

УДК 541.65

А.О. Шийчук, Г.О. Сіренко

### Спектральні зміни катйонного барвника метиленовий синій під час взаємодії із карбоксиметилцелюлозою

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

За допомогою спектрофотометричних методів аналізу досліджено взаємодію барвника метиленовий синій і карбоксиметилцелюлози. Виявлено суттєві зміни в спектрі системи цих речовин, порівняно із спектром чистого барвника. Виявлено можливість застосування даного явища із аналітичною метою.

**Ключові слова:** метиленовий синій, карбоксиметилцелюлоза, спектральні зміни, міжмолекулярні комплекси, катйонні барвники.

A.O. Shyichuk, H.O. Sirenko

### Alternations in Spectra of Cationic Dye Methylene Blue Due to Interactions between the Dye and Carboxymethyl Cellulose

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

Interractions between cationic dye Methylene Blue and carboxymethyl cellulose have been studied via spectrophotometry. Relating to the spectra of pure dye noticeable changes in spectras of Methylene Blue-carboxymethyl cellulose system have been found. A possibility of analytical use of the phenomenon has been found.

**Key words:** Methylene Blue, carboxymethyl cellulose, Spectral Changes, intermolecular complexes, cationic dyes.

*Стаття поступила до редакції 15.09.2009; прийнята до друку 19.10.2009.*

#### Вступ

Взаємодії між барвниками і полійонами досліджують вже досить тривалий час, особливо завдяки зацікавленості барвникової промисловости до цього явища. Такі взаємодії також важливі для біологічних досліджень. Важливість таких досліджень виникає з тієї причини, що біополімери, наприклад, білки або ДНК, є полійонами, а їх взаємодії з барвниками та іншими малорозмірними молекулами є близькими до таких взаємодій синтетичних полійонів [1, 2].

Головною характеристикою взаємодій катйонних барвників з полійонами є зміни в спектрі поглинання (явище метахромізму). Такий ефект пояснюють [1–18] утворенням агрегатів

барвника внаслідок підвищеної локальної концентрації останнього, що також спостерігається в концентрованих водних розчинах. Присутність молекул полійону в розчині призводить до скупчення молекул барвника біля полімерних молекул, що й призводить до метахромізму. Це явище спостерігається вже при концентраціях барвника, менших від  $10^{-5}$  М, хоча в тих же умовах метахромізм не спостерігається для чистого розчину барвника. Схильність барвника до метахромізму в присутності полійонів пояснюється також зменшенням електростатичного відштовхування між молекулами барвника внаслідок частинної нейтралізації їх протійонами. Носіями цих протійонів є полімер,

який, окрім електростатичного ефекту, впорядковувальною дією полімерного ланцюга, внаслідок чого молекули барвника опиняються в умовах, сприятливих для  $\pi$ -електронних взаємодій [3].

Для більшості катйонних барвників у присутності поліаніонів максимум у спектрі поглинання зсувається в бік коротких хвиль, у той же час як поглинання, на характерних для чистого барвника довжинах хвиль, спадає. Нові смуги в спектрах таких систем відносять до димерів, тримерів і вищих агрегатів, які утворюються при зростанні локальної концентрації барвника. З іншого боку, при перевищенні певного вмісту полімеру максимум в спектрі переміщується знову в довгохвильову ділянку спектра. Іноді такий комплекс може поглинати в ділянці хвиль, до 10 нм довших відносно максимуму у «чистому» водному розчині барвника. Такий ефект пояснюється розподіленням молекул барвника вздовж надлишкових ланцюгів полімеру, внаслідок чого ці молекули опиняється далеко одна від одної. На основі цього ефекту був розроблений спектроскопічний метод визначення кількості аніонних місць в 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 припадає на кінець XIX ст., коли катйонні та аніонні барвники (метиленовий синій (Methylene Blue), метиловий зелений (Methyl Green), еозин (Eosine)), були застосовані для ідентифікації різних ділянок у тканинах тваринних організмів [10].

Метод (тест) Грама, запропонований в 1884 році дацьким лікарем Х.К. Грамом (H.Ch. Gram) – метод диференціального фарбування певних бактерій. За Грама методом бактерії фарбують основними барвниками – генціановим або метиленовим фіолетовим та іншими, потім фарбник фіксують розчином йоду. При подальшому промиванні фарбованого препарату спиртом, одні бактерії виявляються міцно фарбовані (грампозитивні), а інші – незабарвлені (грамнегативні) [11].

