

*Aleksandrs Pučkins, Anita Ruža
Daugavpils Universitāte, Latvija*

FLUORESCENTIE SENSORI VIDES EKOĻOGISKAJĀ MONITORINGĀ

Abstract

Today the pollution of environment by metals ions (particularly heavy metal pollution) is very important problem. Therefore current attention has been devoted to development of new sensitive methods for detection of these substances.

It is known that complexation of metal ions with fluorescent compound can affect fluorescence parameters of this compound, what has allowed to assume that change in intensity of fluorescence can be used for heavy metal detection purposes.

Fluorescent sensors are molecular systems consisting of a receptor moiety and of a fluorogenic fragment, which are capable of recognizing a given analyte and signaling recognition through a variation of the emission intensity.

Fluorescent sensors are nowadays growing in popularity in many branches of science. They are applicable in medicine, chemistry and biology. However, it is worth continuing their synthesizing as each sphere of their application needs particular unique qualities of these sensors. At the moment, there is a demand for new stuffs with marked luminescent and special qualities (solubility, stability, toxicity etc.).

Application of efficient methods of fluorescent sensors will facilitate the research related to ecology and biotechnology problems.

Atslēgas vārdi: Fluorescentās metodes, ekoloģiskais monitorings, fluorescentie sensori, luminiscence, smagie metāli.

Ievads

Fluorescentās metodes mūsdienās atrod arvien plašāku pielietojumu daudzās zinātnes un medicīnas jomās, pateicoties to lietošanas ērtībai, jūtībai un vienkāršībai. Liels pieprasījums ir pēc jaunām vielām ar izteiktām luminescentām un specifiskām (šķīdība, stabilitāte, jūtība u.c.) īpašībām. Fluorescējošo vielu klāsts ik pēc laika tiek papildināts ar virkni jaunu fluoroforu, kam ir uzlabotas funkcionālās īpašības (piemēram, intensīvāka luminiscence, lielāka fotostabilitāte, zemāks citotoksiskums utt.). Efektīvu fluorescento sensoru metožu pielietošana turpmāk veicinās vides ekoloģiskā monitoringa un biotehnoloģiju problēmu padziļinātu izpēti. Vides ekoloģiskajā monitoringā ir prioritāri izstrādāt jaunus sensorus ar iespējami zemāku toksiskumu, lai novērstu negatīvo ietekmi uz dzīvajiem organismiem.

Sensoru klasifikācija

Starp fluorescentajiem sensoriem visvairāk izplatīti jonofluorofori, bet starp tiem – sensori priekš dažādiem katjoniem. Visbūtiskākā nozīme fluorescentajiem sensoriem vides kvalitātes monitoringā ir smago metālu jonu konstatēšanai dabas ūdeņos.

Fluorescentos sensorus metālu katjonu noteikšanai var iedalīt piecos tipos:

- 1) Organiskās molekulas, kuras fluorescē ar metāla jona palīdzību;
- 2) Metālorganiskie kompleksi, kuros fluorescē metāls, kas atrodas kompleksa sastāvā;

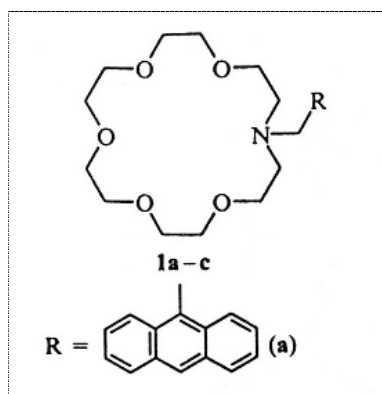
- 3) Metālorganiskie kompleksi, kuri fluorescē pēc cita metāla jonu iedarbības;
- 4) Komplekss no divām organiskām vielām, kurš maina fluorescences intensitāti atkarībā no metālu iedarbības;
- 5) Organiskās molekulas, kurās metāla kompleksēšana izsauc fluorescences dzesēšanu (Брень 2001: 1153).

Pirmo četru grupu pārstāvji darbojas tādā veidā, ka katjonu klātbūtne izsauc fluorescences intensitātes pastiprināšanos. Pretēji, piektās grupas pārstāvjos katjonu klātbūtne veicina to dabiskās fluorescences intensitātes pavājināšanos.

Fluorescentie sensori metālu katjoniem

1. Azakraun-ēteri

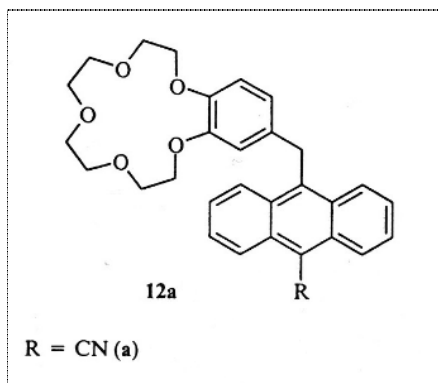
Hemosensori, kuros par receptoriem ir kraun-ēteri. Azakraun-ēteri - visizplatītākais sensoru tips metālu katjoniem. Ar šo sensoru palīdzību iespējams detektēt, piemēram, Hg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} un Cu^{2+} katjonus. Viens no vienkāršākajiem šī tipa pārstāvjiem ir savienojums 1a (De Silva 1986: 1709) (skat. 1. att.).



1. attēls. Viens no azakraun-ēteru sensoru pārstāvjiem.

