

На правах рукописи

Мясникова Дина Андреевна

**ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА
И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
ПЛЕНOK {ЦЕЛЛЮЛОЗА–ИОННАЯ ЖИДКОСТЬ}**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
(МГУ имени М.В. Ломоносова).

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Шеховцова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Бабкина Софья Сауловна,
Московский государственный машинострои-
тельный университет
доктор фармацевтических наук, доцент
Эпштейн Наталья Борисовна,
Обнинский институт атомной энергетики
Национального исследовательского ядерного
университета МИФИ

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государ-
ственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (СГУ).

Защита состоится 26 марта 2015 г. в 11 ч. 00 мин. на заседании диссертационного со-
вета Д 002.109.01 по аналитической химии и радиохимии при Федеральном государ-
ственном бюджетном учреждении науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции
Институте геохимии и аналитической химии им. В.И.Вернадского Российской
академии наук (ГЕОХИ РАН); 119991, ГСП-1, Москва, ул. Косыгина, д.19.

Диссертация и автореферат размещены на сайте Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции
Института геохимии и аналитической химии им. В.И.Вернадского Российской акаде-
мии наук (ГЕОХИ РАН) (<http://intranet.geokhi.ru/>) и на сайте ВАК (<http://vak.ed.gov.ru>).
Автореферат разослан 20 февраля 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Захарченко Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одной из очевидных тенденций современной аналитической химии является миниатюризация, автоматизация и упрощение анализа, его ориентированность на «внелабораторные условия». Химические сенсоры, тест-системы, портативные устройства являются удобными средствами такого анализа. Потребность в расширении круга определяемых соединений и объектов анализа обуславливает динамичное развитие сенсорных технологий с привлечением новых индикаторных систем, а также последних достижений в области материаловедения и микроэлектроники. В отличие от электрохимических сенсоров химические оптически прозрачные чувствительные элементы одинаково удобны как для инструментальной, так и визуальной индикации аналитического сигнала. С применением ионных жидкостей (ИЖ) в сенсорных технологиях в качестве растворителей, специальных добавок к полимерным матрицам-носителям и их модификаторов, а также одновременно пластификаторов и распознающих агентов предложены новые оптические материалы. Среди них особое место занимают материалы на основе природных полимеров, в частности целлюлозы. Некоторые гидрофильные ИЖ растворяют целлюлозу, способную в результате регенерации принимать различные тестовые формы: пленки, губки, шарики, гранулы и др. Целлюлоза является гидрофильным, биосовместимым, биodeградируемым, нетоксичным и недорогим полисахаридом. Перечисленные свойства делают ее привлекательным материалом для иммобилизации различных распознающих аналитических агентов, в том числе биокатализаторов.

К настоящему времени показана возможность применения пленок {целлюлоза–гидрофильная ИЖ} для иммобилизации некоторых ферментов класса гидролаз и оксидаз; продемонстрированы перспективы использования пленок, полученных методом осаждения-растворения целлюлозы в галогенидных ИЖ и модифицированных органическими реагентами, для определения ионов токсичных тяжелых и переходных металлов, неорганических газов. Однако примеры использования пленок {целлюлоза–ИЖ} для определения органических соединений в литературе отсутствуют. Настоящая работа направлена на получение новых пленок {целлюлоза–ИЖ} и усовершенствование предложенных ранее, а также на изучение их аналитических возможностей в качестве чувствительных и селективных элементов оптических химических сенсоров для определения органических соединений, в частности природного эндопероксида артемизинина (АМ), обладающего антималярийной активностью; некоторых синтетических и природных пищевых красителей. *Актуальность* определения перечисленных соединений обусловлена их высокой биологической активностью, а также потребностью контроля их содержания в фармацевтических препаратах, биологически активных добавках (БАД), биологических жидкостях; продуктах текстильного, фармацевтического и пищевого производств соответственно.

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту С.В. Мугиновой за участие в постановке задач и обсуждении результатов исследований.

Цель работы – создание на основе микрокристаллической целлюлозы путем ее растворения и регенерации в двух гидрофильных ИЖ оптически прозрачных целлюлозных пленок с нековалентно иммобилизованными аналитическими реагентами для определения биологически активных органических соединений различной природы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить растворимость целлюлозы и выбранных аналитических реагентов в ИЖ (ацетате и хлориде 1-бутил-3-метилимидазолия, $[BMIm][AcO]$ и $[BMIm][Cl]$), а также влияние ИЖ на каталитические и оптические свойства растворяемых веществ (ферментов, синтетических красителей, флуоресцирующих комплексов);
- установить состав целлюлозных пленок, приготовленных с использованием каждой ИЖ; выяснить условия получения пленок с требуемыми физико-механическими, оптическими и каталитическими свойствами, а также условия получения и измерения аналитического сигнала пленок визуальным и спектроскопическим методами;
- изучить и сравнить физико-механические, оптические, функциональные и сорбционные свойства полученных целлюлозных пленок; исследовать морфологию их поверхностей; выявить наиболее перспективные целлюлозные материалы для определения органических соединений на примере билирубина и артемизинина;
- предложить флуоресцентные индикаторные системы для определения артемизинина, апробировать их в растворе и в составе целлюлозных пленок, а также в анализе реальных объектов.

Научная новизна. Получен и охарактеризован новый целлюлозный материал в виде целлюлозной пленки, приготовленной с использованием $[BMIm][AcO]$, который по прочности, эластичности, устойчивости к влиянию водных растворов различной кислотности, действию полярных органических растворителей, способности к сорбции красителей превосходит известный из литературы прототип, полученный с помощью хлоридной ИЖ. Выявлено ингибирующее действие по неконкурентному механизму ацетатной ИЖ на каталитическую активность нативных пероксидаз хрена и сои в реакции окисления гваякола пероксидом водорода; установлено влияние $[BMIm][AcO]$ на оптические свойства индигокармина и пиронина Б.

На основе пленок {целлюлоза– $[BMIm][Cl]$ } созданы новые целлюлозные материалы с включенными в них растительными пероксидазами, сохраняющими свойства нативных биокатализаторов и стабильными при хранении при комнатной температуре. На примере комплексов европия(III) с тетрациклином показано, что целлюлозные пленки, приготовленные с использованием хлоридной ИЖ, служат удобной матрицей для иммобилизации флуоресцентных зондов, что открывает широкие возможности их дальнейшего применения для определения билирубина и других органических биологически активных соединений. Показана возможность измерения флуоресцентного аналитического сигнала непосредственно в целлюлозной пленке.

С использованием реакции окисления пиронина Б, катализируемой микропероксидазой-11 и комплексом {Mn(II)–додецилсульфат натрия} (известным из литературы миметиком пероксидазы), предложены новые индикаторные системы для чувствительного, селективного и экспрессного определения артемизинина в водных растворах и противомаларийных БАД. Показано, что пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с включенными в них пиронином Б и синтетическим катализатором {Mn(II)–додецилсульфат натрия} могут быть успешно применены в качестве чувствительного элемента флуоресцентного химического сенсора для определения артемизинина в противомаларийных БАД.

Практическая значимость. Получены, охарактеризованы и апробированы в различных индикаторных системах оптически прозрачные целлюлозные пленки, полученные с использованием [BMIm][AcO] и [BMIm][Cl], в отсутствие и в присутствии иммобилизованных в них аналитических реагентов. Показаны перспективы применения пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} в качестве сорбентов синтетических красителей (индигокармина и пиронина Б), а также природных пищевых красителей кармина, куркумина, β-каротина.

Пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с включенными в них растительными пероксидазами и нативные биокатализаторы каталитически активны в реакциях превращения одних и тех же субстратов; пленки сохраняют каталитическую активность на уровне не ниже 50% от их активности в день приготовления в течение 1 месяца; могут быть использованы повторно. Установленные закономерности растворения гемсодержащих белков в растворе {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, а также данные о механизме действия ацетатной ИЖ на их каталитическую активность позволяют на этапе иммобилизации целенаправленно выбирать биокатализатор.

Практическую значимость имеют разработанные флуориметрические методики чувствительного, селективного и экспрессного определения артемизинина по реакции его взаимодействия с пиронином Б в присутствии микропероксидазы-11 и комплекса {Mn(II)–додецилсульфат натрия}, позволяющие определять артемизинин в диапазонах его концентраций 0.1 – 7 и 0.2 – 8 мкМ соответственно. На основе индикаторной системы с пиронином Б и катализатором {Mn(II)–додецилсульфат натрия}, включенной в состав пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, разработана методика определения 0.25 – 8 мкМ артемизинина. Указанные методики успешно апробированы для определения артемизинина в противомаларийных БАД «BestArtemisinin» и «Artemisia annua intense».

