

Московский Государственный Университет
имени М.В. Ломоносова

Химический факультет
Кафедра аналитической химии

На правах рукописи

Мясникова Дина Андреевна

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

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
проф., д.х.н. Шеховцова Т.Н.

Москва - 2015

Содержание

Использованные в работе сокращения	4
Введение	6
Обзор литературы	11
Глава 1. Применение ионных жидкостей для разработки оптических сенсоров и биосенсоров	11
1.1. Использование ионных жидкостей в качестве растворителей для материала подложки/иммобилизации	12
1.1.1. Оптические сенсоры и системы, основанные на силиконовых и золь-гель матрицах	13
1.1.1. Оптические системы и сенсоры на основе целлюлозы	25
1.2. Использование ионных жидкостей в качестве специфической добавки к полимерной матрице	32
1.3. Использование ионных жидкостей как материала матрицы	36
1.4. Использование ионных жидкостей в качестве модификатора поверхности прозрачных триацетилцеллюлозных пленочных мембран	38
1.5. Использование ионной жидкости как пластификатора, лиганда и красителя-датчика одновременно в ионогель-оптодной мембране	40
1.6. Перспективы применения полученных оптических сенсоров	41
в химическом анализе	41
Глава 2. Спектрофотометрические и люминесцентные методы определения артемизинина и его производных	46
2.1. Общие сведения об артемизинине	46
2.2. Физико-химические свойства артемизинина	47
2.3. Определение артемизинина и его производных в лекарственных препаратах, растительном сырье и биологических жидкостях	52
Экспериментальная часть.....	62
Глава 3. Исходные вещества, посуда, аппаратура, методики эксперимента, обработка результатов измерений	62
3.1. Исходные вещества	62
3.2. Посуда, аппаратура	65
3.3. Методики эксперимента	67
3.4. Обработка результатов измерений	74

Обсуждение результатов.....	77
Глава 4. Обоснование выбора индикаторной системы.....	77
4.1. Выбор микрокристаллической целлюлозы как носителя аналитических реагентов	77
4.2. Выбор природы ИЖ в качестве растворителя целлюлозы	78
4.3. Обоснование выбора аналитических реагентов и определяемых соединений.....	81
Глава 5. Условия получения и функциональные характеристики целлюлозных пленок на основе растворов {целлюлоза–[BMIm][AcO]} и {целлюлоза–[BMIm][Cl]}.....	88
5.1. Выбор условий получения целлюлозных пленок	89
5.2. Изучение механических и морфологических свойств целлюлозных пленок.....	101
Глава 6. Целлюлозные пленки с иммобилизованными аналитическими реагентами.....	107
6.1. Условия получения, свойства и применение пленок {целлюлоза–ИЖ–фермент}	107
6.2. Пленки {целлюлоза–ИЖ} для иммобилизации и сорбции катионных и анионных красителей.....	124
6.3. Целлюлозные пленки с иммобилизованными флуоресцирующими комплексами {Eu(III)–дипиколиновая кислота} и {Eu(III)–тетрациклин}.....	142
Глава 7. Пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} для флуориметрического определения артемизинина.....	155
7.1. Реакция окисления пиروнина Б артемизинином в присутствии биокатализаторов и их синтетических аналогов в растворе.....	155
7.2. Получение пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС} и их применение для определения АМ	188
Заключение.....	196
Выводы.....	200
Приложения	202
Список литературы	207

Использованные в работе сокращения

Ионные жидкости (ИЖ)

- [BMIm][Cl] — 1-бутил-3-метилимидазолия хлорид
[BMIm][Br] — 1-бутил-3-метилимидазолия бромид
[BMIm][BF₄] — 1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат
[BMIm][PF₆] — 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат
[BMIm][Tos] — 1-бутил-3-метилимидазолия тозилат
[BMIm][Tf₂N] — 1-бутил-3-метилимидазолия бис-(трифторметансульфонил)-имид
[EMIm][BF₄] — 1-этил-3-метилимидазолия тетрафторборат
[EMIm][ESO₄] — 1-этил-3-метилимидазолия этилсульфат
[HMIm][Cl] — 1-(2-гидроксипропил)-3-метилимидазолия хлорид
[MIm][Cl] — протонированный метилимидазолия хлорид
[OMIm][PF₆] — 1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфат
[PCMVIm][Tf₂N] — поли[1-цианометил-3-винилимидазолия бис-(трифторметансульфонил)-имид
[P_{6,6,6,14}][DCA] — тригексилтетрадецилфосфония дицианамид
ИЖ-биотин — 1-((+)-биотин)пентанамидо)пропил-3-(12-меркаптододecilимидазолия бромид)
ИЖ-СООН — 1-(карбоксиметил)-3-(меркаптододecil)-имидазолия бромид
ПИЖ — полимеризованная ИЖ

Органические растворители

- ДМСО — диметилсульфоксид
ДМФА — диметилформамид
ТГФ — тетрагидрофуран

Ферменты и белки

- ПХ — пероксидаза из корней хрена
ПС — пероксидаза из шелухи сои
ПА — пероксидаза арахиса
МП — микропероксидаза-11
Гб — бычий сывороточный гемоглобин

Другие вещества

- АМ — артемизинин
ДАМ — дигидроартемизинин
АТМ — артемэфир

АТЭ — артеэфир
АТС — артесунат
БР — билирубин
ТЦ — тетрациклин гидрохлорид
ИК — индигокармин
ПБ — пиронин Б
ТС — тимоловый синий
БТС — бромтимоловый синий
ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
o-ДА — *o*-дианизидин
o-ФДА — *o*-фенилендиамин
ОНГП — *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид
ГПТСК — тринатриевая соль 8-гидроксипирен-1,3,6-трисульфоновой кислоты
ТФУ — трифторуксусная кислота
ДПК — дипиколиновая кислота
ПАН — 1-(2-пиридилазо)-2-нафтол
ТАН — 1-(2-тиазолилазо)-2-нафтол
ТЭОС — тетраэтилортосиликат
ЭЦ — этилцеллюлоза
ТОАОН — гидроксид тетраоктиламмония
ДОФ — диоктилфталат
ПММА — полиметилметакрилат
ПВХ — поливинилхлорид
МОБГ — 1,2-бис(4-метоксибензилиден)гидразин
ОДК-3 — 2-(9-метил-9H-карбазол-3-ил)-5-(пиридин-4-ил)-1,3,4-оксидиазол
ТХФБК — тетракис-(4-хлорфенил)борат калия
ПАК — полиакриловая кислота
ПЭМ — полиэлектролитные мембраны без подложки
ФБР — фосфатный буферный раствор
УБР — универсальный буферный раствор
МОПС — натриевая соль морфолинпропансульфоновой-3 кислоты
ПАВ — поверхностно-активное вещество
ЦТАБ — бромид цетилтриметиламмония
ДДС — додецилсульфат натрия
БАД — биологически активные добавки

Введение

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 красите-

лей. *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.

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 $[VMIm][AcO]$ на оптические свойства индигокармина и пиронина Б.

На основе пленок {целлюлоза– $[VMIm][Cl]$ } 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– $[VMIm][Cl]$ } 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 $[VMIm][AcO]$ и $[VMIm][Cl]$, в отсутствие и в присутствии иммобилизованных в них аналитических реагентов. Показаны перспективы применения пленок {целлюлоза– $[VMIm][AcO]$ } в качестве сорбентов синтетических красителей (индигокармина и пиронина Б), а также природных пищевых красителей кармина, куркумина, β -каротина.

Пленки {целлюлоза– $[VMIm][Cl]$ } 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– $[VMIm][Cl]$ }, а также данные о ме-

ханизме 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 растворов), 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 [BMIm][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–[BMIm][Cl]} при их хранении;
- результаты сравнительного изучения сорбции анионного красителя индигокармина и катионного красителя пиронина Б пленками {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и {целлюлоза–[BMIm][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–[BMIm][Cl]}, а также результаты определения артемизинина в противомаларийных БАД с помощью предложенной целлюлозной пленки.

Обзор литературы

Глава 1. Применение ионных жидкостей для разработки оптических сенсоров и биосенсоров

Области применения ИЖ, растворителей нового поколения, в химическом анализе и биотехнологии постоянно расширяются. Это стало возможным благодаря увеличению количества коммерчески доступных ИЖ, усовершенствованию методов их очистки для повторного использования [1], синтезу специальных ИЖ для определенных целей [2-4], а также накоплению большого объема экспериментальных данных о физико-химических характеристиках [5], электрохимических [6], оптических [7] и экстракционных [8-10] свойствах ИЖ. Кроме того, развитие математических моделей оценки экотоксичности ИЖ [11] и новых подходов к предсказанию их биodeградируемости [12] помогло сократить объем экспериментальных исследований, а также время и трудозатраты, необходимые для их проведения.

Наиболее глубоко изучены возможности и перспективы использования ИЖ в электрохимических сенсорах, включая биосенсоры. Результаты этих исследований подробно описаны в обзорных статьях и монографиях [13-15]. Важными свойствами для создания электрохимических сенсоров являются ограниченная растворимость в воде, гидрофобность, экстракционные и пластифицирующие свойства ИЖ, а также возможность поляризации электродов различной природы в среде этих растворителей.

Обнаруженная способность некоторых ИЖ растворять органические [16] и неорганические [15, 17] вещества различной природы, а также приобретенные экспериментаторами навыки получения новых оптических материалов с участием ИЖ открыли возможность использования этих растворителей в оптических сенсорных технологиях. На рис. 1 приведена диаграмма, иллюстрирующая ежегодный рост числа публикаций за период с 2003 по 2014 гг., посвященных применению ИЖ для получения электрохимических и оптических сенсорных материалов. Из диаграммы видно, что интерес исследователей к использованию ИЖ в оптических сенсорных технологиях практически такой же, как и в электрохимических. Однако обзоры, посвященные применению ИЖ в оптических сенсорных технологиях, единичны [7, 18, 19], при этом в большей их части обсуждается какой-то один вид сенсорных материалов (например, ионогели [17-19]). Остальной литературный материал представляет собой разрозненные статьи.

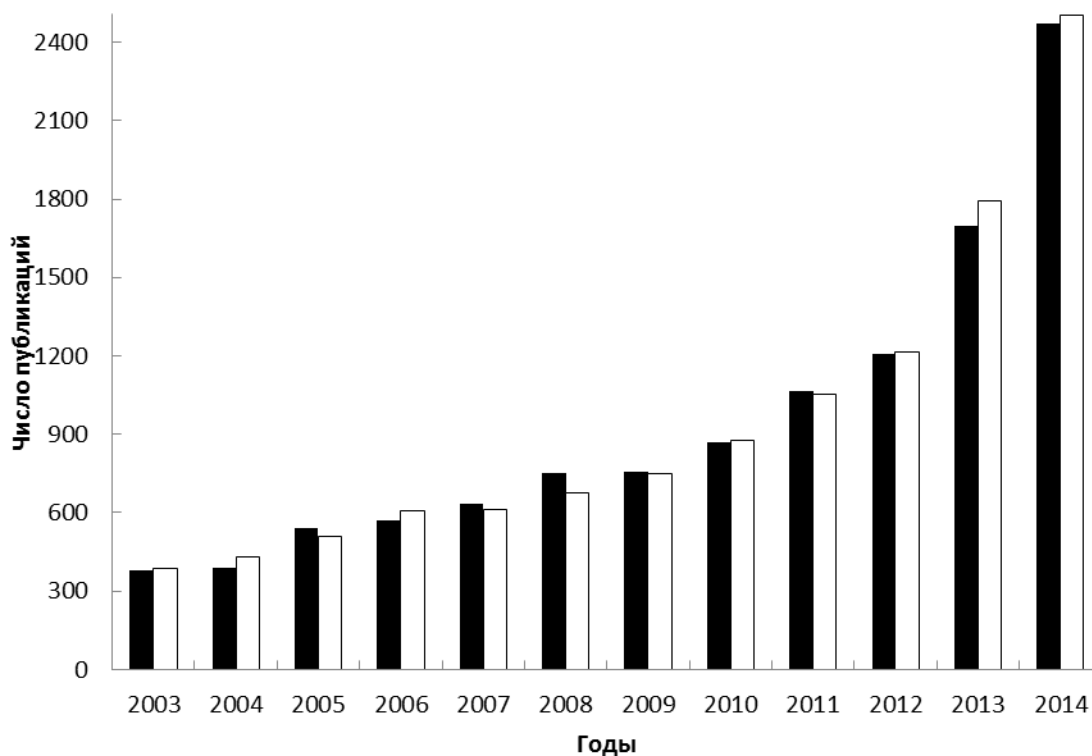


Рис. 1. Статистические данные о применении ИЖ для создания оптических (черные столбцы) и электрохимических (белые столбцы) сенсоров и сенсорных материалов (согласно базе данных <http://www.sciencedirect.com>).

В этой главе мы рассмотрим различные аспекты применения ИЖ в оптических сенсорах и системах, обсудим достоинства и недостатки разработанных сенсоров, а также оценим возможности их практического использования в химическом анализе. Прежде всего отметим, что приведенная классификация приложений ИЖ не может считаться единственно правильной, это вопрос дискуссионный.

1.1. Использование ионных жидкостей в качестве растворителей для материала подложки/иммобилизации

ИЖ – сильно сольватирующие, но слабо координирующие растворители. Они растворяют неорганические газы (CO_2 , O_2 , SO_2 , H_2 , CO и т.д.) [15, 17], тетраэтилортосиликат, ТЭОС [19], моно- и полисахариды (например, углеводы, крахмал, целлюлозу, хитин и хитозан [16, 20]), природные органические материалы (шелк [16], древесину [21, 22]), некоторые синтетические полимеры [23-25], ферменты (оксидоредуктазы и гидролазы [26-28]), а также другие соединения. Это свойство ИЖ наиболее привлекательно для исследователей, работающих в области сенсорных технологий, поскольку перечисленные вещества могут быть использованы в качестве материала подложки для иммобилизации (в частности, натуральные и

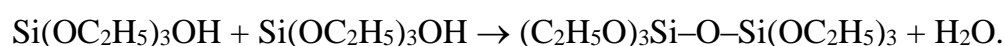
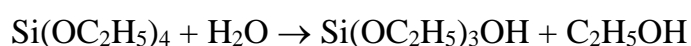
синтетические полимеры), так и определяемых соединений (газы) и распознающих элементов (биокатализаторы). В недавно опубликованных обзорах очень подробно рассмотрены теоретический и практический аспекты взаимодействия целлюлозы, материалов на основе целлюлозы [16, 29, 30] и синтетических полимеров [25] с ИЖ. Мы же сконцентрируем внимание на роли ИЖ как растворителей при приготовлении сенсорных материалов, а также рассмотрим влияние ИЖ на функциональные и аналитические характеристики разработанных сенсоров.

1.1.1. Оптические сенсоры и системы, основанные на силиконовых и золь-гель матрицах

Золь-гель матрицы обладают такими свойствами, как прочность, оптическая прозрачность и электро-, фото- и химическая стабильность [31]. Им можно придать различную форму (монолита, пудры и монодисперсии, волокна и пленки). Более того, золь-гели обладают способностью захватывать распознающие элементы, такие как рН индикаторы, красители и ферменты. Все перечисленные свойства золь-гелей идеальны для создания оптических сенсоров. Золь-гели на основе оксидов кремния, полученные с помощью ИЖ, являются наиболее популярными золь-гель материалами, применяемыми в аналитических целях [32]. Такие материалы, равно как и другие, полученные дисперсией наночастиц кремнезема в ИЖ, называют ионогелями на основе кремнезема [19]. В современной научной литературе термину «ионогель» дают следующее определение: «Ионогель — это полимерный гель (полимерная сеть с большим количеством внутренних связей), полученный в присутствии ИЖ» [19, 33]. Прежде чем обсуждать сенсоры на основе золь-гелей с использованием ИЖ, уместно кратко описать классическую схему получения золь-геля.

Золь-гель технология объединяет целый ряд процессов, в которых одна фаза, представляющая собой раствор или золь (коллоидная суспензия очень маленьких частиц размером 1-100 нм в однородной жидкой фазе), претерпевает золь-гель переход [34]. Золь-гель процесс включает реакции гидролиза и поликонденсации алкоксидного прекурсора (например, ТЭОС) [35], протекающие почти одновременно при комнатной температуре в момент инициации реакции гидролиза. Двухстадийная реакция образования золь-геля очень чувствительна к таким параметрам, как рН раствора, природа и концентрация катализатора, используемого для кислотного/основного гидролиза, температура, время нагревания, природа заместителя (R) и растворителя [35].

Существуют два пути проведения золь-гель процесса: кислотный и основной катализ бимолекулярного нуклеофильного замещения. Кислотный катализ осуществляют путем быстрого депротонирования -OR или -OH заместителей, связанных с Si; в то время как в основных условиях силанольные или гидроксильные группы напрямую атакуют Si [34]. Наиболее часто для кислотного и основного катализа золь-гель процесса в качестве катализаторов используют минеральные кислоты (HCl или CH₃COOH) и соединения аммония соответственно. В процессе золь-гель трансформации вязкость раствора возрастает по мере того, как золь связывается и затвердевает, образуя прочную сеть пор – гель [31]. Оба процесса, гидролиз и конденсация, приводят к образованию низкомолекулярных побочных продуктов, таких как спирт и вода, как это показано на схеме на примере ТЭОС:



Если спирт и воду удаляют из системы путем непрерывного высушивания, например испарения, получается ксерогель. Если же фазу раствора удаляют суперкритическим высушиванием, то в результате образуется аэрогель [31]. Дай (Dai) и соавторы впервые получили аэрогель при помощи ИЖ, как растворителя ТЭОС, не используя суперкритическое высушивание [36]. Поскольку ИЖ имеют пренебрежимо малое давление паров, устойчивая двухфазная (тв-ж) система, называемая ионогель, может сама выступать в качестве материала.

Поскольку золь-гель образуется при комнатной температуре, в него можно иммобилизовать даже ферменты, сохраняя при этом нативную конформацию белка [37, 38]. Однако активность инкапсулированных в золь-гель ферментов значительно ниже активности нативных биокатализаторов, что объясняется низкими скоростями диффузии субстратов сквозь золь-гель и инактивацией ферментов под действием спирта – продукта реакции гидролиза [39]. Для преодоления этих недостатков Лиу (Liu) и соавторы впервые предложили использовать для получения золь-геля ТЭОС и иммобилизации в него фермента ПХ гидрофильную ИЖ, [BMIm][BF₄]. Прекурсор ТЭОС, ИЖ и воду смешивали в объемном соотношении 2:1:1, катализатором служил 0.1М раствор HCl [39]. После 3-х часового перемешивания в полученную гомогенную смесь вводили соответствующее количество ПХ в фосфатном буферном растворе (ФБР, pH 6.86). В результате получали прозрачный золь-гель без трещин с большим количеством червеобразных, сообщающихся каналов и пор диаметром 3 нм [39]. Препарат хранили 2 недели при комнатной температуре.

Активность ПХ в золь-геле определяли по реакции окисления гваякола H_2O_2 . Для этого содержащий фермент золь-гель помещали в ФБР, промывали, а затем раствор декантировали. Поглощение реакционной смеси измеряли после добавления растворов гваякола и H_2O_2 . Благодаря рыхлой, пористой структуре золь-геля скорость внутренней диффузии субстратов возросла и, как следствие, более, чем в 30 раз увеличилась каталитическая активность ПХ по сравнению с ее активностью в золь-геле, не содержащем ИЖ. Авторы предположили, что ИЖ обволакивает ПХ, создавая в процессе получения золь-геля некую оболочку, защищающую ее от негативного воздействия этанола. Кроме того, большое количество гидроксильных групп в золь-геле обуславливает сильные электростатические взаимодействия и водородные связи, которые формируют высокий кинетический барьер для денатурации фермента [39]. Таким образом, структура биокатализатора при описанной методике иммобилизации становится более прочной и устойчивой. ПХ в золь-гель матрице на основе ИЖ продемонстрировала не только высокую каталитическую активность, но также высокую термостабильность: при нагревании до 40°C иммобилизованный и нативный ферменты в ФБР имели одинаковую активность; при нагревании до 60°C остаточная активность ПХ в золь-геле составляла не менее 68% от первоначального значения. К сожалению, полученный биоматериал пока не нашел своего практического применения.

Способность имидазолиевых ИЖ обратимо растворять некоторые неорганические газы [15, 17] делает их привлекательными реагентами для создания оптических газовых сенсоров, особенно на основе полученного кислотным катализом золь-геля. Новый O_2 сенсор был изготовлен путем вливания $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ в золь-гель на основе ТЭОС [23]. Кроме ТЭОС, подкисленной соляной кислотой воды, спирта и ИЖ, золь содержал чувствительный к кислороду флуорофор – хлорид трис(2,2'-бипиридил)рутения(II), $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}$ (рис. 2), и неионогенное ПАВ Тритон X-100. Для определения O_2 использовали его способность эффективно гасить флуоресценцию рутениевого комплекса. Добавка ПАВ при создании золь-геля, как правило, позволяет понизить межфазовую энергию, и, таким образом, уменьшает капиллярное давление на стенки пор геля, оказываемое жидкостью, испаряющейся изнутри капилляра [23, 40]. Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре в открытых стеклянных сосудах.

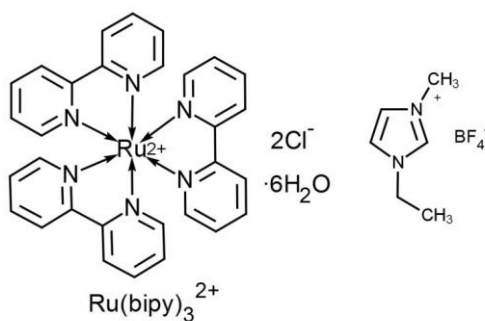


Рис. 2. Структуры рутениевого комплекса [23] и $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$.

Подложкой для золь-геля служили стекла, на которые его наносили путем погружения в реакционный раствор [40] и после равномерной раскатки золь-геля по поверхности стекла материал высушивали при комнатной температуре или при 70°C в течение 18 ч. В результате получали сенсорный материал в виде однородных оптически прозрачных тонких пленок. Такая форма удобна малым диффузионным расстоянием от границы контакта анализируемой газовой смеси до собственно фазы сенсора [31]. Действительно, разработанный сенсор продемонстрировал быстрый и обратимый отклик на газообразный кислород (табл. 1).

Использование ИЖ совместно с Тритон Х-100 позволило существенно снизить риск возникновения трещин и получить более однородный материал по сравнению с композитом без ИЖ [23, 40]. Благодаря оптимизации pH золя и содержания в нем ИЖ удалось ускорить золь-гель процесс за счет уменьшения времени затвердевания геля, повысить чувствительность сенсора к газообразному O_2 (табл. 1), получить более высокие значения константы Штерна-Фольмера, а также в большей степени линеаризованную зависимость Штерна-Фольмера по сравнению с классическим золь-гелем, созданным методом кислотного катализа [40]. Описанные сенсоры были успешно применены для определения O_2 в модельной газовой фазе; однако они не подходят для определения растворенного O_2 , если только пленки на стекле не покрыты защитным слоем.

Таблица 1. Химические оптические сенсоры, разработанные с использованием ИЖ

Определяемое соединение	Подложка/ материал для иммобилизации	Реагент/ индикатор	Ионная жидкость	Условия работы	Диапазон линейности (предел детектирования)	Селективность (+/-) ¹	Образец	Метод детектирования, λ (время отклика, концентрация)	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ионные жидкости как растворители для подложки/ материала иммобилизации									
СО ₂ , растворенный	Полидиметилсилоксановая пленка	ТС/БТС, растворенные в буферном растворе: Н ₂ О, ИЖ, ТБАОН	[BMIm][BF ₄] [BMIm][Tos]	Специальное оборудование	0 – 2% ² 0 – 100%	– ³	Модельная смесь газов	Спектрофотометрия, 470 нм	[41]
		Тринатриевая соль ГПТСК/ ДЦМ в буферном растворе: Н ₂ О, NaHCO ₃ / Na ₃ PO ₄ , ИЖ	[BMIm][Tos]		0 – 20%	–		Флуоресценция, 519 нм, 629 нм, λ _{возб.} 470 нм (50 с в направлении от 0 до 100% и 320 с в обратном направлении)	
О ₂ , газообразный	Золь-гель на основе ТЭОС	Ru(bipy) ₃ Cl	[EMIm][BF ₄]		0 – 100%	–		Флуоресценция, 590–610 нм (5–14 с после в направлении от 100% до 0% О ₂ ; время восстановления 10 с после воздействия 100% N ₂)	[23]
[H ⁺] (рН)	Ионогель-полимерный гель	Метилловый красный, бромкрезоловый зеленый, пурпурный и бромтимоловый синий	[P _{6,6,6,14}][ДЦА]	Микрофлюидная платформа	рН 4.5 – 8	–	Человеческий пот	Колориметрический метод, сравнение с окраской стандарта	[42]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hg(II)	Целлюлозная пленка	ПАН	[BMIm][Cl]	ФБР, pH 5.5; Hg(II), 50 мкМ; время контакта 1–10 мин	1 – 100 ppm	+ ⁴	Модельный раствор	Спектрофотометрия, 600 нм (1–10 мин)	[43]
Ni(II), Zn(II), Mn(II)		ПАН ТАН	[BMIm][Cl] [BM ₂ Im][Cl]	Буферный раствор, pH 8.5–9.0; время контакта 40 с	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁴ М (2.2·10 ⁻⁶ М) -//- (1.6·10 ⁻⁶ М) -//- (1.6·10 ⁻⁶ М)	–		Колориметрия (30–40 с)	[44]
NO ₂ и N ₂ O ₄ , (газ)	Целлюлозная пленка	Каликс[4]-арены	[BMIm][Cl]	SnCl ₄ , 3.8 мкМ в ТФУ _{конц.}	–	–	Модельная смесь газов	Спектрофотометрия, 550 нм	[45]
Cu(II)	Целлюлозная пленка	Eu(ДПК) ₃ ·2H ₂ O Tb(ДПК) ₃ ·2H ₂ O	[BMIm][Cl]	Раствор Cu(II)	–	+ ⁵		Флуоресценция, 617 нм/ 545 нм, λ _{возб.} 273 нм (10 с)	[46]
Гваякол	Золь-гель на основе ТЭОС	ПХ	[BMIm][BF ₄]	ФБР, pH 6.86, H ₂ O ₂ , 1.5 мМ	–	–	Модельный раствор субстрата	Спектрофотометрия, 470 нм (2 мин)	[39]
Сирингалдазин	Целлюлозная пленка	Лакказа из <i>Rhus vernicifera</i>	[BMIm][Cl] [BMIm][Tf ₂ N]	20 мМ ФБР, pH 7.13; инкубация 0.054 г сирингалдазина _{красный} 24 ч/ 180 мин при 27°C	–	–		Спектрофотометрия, поглощение субстрата, 371 нм; продукта его окисления, 555 нм (12 ч)	[27, 47]
	Целлюлозополиаминная пленка		[BMIm][Cl]		–	–		Спектрофотометрия, 530 нм (≥10 мин)	[48]
	Целлюлозонодендримерная пленка		[BMIm][Cl]		0.1 М ФБР, pH 6.5, сирингалдазин _{red} , 0.5 мМ	–		–	
ОНГП	Аминомодифицированная целлюлозная пленка	β-Галактозидаза	[BMIm][Tf ₂ N]	0.1 М ФБР, pH 7.0; ОНГП, 14 мМ	–	–		Спектрофотометрия, 415 нм	[49]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ионные жидкости в качестве специальной полимерной добавки к матрице									
CO ₂ , газообразный	ЭЦ	ГПТСК(ТОА) ₄	[EMIm][BF ₄]	Специальное оборудование	0 – 100%	–	Модельная смесь газов	Флуоресценция, 518 нм (20-54 с)	[50]
CO ₂ , газообразный	ПММА	ГПТСК(ТОА) ₃	[EMIm][BF ₄] (5 – 50 масс. % по отношению к полимерной матрице)		0 – 60%	–		Флуоресценция, 513 нм (15–30 с, 0 – 10%)	[51]
	ЭЦ				0 – 10%	–		Флуоресценция, 610 нм (4–22 с, 100 – 0%)	[52]
O ₂ , газообразный	ПММА	[Ru(bipy) ₃]	[EMIm][BF ₄] [BMIm][BF ₄] [BMIm][PF ₆] [BMIm][SCN]		0 – 100%	–		Флуоресценция, 610 нм (4–22 с, 100 – 0%)	[52]
	ЭЦ								
Ag(I)	ПММА	МОБГ	[EMIm][BF ₄]	5 мМ CH ₃ COOH/ CH ₃ COONa буферный раствор, рН 4.5	Электро-спряденные нановолокна: 1.0·10 ⁻¹⁴ – 1.0·10 ⁻⁷ М (3.40·10 ⁻¹⁶ М); тонкие пленки: 1.0·10 ⁻¹² – 1.0·10 ⁻⁶ М (1.98·10 ⁻¹³ М)	+ ⁶	Модельный раствор	Флуоресценция, 460 и 470 нм	[53]
Ag(I)	ЭЦ	МОБГ	[EMIm][BF ₄]	5 мМ CH ₃ COOH/ CH ₃ COONa буферный раствор, рН 4.5	-/- (4.60·10 ⁻¹⁶ М); -/- (1.90·10 ⁻¹³ М)	-/-	-/-	-/-	[53]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hg(II)	ЭЦ	ОДК-3	[EMIm][BF ₄]	5 мМ CH ₃ COOH/ CH ₃ COONa бу- ферный раствор, рН 5.0	Электро- спряден- ные нано- волокна: 1.0·10 ⁻¹¹ – 1.0·10 ⁻³ М (1.70·10 ⁻¹⁵ М); тонкие пленки: 1.0·10 ⁻⁹ – 1.0·10 ⁻³ М (1.90·10 ⁻¹³ М)	+ ⁷	Минераль- ная вода Sarikiz	Флуоресценция, 418 нм	[54]
Ионные жидкости как материал матрицы									
CO ₂ , газооб- разный	ИЖ	Тринатриевая соль ГПТСК, ТБАОН	[BMIm][BF ₄] [BMIm][Br]	См. текст	0 – 10% 0 – 60% (1.4%)	–	Модельная смесь газов	Флуоресценция, 519 и 521 нм (1–2 мин в рабочем диапазоне значений)	[55]
CO ₂ , газооб- разный, HCO ₃ ⁻			[BMIm][BF ₄] [BMIm][Br]	Стандартный раствор NaHCO ₃	2·10 ⁻⁶ – 1.9·10 ⁻² М (10 ⁻⁸ М) 2·10 ⁻⁴ – 1.2·10 ⁻² М (–)	–	Водный раствор		
Ионные жидкости, как модификатор поверхности мембран									
CN ⁻	Триацетил- целлюлозная мембрана	Комплек Шиффа на ос- нове Со(III)	[BMIm][Br] [BMIm][PF ₆] [OMIm][PF ₆]	Трис буферный раствор, рН 10	1·10 ⁻⁵ – 2.5·10 ⁻⁴ М (4.2·10 ⁻⁶ М)	+	Питьевая вода	Спектрофотометрия, 380 нм (7–10 мин, 1.0·10 ⁻⁴ М)	[56]
АК		Неокупроино- вый комплекс Cu(I)		Раствор Cu(NO ₃) ₂ , рН 3.0	7.4·10 ⁻⁵ – 3.5·10 ⁻³ М (2.2·10 ⁻⁵ М)	–	Апельси- новый сок	Спектрофотометрия, 455 нм (6–8 мин, 4.8·10 ⁻³ М)	[57]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ионные жидкости, как пластификатор, лиганд и краситель-датчик одновременно в полимерной ионогель-оптодной мембране									
Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II)	ПВХ	Анион ИЖ, ДЦА ⁻	[P _{6,6,6,14}][ДЦА]	Раствор нитрат- ов металлов (II)	- (7.24 · 10 ⁻⁴ М) - (2.91 · 10 ⁻⁴ М)	+ ⁸	Модель- ный рас- твор	Спектрофотометрия, 370 нм (Cu-ДЦА) и 600 нм (Co-ДЦА) (345 и 340 с соответ- ственно, 1.0 · 10 ⁻¹ М)	[58]

¹Селективность оптического сенсора была (+) или не была (-) изучена;

²Диапазон парциальных давлений газа (CO₂ или O₂), гПа.

³Информация отсутствует.

Селективность изучена по отношению к перечисленным ниже ионам:

⁴Zn²⁺;

⁵Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pd²⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Hg²⁺;

⁶Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Cr³⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Hg⁺, Hg²⁺, Al³⁺, Sn²⁺, Pb²⁺, NH₄⁺, F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻;

⁷Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cr³⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Hg⁺, Al³⁺, Pb²⁺, NH₄⁺, F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻;

⁸Co²⁺.

Новые пленочные сенсорные материалы для определения CO_2 разработаны на основе эмульсии $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ или $[\text{BMIm}][\text{Tos}]$ в силиконовой матрице [41]. В результате диспергирования ИЖ, которая содержит CO_2 -распознающие молекулы (кислотно-основной индикатор или флуорофор), в однородную фазу гидрофобной силиконовой матрицы, эти две жидкие фазы образуют эмульсию на подобии «вода в масле». $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ и $[\text{BMIm}][\text{Tos}]$ хорошо растворяют CO_2 и высокоселективны по отношению к нему. Растворимость CO_2 в среде ИЖ как минимум в 10-20 раз выше его растворимости в традиционных растворителях, полимерных матрицах или воде [17]. Высокая растворимость углекислого газа в ИЖ обусловлена образованием слабых кислотно-основных комплексов между CO_2 (акцептором электронной пары) и анионом ИЖ (донором электронной пары) [59, 60].

Методика получения сенсорного материала включала приготовление специальных буферной и силиконовой смесей, их смешение и формирование пленки [41]. Буферная смесь содержала растворенные в ИЖ рН индикатор (тимоловый синий, **ТС**; или бромтимоловый синий, **БТС**) или тринатриевую соль 8-гидроксипирен-1,3,6-трисульфоновой кислоты, **ГПТСК**, а также воду и лиофильное органическое основание гидроксид тетрабутиламмония (**ТБАОН**), растворенное в гидрофобном силиконовом полимере. Поскольку ионная пара, образованная отрицательно заряженным ГПТСК и положительно заряженными ионами четвертичного аммония (например, $\text{ГПТСК}(\text{ТБА})_3$), была слишком лиофильной и не растворялась в полярной ИЖ, вместе с ГПТСК дополнительно вводили гидрокарбонат и фосфат натрия, при гидролизе которых образуются гидроксид-ионы.

Смесь силиконовых прекурсоров готовили смешением тетравинилтетраметилциклотетрасилоксана с полидиметилсилоксаном с концевыми виниловыми группами. После этого добавляли сополимер метилгидроксисилоксан-диметилгидроксисилоксан и платиновый комплекс в качестве катализатора. Отметим, что силиконы на основе полидиметилсилоксана имеют высокую проницаемость по отношению к CO_2 .

Для получения эмульсии к силиконовой смеси добавляли буферный раствор, смесь быстро перемешивали. Эмульсию вакуумировали, чтобы избавиться от пузырьков газа, и раскатывали на полиэстерной подложке в виде пленки, которую затем «состаривали». Толщина полученной пленки составляла 60 мкм.

Отклик сенсоров измеряли спектрофотометрически и флуориметрически с помощью двухфазного синхронного усилителя. В последнем случае сенсор помещали в проточную ячейку и возбуждали синусоидально модулированным голубым светом светоизлучающего диода. Интенсивность флуоресценции измеряли относительно интенсивности люминесценции (или времени распада) второго инертного и

спектрально сопоставимого флуорофора, 4-дицианометилен-2-метил-6-(4-(диметиламино)стирил)-4Н-пирана (табл. 1). Чувствительность полученных сенсоров к CO_2 зависела от pK_a индикатора, природы противоиона ИЖ и основания, использованного в буферной системе [41].

Сенсоры, основанные на измерении поглощения ТС и БТС, использовали для полуколичественного определения CO_2 в диапазонах 0 – 100% и 0 – 2% соответственно. Логометрический флуоресцентный сенсор с ГПТСК, созданный с использованием лабораторно синтезированной $[\text{BMIm}][\text{Tos}]$, давал значительно более сильный отклик на CO_2 в диапазоне значений от 0 до 20% по сравнению с материалами на основе $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$. Причина различной чувствительности описанных материалов обусловлена лучшей растворимостью CO_2 в ИЖ с более объемным анионом, Tos^- [41]. Таким образом, для определения малых концентраций углекислого газа в целях клинической диагностики, экологического мониторинга, биотехнологии, технологии упаковывания пищевых продуктов предпочтительнее использовать материалы, полученные с использованием $[\text{BMIm}][\text{Tos}]$, а не $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$. Стоит отметить, что эти новые материалы оказались весьма стабильными при хранении в течение длительного времени, чего нельзя сказать о фотостабильности иммобилизованных в них флуорофоров. К сожалению, приведенные в литературе данные не позволяют сравнить свойства материалов на основе эмульсии, полученных в присутствии и в отсутствие ИЖ.

Группа ирландских ученых разработала простую, гибкую, автономную, не содержащую электроники микрофлюидную систему на основе ионогеля – полимерного геля в $[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{DCA}]$ (рис. 3) и четырех кислотно-основных индикаторов (метилового красного, бромкрезолового зеленого, пурпурного и бромтимолового синего) для мониторинга в режиме реального времени pH пота спортсменов в процессе тренировок [42].

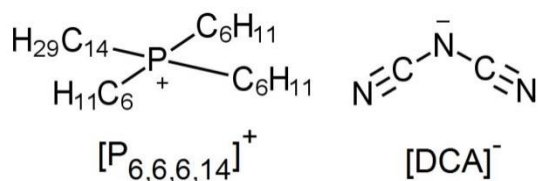


Рис. 3. Структуры катиона и аниона $[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{DCA}]$.

Заключенную в пластырь систему спортсмен прикрепляет к руке и может наблюдать визуально изменение окраски сенсора во времени. Колориметрический метод, основанный на сравнении окрасок сенсора со стандартными цветовыми шкалами, позволяет определять pH в интервале 4.5 – 8 (типичный интервал pH пота человека 5 – 7) с точностью до 0.49 ед. (рис. 4). Возможны запись сигнала сен-

сора на цифровую фото или видео камеру и передача полученного изображения специалисту с помощью коммуникационных электронных устройств типа «умной пыли» или мобильного телефона.

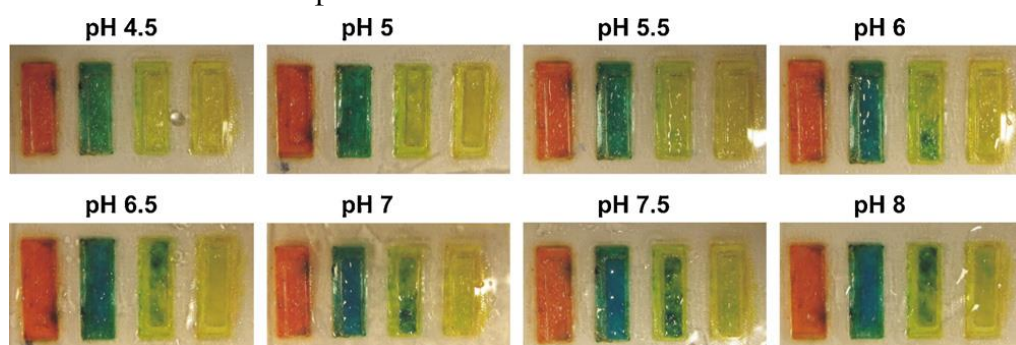


Рис. 4. Фотографии микрофлюидной системы на основе $[P_{6,6,6,14}][DCA]$ при различных значениях pH стандартного раствора искусственного пота: 20 г/л NaCl, 17.5 г/л водного раствора NH_3 , 5 г/л уксусной кислоты и 15 г/л молочной кислоты [42].

Микрофлюидная платформа содержит четыре независимых резервуара и канала, сформированные в шести слоях полиметилметакрилата (ПММА) и чувствительного к давлению клейкого материала с помощью CO_2 лазерной абляции и ламинирования (рис. 5).

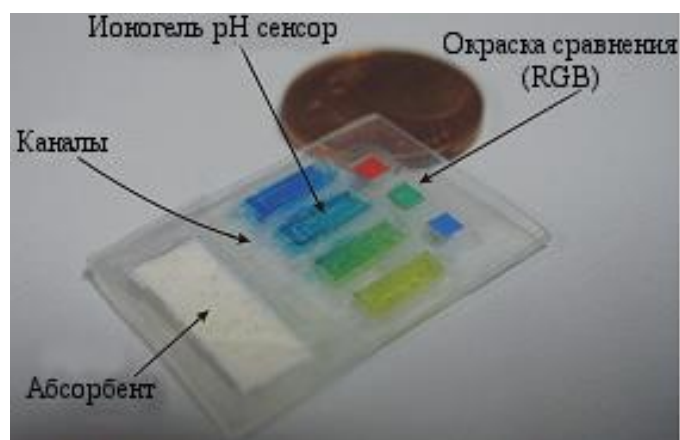


Рис. 5. Устройство микрофлюидной платформы (размер 20 мм × 17 мм) [42].

Каналы соединены с резервуарами, содержащими ионогели с указанными выше индикаторами, и с резервуаром, в котором находится хлопчатобумажное абсорбционное волокно, впитывающее пот с кожи человека. Для удобства считывания аналитического сигнала на платформе имеются окраски сравнения. Методика приготовления ионогеля с включенными в него индикаторами достаточно сложна и описать ее подробно в рамках настоящего обзора не представляется возможным. Скажем лишь, что ионгель представлен не одним, а двумя мономерными единицами: N-изопропилакриламидом и N,N'-метилен-бис(акриламидом), которые растворяют в ИЖ при нагревании до 45°C в течение 10 мин. Реакцию радикальной полимериза-

ции мономеров в растворе ИЖ инициируют с помощью УФ-излучения определенной мощности, в результате чего получают желаемые структуру ионогеля и его физическую консистенцию. Этанольные растворы красителей вводят в ионогель после его полного высушивания при комнатной температуре. Эту процедуру повторяют не менее трех раз. Вымывание красителей при эксплуатации сенсора не наблюдается, однако сенсоры являются одноразовыми. В отличие от вышеописанных сенсорных систем в рассмотренной микрофлюидной системе ИЖ играет роль растворителя мономеров для полимерной матрицы и практически не влияет на качество получаемого материала. Последнее, главным образом, зависит от соблюдения условий реакции радикальной полимеризации мономеров.

1.1.1. Оптические системы и сенсоры на основе целлюлозы

Целлюлоза является биосовместимым, биodeградируемым, нетоксичным и недорогим природным материалом. Перечисленные свойства особенно важны при использовании целлюлозных матриц для иммобилизации таких чувствительных реагентов, как ферменты. К настоящему времени с участием ИЖ предложено много различных целлюлозных материалов в виде пленок, шариков, волокон, губчатых материалов и т.д. [29, 30]. Их создание стало возможным, благодаря растворению микрокристаллической целлюлозы в некоторых гидрофильных ИЖ, что впервые обнаружила группа Роджерса Р.Д. (Rogers R.D.) в 2002 г. [61].

В последнее десятилетие все большее внимание в литературе уделяется объяснению причин хорошей растворимости целлюлозы и целлюлозных материалов (например, лигнина и древесины) в ИЖ [29, 30, 62]. В публикациях, посвященных получению и практическому применению растворов целлюлозы в ИЖ [62, 79, 80], утверждается, что ИЖ переводит целлюлозу в раствор по механизму «прямого» растворения, важную роль в котором играют взаимодействия между анионом ИЖ и ОН-группами целлюлозы. Благодаря особенно высокой акцепторной способности ацетат- и хлорид-анионов имидазольных ИЖ по отношению к ОН-группам целлюлозы, в ней разрушается сеть водородных связей, что, в конце концов, приводит к растворению целлюлозы в ИЖ [79, 80]. Интересен тот факт, что в отличие от природных полимеров, синтетические полимеры плохо растворимы в ИЖ [79, 80]. Роль катиона ИЖ в процессе растворения целлюлозных материалов до сих пор обсуждается [62], однако стоит отметить, что экспериментальные данные и математические расчеты показали, что наилучшей растворяющей способностью по отношению к целлюлозе обладают ИЖ с катионами на основе двузамещенного имидазольного кольца с длиной алкильных заместителей не более 6 атомов углерода [79]. При растворении целлюлозы могут разрушаться не только водородные связи, но также углевод-углеводные связи и водородные связи между молекулами воды

[63]. Кроме того, нельзя пренебрегать Ван-дер-Ваальсовыми и гидрофобными взаимодействиями между целлюлозой и ИЖ, а также конфигурацией гидрофобных и гидрофильных участков молекулы целлюлозы [63]. Исследователи [64] отмечают, что растворимость целлюлозы зависит от степени ее полимеризации, температуры растворения и, что особенно важно, содержания воды в ИЖ. На последнее обстоятельство следует обращать особое внимание при создании целлюлозных пленок. Только хорошо высушенная ИЖ позволяет получить оптически прозрачные и прочные целлюлозные пленки.

Обычно для осаждения целлюлозы из ее раствора в ИЖ в качестве антирастворителя¹ используют воду [27, 47, 48]. В результате получают прозрачные, тонкие и гибкие целлюлозные пленки, которые служат подложкой для нековалентной и ковалентной иммобилизации биокатализаторов. Целлюлозные пленки, содержащие ферменты, в литературе [65] часто называют гидрогелями. В работе [27] в качестве модельного фермента для иммобилизации в такие пленки выбрали лакказы из *Rhus vernicifera*. Микрокристаллическую целлюлозу растворяли в [ВМІм][СІ] (целлюлоза : ИЖ = 4.75 масс. %²), используя импульсное нагревание до 100°C в бытовой микроволновой печи. Раствор лакказы готовили в трех ИЖ: [НМІм][СІ], [ВМІм][СІ] или [ВМІм][Тf₂N]. Раствор фермента в каждой из перечисленных ИЖ добавляли к переохлажденному раствору целлюлозы в [ВМІм][СІ], полученную смесь осторожно перемешивали. Далее раскатывали пленку (толщиной 100-150 мкм), промывали водой для удаления избытка ИЖ и высушивали на воздухе. Пленки были прозрачными и гибкими во всех случаях, кроме того, когда фермент растворяли в гидрофобной ИЖ, [ВМІм][Тf₂N]. Прозрачности других пленок добились выдерживанием в воде в течение 24 ч.

Каталитическую активность лакказы оценивали по максимуму поглощения синрингалдазина и/или его продукта окисления кислородом, имеющего розовую окраску (табл. 1). В течение суток пленку выдерживали в растворе субстрата, затем помещали на стекло, где она удерживалась силами адгезии, после чего стекло с пленкой устанавливали в кюветное отделение спектрофотометра и измеряли поглощение пленки. Лакказа, предварительно растворенная в [ВМІм][Тf₂N], сохраняла до 29% ее первоначальной активности в водном растворе, в то время как остаточная активность фермента, растворенного в [ВМІм][СІ], составляла лишь 18%. Такой эффект объясняют тем, что гидрофобная [ВМІм][Тf₂N] в отличие от гидро-

¹ Антирастворитель – растворитель, используемый для отмывания ИЖ, осаждающий целлюлозу.

² Здесь и далее, масс. % — массовое отношение целлюлозы к ИЖ, выраженное в процентах.

фильной [BMIm][Cl] защищает гидратную оболочку лакказы от разрушительного действия ионов Cl^- при их большой концентрации [27].

Потеря каталитической активности фермента может быть обусловлена потерей конформационной гибкости лакказы при помещении в матрицу подложки и/или уменьшением скоростей диффузии субстрата (или продукта) внутрь и из пленки [47]. Для решения такого рода проблем авторы модифицировали поверхность целлюлозных пленок различными полиаминами с высокой концентрацией первичных аминогрупп. Последние восстанавливали глутаровым альдегидом, а затем фермент, находящийся в цианоборгидридной среде, присоединяли к поверхности пленки. Избыток фермента, электростатически связанного с пленкой, удаляли промыванием. Ковалентно иммобилизованная лакказа сохраняла по крайней мере 50% первоначальной активности, что практически в 2 раза выше, чем в случае нековалентно иммобилизованного биокатализатора [27]. Таким образом, была практически решена проблема недостаточно высокой скорости диффузии субстрата к ферменту, иммобилизованному в пленке.

Исследовательская группа Роджерса Р.Д. предложила еще один подход к ковалентной иммобилизации лакказы на поверхности целлюлозной пленки, восстановленной из [BMIm][Cl] [48]. Этот подход позволяет увеличить количество аминогрупп, доступных для биоконъюгации. Для модификации поверхности пленки выбрали биосовместимые полиамидаминные дендримеры, содержащие вторичные и первичные аминные группы. Глобулярная структура этих соединений имитирует 3D-структуру биомолекул. Дендримеры первого, второго и третьего поколений с высоким содержанием первичных аминогрупп (8, 16 и 32 аминогруппы на одну молекулу дендримера соответственно) ковалентно связывали с поверхностью целлюлозной пленки при помощи связывающего агента 1,3-фенилендиизоцианата. Интересен тот факт, что в реакции окисления сирингалдазина кислородом пленки, модифицированные дендримером с ковалентно иммобилизованной лакказой, были более активны, чем пленки, приготовленные простым смешением целлюлозы и дендримера. Напротив, термическая стабильность лакказы на поверхности целлюлозной пленки не зависела от методики иммобилизации [48]. Улучшению специфической активности фермента способствовало не присутствие ИЖ, а большее количество функциональных групп на поверхности пленки. Стабильность лакказы, иммобилизованной как на поверхности пленки, так и внутри нее, не изучена.

Кляйн М.П. (Klein M.P.) и соавторы предложили методику ковалентной иммобилизации β -галактозидазы (фермента класса гидролаз) в пленку из ацетата целлюлозы [49], которая существенно отличается от вышеописанных методик [27, 47-48]. Гидрофобную ИЖ, [BMIm][Tf₂N], вмешивали в специально приготовленный вяз-

кий сироп ацетата целлюлозы (ацетат целлюлозы : ИЖ = 500 масс. %) в ацетоне. К полученной смеси добавляли раствор гидрата триэтилентетрамина в CH_3COOH , смесь перемешивали до образования гомогенной фазы. Пленки получали путем распределения гомогенного раствора по стеклу. Добавка полиамина обеспечивала присутствие в целлюлозной пленке аминогрупп, необходимых для дальнейшей иммобилизации фермента путем стандартной сшивки глутаровым альдегидом. Пленки активировали 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М ФБР (рН 7.0). Активированные пленки много раз промывали буферным раствором и переносили в раствор β -галактозидазы в 0.1 М ФБР, содержащем добавку 1.5 мМ раствора MgCl_2 – регулятора каталитической активности фермента. Полученную реакционную смесь оставляли на 15 ч при 8°C при медленном перемешивании. После иммобилизации избыток фермента удаляли промыванием пленок в ФБР до снижения каталитической активности промывных вод практически до нуля. Для удаления нековалентно связанных с целлюлозной подложкой молекул белка пленки промывали 1М раствором NaCl и 30%-ным раствором этиленгликоля [49].

Каталитическую активность полученных ферментных препаратов определяли спектрофотометрически по скорости реакции гидролиза *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (ОНГП). Ковалентно иммобилизованный фермент сохранял 60% первоначальной каталитической активности. Полученные целлюлозные пленки можно использовать для гидролиза лактозы по крайней мере 16 раз при 7°C с минимальной потерей активности [49]. Благодаря $[\text{BMIm}][\text{Tf}_2\text{N}]$, макромолекулы ацетата целлюлозы лучше распределяются в объеме раствора, в результате чего повышается способность к формообразованию пленки, и, в конечном счете, ее гибкость.

Пленки, полученные растворением-осаждением целлюлозы из $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$, использовали для колориметрического и флуоресцентного определения ионов некоторых переходных и тяжелых металлов. В такие пленки вместо биокатализаторов включали различные аналитические реагенты [43, 44, 46]. Целлюлозные пленки, модифицированные 1-(2-пиридилазо)-2-нафтолом (ПАН) и 1-(2-тиазолилазо)-2-нафтолом (ТАН), оказались подходящими для количественного определения ионов Zn(II) , Ni(II) и Mn(II) на уровне 1 мкмоль/л [44]. Для получения таких пленок малые количества реагента (~ 1 ммоль/г носителя) добавляли в горячий раствор целлюлозы (1.5–2.0 масс. %) в $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$. Горячую смесь сразу выливали на стекло так, что образовывался слой вязкого раствора. Этот слой тщательно промывали водой до образования пленки набухшей целлюлозы. Количество реагента, вымываемого в процессе промывки, определяли визуально или с помощью качественной реакции. Далее целлюлозную пленку осторожно отделяли от стекла и высушивали

при комнатной температуре. Модифицированные целлюлозные пленки были гибкими, но непрозрачными. Маленький квадратный кусочек пленки (9 мм²) помещали в раствор соли металла, оставляли на определенное время, высушивали в течение 1 мин и сканировали обычным офисным сканером. Аналитический сигнал позволял оценить поглощение ПАН (ТАН)-модифицированной целлюлозной пленкой ионов металлов из растворов их солей в результате образования соответствующих комплексов. Отсканированное изображение разделяли на части с однородным цветом, которые затем обрабатывали с помощью специального программного обеспечения, в результате чего получали среднее значение цветовых составляющих R, G, B (красный, зеленый, синий) и H, S, V (насыщенность, цвет, яркость) и их дисперсию [44]. Полученные целлюлозные пленки можно было использовать повторно после достаточно простой их регенерации путем последовательной промывки в 1М HNO₃, 0.5М NaOH и воде.

Группа Роджерса Р.Д. разработала аналогичные ПАН-модифицированные целлюлозные пленки для визуального и спектрофотометрического определения ионов Hg(II) [43]. Целлюлозные пленки (целлюлоза : ИЖ = 10 масс. %), содержащие инкапсулированный ПАН, были непрозрачными и имели оранжевую окраску. Комплекс Hg(II)-ПАН образовывался при контакте пленки с водным раствором Hg(II) в течение 1–10 мин в зависимости от концентрации ртути (II) в диапазоне от 5 до 100 ppm. При более высоких концентрациях ионов Hg(II) оранжевая окраска ПАН-модифицированных целлюлозных пленок практически мгновенно переходила в фиолетовую окраску комплекса Hg(II)-ПАН. При более низких концентрациях изменение цвета можно было заметить визуально примерно через 5 мин после контакта пленки с раствором Hg(II). Поглощение пленки при 600 нм, соответствующее максимуму поглощения комплекса, возрастало с увеличением концентрации Hg(II), в то время как поглощение несвязанного ПАН при 400 нм уменьшалась. Для регенерации пленок их помещали в 2М уксусную кислоту, в результате чего пленки вновь приобретали оранжевую окраску. Однако после 5 использований регенерация становилась невозможной из-за вымывания инкапсулированного реагента из целлюлозной матрицы. Определению Hg(II) мешают сопоставимые концентрации Cu(II) и Zn(II).

Кроме того, группа Роджерса Р.Д. создала целлюлозные пленки с иммобилизованными каликс[4]аренами, образующими комплексы с NO₂ и N₂O₄, для определения этих газов [45]. Использованные каликсарены отличались структурой радикальных заместителей (рис. 6).

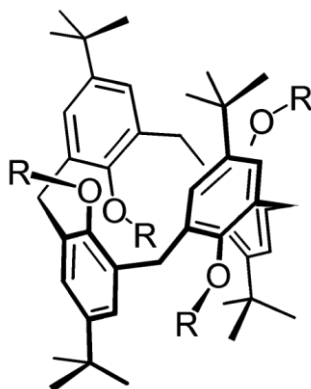


Рис. 6. Структура каликс[4]аренов: Каликс 1 ($R = (CH_2)_5CH_3$) и Каликс 2 ($R = (CH_2)_2CH_3$) [45].

Для создания целлюлозных пленок Каликс 1 и Каликс 2 растворяли в минимально возможном количестве диметилсульфоксида (ДМСО) при 70°C и воздействии ультразвука в течение 2 ч. Затем к этим растворам добавляли $[BMIm][Cl]$ (Каликс : ИЖ = 1 : 1000 масс. %) и после нагревания и воздействия ультразвуком в течение еще 10 мин к смеси добавляли целлюлозу (целлюлоза : ИЖ = 1 : 10 масс. %); условия растворения сохраняли теми же еще в течение 4 ч. Затем раствор центрифугировали для удаления нерастворенных частиц, выливали на стекло и формировали пленку с помощью специального устройства. Для удаления из пленки пузырьков воздуха, ее нагревали феном. Пленки промывали водой, оставляли еще на 24 ч в новой порции воды для полного удаления остатков ИЖ (при этом каликсарены не вымывались). Пленки хранили в воде до момента использования.

Сигнал пленки в присутствии NO_2 и N_2O_4 измеряли двумя способами. При первом способе регистрации пленку сначала помещали в 3.8 мкМ раствор $SnCl_4$ в 99%-ной трифторуксусной кислоте (ТФУ), а затем – в хлороформ. Далее через раствор барботировали смесь газов NO_2 и N_2O_4 , полученных при реакции Cu с $HNO_{3\text{конц.}}$. Окрашивание пленки в темно-фиолетовый цвет свидетельствовало об образовании комплекса каликсарен- NO^+ . Кислота Льюиса, $SnCl_4$, стабилизировала этот комплекс. Пленку можно было использовать дважды после регенерации в хлороформе. Второй способ регистрации сигнала отличался тем, что раствор $SnCl_4$ в ТФУ наносили на пленку капельным методом, а газы пропускали непосредственно через пленку, помещенную на стеклянный фильтр колбы Бунзена, в которой эти газы получали. Поглощение окрашенной в темно-фиолетовый цвет пленки в обоих случаях измеряли относительно пленки без комплекса.

При регенерации пленки путем ее погружения в воду не только разрушался комплекс каликсарен- NO^+ , но и вымывался $SnCl_4$. При повторной обработке раствором $SnCl_4$ в ТФУ пленка разрушалась, что делало невозможным ее многократное использование. Пленки сохраняли хорошие механические свойства и были удобны в эксплуатации при их регенерации в камере с контролируемой влажностью на уровне 80%. Применение таких камер позволило использовать пленки до 4 раз. Перед каждым последующим использованием удаляли избыток влаги из плен-

ки, для чего ее либо промокали фильтровальной бумагой, либо высушивали в сушильном шкафу при 50°C в течение 3 ч, что приводило к разрушению некоторых пленок. К сожалению, в описанной работе показана только возможность определения NO_2 и N_2O_4 , селективность разработанного материала, диапазон определяемых концентраций, возможность определения других NO_x газов, стабильность при длительном хранении не изучены.

Тан (Tan) и соавторы создали прозрачные, тонкие и гибкие целлюлозные гидрогели (рис. 7) для селективного флуоресцентного определения иона меди (II) [46]. Методика получения целлюлозных пленок в целом была аналогична описанным выше методикам [43, 44] с той лишь разницей, что содержание целлюлозы в целевом материале было значительно больше (целлюлоза : ИЖ = 20 масс. %). Определение ионов Cu(II) в диапазоне концентраций 0.1–1 мкМ основано на селективном тушении флуоресценции комплексов $\text{Eu(ДПК)}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Tb(ДПК)}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ДПК — дипиколиновая кислота), включенных в целлюлозные пленки (рис. 7). При этом никакие другие ионы металлов не оказывают подобного влияния (табл. 1). Указанные комплексы обладают интенсивной флуоресценцией, которую можно увидеть даже невооруженным глазом.

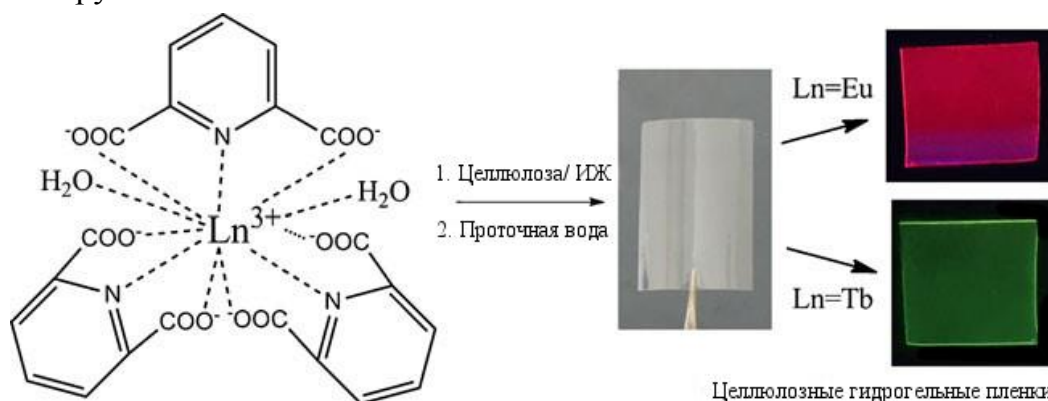


Рис. 7. Схема получения целлюлозных тонких пленок, содержащих комплексы Eu(III) и Tb(III) с ДПК, и фотографии пленок после их облучения УФ-светом, 254 нм [46].

Благодаря защитному действию матрицы гидрогеля, стабильность и термостабильность импрегнированных в пленку комплексов Eu(III) и Tb(III) значительно превосходят таковую в растворе [46]. Тем не менее, хранить полученные пленки до момента их использования все-таки рекомендуют в замороженном состоянии.

С помощью ИЖ создают материалы не только на основе целлюлозы и ее производных. Среди других используемых биополимеров следует упомянуть такие, как хитин, хитозан, шелк, фиброин [81] и ДНК, которым также придают форму пленок, мембран, сфер и др. [65]. В последние годы большое внимание уделяется материалам, полученным при сорастворении в ИЖ двух или более биополимеров (например, целлюлозы–агарозы, целлюлозы–хитозана). Такие материалы представляют интерес в качестве композитов для решения ряда специфических задач и но-

вых матриц для иммобилизации ферментов [66]. Последние достижения и открытия в области применения таких композитных материалов в сенсорных технологиях могут служить темой отдельного обзора.

1.2. Использование ионных жидкостей в качестве специфической добавки к полимерной матрице

ИЖ использовали в качестве специфической добавки к таким полимерам, как этилцеллюлоза, ЭЦ, и/или ПММА [50–54]. Полученные сенсорные материалы в виде однородных тонких пленок на полиэфирной подложке предназначались для определения газов и ионов тяжелых металлов. Благодаря хорошей адгезии по отношению к ЭЦ и ПММА, оптически прозрачная, непроницаемая для ионов полиэфирная подложка обеспечивала возможность работы с тонкими пленками [51].

В пленке на основе ЭЦ для определения CO_2 [50], так же, как и в случае золь-геля [41], использовали флуоресцентный индикатор ГПТСК, а точнее ионную пару ГПТСК и четвертичного аммониевого основания, гидроксид тетраоктиламмония, **ТОАОН**. Такая ионная пара обладала более высоким сродством к ЭЦ матрице. Более того, ионная пара имела высокие поглощение, квантовый выход, фотостабильность и продолжительное время жизни.

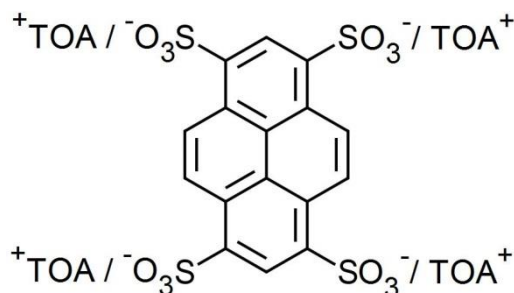


Рис. 8. Структура ионной пары, $(\text{ГПТСК})(\text{ТОА})_4$ [41].

Для приготовления сенсорного материала ЭЦ смешивали с пластификатором, диоктилфталатом (**ДОФ**), **ТОАОН** и $(\text{ГПТСК})(\text{ТОА})_4$ в тетрагидрофуране (**ТГФ**). После этого в смесь добавляли $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$. Полученную смесь подщелачивали.

Схема измерения аналитического сигнала основана на двух процессах. Первый — диффузия CO_2 сквозь мембрану в раствор. Второй — взаимодействие газа и анионного, сильно флуоресцирующего ГПТСК-фенолят аниона. Содержащаяся в индикаторе в следовых количествах вода приводила к тому, что при взаимодействии его с CO_2 образовывалась угольная кислота. Гидратация CO_2 и последующий фотолиз уменьшали интенсивность флуоресценции ГПТСК и превращали флуоресцирующий ГПТСК-анион (Dye^-) в менее флуоресцирующий DyeH [50]. В сен-

сорной системе на основе ИЖ для определения газообразного CO_2 протекала следующая реакция:



В описанном случае ИЖ вместе с ТОАОН использовали в качестве внутренней буферной системы. В присутствии следовых количеств воды $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ путем анионного обмена с ТОАОН превращалась в $[\text{EMIm}][\text{OH}]$. Таким образом, вследствие нейтрализации CO_2 и образования $[\text{EMIm}][\text{HCO}_3]$, $[\text{EMIm}][\text{OH}]$ играла роль системы, подобной буферной. Благодаря ИЖ, чувствительность сенсора возрастала, гиперболическая зависимость отклика сенсора на основе $(\text{ГПТСК})/(\text{ТОА})_4$ в диапазоне концентраций 0–100% CO_2 выпрямлялась, фотостабильность повышалась, а время жизни сенсора увеличивалось вплоть до 95 дней при нормальных условиях. Отметим, что сенсоры без ИЖ переставали давать отклик через 3 дня.

Группа Айдогду (Aydogdu) использовала $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ как специальную добавку для разработки наноразмерных CO_2 -сенсоров на основе ЭЦ и ПММА, работающих по принципу тушения флуоресценции ГПТСК [50, 51]. Сенсорный материал представлял собой электроспряденные нановолокнистые мембраны в виде тонких пленок диаметром 1.2 см. Сенсорную полимерную смесь готовили по методике, аналогичной описанной выше [51]. Электроспряденные нановолокнистые мембраны получали из жидкой полимерной смеси с помощью специального оборудования и методики, которые в деталях описаны и обсуждены в недавнем обзоре [67]. Полученные мембраны с 3D-структурой характеризовались уникальной комбинацией гибкости и прочности, были удобными в использовании, что делает их подходящим материалом не только для определения CO_2 , но и других газов.

Благодаря присутствию ИЖ, жидкая полимерная смесь приобретала оптимальную вязкость и обладала более высокой электропроводностью, что способствовало получению нановолокнистого материала без узелков при более низких концентрациях полимера методом электропрядения. Более того, поскольку ИЖ поглощала кислотные частицы из окружающего воздуха лаборатории, добавка ИЖ повышала фотостабильность красителя, $(\text{ГПТСК})(\text{ТОА})_4$, в полимерной матрице [50, 51]. Наконец, добавка $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ в полимерную смесь повышала воспроизводимость и стабильность CO_2 сенсора с 95 дней [50] до 7 мес [51]. Время регенерации сенсора под действием N_2 , плохо растворимого в ИЖ, составляло около 2, а не 3 мин, как в случае однородных пленок [51]. Разработанные электроспряденные волокна обладали более высокой пористостью, большей удельной поверхностью и высокой газовой проницаемостью по сравнению с однородными пленками [51].

Смесь газов CO_2 и N_2 подводили к проточной кювете, содержащей сенсорный агент, с помощью специальной диффузионной иглы при комнатных условиях либо

после увлажнения воздуха, либо без него [51]. Типичный кинетический отклик однородной пленки для определения CO_2 представлен на рис. 9.

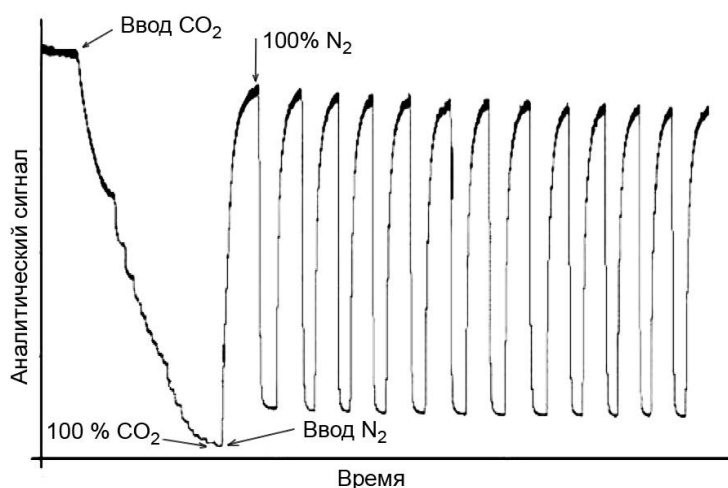


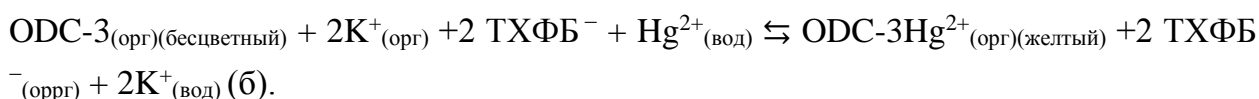
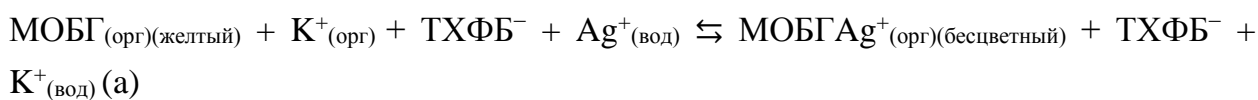
Рис. 9. Типичный кинетический отклик тонкой чувствительной пленки на основе ЭЦ/ПММА с (ГПТСК)(ТОА)₄ в качестве индикатора для определения CO_2 [51].

Чувствительные к кислороду волокна из ЭЦ и ПММА с иммобилизованным комплексом $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ (рис. 1) также получали путем электроформования [52]. Для определения кислорода использовали его способность тушить флуоресценцию рутениевого комплекса. Смешиваемые с водой $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$, $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$, $[\text{BMIm}][\text{SCN}]$ и несмешиваемая $[\text{BMIm}][\text{PF}_6]$ служили добавкой к полимерной матрице. В смеси, содержащей тиоцианат-ион, наблюдали трех-экспоненциальный распад флуоресцирующего комплекса в присутствии и отсутствие O_2 . Это может быть объяснено делокализацией орбиталей лиганда бипиридила и уменьшением времени жизни рутениевого комплекса [52]. Присутствие фтора в виде BF_4^- или PF_6^- повышало растворимость кислорода внутри матрицы. Самым высоким относительным сигналом и чувствительностью к O_2 обладал материал, содержащий 25 масс. % $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$. Тот факт, что ни использованный полимер, ни $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ не влияли на оптические характеристики рутениевого комплекса, свидетельствует о том, что в присутствии кислорода происходит динамическое тушение флуоресценции. Время отклика и регенерации сенсорных волокон после обработки 100 и 0% O_2 были меньше по сравнению с таковыми значениями для тонких пленок (табл. 1). Время жизни и интенсивность флуоресценции рутениевого комплекса в полимерной матрице с добавкой ИЖ существенно не уменьшались в течение 44 мес хранения [52].

Результаты сравнительного исследования аналитических характеристик электроспряденных нановолокон и однородных пленок на основе ЭЦ и ПММА использовали для определения $\text{Ag}(\text{I})$ и $\text{Hg}(\text{II})$ [53, 54]. Сенсорную смесь готовили в соответствии с описанной выше методикой [50–52]. Чувствительные флуороионофоры

– 1,2-бис(4-метоксибензилиден)гидразин (**МОБГ**) и производное карбазола 2-(9-метил-9H-карбазол-3-ил)-5-(пиридин-4-ил)-1,3,4-оксидиазол (**ОДК-3**) – использовали в качестве индикаторов для определения Ag(I) и Hg(II) соответственно. Оба красителя синтезировали в лаборатории. При добавлении этих красителей в ЭЦ и ПММА матрицы вместе с анионной добавкой тетраакс-(4-хлорфенил)борат калия (**ТХФБК**), МОБГ и ОДК-3 превращались в селективные реагенты для определения Ag(I) и Hg(II) соответственно [53, 54]. Ионы металлов селективно экстрагировали по механизму ионного обмена в электроспряденные нановолокна (или однородные пленки) с помощью анионных добавок, в то время как ионы калия диффундировали из мембраны в водную фазу.

Механизм появления отклика красителей МОБГ (а) и ОДК-3 (б) может быть проиллюстрирован следующими реакциями ионного обмена:



В обоих случаях образовывался комплекс флуороионофора с ионом металла в основном состоянии, однако, комплекс ОДК-3 и ионов ртути (II) оказался непрочным. В этой системе наблюдалось смешанное тушение, обусловленное как столкновениями частиц (динамическое), так и образованием комплекса (статическое), в то время как в системе с Ag(I) – только статическое тушение. Обнаружено, что [EMIm][BF₄] повышает фотостабильность ионофоров в полимерной матрице за счет способности поглощать кислотные и основные частицы воздуха лаборатории [54, 55].

Аналитические характеристики разработанных сенсоров для определения Ag(I) и Hg(II) представлены в табл. 1. Как можно судить по данным таблицы, электроспряденные волокна обладают как минимум в 100 раз более высокой чувствительностью к ионам обоих металлов по сравнению с однородными пленками. Нановолокна на основе ЭЦ и ПММА позволяют определить 10⁻³ моль/л ионов серебра и ртути(II), при этом определению этих ионов металлов не мешает присутствие ряда катионов и неорганических анионов в сопоставимых с Hg(II) концентрациях. Только ионы Sn²⁺ в концентрации 10⁻³ моль/л мешают определению Ag(I). Отклик ОДК-3 сенсора значительно изменяется в присутствии ионов Fe³⁺, Ag⁺, Pb²⁺, HCO₃⁻ и OH⁻. Ионофоры МОБГ и ОДК-3, инкапсулированные в матрицу, показали хорошую стабильность: при хранении сенсоров при комнатных условиях их флуоресцентный сигнал практически не изменялся в течение 7 и 5 месяцев соответственно.

1.3. Использование ионных жидкостей как материала матрицы

Смешиваемые с водой ИЖ, [BMIm][BF₄] и [BMIm][Br], использовали в качестве материала матрицы в сенсорных флуоресцентных системах для определения CO₂ в газообразном и растворенном состоянии [55]. Разработанный тип сенсорного материала имеет фундаментальное сходство с оптиковолоконными сенсорами, которые, как правило, содержат CO₂-проницаемую мембрану, заполненную раствором pH-чувствительного красителя (колориметрическим или флуоресцентным кислотно-основным индикатором) [68]. Сенсорную смесь готовили растворением ГПТСК в ИЖ с или без добавки ТБАОН. Указанный четвертичный гидроксид использовали в качестве внутреннего буферного раствора, который стабилизировал депротонированную форму красителя. В отличие от CO₂ сенсоров, описанных выше [50, 51], этот оптический сенсор не имеет полимерной матрицы.

