм.

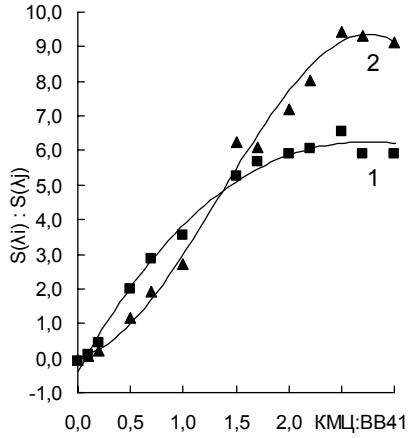


Рис. 11. Залежність співвідношення сиґналів S (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) (1) та S (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) (2) від співвідношення КМЦ:ВВ41.

відносно довжини хвилі. Тому назвемо висоту максимуму у диференційованому спектрі сиґналом (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 числені значення часто відрізняються. У випадку з сигналом S (λ21 = 517 нм) це завдання є порівняно простим, бо можна отримати значення з обох нижніх точок і взяти їх середнє арифметичне. Натомість із сигналами S (λ22 = 575 нм) та S (λ23 = 620 нм) завдання більш складне, адже нижня точка, яка знаходиться між ними, не може бути використана, оскільки вона знаходиться явно зависоко, вочевидь, внаслідок накладання максимумів. Тут можна було б 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 аналізи спектрів. Додаткове дослідження показало, що «шумність» спектру все ж дається взнаки – диференціювання, починаючи з похідної

четвертого порядку, утворює спектр, який складається практично із «шумів». Тому, значення сигналу S (λ_{22} = 575 нм) визначалось за лівою нижньою точкою, а сигналу S (λ_{23} = 620 нм) – за правою.

Залежности значень сигналів S при довжинах хвиль 517, 575 і 620 нм від співвідношення КМЦ:ВВ41 приведені на рис. 10. Апроксимаційні поліноми для кривих 1-3 мають вигляд:

● для S (λ_{21} = 517 нм): $y = 9\cdot10^{-6}x^3 - 0{,}0007x^2 + 0{,}0031x - 7\cdot10^{-5}$, $R^2 = 0{,}9968$ (крива 1); (24)

● для S (λ_{22} = 575 нм): $y = -7\cdot10^{-5}x^5 + 0{,}0007x^4 - 0{,}0024x^3 + 0{,}0041x^2 - 0{,}003x + 0{,}0014$, $R^2 = 0{,}9839$ (крива 2); (25)

● для S (λ_{23} = 620 нм): $y = -3\cdot10^{-5}x^5 + 0{,}0004x^4 - 0{,}0017x^3 + 0{,}0035x^2 - 0{,}0038x + 0{,}0023$, $R^2 = 0{,}9959$ (крива 3), (26)

де $y \equiv S(\lambda_{2i})$, $x \equiv$ КМЦ:ВВ41.

Закономірности загалом такі, як й на рис. 6, але є певні відмінности. Принциповою відмінністю є те, що сигнал S (λ_{21} = 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 кількости полімеру, молекули барвника розподіляються вздовж його ланцюгів, а локальне зростання концентрації стає меншим і комплекс частково руйнується.

На рис. 11 зображено залежности співвідношень сигналів S (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) та S (λ_{21} = 517 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) (аналогічно до співвідношень оптичних густин) від співвідношення КМЦ:ВВ41. Апроксимаційні поліноми для кривих 1, 2 (рис. 11) мають вигляд:

● для S (λ_{21} = 517 нм) : S (λ_{22} = 575 нм): $y = 0{,}09x^3 - 1{,}3778x^2 + 5{,}5252x - 0{,}3946$, $R^2 = 0{,}9918$ (крива 1); (27)

● для S (λ_{21} = 517 нм) : S (λ_{23} = 620 нм): $y = -0{,}8374x^3 + 3{,}3837x^2 + 0{,}4249x + 0{,}0299$, $R^2 = 0{,}987$ (крива 2), (28)

де $y \equiv S(\lambda_{2i}) : S(\lambda_{2j})$, $x \equiv$ КМЦ:ВВ41.

Таким чином, диференціювання спектрів не дає переваг для аналітичних вимірювань. Як видно із рис. 10 і 11, протяжність лінійних ділянок кривих S (λ_{2i}) = f (КМЦ:ВВ41) та [S (λ_{2i}) : S (λ_{2j})] = ψ (КМЦ:ВВ41) не є набагато більшою від протяжности лінійних ділянок у схожих графіках, побудованих на основі звичайних спектрів. Більше того, співвідношення D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) та D (λ_{23} = 620 нм) : D (λ_{22} = 575 нм) є навіть зручнішими. Разом з тим, диференціювання дає важливу інформацію щодо положення маскимумів у спектрі.

