

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**СОРБЦИЯ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОМАГНЕТИТА,  
МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 411 группы  
направления 04.03.01 – «Химия»

Институт химии

Касимцевой Ксении Станиславовны

Научный руководитель  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор, д.х.н.

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

С.Н. Штыков

Зав. кафедрой  
д.х.н., доцент

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

Т.Ю. Русанова

Саратов 2019

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы** заключается в применении магнитной твердофазной экстракции для концентрирования и выделения морина.

Морин – желтое, кристаллическое, полифенольное соединение, которое относится к классу флавоноидов. Он содержится в плодах такого декоративного растения как маклюры оранжевой, которое является материалом для производства желтого красителя, содержащего морин, применяемого для окрашивания ткани хаки для военной одежды. Также морин содержится в миндале, сладком каштане, фруктах и красном вине. При этом уже давно известны его биологические и лечебные свойства, которые в основном связаны с его антиоксидантной активностью.

Магнитная твердофазная экстракция (МТФЭ) – современный метод концентрирования и выделения веществ. Данный метод обладает относительной простотой выполнения и предполагает применение минимальных количеств растворителей (чаще всего органических). Использование магнитных наночастиц (МНЧ) подходит для концентрирования и сорбции огромного спектра органических и неорганических веществ. Применение МНЧ особенно не отличается от применения других видов сорбентов, но дает возможность заменить фильтрацию и центрифугирование на магнитное разделение. Для полного удаления магнитных частиц из раствора требуется значительно меньше времени. Главным инструментом в таком случае считают постоянный магнит, необходимый для проведения эксперимента.

**Целью** работы является разработка методики количественной сорбции и концентрирования морина на наночастицах магнетита, модифицированных полиэтиленмином.

Для достижения поставленной цели решены **задачи**:

1. Выбор условий для флуориметрического определения морина в комплексе с алюминием;

2. Определение константы диссоциации морина и влияние растворенного кислорода на его окисление;
3. Синтез, модификация магнетита и выявление оптимальных условий сорбции морина на МНЧ@ПЭИ;
4. Выбор элюента и условий десорбции морина;
5. Оценка условий концентрирования морина.

#### **Объекты и методы исследования.**

В работе использованы наночастицы магнетита, модифицированные полиэтиленмином (ПЭИ), флавоноид морин, различные виды ПАВ и растворителей для десорбции.

Спектры поглощения снимали с помощью двухлучевого сканирующий спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Япония), спектры флуоресценции – с помощью спектрофлуориметра Shimadzu-RF-5301 (Япония).

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** рассмотрена актуальность применения магнитной твердофазной экстракции с использованием магнитных наночастиц, модифицированных полиэтиленмином (МНЧ@ПЭИ), а также кратко описаны биологические свойства такого флавоноида, как морин.

Представлен **литературный обзор** с описанием биологических свойств морина, его протолитических свойств и использования его как аналитического реагента на металлы. Также представлены уже известные методы его определения и рассмотрены преимущества магнитной твердофазной экстракции как современного метода концентрирования.

Морин – продукт метаболизма растений, который имеет огромный спектр значимых функций в развитии и росте растений. Он ответственен за иммунную функцию, которая поддерживает функциональность и целостность клеточных белков, мембранных липидов и нуклеиновых кислот. Также он играет важную роль в структурировании клеточных белков (регулирование клеточного роста). При этом морин содержит гидроксильные

группы в положениях 3, 2', 4', 5, 7 и, вследствие этих особенностей, он легко образует комплексы со многими металлами, такими как Al (III), Fe (II), Fe (III), La (III) или Gd (III). Формирование комплексов металлов играет роль во многих биологических системах, а также применяется в спектрофотометрических и флуориметрических методах количественного определения металлов и самого флавоноида за счет того, что морин обладает слабой собственной флуоресценцией, которая в несколько раз усиливается при его связывании в хелаты.

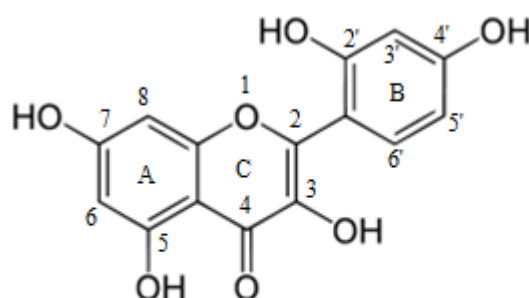


Рисунок 1 – Структурная формула морина

В связи с наличием нескольких гидроксигрупп в своей структуре, морин является мультипротонной кислотой, которая подвергается ступенчатому депротонированию по мере увеличения pH. В литературе определены все пять констант диссоциации различными методами.

