

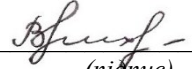
Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Навчально-науковий інститут «Фізико-технічний факультет»

Кафедра медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

До захисту допущено

Кафедрою медичної фізики та біомедичних нанотехнологій протокол № 7 від
15.12.2025

завідувач кафедри  Валерія ТРУСОВА
(підпис) (ім'я, прізвище)

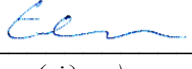
«15» грудня 2025 р.

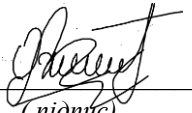
Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти
(першого (бакалаврського) / другого (магістерського))

Дослідження можливості використання флуоресцентних барвників для
детектування іонів важких металів
_____ (назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»
(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма «Медична фізика»
(назва освітньої програми)

Виконавець  Кирил ЄЛЬЦОВ
(підпис) (ім'я, прізвище)

Науковий керівник  Ольга ЖИТНЯКІВСЬКА
(підпис) (ім'я, прізвище)

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Сльцов К.А. – Дослідження можливості використання флуоресцентних барвників для детектування іонів важких металів. – Рукопис.

Дипломна робота магістра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2025.

Робота присвячена дослідженню можливостей створення чутливих, недорогих і біосумісних сенсорних платформ для виявлення іонів токсичних важких металів. Запропонований підхід ґрунтується на поєднанні амілоїдних фібрил з амілоїд-чутливими флуоресцентними барвниками, здатними зазнавати характерних спектральних змін при взаємодії з амілоїдними структурами та іонами металів. Методами абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії досліджено вплив іонів важких металів на спектральні та фотофізичні властивості ряду барвників. Показано, що флуоресцентна відповідь бензантронових барвників визначається не лише їхнім прямим зв'язуванням з іонами металів, але й силою взаємодії металів з амілоїдними фібрилами. Виявлена подвійна чутливість зумовлює перспективність досліджуваних барвників як оптичних зондів для вивчення метал-білкових взаємодій та створення супрамолекулярних сенсорних платформ для екологічного моніторингу важких металів.

Ключові слова: Флуоресцентні барвники; метод абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії; амілоїдні фібрили; детекція металів; важкі метали

ABSTRACT

Yeltsov K.A. – Investigation of the possibility of using fluorescent dyes for the detection of heavy metal ions. – Manuscript.

Master's thesis in the specialty 105 “Applied Physics and Nanomaterials” – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2025.

The thesis is devoted to the study of the feasibility of developing sensitive, low-cost, and biocompatible sensor platforms for the detection of toxic heavy metal ions. The proposed approach combines amyloid fibrils with amyloid-sensitive fluorescent dyes that exhibit characteristic spectral changes upon interaction with amyloid structures and metal ions. Using absorption and fluorescence spectroscopy, the effects of heavy metal ions on the spectral and photophysical properties of a series of dyes were investigated. It is shown that the fluorescence response of benzanthrone dyes is governed not only by their direct binding to metal ions but also by the strength of metal interactions with amyloid fibrils. This dual sensitivity highlights the potential of the studied dyes as optical probes for investigating metal–protein interactions and for developing supramolecular sensor platforms for environmental monitoring of heavy metals.

Keywords: fluorescent dyes; absorption and fluorescence spectroscopy; amyloid fibrils; metal detection; heavy metals

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
<i>1.1 Проблема забруднення вод важкими металами</i>	7
<i>1.2 Методи детекції іонів важких металів: атомно-абсорбційна спектроскопія, ICP-MS, електрохімічні методи: переваги та недоліки</i> ..	10
<i>1.3. Оптичні сенсорні системи для детектування іонів важких металів у воді</i>	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	36
<i>3.1. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку бензантронових барвника АБМ в воді та в присутності амілоїдних фібрил β-лактоглобуліну</i>	36
<i>3.2. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку скварайнового барвника SQ1 в воді та в присутності амілоїдних фібрил β-лактоглобуліну</i>	46
<i>3.3. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку ціанінових барвника в воді та в присутності амілоїдних фібрил β-лактоглобуліну</i>	Помилка! Закладку не визначено.
ВИСНОВКИ	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	60

ВСТУП

Забруднення іонами важких металів створює значну проблему для навколишнього середовища та громадського здоров'я, оскільки такі іони, як ртуть (Hg^{2+}), свинець (Pb^{2+}), кадмій (Cd^{2+}) та мідь (Cu^{2+}), є високотоксичними навіть у слідових рівнях, зберігаються в екосистемах та легко біоакумулюються, що має сильний зв'язок з раком та нейродегенеративними розладами. Точне виявлення цих іонів залишається критичним пріоритетом для моніторингу навколишнього середовища та профілактики захворювань, пов'язаних з важкими металами. Незважаючи на високу чутливість та надійність традиційних аналітичних методів, включаючи атомно-абсорбційну спектроскопію (AAS), мас-спектрометрію з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS) та електрохімічні методи аналізу, їх застосування обмежене високою вартістю, ретельною підготовкою зразків та обмеженою портативністю в польових умовах. Ці обмеження підкреслюють нагальну потребу в нових стратегіях зондування, особливо для виявлення забруднення води. Флуоресцентне зондування стало привабливою альтернативою завдяки своїй високій чутливості, селективності та потенціалу для застосування в реальному часі. Наприклад, низькомолекулярні флуоресцентні зонди характеризуються швидкою реакцією та високою спорідненістю завдяки селективній координації з іонами металів, що дозволяє точно модулювати флуоресценцію.

Одночасно, наноматеріали на основі білків стають високоефективними нанокаркасами для видалення важких металів завдяки їхнім різноманітним функціональним групам амінокислот та здатності до самоорганізації в настроювані супрамолекулярні структури, такі як фібрили, гелі та сферичні конденсати. Нещодавні досягнення в адсорбентах, отриманих з білків та пептидів, демонструють високу ефективність зв'язування металів. Незважаючи на структурну стабільність, велику площу поверхні та численні сайти зв'язування амілоїдних фібрил, що робить їх добре придатними для функціоналізації з оптичними репортерами в біосенсорних застосуваннях, конвергенція каркасів амілоїдних фібрил та флуоресцентних барвників для

виявлення іонів важких металів залишається значною мірою невивченою. Цей гібридний сенсорний підхід може використовувати структурну та зв'язувальну здатність амілоїдних каркасів з оптичною чутливістю флуоресцентних репортерів, що потенційно дозволить створювати портативні, недорогі системи виявлення з підвищеною чутливістю та селективністю.

З огляду на це, в даній роботі було проведено дослідження доцільності розробки сенсорної платформи, що містить амілоїдні фібрили β -лактоглобуліну з флуоресцентними барвниками для виявлення іонів важких металів. Метою даної роботи було 1) оцінити чутливість бензантронового барвника АВМ, сквараїнового барвника SQ1 та ряду ціанінових барвників (АК3-1, АК3-3, АК3-5, АК5-1, АК5-2), до іонів важких металів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} та 2) дослідити потенційну можливість розробки наносистеми β -лактоглобулін + найбільш перспективні флуоресцентні барвники для виявлення важких металів у воді

Для досягнення цієї мети були поставлені та виконані такі завдання:

- 1) Оцінити чутливість барвників до іонів важких металів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} методом абсорбційної спектроскопії;
- 2) Дослідити взаємодію барвників з іонами важких металів методом флуоресцентної спектроскопії;
- 3) Відібрати найбільш перспективні флуоресцентні барвники;
- 4) Дослідити чутливість обраних барвників до взаємодії металів з фібрилами β -лактоглобуліну методом флуоресцентної спектроскопії.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Проблема забруднення вод важкими металами

Джерела надходження важких металів у довкілля поділяються на природного та антропогенного характеру. З техногенних джерел важкі метали потрапляють у середовище у формі різноманітних хімічних сполук [1, 3]. Зокрема, серед сполук неорганічного походження найпоширенішими є карбонати, оксиди, сульфати та сульфіді [1]. Забруднення окремих компонентів екосистеми має нерівномірний розподіл. Частина техногенних викидів потрапляє в атмосферу у вигляді дрібнодисперсних аерозолів, які здатні переміщуватися на великі відстані та спричиняти глобальне забруднення біосфери [6, 10]. Інша частина, разом із гідрохімічним стоком, осідає в безстічних водоймах, накопичуючись у водному середовищі та донних відкладах [1, 2]. Найбільше токсичних речовин акумулюється у ґрунті поблизу промислових зон, що веде до локального забруднення території [1, 3]. Концентрації важких металів у таких зонах нерідко в десятки або навіть тисячі разів перевищують природні фонові показники [2].

Важкі метали є значним забруднювачем водних ресурсів, що привертає дедалі більше уваги через їхню стійкість до впливу зовнішнього середовища та високу біологічну активність. Згідно з даними літературних джерел, основним шляхом проникнення металів в організм риб є вода: 99,1 % для Купруму, 97 % для Кадмію і 98,2 % для Плюмбуму [7].

Численні дослідження свідчать про те, що іони важких металів проникають з навколишнього середовища в організм, де вони накопичуються в тканинах і органах. Рівень цього накопичення залежить від концентрації металів у воді, їхніх фізико-хімічних властивостей та тривалості впливу. В останні роки, через інтенсивне використання свинцю в промисловості та сільському господарстві, особливо небезпечним джерелом його потрапляння в довкілля стали стічні води від металообробних і хімічних підприємств. Основними джерелами забруднення водних екосистем цим важким металом є спалювання вугілля, використання тетраетилсвинцю, а також викиди, пов'язані з діяльністю рудозбагачувальних і металургійних заводів, хімічних підприємств та шахт [4].

Плюмбум входить до переліку глобальних забруднювачів довкілля, визначеного міжнародними організаціями. Його концентрації в ґрунтових і водних середовищах нерідко перевищують встановлені нормативи [6]. Протягом століть науковцям було відомо про небезпечний вплив цього металу на здоров'я людини, і сучасні дослідження підтверджують, що Плюмбум характеризується високою кумулятивною токсичністю. Його іони Pb^{2+} порушують нормальні процеси метаболізму та блокують активність ензимів. Тривале використання вод, навіть із низьким вмістом цього металу, може спричинити як гостре, так і хронічне отруєння. Важливу роль у транспортуванні Плюмбуму у прісноводних екосистемах відіграють його завислі форми, які в річкових системах можуть складати до 98% загального вмісту металу. Крім того, відзначено явище десорбції Плюмбуму з рослин, яке проходить значно активніше порівняно з десорбцією Кадмію [4].

Великі обсяги Кадмію потрапляють у поверхневі води внаслідок господарської діяльності людини. Щорічні концентрації кадмію, які потрапляють у воду, варіюються від 0,01 до 0,1 мкг/л. У ґрунт цей метал надходить разом із пилом і осадам у районах металургійних виробництв, а також у значних кількостях міститься у відходах гальванічної й лакофарбової промисловості. Крім того, Кадмій потрапляє на сільськогосподарські землі через добрива, шлами стічних вод, фосфорні добрива та гербіциди [7]. Сполуки Кадмію є надзвичайно токсичними. Менш розчинні форми переважно впливають на дихальні шляхи й шлунково-кишковий тракт, тоді як розчинні форми, які проникають у кров, завдають шкоди центральній нервовій системі, спричиняють сильне отруєння, провокують дегенеративні зміни внутрішніх органів, особливо печінки, та порушують фосфорно-кальцієвий обмін у риб [6].

На відміну від Плюмбуму та інших важких металів, Кадмію менш властиві завислі форми міграції, які в середньому складають близько 65% у світовому річковому стоку [5]. Для багатьох водойм цей показник ще нижчий і рідко перевищує 25–35% від загального вмісту. Недостатня здатність Кадмію до

зв'язування є однією з причин його активної міграції у розчиненому стані. За дослідженнями Линника П.М. [2], значна частка Кадмію (від 22 до 32%) у донних відкладах водосховищ Дніпра знаходиться у складі обмінної фракції. Це пояснюється тим, що приблизно третина розчиненого Кадмію у водах водосховищ мігрує у формі вільних (гідратованих) іонів Cd^{2+} , які мають здатність адсорбуватися як на завислих речовинах, так і на частках донних відкладів.

У сильно забруднених кадмієм ґрунтах основною формою його присутності є обмінна. Це свідчить про те, що метал перебуває у рухливому стані, який легко поширюється в середовищі. Така властивість кадмію має негативний вплив на екологію, оскільки сприяє підвищенню міграційної здатності елементу в екосистемах. Дослідження також показують, що кадмій, поряд із іншими пріоритетними металами, такими як плумбум і купрум, демонструє високу мобільність у кислому середовищі, але стає менш активним при переході середовища до лужного стану [1].

Одним із найбільш впливових токсикантів, що мають значну біологічну активність, є мідь (Купрум). Основними джерелами потрапляння цього металу в природні води вважаються стічні води промислових підприємств, шахтні води, альгіцидні реагенти, які містять мідь, а також сільськогосподарські стоки. Мідь є одним із ключових мікроелементів, що відіграє важливу роль у процесі фотосинтезу. Її класифікують як малорухливий елемент [2]. Значна частина цього металу концентрується у органічній фракції донних відкладів та міцно там утримується. Варто зазначити високу здатність міді до утворення комплексів, що обумовлює низьку концентрацію її розчинених форм у природних поверхневих водах. Процеси адсорбції металу значною мірою залежать від рН середовища. Збільшення рівня рН сприяє зростанню кількості адсорбованої міді. Для цього елемента характерним є домінування хемосорбції над фізичною сорбцією, яка проявляється значно слабше. Органічні речовини, що містяться у воді,

утворюють з іонами міді розчинні комплекси, які мають низьку здатність до адсорбції завислими частинками [8].

1.2 Методи детекції іонів важких металів: атомно-абсорбційна спектроскопія, ICP-MS, електрохімічні методи: переваги та недоліки

Стандартні підходи для аналізу вмісту та концентрації важких металів у навколишньому середовищі, як правило, включають атомно-абсорбційну спектроскопію (ААС) та мас-спектрометрію з індуктивно пов'язаною плазмою (ICP-MS) [16]. Ці методи вимагають використання складного і дорогого обладнання, яке функціонує під керуванням кваліфікованого персоналу в спеціалізованих лабораторіях. Тому виникає зацікавленість в альтернативних аналітичних інструментах, таких як хімічні датчики. Ці пристрої спрощують процес вимірювань, використовують компактне і малопотужне обладнання і дозволяють проводити аналіз безпосередньо на місці. Серед електрохімічних приладів особливу увагу заслуговує метод інверсійної вольтамперометрії (SV) [17], який застосовується в конфігураціях з робочими електродами з різних матеріалів і давно вважається перспективною альтернативою для подібних досліджень.

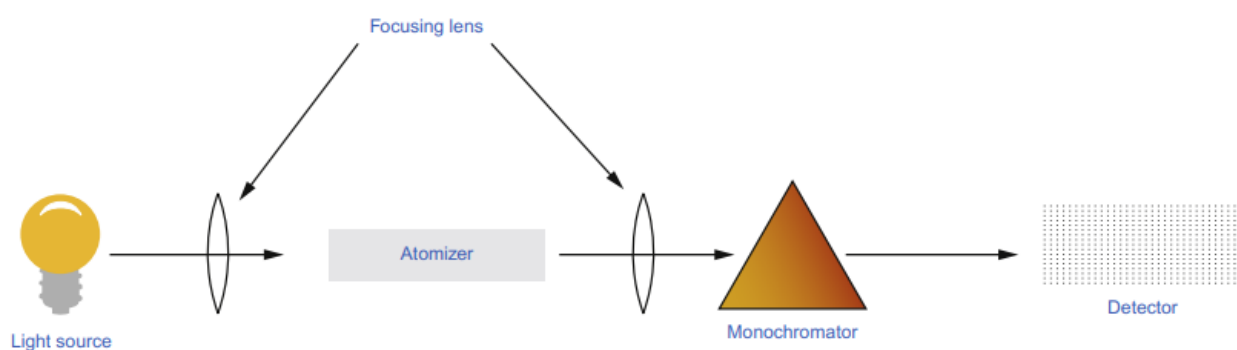


Рис. 1.1 Схематична діаграма базового атомно-абсорбційного спектрометра. [9]

Атомно-абсорбційна спектроскопія є високочутливою аналітичною технікою для кількісного визначення концентрації елементів (металів і металоїдів) у різних типах проб: екологічних, біологічних, промислових та інших. Метод ґрунтується на вимірюванні поглинання оптичного випромінювання вільними

атомами в газоподібному стані. Його універсальність дозволяє застосовувати ААС у багатьох галузях, включаючи промисловість.

Принцип дії заснований на поглинанні світла певної довжини хвилі, унікальної для кожного елемента [10]. Типовий пристрій ААС складається з джерела світла, системи розпилення, спектрометра і детектора (Рис. 1.2.1). На практиці використовуються два основних типи джерел світла: лампа з порожнистим катодом (HCL) і безелектродна розрядна лампа (EDL). Лампи HCL найбільш поширені і складаються з анода і порожнистого циліндричного катода, виконаного з матеріалу цільового елемента, укладених в трубку з інертним газом (неоном або аргоном) при низькому тиску. При бомбардуванні катода інертним газом збуджуються атоми, що призводить до випромінювання характеристичного світла. Такі лампи можуть бути призначені як для одного елемента, так і для декількох елементів одночасно. Лампи EDL характеризуються більшою інтенсивністю і довговічністю, забезпечуючи підвищену точність і зниження меж виявлення для деяких елементів. Радіація в EDL створюється за рахунок взаємодії радіочастотної енергії з аргонною атмосферою всередині лампи [11].

Система розпилення в приладах ААС може бути як полум'яною, так і графітовою. Полум'яна технологія часто використовує суміш повітря з ацетиленом для розпилення речовин, а закис азоту-ацетилен застосовується для елементів, що вимагають більш високої температури. У графітових пічних системах відсутнє відкрите полум'я: розпилення здійснюється при нагріванні графітових трубок електричним струмом. Світло від джерела проходить через монохроматор, який виділяє монохроматичне світло і виключає небажані довжини хвиль. Потім світло направляється на детектор, найчастіше фотоелектронний помножувач, який підсилює сигнал і перетворює його в електричний еквівалент пропорційно інтенсивності світла [12]. Проби вводяться у вигляді рідких або твердих речовин. Залежно від конфігурації системи елемент нагрівається або полум'ям, або електричним джерелом тепла [11, 13].

Основний принцип ААС можна умовно розділити на два ключові етапи: спочатку вільні атоми газу, що утворилися в атомайзері, поглинають світло певної частоти; далі довжина хвилі поглинання визначається унікальними властивостями кожного елемента. Кількість поглиненого світла безпосередньо пов'язана з концентрацією атомів даного елемента в пробі.

Завдяки універсальності методу, ААС широко застосовується не тільки в промисловості, але і в харчовій галузі. Використання цієї техніки дозволяє контролювати вміст металів у продуктах харчування та напоях відповідно до міжнародних вимог законодавства з безпеки та моніторингу. Методи атомної абсорбційної спектроскопії, включаючи полум'яну ААС, графітову піч, холодну парову ААС і генерацію гідриду на основі закону Бера-Ламберта, демонструють високу універсальність. Вони дозволяють виявляти і вимірювати елементи в зразках з вкрай низькими концентраціями, а також ефективно працювати з важкими матрицями зразків, що важливо як для забезпечення безпеки, так і для гарантії якості продукції [9].

Система мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS) представляє собою технологічно розвинений процес, що перетворює рідкий зразок на іони, розділяє їх за масою, а потім забезпечує кількісне вимірювання вмісту елементів. На початковому етапі рідкий зразок проходить через розпилювач, який трансформує його у дрібнодисперсний аерозоль. Цей аерозоль надходить до спреї-камери, де відбувається відсіювання великих крапель і селекція лише найдрібніших частинок для подальшого аналізу [14, 15].

Ключовим компонентом системи є джерело індуктивно зв'язаної плазми (ICP), яке функціонує як високотемпературний механізм іонізації. Плазма утворюється у кварцових трубках, заповнених аргоном, коли RF-генератор створює потужне електромагнітне поле, що індукує електричні струми у газі. У результаті формується високоенергетична плазма з температурою до 10,000 К. При попаданні аерозолі у плазму відбувається миттєва десольвація, випаровування, атомізація і позитивна іонізація [18].

