

УДК 543.426:(547.972.3+546.62+543.38)

DOI: [https://doi.org/10.17721/1728-2209.2025.1\(60\).8](https://doi.org/10.17721/1728-2209.2025.1(60).8)

Любов КОРШЕНКО, асп.

ORCID ID: 0009-0007-7047-3515

e-mail: liubov_korshenko@knu.ua

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ростислав ЛИННИК, канд. хім. наук, ст. дослідник

ORCID ID: 0000-0002-6401-8184

e-mail: rostyslavlinnik@knu.ua

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ХІМІКО-АНАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВІ КОМПЛЕКСУ АЛЮМІНІЮ(III) ІЗ 4'-КАРБОКСИМЕТОКСИФЛАВОНОЛОМ

Вступ. Флуоресцентна спектроскопія – високочутливий метод аналізу, що успішно використовується в біохімічних і медичних дослідженнях, для аналізу об'єктів довкілля, на підприємствах фармацевтичної та харчової промисловості. Для визначення речовин, що не мають власної флуоресценції, запропоновано різноманітні флуоресцентні зонди, чутливі до катіонів металів, неорганічних і органічних аніонів, біомакромолекул. 3-Гідроксифлавоноли і їхні комплекси з іонами перехідних металів активно використовуються для створення нових флуоресцентних зондів. Ефективне застосування таких комплексів в аналізі потребує комплексного дослідження їхніх хіміко-аналітичних властивостей, з'ясування механізму комплексоутворення, а також впливу іонів металу на такі, притаманні 3-гідроксифлавонолам явища, як внутрішньомолекулярне перенесення заряду та протону. У цій роботі наведено результати дослідження оптимальних умов утворення комплексу $Al(III)$ з 2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]оцтовою кислотою ($F4O$), його стехіометричного складу, стійкості, флуоресцентних властивостей і можливості використання як оптичного зонда для детектування аніонів.

Методи. Спектральні характеристики $F4O$ у різних розчинниках, протолітичні властивості, особливості комплексоутворення $F4O$ з іонами $Al(III)$ і можливість використання комплексу для флуоресцентного визначення цитрат-аніонів досліджували спектрофлуориметричним і спектрофотометричним методами. Значення рН розчинів вимірювали потенціометричним методом із використанням скляного комбінованого електрода.

Результати. Взаємодія $Al(III)$ з $F4O$ супроводжується значним підвищенням інтенсивності флуоресценції. У водних розчинах оптимальне значення рН для утворення комплексу $F4O-Al$ міститься в межах 5,15–5,20. За цих умов у розчині утворюється комплекс найпростішої стехіометрії, середньої стійкості. Умовна константа стійкості комплексу, визначена за методом Бенесі – Гільдебранда, становить $6,44 \cdot 10^4$ л/моль. У присутності цитрат-аніонів інтенсивність свічення комплексу знижується. Відповідна крива гасіння флуоресценції лінеаризується в координатах модифікованого рівняння Штерна – Фольмера. Константа гасіння становить $4,88 \cdot 10^6$ л/моль.

Висновки. Досліджено оптимальні умови утворення й основні хіміко-аналітичні характеристики комплексу $Al(III)$ з $F4O$. На прикладі цитрат-аніонів показано, що комплекс $F4O-Al$ може бути перспективним як "On-Off" флуоресцентний зонд для визначення аніонів у водних розчинах. Гасіння свічення у присутності цитрату ймовірно зумовлене руйнуванням комплексу $Al(III)$ з 4'-карбоксиметоксифлавонолом унаслідок зв'язування аніона з металом.

Ключові слова: 3-гідроксифлавонол, комплексоутворення, флуориметрія, визначення аніонів, ESIPT, кетонольна таутомерія.

Вступ

3-Гідроксифлавоноли, або флавоноли – органічні сполуки, що належать до класу флавоноїдів. Представники природних флавоноїдів, зокрема морин, кверцетин, кемпферол, фізетин тощо, широко розповсюджені в різноманітних рослинах і харчових продуктах рослинного походження. Вони є важливою складовою здорового харчування людини, оскільки здатні проявляти антиоксидантну, геропротекторну, протизапальну та антимікробну дію (Tong et al., 2021).

Природне походження флавоноїдів зумовлює їхню високу біосумісність і низьку цитотоксичність, що робить їх привабливими для медичних і біохімічних досліджень. Природні та синтетичні 3-гідроксифлавоноли активно вивчаються науковцями та використовуються для розробки флуоресцентних зондів на їхній основі. Відомі зонди для визначення іонів металів, аніонів, малих біомолекул і біологічно активних сполук, амінокислот, білків і молекул ДНК (Pyrzynska, & Pełkal, 2011; Sengupta, 2017; Gong et al., 2022; Qin et al., 2021). Серед переваг флавоноїдів – здатність до двосмугової флуоресценції, яка зумовлена явищем внутрішньомолекулярного перенесення протона у збудженому стані (ESIPT). Таутомеризація відбувається внаслідок взаємодії 3-гідроксильної та 4-карбонільної груп і забезпечує флавонолам можливість

існування в розчині у двох формах – нормальній (кетон-) N^* - та таутомерній (енольній-) T^* -формі. На стабілізацію тієї чи іншої форми безпосередньо впливає природа розчинника, його полярність і протолітичні властивості. Це робить 3-гідроксифлавоноли високочутливими до мікрооточення та відкриває можливість розробки флуоресцентних зондів на їхній основі для дослідження протолітичних характеристик розчинника (Qin et al., 2021; Zhao et al., 2021).

3-Гідроксифлавоноли здатні утворювати з іонами металів хелатні комплекси, у яких катіони координуються до функціонального аналітичного угруповання, утвореного 3-гідроксильною та 4-карбонільною функціональними групами (Protti et al., 2008). Унаслідок комплексоутворення біологічна активність і терапевтична дія флавоноїдів досить часто посилюються (De Souza, & De Giovanni, 2004; Radu et al., 2024; Roshal, 2023). Однак інтерес до цих сполук не обмежується лише їхніми біохімічними і фармакологічними властивостями. Комплекси металів з органічними сполуками, зокрема й з 3-гідроксифлавонолами, знайшли застосування і як флуоресцентні зонди. Порівняно із зондами на основі незв'язаних органічних сполук, зонди на основі комплексів металів можуть мати потенційні переваги, серед яких більша тривалість життя збудженого стану (τ) і вищі квантові виходи люмінесценції