2. Kraun-ēteri

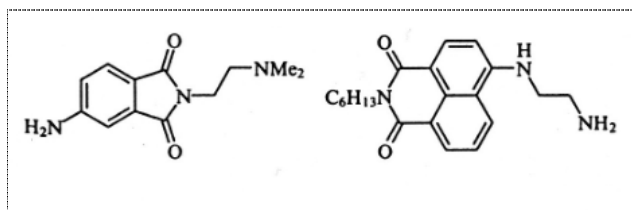
Sensori, kuri detektē Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} katjonus. Šīs grupas sensors – benzokraun-ēteris (skat. 2. att.) – viens no pirmajiem tika piedāvāts kā sensors nātrija jonu detektēšanai (De Silva 1991: 421).



2. attēls. Benzokraun-ēteris (De Silva 1991: 422).

3. Sensori ar poliamīnu receptoriem (skat. 3. att.)

Detektē Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} katjonus.

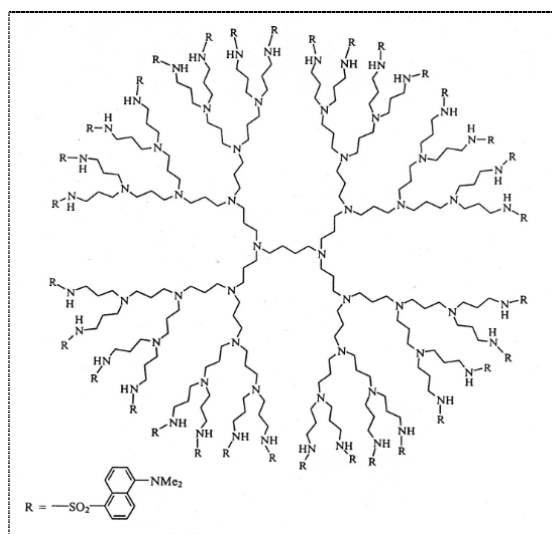


3. attēls. Sensori ar poliamīnu receptoriem (Mitchell 1998: 157).

4. Tetraaminoalkil-trīsdimensiju sensori

Plakniskās konfigurācijas hemosensori, kas satur funkcionālus aizvietotājus, kuri fiksē katjonu vai citu substrātu ārpus plaknes.

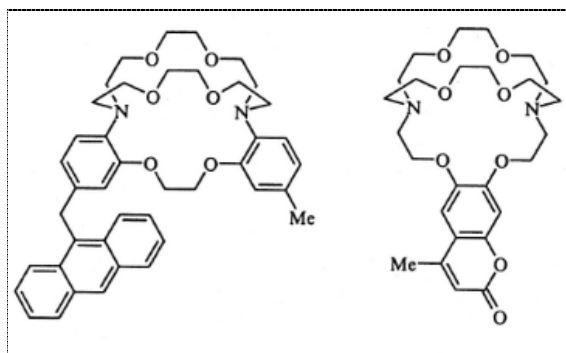
Detektē Cu^{2+} , Co^{2+} (skat. 4. att.), Zn^{2+} , Cd^{2+} katjonus.



4. attēls. Dendrimērs, kuru izmanto kobalta (II) katjonu noteikšanai (Balzani 2000: 853).

5. Kriptandi (skat. 5. att.)

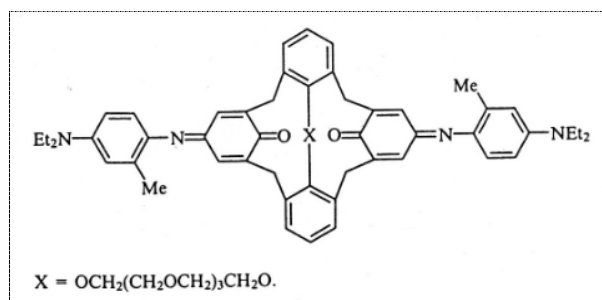
Detektē Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} katjonus. Kriptandi – sensori ar paaugstinātu receptoru spēju (Lehn 1995: 120).



5. attēls. Kriptandu pārstāvji (De Silva 1990: 5193).

6. Kalikсарēni (skat. 6. att.)

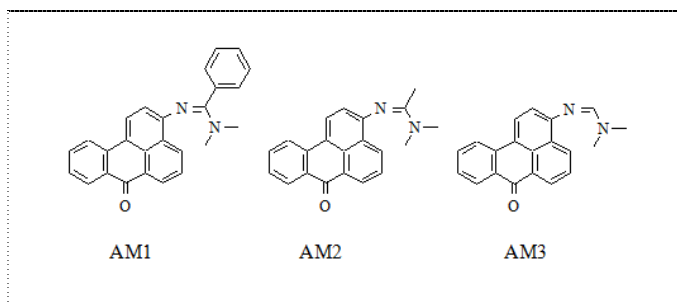
Detektē: Cs⁺, Li⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ katjonus.



6. attēls. Kaliks[4]kraun-ēteris (He 1999: 1329).

7. N,N-aizvietotie 3-amidinobenzantroni

Pašlaik ESF projekta („Starpdisciplinārās zinātniskās grupas izveidošana jaunu fluorescentu materiālu un metožu izstrādei un ieviešanai”) ietvaros tiek izstrādāta jaunu fluorescento sensoru grupa, kuru potenciāli iespējams pielāgot vides monitoringa mērķiem, konkrētāk, smago metālu jonu noteikšanai. Jaunie N,N-aizvietotie 3-amidinobenzantrona atvasinājumi (skat. 7. att.), kas satur amidinogrupu ar brīvajiem elektroniem un spēj veidot kompleksus ar smago metālu katjoniem.



7. attēls. Dažu N,N-aizvietoto 3-amidinobenzantrona atvasinājumu struktūrformulas.