Іони, утворені в плазмі, переміщуються із зони атмосферного тиску до вакуумної секції мас-спектрометра через конусні елементи — семплер і скімер — які відбирають центральний пучок іонів. Далі цей пучок проходить через іонну оптику, що складається з електростатичних лінз, які фокусують і прискорюють іони до мас-аналізатора, водночас видаляючи нейтральні частинки та фотони для зниження фонового шуму. У мас-аналізаторі іони розділяються відповідно до їхнього співвідношення маси до заряду (m/z).

Фінальним компонентом є детектор, який реєструє розділені іони та вимірює їхню інтенсивність. Як правило, для цього використовується електронний множник, що перетворює кожен зареєстрований іон на електричний імпульс. Кількість імпульсів прямо пропорційна концентрації певного елемента у вихідному зразку, забезпечуючи точний кількісний аналіз.

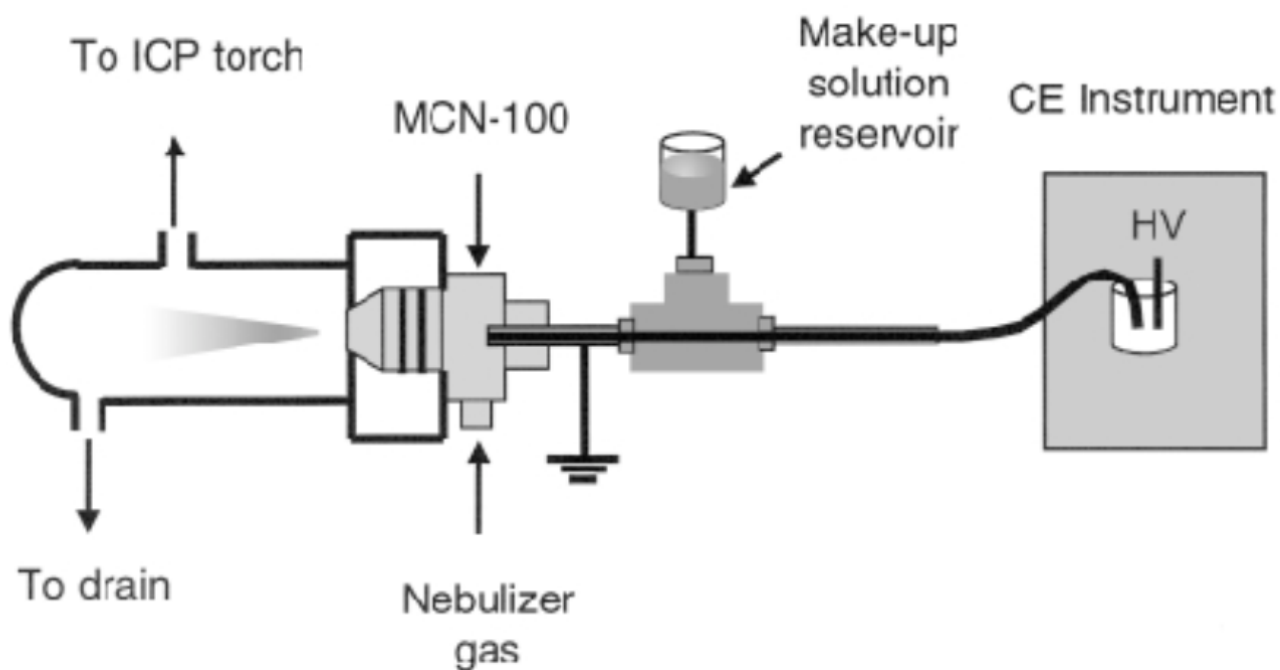


Рис. 1.2 Принципова схема мас-спектрометра з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS) [20]

ICP-MS є одним із найпередовіших методів елементного аналізу завдяки своїй винятковій чутливості, здатності виявляти речовини на рівні ppt (одна частина на трильйон), а також можливості здійснювати багатоелементний аналіз майже всіх хімічних елементів. Важливою перевагою є потенціал ізотопного аналізу та

визначення специфічних форм елементів при залученні хроматографічних технік. Завдяки цим унікальним характеристикам ICP-MS є незамінним інструментом у таких сферах, як екологія, геологія та фармацевтична галузь, де потрібен високоточний контроль токсичних чи слідових елементів [19].

Антиоксидантна здатність являє собою здатність сполук або їх сумішей перешкоджати окислювальному розкладанню різних речовин, таких як перекисне окислення ліпідів [21 — 23]. Спектрометричні методи, що застосовуються для оцінки антиоксидантних властивостей, залежать від безлічі факторів, включаючи температуру, тривалість зберігання, а також природу сполук або їх сумішей [24]. У той же час електрохімічні методи виступають швидким, простим і чутливим альтернативним способом аналізу біоактивних сполук, дозволяючи ефективно оцінювати здатність до видалення радикалів і антиоксидантну ефективність. Ці методи відрізняються низькою вартістю, вимагають мінімальної підготовки зразків і застосовуються як в стаціонарних системах, наприклад, диференціально-імпульсній полярографії і вольтамперометрії, так і в динамічних проточних або електроміграційних системах з використанням амперметричних вимірювань. Динамічні системи надають можливість швидкого і чутливого аналізу простих сполук, тоді як стаціонарні краще підходять для кількісної оцінки обмеженого спектру аналітів і дослідження процесів комплексоутворення біомолекул з мішенями [25].

Серед електрохімічних датчиків вугільний робочий електрод на рідкій або твердій основі є найбільш популярним вибором. Його головна перевага полягає в здатності модифікуватися шляхом додавання органічних або неорганічних речовин, що істотно покращує селективність і чутливість [26].

Але результати залежать від складу розчину (матриці), в якому знаходиться аналіт. Наявність сторонніх електроактивних речовин, зміна іонної сили або рН можуть значно впливати на електродні процеси та, відповідно, на точність і відтворюваність вимірювань, хоча це і перевага іншими методами. Робочі електроди, особливо модифіковані, можуть забруднюватися продуктами реакції

або іншими компонентами зразка, що призводить до зміни їхньої активної поверхні, дрейфу сигналу та необхідності частоті регенерації або заміни.

1.3. Оптичні сенсорні системи для детектування іонів важких металів у воді

Антропогенне надходження важких металів у природні води через стічні води, побутові відходи та промислову діяльність набуває масштабів глобальної проблеми. Основними джерелами цих забруднень є відходи, що виникають у процесі промислового виробництва або побутових операцій, а також використання пестицидів і добрив, які містять метали [27]. Окрім антропогенних факторів, природні процеси, такі як вивітрювання, дощова вода, ерозія гірських порід і ґрунтів, також сприяють надходженню важких металів у навколишнє середовище. Важкі метали визначаються як метали та металоїди з щільністю 4г/см^3 або вищою, здатні існувати у формі елементів, іонів чи комплексних сполук [28]. Згідно з класифікацією Агентства США з охорони навколишнього середовища (EPA), до найтоксичніших важких металів належать миш'як, ртуть, мідь, нікель, свинець, кадмій і хром. Навіть незначна концентрація цих речовин може викликати серйозні проблеми зі здоров'ям або токсичні ефекти [29]. Документація щодо максимальних допустимих рівнів забруднення (MCL) та негативного впливу на здоров'я або токсичних властивостей важких металів добре представлена в численних джерелах [30]. Токсичність важких металів визначається їх здатністю розчинятися у воді, стійкістю до біорозкладання, тривалим періодом напіврозпаду та тенденцією до накопичення у тканинах організму. Варто зазначити, що деякі важкі метали, такі як залізо, мідь та цинк, є необхідними для біологічних процесів і стають токсичними лише за умови надмірних концентрацій [31].

Таким чином, дуже бажаним є швидкий, мініатюрний, точний, економічно ефективний і чутливий моніторинг важких металів у навколишньому середовищі, харчових продуктах, біологічних рідинах та питній воді [32]. Хімічні датчики активно використовуються для виявлення важких металів безпосередньо на місці. Зокрема, датчики, створені на основі наноматеріалів,

демонструють значний потенціал у цьому напрямку завдяки їхній великій поверхневій площі, високій каталітичній ефективності, підвищеній реакційній здатності та сильним адсорбційним властивостям. Різноманітні наноматеріали, серед яких металеві наночастинки (NPs), а також вуглецеві й кремнієві матеріали, знаходять широке застосування у створенні таких датчиків. Висока чутливість наносенсорів зумовлена їхньою винятковою реактивністю, великим співвідношенням площі до об'єму, розширеною функціоналізацією та розмірозалежними характеристиками [33]. Утворення нанокомпозитів, ковалентна функціоналізація та фіксація органічних лігандів суттєво підвищили чутливість і селективність реакцій під час виявлення іонів важких металів. Використання наноматеріалів у конструкції хімічних сенсорів також сприяло покращенню межі виявлення (LOD) та забезпечило кращу відтворюваність результатів. Додатково, завдяки унікальним властивостям наноматеріалів, з'явилися перспективи мініатюризації систем, що призвело до створення технології «лабораторія на чіпі» (LOC) [34]. Загалом, виявлення важких металів досягається за рахунок використання оптичних або електронних властивостей наноматеріалу.

Оптичні хімічні сенсори (OCS) мають значний потенціал і широкий спектр застосувань для оперативного виявлення важких металів безпосередньо на місці. Вони входять до групи хімічних сенсорів, які використовують електромагнітне випромінювання для формування аналітичного сигналу у системі перетворення. Взаємодія досліджуваного зразка з випромінюванням спричиняє зміну певного оптичного параметра, що може бути корельованим зі вмістом аналіту. Робота OCS базується на зміні оптичних характеристик, таких як поглинання, пропускання, випромінювання чи час життя, яка виникає у результаті взаємодії зв'язаного індикатора (органічного барвника) з аналітом [35]. Індукована мішенню агрегація або антиагрегація, а також модифікація поверхні наноматеріалів здатні змінювати оптичні властивості хімічних сенсорів, що базуються на цих матеріалах. Додатково, їх конструкція залежить від вибору оптимальної твердої основи (матриці), типу функціоналізації, морфології

наноматеріалів і методів іммобілізації [36]. Оптичні сенсори поділяються на кілька основних типів, зокрема флуоресцентні, сенсори на основі поверхневого підсилення Раманівського розсіювання (SERS) та сенсори з використанням поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Основна увага приділяється саме ролі наноматеріалів у підвищенні ефективності та функціональності подібних сенсорів.

Флуоресцентні сенсори створені на базі змін фізико-хімічних характеристик флуорофора, викликаних впливом аналіту. До цих характеристик належать інтенсивність флуоресценції, тривалість життя та анізотропія, які безпосередньо пов'язані з процесами перенесення заряду й енергії. Стандартний флуоресцентний наносенсор зазвичай складається з флуоресцентного компонента, що відповідає за сигналізацію зв'язування, та рецепторного елемента для специфічної взаємодії з аналітом [37]. Квантові точки (QD), як альтернатива флуорофорам на основі барвників, отримали широке визнання завдяки своїм унікальним характеристикам, включаючи видатні оптичні властивості, такі як широкий діапазон спектрів поглинання, відмінний квантовий вихід, вузькі настроювані емісії та висока стійкість до фотовибілювання. Завдяки їхній високій фотостабільності, водорозчинності та здатності адаптувати квантові ефекти розміру для утворення емісії від ультрафіолету до ближнього інфрачервоного діапазону, вони перевершують традиційні органічні флуоресцентні барвники, особливо у біосенсорних технологіях [38]. Крім того, застосування квантових точок як флуорофорів забезпечує низку переваг, таких як широкий спектр збудження, вузька емісія, вища фотостабільність, можливість флуоресценції, залежної від розміру кристалу, підвищена квантова ефективність і опція мультиплексного виявлення [39]. Особливий інтерес викликають вуглецеві точки та графенові квантові точки, які не містять важких металів і характеризуються чудовою біосумісністю та функціональною гнучкістю поверхні, що робить їх ідеальними для сенсорингу важких металів. Унікальним доповненням є метод молекулярного відбиття, який створює селективне місце зв'язування на поверхні датчика і сприяє точному розпізнаванню аналітів. Цей

підхід вирізняється не лише високою стабільністю, але й швидкістю виготовлення. Нещодавнє дослідження запропонувало розробку наногібрида із подвійною емісією QDs з використанням методу «іонного відбиття». Зокрема, було створено ратіометричний флуоресцентний зонд на основі CdTe для точного виявлення іонів кадмію (Cd^{2+}) у водних пробах [40]. Конструкція зонда була розроблена на основі ковалентного з'єднання зелених квантових точок CdSe з поверхнею кремнеземних наночастинок, які містили вбудовані червоні квантові точки CdTe. На поверхні були створені специфічні місця для розпізнавання іонів Cd^{2+} шляхом хімічного травлення із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Цей процес пригнічував зелену флуоресценцію квантових точок CdSe на зовнішній стороні наносенсора. Проте зелена флуоресценція поступово відновлювалась після впливу різних концентрацій Cd^{2+} , залишаючи внутрішню червону флуоресценцію незмінною. У результаті при контакті з Cd^{2+} спостерігалось виразне змінення кольору флуоресценції від червоного до зеленого. За оптимальних умов ратіометричний сенсор виявив високу чутливість із межою виявлення (LOD) 25 нМ.

Електрони провідності у плазмонних наноструктурах, таких як AuNPs та AgNPs, на поверхні наночастинок демонструють когерентні коливання під впливом світла певної довжини хвилі. Це призводить до створення значно посиленого електромагнітного поля, відомого як локалізований поверхневий плазмонний резонанс (LSPR). LSPR є вкрай чутливим оптичним перетворювачем, чия ефективність залежить від стану агрегації, типу, розміру та форми плазмонних наночастинок, а також показника заломлення навколишнього середовища. Будь-які зміни в LSPR призводять до зміни кольору колоїдної суспензії.

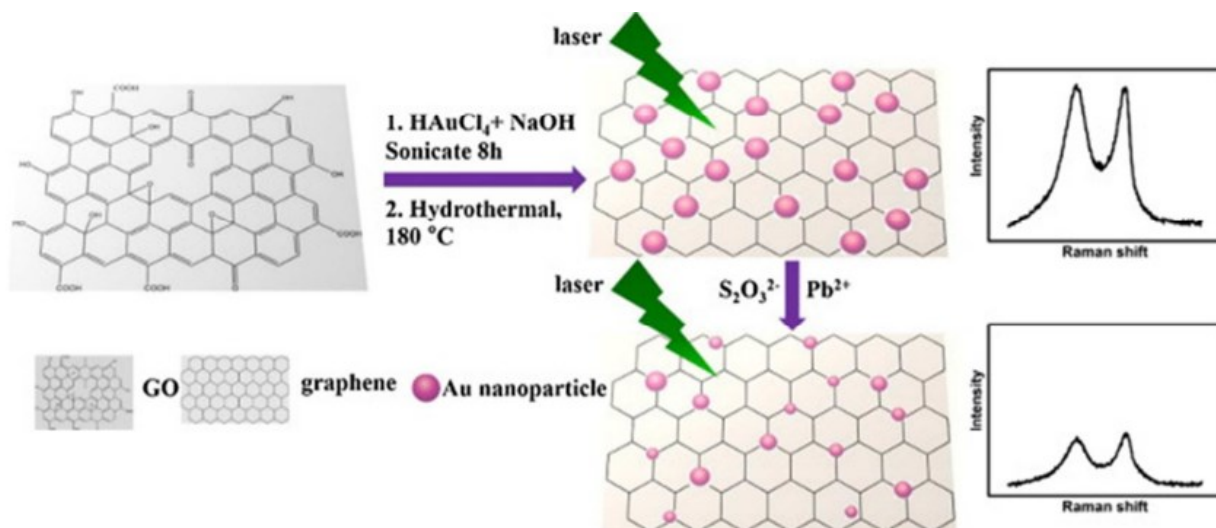


Рис. 1.3 Колоїд AuNPs/rGO як раманівський сенсор для виявлення Pb²⁺ [42]

У поєднанні з явищем поверхнево підсиленого Раманівського розсіювання (SERS), LSPR наночастинок дорогоцінних металів може бути використаний для збільшення локального електромагнітного поля, що дозволяє суттєво підсилити сигнал Раманівського розсіювання до порядку 10^4 [41]. SERS — це потужна техніка, яка дозволяє оптично досліджувати коливальні режими окремих зв'язків для надчутливого виявлення аналітів. Коли аналіти адсорбуються або щільно зв'язуються із наноструктурами благородних металів, їхній розсіювальний Раман-переріз посилюється в кілька разів завдяки SERS. Формування «гарячих точок» для покращення сигналу SERS відбувається через об'єднання плазмонних полів сусідніх наночастинок, що виникає внаслідок агрегації металевих наночастинок. Як високочутливий метод аналізу, SERS пропонує значну перевагу для здійснення мультиплексного аналізу порівняно з флуоресцентними методами завдяки значно вужчим пікам у спектрах Рамана. Оптичне випромінювання, яке взаємодіє з благородними металами, змушує вільні провідні електрони коливатися, що зрештою спричиняє явище поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Наприклад, водний розчин неперервно диспергованих золотих наночастинок (AuNPs) розміром 20 нм має «винно-червоний» колір завдяки сильному піку SPR у поглинальному спектрі. Проте надмірна агрегація AuNPs призводить до втрати властивостей нанорежиму, що проявляється у зміні кольору розчину через зсув піку SPR. Цей

принцип покладено в основу дизайну колориметричних сенсорів для визначення різноманітних аналітів. Дослідження Nie та інших продемонструвало створення колориметричного сенсора на основі 15-нм AuNPs для високочутливого та вибіркового визначення іонів Hg^{2+} , Cu^{2+} і Ag^+ у воді [43]. За відсутності іонів металів додавання о-фенілендіаміну (OPDA) до золотих наночастинок (AuNPs) спричиняло їх агрегування через хімічну взаємодію NH–золото, що призводило до зміни кольору із червоного на синій. Разом із тим, введення іонів Hg^{2+} , Cu^{2+} та Ag^+ викликало їх специфічне відновлення з утворенням металевих наночастинок. Утворені НЧ виступали каталізаторами окисно-відновної реакції між цими металевими іонами та OPDA, у результаті якої OPDA окислювався, утворюючи полімер (полі-OPDA) та 2,3-діамінофеназин (OPDAox). Через недостатню кількість OPDA початковий червоний колір AuNPs зберігався. Розроблений наносенсор продемонстрував високу чутливість до виявлення цих металевих іонів із межою виявлення (LOD) 3 нМ. В іншому дослідженні Шопф та інші створили оптичний сенсор на основі золотих нанострижків (NR), закріплених на скляній підкладці, для визначення присутності ртуті (Hg) завдяки взаємодії плазмонної активності золота та ртуті [44]. Автори встановили, що на поверхні нанострижків утворюється амальгама Au-Hg. Обробка підкладки розчином NaBH_4 не спричиняла жодних оптичних змін. Однак додавання HgCl_2 до розчину NaBH_4 з іммобілізованими нанострижками призводило до значного зміщення кольору зі спостережуваним синім зсувом піку локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Цей ефект виявився пропорційним до відновлення іонів Hg^{2+} та утворення амальгами Au-Hg на поверхні нанострижків.