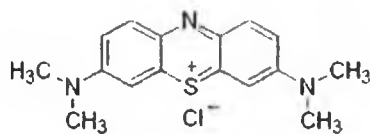
Катйонні барвники на сьогодні застосовуються у різних галузях біології. Метод забарвлення мікроорганізмів у поєднанні з флюоресцентною мікроскопією утворює потужний метод для дослідження будови клітин і тканин, а також для діагностики таких хвороб, як сухоти, обкладниця, болотна пропасниця та ін. [12].

Нуклеїнові кислоти мають сильний кислотний характер завдяки фосфатним складовим ( $pK \sim 2$ ), в той час як білки є менш кислотними ( $pK \sim 5$ )

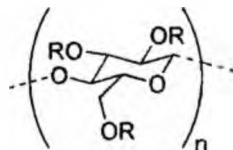
завдяки карбоксильним групам. Таким чином, у межах  $pH$  2-5 тільки нуклеїнові кислоти будуть йонізуватися і поводитися як полійони. Тому, катйонні барвники, наприклад, профлавін (Proflavine), акридиновий оранжевий (Acridine Orange), і метиленовий синій (Methylene Blue), часто застосовують для забарвлення нуклеїнових кислот 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 видів 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.

Мета роботи полягала у дослідженні взаємодій популярного катйонного барвника метиленовий синій (Methylene Blue, MB):



та карбоксиметилцелюлози (КМЦ), яка є поліаніоном:



## I. Експериментальна частина

Для вивчення взаємодії барвника метиленовий синій із КМЦ готували серію досліджуваних розчинів в мірних колбах на 100 мл, в які піпеткою вносили 50 мл  $6 \cdot 10^{-5}$  М розчину барвника і різні кількості розчину КМЦ ( $4,5 \cdot 10^{-4}$  моль-мономер/л) з бюретки. У таблиці наведені кількості розчину КМЦ і відповідні їм співвідношення КМЦ/МВ (молярна концентрація мономера КМЦ, віднесена до молярної концентрації МВ). Після додавання необхідних кількостей реагентів колби доводили до мітки дистильованою водою і витримували один день для повного встановлення рівновагового стану.

Спектри поглинання досліджуваних розчинів записувались на спектрофотометрі Hitachi в кварцевій кюветі товщиною 1,00 см, діапазон довжин хвиль 200-800 нм, крок за довжинами хвиль становив 1 нм.

Таблиця  
Склад досліджуваних розчинів і відповідне їм  
співвідношення компонентів

Розчин КМЦ, мл	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

## II. Результати та обговорення

Спектри розчинів, описаних в експериментальній частині, приведені на рис. 1. По осі абсцис відкладено довжину хвилі  $\lambda$  в нанометрах, а по осі ординат – оптичну густину  $D$  системи для певної довжини хвилі. Стрілками вказано напрямок зміни максимумів поглинання в міру зростання співвідношення мольних часток мономера КМЦ та барвника метиленового синього.

Як видно з рис. 1, максимум  $D$  при 565 нм повністю відсутній у спектрі чистого барвника і зростає в міру збільшення кількості КМЦ. З цього можна зробити висновок про утворення

нової речовини, так як такий максимум відсутній у спектрі чистого розчину КМЦ, який є безбарвним. З літературних даних та результатів досліджень витікає висновок про утворення комплексу, в який входять КМЦ і МВ.

Спектри характеризуються ізобестичною точкою. Тобто, всі спектри відбивають доволі вузький окіл певної точки в ділянці 590 нм. Такий характер спектрів наводить на думку, що барвник (максимуми 670 і 608 нм) та його комплекс із КМЦ (565 нм) перебувають у динамічній рівновазі, положення якої залежить від кількості КМЦ.

Щоб отримати більше інформації з даних спектрів, було побудовано залежності поглинання при довжинах хвиль 670, 608 та 565 нм від співвідношення КМЦ/МВ. Ця побудова подана на рис. 2.