Materiāli un metodes

N,N-aizvietoto 3-amidinobenzantronu sintēze

Organiskie fluorofori (amidīni AM1, AM2) tiek iegūti pēc metodikas, kura aprakstīta darbā „Synthesis and Study of N,N-Substituted 3-Amidinobenzanthrones” (Kirilova 2009: 20-21).

Spektrofluorimetriskie pētījumi

Lai uzņemtu fluorescences spektrus ūdens vidē, tika izmantots spektrofluorimetrs „Signe” ar izšķirtspēju 1 nm (spektrālais diapazons no 400 līdz 800 nm).

Kvarca ķīvetē (1x1 cm) tika ielieti 4 ml darba šķīduma. Apstarojot paraugu ar noteikta garuma ierosināšanas vilni, spektrofluorimetrs pakāpeniski fiksē fluorescences intensitātes izmaiņas šķīdumā pie konkrētā viļņa garuma.

Spektrofluorimetrisko metožu grupas priekšrocības:

- Metode ir ļoti jūtīga (atsevišķos gadījumos var detektēt pat dažas pētāmā objekta molekulas);
- Eksperimenti nav dārgi, ir vienkārši izpildījumā;
- Luminiscences spektri asi reaģē ne tikai uz sensorvielu un pētāmas vielas strukturālajām izmaiņām, bet arī uz ārējiem apstākļiem.

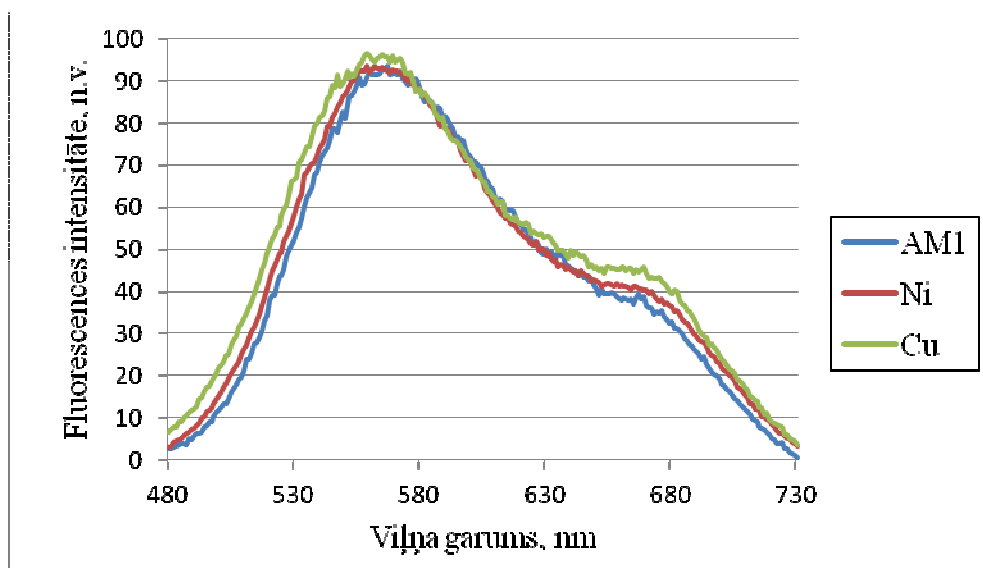
Rezultāti un analīze

Darbs tika veikts tieši ar šiem sensoriem to ķīmiskās uzbūves dēļ. Fluorofori satur amidinogrupu ar brīvajiem elektroniem, un potenciāli spēj kompleksēt smago metālu katjonus. Šiem sensoriem piemīt selektivitāte - sintezētas vielas nereaģēs, piemēram, ar *s*-metālu pārstāvjiem (Na^+ , K^+), jo tiem nav *d*-orbitāļu, kuras parasti piedalās donora-akceptoru saišu veidošanā. Eksperimentu gaitā tika konstatēts, ka sintezētie fluorofori vislabāk veido kompleksus ar t.s. „pārējās” metāliem (pie kuriem pieder arī lielākā smago metālu daļa), kuriem parādās brīvie valentie elektroni *d*- un *f*-orbitālēs (*d*- un *f*-metāli).

- **AM1**

Pētījumu laikā tika iegūti dažādi šķīdumu fluorescences intensitātes spektri, atkarībā no ierosinošās gaismas viļņa garuma (425 un 480 nm).

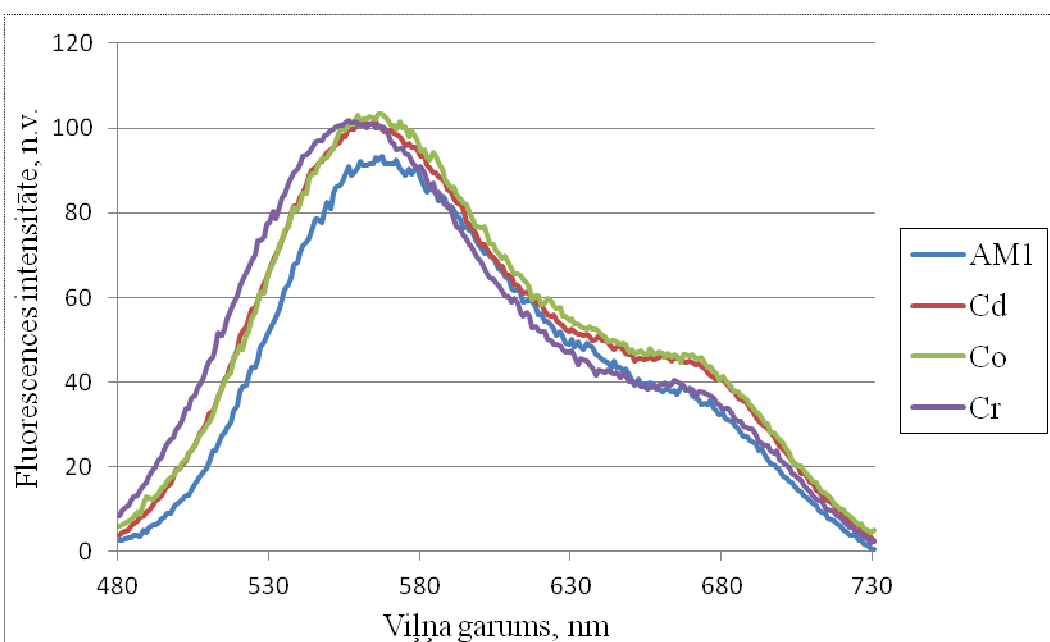
Apstarojot šķīdumus ar 425 nm garo gaismas viļni, tika noskaidrots, ka vismazākās izmaiņas fluorescences intensitātē izraisa niķeļa (II) un vara (II) joni (skat. 8. att.). Tie izraisa nelielu fluorescences pastiprināšanu pie 580 nm (intensitātes pieaugums ne vairāk kā uz 2%). Tika konstatētas arī nelielas hipsohromās nobīdes (5-10 nm).



