

Ім'я користувача:
приховано налаштуваннями конфіденційності

ID перевірки:
1015048406

Дата перевірки:
12.05.2023 11:07:55 EEST

Тип перевірки:
Doc vs Internet

Дата звіту:
12.05.2023 11:09:06 EEST

ID користувача:
100010447

Назва документа: Плагіат_магістерська Чонтош - копия

Кількість сторінок: 54 Кількість слів: 8633 Кількість символів: 62294 Розмір файлу: 1.69 MB ID файлу: 1014735562

5.15% Схожість

Найбільша схожість: 2.7% з Інтернет-джерелом (<https://www.uzhnu.edu.ua/uk/infocentre/get/8877>)

5.15% Джерела з Інтернету

327

Сторінка 56

Пошук збігів з Бібліотекою не проводився

0% Цитат

Вилучення цитат вимкнене

Вилучення списку бібліографічних посилань вимкнене

0% Вилучень

Немає вилучених джерел

Модифікації

Виявлено модифікації тексту. Детальна інформація доступна в онлайн-звіті.

Замінені символи

28

ВСТУП

Актуальність роботи. Аналітична сенсорика має тривалу історію розвитку від використання природніх речовин для визначення вмісту деяких сполук чи іонів, індикаторних папірців та трубок до електричних пристроїв, у яких відгук обробляється і вимірюється.

Згідно [1] Сенсор - це пристрій, який вибірково реагує на конкретний хімічний об'єкт за рахунок проходження хімічної реакції і який можна використати для якісного та кількісного визначення аналіту.. Сучасні хемосенсори об'єднують найрізноманітніші принципи роботи та одержання сигналу: від вже класичних naked-eye та on-off до повністю інтегрованих та автоматизованих інтернет-систем.

Хімічні сенсори застосовуються в різних галузях промисловості, моніторингу навколишнього середовища, медицині та діагностиці. І хоча деякі з них пережили вже століття досліджень та понад 50 років використання, викликом у сучасній аналітичній хімії залишається пошук та дослідження нових сполук – молекулярних чи молекулярно-розмірних сенсорів, здатних селективно реагувати з аналітом.

Зважаючи на основні напрямки розвитку хімічної сенсорики [2] та значне зацікавлення у сфері прогнозування та дослідження властивостей гетерофункціональних сполук, як сенсорів-мультитаскерів, що при зміні деяких умов можуть використовуватися для різних аналітів, поєднання існуючих, давно відомих реагентів в одну сенсорну молекулу є перспективною сферою для а пошук нових та модифікація існуючих реагентів є *актуальним завданням* аналітичної хімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження проводилось у відповідності з науково-дослідною тематикою кафедри аналітичної хімії ДВНЗ «Ужгородський національний університет».

Мета та завдання досліджень. Метою роботи є систематичне дослідження протолітичних та спектрофотометричних характеристик 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату, а також з'ясування можливості його аналітичного застосування як молекулярного сенсора.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати такі завдання:

- 1) синтезувати азопохідне 8-гідроксихіноліну та 3-амінофенілборної кислоти;
- 2) дослідити структуру синтезованої сполуки;
- 3) провести скрінінгове дослідження взаємодії молекули барвника із потенційними аналітами із числа катіонів металів та органічних аналітів різної природи;
- 4) оцінити придатність цих реакцій для аналітичного застосування.

Об'єкт дослідження: 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату як молекулярно-розмірний сенсор.

Предмет дослідження: спектрофотометричні та протолітичні властивості 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату а також його аналітичні характеристики.

Методи дослідження: УВ-вид спектрофотометрія, ІЧ-, ЯМР-спектроскопія, рідинна хромато-мас спектроскопія, ДТА, ДТГ, XPS, крапельні реакції.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше визначено протолітичні властивості 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату та межі існування деяких його форм у середовищі різних буферів. Вперше проведено скрінінг реакційної здатності до комплексоутворення реагенту із катіонами металів. Показано, аналітичний сигнал характерний для реакцій із Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ . Встановлено оптимальні умови безекстракційного визначення Ni^{2+} із використанням синтезованого реагенту.