Автор выносит на защиту:

- установленные условия приготовления пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} и {целлюлоза–[BMIm][Cl]} в отсутствие и присутствии нековалентно иммобилизованных реагентов, их состав и условия функционирования в изученных индикаторных системах с визуальной, спектрофотометрической и флуоресцентной индикацией аналитического сигнала;
- сравнительные данные о механической прочности, эластичности, оптической прозрачности пленок двух видов, а также их устойчивости к действию водных растворов различной кислотности (в отсутствие и присутствии буферных рас-

творов), а также полярных молекулярных органических растворителей (ацетонитрила, ДМСО, ДМФА);

- результаты изучения кинетики реакций окисления гваякола пероксидом водорода, катализируемых нативными пероксидазами хрена и сои, в присутствии различных содержаний $[VMIm][AcO]$; данные о механизме ингибирующего действия ацетатной ИЖ на каталитическую активность растительных пероксидаз; рекомендации по выбору гидрофильных ИЖ, в среде которых пероксидазы хрена и сои в наибольшей степени сохраняют свои каталитические свойства;
- данные о каталитической активности, субстратной специфичности и стабильности пероксидаз хрена и сои в составе пленок {целлюлоза- $[VMIm][Cl]$ } при их хранении;
- результаты сравнительного изучения сорбции анионного красителя индигокармина и катионного красителя пиронина Б пленками {целлюлоза- $[VMIm][Cl]$ } и {целлюлоза- $[VMIm][AcO]$ }, а также пленками {целлюлоза-ИЖ-ПАВ};
- новые индикаторные системы для определения артемизинина, основанные на уменьшении флуоресценции пиронина Б вследствие его окисления эндопероксидом в присутствии микропероксидазы-11 и комплекса {Mn(II)-додецилсульфат натрия}; кинетические характеристики каталитических индикаторных реакций; данные о механизме тушения флуоресценции пиронина Б артемизинином; методики определения артемизинина в модельных растворах и БАД;
- способ флуориметрического определения артемизинина с помощью индикаторной системы {пиронин Б-Mn(II)-додецилсульфат натрия}, включенной в состав пленки {целлюлоза- $[VMIm][Cl]$ }, а также результаты определения артемизинина в противомаларийных БАД с помощью предложенной целлюлозной пленки.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на 10 международных и всероссийских конференциях, симпозиумах, съездах и форумах, включающих 2nd Russian-Hellenic symposium with international participation and young scientist's school (Ираклион, Крит, Греция, 2011), 16th European conference on Analytical Chemistry «Challenges in modern analytical chemistry», «Euroanalysis-2011» (Белград, Сербия, 2011), 1-ую республиканскую научно-практическую конференцию с международным участием «Зеленая химия – в интересах устойчивого развития» (Самарканд, Узбекистан, 2012), 3rd Symposium on Enzymes & Biocatalysis-2012 (Сиань, Китай, 2012), Всероссийскую конференцию с международным участием по аналитической спектроскопии (Краснодар, Россия, 2012), конференции РХО им. Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» (Москва, Россия, 2012 и 2014), International conference «Biocatalysis 2013» (Москва, Россия, 2013), II-ой Съезд аналитиков России (Москва, Россия, 2013), международный междисциплинарный форум ученых и инженеров, специализирующихся в области сенсорных технологий «BioTech 2014. Chemical Sensors Forum» (Веденсвиль, Швейцария, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи и 10 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 2 глав обзора литературы, 1 главы экспериментальной части, 4 глав обсуждения результатов, выводов, приложений, списка литературы, включающего 250 источников. Работа изложена на 219 страницах машинописного текста, содержит 123 рисунка и 32 таблицы.

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

Обзор литературы включает 2 главы. В *первой главе* систематизированы и обсуждены различные аспекты использования ИЖ в составе оптических систем и сенсоров, в том числе биосенсоров. Приведены примеры сенсорных материалов, полученных с применением ИЖ, описаны методики их получения, дизайн, структура, принципы работы и условия функционирования. Обсуждены достоинства полученных с помощью ИЖ оптических сенсорных материалов, продемонстрированы их возможности в химическом анализе, намечены пути дальнейшего их усовершенствования и перспективы применения. Во *второй главе* представлен критический обзор известных колориметрических, спектрофотометрических и люминесцентных методик определения артемизинина и его полусинтетических производных в растительном сырье, фармацевтических препаратах, биологических жидкостях. Обсуждены достоинства и недостатки различных подходов к определению артемизинина и его производных спектроскопическими методами.

Экспериментальная часть работы содержит одну главу (3). В *третьей главе* перечислены исходные вещества, их характеристики, использованное оборудование; приведены методики приготовления растворов и целлюлозных пленок различного состава, методики проведения индикаторных реакций в растворе и в целлюлозных пленках, а также способы обработки результатов измерений.

Обсуждение результатов представлено в четырех главах (4 – 7). В *четвертой главе* обоснован выбор целлюлозы как носителя иммобилизованных аналитических реагентов и ИЖ как растворителя целлюлозы, а также индикаторных систем и определяемых соединений. В *пятой главе* описаны экспериментальные этапы приготовления целлюлозных пленок с использованием $[BMIm][AcO]$ и $[BMIm][Cl]$, приведены сравнительные данные об их физико-механических и оптических свойствах, а также устойчивости к действию водных растворов различной кислотности и полярных молекулярных органических растворителей. Приведены результаты изучения морфологии поверхности целлюлозных пленок двух видов. *Глава шесть* посвящена разработке методик иммобилизации в целлюлозные пленки растительных пероксидаз, синтетических красителей (индигокармина и пиронина Б), а также флуоресцентных зондов, комплексов $Eu(III)$ с дипиколиновой кислотой и тетрациклином. Обсуждены специфические экспериментальные особенности иммобилизации в пленки каждого из упомянутых реагентов; описаны характеристические свойства полученных целлюлозных материалов, установлены условия регистрации их сигнала визуальным и спектроскопическими методами в отсутствие и присутствии артемизинина. Приведены результаты кинетических исследований с участием растительных пероксидаз в присутствии ацетатной ИЖ, поясняющие причины потери в ней каталитической активности ферментов. Представлены данные о выявленной сорбционной способности пленок {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } по отношению к ин-

дигокармину и ряду природных пищевых красителей. В главе семь представлены результаты изучения катализируемой микропероксидазой-11 и комплексом {Mn(II)–додецилсульфат натрия} реакции окисления пиронина Б артемизинином. Они включают данные по выбору условий проведения индикаторной реакции с участием биологического и синтетического катализаторов, результаты расчета кинетических параметров каталитических реакций, данные о механизме тушения флуоресценции пиронина Б, а также аналитические характеристики разработанных методик определения артемизинина в модельных растворах и БАД. Отдельное внимание уделено вопросам подготовки проб БАД к анализу. Экспериментально обоснован выбор состава пленки, полученной с использованием [BMIm][Cl] с включенной в нее индикаторной системой {пиронин Б–Mn(II)–додецилсульфат натрия} и условий ее функционирования в присутствии артемизинина. Разработан способ флуориметрического определения артемизинина с использованием указанной пленки в модельных растворах и в БАД. Аналитические характеристики определения артемизинина с использованием целлюлозной пленки сопоставлены с таковыми, полученными с помощью разработанной нами методики в растворе и других известных из литературы спектроскопических методик.

В **Заключении** обобщены результаты сравнительного изучения физико-механических, оптических и функциональных свойств пленок, приготовленных методом растворения-осаждения целлюлозы в ацетатной и хлоридной ИЖ, в отсутствие и в присутствии включенных в них аналитических реагентов. Обсуждены результаты применения полученных целлюлозных материалов в реакциях с участием растительных пероксидаз для сорбции синтетических и природных красителей и определения артемизинина. Высказаны соображения о дальнейших путях усовершенствования предложенных пленочных материалов в качестве чувствительных элементов оптических химических сенсоров и перспективах их использования в химическом анализе для определения биологически активных органических соединений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве матрицы для иммобилизации аналитических реагентов выбрали микрокристаллическую целлюлозу, что связано с ее способностью к сорбции и более высокой по сравнению с необработанной целлюлозой реакционной способностью, благодаря чему ее можно легко модифицировать для достижения определенных функциональных свойств. Кроме того, препарат микрокристаллической целлюлозы коммерчески доступен, имеются литературные сведения о ее растворении в различных растворителях, в том числе ИЖ.

Применение ИЖ в качестве растворителя микрокристаллической целлюлозы (далее просто целлюлозы) позволяет придавать ей практически любую желаемую тестовую форму, что открывает возможность получения новых материалов для сенсорных технологий. В современной литературе наилучшими растворителями целлюлозы признаны гидрофильные хлоридные и ацетатные ИЖ на основе катиона имидазолия. Мы выбрали [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO], поскольку методики и причины растворения целлюлозы в этих ИЖ наиболее изучены, а их препараты дешевле других ИЖ не менее, чем в 3–7 раз. Пленки на основе целлюлозы, реге-

нерированной из ацетатной ИЖ, никто ранее не получал, лишь изучали процесс растворения в ней целлюлозы.