Смесь газов вводили в кювету с сенсорной смесью с помощью диффузионной иглы при комнатных условиях либо сразу, либо после предварительного насыщения влагой посредством барботирования газа через воду, нагретую до 35°C. Образец с неизвестной концентрацией растворенного CO₂ добавляли в кювету с сенсорной смесью вместе со стандартным раствором NaHCO₃ [55]. Интенсивность флуоресценции ГПТСК в [BMIm][BF₄] и [BMIm][Br] уменьшалась с увеличением концентрации газообразного или растворенного CO₂. Следует отметить, что флуоресценция изученных ИЖ в интересующем диапазоне длин волн была пренебрежимо мала и не влияла на чувствительность красителя. Поскольку изменение сигнала было полностью обратимым, количество используемой ИЖ в течение 6–10 рабочих циклов одной порции сенсорной смеси составляло 1 мл, что является относительно малым расходом дорогостоящего реагента.

Благодаря использованию в качестве матрицы ИЖ, и в особенности [BMIm][BF₄], значительно повысилась стабильность CO₂-сенсора, а время его хранения увеличилось до 7 мес. Более того, поскольку смешиваемая с водой ИЖ содержит следовые количества воды, дополнительное увлажнение для работы сенсора не требовалось [55]. Чувствительность определения растворенного CO₂ была в 100 раз выше при использовании сенсорной смеси с [BMIm][BF₄]. Это может быть связано с каталитическим эффектом иона фтора, входящего в состав тетрафторборатного аниона, на образование бикарбонат-иона по следующей реакции: $2F^- + H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + HF_2^-$ [51]. Сенсор для определения газообразного CO₂, основанный на [BMIm][Br], обладал более широким динамическим диапазоном, чем сенсор на основе [BMIm][BF₄] (табл. 1). Несмотря на это, рабочий динамический диапазон для растворенного CO₂ (табл. 1) с обеими ИЖ был сопоставим с таковым для других оптических сенсоров на CO₂ [50, 51], включая сенсоры, созданные с использо-

ванием ИЖ (табл. 1). Время отклика для CO₂-определяющего коктейля составляло 1–2 мин при замене N₂ на CO₂ и 7–10 мин при замене CO₂ на N₂.

Интересно отметить, что некоторые ИЖ вместе с чувствительными флуоресцентными красителями успешно использованы для разработки микрокапельного температурного сенсора. Интенсивность флуоресценции индикаторного красителя, растворенного в ИЖ, измеряли как функцию от температуры. Несмотря на то, что описание подобных сенсоров лежит за пределами нашего обзора литературы, мы не можем не упомянуть о нем, поскольку этот сенсор представляет собой пример необычного применения ИЖ. Для создания температурного сенсора два флуоресцентных индикатора, родамин Б и родамин 110, растворяли в ИЖ, [EMIm][ESO₄], а затем инкапсулировали в парилен-С, используя вакуумный метод нанесения парилена на жидкость. Парилен-С наносили непосредственно на поверхность жидкости, где он полимеризовался, при этом ИЖ не испарялась даже в вакуумной камере и не мешала процессу полимеризации. В результате каплю красителя запечатывали химически стабильной и проницаемой тонкой пленкой парилена, которая предотвращала вымывание красителя и сохраняла его объем и концентрацию постоянными [69]. Более того, красители одинаково вели себя и в ИЖ и в воде. Микрокапельный сенсор имел диаметр 40 мкм и определял температуру на разной глубине воды от 0 до 850 мкм. Подобный сенсор может найти свое применение для контроля температуры в микроструйных капиллярах, например в капиллярном электрофорезе, и для измерений температуры при изменениях оптического пути между линзой объектива и каплей [68].

Недавно Жао (Zhao) и соавторы опубликовали информацию о новом методе создания нанопористых полиэлектролитных мембран без подложки (ПЭМ) с использованием электростатического комплексообразования между катионной поли(ионной жидкостью) или полимеризованной ИЖ (ПИЖ) и полианионом [70]. В качестве модельного катионного полиэлектролита выбрали ПИЖ на основе катиона имидазолия, [PCMVIIm][Tf₂N]. В качестве анионной части ПЭМ выбрали полиакриловую кислоту (ПАК), широко известную, как слабый электролит. Главная отличительная черта предложенной методики заключается в объединении процесса образования мембраны и создания нанопор. Синтез ПЭМ включает два этапа. Первый — растворение [PCMVIIm][Tf₂N] и ПАК в ДМФА при эквимолярном соотношении 1:1 в пересчете на мономер. Полученный гомогенный раствор раскатывали на стекле и высушивали в течение 1 ч при 80°C. Второй — погружение полученной пленки в водный раствор NH₃ или NaOH и выдерживание в нем в течение 2 ч. В результате такой процедуры частицы акриловой кислоты приобретали заряд, и внутри пленки образовывалась нанопористая структура. После этого получалась

желтоватая, гибкая мембрана без подложки. Обнаружено, что гидрофобность ПИЖ, которая зависит от природы противоионов, является необходимым условием для создания мембраны с иерархической структурой пор.

Для демонстрации возможности аналитического использования разработанной мембраны, ею покрыли интерферометр из тонких волокон и протестировали возможность определения рН в диапазоне от 2 до 10 ед. Важно отметить, что высокая чувствительность предложенного рН-метра сочеталась с быстрым откликом, который составлял 5 с после изменения рН от 3.96 до 6.68 и 12 с при изменении рН от 6.68 до 3.96. Обычно же при высокой чувствительности сенсор проигрывает по времени отклика, и, наоборот, при выигрыше по времени отклика проигрывает в чувствительности [70]. В будущем подход к получению ПЭМ на основе ПИЖ сможет конкурировать с электростатическим послойным методом по простоте и скорости получения мембран.

1.4. Использование ионных жидкостей в качестве модификатора поверхности прозрачных триацетилцеллюлозных пленочных мембран

Абсалан (Absalan) и соавторы предложили использовать ИЖ в качестве нового класса модификаторов при создании химических сенсоров с оптическим преобразованием аналитического сигнала (оптоды) для повышения их чувствительности и воспроизводимости. Авторы реализовали эту идею в создании оптического сенсора для определения цианид-иона и аскорбиновой кислоты (АК) [56, 57]. В качестве материала подложки для сенсора использовали триацетилцеллюлозную мембрану в форме прозрачной пленки. Прозрачную триацетилцеллюлозную пленку получали из отработанной фотопленки, которую предварительно обрабатывали гипохлоритом натрия для удаления окрашенных гелеобразных слоев [56, 57]. Поскольку и цианид-ион, и АК не имеют ярко выраженных оптических свойств, необходимых для непосредственного определения этих веществ, триацетилцеллюлозные пленки обрабатывали раствором определенного ионофора, который реагировал с указанными веществами, формируя аналитический сигнал. В качестве ионофора для определения АК выбрали коммерчески доступный неокупроин (2,9-диметил-1,10-фенантролин), а для определения CN^- — синтезированный в лаборатории комплекс [N,N'-бис(салицилиден)-2,3-диаминопиридин]трибутилфосфорина и моногидратированного перхлората кобальта(III) (комплекс Co(III) и основания Шиффа). Триацетилцеллюлозные пленки обрабатывали раствором ионофора в 10 мкл ИЖ ([BMIm][Br], [BMIm][PF₆] или [OMIm][PF₆]) с добавлением этанола или ТГФ, затем отмывали водой для удаления молекулярного органического растворителя и непрореагировавших реагентов. Ионофор из мембраны не вымывался, сигнал не сдвигался в течение 5 и 7 ч для оптодов на АК и CN^- соответственно [56, 57]. Мем-

браны были стабильны в течение длительного промежутка времени при их хранении под слоем воды. Высокую химическую стабильность оптодов в ходе работы и при хранении можно объяснить электростатическими взаимодействиями (например, Ван-дер-Ваальсовыми) между имидазольевым кольцом ИЖ и молекулами триацетилцеллюлозы [71]. В случае АК сенсора неocupроин, реагент с аминогруппами, может быть химически связан с триацетицеллюлозой [72].

Триацетилцеллюлозную мембрану, модифицированную ИЖ, с иммобилизованным ионофором вертикально помещали в кювету спектрофотометра, заполненную реакционным раствором, содержащим определяемое соединение, после чего измеряли его поглощение при аналитической длине волны (табл. 1). Кроме CN^- и АК, реакционные растворы содержали Трис-буферный раствор и раствор нитрата Cu(II) соответственно. Разница в поглощении оптодов в присутствии и отсутствие определяемых соединений была пропорциональна их концентрациям. Схема взаимодействия CN^- и АК с ионофорами, иллюстрирующая принцип работы описанных оптодов, представлена на рис. 10. Из рисунка видно, что определение CN^- основано на образовании его комплекса с ионофором. Для определения АК использовали сопряженные реакции окисления-восстановления и комплексообразования.

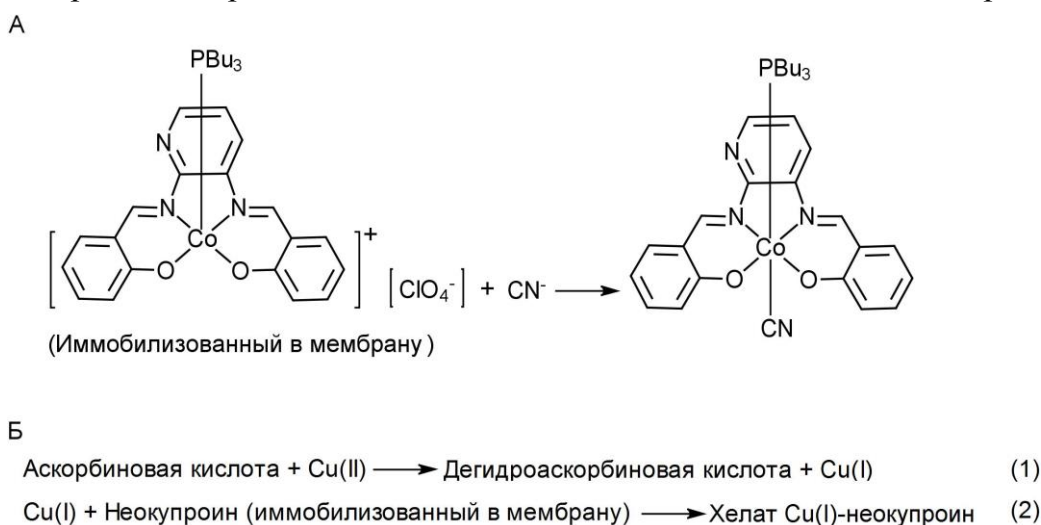


Рис. 10. Схемы взаимодействия CN^- (А) и АК (Б) с ионофором [56, 57].

Мембраны, модифицированные соответствующим количеством ИЖ, обладали многими преимуществами по сравнению с немодифицированной мембраной и мембраной, модифицированной хитозаном [73] или катионными ПАВ [74]. Во-первых, чувствительность (наклон градуировочного графика) для модифицированных ИЖ сенсоров на CN^- и АК в 8 и 1.42 раза соответственно выше таковой для немодифицированных сенсоров [56, 57]. Селективность определения CN^- и АК сильно зависела от природы выбранной ИЖ. Смешиваемая с водой $[\text{BMIm}][\text{Br}]$ не влияла на чувствительность обоих сенсоров. Менее вязкая $[\text{BMIm}][\text{PF}_6]$, но с более

высокой плотностью заряда на катионе по сравнению с [OMIm][PF₆], оказалась более предпочтительным модификатором для сенсора на CN⁻, но не для сенсора на АК. Таким образом, при выборе оптимального модификатора для сенсора надо учитывать благоприятное сочетание вязкости и плотности заряда на катионе, а также растворимость ИЖ в воде.

Во-вторых, ИЖ с ионофором равномерно распределялись по поверхности мембраны, что приводило к улучшению, хоть и незначительному, воспроизводимости сигнала и предела обнаружения определяемых соединений. И наконец, в-третьих, жидкое состояние ИЖ при комнатной температуре обеспечивало высокую скорость диффузии аналитов внутри мембраны, благодаря чему уменьшалось время отклика оптода.

Аналитические характеристики и условия функционирования разработанных оптодов представлены в табл. 1. Существенным недостатком оптода для определения АК является то, что он одноразовый. Напротив, CN⁻-оптод возможно регенерировать путем вытеснения CN⁻ из объема мембраны обработкой HNO₃ или растворами Cu²⁺, Cd²⁺, and Zn²⁺. Предложенные сенсоры были успешно применены для определения АК и CN⁻ в реальных объектах (табл. 1), благодаря их высокой селективности по отношению к указанным соединениям на фоне ионов металлов, ряда органических и неорганических соединений различной природы.

1.5. Использование ионной жидкости как пластификатора, лиганда и красителя-датчика одновременно в ионогель-оптодной мембране

В последние годы появилась тенденция к упрощению конструкции химических сенсоров. Большинство химических сенсоров основано на селективном связывании определяемого иона с лигандом, который либо включают в полимерную матрицу с добавкой ионообменной соли, либо непосредственно иммобилизуют на поверхности датчика. Если аналитический сигнал сенсора измеряют методом оптической спектроскопии в видимом диапазоне длин волн, дополнительно вводят окрашенный краситель [58, 74].

Каванаг (Kavanagh) и сотрудники разработали очень простую сенсорную систему, состоящую всего лишь из двух компонентов: полимера поливинилхлорида (ПВХ) и специально синтезированной ИЖ, [P_{6,6,6,14}][DCA] (рис. 2), способной играть роль сразу нескольких компонентов сенсорного устройства – пластификатора, лиганда и красителя-датчика [58]. Смесь, полученную растворением ПВХ и ИЖ (1:2 масс. %) в ТГФ, заливали внутрь стеклянного кольца, которое закрепляли на поверхности стеклянной пластины резиновыми кольцами, и оставляли внутри конструкции до полного испарения ТГФ на 24 ч [58].

Сенсорный материал представлял собой прозрачную гомогенную мембрану в форме диска толщиной ~10 мкм. Для генерации отклика мембрану помещали в 500 мкл водного раствора соли металла на 30 мин. После удаления пипеткой избытка этого раствора измеряли поглощение ПВХ-ИЖ мембраны, окраска которой зависела от природы иона металла (рис. 11).

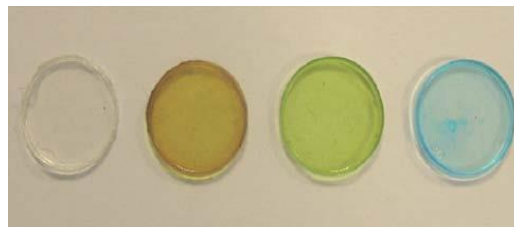


Рис. 11. ПВХ-[P_{6,6,6,14}][DCA] мембрана в отсутствие ионов металлов (бесцветная) и присутствии ионов Cu²⁺ (желтая), Cu²⁺/Co²⁺ (зеленая), Co²⁺ (голубая) [58].

По мнению авторов, миграция ионов металлов в полимерной оптодной мембране происходит по механизму совместной экстракции, а не ионного обмена. Ион металла и его противоион из водного раствора соэкстрагируются внутрь мембраны с сохранением баланса зарядов. Хотя чувствительность определения ионов металлов с использованием описанных мембран не высока (табл. 1), простота получения мембраны, отсутствие вымывания компонентов мембраны и продемонстрированная возможность одновременного определения двух ионов металлов Cu²⁺ и Co²⁺, являются ее несомненными достоинствами.

1.6. Перспективы применения полученных оптических сенсоров в химическом анализе

Характеристики сенсоров и сенсорных материалов, полученных с использованием ИЖ, систематизированы в табл. 1. Как видно из данных таблицы, круг соединений, которые возможно определять с помощью оптических сенсоров, достаточно широк и включает в себя неорганические газы (CO₂ и O₂), ионы тяжелых металлов, цианид-ион и некоторые органические вещества (АК и субстраты ферментов).

Обычно ИЖ используют для разработки газовых сенсоров, что может быть объяснено их способностью абсорбировать и растворять газы, такие как CO₂, O₂, NO_x и др. В таких сенсорах имидазолиевые ИЖ участвуют в процессе приготовления материала подложки или сами являются матрицей. Также их используют в качестве специфической полимерной добавки к полимерной матрице. Наиболее часто определяемый газ в сенсорах с участием ИЖ — CO₂, содержание которого необходимо контролировать в крови, морской воде, в воздухе парников и внутри различных упаковок. Если определение высоких концентраций CO₂ (60–100%) является тривиальной аналитической задачей, то определение малых количеств этого газа до сих пор вызывает сложности. Благодаря использованию ИЖ в сенсорных системах,

стало возможным определение как высоких, так и низких концентраций CO_2 . Как видно из табл. 1, предложены три системы для определения низких концентраций углекислого газа. Спектрофотометрический сенсор с $[\text{VMIm}][\text{BF}_4]$ и pH-индикатором ТС в силиконовой матрице позволяет определять 2% CO_2 и более низкие его концентрации [41]. С помощью сенсора на основе той же матрицы, но с флуоресцентным индикатором ГПТСК, растворенным в $[\text{VMIm}][\text{Tos}]$, возможно определение до 10% CO_2 [41], причем как в газообразном, так и в растворенном состоянии. Флуоресцентный CO_2 сенсор на основе ЭЦ и ПММА-матрицы с красителем ГПТСК и $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ в качестве специфической полимерной добавки [51] позволяет определять вплоть до 10% газообразного CO_2 . Более того, этот сенсор оказался наиболее стабильным из всех описанных выше (стабилен в течение 7 мес), а также обладал наиболее коротким временем отклика. С помощью третьей сенсорной системы, в которой ИЖ используется в качестве матричного материала, возможно чувствительное и селективное определение CO_2 и в газообразной форме, и в растворе [55].

Помимо CO_2 -сенсоров с использованием ИЖ сконструированы O_2 -сенсоры (табл. 1). Определение газообразного O_2 является важной задачей биомедицинского анализа и анализа объектов окружающей среды. Оба O_2 -сенсора основаны на тушении флуоресценции комплекса рутения(II) с 2,2'-бипиридилем молекулами O_2 и характеризуются широкими диапазонами линейности [23, 52]. Один из них в виде золь-геля с $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ имеет меньшее время отклика [23]. Стоит отметить, что сенсоры на основе ЭЦ/ ПММА чрезвычайно стабильны — 44 мес без значительного уменьшения интенсивности флуоресценции (такая стабильность является результатом внесения $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ в матрицу сенсора) [52].

Газы NO_x являются продуктами переработки топлива и других крупномасштабных производственных процессов, загрязняющих атмосферу. Производные этих газов образуют токсичные вещества, входят в состав кислотных дождей, а также участвуют в процессах нитрозирования различных биомолекул, вызывая онкологические и другие опасные заболевания. Для развития методов мониторинга, выделения и переработки NO_x газов на основе целлюлозной пленки создан простой в получении и использовании материал для определения NO_2 и N_2O_4 , однако для его применения на практике требуется более детальное изучение свойств этого материала и условий его функционирования [45].

Довольно большое количество работ посвящено разработке сенсоров для определения ионов металлов. Наибольшей чувствительностью обладают пленочные сенсоры на основе ЭЦ и ПММА для определения Ag(I) и Hg(II) [53, 54] на субнанолярном уровне, т.е. более низком, чем ПДК этих металлов в питьевой воде

по требованиям Минздрава России [75]. Благодаря антибактериальным свойствам, соли серебра и его другие его соединения широко используют в медицине, для очистки воды, поэтому определение Ag(I) в водных растворах важно. Ртуть(II) является наиболее токсичным тяжелым металлом, который встречается в объектах окружающей среды. В матрицах предложенных сенсоров ИЖ играет роль специфической полимерной добавки. Высокая селективность этих сенсоров выгодно отличает их от других оптических сенсорных устройств [74, 76, 77]. Другой пленочный сенсор, чувствительный к ионам Hg(II) , полученный растворением/осаждением целлюлозы в $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$, можно использовать до 5 раз [43]. Практически такой же принцип (но немного ранее) использовали для разработки целлюлозных пленок для определения ионов переходных металлов [44]. Описанный сенсор также можно использовать повторно.

Предложенный CN^- сенсор на основе триацетилцеллюлозной мембраны, модифицированной ИЖ и комплексом $\{\text{Co(III)}$ -основание Шиффа $\}$, позволяет определять этот высоко токсичный анион на уровне 4.2 мкМ [56], что значительно меньше летальной дозы: 40–200 мкМ [78]. Разработан лишь один сенсор для определения органического соединения, а именно АК, $c_{\text{мин}} = 2.2 \times 10^{-5}$ М. В нем ИЖ также играет роль модификатора триацетилцеллюлозной мембраны. Сенсор успешно апробирован в анализе питьевой воды и апельсинового сока [57].

Успех в разработке ферментативных сенсоров не так очевиден по сравнению с сенсорами для определения неорганических газов и ионов металлов. К настоящему времени детально изучены условия нековалентной и ковалентной иммобилизации фермента в матрицу (как правило, эту роль выполняет целлюлозная пленка). Хотя предприняты некоторые попытки определения субстратов ферментов (сирингалдазина, гваякола, ОНПГ), использование подобных сенсоров на практике представляется задачей будущих исследований.

Важно отметить, что для создания оптических сенсорных материалов гидрофильные ИЖ используют чаще, чем гидрофобные. В последнем случае для получения биочувствительного материала необходимо проведение дополнительных этапов эксперимента. Например, для создания прозрачных целлюлозных пленок, полученных осаждением целлюлозы из раствора в $[\text{BMIm}][\text{Tf}_2\text{N}]$, требуется долгая промывка [27]; при иммобилизации β -галактозидазы до добавления $[\text{BMIm}][\text{Tf}_2\text{N}]$ необходимо растворить ацетат целлюлозы в ацетоне [49].

В результате критического обзора и систематизации литературных данных, опубликованных за период с 2000 по 2014 гг., нами выделено пять основных

функций ИЖ в оптических сенсорных материалах: (а) растворители для материала подложки или иммобилизации, (б) специфическая добавка к матрице, (в) материал матрицы, (г) модификатор поверхности триацетилцеллюлозной мембраны и (д) пластификатор, лиганд и краситель-датчик одновременно в полимерных ионогель-оптодных мембранах. Исследователи отдают предпочтение коммерчески доступным ИЖ на основе имидазолиевых катионов (табл. 1), поскольку их физико-химические, оптические, экстракционные и сорбционные свойства уже хорошо изучены. Некоторые несмешиваемые с водой ИЖ, например [OMIm][PF₆] и [BMIm][PF₆], привлекательны тем, что практически нетоксичны, особенно по сравнению с традиционными молекулярными органическими растворителями, такими как ацетон, ацетонитрил, ДМСО и др.

Способность [EMIm][BF₄], [BMIm][BF₄] и [BMIm][Tos] растворять CO₂ и O₂ используют для разработки флуоресцентных и спектрофотометрических сенсоров для определения этих газов в широком диапазоне концентраций. Флуоресцентные красители и рН индикаторы, которые играют роль распознающих элементов газовых сенсорных материалов, легко растворимы в перечисленных ИЖ. Применение ИЖ позволяет значительно улучшить качество сенсорного материала (его прозрачность, гибкость, прочность, однородность поверхности) и стабильность при хранении. Добавка ИЖ к полимерной смеси обеспечивает ее оптимальную вязкость и повышенную электропроводность, что облегчает процесс формирования флуоресцирующих ЭЦ и ПММА нановолокон для чувствительного определения газообразного и растворенного CO₂. С помощью мембран из нановолокон, полученных методом электроформования (электроспряденные) из ЭЦ и ПММА, с высокой удельной поверхностью можно определять Ag(I) и Hg(II) с чрезвычайно высокой чувствительностью. Дальнейшие усилия ученых, на наш взгляд, должны быть сфокусированы на исследовании новых полимерных композитов, контроле наноразмеров электроспряденных мембран и достижении требуемой чувствительности определения различных аналитов для решения конкретных аналитических задач.

Очень перспективным материалом, по нашему мнению, являются прозрачные и однородные ПВХ-ИЖ мембраны. Благодаря применению многофункциональной «дизайнерской» [P_{6,6,6,14}][DCA], удалось значительно упростить устройство сенсора, а также повысить селективность определения иона металла за счет способности аниона ИЖ образовывать комплекс с Cu(II). Весьма вероятно, что будущие исследования таких материалов будут направлены на улучшение специфической функциональности ИЖ и изучение механизма взаимодействия определяемых соединений с распознающими элементами мембраны. Наравне с описанными выше

ПВХ-ИЖ мембранами, большим потенциалом как поверхностно-активные оптические сенсорные материалы, несомненно, обладают разработанные ПИЖ мембраны иерархической структуры.

Важна роль ИЖ в качестве модификатора триацетилцеллюлозных пленок. Именно благодаря гидрофильным ИЖ, а не таким модификаторам как хитозан и ПАВ, обеспечивалась большая однородность поверхности мембраны, в результате чего повышались селективность и воспроизводимость определения CN^- и АК.

Методология разработки оптических сенсоров для определения газов, ионов металлов и H^+ -ионов описана довольно детально, чего нельзя, к сожалению, сказать о биосенсорных материалах. Несмотря на то, что в литературе предложено несколько подходов к нековалентной и ковалентной иммобилизации некоторых ферментов в полученные с помощью галоидных ИЖ целлюлозные пленки и силиконовые золь-гели, в этой области еще остается ряд нерешенных вопросов. Разработанные методики не являются универсальными и специфичны для конкретного фермента. Предложенные материалы пока невозможно использовать многократно. Все еще не найден универсальный эффективный путь повышения скорости диффузии субстрата фермента из раствора к поверхности целлюлозной пленки. Быстрый отклик пленки с биокатализатором наблюдается только при добавлении раствора субстрата непосредственно на ее поверхность. Для удобства практического использования ферментсодержащих пленок необходимо усовершенствовать способы фиксации пленок на поверхности стекла или использовать другие подложки. Практически отсутствует информация о селективности катализа ферментами, иммобилизованными в целлюлозную пленку и золь-гели. Таким образом, для оценки практической значимости полученных с помощью ИЖ биоматериалов целесообразны дальнейшие исследования, направленные на расширение круга иммобилизованных ферментов и определяемых соединений, изучение стабильности биокатализаторов в сенсорных материалах, оптимизацию состава матрицы-носителя и совершенствование конструкции сенсора.

К настоящему времени только сенсоры для определения CO_2 , O_2 и АК имеют конкретные перспективы использования в практике химического анализа. Наиболее близки к широкому практическому применению в ближайшем будущем микрофлюидные платформы, включающие ионогели, предназначенные для мониторинга рН пота человека при физических нагрузках в режиме реального времени в целях диагностики и прогностики состояния его здоровья. Огромный интерес исследователей к ИЖ, а также достигнутые успехи в получении сенсорных материалов с их участием свидетельствуют о том, что адаптация разработанных

материалов к анализу реальных объектов — вопрос ближайшего будущего. Таким образом, все исследования, направленные на развитие оптических сенсорных технологий с применением растворителей нового поколения, ИЖ, актуальны и целесообразны.

Глава 2. Спектрофотометрические и люминесцентные методы определения артемизинина и его производных

2.1. Общие сведения об артемизинине

Артемизинин (АМ) относится к природным противомаларийным эндопероксидам. С момента открытия в 168 г. до н.э. лекарственных свойств однолетней китайской горькой полыни *Artemisia annua* и до сих пор ее листья являются основным источником АМ [82], хотя он содержится также в стеблях, бутонах, цветах и семенах полыни. Содержание АМ в растительном лекарственном сырье невелико (от 0.01 до 1.4% от сухой массы) и зависит от периода сбора растения, места и условий его произрастания [83, 84].

АМ представляет собой сесквитерпеновый лактон с 1,2,4-триоксановым гетероциклическим ядром, в которое включен эндопероксидный мостик (рис. 11, структура 1). Именно этот фрагмент молекулы АМ (фармакофор) определяет антималярийную активность, которая значительно возрастает при замещении в карбонильной группе лактонного кольца (рис. 11, структуры 2-5). Так, дигидроартемизинин (восстановленный АМ) и артезунат (водорастворимый гемисукцинат дигидроартемизинина) более эффективны по отношению к малярийному плазмодию, микроорганизму-возбудителю малярии, чем АМ.

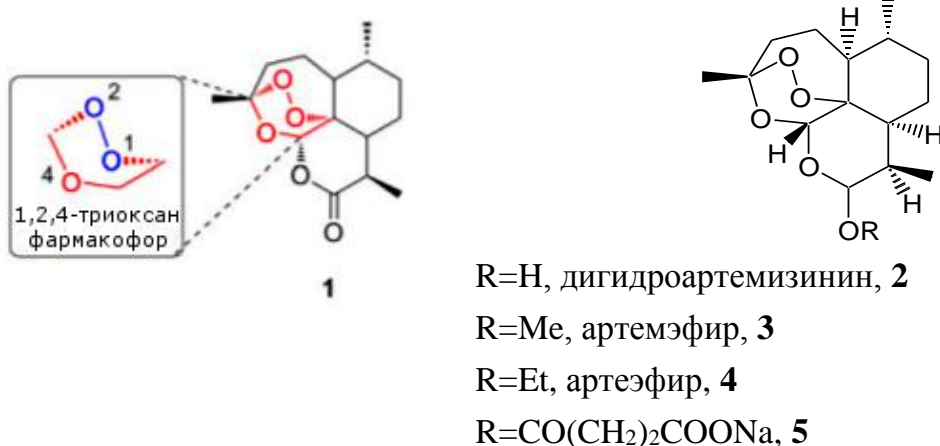


Рис. 11. Структурные формулы АМ (1) и его полусинтетических производных: дигидроартемизинина (ДАМ, 2), артемэфира (АТМ, 3), артеэфира (АТЭ, 4), артезуната (АТС, 5).

Раскрытие пероксидного мостика АМ вследствие восстановительного расщеп-

ления (например, под действием иона Fe(II), свободного или в составе гема) или протонирования приводит к полной потере его антималярийной активности [85, 86].

Механизм действия АМ и его полусинтетических производных на малярийных паразитов включает два последовательных этапа. На первом этапе внутри пораженного эритроцита (или по некоторым данным [85] самого плазмодия) происходят расщепление эндопероксидного мостика АМ и перегруппировка внутри молекулы с образованием нестабильных свободных радикалов. Реакцию катализирует железо(II) гема пораженного эритроцита. На втором этапе образовавшиеся радикалы или их производные алкилируют специфичные малярийные белки, что приводит к повреждению паразитов [85–88].

2.2. Физико-химические свойства артемизинина

АМ (эмпирическая формула $C_{15}H_{22}O_5$) — бесцветное кристаллическое вещество без запаха, температура плавления 156–157°C [89].

Растворимость в воде и органических растворителях. Вследствие малой полярности АМ плохо растворим в воде, но хорошо растворим в органических растворителях, как полярных, так и неполярных (табл. 2). С повышением температуры растворимость АМ возрастает.

Таблица 2. Растворимость (s , г/л) АМ при 25°C в различных растворителях [84, 90]

Растворитель	s , г/л
Вода	0.063 ($4.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л при 37°C)
Гексан	0.46
Ацетонитрил	3.562
Метанол	12
Этанол	28.267
Ацетон	42.319
Этилацетат	100
Хлороформ	266.628

Чаще всего для приготовления стандартных растворов АМ используют полярные растворители, например, этанол, метанол, их смеси с водными буферными растворами [91]. Для экстракционного извлечения АМ из растительного сырья применяют петролейный эфир, *n*-гексан³, ацетонитрил, этанол и его смесь с метанолом, ацетон. Самый эффективный и селективный экстрагент АМ, петролейный эфир, токсичен, летуч и легко воспламеняется [86], поэтому его часто разбавляют гексаном.

³ Далее просто гексан.

Плохая растворимость АМ в воде (табл. 2) снижает эффективность его усвоения при оральном употреблении. Эту проблему решают добавлением к АМ циклодекстринов или использованием вместо АМ более растворимых в воде производных, например АТЭ и АТМ.

Участие АМ в реакциях комплексообразования. Установлено [86, 91], что при 22° С и концентрации 1 ммоль·л⁻¹ АМ легко растворяется в 10 мМ водных растворах α -, β -, γ -циклодекстринов за счёт образования комплексов состава 1:1 типа «гость–хозяин». α -, β - и γ -Циклодекстрины представляют собой полисахариды, состоящие из 6, 7 и 8 мономеров D-глюкозы соответственно (рис. 12), соединенных между собой α -1,4-глюкозидной связью [92].

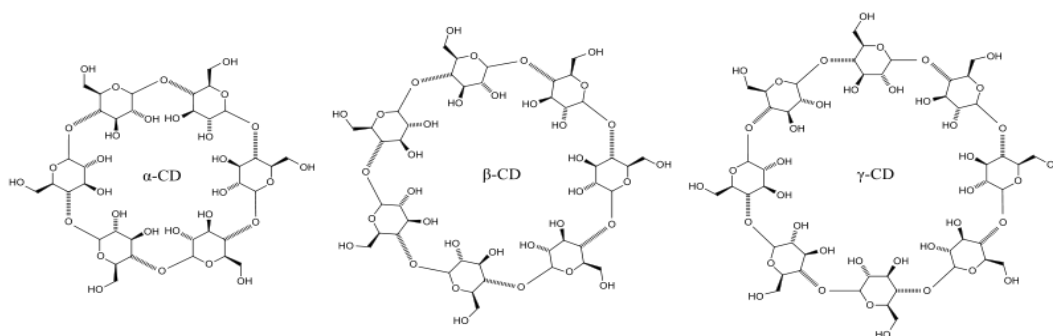


Рис. 12. Структурные формулы α -, β -, γ -циклодекстринов.

При концентрации циклодекстринов 10 мг/мл растворимость АМ в воде увеличивается в 1.7 (α), 6.2 (β) и 5.1 (γ) раз [93, 94]. Растворимость АМ в наименее токсичных 2-гидроксипропил- и сульфоксибутилэфир- β -циклодекстринах сопоставима с таковой в растворе β -циклодекстрина [93, 94]. Исключение составляет гептакис(2,6-ди-*O*-метил)- β -циклодекстрин, который увеличивает растворимость АМ в 12.9 раза [95], однако способен вызывать гепатопатию, нефропатию и гемолиз. При обработке культуры клеток раствором гептакис(2,6-ди-*O*-метил)- β -циклодекстрина в отсутствие и присутствии гормона роста метилжасмоната содержание АМ возрастает в 140-300 раз [92], что свидетельствует о высокой растворяющей способности этого циклодекстрина.

Растворимость производных АМ изучена только в 2-гидроксипропил- β -циклодекстрине и повышается в ряду: АТЭ < АМ < ДАМ. С увеличением концентрации циклодекстрина с 5 до 20% (масса/объем) растворимость перечисленных эндопероксидов возрастает примерно в 3 раза [95]. Заметим, что в растворе 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина повышается не только растворимость, но и стабильность ДАМ [96]. Небольшие добавки к раствору циклодекстринов водорастворимых полимеров поливинилпирролидона, гидроксипропилметилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы не повышают, как ожидалось, способность полисахарида связывать АМ в комплекс.

Наилучшее соответствие размеров молекулы АМ и внутренней полости β -циклодекстрина (рис. 13) обуславливает самую высокую константу устойчивости в ряду $\alpha < \gamma < \beta$ -циклодекстринов.

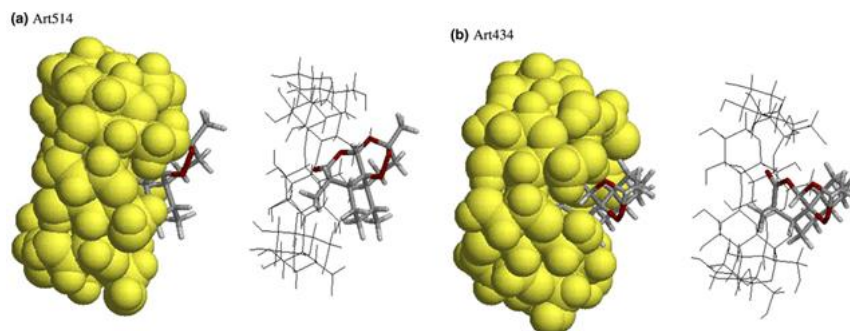


Рис. 13. Две типичные низкоэнергетичные структуры комплекса АМ с β -циклодекстрином [91].

Комплекс {АМ- β -циклодекстрин} в 3-5 раз устойчивее комплекса с γ -циклодекстрином и в 12-17 раз устойчивее комплекса с α -циклодекстрином [93, 97]. Неизменность положения в спектрах кругового дихроизма максимума АМ в свободном виде и в комплексе [98] свидетельствует о том, что при образовании комплекса связь $-O-O-$ в молекулах АМ и АТМ остается снаружи β -циклодекстрина. Комплекс {АМ- β -циклодекстрин} стабилизируется, главным образом, за счет ван-дер-ваальсовых сил, и частично, благодаря диполь-дипольным взаимодействиям. Важно отметить, что скорость щелочного гидролиза АМ в присутствии β -циклодекстрина уменьшается в 2 раза [95].

Константа устойчивости комплекса АМ с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином в 1.5 раза, с сульфобутилэфир- β -циклодекстрином в 2 раза, а с гептакис(2,6-ди-*O*-метил)- β -циклодекстрином в 3.5 раза выше, чем комплекса с β -циклодекстрином [93, 94]. Устойчивость комплексов производных АМ с β -циклодекстрином возрастает в ряду: АТЭ < ДАМ < АМ, при этом константа устойчивости комплекса {ДАМ- β -циклодекстрин} примерно в 2 раза меньше константы устойчивости комплекса АМ с полисахаридом [97].

АМ образует комплексы также и с ионами Fe(II), как в гидратированном состоянии [99], так и в составе гема [100]. Механизм взаимодействия АМ с ионами железа (II), приведенный на рис. 14, включает последовательно протекающие реакции комплексообразования и окисления-восстановления.

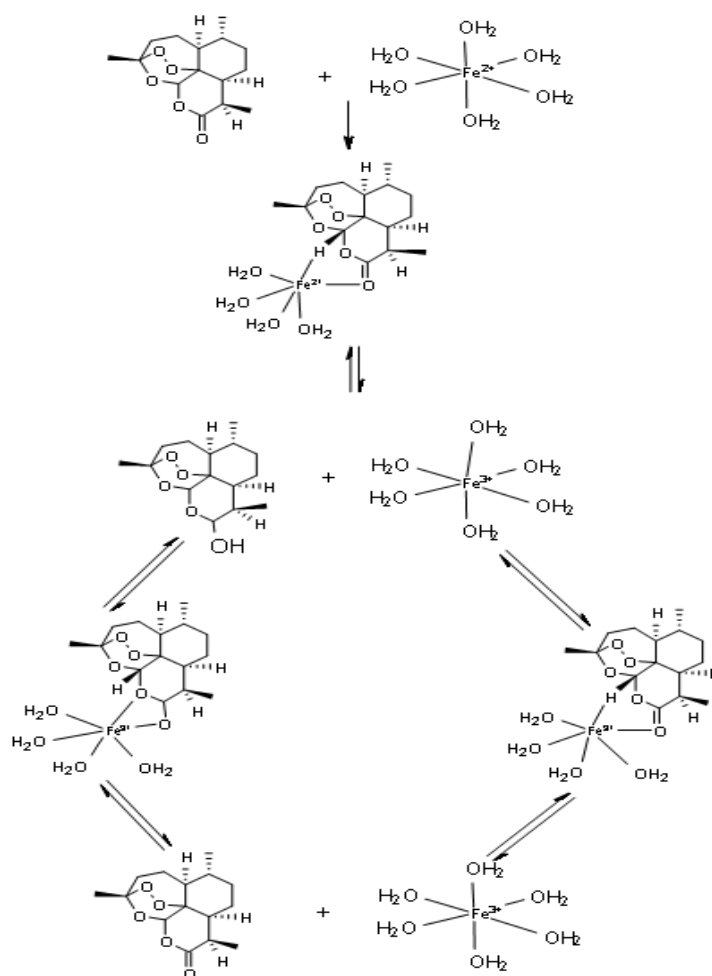


Рис. 14. Механизм взаимодействия АМ с ионами Fe(II)/Fe(III) в водном растворе при нейтральном рН [99].

На первой стадии процесса довольно быстро образуется комплекс гидратированного иона Fe(II) с АМ состава 1:1, который, согласно данным спектрофотометрического исследования, поглощает при 304 нм ($\epsilon = 2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, АМ приготовлен в хлороформе). Далее, как видно из рисунка, АМ в составе комплекса {Fe(II)-АМ} восстанавливается до ДАМ, а ионы Fe(II) окисляются до Fe(III). На второй стадии ДАМ быстро координирует ионы Fe(III) по двум атомам кислорода в 6-м и 7-м положениях с образованием комплекса {Fe(III)-ДАМ} [101], который впоследствии окисляется кислородом воздуха до АМ и Fe(III) (рис. 14). До сих пор в литературе нет устоявшегося мнения о возможности взаимодействия АМ с ионами Fe(III): по одним сведениям эта реакция не идет [100], по другим [101, 102] протекает, но очень медленно.

При добавлении раствора АМ в ДМСО к раствору гема поглощение протопорфирина IX при длине волны полосы Soret, 415 нм, постепенно уменьшается и одновременно возникает максимум при 476 нм (рис. 15). С повышением содержания АМ максимум при 415 нм полностью исчезает. Природа максимума при 476 нм может быть связана как с деформацией порфиринового кольца, так и с ковалентной

модификацией гема, поскольку известно, что АМ способен алкилировать гем [100]. В литературе [85] имеются сведения о способности гема ускорять электровосстановление бензоата АМ на хлорид-серебряном электроде в интервале его концентраций 0.1–2.0 мМ, продукты которого представляют собой изомеры исходного вещества.

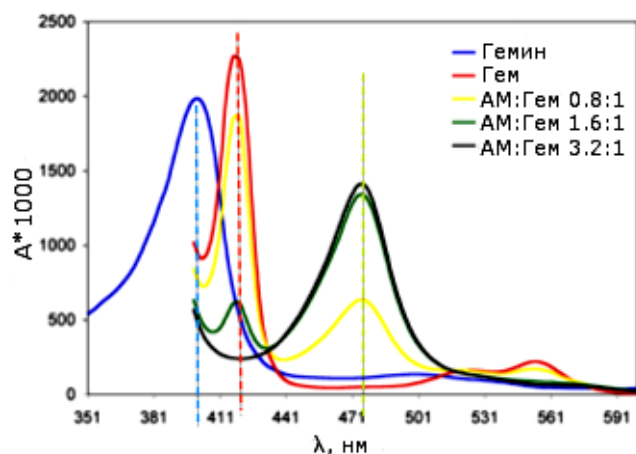


Рис. 15. Спектры поглощения гемина, гема и комплексов АМ-гем с возрастающим молярным соотношением АМ : гем [100].

Оптические свойства. Спектр поглощения 10 мкМ водного раствора АМ характеризуется интенсивной полосой поглощения ниже 200 нм; а также, благодаря наличию бензольных колец в своей структуре, плечом около 220 нм ($\epsilon \sim 1000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$), расположенным вначале максимума поглощения, и очень слабым поглощением вплоть до 300 нм [91]. Поскольку величина молярного коэффициента поглощения АМ невелика, спектрофотометрический метод пригоден для определения только высоких его содержаний. Используемые для растворения АМ органические растворители тоже поглощают при длинах волн максимального поглощения АМ и его производных, что приводит к наложению спектров [87, 91]. Поскольку АМ не обладает собственной флуоресценцией [103], для его определения люминесцентными методами необходима дериватизация.

Реакции кислотного и щелочного гидролиза. Кислотная и щелочная дериватизация заключаются, как правило, в обработке определяемого вещества раствором концентрированной кислоты (обычно 5М НСl) или щелочи (1М КОН). В результате кислотного гидролиза АМ обычно получают ДАМ или α, β -ненасыщенные декалоны [104], которые потом вступают в реакции с различными реагентами. В том случае, когда продукты кислотного гидролиза поглощают в УФ/видимой областях спектра, проведение дополнительных реакций не требуется.

Поскольку АМ содержит лактоновую группу (рис. 11), то в растворах щелочей он гидролизует, в результате чего образуются энولات/карбоксилат АМ с макси-

мумом поглощения при 290 нм, что используют для его определения в УФ-диапазоне. В результате дериватизации АТС, АТМ и ДАМ получается трудноразделимая смесь продуктов различных перегруппировок. Реакции кислотного гидролиза обычно выбирают для доколониной, а реакции щелочного гидролиза для постколониной дериватизации эндопероксидов в хроматографических методиках.

Термическая и фотостабильность АМ. В апротонных органических растворителях АМ устойчив вплоть до 150°C, в протогенных растворителях термостабильность АМ значительно меньше. АТМ менее стабилен, чем АТС при 40°C (в виде сухой пудры, при нормальной влажности), а ДАМ – самое нестабильное производное АМ [105]. При облучении раствора АМ в течение 2.5 мин светом с длиной волны 254 нм АМ разлагается с образованием H₂O₂; последний не образуется, если раствор облучать светом с длиной волны 350 нм [106].

Таким образом, на основании литературных данных можно сделать вывод о том, что при выборе оптических систем для определения АМ, во-первых, следует принимать во внимание его ограниченную растворимость в воде и, следовательно, необходимость использования органических растворителей (преимущественно этанола или метанола) для приготовления рабочих растворов АМ и его экстрактов из различных объектов. Во-вторых, для косвенного определения АМ может оказаться полезной его способность образовывать комплексы с ионами Fe(II)/Fe(III), поскольку эти ионы, в том числе и в составе белков, часто выступают в роли катализаторов различных индикаторных реакций. В-третьих, вследствие слабых оптических свойств чувствительное определение АМ и его производных спектрофотометрическим и люминесцентным методами возможно только при использовании реакций дериватизации.

2.3. Определение артемизинина и его производных в лекарственных препаратах, растительном сырье и биологических жидкостях

В настоящей главе систематизированы и обсуждены литературные сведения за период с 1992 по 2013 гг. о спектрофотометрических и люминесцентных системах и методах определения АМ и его производных (рис. 11) в лекарственном растительном сырье, фармацевтических препаратах и биологических жидкостях, в которых содержание определяемых соединений варьирует от 1 мМ до 100 нМ. Систематизированные данные представлены в табл. 3. Они включают все спектрофотометрические и люминесцентные индикаторные системы, которые применяют для определения АМ и его производных не только методами спектрофотометрии и люминесценции, но и хроматографии: ТСХ и ВЭЖХ с использованием УФ, флуоресцентного и хемилюминесцентного детекторов.

Как мы уже отмечали в гл. 2.2, слабые оптические свойства АМ и его производных обуславливают необходимость проведения реакций дериватизации для перевода определяемых соединений в более интенсивно поглощающие вещества. Поглощение дериватизатов регистрируют спектрофотометрически, а в хроматографических ВЭЖХ и ТСХ методиках используют УФ-детектор и денситометр соответственно. Самыми простыми дериватизационными агентами являются щелочь [107, 108], аммиак [109] и минеральные кислоты (HCl и/или H₂SO₄) [104, 106, 110–113].

Щелочную дериватизацию АМ и его производных АТС и ДАМ применяют в методиках их определения методами ВЭЖХ и ТСХ. При обработке элюата концентрированным (1.2 М) раствором щелочи образуются продукты, поглощающие при 290-291 нм в большей степени, чем исходные АМ, ДАМ и АТС [107, 108]. Такая дериватизация предпочтительна при анализе смеси эндопероксидов. Для дериватизации только АМ можно применять разбавленный раствор NaOH, в этом случае ДОК даже шире, чем при определении АМ в смеси. Хроматографические методики успешно апробированы для определения АМ и его производных в плазме крови (табл. 3).

Помимо раствора щелочи для дериватизации АМ при его определении методом ТСХ используют нагретые пары NH₃(конц.) [109]. Продуктом реакции является 10-азодезоксиартемизинин, содержащий хромофорную группу с $\lambda_{\text{max}} = 320$ нм. Определение проводят денситометрией ТСХ пластинок.

Применение в качестве проявляющих агентов растворов органических оснований: 2,4-динитрофенилгидразина или красителя быстрого голубого, позволяет получать окрашенные зоны АМ (розовую или синюю соответственно) при анализе противомаларийных лекарственных препаратов методом ТСХ [114]. Кроме АМ, из 30 различных вспомогательных веществ только эритромицин давал синюю окраску с быстрым голубым. Напротив, при реакции эритромицина с 2,4-динитрофенилгидразином красная окраска не возникала, что свидетельствует о высокой селективности этого реагента-проявителя. Методика позволяет определять индивидуально АМ, ДАМ и АТС, величины R_f которых значительно различаются на ТСХ-пластинках. Чувствительность определения эндопероксидов после их разделения в тонком слое силикагеля выше, чем на бумаге (табл. 3).

Кислотную дериватизацию для определения эндопероксидных соединений используют значительно чаще, чем щелочную. Самый простой вариант кислотной дериватизации предполагает доколоночную обработку анализируемого раствора 5 М раствором HCl и нагревание на водяной бане [110].

Таблица 3. Спектрофотометрические и люминесцентные системы для определения артемизинина и его производных

Определяемое соединение	Индикаторная система, индикаторное вещество (аналитическая длина волны)	Условия проведения реакции	ДОК, мкМ	Селективность	Объект анализа	Литература
1	2	3	4	5	6	7
Спектрофотометрические системы						
ДАМ, АТС	Постколоночная щелочная дериватизация. Элюат + КОН (1.2 М раствора в 90%-ном метаноле) = <u>PP'</u> (290 нм)	НФ – Water Symmetry C ₈ , ПФ – CH ₃ CN: 0.1М ацетатный буферный раствор, pH 4.8 (50:50 об.%), 0.3 мл/мин, 69°C	0.18–6.15 0.12–5.68	–	Плазма крови	[107]
АМ	АМ + NaOH (0.05 М) = <u>PP'</u> (291 нм) (спектрофотометрия)	12 ч инкубация АМ с плазмой крови/ эритроцитами; 10 минутное центрифугирование; 30 минутное выдерживание в щелочи; 25°C	0.44–176	–	Плазма крови, эритроциты	[108]
АМ	АМ + NH ₃ (пары) = PP (320 нм)	ТСХ, нагревание до 100°C, 2 ч, НФ – SiL G/UV254 60 F ₂₅₄ ; ПФ – гексан-этилацетат-ацетон (16:1:1)	1.8–42.5	–	Растительное сырьё	[109]
АМ, ДАМ, АТС, АТЭ	Эндопероксиды (растворы в метаноле, ультразвук) + обработка 2,4-динитро-фенилгидразином/ красителем быстрый голубой ⁴ (денситометрия)	ТСХ, НФ – Si 60 F ₂₅₄ ; ПФ – хлороформ:метанол: CH ₃ COOH (98:2:0.1)	3.5–35	+	Лекарственные препараты	[114]
		ТСХ, НФ – Whatman, 1001 125, grade №1; ПФ – хлороформ : метанол: CH ₃ COOH (98:2:0.1)	177–354			
АТМ, ДАМ*	Доколоночная кислотная дериватизация (5М HCl, 53°C, 15-45 мин); УФ-детектор (254 нм)	Обращенно-фазовая ВЭЖХ, НФ – C ₁₈ Spherisorb, ПФ – CH ₃ CN : H ₂ O (50:50 об.%), 0.7 мл/мин	0.08–1 0.09–1	–	Плазма крови	[110]
АМ	АМ (экстракт в смеси гексан:этилацетат – 90:10 об.%) + CH ₃ COOH _(лед.) + H ₂ SO _{4(конц.)} + анисовый альдегид (50:1:05) = <u>PP</u> (426 нм)	Обращенно-фазовая ТСХ, НФ – RP 18 F ₂₅₄ S; ПФ – 0.2% ТФУ– CH ₃ CN (35:65 об.%), 110°C, 5 мин	0.106– 0.355	+	Растительное сырьё	[112]

⁴ Быстрый голубой — C₁₅H₁₄ClN₃O₃ · 1/2 ZnCl₂, 4-бензоиламино-2,5-диметоксибензеназониум геми(хлорид цинка) соль.

1	2	3	4	5	6	7
АМ	АМ (экстракт в толуоле) + CH_3COOH : H_2SO_4 : анисовый альдегид (100:2:1, об.%) = <u>PP</u> (530 нм)	ТСХ, нагревание до 105°C, 5 мин; НФ – Si 60 F ₂₅₄ ; ПФ – гексан:диэтиловый эфир (6:5)	0.35–1.1	–	Растительное сырьё	[111]
АМ	АМ (экстракт в петролейном эфире) + этанол : CH_3COOH : H_2SO_4 : анисовый альдегид = <u>PP</u> (100:20:4:2, об.%; 540 нм, денситометрия)	ТСХ, нагревание до 100°C, 12 мин; НФ – Si 60 F ₂₅₄ ; ПФ – гексан : этилацетат – 9:1	0.11–0.43	–		[106]
АМ	АМ (экстракт в гексане, ультразвук) + [H_2SO_4 (конц.) + этанол + H_2O + ванилин _{тв.}] = <u>PP</u> '	ТСХ: НФ – силикагелевые пластинки, ПФ – этилацетат : гексан (1 : 4), 5 мин; ВЭЖХ: НФ – Supelcosil LC-18, ПФ – $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 1 мл/мин, 30°C, 20 мин	–	–		[113]
ДАМ	Постколоночная дериватизация: ДАМ (раствор в CH_2Cl_2) + диацетилдигидрофлуоресцеин + 4-диметиламинопиридин + $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодиимид = <u>PP</u> (235 нм)	НФ – Radial-РАК М-Porasil cartridge, ПФ – гексан : изопропанол (95:5 об. %), 1.5 мл/мин, 25°C, 8 ч	0.065–1.32	–	Модельный раствор	[115]
АМ, ДАМ, АТС, АТМ	Эндопероксид + HCl / HBr / HI / HNO_3 / H_2SO_4 / HClO_4 (NH_3 / Na_3PO_4) + прямой красный TR (420 нм)	Для кислотного варианта – 1 ч Для щелочного варианта – 10 мин	–	+	Растительное сырьё	[104]
ДАМ, АТС, АТМ	$\text{A} + \text{метанол} / \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{A-аналит}$ (продукт зеленого цвета, программное обеспечение для попиксельной обработки изображений)	30-40°C, 2-15 мин	–	+	Фармацевтические препараты	[116]
АМ, ДАМ, АТС	$\text{AM}/\text{ДАМ} + \text{HCl} = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{PP}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ = \text{I}_2 + \text{H}_2\text{O}$ <u>Сафранин Т</u> (красный, 521 нм) + $\text{I}_2 = \text{PP}'$ (бесцветный) + 2I^-	Ацетатный буферный раствор, pH 4–5, встряхивание (5 мин)	57–432 61–432	+		[100]
АТС	$\text{AM} + \text{HCl} = \text{PP} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ = \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ Вариаминовый синий _(Red) (бесцветный) + $\text{I}_2 = \text{Вариаминовый синий}_{(Ox)}$ (фиолетовый; 556 нм)		61–432	+		[117]

1	2	3	4	5	6	7
Люминесцентные системы						
АМ	АМ (экстракт в петролейном эфире) + этанол : CH_3COOH : H_2SO_4 : анисовый альдегид (100 : 20 : 4 : 2 об.%) = <u>PP</u> (540 нм)	ТСХ, нагревание до 100°C, 12 мин; НФ – Si 60 F ₂₅₄ ; ПФ – гексан : этилацетат – 9:1	0.11–0.43	–	Растительное сырье	[106]
АМ	<u>ПБ</u> –Гб–АМ ($\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 547$ нм)	Универсальный буферный раствор, pH 7.2, 2 мин	0.03–1.1	+	Плазма крови, моча	[118]
	<u>ПБ</u> –ПХ–АМ (-//-)		0.14–1.27			[119]
	<u>ПБ</u> –цитохром <i>c</i> –АМ (-//-)	Универсальный буферный раствор, pH 5.3, 2 мин	0.071–1.1			[120]
	<u>ПБ</u> –тирозиназа–АМ (-//-)		0.14–0.84			[121]
АМ*, ДАМ*	АМ (экстракт в гексане) + УФ-облучение = H_2O_2 ; H_2O_2 + (2,4-динитрофенил)-оксалат = высоко энергетический интермедиат, перенос энергии на 2,4,6,8-тетратиоморфорин-опиримидо[5,4- <i>d</i>]пиримидин	ВЭЖХ, НФ - Supelco discovery HS C ₁₈ HPLC column; ПФ – 20 мМ имидазол- HNO_3 буферный раствор (pH 8.5) : CH_3CN (30:70 об.%), 45°C, 0.5 мл/мин	4–80	+	Сыворотка крови	[122]
АМ*, ДАМ*	Постколоночная дериватизации: АМ + люминол (<i>LH</i>) + щелочной раствор катализатора (гематина/гемина/цитохрома- <i>c</i>): $\text{AM}^{\cdot} + \text{O}_2 = \text{O}_2^{\cdot-} + \text{AM}$ $\text{AM}^{\cdot} + \text{LH}^- = \text{L}^{\cdot-} + \text{AM}$ $\text{L}^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} = \text{LOO}^{\cdot-}$ $\text{LOO}^{\cdot-} = \text{LOOL}$ $\text{LOOL} = {}^1\text{AP} + \text{N}_2$ ${}^1\text{AP} = h\nu + \text{AP}$, где <i>AP</i> – аминифталат (хемилюминесцентный детектор, щелочная среда, 425 нм)	Хроматографическое разделение АМ и ДАМ (элюент – CH_3CN : H_2O (50:50 об.%)	0.0885–7 (логарифмические координаты)	+		[123]

Кислотной дериватизации подвергаются АМ и многие его полусинтетические производные, поэтому для определения индивидуальных эндопероксидов их разделяют методом ВЭЖХ. Для визуализации пятен эндопероксидов на ТСХ-пластинках их обрабатывают раствором конц. H_2SO_4 с добавкой анисового альдегида или ванилина с последующей денситометрией (табл. 3). Дериватизацию АМ анисовым альдегидом используют только для определения АМ методом ТСХ, а ванилином – еще и для ВЭЖХ определения. Анисовый альдегид с АМ на ТСХ-пластинках дает пятна розового цвета, в то время как после обработки ванилином пятна окрашены в голубой цвет.

Исследователи используют различные варианты ТСХ методики с анисовым альдегидом, варьируя условия экстракции эндопероксидов, природу и состав растворителей подвижной фазы, соотношение реагентов-проявителей [106, 111–113]. Благодаря применению смеси ТФУ с ацетонитрилом в качестве подвижной фазы, удается не только достичь высокой чувствительности определения АМ ($c_n = 0.106$ мкМ), но и разделить АМ и его природные прекурсоры (артенуин-В и артемизининовую кислоту), которые сопутствуют АМ в растительном сырье [112]. Использование в качестве ПФ смеси гексана и диэтилового эфира позволяет расширить диапазон линейности градуировочных зависимостей, однако c_n АМ увеличивается в 3 раза и составляет 0.35 мкМ [111]. Заметим, однако, что ДОК и нижняя граница определяемых концентраций эндопероксидов по методикам без и с добавлением анисового альдегида практически одинаковы (0.1–1.1 мкМ АМ).

Розовые пятна продукта взаимодействия АМ с анисовым альдегидом на ТСХ-пластинках флуоресцируют при 540 нм (оранжевое свечение) при их возбуждении при 520 нм. Определение можно проводить как спектрофотометрическим, так и флуоресцентным методом. Поскольку длины волн возбуждения и испускания очень близки друг к другу, интерпретация экспериментальных данных затруднена [106]. По этой причине для определения АМ используют более сложные люминесцентные системы, о которых речь пойдет ниже.

Важно отметить, что вариант кислотной дериватизации АМ ванилином в ТСХ варианте не уступает по чувствительности ВЭЖХ (с УФ-детектором) определению и при этом является менее трудоемким и дорогостоящим. Для экспресс-оценки качества растительного сырья предпочтительнее применение именно ТСХ методик, хотя они часто дают заниженные результаты по содержанию АМ. Для расчета общего содержания АМ в растительном сырье (в сухой массе) методом ТСХ найденный результат необходимо умножить на коэффициент 1.21 [111].

Кислотную дериватизацию применяют не только в хроматографических методиках, но и в колориметрических системах, но только для определения суммарного

содержания АМ и его производных (ДАМ, АТС и АТМ), которые могут совместно присутствовать в фармацевтических препаратах [104, 116]. Предложена методика, основанная на кислотной/щелочной дериватизации с последующим добавлением солей диазония [104]. Для кислотной дериватизации применяют одну из сильных минеральных кислот (HCl, HNO₃, HClO₄, H₂SO₄ и др.), в результате чего образуются продукты кислотного разложения АМ и его производных, обычно это α,β -ненасыщенные декалоны [104]. Для щелочной дериватизации эндопероксидов, продуктами которой являются енолы/карбоксилаты АМ и его производных, используют гидроксиды металлов IA и IIA группы Периодической системы и аммиак. Образовавшиеся соединения реагируют с солями диазония по реакции азосочетания, в результате чего бесцветный реакционный раствор в присутствии индикатора красителя прочного красного TR окрашивается в желтый цвет. При использовании этого способа дериватизации содержание АМ и его производных в лекарственных препаратах определяют спектрофотометрическим методом, при этом вспомогательные компоненты лекарственных препаратов не мешают их определению. Отметим также, что методики, основанные на щелочной дериватизации, характеризуются более широким ДОК, чем методики кислотной дериватизации, однако первые более чувствительны к условиям их проведения (рН, температуре).

Возможно также полуколичественное определение АМ и его производных с использованием простой тест-системы, которая без привлечения специального оборудования позволяет ответить на вопрос, достаточно ли содержание АМ и его производных в лекарственном средстве [116]. Для этого лекарственный препарат растворяют в подходящем органическом растворителе (метаноле, этаноле, ацетонитриле, уксусной кислоте и т.д.), способном образовывать водородные связи с определяемым соединением, и добавляют кислоту с pK_a ниже 3.8 (обычно используют H₃PO₄). Продукты кислотного разложения неустановленного состава окрашены в зеленый цвет. Вещества, не являющиеся производными АМ, не образуют продукт зеленого цвета. Стоит отметить, что не все органические растворители подходят для этой методики. Так, ДМСО и изопропанол не дают аналитического сигнала, а в ацетоне цвет продукта дериватизации не зеленый, а розовый.

В ряде случаев кислотную дериватизацию сочетают не с одной (как это было при визуализации пятен на ТСХ-пластинках), а с двумя последовательно протекающими реакциями [100, 117]. Так, например, спектрофотометрическое определение АМ и его производных ДАМ и АРТ в фармацевтических препаратах основано на применении индикаторной системы из трех сопряженных реакций: 1) кислотной дериватизации эндопероксидов 5М раствором HCl, в результате которой образуется H₂O₂, 2) окисления иодида калия пероксидом водорода, в которой выделяется

молекулярный иод, 3) реакции иода с красителем (сафранином Т, вариаминовым синим), в результате чего краситель меняет окраску, а его поглощение при аналитической длине волны пропорционально концентрации эндопероксида (табл. 3). Для определения индивидуальных концентраций АМ, ДАМ необходимо их предварительное разделение. Крахмал и глюкоза, содержащиеся в фармацевтических препаратах, не мешали определению. Обе методики сопоставимы между собой по чувствительности, однако уступают хроматографическим методикам, которые позволяют определять в 50 раз более низкие содержания АМ ($c_{n(ВЭЖХ/ТСХ)} \approx 0.1$ мкМ).

Предложена методика постколоночной дериватизации ДАМ, основанная на реакции *этерификации* с диацетилдигидрофлуоресцеином в присутствии 4-диметиламинопиридина и N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Продукт реакции сложный эфир АМ интенсивно поглощает в УФ области ($\epsilon = 2.480 \times 10^4$ М⁻¹×см⁻¹) [115]. Методика обладает достаточно широким ДОК, а c_n составляет всего 65 нМ. Методика сопоставима по чувствительности с ВЭЖХ и ТСХ методиками и значительно превосходит спектрофотометрические методики (табл. 3). Серьезными недостатками реакции этерификации являются ее длительность (8 ч) и недостаточно высокий теоретический выход продукта ($\leq 80\%$).

Для *люминесцентного определения* АМ и его производных используют три типа индикаторных систем (табл. 3). Первая система основана на *тушении флуоресценции* ксантенового красителя пиронина Б (**ПБ**) при взаимодействии с АМ (этанольный раствор) аналогично тому, как это происходит в присутствии H₂O₂. Катализаторами реакции являются гемин, Гб, цитохром *c*, ПХ и тирозиназа [118–121]. Наибольшей чувствительностью отличается методика, основанная на применении Гб. Определению АМ мешают цианид-ионы вследствие координации с ионами Fe(III) и Cu(II) активных центров перечисленных биокатализаторов [118], а также ионы Al³⁺, Mn²⁺ и Cu²⁺, способные замещать кофакторы металлопротеинов [119–121]. Цианид-ионы во всех системах уменьшают флуоресцентный сигнал вплоть до его полного исчезновения, в то время как в присутствии ионов металлов и аминокислот (лизина, гуанозина и триптофана) погрешность определения АМ в зависимости от природы биокатализатора может быть как положительной, так и отрицательной.

Вторая система включает три *сопряженные реакции*. АМ, как представитель органических пероксидов, при обработке УФ-излучением распадается с образованием пероксида водорода [124]. Последний взаимодействует с (2,4-динитрофенил)оксалатом. Продукт реакции, высокоэнергетический интермедиат, передает энергию флуорофору 2,4,6,8-тетратиоморфоринопиримидо[5,4-*d*]пиримидину, который в возбужденном состоянии испускает квант хемилюми-

несценции. Методика, основанная на использовании описанной индикаторной системы, селективна в присутствии компонентов сыворотки крови [122].

Третья система представлена реакцией *биокаталитического окисления люминола* в щелочной среде в присутствии АМ. Эндопероксид при участии ионов Fe(II) активного центра гемина, гематина или цитохрома *c* разрушается с образованием свободных радикалов. В результате цепочки реакций, приведенных в табл. 3, образуется анион гидропероксида люминола (LOOL), который соединяется с молекулой люминола с образованием эндопероксида люминола. При разрушении последнего образуется аминифталат в синглетном состоянии и испускается квант хемилюминесценции. Индикаторная система чувствительна к кислороду, поэтому необходимо проводить деоксигенацию реакционного раствора. Помимо АМ в реакцию вступает ДАМ, поэтому необходимо предварительное хроматографическое разделение этих двух соединений. Времена удерживания АМ и ДАМ отличаются практически в 2 раза при разделении эндопероксидов с помощью колонки с SiO₂ при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил-вода (50:50 об.%). Описанная методика подходит для определения только АМ и ДАМ, поскольку величины сигналов устойчивых в щелочных растворах АТЭ и АТМ в 10³ раз меньше величины сигнала АМ [123].

Сопоставление аналитических характеристик описанных выше методик (табл. 3) показало, что наиболее чувствительные (c_n на уровне 30-70 нмоль/л) индикаторные флуориметрические системы предложены для определения АМ и его производных в биологических жидкостях (плазме крови и моче) [118-121]. Спектрофотометрические системы, основанные на реакции щелочной дериватизации АМ и его производных [107, 108], уступают флуориметрическим системам по чувствительности по меньшей мере в 6 раз. Флуориметрическая методика, основанная на тушении АМ флуоресценции ПБ в присутствии Гб, является самой чувствительной из разработанных в настоящее время, довольно селективной и простой [118]. Хемилюминесцентные системы определения АМ в сыворотке крови на основе биокаталитического окисления люминола [123] и системы сопряженных реакций, включающей фотохимическое разложение АМ до H₂O₂ [122], весьма чувствительны к условиям их проведения и многостадийны. В практике химического анализа их пока использовали только в сочетании с ВЭЖХ разделением определяемых АМ и ДАМ. Наиболее чувствительная ($c_n = 65$ нмоль/л) спектрофотометрическая система основана на реакции этерификации ДАМ с диацетилдигидрофлуоресцеином, однако, поскольку реакция очень длительна (8 ч) и апробирована только на модельных растворах [115], она не может конкурировать с люминесцентными системами.

Для определения АМ и его производных в лекарственном растительном сырье предпочтительна реакция их кислотной дериватизации анисовым альдегидом после ТСХ разделения [106, 112, 113]. Таким способом можно определять в 5-17 раз меньшие концентрации эндопероксидов, чем при обработке АМ в тонком слое силикагеля парами аммиака.

Колориметрические методики анализа противомаларийных фармацевтических препаратов единичны, являются полуколичественными и позволяют определять только суммарное содержание АМ и его производных [104, 116]. Индивидуальное определение АМ на уровне его концентрации 3.5 мкмоль/л в фармацевтических препаратах возможно методом ТСХ с денситометрией при использовании в качестве реагента-проявителя 2,4-динитрогидразина [114]. Спектрофотометрические методики определения эндопероксидов на основе трех сопряженных реакций [100, 117] уступают по чувствительности ТСХ методике в 17 раз, хотя довольно селективны по отношению к вспомогательным компонентам лекарственных средств.

Учитывая тот факт, что с каждым годом качество противомаларийных лекарственных средств на основе АМ ухудшается, а доля фальсификатов по результатам химического анализа составляет 35% от общего числа (статистические данные 2012 г.) [125], предложенные к настоящему времени спектрофотометрические и люминесцентные системы не позволяют в полной мере решить указанную проблему. Не менее остро стоит вопрос определения артемизинина в противомаларийных БАД, которые можно приобрести в аптеках без рецепта врача. Таким образом, разработка новых чувствительных, селективных и простых спектроскопических методик определения АМ в противомаларийных БАД и фармацевтических препаратах весьма актуальна и целесообразна.

Экспериментальная часть

Глава 3. Исходные вещества, посуда, аппаратура, методики эксперимента, обработка результатов измерений

3.1. Исходные вещества

Для приготовления целлюлозных пленок использовали микрокристаллическую целлюлозу фирмы «Сигма-Олдрич», США, а также гидрофильные ИЖ: [BMIm][Cl], [BMIm][AcO], и гидрофобную [BMIm][Tf₂N]; все препараты фирмы «Сигма», США. Помимо коммерческого препарата [BMIm][Cl] использовали препарат, синтезированный по методике [126] к.х.н. Колесниковым Григорием Владимировичем, ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова (¹³C ЯМР-спектр приведен в Приложении 1). Препараты ИЖ высушивали согласно методике, предложенной Колесниковым Г.В., [BMIm][Cl] растворяли в соответствующем объеме ацетонитрила, засыпали прокаленный CaCl₂ и оставляли на 4 ч. После этого декантировали раствор в круглодонную колбу и осушали на роторном испарителе «Бучи» (Швейцария) при 70°C.

Применяли хитозан, M_r 120 кДа («Сигма», США), как добавку к целлюлозе.

Использовали следующие белки:

- катионную пероксидазу из корней хрена (ПХ), M_r 44173.9 г×моль⁻¹, RZ = 2.2, каталитическая активность по пурпурогаллину 266 ед.×мг⁻¹, pI 8.8, «Сигма», США;
- анионную пероксидазу из шелухи сои (ПС), M_r 44000 г×моль⁻¹, RZ = 3.2, каталитическая активность 90 ед.×мг⁻¹ по пурпурогаллину, pI 3.7, «Сигма», США;
- катионную пероксидазу арахиса (ПА), RZ = 2.0, выделенную из отработанной среды культуральных клеток арахиса *Arachis Hypogaea*, предоставленную профессором Р.Б. Ван Хьюсти (Университет Западного Онтарио, США), pI 4.7;
- микропероксидазу-11 из лошадиного сердца, динатриевую соль (МП), M_r 1861.92 г×моль⁻¹, pI 4.7, «Сигма», США;
- гемоглобин из бычьей сыворотки крови (Гб), M_r 64458 г×моль⁻¹, pI 7.0, «Сигма», США;
- альбумин бычий сывороточный, «Апплихем», Германия.

Исходные 0.1 мМ растворы ПХ и ПС готовили растворением точных навесок их твердых препаратов в 0.1 М ФБР, pH 7.0. Раствор МП с концентрацией 60 мкмоль×л⁻¹ готовили растворением динатриевой соли белка в 10мМ ФБР, pH 7.0. Рабочие растворы ПХ, ПС, Гб и МП готовили непосредственно перед работой разбавлением их исходных растворов 0.1 М и 10 мМ ФБР, pH 7.0 соответственно. В

системах с АМ использовали раствор Гб, разбавленный универсальным буферным раствором, рН 7.0.

Точные концентрации ПХ, ПС, МП и Гб устанавливали спектрофотометрически (ϵ : 9.4×10^4 , 1.4×10^5 [127], 1.78×10^5 [128] $M^{-1} \times cm^{-1}$ при 403, 402, 395 и 405 нм соответственно, $l = 1$ см). Твердые препараты ПХ, ПС, ПА, Гб и МП хранили при температуре +4 и -20°C соответственно, а рабочие растворы — при +4°C. Установлено, что каталитическая активность ПХ, ПС и Гб, рассчитанная в ТМБ единицах (индикаторное вещество с $\lambda_{\text{макс.}} = 374$ нм) при 25°C, составляет 859, 433 и 31 ед. на мг твердого вещества соответственно. При изучении влияния природы ИЖ на каталитическую активность растительных пероксидаз помимо [ВМІm][AcO] использовали [ВМІm][BF₄] («Сигма», США).

Каталитическую активность ферментов оценивали в реакциях превращения *субстратов-восстановителей*, арилдиаминов, фенолов и катехоламинов:

- 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ, «Мерк», Германия); *o*-дианизидина (*o*-ДА), и *o*-фенилендиамина (*o*-ФДА, «Сигма», США);
- гваякола и пирокатехина («Сигма», США);
- добутамина, гидрохлорида допамина, гидротартрата адреналина и сескви-гидрата α -метилдопы («Сигма», США).

Исходные 0.1 мМ растворы арилдиаминов готовили растворением точных навесок их твердых препаратов ТМБ и *o*-ДА в этаноле и *o*-ФДА («Сигма», США) — в воде. Растворы гваякола (18 и 72 ммоль \times л⁻¹) готовили разбавлением его жидкого препарата водой, ацетонитрилом или ИЖ ([ВМІm][AcO] или [ВМІm][BF₄]). Рабочие 0.1 мМ растворы катехоламинов готовили ежедневно растворением точных навесок их твердых препаратов в воде в емкостях из темного стекла. Растворы с меньшими концентрациями субстратов-восстановителей готовили последовательным растворением исходных растворов водой или этанолом непосредственно перед проведением эксперимента.

Применяли 11.2 М раствор H₂O₂ («Мерк», Германия). Точную концентрацию раствора устанавливали перманганатометрически [129] и спектрофотометрически ($\epsilon_{230} = 72.7 M^{-1} \times cm^{-1}$ [130]). Рабочие растворы H₂O₂ с меньшими концентрациями готовили ежедневно разбавлением концентрированного раствора водой. Растворы всех субстратов хранили в холодильнике при +4°C.

Использовали твердые препараты *красителей*: индигокармина (ИК), кармина, β -каротина («Сигма», США) и куркумина («Флюка», Германия), а также пиронина Б (ПБ, ОАО Опытнo-экспериментальный завод «ИРЕА», Москва). Рабочие растворы ИК, ПБ и кармина с концентрациями 85 мМ, 30 и 33 мкМ соответственно готовили растворением точных навесок их твердых препаратов в воде. Вследствие ди-

меризации и фоточувствительности раствор ИК готовили ежедневно в посуде из темного стекла [131]. Концентрированные растворы куркумина и β -каротина готовили аналогично, используя в качестве растворителя красителей этанол и ДМСО, соответственно, и разбавляя до нужной концентрации (33 мкМ) буферными растворами соответствующего рН (гл. 6.2).