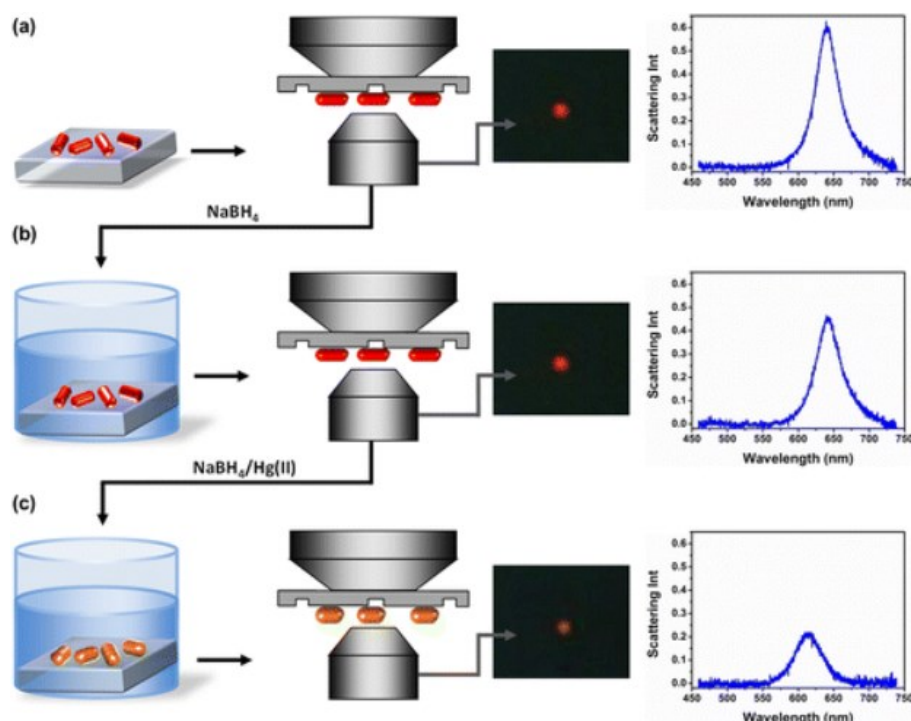


Рис. 1.4 Схема виявлення амальгамування нанострижків Au за допомогою нанострижків, іммобілізованих на підкладці: Спочатку проводиться мікроскопія в темному полі на підкладках з нанострижками Au і реєструється спектр розсіювання вибраного нанострижка (а); Підкладки занурюють у розчин NaBH_4 і реєструють спектр того самого вибраного нанострижня за допомогою спектроскопії в темному полі (b); Підкладки занурюють у розчин $\text{HgCl}_2/\text{NaBH}_4$ і знову реєструють спектр нанострижків за допомогою спектроскопії в темному полі (c). [44]

1.4. Механізми взаємодії флуорофорів з іонами: хелатування, комплексоутворення, енергетичне гасіння

В останні роки помітно зріс інтерес до дослідження рідкоземельних комплексів. Унікальні властивості іонів лантаноїдів зробили їх ефективними замінниками Ca(II) і Mg(II) у багатьох металопротеїнах[46]. Вони також широко застосовуються як реагенти для хірального ЯМР-зсуву, контрастні речовини для МРТ[47], а також як люмінесцентні зонди для вивчення зв'язування металів у біологічних системах. Також було виявлено, що 12 рідкоземельних комплексів мають протипухлинні та фунгіцидні властивості, а різні лікарські засоби часто діють за рахунок інгібування утворення металоферментів [48] або

хелатування.[49] Цей термін був запропонований для супортоподібних груп, які функціонують як дві зв'язуючі одиниці і прикріплюються до центрального атома таким чином, щоб утворювати гетероциклічні кільця.

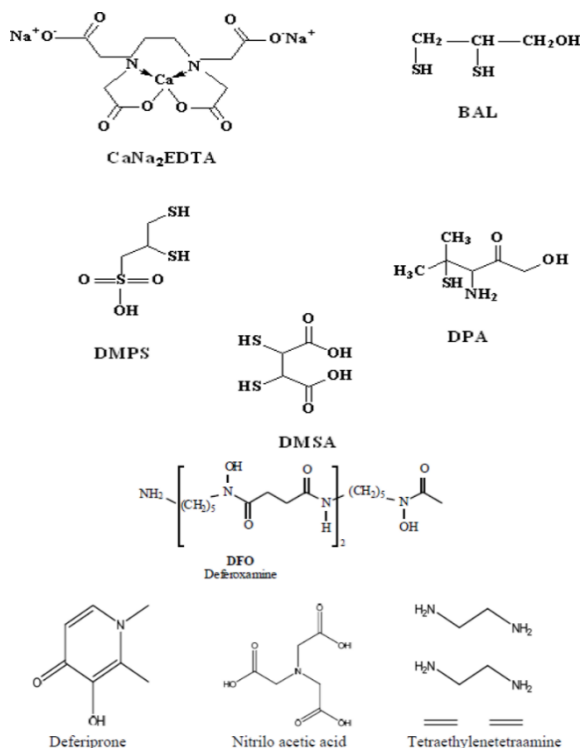


Рис. 1.5 Структури різних хелатуючих агентів, які використовуються для лікування відравлень важкими металами.[62]

Хелатуючі агенти — це органічні або неорганічні сполуки, здатні зв'язувати іони металів, утворюючи складну кільцеподібну структуру, яка називається «хелатом». Хелатуючі агенти мають атоми, що зв'язують «ліганди», які утворюють або два ковалентні зв'язки, або один ковалентний і один координаційний зв'язок, або два координаційні зв'язки у випадку двозубчастих хелатів. В основному атоми S, N і O функціонують як атоми лігандів у формі хімічних груп, таких як $-\text{SH}$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{OH}$, $-\text{OPO}_3\text{H}$ або $>\text{C}=\text{O}$. Двозубчасті або багатозубчасті ліганди утворюють кільцеві структури, що включають іон металу та два атоми лігандів, приєднані до металу [2] (рис. 1.6). Існують також приклади неорганічних хелатних лігандів, які утворюють п'ятичленні кільця з іонами металу. У найпростішому випадку протон (H^+), який може поглинати неподілену пару електронів атома (атомів) ліганду, що зв'язується з хелатором, може брати участь у формуванні координаційного

комплексу. Однак позитивний заряд протона залишається, оскільки в процесі не відбувається втрати або надбання електронів.

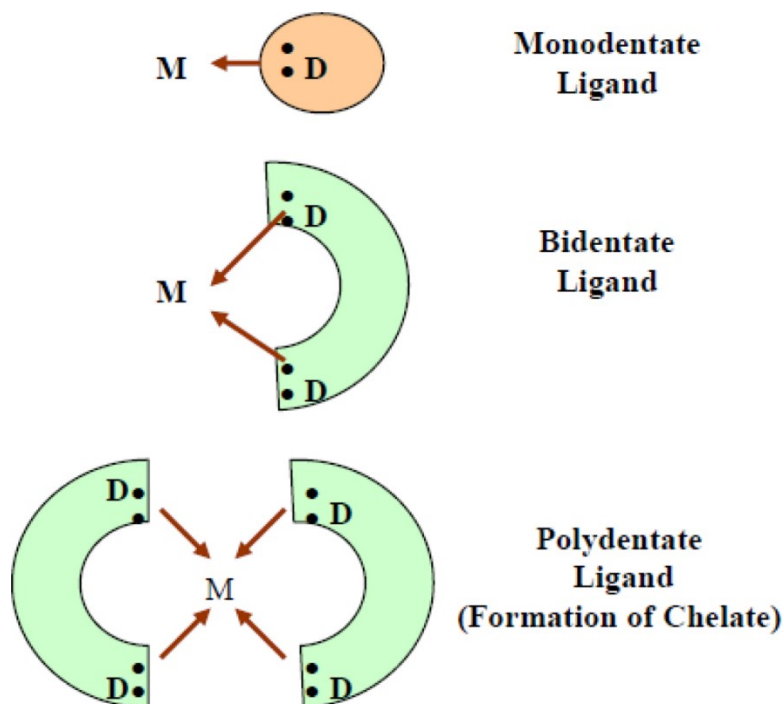


Рис. 1.6 Утворення комплексів метал-ліганд з використанням моно-, бі- та полідентатних лігандів.

Останній також може бути відомий як «чистий іонний заряд» комплексу, який відіграє вирішальну роль у регулюванні фармакокінетичної долі і, зрештою, токсикологічної поведінки таких комплексів *in vivo*. У біологічному середовищі катіони металів, а саме Na^+ , Mg^+ , Cu^+ , Cu^{2+} і Zn^{2+} , а також, зокрема, перехідні метали, такі як Mn, Fe і Co, можуть брати участь у формуванні таких комплексів. Хоча стабільність таких комплексів варіюється, вирішальними факторами є властивості як хелатуючого агента, так і хелатованого металу. Константа стабільності комплексу може бути кількісно виражена в значеннях рівняння рівноваги, які залежать від атомної структури хелатованих металів [62].

Крім того, pH також є важливим фактором, що впливає на утворення та стабільність комплексу. Більшість хелатуючих агентів нестабільні при низькому pH, тоді як при високому pH метали мають тенденцію утворювати нерозчинні гідроксиди, які менш доступні для хелатуючих агентів. Ця особливість стає значущою в патологічних станах, що призводять до ацидозу або алкалозу.

Хелатуючий агент, який займає більше координаційних позицій іона металу, як правило (але не завжди), утворює комплекс з більшою стабільністю, ніж в іншому випадку. Аналогічно, тоді як сумарний іонний заряд хелатора визначає його абсорбцію, розподіл і здатність досягати іона металу для зв'язування, сумарний іонний заряд комплексу визначає його виведення з конкретного місця і екскрецію з організму. Таким чином, важливо, щоб хелатор відповідав критеріям, які дозволяють йому: (1) транспортуватися через фізіологічні бар'єри в компартменти, де концентрується токсичний іон металу, (2) утворювати стабільний комплекс з металом після його видалення з біологічного хелатора, якщо це необхідно в місці, і (3) утворювати хелатний комплекс, властивості якого роблять його нетоксичним і сприяють його виведенню не тільки з місця відкладення, але й з організму [47].

Таким чином, іони металів можуть відігравати життєво важливу роль у біологічному процесі утилізації лікарських засобів організмом. Взаємодія іонів рідкоземельних елементів з лікарськими препаратами може надавати особливу антибактеріальну або протипухлинну дію.[50] Добре відомо, що координаційна здатність ароматичних карбонових кислот щодо рідкоземельних комплексів була приділена значній увазі завдяки сильній координаційній здатності та різноманітності способів з'єднання карбоксилатної групи з утворенням розширених каркасів.[51-53] телмісартан(TMST), 4-[(2-*n*-пропіл-4-метил-6-(1-метилбензimidazol-2-іл)бензimidazol-1-іл)метил]біфеніл-2-карбонова кислота, є відомим лікарським засобом проти високого кров'яного тиску (гіпертонії), який належить до групи антагоністів рецепторів ангіотензину II (ARA II). TMST у своїй молекулярній структурі має карбоксилатну групу, яка може забезпечити відповідне місце для утворення рідкоземельних комплексів. для координації роботи з рідкоземельними елементами.

Флуоресцентна спектроскопія широко використовується для моніторингу молекулярних взаємодій завдяки високій чутливості, відтворюваності та відносній простоті використання. Така взаємодія свідчать про те, що взаємодія

між TMST і іонами металів Y(III) і Nd(III), виходячи з дослідження з вивчення абсорбційної і флуоресцентної спектроскопії [45] може викликати придушення флуоресценції. Отже, цінну інформацію, таку як механізм зв'язування, константа асоціації та стехіометрія, можна отримати за допомогою дослідження придушення флуоресценції TMST цими рідкоземельними іонами. TMST містить два флуорофори, біфеніл та бензімідазол[55,56], які демонструють сильну флуоресценцію в основних середовищах.[54] гасіння флуоресценції - це зменшення квантового виходу флуоресценції флуорофору, викликане різними молекулярними взаємодіями, такими як реакції в збудженому стані, фотоіндукований перенос електронів (PET), резонансний перенос енергії флуоресценції, утворення комплексів в основному стані і зіткнення гасіння.[57] у присутності іонів металів інтенсивність флуоресценції зменшується через приєднання іона металу до рецепторного блоку датчика та утворення нефлуоресцентного комплексу, а отже, загальна флуоресценція згасає. В принципі, цей процес гасіння можна розділити на два види: статичне і динамічне гасіння. Статичне та динамічне гасіння можна відрізнити за різними залежностями від температури та часу життя в збудженому стані. Динамічне гасіння контролюється дифузією, оскільки гаситель повинен проникати у флуорофор протягом усього часу існування збудженого стану. Оскільки висока температура призводить до великого коефіцієнта дифузії, очікується, що константи бімолекулярного гасіння будуть збільшуватися з підвищенням температури. Якщо K_{sv} зменшується з підвищенням температури, можна зробити висновок, що процес гасіння є статичним, а не динамічним.[58-60] статичне гасіння передбачає або існування сфери ефективного гасіння, або утворення нефлуоресцируючого комплексу в основному стані, тоді як колізійне або динамічне гасіння передбачає зіткнення з подальшим утворенням перехідного процесу. Гасіння також може відбуватися за допомогою багатьох тривіальних процесів, таких як ослаблення збудливого світла самим флуорофором або іншими поглинаючими речовинами. За винятком тривіальних процесів, механізми гасіння включають дуже тісний контакт між збудженим

станом флуоресцентних частинок і гасителем, і їх іноді називають контактними гасителями.

Можна розрізнити ці два механізми гасіння, просто вивчивши спектри поглинання досліджуваної системи. Оскільки гасіння при зіткненні впливає лише на збуджений стан флуорофору, зазвичай спектри поглинання флуорофору не змінюються, тоді як утворення комплексів основного стану та подальше статичне гасіння часто призводять до помітних змін у спектрі поглинання. Довжина хвилі випромінювання зберігає своє положення в досліджуваному діапазоні концентрацій. Таким чином, гасіння флуоресценції внаслідок утворення ексиплексу (комплексу в збудженому стані) виключається.

Мікробну активність в ґрунті можна посилити шляхом внесення гумінових речовин, які утворюють комплекси з важкими металами і, отже, знижують їх токсичність для мікроорганізмів. Іншим прикладом є модель поверхневого комплексоутворення (SCM), заснована на механістичному підході до адсорбційних процесів на атомному рівні. SCM не тільки універсальний, але й має фундаментальну фізико-хімічну основу для прогнозування явищ адсорбції важких металів у широкому діапазоні експериментальних та екологічних умов. При комплексоутворенні виключається можливість утворення ексиплексу.

Атом кисню має тенденцію утворювати стабільний комплекс з рідкісноземельним елементом через його сильну спорідненість до Y(III) та Nd(II) [45]. З іншого боку, стабільність комплексу, утвореного атомом азоту з рідкісноземельним елементом, відносно низька. Зазвичай атоми кисню в органічному ліганді координуються з рідкісноземельним елементом двома способами: негативно заряджений кисень утворює стабільний іонний зв'язок, тоді як нейтральний кисень утворює координаційний зв'язок.[61] На основі наведеного вище обговорення була запропонована структура утворюється комплексу. Враховуючи залежність константи зв'язування від температури, вважалося, що за цю взаємодію відповідає термодинамічний процес.

Комплексоутворювачами тут вважаються всі сполуки, у вигляді частинок або розчинів, органічні або неорганічні, які можуть зв'язуватися з катіоном металу. Для комплексоутворювача необхідно використовувати масову концентрацію, а не молярну, оскільки це єдиний параметр концентрації, що піддається однозначному вимірюванню для більшості натуральних комплексантів. Комплексоутворюючі речовини можна виявити лише в тому випадку, якщо вони мають значення $\log K$ у приблизному діапазоні $10 > \log k > 2$. Для того, щоб їх можна було відрізнити, "сусідні" значення k комплексоутворюючих ділянок повинні істотно відрізнятись один від одного. Комплексанти, логарифмічні значення яких розділені менш ніж на одну логарифмічну одиницю, як правило, важко розпізнати.

Термодинамічні параметри, ентальпія (ΔH), ентропія (ΔS) та енергія Гіббса (ΔG), є основними показниками для визначення режиму зв'язування.

$$\log K = -\Delta H/2.303RT + \Delta S/2.303R \quad (1)$$

Ентальпію (ΔH) для процесу комплексоутворення оцінювали за нахилом графіка залежності $\log K$ від $1/t$, використовуючи графічне представлення рівняння Вант-Хоффа, а ентропію (ΔS) потім можна було розрахувати, використовуючи рівняння 2 і 3, де K – константа рівноваги.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S; \quad (2)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (3)$$

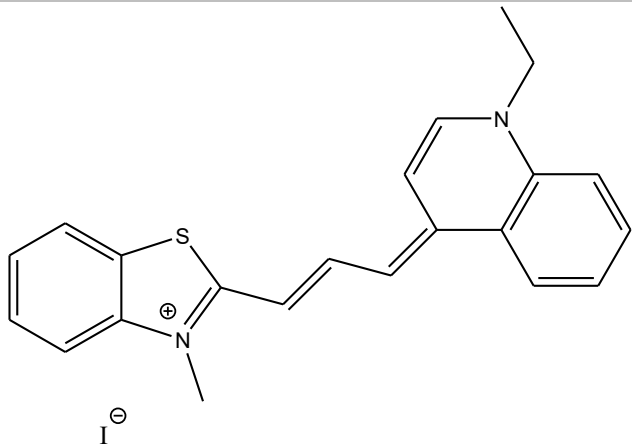
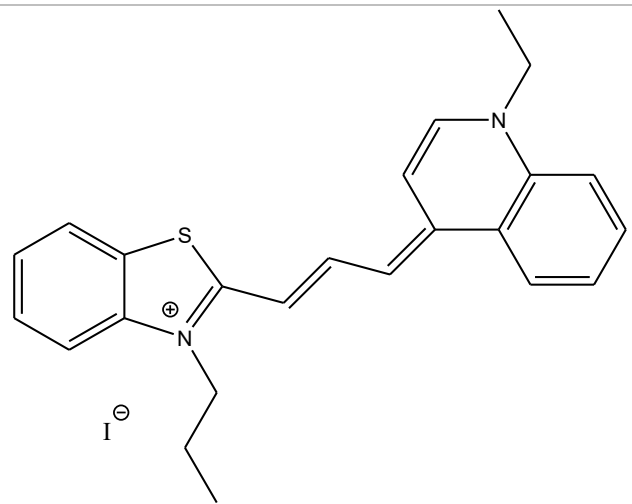
Всі значення термодинамічних параметрів є негативними. Негативні значення ΔG вказують на те, що процес комплексоутворення є мимовільним. Зниження $\log K$ з підвищенням температури і негативні значення ΔH для комплексоутворення показують, що всі реакції комплексоутворення є екзотермічними, а процес зв'язування металу з лігандом визначається ентальпією. Однак комплексоутворення призводить до несприятливої зміни ентропії. Низькі числові значення константи стабільності дозволяють припустити, що комплекси металів розчиняються у воді і можуть легко дисоціювати в іонну форму металу.

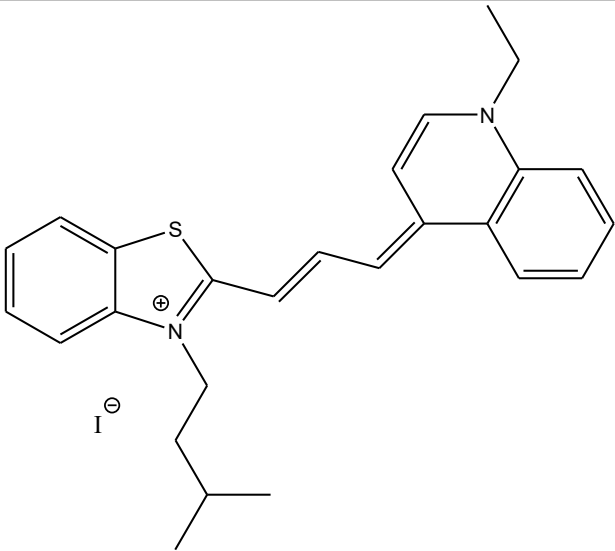
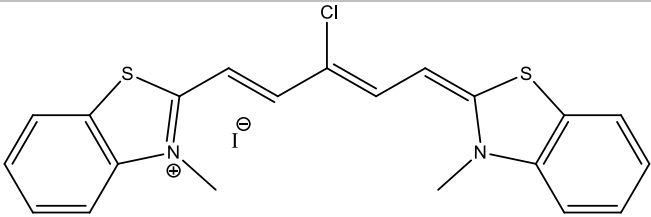
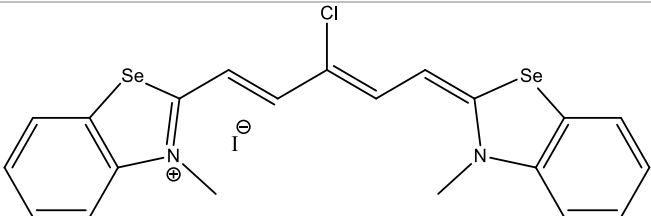
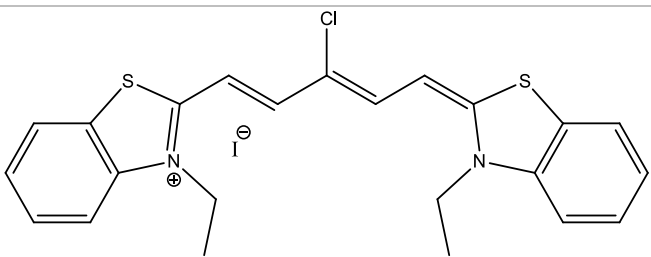
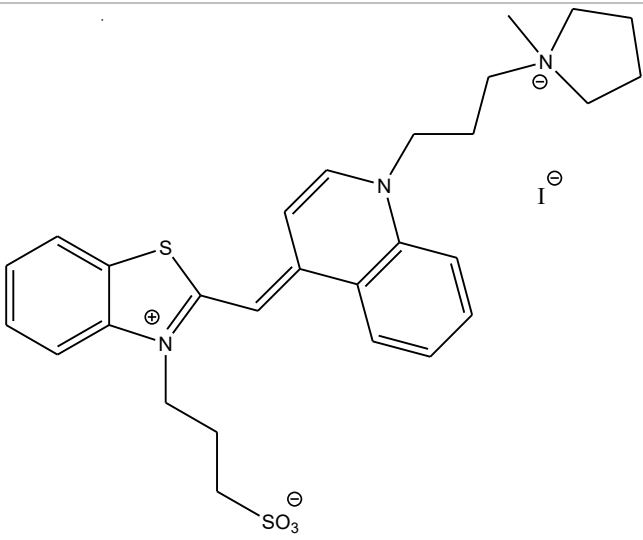
Як правило, комплекси метал-ліганд з константами стабільності 3 і нижче істотно (більше $\approx 5\%$) іонізуються при фізіологічному значенні рН 7,4.