Практичне значення отриманих результатів. Поєднання двох різних за природою аналітичних груп атомів у одній молекулі дозволяє спростити процедури аналізу методами спектрофотометрії шляхом регулювання властивостей аналітичної форми.

Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, синтезі барвника та дослідженнях його протолітичних та спектрофотометричних властивостей, скрінінгу потенційних аналітів, та розробці безекстракційної методики визначення нікелю. Інтерпретація експериментальних даних виконані здобувачем особисто та у співпраці з науковим керівником.

Апробація результатів.

Основні результати роботи доповідались на щорічних наукових студентських конференціях ДВНЗ «УжНУ» 2019-2022 рр.

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано тези доповідей на українській конференції:

1. Чонтош Т.О., Фершал М.В. Дослідження протолітичних властивостей 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату. Програма і тези доповідей Підсумкової студентської конференції ДВНЗ «Ужгородський національний університет», секція «Хімічних наук та екології» (26 травня 2022 р.). – Ужгород: вид. «Говерла», 2022. с. 18-19.

2. М.В. Фершал, Т.О. Чонтош. Дослідження спектрофотометричних та протолітичних властивостей 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату. Збірка тез доповідей Київської конференції з аналітичної хімії: Сучасні тенденції 2022. Наукове видання. – К.: Інтерсервіс. –2022. с.113

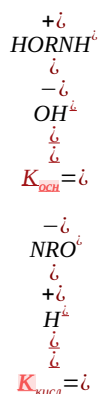
Структура та обсяг роботи. Дипломна робота магістра складається із вступу, трьох розділів, висновків, переліку використаних джерел (58 найменувань) та додатків.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. 8-Гідроксихінолін як аналітичний реагент

1.1.1. Загальна характеристика 8-гідроксихіноліну. 8-Гідроксихінолін (8-ГХ) – добре відомий аналітичний реагент, що застосовується в абсорбційній спектрофотометрії, екстракції і хроматографії. Його вважають наступним за важливістю хелатуючим агентом після ЕДТА. За звичайних умов це практично безбарвні, голкоподібні кристали з характерним запахом. Розчинні в хлороформі, спирті, ацетоні, деяких інших органічних розчинниках, а також кислотах та лугах, проте малорозчинний у воді та ефірах. Здатність до утворення 8-ГХ стабільних 5-членних комплексів, пояснюється особливістю будови сполуки – наявністю та розміщенням гідроксильної групи та гетероциклічного нірогену [3].

Завдяки вищезгаданим структурним елементам 8-ГХ також має здатність діяти як слабка основа і слабка кислота, що позначається і на розчинності 8-ГХ. Амфотерні властивості 8-ГХ виражають за допомогою відповідних констант (1), (2) [3]:



Широке застосування 8-оксихіноліну та його похідних в аналітичній хімії пояснюється наступним[4]:

- 1) більшість 8-оксихінолінатів мають строгий стехіометричний склад і тому можуть використовуватися в прямому гравіметричному аналізі;
- 2) металокомплекси, що мають хромофорну дію, забарвлені у різні кольори, а тим, що не мають такої властивості, притаманні різні відтінки

жовтого – це може бути використано для екстракційно-фотометричних методів аналізу;

3) вміст 8-оксихіноліну в осадах можна визначити титриметрично з використанням бромиду чи інших окисників.

Молекула 8-ГХ легко піддається модифікації, що робить її перспективним компонентом для одержання барвників різного складу, що можуть бути застосовані в хімічному аналізі для визначення металів з вищою селективністю, аніж у самого 8-ГХ. Однією з реакцій, що найбільш широко застосовується для синтезу нових сполук оксиду є реакція діазотування та подальше азосполучення, оскільки варіюючи склад азо- та діазоскладової можна одержати продукт з попередньо змодельованими властивостями, а проведення самої реакції легке в реалізації. Схему проведення наведено нижче.

Рис.1.1. Одержання азо-8-гідроксихінолінатів.

За останні десятиліття вченими досягнуто прогресу щодо чутливих властивостей флуоресцентних хемосенсорів із центром 8-ГХ для деяких іонів металів, а саме Fe^{3+} , Al^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pd^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} та K^+ та аніонів, такі як F^- , CN^- , тощо[].