Для выяснения перспектив применения ИЖ в сенсорных биотехнологиях, в частности для разработки оптических химических сенсоров на основе растительных пероксидаз, выбрали коммерческие, высокоактивные и стабильные пероксидазы, выделенные из корней хрена (ПХ) и шелухи сои (ПС). Литературные сведения об иммобилизации растительных пероксидаз в целлюлозные пленки, приготовленные с помощью ИЖ, отсутствовали.

Для создания пленок с иммобилизованными красителями в качестве *модельного анионного красителя* выбрали *индигокармин*, который растворим в воде, интенсивно окрашен, обладает восстановительными свойствами и является субстратом ПХ и ПС. Индигокармин (рис. 1а) — наиболее распространенный синий краситель хлопка и шерстяных волокон вследствие его сродства к целлюлозным волокнам. В фармацевтической промышленности индигокармин применяют для придания товарного вида таблеткам и драже, в медицинской диагностике — для подкрашивания живых тканей и определения концентрации пероксидазы в крови. Индигокармин является канцерогеном, вызывает серьезные аллергические реакции, провоцирует проблемы с сердцем и приступы удушья, поэтому контроль содержания этого красителя в продуктах питания, лекарственных препаратах, косметических средствах чрезвычайно важен. Мы предполагали, что на основе целлюлозных пленок с иммобилизованными растительными пероксидазами нам удастся создать материалы для определения индигокармина в продукции кондитерских, фармацевтических и текстильных производств.

В качестве *модельного катионного красителя* использовали ксантеновый краситель *пиронин Б*, который так же, как индигокармин растворим в воде и интенсивно окрашен, но помимо этого обладает интенсивной флуоресценцией в водных и спиртовых растворах. Выбор пиронина Б (рис. 1б) обусловлен, прежде всего, тем, что явление тушения флуоресценции именно этого красителя было положено в основу ряда известных из литературы чувствительных методик определения АМ в сыворотке крови с использованием некоторых гемсодержащих биокатализаторов (Гб, ПХ, цитохрома *c*, тирозиназы). Из литературы известно, что синтетические аналоги оксидоредуктаз, например комплекс Mn(II) с анионным ПАВ додецилсульфатом натрия (ДС), катализирует реакцию окисления ПБ пероксидом водорода. По мере протекания реакции интенсивность флуоресценции красителя уменьшается пропорционально концентрации H_2O_2 . Поскольку АМ содержит пероксидный мостик в своей структуре (рис. 1в), можно было ожидать проявления подобного эффекта при замене H_2O_2 на АМ.

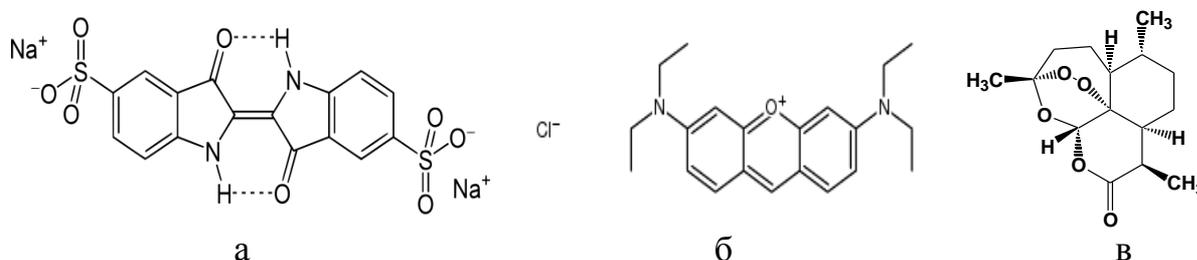


Рис. 1. Структурные формулы индигокармина (а), пиронина Б (б) и АМ (в).

Кроме ферментов и красителей в целлюлозные пленки можно импрегнировать комплексы лантаноидов (Eu^{3+} и Tb^{3+}) с органическими лигандами, например с дипиколиновой кислотой (ДПК). Практическая значимость пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} с иммобилизованными в них комплексами $\text{Eu}(\text{ДПК})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Tb}(\text{ДПК})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ продемонстрирована в литературе на примере селективного определения ионов $\text{Cu}(\text{II})$, основанного на эффекте тушения ими сенсibilизированной флуоресценции указанных хелатов лантаноидов. Целлюлозные пленки такого вида ранее не использовали для определения органических соединений.

Иммобилизация в целлюлозные пленки второго флуоресцентного зонда, комплекса {Eu(III)-ТЦ}, открывает возможности определения и артемизинина, и билирубина. Комплекс {Eu(III)-ТЦ} используют для определения низких концентраций H_2O_2 . Определение основано на увеличении интенсивности флуоресценции комплекса {Eu(III)-ТЦ} вследствие образования тройного комплекса {Eu(III)-ТЦ- H_2O_2 }. Следовало ожидать проявления подобного действия при замене пероксида водорода на АМ. Щелочной раствор билирубина, согласно литературным данным, напротив, способен гасить флуоресценцию комплекса {Eu(III)-ТЦ}.

Получение целлюлозных пленок с использованием ИЖ

Основная задача первого этапа исследования состояла в выяснении условий получения целлюлозных пленок с помощью ацетатной ИЖ. Методика приготовления пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} была известна из литературы, однако для сравнения условий получения целлюлозных пленок с использованием ацетатной и хлоридной ИЖ и, что особенно важно, их функциональных характеристик и перспектив применения для определения органических соединений, что не было известно из литературы; эксперименты проводили параллельно с двумя ИЖ.

Методика получения целлюлозных пленок включала растворение целлюлозы в ИЖ, раскатку пленок, их охлаждение, промывание антирастворителем для осаждения целлюлозы и вымывания избыточных количеств ИЖ, разрезание пленки на тест-формы, размер которых зависел от используемого в дальнейшем способа индикации аналитического сигнала пленки (визуального, спектрофотометрического или флуоресцентного). Толщина полученных целлюлозных пленок, измеренная микрометром в разных местах, составляла 150–200 мкм. Схема подготовки целлюлозных пленок к работе приведена на рис. 2.

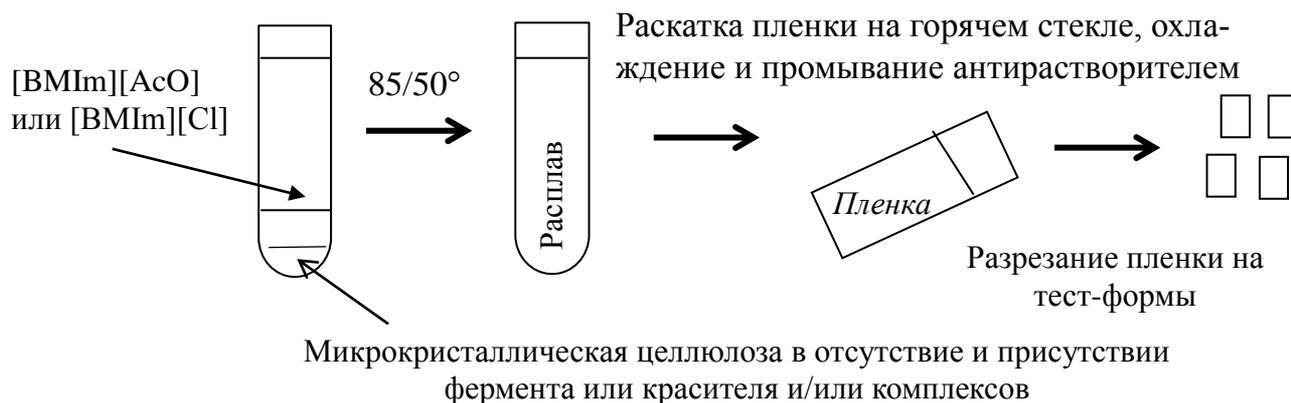


Рис. 2. Схема подготовки целлюлозных пленок к работе.

Установили, что пленки приемлемой прочности и плотности, необходимой для последующей иммобилизации реагентов, получаются из растворов целлюлозы в [ВМІm][AcO] и [ВМІm][Cl] при ее содержаниях 14 и 4% масс. соответственно. Температура растворения целлюлозы в ацетатной ИЖ и природа антирастворителя, как мы показали, влияют на прозрачность и прочность полученных пленок (табл. 1, 2). Наиболее прозрачными и одновременно прочными являются пленки {целлюлоза–[ВМІm][AcO]}, приготовленные из раствора, нагретого до 50°C, при использовании в качестве промывной жидкости этанола. Для пленок {целлюлоза–ВМІm][Cl]} наиболее подходящей промывной жидкостью была признана вода.