Як видно з рис. 2, поглинання на довжинах хвиль 670 і 608 нм майже рівномірно спадає, а поглинання на 565 нм майже рівномірно зростає до певної точки, яка відповідає співвідношенню КМЦ/МВ 0,53. При подальшому зростанні співвідношення КМЦ/МВ поглинання при цих довжинах хвиль також рівномірно змінюється, але з помітно іншим кутовим коефіцієнтом. Тобто можна говорити про певне насичення. За літературними даними можна висловити припущення про те, що весь барвник витрачається на комплексоутворення і наступне додавання КМЦ майже не призводить до збільшення кількості комплексу.

Із спектрів системи можна отримати ще декілька кількісних характеристик. Як виявилось, співвідношення оптичних густин на різних довжинах хвиль також залежать від кількості КМЦ в системі. Наприклад, можна розділити значення оптичної густини за довжиною хвилі 565 нм на значення оптичних густин за довжиною хвиль 608 та 670 нм. Графіки залежностей цих часток від співвідношення КМЦ/МВ приведені на рис. 3.

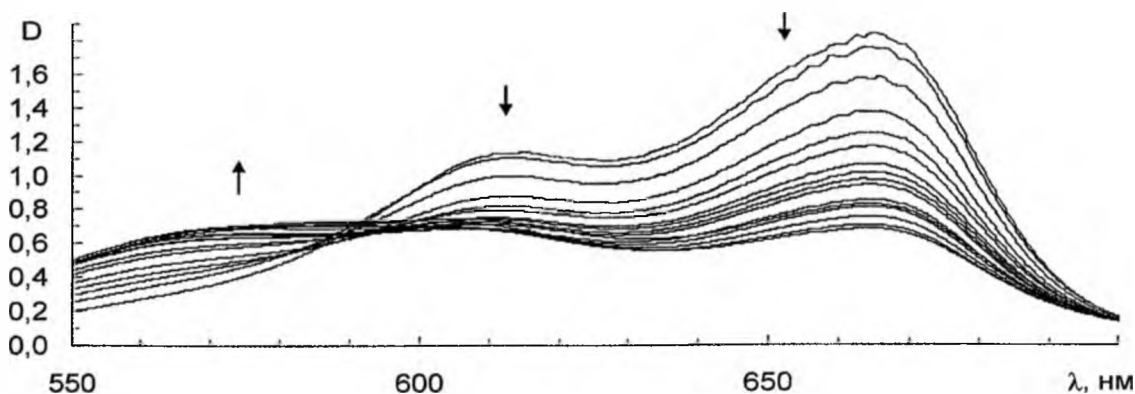


Рис. 1. Спектри системи КМЦ-МВ.

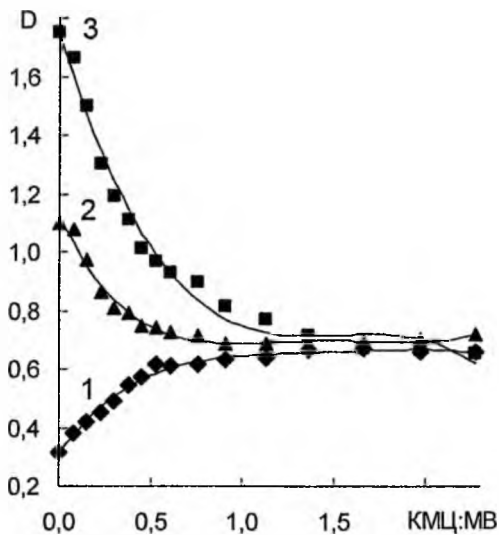


Рис. 2. Залежність оптичної густини при довжинах хвиль 565 (1), 608 (2) і 670 (3) нм від мольного співвідношення мономера КМЦ та МВ.

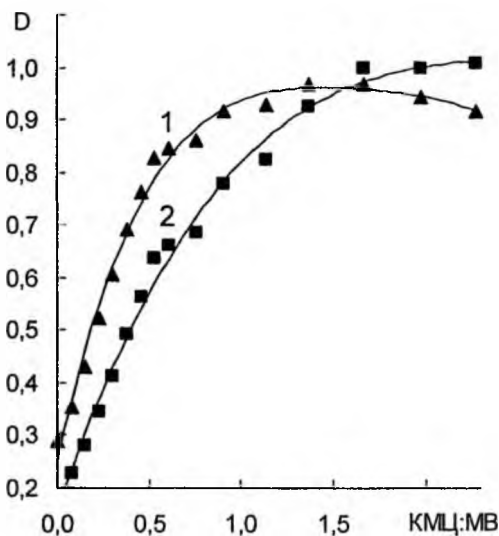


Рис. 3. Залежність співвідношення значень оптичних густин  $D(\lambda_{11} = 565 \text{ нм}) : D(\lambda_{12} = 608 \text{ нм})$  (1) та  $D(\lambda_{11} = 565 \text{ нм}) : D(\lambda_{13} = 670 \text{ нм})$  (2).