У підсумку можна відзначити, що барвник ВВ41 може бути застосуваний для аналізи КМЦ. Для кількісного визначення КМЦ достатньо реєструвати значення оптичної густини лише для кількох довжин хвиль і використовувати або їх безпосередні значення, або їх співвідношення.

Висновки

1. Барвники метиленовий синій та катіонний синій 41 та їх взаємодії із КМЦ виявили ряд схожих властивостей, таких як: наявність двох максимумів у спектрі чистого барвника, поява третього максимуму при коротших довжинах хвиль, а також подібний характер залежности оптичних густин та їх співвідношень від співвідношення КМЦ:барвник.

2. Виникнення нового максимуму під час взаємодії КМЦ із барвниками можна пояснити утворенням тримерів і вищих аґреґатів барвника, так як димери вже присутні в розчині, що підтверджено наявністю двох максимумів у спектрах розчинів чистих барвників МВ та ВВ41. Утворенню тримерів сприяє збільшення локальної концентрації барвника в околі полімерного ланцюга КМЦ або всередині статистичних клубків.

3. Ймовірно, зареєстровані зміни спектрів викликані частковою компенсацією заряду катйонів барвника анйонними групами КМЦ з наступною аґреґацією барвник. На користь утворення аґреґатів говорить наступне: найпротяжнішою лінійною ділянкою характеризується залежність не оптичної густини від кількости КМЦ і не співвідношення максимумів барвників і їх комплексів з КМЦ, а залежність співвідношення максимумів самого барвника (коефіцієнт апроксимації R^2 дорівнює 0,98-0,99).

4. Залежність співвідношеннь) (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм) та D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм від співвідношення КМЦ:барвник є лінійною майже на всій ділянці вивчених співвідношень КМЦ:барвник, при чому на цій кривій не спостерігається насичення, яке було присутнє на інших залежностях.

5. В міру збільшення співвідношення КМЦ:барвник співвідношення (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм) та D (λ_{22} = 575 нм) : D (λ_{23} = 620 нм) також зростають і, за певних умов, перевищують одиницю. Інакше кажучи, при малому співвідношенні КМЦ:барвник, ймовірно, було більше мономера і тому максимуми при 670 (МВ) та 620 (ВВ41) нм були вищими від максимумів при 608 (МВ) та 575 (ВВ41) нм, а в міру зростання співвідношення КМЦ:барвник димерів стало більше, ніж мономерів.

6. При перевищенні певного значення співвідношенням КМЦ:барвник, максимуми при 565 нм (КМЦ:МВ) та при 517 нм (КМЦ:ВВ41) припиняють зростати, а максимуми при 608 і 670 нм (КМЦ:МВ) та максимуми при 575 і 620 нм (КМЦ:ВВ41) знижуються значно повільніше в ділянці співвідношення КМЦ:барвник від 2 до 3, ніж в ділянці співвідношення КМЦ:барвник від 0 до 1. Якщо припустити, що комплекс КМЦ з барвником є, фактично, тримером барвника, то виходить, що при перевищенні кількістю КМЦ певного значення відносно кількости барвника, кількість тримерів зростає дуже повільно, а кількість мономерів зменшується швидше на користь димерів і тримерів, відповідно співвідношення димер : мономер зростатиме, хоча абсолютні значення поглинання змінюються малопомітно. У міру подальшого зростання кількости КМЦ спостерігається явище зворотнього метахромізму: молекули барвника розподіляються між молекулами полімеру і локальна концентрація барвника зменшується.

З точки зору застосування з аналітичною метою

отримані дані не ілюструють однозначної переваги котрогось із барвників. З одного боку, максимуми поглинання чистого метиленового синього краще розділені і його спектр не потребує математичної обробки. Тобто, метиленовий синій краще підходить для визначення за співвідношенням оптичних густин D (λ_{12} = 608 нм) : D (λ_{13} = 670 нм). Натомість новий максимум поглинання, який відповідає комплексу із КМЦ, є більш інтенсивним для системи КМЦ:ВВ41. Тобто, катіонний синій 41 краще підходить для визначення за оптичною густиною D (λ_{21} = 517 нм). На вибір застосування того чи іншого барвника впливають також сторонні речовини, pH середовища тощо.