(Demas, & DeGraff, 1997). Один із напрямів використання комплексів металів із 3-гідроксифлавонами у аналізі – визначення аніонів (Qin et al., 2021). Часто визначення ґрунтується на взаємодії аніона з металом, що входить до складу комплексу, з подальшим його руйнуванням і вивільненням у розчин незв'язаного флавонолу (так звана стратегія витіснення) (Sathish et al., 2006; Du et al., 2018). Переваги такого підходу – простота отримання зонда (утворення комплексу відбувається за рахунок координаційних, а не ковалентних зв'язків), відсутність потреби в інтеграції флуорофора до складу рецептора, можливість гнучкого налаштування вибіркової шляхом вибору катіона та флуоресцентного ліганда. Попри відносну простоту описаного підходу та його широке практичне застосування, вплив природи флуоресцентного ліганда на сенсорну поведінку утвореного комплексу щодо аніонів досі залишається недостатньо з'ясованим, оскільки наявні результати досліджень свідчать про різну вибіковість зондів, що містять однаковий іон металу, але різні ліганди (Lou et al., 2012). Глибше розуміння механізму стратегії витіснення потребує детального дослідження чинників, що впливають на взаємодію між металом у складі комплексу й аніоном, і зумовлюють вибіковість флуоресцентного зонда.

Окрім визначення аніонів, подібні системи на основі хелатних комплексів металів з органічними лігандами можуть застосовуватися також для виявлення малих біомолекул, що мають безпосереднє значення для діагностики та лікування різноманітних захворювань. Наприклад, комплексні сполуки алюмінію проявляють сенсорні властивості щодо нуклеозидфосфатів, зокрема аденозин 5'-трифосфату (АТФ), який є основним джерелом енергії, необхідної для підтримання життєдіяльності та нормального функціонування клітин організму (Huang, Wang, & Xiao, 2020).

Отже, унікальні фотохімічні й комплексоутворювальні властивості 3-гідроксифлавонів роблять їх одними з найперспективніших органічних сполук для розробки нових флуоресцентних зондів. Водночас, як зазначено в роботі (Roshal, 2023), розширенню застосування флавоноїдів як флуоресцентних зондів сприятиме детальне дослідження процесів комплексоутворення за їхньої участі, вивчення спектральних характеристик флавоноїдів і їх комплексів, а також з'ясування зв'язку між структурою та сенсорними властивостями щодо аналітів різної природи. Розробка та впровадження нових флуоресцентних зондів у практику аналізу є *актуальним* завданням сучасної хімічної науки.

Метою нашої роботи було дослідження умов комплексоутворення між іонами Al(III) та однією з похідних флавонолу – 2-[4-(3-гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]оцтовою кислотою (F4O) та оцінювання можливості використання комплексу, що утворюється, для флуоресцентного визначення аніонів.

Методи

Для приготування розчинів і виконання експериментальних досліджень використовували деіонізовану воду (18.2 МОм·см) та органічні розчинники: диметилсульфоксид (ДМСО) (Honeywell, Ізраїль, for HPLC, ≥99,7 %), ацетонітрил (Sigma Aldrich, for HPLC, ≥99,9 %), етилацетат (Merck KGaA, Німеччина, HPLC-grade).

F4O синтезували за методикою, наведеною в роботі (Zamotaiev et al., 2011). Використовували робочий розчин F4O у ДМСО з концентрацією 1,0 ммоль/л. Отриманий розчин зберігали в холодильнику.

Вихідний розчин алюмінію з концентрацією 5 ммоль/л готували шляхом розчинення необхідної наважки алюмокалійєвих галунів $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (Реахім, Україна, ч) у деіонізованій воді в мірній колбі місткістю 50,0 мл. Робочий розчин з концентрацією 1 ммоль/л готували шляхом розбавлення вихідного розчину.

Вихідний розчин цитрату з концентрацією 5 ммоль/л готували розчиненням наважки препарату $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ (Реахім, Україна, чда) у деіонізованій воді в мірній колбі місткістю 25,0 мл. Робочий розчин з концентрацією 0,01 ммоль/л готували шляхом послідовного розбавлення вихідного розчину деіонізованою водою.

У роботі використовували буферні розчини: ацетатний, цитратний, уротропіновий, HEPES-KOH, TRIS-HCl, а також універсальну буферну суміш. Буферні розчини з концентрацією 0,05 моль/л готували шляхом розчинення в деіонізованій воді необхідних кількостей ацетату натрію (ТОВ "НВП «Альфарус»", Україна, хч), цитрату натрію (Реахім, Україна, чда), уротропіну (Carlo Erba, Франція, for analysis – ACS reagent), 2-[4-(2-гідроксипіперидин-1-іл)етансульфонової кислоти (HEPES) (Sigma-Aldrich, США, ≥99,5 %), і тріс(гідроксиметил)амінометану (TRIS) (Merck KGaA, Німеччина, for analysis – ACS reagent, ≥99,8 %) у мірних колбах місткістю 100,0 мл. Для встановлення рН буферних розчинів використовували розчини HCl (Carlo Erba, Франція, 12 %, хч) і KOH (Реахім, Україна, осч) з концентрацією 0,01, 0,1 та 1,0 моль/л. Розчини універсальної буферної суміші готували згідно з рекомендаціями (Пурье, 1989) із суміші борної (Реахім, Україна, хч), фосфатної (Макрохім, Україна, чда) і ацетатної (ТОВ "Хімлаборреактив", Китай, ≥99,8 %) кислот з концентрацією 0,04 моль/л (за кожною з кислот) і розчину KOH.

Спектри поглинання розчинів реєстрували з використанням двопробного спектрофотометра UV-2401PC (Shimadzu, Японія). Спектри флуоресценції реєстрували за допомогою спектрофлуориметра LS-55 (Perkin Elmer, Велика Британія) з ксеноновою імпульсною лампою і детектором R928. Для проведення фотометричних і люмінесцентних вимірювань використовували кварцові кювети, $l = 1,0$ см. Значення рН досліджуваних розчинів вимірювали з використанням іономіра ST 3100 (OHAUS Corporation, США) зі скляним комбінованим рН-електродом ST 310 (OHAUS Corporation, США). Іономір попередньо калібрували за стандартними буферними розчинами. Зважування реактивів проводили на аналітичних вагах ABS 80-4 (Kern&Sohn GmbH, Німеччина) із точністю до 0,0001 г. Деіонізовану воду отримували за допомогою системи Direct – Q3 UV (Millipore, Німеччина).