Для определения морина в растительных и пищевых объектах чаще используют количественные методы, нежели качественные. Анализ литературы за последнее время показал, что очень часто используют хроматографические методы с различными способами детектирования, и реже спектрофотометрические и электрохимические способы. Основным преимуществом первых является возможность одновременного разделения и определения морина в смесях с другими флавоноидами.

МТФЭ среди всех существующих методов концентрирования и разделения нашла широкое применение. Это связано с относительной простотой ее выполнения, применением минимальных количеств

растворителей (чаще всего органических), а также рядом преимуществ МНЧ по сравнению с другими сорбентами:

- Они обладают явлением суперпарамагнетизма, т.е. проявляют магнитные свойства только при воздействии постоянного магнитного поля;
- Обеспечивают быстрое и простое отделение сорбента от жидкой матрицы (10-20 сек);
- Обеспечивают высокую эффективность сорбции, обусловленную большим отношением поверхности наночастиц к их объему;
- Могут ресуспендироваться после устранения внешнего магнитного поля, что позволяет быстро и просто промывать сорбент;
- Подходят для многократного использования;
- В модифицированном виде могут долго находиться в водных растворах и не являются канцерогенами.

ТФЭ широко используется для процессов концентрирования и разделения веществ, так как основана на процессах сорбции и десорбции. Также эффективность использования этого метода определяется средством определяемого соединения и сорбента. Выбор оптимального сорбента и элюента позволяет добиться высоких степеней концентрирования определяемых компонентов.

**В экспериментальной части** описаны объекты и методы исследования; оборудование и аппаратура; приведены методики синтеза МНЧ@ПЭИ, приготовления растворов и проведения экспериментов.

В данной работе были синтезированы и модифицированы МНЧ:

*Методика синтеза и модификации магнитных наночастиц*

Наночастицы магнетита получали методом химического осаждения из смешанного раствора солей двух- и трехвалентного железа.

Первоначально готовили растворы используемых реагентов. Далее в реакционную камеру (химический стакан, снабженный механической

мешалкой) помещали 20 мл 1 М раствора NaOH и 150 мл воды. Через камеру с раствором солей и реакционную камеру, содержащую гидроксид натрия, барботировали азот в течение 10 мин, чтобы удалить растворенный кислород. Далее раствор солей железа в течение нескольких секунд впрыскивали под давлением азота в активно перемешиваемый раствор гидроксида натрия и оставляли при перемешивании на 30 мин в атмосфере азота.

Полученный черный осадок наночастиц магнетита осаждали с помощью постоянного магнита и сливали надосадочную жидкость, вытесняя ее азотом в сливную камеру. Затем, при перемешивании к осадку добавляли 50 мл воды (также под давлением азота), еще раз перемешивали в течение 5 – 7 мин. Процедуру повторяли 2 раза. В процессе последней промывки оставляли 30 – 40 мл жидкости и систему интенсивно перемешивали. Все процессы смешивания реагентов и промывки проводили в атмосфере азота, регулируя давление газа в каналах системой клапанов.

Химическая реакция, соответствующая формированию наночастиц магнетита, представлена ниже:



Формирование наночастиц магнетита происходит в диапазоне значений pH от 9 до 14 в отсутствие кислорода при условии, что соотношении молярных концентраций:  $\text{Fe}^{3+} : \text{Fe}^{2+} = 2 : 1$

Для модификации нестабилизированных МНЧ их помещали в стеклянную лабораторную коническую колбу на 250 мл и добавляли 13.5 мл раствора полиэтиленimina с концентрацией 20 мг/мл. После чего содержимое колбы перемешивали на шейкере 15 минут. Полученный черный осадок модифицированных наночастиц магнетита осаждали с помощью постоянного магнита и сливали надосадочную жидкость. Затем, при перемешивании к осадку добавляли 150 мл деионизированной воды, и снова перемешивали в течение 5 – 7 мин. Процедуру повторяли 3 раза. Полученный

коллоидный раствор модифицированных магнитных наночастиц помещали в пластиковую пробирку и хранили при комнатной температуре.

#### Методика сорбции морина

В эппендорф объёмом 5 мл вводили 0.2 мл флавоноида ( $2 \cdot 10^{-4}$  М), 1 мл ацетатно-аммиачного буфера (рН 11), 1.0 мл магнитных наночастиц, модифицированных полиэтиленимином (13.0 мг) и 1.8 мл дистиллированной воды. Раствор флавоноида с сорбентом подвергали механическому или ультразвуковому перемешиванию в течение 15 и 10 мин соответственно при 20-30°C, ставили на постоянный магнит и отбирали надосадочную жидкость в отдельный чистый эппендорф для дальнейшего определения спектрофотометрическим или спектрофлуориметрическим методом.

#### Методика концентрирования морина

В стеклянную банку с прикручивающейся крышкой объёмом 25, 50 или 100 мл последовательно приливали следующие количества реагентов (таблица 1).