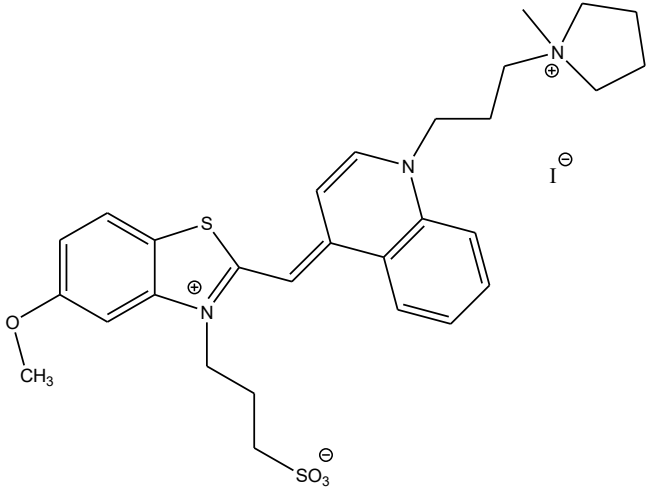
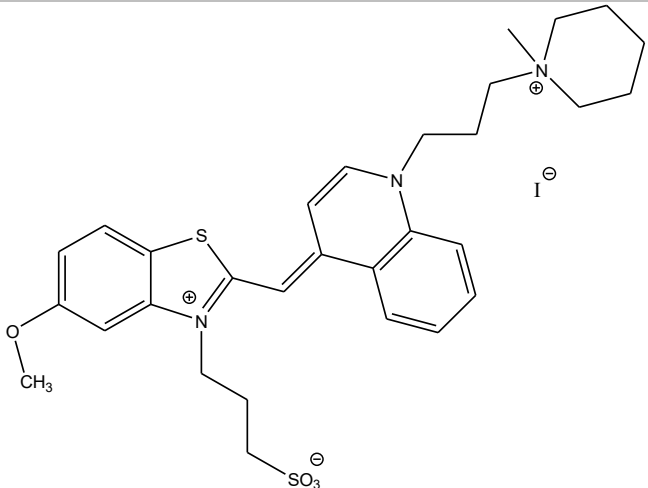
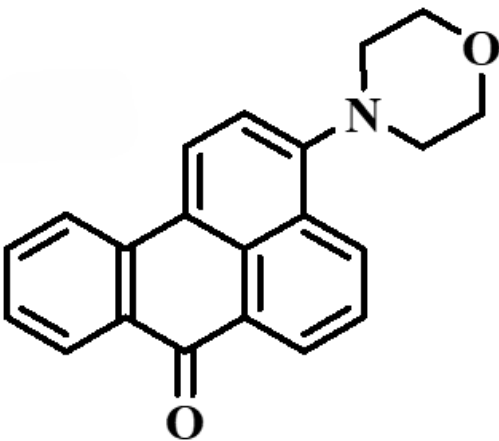
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

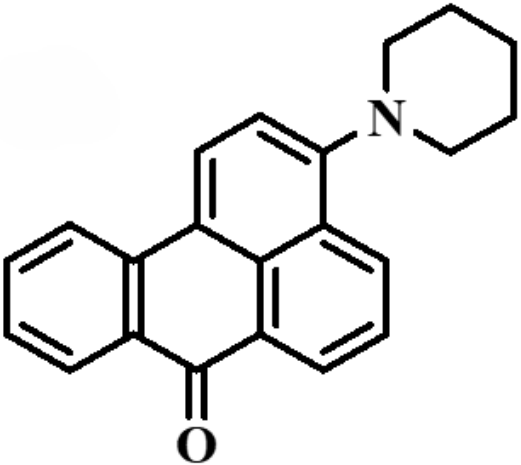
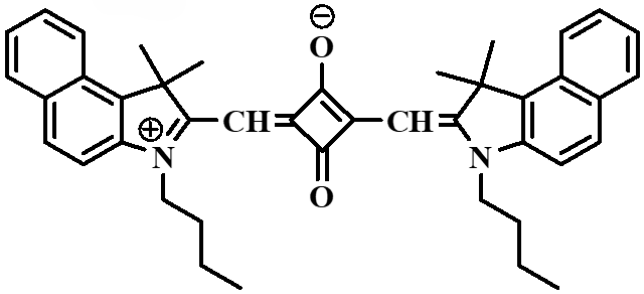
Матеріали

Бичачий β -лактоглобулін (β lg), дигідрат хлориду міді (II), хлорид нікелю (II), нітрат свинцю (II), хлорид цинку та тіофлавін Т (ThT) були придбані у компанії Sigma, США. Бензантронові зонди АВМ [66] і А6 були синтезовані в Даугавпілському університеті, Латвія. Ціанінові барвники та сквараїновий барвник було синтезовано в університеті Софії, Болгарія. Всі інші реагенти були аналітичного класу і використовувалися без додаткового очищення.

Барвники	Структура	Коефіцієнти поглинення E , $M^{-1}cm^{-1}$
AK3-1		136000
AK3-3		159400

AK3-5		150000
AK5-1		191158
AK5-2		200442
AK5-3		222041
AK1_2_17		83200

AK1_2_19	 <chem>COc1ccc2c(c1)[n+]([C-](S(=O)(=O)[O-])CC)cc2C=C3C=CC4=CC=CC=C3N4CC[N+]5CCCC5.[I-]</chem>	70700
AK1_2_20	 <chem>COc1ccc2c(c1)[n+]([C-](S(=O)(=O)[O-])CC)cc2C=C3C=CC4=CC=CC=C3N4CC[N+]5CCCCC5.[I-]</chem>	59300
ABM	 <chem>O=C1C2=CC=CC=C2C(=C3C=CC=CC=C3N1C4CCOCC4)C5=CC=CC=C5</chem>	9263

A6		10233
SQ1		230000

Підготовка робочих розчинів

Розчини β -лактоглобуліну 10 мг/мл (β lgF) готували в дистильованій воді з HCl (pH 2,0). Реакцію фібрилізації білка (розчини) проводили при 90 °C протягом 2 днів. Кінетика утворення амілоїду контролювалася за допомогою тесту з тіофлавіном Т [67], який виявив збільшення інтенсивності флуоресценції барвника при 480 нм приблизно в 7 разів (дані не наведені). Робочі розчини білка готували шляхом розчинення вихідного розчину фібрилярного β -лактоглобуліну в дистильованій воді (pH 6,07). Стокові розчини зондів готували в етанолі, а ThT розчиняли в 10 mM буфері Тріс (pH 7,4). Флуориметричні вимірювання проводили в дистильованій воді (pH 6,07).

Спектроскопічні вимірювання

Спектри поглинання досліджуваних барвників реєстрували за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-2600 (Японія) при 25°C. Концентрації барвників визначали спектрофотометрично з використанням коефіцієнтів екстинкції

$\varepsilon_{444}^{EtOH} = 9.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ та $\varepsilon_{412}^{water} = 3.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для АВМ та ThT відповідно.

Сpektри стаціонарної флуоресценції реєстрували за допомогою спектрофлуориметра RF-6000 (Shimadzu, Японія). Флуоресцентні вимірювання проводили при 25 °C з використанням кварцових кювет з довжиною шляху 10 мм. Сpektри флуоресценції реєстрували в діапазоні 480–800 нм з довжиною хвилі збудження 460 нм. Ширину щілини збудження та випромінювання встановлювали на рівні 10 нм.

Аналіз флуоресцентних спектрів

Деконволюцію спектрів поглинання барвника виконували за допомогою Origin 9.0 (OriginLab Corporation, Нортгемптон, США) з використанням логарифмічно-нормальної асиметричної функції (LN) [68]:

$$I = I_{\max} \exp \left[-\frac{\ln 2}{\ln^2(\rho)} \ln^2 \left(\frac{a - \lambda}{a - \lambda_c} \right) \right], \quad (1)$$

де I - Інтенсивність флуоресценції, $I_{\max}$ - максимум випромінювання, λ - довжина хвилі, λ_c - положення піку, ρ - асиметрія функції, що визначається як:

$$\rho = \frac{\lambda_c - \lambda_{\min}}{\lambda_{\max} - \lambda_c} \quad (2)$$

де $\lambda_{\min}$ та $\lambda_{\max}$ позначають значення довжини хвилі при половинному випромінюванні. Параметр a позначає граничну довжину хвилі:

$$a = \lambda_c + \frac{(\lambda_{\max} - \lambda_{\min}) \cdot \rho}{\rho^2 - 1} \quad (3)$$

Модель зв'язування

Кількісні характеристики зв'язування барвників з білком були визначені за моделлю адсорбції Ленгмюра шляхом аналізу змін інтенсивності флуоресценції зонда, індукованих білком, на довжинах хвиль, що відповідають максимуму емісії зондів (для нерозкладених спектрів було обрано 624 нм). Припускаючи, що флуоресцентна реакція барвника пропорційна кількості флуорофору,

зв'язаного з білком, зміну інтенсивності флуоресценції зонда, індуковану β -lgF, при максимумі флуоресценції можна записати

$$\text{як: } \Delta I = I - I_0 = [\alpha_{bound} B + \alpha_{free} (Z - B)] - \alpha_{free} Z = (\alpha_{bound} - \alpha_{free}) B = F_{mol} B \quad (4)$$

де I_0 та I – інтенсивність флуоресценції барвника в буферному розчині та в присутності білка, відповідно; F_{mol} є коефіцієнтом, пропорційним різниці квантових виходів барвника в буфері та при зв'язуванні з макромолекулою; α_{bound} та α_{free} – молярна флуоресценція відповідно зв'язаного та вільного барвника, Z – загальна концентрація зонда. Якщо одна молекула білка містить n місця зв'язування барвника, константа асоціації (K_a) визначається за формулою:

$$K_a = \frac{B}{(Z - B)(P \cdot n - B)} \quad (5)$$

де P є загальною концентрацією білка.

Параметр F_{mol} було розраховано на основі флуориметричного титрування барвника фібрилярним β -лактоглобуліном. Зокрема, при високих концентраціях білка, коли $P / n \gg B$, з поєднання рівнянь (4) і (5) отримуємо

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{BF_{mol}} = \frac{1}{K_a P n Z F_{mol}} + \frac{1}{Z F_{mol}} \quad (6)$$

$$F_{mol} = 1 / aZ \quad (7)$$

де a – перетин з віссю Y лінійного наближення графіка $1 / \Delta I = 1 / P$.

Далі рівняння (4) і (5) можна перегрупувати, щоб отримати:

$$\Delta I = \frac{1}{2} F_{mol} \left[Z + nP + 1 / K_a - \sqrt{(Z + nP + 1 / K_a)^2 - 4nPZ} \right] \quad (8)$$

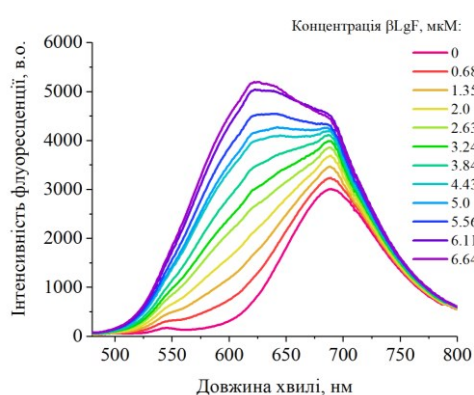
Наближення експериментальних залежностей ΔI (збільшення інтенсивності флуоресценції) від P (загальної концентрації білка) за допомогою рівняння 8

дозволило нам визначити інші параметри зв'язування барвника з білком – константу асоціації (K_a) та стехіометрію зв'язування (n).

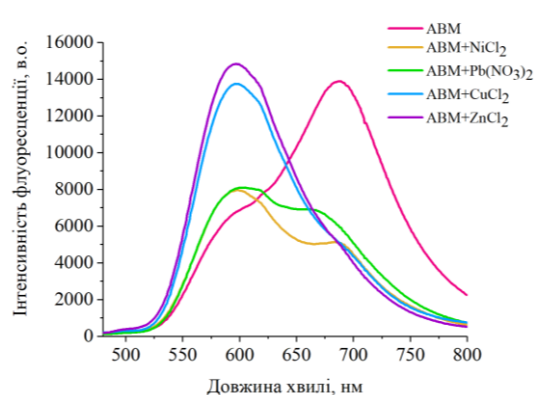
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку бензантронових барвника АБМ в воді та в присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну

На початковому етапі нашого дослідження ми оцінили зв'язування АБМ з амілоїдними фібрилами β -лактоглобуліну. Як видно з рисунка 3.1, вільний барвник у водному середовищі характеризується максимумом емісії при 690 нм. Максимум емісії АБМ зміщується від 538 нм у неполярному бензолі до 650 нм у полярному етанолі, що виникає внаслідок внутрішньомолекулярного перенесення заряду між амінозамісником і карбонільною групою, що збільшує дипольний момент збудженого стану та індукує релаксацію розчинника [69]. Додавання фібрилярного β -лактоглобуліну до АБМ у воді спричинило помітне збільшення інтенсивності флуоресценції, що супроводжувалося гіпсохромним зсувом максимуму емісії на ~ 65 нм, що вказує на перенесення барвника в неполярне середовище. Для кількісної оцінки зв'язування АБМ посилення флуоресценції при 625 нм (ΔI) як функція концентрації білка було підібрано за допомогою моделі адсорбції Ленгмюра (рівняння 8), що дало константу асоціації $K_a = 1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ і кількість місць зв'язування $n = 7.5 \pm 0.3 \text{ mol/mol}$.



А



Б

Рисунок 3.1. Спектри випромінювання АБМ у присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну (А) та іонів важких металів (Б). Концентрація АБМ становила 1 мкМ та 10 мкМ відповідно для систем АБМ- β -lgF та АБМ- β -lgF-важкі метали.

Далі ми оцінили здатність АВМ виявляти іони важких металів у водних розчинах (рис. 3.1 В). У воді бензатроновий барвник АВМ демонструє широкий спектр випромінювання з виразним піком при 690 нм і плечем приблизно при 560 нм. Коли він зв'язується з важкими металами, смуга 690 нм зменшується, а випромінювання близько 560 нм збільшується, причому ступінь цих змін залежить від конкретного іона. Зокрема, зв'язування з Ni^{2+} і Pb^{2+} призводить до приблизно 1,8-кратного зниження інтенсивності флуоресценції при 690 нм, 20-нм синього зсуву максимуму випромінювання та появи чіткої смуги при 560 нм. Примітно, що АВМ виявляє ще вищу афінність до Cu^{2+} і Zn^{2+} , що підтверджується повним гасінням смуги 690 нм і появою дуже інтенсивного максимуму випромінювання при 560 нм. Добре відомо, що взаємодія між флуоресцентними барвниками та іонами важких металів в основному контролюється наявністю функціональних донорних груп у їх молекулярній структурі (таких як карбоніл, амін, азот, гідроксил тощо), які діють як координаційні центри для зв'язування металів [63]. Зсув піків емісії для АВМ з іонами металів, ймовірно, виникає внаслідок утворення комплексів метал-ліганд з переносом заряду, що включають перенесення електронів з молекулярних орбіталей в металі до орбіталей в ліганді. Наші результати вказують на те, що Pb^{2+} і Ni^{2+} , ймовірно, демонструють слабший комплекс метал-ліганд з переносом заряду. Сильне гасіння максимуму 690 нм і синій зсув приблизно на 560 нм можна пояснити утворенням комплексу перенесення заряду метал-ліганд, що включає аміно- та карбонільні групи АВМ, оскільки численні дослідження вказують на перевагу Cu^{2+} до цих структурних груп [63,70]. Навпаки, Zn^{2+} має тенденцію утворювати стабільні координаційні комплекси головним чином через карбонільний кисень [63,70], який також присутній у структурі АВМ. При взаємодії з карбонільною групою АВМ Zn^{2+} , ймовірно, стабілізує збуджений стан барвника, зменшуючи нерадіаційний розпад і приводячи до появи високоемсійної смуги при 560 нм.

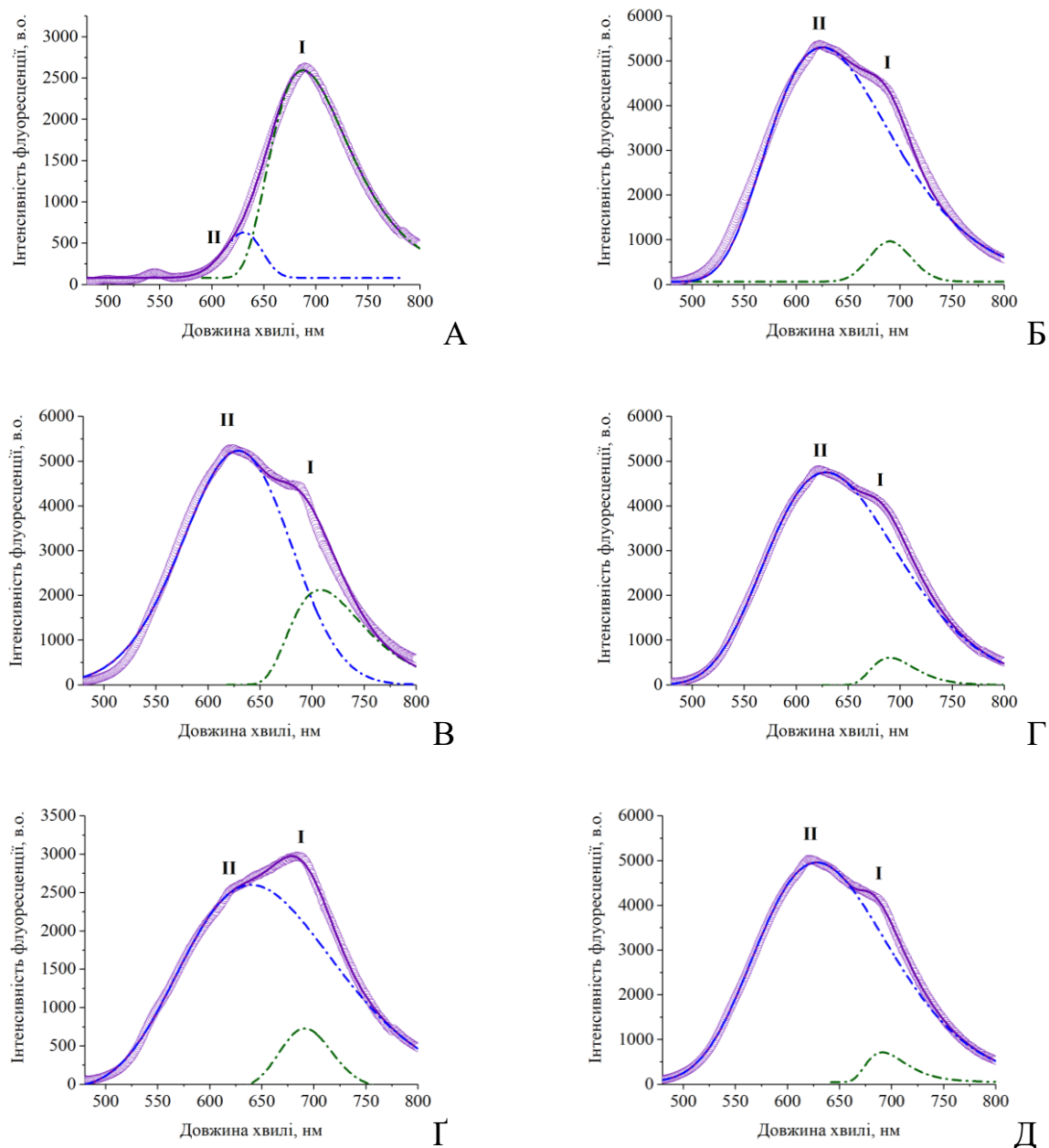


Рисунок 3.2. Деконволюція спектрів поглинання АВМ на два компоненти у воді (А), у присутності 6,64 мкМ β -IgF (Б), система АВМ- β -IgF-Ni (В), система АВМ- β -IgF-Pb (Г), система АВМ- β -IgF-Cu (І), система АВМ- β -IgF-Zn (Д). Концентрація важких металів становила 423 мкМ. Порожні кола позначають вихідні дані. Суцільна лінія демонструє апроксимацію експериментальних даних асиметричною логарифмічно-нормальною функцією.