1.1.2. Сучасне застосування 8-ГХ в аналітичній хімії. Похідні 8-ГХ як чутливі частини сенсорних систем дають можливість селективного визначення іонів металів, що мають фізіологічне значення, а саме: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} . Наприклад, у роботі [5] запропоновано використання ксантауренової кислоти (рис.1.2) як високочутливого, селективного реагенту для іонів калію, при чому визначенню не заважають іони натрію. Згідно із роботою, при додаванні в пробу K^+ відбувається різке збільшення інтенсивності флуоресценції при $\lambda=448$ нм.

Рис.1.2. Структурна формула ксантауренової кислоти при фізіологічному рН [5]/

У статті [6] описано синтез та можливості застосування похідного 8-ГХ для дослідження вмісту кобальту у водно-органічному середовищі. Як зазначається у роботі, селективне та чутливе виявлення іонів цього металу є дуже важливим, оскільки іони Co^{2+} відіграють вагомую роль у метаболізмі заліза, утворенні гемоглобіну та еритроцитів у людському організмі. Окрім цього метал застосовується у промисловості зарядних батарей та суперсплавів. Запропонована сполука проявила високу селективність реакції з Co^{2+} , утворюється забарвлена комплексна сполука з $\lambda_{\text{макс.}}=469$ нм.

Рис.1.3. Структурна формула колориметричного зонда для селективного виявлення Co^{2+} [6].

Деякі сполуки 8-ГХ придатні для аналізу токсичних металів. Так у [7] запропоновано 4 флуоресцентні хемодозиметри для високочутливого та вибіркового виявлення ртуті (див. табл. 1.1.). Дані зонди придатні для застосування як у водних розчинах, так і на тест-смужках.

Таблиця 1.1. Флуориметричні хемодозиметри для визначення Hg^{2+} [6].

Структурна формула хемодозиметра	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (нм)	Тип відгуку
	351/(506/428)	Ратіометрія
	350/496	Turn-on
	345/498	Turn-on
	357/500	Turn-on

Здатність сполук 8-ГХ утворювати з металами комплекси, що проявляють різні оптичні властивості, успішно застосована при моделюванні, синтезі та дослідженні нового 2-канального сенсору для іонів Hg^{2+} та Cu^{2+} [8]. Сполука проявляє флуоресценцію та червоний зсув від 463 до 490 нм при додаванні 10 мкМ Hg^{2+} , в той час як додавання Cu^{2+} спричиняло появу максимумів світлопоглинання при 307 нм та 390 нм з ізобестичною точкою при 340 нм. Механізм взаємодії між реагентом і відповідними металами показано на рис.1.4.

Рис.1.4. Механізм взаємодії 7-алілхінолін-8-олу з Cu^{2+} та Hg^{2+} [8].

Продовжуючи тему багатофункціональності похідних 8-ГХ варто згадати металорганічну сполуку цинку рамкової будови на основі 8-ГХ [9]. Розробники вбачають у ній перспективний сенсор для Fe^{3+} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ та нітроароматичних сполук. Взаємодія із аналітами супроводжується гасінням флюоресценції вихідної сполуки при збудженні з $\lambda=350\text{nm}$.

Відомо, що вода є забрудником органічних розчинників. Методи її виявлення в органічному середовищі мають низку недоліків, пов'язаних із складністю виконання, токсичністю реагентів, тощо, і тому все ще потребують вдосконалення. У роботі [10] пропонується два реагенти для високочутливого виявлення води в полярних органічних розчинниках. Принцип роботи базується на гасінні флуоресценції компонентів в різних розчинниках в присутності слідових кількостей води. Структурні формули згаданих похідних 8-ГХ наведені на рис. 1.5.

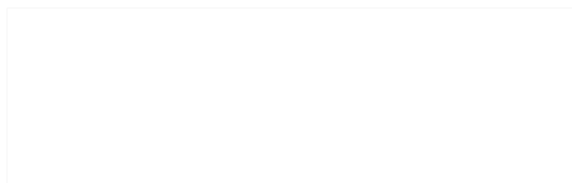


Рис.1.5. Структурні формули реагентів для флуориметричного виявлення слідів води в органічних розчинниках [10].