Таблица 1 – Необходимые количества реагентов для концентрирования морина. ААБ. рН 11.  $C_{MO} = 2 \cdot 10^{-4}$  М.

	$V_{MO}$ , мл	$V_{MNЧ@ПЭИ}$ , мл	$m_{MNЧ@ПЭИ}$ , мг	$V_{ААБ}$ , мл	$V_{H_2O}$ , мл
25 мл	0.2	1.8	23.4	5	18
50 мл	0.2	1.8	23.4	10	38
100 мл	0.2	2	26	10	87.8

Перемешивали с помощью УЗ в течении 10 мин и ставили на постоянный магнит, после чего отбирали необходимый для анализа объем надосадочной жидкости и анализировали спектрофотометрическим или спектрофлуориметрическим методом. Далее проводили десорбцию указанным ниже способом.

### Методика десорбции морины

На первой стадии, используя методику сорбции, проводили концентрирование морины. Далее к сорбенту, содержащему аналит, добавляли необходимый объем элюента (2 мл 0.1 М NaOH) и подвергали УЗ-перемешиванию в течение ~30 минут, после чего ставили на постоянный магнит и отбирали 1.0 мл элюата в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл. Для отделения остатков ПЭИ и оставшихся наночастиц магнетита элюат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин, после чего снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-500 нм. Для определения степени извлечения морины при концентрировании его из больших объемов (25-100 мл) применяли флуориметрический метод анализа.

### Флуориметрическая методика определения морины

В пробирку на 10 мл последовательно приливали 0.5 мл надосадочной жидкости после концентрирования и центрифугирования, 1 мл ААБ рН 4.5, 0.15 мл  $AlCl_3$  ( $3 \cdot 10^{-3}$  М), 0.15 мл ДДС (0.1 М) и доводили дистиллированной водой до 5 мл. Перемешивали и спустя 15 мин снимали спектр флуоресценции при 418 нм, в диапазоне длин волн 440-600 нм, с шириной щелей 10 нм.

Описаны **результаты** по спектральным характеристикам морины и протолическому равновесию в растворах, а также по влиянию концентрации ионов алюминия и мицелл ПАВ на его флуоресценцию. Показаны результаты применения МТФЭ для сорбции и концентрирования морины с последующей десорбцией.

Из литературы известно, что наблюдаемая полоса I (360-390 нм) объясняется наличием циамонильной системы (кольцо В-С), в то время как полоса II (260-265 нм) соответствует бензоильной части (кольцо А – С). Эти пики возникают из-за  $\pi$ - $\pi^*$  - переходов и сопряжения системы колец А и В, прикрепленных к среднему кольцу (С).



### Определение константы диссоциации

Константы диссоциации ОН-групп морина сильно отличаются по литературным данным. Это вызвано окисляемостью морина растворенным в воде кислородом, скорость которой растет с увеличением значения рН. В связи с этим, при изучении и описании свойств данного флавоноида крайне необходимо учитывать влияние окисления на систему.

Именно поэтому в исследуемом интервале значений рН нами были оценены изменения спектров поглощения морина, по которым далее рассчитывали значение величины первой константы диссоциации. Из спектров поглощения молекулярной и диссоциированной форм морина видно, что изменение оптической плотности в течение 30 минут не превышает 2%, и, следовательно, обе формы устойчивы к окислению и практически не меняются в течение данного промежутка времени.

При этом нами были рассчитаны константы диссоциации при двух длинах волн  $\lambda=350$  нм и  $\lambda=395$  нм. Полученная величина согласуется с некоторыми литературными данными.

### Флуориметрическая методика определения морина

При анализе литературы упоминалось, что морин является органическим реагентом на металлы, образуя с ними хелаты, а также он обладает собственной слабой флуоресценцией, интенсивность которой увеличивается при изменении микроокружения (растворитель, мицеллы ПАВ) и введении ионов металлов.

Нами было изучено влияние природы и концентрации ПАВ в области критической концентрации мицеллообразования (ККМ). В качестве представителей катионных ПАВ апробировали влияние мицелл бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ), анионных – додецилсульфата натрия (ДДС), а неионных – Тритона X-100 (ТХ-100).

По спектрам флуоресценции морина и комплексов морин- $Al^{3+}$ -ПАВ видно, что мицеллы ДДС увеличивают её практически в 4 раза, что, скорее

всего, связано с анионным характером ДДС, позволяющим концентрировать на поверхности мицелл одновременно катион алюминия и морина.

В целях разработки флуориметрической методики определения морина нами был проведен анализ и подбор оптимальных условий флуоресценции его комплекса с алюминием. Цель эксперимента заключалась в снижении предела обнаружения флуоресцентной методики количественного определения морина в виде его хелата с  $Al^{3+}$  в присутствии мицелл ПАВ.