Качество твердого препарата ПБ проверяли методом ТСХ. Применяли нормально-фазовые силикагелевые пластинки «Analtech» («Newak», Германия) на стеклянной подложке в хроматографической камере (10×15 см). Подвижной фазой служила смесь *n*-бутанол–вода– CH_3COOH (10:2:1 об.%) [132]. На ТСХ-пластинку наносили 1%-ный водный раствор красителя. Для проявления пятен ПБ после разделения ТСХ-пластинку оставляли на воздухе до полного высыхания. На хроматограмме получали одно пятно розового цвета с R_f равным 0.81. Качественной реакцией с родамином аммония доказано отсутствие в препарате ПБ ионов железа (III).

Для иммобилизации ПАВ в целлюлозные пленки использовали твердые препараты цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) («Флюка», США) и додецилсульфата натрия (ДДС) («Хеликон», Россия). Раствор ДДС с концентрацией 10 ммоль \times л⁻¹ готовили по точной навеске его твердого препарата в воде.

Исходные 0.3 и 5 мМ растворы артемизинина (АМ) готовили растворением точных навесок его твердого препарата («Сигма», США) в этаноле и метаноле соответственно в посуде из темного стекла. Рабочие растворы с меньшими концентрациями получали разбавлением водой. Растворы АМ хранили при температуре +4°C и использовали в течение 5 дней.

Рабочий 10 мМ раствор Mn(II) готовили растворением в воде точной навески его твердого препарата MnCl_2 (ч.д.а., «Реахим», Россия). Применяли стандартные растворы ионов Fe(III), Co(II), Cu(II) и Mg(II) (1 мг \times мл⁻¹) в виде $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ соответственно и Fe(II) (0.1 мг \times мл⁻¹) в форме FeSO_4 (все «Экоаналитика», Россия). Разбавленные растворы ионов металлов готовили разбавлением исходных растворов водой. Рабочие 0.1 М растворы глюкозы и фруктозы готовили растворением их твердых препаратов («Сигма», США) в воде и использовали в день приготовления.

Для приготовления комплекса {Eu(III)–тетрациклин} использовали твердые препараты $\text{EuCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и тетрациклина гидрохлорида (ТЦ) («Сигма», США). Рабочие 6.3 и 2.1 мМ растворы Eu(III) и ТЦ готовили растворением точных навесок их препаратов в воде и этаноле соответственно. Рабочий 0.2 мМ раствор билирубина (БР) готовили растворением точной навески его твердого препарата («Сигма», США) в 500 мкл 0.1М раствора NaOH и последующим разбавлением до 10.0 мл водой. Раствор хранили в посуде из темного стекла и использовали в течение 3–4

дней. Для получения дипиколината европия (III) в составе целлюлозной пленки использовали точную навеску твердого препарата дипиколиновой кислоты («Сигма», США).

Применяли конц. азотную и орто-фосфорную кислоты (х.ч., «Реахим», Россия), ледяную уксусную кислоту (ч.д.а, «Химмед», Россия), 5М раствор соляной кислоты (ос.ч.), приготовленный из фиксанального раствора («Гермед», Германия). Рабочие растворы HCl и H₃PO₄ с меньшими концентрациями готовили разбавлением 5М и конц. растворов водой соответственно. Водный 0.04М раствор борной кислоты готовили растворением точной навески ее твердого препарата («Реахим», Россия). Для приготовления водного 2М рабочего раствора ДАБКО использовали точную навеску твердого препарата, любезно предоставленного сотрудником кафедры органической химии химического факультета МГУ к.х.н. А.В. Ивановым. Раствор NaOH (0.2 моль×л⁻¹) получали растворением в воде точной навески его твердого препарата («Экрос», Россия).

Фосфатный, цитратный, цитратно-фосфатный, ацетатный и боратный буферные растворы готовили в соответствии с рекомендациями работы [133]. Для приготовления растворов буферных смесей использовали твердые препараты гидро- и дигидрофосфатов натрия («Мерк», Германия), цитрата и ацетата натрия (ч.д.а., «Хеликон», Россия), лимонной кислоты (ч.д.а., «Химмед», Россия) буры десятиводной (ч.д.а., «Химмед», Россия). Универсальный буферный раствор (УБР) готовили смешением 0.04М растворов уксусной, борной и орто-фосфорной кислот с добавлением необходимого количества 0.2М раствора NaOH в зависимости от требуемого pH. Буферный раствор МОПС готовили растворением навески его твердого препарата («Флюка», США) в воде с последующим доведением до pH 6.9 раствором NaOH с концентрацией 0.1 моль×л⁻¹. Трис-HCl буферный раствор (pH 7.1 и 8.0) готовили смешением 0.1 М растворов трис(гидроксиметил)-аминометана («Сигма», США) и соляной кислоты.

Органические растворители: метанол, ДМСО, ацетонитрил (ч.д.а, «Химмед», Россия), этанол (ч.д.а., «Реахим», Россия) и ДМФА (ч.д.а, «Компонент-Реактив», Россия) использовали без дополнительной очистки.

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке «Миллипор» (Франция), с удельной электропроводностью не более 18.2 МΩ×см⁻¹.

3.2. Посуда, аппаратура

Использовали мерные колбы с притертыми пробками и градуированные стеклянные пробирки, которые предварительно очищали конц. HNO₃ (ос.ч.), тщательно промывали деионизованной водой, стерилизовали в течение 15 мин при

температуре 105°C в сушильном шкафу («Утенос Электротехника», Латвия); пластиковые пробирки «Эппендорф», емкостью 1 мл, а также пластиковые пробирки емкостью 2, 5, 15 и 50 мл, стеклянные и пластиковые чашки Петри диаметром 3, 5 и 10 см («Хеликон», Россия), пластиковый пинцет.

В качестве подложки при формировании целлюлозных пленок и при измерении их аналитического сигнала использовали предметные стекла фирмы («Мензел», Германия).

Толщину целлюлозных пленок измеряли микрометром МК-25 фирмы «Эталон» (Россия) с погрешностью ± 0.000002 м. Прочность и эластичность пленок устанавливали на приборе «РМ-50» фирмы «МАШПЛАСТ» (Россия) с относительной погрешностью $\pm 1\%$ от измеряемой нагрузки.

Фотографии пленок получали на сканирующем электронном микроскопе «Carl Zeiss Supra 40», Германия (предельное разрешение 3-4 нм, ускоряющее напряжение ЕНТ 10 кВ, апертура 30 мкм, датчик InLens) на физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова.

Оптическую плотность реакционных растворов измеряли на спектрофотометре «Shimadzu UV mini-1240A» (Япония) с точностью ± 0.0003 опт. ед. в кварцевой микрокювете (объем 600 мкл, $l = 1$ см). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu RF 5301» (Япония) (толщины входной и выходной щелей – 5 нм; микрокювета объемом 600 мкл) и спектрофлуориметре «Agilent Technologies Cary Eclipse» (толщину входной и выходной щелей варьировали в интервале 5–15 нм; кварцевые кюветы объемом 600 и 3000 мкл).

Точные навески препаратов взвешивали на электронных весах фирмы «Охаус» (США) с погрешностью ± 0.0001 г и фирмы «Меттлер Толедо» (модель МХ5, Швейцария) с погрешностью ± 0.005 мг. Для отбора малых объемов растворов реагентов применяли микродозаторы «Биохит» (Финляндия) и «Эппендорф» (США).

Измеряли рН буферных растворов на рН-метре «Эксперт-001.1.101» («Эконикс-эксперт», Россия) с комбинированным рН электродом ЭСК-10601/7 (Россия), откалиброванным по водным стандартным буферным растворам.

Растворы нагревали и/или термостатировали в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия). Точность поддержания температуры составляла $\pm 1^\circ\text{C}$.

Для перемешивания реакционных растворов и проведения экстракции АМ использовали шейкер «ELMIS-3.16L» (Латвия). Для разложения фармацевтических препаратов использовали ультразвуковую баню УЗВ-1,3 («Сапфир», Россия). Для отделения осадка от надосадочной жидкости использовали центрифугу «ELMISМ-6» (Латвия).

Для фиксирования времени проведения индикаторных реакций использовали секундомер фирмы «Агат» (Россия) с погрешностью ± 0.2 с.

3.3. Методики эксперимента

Методика 1 получения целлюлозных пленок с использованием $[BMIm][AcO]$ ($[BMIm][Cl]$) в отсутствие (1а) и в присутствии биокатализаторов (1б), красителей (1в), ПАВ (1г), $\{Eu(III)-TЦ\}$ (1д) или $\{PB-Mn(II)-ДДС\}$ (1е). В пластиковую пробирку емкостью 1 мл вводили последовательно 154 (44) мг целлюлозы и 1.1 г ИЖ. Микропробирку закрывали крышкой и помещали в термостат при температуре 50 (85)°С. Смесь выдерживали в таких условиях в течение 7 ч при периодическом аккуратном перемешивании тонкой стеклянной палочкой до полного растворения целлюлозы (и белков) в ИЖ. Горячий раствор с помощью той же палочки быстро и равномерно переносили на нагретое предметное стекло и раскатывали по нему для получения пленки толщиной ≈ 0.2 мм. После распределения раствора по стеклу, его немного охлаждали, после чего заполняли образовавшиеся по краям пустоты, распределяя раствор по пластинке так, чтобы он полностью покрывал положку. Полученные стекла с пленками помещали в холодильник на 1–1.5 ч при +4°С. Затем стекла с застывшими пленками последовательно опускали на 15 мин в этанол (воду) объемом 15 мл для удаления избыточного количества ИЖ, в результате чего пленки приобретали бледно-желтую окраску. В ходе промывания пленки становились прозрачными и бесцветными и соскальзывали со стеклянных пластин. Неровные края пленок аккуратно обрезали и отбрасывали. Оставшиеся пленки в набухшем состоянии разрезали канцелярским ножом на квадраты размером 10×10 мм², помещали в пластиковый контейнер, плотно его закрывали и хранили при комнатной температуре в темном месте. Из расплава объемом 300 мкл получали 4 пленки указанного выше размера.

При иммобилизации белков и красителей (ПАВ) методика оставалась такой же с той лишь разницей, что сначала в микропробирку вносили 0.6 мг биокатализатора (**методика 1б**) или красителя (ИК и ПБ) (**методика 1в**) или ПАВ (ЦТАБ и ДДС) (**методика 1г**), или $Eu(DPK)_3$ (**методика 1д**) ; 1.3 мг ТЦ и 0.4 мг $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ (**методика 1е**), или 0.3 мг ПБ, 0.2 мг $MnCl_2$ и 0.35 мг ДДС (**методика 1ж**), а затем добавляли целлюлозу и ИЖ. Заметим, что окраска пленок с красителями зависела от их природы и используемой для растворения целлюлозы ИЖ (гл. 6.2).

Методика 2 изучения прочности и эластичности целлюлозных пленок на установке «РМ-50». Целлюлозные пленки готовили по методике 1а, но размером 5×2 см². Полученные пленки немного подсушивали на воздухе, затем помещали в специальные зажимы, которые прилагаются к установке «РМ-50». Зажимы с плен-

ками закрепляли в гнездах разрывной машины. После этого передвижением нижнего зажима целлюлозную пленку натягивали так, чтобы на ее поверхности не было складок и вздутий. Далее в программе устанавливали скорость движения нижнего зажима на значение $1 \text{ мм} \times \text{с}^{-1}$ и нажимали кнопку «старт». Когда пленка рвалась, программа регистрировала диаграмму прочности (зависимость внешнего напряжения в МПа от относительного удлинения пленки, %) и фиксировала численные значения прочности и эластичности в таблице на экране компьютера. При изучении влияния молекулярных органических растворителей и водных растворов различной природы на прочность и эластичность пленок, их предварительно, до помещения в зажимы, вымачивали в течение 3 мин в соответствующем растворе, а затем повторяли описанные выше действия.

Методика 3 изучения влияния [BMIm][AcO] на каталитическую активность ПХ и ПС в реакции окисления гваякола пероксидом водорода. В пластиковую пробирку емкостью 1 мл последовательно вводили необходимый объем ФБР (рН 6.0) или воды, 0 – 400 мкл ИЖ, 30 – 60 мкл 18 – 72 мМ раствора ГК, 4.5 – 11.0 мкл 1.2 – 0.3 мкМ раствора фермента. Раствор перемешивали, выдерживали в течение 15 мин и вводили 60 мкл 1.2 – 2.2 М H_2O_2 . Общий объем реакционной смеси составлял 600 мкл. В момент добавления H_2O_2 реакционную смесь тщательно перемешивали, переливали в микрокювету и регистрировали кинетику окисления ГК при 470 нм [134]. Полосы поглощения ИЖ и продуктов пероксидазного окисления ГК не пересекались.

Методика 4 определения концентрации ПХ (ПС, Гб) в промывных водах по реакции окисления ТМБ пероксидом водорода. В пластиковую пробирку емкостью 1 мл последовательно вводили 504 мкл 0.1 М ФБР (рН 7.0), 6 мкл стандартного раствора биокатализатора (или промывных вод, использованных для удаления избытка [BMIm][Cl]; 15 мл собранных промывных вод разбавляли до 25.0 мл в мерной колбе), 30 мкл 0.5 мМ раствора ТМБ и 60 мкл 0.01 М раствора H_2O_2 . При этом суммарный объем реакционной смеси составлял 600 мкл. Реакционный раствор быстро перемешивали, переливали в микрокювету и регистрировали величину оптической плотности реакционного раствора во времени каждые 5 с в течение 2 мин при 374 нм. Эта длина волны соответствует максимуму поглощения индикаторного вещества, промежуточного продукта окисления ТМБ с $\varepsilon = 23.7 \text{ мМ} \times \text{см}^{-1}$ [135].

Скорость реакции окисления ТМБ пероксидом водорода с участием нативных биокатализаторов рассчитывали по методу тангенсов [136]. Для этого по полученным данным строили кинетические кривые в координатах оптическая плотность (А)– время (t , с) при 374 нм и рассчитывали наклон начального участка кинетиче-

ской кривой – $tg\alpha$. Концентрацию биокатализаторов в промывных водах определяли по градуировочному графику, построенному в координатах: $tg\alpha$ – содержание биокатализатора, нмоль.

При проведении контрольного опыта в реакционную смесь вводили 6 мкл промывных вод, полученных после промывания плёнки, не содержащей биокатализатор.

Методика 5 определения каталитической активности биокатализаторов в плёнках {целлюлоза-[BMIm][Cl]} визуальным методом. Влажную целлюлозую пленку пинцетом аккуратно размещали на предметном стекле. В одну и ту же точку плёнки микродозатором последовательно наносили 20 мкл 0.1 мМ раствора арилдиамина (или катехоламина) и 10 мкл 0.1 мМ раствора пероксида водорода. При добавлении H_2O_2 включали секундомер. Фиксировали время появления в плёнке окраски определённой интенсивности. При проведении контрольного опыта (в отсутствие биокатализатора) использовали плёнку, не содержащую биокатализатор. В остальном методика эксперимента оставалась прежней. Для оценки каталитической активности пленки с верхней и нижней стороны использовали две пленки одной и той же серии.

Прозрачность ферментсодержащих 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, измеряли поглощение плёнки, а затем рассчитывали её прозрачность.

Методика 6 регистрации сигнала флуоресценции пленок без и с иммобилизованными ПБ, {Eu(III)-ТЦ}, {ПБ-МП} или {ПБ-Mn(II)-ДДС}. Пленку размером 1×2 см, приготовленную по методикам 1в, 1д-ж, помещали на зеркальную пластину, которую использовали в качестве отражающей поверхности [137], размером 1×2.5 см. 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 (Приложение 4, табл. 2). Регистрировали спектр флуоресценции пленки при соответствующей длине волны возбуждения флуорофора или измеряли значение интенсивности флуоресценции при соответствующей длине волны испускания. Контрольным опытом во всех экспериментах служила пленка без флуорофора, полученная с применением той же самой ИЖ (методика 1а), что и пленка с флуорофором.

Методика 7 получения тройного комплекса {Eu(III)–ТЦ–H₂O₂} в растворе.

В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 100 мкл 6.3 мМ раствора EuCl₃, 100 мкл 2.1 мМ раствора ТЦ, 120 мкл метанола, 60 мкл 0.5 мМ раствора H₂O₂ и 2620 мкл буферного раствора МОПС (рН 6.9). Раствор перемешивали, переливали в кварцевую кювету и регистрировали спектры флуоресценции в интервале длин волн 500–700 нм, $\lambda_{\text{возб.}} = 405$ нм.

Методика 8 определения БР в растворе в индикаторной системе {Eu(III)–ТЦ}. В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 1.0 мл 0.1 М трис-буферного раствора (рН 7.1), 300 мкл 1.5 мМ раствора ТЦ, 300 мкл 0.5 мМ раствора EuCl₃·6H₂O и 400 мкл 0.01 мМ раствора БР, так чтобы общий объем смеси составлял 3.0 мл. Раствор осторожно перемешивали, переливали в кварцевую кювету и через 15 мин после смешения реагентов регистрировали спектры флуоресценции в интервале длин волн 500–700 нм или измеряли флуоресценцию при 617 нм ($\lambda_{\text{возб.}} = 390$ нм). При проведении контрольного опыта вместо щелочного раствора БР вводили 400 мкл 5 мМ раствора NaOH.

Методика 9а проведения реакции окисления ПБ артемизинином в присутствии МП. В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 75–1200 мкл 30 мкМ раствора ПБ, 12.5–500 мкл 50 мкМ раствора МП, 0–100 мкл 30 мкМ водно-органического раствора АМ (95:5 об.%), 0–100 мкл органического растворителя, так чтобы объем органического растворителя оставался постоянным, и необходимое количество УБР с рН 3.5–6.8 так, чтобы объем раствора был постоянный и равен 3.0 мл. Раствор перемешивали, переливали в кварцевую кювету, выдерживали 1 мин и либо регистрировали спектры флуоресценции в интервале длин волн 500–700 нм, либо измеряли величины интенсивности флуоресценции (I) при 569 нм ($\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм). При проведении контрольного опыта вместо раствора АМ вводили такой же объем органического растворителя и регистрировали сигнал I₀.

Методика 9б определения АМ по реакции окисления ПБ артемизинином в присутствии МП методом градуировочного графика. В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 200 мкл 30 мкМ раствора ПБ, 240 мкл 50 мкМ раствора МП, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 мкл 30 мкМ или 10, 50 мкл 3 мкМ этанольного раствора АМ, 30–100 мкл этанола, так чтобы его объемное содержание в системе оставалось постоянным и составляло 100 мкл и 2360 мкл УБР, рН 5.9. Раствор перемешивали, переливали в кварцевую кювету, выдерживали 1 мин, измеряли интенсивность флуоресценции в отсутствие и присутствии АМ ($\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм). По полученным данным рассчитывали отношение интенсивностей при 569 нм и строили зависимость I₀/I – c(АМ), мкМ.

Методика 10а проведения реакции окисления ПБ артемизинином в присутствии комплекса {Mn(II)–ДДС}. В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 75–1200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 0–245 мкл 10 мМ раствора Mn(II) и 0–245 мкл 10 мМ раствора ДДС, 0–100 мкл 30мкМ водно-органического раствора АМ, 0–100 мкл органического растворителя, так чтобы объем органического растворителя оставался постоянным, и необходимое количество УБР с рН в интервале 3.5–6.8 так, чтобы объем смеси составлял 3.0 мл. Раствор перемешивали, переливали в кварцевую кювету, выдерживали 2 мин. Далее поступали, как описано в методике 9а.

Методика 10б определения АМ по реакции окисления ПБ артемизинином в присутствии комплекса {Mn(II)–ДДС} методом градуировочного графика. В пробирку емкостью 5 мл последовательно вносили 200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 30 мкл 10мМ раствора Mn(II) и 30 мкл 10мМ раствора ДДС, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 мкл 30 мкМ или 20, 50 мкл 3 мкМ этанольного раствора АМ, 20–100 мкл этанола, так чтобы его объемное содержание в системе оставалось постоянным и составляло 100 мкл, и 2540 мкл УБР, рН 5.9. Раствор перемешивали, переливали в кварцевую кювету, выдерживали 2 мин. Далее поступали, как описано в методике 9б.

Методика 11а определения АМ в БАД «Best Artemisinin» с использованием индикаторной системы ПБ–МП методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II). Точную навеску (масса 0.0254 г) белого порошка из капсулы препарата помещали в фарфоровую ступку, растирали, а затем растворяли в 20.0 мл этанола в течение 2 ч при постоянном встряхивании на шейкере. Нерастворившиеся вспомогательные компоненты БАД отфильтровывали через фильтр «синяя лента». Далее 30 мкл фильтрата разбавляли этанолом до 1.5 мл. Определение проводили методом градуировочного графика (I) и добавок (II). Для этого в реакционную смесь вводили последовательно 200 мкл 30 мкМ раствора ПБ, 240 мкл 50 мкМ раствора МП, 10 мкл анализируемого раствора (I) или 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления универсальным буферным раствором с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 0.5 – 2.5 мкМ.

Методика 11б определения АМ в БАД «Best Artemisinin» с использованием индикаторной системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II). Перевод образца в раствор осуществляли как описано в методике 11а. Определение проводили методом градуировочного графика (I) и добавок (II). Для этого в пластиковую пробирку последовательно вводили 200 мкл

30мкМ раствора ПБ, 30 мкл 10мМ раствора Mn(II) и 30 мкл 10мМ раствора ДДС, 10 мкл анализируемого раствора (I) или 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления универсальным буферным раствором с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 0.5 – 2.5 мкМ.

Методика 12а ***определения АМ в БАД «Artemisia annua intense» с использованием индикаторной системы ПБ–МП методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) при спиртовой экстракции АМ из препарата.*** Точную навеску (масса 0.2300 г) коричневого порошка из капсулы препарата помещали в фарфоровую ступку, растирали до получения мелкодисперсного состояния и растворяли в 20.0 мл этанола в течение 1 ч при постоянном встряхивании на шейкере. Нерастворившиеся вспомогательные компоненты БАД отфильтровывали через фильтр «синяя лента». Определение АМ в полученном фильтрате проводили методом градуировочного графика (I) и добавок (II). Для этого в пластиковую пробирку последовательно вводили 200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 240 мкл 50мкМ раствора МП, 10 мкл анализируемого раствора (I) или 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 1 – 5 мкМ.

Методика 12б ***определения АМ в БАД «Artemisia annua intense» с использованием индикаторной системы {ПБ–МП} методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) при водной экстракции АМ из препарата.*** Точную навеску (масса 0.230 г) коричневого порошка из капсулы препарата помещали в фарфоровую ступку, растирали до получения мелкодисперсного состояния и растворяли в 70.0 мл дистиллированной воды при нагревании до 65⁰С в течение 30 мин. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин при скорости центрифугирования 1000 об.×мин⁻¹. Нерастворившиеся вспомогательные компоненты БАД отфильтровывали через фильтр «синяя лента». Определение АМ в полученном фильтрате проводили методом градуировочного графика (I) и добавок (II). Для этого в пластиковую пробирку последовательно вводили 200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 240 мкл 50мкМ раствора МП, 100 мкл анализируемого раствора (I) или 100 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 1 – 5 мкМ.

Методика 12в определения АМ в БАД «*Artemisia annua intense*» с использованием индикаторной системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) при спиртовой экстракции АМ из препарата. При переводе образца в раствор придерживались методики 12а. Для определения АМ методом градуировочного графика (I) и добавок (II) в пластиковую пробирку последовательно вводили 200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 30 мкл 10мМ раствора Mn(II) и 30 мкл 10мМ раствора ДДС, 10 мкл анализируемого раствора (I) или 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 1 – 5 мкМ.

Методика 12г определения АМ в БАД «*Artemisia annua intense*» с использованием индикаторной системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) при водной экстракции АМ из препарата. Пробоподготовку образца проводили в соответствии с методикой 12б. Для определения АМ в пластиковую пробирку последовательно вводили 200 мкл 30мкМ раствора ПБ, 30 мкл 10мМ раствора Mn(II) и 30 мкл 10мМ раствора ДДС, 100 мкл анализируемого раствора (I) или 100 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 мкМ в качестве добавок (II). Суммарный объем реакционной смеси после разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. Градуировочные зависимости строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций АМ 1 – 5 мкМ.

Методика 13 проведения реакции с участием АМ и пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС}. Пленки размером 1×2 см получали по методике 1ж, промывали этанолом, помещали в пробирку емкостью 5 мл с заранее приготовленной смесью УБР и 0–100 мкл 30мкМ этанольного раствора АМ, 0–100 мкл этанола, так чтобы объем последнего в системе оставался постоянным. Суммарный объем реакционной смеси составлял 3.0 мл. Через определенное время пленку аккуратно с помощью пинцета доставали из реакционного раствора, помещали на зеркальную пластину и далее действовали так, как описано в методике 6.

Методика 14 определения АМ в БАД «*Best Artemisinin*» методом добавок с использованием пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС}. Пробоподготовку проводили в соответствии с методикой 11 а. Для определения АМ в пластиковую центрифужную коническую пробирку емкостью 5 мл вводили последовательно 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора АМ с концентрациями 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 мкМ в качестве добавок. Полученный раствор тщательно перемешивали. Суммарный объем реакционной смеси после разбавления

УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. После этого в пробирку с помощью пинцета вносили пленку размером 1×2 см, приготовленную по методике 1ж и промытую водой. Пленку располагали в пробирке таким образом, что она прилегла одной своей стороной к стенке пробирки и удерживалась там за счет сил адгезии. По окончании химической реакции через 30 с реакционную смесь выливали из пробирки, а пленку осторожно вынимали пинцетом и располагали на зеркальной пластинке. Флуоресцентный сигнал пленки регистрировали, как это описано в методике 6. Градуировочную зависимость строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций AM 0.5 – 2.5 мкМ.

Методика 15 определения AM в БАД «Artemisia annua intense» методом добавок с использованием пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС}. Пробоподготовку проводили в соответствии с методикой 12 а. Для определения AM в пластиковую пробирку емкостью 5 мл вводили последовательно 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл стандартного раствора AM с концентрациями 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 мкМ в качестве добавок. Суммарный объем реакционной смеси после разбавления УБР с рН 5.9 составлял 3.0 мл. После этого в пробирку вносили пленку размером 1×2 см, приготовленную по методике 1ж и промытую водой. Пленку располагали в пробирке таким образом, что она прилегла одной своей стороной к стенке пробирки и удерживалась там за счет сил адгезии. По окончании химической реакции через 30 с реакционную смесь выливали из пробирки, а пленку осторожно вынимали пинцетом и располагали на зеркальной пластике. Флуоресцентный сигнал пленки регистрировали как это описано в методике 6. Градуировочную зависимость строили в координатах $I_0/I - c_{AM}$, мкМ в диапазоне концентраций AM 0.5 – 2.5 мкМ.

3.4. Обработка результатов измерений

Скорость индикаторных реакций определяли методом тангенсов [136]. В методе тангенсов абсолютные значения начальных скоростей ферментативных реакций (V_0 , мкМ×мин⁻¹) рассчитывали из величин тангенсов углов наклона кинетических кривых по следующей формуле:

$$V_0 = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\varepsilon l} = \frac{tg \alpha}{\varepsilon l}, \quad (1)$$

где $tg \alpha$ — тангенс угла наклона кинетических кривых, построенных в координатах оптическая плотность (A) – время (t , с); l – толщина кюветы (см); ε – молярный коэффициент поглощения индикаторного вещества.

Относительные активности растительных пероксидаз в среде ИЖ-буферный раствор по отношению к активности в водной среде (a_i/a_0) рассчитывали по форму-

ле: $a_i/a_0 = \text{tg}\alpha_i/\text{tg}\alpha_0$, где $\text{tg}\alpha_i$ и $\text{tg}\alpha_0$ – тангенсы угла наклона кинетических кривых в координатах оптическая плотность (A) – время (t , с) в присутствии и отсутствие ИЖ соответственно.

Для оценки кинетических параметров катализируемого нативными растительными пероксидазами окисления ГК пероксидом водорода в присутствие ацетатной ИЖ кинетические кривые описывали уравнением Михаэлиса – Ментен и линеаризовали в рамках моделей Лайнуивера-Берка [138]:

$$V_0 = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_m \cdot [S]} = \frac{K_m}{V_m \cdot [S]} + \frac{1}{V_m}, \quad (3)$$

где V_m – максимальная скорость реакции, мкМ·мин⁻¹; K_m – константа Михаэлиса, мкМ; $[S]$ – концентрация пероксида, мкМ.

Величины K_i в присутствии 10 об.% [ВМІm][AcO] рассчитывали по приведенным ниже формулам:

$$V_{0,i} = \frac{k_{cat}[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (4)$$

$$\frac{V_{0,i}}{V_{0,i+1}} = \frac{k_{cat,i}}{k_{cat,i+1}} = \frac{1 + \frac{[I]_{i+1}}{K_{i,i+1}}}{1 + \frac{[I]_i}{K_{i,i}}} \quad (6)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (5)$$

$$\frac{a_i}{a_0} = \frac{k_{cat,i}}{k_2} = \frac{1}{1 + \frac{[I]_i}{K_{i,i}}} \quad (7)$$

$$K_{I,i} = \frac{[I]_i}{\frac{a_0}{a_i} - 1} \quad (8)$$

Эффективную каталитическую константу (k_{cat} , мин⁻¹) рассчитывали по формуле:

$$k_{kat} = \frac{V_m}{[E]_0}, \quad (9)$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация фермента, мкМ.

Степень ингибирования пероксидаз (I , %) в присутствии молекулярных органических растворителей (МОР) и ИЖ рассчитывали по формуле:

$$I\% = 100\% - \frac{\text{tg}\alpha_{ing}}{\text{tg}\alpha_0} \times 100\%, \quad (10)$$

где $\text{tg}\alpha_{ing}$ и $\text{tg}\alpha_0$ – скорости индикаторной реакции в присутствии и отсутствие ингибитора соответственно.

Степень вымывания биокатализаторов (%) из пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]} рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{вымывания}} = \frac{c_{E(\text{пр.в.})}}{c_{E(\text{пл.})}} \times 100\% \quad (11)$$

где $c_{E(\text{пр.в.})}$ — концентрация белка в промывных водах, найденная по уравнению градуировочной зависимости (гл. 6.1, табл. 12), $c_{E(\text{пл.})}$ — концентрация белка в пленке. Для расчета степени вымывания красителей использовали аналогичную формулу, подставляя в нее вместо концентраций биокатализаторов соответствующие концентрации красителей.

Степень сорбции красителей (%) рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{сорбции}} = \frac{\Delta A_t}{A_{\text{исх.}}} \times 100\% \quad (12)$$

где ΔA_t — изменение оптической плотности раствора красителя за наблюдаемое время t при характеристической длине волны (611 нм для ИК и 555 нм для ПБ), $A_{\text{исх.}}$ — оптическая плотность исходного раствора красителя при характеристической длине волны.

Результаты экспериментов обрабатывали с применением методов математической статистики. Использовали следующие обозначения:

\bar{x} — среднее для ряда в n измерениях, $\bar{x} = \sum x_i/n$;

V — дисперсия, $V = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}$

s — стандартное отклонение, $s = \sqrt{\frac{\sum (x - x_i)^2}{n-1}}$

s_r — относительное стандартное отклонение, $s_r = \frac{s}{\bar{x}}$.

Нижнюю границу определяемых содержаний (c_n) характеризовали минимально определяемой концентрацией при заданной вероятности $P = 0.95$ и числе параллельных измерений n , при которых $s_r \leq 0.33$. Предел обнаружения рассчитывали по 3 σ -критерию по формуле: $c_{\text{мин}} = 3 \frac{s_0}{S}$, где s_0 — стандартное отклонение фона, s — крутизна градуировочной зависимости.

Для обработки экспериментальных данных использовали программу Excel 2007. Для расчёта погрешности разности ($I_0 - I$) и отношений интенсивностей флуоресценции (I_0/I) применяли программу GraphPad.

Обсуждение результатов

Глава 4. Обоснование выбора индикаторной системы

4.1. Выбор микрокристаллической целлюлозы как носителя аналитических реагентов

Целлюлоза — природный линейный полисахарид, [поли(1→4)-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза], общей формулы $[C_6H_7O_2(OH)_3]_n$, обладающий пористой структурой, состоит из однородных по размеру и пористости жестких сферических частиц и отличается высокой степенью гидрофильности [139]. На рис. 16 представлена химическая структура целлюлозы, из которой видно, что каждый мономер содержит три гидроксильных группы. Благодаря большому количеству гидроксильных групп в макромолекуле, целлюлозу можно легко модифицировать путем введения различных заместителей, например, ацетил-, карбоксиметил- и диэтиламиноэтил-групп.

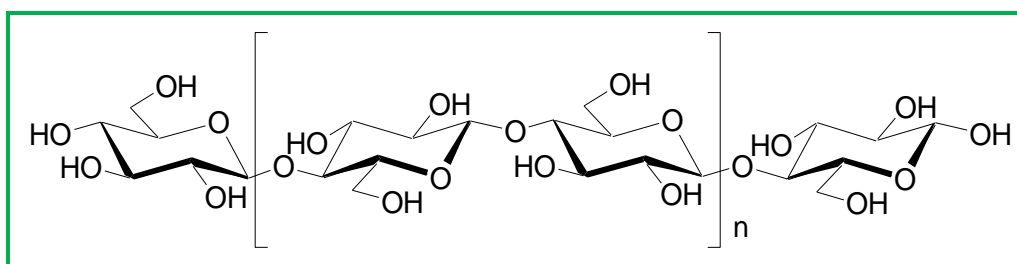


Рис. 16. Химическая структура целлюлозы, показывающая повторяющуюся целлобиозную единицу.

Кроме того, целлюлоза — биосовместимый, биodeградируемый и нетоксичный материал [140]. Указанные свойства целлюлозы и ее производных в совокупности с доступностью, дешевизной и легкостью утилизации обуславливают ее успешное применение в качестве носителя или ионообменников, иммуносорбентов в хроматографии и матрицы для физической и ковалентной иммобилизации широкого круга аналитических реагентов, в том числе оксидоредуктаз [141, 142]. Разработанные биоматериалы в виде индикаторных бумаг и гранулированных порошков оптически непрозрачны, их используют преимущественно в тест-методах химического анализа с визуальной индикацией аналитического сигнала [143, 144].

Исследователи отмечают, что растворимость целлюлозы зависит от ее происхождения (микрокристаллическая целлюлоза, фильтровальная бумага, волокнистая масса из мягкой и твердой древесины и т.д.), степени полимеризации, температуры растворения [64, 139]. А для растворения целлюлозы в ИЖ самым важным фактором является содержания воды в системе [64]. Известны предельно-допустимые содержания воды, при превышении которых целлюлоза при

определенной температуре и концентрации выпадает в осадок (рис. 2, табл. 1, приложение 2). Мы использовали коммерческий препарат микрокристаллической целлюлозы в виде белоснежного легкосыпучего порошка со средним размером частиц 20-90 мкм [145]. Особенностью микрокристаллической целлюлозы является то, что в отличие от природной α -целлюлозы, из которой ее получают путем кислотного гидролиза (для удаления аморфных областей), она не имеет волокнистой структуры, а состоит из отдельных крупно кристаллических агрегатов, содержащих сотни и тысячи макромолекул [139, 146]. Эти агрегаты обычно имеют примерно одинаковый диаметр и длину, составляющие в среднем 1000 нм [147]. Такие размеры обеспечивают уникальные свойства микрокристаллической целлюлозы, в частности ее способность к сорбции, более высокую реакционную способность по сравнению с необработанной целлюлозой, что открывает пути ее модификации для достижения определенных свойств, возможность создания материалов (таблеток, пластин и др.) даже без дополнительной обработки [146]. Коммерческая доступность препарата микрокристаллической целлюлозы, имеющиеся в литературе сведения о ее растворении в различных растворителях, в том числе и ИЖ, полностью оправдывают выбор этой матрицы.

4.2. Выбор природы ИЖ в качестве растворителя целлюлозы

Как мы отмечали в гл. 1.1.2, применение ИЖ в качестве растворителя целлюлозы позволяет придавать ей практически любую желаемую тестовую форму: пленки, волокна, шарика, губки и др., что открывает возможность получения новых материалов для сенсорных технологий. Особенностью использования [BMIM][Cl] является возможность не только растворить в нем целлюлозу, но и регенерировать ее в дальнейшем путем осаждения в виде оптически прозрачной пленки [27, 61]. Известные из литературы растворители целлюлозы, такие как кислоты (серная, фосфорная, трифторуксусная), комплексные (кадоксен, куен, куоксам и др.) и четвертичные основания и апротонные растворители (N-метилморфолин-N-оксид, N-метилпиперидин-N-оксид и др.) растворяют целлюлозу, однако, из их однородных прозрачных растворов практически невозможно получить прозрачные материалы [147, 148]. Только при осаждении и омылении ацетилцеллюлозной пленки из щелочных растворов ксантагенат целлюлозы (вискозы) получается прозрачный целлофан [149].

В современной литературе наилучшими растворителями целлюлозы признаны хлоридные и ацетатные ИЖ на основе катиона имидазолия, среди них [BMIm][Cl], [BMIm][AcO] [61, 62, 150], [EMIm][Cl], [EMIm][AcO] [151, 152], [AMIm][Cl] [153]. Несмотря на то, что все эти ИЖ коммерчески доступны, мы выбрали [BMIm][Cl] и

[BMIm][AcO], поскольку методики и причины растворения целлюлозы в этих ИЖ наиболее изучены, а также они дешевле других перечисленных ИЖ не менее, чем в 3–7 раз. Напомним, что эти ИЖ растворяют целлюлозу благодаря высокой акцепторной способности их анионов по отношению к ОН-группам целлюлозы, которая, согласно литературным данным [80], в большей степени выражена у [BMIM][AcO] по сравнению с [BMIM][Cl] (рис. 17).

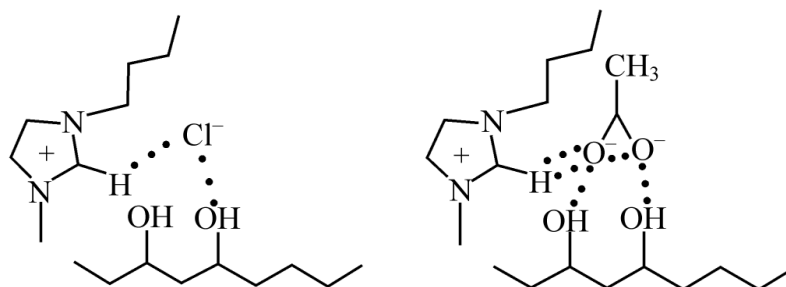


Рис. 17. Схема взаимодействия целлюлозы с [BMIm][Cl] (слева) и [BMIm][AcO] (справа) [80].

В результате такого взаимодействия сеть водородных связей в целлюлозе при нагревании в ИЖ разрушается, и образуется однородный раствор [154]. Растворимость целлюлозы в ацетатной ИЖ в 3 раза выше таковой в хлоридной ИЖ при обычном нагревании, без использования ультразвука и микроволнового излучения [62].

Отработанные методики синтеза [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO] позволяют получать препараты, аналогичные по качеству коммерческим (Приложение 1). Физико-химические характеристики использованных в работе ИЖ приведены в табл. 4. Из данных таблицы видно, что хлоридная ИЖ представляет собой твердое вещество, а ацетатный препарат при комнатной температуре — вязкая жидкость, при этом их плотности и полярности близки.

Таблица 4. Физико-химические характеристики использованных в работе ИЖ [27, 155, 146]

ИЖ	$\log P^{\S}$	$\rho, \text{г} \times \text{см}^{-3}$ (25, °C)	$\eta, \text{мПа} \times \text{с}$ (t, °C)	$E_T^{N^{\dagger}}$	$t_{\text{пл}}, \text{°C}$
[BMIm][AcO]	-2.77	1.055	1630 (20)	0.572	-20
[BMIm][Cl]	-2.4	1.10	тв.	0.614	66

Методика приготовления пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} предполагает удаление избыточных количеств ИЖ путем промывания водой [27], тем не менее какое-то незначительное количество ИЖ все же остается в пленке и может влиять на ее оптические свойства. По этой причине при работе с выбранными ИЖ следует

[†]Нормализованный параметр полярности по шкале Димрота-Райхардта. По нормализованной шкале самым полярным растворителем считается вода, самым неполярным — тетраметилсилан.

[§]Величины логарифма коэффициента распределения ИЖ (MOP) в системе *n*-октанол/вода, характеризующие гидрофобность этих веществ.

учитывать тот факт, что они поглощают в ближней УФ и видимой областях спектра (рис. 18). Как видно из рисунка, в отличие от [BMIm][Cl] ацетатная ИЖ значительно сильнее поглощает свет УФ и видимого диапазона спектра, в то время как максимумы поглощения обеих ИЖ в УФ-области практически совпадают (для [BMIm][AcO]: $\varepsilon_{209} = 4450 \pm 280 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [156]). Кроме того, эти ИЖ в диапазоне 350–550 нм обладают собственной флуоресценцией, длина волны и интенсивность которой сильно зависит от длины волны возбуждения [157].

Следует отметить, что [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO] более токсичны (экоотоксичность $\log EC^{50\dagger}$, мкМ: 3.41, 3.32 соответственно), чем ДМСО, ацетонитрил и этанол ($\log EC^{50}$, мкМ: 6.10, 5.73 и 5.88 соответственно), но менее токсичны, чем толуол ($\log EC^{50} = 2.33$ мкМ), и сравнимы по токсичности с пиридином ($\log EC^{50} = 3.43$ мкМ) [11]. При этом токсичность [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO] определяется, главным образом, их катионом, для утилизации которого из водных растворов в настоящее время разработан специальный методический прием [158]. При добавлении к водным растворам ионных растворителей твердого препарата K_3PO_4 образуется двухфазная система, в которой нижняя фаза насыщена K_3PO_4 , а верхняя — ИЖ. Разделение фаз происходит, вероятнее всего, за счет высокой структурирующей способности PO_4^{3-} , в результате чего объемный катион алкилимидазолия с сопутствующим анионом выталкиваются и образуют отдельную фазу, которую можно достаточно легко отделить простым декантированием [158]. Такой прием весьма полезен для утилизации ИЖ из промывных вод, если в качестве антирастворителя для удаления избытка ионного растворителя из целлюлозных пленок используют воду.

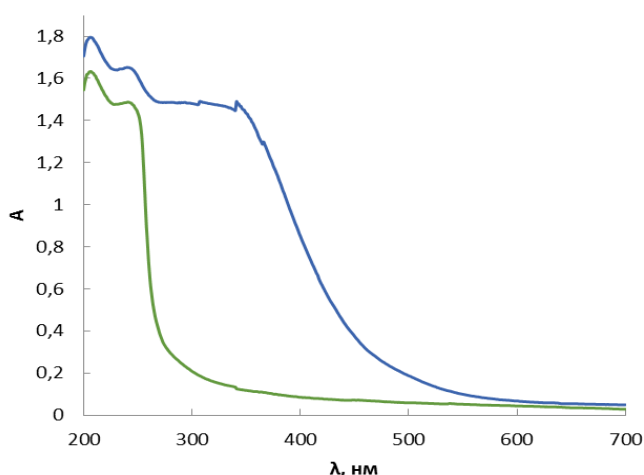


Рис. 18. Спектры поглощения коммерческих препаратов [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO] (раствор сравнения — вода).

$\dagger \log EC_{50}$ — экспериментальные значения экоотоксичности для *V. fischeri*, при воздействии вещества в течение 15–30 мин.

Целлюлозные пленки, полученные с помощью [BMIm][Cl], использовали для создания оптических сенсоров для определения ряда ионов металлов и неорганических газов (табл. 1). Примеры их применения для определения *органических* соединений, а также в целях иммобилизации растительных пероксидаз в литературе не описаны. Пленки на основе целлюлозы, регенерированной из ацетатной ИЖ, ранее вовсе не получали, лишь изучали процесс растворения целлюлозы в [BMIm][AcO] [64, 79, 80, 146]. Таким образом, разработка методики получения пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]} и изучение аналитических возможностей пленок, полученных с помощью обеих ИЖ, при определении органических соединений позволят, с одной стороны, расширить ассортимент сенсорных материалов на основе целлюлозы, а с другой стороны, оценить перспективность использования этих материалов в целях химического анализа.

4.3. Обоснование выбора аналитических реагентов и определяемых соединений

Оксидоредуктазы как аналитические реагенты. На момент начала исследований в литературе (гл. 1.1.2) имелись данные об использовании пленок {целлюлоза-ИЖ} для иммобилизации гидролаз (целлюлазы, эстеразы и β -галактозидазы) и оксидазы (лакказы). Литературные сведения об иммобилизации растительных пероксидаз (представителей класса оксидоредуктаз) в целлюлозу с помощью ИЖ отсутствовали. Изучение перспектив применения ИЖ в сенсорных технологиях, в частности для разработки оптических сенсоров на основе коммерческих растительных пероксидаз, представляется весьма актуальным по ряду причин.

Во-первых, оптических биосенсоров разработано существенно меньше, чем электрохимических, а работы по использованию для этих целей ферментов и ИЖ единичны (табл. 1). До настоящего времени нековалентно иммобилизованные на различных носителях растительные пероксидазы, преимущественно ПХ, использовали в ферментативных тест-системах для определения ингибиторов фермента — токсичных ионов металлов — в разнообразных объектах (водах, почвах, пищевых продуктах, фармацевтических препаратах и биологических жидкостях) [159]. Скорость ферментативной реакции контролировали визуально. В последнее десятилетие наблюдается повышенный интерес исследователей к разработке оптических сенсоров на основе пероксидазы для определения её *органических* субстратов. Однако, несмотря на определенный прогресс в этой области, оптические биосенсоры по своей распространенности, по-прежнему, уступают электрохимическим [160,161].

Во-вторых, применение ИЖ в сенсорных материалах позволит расширить круг задач химического анализа и биотехнологии, решаемых с привлечением пероксидаз.

Дополнительным аргументом в пользу выбора растительных пероксидаз (ЕС 1.11.1.7) для разработки оптических сенсоров является их широкая субстратная специфичность: они катализируют превращение большого круга восстановителей органической природы (арилдиамины, фенолы, катехоламины, фенотиазины и др.) [162]. Кроме того, их каталитическая активность изменяется в присутствии ряда азот- и серосодержащих органических веществ, эндопероксидных соединений [85, 118–121, 127]. Все эти вещества являются биологически активными соединениями, и разработка новых оптических систем и сенсоров для их определения в различных объектах весьма актуальна.

В настоящее время пероксидазы выделяют из различных растений: люцерны, табака, вигны, фасоли, арахиса, батата, листьев королевской пальмы [163, 164]. Для исследования мы выбрали пероксидазы, выделенные из корней хрена и шелухи сои, препараты которых являются коммерческими, высокоактивными и стабильными, что обуславливает целесообразность применения пероксидаз в качестве аналитических реагентов для проведения химического анализа. Аминокислотные последовательности указанных растительных пероксидаз идентичны более чем на 50% [165], однако эти ферменты отличаются по физико-химическим свойствам и, что особенно важно, по субстратной специфичности [166]. Кроме того, ПХ и ПС отличаются значением рI: ПХ – катионный фермент, а ПС – анионный биокатализатор. Самостоятельный научный интерес представляет сравнение каталитических свойств этих растительных пероксидаз в составе пленок {целлюлоза–ИЖ}. Ранее [167] в лаборатории кинетических методов анализа МГУ выявлена «дружелюбность» $[BMIm][BF_4]$ и N-бутил-4-метилпиридиния, $[BMPy][BF_4]$, по отношению к ПХ и ПС в реакции окисления гваякола пероксидом водорода, которая выражается в сохранении растительными пероксидазами не менее 20% начальной каталитической активности в присутствии ≥ 60 об.% высоко-полярных ионных растворителей. Этот факт позволяет надеяться, что растительные пероксидазы и в составе целлюлозных пленок, полученных с использованием других гидрофильных ИЖ, будут проявлять каталитическую активность.

Хромогенные синтетические красители как аналитические реагенты. Одним из возможных путей применения целлюлозных пленок, содержащих ПХ и ПС, мы видели в обесцвечивании растворов красителей, используемых в текстильной, пищевой и фармацевтической промышленности. Утилизация окрашенных и часто

токсичных вод этих производств все еще является одной из важных экологических задач, особенно в Европе [168].

В качестве модельного анионного красителя выбрали индигокармин (рис. 19, а), который растворим в воде, интенсивно окрашен ($\epsilon_{618} = 8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [169]), обладает восстановительными свойствами ($E^\circ = -0,13 \text{ В}$ при 25°C , $\text{pH } 7.0$ [169, 170]) и является субстратом ПХ и ПС [171, 172]. В воде при $\text{pH } 7.0$ ИК практически не флуоресцирует, выход флуоресценции при 670 нм не превышает 0.003 , $\lambda_{\text{возб.}} = 655 \text{ нм}$ [173].

ИК – наиболее широко распространенный синий краситель хлопка и шерстяных волокон благодаря его сродству к целлюлозным волокнам. Этот индигоидный краситель также известен как пищевая добавка E-132 при производстве безалкогольных и ликеро-водочных напитков, мороженого, всевозможных сладостей [174].

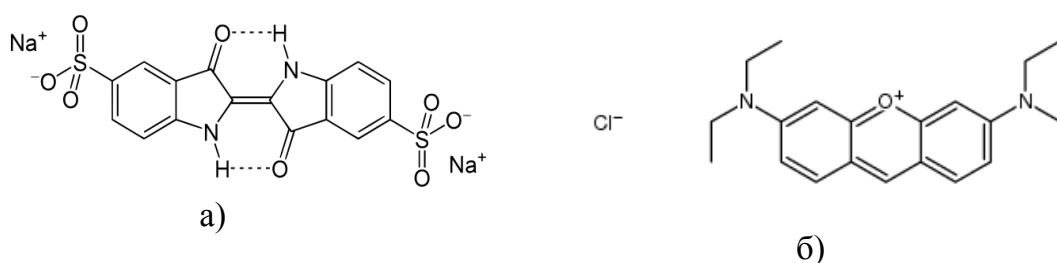


Рис. 19. Структурные формулы ИК (а) и ПБ (б).

В фармацевтической промышленности ИК применяют для придания товарного вида таблеткам и драже, в медицинской диагностике — для подкрашивания живых тканей [174] и определения концентрации пероксидазы в крови [171]. В химическом анализе ИК нашел применение в качестве кислотно-основного и окислительно-восстановительного индикатора, его лейкооснование используют как фотометрический реагент при определении кислорода и озона (при 570 нм), а также нитратов в кислой среде [175]. ИК часто является компонентом при производстве ополаскивателей для волос, его используют при приготовлении чернил, синьки, акварельных красок и мыла. ИК является канцерогеном, вызывает серьезные аллергические реакции, провоцирует проблемы с сердцем и приступы удушья [176], поэтому контроль содержания этого красителя в продуктах питания, лекарственных препаратах, косметических средствах чрезвычайно важен.

В настоящее время предложены различные способы выделения (коагуляция, адсорбция, ультрафильтрация [168]) и переработки индигоидных красителей, основанные на использовании химических методов (окислении реагентом Фентона [177], озонировании, фотокаталитическом окислении [178]) и электрохимических методов (электрокоагуляции, электрохимическом окислении/восстановлении [179]), а также аэробной и анаэробной биodeградации с использованием лигнинолитиче-

ских грибков [180]. Одним из современных способов биodeградации и обесцвечивания текстильных красителей, в том числе и ИК, является окислительная биodeградация с участием лакказы [181] и пероксидазы [182]. В качестве эффективных сорбентов ИК себя показали хитин, хитозан [183], хитозан сшитый с глутаровым альдегидом [184], а также гидрогели на основе производных этилметакрилата, метилпропана и акриламида [185].

Мы предполагали, что на основе целлюлозных пленок с иммобилизованными растительными пероксидазами нам удастся создать биоразлагаемые материалы многоразового применения для определения ИК в водах кондитерских, фармацевтических и текстильных производств.

В качестве модельного катионного красителя выбрали ксантеновый краситель *пиронин Б* (рис. 19, б), который так же, как ИК растворим в воде и интенсивно окрашен $\lambda_{\text{макс.}} = 555 \text{ нм}$ [186], но в отличие от ИК обладает интенсивной флуоресценцией в водных и спиртовых растворах ($\lambda_{\text{возб./фл.}} = 355/571, 553/571 \text{ нм}$) [186].

Выбор ПБ был обусловлен прежде всего тем, что явление тушения флуоресценции именно этого красителя было положено в основу ряда чувствительных методик определения АМ в сыворотке крови с использованием некоторых гемсодержащих биокатализаторов (Гб, ПХ, цитохрома *c*, тирозиназы) (гл. 2).

В настоящей работе было решено изучить возможность использования для флуориметрического определения АМ в присутствии ПБ других катализаторов: МП и комплекса {Mn(II)–ДДС}. МП — олигопептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков, ковалентно связанных с геминовым центром (рис. 20). Структура МП соответствует активному центру цитохрома *c* с ближайшим полипептидным окружением. Основное преимущество МП перед Гб и другими перечисленными выше белками состоит в стерически незатрудненном пространственном окружении ее активного центра, что, по нашему мнению, должно облегчать подход молекулы АМ к железу. Благодаря использованию МП в качестве биокатализатора, мы рассчитывали улучшить аналитические характеристики методики флуориметрического определения АМ в растворе и на основе индикаторной системы {ПБ–МП} разработать сенсорный целлюлозный материал.

Из литературы [187, 188] известно, что синтетические аналоги оксидоредуктаз — комплексы Mn(II) и Mo(VI) с анионным поверхностно-активным веществом ДДС (рис. 21), катализируют 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, можно было ожидать проявления подобного эффекта при замене H_2O_2 на АМ.

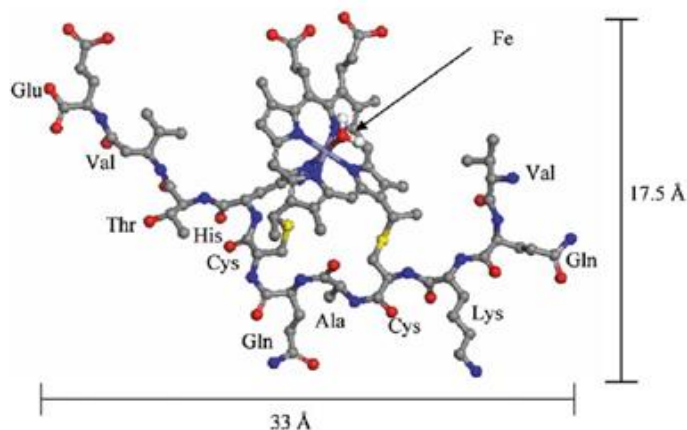


Рис. 20. Пространственная модель МП, рассчитанная в работе [189].

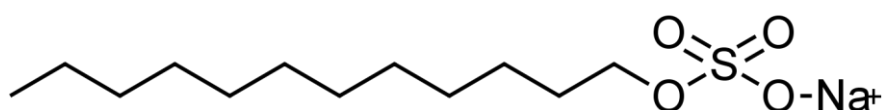


Рис. 21. Структурная формула ДДС.

От изучения системы {ПБ–Мо(VI)–ДДС} отказались, поскольку ее чувствительность по отношению к пероксиду водорода была в 10 раз ниже, чем при использовании комплекса {Mn(II)–ДДС} [188].

Важно отметить, что ПБ, как представитель ксантеновых красителей, чувствителен к молекулярному окружению [190] и способен образовывать супрамолекулярный комплекс с ДНК, благодаря чему возможно вольтамперометрическое определение последней [191]. Это свойство ПБ может оказаться полезным в оптических системах с использованием биомолекул или их искусственных аналогов, в частности комплекса {Mn(II)–ДДС}. Дополнительный научный интерес представляет сравнение поведения красителей различной природы, анионного ИК и катионного ПБ, при иммобилизации в целлюлозную пленку.

Комплексы {Eu(III)–дипиколиновая кислота} и {Eu(III)–ТЦ} как флуоресцентные метки. Кроме ферментов и красителей, в целлюлозные пленки можно импрегнировать комплексы лантаноидов (Eu^{3+} и Tb^{3+}) с органическими лигандами, например, с дипиколиновой кислотой (ДПК) [46]. Как мы уже отмечали ранее в гл. 1.1.2 обзора литературы, практическая значимость пленок {целлюлоза–[VMIm][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 на примере селективного определения ионов $\text{Cu}(\text{II})$, основанного на эффекте тушения ими сенсibiliзируемой флуоресценции хелатов лантаноидов [46]. Целлюлозные пленки такого вида ранее не использовали для определения органических соединений. Однако из литературы [192, 193, 194, 195] известно, что в растворе эффекты тушения в системе {Ln(III)–лиганд–

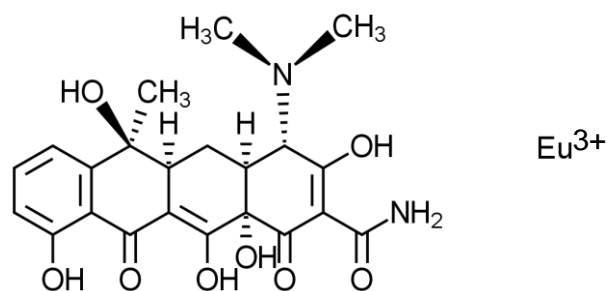
сенсibilизатор} активно применяют для определения не только неорганических, но и биологически активных органических соединений. Это обстоятельство дает надежду на обнаружение подобных эффектов АМ и БР на флуоресцентный сигнал пленок {целлюлоза–ИЖ–Eu(ДПК)₃}.

Мы решили исследовать возможность иммобилизации в целлюлозные пленки комплекса {Eu(III)–ТЦ} (рис. 22, а), применение которого в качестве второго флуоресцентного зонда также открывает возможности определения двух органических соединений: АМ (рис. 1) и БР (рис. 22, б).

Комплекс {Eu(III)–ТЦ} используют для определения низких концентраций H₂O₂ (2 мкМ на уровне его содержаний в атмосфере и морской среде) [196–198]. Определение пероксида водорода основано на увеличении интенсивности флуоресценции комплекса {Eu(III)–ТЦ} в результате образования тройного комплекса {Eu(III)–ТЦ–H₂O₂} [199]. Следовало ожидать проявления подобного действия при замене пероксида водорода на АМ.

Возможна реализация еще одного подхода для определения АМ, основанного на его предварительном кислотном разложении до пероксида водорода (гл. 2) с последующим «проявлением» по реакции с комплексом {Eu(III)–ТЦ}. Очевидной проблемой, которую нам, видимо, предстоит решить при этом, является значительное различие в значениях рН сопряженных реакций: 0–1 для проведения реакции разложения АМ и 6.9 – для образования тройного комплекса {Eu(III)–ТЦ–H₂O₂}. Поскольку сильные основания неорганической природы тушат флуоресценцию тройного комплекса [197], мы решили апробировать в обсуждаемой системе сильные органические основания.

а)



б)

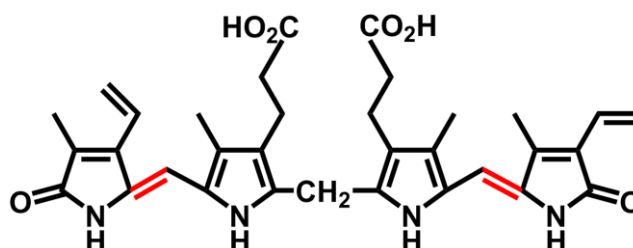


Рис. 22. Структурные формулы комплекса {Eu(III)–ТЦ} (а) и БР (б).

Щелочной раствор БР, напротив, способен гасить флуоресценцию комплекса {Eu(III)–ТЦ}. На основе этой индикаторной системы разработана методика определения БР в сыворотке крови на уровне его концентраций 0.2–25 мкМ [46].

Выбор определяемых соединений. Основное внимание в исследовании мы сосредоточили на разработке на основе пленок {целлюлоза–ИЖ} сенсорных оптических систем для определения АМ, природного противомаларийного соединения (рис. 1), и БР, желчного пигмента, продукта метаболического распада гема крови (рис. 22, б).

Выбор АМ в качестве модельного эндопероксида обусловлен тем, что он в комбинации с его полусинтетическими производными (АТМ, АТЭ, АТС) входит в состав наиболее эффективных современных лекарственных препаратов для лечения и профилактики малярии, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения. Все полусинтетические производные АМ отличаются только структурой заместителя в карбонильной группе лактонного кольца и часто проявляют похожие свойства в различных индикаторных системах (табл. 3). Актуальность поиска новых чувствительных, селективных и простых индикаторных оптических систем и сенсоров для определения АМ в БАД и фармацевтических препаратах для оценки их качества дополнительно подтверждается тем, что АМ проявляет биологическую активность не только по отношению к малярийному плазмодию, но и к раковым клеткам (урогенитальной разновидности) [125].

В клиническом анализе для определения БР в сыворотке крови широко используют фотометрическую методику Йендрашика-Клегхорна-Грофа, основанную на реакции диазотирования [199]. В литературе описаны единичные спектрофотометрические и хемилюминесцентные системы [200–204], а также оптоволоконные сенсоры [205] для определения БР, предложена методика определения БР методом мицеллярной электрокинетической хроматографии [206] и ферментативным методом с использованием билирубиноксидазы [207–209]. Описана только одна флуоресцентная система, основанная на тушении билирубином флуоресценции комплекса {Eu(III)–ТЦ} [199]. До настоящего времени эта система была апробирована для определения БР в растворе, ее не применяли в сенсорных системах, в том числе на основе целлюлозных пленок. Таким образом, исследования, направленные на создание сенсорного устройства на основе этой системы, являются оригинальными. Мы ожидаем, что новая индикаторная сенсорная система {Eu(III)–ТЦ–БР} позволит определять желчный пигмент на уровне его концентраций 10^{-8} – 10^{-7} моль \times л $^{-1}$, соизмеримых с его содержанием определяемым хемилюминесцентным методом, и в 10 раз меньших, чем определяемых спектрофотометрическими и ферментативными методами.

Глава 5. Условия получения и функциональные характеристики целлюлозных пленок на основе растворов {целлюлоза–[BMIm][AcO]} и {целлюлоза–[BMIm][Cl]}

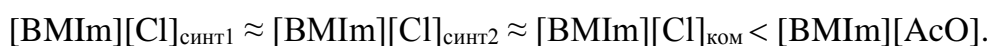
Основная задача, которую необходимо было решить на первом этапе исследования, состояла в выяснении условий получения целлюлозных пленок с помощью ацетатной ИЖ. Методика приготовления пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} была известна из литературы [27], однако для сравнения условий получения целлюлозных пленок с использованием ацетатной и хлоридной ИЖ и, что особенно важно, их функциональных характеристик и перспектив применения для определения органических соединений, сочли целесообразным проводить эксперимент параллельно с двумя ИЖ, ацетатной и хлоридной. Помимо коммерческого препарата, [BMIm][Cl]_{ком.}, использовали два лабораторно синтезированных препарата этой ИЖ, полученных по методике, описанной в работе [126]. В отличие от практически бесцветного твердого коммерческого образца лабораторно синтезированные препараты, [BMIm][Cl]_{синт1} и [BMIm][Cl]_{синт2}, были жидкими при комнатной температуре и окрашены в бурый и бледно-желтый цвет соответственно вследствие присутствия микропримесей. Заметим, что ^{13}C ЯМР спектры использованных коммерческого и синтезированных препаратов ИЖ были идентичны. Лабораторно синтезированные препараты различались между собой квалификацией используемых ре-

агентов и особенностями выделения ИЖ. Применение вместо коммерческого лабораторно синтезированных препаратов [BMIm][Cl] позволяло снизить стоимость целевых целлюлозных материалов по меньшей мере в 3 раза.

5.1. Выбор условий получения целлюлозных пленок

Первый этап приготовления пленок заключался в растворении навески микрокристаллической целлюлозы в выбранных ИЖ. В литературе предложено два метода растворения целлюлозы в алкилимидазольных ИЖ: нагревание в термостате до температуры 100°C [210] и в микроволновой печи [64, 211]. Микроволновое излучение в большинстве случаев приводит к деструкции целлюлозы [210]. Использование бытовой микроволновой печи (без контроля мощности и времени облучения, то есть при неравномерном нагреве образца) [27] вряд ли можно считать корректным. Применение специализированной микроволновой печи требует большого расхода ИЖ, что мы сочли нецелесообразным.

Для получения раствора целлюлозы в ИЖ использовали простой лабораторный термостат (гл. 3.2), а в качестве исходной температуры для растворения смеси {целлюлоза–ИЖ} выбрали 66°C, то есть температуру плавления [BMIm][Cl] (табл. 4). Содержание целлюлозы в этом эксперименте составляло 2% масс. по отношению к ИЖ. В результате проведенных исследований установили, что в рассматриваемых условиях способность растворять целлюлозу возрастала в следующем ряду исследованных ИЖ:



В ацетатной ИЖ целлюлоза растворялась быстрее, чем в хлоридной, что согласовалось с литературными данными [27, 48, 61, 154]. Все препараты [BMIm][Cl] одинаково хорошо растворяли целлюлозу, однако раствор целлюлозы в [BMIm][Cl]_{синт1} как и сам образец ИЖ был интенсивно окрашен в бурый цвет. Это обстоятельство позволяло предположить, что и целлюлозная пленка, полученная из такого раствора, будет окрашена. Тем не менее, мы не отказались от применения [BMIm][Cl]_{синт1}, а сочли целесообразным его использование в дальнейшем для выяснения условий отмывки целлюлозных пленок от избыточных количеств хлоридной ИЖ. Окраска ИЖ позволила бы легко зафиксировать момент, когда пленка успешно отмыта от ИЖ. Обнаружили, что при длительном хранении (5 мес и более) коммерческий препарат хлоридной ИЖ превращался в монолит, работать с которым было возможно только после растворения в ацетонитриле и осушки препарата по методике, описанной в гл. 3.1.

В дальнейшем применяли преимущественно синтезированный образец 2 (далее просто [BMIm][Cl]), а коммерческий препарат использовали только для проведения

сравнительных экспериментов по изучению аналитических возможностей полученных целлюлозных пленок.

Напомним, что целлюлоза регенерируется из ИЖ в виде пленки при определенном (в зависимости от природы ИЖ) количестве воды в растворе (гл. 1.1.2, Приложение 2). Вода присутствует как в самой целлюлозе, так и в препарате ИЖ [64, 150]. Учитывая этот факт, использовали сухой препарат микрокристаллической целлюлозы[†] и дополнительно высушивали [BMIm][Cl] по методике, приведенной в гл. 3.1, с. 63. Поскольку опыт исследователей кафедры теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) Федерального университета г. Архангельска показал, что без специального дорогостоящего оборудования («НААКЕ RNEOCORD 9000 RHEOMETER») полностью удалить воду из [BMIm][AcO] практически невозможно, препарат [BMIm][AcO] дополнительно не высушивали. Содержание воды в коммерческом препарате ацетатной ИЖ по данным производителя невелико и не превышает 2% масс. Мы полагали, что такое содержание влаги не должно препятствовать растворению целлюлозы в этой высоко полярной ИЖ (табл. 4). Ацетатную ИЖ хранили в сухом темном месте, в плотно закрытой банке, крышку которой дополнительно обматывали герметизирующей пленкой «Парафилм» во избежание повышения содержания воды в препарате.

Основной научный интерес для нас представляла разработка методики приготовления целлюлозных пленок с помощью ацетатной ИЖ, поэтому логично было бы начать исследование с изучения процесса растворения микрокристаллической целлюлозы именно в этой ИЖ. Однако литературных данных о растворении целлюлозы в хлоридной ИЖ было существенно больше, по этой причине сначала получали пленки состава {целлюлоза–[BMIm][Cl]}.

Первые эксперименты показали, что при 66°C целлюлоза растворялась в хлоридной ИЖ, однако 2%-ый раствор полимера при этой температуре получался слишком вязким и раскатать его в плёнку не представлялось возможным. Для решения этой проблемы повысили температуру растворения до 85°C. Дальнейшее увеличение температуры считали нецелесообразным из-за деструкции целлюлозы, вызванной расщеплением ее цепочек или открытием пиранозных колец под действием ИЖ [212, 213]. Установили, что вязкость раствора {целлюлоза–[BMIm][Cl]} уменьшилась, время растворения сократилось с 4 до 2 ч, однако целлюлозный материал представлял собой не пленку, а желеобразную массу. Таким образом, успешное растворение целлюлозы в ИЖ не гарантирует получение материала с требуемыми свойствами, поскольку важна не только температура расплава, но и

[†] При необходимости возможно высушивание препарата микрокристаллической целлюлозы в вакуумной печи в течение ночи при 100°C [205].

содержание целлюлозы в нем. Для выбора подходящего содержания целлюлозы в [BMIm][Cl] его варьировали в диапазоне 2–5% масс. (с шагом 0.5%). Подходящим считали такое содержание целлюлозы, при котором раствор можно было легко и быстро раскатать в плёнку вручную, а поверхность получаемой пленки была наиболее однородной и прозрачной. Работу выполняли следующим образом. Точную навеску целлюлозы добавляли к точно взвешенному количеству [BMIm][Cl]. После перемешивания полученную смесь нагревали в термостате при 85°C до полного растворения целлюлозы, то есть до момента, когда расплав становился визуально прозрачным, без видимых включений и пузырьков (рис. 23).



Рис. 23. Фотографии смеси микрокристаллической целлюлозы с [BMIm][Cl] в течение времени (температура термостата – 85°C).

Далее горячий раствор выливали на горячее предметное стекло (гл. 3.3, методика 1а) и стеклянной палочкой быстро и равномерно распределяли его по ограниченной площади стеклянной подложки, раскатывая пленку. Затем пленку помещали в закрытый контейнер и убирали в холодильник на 1 ч.

На рис. 24 представлена фотография прозрачной, довольно прочной и гибкой пленки, полученной растворением 4% масс. целлюлозы в 1.1 г хлоридной ИЖ при 85°C, после промывания пленки водой. Однородные прозрачные растворы с содержанием целлюлозы 4.5 и 5% масс. получались спустя не менее 15 ч и были слишком вязкими, чтобы раскатать их в пленку. В литературе [210] имеются сведения о целлюлозных пленках, приготовленных с помощью [BMIm][Cl] при содержании целлюлозы 2.0% масс., температуре 70°C (в микроволновой печи), времени растворения 20 мин. Для дальнейших исследований выбрали содержание целлюлозы равное 4% масс., поскольку полученные плёнки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} были прочными и прозрачными ($T = 98.4 \pm 0.4\%$, $n = 3$, $P = 0.95$; рис. 25) в видимой области спектра. Более того, предполагали, что пленка с содержанием не 3.5, а 4% масс. будет обладать более плотной структурой, которая позволит лучше удерживать иммобилизованные аналитические реагенты.



Рис. 24. Фотография целлюлозной пленки, полученной из раствора в $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$, после выдерживания в холодильнике в течение 1 ч и промывания водой (содержание целлюлозы 4% масс., температура расплава 85°C).

На основании литературных данных о растворимости целлюлозы в $[\text{BMIm}][\text{AcO}]$ [62, 151] можно было предположить возможность приготовления пленок с содержанием полисахарида по меньшей мере в 3 раза большем, чем с помощью $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$ даже при температуре 66°C . В табл. 5 приведены результаты, полученные при варьировании содержания целлюлозы в ацетатной ИЖ в диапазоне 2–15% масс. (с шагом 0.5%). Для удобства сопоставления в этой же таблице систематизированы данные, полученные с использованием в качестве растворителя целлюлозы $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$.

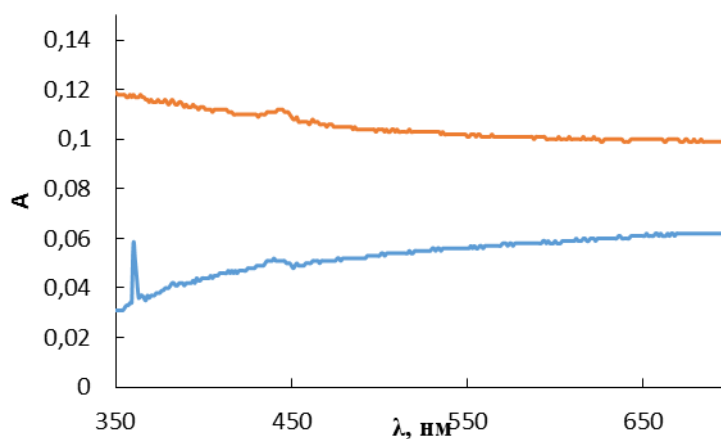


Рис. 25. Спектры поглощения **стекла** и **пленки** {целлюлоза– $[\text{BMIm}][\text{Cl}]$ } на предметном стекле относительно воздуха.

Из табл. 5 видно, что ацетатная ИЖ растворяет не только бóльшие количества целлюлозы, но и значительно быстрее, чем хлоридная ИЖ. Например, 4% масс. целлюлозы ацетатная ИЖ растворяет всего за 1 ч, в то время как для растворения такого же количества полимера в хлоридной ИЖ требуется 5–6 ч.

Таблица 5. Сравнительные характеристики пленок с разным содержанием целлюлозы, полученных при использовании [BMIm][AcO] и [BMIm][Cl] (температура раствора {целлюлоза–ИЖ} – 66 и 85°C соответственно)

Диапазон содержаний целлюлозы, % масс.	Прозрачность*/окраска раствора	Описание материала	Время растворения, ч
[BMIm][AcO]			
2–6	+/- желтый	Желеобразная масса, пленку сформировать невозможно	1–3
6.5–8.5		Пленка сформирована, но недостаточно прочная	3
9–12		Прочность пленки выше, чем у пленок с содержанием целлюлозы 6.5–8.5% масс.	4–5
13–15		Прочные пленки	5–7
[BMIm][Cl]_{ком}/[BMIm][Cl]_{синт,2}			
2–3	+/- бледно-желтый	Желеобразная масса, пленка не образуется	2
3.5–4		Прочность пленок приемлема для работы с ними	6–7
4.5–5		Пленку раскатать не удается из-за высокой вязкости расплава	>15

*Прозрачность расплава: прозрачный (+), немного мутный (±).

Данные табл. 5 свидетельствуют о том, что пленки приемлемой прочности получают из раствора целлюлозы в [BMIm][AcO] при ее содержании 9% масс. При меньших содержаниях пленка либо не формируется (рис. 26), либо формируется, но не столь прочная, как при 6.5–8.5% масс. (рис. 27). В качестве оптимального, по нашему мнению, содержания выбрали 14% масс. целлюлозы, поскольку пленки с таким содержанием полимера получались более плотными, что было необходимо для последующей иммобилизации реагентов. Раствор с содержанием целлюлозы 15% масс. был слишком вязким, что затрудняло раскатку пленок вручную.



Рис. 26. Фотография целлюлозного материала, полученного из раствора в [BMIm][AcO], температура расплава 66°C, содержание целлюлозы 5% масс.