Значення pK_a методом потенціометричного титрування визначали у водно-метанольному розчині ($\omega_{CH_3OH} = 30$ % об.) з використанням як титранта 0,1 моль/л розчину KOH. Титрували в напівавтоматичному режимі, з подальшою обробкою отриманих даних програмним забезпеченням. Спектрофотометрично pK_a визначали за методом Комаря (Альберт, & Сергент, 1964). Для цього готували серію розчинів F4O з концентрацією 20 мкмоль/л з різними значеннями рН у діапазоні 6,4–10,0 і реєстрували їхні спектри поглинання. Для створення необхідного рН використовували універсальну буферну суміш. Константу дисоціації розраховували за рівнянням Гендерсона – Гассельбаха:

$$pK_a = pH + \lg \frac{A_i - A}{A - A_m}$$

де рН – значення рН у розчині, що містить суміш аніонної та молекулярної форм сполуки, A_i – оптична густина розчину, що містить тільки аніонну форму сполуки, A – оптична густина розчину, що містить суміш аніонної та

молекулярної форм сполуки, A_m – оптична густина розчину, що містить лише молекулярну форму сполуки.

Для визначення оптимального для комплексоутворення рН готували серію розчинів з концентрацією F4O 5 мкмоль/л, концентрацією Al(III) 10 мкмоль/л і різним рН у діапазоні від 4,2 до 7,1. Необхідне значення рН встановлювали за допомогою буферних сумішей HEPES-уротропін-HCl. Реєстрували спектри флуоресценції отриманих розчинів з довжиною хвилі збудження 405 нм після досягнення рівноваги комплексоутворення (впродовж 8 хв).

Стехіометрію і стійкість комплексу вивчали з використанням методів ізомольної серії (Бабко, 1955) і Бенесі – Гільдебранда (Wang, & Yu, 2007). Для побудови діаграми ізомольної серії готували серію розчинів з різним співвідношенням концентрацій F4O:Al(III) так, щоб загальний об'єм і сумарний вміст компонентів залишався незмінним. Після досягнення рівноваги комплексоутворення (протягом 8 хв) реєстрували спектри флуоресценції отриманих розчинів і будували залежність $\Delta I^{470} = I - I_{F4O}$ від мольної частки компонентів суміші, де I – загальна інтенсивність флуоресценції системи F4O-Al при довжині хвилі 470 нм, I_{F4O} – інтенсивність флуоресценції розчинів F4O з концентрацією, що відповідає концентрації розчинів ізомольної серії, при тій самій довжині хвилі. Для визначення умовної константи стійкості комплексу F4O-Al обробляли залежність інтенсивності флуоресценції системи F4O-Al від концентрації Al(III) відповідно до рівняння Бенесі – Гільдебранда:

$$\frac{1}{I - I_{\min}} = \frac{1}{I_{\max} - I_{\min}} + \frac{1}{K_{B-H}(I_{\max} - I_{\min})C_{Al(III)}},$$

де I та $I_{\min}$ – інтенсивність флуоресценції у присутності та за відсутності іонів алюмінію в розчині відповідно, $I_{\max}$ – інтенсивність флуоресценції із вмістом алюмінію, що відповідає ділянці насичення кривої " $I_{F4O-Al} - C_{Al(III)}$ ", K_{B-H} – умовна константа стійкості комплексу, $C_{Al(III)}$ – мольна концентрація іонів алюмінію в розчині. Будували графік у координатах " $1/(I - I_{\min}) - 1/C_{Al(III)}$ ", отримували рівняння лінійної регресії. Умовну константу стійкості розраховували з отриманого рівняння як відношення Intercept/Slope.

Для дослідження взаємодії комплексу F4O-Al з цитрат-іонами, готували розчин, що містив буферну суміш HEPES-уротропін-HCl з рН 5,18, 10,0 мкмоль/л F4O та 1,0 мкмоль/л Al(III). До отриманого розчину піпет-дозатором додавали робочий розчин цитрату натрію з концентрацією 10,0 мкмоль/л і реєстрували спектри флуоресценції з довжиною хвилі збудження 405 нм після досягнення рівноваги взаємодії (впродовж 8 хв). Отриману залежність інтенсивності свічення комплексу від концентрації цитрат-аніонів обробляли за модифікованим рівнянням Штерна – Фольмера (Lakowicz, 2006):

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{f_1 K_{MS-V} C_{Cit}},$$

де I_0 – інтенсивність флуоресценції комплексу за відсутності цитрату, $\Delta I = I_0 - I$ – різниця інтенсивності свічення за відсутності та у присутності цитрату, f_1 – частка флуорофора, доступна для гасника, K_{MS-V} – константа гасіння флуоресценції, C_{Cit} – мольна концентрація цитрату в розчині. Будували графік у координатах " $I_0/\Delta I - 1/C_{Cit}$ ", за отриманим рівнянням лінійної регресії розраховували константу гасіння K_{MS-V} . Межу виявлення (MB) цитрат-аніонів розраховували за початковою лінійною ділянкою кривої гасіння флуоресценції цитрат-аніонами за рівнян-

ням: $MB = 3\sigma/b$, де σ – стандартне відхилення вимірювань інтенсивності флуоресценції холостого розчину (розчину за відсутності цитрат-аніонів), b – тангенс кута нахилу (slope) залежності інтенсивності флуоресценції за 470 нм від концентрації цитрату.

Результати

Спектральні характеристики, флуоресцентні та протолітичні властивості F4O. 2-[4-(3-Гідрокси-4-оксо-4Н-хромен-2-іл)фенокси]оцтова кислота – похідна 3-гідрокси-4'-метоксифлавоноу, що раніше була запропонована як флуоресцентна мітка для дослідження взаємодії пептидів з олігонуклеотидами та нуклеїновими кислотами (Zamotaiev et al., 2011). Спектри поглинання сполуки у різних розчинниках містять смугу з максимумом при 350–360 нм (рис. 1). Як і для інших похідних 3-гідроксифлавонону, для F4O характерна двосмугова флуоресценція, зумовлена внутрішньомолекулярним перенесенням протона у збудженому стані. Дві смуги у спектрі флуоресценції, з максимумами при 440–450 нм і при 530–540 нм, спостерігаються для розчинів F4O у ДМСО і ацетонітрилі (рис. 1, б; 1, в). Одна смуга флуоресценції характерна для спектра емісії водного розчину (рН 7,8), а також для спектра розчину у етилацетаті (рис. 1А, 1Г). Максимуми свічення припадають відповідно на довжини хвиль 450 і 535 нм (табл. 1).

Досліджуваний 4'-карбоксиметоксифлавонол містить у своєму складі функціональні групи, здатні до електролітичної дисоціації: $-\text{COOH}$ та $-\text{OH}$. Методом потенціометричного титрування і спектрофотометричним методом Комаря встановлено значення pK_{a1} і pK_{a2} дисоціації цих функціональних груп (табл. 2). Значення pK_{a1} спектрофотометричним методом визначити не вдалося, імовірно, з огляду на віддаленість карбоксильної групи від хромофорної системи F4O. Отримані результати добре узгоджуються з результатами, наведеними в роботі (Zamotaiev et al., 2011), а також з даними, отриманими розрахунковим методом за допомогою програмного пакета Marvin 20.9.0 (ChemAxon).