8. attēls. AM1 fluorescences spektri Ni^{2+} un Cu^{2+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

Lielāko ietekmi atstāj kadmija (II), hroma (III) un kobalta (II) jonu klātbūtne (skat. 9. att.). Visi šie smagie metāli izraisa amidīna AM1 šķīduma fluorescences pastiprināšanu,

pastiprinot intensitāti uz 10-12 vienībām (10-12%). Pēc hroma (III) jonu pievienošanas konstatēta hipsohromā nobīde uz 10 nm. Ar citu šķīdumu spektriem nobīdes nav konstatētas.



9. attēls. AM1 fluorescences spektri Cd^{2+} , Co^{2+} un Cr^{3+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

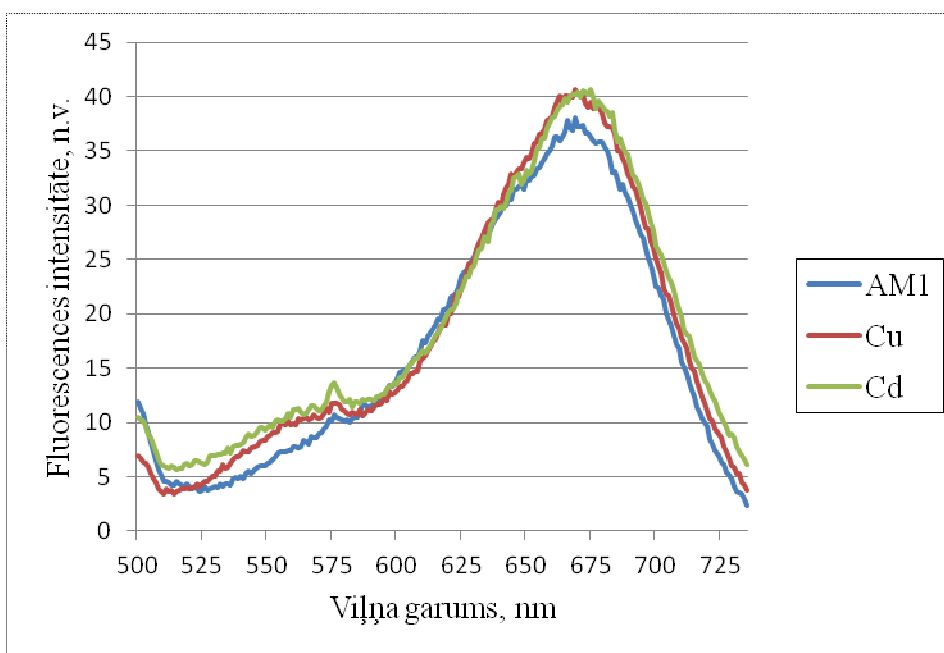
Tātad var secināt, ka amidīna AM1 izmantošana smago metālu jonu noteikšanai ūdens vidē ar izvēlēto ierosinošās gaismas viļņa garumu ir diezgan apgrūtināta līdzīgo spektru dēļ.

Tā kā pētījumi ar 425 nm garo ierosināšanas vilni nedeva reprezentatīvus rezultātus, tika nolemts atkārtot fluorometriskus mērījumus ar amidīnu AM1 ar 480 nm garo ierosināšanas vilni.

Tika konstatēts, ka ierosinošā viļņa garuma maiņa ietekmē fluorescences intensitātes sadalījumu. Mainot ierosinošā viļņa garumu, tika konstatēts, ka amidīnam AM1 raksturīgi divi fluorescences intensitātes maksimumi (pie 560 un 670 nm). Viena vai otra maksimuma dominēšana ir tieši atkarīga no ierosinošā viļņa garuma. Ja apstarot amidīna AM1 un smago metālu šķīdumus ar 425 nm garo ierosināšanas vilni, tad fluorescences intensitātes maksimālas vērtības koncentrēsies pie 560 nm, bet ja viļņa garums būs 480 nm – pie 670 nm.

Tika konstatētas arī izmaiņas fluorescences intensitātē. Apstarojot amidīnu AM1 ar 480 nm garo ierosināšanas vilni, fluorescences intensitāte samazinājās vairāk nekā divas reizes (skat. 10. att.).