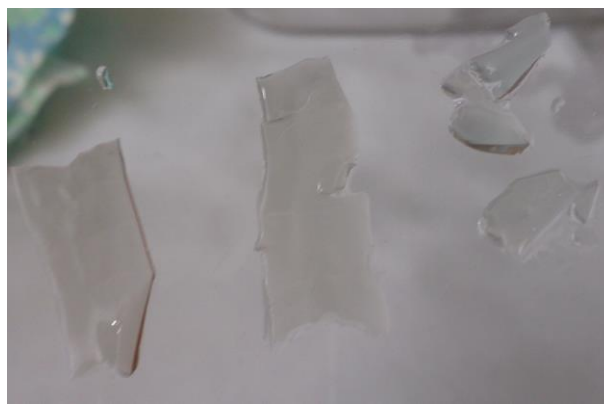


Рис. 27. Фотография целлюлозного материала, полученного из раствора в [BMIm][AcO], температура расплава 66°C, содержание целлюлозы 8% масс.

Отметим, что при растворении целлюлозы в [BMIm][AcO] при 85°C (температура, выбранная нами для получения пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]}) наблюдалась ее деструкция, о чем свидетельствовало бурое окрашивание раствора в нижней части пробирки Эппендорфа (рис. 28). Такая картина наблюдалась уже через 2 ч после начала растворения. На рис. 29 для сравнения приведен раствор целлюлозы в хлоридной ИЖ через 6 ч растворения. Видимые признаки деструкции целлюлозы отсутствуют. Таким образом, [BMIm][AcO] обладает более высокой растворяющей способностью по отношению к целлюлозе по сравнению с хлоридной ИЖ из-за более выраженного деструктурирующего действия ацетатной ИЖ.



Рис. 28. Характерное бурое окрашивание раствора целлюлозы при ее растворении в ацетатной ИЖ при 85°C, свидетельствующее о деструкции полимера.



Рис. 29. Сравнение окрасок растворов целлюлозы в хлоридной ИЖ (слева) и ацетатной ИЖ (справа) при 85°C.

Отдельного внимания заслуживает выбор природы промывной жидкости или так называемого антирастворителя для удаления избыточных количеств ИЖ из сформировавшейся целлюлозной пленки, особенно в случае пленок, полученных с помощью ацетатных ИЖ. Методом компьютерного моделирования [214] и экспериментальным путем [61, 213] показано, что из трех промывных жидкостей: вода, этанол и ацетон, наиболее эффективным антирастворителем и [BMIm][AcO], и [BMIm][Cl] является вода. В дальнейших экспериментах мы использовали не только воду, но и этанол и ацетонитрил, поскольку последний обычно применяют при синтезе и очистке этих ИЖ [126], следовательно, он хорошо их растворяет.

После того, как застывшую пленку доставали из холодильника, ее промывали одним из выбранных антирастворителей в течение 15 мин (времени, через которое пленка соскальзывала с поверхности стекла), далее 3-5 мин подсушивали на воздухе; помещали на предметное стекло, которое вставляли в кюветное отделение спектрофотометра и регистрировали спектр поглощения (рис. 30) по отношению к стеклу. Влажная целлюлозная пленка довольно прочно удерживалась на стекле за счет сил адгезии.

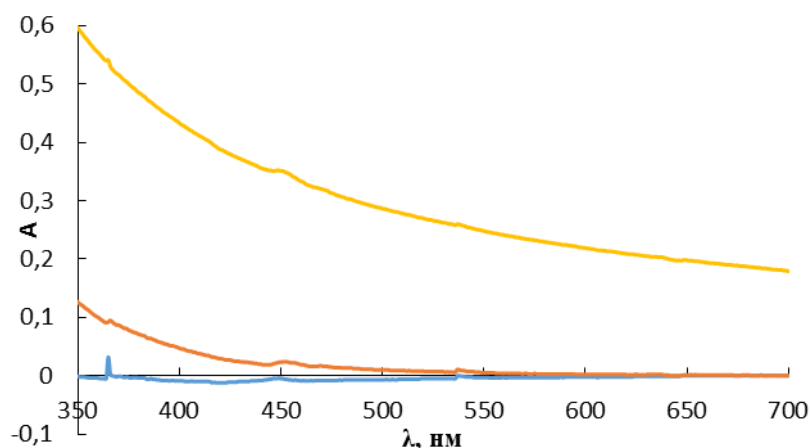


Рис. 30. Спектры поглощения пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} относительно стекла после промывания пленок **водой**, **этанолом**, **ацетонитрилом**.

Как видно из рис. 30, вода действительно оказалась наиболее подходящей промывной жидкостью для пленок, полученных с помощью [BMIm][Cl], что согласовалось с имеющимися литературными данными. Поглощение в видимой области спектра этих пленок после промывания водой практически нулевое. Небольшое увеличение поглощения в диапазоне длин волн 350–400 нм после однократного промывания целлюлозной пленки этанолом вероятнее всего связано с тем, что спирт по сравнению с водой медленнее отмывает хлоридную ИЖ. Действительно, при более длительном промывании или промывании пленки несколькими порциями этанола поглощение в указанном диапазоне длин волн уменьшалось до фонового значения. Хотя этанол можно использовать в качестве антирастворителя хло-

ридной ИЖ, мы все же отдали предпочтение воде, поскольку прочность целлюлозных пленок в последнем случае была выше. Вопреки ожиданиям, ацетонитрил оказался совсем неподходящим антирастворителем: пленки после промывания в нем приобретали беловатый цвет, и, как видно из рис. 30, теряли оптическую прозрачность. Мы полагаем, что это связано с взаимодействием ацетонитрила и целлюлозы, однако в литературе подтверждений высказанному предположению найти не удалось.

На основании данных работы [214] мы ожидали, что так же, как и в случае хлоридной ИЖ, наиболее подходящим антирастворителем для ацетатной ИЖ окажется вода. Однако на практике это оказалось совсем не так. На рис. 31 приведены спектры поглощения пленок {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} в диапазоне длин волн 350–700 нм. Как видно из рисунка, после промывания водой пленки получались непрозрачными; кроме того, они были ломкими, с трещинами. После обработки пленок этанолом и ацетонитрилом их прозрачность была практически одинаковой, однако пленка, полученная после промывания спиртом, была более прочной. В ацетонитриле от пленки отшелушивались небольшие чешуйки, которые были видны невооруженным глазом, в результате чего прочность пленки значительно уменьшалась.

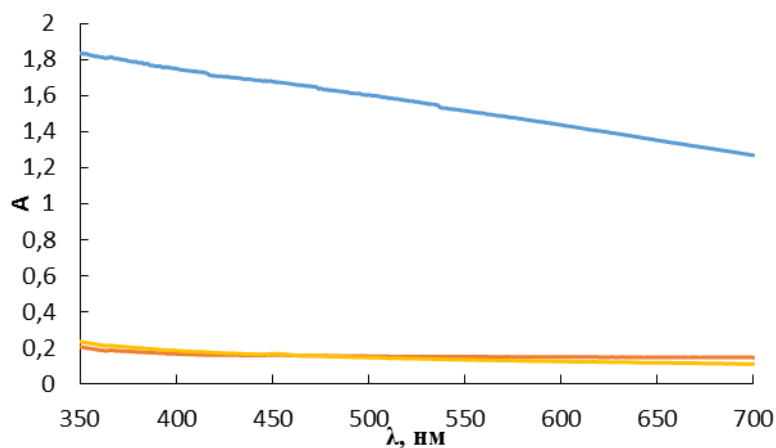


Рис. 31. Спектры поглощения целлюлозных пленок, полученных осаждением целлюлозы, растворенной при 66°C, из раствора в [ВМIm][AcO] **водой, спиртом, ацетонитрилом.**

Стоит отметить, что даже при температуре 66°C внизу пробирки Эппендорфа наблюдалось бурое окрашивание, поэтому температуру растворения понизили еще на 6°C. При 60°C целлюлоза при содержании 14% масс. растворялась в течение 6-7 ч. Спектры поглощения полученных пленок представлены на рис. 32. Как видно из рисунка, при снижении температуры раствора прозрачность пленок увеличилась почти на 7%, то есть этанол по-прежнему оставался предпочтительной промывной

жидкостью. Причина такой закономерности заключается, видимо, в том, что уже при 66°C происходит частичная деструкция целлюлозы, которая, согласно литературным данным [213], зависит как от времени, так и от температуры растворения целлюлозы. При снижении температуры раствора доля деструктурированного полимера уменьшается, в результате чего получают более прозрачные пленки, что согласуется с литературными данными.

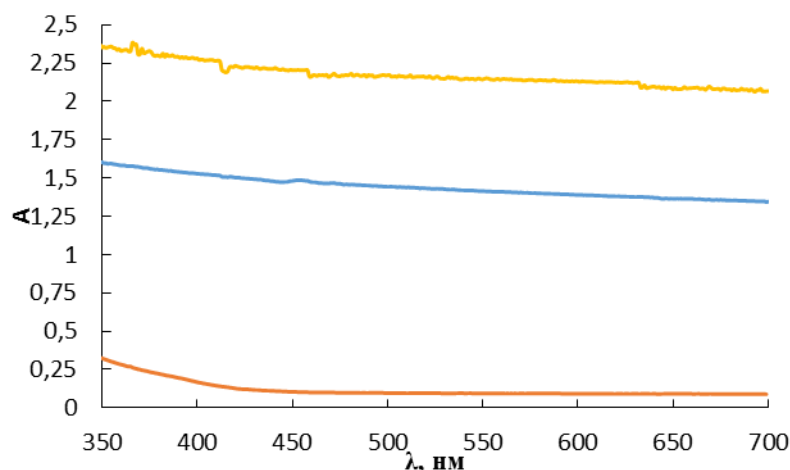


Рис. 32. Спектры поглощения целлюлозных пленок, полученных осаждением целлюлозы, растворенной при 60°C, из раствора в [BMIm][AcO] **водой, спиртом, ацетонитрилом**.

Целлюлоза, растворенная в ацетатной ИЖ при 60°C, после промывания ацетонитрилом регенерировалась в виде непрозрачных пленок (рис. 32), хотя при 66-70°C их прозрачность была выше (рис. 31). Возможно, это связано с разным характером взаимодействия деструктурированной и не деструктурированной целлюлозы с ацетонитрилом. С целью подтверждения этого предположения, мы понизили температуру растворения еще на 10°C, снова получили пленки, промыли их ацетонитрилом и зарегистрировали спектры их поглощения (рис. 33).

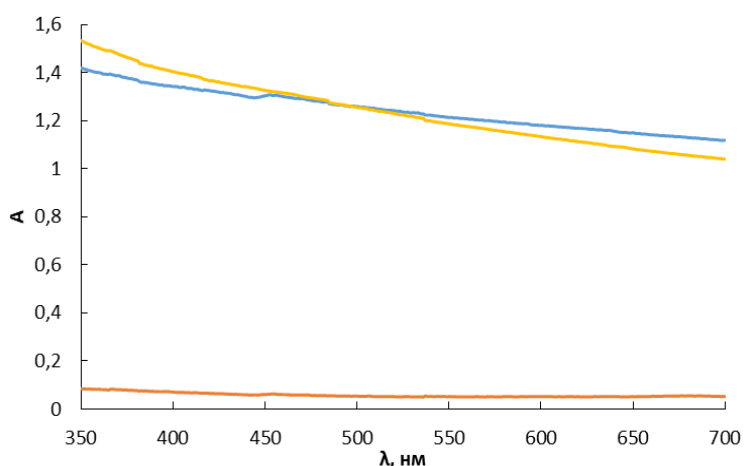


Рис. 33. Спектры поглощения целлюлозных пленок, полученных осаждением целлюлозы, растворенной при 50°C, из раствора в [BMIm][AcO] **водой, спиртом, ацетонитрилом**.

Как видно из представленных на рис. 33 данных, действительно, после обработки ацетонитрилом поглощение пленки значительно уменьшилось, практически стало таким же, как у пленки, промытой водой. Однако пленки все же были непрозрачны. Наиболее прозрачными получились пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]}, обработанные этанолом. Интересно отметить тот факт, что прочность и эластичность пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]}, приготовленной из раствора {целлюлоза–[BMIm][AcO]} при 60°C и промытой этанолом, уменьшались после дополнительного выдерживания пленки в воде. На рис. 34 в подтверждение этого факта приведена диаграмма прочности пленки, промытой этанолом (красная кривая), а затем выдержанной в воде (синяя кривая). Это обстоятельство косвенно свидетельствует о целесообразности присутствия этанола в реакционных средах, в которых используют пленку {целлюлоза–[BMIm][AcO]}.

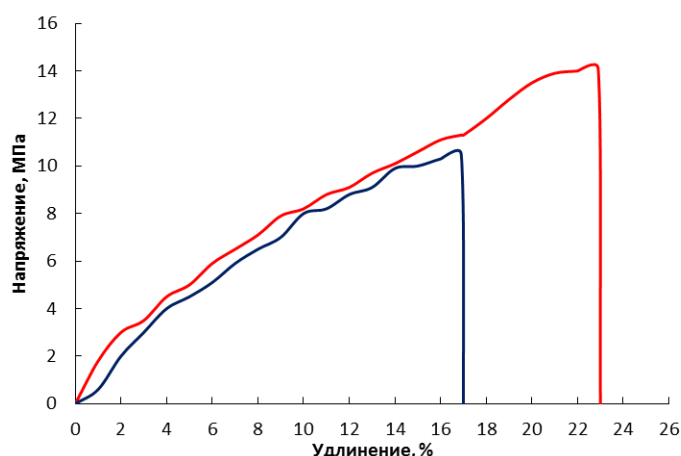


Рис. 34. Диаграммы прочности пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]}, полученных из раствора при 60°C, промытых этанолом *до* (красная кривая) и *после* (синяя кривая) вымачивания в воде.

В табл. 6 систематизированы результаты, полученные при изучении прозрачности целлюлозных пленок [BMIm][AcO], во всех исследованных нами случаях.

Таблица 6. Величины прозрачности целлюлозных пленок, полученных из растворов целлюлозы в [BMIm][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

Из приведенных в таблице результатов видно, что с уменьшением температуры растворения прозрачность пленок после промывания в воде и этаноле возрастает, а в ацетонитриле, напротив, уменьшается. Важно отметить, что текстура пленок при использовании изученных промывных жидкостей различна, что наглядно иллюстрирует рис. 35. На пленке после ее обработки водой заметны трещины, а при использовании ацетонитрила так же, как и в случае пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]}, наблюдали отшелушивание тонких слоев целлюлозы. Сформулированным нами требованиям (с. 96) удовлетворяла пленка, полученная при осаждении растворенной в [BMIm][AcO] целлюлозы этанолом. Вероятно, этанол играет роль временного пластификатора целлюлозы [215], способствуя повышению эластичности пленки в ходе регенерации целлюлозы. Таким образом, далее в качестве антирастворителя для [BMIm][AcO] в дальнейшем использовали этанол.



Рис. 35. Целлюлозные пленки, полученные растворением-осаждением из [BMIm][AcO], при использовании в качестве антирастворителя (слева направо) воды, этанола и ацетонитрила.

Отдельно остановимся на *методике раскатывания пленок*. Экспериментальным путем выяснили, что прежде, чем разливать раствор целлюлозы в ИЖ на предметное стекло, необходимо стекло нагреть до температуры раствора, затем вылить горячий раствор на стекло и равномерно распределить его по площади подложки. Однако при прекращении подогрева раствор целлюлозы в ИЖ «стягивается» к центру стекла, по-видимому, под действием поверхностного натяжения, в результате чего по краям пленки появляются пустоты. Поэтому после раскатки пленки необходимо не сразу класть горячее стекло в холодильник, а сначала оставить горячий раствор на несколько секунд на горизонтальной поверхности стекла без подогрева, после чего удалить пустоты, аккуратно распределяя раствор по подложке стеклянной палочкой.

Для оптимизации методики промывания пленок снова использовали окрашенный в бурый цвет препарат [BMIm][Cl]_{сипт.,1}, что заметно облегчало контроль качества отмытки плёнки от ИЖ. Хотя желтая окраска коммерческого препарата [BMIm][AcO] была менее интенсивной (рис. 18), наблюдать за процессом отмыва-

ния ацетатной ИЖ из пленки было также легко. Для смывания видимого глазу избыточного количества ИЖ оказалось достаточно одной порции антирастворителя (15 мл). При этом пленку выдерживали в антирастворителе 15 мин, периодически аккуратно раскачивая емкость с пленкой и промывной жидкостью для обеспечения доступа чистого антирастворителя к пленке. Заметим, что промывание следует проводить в статическом режиме, а не под струей промывной жидкости, поскольку в последнем случае возможна деформация пленки. По этой же причине не стоит ставить емкость с пленкой и антирастворителем на шейкер. Оказалось, что даже при использовании бесцветной коммерческой хлоридной ИЖ процесс её вымывания из пленки можно легко зафиксировать по появлению характерных маслянистых разводов на поверхности воды.

Тест-материалы, квадраты площадью 1 см², получали разрезанием только что полученной пленки канцелярским ножом. Пленки следует резать сразу после промывания, поскольку по мере высыхания они становились похожими на целлофан (рис. 36), что затрудняло в дальнейшем их разрезание. Даже после вымачивания в воде такие пленки плохо набухали и разрезать их было трудно.

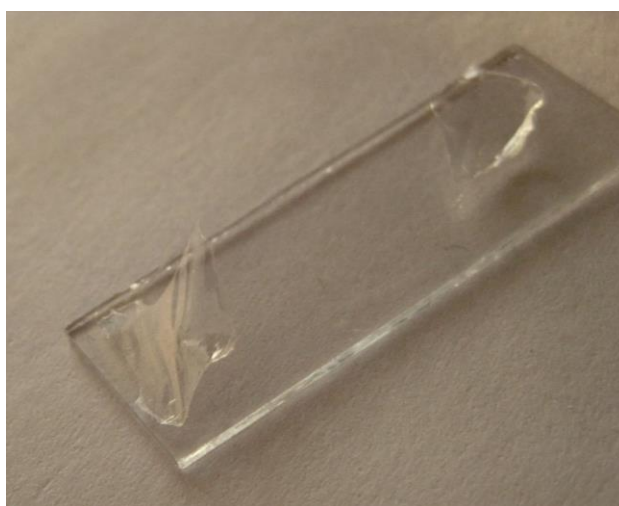


Рис. 36. Фотография пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} высушенной на воздухе при комнатной температуре.

Выбранные нами условия получения целлюлозных плёнок с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ систематизированы в табл. 7, а методика подробно описана в гл. 3.3.

Таблица 7. Выбранные условия получения пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и {целлюлоза–[BMIm][AcO]}

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	Квадрат площадью 1 см ²	

Толщину полученных пленок рассчитывали из соотношения массы и площади пленки, основываясь на предположении о том, что плотность пленок примерно равна плотности ИЖ (табл. 4). Рассчитанная толщина обеих пленок оказалась равной 300 мкм. Мы обратили внимание на то, что после промывания пленки становились немного тоньше, вероятно, вследствие удаления избыточных количеств ИЖ. Для измерения средней толщины целлюлозных пленок после обработки антирастворителем и высушивания на воздухе в течение не более 15 мин, использовали микрометр. Установили, что толщина целлюлозных пленок, измеренная микрометром в разных местах, составляет 150–200 мкм.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы получили целлюлозные пленки двух видов, с использованием ацетатной и хлоридной ИЖ. Условия получения пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} оказались более мягкими. Температура растворения целлюлозы в ацетатной ИЖ на 35^oC ниже таковой в хлоридной ИЖ, при этом время растворения одинаковое. В 3.5 раза большее содержание целлюлозы в пленке, приготовленной с помощью ацетатной ИЖ, по нашему мнению, может обеспечить бóльшую прочность и более плотную структуру материала. Пленки, полученные с применением хлоридной ИЖ, оказались более прозрачными, и для их промывания вместо этанола в качестве промывной жидкости использовали воду. Толщина этих пленок была практически одинаковой.

5.2. Изучение механических и морфологических свойств целлюлозных пленок

При описании механических свойств полимерных пленок в литературе (гл. 1) часто используют словосочетание «прочные пленки». Однако до сих пор «проч-

ность» целлюлозных пленок, полученных с применением различных гидрофильных ИЖ, специально не измеряли и не сравнивали. Для оценки физико-механических свойств (а именно, прочности и эластичности) полимерных пленок обычно используют установку «РМ-50», то есть разрывную машину. Для работы на установке необходимы образцы длиной 5 см, которые готовили по методике 1а. Ширина образцов составляла 2 см. Далее поступали, как описано в методике 2. Полученные значения физико-механических параметров целлюлозных пленок приведены в табл. 8.

Таблица 8. 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–[BMIm][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–BMIm][Cl]}			
85	94±3	7.86	1.31

Анализ данных табл. 8, показал, что наиболее прочными и одновременно прозрачными являются пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]}, полученные при 50°C. Их эластичность лишь немногим ниже, чем у пленок, приготовленных из расплава при 60°C. При этом стоит заметить, что понижение температуры расплава до 50°C дало трехкратный выигрыш в прочности и позволило существенно (на 11 и 17% соответственно) повысить прозрачность пленок по сравнению с таковой для пленок, полученных из расплавов при 60 и 66°C. Прозрачность материала {целлюлоза–BMIm][Cl]} на 7% выше, чем у пленок на основе ацетатной ИЖ. Тем не менее существенным преимуществом последних является их прочность и эластичность, количественные характеристики которых превышают эти величины для пленок {целлюлоза–BMIm][Cl]} в 2.5 и 9.5 раз соответственно.

Поскольку в аналитической практике приходится работать в различных средах, сочли целесообразным и полезным изучить влияние водных растворов различной кислотности (в присутствии и в отсутствие буферных растворов), а также молекулярных органических растворителей (ДМСО, ДМФА и ацетонитрила) на функциональные свойства полученных пленок – основы будущего оптического сенсора.

Работу проводили по методике 2, гл. 3.3. Установили, что прочность пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} после их обработки 0.1М растворами соляной кислоты и гидроксида натрия, а также указанными органическими растворителями теряли прочность, что не позволяло зарегистрировать диаграммы прочности на приборе «РМ-50», который имелся у нас в распоряжении. Однако они были вполне пригодными к использованию в водных слабокислых, нейтральных и слабощелочных растворах.

На рис. 37, 38 приведены диаграммы, иллюстрирующие зависимость прочности и эластичности пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]} от природы и рН внешнего раствора. Как видно из рис. 37а эти целлюлозные пленки наиболее прочные и эластичные в водных нейтральных растворах и наименее прочные (прочность в 6 раз ниже, чем в ФБР) — в ацетатном буферном растворе (АБР), рН 3.8 (рис. 37б). Такое влияние АБР на прочность целлюлозных пленок, вероятно, связано с разрушительным действием ацетат-иона в составе буферной смеси на целлюлозу, регенерированную из ацетатной ИЖ. Заметим, что разбавленные растворы HCl и NaOH уменьшают прочность пленок, приготовленных с помощью ацетатной ИЖ, в меньшей степени, чем ацетатный и боратный буферные растворы (ББР). Пленки обладают более высокой эластичностью в ФБР. Стоит отметить, что пленки, обработанные обычной дистиллированной водой (рН ≈5) обладали такой же прочностью, как и пленки, обработанные ФБР, что еще раз подчеркивает, что наиболее комфортными условиями для работы с целлюлозными пленками являются среды близкие к нейтральным. При этом внешний вид пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]} и их прозрачность во всех изученных водных растворах оставались такими же, как в воде.

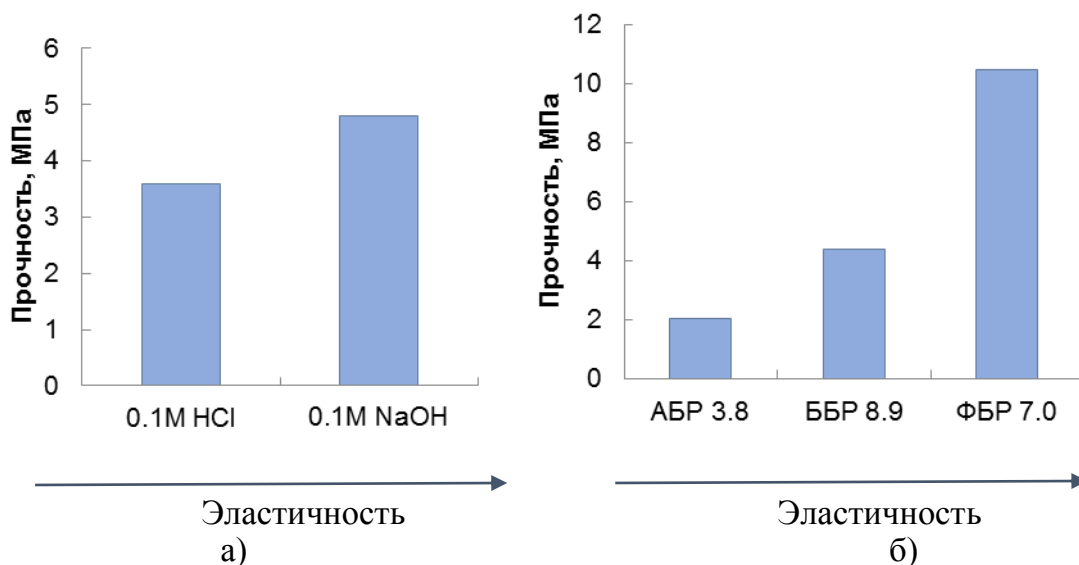


Рис. 37. Влияние природы и рН водных растворов в отсутствие (а) и в присутствии буферов (б) на прочность и эластичность пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]}. Прочность пленок в воде составляет 17 МПа.

Изученные молекулярные органические растворители 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 (рис. 38). Интересно, что разрушающее действие органического растворителя на целлюлозную пленку усиливается с уменьшением его полярности (рис. 38). Так, наиболее полярный из изученных молекулярных органических растворителей ацетонитрил в наименьшей степени воздействует на физико-механические свойства пленок, а наименее полярный ДМФА — в наибольшей. Отметим также, что влияние органических растворителей на прочность пленок сопоставимо по величине с влиянием разбавленных растворов соляной кислоты и щелочи. Мы выявили еще одну интересную особенность целлюлозных пленок, полученных с применением ацетатной ИЖ. При выдерживании пленок в течение 3 мин в ДМСО или ДМФА их прозрачность возрастала с $87\pm 3\%$ (табл. 8) до 93 ± 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.

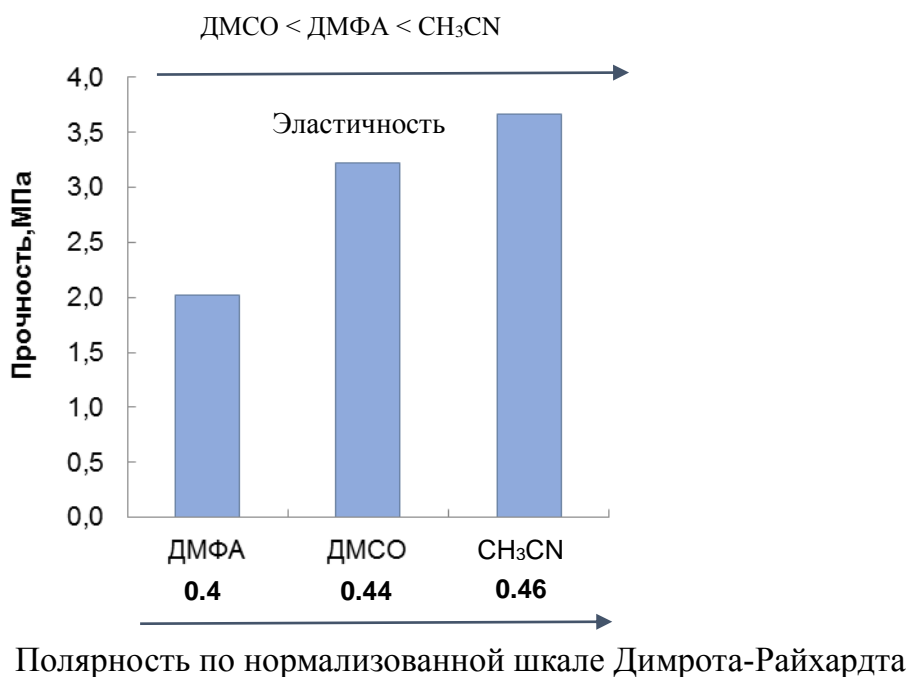


Рис. 38. Влияние молекулярных органических растворителей на прочность и эластичность пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]}.

Морфологию поверхности приготовленных по методике 1а целлюлозных пленок изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Подготовка целлюлозных пленок для получения СЭМ-снимков состояла в том, что их предварительно промывали этанолом (даже если для приготовления пленок ис-

пользовали хлоридную ИЖ), тщательно высушивали, а затем на пленки напыляли слой металлического никеля, чтобы сделать пленку проводящим материалом.

На рис. 39, 40 приведены СЭМ снимки поверхности целлюлозных пленок, полученных при использовании ацетатной и хлоридной ИЖ соответственно. Сравнивая полученные снимки (рис. 39а и 40а) при небольшом увеличении, можно сказать, что поверхность обеих пленок, в основном, ровная, за исключением некоторых дефектов, которые, как правило, возникают из-за раскатывания пленок вручную. При большом увеличении видна губчатая структура пленок, в особенности в случае пленки {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} при ее фотографировании в анфас (рис. 39б), а не под углом, как это делали с пленкой {целлюлоза-ВМIm}[Cl]} (рис. 40б). Полученный нами снимок поверхности пленки, приготовленной с помощью хлоридной ИЖ, аналогичен представленному в литературе, рис. 40в. Различия в фотографиях несомненно связаны с тем, что мы использовали микрокристаллическую целлюлозу, а не бумажную массу, как авторы работы [61]. На основании полученных СЭМ-снимков поверхностей 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.

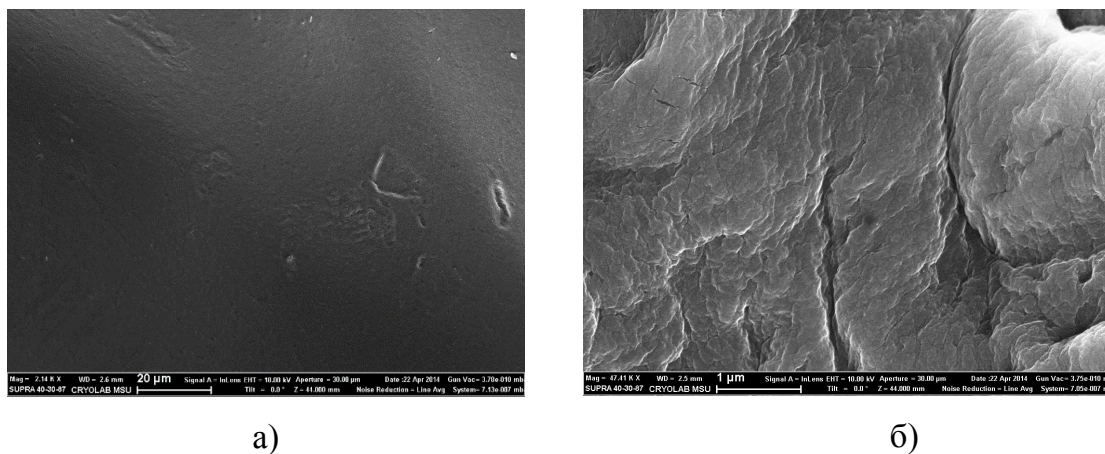
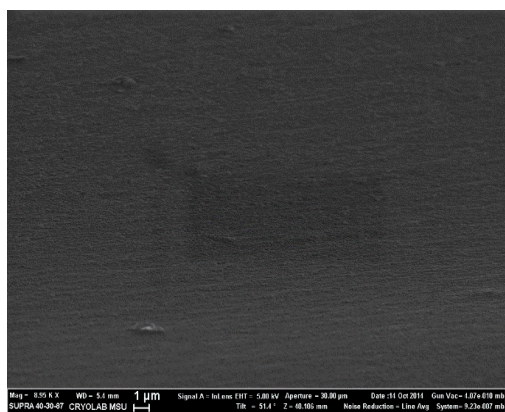
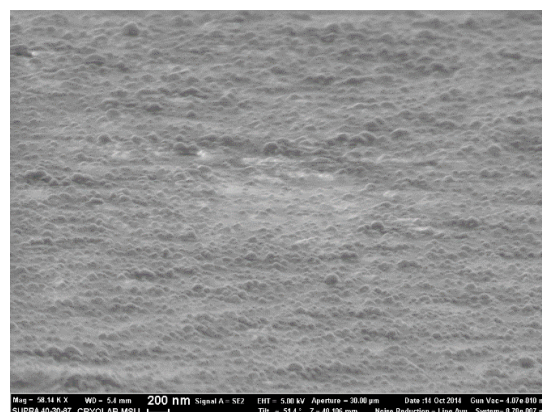


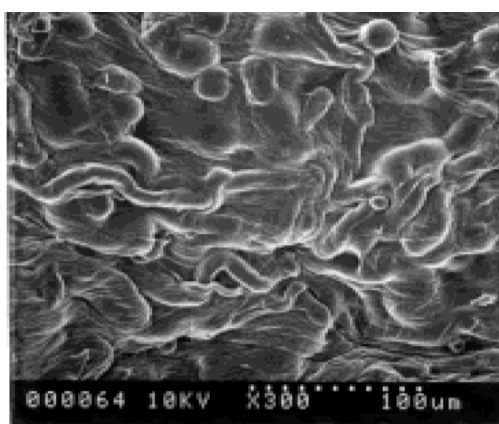
Рис. 39. СЭМ фотографии пленок, полученных из раствора {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} в условиях методики 1а. *Анфас*. Увеличение в 2140 (а) и 47410 (б) раз.



а)



б)



в)

Рис. 40. СЭМ фотографии пленок, полученных из растворов {целлюлоза–[BMIm][Cl]} в условиях методики 1а и {бумажная масса–[BMIm][Cl]} в условиях работы [61]. Под углом. Увеличение в 8950 (а), 58140 (б) и 300 (в) раз.

При хранении целлюлозных пленок следует учитывать, что в открытой чашке Петри пленка легко захватывает из воздуха различные пылевые частицы, которые видны под оптическим микроскопом. По этой причине в дальнейшем влажные пленки в чашке Петри сразу накрывали крышкой, чтобы ограничить их контакт с воздухом, и хранили при комнатной температуре.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы разработали методику получения пленок {микрористаллическая целлюлоза–[BMIm][AcO]}, уточнили условия приготовления пленок с помощью хлоридной ИЖ, а также изучили и сравнили физико-механические, функциональные свойства и морфологию поверхности двух типов пленок. Установили, что, хотя полученные с помощью ацетатной ИЖ пленки незначительно проигрывают пленкам {целлюлоза–[BMIm][Cl]} по прозрачности, они заметно превосходят последние по прочности, эластичности, устойчивости к действию водных растворов в отсутствие и в присутствии буферных растворов, а также изученных молекулярных полярных органических растворителей.

Полученные данные СЭМ о губчатой структуре обеих целлюлозных пленок не позволяют отдать предпочтение какому-то одному виду пленок, поэтому дальнейшие исследования проводили параллельно с двумя пленками.

Глава 6. Целлюлозные пленки с иммобилизованными аналитическими реагентами

Следующий этап исследования включал выбор условий иммобилизации в целлюлозные пленки, приготовленные с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ, аналитических реагентов – участников индикаторных оптических систем для определения целевых органических соединений (гл. 4). Поскольку выбранные в гл. 4 аналитические реагенты имеют разную природу, обладают различными химическими и оптическими свойствами, условия их закрепления в целлюлозном материале изучали индивидуально в каждом случае. Традиционно при иммобилизации органических реагентов используют динамический или статический способы, при которых материал матрицы погружают в раствор реагента и вымачивают в течение определенного времени или прокачивают раствор реагента через матрицу соответственно [127, 143]. В нашем случае методика иммобилизации отличалась тем, что реагенты иммобилизовали не в готовую матрицу (пленку), а их добавляли в смесь для иммобилизации в процессе создания целлюлозного материала. Такой подход применяли ранее другие исследователи при получении с помощью ИЖ целлюлозных пленок, модифицированных органическими реагентами [44] и ферментами [27].

6.1. Условия получения, свойства и применение пленок {целлюлоза–ИЖ–фермент}

Для иммобилизации растительных пероксидаз мы прежде всего попробовали вмешивать их твердые препараты в готовый охлажденный до 25°C раствор целлюлозы в ИЖ, как это делали Р.Д. Роджерс с сотрудниками при иммобилизации лакказы [27]. Однако в растворе {целлюлоза–[BMIm][AcO]} пероксидазы не растворялись без дополнительного нагревания, а при введении их в раствор целлюлозы в хлоридной ИЖ при 25°C смесь кристаллизовалась (рис. 41). Вследствие указанных обстоятельств требовалась детальное изучение условий закрепления растительных пероксидаз в целлюлозных плёнках.

Иммобилизация ПХ и ПС в целлюлозную пленку, на наш взгляд, была бы успешной только при условии их полного растворения в ионных растворителях наряду с целлюлозой. Заметим, что на момент начала исследования в литературе отсутствовали сведения о растворимости растительных пероксидаз в используемых нами ИЖ. Работу по растворению ферментов проводили следующим образом. Взвешенные количества биокатализатора (ПХ/ПС), целлюлозы и ИЖ аккуратно

смешивали в пробирке емкостью 1 мл, которые устанавливали в гнезда термостата. При работе с ацетатной ИЖ смесь нагревали с 40 до 50°C, при использовании хлоридной ИЖ – с 66 до 85°C. Установили, что уже при 40°C пероксидазы довольно быстро (2 ч) растворялись в [BMIm][AcO], а в [BMIm][Cl], как в коммерческом, так и в синтезированных препаратах – при температуре их плавления, 66°C. Таким образом, ацетатная ИЖ оказалась одинаково хорошим растворителем как для целлюлозы, так и пероксидаз. Поскольку для нас было важно не только растворить пероксидазы в ИЖ, но и получить оптически прозрачные и каталитически активные ферментсодержащие целлюлозные пленки, в дальнейшем растворы целлюлоза–[BMIm][AcO]/ [BMIm][Cl]–фермент готовили при 50/85°C в соответствии с методикой 1б.



Рис. 41. Фотография раствора {целлюлоза-[BMIm][Cl]} с добавленной ПХ.

Каталитическую активность целлюлозных пленок с иммобилизованными ферментами контролировали по реакции окисления ТМБ пероксидом водорода, придерживаясь методики 3. Установили, что ПХ и ПС, иммобилизованные в целлюлозные пленки, полученные растворением целлюлозы в [BMIm][AcO], проявляли очень слабую каталитическую активность. Пленка после добавления растворов ТМБ и H₂O₂ имела бледную, едва заметную глазу окраску. Напротив, пленки, приготовленные с помощью [BMIm][Cl], были каталитически активны, их окраска быстро менялась из бесцветной через синюю в бурю (рис. 42). Хотя растворы субстратов наносили на поверхность пленки капельным путем, они быстро пропитывали весь ее объем, пленка окрашивалась целиком (рис. 42), а не только поверхность или какая-то ее часть. Такая особенность окрашивания материала свойственна гидрогелям [216].

Пионеры в области получения целлюлозных пленок с лакказой, Р.Д. Роджерс и сотр., отмечали две основные причины потери ее каталитической активности в ходе иммобилизации: инактивационное действие хлоридной ИЖ на фермент и термическая деструкция биокатализатора [27]. В нашем случае ферменты, иммобилизованные в пленки, полученные из раствора {целлюлоза-[BMIm][Cl]}, проявляли

значительно более высокую каталитическую активность, чем пленки, приготовленные с помощью ацетатной ИЖ, хотя температура раствора первой смеси была на 35°C выше, чем для второй. Это обстоятельство давало основание полагать, что ключевая причина потери активности пероксидаз состояла в различном по степени инактивирующем действии ацетатной и хлоридной ИЖ.

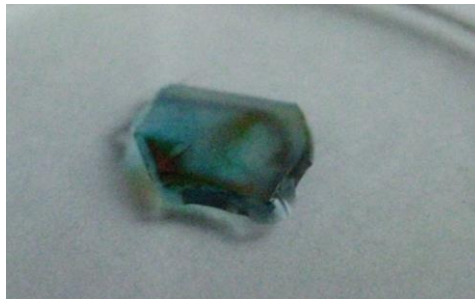


Рис. 42. Фотография пленки, полученной из раствора состава {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, сразу после нанесения растворов ТМБ и H₂O₂.

Для выяснения причин практически полной потери каталитической активности пероксидазами в ацетатной ИЖ изучили кинетику окисления гваякола пероксидом водорода в присутствии [BMIm][AcO]. Это было возможно, благодаря тому, что ацетатная ИЖ при комнатной температуре была жидкостью. Для проведения аналогичного исследования в присутствии хлоридной ИЖ потребовалось бы ее нагревание до 66°C для получения раствора, в который можно было вводить ферменты и субстраты, а затем измерять во времени поглощение и оценивать скорость индикаторной реакции. Однако в нашем распоряжении не было спектрофотометра с термостатируемым кюветным отделением, кроме того, сравнивать влияние обеих ИЖ на скорость индикаторной реакции при разных температурах было бы некорректно. Интересующие нас сведения о характере и степени влияния обеих ИЖ на каталитическую активность нативных растительных пероксидаз в литературе отсутствовали.

С теоретической точки зрения для нас было важно не только установить характер и степень влияния [BMIm][AcO] на каталитическую активность нативных ПХ и ПС, но и сравнить действие ацетатной ИЖ с ранее полученными в нашей лаборатории данными по влиянию [BMIm][BF₄] и [BMPy][BF₄], и таких молекулярных органических растворителей (МОР), как ДМСО, этанол и ацетонитрил на каталитическую активность ПХ и ПС при их участии в той же индикаторной реакции. Указанные ИЖ содержат в своем составе катионы и анионы, которые различаются по способности «структурировать» воду и могут по-разному влиять на активность и стабильность ферментов в водных растворах [26,217,218].

Изучение влияния [BMIm][AcO] на каталитическую активность нативных ПХ и ПС. Эксперимент в присутствии 0–75 об.% [BMIm][AcO] проводили по методике

4 в условиях, установленных ранее для реакции в водной среде [219]. При этом реакционный раствор оставался оптически прозрачным, что позволяло использовать в качестве соразтворителя ацетатной ИЖ подходящий для водной среды 0.05 М ФБР с рН 6.0. В качестве субстрата-окислителя использовали H_2O_2 .

При введении в реакционный раствор даже 10 об.% [ВМІm][АсО] (0.5 М) скорость реакции пероксидазного окисления ГК резко уменьшалась по сравнению с таковой в отсутствие ИЖ, при этом каталитическая активность ПХ в 1.7 раза была выше, чем соевого фермента (табл. 9). С повышением содержания [ВМІm][АсО] 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 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][АсО] 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 (табл. 9). Таким образом, каталитическая активность растительных пероксидаз зависит от природы фермента и соразтворителя ИЖ.

Таблица 9. Значения относительной активности ПХ и ПС (a_i/a_0 , %) в реакции окисления ГК пероксидом водорода в присутствии различных содержаний [ВМІm][АсО] (соразтворитель ИЖ – 0.05 М ФБР, рН 6.0)

Среда	Состав среды (об. %)	a_i/a_0 , %	
		ПХ	ПС
[ВМІm][АсО]:ФБР	10:90	23.90	14.24
	25:75	0.79	9.65
	50:50	0.19	8.29
	75:25	0.18	5.95
[ВМІm][АсО]:H ₂ O	10:90	4.02	38.13
	25:75	0.45	12.36
	50:50	0.22	10.32
	75:25	0.19	9.42

Для оценки кинетических параметров индикаторной реакции в присутствии 10 об.% ацетатной ИЖ использовали координаты Лайнуивера-Берка, из которых графическим методом [138] при трех концентрациях каждого фермента рассчитали V_m и K_m (табл. 10). Предварительно показали, что в стационарных условиях начальная скорость пероксидазного окисления ГК подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Дополнительно в табл. 10 приведены рассчитанные значения константы скорости выделения продукта индикаторной реакции k_2 ($V_{max}/[E_0]$) и каталитической константы k_{cat} (рис. 43, уравнение 6), которая отражает реакционную способность пероксидаз в присутствии ацетатной ИЖ. Сопоставление величин K_m показало, что при 10 об.% [ВМІm][АсО] сродство ПХ к H_2O_2 , не менее, чем в 3 раза выше,

чем сродство ПС. Максимальная скорость реакции, а также k_{cat} практически не зависят от природы фермента (табл. 10). Тот факт, что константы скорости выделения продукта индикаторной реакции k_2 для ПХ и ПС близки по величине, косвенно свидетельствует об участии [BMIm][AcO] во второй необратимой стадии ферментативной реакции ($E + S \leftrightarrow ES \xrightarrow{k_2} E + P$).

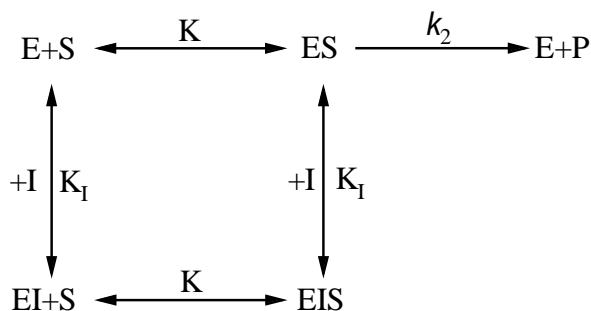


Рис. 43. Кинетическая схема неконкурентного ингибирования растительных пероксидаз в реакции окисления ГК пероксидом водорода в присутствии [BMIm][AcO] (ИЖ обозначена как ингибитор, I).

Таблица 10. Кинетические параметры катализируемой ПХ и ПС реакции окисления ГК пероксидом водорода в присутствии 10 об.% [BMIm][AcO] (концентрации: ГК – 0.9 и 5.4 мМ, H₂O₂ – 100 – 200 и 200 – 300 мМ в реакциях, катализируемых ПХ и ПС соответственно; соразтворитель ИЖ – 0.05 М ФБР, pH 6.0; $n = 3$, $P = 0.95$)

Концентрация фермента, нМ	Константа Михаэлиса-Ментен K_m , мкМ	Максимальная скорость V_{max} , мкМ×мин ⁻¹	Константа скорости стадии выделения продукта $k_2 \times 10^{-3}$, мин ⁻¹	k_{cat} , с ⁻¹
<u>ПХ</u>				
5.0	1.17 ± 0.03	1.79 ± 0.03	0.36 ± 0.03	1.13
9.0	1.13 ± 0.01	2.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.98
14.0	1.19 ± 0.05	2.89 ± 0.06	0.19 ± 0.06	0.97
<u>ПС</u>				
5.5	4.10 ± 0.01	1.65 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.38
10.5	3.96 ± 0.09	3.44 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.78
15.25	4.22 ± 0.03	5.63 ± 0.04	0.37 ± 0.04	1.43

Для оценки константы ингибирования (K_i) растительных пероксидаз ацетатной ИЖ в реакции окисления ГК пероксидом водорода использовали кинетическую схему (рис. 43), приведенную в работе [220] для расчета константы ингибирования ПХ другой гидрофильной ИЖ, [BMIm][BF₄]. Предложенная схема является адаптированной схемой неконкурентного ингибирования ПХ в присутствии [BMIm][BF₄], ионы которой, как и ионы ацетатной ИЖ, не являются структурными аналогами субстратов. Величины K_i в присутствии 10 об.% [BMIm][AcO] рассчитывали по приведенным в гл. 3.4 формулам 5–9.

Для ПХ величины K_i в системах [BMIm][AcO] : ФБР и [BMIm][AcO] : H₂O (10:90 об.%) составили соответственно (159 ± 6) и (21.2 ± 0.8) мМ; а для ПС – (80 ± 3) и (295 ± 10) мМ ($n = 3$, $P = 0.95$). Таким образом, 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. Напротив, если соразтворителем ИЖ является вода, то более «уязвимым» к влиянию [BMIm][AcO] становится ПХ. Следовательно, целесообразно учитывать природу соразтворителя ИЖ при проведении индикаторных реакций в присутствии ацетатной ИЖ, и ПХ предпочтительнее в системе [BMIm][AcO] : ФБР (10:90 об.%). Величина константы ингибирования ПХ и каталитическая константа скорости реакции в присутствии 10 об.% ацетатной ИЖ в смеси с ФБР в 18 и 10 раз соответственно меньше таковых для системы [BMIm][BF₄] : ФБР (25:75 об.%) [220]. Эти факты свидетельствуют о том, что [BMIm][AcO] значительно более сильный чем [BMIm][BF₄] ингибитор каталитической активности фермента в рассматриваемой реакции.

Для объяснения характера и степени влияния ИЖ на каталитическую активность и стабильность ферментов привлекают их физико-химические свойства, такие как вязкость, полярность, гидрофобность и др., а также специфические эффекты ионов, которые подчиняются теории космотропии [26,217,218,221]. Космотропность – мера структурирующего действия ионов на воду [217]. Количественно степень «космотропности» иона чаще всего характеризуют величинами *B*-коэффициентов вязкости, значения которых для ионов-космотропов выше, чем для ионов-хаотропов [26, 218]. Промежуточное положение занимают пограничные ионы [217]. В соответствии с теорией космотропии в водных растворах анионы-космотропы и катионы-хаотропы стабилизируют ферменты; напротив, анионы-хаотропы и катионы-космотропы их дестабилизируют.

На рис. 44 приведены ряды анионов и катионов, присутствующих в изученных нами средах, в соответствии с величинами их *B*-коэффициентов вязкости. По положению ацетат-иона в ряду анионов можно было бы ожидать, что ацетатная ИЖ будет значительно более слабым ингибитором пероксидаз, чем ИЖ на основе аниона BF₄⁻. Однако экспериментальные данные показали обратное. Относительная каталитическая активность ПС сохраняется на уровне 20% при содержании ацетатной ИЖ в 6 раз меньшем, чем [BMIm][BF₄]. ПХ в присутствии > 70 об.% [BMIm][BF₄] и [BMPy][BF₄] вовсе неактивна, хотя ее остаточная активность в [BMIm][AcO] близка к таковой для ПС. С позиций теории космотропии не удастся объяснить и тот факт, что [BMPy][BF₄] является более сильным ингибитором, чем [BMIm][BF₄] (рис. 44). По результатам нашего эксперимента можно сказать, что анионный эффект ИЖ оказывается более

существенным, чем катионный, поскольку при замене катиона ИЖ близкие величины остаточной каталитической активности ПС наблюдаются при 80 об.% [ВМІm][BF₄] и 60 об.% [ВМРy][BF₄], а при замене аниона — при 60 об.% [ВМІm][BF₄] и 10 об.% [ВМІm][AcO]. Дополнительным подтверждением выказанного тезиса может служить повышение остаточной каталитической активности ПС в присутствии 10-25 об.% [ВМІm][AcO] при замене ФБР на воду с тем же значением рН. Относительная активность ПС возрастает, поскольку в системе присутствует хаотропичный анион Н₂РO₄⁻, молярная доля которого при рН 6.0 составляет 0.918. Необычное поведение [ВМІm][AcO] можно объяснить высокой нуклеофильностью ацетат-иона [26, 221].

	← Стабилизация фермента		Дестабилизация фермента →	
Катионы	K⁺ (X)	ВМРy⁺ (K/X)	ВМІm⁺ (K)	
В-коэффициент, дм ³ × моль ⁻¹	-0.024	-0.370	-0.372	
Анионы	НРО₄²⁻ (K)	СН₃СОО⁻ (K)	ВF₄⁻ (X)	Н₂РО₄⁻ (X)
В-коэффициент, дм ³ × моль ⁻¹	0.172	-0.002	-0.054	-0.058

Рис. 44. Значения В-коэффициентов вязкости для катионов и анионов изученных сред (дм³ × моль⁻¹).

Для расчета В-коэффициентов катионов и анионов использованы уравнения: $V(\text{катион}) = 0,307z - 0,00205 r z^{1/2} - 1,0 \times 10^{-6} r^2$; $V(\text{анион}) = 0,747 - 0,00617(r/|z|) - 1,172 \times 10^{-5}(r/|z|)^2$, где r и z – радиус и заряд ионов соответственно [217]. К – ион-космотроп, X – ион-хаотроп, К/Х – пограничный ион.

Ранее в работе [219] было показано, что несмотря на существенные различия в величинах показателя преломления среды (n_D^{25}) и динамической вязкости (η), в системах в присутствии указанных выше ИЖ и МОР корреляции этих параметров с остаточными активностями ферментов не наблюдались.

На рис. 45 в виде диаграмм представлены зависимости объемных содержаний МОР и ИЖ, вызывающие 50%-ное ингибирование ПХ и ПС (ω , об.%), от величин E_T^N и $\log P$. Как видно из рис. 45а, величины ω строго не коррелируют с величинами E_T^N ни для ИЖ, ни для МОР. Отметим лишь тенденцию роста величины ω с увеличением полярности ИЖ для ПС.

С уменьшением показателя гидрофобности ($\log P$) повышаются, хотя и незначительно, объемные содержания МОР, вызывающие 50%-ное ингибирование каталитической активности пероксидаз, это чуть более заметно в случае ПС (рис. 45 б). Напротив, для ИЖ величина ω убывает с уменьшением величины $\log P$ в ряду [ВМІm][BF₄] > [ВМРy][BF₄] > [ВМІm][AcO]. Так, ацетатная ИЖ ингибирует обе пероксидазы на 50% при содержаниях менее 10 об.%. Исключение составляет [ВМРy][BF₄] в случае ПХ. Все перечисленные несоответствия между величинами ω и $E_T^N/\log P$ для [ВМІm][BF₄], [ВМРy][BF₄] и [ВМІm][AcO] могут быть связаны как с различной природой буферных растворов (имидазольного, коллидинового и

фосфатного соответственно), соразвителей ИЖ, содержанием воды в реакционном растворе (20, 40 и 90 об.%), так и природой биокатализаторов (ПХ является катионным ферментом, а ПС – анионным, pI составляют 8.8 и 4.1 соответственно). Тем не менее очевидно, что с ростом гидрофильности имидазолиевых ИЖ их ингибирующее действие на обе пероксидазы усиливается.

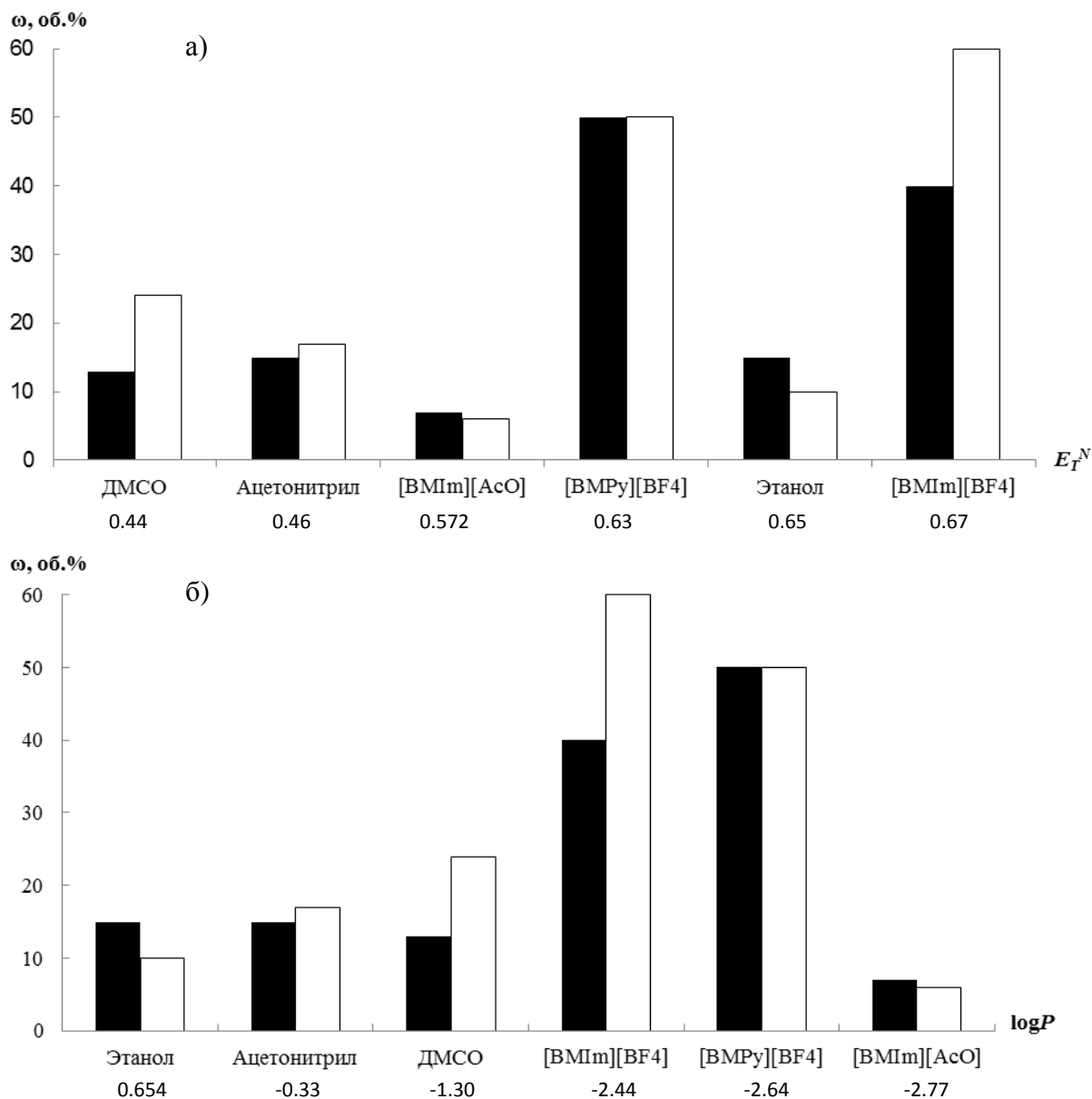


Рис. 45. Содержания (ω , об.%) МОР и ИЖ, при которых наблюдали 50% ингибирование ПХ (■) и ПС (□) в реакции окисления ГК пероксидом водорода (в случае [ВМІm][AcO]) и *трет*-бутилгидропероксидом (в остальных случаях). Растворители расположены в порядке возрастания величины E_T^N (а) [156, 222, 223] и уменьшения величины $\log P$ (б) [26, 223].

Принимая во внимание все сказанное выше, в качестве основного критерия для оценки степени ингибирующего действия ИЖ (по крайней мере на основе одного и того же катиона) на растительные пероксидазы, следует, по нашему мнению, рассматривать величину $\log P$. Этот вывод согласуется с мнением авторов обзора [221],

которые указали гидрофобность как одно из наиболее важных физико-химических свойств ИЖ, влияющих на активность и стабильность других ферментов. Отдельно стоит подчеркнуть, что большую роль в степени влияния гидрофильных ИЖ на активность растительных пероксидаз играет природа соразтворителя ИЖ и природа фермента.

Таким образом, проведенные исследования объясняют практически полную потерю каталитической активности ферментсодержащими целлюлозными пленками, приготовленными с использованием ацетатной ИЖ. Последняя уже при содержании 10 об.% является сильным неконкурентным ингибитором каталитической активности обеих пероксидаз в реакции окисления ГК пероксидом водорода, причем ингибирующее действие этой ИЖ в большей степени выражено в случае ПС. В растворе целлюлозы содержание ацетатной ИЖ значительно больше, 86 об.%. С учетом полученных результатов все дальнейшие исследования проводили с ферментсодержащими пленками, приготовленными с помощью хлоридной ИЖ.

Свойства и применение пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-фермент}. Еще на этапе предварительных испытаний (с. 109) мы заметили, что ПС растворяется в смеси {целлюлоза-[BMIm][Cl]} медленнее, чем ПХ. Мы предположили, что различие в скоростях растворения может быть обусловлено различием в величинах rI ферментов, ведь Р.Д. Роджерс иммобилизовал катионную лакказу [27] с rI 8.2, а использованная нами ПХ имела rI 8.8. Если высказанная гипотеза справедлива, то пероксидазы, значение rI которых лежит в кислой области должны, подобно ПС, растворяться медленнее, чем ПХ. Чтобы проверить наше предположение, мы провели эксперимент с пероксидазой арахиса. Действительно, ПА растворялась в хлоридной ИЖ еще медленнее, чем соевый фермент, хотя величины их rI близки (табл. 11). Даже после нагревания в течение четырёх суток ПА так и не растворилась до конца в смеси целлюлоза-ИЖ.

Мы расширили круг биомолекул, дополнив его двумя белками – Гб и альбумином (табл. 11), величины rI которых находятся между их значениями для ПХ и ПС. Установили, что Гб растворяется на час дольше, чем ПХ, что и следовало ожидать; однако, альбумин растворялся за то же время, что и ПХ. Кроме того, при промывании водой плёнки, содержащей ПХ и альбумин в качестве стабилизирующей добавки, обнаружили, что процент вымывания фермента в присутствии простого белка значительно увеличился. Для объяснения полученных результатов, по-видимому, следует учитывать не только rI белка, но и другие факторы, влияющие на растворимость, например, пространственное строение и размер глобулы биомолекулы.

Таблица 11. Зависимости времени растворения фермента/белка в ИЖ от значения рI

Белок	ПХ	Гб	Альбумин	ПС	ПА
рI	8.8	7	4.7	3.7	3.89
Время растворения, ч	≤6	≤7	≤6	≈10	Не растворяется полностью даже через 96 ч.

Поскольку пероксидазы в целлюлозных пленках иммобилизованы нековалентно, можно было ожидать, что при промывании плёнок водой для удаления избыточной ИЖ фермент может вымываться из пленки. Хотя физически иммобилизованная лакказа не вымывалась из пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} [27], мы проверили, так ли это в нашем случае. Для этого порцию воды, в которой мы промывали пленки, собирали в мерную колбу, разбавляли до нужного объёма водой. Затем из полученного раствора отбирали аликвоту и вводили её в реакцию окисления ТМБ пероксидом водорода. Кинетика неферментативного и ферментативного окисления ТМБ пероксидом водорода довольно хорошо изучена [127, 219, 224], схема представлена на рис. 46.

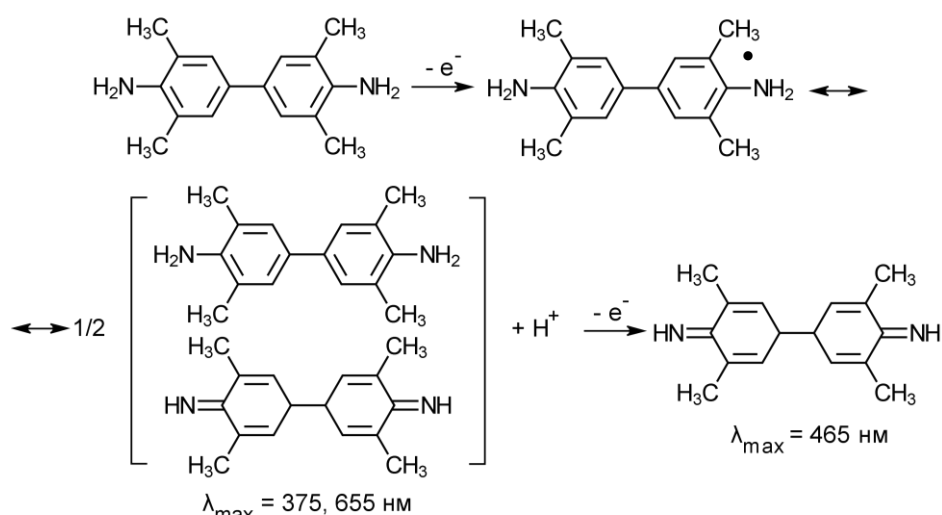


Рис. 46. Схема пероксидазного окисления ТМБ.

Каталитическую активность ПХ в промывных водах определяли по методике 5 (гл. 3.3). В качестве индикаторного вещества обычно используют промежуточный продукт окисления ТМБ, поглощающий при 375 и 655 нм. Мы регистрировали изменение во времени поглощения индикаторного вещества при 374 нм, для которого была известна величина молярного коэффициента поглощения. Концентрацию биокатализаторов в промывных водах устанавливали по графику зависимости скорости индикаторной реакции, характеризуемой $\text{tg}\alpha$, от концентрации белка. Уравнения градуировочных зависимостей и найденные значения содержаний вымываемых из плёнки белков приведены в табл. 12.

Таблица 12. Результаты определения степени вымывания биокатализаторов из плёнки {целлюлоза-[BMIm][Cl]} ($n = 3, P = 0.95$)

Белок	Уравнение градуировочной зависимости: $y = ax + b$	Количество биокатализатора в промывных водах	
		моль $\times 10^{11}$	% от исходного содержания в плёнке (0.2 мг)
ПХ	$y = 3.72x + 0.14$	1.26 ± 0.01	0.31 ± 0.02
ПХ + альбумин	-//-	7.43 ± 0.03	1.82 ± 0.07
ПС	$y = 0.45x + 0.03$	2.06 ± 0.02	0.51 ± 0.02
Гб	$y = 0.02x + 0.01$	4.55 ± 0.02	1.63 ± 0.03

* $y - \text{tg}\alpha \times 10^2, x - c$ (биокатализатора), нМ.

**для приготовления целлюлозной пленки (11.7 см²) использовали 300 мкл (1/3 исходного объема) расплава {целлюлоза-ИЖ-фермент}, которые содержали 0.2 мг биокатализатора.

Степень вымывания биокатализаторов (%) увеличивалась в ряду: ПХ (0.04) < ПС (1.8) < Гб (1.9). Скорость реакции окисления ТМБ в присутствии промывных вод, собранных после обработки водой целлюлозной плёнки, несодержащей фермент, была в 10 раз меньше скорости окисления Гб, поэтому мы ею пренебрегали. В результате установили, что тестовая форма содержала 4×10^{-10} моль обеих пероксидаз. При увеличении содержания пероксидаз в пленке скорость индикаторной реакции окисления ТМБ становилась слишком высокой, было неудобно регистрировать изменения окраски пленки. Уменьшение содержания пероксидаз было невозможным, поскольку масса навески была слишком маленькой, чтобы взвесить ее с достаточной точностью.

Каталитическую активность ферментсодержащих целлюлозных пленок оценивали по методике 3, используя в качестве субстратов арилдиамины: ТМБ (1), *o*-ДА (2) и *o*-ФДА (3); катехоламины: α -метилдопу (4), допамин (5), адреналин (6) и добутамин (7), а также их предшественника пирокатехина (8) (рис. 47). Для сравнения каталитической активности ферментов изменения цвета пленки с участием иммобилизованных ПХ и ПС в индикаторных реакциях записывали на видео, а затем определяли время появления окраски одинаковой интенсивности (на рис. 47 выделены кругом) в каждом случае. 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) << *o*-ДА (1.65) \approx ТМБ (4.02); адреналин (-1.37) < α -метилдопа (-1.7) < допамин (-0.98) < добутамин (3.6) [225, 226]. Аналогичную последовательность наблюдали и для ПС, исключение составляли адреналин и добутамин, которые не превращались соевым биокатализатором. 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 [BMIm][Cl] и нагревание смеси до 85°C в течение 7 ч. Мы полагаем, что сохранение каталитической активности растительных пероксидаз в составе пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} обусловлено не только уникальной структурой целлюлозных материалов, приготовленных с использованием ИЖ, [227, 228], но и менее выраженным по сравнению с [BMIm][AcO] ингибирующим действием.

[ТМБ—H ₂ O ₂]+пленка											
	Время, с										
Фермент	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ПХ			○								
ПС					○						

1

[o-ДА — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ		○		
ПС			○	

2

[o-ФДА — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ	○			
ПС			○	

3

[Метилдопа — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ	○			
ПС		○		

4

[Допамин — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ	○			
ПС		○		

5

[Адреналин — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ				○
ПС				

6

[Добутамина — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ			○	
ПС				

7

[Пирокатехин — H ₂ O ₂]+ пленка				
Фермент	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
ПХ	○			
ПС		○		

8

Рис. 47. Изменение во времени окраски плёнок {целлюлоза-[BMIm][Cl]}, содержащих ПХ и ПС, в различных индикаторных системах (содержания: ферментов – 0.4 нмоль, субстрата-восстановителя – 0.2 мкмоль, H₂O₂ – 1 мкмоль).

Для выбора подходящих *условий хранения* иммобилизованных препаратов пероксидаз апробировали три способа: 1) под слоем воды; 2) в высушенном состоянии; 3) в набухшем состоянии в герметичном контейнере. Поскольку в процессе промывания плёнки водой некоторое количество фермента вымывается из пленки, мы предположили, что при хранении плёнки в воде каталитическая активность двух сторон плёнки (верхней, не соприкасавшейся с дном контейнера в процессе хранения, и нижней, которая с ним соприкасалась) будет разной. Каталитическую активность иммобилизованного в целлюлозную пленку фермента контролировали по методике 3, используя в качестве индикаторной реакцию окисления ТМБ пероксидом водорода. При этом, как мы уже указывали ранее (рис. 42), изменялся цвет пленки. Установили, что сразу после получения плёнок их активность сверху и снизу одинакова и не зависит от природы фермента. Вследствие меньшего вымывания из плёнки ПХ, ее каталитическая активность в конечном иммобилизованном препарате выше, чем у ПС.

Для выяснения подходящей *температуры хранения* партию фермент-содержащих пленок разделили на две серии. Первую серию пленок хранили при комнатной температуре, а вторую — в холодильнике при +4°C. В обоих случаях пленки находились в герметичных контейнерах одни сутки и одну неделю. Каталитическую активность пленок из обеих серий оценивали с двух сторон, придерживаясь методики 5. Установили, что ПХ и ПС в целлюлозных пленках, которые хранили при +4°C, теряли каталитическую активность в 1.3 раза быстрее, чем ферменты в пленках, которые хранили при комнатной температуре (20–25°C). Возможно, что при +4°C вода в составе целлюлозной плёнки частично структурируется, вследствие чего нарушается нативная конформация белка и его каталитические свойства ослабляются. Таким образом, хранить пленки целесообразнее при комнатной температуре. Интересно отметить, что и через сутки и через неделю ПХ в целлюлозных плёнках обеих серий была активнее, чем ПС. Кроме того, обнаружили, что при хранении пленок в воде в течение недели при комнатной температуре ПХ и ПС вымывались из пленки, причем в большей степени с поверхности пленки, соприкасающейся с водой.

При хранении пленок на воздухе в течение дня они теряли свою проницаемость для растворов субстратов: реакция окисления ТМБ пероксидом водорода на таких пленках протекала очень медленно. Пленки становились ломкими и непригодными для дальнейшего практического использования (рис. 48). Скорость индикаторной реакции возрастала, но, к сожалению, не до первоначального уровня, если перед проведением эксперимента подсохшие пленки выдержать в воде в течение 2–2.5 ч для набухания.



Рис. 48. Фотография пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПХ} после ее высушивания на воздухе при комнатной температуре в течение одного дня.

Добиться высокой каталитической активности растительных пероксидаз в составе плёнок удалось при их хранении при комнатной температуре в набухшем состоянии в плотно закрытом контейнере, в отсутствие доступа воздуха. Выбрав именно такой способ хранения, изучили *стабильность ПХ и ПС в составе целлюлозных пленок* в течение 35 дней. Каталитическую активность пленок определяли по методике 5, используя в качестве индикаторной реакцию окисления ТМБ пероксидом водорода. Остаточную каталитическую активность пероксидаз рассчитывали как отношение времен появления чистой бурой окраски (рис. 47, шкала 1) в определенный день хранения и в день приготовления пленки. На рис. 49 приведены диаграммы, иллюстрирующие зависимость каталитической активности иммобилизованных в пленке ПХ и ПС от времени хранения препаратов. Как видно из рисунка, в течение первой недели обе ферментсодержащие пленки были так же активны, как и в день приготовления. Через 35 дней ПХ и ПС в пленках {целлюлоза–[BMIm][Cl]} сохраняли не менее 80 и 70% своей первоначальной каталитической активности соответственно, что позволяет заключить, что препараты стабильны при комнатной температуре в отсутствие доступа воздуха не менее одного месяца.

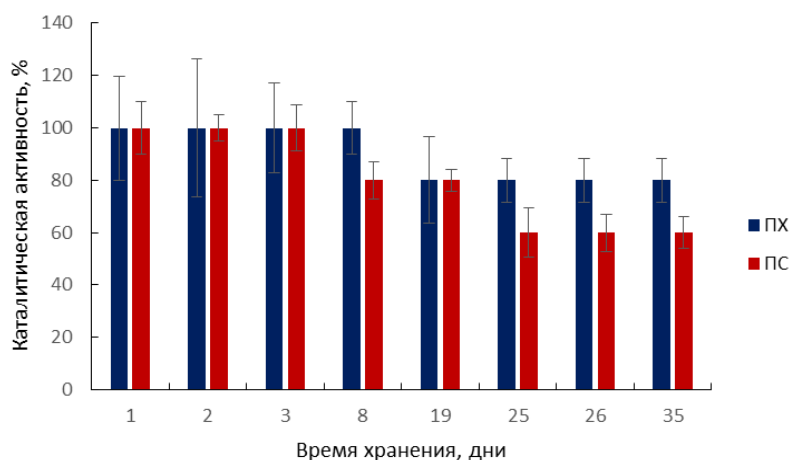


Рис. 49. Зависимость каталитической активности ПХ и ПС, иммобилизованных в пленку {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, от времени их хранения в набухшем состоянии в закрытом контейнере при комнатной температуре ($n = 3$, $P = 0.95$).

При работе с пленками {целлюлоза–[ВМІm][СІ]–пероксидаза} обратили внимание на то, что после добавления капли раствора арилдиамина, ТМБ, *o*-ДА или *o*-ФДА, субстраты окислялись даже в отсутствие пероксида водорода, в результате чего пленки окрашивались (рис. 50).

		Время, мин										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Фермент	ТМБ + пленка											
ПХ	[Color gradient from white to green]											
ПС	[Color gradient from white to blue]											
		<i>o</i> -ДА + пленка										
ПХ	[Color gradient from white to orange]											
ПС	[Color gradient from white to orange]											
		<i>o</i> -ФДА + пленка										
ПХ	[Color gradient from white to yellow]											
ПС	[Color gradient from white to yellow]											

Рис. 50. Изменение окраски пленок {целлюлоза–[ВМІm][СІ]} с иммобилизованными ПХ и ПС при нанесении на их поверхность растворов арилдиамина.

Обнаруженный факт позволяет утверждать, что иммобилизованные в целлюлозную пленку растительные пероксидазы проявляют не только пероксидазную, но и оксидазную активность, свойственную нативным биокатализаторам. Это может служить дополнительным аргументом в пользу тезиса о том, что хлоридная ИЖ «дружелюбна» по отношению к растительным пероксидазам, поскольку при физической иммобилизации биокатализаторов сохраняется их нативная структура. Заметим, что в растворе в отсутствие пероксида водорода реакции окисления арилдиамина кислородом протекают очень медленно, в то время как на пленке окраска продуктов заметна уже на первых минутах реакции, как это было в случае ТМБ, наиболее легко окисляемого арилдиамина (рис. 51). Мы полагаем, что это связано, с одной стороны, с быстрым по сравнению с раствором контактом участников ферментативной реакции на пленке, с другой стороны, с возможным активирующим действием остаточных количеств ИЖ на каталитическую активность растительных пероксидаз.



Рис. 51. Фото целлюлозной пленки, полученной из раствора {целлюлоза–[ВМІm][СІ]} без фермента (1) и с ПХ (2), через 2 мин после добавления 20 мкл 0.1 мкМ раствора ТМБ и 10 мкл Н₂О.