Таблица 1. Величины прозрачности целлюлозных пленок, полученных из растворов целлюлозы в [ВМІm][AcO] при разных температурах с использованием разных промывных жидкостей (350–700 нм; $n = 3$, $P = 0.95$)

Промывная жидкость	Т, % пленок, полученных при различной температуре (°C) растворения		
	50	60	66
Вода	5.7±0.5	3.6±0.1	2.8±0.1
Этанол	87.0±0.3	76.1±0.3	69.8±0.1
Ацетонитрил	5.8±0.7	6.7±0.8	71.1±0.5

Прозрачность материала {целлюлоза–ВМІm][Cl]} на 7% выше, чем у пленок на основе ацетатной ИЖ (табл. 2), тем не менее, существенным преимуществом пленок {целлюлоза–[ВМІm][AcO]} является их прочность и эластичность, количественные характеристики которых превышают эти величины для пленок {целлюлоза–ВМІm][Cl]} в 2.5 и 9.5 раз соответственно.

Выбранные нами условия получения целлюлозных плёнок с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ систематизированы в табл. 3.

При изучении влияния растворов различной кислотности на функциональные свойства полученных пленок (рис. 3) выяснили, что они наиболее прочные и эластичные в водных нейтральных растворах и наименее прочные (прочность в 6 раз ниже, чем в фосфатном буферном растворе, **ФБР**) — в ацетатном буферном растворе (**АБР**) с рН 3.8. Прочность пленок целлюлоза–[ВМІm][AcO]} в боратном буферном растворе (**ББР**) с рН 8.9 сопоставима с таковой в 0.1М растворе HCl.

Таблица 2. Зависимость оптических и механических свойств пленок от температуры расплава {целлюлоза–ИЖ} ($n = 3$, $P = 0.95$)

t, °C	Прозрачность, %	Прочность, МПа	Эластичность (относительное удлинение, %)
Пленка, приготовленная из расплава {целлюлоза–[ВМІm][AcO]}			
50	87.0±0.3	12.47	19.22
60	76.1±0.3	4.39	21.80
66	69.8±0.1	4.20	11.99
Пленка, приготовленная из расплава {целлюлоза–ВМІm][Cl]}			
85	94±3	7.86	1.31

Таблица 3. Выбранные условия получения пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} и {целлюлоза–[BMIm][Cl]}

Параметр	Выбранное значение	
	[BMIm][AcO]	[BMIm][Cl]
Содержание целлюлозы, % масс. по отношению к ИЖ	14	4
Время растворения, ч	7	
$t_{\text{нагрева}}, ^\circ\text{C}$	50	85
Антирастворитель	Этанол	Вода
Объем антирастворителя, мл	15	
Время промывания, мин	15	
Тестовая форма при индикации сигнала	Квадрат размером $1 \times 1 \text{ см}^2$	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ визуальным и спектрофотометрическим методами ▪ флуоресцентным методом 	Прямоугольник размером $1 \times 2 \text{ см}^2$	

Полярные молекулярные органические растворители, такие как ацетонитрил, ДМСО и ДМФА, примерно в 5 раз уменьшают прочность пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} по сравнению с ее величиной в ФБР (рН 7.0), в то время как эластичность в их присутствии снижается всего лишь в 1.5 раза. Интересно, что разрушающее действие органического растворителя на целлюлозную пленку ослабляется с повышением его полярности в ряду ДМФА < ДМСО < ацетонитрил. Еще одна особенность целлюлозных пленок, полученных с применением ацетатной ИЖ: при выдерживании в течение 3 мин в ДМСО или ДМФА их прозрачность возрастала с $(87 \pm 3)\%$ (табл. 2) до $(93 \pm 3)\%$ и $(92.9 \pm 0.2)\%$ соответственно ($n = 3, P = 0.95$), то есть становилась практически такой же, как у пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]}. Однако при использовании в качестве промывной жидкости не этанола, а ДМСО или ДМФА, пленка не формируется.

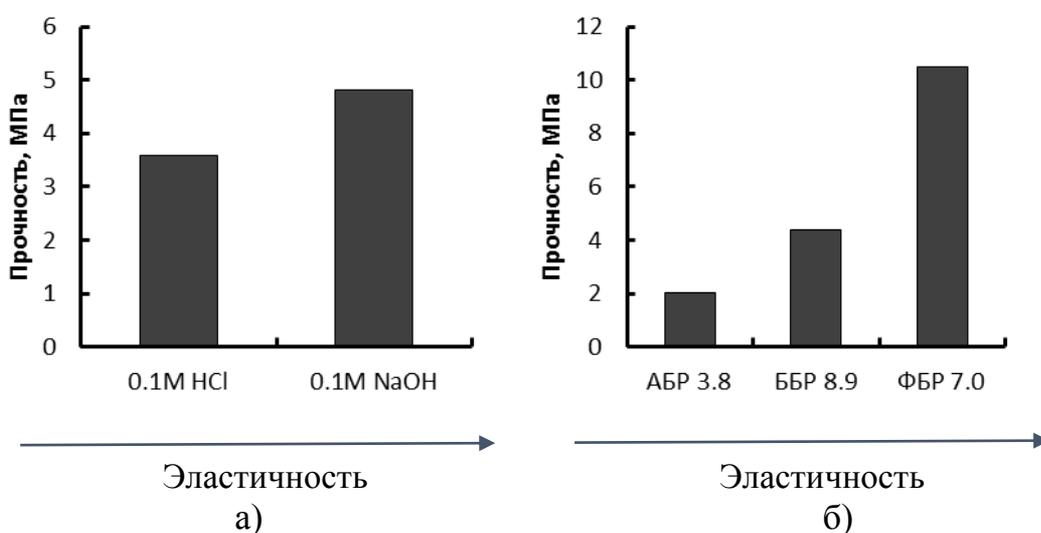


Рис. 3. Влияние природы и рН водных растворов в отсутствие (а) и в присутствии буферных растворов (б) на прочность и эластичность пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]}. Прочность пленок в воде составляет 17 МПа.

Результаты изучения морфологии полученных целлюлозных пленок методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали, что поверхность обеих пленок, в основном, ровная, за исключением некоторых дефектов, которые, как правило, возникают из-за раскатывания пленок вручную (рис. 4). Можно предполагать, что обе целлюлозные пленки могут служить хорошей матрицей для физической иммобилизации аналитических реагентов, а также, возможно, будут проявлять сорбционные свойства из-за большой площади их поверхности и внутреннего объема.

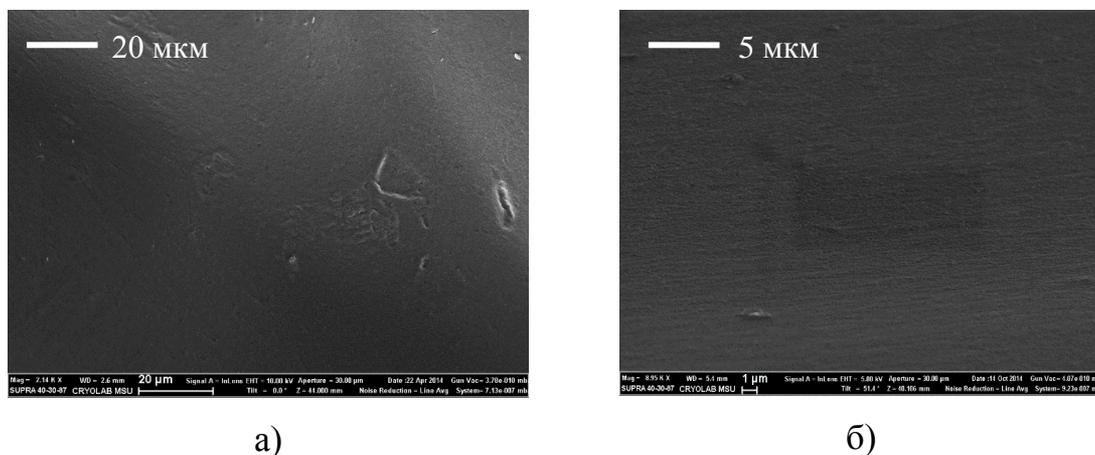


Рис. 4. СЭМ фотографии пленок, полученных из растворов {целлюлоза–[BMIm][AcO]} (а) и {целлюлоза–[BMIm][Cl]} (б).

Создание пленок с иммобилизованными аналитическими реагентами

На следующем этапе исследования выбрали условия иммобилизации в целлюлозные пленки, приготовленные с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ, аналитических реагентов – компонентов индикаторных систем. Методика иммобилизации отличалась тем, что реагенты иммобилизовали не в готовую матрицу (пленку), а добавляли в смесь для иммобилизации в процессе создания целлюлозного материала (рис. 2).