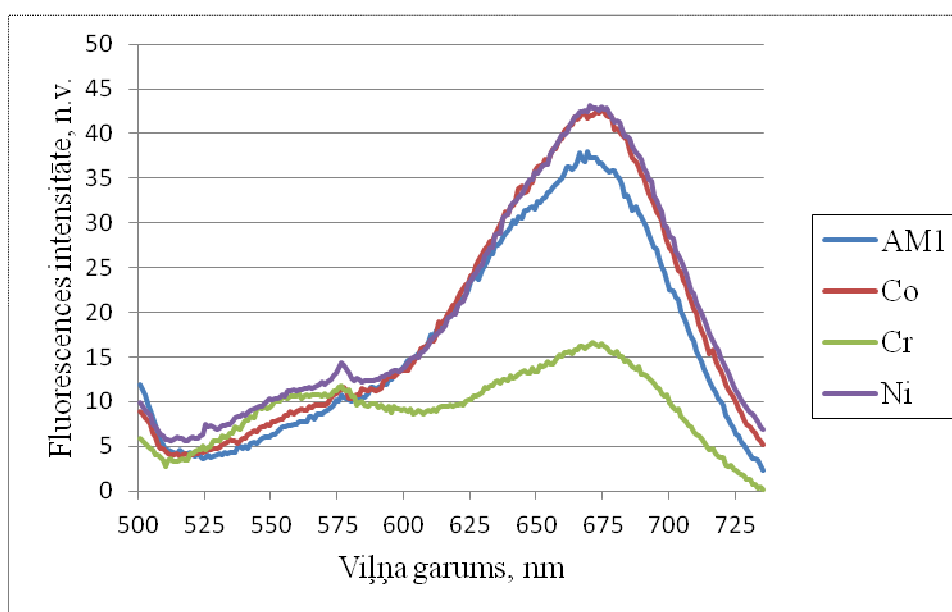
Šajā gadījumā visvājākās izmaiņas AM1 šķīduma fluorescences intensitātē izraisīja vara (II) un kadmija (II) jonu pievienošanās (skat. 10. att.). Tika konstatēta fluorescences intensitātes pastiprināšanās uz 4-5 vienībām. Gadījumā ar kadmija (II) joniem tika novērota neliela spektra batohromā nobīde (apmēram 5 nm).



10. attēls. AM1 fluorescences spektri Cd^{2+} un Cu^{2+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

Kobalta (II) un niķeļa (II) joni izraisa nedaudz intensīvāku fluorescences pastiprināšanu (skat. 11. att.) – intensitāte pastiprinās vidēji uz 15%. Abos šķīdumos konstatētas minimālās spektru hipsohromās nobīdes (5-10 nm). Neskatoties uz to, ka kobalta (II) un niķeļa (II) jonu pievienošanās pie amidīna AM1 šķīduma izraisa vairāk izteiktu fluorescences intensitātes pastiprināšanu (salīdzinājumā ar kadmija (II) un vara (II) joniem), to atpazīšana būs diezgan apgrūtināta sakarā ar fluorescences spektru tuvumu (pārāk līdzīgas intensitātes izmaiņas).

Visperspektīvākā amidīna AM1 izmantošana var būt saistīta ar hroma (III) jonu detektēšanu ūdens vidē. Hroma jonu klātbūtne izraisa spēcīgu fluorescences dzēšanu – konstatēta fluorescences intensitātes samazināšanās vairāk nekā uz 50% (skat. 11. att.).



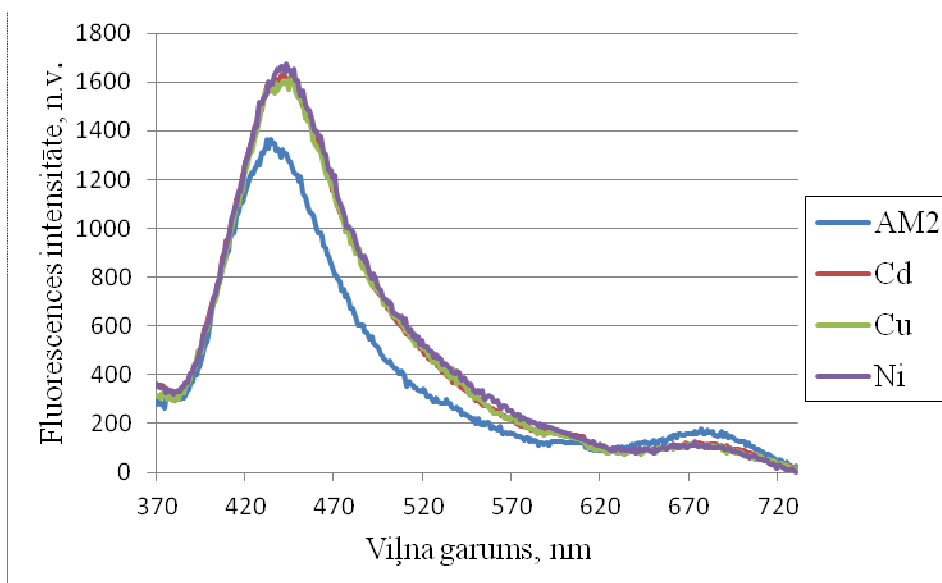
11. attēls. AM1 fluorescences spektri Cr^{3+} , Co^{2+} un Ni^{2+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

- **AM2**

Amidīna AM2 fluorescences spektri tika iegūti, apstarojot šķīdumus ar 300 nm garo ierosināšanas viļni.

Amidīna AM2 šķīdumam kadmija (II), vara (II) un niķeļa (II) jonu klātbūtnē konstatētas gandrīz identiskas izmaiņas. Šīs izmaiņas pie dotā ierosinošā viļņa garuma nedos nekādas iespējas precīzi identificēt augstāk minētos smagos metālus ūdens paraugos, tā kā fluorescences spektri atrodas pārāk tuvu viens otram un tos ir praktiski neiespējami atšķirt (skat. 12. att.).