На примере пленок, содержащих ПХ (рис. 52, голубая кривая), проверили возможность их повторного использования в реакции окисления ТМБ пероксидом водорода после отмывки продуктов индикаторной реакции водой. Для этого 20 мкл 0.1 мМ раствора ТМБ и 10 мкл 0.1 мМ раствора H_2O_2 последовательно наносили в одну и ту же точку пленки. В момент добавления H_2O_2 включали секундомер. Набухшую пленку {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПХ} быстро помещали на поверхность стеклянной пластинки, на которой она удерживалась адгезионными силами. Регистрировали спектр поглощения окрашенной пленки (рис. 52, оранжевая кривая). Затем окрашенную пленку промывали в воде в течение 15 мин и снова регистрировали спектр поглощения (рис. 52, зеленая кривая). Далее на поверхности пленки проводили реакцию окисления ТМБ еще раз и регистрировали спектр пленки (рис. 52, желтая кривая) так, как это делали вначале. Следует отметить, что контролировать степень отмывки пленки удобнее по максимуму поглощения промежуточного продукта окисления ТМБ при 655 нм [224]. Из представленных спектров видно, что после однократного промывания водой, пленки, содержащие ПХ, возможно использовать еще раз, однако, каталитическая активность фермента при этом снижалась в 2.5 раза.

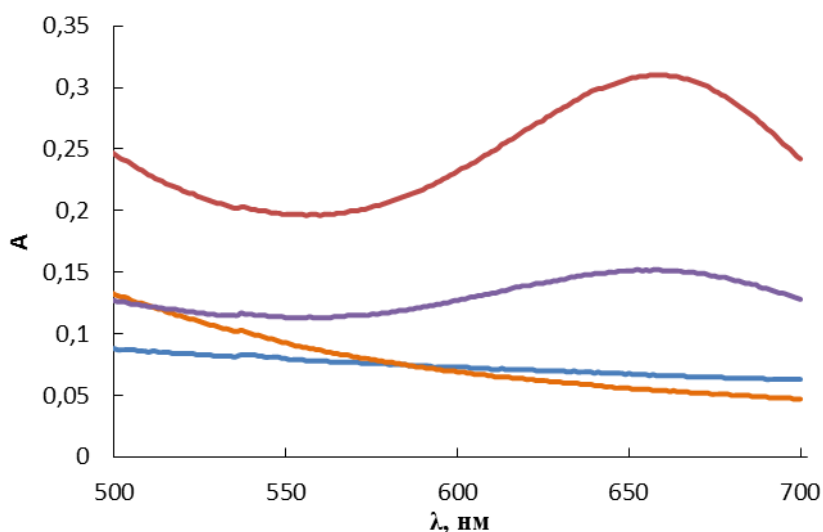


Рис. 52. Спектры поглощения целлюлозных пленок с иммобилизованной ПХ: **чистой пленки**, **окрашенной пленки** после проведения реакции окисления ТМБ пероксидом водорода, **промытой пленки** и **повторно использованной пленки** (относительно стекла).

Поскольку реакция с участием ТМБ протекала с достаточно высокой скоростью, продукты окисления были интенсивно окрашены, а переходы окрасок контрастны, именно эту реакцию мы использовали в качестве индикаторной на следующем этапе экспериментальной работы, при апробации полученных тест-материалов для полуколичественного определения ТМБ.

Как видно из рис. 53 с уменьшением концентрации наносимого на пленку субстрата, уменьшается интенсивность окраски пленки, вплоть до ее полного исчезновения при содержании ТМБ в индикаторной системе $2 \cdot 10^{-9}$ моль. Таким образом, по имеющейся шкале окраски пленки (рис. 53) можно оценить концентрацию целевого субстрата. Наиболее удобно фиксировать окраску пленки через 0.5 мин после добавления растворов субстратов, при котором интенсивности бурой окраски конечного продукта окисления ТМБ разных концентраций более всего различаются.

v(ТМБ), моль	Время наблюдения, мин			
	0.5	1.0	1.5	2.0
$2 \cdot 10^{-7}$				
$1 \cdot 10^{-7}$				
$2 \cdot 10^{-8}$				
$8 \cdot 10^{-9}$				
$4 \cdot 10^{-9}$	● ●	● ●	● ●	● ●
$2 \cdot 10^{-9}$				

Рис. 53. Изменение во времени окраски целлюлозной плёнки, содержащей ПХ, в системе ТМБ – H_2O_2 в присутствии различных содержаний ТМБ (содержания: ПХ – 0.3 нмоль (13.5 мкг), H_2O_2 – 1 мкмоль). Для содержания $4 \cdot 10^{-9}$ моль кружками обозначена неравномерная окраска пленки.

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 $[BMIm][Cl]$. Такие целлюлозные пленки с растительными пероксидазами выгодно отличаются от существующих аналогов, особенно от целлюлозных пленок с нековалентно иммобилизованной лакказой [27], с бóльшей в 3 раза остаточной каталитической активностью, и, следовательно, бóльшей 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, по-видимому, может быть показателем «дружелюбности» хлоридной ИЖ по отношению к этим ферментам. Напротив, ацетатная ИЖ, как мы показали, 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–[ВМІm][AcO]} для иммобилизации ПХ и ПС не представляется возможным.

Пленки {целлюлоза–[ВМІm][Cl]}, использованные в качестве носителя для иммобилизованных пероксидаз не изменяют химизм индикаторных реакций. Следует подчеркнуть, что ПХ и ПС в пленках {целлюлоза–[ВМІm][Cl]} отличаются высокой каталитической активностью, которая сохраняется в течение не менее 35 дней. Данные о стабильности других ферментов, иммобилизованных в целлюлозные пленки, в литературе отсутствуют.

Впервые обнаружено, что скорость растворения растительных пероксидаз в расплаве {целлюлоза–ИЖ} возрастает с увеличением значения rI фермента и максимальна для ПХ. Выявление подобной закономерности полезно для дальнейших исследований и использования систем {фермент–ИЖ}. Таким образом, разработанная методика иммобилизации в целлюлозную пленку представляется более предпочтительной для иммобилизации катионных ферментов, таких как ПХ.

На примере реакций окисления арилдиаминов и катехоламинов пероксидом водорода показана принципиальная возможность визуального и, при необходимости, спектрофотометрического определения перечисленных субстратов с использованием предложенных пленок состава {целлюлоза–[ВМІm][Cl]–ПХ/ПС}. Отдельно подчеркнем тот факт, что аналитический сигнал при визуальной или спектрофотометрической регистрации измеряют с одной (верхней) стороны пленки, нижняя ее сторона плотно прилегает к поверхности стеклянной пластинки и прочно там удерживается силами адгезии. Дальнейшее совершенствование полученных целлюлозных материалов, на наш взгляд, должно заключаться в применении более чувствительных индикаторных систем, например с участием тироксина, ускоряющего превращение катехоламинов в присутствии ПХ [226].

6.2. Пленки {целлюлоза–ИЖ} для иммобилизации и сорбции катионных и анионных красителей

Иммобилизацию индигокармина и пиронина Б в целлюлозные пленки двух видов проводили по методике 1в. Установили, что сразу после добавления навесок ИК и ПБ к смесям {целлюлоза–[ВМІm][Cl]} и {целлюлоза–[ВМІm][AcO]} и при растворении в них анионный и катионный красители ведут себя по-разному. Более того, поведение одного и того же красителя в присутствии разных ИЖ, хлоридной и ацетатной, различно. Остановимся отдельно на особенностях растворения ИК и ПБ в каждой из указанных смесей.

При растворении ИК в смеси {целлюлоза–[ВМІm][Cl]} сначала образуется голубой раствор с включениями не растворившегося красителя (рис. 52, 1а), который по мере растворения ИК становится однородным и приобретает насыщенный тем-

но-синий цвет (рис. 52, 1б). Напомним, что синяя окраска характерна для нейтрального водного раствора красителя. При добавлении навески ИК к смеси {целлюлоза–[BMIm][AcO]} последняя окрашивалась не в синий, а в коричнево-красный цвет, который в процессе растворения постепенно становился зеленым (рис. 52). Краситель полностью растворялся в смесях {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и {целлюлоза–[BMIm][AcO]} за 7 ч, то есть время растворения целлюлозы в ИЖ в присутствии ИК оставалось таким же, как и в его отсутствие.

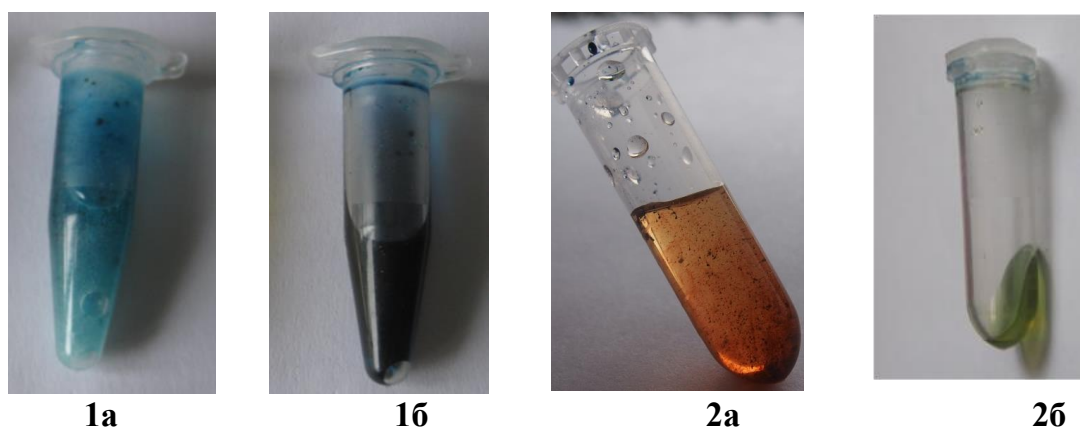


Рис. 52. Фотографии смеси {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ИК} (1) и {целлюлоза–[BMIm][AcO]–ИК} (2) сразу после смешения реагентов (1а, 2а) и через 7 ч (1б, 2б) при 85 (а) и 50 (б)°С.

Мы предположили, что различные окраски смесей {целлюлоза–ИЖ–ИК} связаны с разными кислотно-основными свойствами ИЖ вследствие разной природы их анионов. В литературе информация о кислотно-основных свойствах изученных ИЖ отсутствует. Мы зарегистрировали спектры поглощения водного раствора ИК при различных значениях pH (рис. 53) и его раствора в ацетатной ИЖ (рис. 54), в присутствии которой цвет тройной смеси отличался от цвета водного раствора (рис. 52, 2а). Как видно из данных рис. 53, в слабо кислой и нейтральной средах доминирует синяя форма красителя, в щелочной среде (при pH > 11.6) – желтая с максимумом поглощения близким к описанному в литературе (437 нм [229]). При pH 10.6 поглощают две ионные формы ИК, вследствие чего раствор окрашен в зеленый цвет.

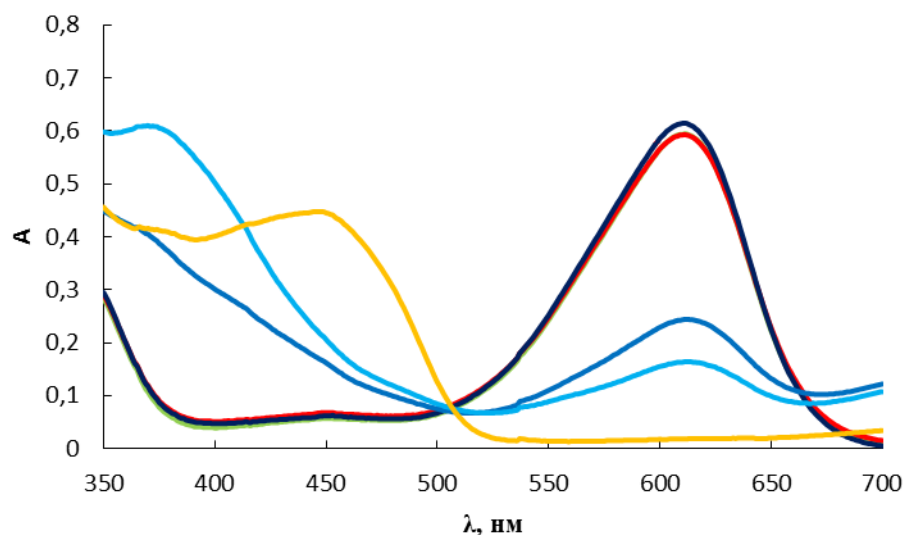


Рис. 53. Спектры поглощения 50 мкМ водного раствора ИК при разных рН: **3.8, 7.0, 8.9, 10.6, 11.5, 13.0** (раствор сравнения – вода).

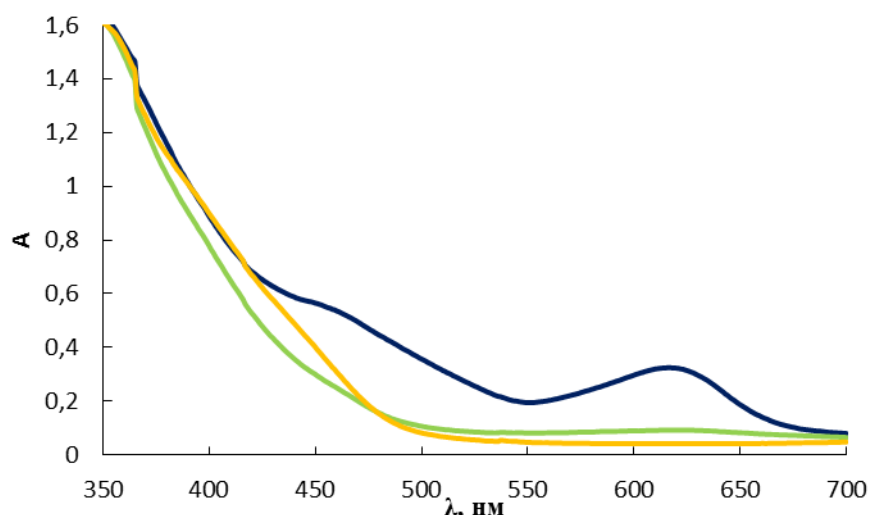


Рис. 54. Спектры поглощения **[BMIm][AcO]**, 50 мкМ раствора ИК в **[BMIm][AcO]** **в отсутствие** и **в присутствии 1 мг целлюлозы** (раствор сравнения – вода).

Красная окраска ИК появляется в щелочных водных растворах в результате окисления желтой формы кислородом воздуха или восстановления зеленой, например, глюкозой (рис. 55), поэтому красная окраска неустойчива. Поскольку структурной единицей целлюлозы служит остаток β -глюкозы $[C_6H_7O_2(OH)_3]_n$ (рис. 16), мы предположили, что при растворении ИК в ацетатной ИЖ краситель может окисляться кислородом воздуха, а затем восстанавливаться целлюлозой. Для подтверждения высказанной гипотезы изучили спектры поглощения ИК в ацетатной ИЖ в отсутствие и в присутствии 1 мг целлюлозы, что в 150 раз меньше того количества, которое использовали для приготовления целлюлозной пленки по методике 1. Заметим, что при указанном содержании целлюлозы раствор оставался оптически прозрачным без нагревания.

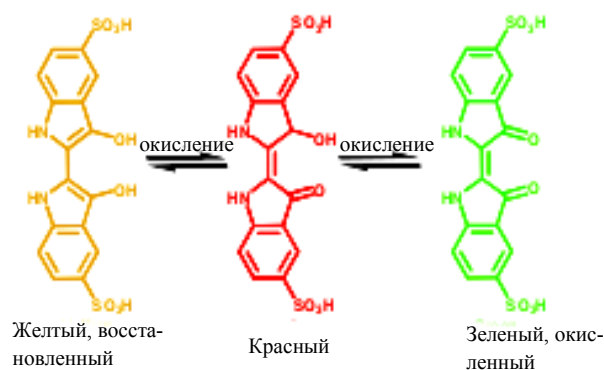


Рис. 55. Схема окисления-восстановления ИК в водных щелочных растворах кислородом воздуха [170, 230].

Спектр поглощения раствора ИК в ацетатной ИЖ (рис. 54, синяя кривая) более всего напоминает спектр водного раствора ИК при pH 10.6 с максимумом поглощения при 611 нм и небольшим плечом ниже 500 нм, которое приписывают желтой форме красителя. Визуально раствор ИК в [BMIm][AcO] окрашен в зеленоватый цвет, что косвенно свидетельствует о том, что ацетатная ИЖ имеет щелочную реакцию среды. После введения 1 мг целлюлозы спектр поглощения раствора красителя в ацетатной ИЖ похож на его спектр при pH 13.0, когда краситель полностью переходит в желтую форму. Красная окраска раствора ИК в ацетатной ИЖ в отсутствие целлюлозы появлялась только при добавлении к ИЖ твердого препарата красителя, а не его водного раствора. Однако она быстро переходила в зеленую в результате окисления кислородом воздуха. Полученные результаты поясняют появление различных окрасок в растворе ИК в ИЖ и подтверждают нашу гипотезу о восстановлении ИК целлюлозой.

Интересно было проверить, сохраняет ли ИК свойства кислотно-основного индикатора при иммобилизации. Для этого пленку {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ИК} помещали в растворы разной кислотности и следили за изменением окраски целлюлозного материала (рис. 56). Как видно из фотографий, пленки в 0.1 М растворе щелочи через 1.5 мин изменяли исходный синий цвет на желто-зеленый, а пленки в 0.1 М растворе соляной кислоты по-прежнему оставались синими. Тот факт, что ИК сохранял свои кислотно-основные свойства при иммобилизации в целлюлозную пленку свидетельствует о «дружелюбности» [BMIm][Cl] по отношению к ИК.

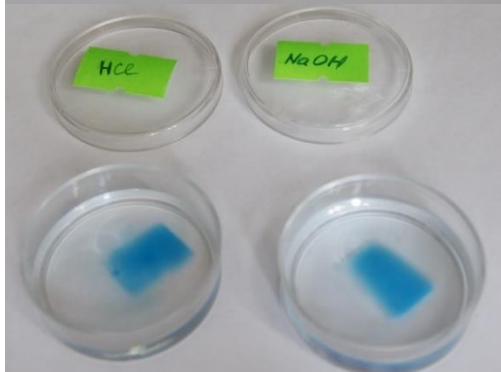
Таким образом, установили, что ИК растворяется в обеих ИЖ, однако если [BMIm][Cl] практически не влияет на оптические и кислотно-основные свойства красителя, то [BMIm][AcO] химически активен по отношению к ИК, в результате чего краситель в ее растворе частично окисляется кислородом воздуха. Это обстоятельство позволяет предположить, что ацетатная ИЖ лучше растворяет молекулярный кислород, чем хлоридная ИЖ, поэтому ее следует применять с осторожностью для иммобилизации реагентов, способных к автоокислению. Более того, ацетатная

ИЖ в отличие от хлоридной ИЖ изменяет кислотно-основные свойства анионного красителя ИК.

Первоначальный вид пленок



Сразу после помещения в растворы кислоты и щелочи



Через 1.5 мин после помещения в растворы кислоты и щелочи

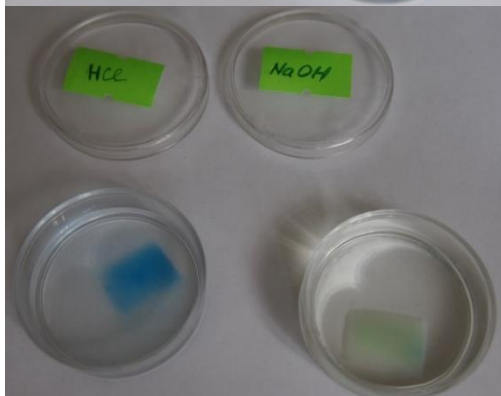


Рис. 56. Фотографии пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ИК} в растворах с рН 2.0 (0.1 М HCl) и 13.0 (0.1 М NaOH).

При *растворении катионного красителя ПБ* в хлоридной и ацетатной ИЖ наблюдали картину, подобную той, что описана выше для ИК. При растворении ПБ в [BMIm][Cl] наблюдался небольшой (5 нм) батохромный сдвиг максимума поглощения красителя, при этом характер спектра и величина максимального поглощения оставались практически такими же, как у спектра поглощения водного раствора красителя (рис. 57а). Напротив, спектр поглощения раствора ПБ в [BMIm][AcO] кардинальным образом отличался от спектров поглощения этого красителя в воде и хлоридной ИЖ (рис. 57б). Характерная для водного раствора полоса максимального поглощения красителя при 555 нм в спектре поглощения раствора ПБ в ацетатной ИЖ отсутствовала. Действительно, при смешении ПБ с ацетатной ИЖ малиновая окраска красителя быстро исчезала. Интересно отметить, что при добавлении $KCl_{тв.}$ к раствору ПБ в [BMIm][AcO] или при большом (в 100 раз) разбавлении последнего водой цвет красителя возвращался. Можно предположить, что наблюдае-

мое явление связано с разрушением ионной пары ПБ...АсО, вследствие образования которой окраска красителя в растворе ацетатной ИЖ исчезала.

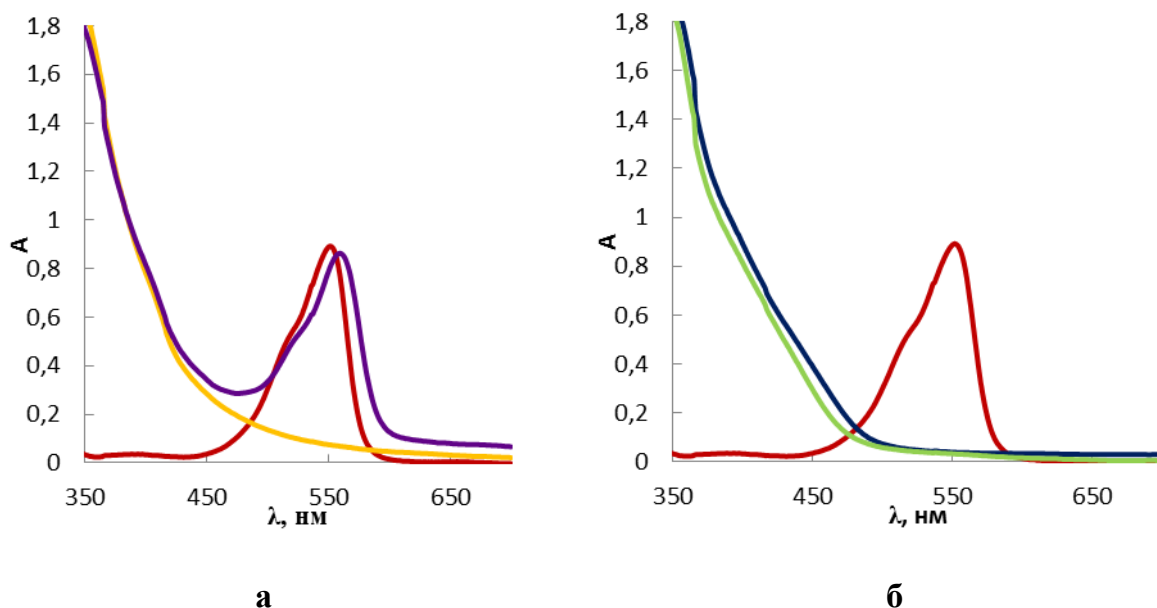


Рис. 57. Спектры поглощения [BMIm][Cl] (а), [BMIm][AcO] (б) и 30 мкМ растворов ПБ в воде, [BMIm][Cl] и [BMIm][AcO] (раствор сравнения – вода).

На основании полученных данных можно было ожидать, что ПБ при облучении светом с длиной волны 355 нм будет проявлять свои флуоресцентные свойства только в пленках, приготовленных с помощью хлоридной, но не ацетатной ИЖ. На рис. 58 приведены спектры флуоресценции целлюлозных пленок двух видов с иммобилизованным в них ПБ. Из рис. 58а видно, что в спектре флуоресценции пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ} при 581 нм наблюдается отчетливый максимум, который сдвинут на 10 нм в длинноволновую область спектра по сравнению с его положением в спектре водного раствора ПБ [186]. В спектре флуоресценции пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ПБ} характерный для ПБ максимум флуоресценции действительно отсутствует, а интенсивность флуоресценции мало отличается от ее фоновых значений (8-9 усл. ед.) в изученном интервале длин волн. Повышение флуоресценции ПБ в пленках обоих видов при $\lambda < 530$ нм можно объяснить флуоресценцией самой ИЖ, а точнее ее катиона [BMIm]⁺. Обнаруженный факт может служить косвенным доказательством присутствия в целлюлозных пленках остаточных количеств ИЖ даже после отмывки. Поскольку флуоресцентный сигнал ИЖ при $\lambda > 530$ нм очень мал, остаточные количества ИЖ в пленках не мешают регистрации полезного сигнала ПБ.

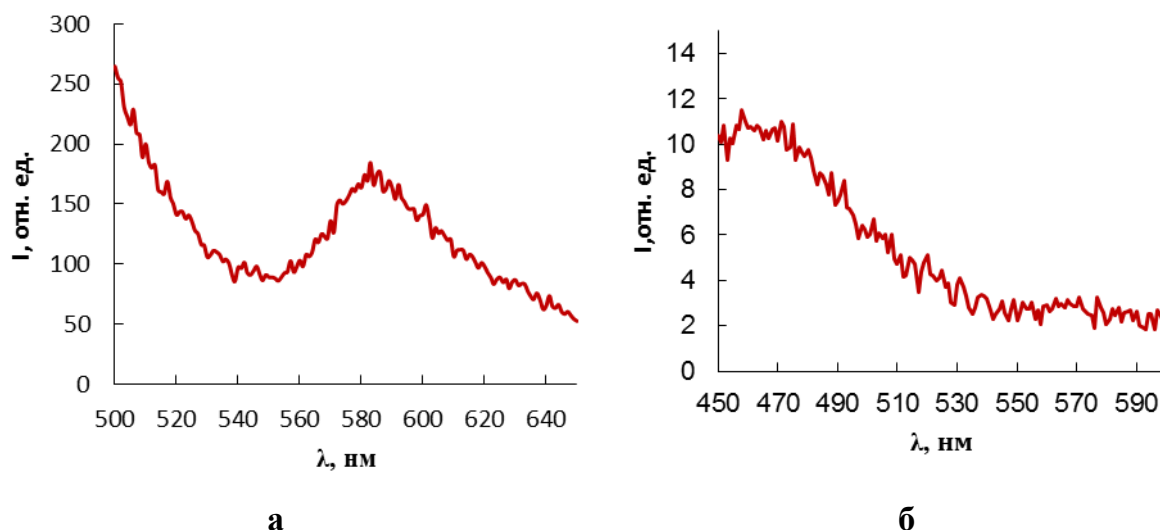


Рис. 58. Спектры флуоресценции пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ} (а) и {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ПБ} (б) (содержание ПБ – 0.6 мкг; $\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм, ширины входящей и выходящей щели 5 нм; фоновый сигнал целлюлозных пленок без ПБ в рассматриваемых условиях не превышал 8-9 усл. ед.).

Проведенные исследования показали, что хлоридная ИЖ более «дружелюбна» не только к пероксидазам (гл. 6.1), но и к изученным синтетическим красителям, поскольку их оптические свойства практически не изменяются при иммобилизации в целлюлозные пленки по сравнению с таковыми для их водных растворов. К сожалению, пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ПБ}, приготовленные по методике 1в, оказались непригодными для использования в аналитических целях, в частности для определения АМ вследствие потери ПБ способности поглощать свет видимого диапазона спектра и флуоресцировать. И еще одно важное дополнение. Иммобилизованные препараты ИК, приготовленные с помощью ацетатной ИЖ, окрашены не в синий, а сине-зеленый цвет. Пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ПБ} имели бледно-вишневую окраску, а не малиновую, как пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]}.

Для выяснения способности пленок двух видов удерживать иммобилизованные в них красители оценили *степень вымывания красителей* из них (табл. 13). Для этого промывные воды собирали, переливали в мерную колбу, разбавляли до 25.0 мл водой, а затем регистрировали спектр поглощения. По величинам оптической плотности при 611 и 555 нм рассчитывали концентрации ИК и ПБ соответственно, используя приведенные в гл. 4 молярные коэффициенты их поглощения, а затем степень вымывания по формуле 11, гл. 3.4.

Таблица 13. Вымывание красителей из целлюлозных плёнок ($n = 3$, $P = 0.95$) в течение 20 мин (антирастворитель при получении плёнок – вода*)

Вымывание	{Целлюлоза–[BMIm][AcO]}**		{Целлюлоза–[BMIm][Cl]}	
	ИК	ПБ	ИК	ПБ
моль×10 ⁸ , в промывных водах	5.60±0.03	2.73±0.04	10.93±0.07	0.12±0.02
%, от исходного содержания в плёнке, 0.2 мг	13.06±0.05	7.09±0.05	25.49±0.08	0.31±0.03

*Применение воды в качестве промывной жидкости для плёнок состава {целлюлоза–[BMIm][AcO]} обусловлено необходимостью сравнения степеней вымывания двух красителей в одинаковых условиях из обеих плёнок.

** Величины могут быть несколько занижены, поскольку ацетатная ИЖ изменяет оптические свойства обоих красителей.

Как видно из данных таблицы, катионный краситель ПБ удерживался в плёнках двух видов лучше, чем анионный ИК, причем при использовании плёнок, приготовленных с помощью хлоридной ИЖ, вымывание ПБ было минимальным. Наименьшей степенью вымывания ИК характеризуются иммобилизованные препараты, полученные на основе пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]}. Уменьшить количество и скорость вымывания анионного красителя из этой пленки удалось при замене воды в качестве промывной жидкости на этанол, в котором ИК менее растворим [231]. Однако при увеличении времени контакта ИК с этанолом краситель продолжал вымываться, что не позволяло использовать его иммобилизованные препараты для аналитических приложений. Напротив, приведенная в табл. 14 степень вымывания ПБ из пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, не изменялась даже после выдерживания пленки в течение суток не только в наиболее подходящем антирастворителе этаноле (табл. 7), но и в воде. Обратим внимание на то, что как и в случае растительных пероксидаз катионный краситель ПБ удерживается пленкой лучше, чем анионный.

Для сравнения *морфологии поверхности плёнок*, приготовленных с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ, с *иммобилизованными красителями ИК и ПБ* получили и изучили их СЭМ фотографии. Из рис. 59 видно, что поверхность пленки {целлюлоза–[BMIm][AcO]–ИК} отличается от поверхности аналогичной пленки без красителя (рис. 39) отчетливой периодической структурой. К сожалению, нам не удалось получить фотографию поверхности пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ИК} вследствие их сильного разогрева в напылительной камере при нанесении на пленку слоя металлического никеля.

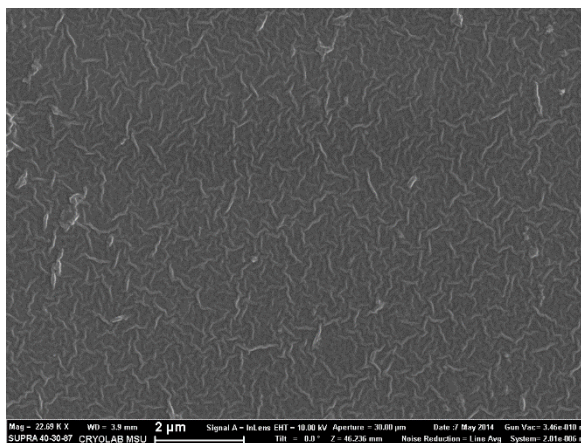


Рис. 59. СЭМ фотография поверхности пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ИК}, увеличение в 34250 раз.

На СЭМ фотографиях пленки с иммобилизованным ПБ (рис. 60) отсутствовали периодические структуры, характерные для иммобилизованного ИК. Наблюдались лишь отдельные неравномерно распределенные включения кристаллов красителя. Поскольку пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ПБ} были слабо окрашены и в отличие от пленок, приготовленных с помощью хлоридной ИЖ, не флуоресцировали, их СЭМ фотографии не делали.

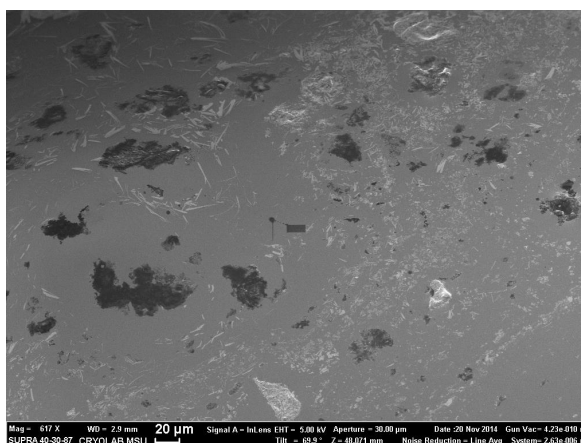


Рис. 60. СЭМ фотография пленок состава {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ}. Увеличение в 617 раз.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что пленки, приготовленные с использованием ацетатной ИЖ, не оправдали наших ожиданий в качестве носителей для синтетических красителей. Они оказались непригодны для иммобилизации в них ИК вследствие химических взаимодействий красителя с растворенным в ИЖ кислородом и целлюлозой, что приводило к ослаблению или полной потере оптических свойств анионного красителя ИК. Более того, при иммобилизации ИК в пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} и {целлюлоза-[BMIm][Cl]} краситель интенсивно вымывался из обоих целлюлозных материалов. Наиболее успешными оказались результаты, полученные при иммобилизации ПБ в пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]}. Нам удалось приготовить иммобилизованный препарат, из которого катионный краситель почти не вымывался и сохра-

нял способность поглощать и флуоресцировать в том же диапазоне длин волн, что и водный раствор ПБ.

Прежде чем окончательно отказаться от применения пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]} в химическом анализе, апробировали их в качестве сорбентов ИК и ПБ из водных растворов. Для этого пленку {целлюлоза-[BMIm][AcO]}, приготовленную по методике 1а, погружали в кювету (толщина поглощающего слоя 1 см), заполненную водным раствором красителя (объем 3.00 мл). Через определенные промежутки времени целлюлозную пленку вынимали из раствора пластиковым пинцетом, размещали на предметном стекле; последнее вставляли в кюветное отделение спектрофотометра и измеряли поглощение пленки относительно аналогичной целлюлозной пленки без красителя при длине волны его максимального поглощения. Затем измеряли поглощение раствора, в котором выдерживали пленку (рис. 61, 62). Далее пленку возвращали в раствор и через определенные промежутки времени повторяли описанные выше операции. По полученным данным строили зависимости поглощения пленки и раствора от времени выдерживания. Как видно из рис. 61 и 62, ИК быстрее и эффективнее сорбируется пленкой, чем ПБ. После 50-ти минутного выдерживания пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} в водном растворе ИК концентрация красителя в ней составляла половину от его концентрации в растворе. Рассчитанная емкость пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} по отношению к ИК через 3 ч была равна 23.2 мкг/см^2 , то есть в 7.7 раза превышала ее величину для ПБ (3 мкг/см^2). Отметим, что для пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} сорбция красителей была значительно ниже. В случае ИК емкость пленки была практически в 5 раз ниже и составляла не более 5 мкг/см^2 , а в случае ПБ степень сорбции составляла менее 3%, что не позволяло достоверно зарегистрировать изменения спектра поглощения раствора красителя.

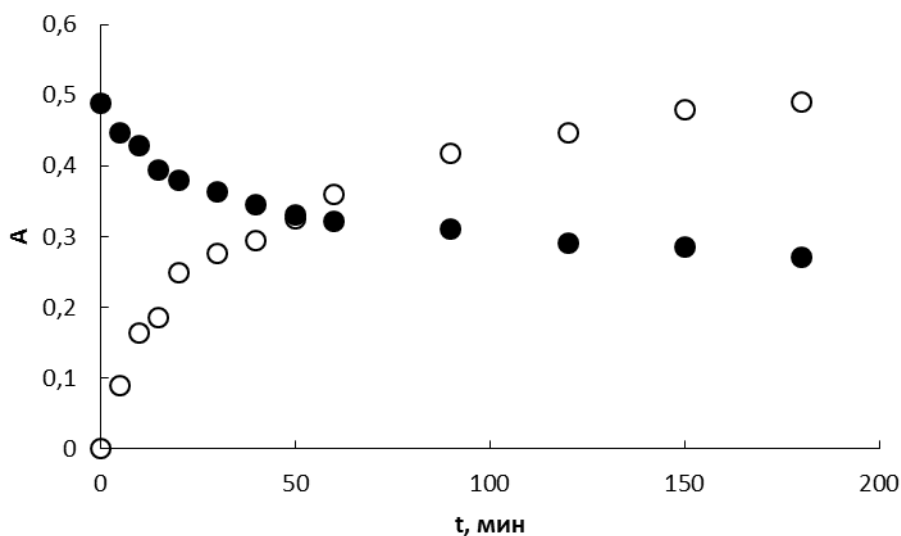


Рис. 61. Зависимости поглощения водного 30 мкМ раствора ИК (●) и пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} (○) от времени их контакта (раствор сравнения — вода; пленка сравнения — целлюлозная пленка без ИК, 611 нм).

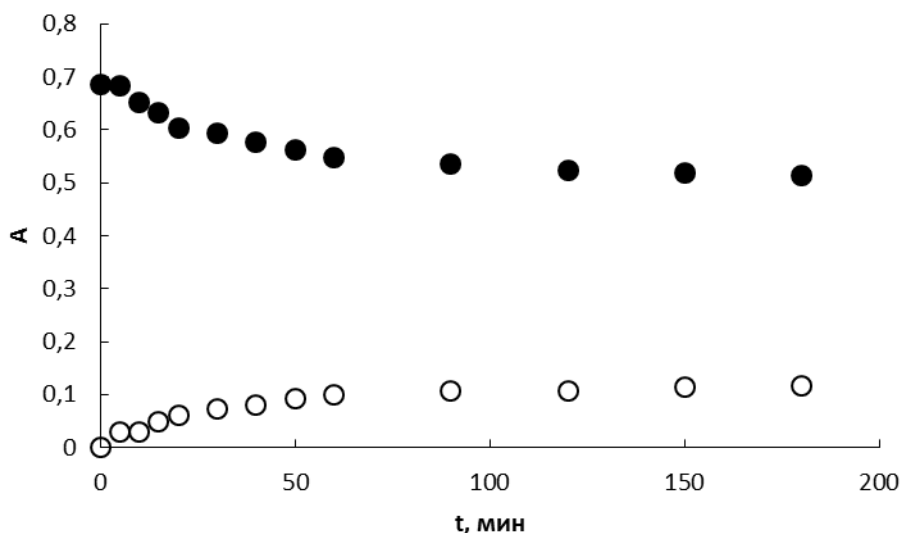


Рис. 62. Зависимости поглощения водного 30 мкМ раствора ПБ (●) и пленки состава {целлюлоза-[BMIm][AcO]} (○) от времени их контакта раствор сравнения — вода; пленка сравнения — целлюлозная пленка без ПБ, 555 нм).

Представлялось интересным выяснить, различаются ли оптические свойства красителя в растворе и при его сорбции пленками {целлюлоза-[BMIm][AcO]}, а также морфология поверхности пленки с сорбированным и иммобилизованным ИК (методика 1б). С этой целью зарегистрировали спектры поглощения пленки с сорбированным ИК (рис. 63), а также сделали СЭМ фотографии ее поверхности (рис. 64).

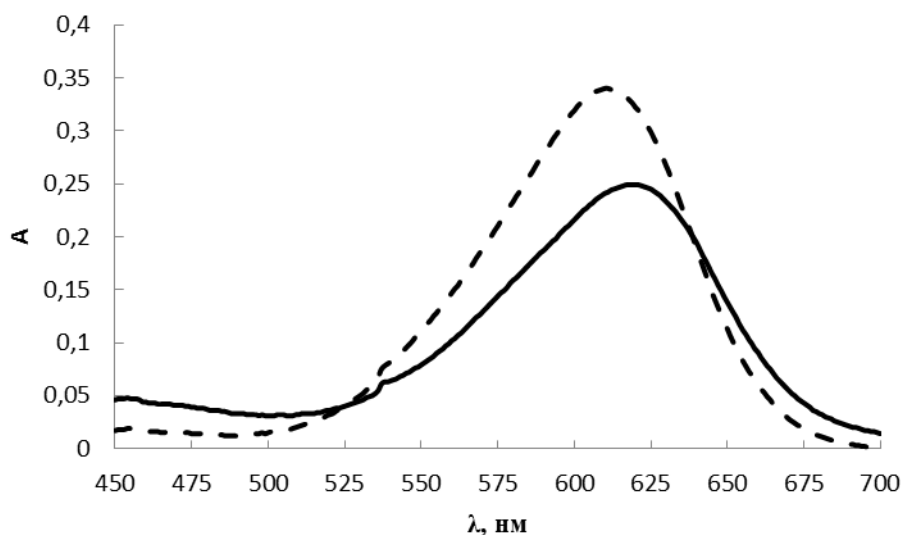


Рис. 63. Спектры поглощения пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} с сорбированным ИК (—) и 25 мкМ водного раствора красителя (- -); раствор сравнения — вода; пленка сравнения — целлюлозная пленка без красителя.

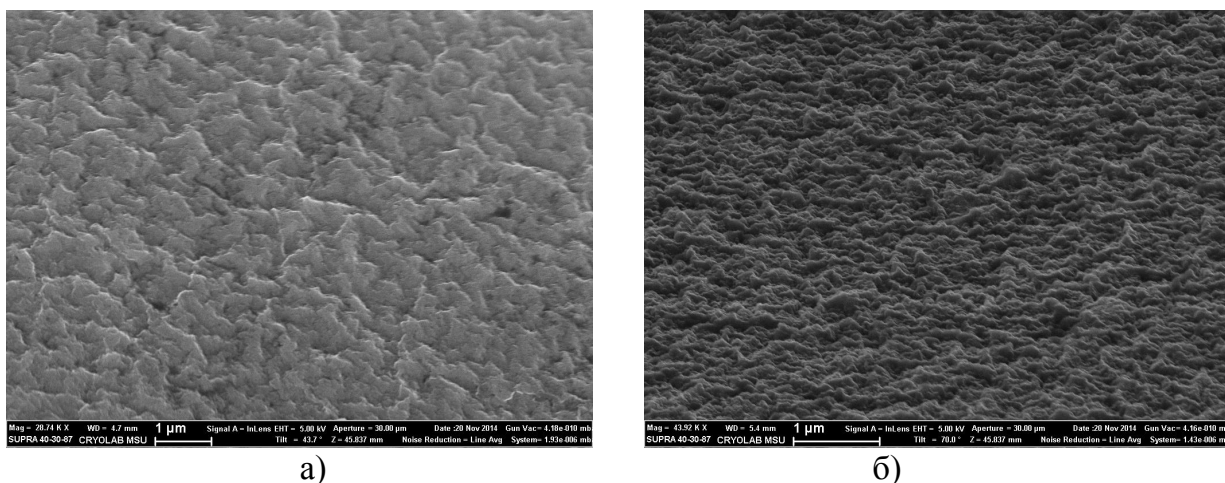


Рис. 64. СЭМ фотографии поверхности пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} с сорбированным ИК при увеличении в 28740 (а) и 43920 (б) раз.

Из рис. 63 видно, что спектры поглощения растворенного в воде ИК и сорбированного пленкой похожи, только максимум поглощения ИК в фазе пленки сдвинут по сравнению с таковым в водном растворе на 8 нм в длинноволновую область. Наблюдаемый bathochromный сдвиг может быть обусловлен присутствием остаточных количеств ацетатной ИЖ в пленке. Пленка {целлюлоза-[BMIm][AcO]} с сорбированным ИК, как и раствор красителя, окрашена в интенсивный синий цвет (рис. 65). Как видно из фотографии, пленка окрашена целиком, т. е. краситель из раствора сорбируется не только на поверхности пленки, но и во всем ее объеме. Полученные данные свидетельствуют о том, что при сорбции в пленку {целлюлоза-[BMIm][AcO]} ИК практически не меняет свои оптические свойства.

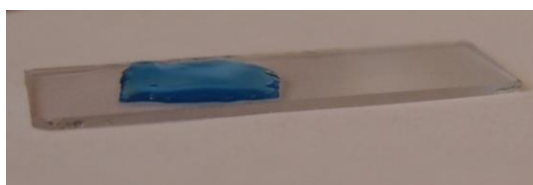


Рис. 65. Фотография пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} после сорбции ИК из его водного раствора в течение 1 ч (комнатная температура).

Однако морфология поверхности и структура пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]} с сорбированным (рис. 64) и иммобилизованным (рис. 59) ИК различались. На СЭМ фотографиях пленок с сорбированным красителем не наблюдались характерные для пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]-ИК} периодические структуры (рис. 59). Поверхность пленки с сорбированным ИК была больше похожа на поверхность целлюлозной пленки без красителя (рис. 39).

На рис. 66 приведены результаты изучения сорбционных свойств пленок двух видов по отношению к ИК. Из рисунка видно, что степень сорбции ИК пленками {целлюлоза-[BMIm][Cl]} не превышает 13%, однако уже через 2 ч выдерживания

пленки в растворе красителя он десорбируется. Напротив, степень сорбции ИК пленкой {целлюлоза-[BMIm][AcO]} достигает 71% через 6 ч пребывания в водном растворе ИК и даже через сутки пленка продолжает удерживать краситель. При обработке пленки 0.1 М раствором NaOH сорбированный ИК легко вымывался из нее, что позволяло использовать пленку по меньшей мере еще один раз без существенной потери в ее емкости.

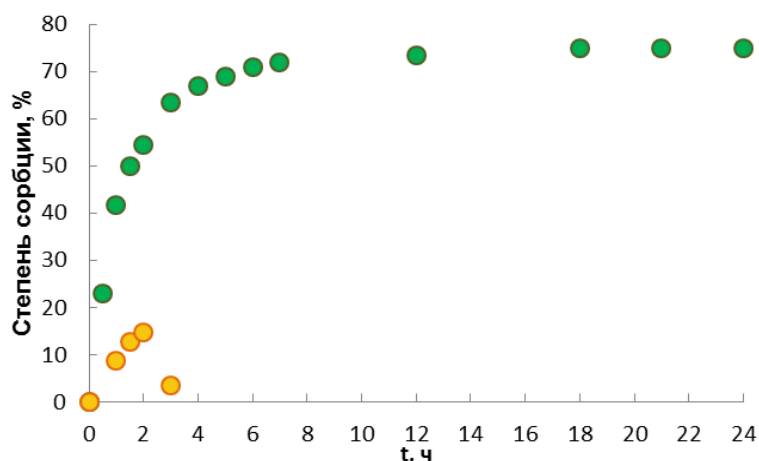


Рис. 66. Кинетика сорбции ИК из его водного 30 мкМ раствора пленками {целлюлоза-[BMIm][AcO]} и {целлюлоза-[BMIm][Cl]}.

Как обсуждено выше в гл. 4, для выделения ИК из его водных растворов используют хитин и хитозан (в виде мелкодисперсных порошков), а также хитозан, сшитый с глутаровым альдегидом [183, 184]. ИК сорбируется указанными сорбентами за 3 ч, наибольшая степень сорбции наблюдается в случае немодифицированного хитозана, его емкость по отношению к ИК составляет $(1.54 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ моль \times г⁻¹.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика получения хитозановых покрытий на стеклянной подложке [232]. Хитозановое покрытие получали путем равномерного распределения 200 мкл 1%-ного раствора хитозана в ледяной уксусной кислоте по предметному стеклу размером 1.2 \times 2.5 см с последующим высушиванием в течение суток при комнатной температуре [232]. Мы апробировали хитозановые покрытия для сорбции ИК и полученные результаты сравнили с результатами для пленок {целлюлоза-[BMIm][AcO]}.

Работу проводили следующим образом. В кювету с толщиной поглощающего слоя 1 см наливали 3.00 мл водного раствора ИК, предметное стекло с хитозановым покрытием располагали в кювете под углом 45° и выдерживали его в растворе в течение 1 ч. Каждые 15 мин в течение этого часа стекло вынимали из раствора, измеряли поглощение раствора красителя и рассчитывали величину степени сорбции по формуле (12), гл. 3.4. Установили, что через 1 ч содержание ИК на 1 см² пленки составляет 14.8 мкг, что на 8 мкг меньше содержания красителя, сорбированного пленкой {целлюлоза-[BMIm][AcO]}. Отметим, что хитозановым покрытием ИК сорбируется быстрее, чем целлюлозной пленкой. Так, наибольшая степень

сорбции хитозаном (58%) достигается уже через 10 мин после помещения стеклянной пластинки с хитозановым покрытием в раствор красителя, в то время как близкая по величине степень сорбции ИК пленками {целлюлоза-[BMIm][AcO]} – только через 1.5 ч. Тем не менее максимальная степень сорбции ИК целлюлозными пленками через 8 ч составляет 73%, что в 1.5 раза превышает ее максимальное значение для хитозанового покрытия через 1 ч. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенные нами пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} могут служить сорбентом для ИК, хотя они уступают по сорбционным свойствам хитозановому препарату [232], зато превосходят известные из литературы сорбенты ИК на основе модифицированного хитозана [184] и сравнимы с хитином [183]. Важно отметить, что целлюлозный материал возможно использовать повторно без существенной потери его прочности и способности к сорбции. Напротив, хитозановые покрытия при попытке отмыть сорбированный ИК водой, 0.1 М растворами HCl или NaOH разрушались.

Для повышения сорбционной способности целлюлозных пленок по отношению к красителям получили пленки с включенными в них ПАВ, катионным ЦТАБ и анионным ДДС (методика 1г). Мы предположили, что сорбционные свойства пленок можно повысить за счет образования ионных пар между противоположными по заряду молекулами ПАВ в составе пленки и красителя в растворе, в который погружена пленка. Мы ожидали, главным образом, повышения степени сорбции для пар: катионный ПАВ (ЦТАБ) – анионный краситель (ИК) и анионный ПАВ (ДДС) – катионный краситель (ПБ). Работу проводили следующим образом. Кювету с толщиной поглощающего слоя 1 см заполняли водным раствором соответствующего красителя (объем 3.0 мл), затем с помощью пластикового пинцета в раствор аккуратно помещали целлюлозную пленку, приготовленную по методике 1г. Пленка, благодаря своей плотности, располагалась в толще раствора практически вертикально, не прилипала к стенкам, только одним углом едва касалась дна кюветы. Через определенные промежутки времени пленку вынимали из раствора красителя, временно располагали на предметном стекле, измеряли поглощение раствора, после чего пленку снова возвращали в раствор. Такую операцию проводили несколько раз. Степень сорбции красителя целлюлозными пленками рассчитывали по формуле (12), гл. 3.4. Зависимости от времени степени сорбции ИК и ПБ пленками {целлюлоза-[BMIm][AcO]} и {целлюлоза-[BMIm][Cl]} с включенными в них ПАВ представлены на рис. 67 и 68 соответственно.

Полученные результаты показывают, что включение ПАВ в состав целлюлозных пленок обоих видов, к сожалению, не приводит к повышению степени сорбции красителей по сравнению с ее величиной в отсутствие ПАВ (рис. 66, 67, 68). Только в случае катионного ПБ при использовании пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ДДС} степень сорбции возрастает на 3% по сравнению с таковой для аналогичных пленок без ПАВ и при этом составляет всего 6 % (рис. 68б). Вероятно, молекулы

ПАВ закрывают поры пленок, вследствие чего их сорбционная способность снижается. Так, например, пленка {целлюлоза–[BMIm][AcO]} без ПАВ за одно и то же время сорбирует примерно в 2 раза больше ИК из его водного раствора той же концентрации (рис. 62,68), чем ПАВ-содержащая пленка (рис. 67а). Для пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПАВ} наблюдается вымывание ИК уже после 10-ти минутного выдерживания пленки в растворе красителя (рис. 67б), в то время как для пленки без ПАВ – не ранее, чем через 2 ч (рис. 66). Целлюлозные пленки с включенными в них катионным и анионным ПАВ оказались менее прочными, чем пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, при этом особенно ломкими они были в случае ЦТАБ. Степени сорбции обоих красителей пленками {целлюлоза–[BMIm][AcO]} выше таковых значений для пленок, приготовленных с помощью хлоридной ИЖ, при этом мало зависят от природы ПАВ в составе пленки (рис. 67а и 68а). Несмотря на то, что нам не удалось повысить степень сорбции синтетических красителей в целлюлозных пленках, важным итогом проведенного исследования является выявленная возможность иммобилизации анионного ДДС в пленку {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и средство к ней ПБ. Напомним, что в дальнейшем планировалось изучение аналитических возможностей системы {ПБ–Mn(II)–ДДС} для определения АМ (гл. 4).

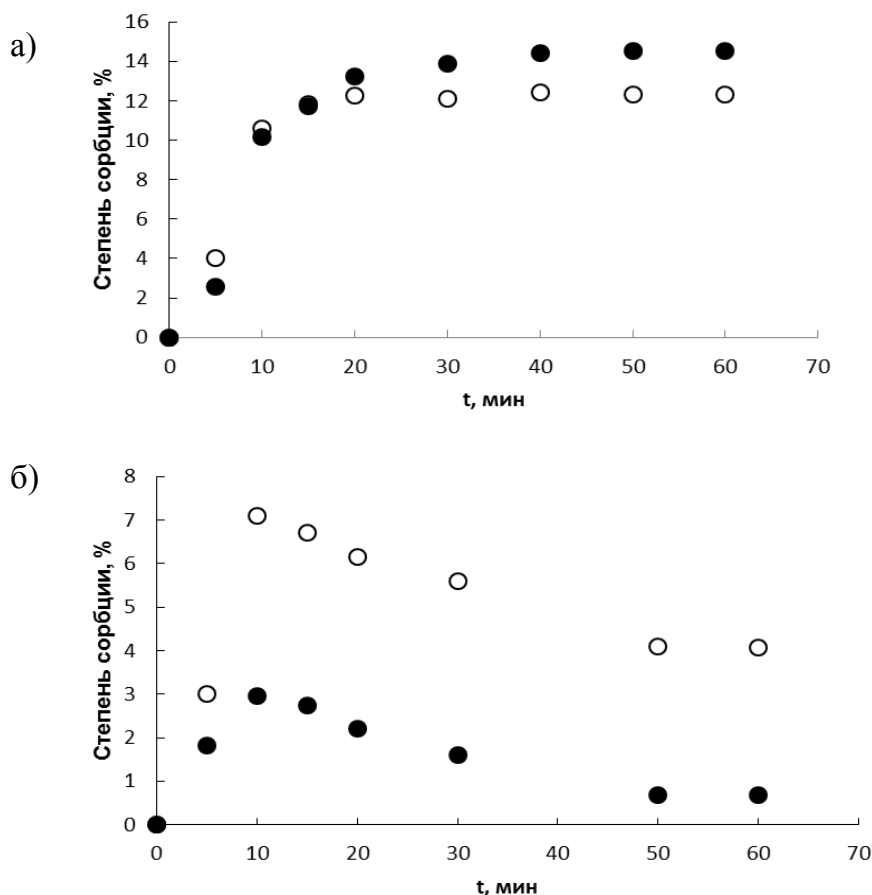


Рис. 67. Кинетика сорбции ИК из его водного 30 мкМ раствора пленками {целлюлоза–[BMIm][AcO]} (а) и {целлюлоза–[BMIm][Cl]} (б) с включенными в них ЦТАБ (●) и ДДС (○).

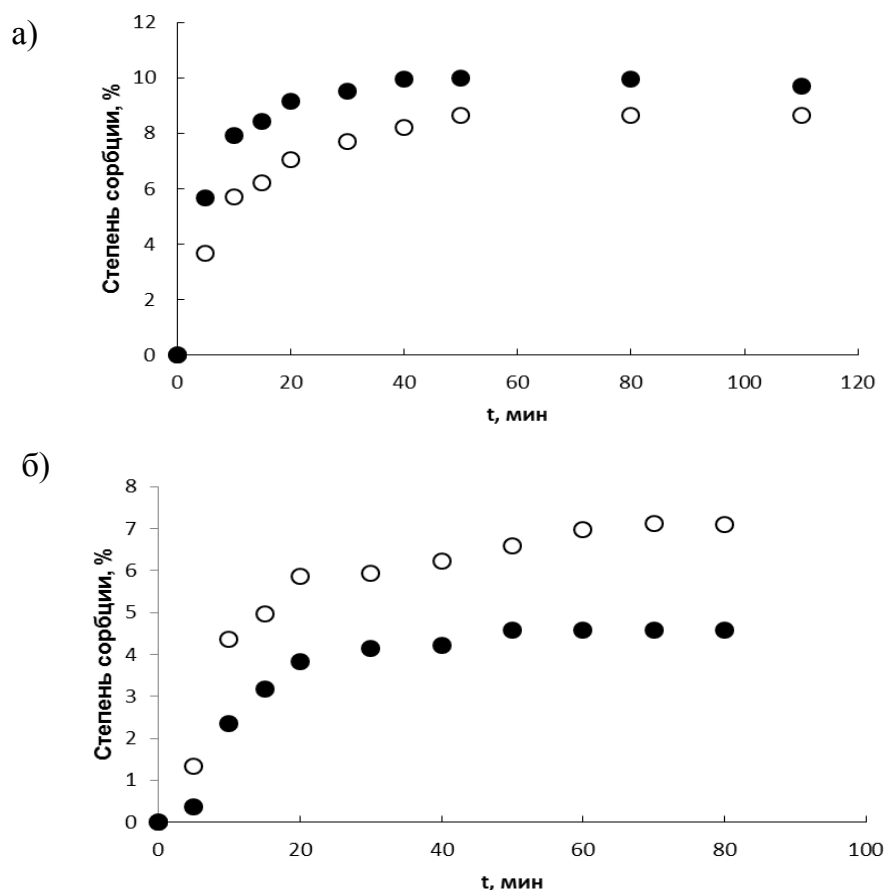


Рис. 68. Кинетика сорбции ПБ из его водного 30 мкМ раствора пленками {целлюлоза-[VMIm][AcO]} (а) и {целлюлоза-[VMIm][Cl]} (б) с включенными в них ЦТАБ (●) и ДДС (○).

Поскольку пленки состава {целлюлоза-[VMIm][AcO]} оказались хорошими сорбентами для ИК, синтетического производного природного красителя индиго, изучили сорбционные свойства по отношению к другим, но уже природным пищевым красителям различной природы (табл. 14).

Таблица 14. Некоторые свойства изученных природных красителей

Название (Е номер)	Формула	Цвет	λ , нм	$pK_{a, i}$
Куркумин (E100)		Ярко желтый	435	7.8, 8.5, 9.0
Кармин (E120)		Ярко красный	530	2.81, 5.43, 8.10
β -Каротин (E160a)		Оранжевый	451	14.43

На рис. 69 и 70 соответственно приведены зависимости степени сорбции природных красителей пленками {целлюлоза-[BMIm][AcO]} от pH и температуры их водных растворов.

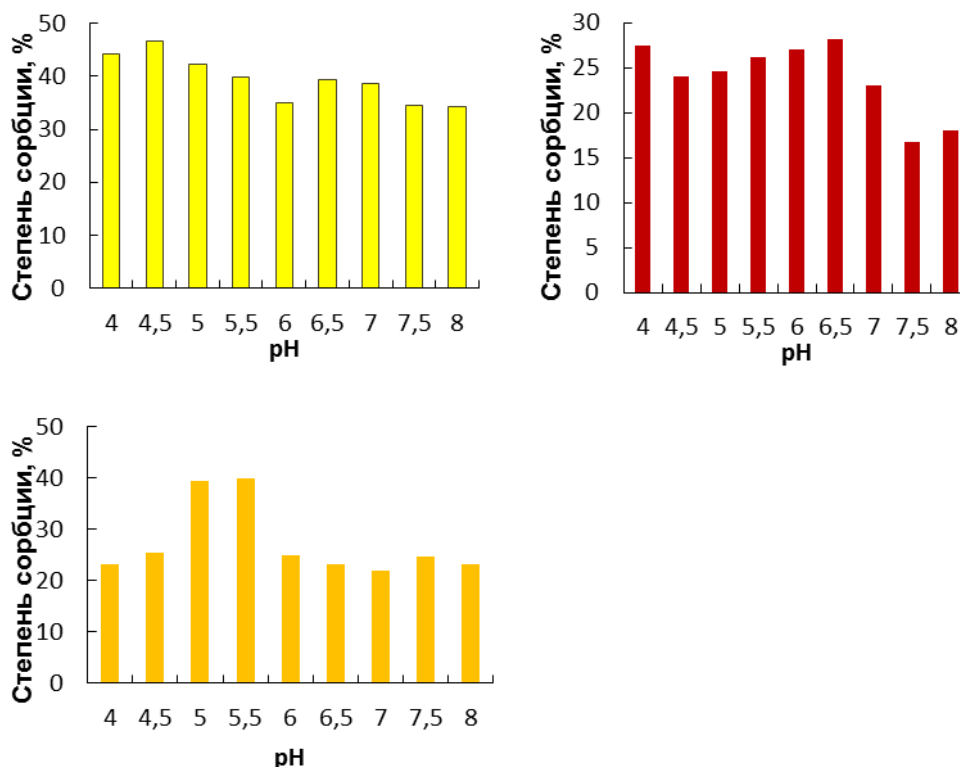


Рис. 69. Зависимости степени сорбции **куркумина**, **кармина** и **β-каротина** пленкой {целлюлоза-[BMIm][AcO]} от pH водных растворов красителей (время сорбции – 24 ч, комнатная температура).

Как видно из диаграмм рис. 69, при комнатной температуре зависимости степени сорбции куркумина и кармина от pH не имеют выраженных максимумов, по-видимому, вследствие одновременного присутствия в растворе двух-трех ионных форм из-за небольших различий в величинах их ступенчатых констант кислотности (табл. 15). Напротив, в случае β-каротина наблюдается отчетливый максимум при pH 5.0–5.5. Для дальнейших исследований в качестве наиболее подходящих значений pH выбрали 4.5; 6.5 и 5.5 для куркумина, кармина и β-каротина соответственно, при которых степень сорбции была наибольшей в изученном интервале pH.

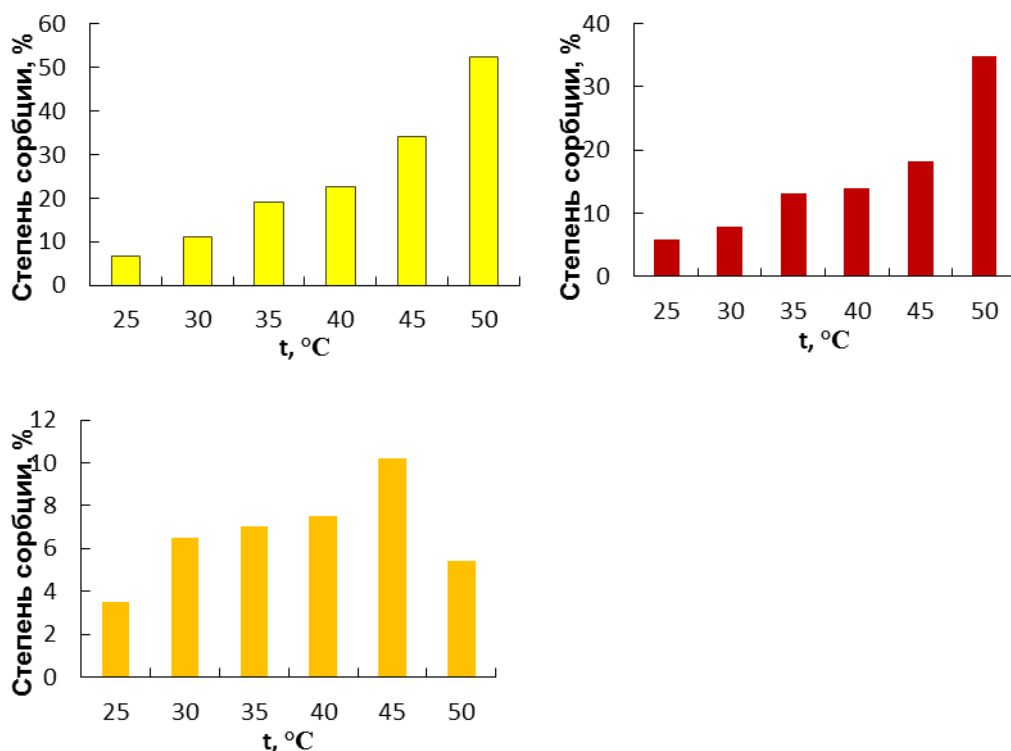


Рис. 70. Зависимости степени сорбции **куркумина**, **кармина** и **β-каротина** пленкой {целлюлоза–[BMIm][AcO]} при pH 4.5, 6.5 и 5.5 от температуры их водных растворов. Время сорбции – 3 ч.

Как и ожидали, с ростом температуры степень сорбции кармина и куркумина пленкой {целлюлоза–[BMIm][AcO]} при выбранных значениях pH возрастала и только для β-каротина немного уменьшалась при 50°C по сравнению с ее величиной при 45°C. Необычное поведение β-каротина, скорее всего, связано со структурой его молекулы, которая отличается большим по величине отношением длины к ширине. Наибольший процент сорбции куркумина и кармина наблюдался при 50°C, а β-каротина – при 45°C. Как при комнатной, так и при повышенной температурах водного раствора степень сорбции возрастала в ряду ($\log P$ [233]): β-каротин (17.62) < кармин (0.97) < куркумин (3.29) (рис. 71). Лучше других сорбировался куркумин – самый неполярный из изученных природных красителей (рис. 68, 69), однако даже его степень сорбции при 50°C не превышала 53%. На рис. 72 представлены фотографии пленок {целлюлоза–[BMIm][AcO]} с сорбированными красителями как наглядные иллюстрации сорбционных свойств предложенного целлюлозного материала.

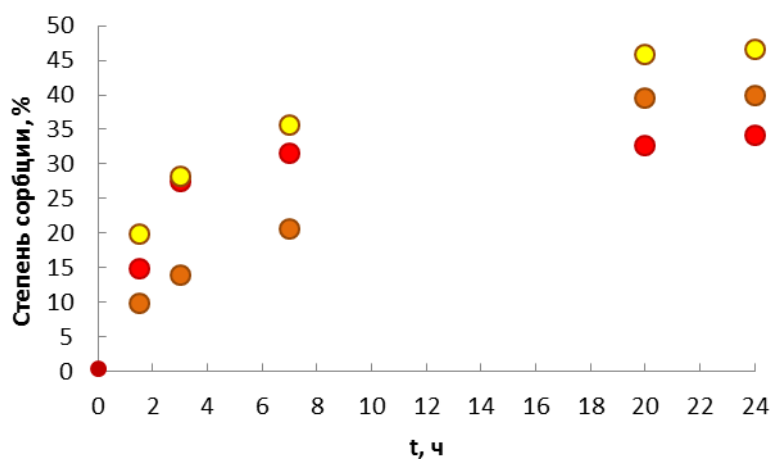


Рис. 71. Кинетические кривые сорбции **куркумина**, **кармина** и **β-каротина** из их растворов пленками {целлюлоза–[ВМІm][AcO]} (рН 4.5; 6.5 и 5.5 соответственно, комнатная температура).



Рис. 72. Фотографии пленок состава {целлюлоза–[ВМІm][AcO]} с сорбированными **куркумином**, **кармином** и **β-каротином** (слева направо); рН 4.5; 6.5 и 5.5 соответственно, комнатная температура. Время сорбции – 24 ч.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наиболее перспективными для дальнейших исследований, а именно для применения в качестве чувствительного элемента флуоресцентной сенсорной системы для определения АМ (гл. 4) являются пленки {целлюлоза–[ВМІm][Cl]} с иммобилизованным в них катионным красителем ПБ. Такие пленки прочные, гибкие, оптически прозрачные, из них ПБ мало вымывается и сохраняет свои оптические свойства. Пленки {целлюлоза–[ВМІm][AcO]} могут представлять интерес как новый материал для сорбции синтетических и пищевых красителей из их водных растворов.

6.3. Целлюлозные пленки с иммобилизованными флуоресцирующими комплексами {Eu(III)–дипиколиновая кислота} и {Eu(III)–тетрациклин}

Возможность применения пленок {целлюлоза–ИЖ} в качестве матрицы для иммобилизации флуоресцирующих комплексов изучили на примере дипиколината европия(III), Eu(ДПК)₃, и комплекса {Eu(III)–тетрациклин}. Флуоресценция указанных комплексов возникает в результате переноса энергии электронного возбуждения от доноров или сенсбилизаторов энергии (в нашем случае ДПК и ТЦ) к

центру свечения (иону Eu^{3+}) [46, 234, 235]. Молекулы органического лиганда при поглощении кванта света переходят в возбужденное синглетное состояние, и только часть молекул – в триплетное. Если энергия триплетного уровня органического лиганда больше энергии резонансного уровня центра свечения, лиганд передает энергию электронного возбуждения на резонансный уровень иона металла, в результате чего лантаноид испускает характерный для него квант флуоресценции, а сигнал флуоресценции европия возрастает в 10^4 – 10^5 раз [235]. Такое явление называется сенсibilizированной люминесценцией.

Как видно из данных табл. 15, для комплексов европия(III) с лигандами (ДПК и ТЦ) как в растворе, так и в составе пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, наблюдаются все те же характерные для лантаноида электронные переходы, однако количество энергии, переданной лигандом и, как результат, испущенной ионом металла, возрастает. Заметим, что в спектре флуоресценции комплекса $\text{Eu}(\text{ДПК})_3$, иммобилизованного в целлюлозную пленку, полоса, отвечающая запрещенному переходу ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$, отсутствует. В целях химического анализа флуоресцентный сигнал комплексов хелатов европия(III) обычно регистрируют при 616–617 нм или при 616–617, и 595 нм и рассчитывают отношение интенсивностей [235].

Таблица 15. Длины волн возбуждения и флуоресценции европия(III) и его комплексов с органическими лигандами

Флуорофор (раствор/пленка)	$\lambda_{\text{возб.}}$, нм	$\lambda_{\text{фл.}}$, нм (электронный переход)	Литература
EuCl_3 (раствор)	279	617 (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) 595 (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$) 575–581 (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$)	[235]
$\text{Eu}(\text{ДПК})_3$ (пленка {целлюлоза–[BMIm][Cl]})	273	617 595	[46]
Eu –ТЦ (раствор)	390 или 406	616–617 595 581	[197, 199]

Обсудим последовательно результаты, полученные нами при изучении флуоресцентных свойств пленок {целлюлоза–ИЖ} с включенными в них комплексами европия(III) с ДПК и ТЦ. Поскольку чувствительность флуоресцентного анализа зависит от величины фонового сигнала, сначала остановимся на результатах измерения флуоресцентного сигнала целлюлозных пленок в отсутствие комплексов европия(III). Во всех случаях флуоресцентный сигнал целлюлозных пленок измеряли так, как описано в методике 6.

Флуоресцентные сигналы пленок {целлюлоза–ИЖ}, не содержащих комплексы $\text{Eu}(\text{ДПК})_3$ и $\text{Eu}(\text{ТЦ})_3$. Целлюлозные пленки, приготовленные по методике 1а, облу-

чали светом с $\lambda=279$ нм, которая соответствовала длине волны возбуждения Eu^{3+} . Из рис. 73 видно, что в области 300–500 нм слабо флуоресцируют обе пленки - {целлюлоза-[BMIm][Cl]} и {целлюлоза-[BMIm][AcO]}, что обусловлено, вероятно, присутствием в их составе остаточных количеств ИЖ. При этом интенсивность сигнала пленок, приготовленных с использованием ацетатной ИЖ, немного выше, чем в случае применения хлоридной ИЖ. По-видимому, пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]} даже после промывания этанолом удерживают бóльшие остаточные количества ИЖ из-за более плотной структуры целлюлозного материала. Появление в спектрах флуоресценции максимумов при 558 нм вызвано использованием в качестве монохроматора флуориметра дифракционной решетки, которая дает дополнительные полосы с длинами волн, равными $\lambda/2$ и 2λ , где λ – установленная длина волны. В интересующей нас области спектра, в диапазоне длин волн 550–700 нм, в которой можно ожидать максимумов флуоресценции комплексов (табл. 16), наблюдается фоновый сигнал, который для обеих целлюлозных пленок не превышает 4 отн. ед.

Иммобилизация комплекса $\text{Eu}(\text{ДПК})_3$. Целлюлозные пленки с иммобилизованным $\text{Eu}(\text{ДПК})_3$ получали по методике 1д. При этом содержание комплекса в них варьировали от 0.2 до 0.7 мг. При выборе указанных содержаний дипиколината европия(III) опирались на данные работы [46]. В спектрах флуоресценции целлюлозных пленок с иммобилизованным комплексом $\text{Eu}(\text{ДПК})_3$ (рис. 74) вблизи 600 нм отчетливо видны два максимума: основной интенсивный при 617 нм и более слабый при 595 нм, которые отвечают электронным переходам ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ и ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ соответственно (табл. 16). Третий максимум (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$), едва просматривается при 579 нм.

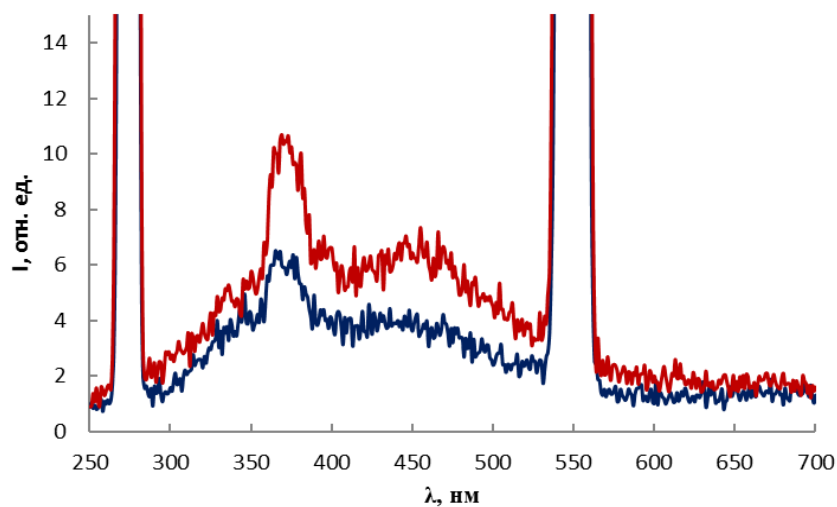


Рис. 73. Спектры флуоресценции пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]} и {целлюлоза-[BMIm][AcO]}; $\lambda_{\text{возб.}}=279$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм.

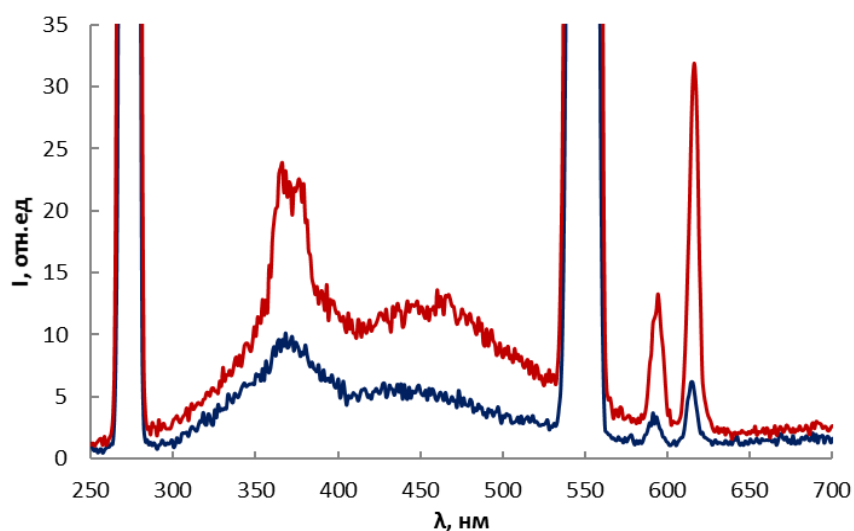


Рис. 74. Спектры флуоресценции пленок состава {целлюлоза-[BMIm][Cl]-Eu(DPK)₃} и {целлюлоза-[BMIm][AcO]-Eu(DPK)₃} (содержание комплекса – 0.2 мг; $\lambda_{\text{возб.}}=279$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм).