В останній час проявляють підвищену увагу до методів візуалізації біологічно активних речовин у середині клітин живих організмів. Так, Giovanna Faggugia та її колеги запропонували зонд [11], придатний для вивчення внутрішньоклітинної регуляції Mg^{2+} . Молекули, структурні формули яких вказано на рис.1.6, є проникними для клітин та проявляють флуоресценцію при зв'язуванні з Mg^{2+} , що не піддається впливу змін рН у фізіологічному діапазоні.

Рис.1.6. Структурна формула флуоресцентного зонду для внутрішньоклітинного виявлення Mg^{2+} [11] .

Ще одна робота, пов'язана із візуалізацією клітин та процесів, що в них відбуваються, запропонована у [12]. Синтезований ацилгідрозид 8-ГХ виявляє екзогенний NO в клітинах A549 (карцинома легень) і ендогенно генерований NO в RAW 264,7 клітинах. Хіноліновий флуорофор проявляє 28-кратну флуоресценцію при додаванні монооксиду нітрогену (див. рис.1.7), при цьому проявляючи низьку цитотоксичність та високу селективність.

Рис.1.7. Схема взаємодії між NO та ацилгідрозидом 8-ГХ[12].

Вплив деяких аніонів на протікання біологічних і хімічних процесів спровокував дослідження рецепторів та сенсорів для виявлення та визначення останніх.

Як найменший аніон, F^- володіє особливими хімічними властивостями та вимагає строгого підходу до його виявлення. Поширеність флуоридів у зубних пастах, використання при ортодонтичних лікуваннях та в стоматологічній профілактиці підсилює інтерес до пошуку нових чутливих та селективних сенсорів для цього іону.

У дослідженні [13] було запропоновано похідне 8-ГХ для колориметричного та флуоресцентного виявлення флуорид-іонів. Додавання F^- до розчину сполуки у ТГФ викликало значний червоний зсув до 363 і 410

10

нм разом із появою ізобестичної точки при 340 нм у спектрах світлопоглинання, що супроводжувалося зміною забарвлення з безбарвного на жовтувато-зелений. Датчик показував помірний рівень синьої флуоресценції при 403 нм, яка поступово зменшувалася, в той час як додавання різних кількостей флуоридів викликало появу нової смуги випромінювання при довжині хвилі 520 нм. Утворення нового водневого зв'язку OH-F^- (рис.1.8) було доведено за допомогою Н-ЯМР аналізу.

Рис.1.8. Схема утворення координаційної флуоресцентної сполуки з F^- [13].

Відомою аналітичною проблемою є виявлення у водних розчинах великих аніонів, схильних до сольватації, одним із яких є пірофосфат-іон (ПФІ). ПФІ, який утворюється в клітинних умовах внаслідок гідролізу АТФ, і відіграє важливу роль у енергетичному обміні через свою здатність впливати на метаболічні процеси було успішно виявлено у водних розчинах за допомогою сполуки, структурну формулу якої зображено на рис.1.9. [14]. Додавання F^- , Cl^- , Br^- , I^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , CH_3COO^- , NO_3^- , SO_4^{2-} не викликало значної зміни у спектрах випромінювання детектора.

Рис.1.9. Структурна формула флуоресцентного зонду для ПФІ [14].

Таким чином, аналітична хімія похідних 8-ГХ розвивається далеко поза рамками гравіметричного застосування для виявлення катіонів. Нові сполуки володіють значно вищою чутливістю та селективністю та відповідають тенденціям у напрямку спрощення проведення хімічного аналізу біологічних об'єктів.

1.1.3. Застосування похідних 8-ГХ в інших галузях. Реакція азосполучення з 8-ГХ активно застосовується не тільки в аналітичній хімії. Завдяки широкому спектру забарвлень та хорошій фарбувальній здатності щодо різних текстильних виробів азо-похідні 8-ГХ мають високий попит в області фарбників для тканин. У роботі [15] показано схему синтезу та основні властивості двох барвників: 5-(6-нітротолуолфенілазо)-8-гідроксихіноліну (світло-оранжевий колір) та 5-(4-хлорфенілазо)-8-гідроксихіноліну (темно-червоний). Структурні формули барвників зображено на рис. 1.10 а та б відповідно.