Досліджено вплив рН розчину на інтенсивність свічення F4O. Встановлено, що зі збільшенням рН з 2,0 до 8,0 інтенсивність флуоресценції сполуки зростає. Подальше збільшення рН призводить до зменшення інтенсивності свічення (рис. 2).

Для водного розчину з рН 7,8 молярний коефіцієнт поглинання становить $\epsilon^{360} = 6,1 \cdot 10^3$ л/моль·см.

Взаємодія F4O з Al(III). Раніше було встановлено, що взаємодія F4O з іонами алюмінію супроводжується появою нових смуг на спектрах поглинання та флуоресценції, а також значним посиленням інтенсивності свічення (Корщенко та ін., 2024). Максимум смуги у спектрі флуоресценції комплексу припадає на довжину хвилі 470 нм.

У цій роботі нами досліджено оптимальні умови комплексоутворення F4O з іонами алюмінію. Вплив рН на утворення комплексу вивчали, використовуючи буферну суміш на основі HEPES, уротропіну та HCl. Такий склад суміші було обрано на підставі даних літератури (Ferreira et al, 2015) і результатів власних досліджень. Як бачимо з рис. 3, інтенсивність флуоресценції комплексу стрімко зростає зі збільшенням рН, досягаючи максимального значення при рН 5,15–5,20. Подальше збільшення рН призводить до різкого зменшення інтенсивності свічення. З огляду на це, подальші дослідження виконували у вказаному діапазоні рН з використанням буферної суміші HEPES–уротропін–HCl.

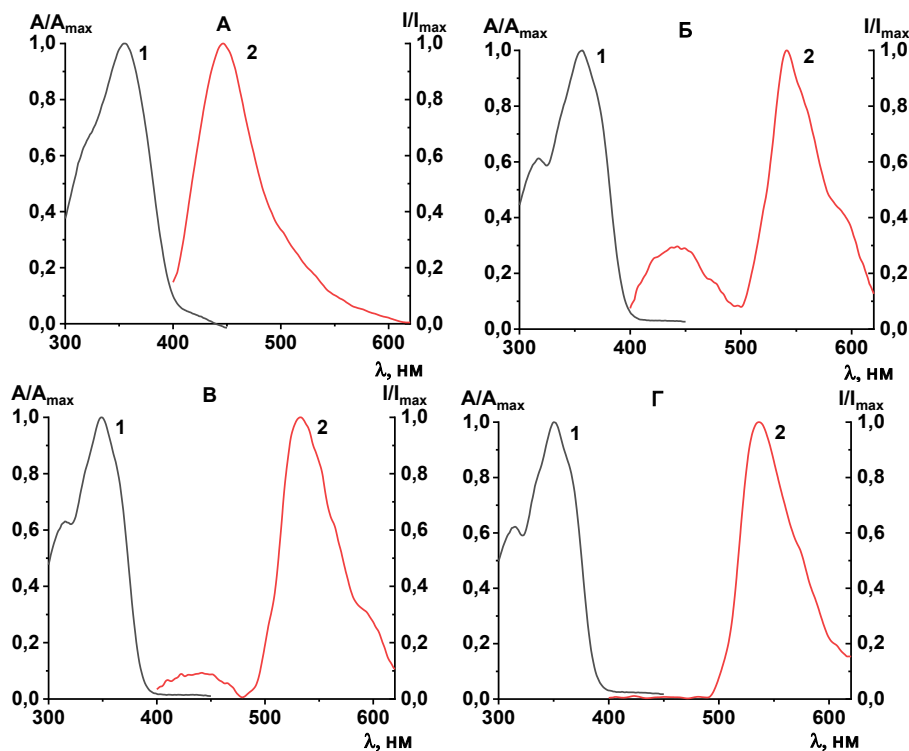


Рис. 1. Нормовані спектри поглинання (1) і флуоресценції (2) F4O у різних розчинниках: H₂O (рН 7,8) – А, ДМСО – Б, ацетонітрил – В, етилацетат – Г. $\lambda_{\text{ex}} = 360$ нм, C_{F4O} , мкмоль/л: 5,0 (спектри флуоресценції), 33 (спектри поглинання), $l = 1,0$ см

Спектральні характеристики F4O в різних розчинниках

Таблиця 1

Розчинник	λ_{abs} , нм	λ_{em} , нм		Стоксів зсув	
		N*-форма	T*-форма	$\Delta\lambda$, нм	$\Delta\nu$, см ⁻¹
Ацетонітрил	350	441	533	91 (183)	5896 (9810)
Етилацетат	350	—	535	185	9880
H ₂ O, pH 7.8	355	450	—	95	5947
ДМСО	360	450	540	90 (180)	5556 (9259)

Значення pK_a для F4O, отримані різними методами

Таблиця 2

	Метод визначення		
	Потенціометричний	Спектрофотометричний	Розрахунковий
pK_{a1}	3,5	—	3,0
pK_{a2}	9,8	9,2	9,2

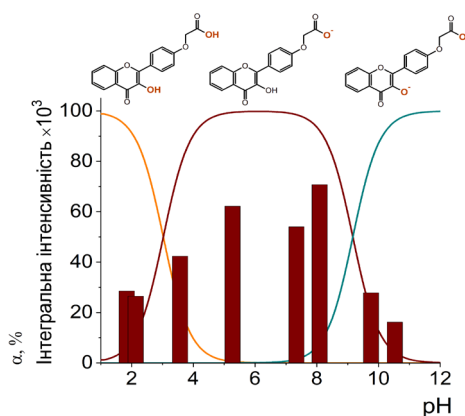


Рис. 2. Діаграма розподілу протолітичних форм F4O (криві) і інтегральна інтенсивність світіння F4O за різних рН (стовпчики). Діаграма розподілу протолітичних форм побудована за допомогою програмного пакета Marvin 20.9.0 (ChemAxon). $C_{\text{F4O}} = 2,0$ мкмоль/л