При одинаковом (0.2 мг) содержании комплекса Eu(DPK)₃ в материале пленка {целлюлоза-[BMIm][AcO]-Eu(DPK)₃} флуоресцирует в 4.8 раз интенсивнее, чем аналогичная пленка, полученная с помощью хлоридной ИЖ. Более того, при повышении содержания комплекса с 0.2 до 0.7 мг (с 0.02 до 0.06% масс.) пленки {целлюлоза-[BMIm][AcO]-Eu(DPK)₃} все еще флуоресцировали, их сигнал увеличился на 50 отн. ед., а сигнал пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-Eu(DPK)₃} был близок к фоновому. Таким образом, эффект концентрационного тушения в пленках двух видов наблюдался при разных концентрациях хелата. В литературе [236] отмечена зависимость интенсивности сигнала флуорофоров от природы аниона ряда гидрофильных и гидрофобных ИЖ на основе катиона имидазолия, но, к сожалению, не для используемых нами ИЖ. Мы полагаем, что аналогичная ситуация может наблюдаться и в нашем случае.

Отметим важную особенность приготовления целлюлозных пленок с иммобилизованным пиколином европия(III). От избыточных количеств ИЖ избавлялись промыванием обеих целлюлозных пленок этанолом, поскольку при использовании воды в качестве промывной жидкости в спектрах флуоресценции отсутствовали характерные максимумы флуоресценции пиколината европия (табл. 16) вследствие его хорошей растворимости в воде.

Иммобилизация комплекса {Eu(III)-ТЦ}. Пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]-Eu(III)-ТЦ} получали по методике 1е. От приготовления пленок с использованием ацетатной ИЖ в этом эксперименте вынуждены были отказаться, поскольку установили, что при растворении в [BMIm][AcO] в отсутствие целлюлозы ТЦ быстро окрашивался в бурый цвет. Появление бурой окраски раствора вместо характерной желтой свидетельствовало о эимеризации ТЦ, то есть о его превращении в менее

активную форму, 4-эпитетрациклин [237]. Таким образом, ацетатная ИЖ оказалась химически активной по отношению к ТЦ, лиганду-сенсбилизатору. Как и при иммобилизации растительных пероксидаз и синтетических красителей, флуоресцирующий комплекс {Eu(III)–ТЦ} получали непосредственно в пластиковой микропробирке добавлением тщательно перемешанных навесок хлорида европия(III) и ТЦ (в мольном соотношении 1:3) к смеси целлюлозы в хлоридной ИЖ. Затем полученную смесь снова перемешивали и нагревали до 85°C (табл. 7). Далее действовали так, как описано в методике 1а.

На рис. 75 представлен спектр флуоресценции пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–Eu(III)–ТЦ}, полученный при ее возбуждении светом с длиной волны 390 нм, соответствующей максимуму поглощения комплекса. В спектре виден отчетливый и интенсивный максимум при 617 нм, характерный для комплекса в водном растворе. Однако более детальное сравнение полученного спектра флуоресценции (рис. 75) со спектром флуоресценции водного раствора комплекса {Eu(III)–ТЦ} (рис. 76) показало, что характер спектра пленки с иммобилизованным комплексом европия (III) все же другой. В спектре отсутствуют второй и третий максимумы при 595 и 581 нм, то есть тонкая структура спектра пропадает. Мы полагаем, что исчезновение этих максимумов может быть связано, во-первых, с влиянием на сигнал ИЖ, а, во-вторых, с другими по сравнению с водным раствором условиями получения комплекса (нагревание в процессе получения раствора целлюлозы в ИЖ, другая кислотность среды, вызванная присутствием ионного растворителя, и т.п.). Спектры на рис. 76а наглядно подтверждают литературные данные о том, что связывание европия(III) в комплекс с ТЦ приводит к повышению интенсивности флуоресценции в 2.5 раза (то есть наблюдается сенсбилизированная флуоресценция). При этом полосы испускания комплекса и иона европия (III) не перекрываются, а ТЦ в аналитическом интервале длин волн не флуоресцирует.

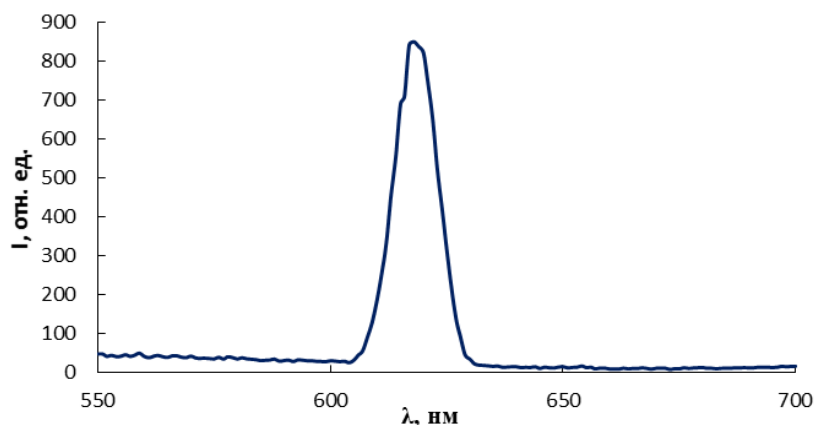


Рис. 75. Спектр флуоресценции пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–Eu(III)–ТЦ}. Содержание комплекса – 0.2 мг; $\lambda_{\text{возб.}}=390$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм.

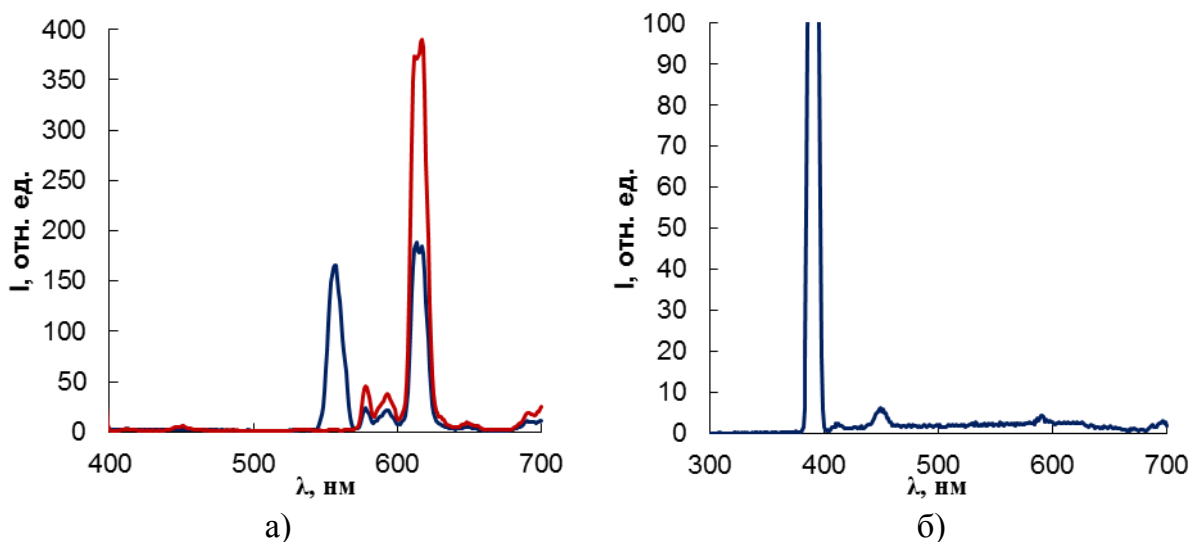


Рис. 76. Спектры флуоресценции растворов EuCl_3 ($\lambda_{\text{возб.}}=279$ нм), $\{\text{Eu-TTC}\}$ ($\lambda_{\text{возб.}} = 390$ нм) (а), а также раствора ТЦ ($\lambda_{\text{возб.}} = 390$ нм) (б). Концентрации, мкМ: Eu(III) – 85, ТЦ – 255, стехиометрия комплекса $\{\text{Eu-TTC}\}$ — 1:3; МОПС буферный раствор, рН 6.9; ширины входной и выходной щели – 5 нм.

Сопоставление интенсивностей флуоресценции пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с иммобилизованными комплексами Eu(ДПК)_3 и $\{\text{Eu(III)-TTC}\}$ при одинаковом их содержании (0.2 мг) показало, что сигнал комплекса с ТЦ при 617 нм превышает таковой для дипиколината европия(III) в 26 раз. Пленка {целлюлоза–[BMIm][AcO]– Eu(ДПК)_3 } даже при содержании комплекса равном 0.7 мг флуоресцирует в 10 раз слабее пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]– Eu(III)-TTC }, в которой содержание флуорофора 0.2 мг. Полученные результаты указывают на перспективность использования наиболее интенсивно флуоресцирующих пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]– Eu(III)-TTC } для определения артемизинина и, особенно БР, как потенциального тушителя флуоресценции комплекса европия(III) с ТЦ.

Применение целлюлозных пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]– Eu(III)-TTC } для определения АМ и БР. Прежде чем приступить к изучению влияния АМ и БР на интенсивность флуоресценции комплекса $\{\text{Eu(III)-TTC}\}$, закрепленного нековалентно в пленке {целлюлоза–[BMIm][Cl]}, исследовали характер действия каждого целевого соединения на сигнал комплекса в растворе.

Действие АМ в индикаторной системе $\{\text{Eu(III)-TTC}\}$. Комплекс $\{\text{Eu(III)-TTC}\}$ широко используют в качестве флуоресцирующего реагента для определения пероксида водорода [196, 197]. Методика основана на повышении сигнала флуоресценции двойного комплекса $\{\text{Eu(III)-TTC}\}$ в буферном растворе МОПС с рН 6.9 за счет образования тройного комплекса $\{\text{Eu(III)-TTC-H}_2\text{O}_2\}$ ($\lambda_{\text{возб.}} = 406$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 617$ нм). Интенсивность флуоресценции возрастает пропорционально концентрации пероксида водорода при условии соблюдения стехиометрии комплекса Eu(III):TTC равной 3:1 [238]. На рис. 77 (кривые 1 и 2) приведены спектры флуоресценции, по-

лученные нами при воспроизведении результатов работы [196] с H_2O_2 концентрации 10 мкМ, которые хорошо согласуются с литературными данными. Комплекс $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ}\}$ получали по методике 7. Однако при введении в индикаторную систему вместо пероксида водорода раствора АМ сигнал комплекса $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ}\}$ не изменялся, то есть определять АМ с использованием такого подхода даже в растворе невозможно, по-видимому, вследствие стерических затруднений при образовании тройного комплекса $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ-АМ}\}$.

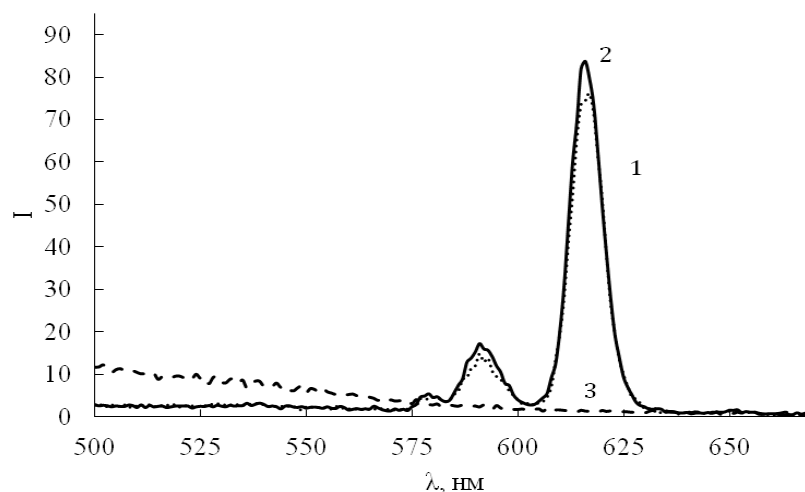


Рис. 77. Спектры флуоресценции системы $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ}\}$ в отсутствие (1) и в присутствии (2) H_2O_2 , (3) ДАБКО. Концентрации: EuCl_3 – 21 мкМ (1–3), ТЦ – 7 мкМ (1–3), H_2O_2 – 10 мкМ (2), ДАБКО – 0.5 М (3) (МОПС буферный раствор, pH 6.9; $\lambda_{\text{возб.}} = 406$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм).

Мы апробировали еще один подход к определению АМ с использованием комплекса $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ}\}$. Этот подход заключался в предварительном кислотном разложении эндопероксида, в результате которого выделялся пероксид водорода (гл. 2), с последующим «проявлением» последнего с помощью комплекса $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ}\}$. Для сочетания реакций разложения АМ 2.5М раствором соляной кислоты, условия которого были установлены ранее [219], и образования комплекса $\{\text{Eu}(\text{III})\text{-ТЦ-H}_2\text{O}_2\}$ требовалось нейтрализовать реакционный раствор. Для этого выбрали сильное органическое основание ДАБКО (рис. 78), $\text{pK}_{\text{a},1} = 8.82$ [239], которое хорошо растворяется в воде и, в отличие от третичных аминов, не дымит на воздухе. Возможность протекания побочной реакции окисления пероксидом водорода третичного азота в молекуле ДАБКО до соответствующего N-оксида, характерной для всех азотистых оснований, была невелика вследствие малой концентрации окислителя.



Рис. 78. Структурная формула ДАБКО.

Мы ожидали, что применение ДАБКО, с одной стороны, позволит создать в индикаторной системе нужную кислотность (рН 6.9), а с другой стороны, не будет тушить флуоресценцию комплексов $\{Eu(III)-TЦ\}$ и $\{Eu(III)-TЦ-H_2O_2\}$ подобно тому, как это происходит в присутствии ионов щелочных металлов и аммония, ацетат-, карбонат-, гидрокарбонат- и фосфат-ионов [197]. Для достижения рН равного 6.9 в реакционный раствор через 5 мин после проведения реакции разложения АМ 2.5М HCl вводили 700 мкл 2М раствора ДАБКО. Полученный раствор перемешивали и добавляли к нему 1680 мкл буферного раствора МОПС с рН 6.9 и раствор комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$, полученный по методике 7.

При введении рассчитанного количества ДАБКО рН реакционного раствора (АМ+HCl) соответствовал 6.9, однако характерная желтая окраска комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$ исчезала и, как результат, флуоресценция не наблюдалась (рис. 77, кривая 3). Аналогичная ситуация возникала не только в присутствии, но и в отсутствие как АМ, так и H_2O_2 . По-видимому, ДАБКО, как бидентатный лиганд, связывает ионы $Eu(III)$ в комплекс, и при использованной нами довольно большой его концентрации (0.5 М) тушит флуоресценцию $\{Eu(III)-TЦ\}$. В литературе имеется только одна работа [196], в которой флуоресценцию тройного комплекса изучали в присутствии ДАБКО. Однако концентрация основания в системе была в 40 раз меньше той, что использовали мы, поэтому тушение не наблюдалось.

Полученные результаты, к сожалению, свидетельствуют о невозможности применения индикаторной системы $\{Eu(III)-TЦ\}$ для определения АМ в растворе, а, следовательно, и в целлюлозной пленке.

Действие БР в индикаторной системе $\{Eu(III)-TЦ\}$. На первом этапе исследования воспроизвели эффект тушения флуоресценции комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$ билирубином в 0.1 М *трис*-HCl буферном растворе с рН 7.1 в соответствии с методикой, приведенной в работе [199] ($\lambda_{возб.} = 390$ нм, время реакции 15 мин; ширины входной и выходной щели – 5 нм). Следует сразу пояснить, что уменьшение флуоресценции при действии пигмента, по мнению авторов [199], связано с замещением молекулы ТЦ в комплексе $\{Eu(III)-TЦ\}$ на молекулу БР (рис. 22). Соотношение концентраций европия(III) и ТЦ в системе составляет 3.3 : 1, стехиометрия комплекса не установлена.

При воспроизведении эксперимента получили уравнение градуировочной зависимости интенсивности флуоресценции комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$ от концентрации БР: $y=0.9959x + 10.488$, $x - c \times 10^7$ М, $r = 0.9885$, которое отличалось от уравнения $y=1.3709x + 29.68554$, $x - c \times 10^7$ М, $r = 0.994$, приведенного в работе [199], более низкими значениями крутизны и фонового сигнала. При выяснении причин расхождения результатов определения БР в модельных растворах нами и авторами работы [199] мы обратили внимание на некоторые недостатки предложенной ими методики. Так, авторы не учитывали контрольный опыт, хотя раствор БР был приготовлен в щелочи, которая согласно литературным данным [235, 240], гасит флуоресценцию комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$. Более того, реакционный раствор разбавляли не *трис*-НСI буферным раствором, а водой, что как мы показали, приводит к сдвигу заявленного значения рН на 0.2 ед. в сторону более низких значений. С учетом флуоресценции контрольного опыта и при разбавлении реакционного раствора не водой, а буферным раствором (методика 8) мы установили, что через 15 мин после добавления 10 мкМ раствора БР флуоресцентный сигнал комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$ понижался на 10%, а при введении только NaOH — на 8%. Таким образом, вклад БР в уменьшение флуоресценции комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$ составлял всего лишь 2%. Такое незначительное уменьшение сигнала дало нам повод усомниться в возможности замены TЦ на БР в комплексе $\{Eu(III)-TЦ\}$.

Для прояснения ситуации изучили спектры поглощения компонентов индикаторной системы, их двойных смесей и тройной смеси $Eu(III)+TЦ+БР$ и сравнили их с аналогичными спектрами, приведенными в литературе (рис. 79 а и б соответственно). Для получения выраженных максимумов нам пришлось повысить концентрацию TЦ в 10 раз по сравнению с той, что указана в работе [199]. Из приведенных спектров видно, что $Eu(III)$ (рис. 79а, кривая 2) не поглощает в изученном диапазоне длин волн. Напротив, TЦ при 275 и 365 нм и БР при 440 нм имеют ярко выраженные максимумы (рис. 79а, кривые 1 и 3 соответственно). В спектре смеси $Eu(III)-TЦ$ (рис. 79а, кривая 4) наблюдается полоса при 395 нм, которая отсутствует в спектрах TЦ и $Eu(III)$, что однозначно свидетельствует об образовании комплекса $\{Eu(III)-TЦ\}$. Однако при добавлении БР к $Eu(III)$ или $\{Eu(III)-TЦ\}$ (рис. 79а, кривые 6 и 7 соответственно) новый максимум в спектре не возникает, что не позволяет нам, в отличие от авторов, с уверенностью утверждать, что образуется комплекс $\{Eu(III)-БР\}$, а TЦ вытесняется из координационной сферы европия (III).

Доказательством взаимодействия БР с комплексом $\{Eu(III)-TЦ\}$ авторы считают увеличение поглощения смеси $\{Eu(III)-TЦ-БР\}$ (рис. 79б, кривая 7) по сравнению с поглощением $\{Eu(III)-TЦ\}$ (рис. 79б, кривая 4) и небольшой сдвиг миниму-

ма поглощения смеси $\{Eu(III)-TЦ-BP\}$ по сравнению с полосой $\{Eu(III)-TЦ\}$. Однако, на наш взгляд, это не столь очевидный вывод. Сравнение спектров поглощения BP и смеси $\{Eu(III)-BP\}$ (рис. 79а, кривые 3 и 6 соответственно) показало, что в присутствии иона металла изменяется форма спектра пигмента: при 440 нм поглощение уменьшается, а максимум уширяется. Однако такое изменение спектра BP может быть обусловлено не только образованием комплекса с ионом $Eu(III)$, но и изменением состояния BP в растворе после введения иона металла вследствие образования кластеров или флокулянтов пигмента [241], о чем свидетельствует наличие плеча в спектре BP в области 480–560 нм. Реальная растворимость BP в ФБР - 7.4 составляет < 0.005 мг в 100 мл (то есть $85 \text{ пмоль} \times \text{л}^{-1}$), а при больших концентрациях пигмента, в том числе и при изученной нами концентрации $2 \text{ мкмоль} \times \text{л}^{-1}$, BP существует в растворе в виде коллоидного золя [241], что способствует образованию флокулянтов BP.

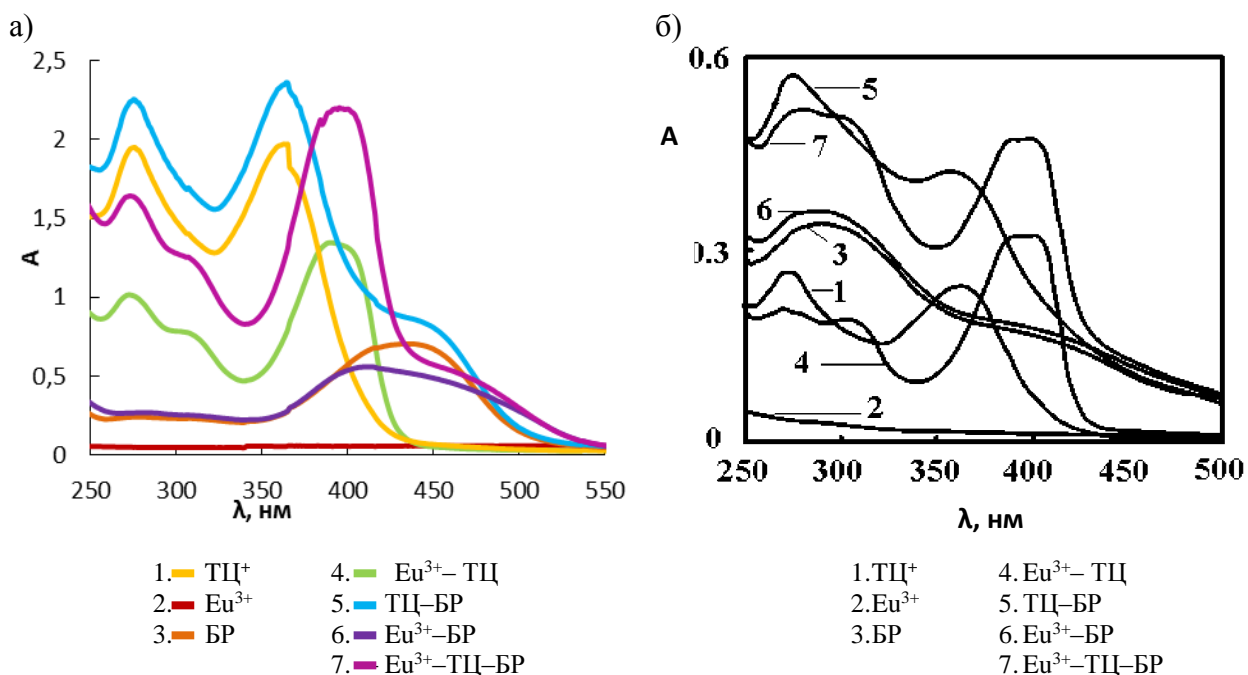


Рис. 79. Спектры поглощения компонентов индикаторной реакции, их смесей и конечной реакционной смеси, полученные нами (а) и известные из литературы [199] (б). Концентрации, мкМ: $Eu(III)$ – 74, TЦ – 222, BP – 2; 0.1 М *трис*-HCl буферный раствор, pH 7.1; раствор сравнения – *трис*-HCl буферный раствор.

Авторы работы [199] утверждают, что в индикаторной системе также образуется комплекс $\{TЦ-BP\}$. Доказательством этого они считают увеличение поглощения в системе $\{TЦ-BP\}$ (рис. 79б, кривая 5) по сравнению с поглощениями индивидуальных растворов TЦ и BP (рис. 79б, кривые 1 и 3 соответственно). Однако спектр,

полученный математическим сложением спектров поглощения ТЦ и БР (рис. 80, кривая 4), практически совпадает со спектром их смеси (рис. 80, кривая 3), из чего можно сделать вывод, что комплекс {ТЦ–БР} у нас не образуется.

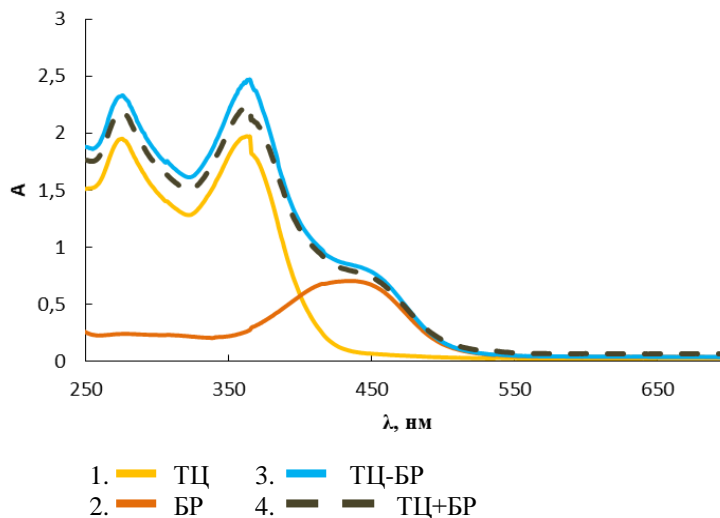


Рис. 80. Спектры поглощения 222 мкМ раствора ТЦ и 2 мкМ раствора БР, а также их смесей; 0.1 М *трис*-НСl буферный раствор, рН 7.1. Раствор сравнения – *трис*-НСl буферный раствор.

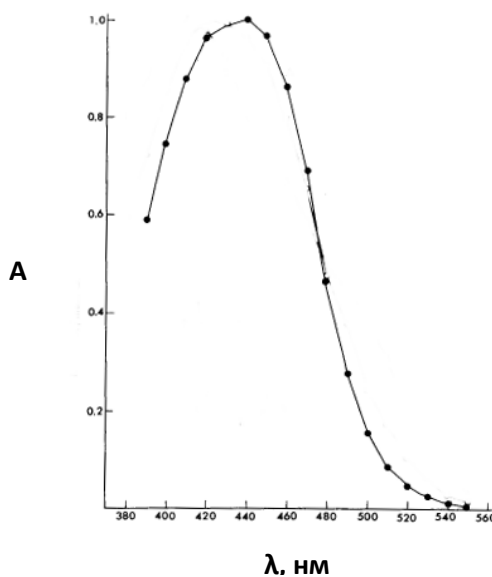


Рис. 81. Спектр поглощения 8.6 мкМ раствора БР в 0.1 М ФБР, рН 7.4 [241].

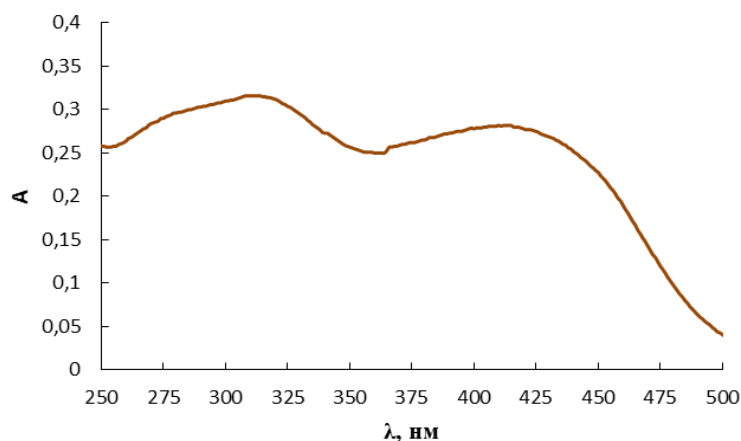


Рис. 82. Спектр поглощения 2 мкМ раствора БР, приготовленного на 0.1 М растворе NaOH, после 7-дневного хранения в холодильнике при 4°C; 0.1 М *трис*-HCl буферный раствор, pH 7.1. Раствор сравнения – *трис*-HCl буферный раствор.

Мы выявили различие в спектрах поглощения раствора БР, полученных нами и авторами работы [199] (рис. 79 а и б, кривые 3). Однако наш спектр поглощения хорошо согласовался со спектром поглощения БР, приведенного в другом литературном источнике [241], рис. 81. Отсутствие на рис. 79б (кривая 3) выраженного характеристического максимума поглощения БР при 440 нм может означать, что, либо раствор БР не был свежеприготовленным, либо молекула пигмента была повреждена при перемешивании, встряхивании или действии ультразвука. БР чувствителен к pH, действию света, присутствию в его растворе окислителей и даже следовых количеств ионов металлов. Мы показали, что при хранении щелочного раствора БР в течение 7 суток в холодильнике его максимум поглощения при 440 нм уменьшается (рис. 82) и спектр становится все более похожим на приведенный на рис. 79б (кривая 3). Полученные результаты указывают на то, что обнаруженный авторами [199] эффект тушения флуоресценции мог быть обусловлен не БР, а продуктом его превращения.

В литературе [242] мы нашли информацию об образовании двойного комплекса {Eu(III)–БР}. Электрохимическим методом было показано, что комплекс {Eu(III)–БР} образуется в *трис*-HCl буферном растворе при pH 8.0 при наличии избыточных количеств Eu(III) по отношению к БР. Такая индикаторная система содержала не три, а всего лишь два компонента, что должно было, по нашему мнению, облегчить трактовку полученных результатов. Влияние БР на флуоресценцию европия(III) изучили при двух значениях pH: 8.0, при котором образуется комплекс {Eu(III)–БР} и 7.1, наиболее подходящем для системы {Eu(III)–ТЦ–БР}. Помимо pH варьировали концентрации иона металла и концентрацию БР, соблюдая при этом условие, что лантаноид должен присутствовать в избыточном по отношению к пигменту количестве. Как видно из данных табл. 17, при концентрациях БР рав-

ных 10 и 20 мкМ и концентрации Eu(III) 70 мкМ, флуоресцентный сигнал неустойчив при двух изученных значениях pH, меняется во времени и практически не зависит от концентрации БР. При концентрациях БР и Eu(III) 2 и 7 мкМ соответственно сигнал возрастает по сравнению с его величиной в отсутствие БР, причем в большей степени при pH 7.1, а не при pH 8.0, как мы ожидали. При этом по мере выдерживания БР в растворе Eu(III) заметна тенденция роста сигнала, которая при нейтральном pH выражена сильнее, чем в слабо щелочном реакционном растворе. Нам не удалось найти в литературе объяснение наблюдаемым в системе эффектам. Можно только предположить, что образующийся комплекс {Eu(III)–БР} обладает более выраженными флуоресцентными свойствами, подходящие условия проявления которых требуют дополнительного изучения в растворе.

Сложность рассматриваемых индикаторных систем, по нашему мнению, состоит прежде всего в том, что до конца непонятны причины уменьшения сигнала комплекса {Eu(III)–ТЦ} в присутствии БР, а также повышения флуоресценции европия(III) при введении пигмента. Для принятия окончательного решения о целесообразности использования индикаторной системы {Eu(III)–ТЦ} для определения БР с помощью целлюлозных пленок необходимы исследования в растворе, направленные на выяснение причин и механизма тушения флуоресценции {Eu(III)–ТЦ} билирубином, а также условий проявления эффекта тушения в отсутствие и в присутствии хлоридной ИЖ.

Таблица 16. Зависимость интенсивности флуоресценции системы {Eu(III)–БР} от времени наблюдения за сигналом (0.1 М *трис*-HCl буферный раствор, $\lambda_{\text{возб.}} = 279$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 617$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм; $n = 3$, $P = 0.95$)

Концентрации (в кювете), мкМ		I, усл. ед. через t (мин) наблюдения		
Eu(III)	БР	0	10	20
pH 7.1				
70	0	132±4		
	20	145	159	151
	10	135	149	148
7	0	68±2		
	2	118	157	165
pH 8.0				
70	0	158±10		
	20	159	135	129
	10	121	126	128
7	0	101±4		
	2	123	134	140

Таким образом, в результате проведенных исследований мы получили оптически прозрачные флуоресцирующие пленки состава {целлюлоза-[BMIm][AcO]-Eu(ДПК)₃} и {целлюлоза-[BMIm][Cl]-Eu(III)-ТЦ}, которые могут служить потенциальными чувствительными элементами флуоресцентных сенсоров. Невозможность использования предложенных пленок для определения АМ и БР по обсужденным выше причинам не исключает других возможностей их применения в будущем. Справедливость этого заключения подтверждена многочисленными примерами успешного использования лантанидных комплексов в растворе в целях химического анализа [194,195].

Глава 7. Пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]} для флуориметрического определения артемизинина

Ранее в главе 6.2. мы показали, что пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ} обладают интенсивной флуоресценцией (рис. 58а, $\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 581$ нм), довольно хорошо удерживают катионный ксантеновый краситель ПБ (табл. 14) и поэтому являются перспективными материалом для их использования в сенсорных флуоресцентных системах для определения АМ. Напомним, что в гл. 4 на основании имеющихся литературных данных (гл. 2) мы выбрали две индикаторные флуоресцентные системы для определения АМ. Обе системы основаны на реакции окисления ПБ в присутствии АМ, только в одной системе катализатором служит МП, а в другой — ее синтетический аналог, 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 детальное изучение реакций в растворе. Результаты этих исследований обсуждены в гл. 7.1.

7.1. Реакция окисления пиронина Б артемизинином в присутствии биокатализаторов и их синтетических аналогов в растворе

Ранее в гл. 2 отмечали, что в реакциях окисления ПБ артемизинином наибольшей каталитической активностью и эффективностью обладает Гб (табл. 3). Прежде чем приступить к изучению выбранных нами каталитических систем с участием МП и комплекса {Mn(II)-ДДС}, изучили спектры флуоресценции индивидуальных компонентов реакции (рис. 83), а затем воспроизвели катализируемую Гб реакцию окисления ПБ водно-этанольным раствором АМ в условиях, описанных в работе [118]. В этих целях использовали этанольный раствор ПБ и водно-этанольный (95:5 об.%) раствор АМ. Спектры флуоресценции каталитической реакции окисления ПБ раствором АМ регистрировали при комнатой температуре через 2 мин после смешения реагентов.

Как видно из рис. 83, максимум флуоресценции ПБ соответствует 563 нм, т.е. сдвинут в длинноволновую область по сравнению с полосой максимальной флуоресценции ПБ (547 нм), известной из литературы [118]. Батохромный сдвиг, по-видимому, связан с применением препарата ПБ другого производителя, влиянием на сигнал компонентов универсального буферного раствора: уксусной, борной и орто-фосфорной кислот и NaOH, а также примесей в них. Этим же обстоятельством можно объяснить тот факт, что величина флуоресцентного сигнала красителя почти в 3 раза меньше той, что указана в литературе. Гб и АМ практически не флуоресцируют в интервале длин волн 555–579 нм, в котором интенсивно излучает ПБ.

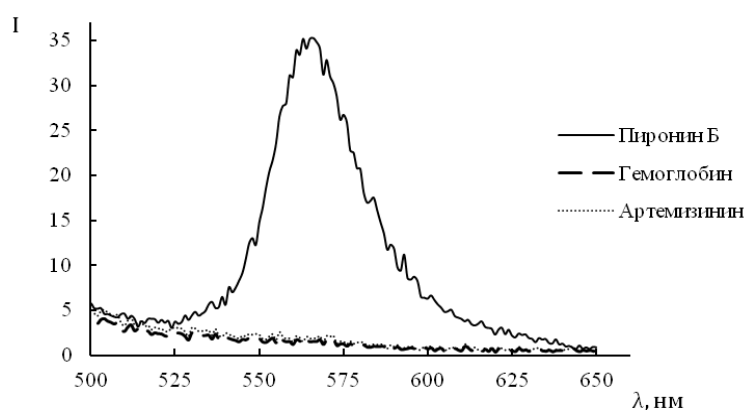


Рис. 83. Спектры флуоресценции растворов ПБ, Гб и АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ; Гб – 15 нМ; АМ – 0.48 мкМ; УБР, pH 7.2, $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм.

На рис. 84 приведены спектры флуоресценции ПБ, его смеси с Гб, а также системы ПБ–Гб–АМ в УБР. Из рисунка видно, что интенсивность флуоресценции ПБ при 563 нм практически не изменялась даже при высокой концентрации АМ (71 мкМ); небольшое уменьшение сигнала (8 ед.) зафиксировали только при 446 нм.

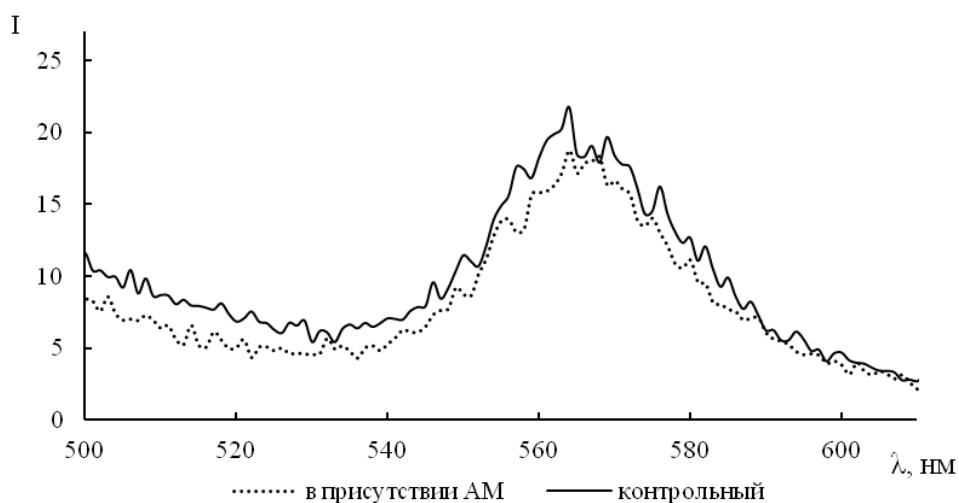


Рис. 84. Спектры флуоресценции системы ПБ–Гб в отсутствие и присутствии АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ; Гб – 15 нМ; АМ – 71 мкМ (УБР, pH 7.2, $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм).

Интенсивность флуоресценции в системе ПБ–Гб в присутствии малых концентраций АМ (5 мкМ) понижалась заметно, если концентрация белка в реакционном растворе в 660 раз превышала указанную в литературе концентрацию (рис. 85). Однако флуоресценцию красителя тушил не только АМ, но и Гб, который при микромолярных концентрациях уменьшал интенсивность сигнала не менее чем на 30%. Мы предполагаем, что несовпадение полученных нами результатов с литературными данными [118] может быть вызвано другим качеством используемых препаратов АМ и Гб.

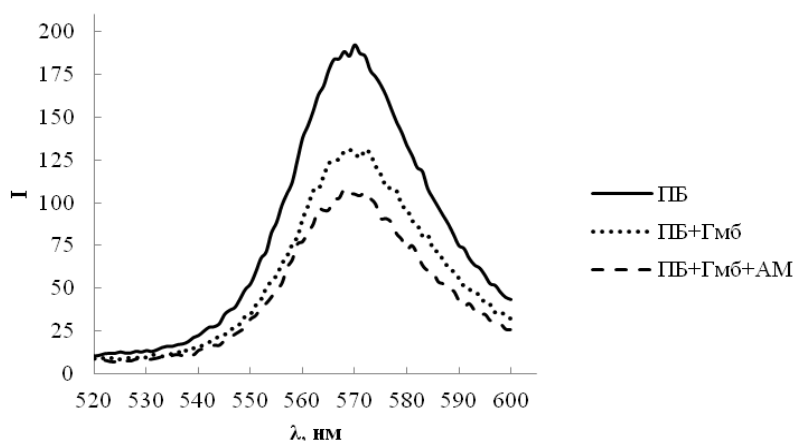


Рис. 85. Спектры флуоресценции системы ПБ–Гб–АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Гб – 10 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 7.2; $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм).

Несмотря на получение не слишком обнадеживающих данных, оставалась надежда достичь эффективного тушения флуоресценции ПБ в присутствии АМ с использованием в качестве биокатализатора МП, поскольку структура этого так называемого мини-фермента, в отличие от состоящего из 4-х субъединиц Гб, стерически более доступна для взаимодействия с эндопероксидом.

Определение артемизинина с использованием системы тиронин В – микропероксидаза-11/{Mn(II) – додецилсульфат натрия}. Действие АМ на флуоресцентный сигнал ПБ в присутствии МП исследовали в условиях, описанных в литературе [120] для цитохрома *c*. Из рис. 86 видно, что МП не обладает собственной флуоресценцией и не влияет, как и этанол, на интенсивность флуоресценции красителя. При добавлении в реакционный раствор АМ резко уменьшался флуоресцентный сигнал, что свидетельствовало о перспективности использования этой индикаторной системы для разработки методики определения АМ.

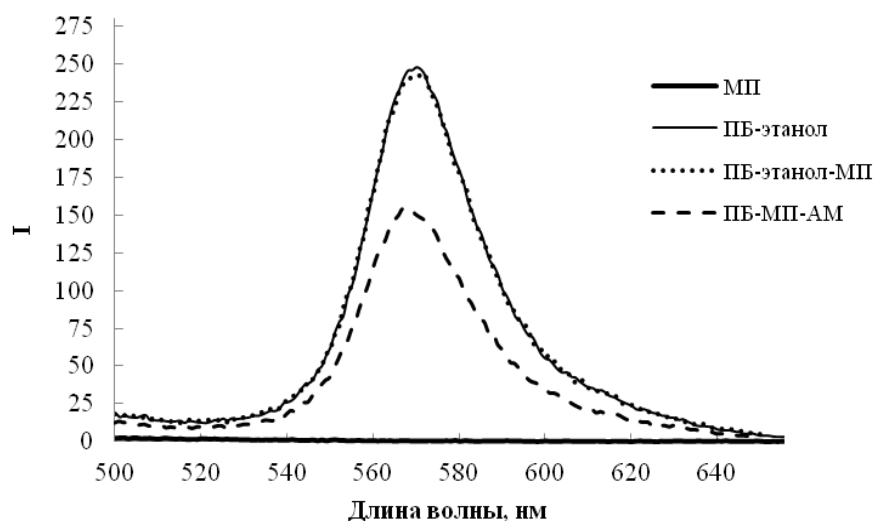


Рис. 86. Спектры флуоресценции системы ПБ–МП–АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 5 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 6.0; *здесь и далее* – $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм).

Спектры флуоресценции продукта реакции ПБ–{Mn(II)–ДДС}–АМ регистрировали в наиболее подходящих условиях для определения H_2O_2 [243]: УБР, рН 5.3, концентрации ПБ — 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ; $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, ширины входной и выходной щелей — 5 нм. При введении водно-этанольного раствора АМ с концентрацией 1 и 10 мкМ в индикаторную систему в отсутствие комплекса {Mn(II)–ДДС} интенсивность флуоресценции ПБ оставалась практически такой же, как и в контрольном опыте (табл. 17), в то время как при добавлении 1 мкМ H_2O_2 при прочих равных условиях флуоресценция уменьшалась, хотя и незначительно (на 12 ед.). Заметим, что в присутствии 0.15 об.% этанола, добавленного в реакционный раствор вместе с АМ (или с H_2O_2), интенсивность флуоресценции ПБ практически не изменялась.

Таблица 17. Зависимость интенсивности флуоресценции ПБ при 569 нм от состава реакционной смеси, времени проведения реакции и условий измерений

Состав реакционной смеси	I, усл. ед.		
	Без продувки N_2 через		С продувкой N_2 в течение 15 мин ^a
	2 мин	30 мин	
ПБ	208.18	207.56	182.83
ПБ– $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (0.15 об.%)	208.09	203.07	185.02
ПБ– H_2O_2 (1 мкМ)– $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (0.15 об.%)	195.68	182.35	150.68
ПБ–АМ (1 мкМ)	208.70	194.67	188.88
ПБ–АМ (10 мкМ)	204.32	181.51	184.29
ПБ– H_2O_2 (1 мкМ)– $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (0.15 об.%)–{Mn(II)–ДДС}	168.81	162.53	126.03
ПБ–АМ (1 мкМ)–{Mn(II)–ДДС}	177.66	162.46	138.80
ПБ–АМ (10 мкМ)–{Mn(II)–ДДС}	176.10	166.15	133.75

^aспектр флуоресценции регистрировали через 2 мин после начала реакции.

В присутствии комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ флуоресцентный сигнал ПБ уменьшался более заметно при добавлении как H_2O_2 , так и АМ. АМ при концентрации 10 мкМ понижал интенсивность флуоресценции на 33 ед. (15.8%), в то время как в отсутствие комплекса — всего на 3.8 ед. (1.83%), если интенсивность флуоресценции измеряли через 2 мин после начала реакции. При увеличении времени проведения реакции с 2 до 30 мин сигнал в присутствии АМ уменьшался в большей степени, однако не столь существенно, чтобы увеличивать время на проведение одного определения в 15 раз. Тушение флуоресценции было эффективнее при добавлении H_2O_2 . Очевидно, что комплекс $\{Mn(II)-ДДС\}$ катализирует окисление ПБ артемизином, подобно тому, как это происходило при использовании H_2O_2 . Механизм каталитического действия комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ в реакции окисления ПБ пероксидом водорода достоверно не установлен, однако предложена наиболее вероятная схема действия комплекса (рис. 87).

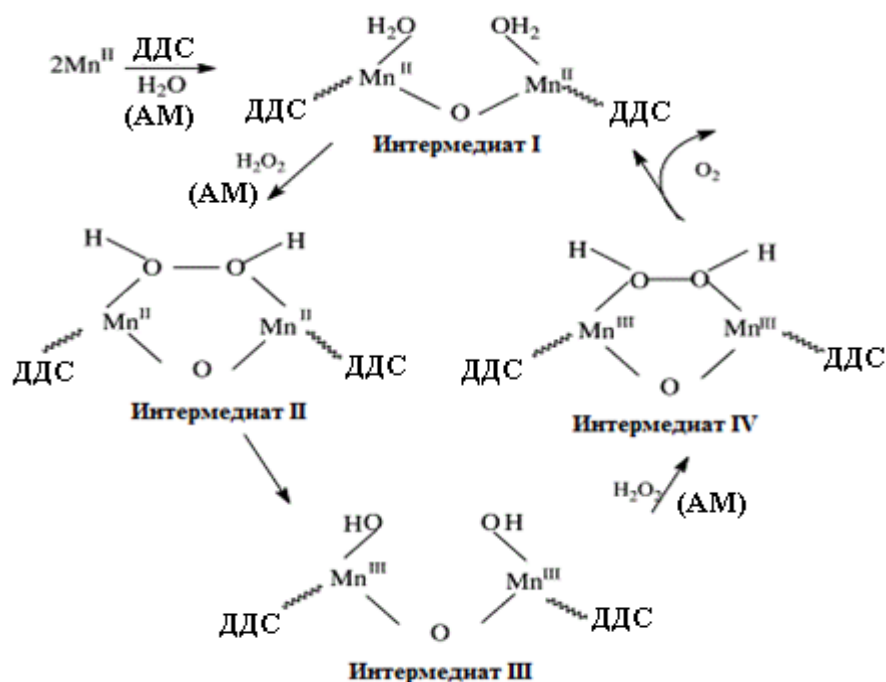


Рис. 87. Предполагаемый механизм действия комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ в реакции окисления ПБ раствором H_2O_2 (АМ) [243].

В литературе [238] имеются сведения о том, что растворенный в воде кислород тушит флуоресценцию ПБ за счет столкновений с молекулами флуорофора. Однако влияние кислорода на сигнал ПБ изучали при других условиях возбуждения флуоресценции: $\lambda_{возб.} = 500$ нм, $\lambda_{фл.} = 580$ нм. При выяснении того, как будет меняться интенсивность флуоресценции ПБ при удалении из реакционной смеси растворенного O_2 путем продувки его азотом в течение 15 мин, установили, что сигнал ПБ не увеличился, как ожидали, а, напротив, уменьшился на 30% по сравнению с

его величиной в системе без продувки. Такая ситуация наблюдалась как в отсутствие, так и в присутствии этанола. Для объяснения полученных результатов потребуется отдельное исследование.

При введении в систему АМ и после продувки системы азотом флуоресцентный сигнал в отсутствие комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ не изменялся, а в присутствии катализатора значительно уменьшался (на 25.6 и 27.7% при концентрациях АМ 1 и 10 мкМ соответственно и на 32% при введении в систему 1 мкМ H_2O_2).

Полученные данные показывают, что, хотя удаление кислорода продуванием реакционного раствора азотом не позволяет повысить сигнал ПБ, тем не менее, способствует усилению эффекта тушения АМ. Все дальнейшие эксперименты проводили без продувки реакционной смеси азотом, поскольку сочли не оправданным значительно увеличивать продолжительность анализа и его трудоемкость для усиления эффекта тушения всего лишь в 2 раза.

В целом полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения выбранных индикаторных систем для разработки методик флуориметрического определения АМ.

Выбор рН и природы буферного раствора. Подбор выгодных для определения АМ условий в системах ПБ–МП/ $\{Mn(II)-ДДС\}$ начали с выбора подходящего значения рН. Работу проводили по методикам 8а и 9а с той лишь разницей, что в ферментативной системе вместо цитохрома *c* использовали МП, а в системе ПБ– $\{Mn(II)-ДДС\}$ водный раствор H_2O_2 заменили водно-этанольным (95:5 об.%) раствором АМ. Концентрация раствора АМ при этом рН составляла 5 мкМ.

Из рис. 88 видно, что наибольший эффект тушения флуоресценции ПБ раствором АМ достигается в интервале рН от 5.0 до 6.2. При использовании в качестве катализатора реакции комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ наибольшие разности интенсивностей флуоресценции ПБ в отсутствие и в присутствии АМ, а также отношение этих сигналов наблюдаются не при рН 5.3, как это было в присутствии H_2O_2 , а при рН 5.9 (рис. 89), который и выбрали для дальнейших исследований для удобства сравнения результатов, полученных при использовании двух индикаторных систем. Заметим, что сигналы флуоресценции ПБ при катализе МП в меньшей степени зависят от рН реакционного раствора, чем в системе ПБ– $\{Mn(II)-ДДС\}$.

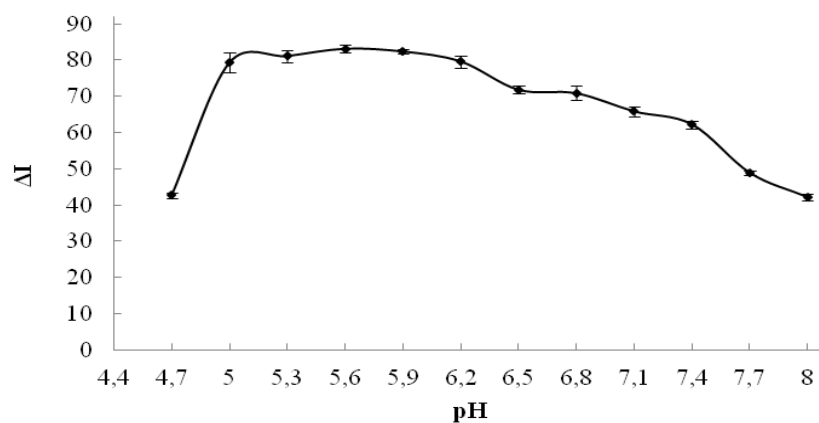
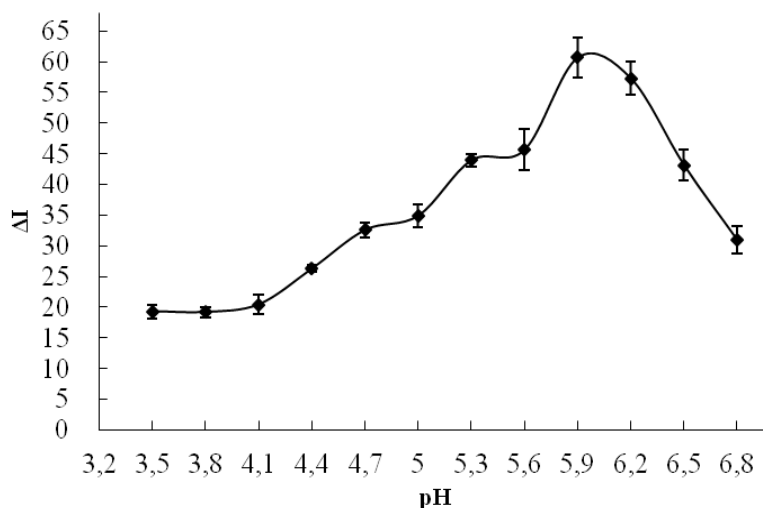


Рис. 88. Зависимости величин ΔI от pH реакционной среды в системе ПБ–МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 5 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР; время реакции – 2 мин).

a)



b)

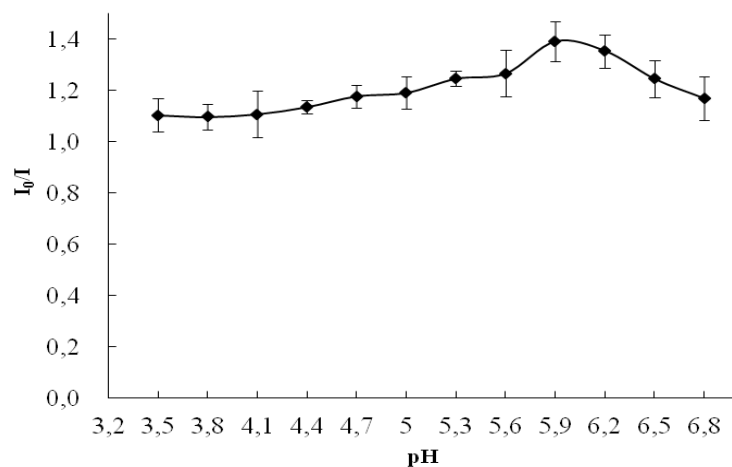
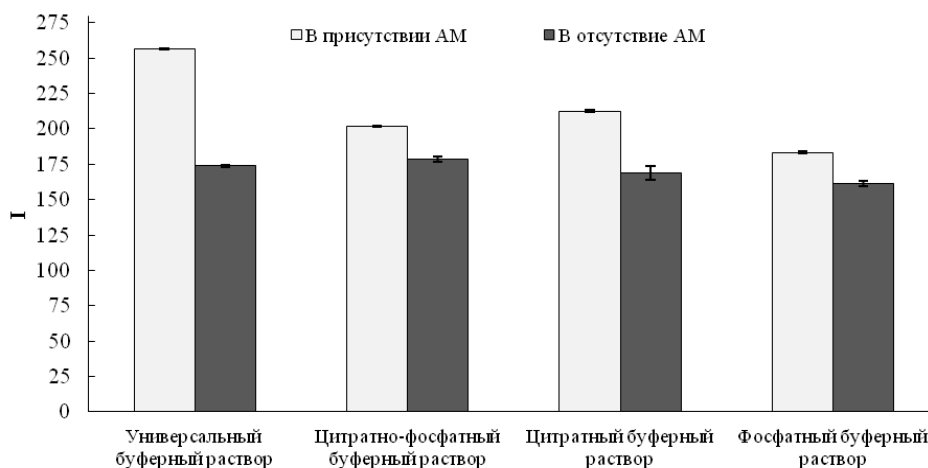


Рис. 89. Зависимости величин ΔI (a) и I_0/I (б) от pH реакционной смеси в системе ПБ–{Mn(II)–ДДС}–АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ, АМ – 5 мкМ.

При рН 5.9 буферными свойствами, помимо УБР, обладают также цитратный, фосфатный и цитратно-фосфатный буферные смеси. На рис. 90 представлена диаграмма, иллюстрирующая зависимость интенсивности флуоресценции ПБ в отсутствие и в присутствии АМ от природы буферного раствора.

а)



б)

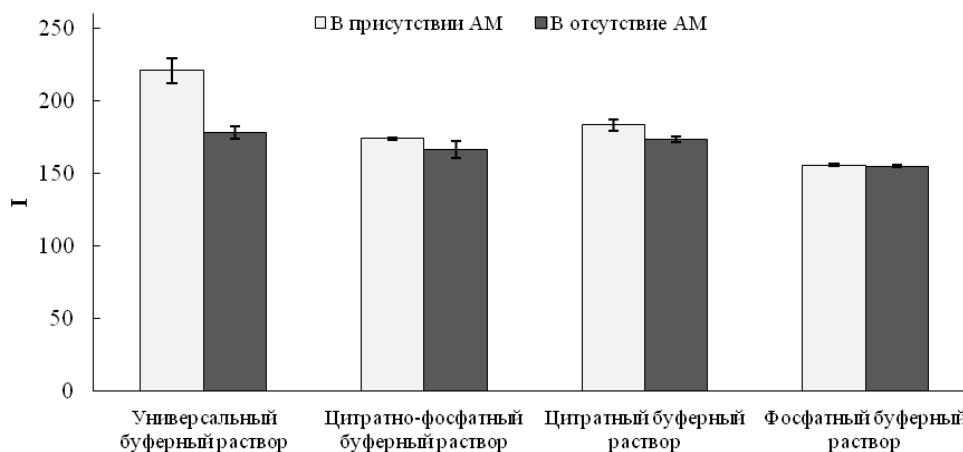


Рис. 90. Зависимость интенсивности флуоресценции ПБ в отсутствие и присутствии 5мкМ раствора АМ от природы буферного раствора в системах ПБ–МП (а) и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (б). Концентрации: ПБ – 2 мкМ (а, б), МП – 5 мкМ (а), Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (б) (рН 5.9).

Из рис. 90 видно, что применение УБР обеспечивает не только высокий сигнал ПБ, но и наибольший эффект тушения флуоресценции при введении АМ, который возрастал в ряду буферных растворов: фосфатный < цитратно-фосфатный < цитратный < универсальный. Уменьшение сигнала ПБ в буферных системах, содер-

жащих лимонную кислоту, в отсутствие АМ можно объяснить образованием комплексов ионами Mn^{2+} с цитрат-ионами, что понижало активность металла-катализатора. Уменьшение сигнала в фосфатном буферном растворе может быть связано с тушением флуоресценции фосфат-ионами за счет образования комплексов с ионами $Mn(II)$. Универсальный и цитратно-фосфатный буферные растворы также содержат фосфат-ионы, однако их концентрация в них значительно ниже, чем в составе фосфатной буферной смеси. Таким образом, для проведения обеих индикаторных реакций выбрали УБР с pH 5.9.

При варьировании объема УБР от 100 мкл до 3.5 мл (2.86 и 85.7 об.% соответственно) величина сигнала практически не менялась. Так, например, в реакции окисления ПБ раствором АМ, катализируемой комплексом $\{Mn(II)-ДДС\}$, интенсивность флуоресценции изменялась от 172 до 170 ед. В дальнейшем использовали до 3.0 мл универсального буферного раствора, общий объем реакционной смеси при этом составлял 3.5 мл.

Выбор концентраций пиронина Б, катализаторов и времени проведения реакции. При варьировании концентрации красителя в системе ПБ–МП изменялся как сигнал контрольного опыта, так и полезный сигнал, поэтому использовали их отношение I_0/I (рис. 91). В качестве наиболее подходящей выбрали концентрацию красителя 2 мкМ, выше которой величина I_0/I более не менялась.

Из рис. 92а видно, что при концентрациях красителя меньших, чем 2 мкМ сигналы в отсутствие и в присутствии АМ статистически не различаются. Максимальное отношение интенсивностей наблюдается также при концентрации ПБ 2 мкМ (рис. 92б), которую и выбрали для дальнейшей работы.

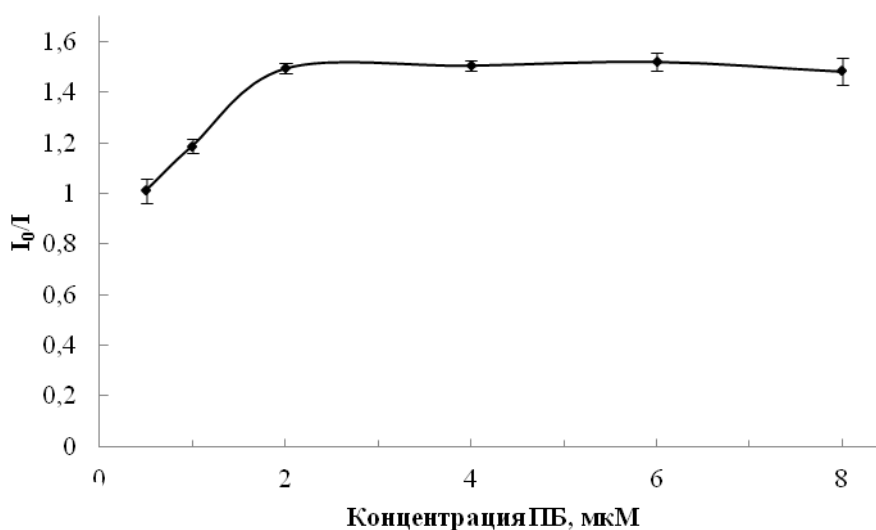
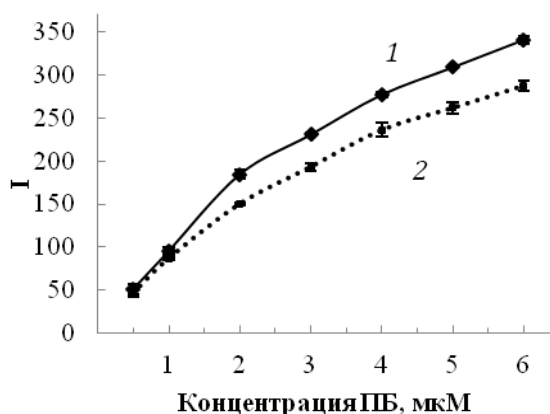


Рис. 91. Зависимость величины I_0/I от концентрации ПБ в системе ПБ–МП. Концентрации: МП – 5 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР, pH 5.9; время реакции – 2 мин).

a)



б)

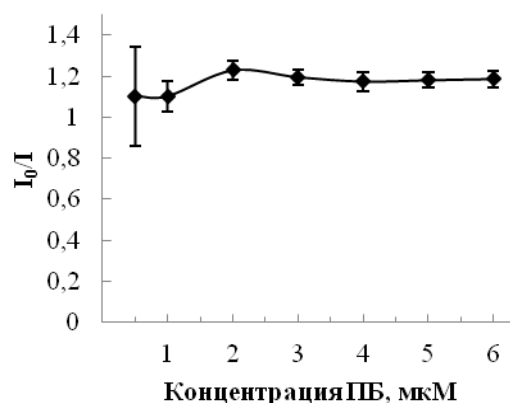


Рис. 92. Зависимость от концентрации ПБ интенсивности флуоресценции в отсутствие (1) и в присутствии 5 мкМ раствора АМ (2) (а) и их соотношения (б). Концентрации: Мп(II) и ДДС – 0.1 мМ (УБР, рН 5.9).

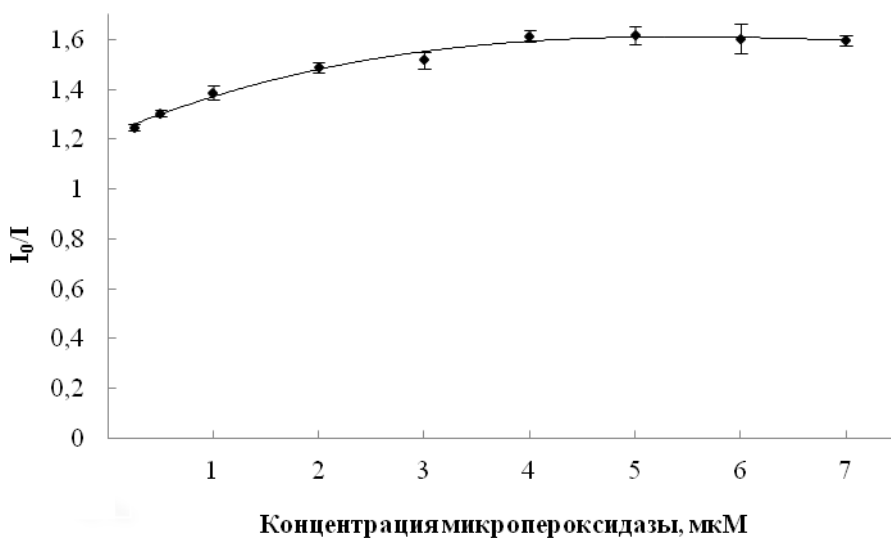


Рис. 93. Зависимость величины I_0/I от концентрации МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 5.9; время реакции – 2 мин, $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 569$ нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм; $n = 3$, $P = 0.95$).

При концентрации МП равной 4 мкМ величина I_0/I достаточно велика и хорошо воспроизводима (рис.93).

Зависимости величины I_0/I от концентраций Мп(II) и ДДС приведены на рис. 94–95. Из экспериментальных данных видно, что в присутствии АМ наибольшей каталитической активностью обладает комплекс {Мп(II)-ДДС} состава 1:1, концентрации иона металла и ПАВ составляют 0.1 мМ.

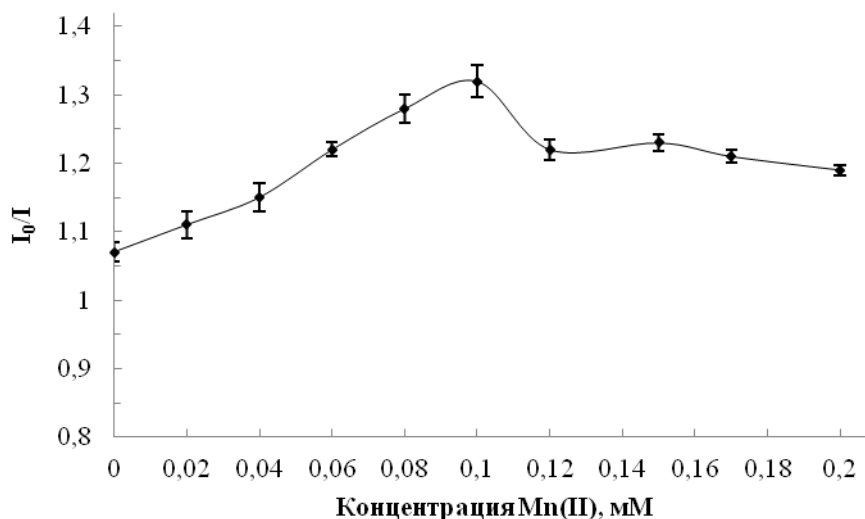


Рис. 94. Зависимость величины I_0/I от концентрации Mn(II). Концентрации: ПБ – 2 мкМ, ДДС – 0.1 мМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 5.9; время реакции – 2 мин).

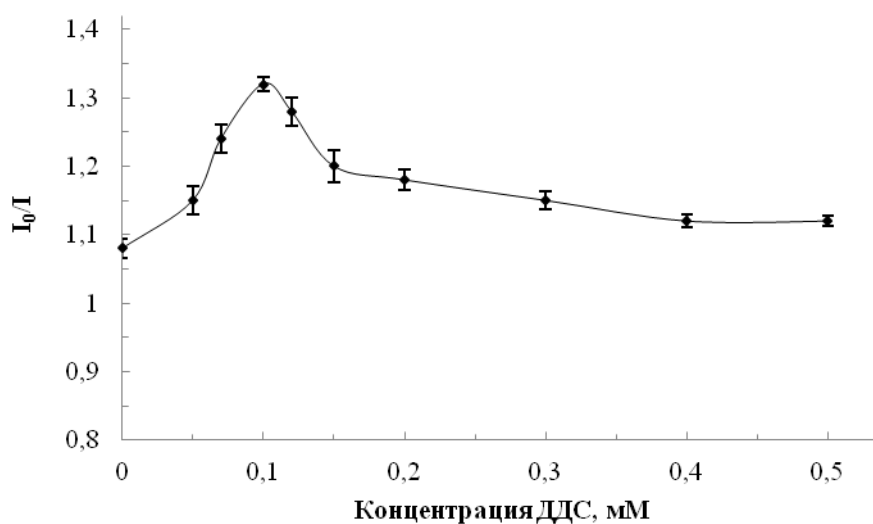


Рис. 95. Зависимость величины I_0/I от концентрации ДДС. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) – 0.1 мМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 5.9; время реакции – 2 мин).

Для подтверждения гипотезы об образовании комплекса ионов марганца(II) с ДДС получили спектры поглощения растворов Mn(II), ДДС, а также их смеси (рис. 96). Сумма оптических плотностей растворов индивидуальных веществ Mn(II) и ДДС не равна величинам оптической плотности раствора смеси, следовательно, образуется комплекс.

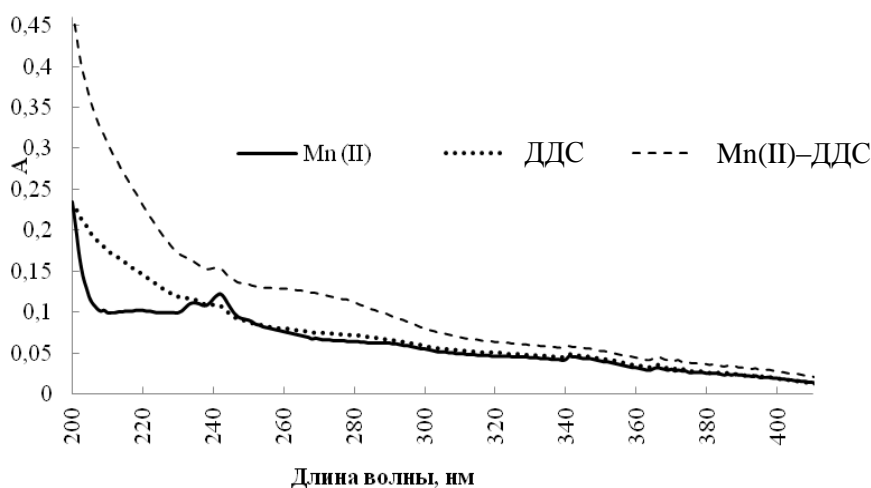


Рис. 96. Спектры поглощения водных растворов $Mn(II)$, ДДС и комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ (1:1). Концентрации: $Mn(II)$ и ДДС – 2.5 мМ (раствор сравнения – УБР, рН 5.9, $l = 1$ см).

ДДС является анионным ПАВ, поэтому при ККМ равной 8 мМ и выше ДДС может влиять на интенсивность флуоресценции ПБ в отсутствие и в присутствии АМ и $Mn(II)$. Известно [244], что введение в индикаторную систему ПАВ различной природы позволяет направленно изменять величину флуоресцентного сигнала за счет включения флуорофора в мицеллы ПАВ. Такой подход широко применяют в практике химического анализа для повышения чувствительности и селективности флуориметрических методик. Несмотря на то, что концентрация ДДС в нашей индикаторной системе в 80 раз меньше ККМ, изучили влияние ДДС на интенсивность флуоресценции ПБ при концентрациях, превышающих ККМ. Из рис. 97 видно, что при концентрациях ДДС, равных 15 и 40 мМ, интенсивность флуоресценции возрастает почти в 2 раза, однако, уменьшение сигнала в присутствии 5 мкМ АМ статистически незначимо. Следовательно, АМ тушит флуоресценцию ПБ только в присутствии катализаторов. Эффект тушения АМ не проявляется в мицеллярной среде ДДС.

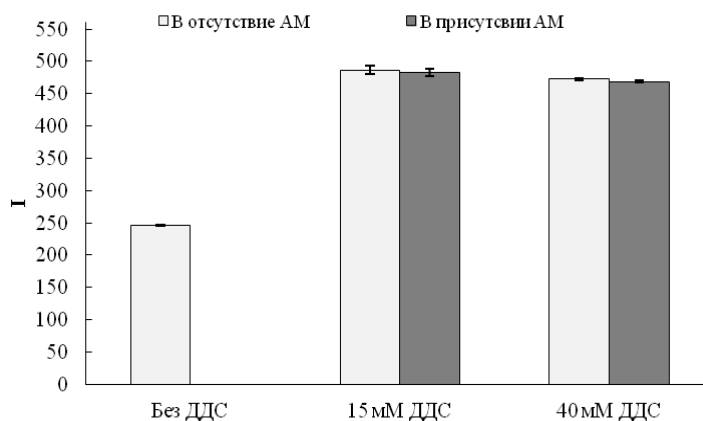


Рис. 97. Зависимость интенсивности флуоресценции ПБ в отсутствие и присутствии АМ от концентрации ДДС. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, АМ – 5 мкМ (УБР, рН 5.9).

Далее изучили зависимость величины I_0/I от времени проведения индикаторных реакций. Наиболее удобным считали время, через которое величина I_0/I достигала наибольшего значения и далее не менялась. Согласно данным работы [243] скорость реакции окисления ПБ пероксидом водорода в присутствии комплекса $\{Mn(II)-ДДС\}$ высока: через одну минуту после начала реакции кривая зависимости I_0/I от времени проведения реакции выходит на плато и более не меняется. Окислительная способность АМ выражена в меньшей степени по сравнению с H_2O_2 (табл. 17), поэтому отношение сигналов перестает меняться только через 2 мин после смешения реагентов (рис. 98, кривая 2). Это время выбрали в качестве наиболее удобного для последующего проведения экспериментов.

При использовании системы ПБ–МП величина I_0/I в течение 1 мин достигала значения 1.55, а затем медленно возрастала в течение 15 мин. Заметим, что сигнал системы в контрольном опыте в течение изученного интервала времени оставался постоянным в обеих индикаторных реакциях. В качестве удобного времени проведения ферментативной реакции выбрали 1 мин, при котором наблюдалась самая высокая воспроизводимость результатов анализа.

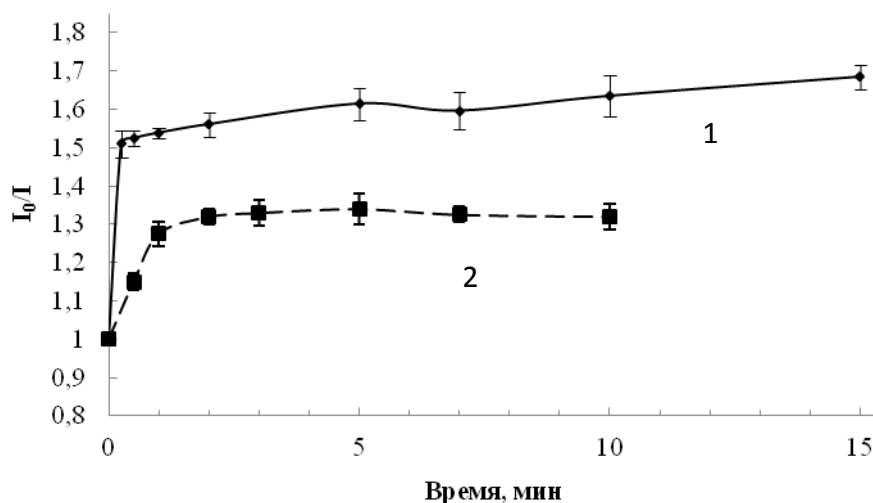


Рис. 98. Зависимость величины I_0/I от времени проведения реакции окисления ПБ раствором АМ в присутствии МП (1) и комплекса $\{Mn(II) - ДДС\}$ (2). Концентрации: ПБ – 2 мкМ (1, 2), МП – 4 мкМ (1), Мп(II) и ДДС – 0.1 мМ (2), АМ – 5 мкМ (1, 2) (УБР, рН 5.9).