ПХ и ПС, иммобилизованные в пленки, полученные растворением-осаждением целлюлозы в [BMIm][AcO], обладали слабой каталитической активностью; значительно более высокую каталитическую активность они проявляли при иммобилизации в пленки, полученные из раствора {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, хотя температура раствора в этой ИЖ была на 35°C выше, чем в растворе в ацетатной ИЖ (табл. 3). Очевидно, причина потери активности пероксидазами состояла в различном по степени инактивирующем действии ацетатной и хлоридной ИЖ.

Изучив влияние [BMIm][AcO] на каталитическую активность нативных ПХ и ПС, обнаружили, что при введении в реакционный раствор даже 10 об.% 0.5 М [BMIm][AcO] скорость реакции пероксидазного окисления гваякола резко уменьшалась по сравнению с таковой в отсутствие ИЖ, при этом каталитическая активность ПХ была выше, чем у соевого фермента в 1.7 раза. С повышением содержания [BMIm][AcO] остаточная каталитическая активность ПС убывала в меньшей степени, чем у ПХ. Например, при увеличении содержания ацетатной ИЖ от 10 до

25 об.% величина a_i/a_0^ξ для ПХ понижалась более, чем в 30 раз, а для ПС — всего в 1.5 раза. При замене ФБР на воду с таким же значением рН обнаружили, что в отсутствие буфера в реакционном растворе в присутствии изученных содержаний [ВМІm][AcO] соевый фермент еще проявляет 10% активности от ее величины в водной среде, в то время как ПХ инактивирована практически полностью уже при 25 об.% ИЖ. Для ПХ величины константы ингибирования, K_i , рассчитанные для установленного неконкурентного механизма, в системах [ВМІm][AcO] : ФБР и [ВМІm][AcO] : H₂O (10:90 об.%) составили соответственно (159 ± 6) и (21.2 ± 0.8) мМ; а для ПС – (80 ± 3) и (295 ± 10) мМ ($n = 3, P = 0,95$). Очевидно, что при использовании ФБР в качестве соразтворителя ИЖ соевый фермент более чувствителен к действию ИЖ, чем ПХ, поскольку величина K_i для ПС в 7.5 раз меньше таковой для ПХ. Таким образом, каталитическая активность растительных пероксидаз зависит от природы фермента и соразтворителя ИЖ.

В дальнейших исследованиях применяли ферментсодержащие пленки, приготовленные с помощью хлоридной ИЖ.

Установили, что время (ч) растворения фермента/белка в расплаве {целлюлоза-[ВМІm][Cl]} возрастало в ряду: 6 (ПХ) < 7 (Гб) < 10 (ПС) < 96 (пероксидаза арахиса), в котором убывали величины их рI: 8.2-9.0 > 7.0 > 4.1 > 3.89. Таким образом, катионные пероксидазы, как оказалось, растворяются быстрее анионных ферментов, кроме того, проявляют в целлюлозных пленках более высокую активность и стабильность.

Прозрачность целлюлозных плёнок (Т,%) оценивали *спектрофотометрическим методом* в видимой области спектра. Для этого набухшую плёнку располагали на поверхности стекла, на котором она удерживалась силами адгезии. Стекло, размер которого соответствовал размеру кюветного отделения спектрофотометра, помещали в спектрофотометр «Shimadzu UV mini-1240А», измеряли поглощение плёнки относительно стекла, а затем рассчитывали её прозрачность. Прозрачность пленок, раскатанных из одного расплава составила $(94 \pm 3)\%$ ($n=3, P=0.95$).

Для оценки каталитической активности биокатализаторов в плёнках {целлюлоза-[ВМІm][Cl]} *визуальным методом* влажную пленку пинцетом аккуратно размещали на предметном стекле. В одну и ту же точку плёнки микродозатором последовательно наносили раствор арилдиамин (или катехоламина) и раствор пероксида водорода. При добавлении H₂O₂ включали секундомер и фиксировали время появления в плёнке окраски определённой интенсивности. При проведении контрольного опыта использовали плёнку, не содержащую биокатализатор. В остальном методика эксперимента оставалась прежней.

^ξ Относительные активности растительных пероксидаз в среде ИЖ-буферный раствор по отношению к активности в водной среде (a_i/a_0) рассчитывали по формуле: $\frac{a_i}{a_0} = \frac{\text{tga}_i}{\text{tga}_0}$, где tga_i и tga_0 – тангенсы угла наклона кинетических кривых в координатах оптическая плотность (A) – время (t , с) в присутствии и отсутствие ИЖ соответственно.

Пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} не изменяют химизм индикаторных реакций окисления арилдиаминов: 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), *o*-дианизидина (*o*-ДА) и *o*-фенилендиамина (*o*-ФДА); а также катехоламинов: α -метилдопы, допамина, адреналина и добутамина и пирокатехина. Скорости индикаторных реакций с участием ПХ возрастали в последовательности, соответствующей рядам субстратной специфичности нативного фермента (в скобках указаны величины $\log P$): *o*-ФДА (0.32) \ll *o*-ДА (1.65) \approx ТМБ (4.02); адреналин (-1.37) $<$ α -метилдопа (-1.7) $<$ допамин (-0.98) $<$ добутамин (3.6). Аналогичную последовательность наблюдали и для ПС; исключение составляли адреналин и добутамин, которые не превращались соевым биокатализатором. Важно, что нековалентно иммобилизованные в целлюлозные пленки ПХ и ПС сохраняли 54 и 58% исходной каталитической активности соответственно, несмотря на присутствие больших количеств (96% масс.) высоко полярной [ВМIm][Cl] и нагревание смеси до 85°C в течение 7 ч (табл. 3). Мы полагаем, что сохранение каталитической активности растительных пероксидаз в составе пленок {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} обусловлено не только уникальной структурой целлюлозных материалов, приготовленных с использованием ИЖ, но и менее выраженным по сравнению с [ВМIm][AcO] ингибирующим действием хлоридной ИЖ.

Установили, что при хранении полученных ферментсодержащих пленок при комнатной температуре в набухом состоянии в плотно закрытом контейнере в отсутствие доступа воздуха ПХ и ПС в составе целлюлозных пленок в течение 35 дней сохраняли не менее 80 и 70% каталитической активности соответственно от ее величины в день приготовления пленок. Данные о стабильности других ферментов, иммобилизованных в целлюлозные пленки, в литературе отсутствуют. На примере пленок, содержащих ПХ, показали возможность их повторного использования в реакции окисления ТМБ пероксидом водорода после отмывки продуктов индикаторной реакции водой.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований установлено, что ПХ и ПС могут быть эффективно иммобилизованы в оптически прозрачные, гибкие и прочные целлюлозные пленки, полученные путем растворения-регенерации микрокристаллической целлюлозы в [ВМIm][Cl]. Такие целлюлозные пленки с растительными пероксидазами выгодно отличаются от существующих аналогов, особенно от целлюлозных пленок с нековалентно иммобилизованной лакказой, с большей в 3 раза остаточной каталитической активностью, и, следовательно, большей скоростью превращения субстрата (индикаторные реакции протекают в течение 1-2 мин, а не 12 ч и более). Иммобилизованные пероксидазы сохраняют не менее 50% своей первоначальной каталитической активности, что, очевидно, является показателем «дружелюбности» хлоридной ИЖ по отношению к этим ферментам. Напротив, ацетатная ИЖ является эффективным неконкурентным ингибитором растительных пероксидаз как нативных, так и иммобилизованных в целлюлозную пленку. Ингибирующее действие ацетатной ИЖ на каталитическую активность ПХ и ПС обусловлено, главным образом, действием ее аниона. К сожалению, применять пленки {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} для иммобилизации ПХ и ПС невозможно.

Создание пленок {целлюлоза–ИЖ–краситель}

При иммобилизации индигокармина (ИК) и пиронина Б (ПБ) в целлюлозные пленки двух видов установили, что после добавления навесок ИК и ПБ к смесям {целлюлоза–[ВМIm][Cl]} и {целлюлоза–[ВМIm][AcO]} и при растворении в них анионный и катионный красители ведут себя по-разному. Более того, поведение одного и того же красителя в присутствии хлоридной и ацетатной ИЖ различно.

Анионный ИК растворяется в обеих ИЖ, однако если в [ВМIm][Cl] оптические и кислотно-основные свойства красителя практически такие же, как в водном растворе, то в [ВМIm][AcO] оптические свойства ИК изменяются вследствие химических взаимодействий красителя с растворенным в ИЖ кислородом и целлюлозой. В результате иммобилизованные препараты ИК, приготовленные с помощью ацетатной ИЖ, окрашены в сине-зеленый цвет, а не в синий как пленки {целлюлоза–[ВМIm][Cl]–ИК}.

Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае ПБ: при растворении в [ВМIm][Cl] краситель сохранял свои оптические свойства, однако при растворении в [ВМIm][AcO] его характерная малиновая окраска заметно ослабевала, а пленки {целлюлоза–[ВМIm][AcO]–ПБ} имели бледно-вишневую окраску, а не малиновую, как пленки {целлюлоза–[ВМIm][Cl]}. В спектре флуоресценции пленок {целлюлоза–[ВМIm][AcO]–ПБ} характерный для ПБ максимум флуоресценции при 581 нм ($\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм) отсутствует, а интенсивность флуоресценции мало отличается от ее фоновых значений (8-9 усл. ед.) в интервале длин волн 540–640 нм.

Для измерения флуоресцентного сигнала пленку размером 1×2 см² помещали на зеркальную пластину размером 1×2.5 см², которую использовали в качестве отражающей поверхности. Полученную конструкцию устанавливали в специальное отделение спектрофлуориметра «Agilent Technologies Cary Eclipse», где закрепляли с помощью зажима, отрегулировав расстояние (самое близкое) и угол (35°) по отношению к источнику возбуждения. Регистрировали спектр флуоресценции целлюлозной пленки при соответствующей длине волны возбуждения флуорофора (пиронина Б, а далее и комплексов Eu(III) с дипиколиновой кислотой и тетрациклином) или измеряли интенсивность флуоресценции при соответствующей длине волны испускания. Контрольный опыт во всех экспериментах проводили с пленкой без флуорофора, полученной с применением той же ИЖ, что и пленка с флуорофором.

Проведенные исследования показали, что хлоридная ИЖ более «дружелюбна» не только к пероксидазам, но и к изученным синтетическим красителям, поскольку их оптические свойства практически не изменяются при иммобилизации в пленки {целлюлоза–[ВМIm][Cl]}.

Обнаружили, что ПБ удерживается в пленках двух видов лучше, чем ИК, причем при использовании пленок, приготовленных с помощью хлоридной ИЖ, вымывание ПБ минимально ($0.31 \pm 0.03\%$, $n = 3$, $P = 0.95$). Степень вымывания ПБ из пленки {целлюлоза–[ВМIm][Cl]} не изменяется даже после выдерживания пленки в течение суток не только в наилучшем антирастворителе этаноле, но и в воде. Как и в случае растительных пероксидаз, катионный краситель ПБ удерживается пленкой {целлюлоза–[ВМIm][Cl]} лучше, чем анионный. Более того, ПБ в составе этой пленки сохраняет способность поглощать и флуоресцировать в том же диапазоне

длин волн, что и его водный раствор. Эта целлюлозная пленка в дальнейшем была использована для определения АМ.

Проверка сорбционной способности целлюлозных пленок без красителей по отношению к ИК и ПБ (рис. 4) показала, что степень сорбции ИК пленками {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} не превышает 13%, однако уже через 2 ч выдерживания пленки в растворе красителя он десорбируется. Напротив, степень сорбции ИК пленкой {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} достигает 71% через 6 ч ее пребывания в водном растворе ИК, и даже через сутки пленка продолжает удерживать краситель. При обработке пленки 0.1 М раствором NaOH сорбированный ИК легко вымывается из нее, что позволяет использовать пленку, по меньшей мере, еще один раз без существенной потери в ее емкости.

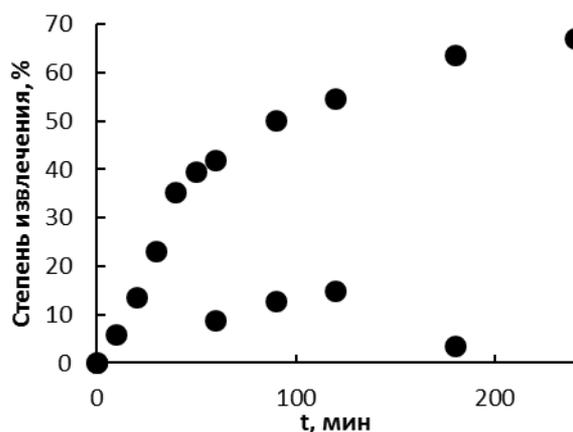


Рис. 4. Кинетика сорбции ИК из его водного 30 мкМ раствора пленками {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} (●) и {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} (○).

Для повышения степени сорбции синтетических красителей в целлюлозные пленки в их состав включили ПАВ (анионный додецилсульфат натрия, ДДС, и катионный, цетилтриметиламмония бромида). При этом мы не достигли желаемых результатов, тем не менее выявленная возможность иммобилизации анионного ДДС в пленку {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} и сродство к ней ПБ в дальнейшем оказались полезными при изучении возможностей использования системы {ПБ-Mn(II)-ДДС} для определения АМ.

Поскольку пленки состава {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} оказались хорошими сорбентами для ИК, синтетического производного природного красителя индиго, изучили сорбционные свойства по отношению к другим, природным пищевым красителям различной природы (куркумину, кармину и β-каротину). При комнатной температуре зависимости степени сорбции куркумина и кармина от pH не имели выраженных максимумов, по-видимому, вследствие одновременного присутствия в растворе двух-трех ионных форм из-за небольших различий в величинах их ступенчатых констант кислотности. Напротив, в случае β-каротина наблюдается отчетливый максимум при pH 5.0–5.5. Степени сорбции куркумина, кармина и β-каротина были наибольшими при pH 4.5; 6.5 и 5.5 соответственно. При повышении температуры растворов красителей их сорбция в целлюлозные пленки увеличивалась. Как при комнатной, так и при повышенной температурах водных и водно-органических растворов степень сорбции возрастала в ряду (logP): β-каротин (17.62) < кармин (0.97) < куркумин (3.29). Проведенные исследования показали, что пленки {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} могут представлять интерес как новый материал для сорбции синтетических и пищевых красителей из их водных и водно-органических растворов.

Изучение возможности применения пленок {целлюлоза–ИЖ} в качестве матрицы для иммобилизации флуоресцирующих комплексов, на примере дипиколината европия(III), Eu(ДПК)₃, и комплекса {Eu(III)–тетрациклин}

Получили оптически прозрачные флуоресцирующие пленки состава {целлюлоза–[VMIm][AcO]–Eu(ДПК)₃} и {целлюлоза–[VMIm][Cl]–Eu(III)–тетрациклин (ТЦ)}, которые могут служить потенциальными чувствительными элементами флуоресцентных химических сенсоров. Сопоставление интенсивностей флуоресценции пленок {целлюлоза–[VMIm][Cl]} с иммобилизованными комплексами Eu(ДПК)₃ и {Eu(III)–ТЦ} при одинаковом их содержании (0.2 мг) показало, что сигнал комплекса с ТЦ при 617 нм (наиболее интенсивная полоса в спектре флуоресценции Eu(III) и его комплексов) превышает таковой для дипиколината европия(III) в 26 раз. Пленка {целлюлоза–[VMIm][AcO]–Eu(ДПК)₃} даже при содержании комплекса 0.7 мг флуоресцирует в 10 раз слабее пленки {целлюлоза–[VMIm][Cl]–Eu(III)–ТЦ} с содержанием флуорофора 0.2 мг.

Изучение в растворе систем {Eu(III)–ТЦ} в присутствии АМ и билирубина (БР) показало, что АМ вследствие стерических затруднений не влияет на флуоресцентный сигнал комплекса, а действие БР оказалось более сложным, чем можно было предположить на основании литературных данных. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования системы {Eu(III)–ТЦ–БР} в растворе, прежде чем ее будет возможно перенести в целлюлозные пленки.

Создание методик определения артемизинина в растворе и с использованием пленок {целлюлоза–[VMIm][Cl]} с иммобилизованным реагентом

Ранее мы показали, что пленки {целлюлоза–[VMIm][Cl]–ПБ} обладают интенсивной флуоресценцией ($\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 581$ нм), хорошо удерживают катионный ксантеновый краситель ПБ и поэтому являются перспективным материалом для использования в сенсорных флуоресцентных системах для определения АМ. На основании литературных данных выбрали две индикаторные флуоресцентные системы для определения АМ, основанные на реакции окисления ПБ в присутствии АМ, только в одной системе катализатором служит МП, а в другой — синтетический аналог ПХ, комплекс {Mn(II)–ДДС}. Действие АМ в указанных индикаторных системах ранее не было изучено, поэтому созданию целлюлозных пленок с включенными в них компонентами указанных индикаторных систем предшествовало *изучение реакций в растворе*.