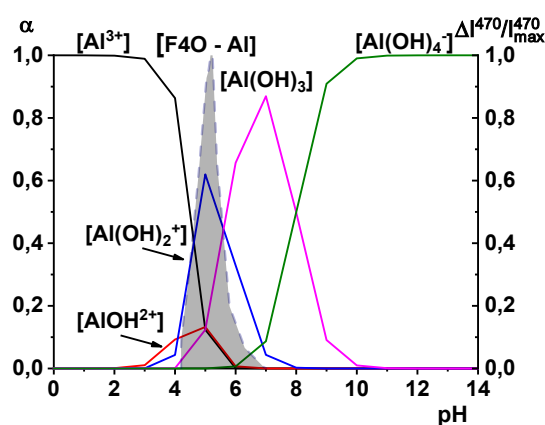


Рис. 3. Діаграма розподілу гідроксокомплексів алюмінію та нормована залежність інтенсивності флуоресценції комплексу F4O-Al від рН середовища. $C_{\text{F4O}} = 5,0$ мкмоль/л, $C_{\text{Al(III)}} = 10,0$ мкмоль/л

Стехіометрію і стійкість комплексу F4O з Al(III) за оптимального pH розчину встановлювали відповідно методами ізомольної серії та Бенесі – Гільдебранда. Отримана діаграма ізомольної серії вказує на утворення комплексної сполуки зі стехіометричним співвідношенням компонентів 1:1 (рис. 4).

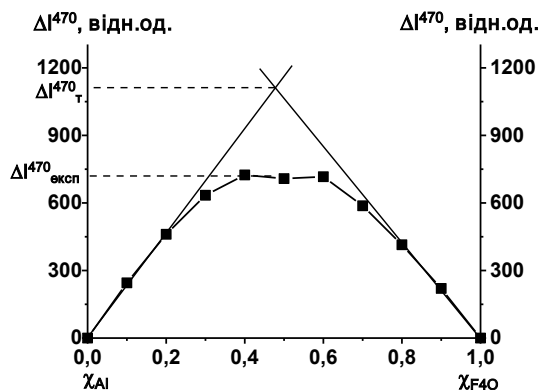


Рис. 4. Діаграма ізомольної серії для системи F4O-Al. $C_{i.c.} = 6,7$ мкмоль/л, pH 5,18, $\lambda_{ex} = 405$ нм, χ – мольна частка

Унаслідок побудови графічної залежності інтенсивності флуоресценції комплексу від концентрації іонів алюмінію в координатах Бенесі – Гільдебранда, отримали пряму (рис. 5), що описується рівнянням регресії: $\frac{1}{I-I_{min}} = (1,29 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} + (1,51 \pm 0,02) \cdot 10^{-8} \cdot \frac{1}{C_{Al(III)}}$, л/моль, $R^2 = 0,999$.

З отриманого рівняння розраховували умовну константу стійкості комплексу, яка становить $6,44 \cdot 10^4$ л/моль.

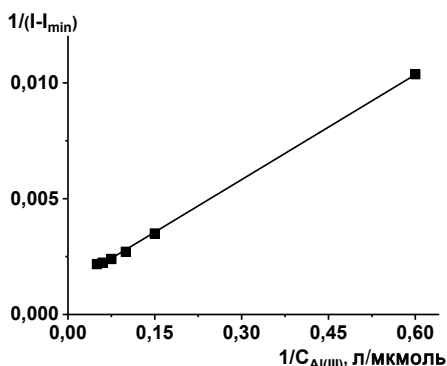


Рис. 5. Інтенсивність флуоресценції комплексу F4O-Al залежно від концентрації іонів Al³⁺ у координатах рівняння Бенесі – Гільдебранда. $C_{F4O} = 4,0$ мкмоль/л, pH 5,15, $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{max} = 470$ нм, $l = 1,0$ см

Взаємодія комплексу F4O-Al(III) з аніонами. Взаємодію комплексу F4O-Al з аніонами вивчали на прикладі цитрат-аніонів. У присутності цитрату спостерігалось істотне гасіння світіння комплексу (рис. 6). Так, уже за концентрації цитрату в розчині 0,6 мкмоль/л, інтенсивність флуоресценції знижувалась майже на 90 % (рис. 7).

Крива гасіння флуоресценції комплексу F4O-Al цитрат-іонами лінеаризується в координатах модифікованого рівняння Штерна – Фольмера (рис. 8). Отримана пряма описується рівнянням регресії:

$$\frac{I_0}{\Delta I} = (1,00 \pm 0,06) + (2,05 \pm 0,05) \cdot 10^{-7} \cdot \frac{1}{C_{Cit}}, \text{ л/мкмоль}, R^2 = 0,997.$$

Константа гасіння флуоресценції (K_{ms-v}) комплексу F4O-Al цитрат-аніонами, розрахована з наведеного вище рівняння, становить $4,88 \cdot 10^6$ л/моль.

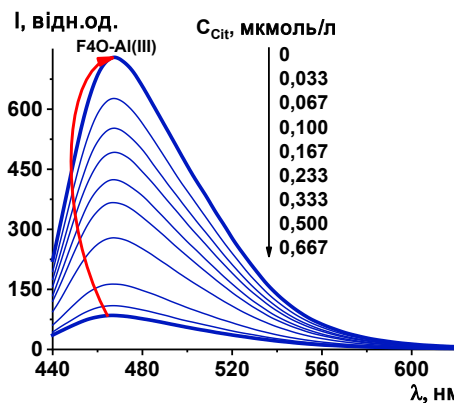


Рис. 6. Спектри флуоресценції комплексу F4O-Al за різної концентрації цитрат-іонів. $C_{F4O} = 10,0$ мкмоль/л, $C_{Al(III)} = 1,0$ мкмоль/л, $\lambda_{ex} = 405$ нм, pH 5,18

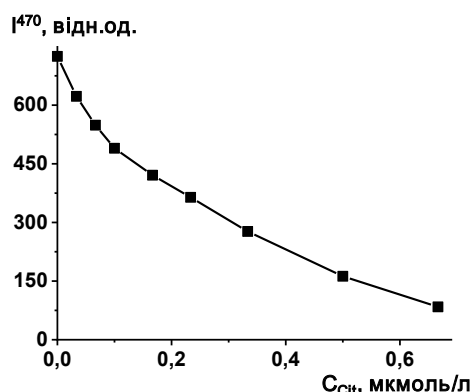


Рис. 7. Інтенсивність флуоресценції комплексу F4O-Al залежно від концентрації цитрат-іонів у розчині. $C_{F4O} = 10$ мкмоль/л, $C_{Al(III)} = 1,0$ мкмоль/л, $\lambda_{ex} = 405$ нм, pH 5,18, $l = 1,0$ см