*Ізосбестична точка (isosbestic point) – у спектроскопії так називають певну довжину хвилі, при якій дві хімічні речовини мають однакову молярну адсорбцію [27].

Шийчук А.О. – студент V курсу
Сіренко Г.О. – завідувач кафедри теоретичної та прикладної хемії, доктор технічних наук, професор.

[1] M.G. Neumann, M.J. Tiera. The Use of Basic Dyes as Photochemical Probes // *Química Nova*, **16** (4), pp. 280-287 (1993).
[2] L.S. Lerman. // *J. Mol. Biol.*, **18** (3), (1961).
[3] L.S. Lerman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (49), (1963).
[4] V. Vitagliano, L. Constantino. // *J. Phys. Chem.*, **197** (74), (1970).
[5] V. Vitagliano, L. Constantino, Zagar A. // *J. Phys. Chem.*, **204** (77), (1973).
[6] D.F. Bradley, G. Falsenfeld. // *Nature*, **1920** (184), (1959).
[7] L. Constantino, A.M. Liquori, V. Vitagliano. // *Biopolymers*, **1** (2), (1964).
[8] V. Vitagliano. *Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry.* E. Wyn Jones (Ed.), D. Riedel, Dordrecht, cc. 437-466, (1975).
[9] G. Barone, V. Crescenzi, F. Quadrifoglio, V. Vitagliano. // *Ric. Sci.*, **503** (36), (1966).
[10] E. Gurr, N. Anaud, M.K. Unni, N.R. Ayynagar. Applications of Synthetic Dyes to Biological Problems, *The Chemistry of Synthetic Dyes*, K. Venkataraman (Ed.), Academic Press, New York, Vol. VII, pp. 277-351 (1974).
[11] W.B. Hugo, A.D. Russel. // *Pharmaceutical Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 5, (1977).
[12] F. Kawamoto. // *Lancet*, **200** (337), (1991).
[13] C. Bustamante // *Ann. Rev. Biophys., Biophys. Chem.*, **415** (20), (1991).
[14] H.S. Rosenkrans, A. Bendich. // *Biophys. Biochim. Cytol.*, **663** (4), (1958).
[15] C. Paoletti, J.-B. Le Pecq. // *Methods Enzymol.*, **255** (21-D), (1971).
[16] A. Guttman, N. Cooke. // *Anal. Chem.*, **63** (2028), (1991).
[17] R.M. Lynch, K.E. Fogarty, F.S. Fay. // *J. Cell. Biol.*, **385** (112), (1991).
[18] M.H. Ratinaud, P. Leprat, R. Julien. // *Cytometry*, **206** (9), (1988).
[19] L. Kass, G.L. Harrison, C. Lindheimer. // *Biotech. Histochem.*, **201** (77), (2002).
[20] L. Kass. // *Histotechnology*, **10** (11), (1988).
[21] www.gaussian.com.
[22] A.D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior // *Phys. Rev.*, 3098 (A38).
[23] Ch. Lee, W. Yang, R.G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density // *Phys. Rev.*, 785 (B37).
[24] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès. 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*, 464 (1-3), pp. 211-226 (1999).
[25] A. Savitzky, M.J.E. Golay. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures // *Analytical Chemistry*, 36, pp. 1627-1639 (1964).
[26] www.originlab.com.
[27] J.W. Moore, R.G. Pearson, A.A. Frost. *Kinetics and Mechanism*, Contributor John W. Moore, Ralph G. Pearson. Edition: 3, illustrated, revised // John Wiley and Sons, ISBN 0471035580, 9780471035589 (1981).

A. Shyichuk, H. Sirenko

Alternations in Spectra of the Methylene Blue and Basic Blue 41 Dyes due to Interactions between the Dyes and Carboxymethyl Cellulose

"Vasyl Stefanyk" Pre-Carpathian National University,
57, Shevchenko Str., Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine

Interactions between the Methylene Blue and Basic Blue 41 cationic dyes and carboxymethyl cellulose have been studied using spectrophotometry accompanied by the mathematical refinement of the spectra obtained. Noticeable changes in spectra of the dyes have been found depending on concentration of carboxymethyl cellulose. A possible uses of the registered phenomena for analytical purposes have been discussed.

Key words: Methylene Blue, Basic Blue 41, carboxymethyl cellulose, spectral changes, intermolecular complexes, cationic dyes, differentiation.