Visos gadījumos tika konstatēta fluorescences intensitātes pastiprināšana (intensitātes pieaugums uz 20%). Tika konstatētas arī nelielas spektru batohromās nobīdes (20-25 nm).

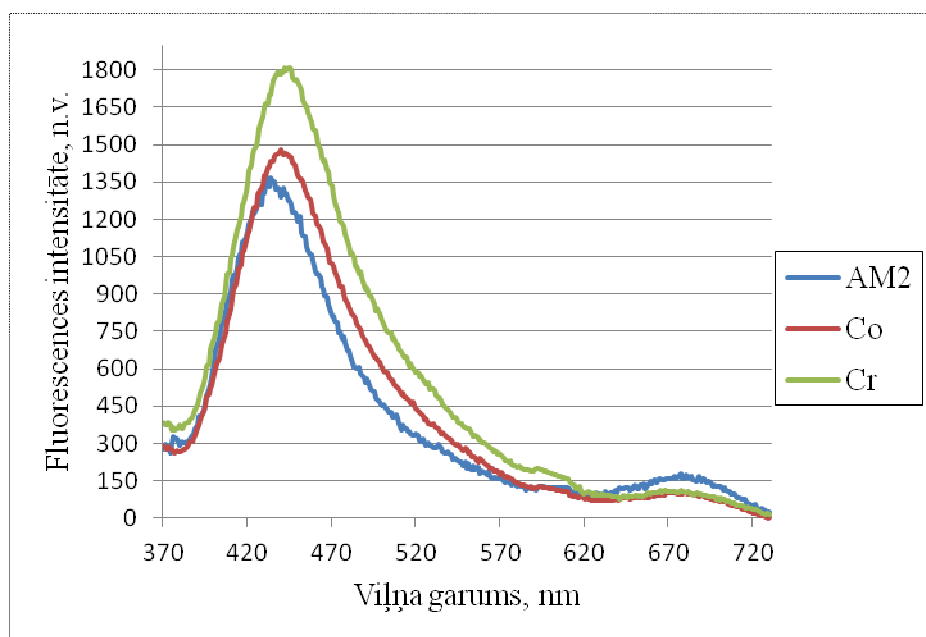


12. attēls. AM2 fluorescences spektri Cd^{2+} , Cu^{2+} un Ni^{2+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

Pavisam atšķirīgus rezultātus var iegūt, uzņemot AM2 fluorescences spektrus ar hroma (III) un kobalta (II) joniem (skat. 13. att.). Kobalta (II) jonu klātbūtnē AM2 ūdens šķīdumā izraisa relatīvi vāju fluorescences pastiprināšanu (vājāku nekā gadījumos ar kadmija (II), vara (II) un niķeļa (II) joniem) – intensitāte pastiprinās tikai uz 8%.

Visperspektīvākais virziens (tāpat kā ar amidīnu AM1) ir AM2 izmantošana trīsvērtīgā hroma detektēšanai. Hroma jonu klātbūtnē AM2 ūdens šķīdumā izraisa diezgan stipru fluorescences intensitātes pastiprināšanu (fluorescence pastiprinājās uz 33%).

Abiem šķīdumiem konstatētas spektru batohromās nobīdes uz 20-25 nm (skat. 13. att.).



13. attēls. AM2 fluorescences spektri Co^{2+} un Cr^{3+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē; 10^{-5} M).

Visiem AM2 spektriem pēc sīkākas izpētes tika konstatētas arī otrās fluorescences intensitātes maksimumu koncentrēšanās vietas (pie 670 nm), kuras var mēģināt aktivizēt, mainot ierosināšanas viļņa garumu.

Zinātniskajā literatūrā šo parādību piedāvāts izmantot kā papildus instrumentu smago metālu noteikšanai, salīdzinot fluorescences intensitāšu lielumu attiecības.

Uz amidīna AM2 šķīdumu spektru piemēra tika aprēķināta matemātiskā likumsakarība starp fluorescences intensitātēm pie 430 nm un 670 nm. Tika iegūti sekojošie rezultāti:

	I_{430}	I_{670}	I_{430}/I_{670}
Co^{2+}	1377,24	100,387	13,7193
Cu^{2+}	1531,38	115,36	13,2748
Ni^{2+}	1525,98	113,095	13,4929
Cr^{3+}	1650,64	105,71	15,6148
Cd^{2+}	1527,15	115,013	13,2781

Tātad, var redzēt, ka hroma jonu detektēšanai var izmantot ne tikai šķīdumu fluorescences intensitāšu izmaiņas pie 430 nm (maksimālas vērtības), bet arī savstarpējas izmaiņas starp diviem maksimumu sakopojumiem. Šo parādību zinātniskajā literatūrā tiek piedāvāts izmantot, piemēram, Co^{2+} un K^+ jonu noteikšanai (Wang 2009: 557-561).