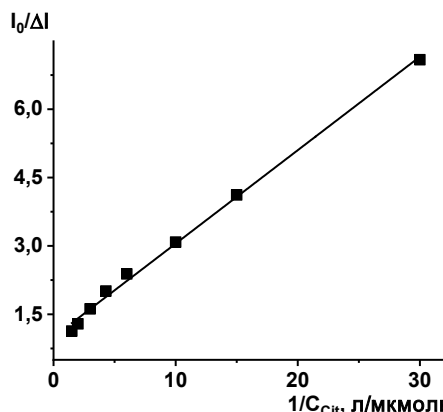
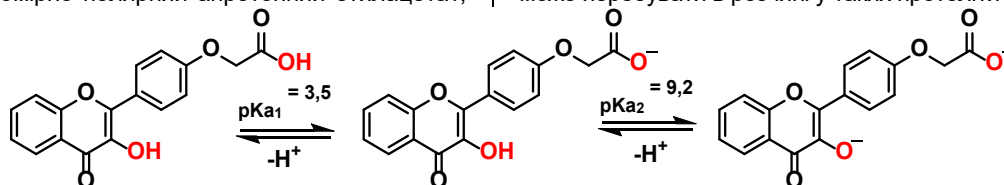


Рис. 8. Гасіння флуоресценції комплексу F4O-Al залежно від концентрації цитрат-іонів у координатах модифікованого рівняння Штерна – Фольмера. $C_{F4O} = 10$ мкмоль/л, $C_{Al(III)} = 1,0$ мкмоль/л, $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{max} = 470$ нм, pH 5,18, $l = 1,0$ см

Дискусія і висновки

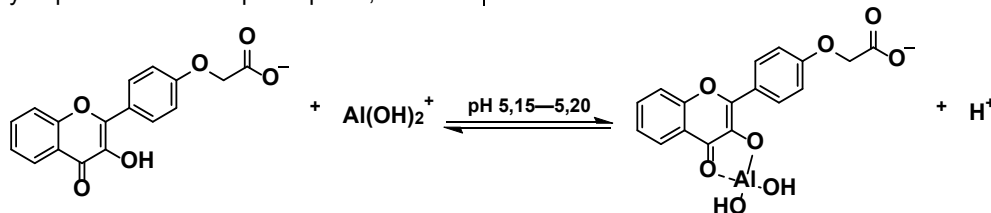
Досліджуваний 4'-карбоксиметоксифлавонол характеризується інтенсивною флуоресценцією як у протонних, так і в апротонних розчинниках. Завдяки здатності до перенесення протона в межах 3-гідрокси-4-кето функціонального угруповання, у збудженому стані молекула F4O може існувати у двох таутомерних формах – N* і T*. Як наслідок, у спектрі флуоресценції спостерігаються дві смуги, що відповідають емісії кожної з таутомерних форм.

Справді, для розчинів F4O у середньо полярних апротонних ДМСО і ацетонітрилі спектри флуоресценції містять дві смуги (табл. 1). Для водного розчину й розчину в етил-ацетаті у спектрах флуоресценції присутня лише одна смуга. Водночас вода, як сильно полярний протонний розчинник, пригнічує процес ESIPT внаслідок утворення водневих зв'язків між молекулами F4O і води, краще стабілізує збуджену N*-форму F4O (смуга з максимумом при 450 nm). Помірно полярний апротонний етилацетат,



Для оцінювання флуоресцентних властивостей окремих протолітичних форм F4O отримані результати щодо впливу pH на інтенсивність флуоресценції порівняли з розподілом протолітичних форм сполуки (рис. 2). Найвища інтегральна інтенсивність флуоресценції досягається за pH 7,8, за якого F4O перебуває в розчині переважно у формі моноаніона.

Як уже зазначалось, взаємодія Al(III) з 4'-карбоксиметоксифлавоном у водних розчинах супроводжується значним посиленням інтенсивності свічення. Оптимальне значення pH для комплексоутворення розміщується в межах 5,15–5,20. Згідно з діаграмою ізомольної серії (рис. 4), за цих умов у розчині утворюється комплекс найпростішої стехіометрії (F4O:Al = 1:1), який, зважаючи на форму отриманої ізомольної кривої, можна



Можливість застосування комплексу F4O-Al як флуоресцентного зонда для визначення аніонів продемонстровано на прикладі його взаємодії з цитратом натрію. Ефект гасіння свічення комплексу у присутності цитрат-іонів можна використати для кількісного їхнього визначення. Крива гасіння флуоресценції лінеаризується в координатах модифікованого рівняння Штерна – Фольмера. Межа виявлення цитрат-іонів досягає 0,02 мкмоль/л. Гасіння свічення у присутності цитрату ймовірно спричинене руйнуванням комплексу Al(III) з F4O внаслідок утворення комплексу Al(III) з цитратом і вивільненням флавонолу.

Отже, комплекс "4'-карбоксиметоксифлавонол – Al(III)" може бути перспективним для визначення аніонів, зокрема цитрат-іонів, у різноманітних об'єктах за ефектом гасіння флуоресценції. Флуоресцентний зонд на основі такого комплексу може бути корисним для визначення аніонів у біологічних рідинах, пробах природних поверхневих вод, для контролю технологічних процесів і продукції фармацевтичної, харчової промисловості.

Внесок авторів: Любов Коршенко – формальний аналіз, валідація даних, написання (оригінальна чернетка); Ростислав Лінник – концептуалізація, написання (перегляд і редагування).

Подяки. Автори висловлюють щиру подяку д-ру хім. наук, проф. кафедри органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка Василю Пивоваренку та його науковій групі за наданий для досліджень

навіпаки, стабілізує T*-форму (смуга з максимумом при 535 nm). Це можна використати для розробки на основі F4O флуоресцентного зонда, чутливого до мікрооточення. Окрім цього, описане явище зумовлює значний Стоксов зсув у F4O (понад 180 nm), що є особливо цінним для біохімічних досліджень і біомедичної візуалізації.

Згідно з установленими значеннями констант дисоціації гідроксильної і карбоксильної груп, залежно від pH, F4O може перебувати у таких протолітичних формах:

розглядати як комплекс середньої стійкості. Умовна константа стійкості комплексу, розрахована за методом Бенесі – Гільдебранда, становить $6,44 \cdot 10^4$ л/моль. Лінійність отриманої залежності (рис. 5) свідчить про утворення в розчині комплексної сполуки зі співвідношенням компонентів 1:1, що додатково підтверджує результат, отриманий на основі діаграми ізомольної серії.

Беручи до уваги те, що при pH 5,15–5,20 іони алюмінію перебувають у розчині у формі $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, F4O існує у формі моноаніона, а також, спираючись на дані літератури щодо регіоселективності утворення комплексних сполук 3-гідроксифлавонів з іонами металів (Roshal, 2023), можна зробити припущення про ймовірну будову комплексу F4O-Al:

4'-карбоксиметоксифлавонол, допомогу в інтерпретації отриманих результатів і участь у їхньому обговоренні.