Выбор природы и содержания органического растворителя. Поскольку интенсивность флуоресценции зависит от природы органического растворителя, в котором приготовлен исходный раствор АМ, изучили зависимость сигнала в отсутствие и в присутствии АМ, растворенного в метаноле и ДМСО, и впоследствии разбавленного водой в 20 раз. В выбранных полярных растворителях, так же, как и

в этаноле, АМ хорошо растворим (гл. 2). На рис. 99 представлена диаграмма, иллюстрирующая зависимость интенсивности флуоресценции ПБ от природы органического растворителя при постоянном его содержании в рабочем растворе – 5 об.%. При этом содержание органического растворителя в реакционном растворе не превышало 2.9 об.%.

Из рис. 99 видно, что в обеих индикаторных системах применение этанола в качестве соразтворителя для приготовления раствора АМ обеспечивает не только высокий сигнал ПБ, но и наибольшую степень тушения флуоресценции АМ (% для системы ПБ–МП; ПБ–{Mn(II)-ДДС}), которая возрастает в ряду растворителей: метанол (18; 3) ≤ ДМСО (22; 5) < этанол (38; 13). В качестве наиболее подходящего соразтворителя для АМ выбрали этанол.

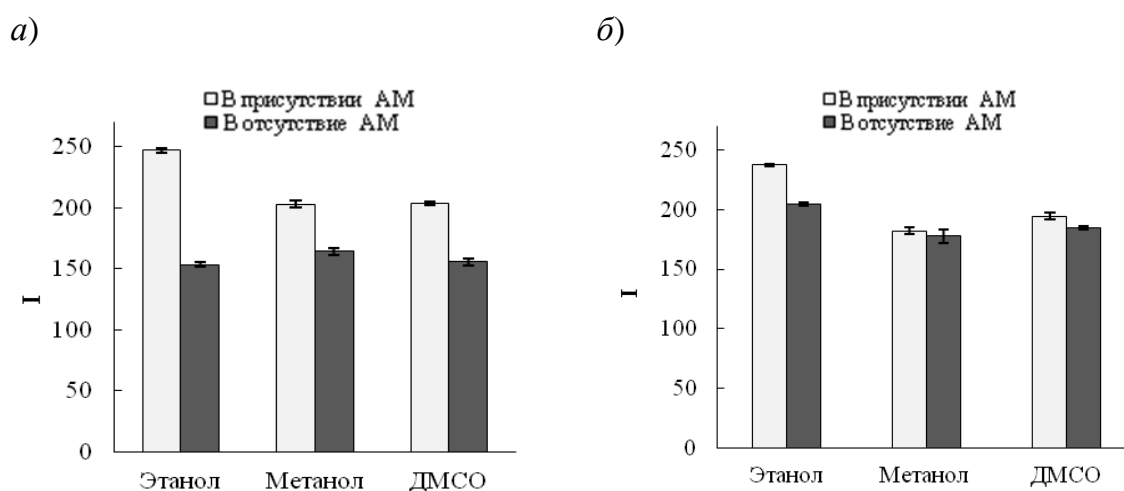
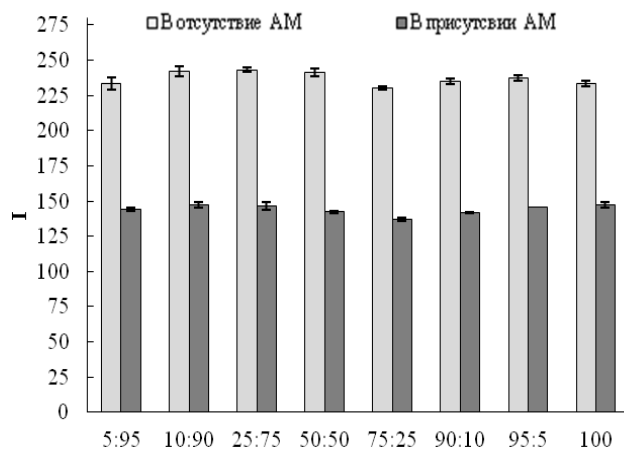


Рис. 99. Зависимость интенсивности флуоресценции ПБ в отсутствие и присутствии АМ от природы растворителя для приготовления раствора АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ (а, б), МП – 4 мкМ (а), Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (б), АМ – 5 мкМ (а, б), содержание органического растворителя в рабочем растворе АМ – 5 об.%. (УБР, рН 5.9; время реакции – 1 (а) и 2 (б) мин).

При увеличении содержания этанола в рабочем растворе АМ сигнал продукта в контрольном опыте уменьшался незначительно (не более чем на 10 усл. ед.; 4.3%), (рис. 100), в то время как отношение сигналов I_0/I практически не изменялось по величине (рис. 101). Однако в системе с участием МП влияние этанола на сигнал выражено несколько сильнее, чем в случае катализа комплексом (3 и 0.7% соответственно). Таким образом, использование этанольного раствора АМ возможно в двух индикаторных системах, хотя для системы ПБ–{Mn(II)-ДДС} он более предпочтителен.

a)



б)

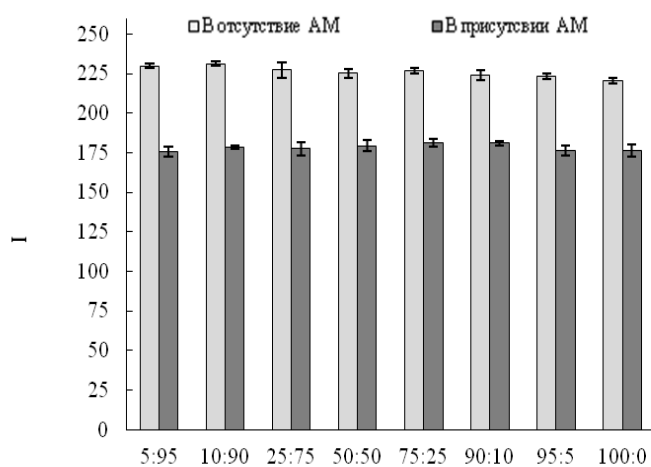


Рис. 100. Зависимость интенсивности флуоресценции ПБ в отсутствие и присутствии 5 мкмоль л^{-1} АМ от объемного содержания органического растворителя в водном растворе АМ для систем ПБ–МП (a) и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (б). Концентрации: ПБ – 2 мкМ , Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (УБР, pH 5.9).

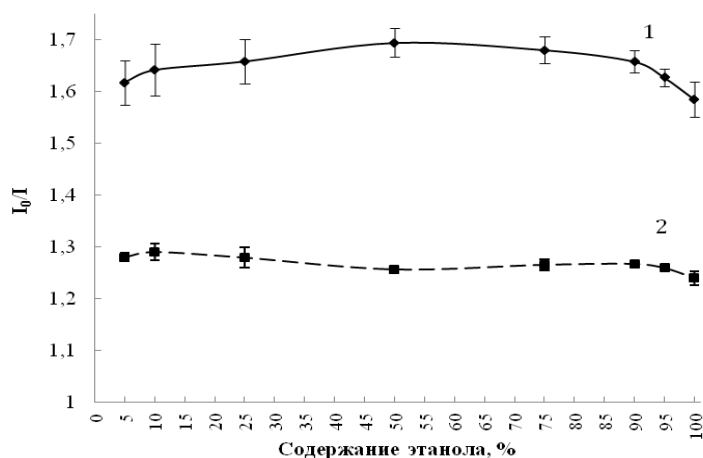


Рис. 101. Зависимость отношения I_0/I от объемного содержания этанола в водном растворе АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ (1, 2), МП – 4 мкМ (1), Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (2), АМ – 5 мкМ (1, 2) (УБР, pH 5.9; время реакции – 2 мин).

Таким образом, в результате подбора подходящих условий проведения реакций окисления ПБ раствором АМ, катализируемых МП и комплексом {Mn(II)–ДДС}, выбрали параметры, представленные в табл. 18.

Таблица 18. Наиболее подходящие условия проявления действия АМ в системах ПБ–МП и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (универсальный буферный раствор; $\lambda_{\text{возб.}} = 345 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 569 \text{ нм}$, ширины входной и выходной щелей – 5 нм)

Система	Выбранные параметры			
	рН	с _{пб} , мкМ	с(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.

**Сравнительный анализ изученных флуориметрических систем
для определения артемизинина**

Флуориметрическое определение артемизинина в модельных растворах.

В выбранных нами условиях (табл. 18) разработали методики определения АМ (гл. 3.3), аналитические характеристики которых представлены в табл. 19.

Таблица 19. Аналитические характеристики разработанных флуориметрических методик определения АМ

Система	ДОК, мкМ	Уравнение градуировочной зависимости ($n = 8, P = 0.95$)	r	s_{Γ} при $c_{\text{н}}$ ($n=5$)	$c_{\text{мин}}$, мкМ
ПБ–МП	0.1 – 7	$y^a = (0.101 \pm 0.003)x + (1.060 \pm 0.010)$	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

^a $y - I_0/I$, $x - c$, мкМ.

Сопоставление коэффициентов чувствительности и пределов обнаружения двух методик показывает, что система с биологическим катализатором позволяет определять АМ с большей чувствительностью практически в одном и 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} обладает слабым собственным тушением. Обе

методики характеризуются хорошей воспроизводимостью. Следует отдельно оговорить тот факт, что в литературе предел обнаружения для систем с участием цитохрома *c*, Гб, ПХ и тирозиназы рассчитывали в отсутствие этанола, поскольку методики разрабатывались для определения АМ в сыворотке крови и моче. В связи с этим сопоставлять характеристики предложенных нами и известных из литературы флуориметрических методик определения АМ (табл. 3) не совсем корректно.

Потенциально определению АМ могут мешать ионы металлов, способные образовывать комплексы с определяемым соединением (Fe(II), Fe(III), Mn(II), Cu(II)) (гл. 2), и/или влиять на эффективность действия катализатора (Mg(II), Mn(II)). Кроме того, можно ожидать, что мешающее действие на результаты определения АМ будут оказывать такие вспомогательные компоненты БАД, как стеарат магния и инулин (полимер D-фруктозы, гидролизующийся до глюкозы). К сожалению, изучить мешающее действие последних не удалось из-за отсутствия их препаратов.

Считали, что компонент не мешает определению АМ, если в его присутствии относительная погрешность величины I_0/I изменялась менее чем на $\pm 5\%$ по сравнению с таковой в его отсутствие. Изучение селективности разработанных методик (табл. 20) при концентрации АМ в системе 1 мкМ показало, что методики сопоставимы по селективности между собой и с методиками, описанными в литературе (табл. 3, гл. 2).

Таблица 20. Влияние посторонних веществ на результаты определения 1 мкмоль \times л⁻¹ АМ с использованием разработанных методик

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

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

Определение типа тушения флуоресценции. Разработанные методики определения АМ основаны на эффекте тушения флуоресценции, поэтому представлялось целесообразным выяснить тип этого тушения. В общем случае различить статическое и динамическое тушение можно по измерению времени затухания флуоресценции [245]. При статическом тушении связанные в комплекс флуорофоры не

флуоресцируют, наблюдается флуоресценция только несвязанных флуорофоров, для которых время затухания равно t . Таким образом, для статического тушения $t_0/t = 1$, где t_0 и t – время затухания флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно. Динамическое тушение характеризуется одинаковым уменьшением интенсивности и времени затухания флуоресценции в зависимости от концентрации тушителя: $I_0/I = t_0/t$ [194].

Для определения типа тушения флуоресценции рассчитали время тушения флуоресценции ПБ в отсутствие (t_0) и в присутствии АМ (t) при 5 концентрациях тушителя, поскольку линейность, наблюдаемая в координатах Штерна-Фольмера ($I_0/I - [Q]$, где $[Q]$ — концентрация тушителя, то есть АМ), (табл. 17) еще не доказывает динамический характер тушения. При использовании в качестве катализатора МП концентрации АМ в реакционном растворе составляли 0,5, 1, 2, 3 и 5 мкМ, а при катализе комплексом $\{Mn(II)-ДДС\}$ – 0,5, 1, 3, 5 и 7 мкМ. Как видно из рис. 102, зависимости для обеих систем подчиняются уравнению $I_0/I = t_0/t$, то есть очевиден динамический тип тушения флуоресценции.

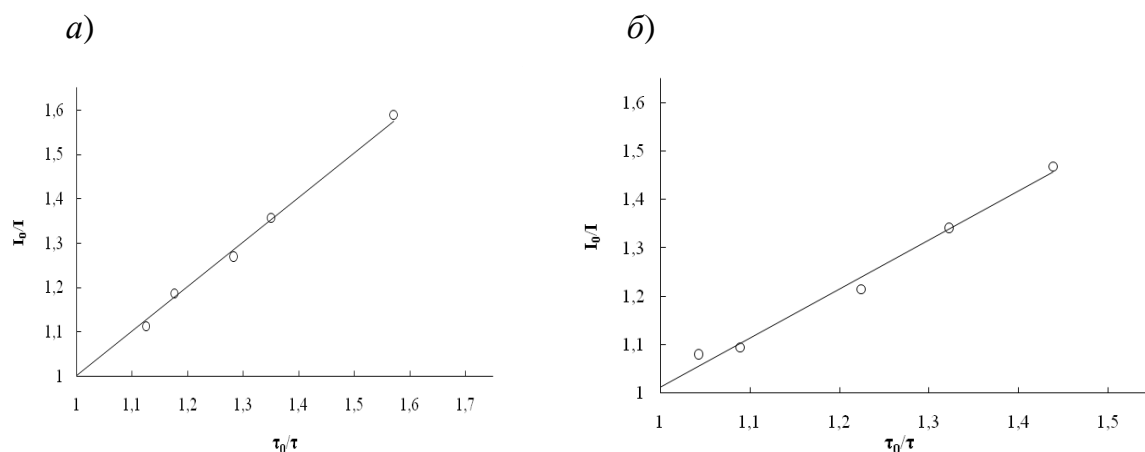


Рис. 102. Зависимость I_0/I и t_0/t от концентрации АМ. Концентрации: ПБ – 2 мкМ (а, б), МП – 4 мкМ (а), Mn(II) и ДДС – 0,1 мМ (б) (универсальный буферный раствор, рН 5,9).

Поскольку тушитель влияет только на возбужденное состояние флуорофора, дополнительным аргументом в пользу динамического тушения является тот факт, что структура спектра поглощения ПБ не меняется в присутствии АМ (рис. 102). В спектрах поглощения красителя отсутствуют возмущения, которые обычно возникают при статическом тушении, например, при образовании комплекса тушителя с флуорофором. Все вышесказанное позволяет сделать вывод о том, что в реакционном растворе в обеих обсуждаемых системах существует один тип флуорофоров, одинаково доступных для тушителя, то есть наблюдается динамическое тушение.

Динамическое тушение описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$I_0/I = 1 + K_{\text{дин}}[Q] = 1 + k_a t_0 [Q],$$

где $K_{\text{дин}} = k_a t_0$ – штерн-фольмеровская константа тушения, k_a – бимолекулярная константа скорости тушения. Полезно отметить, что $K_{\text{дин}}^{-1}$ равна концентрации АМ, при которой $I_0/I = 2$, т.е. тушится на 50%.

Таблица 21. Характеристики тушения флуоресценции ПБ артемизинином в присутствии МП и комплекса {Mn(II)–ДДС}

Система	Уравнение Штерна-Фольмера	$r (n=8)$	$K_{\text{дин}}, \text{мкМ}^{-1}$	$k_a, \text{мин}^{-1}$
ПБ–МП	$y^a = 0.114x + 1$	0.9864	0.114	0.012
ПБ–{Mn(II)–ДДС}	$y = 0.068x + 1$	0.9900	0.068	0.015

^a y – I_0/I , x – $c(\text{AM})$, мкМ.

Данные табл. 21 свидетельствуют о том, что скорость затухания флуоресценции в системе ПБ–{Mn(II)–ДДС} в присутствии АМ несколько выше, чем в ферментативной системе, однако, принимая во внимание рассчитанные значения коэффициента корреляции для обеих систем, вряд ли можно считать это различие статистически значимым. Величина $K_{\text{дин}}$ для ферментативной реакции почти в два раза больше таковой для неферментативной, а это означает, что в присутствии МП концентрация АМ (8.77 мкМ), вызывающая 50%-ное тушение флуоресценции ПБ, в 2 раза меньше, чем в системе {Mn(II)–ДДС}. Таким образом, ферментативная система предпочтительнее неферментативной в аспекте чувствительности флуоресцентного сигнала к присутствию тушителя, АМ.

Расчет кинетических параметров каталитических реакций. Для сравнения эффективности действия биокатализатора, МП, и синтетического катализатора, {Mn(II)–ДДС}, имитирующего оксидоредуктазу, рассчитали кинетические параметры каталитических реакций окисления ПБ артемизинином. Кинетические данные линеаризовали в координатах Лайнуивера-Берка, Хейнса и Иди-Хофсти [138] при постоянной концентрации АМ 5 мкМ и трех различных концентрациях катализаторов. Фиксировали начальную скорость реакций в стационарных условиях. Полученные линейные зависимости для систем ПБ–МП и ПБ–{Mn(II)–ДДС} представлены на рис. 3 и 4 в Приложении 3.

Таблица 22. Кинетические параметры систем ПБ–МП (I) и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (II) в присутствии 5 мкМ АМ как субстрата ($n = 3, P = 0.95$)

Координаты	Система	K_m , мкМ	$V_{\max.}$, мкМ \times с $^{-1}$	$k_{\text{кат.}}$, с $^{-1}$
Лайнуивер-Берк	I	18 \pm 1	0.58 \pm 0.02	0.145 \pm 0.005
	II	31 \pm 9	0.42 \pm 0.08	0.0042 \pm 0.0008
Хейнс	I	17 \pm 1	0.58 \pm 0.02	0.145 \pm 0.005
	II	36 \pm 9	0.50 \pm 0.09	0.0050 \pm 0.0009
Иди-Хофсти	I	17 \pm 1	0.58 \pm 0.02	0.145 \pm 0.005
	II	25 \pm 3	0.36 \pm 0.02	0.0036 \pm 0.0002

Из кинетических данных, приведенных в табл. 22, видно, что для системы ПБ–МП численные значения K_m и $V_{\max.}$, рассчитанные тремя графическими методами, хорошо согласуются между собой. Однако при использовании комплекса {Mn(II)–ДДС} кинетические параметры различаются, причем даже те их значения, которые рассчитаны методами Иди-Хофсти и Хейнса. Известно [246], что эти методы дают более точные результаты, чем метод Лайнуивера-Берка, поскольку величины, откладываемые на осях в координатах Хейнса и Иди-Хофсти, входят как зависимые, так и независимые переменные. Несмотря на обнаруженные различия, при замене {Mn(II)–ДДС} на МП очевидна тенденция уменьшения величины константы Михаэлиса и повышения величины максимальной скорости, что в совокупности с рассчитанной каталитической константой, которая в 5 раз больше для ферментативной системы, позволяет обоснованно считать МП более эффективным катализатором, чем комплекс {Mn(II)–ДДС}.

Таким образом, в результате изучения кинетики индикаторных реакций в присутствии АМ, расчета и сопоставления их кинетических параметров, а также аналитических характеристик показали, что для определения АМ использование индикаторной системы ПБ–МП более предпочтительно, чем системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Кроме того, в присутствии МП эффект динамического тушения АМ флуоресценции ПБ выражен в 2 раза сильнее. Селективность и экспрессность разработанных флуориметрических методик по отношению к изученным соединениям сопоставимы, что позволяет использовать их для определения АМ в одних и тех же БАД. Единственным недостатком ферментативной системы можно считать ее большую «уязвимость» к действию этанола.

Флуориметрическое определение артемизинина в БАД

С целью апробации разработанных флуориметрических методик определения АМ с использованием систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП проанализировали препараты БАД, сведения о которых приведены в табл. 23. Указанные препараты успешно применяют в медицине для лечения и профилактики малярии. В послед-

нее время лекарственные средства, в том числе и БАД, на основе полыни *Artemisia annua* L. используют также для лечения рака, в особенности рака груди и лейкемии [247].

При выборе способа пробоподготовки опирались на имеющиеся литературные данные о растворимости АМ и вспомогательных компонентов фармацевтических препаратов в воде и органических растворителях, а также об эффективных методах извлечения АМ из сухого растительного сырья [84]. От применения неполярных органических растворителей, например, гексана, отказались, поскольку извлечение АМ из лекарственного растительного сырья сопровождается соэкстракцией эфирных масел, хлорофилла и восков.

Таблица 23. Сведения о БАД, использованных в работе

БАД	Фирма-производитель	Лекарственная форма	Вспомогательные вещества
«Best Artemisinin» (образец №1) «Artemisia annua intense» (образец №2)	«Doctor's best», США «novoForm- PharmaGmbH», Германия	Капсулы с очищенным экстрактом Капсулы с сухим рас- тительным экстрактом	Целлюлоза, стеарат магния Инулин

Для извлечения АМ из БАД использовали экстракцию этанолом и водой. Эффективность экстракции АМ из биомасс с помощью этанола достигает 91% при комнатной температуре [246]. Дополнительными аргументами в пользу выбора этанола в качестве экстрагента являются выявленное нами его преимущество перед другими полярными органическими растворителями в разработанных флуориметрических методиках и его доступность. Хотя в ряде публикаций [84] горячая вода признана малоэффективным экстрагентом при извлечении АМ из растительного сырья, мы решили проанализировать водную вытяжку образца №2 для сравнения результатов, полученных при использовании двух экстрагентов, а также для предварительной оценки вклада компонентов этанольного и водного экстрактов в конечный результат анализа. Прежде всего, представляют интерес такие компоненты, как растительные флавоноиды, нерастворимые в воде (в отличие от их гликозидов), но растворимые в этаноле, которые способны действовать синергично с АМ против малярийного плазмодия и раковых клеток [189].

Разработка методики определения АМ в препарате «BestArtemisinin». Содержимое капсулы препарата «Best Artemisinin» представляет собой мелкий однородный белый порошок (рис. 103), не растворимый в воде комнатной температуры и ограниченно растворимый в этаноле. Образование нерастворимого в воде и этаноле осадка обусловлено присутствием в составе образца №1 целлюлозы, а также стеарата магния, хорошо растворимого в этаноле, но ограниченно растворимого в воде, 0.003 г в 100 г, 15°C [248]. Применение в качестве экстрагента этанола позво-

ляет полностью перевести в раствор содержащийся в препарате АМ в количестве 100 мг на 1 капсулу совместно с сопутствующим вспомогательным компонентом стеаратом магния.



Рис. 103. Фотографии содержимого капсул БАД «BestArtemisinin» (а) и «Artemisia annua intense» (б).

На рис. 104 приведены спектры поглощения стандартного этанольного раствора АМ и раствора образца №1 в этаноле после отделения целлюлозы центрифугированием ($1000 \text{ об.} \times \text{мин}^{-1}$) и фильтрования через бумажный фильтр. В спектре поглощения образца №1 в отличие от спектра поглощения стандартного раствора АМ в интервале длин волн 250–310 нм выраженный максимум отсутствует, что, по-видимому, связано с наложением максимумов поглощения АМ и стеарата магния. К сожалению, мы не смогли зарегистрировать спектр поглощения стеарата магния из-за недоступности препарата. Поскольку для оценки качества этого вспомогательного вещества применяют главным образом метод инфракрасной спектроскопии, найти подтверждение нашему предположению не удалось и в литературе.

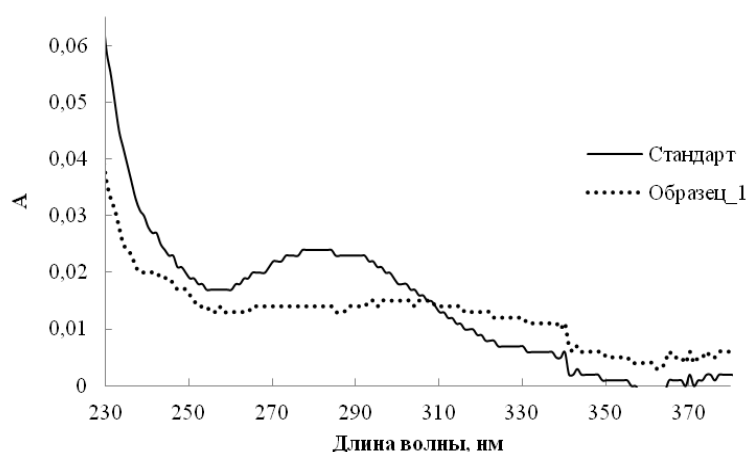


Рис. 104. Спектры поглощения 0.5 мМ стандартного этанольного раствора АМ и раствора препарата «Best Artemisinin» в этаноле (раствор сравнения – этанол, $l = 1 \text{ см}$).

Для изучения динамики экстракции АМ в этанол через определенные промежутки времени отбирали аликвоты надосадочной жидкости, последовательно вво-

дили их в системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП (согласно методикам 10а, б), по экспериментальным данным рассчитывали величины I_0/I и строили зависимости I_0/I от времени проведения экстракции. Установили, что через 2 ч после начала экстракции величина I_0/I перестает зависеть от времени. Это время выбрали для проведения экстракции АМ из образца №1 для дальнейшего определения эндопероксида в экстракте.

Препарат «Best Artemisinin» анализировали по методикам 9а и 9б, приведенным в гл. 3.3. Результаты флуориметрического определения АМ в препарате «Best Artemisinin» представлены на рис. 105–107 и табл. 24.

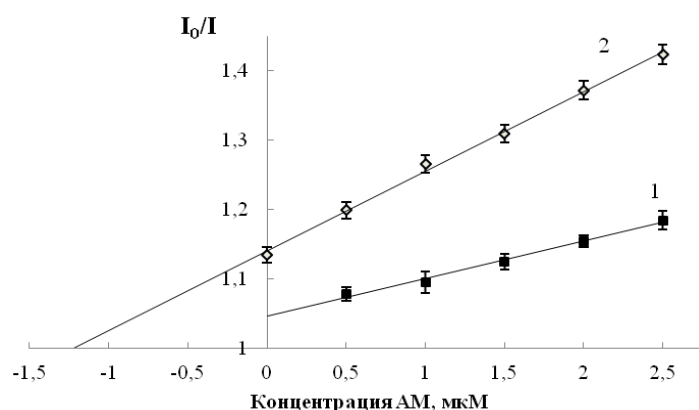


Рис. 106. Определение АМ в препарате «Best Artemisinin» по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (УБР, pH 5.9).

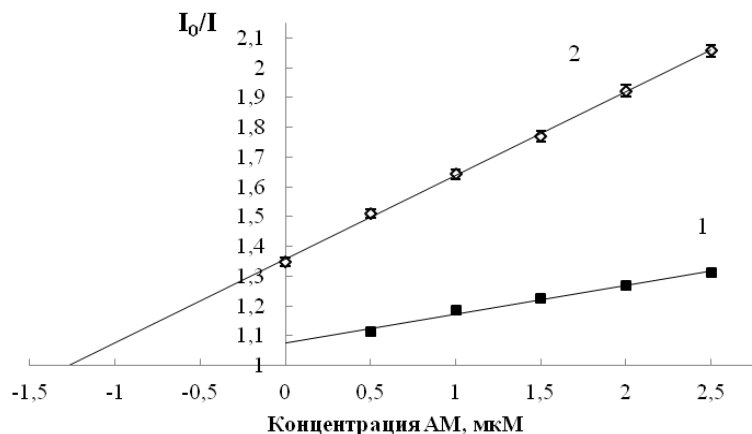


Рис. 107. Определение АМ в препарате «Best Artemisinin» по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 4 мкМ (УБР, pH 5.9).

Таблица 24. Результаты флуориметрического определения АМ в БАД «Best Artemisinin» с использованием систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП, полученные методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) ($n = 5, P = 0.95$). Содержание АМ в экстракте по данным производителя 18 мМ

Система	Метод	Уравнение градуировочной зависимости $I_0/I = ac_{AM} + b$				r	Найдено АМ, мМ в экстракте*
		a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$		
		мкМ ⁻¹					
ПБ–{Mn(II)–ДДС}	I	0.063	0.001	1.033	0.004	0.9984	24 ± 2
	II	0.115	0.003	1.140	0.005	0.9983	17 ± 1
ПБ–МП	I	0.097	0.003	1.079	0.014	0.9949	42 ± 2
	II	0.280	0.004	1.358	0.007	0.9991	19 ± 1

* s_r не превышает 0.03 ($n = 5, P = 0.95$)

Анализ данных табл. 24 показал, что для обеих изученных флуориметрических систем крутизна градуировочных зависимостей при определении АМ методом добавок в 2-3 раза выше, чем у полученной методом градуировочного графика. Этот факт свидетельствует о мешающем влиянии матрицы на результаты флуориметрического определения АМ, которое наиболее заметно в случае системы ПБ–МП. Завышенные результаты, полученные методом градуировочного графика, обусловлены, по-видимому, мешающим действием стеарата магния. Результаты флуориметрического определения АМ методом добавок согласуются с данными производителя о содержании АМ в образце №1 (табл. 25). Время анализа образца №1, включающего пробоподготовку, не превышает 6 ч.

Таблица 25. Результаты анализа БАД «Best Artemisinin» на содержание АМ с использованием разработанных флуориметрических методик методом добавок ($n = 5, P = 0.95$)

Система	Найдено	Паспортное содержание
	мг/капсула	
ПБ–{Mn(II)–ДДС}	99 ± 6	100
ПБ–МП	108 ± 6	

Разработка методики определения АМ в препарате «Artemisia annua intense». Содержимое капсулы препарата «Artemisia annua intense» представляет собой смесь измельченной сухой полыни с инулином в соотношении 30:1 (рис. 103, б). Инулин (полисахарид, полимер D-фруктозы) очень трудно растворим в холодной воде, лучше растворяется в теплой воде (30–50°C) и легко растворим в горячей воде (60–80°C). Следовательно, можно ожидать, что при растворении образца №2 в горячей воде в раствор полностью перейдут и АМ (если содержание в препарате не

превышает его растворимость, 4.3 ммоль л^{-1} , что составляет 0.1214 г в 100 мл воды [249]), и инулин. При растворении образца №2 в горячей воде получили коричневый раствор со взвесью, внешне напоминающий заваренный чай. Взвесь на этапе предварительных испытаний сразу отделяли центрифугированием ($1000 \text{ об.} \times \text{мин}^{-1}$) и фильтрованием через бумажный фильтр. Маточный раствор оставался оптически прозрачным после остывания до комнатной температуры.

На рис. 108 приведены спектры поглощения этого раствора образца №2 и для сравнения 10 мкМ стандартного водного раствора АМ. Как видно из рис. 108а, спектр поглощения водной вытяжки образца №2 характеризуется интенсивной полосой поглощения при $220\text{--}225 \text{ нм}$, а также слабо выраженными максимумами при 289 и 323 нм и не похож на спектр поглощения стандартного водного раствора АМ, рис. 108б.

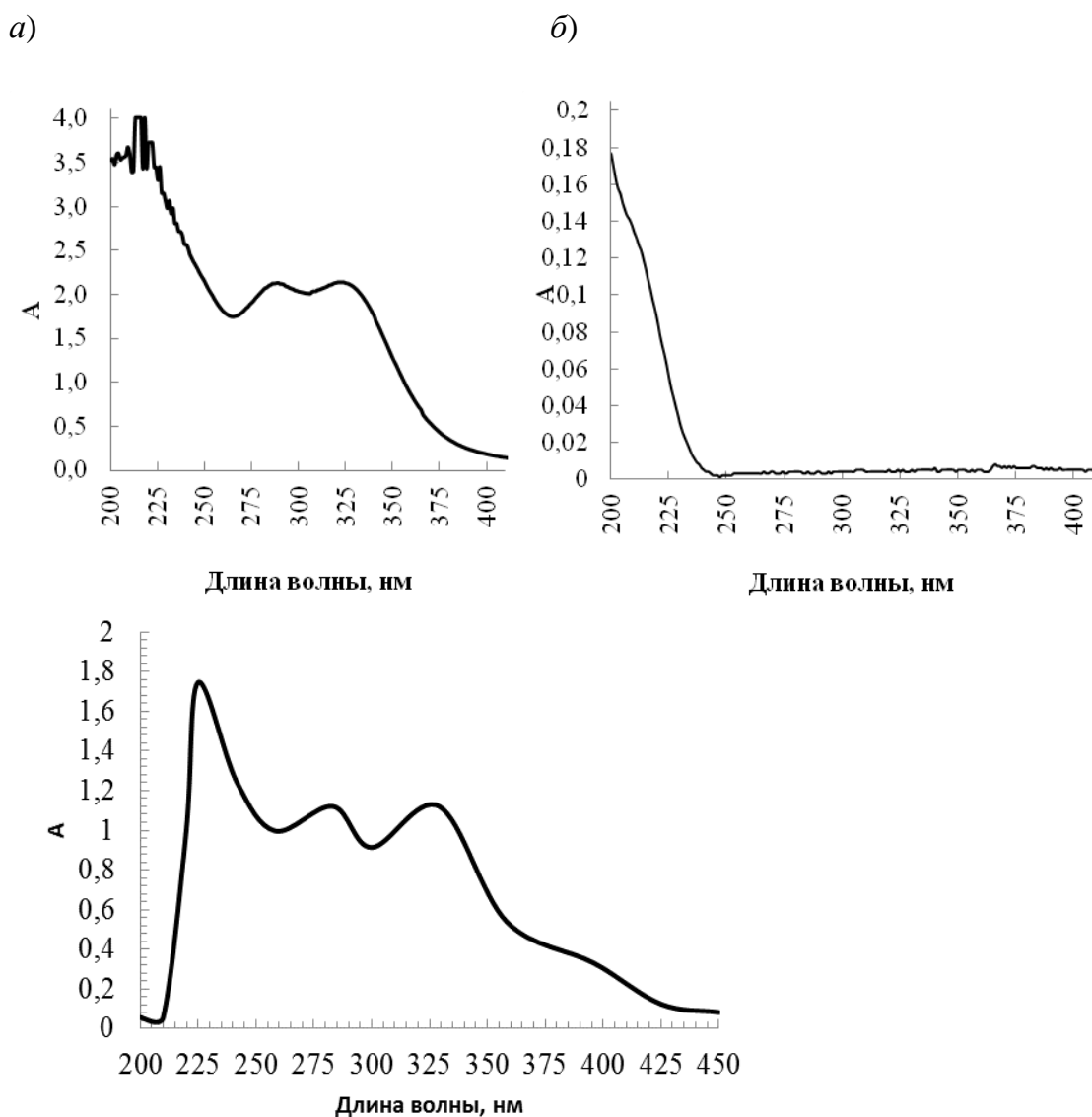


Рис. 108. Спектры поглощения водного раствора препарата «*Artemisia annua intense*» (а), стандартного 10 мкМ водного раствора АМ (б) и водного экстракта «*Artemisia annua tea*» [103] (в) (раствор сравнения – вода, $l = 1 \text{ см}$).

Согласно литературным данным [91] и полученному нами спектру поглощения стандартного водного раствора, АМ характеризуется интенсивной полосой поглощения с максимумом ниже 200 нм (не доступной для регистрации), едва заметным плечом при 220 нм и практически не поглощает при 300 нм и выше. Очевидно, при растворении образца №2 в горячей воде помимо АМ в раствор переходят некоторые компоненты растительного сырья, поглощающие в интервале длин волн 275–375 нм. Инулин в указанном интервале длин волн поглощает слабо [248]. Длины волн максимального поглощения хорошо растворимых в воде гликозидов флавоноидов, содержащих в молекуле 3 и более моносахаридных остатка, варьируют в диапазоне 290 – 360 нм [237]. Спектр водной вытяжки образца №2 очень похож на спектр поглощения водного экстракта «*Artemisi annua tea*», известный из литературы [103] (рис. 108, в). В обоих спектрах присутствуют максимумы при 280 и 324 нм, однако без проведения хроматографического анализа невозможно сказать, к какому классу соединений можно их отнести.

С целью подбора подходящих условий извлечения АМ из образца №2 водой варьировали время проведения экстракции, температуру раствора – 25, 45 и 65°C, а также в двух последних случаях дополнительно использовали ультразвуковую экстракцию при частоте 50 Гц. Согласно литературным данным [113], сочетание повышенной температуры и ультразвука позволяет повысить степень извлечения АМ из растительного сырья по сравнению с традиционным экстракционным процессом, что проиллюстрировано на примере использования гексана в качестве экстрагента. Через определенные промежутки времени: 15, 30, 60 и 90 мин, отбирали аликвоту надосадочной жидкости, полученной растворением навески образца №2 в воде соответствующей температуры, после остывания до комнатной температуры ее вводили последовательно в системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП (согласно методикам 11б, г.) и измеряли флуоресцентный сигнал I при 569 нм, $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм. Контрольный опыт (этанольный раствор ПБ) проводили через все стадии пробоподготовки и измеряли величину I_0 в идентичных условиях.

Из приведенных диаграмм (рис. 109 и 110) видно, что с повышением температуры раствора с 25 до 45°C отношение I_0/I возрастает, что свидетельствует о повышении степени извлечения АМ, однако нагревание раствора до 65°C не приводит к существенному повышению величины I_0/I . Такая ситуация наблюдается сразу после растворения образца №2 в воде. Использование УЗ-экстракции раствора, к сожалению, не приводит к ожидаемому повышению величины I_0/I . Отношение I_0/I наиболее велико при нагревании раствора с образцом №2 до 65°C и проведении

экстракции в течение 30 мин. Дальнейшее увеличение времени экстракции не приводит к статистически значимому увеличению величины I_0/I .

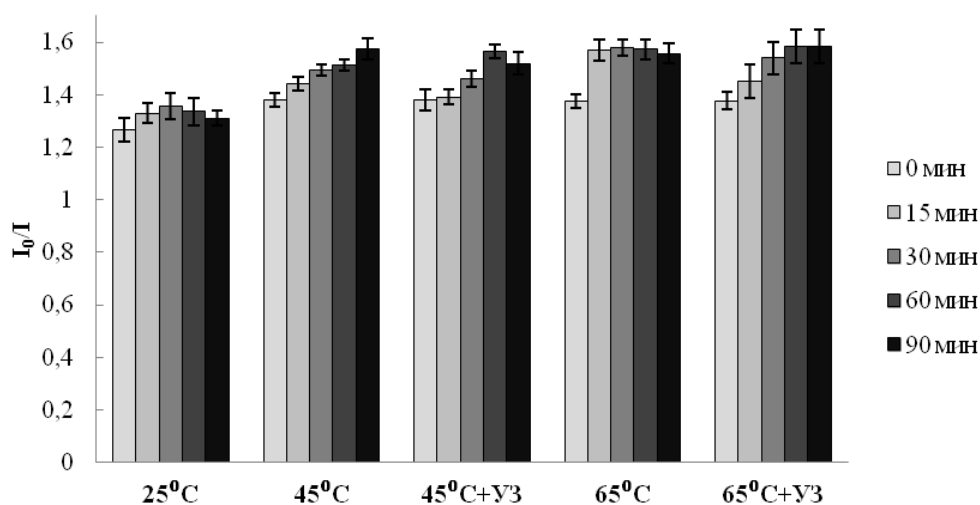


Рис. 109. Зависимость I_0/I в системе ПБ–{Mn(II)}–ДДС от условий экстракции водой АМ из препарата «*Artemisia annua intense*». Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ (УБР, pH 5.9).

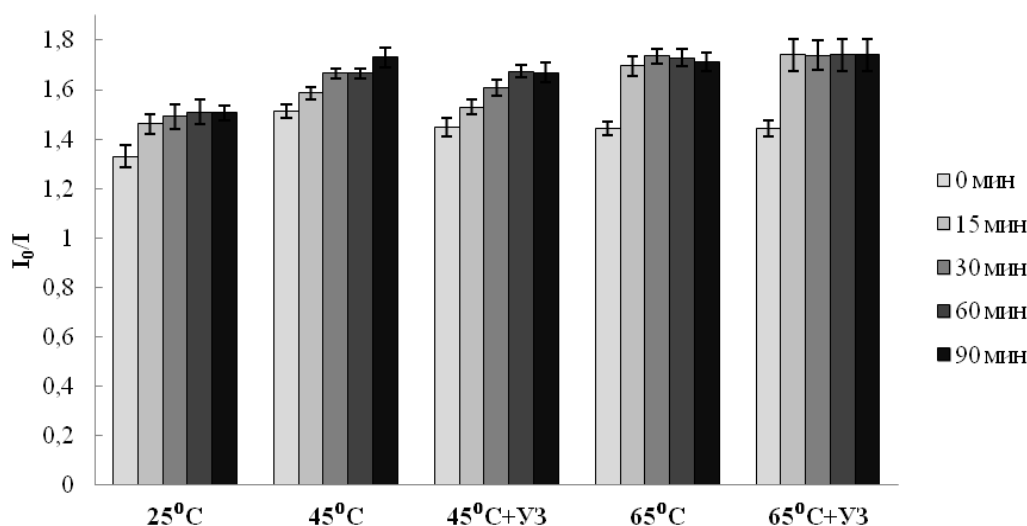


Рис. 110. Зависимость I_0/I в системе ПБ–МП от условий экстракции водой АМ из препарата «*Artemisia annua intense*». Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 4 мкМ.

Как отмечалось ранее в гл. 2 обзора литературы, водные вытяжки сухой пыли *Artemisia annua* L. флуоресцируют при возбуждении их светом с длиной волны 365 нм [103]. Заметим, что стандартный раствор АМ не флуоресцирует при возбуждении при 345 и 365 нм. При изучении флуоресценции водной вытяжки образца №2 при возбуждении при 345 и 365 нм установили (рис. 111а), что максимум ее флуоресценции соответствует 460 нм, а в условиях определения АМ с помощью систем ПБ–{Mn(II)}–ДДС и ПБ–МП ($\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 569$ нм) не превышает 3 усл. ед.

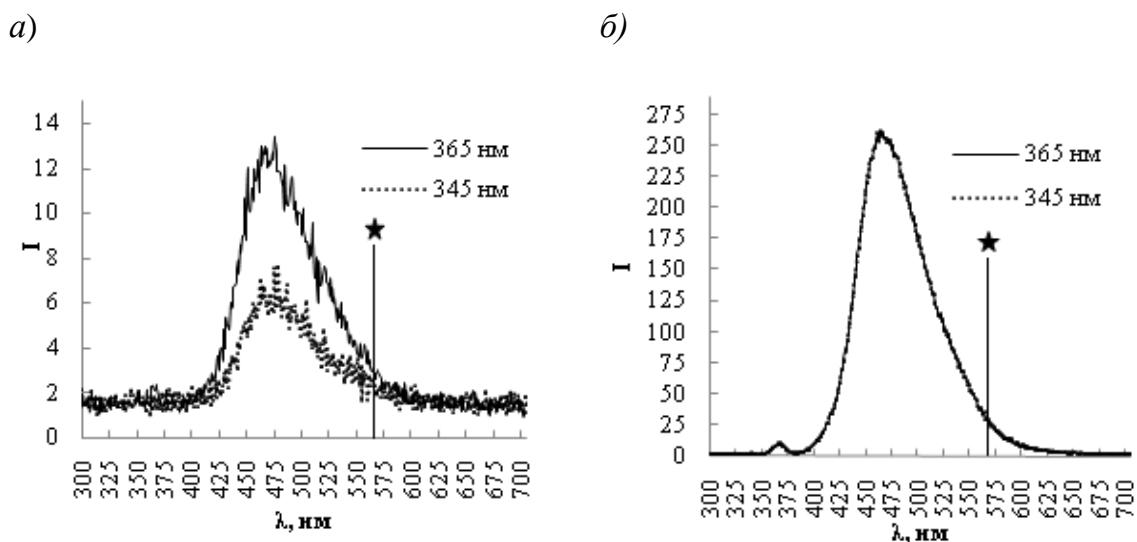


Рис. 111. Спектры флуоресценции водного раствора препарата «*Artemisia annua intense*» при длинах волн возбуждения 345 и 365 нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм (а) и 10 нм (б).

Вклад матрицы водной вытяжки становится существенным, только если регистрировать сигнал при ширинах щелей 10 нм (рис. 111 б), при этом спектры флуоресценции идентичны для систем с двумя значениями длин волн возбуждения. Таким образом, сигнал, обусловленный флуоресценцией матрицы образца №2, по-видимому, из-за присутствия в экстракте флавоноловых гликозидов растительного происхождения, преобладающих в листьях горькой полыни [103], при возбуждении и регистрации флуоресценции ПБ при щелях 5 нм, не должен влиять на результаты определения АМ с помощью разработанных флуориметрических методик. Для оценки вклада матрицы объекта сравнили спектры поглощения водного раствора ПБ и водной вытяжки образца (рис. 112): их перекрывание при длине волны возбуждения 345 нм больше, чем при 365 нм.

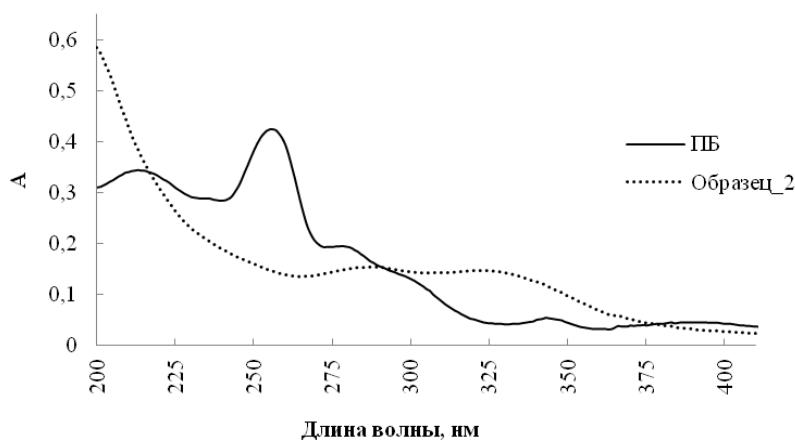


Рис. 112. Спектры поглощения водного раствора препарата «*Artemisia annua intense*» и стандартного 2 мкМ водного раствора ПБ (раствор сравнения – вода, $l = 1$ см).

В этаноле при комнатной температуре образец №2 растворяется частично с образованием белого осадка с коричневыми вкраплениями и бесцветной надосадочной жидкости. По плотности раствора можно судить, что в экстракт частично переходят флавоноиды. Сравнение спектров поглощения этанольного раствора образца №2 после центрифугирования ($1000 \text{ об} \times \text{мин}^{-1}$) и фильтрования через бумажный фильтр (рис. 113) показало, что в интервале длин волн 250–300 нм в обоих спектрах наблюдается размытый максимум АМ, что подтверждает возможность экстракции АМ из образца №2 этанолом. Однако в спектре поглощения образца едва заметно плечо в диапазоне 300–350 нм, которое может быть обусловлено присутствием в экстракте растительных флавоноидов, поглощающих в основном в интервале длин волн $(340 \pm 50) \text{ нм}$ [250].

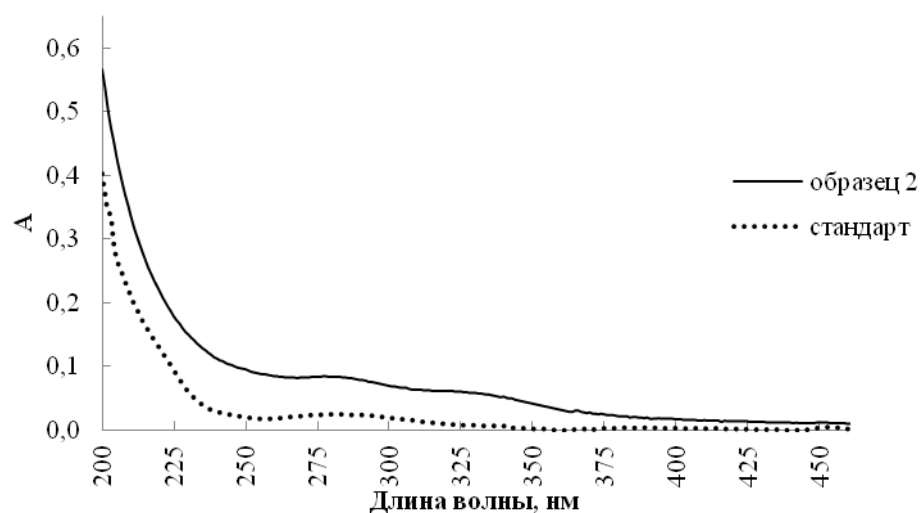


Рис. 113. Спектр поглощения этанольного раствора препарата «*Artemisia annua intense*» (раствор сравнения – этанол, $l = 1 \text{ см}$).

При исследовании динамики экстракции точную навеску образца №2 растворяли в этаноле, полученную смесь встряхивали на шейкере. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, как это указано в методиках 10а, в гл. 3.3, и вводили их последовательно в системы ПБ- $\{\text{Mn}(\text{II})\text{-ДДС}\}$ и ПБ-МП. Из рис. 114 видно, что через 1 ч после встряхивания отношение сигналов I_0/I перестает меняться и кривые для двух индикаторных систем выходят на плато. В качестве наиболее удобного времени экстракции АМ из образца №2 этанолом выбрали 1 ч.

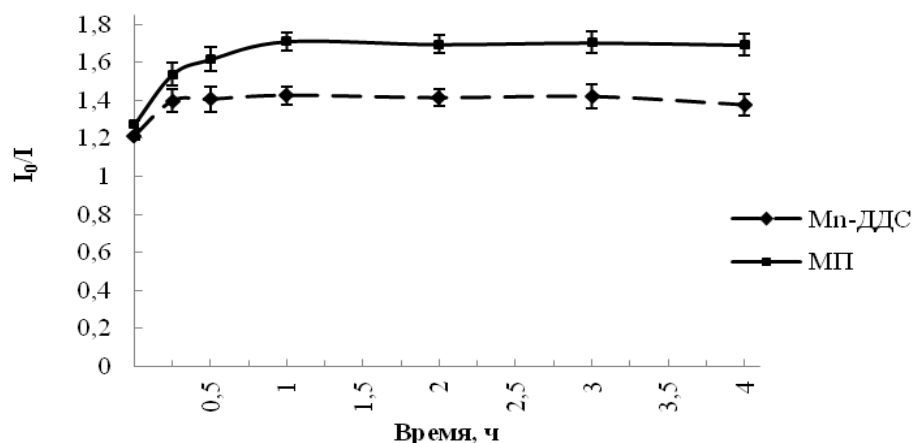


Рис. 114. Зависимость I_0/I от времени экстракции АМ этанолом из препарата «*Artemisia annua intense*». Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ, МП – 4 мкМ).

Препарат «*Artemisia annua intense*» анализировали с использованием двух методов пробоподготовки: экстракции водой при 65°C в течение 30 мин (методики 11б, г) и этанолом при комнатной температуре в течение 1 ч (методики 11а, в).

Результаты флуориметрического определения АМ в препарате «*Artemisia annua intense*» представлены на рис. 115–118, табл. 26 и 27.

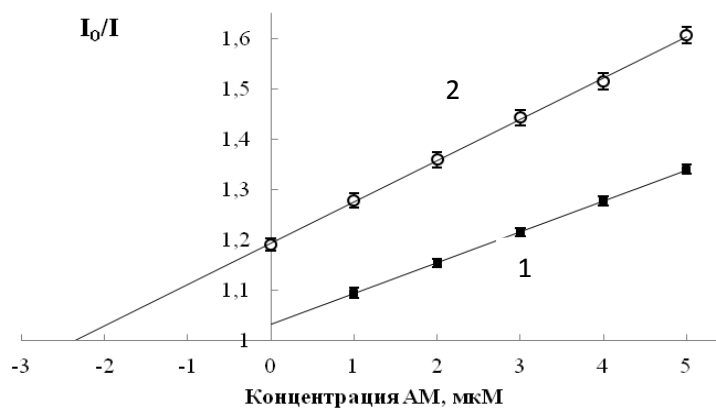


Рис. 115. Определение АМ в препарате «*Artemisia annua intense*» после экстракции водой по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ.

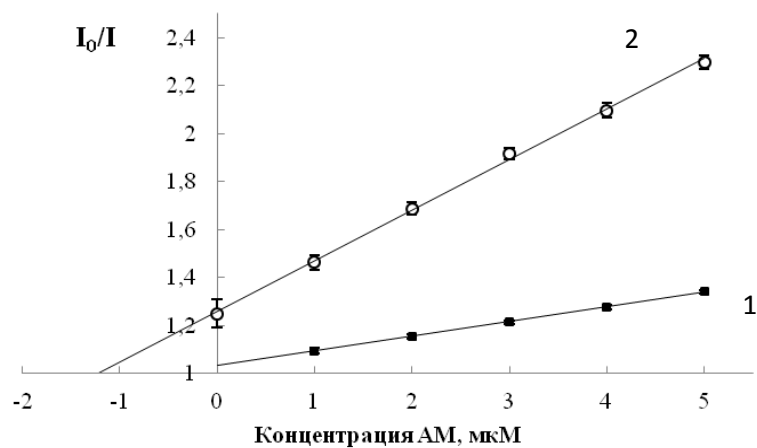


Рис. 116. Определение АМ в препарате «*Artemisia annua intense*» после экстракции водой по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 4 мкМ.

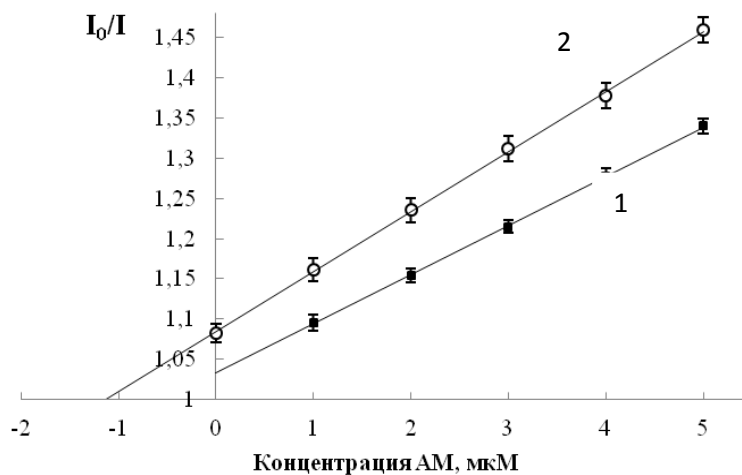


Рис. 117. Определение АМ в препарате «*Artemisia annua intense*» после экстракции этиловым спиртом по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0.1 мМ.

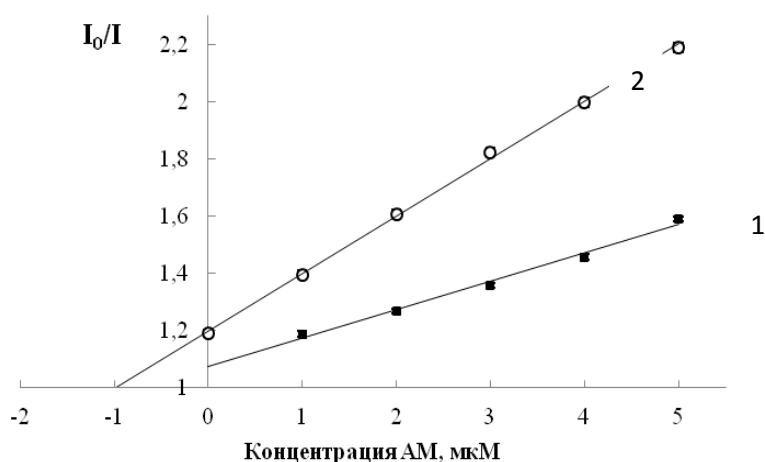


Рис. 118. Определение АМ в препарате «*Artemisia annua intense*» после экстракции спиртом по градуировочной зависимости (1) и методом добавок (2) с использованием системы ПБ–МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 4 мкМ.

Таблица 26. Результаты флуориметрического определения АМ в водном и этанольном экстрактах БАД «*Artemisia annua intense*» с использованием систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП, полученные методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) ($n = 5, P = 0.95$)

Растворитель	Система	Метод	Уравнение градуировочной зависимости $I_0/I = ac_{AM} + b$				r	Найдено АМ, мМ в экстракте*
			a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$		
			мкМ ⁻¹					
Вода	ПБ–{Mn(II)–ДДС}	I	0.063	0.001	1.033	0.004	0.9984	0.76 ± 0.05
		II	0.082	0.001	1.194	0.003	0.9994	0.71 ± 0.01
	ПБ–МП	I	0.097	0.003	1.079	0.014	0.9949	0.54 ± 0.06
		II	0.211	0.004	1.26	0.01	0.9986	0.37 ± 0.02
Этанол	ПБ–{Mn(II)–ДДС}	I	0.097	0.003	1.079	0.014	0.9949	0.54 ± 0.06
		II	0.211	0.004	1.26	0.01	0.9986	0.37 ± 0.02
	ПБ–МП	I	0.097	0.003	1.079	0.014	0.9949	0.35 ± 0.01
		II	0.201	0.003	1.200	0.007	0.9987	0.30 ± 0.01

* s_T не превышает 0.05 ($n = 5, P = 0.95$)

Анализ данных табл. 26 показал, что вне зависимости от природы экстрагента и использованной флуориметрической системы крутизна градуировочных зависимостей при определении АМ методом добавок в подавляющем большинстве случаев больше, чем крутизна градуировочных графиков. Результаты определения концентрации АМ в этанольном экстракте, полученные с применением обеих флуори-

метрических систем, сопоставимы между собой. Напротив, концентрации АМ в водных экстрактах, найденные при использовании систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП, заметно отличаются друг от друга, что указывает на то, что компоненты водной вытяжки в большей степени мешают флуориметрическому определению АМ, чем компоненты этанольного экстракта.

Как видно из данных табл. 27, найденное содержание АМ в сухом растительном экстракте препарата «*Artemisia annua intense*» варьирует от 0.68 до 2.1% в зависимости от выбранных экстракционной методики, флуориметрической системы и метода определения (градуировочный график или метод добавок). К сожалению, на упаковке БАД производитель указал только массу полыни в капсуле (200 мг), сведения о содержании активного компонента АМ отсутствуют. Найденные содержания АМ в большинстве своем находятся в пределах диапазона его содержаний в сухом растительном сырье, известного из литературы, 0.01–1.5% [83, 84].

Таблица 27. Результаты определения АМ в БАД «*Artemisia annua intense*» с использованием систем ПБ–{Mn(II)–ДДС} и ПБ–МП, полученные методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) ($n = 5, P = 0.95$)

Растворитель	Система	Метод	Найдено АМ	
			мг/капсула	%, капсула
Вода	ПБ–{Mn(II)–ДДС}	I	4.3±0.3	2.1±0.1
		II	4.01±0.06	2.00±0.03
	ПБ–МП	I	3.0±0.3	1.5±0.2
		II	2.1±0.1	1.04±0.06
Этанол	ПБ–{Mn(II)–ДДС}	I	1.4±0.1	0.68±0.06
		II	1.92±0.06	0.96±0.03
	ПБ–МП	I	1.98±0.06	0.99±0.03
		II	1.70±0.06	0.85±0.03

Таким образом, важным итогом этого этапа проведенных исследований является то, что:

- выбраны индикаторные системы для определения артемизинина с использованием красителя пиронина Б и катализаторов микропероксидазы-11 и комплекса {Mn(II)–ДДС} – синтетического аналога оксидоредуктаз;
- на основе предложенных индикаторных систем разработаны флуориметрические методики определения антималярийного эндопероксида в растворе, которые апробированы в анализе БАД на основе растительных экстрактов.

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

7.2. Получение пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС} и их применение для определения АМ

Для проведения изученных нами в растворе каталитических индикаторных систем ПБ–МП и ПБ–{Mn(II)–ДДС} (гл. 7.1) в целлюлозной пленке, приготовленной с помощью хлоридной ИЖ, необходимо было решить следующие практические задачи:

- 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 препаратов БАД.

Поскольку мы не располагали информацией о том, как хлоридная ИЖ влияет на каталитическую активность МП, на первом этапе исследования по методике 1б получили пленку состава {целлюлоза–[BMIm][Cl]–МП} с содержанием биокатализатора 0.6 мг и оценили ее каталитическую активность в реакции окисления *o*-ДА пероксидом водорода визуальным методом (методика 5). Установили, что в ходе иммобилизации МП сохраняет только 20% своей исходной каталитической активности в водном растворе, чего явно недостаточно для обеспечения удобной для регистрации скорости реакции окисления ПБ в присутствии АМ в целлюлозной пленке. Это обстоятельство и обусловило наш дальнейший интерес исключительно к применению в составе целлюлозной пленки синтетического катализатора, комплекса {Mn(II)–ДДС}.

Пленку {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС} получали по методике 1ж, предварительно убедившись в том, что анионный ДДС при концентрации 1 мМ[§] (в 8 раз меньшей, чем ККМ) не изменяет флуоресцентные свойства красителя при его возбуждении при 355 нм в растворе нагретой до температуры плавления хлоридной ИЖ (рис. 120). Обратим внимание на то, что флуоресцентный сигнал ИЖ в аналитическом диапазоне длин волн, то есть при 550–650 нм, не превышает 9–10 усл. ед., следовательно, можно было ожидать, что остаточные количества ИЖ в составе пленки не будут мешать определению АМ при 581 нм по полосе испускания ПБ.

[§] Такая концентрация ПАВ в растворе получается при растворении 0.3 мг ДДС в 1 мл хлоридной ИЖ.

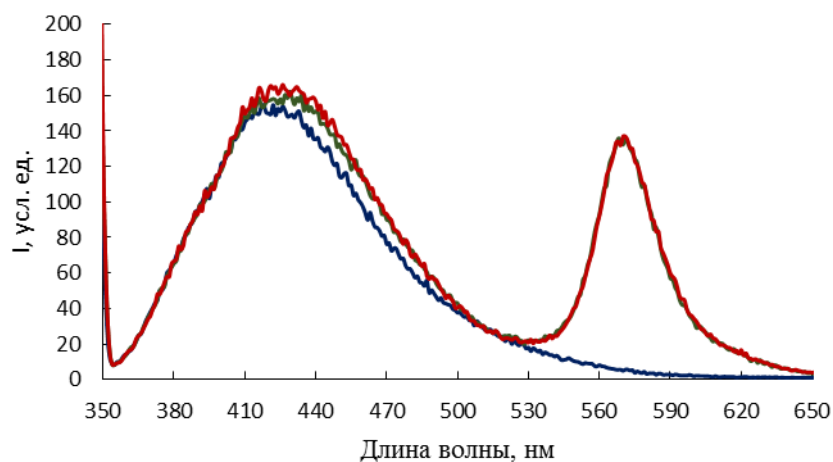


Рис. 120. Спектр флуоресценции [BMIm][Cl] и растворов ПБ в [BMIm][Cl] в **отсутствии** и в **присутствии ДДС** (содержание ПБ и ДДС в 1 мл раствора 0.6 и 0.3 мг соответственно; $\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм, ширины входной и выходной щели – 5 нм).

Для выбора подходящего состава пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ} варьировали содержания красителя, Mn(II) и ДДС, а также соотношение последних. Флуоресцентный сигнал пленок регистрировали как описано в методике 6. Как видно из рис. 121, при увеличении содержания красителя от 0.1 до 0.3 мг величина сигнала флуоресценции быстро возрастала, а затем при содержаниях 0.4–0.7 мг уменьшалась вследствие концентрационного тушения. В качестве подходящего содержания красителя выбрали 0.3 мг, при котором флуоресцентный сигнал был наибольшим.

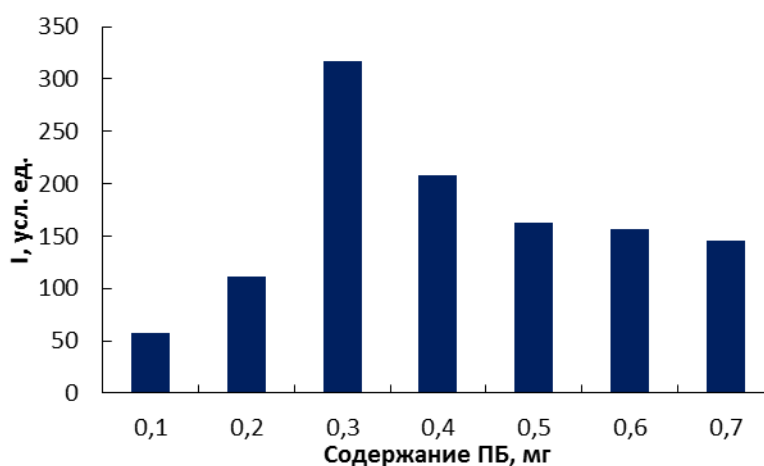


Рис. 121. Зависимость интенсивности флуоресценции пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ} от содержания красителя в исходной смеси ($\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 581$ нм; ширины входной и выходной щелей – 5 нм).

При иммобилизации в целлюлозную пленку Mn(II) и ДДС пленки становятся менее прочными, чем в отсутствие ПАВ, аналогично тому, как было, когда в пленку иммобилизовали ДДС (гл. 6.2). При избытке какого-то одного из компонентов

комплекса пленка становится непрочной, непригодной к использованию. Приемлемое для работы качество пленки обеспечивает мольное соотношение Mn(II):ДДС $\approx 1:1$.

При этом сигнал флуоресценции в пленке {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} был наибольшим при содержаниях реагентов, указанных в табл. 28, – 200 усл. ед. вместо ожидаемых 300 усл. ед., когда краситель растворяли только в ИЖ (рис. 121). Уменьшение сигнала более чем на 30%, возможно, связано с бóльшим вымыванием катионного ПБ в процессе отмывки избыточного количества ИЖ водой из-за присутствия в составе пленки анионного ПАВ.

Таблица 28. Выбранные содержания компонентов в растворе для приготовления пленки {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС}

Вещество	Целлюлоза	ИЖ ^а	ПБ ^б	MnCl ₂	ДДС
Содержание, мг	44	1100	0.25	0.2	0.35

^а ИЖ впоследствии удаляли из целлюлозной пленки промыванием водой.

^б Содержание указано с учетом вымывания в процессе приготовления пленки.

Установили, что *морфология поверхности пленки* {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} с красителем и синтетическим катализатором (рис. 122) отличается от таковой для пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ} (рис. 60): на поверхности материала видна слоистая структура с неоднородными белесыми включениями, образование которой обусловлено введением в пленку комплекса {Mn(II)-ДДС}.

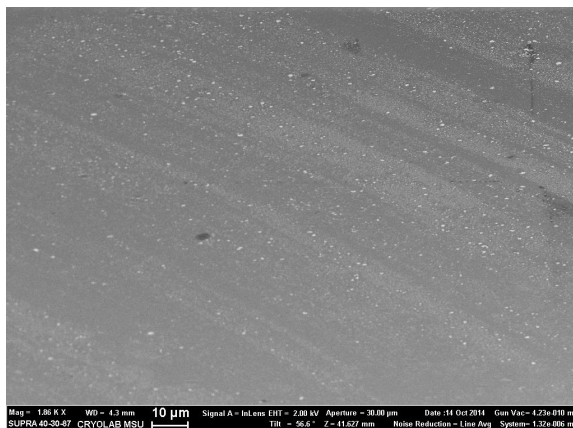


Рис. 122. СЭМ фотографии пленок состава {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС}, полученной по методике 1ж. Увеличение в 1860 раз.

Выбор условий регистрации флуоресцентного сигнала пленок {целлюлоза-[BMIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС}. Для выбора *подходящего значения pH и времени проведения индикаторной реакции* пленку, приготовленную по методике 1ж и предварительно промытую водой, помещали в УБР (5.0 мл), кислотность которого варьировали в интервале 5.0–6.5, и регистрировали флуоресцентный сигнал пленки

(методика 6, табл. 29) до и после проведения реакций в отсутствие и в присутствии АМ (50 мкМ) каждые 30 с в течение 1.5 мин. По полученным результатам рассчитывали величины I_0/I при трех значениях рН и трех интервалах времени (табл. 29).

Таблица 29. Зависимость интенсивности флуоресценции и величины I_0/I пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} от рН и времени проведения реакции в присутствии 50 мкМ АМ

рН	I , усл. ед. при t , с			
	0	30	60	90
5.0	144.34	79.60	65.60	51.84
5.9	199.70	55.42	48.80	33.65
6.5	201.93	99.23	80.85	55.12
I_0/I				
5.0	1.00	1.81	2.20	2.78
5.9	1.00	3.60	4.09	5.93
6.5	1.00	2.03	2.49	3.66

Из данных табл. 29 видно, что, как и при проведении реакции в растворе наибольшее уменьшение сигнала ПБ в присутствии АМ наблюдается при рН 5.9, при этом эффект тушения флуоресценции усиливается во времени. Однако скорость уменьшения сигнала пленки заметно выше, чем в растворе (рис. 98, кривая 2). Это обстоятельство связано с частичным, хорошо воспроизводимым вымыванием красителя из пленки ($s_f = 0.03$, $n=3$) в процессе проведения реакции. Во избежание потерь ПБ в качестве подходящего времени проведения реакции выбрали 30 с, при котором вымывание ПБ не превышает 3%.

В установленных 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. 30 *аналитические характеристики* такого *определения АМ* представлены в сравнении с аналогичными характеристиками, полученными нами при проведении реакции в растворе (гл. 7.1). Из данных таблицы видно, что ДОК при использовании пленки остается таким же, как и для методики в растворе, однако крутизна градуировочной зависимости повышается в 2 раза. При этом стоит отметить, что методика, разработанная для определения АМ в растворе, отличается от методики 14 с применением целлюлозной пленки более низким пределом обнаружения и значительно более высокой воспроизводимостью результатов анализа (табл. 30).

Таблица 30. Аналитические характеристики определения АМ в системе ПБ–Mn(II)–ДДС с помощью пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и в растворе ($P = 0.95$)

Регистрация сигнала ($\lambda_{\text{возб.}}/\text{фл.}, \text{нм}$)	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, $n = 5$)	0.13	0.02	1.2	0.2	0.9153	0.23
Раствор (345/ 569)	0.2 – 8 (0.004, $n = 8$)	0.0622	0.0009	1.035	0.004	0.9993	0.12

При оценке селективности определения АМ с помощью пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС} считали, что посторонний компонент не мешает определению эндопероксида, если относительная погрешность величины I_0/I в присутствии этого компонента изменяется менее чем на $\pm 10\%$ по сравнению с таковой в его отсутствие. Выбранный критерий был более мягким по сравнению с критерием для определения АМ в растворе, для которого допустимая относительная погрешность в присутствии мешающего компонента составляла менее $\pm 5\%$ (табл. 20). Это основано на том, что погрешность определения с помощью твердофазных оптических сенсоров обычно более высокая [161], чем в растворе. Сопоставление данных табл. 31 и 20 показало, что определение АМ с помощью целлюлозных пленок уступает по селективности методике, разработанной для анализа в растворе. Сигнал пленки, более чувствителен к изменению химического состава раствора, в который она погружена. По нашему мнению, это может быть связано со способностью целлюлозной пленки к хемосорбции. Наибольшее мешающее влияние на результаты определения 1 мкМ АМ, как и в случае раствора, оказывают ионы Fe(II), образующие комплекс с АМ (гл. 2), а также H_2O_2 , который в присутствии комплекса {Mn(II)–ДДС} окисляет ПБ. В результате сигнал красителя еще больше уменьшается, что приводит к завышенным результатам определения АМ. Однако отметим одну интересную особенность. Ионы марганца(II) и глюкоза, которые усиливали эффект тушения флуоресценции при проведении реакции окисления артемизинином ПБ в растворе, в пленке, напротив, его ослабляли.

Таблица 31. Влияние посторонних веществ на результаты определения 1 мкмоль \times л⁻¹ АМ с использованием пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ–Mn(II)–ДДС}

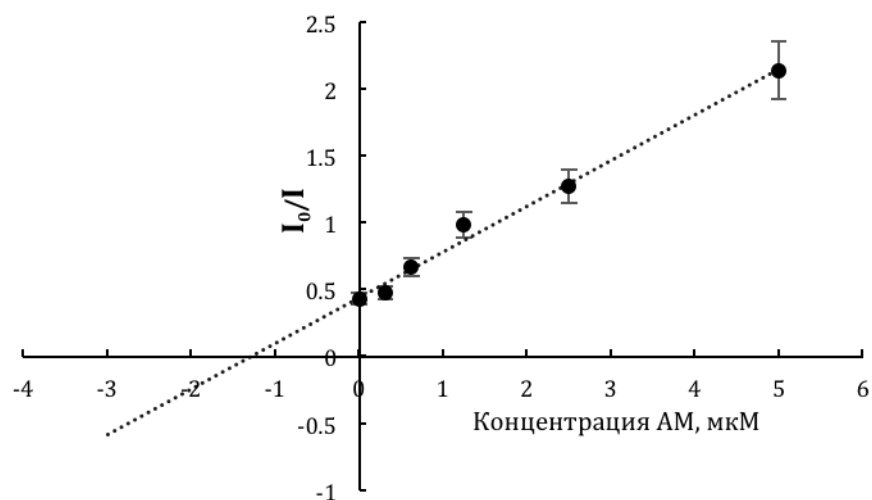
Компонент	Отношение $c_{\text{AM}}:c_{\text{постор. в-во}}$	Δ^a , %
Fe(II)	1:3	+9.6
Fe(III)	1:20	+9.7
Co(II)	1:20	-10.2
Mn(II)	1:20	-9.9
Cu(II)	1:15	+9.8
Mg(II)	1:10	+9.3
Фруктоза	1:50	-9.6
Глюкоза	1:1000	-10.7
H_2O_2	1:2	+10.4

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

Флуориметрическое определение артемизинина в БАД

Для демонстрации практической значимости разработанной нами пленки {целлюлоза–[ВМІm][СІ]–ПБ–Mn(II)–ДДС} для определения АМ с ее помощью проанализировали те же препараты БАД, в которых содержание АМ ранее установили с использованием индикаторной реакции в растворе (табл. 23). Определение АМ в препаратах «Best Artemisinin» и «*Artemisia annua intense*» проводили методом добавок по методикам 14 и 15 соответственно. Для подготовки образца «*Artemisia annua intense*» к анализу использовали экстракцию этанолом в течение 2 ч с последующим фильтрованием. Результаты флуориметрического определения АМ в препаратах БАД с помощью целлюлозных пленок представлены на рис. 123 и в табл. 32.