На наступному етапі нашого дослідження ми вивчали чутливість АВМ до іонів важких металів у присутності амілоїдних фібрил. На рисунку 3.2 показано

спектри випромінювання АВМ у системах, що містять β -lgF і важкі метали. Коли присутній тільки β -lgF, АВМ демонструє виразний пік випромінювання при 560 нм разом із слабшим плечем близько 690 нм. Додавання іонів важких металів змінило відносну інтенсивність цих смуг залежно від металу. Зокрема, додавання Zn^{2+} , Ni^{2+} і Pb^{2+} не змінило істотно загальну форму спектрів випромінювання, тоді як у присутності Cu^{2+} пік 690 нм став домінуючим.

Таблиця 3.1. Спектральні характеристики АВМ у водних розчинах, фібрил β -лактоглобуліну та систем β -lgF–метал

Система	Смуга	$A_{\max}$	λ_c , cm^{-1}	FWHM, cm^{-1}	ρ , cm^{-1}	R^2
ABM	I	2514.9	687.7	92.1	0.633	0.996
	II	551.7	630.8	43.3	1.152	
ABM_bLgF	I	903.5	690	47.2	0.950	0.999
	II	5240	625	142.3	0.708	
ABM_bLgF_Ni	I	2120	708	85	0.635	0.993
	II	5231.0	629	122.8	1.082	
ABM_bLgF_Pb	I	613.5	689.9	49.7	0.692	0.999
	II	4755.7	628.4	150.5	0.781	
ABM_bLgF_Cu	I	783.3	691.3	59.2	0.915	0.999
	II	2653.9	639.8	175.7	0.795	
ABM_bLgF_Zn_	I	665.1	691.2	46.0	0.638	0.999

На початковому етапі нашого дослідження ми оцінили зв'язування АВМ з амілоїдними фібрилами β -лактоглобуліну. Як видно з рисунка 3.26, вільний барвник у водному середовищі характеризується максимумом емісії при 690 нм.

Максимум емісії АВМ зміщується від 538 нм у неполярному бензолі до 650 нм у полярному етанолі, що виникає внаслідок внутрішньомолекулярного перенесення заряду між амінозамісником і карбонільною групою, що збільшує дипольний момент збудженого стану та індукує релаксацію розчинника [69]. Додавання фібрилярного β -лактоглобуліну до АВМ у воді спричинило помітне збільшення інтенсивності флуоресценції, що супроводжувалося гіпсохромним зсувом максимуму емісії на ~ 65 нм, що вказує на перенесення барвника в неполярне середовище. Для кількісної оцінки зв'язування АВМ посилення флуоресценції при 625 нм (ΔI) як функція концентрації білка було підібрано за допомогою моделі адсорбції Ленгмюра (рівняння 8), що дало константу асоціації $K_a = 1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ і кількість місць зв'язування $n = 7.5 \pm 0.3 \text{ mol/mol}$.

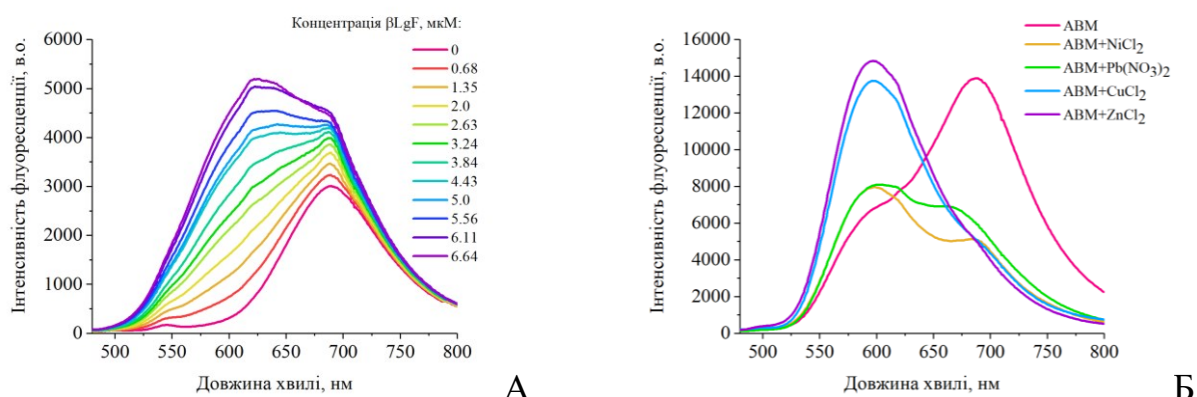


Рисунок 3.26. Спектри випромінювання АВМ у присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну (А) та іонів важких металів (Б). Концентрація АВМ становила 1 мкМ та 10 мкМ відповідно для систем АВМ- β -lgF та АВМ- β -lgF-важкі метали.

Далі ми оцінили здатність АВМ виявляти іони важких металів у водних розчинах (рис. 3.2 В). У воді бензотроновий барвник АВМ демонструє широкий спектр випромінювання з виразним піком при 690 нм і плечем приблизно при 560 нм. Коли він зв'язується з важкими металами, смуга 690 нм зменшується, а випромінювання близько 560 нм збільшується, причому ступінь цих змін залежить від конкретного іона. Зокрема, зв'язування з Ni^{2+} і Pb^{2+} призводить до приблизно 1,8-кратного зниження інтенсивності флуоресценції при 690 нм, 20-

нм синього зсуву максимуму випромінювання та появи чіткої смуги при 560 нм. Примітно, що АВМ виявляє ще вищу афінність до Cu^{2+} і Zn^{2+} , що підтверджується повним гасінням смуги 690 нм і появою дуже інтенсивного максимуму випромінювання при 560 нм. Добре відомо, що взаємодія між флуоресцентними барвниками та іонами важких металів в основному контролюється наявністю функціональних донорних груп у їх молекулярній структурі (таких як карбоніл, амін, азот, гідроксил тощо), які діють як координаційні центри для зв'язування металів [63]. Зсув піків емісії для АВМ з іонами металів, ймовірно, виникає внаслідок утворення комплексів метал-ліганд з переносом заряду, що включають перенесення електронів з молекулярних орбіталей в металі до орбіталей в ліганді. Наші результати вказують на те, що Pb^{2+} і Ni^{2+} , ймовірно, демонструють слабший комплекс метал-ліганд з переносом заряду. Сильне гасіння максимуму 690 нм і синій зсув приблизно на 560 нм можна пояснити утворенням комплексу перенесення заряду метал-ліганд, що включає аміно- та карбонільні групи АВМ, оскільки численні дослідження вказують на перевагу Cu^{2+} до цих структурних груп [63,70]. Навпаки, Zn^{2+} має тенденцію утворювати стабільні координаційні комплекси головним чином через карбонільний кисень [63,70], який також присутній у структурі АВМ. При взаємодії з карбонільною групою АВМ Zn^{2+} , ймовірно, стабілізує збуджений стан барвника, зменшуючи нерадіаційний розпад і приводячи до появи високоемсійної смуги при 560 нм.

На наступному етапі нашого дослідження ми вивчали чутливість АВМ до іонів важких металів у присутності амілоїдних фібрил. На рисунку 2 показано спектри випромінювання АВМ у системах, що містять $\beta\text{-IgF}$ і важкі метали. Коли присутній тільки $\beta\text{-IgF}$, АВМ демонструє виразний пік випромінювання при 560 нм разом із слабшим плечем близько 690 нм. Додавання іонів важких металів змінило відносну інтенсивність цих смуг залежно від металу. Зокрема, додавання Zn^{2+} , Ni^{2+} і Pb^{2+} не змінило істотно загальну форму спектрів випромінювання, тоді як у присутності Cu^{2+} пік 690 нм став домінуючим. Для аналізу спектральної поведінки АВМ у комбінованих системах амілоїд-важкі метали спектри

флуоресценції барвника були розкладені за допомогою логарифмічно-нормальної (LN) функції, яка добре підходить для розділення асиметричних спектрів [68].

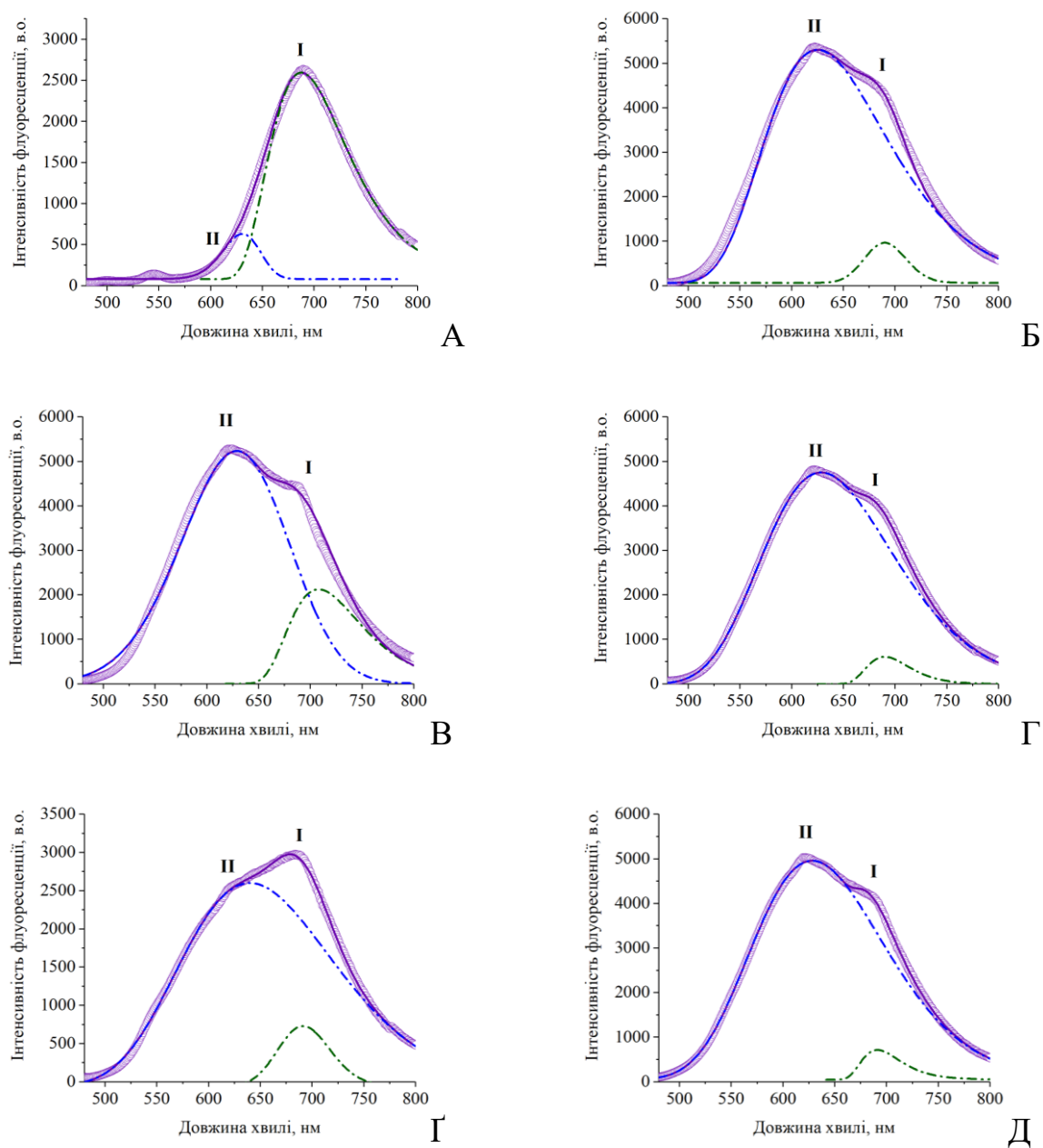


Рисунок 3.3. Деконволюція спектрів поглинання АВМ на два компоненти у воді (А), у присутності 6,64 мкМ β -lgF (Б), система АВМ- β -lgF-Ni (В), система АВМ- β -lgF-Pb (Г), система АВМ- β -lgF-Cu (І), система АВМ- β -lgF-Zn (Д). Концентрація важких металів становила 423 мкМ. Порожні кола позначають вихідні дані. Суцільна лінія демонструє апроксимацію експериментальних даних асиметричною логарифмічно-нормальною функцією.

Було виявлено, що спектри флуоресценції АВМ у воді, у присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну та в системах АВМ- β -lgF-важкі метали можна представити як суму двох різних смуг, що відповідають короткохвильовим і довгохвильовим спектральним компонентам. З даних деконволюції було отримано набір параметрів, включаючи амплітуду та три дескриптори форми: (I) положення піку, яке відображає полярність середовища; (II) повну ширину на півмаксимумі (FWHM); та (III) параметр асиметрії піку.

Таблиця 1. Спектральні характеристики АВМ у водних розчинах, фібрил β -лактоглобуліну та систем β -lgF-метал

Система	Смуга	$A_{\max}$	$\lambda_c, \text{cm}^{-1}$	FWHM, cm^{-1}	ρ, cm^{-1}	R^2
ABM	I	2514.9	687.7	92.1	0.633	0.996
	II	551.7	630.8	43.3	1.152	
ABM_bLgF	I	903.5	690	47.2	0.950	0.999
	II	5240	625	142.3	0.708	
ABM_bLgF_Ni	I	2120	708	85	0.635	0.993
	II	5231.0	629	122.8	1.082	
ABM_bLgF_Pb	I	613.5	689.9	49.7	0.692	0.999
	II	4755.7	628.4	150.5	0.781	
ABM_bLgF_Cu	I	783.3	691.3	59.2	0.915	0.999
	II	2653.9	639.8	175.7	0.795	
ABM_bLgF_Zn_	I	665.1	691.2	46.0	0.638	0.999

Як підсумовано в таблиці 1, батохромна смуга I (690 нм) домінує над гіпсохромною смугою II (630 нм) у водній АВМ, тоді як смуга II переважає в

обох системах АВМ- β -lgF і АВМ- β -lgF-metal. Після додавання важких металів було спостерігано кілька характерних змін порівняно з АВМ- β -lgF: (I) збільшення амплітуди смуги I у присутності Ni^{2+} і Cu^{2+} , більш виражене для Ni^{2+} ; (II) незначне зменшення амплітуди смуги II для Zn^{2+} і Pb^{2+} ; та (III) 1,9-кратне зменшення інтенсивності флуоресценції смуги II в системі АВМ- β -lgF- Cu^{2+} . Ці спектральні зміни супроводжувалися розширенням смуги I (Ni^{2+} і Cu^{2+}) і смуги II (Cu^{2+}), що відобразилося у збільшенні значень FWHM, а також у збільшенні параметра асиметрії смуги II у комплексі Cu^{2+} . Присутність важких металів не вплинула на положення піків, за винятком смуги I АВМ- β -lgF- Ni , де було спостерігалося незначне зміщення у бік довших хвиль.

В цілому, результати в таблиці 1 показують, що додавання Ni^{2+} і Cu^{2+} впливає на флуоресцентну реакцію АВМ, зв'язаного з фібрилами, сильніше, ніж інші випробувані іони важких металів. З огляду на найвищу флуоресцентну реакцію АВМ у водних розчинах з Cu^{2+} і Zn^{2+} , ці результати свідчать про те, що чутливість барвника до важких металів і сила взаємодії між важкими металами та амілоїдними фібрилами є ключовими факторами спектральної поведінки барвника, зв'язаного з фібрилами. Про механізм взаємодії іонів важких металів з амілоїдними фібрилами β -лактоглобуліну відомо мало. Однак Пейдаеш та його колеги [64] продемонстрували, що адсорбція хрому, нікелю, срібла та платини на амілоїдних фібрилах β -лактоглобуліну є високо екзотермічним та іон-специфічним процесом. Припускаючи, що доступність місць зв'язування металів для різних іонів у β -lgF варіюється, сильніше зв'язування Cu^{2+} та Ni^{2+} з фібрилами може порушити локальне середовище АВМ, підсилюючи спектральні зсуви та зміни інтенсивності порівняно з Zn^{2+} та Pb^{2+} . Проте необхідні подальші дослідження для з'ясування молекулярних механізмів зв'язування металів з фібрилами та кількісної оцінки афінності зв'язування.

Як підсумовано в таблиці 3.1, батохромна смуга I (690 нм) домінує над гіпсохромною смугою II (630 нм) у водній АВМ, тоді як смуга II переважає в обох системах АВМ- β -lgF і АВМ- β -lgF-метал. Після додавання важких металів

було спостерігано кілька характерних змін порівняно з АВМ- β -lgF: (I) збільшення амплітуди смуги I у присутності Ni^{2+} і Cu^{2+} , більш виражене для Ni^{2+} ; (II) незначне зменшення амплітуди смуги II для Zn^{2+} і Pb^{2+} ; та (III) 1,9-кратне зменшення інтенсивності флуоресценції смуги II в системі АВМ- β -lgF- Cu^{2+} . Ці спектральні зміни супроводжувалися розширенням смуги I (Ni^{2+} і Cu^{2+}) і смуги II (Cu^{2+}), що відобразилося у збільшенні значень FWHM, а також у збільшенні параметра асиметрії смуги II у комплексі Cu^{2+} . Присутність важких металів не вплинула на положення піків, за винятком смуги I АВМ- β -lgF- Ni , де було спостерігалося незначне зміщення у бік довших хвиль.

В цілому, результати в таблиці 3.1 показують, що додавання Ni^{2+} і Cu^{2+} впливає на флуоресцентну реакцію АВМ, зв'язаного з фібрилами, сильніше, ніж інші випробувані іони важких металів. З огляду на найвищу флуоресцентну реакцію АВМ у водних розчинах з Cu^{2+} і Zn^{2+} , ці результати свідчать про те, що чутливість барвника до важких металів і сила взаємодії між важкими металами та амілоїдними фібрилами є ключовими факторами спектральної поведінки барвника, зв'язаного з фібрилами. Про механізм взаємодії іонів важких металів з амілоїдними фібрилами β -лактоглобуліну відомо мало. Однак Пейдаеш та його колеги [64] продемонстрували, що адсорбція хрому, нікелю, срібла та платини на амілоїдних фібрилах β -лактоглобуліну є високо екзотермічним та іон-специфічним процесом. Припускаючи, що доступність місць зв'язування металів для різних іонів у β -lgF варіюється, сильніше зв'язування Cu^{2+} та Ni^{2+} з фібрилами може порушити локальне середовище АВМ, підсилюючи спектральні зсуви та зміни інтенсивності порівняно з Zn^{2+} та Pb^{2+} . Проте необхідні подальші дослідження для з'ясування молекулярних механізмів зв'язування металів з фібрилами та кількісної оцінки афінності зв'язування.