Джерела фінансування. Це дослідження не отримало гранту від установ у публічному, комерційному або некомерційному секторах. Фінансування здійснювалось Київським національним університетом імені Тараса Шевченка за програмою підготовки доктора філософії.

Список використаних джерел

- Альберт, А., & Сергент, Е. (1964). *Константы ионизации кислот и оснований*. Химия.
- Бабко, А. К. (1955). *Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах*. АН УССР.
- Коршенко, Л. І., Замотаєв, О. М., Лінник, Р. П., & Пивоваренко, В. Г. (2024). Флуоресцентний зонд на основі 4'-карбоксиметоксифлавонолу: хіміко-аналітичні властивості та застосування. *Сучасні проблеми хімії* (с. 13). Київський національний університет імені Тараса Шевченка. <https://conf.chem.knu.ua/arhiv/tezu/2024/all.pdf>
- Лурье, Ю. Ю. (1989). *Справочник по аналитической химии*. 6-е изд. Химия.
- De Souza, R. F. V., & De Giovanni, W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.1179/135100004225003897>
- Demas, J. N., & DeGraff, B. A. (1997). Applications of Luminescent Transition Metal Complexes to Sensor Technology and Molecular Probes. *Journal of Chemical Education*, 74(6), 690. <https://doi.org/10.1021/ed074p690>
- Du, W., Jia, C., Zhang, Y., Chen, Q., Wang, Y., Huang, Y., & Zhang, Q. (2018). A Sc-3-HF complex as a fluorescent chemosensor for the selective detection of dihydrogen phosphate. *Analytical Methods*, 10(17), 1993–1998. <https://doi.org/10.1039/c8ay00048d>
- Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Advances*, 5(39), 30989–31003. <https://doi.org/10.1039/c4ra15453c>

- Gong, S., Qin, A., Zhang, Y., Li, M., Liang, Y., Xu, X., Wang, Z., & Wang, S. (2022). A novel flavonol-based fluorescent probe for rapid detection of Cysteine in food samples and its applications in bioimaging systems. *Microchemical Journal*, 183, 108034. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108034>
- Huang, Q., Wang, T., & Xiao, N. (2020). Selective monitoring ATP using a fluorogenic Al(III)-probe complex in aqueous medium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 117946. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117946>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lou, X., Ou, D., Li, Q., & Li, Z. (2012). An indirect approach for anion detection: the displacement strategy and its application. *Chemical Communications*, 48(68), 8462. <https://doi.org/10.1039/c2cc33158f>
- Protti, S., Mezzetti, A., Lapouge, C., & Cornard, J.-P. (2008). Photochemistry of metal complexes of 3-hydroxyflavone: towards a better understanding of the influence of solar light on the metal-soil organic matter interactions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(1), 109–119. <https://doi.org/10.1039/b709682h>
- Pyrzyska, K., & Pekał, A. (2011). Flavonoids as Analytical Reagents. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41(4), 335–345. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.607077>
- Qin, T., Liu, B., Xu, Z., Yao, G., Xu, H., & Zhao, C. (2021). Flavonol-based small-molecule fluorescent probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 336, 129718. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129718>
- Radu, C., Olteanu A.A., Aramă C.C., Uivarosî V. (2024). Hydroxyflavone complexes with biogenic and abiogenic metals. *Farmacia*, 72(4), 751–764. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.4.3>
- Roshal, A. D. (2023). Complexation of Flavonoids: Spectral Phenomena, Regioselectivity, Interplay with Charge and Proton Transfer. *The Chemical Record*, e202300249. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300249>
- Sathish, S., Narayan, G., Rao, N., & Janardhana, C. (2006). A Self-Organized Ensemble of Fluorescent 3-Hydroxyflavone-Al (III) Complex as Sensor for Fluoride and Acetate Ions. *Journal of Fluorescence*, 17(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10895-006-0137-1>
- Sengupta, P. K. (2017). Pharmacologically Active Plant Flavonols as Proton Transfer Based Multiparametric Fluorescence Probes Targeting Biomolecules: Perspectives and Prospects. *Reviews in Fluorescence* 2016, 45–70. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48260-6_4
- Tong, C., Shi, F., Tong, X., Shi, S., Ali, I., & Guo, Y. (2021). Shining natural flavonols in sensing and bioimaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116222>
- Wang, R., & Yu, Z. (2007). Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 23(9), 1353–1359. [https://doi.org/10.1016/s1872-1508\(07\)60071-0](https://doi.org/10.1016/s1872-1508(07)60071-0)
- Zamotaiev, O. M., Postupalenko, V. Y., Shvadchak, V. V., Pivovarenko, V. G., Klymchenko, A. S., & Mély, Y. (2011). Improved Hydration-Sensitive Dual-Fluorescence Labels For Monitoring Peptide–Nucleic Acid Interactions. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 101–107. <https://doi.org/10.1021/bc100434d>
- Zhao, X., Li, X., Liang, S., Dong, X., & Zhang, Z. (2021). 3-Hydroxyflavone derivatives: promising scaffolds for fluorescent imaging in cells. *RSC Advances*, 11(46), 28851–28862. <https://doi.org/10.1039/d1ra04767a>
- Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Advances*, 5(39), 30989–31003. <https://doi.org/10.1039/c4ra15453c>
- Gong, S., Qin, A., Zhang, Y., Li, M., Liang, Y., Xu, X., Wang, Z., & Wang, S. (2022). A novel flavonol-based fluorescent probe for rapid detection of Cysteine in food samples and its applications in bioimaging systems. *Microchemical Journal*, 183, 108034. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108034>
- Huang, Q., Wang, T., & Xiao, N. (2020). Selective monitoring ATP using a fluorogenic Al(III)-probe complex in aqueous medium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 117946. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117946>
- Korshenko, L. I., Zamotaiev, O. M., Linnik R. P., & Pyvovarenko V. G. (2024). Fluorescent probe based on 4'-carboxymethoxyflavonol: chemical-analytical properties and application. *Modern Chemistry Problems* (p. 13). Taras Shevchenko National University of Kyiv. <https://conf.chem.knu.ua/arhiv/tezu/2024/all.pdf>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lou, X., Ou, D., Li, Q., & Li, Z. (2012). An indirect approach for anion detection: the displacement strategy and its application. *Chemical Communications*, 48(68), 8462. <https://doi.org/10.1039/c2cc33158f>
- Lurie, Y. Y. (1989). *Handbook of Analytical Chemistry*. 6th ed. Khimiya.
- Protti, S., Mezzetti, A., Lapouge, C., & Cornard, J.-P. (2008). Photochemistry of metal complexes of 3-hydroxyflavone: towards a better understanding of the influence of solar light on the metal-soil organic matter interactions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(1), 109–119. <https://doi.org/10.1039/b709682h>
- Pyrzyska, K., & Pekał, A. (2011). Flavonoids as Analytical Reagents. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41(4), 335–345. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.607077>
- Qin, T., Liu, B., Xu, Z., Yao, G., Xu, H., & Zhao, C. (2021). Flavonol-based small-molecule fluorescent probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 336, 129718. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129718>
- Radu, C., Olteanu A.A., Aramă C.C., & Uivarosî V. (2024). Hydroxyflavone complexes with biogenic and abiogenic metals. *Farmacia*, 72(4), 751–764. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.4.3>
- Roshal, A. D. (2023). Complexation of Flavonoids: Spectral Phenomena, Regioselectivity, Interplay with Charge and Proton Transfer. *The Chemical Record*, e202300249. <https://doi.org/10.1002/tcr.202300249>
- Sathish, S., Narayan, G., Rao, N., & Janardhana, C. (2006). A Self-Organized Ensemble of Fluorescent 3-Hydroxyflavone-Al (III) Complex as Sensor for Fluoride and Acetate Ions. *Journal of Fluorescence*, 17(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10895-006-0137-1>
- Sengupta, P. K. (2017). Pharmacologically Active Plant Flavonols as Proton Transfer Based Multiparametric Fluorescence Probes Targeting Biomolecules: Perspectives and Prospects. *Reviews in Fluorescence* 2016, 45–70. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48260-6_4
- Tong, C., Shi, F., Tong, X., Shi, S., Ali, I., & Guo, Y. (2021). Shining natural flavonols in sensing and bioimaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116222>
- Wang, R., & Yu, Z. (2007). Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 23(9), 1353–1359. [https://doi.org/10.1016/s1872-1508\(07\)60071-0](https://doi.org/10.1016/s1872-1508(07)60071-0)
- Zamotaiev, O. M., Postupalenko, V. Y., Shvadchak, V. V., Pivovarenko, V. G., Klymchenko, A. S., & Mély, Y. (2011). Improved Hydration-Sensitive Dual-Fluorescence Labels For Monitoring Peptide–Nucleic Acid Interactions. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 101–107. <https://doi.org/10.1021/bc100434d>
- Zhao, X., Li, X., Liang, S., Dong, X., & Zhang, Z. (2021). 3-Hydroxyflavone derivatives: promising scaffolds for fluorescent imaging in cells. *RSC Advances*, 11(46), 28851–28862. <https://doi.org/10.1039/d1ra04767a>