В результате изучения влияния многочисленных параметров на величину аналитического сигнала индикаторной системы: рН и природы буферного раствора, концентраций ПБ, МП, {Mn(II)–ДДС} (а также их соотношения), времени регистрации сигнала, природы органического растворителя АМ, выбрали параметры, представленные в табл. 4.

Таблица 4. Условия проявления наибольшего действия АМ в системах ПБ–МП и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (универсальный буферный раствор; $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 569$ нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм)

Система	Выбранные параметры			
	рН	$c_{\text{ПБ}}$, мкМ	c (катализатора), мкМ	Время проведения реакции, мин
ПБ–МП	5.0–6.2	2	4	1
ПБ–{Mn(II)–ДДС}	5.9	2	100	2

Выбранные нами условия тушения артемизинином флуоресценции ПБ в изученных системах похожи; различаются между собой, главным образом, концентрации катализаторов. Концентрация МП в 25 раз меньше концентрации комплекса {Mn(II)–ДДС}. Дополнительным преимуществом биокаталитической системы является диапазон в единицу рН, в котором наиболее эффективно действие АМ. В выбранных условиях разработали методики определения АМ (табл. 5).

Таблица 5. Аналитические характеристики разработанных флуориметрических методик определения АМ с использованием индикаторных систем в растворе

Система	ДОК ^а , мкМ	Уравнение градуировочной зависимости ($n = 8, P = 0.95$)	r	$s_{\text{Г}}$ при $c_{\text{H}} (n=5)$	$c_{\text{мин}}$, мкМ
ПБ–МП	0.1 – 7	$y^{\text{б}} = (0.101 \pm 0.003)x + (1.060 \pm 0.010)$	0.9970	0.008	0.07
ПБ–{Mn(II)–ДДС}	0.2 – 8	$y = (0.0622 \pm 0.0009)x + (1.035 \pm 0.004)$	0.9993	0.007	0.12

^а Диапазон определяемых концентраций.

^б y – I_0/I , отношение сигнала контрольного опыта к полезному сигналу, x – c , мкМ.

Сопоставление коэффициентов чувствительности и ДОК двух методик показывает, что система с биологическим катализатором позволяет определять АМ с большей чувствительностью практически в том же диапазоне концентраций. Более низкий предел обнаружения АМ с использованием системы ПБ–МП связан, по нашему мнению, с отсутствием влияния МП на сигнал, в то время как комплекс {Mn(II)–ДДС} проявляет слабое собственное тушение.

Данные о влиянии посторонних веществ на результаты определения АМ представлены в табл. 6.

Результаты изучения кинетики индикаторных реакций в присутствии АМ, расчета и сопоставления их кинетических параметров, а также аналитических характеристик методик показали, что для определения АМ использование индикаторной системы ПБ–МП предпочтительнее, чем системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Кроме того, в присутствии МП эффект установленного нами динамического тушения АМ флуоресценции ПБ выражен в 2 раза сильнее. Селективность определения изученных соединений и экспрессность разработанных методик сопоставимы, что позволяет использовать их для определения АМ в одних и тех же БАД. Единственным

недостатком ферментативной системы можно считать ее бóльшую «уязвимость» к действию этанола.

Таблица 6. Влияние посторонних веществ на результаты определения 1 мкМ АМ с использованием индикаторных систем в растворе

Компонент	Система ПБ–МП		Система ПБ–{Mn(II)–ДДС}	
	Отношение $C_{AM}:C_{постор. в-во}$	$\Delta^a, \%$	Отношение $C_{AM}:C_{постор. в-ва}$	$\Delta, \%$
Fe(II)	1:10	+4.8	1:40	+4.9
Fe(III)	1:10	+4.5	1:10	-3.8
Co(II)	1:20	+4.0	1:30	+4.3
Mn(II)	1:20	+4.1	1:10	+4.4
Cu(II)	1:15	+4.9	1:30	+4.0
Mg(II)	1:30	-4.7	1:20	+3.9
Фруктоза	1:50	-4.6	1:70	-4.0
Глюкоза	1:1000	+4.7	1:1000	+4.9

^a Относительная погрешность приведена с учетом знака, чтобы показать увеличение/уменьшение сигнала при введении постороннего вещества.

Флуориметрическое определение артемизинина в биологически активных добавках. С целью апробации разработанных методик определения АМ с использованием систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП проанализировали БАД «Best Artemisinin» и «Artemisia annua intense», применяемые для лечения и профилактики малярии. В последнее время лекарственные средства на основе полыни *Artemisia annua* L. используют также для лечения рака, в особенности рака груди и лейкемии. Результаты флуориметрического определения АМ методом добавок в препарате «Best Artemisinin» согласуются с данными производителя. Время анализа, включающего пробоподготовку, не превышает 6 ч.

Полученные на этом этапе результаты служат надежным практическим и теоретическим фундаментом для перевода выбранных индикаторных реакций из раствора в пленку {целлюлоза–[VMIm][Cl]}.

Изучение выбранной индикаторной системы в целлюлозной пленке

Для перевода изученных нами в растворе каталитических индикаторных систем ПБ–МП и ПБ–{Mn(II)–ДДС} в целлюлозную пленку, приготовленную с помощью хлоридной ИЖ, необходимо было соиммобилизовать в пленку краситель и катализатор; выбрать подходящий состав реагентов в пленке; изучить влияние АМ на флуоресценцию пленки с закрепленными в ней ПБ и катализатором, а затем оценить практическую значимость полученного целлюлозного материала при определении концентрации АМ в модельных растворах, а также в растворах и экстрактах БАД.

Обнаружили, что иммобилизация в целлюлозную пленку как одного ДДС, так и Mn(II) совместно с ДДС понижает прочность пленки. Приемлемое для работы качество пленки обеспечивает молярное соотношение Mn(II):ДДС = 1:1.

При проведении реакции в растворе наибольшее уменьшение сигнала ПБ в присутствии АМ наблюдалось при рН 5.9, при этом эффект тушения флуоресценции усиливался во времени. Однако скорость уменьшения сигнала пленки была заметно выше, чем в растворе. Это обстоятельство связано с частичным, хорошо воспроизводимым вымыванием красителя из пленки ($s_r = 0.03$, $n = 3$) в процессе проведения реакции. Во избежание потерь ПБ выбрали время проведения реакции 30 с, при котором вымывание ПБ не превышало 3%.

В выбранных условиях (рН 5.9, время реакции 30 с) изучили зависимость величины I_0/I пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} от концентрации АМ в модельных стандартных растворах. В табл. 7 сопоставлены аналитические характеристики определения АМ в пленках и растворе. Методика определения АМ в растворе отличается более низким пределом обнаружения и значительно более высокой воспроизводимостью результатов анализа.

Таблица 7. Аналитические характеристики определения АМ в системе ПБ-Mn(II)-ДДС с помощью пленок {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} и в растворе (для системы в пленки $n=3$, для системы в растворе $n=8$, $P = 0.95$)

Регистрация сигнала ($\lambda_{\text{возб.}}/\text{фл., нм}$)	ДОК, мкМ (s_r при c_n)	Уравнение градуировочной зависимости $I_0/I = ac_{\text{AM}} + b$				r	$c_{\text{мин}}$, мкМ
		a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$		
		мкМ ⁻¹					
Пленка (355/ 581)	0.25–8 (0.2)	0.13	0.02	1.2	0.2	0.9153	0.23
Раствор (345/569)	0.2–8 (0.007)	0.0622	0.0009	1.035	0.004	0.9993	0.12

Наибольшее мешающее влияние на результаты определения 1 мкМ АМ, как и в случае раствора, оказывали ионы Fe(II), образующие комплекс с АМ, а также H₂O₂, который в присутствии комплекса {Mn(II)-ДДС} окисляет ПБ. В результате сигнал красителя еще больше уменьшался, что приводило к завышенным результатам определения АМ. Однако ионы марганца(II) и глюкоза, которые усиливали эффект тушения флуоресценции при проведении реакции окисления артемизинином ПБ в растворе, в пленке, напротив, его ослабляли.

Для демонстрации практической значимости разработанной нами пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} для определения АМ с ее помощью проанализировали те же БАД, в которых содержание АМ ранее установили с использованием индикаторной реакции в растворе (табл. 8). АМ определяли в препаратах «Best Artemisinin» и «Artemisia annua intense» методом добавок. Для подготовки образца «Artemisia annua intense» к анализу использовали экстракцию этанолом в течение 2 ч с последующим фильтрованием.