3.2. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку сквараїнового барвника SQ1 в воді та в присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну

Сквараїновий барвник SQ-1 має симетричну цвітеріонну структуру, що складається з центрального квадратного ядра, оточеного двома бутилзаміщеними гетероциклічними хромофорами [71]. Ця власна електронна симетрія призводить до різкого та інтенсивного спектру поглинання, що характеризується домінантним піком при 662 нм та вторинним плечем при 614 нм в етанолі [71]. SQ-1 продемонстрував надзвичайну універсальність у широкому діапазоні застосувань [69,71–74]. Примітно, що барвник демонструє високу чутливість до індукованих білками модифікацій структурних та фізико-хімічних властивостей ліпідних бішарів [71], служить ефективним флуоресцентним зондом для виявлення активних форм кисню [72,75] та забезпечує потужну платформу як для виявлення, так і для структурного аналізу амілоїдних фібрил [69]. Завдяки своїй флуоресценції в ближньому інфрачервоному діапазоні, SQ-1 виявився дуже придатним для розробки фотолюмінесцентних наноматеріалів на основі амілоїду, що досягається шляхом функціоналізації нанофібрил інсуліну барвником, де SQ-1 діє як довготривалий флуоресцентний сенсор у каскадній системі [73, 74].

В данній роботі ми розширюємо застосування сквараїнового барвника SQ-1, оцінюючи його чутливість до іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} , а також досліджуємо потенційну розробку наносистеми β -лактоглобулін/SQ-1 для виявлення важких металів у воді. На рисунку 3.28 показано спектри поглинання та флуоресценції флуорофора у водному розчині та у присутності цих іонів металів. Спектр поглинання SQ-1 у воді демонструє два піки при 614 нм та 660 нм, причому короткохвильовий компонент демонструє вищу абсорбцію, ніж довгохвильовий пік. Якщо припустити, що в етанолі короткохвильовий компонент проявляється як незначне спектральне плече, домінантний пік 614 нм, що спостерігається у водному розчині, свідчить про агрегацію барвника через π – π взаємодії стекінгу. Тенденція сквараїнових барвників до агрегації у воді була описана в попередніх

дослідженнях і зазвичай залежить від концентрації барвника [76, 77]. Додавання іонів важких металів призвело до помітного зниження поглинання Н-агрегатів, причому ефект зменшувався в порядку $\text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. Важливо, що пік мономеру (~660 нм) переважав у всіх досліджених системах, за винятком Zn^{2+} , де поглинання мономеру та Н-агрегатів залишалося порівнянним, що свідчить про часткове збереження агрегації у присутності цього іона. Більше того, як показано на рисунку 3.4, зв'язування з Cu^{2+} та Pb^{2+} індукує приблизно 1.6-кратне зниження поглинання при 614 нм, що супроводжується зменшенням поглинання мономеру, червоним зсувом максимуму мономеру на 28 нм та помітним розширенням смуги.

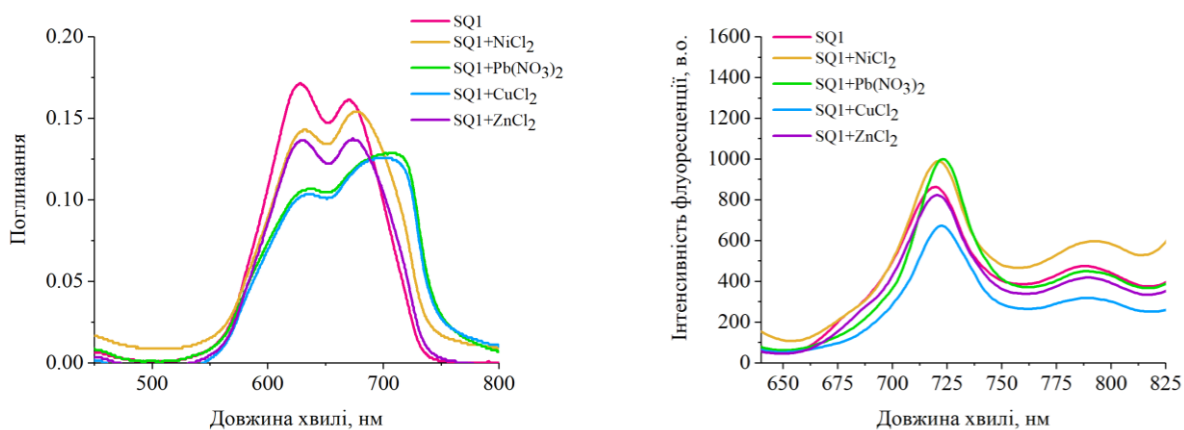


Рисунок 3.4. Спектри поглинання (ліворуч) та випромінювання (праворуч) SQ-1 у воді та за наявності іонів важких металів. Концентрація важких металів становила 423 мкМ. Концентрація SQ1 становила 2 мкМ.

У водному розчині SQ-1 демонструє широкий спектр випромінювання з чітким піком при 715 нм. Додавання іонів важких металів призводить до виражених змін інтенсивності флуоресценції барвника, причому величина цих ефектів залежить від конкретного іона металу. Примітно, що зв'язування з Ni^{2+} та Pb^{2+} викликає приблизно 1.4-кратне збільшення інтенсивності флуоресценції при 715 нм, що супроводжується зсувом максимуму випромінювання в червону область на 3 нм та посиленням плеча при 787 нм, причому ефект найбільш виражений для Ni^{2+} . Навпаки, комплексоутворення SQ-1 з Cu^{2+} призводить до зменшення

інтенсивності флуоресценції при 715 нм разом зі зсувом максимуму випромінювання в червону область на 2 нм.

Численні дослідження показують, що механізм чутливості сквараїнових барвників, ймовірно, залежить від координації між молекулою барвника та іоном металу, що може викликати значні зміни як в електронній структурі барвника, так і в його агрегаційній поведінці [77-81]. Загалом, молекули-зонди демонструють селективність до певних іонів металів на основі того, наскільки ефективно атоми лігандів з неподіленою парою електронів, такі як азот, кисень і сірка, можуть координуватися з цими іонами. Тому, щоб інтерпретувати вищезгадані зміни в спектрах поглинання та флуоресценції барвників, необхідно обговорити можливі механізми, що лежать в основі взаємодії сквараїнового барвника з металом. Численні дослідження, що вивчають сенсорну поведінку сквараїнових барвників, вказують на те, що при взаємодії з цільовим іоном металу вони можуть (а) утворювати координаційні комплекси через багаті на електрони сайти на барвнику або (б) порушувати агрегати барвника, які зазвичай присутні у водних середовищах. Ці процеси дозволяють сквараїновим барвникам функціонувати як сенсори «ввімкнення» або «вимикання», залежно від конкретного іона металу та структури барвника [77-81].

Одним з можливих пояснень вищезгаданих змін у спектрах поглинання та флуоресценції барвників є зв'язок між взаємодією метал-барвник та агрегаційним станом SQ-1. У водному розчині домінантна смуга поглинання при 614 нм вказує на наявність агрегатів Н-типу, утворених шляхом π - π укладання молекул сквараїну. Після додавання іонів важких металів ці агрегати порушуються різною мірою, що призводить до зниження поглинання агрегатів та відповідного збільшення мономерної смуги поблизу 660 нм. Різний ступінь порушення агрегатів ($\text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$) ймовірно відображає варіації у спорідненості зв'язування та координаційній геометрії кожного іона металу зі сквараїновим барвником. Zn^{2+} , здається, частково зберігає агрегований стан, про що свідчать порівнянні інтенсивності піків мономеру та Н-агрегату, можливо, через слабші

або більш стерично утруднені взаємодії. Примітно, що дослідження Чена та ін. повідомляли, що серед кількох протестованих іонів металів лише Hg^{2+} викликав значну сенсорну реакцію для спорідненого сквараїнового барвника, що підкреслює сильну залежність сенсорної поведінки від структури барвника та характеристик зв'язування металу [77].

Флуоресцентна реакція SQ-1 додатково підтверджує цю інтерпретацію. Посилене випромінювання, що спостерігається при взаємодії з Ni^{2+} та Pb^{2+} , може виникати внаслідок деагрегації, яка зменшує не випромінювальні шляхи розпаду і таким чином сприяє більш ефективному випромінюванню. Спостережувані червоні зміщення та збільшення інтенсивності плечей свідчать про незначні зміни електронного оточення барвника, потенційно спричинені конформаційними змінами, індукованими металом, або стабілізацією певних орієнтацій барвника. Навпаки, Cu^{2+} індукує гасіння флуоресценції, ймовірно, через сильнішу координацію зі сквараїновим ядром, що сприяє не випромінювальним шляхам, таким як перенесення електронів або енергії, або сприяє структурним збуренням, що сприяють агрегації.

На наступному етапі нашого дослідження ми вивчили реакцію SQ-1 на іони важких металів у присутності амілоїдних фібрил. На рисунку 3.29 представлені спектри випромінювання SQ-1 у системах, що містять $\beta\text{-lgF}$ та різні іони металів. За відсутності металів SQ-1 демонструє сильний пік випромінювання при 660 нм зі слабкішим плечем близько 760 нм. Додавання іонів важких металів модулює відносну інтенсивність цих смуг специфічним для металу чином, що відображає різницю в взаємодії між SQ-1, $\beta\text{-lgF}$ та іонами металів. Зокрема, додавання Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} суттєво не змінило загальну форму спектрів випромінювання, але вплинуло на інтенсивність піків. Порівняно з системою SQ-1– $\beta\text{-lgF}$, спостерігалось посилення інтенсивності флуоресценції у присутності цих іонів, причому ефект був найбільш вираженим для Zn^{2+} . На противагу цьому, додавання Cu^{2+} до системи SQ-1– $\beta\text{-lgF}$ призвело до зменшення інтенсивності випромінювання в 1.4 раза.

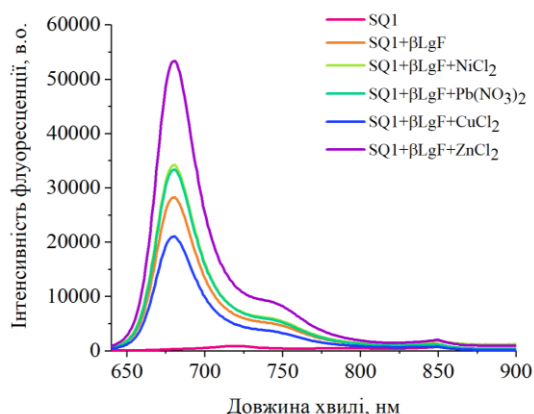
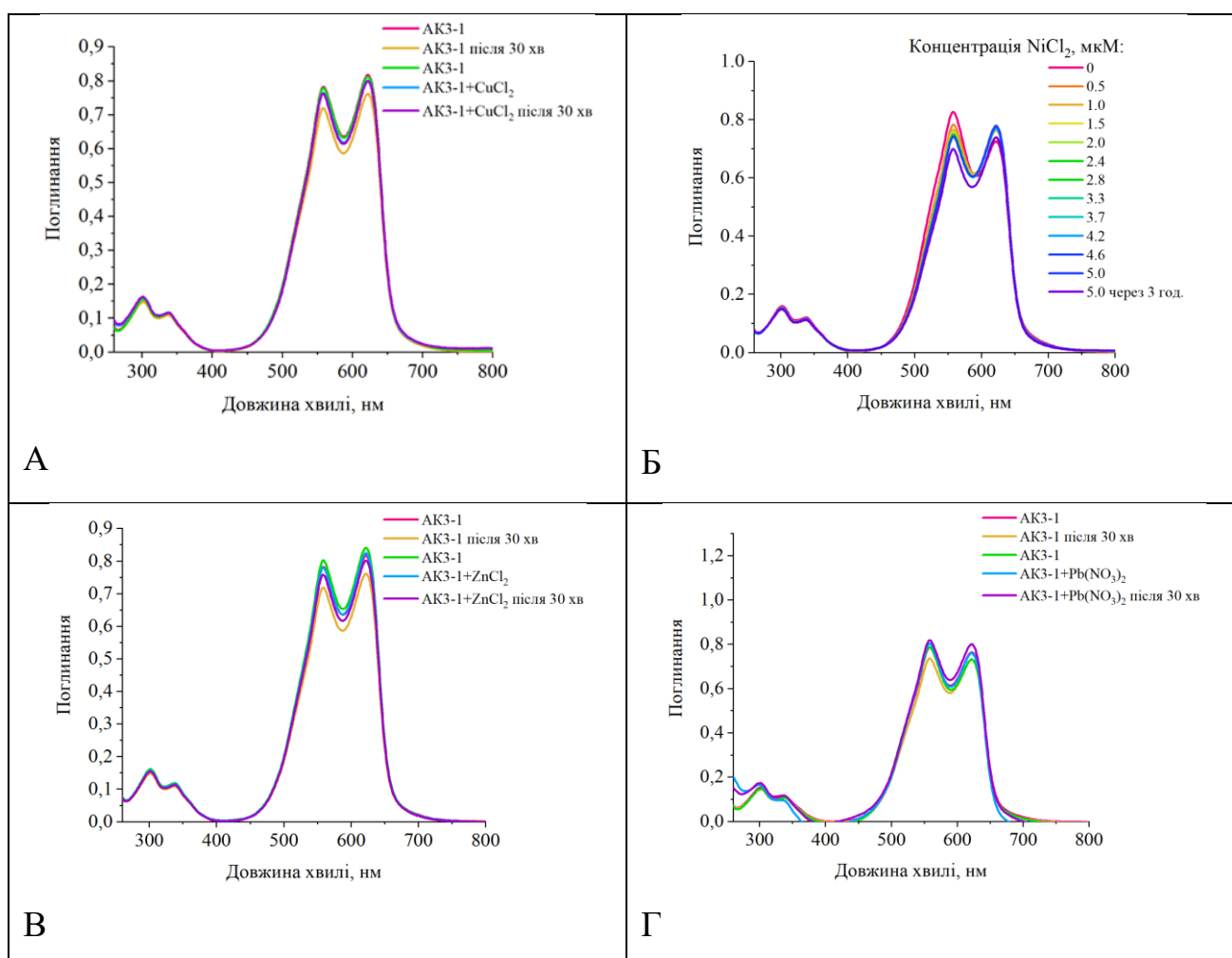


Рисунок 3.5. Спектри випромінювання SQ-1 у воді, за наявності 6.64 мкМ β -lgF та за наявності іонів важких металів. Концентрація важких металів становила 423 мкМ. Концентрація SQ1 становила 2 мкМ.

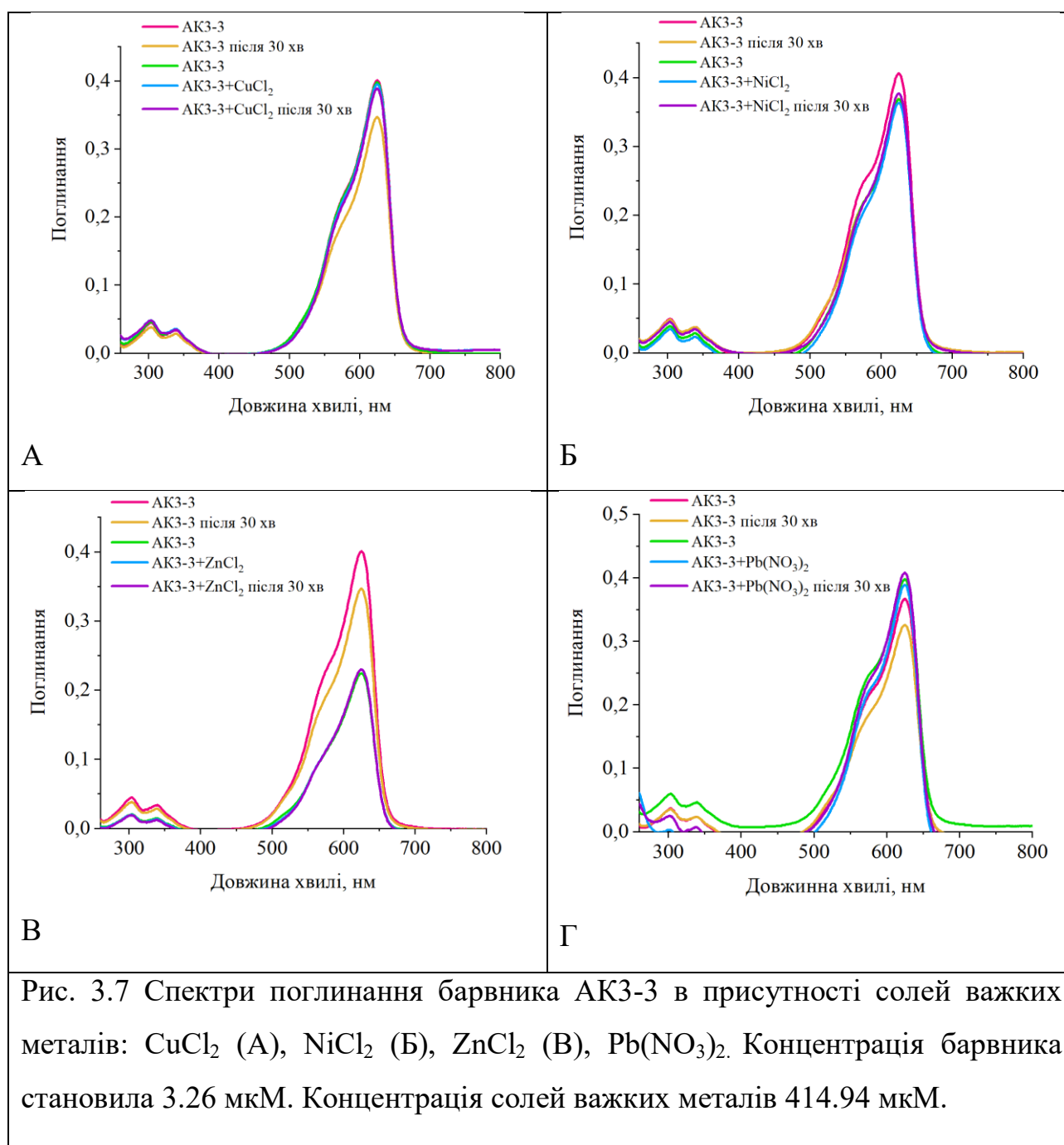
Можливим поясненням цих спостережень є те, що іони металів взаємодіють як з барвником, так і з амілоїдними фібрилами, змінюючи локальне середовище SQ-1. Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} можуть слабо зв'язуватися з фібрилами або взаємодіяти з барвником таким чином, що обмежує невипромінювальну релаксацію, що призводить до посилення флуоресценції. З іншого боку, Cu^{2+} , ймовірно, сильніше зв'язується з фібрилами та/або барвником, викликаючи конформаційні зміни або сприяючи гасячим взаємодіям, які зменшують інтенсивність випромінювання. Ці результати свідчать про те, що флуоресцентна реакція SQ-1 визначається не лише прямими взаємодіями барвник-метал, але й тим, як іони металів впливають на структурне та електричне середовище барвника, пов'язаного з фібрилами. Вплив іонів металів на агрегацію відіграє вирішальну роль у визначенні поведінки поглинання та випромінювання SQ-1. Однак необхідні подальші дослідження, щоб оцінити чутливість SQ-1 до додаткових іонів металів та з'ясувати молекулярні механізми, що лежать в основі взаємодій метал-барвник та метал-барвник-фібрила.

3.3. Вплив іонів важких металів на спектральну поведінку ціанінових барвників в воді та в присутності амілоїдних фібрил β -лактоглобулі

На наступному етапі роботи було досліджено також чутливість трьох триметинових ціанінових барвників (АК31, АК33, АК35), двох пентаметинових (АК5-1 та АК5-2) та двох монометинових барвників (АК1-2-19 та АК1-2-20) до іонів важких металів у воді. Спектри поглинання зондів представлено на Рис. 3.6-3.12. Варто зазначити, що дані ціанінові барвники виявилися менш чутливими до іонів важких металів ніж бензантронови зонд АВМ та сквараїновий барвник.



Зокрема, іони важких металів до не викликали суттєвих змін в спектрах поглинання АКЗ-1 (Рис.3.6). Аналогічно, спектральна відповідь бензанонового зонду АКЗ-3 не змінювалася в присутності іонів Ni^{2+} , Pb^{2+} та Cu^{2+} , тоді як в присутності Zn^{2+} спостерігалось незначне зменшення поглинання.