Як видно з рис. 3, залежності згаданих вище часток від кількості КМЦ майже не відрізняються від залежності оптичної густини системи за довжиною хвилі 565 нм. На перший погляд, відрізняється хіба що кутовий коефіцієнт, але кут зламу графіка десь такий же, як і в згаданій залежності  $D_{565}$ -КМЦ/МВ. На цій підставі можна зробити висновок про недоцільність використання співвідношень  $D_{565}/D_{608}$  і  $D_{565}/D_{670}$ .

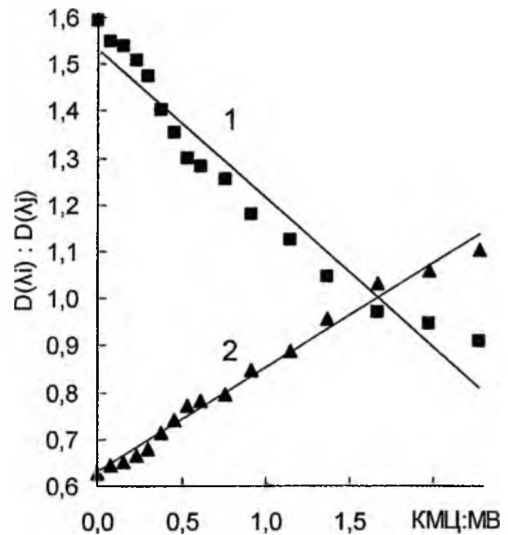


Рис. 4. Залежність співвідношення значень оптичних густин  $D(\lambda_{13} = 670 \text{ нм}) : D(\lambda_{12} = 608 \text{ нм})$  (1) та  $D(\lambda_{12} = 608 \text{ нм}) : D(\lambda_{13} = 670 \text{ нм})$  (2).

Дещо інша картина спостерігається, якщо побудувати графіки часток  $D_{670}/D_{608}$  і  $D_{608}/D_{670}$  від співвідношення КМЦ/МВ, які приведені на рис. 4.

Лінійна ділянка в таких залежностях триває для КМЦ/МВ від 0 до 1,65, тобто, є помітно ширшою від лінійних ділянок всіх попередніх залежностей, де вона була в межах КМЦ/МВ від 0 до 0,53.

Наявність лінійних ділянок у згаданих вище залежностях означає, що є низка характеристик, які лінійно змінюються від співвідношення КМЦ/МВ, тобто, від кількості КМЦ. Така властивість даної системи означає, що є можливість застосування описаного явища для кількісного визначення КМЦ методом калібрувального графіка.

Для такого завдання дуже перспективним виявляються застосування співвідношення власних максимумів барвника,  $D_{670}/D_{608}$  і  $D_{608}/D_{670}$ , так як лінійна ділянка у їх залежності від КМЦ/МВ є найширшою (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 вимірювати поглинання на трьох, двох, або і на одній довжині хвилі (565, 608, 670 нм). Таке спрощення не повинно відбитися на результатах і, натомість, дозволяє використовувати простішу, дешевшу і, відповідно, доступнішу апаратуру як, наприклад, «Спекол-11», який дозволяє отримувати значення оптичної густини з точністю до третього знака після коми.

## Висновки

1. За результатами спектрофотометричного дослідження взаємодії барвника метиленовий синій з карбоксиметилцелюлозою виявлено, що має місце зміна кольору системи (метахромізм).

2. Спираючись на літературні дані та результати досліджень, пояснено метахромізм барвника метиленового синього в присутності карбоксиметилцелюлози утворенням деякого

міжмолекулярного комплексу.

3. Знайдено додаткові аргументи на користь поширеної в літературі гіпотези про спричинення метахромізму агрегацією молекул барвника.

4. Встановлені умови, за якими зміни в спектрах є лінійними функціями концентрації КМЦ, що дозволяє застосувати дане явище для кількісного аналізу останньої, а також інших аніонних полімерів.

## 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.

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

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

### Рецензент

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