Таблица 8. Результаты флуориметрического определения АМ в противомаларийных БАД «Best Artemisinin» и «Artemisia annua intense» с использованием системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} в пленке {целлюлоза–[BMIm][Cl]} ($n = 3, P = 0.95$) и растворе ($n = 5, P = 0.95$) методом добавок. Содержание АМ в растворе «Best Artemisinin» по данным производителя – 18 мМ, в капсуле – 100 мг

Регистрация сигнала	Уравнение градуировочной зависимости $I_0/I = ac_{AM} + b$				r	Найдено АМ	
	a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$		в экстракте, мМ	в капсуле, мг
	мкМ ⁻¹						
«Best Artemisinin»							
Пленка	0.35	0.06	0.43	0.1	0.9774	19 ± 3	108±10
Раствор	0.115	0.003	1.140	0.005	0.9983	17 ± 1	99±6
«Artemisia annua intense»							
Пленка	0.59	0.08	1.5	0.4	0.9863	0.7 ± 0.2	4.3±0.6
Раствор	0.211	0.004	1.26	0.01	0.9986	0.37 ± 0.02	0.96±0.03

Несмотря на то, что методика определения артемизинина с помощью пленок по аналитическим характеристикам несколько уступает методике, проводимой в растворе, полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности и перспективности дальнейших исследований по применению пленок состава {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с иммобилизованными реагентами для решения задач химического анализа.

Выводы

1. Методом растворения-осаждения микрокристаллической целлюлозы в гидрофильной ионной жидкости, ацетате 1-бутил-3-метилимидазолия, [BMIm][AcO], получены целлюлозные пленки, обладающие высокими оптической прозрачностью ($T \approx 90\%$), механической прочностью, эластичностью и устойчивостью в растворах различной кислотности (в присутствии и отсутствии буферных растворов) и в молекулярных органических растворителях (ацетонитриле, ДМСО, ДМФА).
2. С использованием [BMIm][Cl] получены оптически прозрачные и прочные целлюлозные пленки с физически иммобилизованными в них пероксидазами хрена и сои, сохраняющими свойственную нативным ферментам субстратную специфичность и более 50% исходной каталитической активности от ее величины в растворе в течение первой недели хранения. Иммобилизованные препараты можно использовать по крайней мере дважды после простой регенерации.
3. Выявлена зависимость скорости растворения гемсодержащих белков в растворе целлюлоза–ионная жидкость от величины их pI и показана предпочтительность иммобилизации в целлюлозные пленки катионных гемсодержащих белков перед анионными.

4. Имобилизация растительных пероксидаз в пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]} сопровождается потерей их каталитической активности вследствие ингибирующего действия ацетатной ИЖ на ферменты по неконкурентному механизму.
5. Пленки, приготовленные с использованием ацетатной ИЖ способны сорбировать синтетические (индигокармин) и природные пищевые (куркумин, кармин и β -каротин) красители из их водных и водно-органических растворов. Степень сорбции (в %) возрастает в ряду: β -каротин (21) < кармин (32) < куркумин (36) < индигокармин (71).
6. Показана потенциальная возможность использования комплекса {Eu(III)–тетрациклин}, иммобилизованного в пленку {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, для определения билирубина, способного тушить сенсibilизированную флуоресценцию иона лантанида.
7. На основе реакции окисления пиронина Б артемизинином, катализируемой микропероксидазой-11 и комплексом {Mn(II)–додецилсульфат натрия}, предложены новые индикаторные флуоресцентные системы в растворах и разработаны чувствительные, селективные, простые и экспрессные флуориметрические методики определения артемизинина в диапазонах концентраций 0.1 – 7 мкМ ($s_r = 0.008$ при $c_n, n = 5$) и 0.2 – 8 мкМ ($s_r = 0.007$ при $c_n, n = 5$) соответственно. Время анализа не превышает 1 ч.
8. Созданы пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–пиронин Б–Mn(II)–додецилсульфат натрия}, установлены условия их функционирования и на их основе разработан чувствительный, селективный и экспрессный способ определения артемизинина в диапазоне концентраций 0.25–8 мкМ ($s_r = 0.2$ при $c_n, n = 3$).
9. Пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с соиммобилизованными пиронином Б и комплексом {Mn(II)–ДДС} успешно применены для флуориметрического определения артемизинина в противомаларийных БАД «BestArtemisinin» и «Artemisia annua intense».

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих статьях:

1. *Muginova S.V., Myasnikova D.A., Poliakov A.E., Shekhovtsova T.N.* Immobilization of plant peroxidases in cellulose–ionic liquid films. // Mendel. Comm. 2013. V. 23. P. 74–75.
2. *Мясникова Д.А., Поляков А.Е., Вашкинская О.Е., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Влияние природы гидрофильной ионной жидкости на каталитическую активность пероксидаз хрена и сои. // Вест. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2014. Т. 55. № 2. С. 126–135.

и тезисах докладов:

3. *Muginova S.V., Poliakov A.E., Myasnikova D.A., Shekhovtsova T.N.* Application of hydrophilic ionic liquids for the reactions catalyzed by plant peroxidases, native and

encapsulated in a cellulose matrix. / Abstracts of the 2nd Russian – Hellenic symposium with international participation and young scientist's school. «Biomaterials and bionanomaterials: Recent advances and safety – toxicology issues». Heraklion, Crete, Greece. May 5–12, 2011. P. 43.

4. *Muginova S., Poliakov A., Myasnikova D., Shekhovtsova T.* Novel aspects of the application of water-miscible ionic liquids in catalysis by plant peroxidases: formation of the reaction media and supporting material for the enzyme immobilization. / Abstracts of the 16th European conference on analytical chemistry «Challenges in modern analytical chemistry». «Euroanalysis-2011». Belgrade, Serbia. 2011, September 11–15. BC21.
5. *Мясникова Д.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Применение гидрофильных ионных жидкостей для иммобилизации растительных пероксидаз и определения их органических субстратов. / Тезисы докладов 1-ой республиканской научно-практической конференции (с международным участием) «Зеленая химия – в интересах устойчивого развития». г. Самарканд, Узбекистан. 26–28 марта 2012. С. 38.
6. *Shekhovtsova T., Muginova S., Polyakov A., Myasnikova D.* Plant peroxidases in the determination of their organic substrates in water, water-organic media, and ionic liquids. / Abstracts of the 3^d symposium on Enzymes & Biocatalysis-2012 (SEB-2012). Xi'an, China. 2012, April 25–28. P. 142.
7. *Мясникова Д.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Оптический сенсор на основе композита {пероксидаза-целлюлоза-ионная жидкость} для определения катехоламинов. / Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием по аналитической спектроскопии. Краснодар, Россия. 23–29 сентября 2012. С. 78.
8. *Мясникова Д.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Каталитически активные и стабильные пленки {целлюлоза–ионная жидкость–пероксидаза} как основа оптических биосенсоров. / Тезисы докладов конференции РХО им. Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов». Москва, Россия. 24–25 октября 2012. С. 128–129.
9. *Myasnikova D.A., Poliakov A.E., Vashkinskaya O.E., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* The effects of imidazolium and pyridinium hydrophilic ionic liquids on the catalytic activity of horseradish and soybean peroxidases. «Biocatalysis-2013». Moscow, Russia. 2013, July 2–5. P. 81.
10. *Мясникова Д.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* О возможности использования биокаталитического окисления тетрациклина. / Тезисы докладов 2-го съезда «Аналитики России». Москва, Россия. 23–27 сентября 2013. С. 279.
11. *Myasnikova D.A., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* Optical and performance properties of the cellulose films regenerated from ionic liquids. / Abstracts of

«BioTech 2014. Chemical Sensors Forum». Wädenswil, Switzerland. 2014, September 4–8. P. 65.

12. *Мясникова Д.А., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Пленка на основе целлюлозы, регенерированной из ацетата 1-бутил-3-метилимидазолия, для сорбции пищевых красителей. /Тезисы докладов конференции РХО им. Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов». Москва, Россия. 23 октября 2014. С. 142–144.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракты: №П868 от 25.05.2010 и №П991 от 27.05.2010) и РФФИ (гранты: №09-03-00823-а, №12-03-00249-а).

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам, аспирантам и студентам лаборатории кинетических методов анализа за постоянное внимание и помощь в получении и обсуждении результатов; к.х.н. Г.В. Колесникову за синтез ионных жидкостей; к.х.н. А.В. Иванову за предоставленный препарат ДАБКО; проф. Л.Г. Томиловой и к.х.н. Т.В. Дубининой кафедры органической химии МГУ за помощь при высушивании ионных жидкостей; доценту Н.И. Ивановой и ст. лаборанту Т.В. Красноперовой кафедры коллоидной химии МГУ за помощь в оценке физико-механических свойств целлюлозных пленок; аспиранту кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета МГУ А.А. Тепанову, студенту 5 курса кафедры физики полупроводников физического факультета МГУ И.В. Божьеву и к.ф.-м.н., н.с. отдела микроэлектроники НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына МГУ С.А. Евлашину за получение СЭМ фотографий целлюлозных материалов.