- **Kvantitatīva analīze**

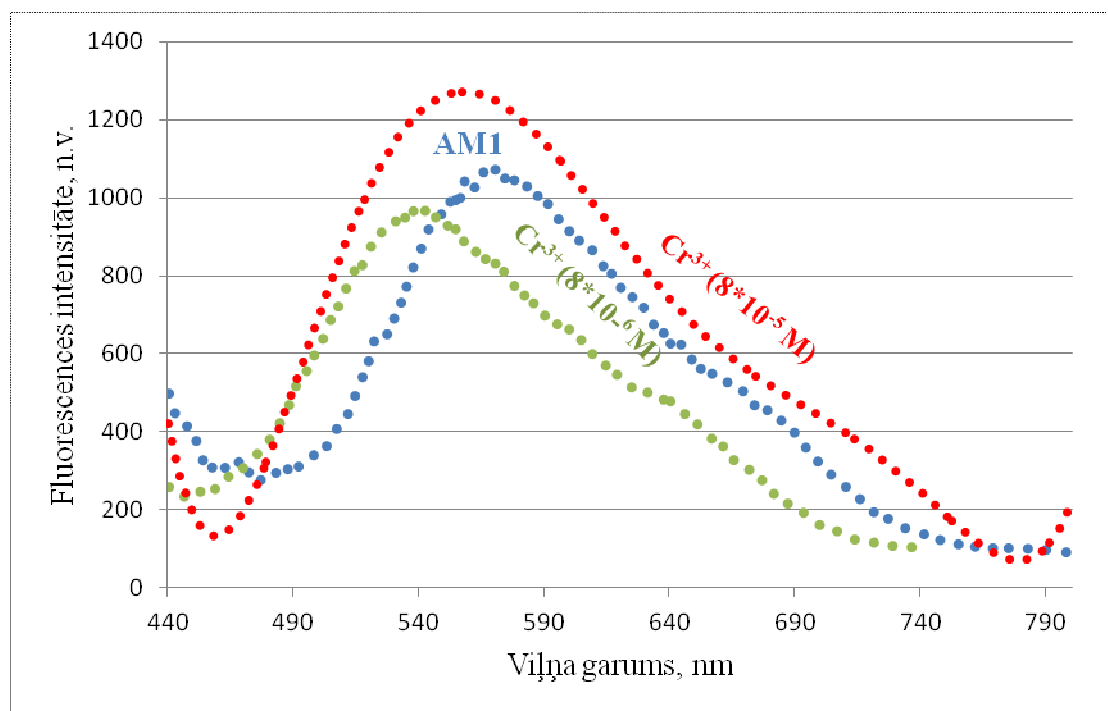
Spektrofluorometrisko pētījumu laikā tika izvirzīta hipotēze, ka amidīnus AM1 un AM2 var izmantot ne tikai kvalitatīvai, bet arī kvantitatīvai smago metālu noteikšanai. Lai

apliecinātu vai apgāztu izvirzīto hipotēzi, tika atkārtoti spektrofluorimetriskie mērījumi ar smago metālu, kurš šī pētījuma etapā tika atzīst par visperspektīvāko metālu detektēšanai – ar trīsvērtīgo hromu.

Lai pārbaudītu hipotēzi, tika izmantoti sagatavotie amidīnu un trīsvērtīgā hroma sāls šķīdumi ar dažādām koncentrācijām ($8 \cdot 10^{-5}$ M un $8 \cdot 10^{-6}$ M).

Apstarojot amidīna AM1 un smago metālu sāls šķīdumus ar 425 nm garo ierosināšanas vilni, tika iegūti sekojoši rezultāti: samazinot smago metālu jonu koncentrāciju, pavājinās arī fluorescences intensitāte (skat. 14. att.). Ar smago metālu jonu koncentrāciju 10^{-5} pakāpē šķīdumam piemīt izteikta fluorescences pastiprināšana, bet ar koncentrāciju 10^{-6} pakāpē - otrādi, novērojama intensitātes dzēšana.

Līdz ar fluorescences pavājināšanu, notiek arī vairāk izteiktā spektru hipsohromā nobīde. Salīdzinot intensitāšu vērtības, var konstatēt, ka smago metālu jonu koncentrācijas samazināšana desmit reizes, pavājināja fluorescenci uz 30% (skat. 14. att.).



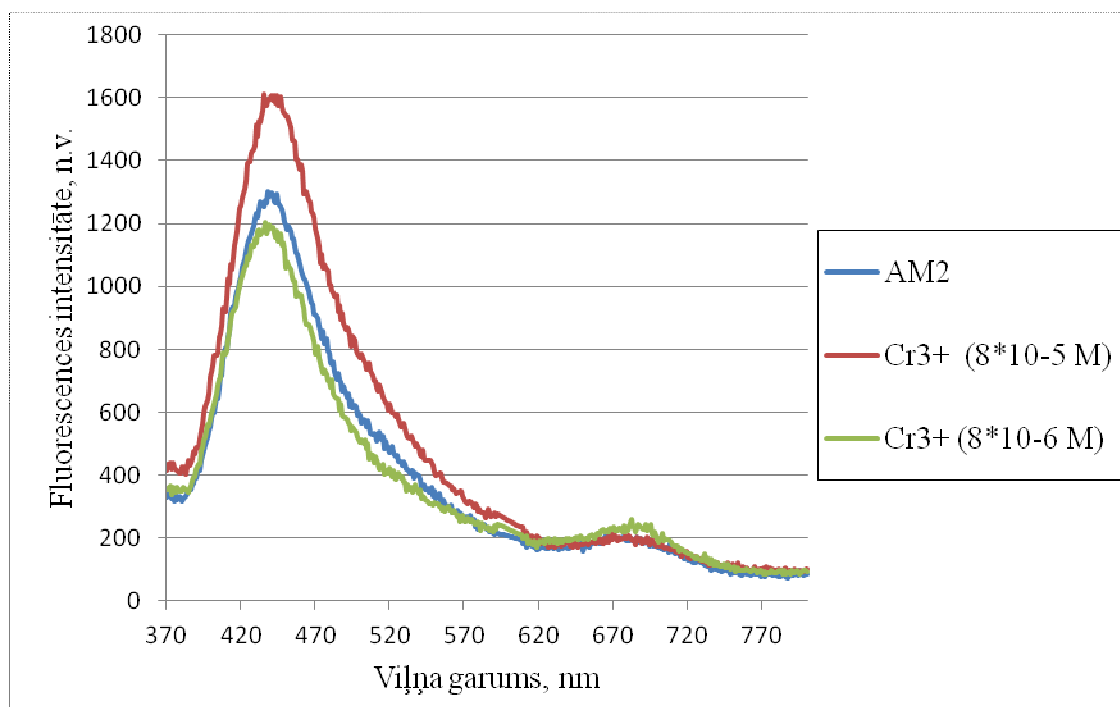
14. attēls. AM1 fluorescences spektri Cr³⁺ jonu klātbūtnē (ūdens vidē).