а)



б)

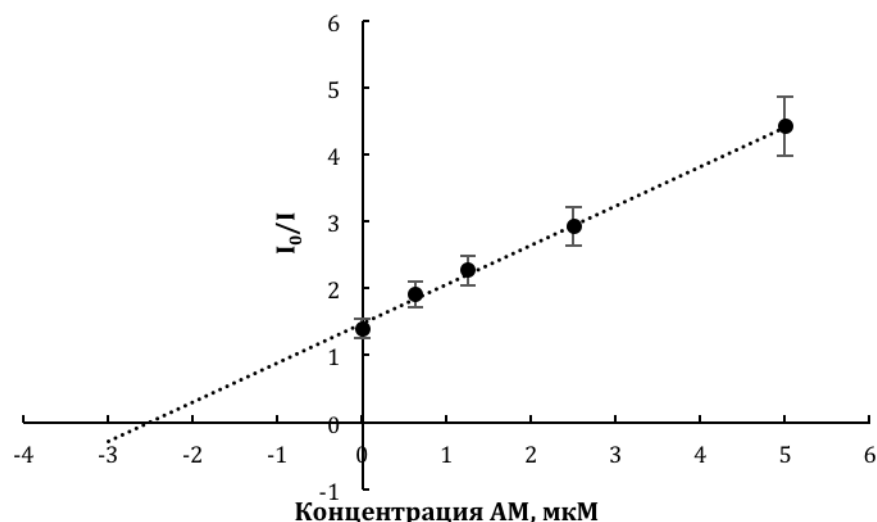


Рис. 123. Определение АМ в препаратах «Best Artemisinin» (а) и «*Artemisia annua intense*» (б) методом добавок с использованием пленок {целлюлоза–[ВМІm][СІ]–ПБ–Mn(II)–ДДС} (УБР, рН 5.9; $\lambda_{\text{возб.}}$ = 355 нм, $\lambda_{\text{фл.}}$ = 581 нм, ширины входной и выходной щелей – 5 нм; $n = 3$, $P = 0.95$).

Таблица 32. Результаты флуориметрического определения АМ в БАД «Best Artemisinin» и «Artemisia annua intense» с использованием системы ПБ–{Mn(II)–ДДС} в пленке {целлюлоза–[BMIm][Cl]} и растворе, полученные методом добавок (пленка: $n = 3$; раствор: $n = 5$; $P = 0.95$). 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

* s_T не превышает 0.07 ($n = 3$, $P = 0.95$).

** s_T не превышает 0.12 ($n = 3$, $P = 0.95$).

Из данных таблицы видно, что результаты определения АМ в препарате «Best Artemisinin», полученные с помощью методики в растворе и при использовании пленки, хорошо согласуются с данными производителя. Содержания АМ в препарате «Artemisia annua intense», найденные с применением целлюлозной пленки, почти в 5 раз выше тех, что получены с использованием методики в растворе. Обнаруженное различие, по нашему мнению, может быть связано с тем, что индикаторная система ПБ–{Mn(II)–ДДС} в составе пленки более чувствительна к компонентам растительного сырья органической природы вследствие сорбционной способности целлюлозного материала. Воспроизводимости методик определения АМ в БАД с применением пленки и индикаторной системы в растворе, как показал тест Фишера, статистически значимо различаются. При этом воспроизводимость анализа с помощью пленки ниже, чем в растворе.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработан материал на основе оптически прозрачной пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]} с иммобилизованным индикаторным реагентом ПБ–Mn(II)–ДДС, который, как мы показали, может служить новым высокочувствительным элементом для будущего флуоресцентного сенсора для определения АМ. Предложенные нами методики определения АМ с использованием разработанного целлюлозного материала и индикаторных систем в растворе по чувствительности по крайней мере в 10 раз превосходят описанные в литературе спектрофотометрические методики и сравнимы с чувствительностью люминесцентных индикаторных систем (гл. 2). Еще одним существенным достоинством разработанных нами методик является их простота. Индикаторный реагент ПБ–Mn(II)–ДДС в отличие от люминола устойчив при хранении;

для проведения реакции с его использованием не требуется нагревание, как в случае дериватизации анисовым альдегидом. Хотя ВЭЖХ методики превосходят разработанные нами методики по селективности, поскольку позволяют определять АМ в смеси с его производными, однако в реальных фармацевтических препаратах и БАД редко встречается более двух соединений артемизининового ряда. Селективность разработанных нами методик по отношению к веществам, которые могут присутствовать в фармацевтических препаратах, не уступает селективности методик, описанных в литературе. Еще одним важным достоинством наших методик является экспрессность. Для проведения индикаторной реакции и одного измерения аналитического сигнала в целлюлозных пленках и растворе требуется не более 2 мин. Длительной является только пробоподготовка реального образца (экстракция АМ), которая необходима только в тех случаях, когда препарат является измельченным растительным сырьем. Все известные из литературы ВЭЖХ методики часто используют не только экстракцию АМ, но и его дериватизацию, что значительно увеличивает время проведения анализа. С помощью разработанной целлюлозной пленки можно определять АМ в фармацевтических препаратах и БАД разного химического состава.

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-[ВМIm][Cl]} с иммобилизованными реагентами для решения задач химического анализа.

Заключение

Настоящая работа является первым систематическим исследованием, в котором методом растворения-осаждения микрокристаллической целлюлозы в $[BMIm][AcO]$ получены целлюлозные пленки, превосходящие по своей прочности, эластичности и устойчивости в водных растворах различной кислотности и молекулярных растворителях их прототипы, приготовленные с применением $[BMIm][Cl]$. Добиться указанного превосходства в физико-механических свойствах пленок {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } удалось благодаря в 3.75 раза бóльшей растворимости целлюлозы в ацетатной ИЖ. Хотя содержание биополимера в пленках {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } было в 3.5 раза больше, чем в пленках {целлюлоза- $[BMIm][Cl]$ }, полученные пленки не уступали последним по прозрачности и при этом обладали способностью сорбировать синтетические (индигокармин и пиронин Б) и природные пищевые (куркумин, кармин и β -каротин) красители.

Пленки {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } сорбировали в 3.5 и 3 раза больше анионного красителя индигокармина и катионного красителя пиронина Б соответственно по сравнению с пленками, приготовленными с помощью хлоридной ИЖ. При включении в состав пленок {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } заряженных молекул ПАВ, имеющих заряд, противоположный заряду красителя, степень сорбции красителей существенно не изменялась, однако уменьшалась прочность и эластичность целлюлозного материала.

Обнаружено, что использованные в работе аналитические реагенты: растительные пероксидазы и микропероксидаза-11, красители, а также тетрациклин, претерпевают химические изменения в $[BMIm][AcO]$, но не в хлоридной ИЖ. Это обстоятельство несомненно ограничивает применение предложенного материала в химическом анализе в качестве матрицы для иммобилизации аналитических реагентов, тем не менее пленки {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ }, особенно модифицированные привитыми группами, могут конкурировать с другими материалами, полученными на основе природных полимеров (хитина, хитозана и т.п.), по способности сорбировать пищевые красители. Мы продемонстрировали возможность регенерации пленок {целлюлоза- $[BMIm][AcO]$ } после сорбции ими индигокармина водой, 0.1M растворами HCl или NaOH, что позволяет использовать предложенный целлюлозный материал повторно.

При изучении причин подавления каталитической активности пероксидаз хрена и сои в ацетатной ИЖ получили экспериментальные данные, позволившие сформулировать важные практические рекомендации по выбору ИЖ, в присутствии которых растительные пероксидазы будут в большей степени сохранять каталитическую активность. Таким фактором, в первую очередь, является величина $\log P$, по

крайней мере, для ИЖ с одним и тем же катионом, но разными анионами. С ростом величины показателя гидрофобности ИЖ ее ингибирующее действие на пероксидазу снижается. Немаловажными факторами являются также природа соразтворителя ИЖ и природа биокатализатора (катионный или анионный фермент).

В отличие от пленок, приготовленных с использованием ацетатной ИЖ, оптически прозрачные пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]}, как мы показали, являются удобной матрицей для иммобилизации большинства изученных реагентов. Так, на основе пленок {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} получены нековалентно иммобилизованные препараты пероксидаз хрена и сои, которые выгодно отличались от известного из литературы прототипа (целлюлозных пленок с лакказой) в 3 раза большей каталитической активностью и высокой стабильностью при комнатной температуре. В течение первой недели хранения каталитическая активность пероксидаз хрена и сои не менялась, а через месяц составляла соответственно 80 и 70% от ее величины в день приготовления пленок. Полученные нами результаты в совокупности с литературными данными свидетельствуют о предпочтительности иммобилизации в пленки катионных ферментов. В дальнейшем работу с пленками {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} целесообразно продолжить в двух направлениях: разработать способы *ковалентной* иммобилизации ферментов в целлюлозные пленки, что позволило бы решить проблему вымывания биокатализаторов, а также расширить круг индикаторных систем с полученными иммобилизованными препаратами. Обнаруженный нами факт, что субстратная специфичность пероксидаз хрена и сои в составе пленок {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} по отношению к арилдиаминам и катехоламинам остается такой же как у нативных биокатализаторов, указывает на возможность перенесения в пленки ранее разработанных в нашей лаборатории оптических индикаторных систем для определения органических соединений фенольной природы в растворах.

При иммобилизации индигокармина и пиронина Б в пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} установили, что анионный индигоидный краситель легко вымывается из пленки, в то время как катионный родаминовый краситель довольно хорошо удерживается целлюлозным материалом. Обнаруженная нами возможность закрепления в целлюлозной пленке пиронина Б позволила создать пленку состава {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС}. В результате подбора содержаний компонентов пленки и условий ее функционирования в присутствии артемизинина предложили способ флуоресцентного определения артемизинина с использованием разработанной пленки и апробировали его в анализе двух противомаларийных БАД. Правильность проведенного анализа свидетельствует о перспективности применения указанного материала в качестве чувствительного элемента флуоресцентного

химического сенсора. Следует отдельно подчеркнуть тот факт, что достигнутой чувствительности определения артемизинина (0.2 мкМ) с помощью пленки {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-ПБ-Mn(II)-ДДС} достаточно для анализа не только БАД, но и фармацевтических препаратов, с также крови и мочи при фармакокинетических исследованиях для оценки эффективности лечения малярии.

Сравнительно невысокая ($s_f = 0.20$, $n = 3$) воспроизводимость определения артемизинина с использованием с целлюлозных пленок по сравнению с методикой в растворе связана, по нашему мнению, главным образом, с тем, что мы создаем пленку вручную, без специального оборудования, в результате чего неизбежны некоторые неоднородности в структуре материала. Избежать такого рода проблем в будущем поможет приобретение и использование специальной подложки для вытяжки полимерных материалов американской фирмы «R.D. Specialists» из толстого стекла на резиновых ножках, предотвращающих его скольжение, и специального стального стержня известного диаметра для раскатывания пленок. Подложка позволяет раскатывать пленки воспроизводимой толщины по всей площади поверхности материала.

Еще одним направлением использования пленок {целлюлоза-[ВМIm][Cl]} является иммобилизация в них флуоресцентных зондов, в особенности комплекса {Eu(III)-ТЦ}, с последующим применением полученных целлюлозных препаратов для определения БР. Мы получили пленки состава {целлюлоза-[ВМIm][Cl]-Eu(III)-ТЦ}, выяснили условия регистрации их сигнала, однако, для разработки способа определения БР с их использованием необходимо продолжить исследования указанной индикаторной системы в растворе. Мы установили, что БР, вопреки литературным данным, при определенных условиях способен образовывать флуоресцирующий комплекс с ионом Eu(III), вследствие чего сигнал иона металла усиливается подобно тому, как это происходит при связывании европия(III) в комплекс с тетрациклином. Индикаторная реакция оказалась чрезвычайно чувствительной к соотношению концентраций реагентов, рН, протекает во времени. Выяснение условий проявления действия БР на сигнал Eu(III) в отсутствие и присутствии тетрациклина станет предметом дальнейших исследований в нашей лаборатории.

Таким образом, в результате проведенных сравнительных исследований аналитических возможностей целлюлозных пленок, приготовленных с помощью ацетатной и хлоридной ИЖ, показали, что пленки {целлюлоза-[ВМIm][AcO]} представляют интерес в качестве пленок-сорбентов синтетических и природных пищевых красителей. Сорбционная способность пленок зависит от природы ИЖ, использованной для их приготовления, и природы красителя. Расширение круга пищевых

красителей и изучение закономерностей их сорбции разработанными целлюлозными пленками позволит получить целлюлозные материалы для выделения и определения этих красителей в продуктах фармацевтических и пищевых производств. Применение пленок {целлюлоза–[BMIm][Cl]} открывает широкие возможности для их использования в роли чувствительного элемента оптических химических сенсоров для определения органических биологически активных соединений как с визуальной, так и с инструментальной детекцией аналитического сигнала. Особый интерес представляют предложенные нами новые флуориметрические индикаторные системы для определения артемизинина, которые могут быть использованы не только для анализа БАД, лекарственных препаратов, но и при их дополнительном усовершенствовании для анализа биологических жидкостей, в частности крови и мочи.

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 отсутствие 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. Иммобилизация 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 ($s_T = 0.008$ 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 соимобилизованными пиронином Б и комплексом {Mn(II)–ДДС} успешно применены для флуориметрического определения артемизинина в противомаларийных БАД «BestArtemisinin» и «Artemisia annua intense».

Приложение 1

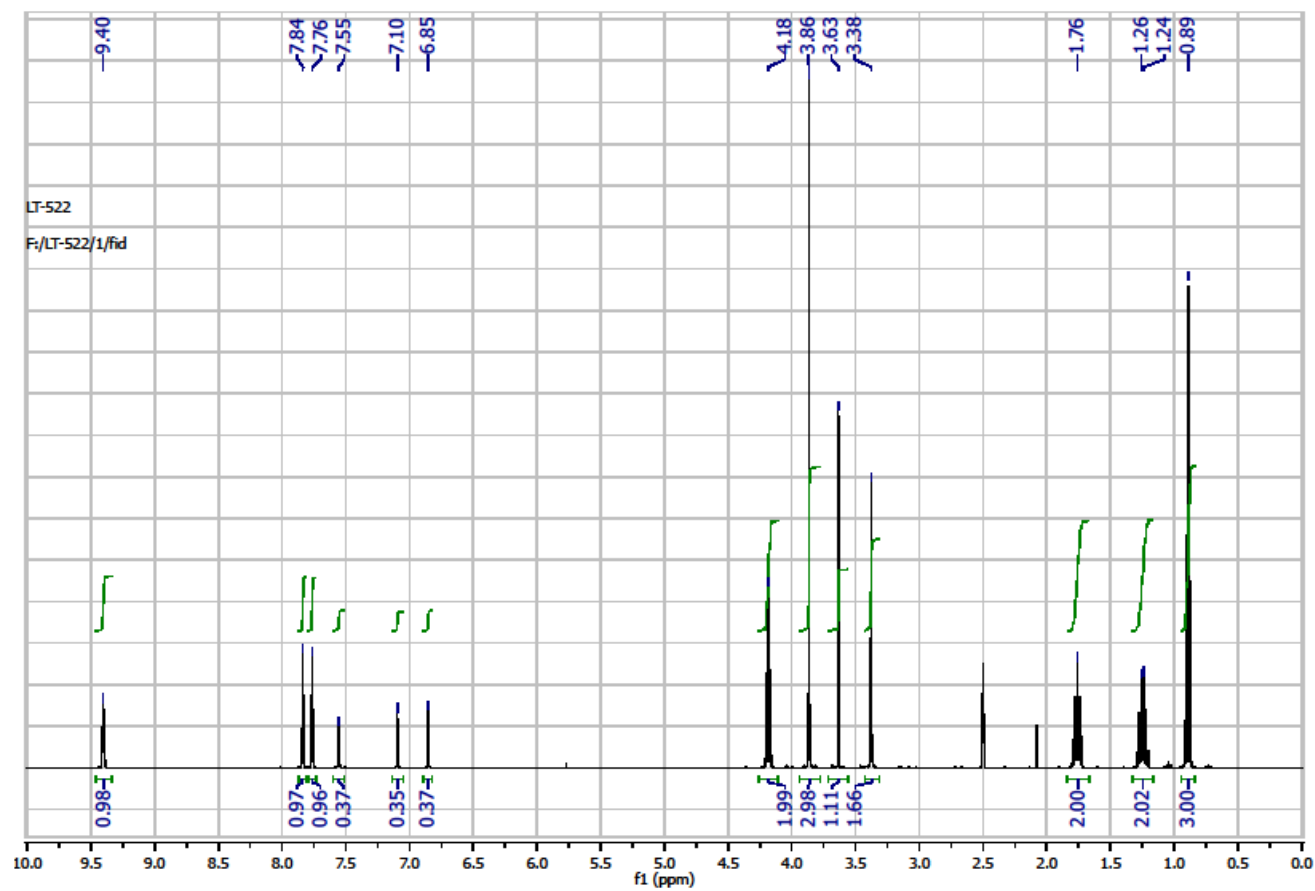


Рис. 1. ¹³C ЯМР спектр препарата [BMIm][Cl]_{синт1}.

Приложение 2

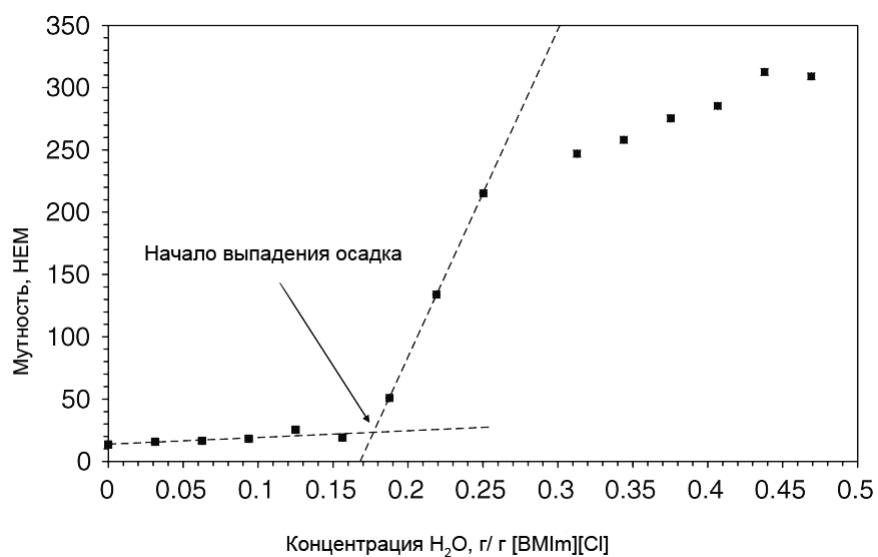


Рис. 2. Влияние содержания воды в препарате [BMIm][Cl] на растворимость целлюлозы [64].

Таблица 1. Максимальное содержание воды (г) на 100 г [BMIm][Cl], включая содержание влаги в целлюлозе, при превышении которого целлюлоза начинает выпадать в осадок в [BMIm][Cl] [64]

Температура, °С	Содержание целлюлозы, г		
	0.5	1	2
95	0.1967	0.1872	0.1614
90	0.2934	0.2702	0.2120

Приложение 3

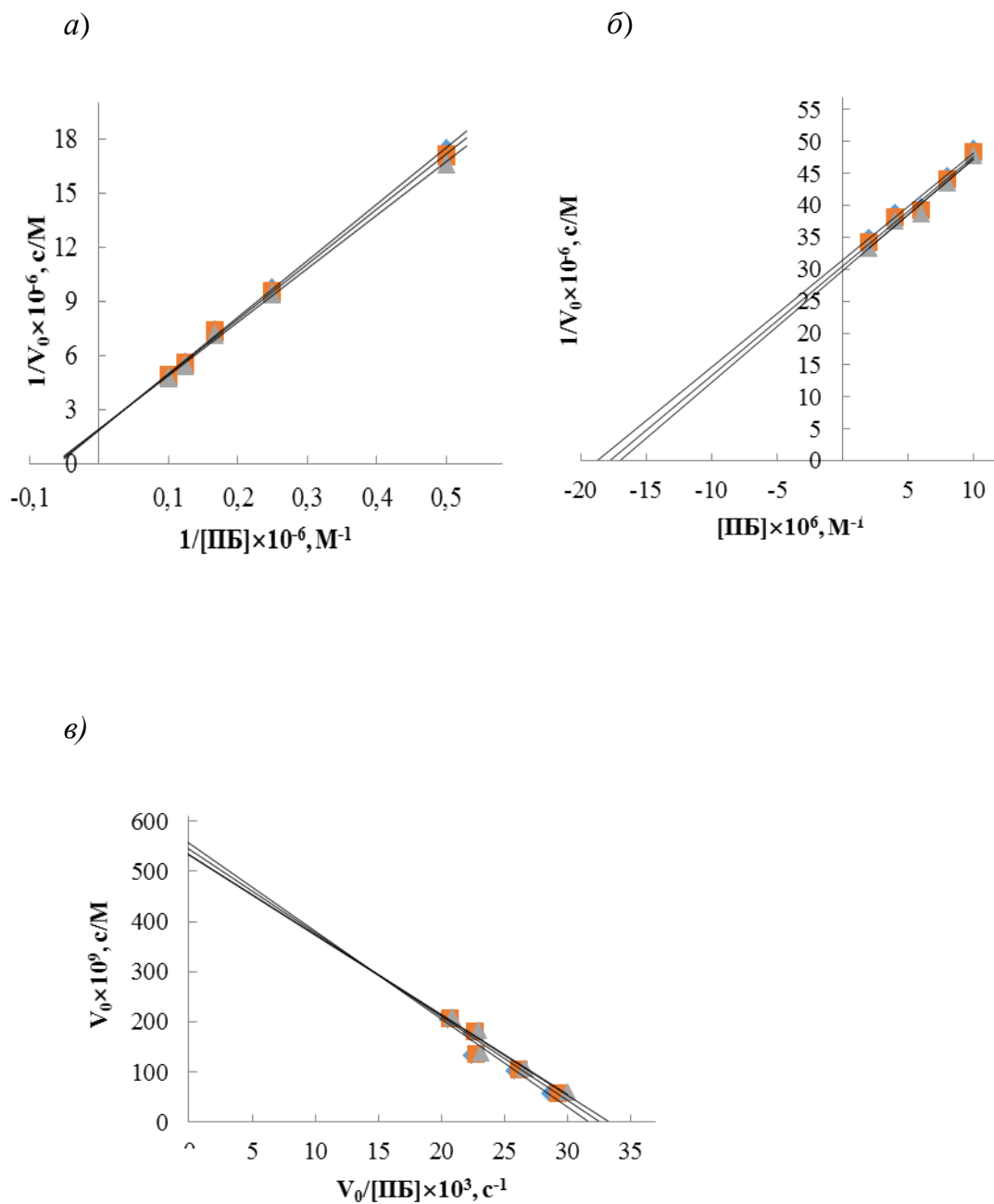
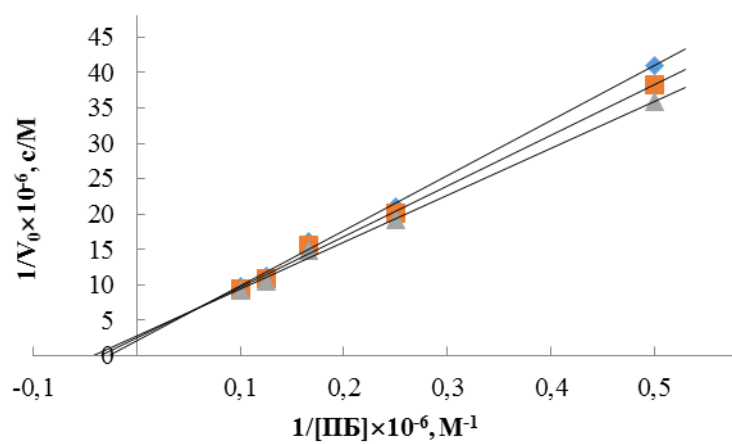
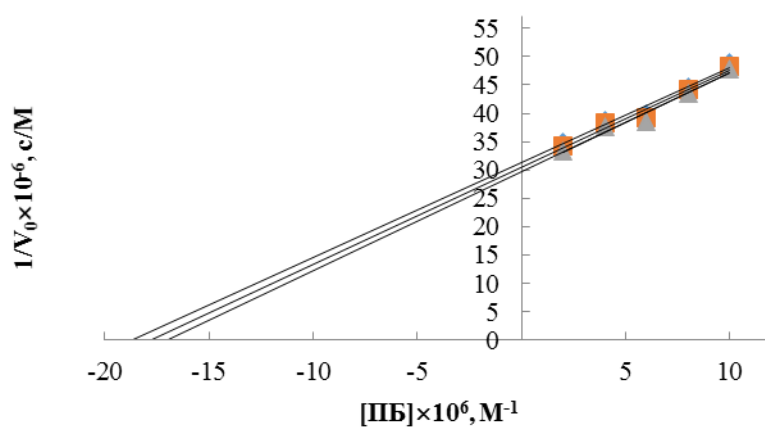


Рис. 3. Линеаризация по методам Лайнуивера-Берка (а), Хейнса (б) и Иди-Хофсти (в) для системы ПБ-МП. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, МП – 4 (◇), 5 (▲) и 6 (■) мкМ.

a)



б)



в)

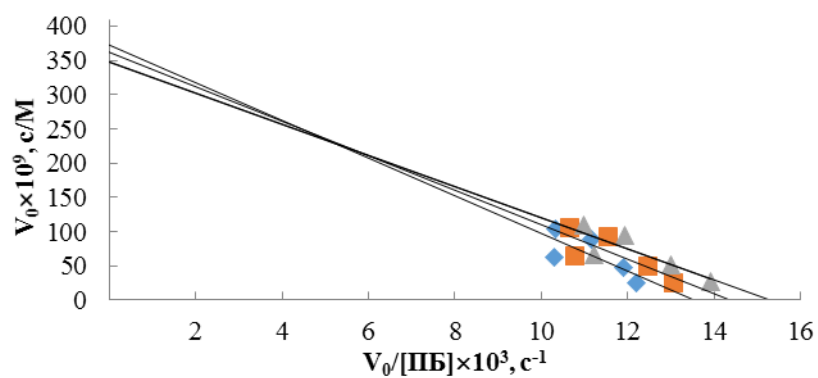


Рис. 4. Линеаризация по методу Лайнуивера-Берка (а), Хейнса (б) и Иди-Хофсти (в) для системы ПБ–{Mn(II)–ДДС}. Концентрации: ПБ – 2 мкМ, Mn(II) и ДДС – 0,1 (◇); 0,2 (▲); 0,5 (■) мМ.

Приложение 4

Таблица 2. Зависимость интенсивности флуоресценции пленки {целлюлоза–[BMIm][Cl]–ПБ} от угла падения возбуждающего излучения, содержание ПБ 0.3 мг

угол, °	35	30	25	20
I, усл. ед.	284.1214	140.4939	68.02061	33.64705

Список литературы

1. Clare B., Sirwardana A., MacFarlane D. R. Synthesis, purification and characterization of ionic liquids. // *Top. Curr. Chem.* 2009. V. 290. P. 1–40.
2. Das D.; Dasgupta A., Das P. K. Improved activity of horseradish peroxidase (HRP) in 'specifically designed' ionic liquid. // *Tetrahedron Lett.* 2007. V. 48. № 32. P. 5635–5639.
3. Visser A. E., Swatloski R. P., Reichert W. M., Mayton R., Sheff, S., Wierzbicki A., Davis J. H., Rogers R. D. Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions. // *Chem. Commun.* 2001. V. 46. № 1. P. 135–136.
4. Zhao H., Baker G. A., Song Z., Olubajo O., Crittle T., Peters D. Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. // *Green Chem.* 2008. V. 10. № 6. P. 696–705.
5. Zhang S., Lu X., Zhou Q., Li X., Zhang, X., Li S. Ionic liquids: physicochemical properties. (1 edition). Oxford, UK: Elsevier Science, 2009. 478 p.
6. Ohno H. Electrochemical aspects of ionic liquids. (2 edition). Hoboken, New Jersey: Wiley, 2011. 465 p.
7. Mudring A-V. Optical spectroscopy and ionic liquids. // *Top. Curr. Chem.* 2009. V. 290. P. 285–310.
8. Pletnev I. V., Smirnova S. V., Egorov V. M. Liquid-liquid extraction of organic compounds. Ionic liquids in chemical analysis: analytical chemistry. (1 edition). Editor Koel M. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. pp. 243–268.
9. Luo H., Dai S./ Separation of metal ions based on ionic liquids. Ionic liquids in chemical analysis: analytical chemistry. (1 edition). Editor Koel. M. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. pp. 269–294.
10. Chen X., Liu J., Wang J. Ionic liquids in the assay of proteins. // *Anal. Methods.* 2010. V. 2. № 9. P. 1222–1226.
11. Alvarez-Guerra M., Irabien A. Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach. // *Green Chem.* 2011. V. 13. № 6. P. 1507–1516.
12. Pham T. P. T., Cho C-W., Yun Y-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. // *Water Res.* 2010. V. 44. № 2. P. 352–372.
13. Liu J., Jönsson J. Å., Jiang G. Application of ionic liquids in analytical chemistry. // *Trends Anal. Chem.* 2005. V. 24. № 1. P. 20–27.
14. Wei Di, Ivaska A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 607. № 2. P. 126–135.
15. Singh V. V., Nigam A. K., Batra A., Boopathi M., Singh B., Vijayaraghavan R. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors and biosensors. // *J. Int. Electrochem.* 2012. V. 2012. Article ID 165683. 19 p.
16. El Seoud O. A., Koschella A., Fidale L. C., Dorn S., Heinze T. Applications of ionic liquids in carbohydrate chemistry: a window of opportunities. // *Biomacromolecules.* 2007. V. 8. № 9. P. 2629–2647.
17. Lei Z., Dai C., Chen B. Gas solubility in ionic liquids. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. № 2. P. 1289–1326.
18. Kavanagh A., Byrne R., Diamond D., Fraser K. J. Stimuli responsive ionogels for sensing applications — An overview. // *Membranes.* 2012. V. 2. № 1. P. 16–39.
19. Bideau J., Viau L., Vioux A. Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. № 2. P. 907–925.
20. Xie H., Zhang S., Li S. Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents of CO₂. // *Green Chem.* 2006. V. 8. № 7. P. 630–633.
21. Li B., Filpponen I., Argyropoulos D. S. Acidolysis of wood in ionic liquids. // *Ind. Chem. Res. Eng.* 2010. V. 49. № 7. P. 3126–3136.

22. Cheng C., Li J. Preparation of ligninocellulose aerogel from wood-ionic liquid solution. // *Adv. Mater. Research*. 2011. V. 280. P. 191–195.
23. Oter O., Ertekin K., Derinkyu S. Photophysical and optical oxygen sensing properties of tris(bipyridine)ruthenium(II) in ionic liquid modified sol–gel matrix. // *Mater. Chem. Phys.* 2009. V. 113. № 1. P. 322–328.
24. Ueki T., Watanabe M. Macromolecules in ionic liquids: progress, challenges, and opportunities. // *Macromolecules*. 2008. V. 41. № 11. P. 3739–3748.
25. Ye Y.-S., Rick J., Hwang B.-J. Ionic liquid polymer electrolytes. // *J. Mater. Chem. A*. 2013. V. 1. № 8. P. 2719–2743.
26. Zhao H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. // *J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic*. 2005. V. 37. P. 16–25.
27. Turner M. B., Spear S. K., Holbrey J. D., Rogers R. D. Production of bioactive cellulose films reconstituted from ionic liquids. // *Biomacromolecules*. 2004. V. 5. № 4. P. 1379–1384.
28. Turner M. B., Spear S. K., Huddleston J. G., Holbrey J. D., Rogers R. D. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. // *Green Chem.* 2003. V. 5. № 4. P. 443–447.
29. Gilbil M. E. Current status of applications of ionic liquids for cellulose dissociation and modification: review. // *IJEST*. 2012. V. 4. P. 3556–3571.
30. Gericke M., Fardim P., Heinze T. Ionic liquids — promising but challenging solvents for homogeneous derivatization of cellulose. // *Molecules*. 2012. V. 17. № 6. P. 7458–7502.
31. Díaz-García M. E., Laiño R. B. Molecular imprinting in sol–gel materials: recent developments and applications. // *Microchim. Acta*. 2005. V. 149. № 1–2. P. 19–36.
32. Muginova S. V., Galimova A. Z., Polyakov A. E., Shekhovtsova T. N. Ionic liquids in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: capabilities and prospects. // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. № 4. P. 331–351.
33. Susan M.A., Kaneko T., Noda, A., Watanabe M. Ion gels prepared by in situ radical polymerization of vinyl monomers in an ionic liquid and their characterization as polymer electrolytes. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 13. P. 4976–4983.
34. Buckley A. M., Greenblat M. The sol–gel preparation of silica gels. // *J. Chem. Education*. 1994. V. 71. № 7. P. 599–602.
35. Mujahid A., Lieberzeit A., Dickert L. Chemical sensors based on molecularly imprinted sol–gel materials. // *Materials*. 2010. V. 3. № 4. P. 2196–2217.
36. Dai S., Ju Y. H., Gao H. J., Lin J. S., Pennycook S. J., Barnes C. E. Preparation of silica aerogel using ionic liquids as solvents. // *Chem. Comm.* 2000. № 3. P. 243–244.
37. Pierre A. C. The sol–gel encapsulated of enzymes. // *Biocatal. Biotransform.* 2004. V. 22. № 3. P. 145–170.
38. Xu Z., Chen X., Dong S. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices. // *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2006. V. 25. № 9. P. 899–908.
39. Liu Ya., Wang M., Li Zh., He P., Liu H., Li J. Highly active horseradish peroxidase immobilized in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate room-temperature ionic liquid based sol–gel host materials. // *Chem. Comm.* 2005. № 13. P. 1778–1780.
40. McDonagh C., Bowe P., Mongey K., MacCraith B. D. Characterisation of porosity and sensor response times of sol–gel-derived thin films for oxygen sensor applications. // *J. of Non-Crystalline Solids*. 2002. V. 306. № 2. P. 138–148.
41. Borisov S. M., Waldhier M., Klimant I., Wolfbeis O. S. Optical carbon dioxide sensors based on silicone-encapsulated room-temperature ionic liquids. // *Chem. Mater.* 2007. V. 19. № 25. P. 6187–6194.

42. *Curto V.F., Fay C., Coyle C., O'Toole C., Barry C., Hughes S., Moyna N., Diamond D., Benito-Lopez F.* Real-time sweat pH monitoring based on a wearable chemical barcode micro-fluidic platform incorporating ionic liquids. // *Sensors&Actuators B*. 2012. V. 172–173. P. 1327–1334.
43. *Poplin J. H., Swatloski R. P., Holbrey J. D., Spear S. K., Metlen A., Gratzel M., Nazeeruddin M.K., Rogers R. D.* Sensor technologies based on a cellulose supported platform. // *Chem. Commun.* 2007. № 20. P. 2025–2027.
44. *Egorov V. M., Smirnova S.V., Formanovsky A. A., Pletnev I.V., Zolotov Y. A.* Dissolution of cellulose in ionic liquid as a way to obtain test materials for metal-ion detection. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 387. № 6. P. 2263–2269.
45. *Hines J. H., Wanigasekara E., Rudkevich D., Rogers R. D.* Calix[4]arenes immobilized in a cellulose-based platform for entrapment and detection of NO_x gases. // *J. Mater. Chem.* 2008. V. 18. № 34. P. 4050–4055.
46. *Tan Ch., Wang Q.* Luminescent Cu²⁺ probes on rare-earth (Eu³⁺ and Tb³⁺) emissive transparent cellulose hydrogels. // *J. Fluoresc.* 2012. V. 22. № 6. P. 1581–1586.
47. *Turner M. B., Spear S. K., Holbrey J. D., Daly D. T., Rogers R. D.* Ionic liquid-reconstituted cellulose composites as solid support matrices for biocatalyst immobilization. // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. № 5. P. 2497–2502.
48. *Bagheri M., Rodriguez H., Swatloski R. P., Spear S. K., Daly D. T., Rogers R. D.* Ionic liquid-based preparation of cellulose-dendrimer films as solid supports for enzyme immobilization. // *Biomacromolecules*. 2008. V. 9. № 1. P. 381–387.
49. *Klein M.P., Scheeren C.W., Lorenzoni A.S. G., Dupont J., Frazzon J., Hertz P.F.* Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. // *Process Biochem.* 2011. V. 46. № 6. P. 1375–1379.
50. *Oter O., Erekin K., Derinkaya S.* Ratiometric sensing of CO₂ in ionic liquid modified ethyl cellulose matrix. // *Talanta*. 2008. V. 76. № 3. P. 557–563.
51. *Aydogdu S., Ertekin K., Susiu A., Ozdemir, M., Celik E., Cocen U.* Optical sensing with ionic liquid doped electrospun nanofibers. // *J. Fluoresc.* 2011. V. 1. № 2. P. 607–613.
52. *Ongun M. Z., Oter O., Sabanci G., Ertekin K., Celik E.* Enhanced stability of ruthenium complex in ionic liquid doped electrospun fibers. // *Sens. & Actuators, B*. 2013. V. 183. P. 11–19.
53. *Kacmaz S., Ertekin K., Suslu A., Ozdemir M., Ergun Y., Ceclik E., Cocen U.* Emission based sub-nanomolar silver sensing with electrospun nanofibers. // *Sens. & Actuators, B*. 2011. V. 153. № 1. P. 205–213.
54. *Ongun M. Z., Ertekin K., Hizliates C. G., Oter O., Ergun Y., Celik E.* Determination of Hg(II) at sub-nanomolar levels: A comparative study with nanofibrous materials and continuous thin films. // *Sens. & Actuators, B*. 2013. V. 181. P. 244–250.
55. *Oter O., Ertekin K., Topkaya D., Alp S.* Emission-based optical carbon dioxide sensing with HTPS in green chemistry reagents: room temperature ionic liquids. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 5. P. 1225–1234.
56. *Absalan G., Asadi M., Kamran S., Torabi S., Sheikhan L.* Design of a cyanide ion optode based on immobilization of a new Co(III) Schiff base complex on triacetylcellulose membrane using room temperature ionic liquids as modifiers. // *Sens. & Actuators B*. 2010. V. 147. № 1. P. 31–36.
57. *Absalan G., Arabi M., Tashkhourian J.* Construction of an optical sensor for the determination of ascorbic acid using ionic liquids as modifier. // *Anal. Sci.* 2012. V. 28. № 12. P. 1225–1230.
58. *Kavahagh A., Byrne R., Diamond D., Radu A.* A two-component polymeric optode membrane based on a multifunctional ionic liquid. // *Analyst*. 2011. V. 136. № 2. P. 348–353.

59. Bates E. D., Mayton R. D., Ntai, I., Davis J. Y. CO₂ Capture by a task-specific ionic liquid. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 6. P. 926–927.
60. Anthony J. L., Maginn E. J., Brennecke J. F. Solubilities and thermodynamic properties of gases in the ionic liquid 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. // *J. Phys. Chem. B.* 2002. V. 106. № 29. P. 7315–7320.
61. Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., Rogers R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 18. P. 4974–4975.
62. Wang H., Gurau G., Rogers R. D. Ionic liquid processing of cellulose. // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. № 4. P. 1519–1537.
63. Lindman B., Karlström G., Stigsson L. On the mechanism of dissolution of cellulose. // *J. Mol. Liq.* 2010. V. 156. № 1. P. 76–81.
64. Mazza M., Catana D.-A., Vaca-Garcia C., Cecutti C. Influence of water on the dissolution of cellulose in selected ionic liquids. // *Cellulose.* 2008. V. 16. № 2. P. 207–215.
65. Lee S. H., Miyauchi M., Dordick J. S., Linhart R. J./ Preparation of biopolymer-based material using ionic liquids for the biomedical application. *Ionic liquid applications: pharmaceuticals, therapeutics, and biotechnology.* Editor Malhotra S.V. ACS Symp. Ser., 2010. pp. 115–134
66. Kim M. H., An S., Won K., Kim H. J., Lee S. H. Entrapment of enzymes into cellulose-biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. // *J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic.* 2012. V. 75. P. 68–72.
67. Teo W-E., Inai R., Ramakrishna S. Technological advances in electrospinning of nanofibers. // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2011. V. 12. № 1. P. 1-19.
68. Wang Z., Wang Y., Cai W-J., Liu S-Y. A long pathlength spectrophotometric pCO₂ sensor using a gas-permeable liquid-core waveguide. // *Talanta.* 2002. V. 57. № 1. P. 69–80.
69. Kan T., Aoki H., Binh-Khiem N., Matsumoto K., Shimoyama I. Ratiometric optical temperature sensor using two fluorescent dyes dissolved in an ionic liquid encapsulated by Parylene films. // *Sens.* 2013. V. 13. № 4. P. 4138–4145.
70. Zhao Q., Yin M., Zhang A. P., Prescher S., Antonietti M., Yuan. J. Hierarchically structured nanoporous poly(ionic liquid) membranes: facile preparation and application in fiber-optic pH sensing. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 15. P. 5549–5542.
71. Xing D. Y., Peng N., Chung T-Sh. Investigation of unique interactions between cellulose acetate and ionic liquid [EMIM]SCN, and their influences on hollow fiber ultrafiltration membranes. // *J. Membrane Sci.* 2011. V. 380. № 1–2. P. 87–97.
72. Kostov Y., Tzonkov S. Yotova L., Krysteva M. Membranes for optical pH sensors. // *Anal. Chim. Acta.* 1993. V. 280. № 1. P. 15–19.
73. Wang Q., Tang H., Xie Q., Tan L., Zhang Y., Li B., Yao S. Room temperature ionic liquids/multi-walled carbon nanotubes/chitosan composite electrode for electrochemical analysis of NADH. // *Electrochem. Acta.* 2007. V. 52. № 24. P. 6630–6637.
74. Qazi H. H., bin Mohammed A. B., Akham M. Recent progress in optical chemical sensors. // *Review. Sensors.* 2012. V. 12. № 12. P. 16522–16556.
75. Курляндский Б.А., Сидоров К.К. Предельно допустимые концентрации (ПДК) в воде водных объектов хозяйственно питьевого и культурно-бытового водопользования. Гигиенические нормативы ГН 2.1.5.1315-03. Минздрав России. 2007. С. 28.
76. Baezzat M. R., Ilahi R. A. Design and evaluation of a silver optical sensors based on immobilization of Rose Bengal on triacetylcellulose membrane. // *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2013. V. 5. № 5. P. 2498–2502.
77. Cambell D. P./ Planar–waveguide interferometers for chemical sensing. *Optical guided-wave chemical and biosensors I. Methods and applications.* Editors M. Zourob, A. Lakh-takia. Berlin: Springer, 2010. V. 7. pp. 55–100.

78. Keusgen M., Kloock J. P., Knobbe D. T., Jünger M., Krest I., Goldbach M., Klein W., Schöning M. J. Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. // *Sens. & Actuators B*. 2004. V. 103. № 1–2. P. 380–385.
79. Сашина Е.С., Новоселов Н. П. Влияние строения ионных жидкостей на их растворяющие свойства по отношению к природным полимерам. // *Журнал общей химии*. 2009. Т. 79. № 6. С. 885–890.
80. Sahina E. S., Novoselov N. P., Kuz'mina O. G., Troshenkova S. V. Ionic liquids as new solvents of natural polymers. // *Fibre Chem*. 2008. V. 40. P. 210–277.
81. Сашина Е.С., Голубихин А. Ю., Новоселов Н. П. Термохимическое исследование растворения и регенерации фиброина из растворов в ионных жидкостях на основе имидазола. // *Журнал общей химии*. 2012. Т. 82. № 8. P. 1374–1381.
82. Liu C., Zhao Y., Wang Y. Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2006. V. 72. № 1. P. 11–20.
83. Соктеева Т.Э., Рыжова Г.Л., Дычко К.А., Хасанов В.В., Жигжитжапова С.В., Раднева Л.Д. Содержание артемизинина в экстрактах *Artemisia annua L.*, полученных разными методами. // *Химия растит. сырья*. 2011. № 4. С. 131–134.
84. Lapkin A., Plucinski P. Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. // *J. Nat. Prod*. 2006. V. 69. № 11. P. 1653–1664.
85. Chen H.-Y., Chen Y., Zhu S.-M., Bian N.-S., Shan F., Li Y. Decomposition mechanism of an artemisinin-type compound via hemin-electrocatalysis. // *Talanta*. 1999. V. 48. № 1. P. 143–150.
86. Olliaro P.L., Haynes R.K., Meunier B., Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinine-type compounds. // *Trends in Parasitology*. 2001. V. 17. № 3. P. 122–126.
87. Zhang S., Gerhard G. S. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target. // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 10. e7472.
88. Meshnick S.R., Taylor T.E., Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. // *Microbiol. Rev*. 1996. V. 60. № 2. P. 301–315.
89. Dhingra V., Rao K.V., Narasu M.L. Artemisinin: present status and perspectives. // *Biochem. Ed*. 1999. V. 27. № 2. P. 105–109.
90. Liu Y., Lu H., Pang F. Solubility of artemisinin in seven different pure solvents from (283.15 to 323.15) K. // *J. Chem. Eng. Data*. 2009. V. 54. № 3. P. 762–764.
91. Marconi G., Mont iS., Manoli F., Esposti A.D., Mayer B. A circular dichroism and structural study of the inclusion complex artemisinin- α -cyclodextrin. // *Chem. Phys. Lett*. 2004. V. 383. № 5–6. P. 566–571.
92. Durante M., Caretto S., Quarta A., De Paolis A., Nisi R., Mita G. β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. // *Biotechnol. Prod. Process. Eng*. 2011. V. 90. № 6. P. 1905–1913.
93. Usuda M., Endo T., Nagase H., Tomono K., Ueda H. Interaction of antimalarial agent artemisinin with cyclodextrins. // *Drug Dev. Ind. Pharm*. 2000. V. 26. № 6. P. 613–619.
94. Rajewski R.A., Traiger G., Bresnahan J., Jaberaboansari P., Stella V. J., Thompson V.O. Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether β -cyclodextrin derivatives. // *J. Pharm. Sci*. 1995. V. 84. № 8. P. 927–932.
95. Illapakurthy A.C., Sabnis Y.A., Avery B.A., Avery M.A., Wyandt C.M. Interaction of artemisinin and its related compounds with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution state: experimental and molecular-modeling studies. // *J. Pharm. Sci*. 2003. V. 92. № 3. P. 649–655.
96. Wong J.W., Yuen K. H. Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β - and γ -cyclodextrins. // *Int. J. Pharm*. 2001. V. 227. № 1–2. P. 177–185.

97. Wong J.W., Yuen K. H. Inclusion complexation of artemisinin with α -, β - and γ -cyclodextrins. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2003. V. 29. № 9. P. 1035–1044.
98. Yang B., Lin J., Chen Y., Liu Y. Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. // Bioorg. & Med. Chem. 2009. V. 17. № 17. P. 6311–6317.
99. Sibmooh N., Udomsangpetch R., Kijjoa A. Redox reaction of artemisinin with ferrous and ferric ions in aqueous buffer. // Chem. Pharm. Bull. 2001. V. 49. № 12. P. 1541–1546.
100. Sreevidya T.V., Narayana B. Spectrophotometric determination of artemisinin and dihydroartemisinin. // Indian J. Chem. Tech. 2008. V. 15. № 1. P. 59–62.
101. Mpiana P.T., Mavakala B.K., Wu Yu Zh. Interaction of artemisinin based antimalarial drugs with hemin in water-DMSO mixture. // Int. J. Pharm. 2007. V. 3. № 4. P. 302–310.
102. Dwira S., Fadilah, Tedjo A. Interaction analysis of hemin with antimalarial artemisinin groups through in-silico and in-vitro approach. // Internet J. Med. Update. 2013. V. 8. № 2. P. 29–34.
103. Lutgen P., Michels B./ Proceedings of the International Conference “Maladies tropicales, aspects humanitaires et économiques”. Luxembourg, June 3-4 2008. Bactericidal properties of *artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light.
104. Green M.D. Patent WO2003048766 A2// 2003.
105. Van Acker K., Mommaerts M., Vanermen S., Meskens J., Heyden Y. V., Plaizier-Vercammen J. Chemical stability of artemisinin derivatives. // Malar J. 2012. V. 11. P. 99.
106. Ankli A., Widmer V., Reich E., Handloser D., Steiner M. Quantitative HPTLC analysis of artemisinin in dried leaves of *Artemisia annua*. // Camag bibliography service. Planar chromatography. 2007. V. 30. № 15. P. 4–5.
107. Batty K.T., Davis T.M.E. Selective high-performance liquid chromatographic determination of artesunate and α - and β -dihydroartemisinin in patients with falciparum malaria. // J. Chromatogr. B. 1996. V. 677. № 2. P. 345–350.
108. Bharati A., Sabat S.C. A spectrophotometric assay for quantification of artemisinin. // Talanta. 2002. V. 52. № 3. P. 1033–1037.
109. Koobkokkrud T., Chochai A., Kerdmanee C. TLC – densitometric analysis of artemisinin for the rapid screening of high-producing plantlets of *Artemisia annua* L. // Phytochem. Anal. 2007. V. 18. № 3. P. 229–234.
110. Thomas C.G., Ward S.A., Edwards G. Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // J. Chromatogr. 1992. V. 583. № 1. P. 131–136.
111. Quennoz M., Bastian C., Simonnet X. Quantification of the total amount of artemisinin in leaf samples by thin layer chromatography. // Chimia. 2010. V. 64. № 10. P. 755–757.
112. Bhandari P., Gupta A.P., Singh B., Kaul V. K. Simultaneous densitometric determination of artemisinin, artemisinic acid and arteannuin-B in *Artemisia annua* using reversed-phase thin layer chromatography. // J. Sep. Sci. 2005. V. 28. № 17. P. 2288–2292.
113. Briars R., Paniwnyk L./ Proceedings of the International Congress on Ultrasonics. Gdansk, September 5–8 2011. P. 581–585.
114. Ioset J.-R., Kaur H. Simple field assay to check quality of current artemisinin-based antimalarial combination formulations. // PLoS One. 2009. V. 4. № 9. e7270.
115. Luo X.D., Xie M. Sub-nanogram detection of dihydroartemisinin after chemical derivatization with diacetyldihydrofluorescein followed by high-performance liquid chromatography and UV absorption. // Chromatographia. 1987. V. 23. № 2. P. 112–114.
116. Green M.D. Patent WO2009061808 A2// 2009.

117. *Sreevidya T.V., Narayana B.* A simple and rapid spectrophotometric method for the determination of artesunate in pharmaceuticals. // *Eurasian J. Anal. Chem.* 2009. V. 4. № 1. P. 119–126.
118. *Chen L., Zhang Y., Yin H., Liu L., Yang Z., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using hemoglobin as catalyst and pyronine B as substrate. // *Wuhan Univ. J. Natural Sci.* 2006. V. 11. № 3. P. 704–708.
119. *Chen L., Liu L., Shen H.* Spectrofluorimetric determination of artemisinin with pyronine B as the substrate for horseradish peroxidase. // *Chin. Sci. Bulletin.* 2005. V. 50. № 17. P. 1834–1838.
120. *Chen L., Yin H., Yang Z., Zhang K., Liu L., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using cytochrome *c* as catalyst and pyronine B as indicator. // *Chin. J. Anal. Chem.* 2006. V. 36. № 2. P. 173–177.
121. *Chen L., Yin H., Yang Z., Zhang K., Liu L., Shen H.* Fluorescence determination of artemisinin using tyrosinase as catalyst and pyronine B as monitor. // *Chin. J. Anal. Chem.* 2005. V. 23. № 8. P. 1047–1052.
122. *Amponsaa-Karikari A., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N.* Determination of artemisinin in human serum by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20. № 11. P. 1157–1162.
123. *Green M.D., Mount D.L., Todd G.D., Capomacchia A.C.* Chemiluminescent detection of artemisinin. Novel endoperoxide analysis using luminol without hydrogen peroxide. // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 695. № 2. P. 237–242.
124. *Hong J., Maguhn J., Freitag D., Kettrup A.* Determination of H₂O₂ and organic peroxides by high-performance liquid chromatography with post-column UV-irradiation, derivatization and fluorescence detection. 1998. V. 361. № 2. P. 124–128.
125. *Nayyar G.M.L., Breman J.G., Newton P.N., Herrington J.* Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. // *The Lancet Infectious Diseases.* 2012. V. 12. № 6. P. 488–496.
126. *Dupont J., Consorti C.S., Suarez P.A.Z., de Souza R.F.* Preparation of 1-butyl-3-methyl imidazolium-based room temperature ionic liquids [1H-Imidazolium, 1-butyl-3-methyl-, chloride (1⁻); 1H-Imidazolium, 1-butyl-3-methyl-, tetrafluoroborate (1⁻); 1H-Imidazolium, 1-butyl-3-methyl-, hexafluorophosphate (1⁻)]. // *Org. Synth. Coll.* 2004. V. 10. P. 184–187.
127. *Чернецкая С.В.* Методы определения ртути (II), кадмия (II), висмута (III) с использованием пероксидазы хрена. Дисс... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1995. 255с.
128. *Miller Yu.I., Smith A., Morgan W.T., Shaklai N.* Role of hemopexin in protection of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation. // *Biochem.* 1996. V. 35. P. 13112–13117.
129. *Кольтгофф И.М., Сендел Е.Б.* Количественный анализ. М.: Госхимиздат, 1948. С. 822.
130. *Gaspar S., Popescu I.C., Gazaryan I.G., Bautista A.G., Sakharov I.Y., Mattiasson B., Csoregi B.* Biosensors based on novel plant peroxidases; a comparative study. // *Electrochem. Acta.* 2000. V. 46. P. 255-264.
131. *Baen S., Olbrich-Stock M., Posdorfer J., Schindler R.N.* An optical and spectroelectrochemical investigation of indigo carmine. // *Zeitschrift für Psychikalische Chemie.* 1991. Bd. 173. S 251–255.
132. *Titford M.* Comparison of historic Grüber dyes with modern counterparts using thin layer chromatography. // *Biotech. Histochem.* 2007. V. 82. № 4-5. P. 227–234.
133. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 429 с.

134. Laszlo J.S., Compton D.L. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium based ionic liquids. // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2002. V. 18. № 1–3. P. 109–120.
135. Josephy P.D., Eling T., Mason R.P. // The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 3669–3675.
136. Яцимирский К.Б. Кинетические методы анализа. 2-е изд. М.: Химия, 1967. 200с.
137. Родионов П.В. Твердофазные флуоресцентные биосенсоры для определения фенольных соединений и органических пероксидов. Дис... канд. хим. наук. М.: МГУ, 2013. 217с
138. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 348 с.
139. Целлюлоза и ее производные. / под. ред. Н. Байклза, Л. Сегала. Москва: Мир, 1974. Т. 2. С. 121, С. 412.
140. Hinestroza J., Netravali A.N. Cellulose-based composites. New green nanomaterials. 2 ed. Weinheim: Wiley, 2014. 328p.
141. Befani O., Graziani M.T., Agostinelli E., Crippa E. Biochemical engineering of biocatalyst immobilized on cellulose materials. // *Enzym. Microb. Technol.* 1993. V. 15. P. 551–566.
142. Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Долманова И.Ф. Тест-метод определения ртути на уровне ПДК с использованием пероксидазы, иммобилизованной на бумаге. // *Журн. аналит. химии.* 1995. Т. 50. № 5. С. 538–542.
143. Саввин С.Б., Кузнецов В.В., Шереметьев С.В., Михайлова А.В. Оптические химически сенсоры (микро- и наносистемы) для анализа жидкостей. // *Рос. хим. журн.* 2008. Т. LII. № 2. С. 7–16.
144. Золотов Ю.А., Иванов В.М., Амелин В.Г. Химические тест-методы анализа. М.: Едиториал УРСС, 2002. С. 304.
145. Bhattacharyya S.K., Chakraborty A., Gosh S., Dasgupta S., Mukhopadhyay R., Bandyopadhyay. Microcrystalline cellulose (MCC) as green multifunctional additive (MFA) in emulsion styrene butadiene rubber based high silica compound. // *Plast. Rubber Compos.* 2013. V. 42. № 9. P. 393–400.
146. Махова Т.А. Характеристика свойств и применение ацетата 1-бутил-3-метилимидазолия в химии лигнина. Дисс... канд. хим. наук. Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет, 2010. 118с.
147. Khalil H.P.S.A., Bhat A.H., Yusta A.F.I. Green Composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 87. P. 963–979.
148. Гриншпан Д.Д. Новые процессы получения и переработки растворов целлюлозы. Сборник статей. Химические проблемы создания новых материалов и технологий. 1998. С. 87–132.
149. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972. 520 с.
150. Chen X., Zhang Yu., Wang H. Solution rheology of cellulose in 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride. // *J. Rheol.* 2011. V. 55. № 3. P. 485–494.
151. Kosan B., Michels C., Meister F. Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. // *Cellulose.* 2008. V. 15. № 1. P. 59–66.
152. Liu X., Pang J., Zhang X., Wu Yu., Sun R. Regenerated cellulose film with enhanced tensile strength prepared with ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazoliumacetate (EMIMAc). // *Cellulose.* 2013. V. 20. № 3. P. 1391–1399.
153. Zhu Sh., Wu Yu., Chen Q., Yi Z., Wang C., Jin Sh., Ding Yi., Wu G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. // *Green Chem.* 2006. V. 8. P. 325–327.
154. Remsing R.C., Swatloski R.P., Rogers R.D., Moyna G. Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-*N*-butyl-3-methylimidazolium chloride: a ¹³C and ^{35/37}Cl

- NMR relaxation study on model systems. // Chem. Comm. 2006. V. 12. P. 1271–1273.
155. *Filho M.V., Stillger T., Muller M., Liese A., Wandrey C.* Is logP a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions? // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. P. 2993–2996.
156. *Боголицын К.Г., Скребец Т.Э., Махова Т.А.* Физико-химические свойства ацетата 1-бутил-3-метилимидазолия // Журн. общей химии. 2009. Т. 79. № 1. С. 128–131.
157. *Paul A., Mandal P.K., Samanta A.* On the optical properties of the imidazolium ionic liquids. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. № 18. P. 9148–9153.
158. *Gutowski K.E., Broker G.A., Willauer H.D., Huddleston J.G., Swatloski R.P., Holbrey J.D., Rogers R.D.* Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water structuring salts for recycle, metathesis and separations. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 6632–6633.
159. *Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А.* Определение ионов металлов с использованием нативных и иммобилизованных ферментов. Обзор. // Российский химический журнал. 2004. Т. XLVIII. № 4. С. 95–103.
160. *Abdullah J., Ahmad M., Heng L.Y., Karuppiah N., Sidek H.* Stacked films immobilization of MBTH in nafion/sol-gel silicate and horseradish peroxidase in chitosan for the determination of phenolic compounds. // Anal. Bioanal. Chem. 2006. V. 386. P. 1285–1292.
161. *Родионов П.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н.* Оптические сенсоры для определения фенольных соединений различного строения. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 11. С. 1044–1055.
162. *Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П.* Пероксидазный катализ и его применение. М.: МГУ, 1981. 92с.
163. *Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А.* Новые подходы в ферментативных методах определения субстратов оксидоредуктаз. В кн. Биохимические методы анализа. Т. 12. Серия «Проблемы аналитической химии». М.: Наука, 2010. С. 12–49.
164. *Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И.* Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. // Успехи биол. химии. 2006. Т. 46. С. 303–312.
165. *Ryan B.J., Carolan N., O’Fágáin C.* Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches. // Trends Biotech. 2006. V. 24 № 8. P. 355–363.
166. *Аллеева И.С.* Анионные пероксидазы и их применение в биокатализе. Автореферат диссертации на соискание учёной степени канд. хим.наук. М.: МГУ, 2007. 26с.
167. *Muginova S.V., Galimova A.Z., Poliakov A.E., Shekhovtsova T.N.* Hydrophilic ionic liquids as novel reaction media for the determination of quaiacol using horseradish and soybean peroxidases. // Mendel. Comm. 2011. V. 21. P. 97–98.
168. *Ulson de Souza S.M.A.G., Forgiarini E., Ulson de Souza A.A.* Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). // J. Hazard. Mat. 2007. V. 147. № 3. P. 1073–1078.
169. *Melo J.S., Moura A.P., Melo M.G.* Photophysical and spectroscopic studies of indigo derivatives in their keto and leuco forms. // J. Phys. Chem. A. 2004. V. 108. P. 6975–6981.
170. *Majerich D.M., Schmuckler J.S.* Demonstrating indigo carmine oxidation-reduction reactions: A choreography for chemical reactions. // J. College Sci. Teaching. 2008. P. 14–16.
171. *Асатиани В.С.* Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. С. 612.
172. *Jiménez L., Parra M., Tomás V., Martínez-Gutiérrez R., García-Cánovas F., Tudela J.* Indigo carmine biodegradation catalyzed by soybean peroxidase. / New Biotechnol. 2009. V. 25. Abstracts 2.4.28.
173. *Roberts E.L., Burgueres S., Warner I. M.* Spectroscopic studies of indigo carmine dye in organized media. // Appl. Spectrosc. 1998. V. 52. № 10. P. 1305–1313.
174. *Степанов С.В.* Отчет об экспериментальном изучении общей токсичности и влияния на иммунную систему препарата «Индигокармин, раствор для внутривенного

- введения 4 мг/мл» производства ООО «Эллара». ФГУН Институт Токсикологии ФМБА России. 2011. С. 5–6.
175. *Sari M.M.* Removal of acidic indigo carmine textile dye from aqueous solutions using radiation induced cationic hydrogels. // *Water Sci. Technol.* 2010. V. 61. № 8. P. 2097–2104.
176. *Barka N., Assabbane A., Nounah A., Ichou Y. A.* Photocatalytic degradation of indigo carmine in aqueous solution by TiO₂-coated non-woven fibres. // *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 152. P. 1054–1059.
177. *Deshpande S.S.* Handbook of food toxicology. New-York: Marcel Deccer, 2002, p. 238.
178. *Rodriguez E., Peche R., Merino J.M., Camarero L.M.* Decoloring of aqueous solutions of indigo carmine dye in an acid medium by H₂O₂/UV advanced oxidation. // *Environ. Eng. Sci.* 2007. V. 24. № 3. P. 363–371.
179. *Solís-Oba M., Eloy-Juárez M., Teutli M., Nava J.L., González I.* Comparison of advanced techniques for the treatment of an indigo model solution: electro incineration, chemical coagulation and enzymatic. // *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2009. V. 8. № 3. 275–282.
180. *Balan D.S.L., Monteiro R.T.R.* Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. // *J. Biotechnol.* 2001. V. 89. P. 141–145.
181. *Kaushik P., Malik A.* Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. // *Environ. Int.* 2009. V. 35. № 1. P. 127–141.
182. *Liu Yu H., Ye M., Lu Yi, Zhang X., Li G.* Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by direct evolution. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 91. № 3. P. 667–675.
183. *Prado A.G.S., Torres J.D., Faria E.A., Dias S.C.L.* Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan. // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 277. № 1. P. 43–47.
184. *Cestari A.R., Vieira E.F.S., Tavares A.M.G., Bruns R.E.* The removal of indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. // *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 153. P. 566–574.
185. *Dalaran M., Emik S., Güçlü G., İyim T. B., Özgümüş S.* Removal of acidic dye from aqueous solutions using poly(DMAEMA-AMPS-HEMA) terpolymer/MMT nanocomposite hydrogels. // *Polym. Bull.* 2009. V. 63. P. 159–171.
186. *Toprak M., Arik M.* An investigation of energy transfer between coumarin 35 and xanthene derivatives in liquid medium. // *Turk. J. Chem.* 2010. V. 34. P. 285–293.
187. *Pisklak T.J., Macías M., Coutinho D.H., Huang R.S., Balkus K.J.* Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst. // *Top. Catal.* 2006. V. 38. № 4. P. 269–278.
188. *Chen L.-H., Liu L.-Z., Shen H.-X.* Studies on mimic peroxidase behaviors of molybdenum(VI)-sodium dodecyl sulphate complex determination of hydrogen peroxide and glucose. // *Anal. Lett.* 2004. V. 37. № 4. P. 561–573.
189. *Ferreira J.F.S., Luthria D.L., Sasaki T., Heyerick A.* Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. // *Molecules.* 2010. V. 15. P. 3135–3170.
190. *Arik M., Onganer Y.* Molecular excitons of pyronin B and pyronin Y in colloidal silica suspension. // *Chem. Phys. Lett.* 2003. V. 375. 126–133.
191. *Sun W., You J., Hu X., Jiao K.* Utilization of pyronine B as voltammetric probe for the determination of DNA. // *Anal. Lett.* 2006. V. 39. P. 33–45.
192. *Bünzli J.-C.G.* Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 2729–2755.

193. *Montgomery C.P., Murray B.S., New E.J., Pal R., Parker D.* Cell-penetrating metal complex optical probes: Targeted and responsive systems based on lanthanide luminescence. // *Accounts Chem. Res.* 2009. V.42. P. 925–937.
194. *Леоненко И.И., Александрова Д.И., Егорова А.В., Антонович В.П.* Аналитическое применение эффектов тушения люминесценции. // *Методы и объекты химического анализа.* 2012. Т. 7. № 3. С. 108–125
195. *Смирнова Т.Д.* Флуориметрические методы определения некоторых биологических активных веществ с использованием переноса энергии и организованных сред. Дис... канд. хим. наук. Саратов: ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского», 2012. 308с.
196. *Rakicioglu Y., Perrin J.H., Schulman S.G.* Increased luminescence of the tetracycline-europium(III) system following oxidation by hydrogen peroxide. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. V. 20. № 1–2. P. 387–399.
197. *Wu M., Lin Z., Dürkop A., Wolfbeis O.S.* Time-resolved enzymatic determination of glucose using a fluorescent europium probe for hydrogen peroxide. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 380. P. 619–626.
198. *Dehaen G., Absillis G., Driesen K., Binnemans K., Parac-Vogt T.N.* (Tetracycline)europium(III) complex as luminescent probe for hydrogen peroxide detection. // *Helvetica Chim. Acta.* 2009. V. 92. P. 2387–2397.
199. *Bian W., Zngang N., Wang L.* Spectrofluorometric determination of total bilirubin in human serum samples using tetracycline-Eu³⁺. // *Anal. Sci.* 2010. V. 6. № 7. P. 785–789.
200. *Kazmierczak S.C., Robertson A.F., Catrou P.G., Briley K.P., Kreamer B.L., Gourley G.R.* Direct spectrophotometric method for measurement of bilirubin in newborns: comparison with HPLC and automated diazo method. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. № 7. P. 1096–1097.
201. *Sevillanocabeza A., Alberolagarbi M. C., Campinsfalco P.* Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of bilirubin and albumin in human serum using the diazo method. // *Microchem. J.* 1994. V. 50. № 1. P. 14–27.
202. *Lu C., Lin J.M., Huie C.W.* Determination of total bilirubin in human serum by chemiluminescence from the reaction of bilirubin and peroxyxynitrite. // *Talanta.* 2004. V. 63. № 2. P. 333–337.
203. *Lu C., Song G., Lin J.M., Huie C.W.* Enhancement in sample preconcentration by the on-line incorporation of cloud point extraction to flow injection analysis inside the chemiluminescence cell and the determination of total serum bilirubin. // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 590. № 2. P. 159–165.
204. *Lee H.S., Karim M.M., Alam S.M., Lee S.H.* Quantitative determination of bilirubin by inhibition of chemiluminescence from lucigenin. // *Luminescence.* 2007. V. 22. № 4. P. 331–337.
205. *Li X. P., Rosenzweig Z.* A fiber optic sensor for rapid analysis of bilirubin in serum // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 353. № 2–3. P. 263–273.
206. *Nie Z., Fung Y.S.* Microchip capillary electrophoresis for frontal analysis of free bilirubin and study of its interaction with human serum albumin. // *Electrophoresis.* 2008. V. 29. № 9. P. 1924–1931.
207. *Kurosaka K., Senba S., Tsubota H., Kondo H.* A new enzymatic assay for selectively measuring conjugated bilirubin concentration in serum with use of bilirubin oxidase. // *Clin. Chim. Acta.* 1998. V. 269. P. 125–1097.
208. *Andreu Y., Galbán J., de Marcos S., Castillo J. R.* Determination of direct-bilirubin by a fluorimetric-enzymatic method based on bilirubin oxidase. // *Fresenius' J. Anal. Chem.* 2000. V. 368. № 5. P. 516–521.
209. *Kosaka A., Yamamoto C., Morishita Y., Nakane K.* Enzymatic determination of bilirubin fractions in serum. // *Clin. Biochem.* 1987. V. 20. № 6. P. 451–458.

210. *Егоров В.М.* Ионные жидкости для экстракции и создания химических сенсоров. Автореферат на соискание ученой степени кандидата химических наук. 2008.
211. *Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D.* Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. // *Green Chem.* 2001. V. 3. № 4. P. 156–164.
212. *Bentivoglio G., Röder T., Fasching M., Schottenberger H., Sixta H.* Cellulose processing with chloride-based ionic liquids. // *Lenzinger Berichte.* 2006. Bd. 86. S. 154–161.
213. *Li D., Sevastyanova O., Ek M.* Pretreatment of softwood dissolving pulp with ionic liquid. // *Holzforshung.* 2012. V. 66. P. 935–943.
214. *Gupta K.M., Jiang Ah. Hu. L.* Cellulose regeneration from a cellulose/ionic liquid mixture: the role of anti-solvents. // *RSC Adv.* 2013. V. 3. P. 12794–12801.
215. *Mauriac P., Marion P.* US8206621 B2. Use of ethanol as plasticizer for preparing subcutaneous implants containing thermolabile active principles dispersed in a PLGA matrix. // 2012.
216. *Buenger D., Topuz F., Groll J.* Hydrogels in sensing application. // *Prog. Polym. Sci.* 2012. V. 37. № 12. P. 1678–1719.
217. *Zhao H.* Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006. V. 81. № 6. P. 877–891.
218. *Zhao H., Olubajo O., Song Z., Sims A.L., Person T.E., Lawal R.A., Holley L.A.* Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. // *Bioorg. Chem.* 2006. V. 34. № 1. P. 15–25.
219. *Поляков А.Е.* Peroксидазы хрена и сои для определения фенольных и эндопероксидных соединений в водных, водно-органических средах и гидрофильных ионных жидкостях. Дис... канд. хим. наук. М.: МГУ, 2011. 230с.
220. *Hong E.S., Kwon O.Y., Ryu K.* Strong substrate-stabilizing effect of a water-miscible ionic liquid [BMIM][BF₄] in the catalysis of horseradish peroxidase. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 3. P. 529–533.
221. *Naushad M., Al Othman Z.A., Khan A.B., Ali M.* Effect of ionic liquid on activity stability, and structure of enzymes: a review. // *J. Biol. Macromol.* 2012. V. 51. № 4. P. 555–560.
222. Tables for chemistry. Solvent polarity acc. Dimroth and Reichardt. <http://www.stenutz.eu/chem/solv20.php>.
223. <http://ILThermo.boulder.nist.gov/ILThermo/>.
224. *Мугинова С.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н.* Кинетика и химизм реакций окисления *o*-фенилендиамина, *o*-дианизидина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода, катализируемых пероксидазой хрена, иммобилизованной на различных носителях. // *Журн. прикладной химии.* 1999. Т. 72. № 5. С. 803–810.
225. *Leon J.C., Alpeeva I.S., Chubar T.A., Galaev I.Y., Csoregi E., Sakharov I.Y.* Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. // *Plant. Sci.* 2002. V. 163. № 5. P. 1011–1019.
226. *Poliakov A.E., Dumshakova A.V., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and α -methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms. // *Talanta.* 2011. V. 84. № 3. P. 710–716.
227. *Yabuki S., Hirata Y., Sato Y., Iijima S.* Preparation of a cellulose-based enzyme membrane using ionic liquid to lengthen the duration of enzyme stability. // *Anal. Sci.* 2012. V. 28. P. 373–377.
228. *Yabuki S., Iwamoto M., Hirata Y.* Long-term stability of a cellulose-based glucose oxidase membrane. // *Mater.* 2014. V. 7. P. 899–905.

229. Roberts E.L., Burgueres S., Warner I. M. Spectroscopic studies of indigo carmine dye in organized media. // Appl. Spectrosc. 1998. V. 52. № 10. P. 1305–1313.
230. <http://www.chem.ed.ac.uk/sites/default/files/outreach/experiments/indigo-teach.pdf>
231. <http://www.jagson.com/food-color/indigocarmine.php>
232. Олейник Л.И., Веселова И.А., Родионов П.В., Будашов И.А., Шеховцова Т.Н. Оптический биосенсор на основе {пероксидаза – хитозан} для определения гидрохинона. // Завод. лаб. Диагностика материалов. Т. 77. № 4. С. 23–28.
233. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
234. Тихомирова Т.И., Смирнов В.С., Быстров В.Ю. Определение тетрациклина по сенсibilизированной люминесценции европия(III), сорбированного на кремнеземе, химически модифицированном группами иминодиуксусной кислоты. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. Т. 49. № 5. С. 344–348.
235. Егорова А.В., Скрипинец Ю.В., Александрова Д.И., Антонович В.П. Сенсibilизированная люминесценция и ее применение в биоанализе. // Методы и объекты химического анализа. 2010. Т. 5. № 4. С. 180–201.
236. Zhu W., Li W., Yang H., Jiang Y., Wang Ch., Chen Yu, Li G. A rapid and efficient way to dynamic creation of cross-reactive sensor arrays based on ionic liquids. // Chem. Eur. J. V. 19. № 35. P. 11603–11612.
237. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. Пятигорск.: Пятигорская ГФА Росздрава, 2007. С. 317.
238. Wolfbeis OS, Durkop A, Wu M, Lin Z. A Europium-Ion-Based Luminescent Sensing Probe for Hydrogen Peroxide // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2002. V. 41. № 23. P. 4495–4498.
239. Ripin D.H., Evans D.A. pK_a's of nitrogen acids. 2002. Chem. 206.
240. Duerkop A., Turel M., Lobnik A., Wolfbeis O.S. Microtiter plate assay for phosphate using a europium-tetracycline complex as a sensitive luminescent probe. // Anal. Chim. acta. 2006. V. 555. P. 292–298.
241. Lee K.S., Gartner L. M. Spectrophotometric characteristics of bilirubin. // Pediat. Res. 1976. V. 10. P. 782–788.
242. 265. Zhuang Q., Dai H., Liu H. Electrochemical study on the interaction of bilirubin with europium ions in aqueous media. // Electroanalysis. 1999. V. 11. № 18. P. 1368–1371.
243. Chen Li-Hua, Liu Liu-Zhan, Shen Han-Xia. Mn(II)-sodium dodecylsulphate complex mimic enzyme-catalyzed fluorescence quenching of pyronine B by hydrogen peroxide. // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 480. P. 143–150.
244. Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции развития. // Журн. аналит. химии. 2000. Т. 55. № 7. С. 679–686.
245. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer. 2006. XXVI. 954p.
246. Rodrigues R.A.F., Foglio M.A., Ju'nior S.B., Santos A.d.S., Rehder V.L.G. Otimizaçãodo process ode extraçãoe isolamento do antimalárico artemisinina a partirde *Artemisia annua* L. // Quim. NoVa. 2006. V. 29. P. 368–372.
247. Singh N.P., Lai H. Synergistic cytotoxicity of artemesinin and sodium butyrate on human cancer cells. // Anticancer. Res. 2005. V. 25. P. 4325–4332.
248. Голубев В.Н. Топинамбур: состав, свойства, способы переработки и области применения / В.Н. Голубев, И.В. Волкова, Х. М. Кумаланов. М., 1995. 185с.
249. Jung M., Lee K., Kendrick H., Robinson B.L., Croft S.L. Synthesis, stability, andantimal arial activity of new hydrolytically stable and water-soluble(+) –deoxoartelinic acid. // J. Med. Chem. 2002.V. 45. № 2. P. 4940–4944.
250. Федосеева Г.М., Минович В.М., Горячкина Е.Г., Переломова М.В. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: Химический анализ лекарственных растений. Методическое пособие по фармакогнозии. Иркутск: Типография ИГМУ Минсоцразвития РФ, 2009. 67с.