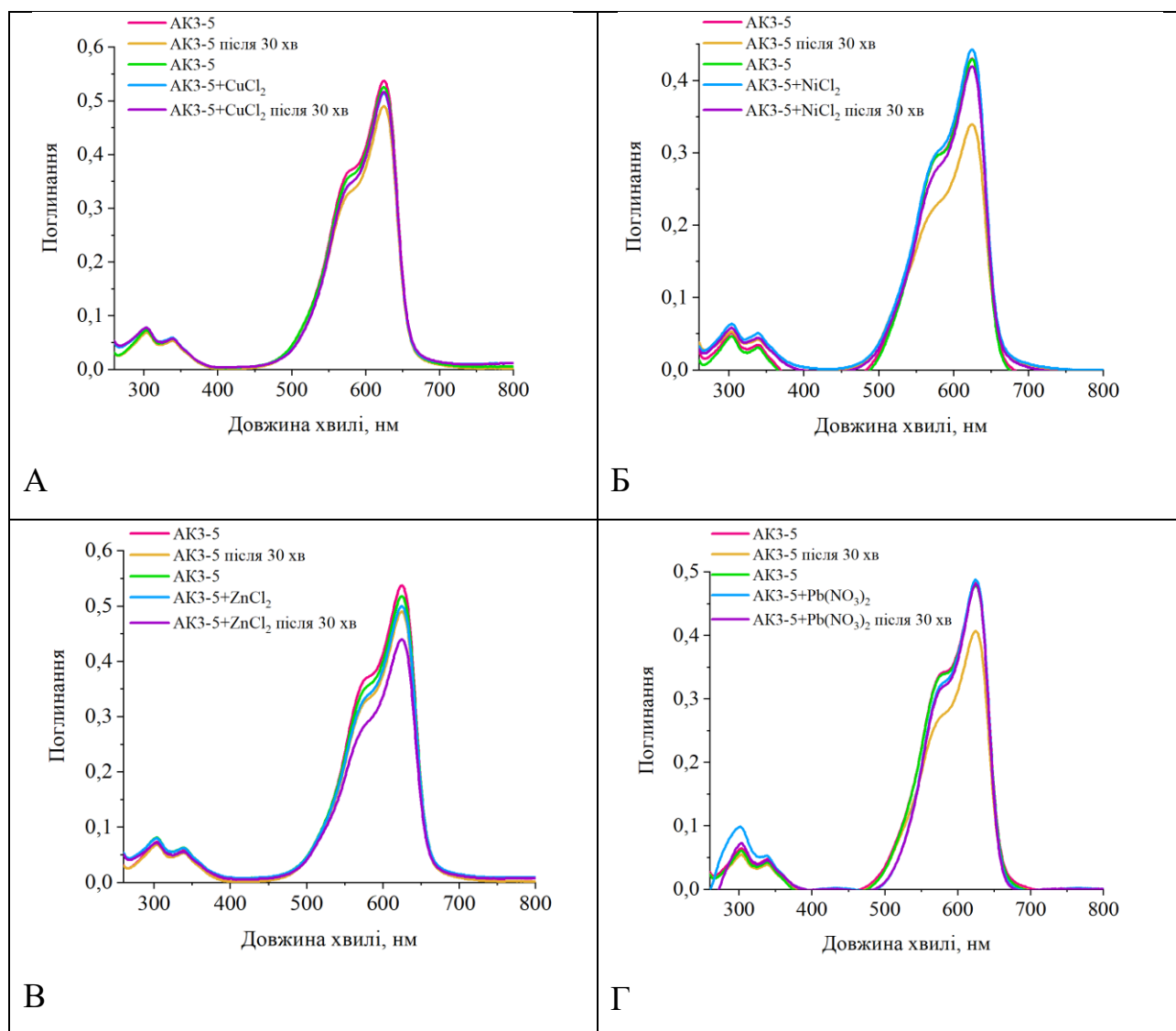
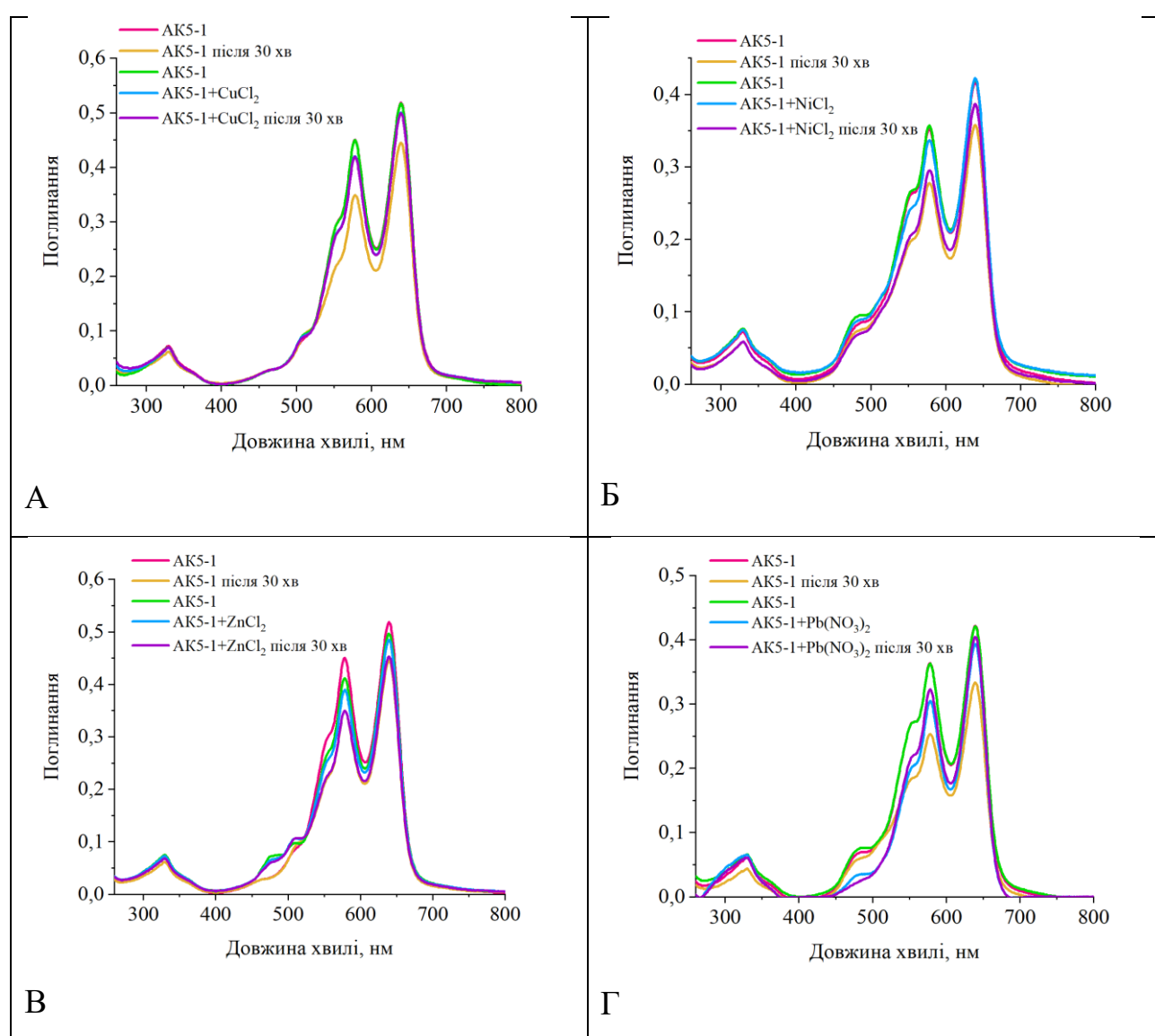


Рис. 3.8 Спектри поглинання барвника АК3-5 в присутності солей важких металів: CuCl_2 (А), NiCl_2 (Б), ZnCl_2 (В), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Г). Концентрація барвника становила 4.74 мкМ. Концентрація солей важких металів 414.94 мкМ.

Зміни в спектрах поглинання зонда АК3-5 також були незначними. Зокрема, поглинання в присутності металу Купруму на 625 нм зростає на 0.027; в присутності Нікелю поглинання при тій самій довжині хвилі - зростає на 0.080; в присутності Цинку поглинання при тій самій довжині хвилі - падає на 0.050; в присутності Плюмбуму поглинання при тій самій довжині хвилі - зростає на 0.074. Для всіх чотирьох металів зсув максимумів поглинання не відбувався.

Спектри поглинання барвника АК5-1 у воді характеризуються двома піками, короткохвильовий на 560 нанометрах є ознакою Н-агрегатів, притаманних ціаніновим барвникам у воді. Додавання іонів важких металів не викликало

суттєвих змін спектральної поведінки даного барвника. Зокрема, поглинання в присутності металу Купруму на 578 нм зростає лише на 0.060 порівняно з контролем, в той час як поглинання на 639 нм зростає на 0.053; в присутності Нікелю зміни були навіть менші; в присутності Цинку поглинання при тій самій довжині хвилі ніяк не змінилося, а поглинання на іншому піку зростає на 0.007; в присутності Плюмбуму поглинання при тій самій довжині хвилі - зростає на 0.070, а поглинання на іншому піку зростає теж на 0.070. Для всіх чотирьох металів зсув максимумів поглинання не відбувався.



Варто відзначити, що додавання іонів важких металів до АК5-2 у воді мало більш суттєвий вплив на спектральну поведінку в порівнянні з АК5-1. Зокрема, для Cu^{2+} та Zn^{2+} спостерігалось незначне зменшення поглинання. Однак, додавання Ni^{2+} та Pb^{2+} супроводжувалось зменшенням поглинання на довжині хвилі 560 нм та 649.5. Це зменшення супроводжується зростанням інтенсивності на довжинні хвилі 472 нм. Ці данні свідчать про те, Ni^{2+} та Pb^{2+} , взаємодіючи з іонами важких металів, посилює агрегацію данного барвника.

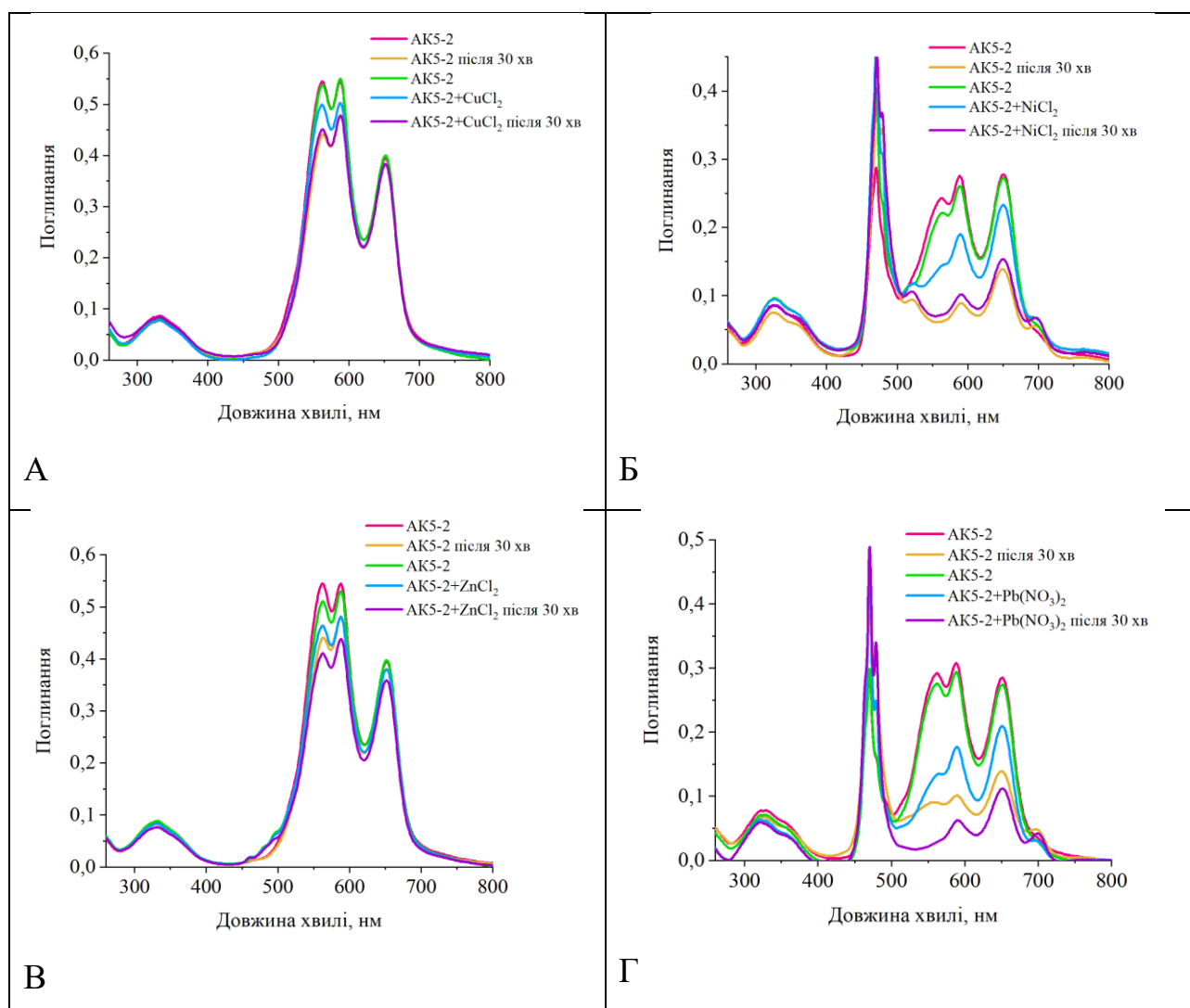
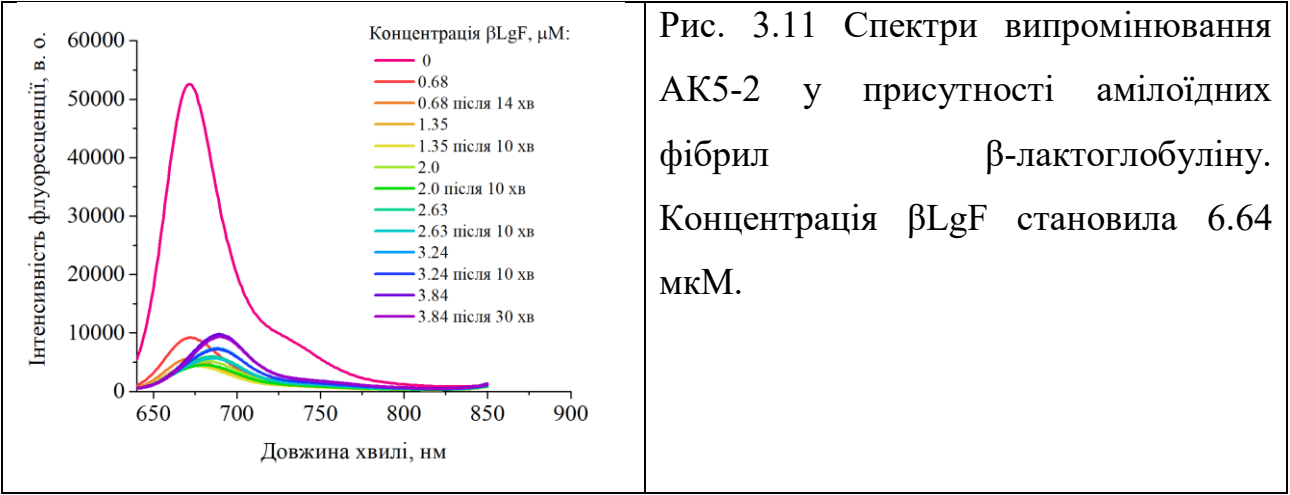
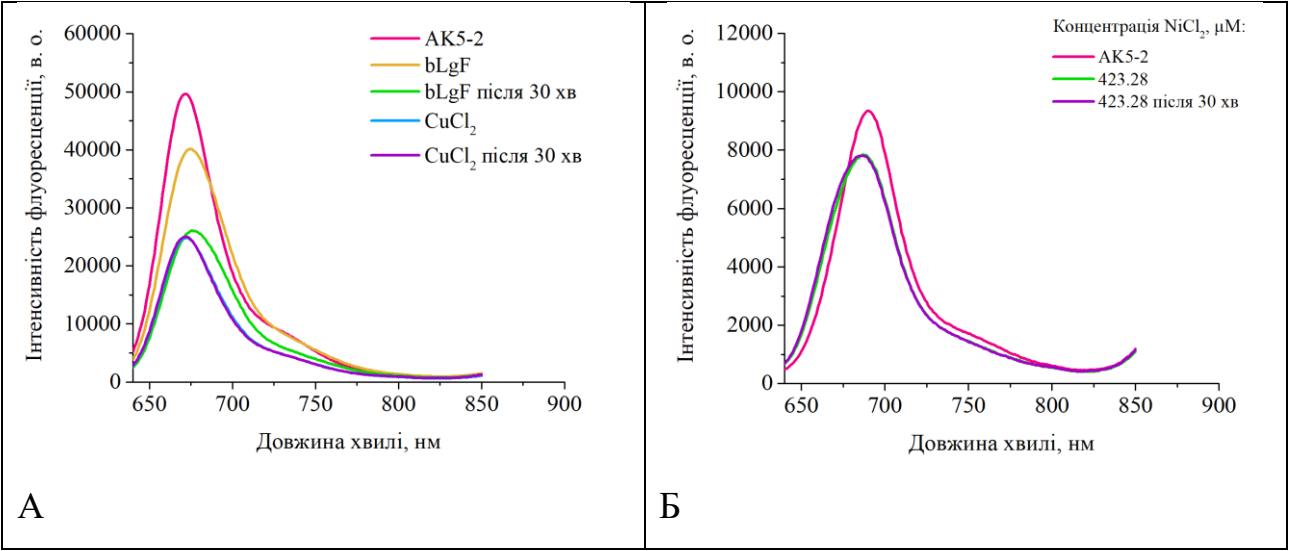


Рис. 3.10 Спектри поглинання барвника АК5-2 в присутності солей важких металів: CuCl_2 (А), NiCl_2 (Б), ZnCl_2 (В), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Г). Концентрація барвника становила 7.19 мкМ. Концентрація солей важких металів 414.94 мкМ.

Оскільки, в писутності важких металів суттєві зміни в спектрах поглинання спостерігалися лише для зонда АК5-2, в подальшому спектральну відповідь даного барвника було досліджено в присутності також амілоїдни фібрил лактоглобуліну. Типові спектри флуоресценції барвників в присутності амілоїдних фібрил наведено на малюнку 3.11.



При додаванні білка спала інтенсивність флуоресценції барвника на 43243 в. о. та відбувся зсув максимумів вправо на 18 нм внаслідок процесів зв’язування, тобто збільшення інтенсивності флуоресценції при додаванні фібрил.



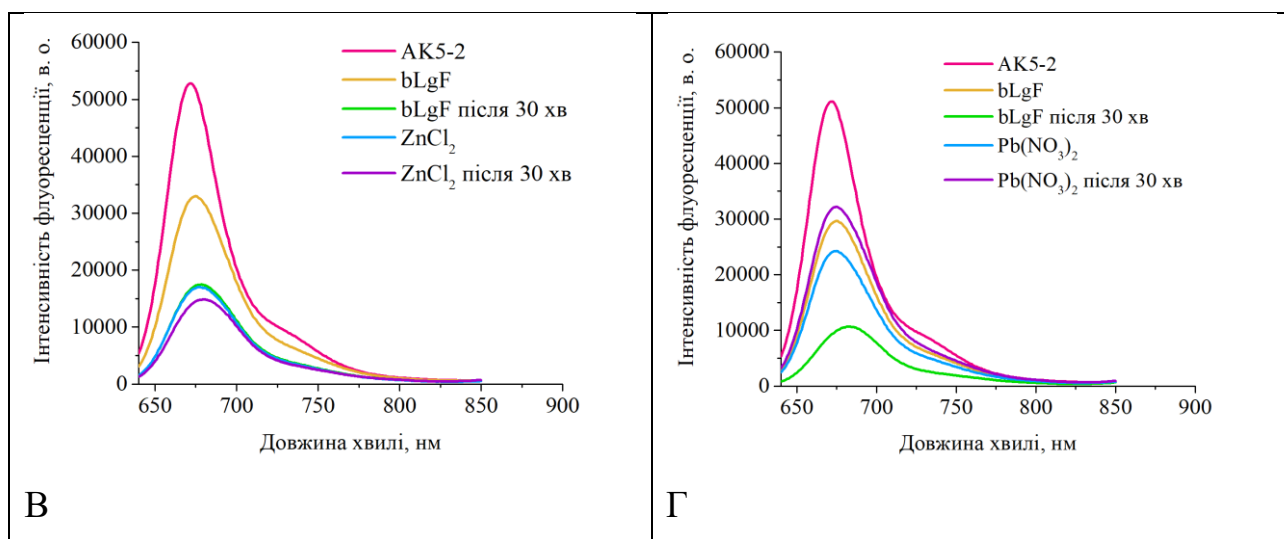


Рис. 3.23 Вплив амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну на спектри флуоресценції барвника AK5-2 в присутності солей важких металів: CuCl₂ (А), NiCl₂ (Б), ZnCl₂ (В), Pb(NO₃)₂ (Г). Концентрація барвника становила 6.64 мкМ. Концентрація солей важких металів 423.28 мкМ.