References

- Albert, A., & Sergeant, E. (1964). *Ionization constants of acids and bases*. Khimiya.
- Babko, A. K. (1955). *Physicochemical Analysis of Complex Compounds in Solutions*. Academy of Sciences of the Ukrainian SSR.
- de Souza, R. F. V., & De Giovani, W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.1179/135100004225003897>
- Demas, J. N., & DeGraff, B. A. (1997). Applications of Luminescent Transition Metal Complexes to Sensor Technology and Molecular Probes. *Journal of Chemical Education*, 74(6), 690. <https://doi.org/10.1021/ed074p690>
- Du, W., Jia, C., Zhang, Y., Chen, Q., Wang, Y., Huang, Y., & Zhang, Q. (2018). A Sc–3-HF complex as a fluorescent chemosensor for the selective detection of dihydrogen phosphate. *Analytical Methods*, 10(17), 1993–1998. <https://doi.org/10.1039/c8ay00048d>

Liubov KORSHENKO, PhD Student
 ORCID ID: 0009-0007-7047-3515
 e-mail: liubov_korshenko@knu.ua
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Rostyslav LINNIK, PhD (Chem.), Senior Researcher
 ORCID ID: 0000-0002-6401-8184
 e-mail: rostyslavlinnik@knu.ua
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CHEMICAL-ANALYTICAL PROPERTIES OF A FLUORESCENT PROBE BASED ON ALUMINIUM(III) COMPLEX WITH 4'-CARBOXYMETHOXYFLAVONOL

Background. Fluorescence spectroscopy is a highly sensitive analytical method that is successfully used in biochemical and medical research, for environmental objects analysis, in the pharmaceutical and food industries. For the determination of substances without their own fluorescence, various fluorescent probes sensitive to metal cations, inorganic and organic ions, and biomacromolecules have been proposed.

3-Hydroxyflavones and their transition metal complexes are actively used for creating new fluorescent probes. The effective use of such complexes in analysis requires a comprehensive study of their chemical and analytical properties, clarification of the complex formation mechanism, and the influence of metal ions on phenomena inherent in 3-hydroxyflavones, such as intramolecular charge and proton transfer. This work presents the results of a study of the optimal conditions for the formation of a Al(III) with 2-[4-(3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenoxy]acetic acid (F4O) complex, its stoichiometric composition, stability, fluorescent properties, and the possibility of its use as an optical probe for anion detection.

M e t h o d s . *The spectral characteristics of F4O in different solvents, its protolytic properties, the features of its complex formation with Al(III) ions, and the possibility of using the complex for the fluorescent determination of citrate anions were investigated using spectrofluorimetric and spectrophotometric methods. The pH values of the solutions were measured by the potentiometric method using a combined glass electrode.*

R e s u l t s . *The interaction between Al(III) and F4O is accompanied by a significant increase in fluorescence intensity. In aqueous solutions, the optimal pH value for the formation of the F4O-Al complex is in the range of 5.15–5.20. In these conditions, in the solution, a complex with the simplest stoichiometry and medium stability forms. The conditional stability constant of the complex, determined by the Benesi – Hildebrand method, is $6,44 \cdot 10^4$ L/mol. In the presence of citrate anions, the luminescence intensity of the complex decreases. The corresponding fluorescence quenching curve is linearized in the coordinates of the modified Stern-Volmer equation. The quenching constant is $4,88 \cdot 10^6$ L/mol.*

C o n c l u s i o n s . *The optimal conditions for the formation and the main chemical-analytical characteristics of the Al(III) complex with F4O were investigated. Using citrate anions as an example, it was shown that the F4O-Al complex can be promising as an "On-Off" fluorescent probe for the determination of anions in aqueous solutions. The quenching of luminescence in the presence of citrate is probably due to the destruction of the Al(III) complex with 4'-carboxymethoxyflavonol as a result of the anion binding to the metal.*

K e y w o r d s : *3-hydroxyflavone, complex formation, fluorimetry, anions determination, ESIPT, keto-enol tautomerism.*

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.