По полученным спектрам флуоресценции видно, что при увеличении концентрации металла происходит усиление интенсивности спектров флуоресценции комплекса морина. Максимум флуоресценции наблюдается при концентрации ионов алюминия  $\geq 1 \cdot 10^{-4}$  М.

Влияние концентрации ДДС: по спектрам также видно, что после солюбилизации комплекса в мицелле происходит резкий скачок почти в 4 раза. Последующее увеличение концентрации ДДС постепенно приводит к снижению интенсивности флуоресценции.

Также показано, что при перемешивании системы МО-АI-ДДС в течении 10-40 минут интенсивность флуоресценции изменяется, но не значительно.

Для расчета квантового выхода комплекса МО-АI-ДДС в качестве стандарта был использован флуоресцеин. Относительный квантовый выход флуоресценции комплекса морина с алюминием в присутствии ДДС составил 0.32.

### Сорбция морина

Для определения оптимальных условий сорбции было изучено влияние кислотности среды раствора (в интервале рН 5-11), времени сорбции, массы сорбента (в интервале 2.6 – 18.2 мг) и аналита (в интервале  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $8 \cdot 10^{-5}$  М), температуры раствора и воздействия ультразвука на степень извлечения морина методом МТФЭ. На основе полученных данных были выбраны оптимальные условия для сорбции морина, которые использовались для дальнейшей работы.

### Концентрирование морина

Также было апробировано концентрирование морина методом МТФЭ из растворов объемом 25, 50 и 100 мл. Контроль сорбции вели флуориметрическим методом по его остаточной концентрации в растворе после сорбции по причине очень малого содержания морина в растительных организмах. Для каждого объема рассмотрено влияние таких факторов, как масса сорбента, время установления равновесия, способ перемешивания и объем необходимого элюента. Концентрация самого морина выбиралась так, чтобы в растворах 25, 50 и 100 мл была одинаковая масса флавоноида ( $1.28 \cdot 10^{-5}$  г) и постепенно снижающаяся концентрация в растворе.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что при объеме раствора 25 мл при добавлении более 20-23 мг сорбента степень извлечения увеличивается незначительно, поэтому это значение было использовано как оптимальное. Такая же зависимость наблюдается и в растворах с общим объемом 50 мл. При этом в 100 мл растворах предельное значение степени сорбции наблюдается при массе сорбента 26-36.5 мг наибольшие значения степени сорбции за меньшее время (~10 мин) по сравнению с механическим перемешиванием.

### Десорбция морина

Для количественного элюирования морина с поверхности наночастиц нами были апробированы несколько растворителей. На основе полученных значений можно сделать вывод, что NaOH наиболее удобен для элюирования морина с поверхности МНЧ@ПЭИ, при этом с увеличением объема щелочи в растворе степень десорбции уменьшается, что, вероятно, связано с разрушением модифицированного покрытия МНЧ. Наилучшим временем десорбции является 30-40 мин при УЗ-перемешивании.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ литературы и описаны свойства морина, его биологическая активность и используемые для его определения методы.

2. Определена константа диссоциации первой ОН-группы морина и показано, что в интервале рН 3-6 растворенный кислород не влияет на спектры поглощения морина. Флуориметрическим методом исследовано влияние катионных, анионных и неионных мицелл ПАВ на комплексообразование морина с алюминием. Показано, что в мицеллярном растворе додецилсульфата натрия интенсивность флуоресценции хелата растет в 4 раза, рассчитан квантовый выход флуоресценции, равный 0.32. Градуировочный график для определения морина линеен в интервале  $1.8 \cdot 10^{-8}$  -  $2 \cdot 10^{-7}$  М, предел обнаружения составил  $6 \cdot 10^{-9}$  М, предел определения  $1.8 \cdot 10^{-8}$  М.

3. Синтезированы наночастицы магнетита, модифицированные полиэтиленгликолем со средним размером  $19 \pm 3$  нм. Изучено влияние рН, массы сорбента, времени перемешивания и температуры на сорбцию морина. Показано, что степень извлечения в интервале  $(97 \pm 3)\%$  достигается при сорбции морина в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  М при рН 11, при массе сорбента 13 мг, времени сорбции 10-15 мин при механическом и 3-5 мин при ультразвуковом перемешивании при температуре 25-30°C. Сорбция на магнитных наночастицах, модифицированных ПЭИ позволяет проводить концентрирование морина из объемов 25, 50 и 100 мл с коэффициентами концентрирования, изменяющимися в интервале  $(1.8-4.7) \cdot 10^3$ .

4. Изучено влияние природы элюента на десорбцию морина и показано, что количественная десорбция  $(95 \pm 2)\%$  достигается при использовании 2 мл 0.1 М NaOH и времени перемешивания 30 мин.