Інтенсивність флуоресценції в присутності металу Купруму на 676 нм спадає на 1065 в. о. порівняно з контролем, причому зсув максимуму був вліво на 5 нм. В присутності Нікелю флуоресценція довжині хвилі 686 нм спадає на 50 в. о. Інтенсивність флуоресценції в присутності металу Цинку на 678 нм спадає на 2608 в. о. порівняно з контролем, причому зсув максимуму був вправо на 2 нм. Інтенсивність в присутності металу Плюмбуму самій довжині хвилі 682 нм зростає на 21594 в. о. порівняно з контролем, причому зсув максимуму був вліво на 7 нм.

ВИСНОВКИ

Дипломна робота присвячена комплексному дослідженню чутливості одного бензантронового зонда АВМ, сквараїнового зонда SQ-1 та п'яти ціанінових зондів (АК3-1, АК3-3, АК3-5, АК5-1 та АК5-2) до чотирьох екологічно значущих іонів важких металів — Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} . Встановлено, що:

- Бензантроновий зонд АВМ демонструє чіткі, специфічні для окремих металів флуоресцентні відповіді як у водних розчинах, так і в середовищі, пов'язаному з фібрилами. Зокрема, у водному розчині при зв'язуванні з іонами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} та Pb^{2+} АВМ зазнає виражених спектральних змін, причому іони Cu^{2+} і Zn^{2+} спричиняють найсильніший ефект завдяки їхній переважній координації з амінними та карбонільними донорними групами.
- Інкорпорація АВМ у фібрили β -лактоглобуліну підсилює флуоресценцію барвника та забезпечує селективну модуляцію емісійних сигналів при зв'язуванні металів, при цьому іони Ni^{2+} і Cu^{2+} викликають найбільш значні зміни спектральних характеристик.
- Флуоресцентна відповідь АВМ відображає не лише пряме зв'язування барвника з іонами металів, але й силу взаємодії металів з амілоїдними фібрилами. Така подвійна чутливість робить АВМ перспективним оптичним зондом для дослідження метал–білкових взаємодій і розробки супрамолекулярних платформ для сенсингу важких металів.
- Досліджено чутливість флуоресцентного сквараїнового барвника SQ-1 до іонів важких металів. Результати показали, що оптичні властивості барвника залежать від металу, головним чином під впливом змін агрегатного стану та координації метал-барвник. Ni^{2+} та Pb^{2+} сприяли деагрегації SQ-1 та посилювали випромінювання флуоресценції, тоді як Cu^{2+} індукував гасіння флуоресценції, що узгоджується із сильною координаційною взаємодією.

- У присутності фібрил β -лактоглобуліну SQ-1 зберігав свою чутливість та демонстрував металоспецифічні зміни флуоресценції, що вказує на потенціал для розробки наносистем на основі білків для виявлення важких металів у водних середовищах.
- Ціанінові барвники виявилися не чутливими до іонів важких металів

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. M.A. Salam; S.C. Paul (2019) Contamination profile of heavy metals in marine fish and shellfish <https://doi.org/10.22034/gjesm.2019.02.08>
2. Chunxia Zhang, Qingqing Qiao (2011) Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.006>
3. CHI Qiao-qiao, ZHU Guang-wei, Alan Langdon (2007) Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China Author links open overlay panel [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60244-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60244-7)
4. Колесник Н. Л. Важкі метали в екосистемі ставів та їх вплив на рибопродуктивність і харчову цінність риби в умовах інтенсивного вирощування: дис. кандидата с.-г. наук : 06.02.03. Київ, 2012. 191 с.
5. Федоненко О. В., Шарамок Т. С., Єсіпова Н. Б. Розподіл свинцю та кадмію в екосистемі самарського рибницького ставу Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2007. Вип. 6, № 788. С. 105–109.
6. Ambreen F., Javed M., Batool U. Tissue specific heavy metals uptake in economically important fish, Cyprinus carpio at acute exposure of metals mixtures. Pakistan J. Zool. 2015. Vol. 47, N 2. P. 399–407.
7. Курант В. З. В. О. Хоменчук, В. Я. Бияк Шляхи проникнення та вміст важких металів в організмі риб (огляд). Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. Тернопіль, 2011. 2 (47). С. 262–269.
8. [Per-Arne Amundsen](#), Frode J. Staldvik et al (1997) Heavy metal contamination in freshwater fish from the border region between Norway and Russia [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)84058-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)84058-2)
9. M.N. Mohd Fairulnizal, B. Vimala, D.N. Rathi, and M.N. Mohd Naeem 2019 Atomic absorption spectroscopy for food quality evaluation <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00009-3>

10. P. Hannaford, Alan Walsh 1916–1998, *Hist. Rec. Aust. Sci.* 13 (2) (2000) 179–206. <https://doi.org/>
11. R.D. Beaty, J.D. Kerber (1993) *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectroscopy*, second ed., The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT.
12. R. Garcí'a, A. Ba'ez (2012) Atomic absorption spectrometry (AAS), in: D.M.A. Farrukh (Ed.), *Atomic Absorption Spectroscopy*, InTech.
13. A. Hineman (2011) Determination of As, Se and Hg in Waters by Hydride Generation/Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy, Perkin Elmer, Inc., ON, Canada.
14. Thomas, R. (2013). *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14923>
15. Date, A. R., & Gray, A. L. (1983). Plasma source mass spectrometry using an inductively coupled plasma and a quadrupole mass analyser. *Analyst*, 108(1292), 1037-1044. <https://doi.org/10.1039/AN9830801037>
16. De Acha N, Elosúa C et al (2019) Fluorescent sensors for the detection of heavy metal ions in aqueous media. *Sensors* 19(3):599 <https://doi.org/10.3390/s19030599>
17. Borah SB, Bora T et al (2015) Heavy metal ion sensing in water using surface plasmon resonance of metallic nanostructures. *Groundw Sustain Dev* 1(1-2):1–11 <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2015.12.004>
18. Montaser, A. (Ed.). (1998). *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Wiley-VCH. DOI: <https://doi.org/10.1002/9783527612731>
19. A. Boden, V. Taylor. (2015). Recent Developments in ICP-MS Technology. In: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Recent Advances and Applications* (S. D. Tanner, Ed.), Royal Society of Chemistry, 1–19. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781782622325-00001>.
20. Jason Day, Joseph A Caruso et al (2000) A comparison of capillary electrophoresis using indirect UV absorbance and ICP-MS detection with a self-aspirating nebulizer interface <https://doi.org/10.1039/a910268j>

21. M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127** (1), 183-198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>.
22. J. Sochor, P. Salas, J. Zehnalek, B. Krska, V. Adam, L. Havel, R. Kizek. (2010). An assay for spectrometric determination of antioxidant activity of a biological extract. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 126 (11), 416-417
23. J. Sochor, M. Ryvolova, O. Krystofova, Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages *Molecules*, 15 (2010) 8618 <https://doi.org/10.3390/molecules15128618>
24. O. Rop, T. Jurikova, J. Sochor et al Antioxidant Capacity, Scavenging Radical Activity And Selected Chemical Composition Of Native Apple Cultivars From Central Europe 34 (2011) 187 <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00387.x>
25. W. Andlauer and J. Heritier, Food Chem. Rapid electrochemical screening of antioxidant capacity (RESAC) of selected tea samples 125 (2011) 1517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.046>
26. D. Hynek, S. Krizkova, L. Krejcova et al Metallothionein Electrochemically Determined using Brdicka Reaction as a Promising Blood Marker of Head and Neck Malignant Tumours *Sci.*, 7 (2012) 1749. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)13839-9](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)13839-9)
27. F. Fu, Q. Wang, Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review, *J. Environ. Manage.* 92 (2011) 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
28. I. Ugulu, Determination of heavy metal accumulation in plant samples by spectrometric techniques in Turkey, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (2015) 113–151. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.935981>
29. US EPA, Drinking water contaminants – Standards and Regulations, (n.d.). <https://www.epa.gov/dwstandardsregulations> (accessed August 17, 2017).

30. V. Poornima, V. Alexandar, S. Iswariya, P.T. Perumal, T.S. Uma, X. Jiang, Y. Zhang, Gold nanoparticle-based nanosystems for the colorimetric detection of Hg²⁺ ion contamination in the environment, *RSC Adv.* 6 (2016) 46711–46722. <https://doi.org/10.1039/C6RA04433F>
31. M. Arora, B. Kiran, S. Rani, A. Rani, B. Kaur, N. Mittal, Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources, *Food Chem.* 111 (2008) 811–815. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.049>
32. B. Kaur, R. Srivastava, B. Satpati, Ultratrace detection of toxic heavy metal ions found in water bodies using hydroxyapatite supported nanocrystalline ZSM-5 modified electrodes, *New J. Chem.* 39 (2015) 5137–5149. <https://doi.org/10.1039/C4NJ02369B>
33. S.B.D. Borah, T. Bora, S. Baruah, J. Dutta, Heavy metal ion sensing in water using surface plasmon resonance of metallic nanostructures, *Groundw. Sustain. Dev.* 1 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2015.12.004>
34. C.V. Hoang, M. Oyama, O. Saito, M. Aono, T. Nagao, R. Hillenbrand, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, O. Saito, M. Rana, A. Ono, Monitoring the presence of ionic mercury in environmental water by plasmon-enhanced Infrared spectroscopy, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1175.
35. a) P. Gruber, M.P.C. Marques, N. Szita, T. Mayr, Integration and application of optical chemical sensors in microbioreactors, *Lab Chip.* 17 (2017) 2693–2712.
b) Š.K. Urek, N. Frančil, M. Turel, A. Lobnik, Sensing heavy metals using mesoporous-based optical chemical sensors, *J. Nanomater.* (2013), 501320. <https://doi.org/10.1039/C7LC00538E>
36. Y. Ding, S. Wang, J. Li, L. Chen, Nanomaterial-based optical sensors for mercury ions, *Trend Anal. Chem.* 82 (2016) 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.015>
37. I.A. Buryakov, T.I. Buryakov, V.T. Matsaev, Optical chemical sensors for the detection of explosives and associated substances, *J. Anal. Chem.* 69 (2014) 616–631.

38. J. Li, J.-J. Zhu, Quantum dots for fluorescent biosensing and bio-imaging applications, *Analyst* 138 (2013) 2506-2515.
<https://doi.org/10.1039/C3AN36705C>
39. Y.-Y. Wang, X. Xiang, R. Yan, Y. Liu, F.-L. Jiang, Förster resonance energy transfer from quantum dots to Rhodamine B as mediated by a cationic surfactant: A thermodynamic perspective, *J. Phys. Chem. C*, (2017),
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08236>.
40. J. Wang, C. Jiang, X. Wang, L. Wang, A. Chen, J. Hu, Z. Luo, S. Wang, S.S. Gambhir, S. Weiss, Fabrication of an “ion-imprinting” dual-emission quantum dot nanohybrid for selective fluorescence turn-on and ratiometric detection of cadmium ions, *Analyst* 141 (2016) 5886–5892.
<https://doi.org/10.1039/C6AN00868B>
41. M.S. Frost, M.J. Dempsey, D.E. Whitehead, Highly sensitive SERS detection of Pb²⁺ ions in aqueous media using citrate functionalised gold nanoparticles, *Sensors Actuators B Chem.* 221 (2015) 1003–1008.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.001>
42. N. Ullah, M. Mansha, I. Khan, Nanomaterial-based optical chemical sensors for the detection of heavy metals in water: Recent advances and challenges. 100 (2018) 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.002>
43. J. Yang, Y. Zhang, L. Zhang, H. Wang, J. Nie et al. Analyte-triggered autocatalytic amplification combined with gold nanoparticle probes for colorimetric detection of heavy-metal ions, *Chem. Commun.* 53 (2017) 7477–7480. <https://doi.org/10.1039/C7CC02198D>
44. C. Schopf, A. Martín, D. Iacopino, Plasmonic detection of mercury via amalgam formation on surface-immobilized single Au nanorods, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 18 (2017) 60–67. <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1258293>
45. J. Chem Complexation and Mechanism of Fluorescence Quenching of Telmisartan with Y(III) and Nd(III) (2010) 5759–5765.
<https://doi.org/10.1021/je100711u>

46. Hughes, M. N. *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*; Wiley: New York, 1975.
47. Yam, V. W.-W.; Lo, K. K.-W. Recent Advances in Utilization of Transition Metal Complexes and Lanthanides as Diagnostic Tools. *Coord. Chem. Rev.* 1999, 184, 157–240. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00262-8)
48. Albert, A. *The Physico-Chemical Basis of Therapy: Selective Toxicity*, 6th ed.; Chapman and Hall: London, 1979.
49. Hughes, M. N. *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1981.
50. Khalil, M. M.; El-Deeb, M. M.; Mahmoud, R. K. Equilibrium Studies of Binary Systems Involving Lanthanide and Actinide Metal Ions and Some Selected Aliphatic and Aromatic Monohydroxamic Acids. *J. Chem. Eng. Data* 2007, 52, 1571–1579. <https://doi.org/10.1021/je600541a>
51. Li, Y.; Zheng, F. K.; Liu, X.; Zou, W. Q.; Guo, G. C.; Lu, C. Z.; Huang, J. S. Crystal Structures and Magnetic and Luminescent Properties of a Series of Homodinuclear Lanthanide Complexes with 4-Cyanobenzoic Ligand. *Inorg. Chem.* 2006, 45, 6308–6316. <https://doi.org/10.1021/ic0602603>
52. Azab, H. A.; El-Korashy, S. A.; Anwar, Z. M.; Hussein, B. H. M.; Khairy, G. M. Eu(III)-Anthracene-9-carboxylic Acid as a Responsive Luminescent Bioprobe and Its Electroanalytical Interactions with N-Acetyl Amino Acids, Nucleotides, and DNA. *J. Chem. Eng. Data* 2010, 55, 3130–3141. <https://doi.org/10.1021/je100008q>
53. Li, H.; Xian, H.; Zhao, G. Synthesis and Crystal Structure of La(III), Y(III) Complexes of Homoveratric Acid with 1,10-Phenanthroline. *J. Rare Earths* 2010, 28, 7–11. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(09\)60039-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(09)60039-9)
54. Cagigal, E.; Gonzalez, L.; Alonso, R. M.; Jimenez, R. M. pKa Determination of Angiotensin II Receptor Antagonists (ARA II) by Spectrofluorimetry. *J. Pharm.*

- Biomed. Anal. 2001, 26, 477–486. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00413-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00413-7)
55. Katritzky, A. R.; Rees, C. W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry: The Structure, Reactions, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds*; Pergamon Press: London, 1984.
 56. Verdasco, G.; Martí'n, M. A.; del Castillo, B.; Lo'pez-Alvarado, P.; Mene'ndez, C. Solvent Effects on the Fluorescent Emission of Some New Benzimidazole Derivatives. *Anal. Chim. Acta* 1995, 303, 73– 78. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00365-S](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00365-S)
 57. Bhattacharyya, M.; Chaudhuri, U.; Poddar, R. K. Evidence for Cooperative Binding of CPZ with Hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 167, 1146–1153. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)90643-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)90643-2)
 58. Guo, M.; Zou, J. W.; Yi, P. G.; Shang, Z. C.; Hu, G. X.; Yu, Q. S. Binding Interaction of Gatifloxacin with Bovine Serum Albumin. *Anal. Sci.* 2004, 20, 465–470. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.465>
 59. Wang, C.; Wu, Q. H.; Li, C. R.; Wang, Z.; Ma, J. J.; Zang, X. H.; Qin, N. X. Interaction of Tetrandrine with Human Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *Anal. Sci.* 2007, 23, 429–433.
 60. Siddiqi, K. S.; Bano, S.; Mohd, A.; Khan, A. A. P. Binding Interaction of Captopril with Metal Ions: A Fluorescence Quenching Study. *Chin. J. Chem.* 2009, 27, 1755–1761. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200990295>
 61. Jiang, Z.; Cai, R.; Zhang, H. *Analytical Chemistry of Rare Earths*, 2nd ed.; Science Publishing: Beijing, 2000; pp 21-30.
 62. Swaran J.S. Flora and Vidhu Pachauri; *Chelation in Metal Intoxication*; 2010, 7(7), 2745-2788 <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>
 63. N. De Acha, C. Elosúa, J.M. Corres, and F.J. Arregui, *Sensors*, **19**, 599 (2019). <https://doi.org/10.3390/s19030599>

- 64.M. Peydayesh, S. Bolisetty, T. Mohammadi, and R. Mezzenga, *Langmuir*, **35**, 4161 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04234>
- 65.L.C. Ramírez-Rodríguez, L.E. Díaz Barrera, M.X. Quintanilla-Carvajal, *et al.*, *Membranes*, **10**, 386 (2020). <https://doi.org/10.3390/membranes10120386>
- 66.E.M. Kirilova, I. Kalnina, G.K. Kirilov, and I. Meirovics, *J. Fluoresc.* **18**, 645 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0340-3>
- 67.M. Groenning, *J. Chem. Biol.* **3**, 1 (2010), <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0027-5>
- 68.M. Bacalum, B. Zorila, and M. Radu. *Anal Biochem.* **440**, 123 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.05.031>
- 69.G. Gorbenko, V. Trusova, E. Kirilova, *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **495**, 275 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.07.005>
- 70.Z. Yan, Y. Cai, J. Zhang, Y. Zhao, *et al.*, *Measurements*, **187**, 110355 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.110355>
- 71.V.M. Ioffe, G.P. Gorbenko, T. Deligeorgiev, N. Gadjev, A.Vasilev *Biophys. Chem.* **128**, 75–86 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.03.007>
72. V. Trusova, G. Gorbenko, G., T. Deligeorgiev, N. Gadjev, N. East Europ *J Phys*, **3**(3), 25-34. (2016) <https://doi.org/10.26565/2312-4334-2016-3-02>
- 73.V. Trusova, U. Tarabara, O. Zhytniakivska, K.Vus, G. Gorbenko. *BBA Adv.*, **2**, 100059 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2022.100059>
- 74.G. Gorbenko, U. Tarabara, O. Zhytniakivska, K.Vus, V. Trusova. *Mol. Syst. Des. Eng* **7**, 1307-1317 (2022). <https://doi.org/10.1039/D2ME00063F>
- 75.V.M.Trusova, G.P. Gorbenko, T Deligeorgiev, T. et al. *J Fluoresc.* **19**, 1017–1023 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0501-z>
- 76.K. Illina, W.M. MacCuaig, M. Laramie, et al. *Bioconjugate Chem.* **31**, 194-213 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00482>
- 77.C. Chen, R. Wang, L. Guo, et al. *Organic Letters*, **13**(5), 1162–1165 (2011). <https://doi.org/10.1021/ol200024g>
- 78.D.D. Ta, S.V. Dzyuba, *Chemosensors*, **9**, 302 (2021). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9110302>

- 79.X. Liu, N. Li, M.M. Xu, et al. Materials 2018, 11 (1998).
<https://doi.org/10.3390/ma11101998>
- 80.H. Li, Y. Tang, K.Shen, J.Li, et al. RSC Adv., 13, 17202-17211 (2023).
<https://doi.org/10.1039/D3RA02419A>
- 81.S. Thapa, K.R. Singh, S.S. Pandey. Chemosensors. 13(8), 288.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors13080288J>