Atšķirībā no amidīna AM1, AM2 šķīdumus apstaro ar 300 nm garo ierosināšanas vilni, bet mērījumos tomēr tika konstatētas līdzīgas likumsakarības.

Smago metālu jonu koncentrācijas samazināšana izraisa fluorescences dzēšanu (kā salīdzinājumā ar tīro AM2, tā arī salīdzinājumā ar šķīdumu ar lielāku jonu koncentrāciju) (skat. 15 att.). Smago metālu jonu koncentrācijas samazināšana desmit reizes (no $8 \cdot 10^{-5}$ M līdz $8 \cdot 10^{-6}$ M) pavājināja fluorescences intensitāti uz 37% (skat. 15. att.).

Pēc smago metālu sāls šķīdumu pieliešanas AM2 šķīdumā, abos gadījumos konstatētas niecīgas batohromās nobīdes (5-10 nm) (skat. 15. att.).

Pie viļņa garuma 670-680 nm atkal konstatēts otrs potenciālais fluorescences intensitāšu maksimumu sakopojums (skat. 15. att.). To var mēģināt aktivēt, mainot ierosināšanas viļņa garumu uz, piemēram, 480 nm. Pie esošā ierosināšanas viļņa garuma intensitāšu maksimumu centrs atrodas pie 440-460 nm (skat. 15. att.).



15. attēls. AM2 fluorescences spektri Cr^{3+} jonu klātbūtnē (ūdens vidē).

Apkopojot iegūto informāciju var apgalvot, ka iegūtos amidīnus var izmantot kā kvalitatīvai, tā arī kvantitatīvai (robežās no $8 \cdot 10^{-5}$ M līdz $8 \cdot 10^{-6}$ M) smago metālu noteikšanai.

Secinājumi

1. Pēc spektrofluorometrisko pētījumu rezultātiem var secināt, ka N,N-aizvietoto 3-amidinobenzantrona atvasinājumus var izmantot dažu smago metālu noteikšanai.
2. Šo organisko fluoroforu fluorescences izmaiņas smago metālu klātbūtnē var izmantot smago metālu noteikšanai.
3. Ar jauno sensoru palīdzību var veikt kvalitatīvo smago metālu noteikšanu.
4. Ar jauno N,N-aizvietoto 3-amidinobenzantrona atvasinājumu palīdzību var veikt kvantitatīvo smago metālu noteikšanu koncentrāciju robežās no $8 \cdot 10^{-5}$ M līdz $8 \cdot 10^{-6}$ M.
5. Pētījumu gaitā iegūtie dati liecina par sensoru pielietošanas efektivitāti un perspektivitāti. Visperspektīvākais pielietošanas virziens – trīsvērtīgā hroma jonu noteikšana ūdens vidē.

Bibliogrāfija

1. Balzani, V., Ceroni, P., Gestermann, S., Kauffmann, C., Gorka, M., Vögtle, F. (2000) Dendrimers as fluorescent sensors with signal amplification. *Chemical Communications*, Nr.20: 853-854.
2. De Silva, A.P., De Silva, S.A. (1986) Fluorescent signalling crown ethers - switching on' of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ. *Chemical Communications*, Nr.20: 1709-1710.
3. De Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N., Sandanayake, K.R.A.S. (1990) A new benzo-annulated cryptand and a derivative with alkali cation-sensitive fluorescence. *Tetrahedron Letters*, Nr.31: 5193.
4. De Silva, A.P., Sandanayake, K.R.A.S. (1991) Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors for alkali cations: optimization of sensor action by variation of structure and solvent. *Tetrahedron Letters*, Nr.32: 421-423.
5. He, Y.-B., Huang, H., Meng, L.-Z., Wu, C.-T., Yu, T.-X. (1999) New Calix[4]crown Diacylamides with Fluorescent Response to Complexation with Metal Ions. *Chemistry Letters*, Nr.12: 1329-1330.
6. Kirilova, E.M., Belyakov, S.V., Kalnina, I. (2009) Synthesis and Study of N,N-Substituted 3-Amidinobenzanthrones. *Topics in Chemistry & Materials Science*, Nr.3: 19-28.
7. Lehn, J.M. (1995) *Supramolecular Chemistry*. New York: Wiley-VCH, Weinheim.
8. Mitchell, K.A., Brown, R.G., Dongwu, Y., Chang, S.-C., Utecht, R.E., Lewis, D.E. (1998) A fluorescent sensor for Cu²⁺ at the sub-ppm level. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Nr.115: 157.
9. Wang, X., Zheng, W., Lin, H., Liu, G. (2009) A New Fluorescent Chemosensor Detecting Co²⁺ and K⁺ in DMF Buffered Solution. *Journal of Fluorescence*, Nr. 20: 557-561.
10. Брень В.А. (2001) Флуоресцентные и фотохромные хемосенсоры. *Успехи химии*, № 70: 1152-1174.