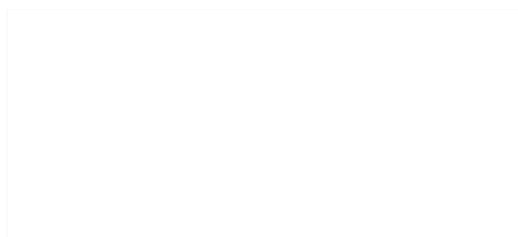


Рис.1.10. а - 5-(6-нітротолуолфенілазо)-8-гідроксихінолін, б - 5-(4-хлорфенілазо)-8-гідроксихінолін.

Відомо про застосування сполук 8-ГХ у медицині в якості протигрибкових та антибактеріальних препаратів, наприклад, нітросолін та кліюнол. Такі властивості пов'язують із здатністю 8-ГХ до комплексоутворення з металами, необхідними для життєдіяльності мікроорганізмів. Проте пошук нових протимікробних препаратів не припиняється через появу резистентності нових штамів. Продовжуються дослідження щодо впливу похідних 8-ГХ на клітини різних видів раку [16] та вірусів, зокрема COVID-19 [17].

Застосування деяких споріднених до 8-ГХ сполук в якості інгібіторів кислотної корозії різних сталей також показало свою ефективність в дослідженнях останніх десяти років. Групу арилсульфонових естерів проявили хорошу захисну дію щодо м'яких сталей [18]. Відповідні сульфонові ефіри 8-ГХ (рис. 1.11) синтезували за загальною методикою. 8-ГХ та його похідні є одними з найбільш широко застосовуваних органічних сполук для захисту від корозії металів у різних кислотах і нейтральних середовищах [19].

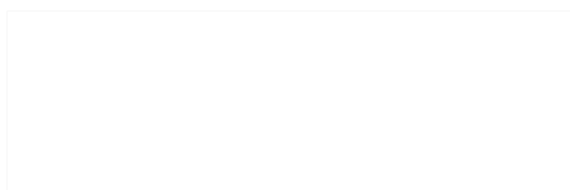


Рис.1.11. Схема синтезу арилсульфонових естерів 8-ГХ [19].

Таким чином, завдяки своїм аналітичним характеристикам та широкому використанні у інших галузях 8-ГХ та його похідні залишаються цікавими для вивчення, а велика кількість напрацювань у цьому полі дозволяє глибше зрозуміти властивості групи цих сполук.

1.2. Фенілборні кислоти як реагенти в аналітичній хімії

1.2.1. Боронові кислоти: історія, хімічні властивості та застосування. Боронові кислоти – сполуки, у яких тривалентний Бор зв'язаний із двома гідроксильними група та алкільним або арильним замісником, на відміну від свого карбонового аналогу, карбонових кислот, не зустрічаються у природі. Вперше їх синтезовано у 1860 році [20]. В літературі зустрічається класифікація їх як продукту оксигенації борвмісних органічних сполук серед багатьох інших (рис. 1.12). Боронові кислоти є твердими речовинами, що зазвичай існують у вигляді суміші олігомерів ангідридів – шестичленних бороксинів або у випадку фенілборонової кислоти (ФБК) – у вигляді димеру [21].

Рис.1.12. Боронові кислоти як продукти окиснення борвмісних органічних сполук.

Сукупність властивостей, характерних для боронових кислот як м'яких кислот Льюїса, разом із стабільністю робить цей клас важливим компонентом для органічного синтезу [22]. Серед найважливіших реакцій виділяють реакції перехресного приєднання (див. схему 1.1) [23] які застосовують для одержання біологічно активних компонентів, та реакцію із цукрами, поліолами [24] та амінокислотами, що мають сусідні донори-основи Льюїса, можливу завдяки кислотно-основним властивостям боронових кислот у водному середовищі схема 1.2.

14

Схема 1. 1

Схема 1. 2

Зважаючи на низьку токсичність боронові кислоти та їх похідні успішно застосовуються для цільової доставки ліків у організмі [25] та у якості біохемосенсорів для діагностування ракових захворювань, як антибактеріальні та противірусні агенти [26].

1.2.2. Особливості реакції із сахаридами та утворення боронатного естеру. Процес утворення боронатного естеру не є таким простим, як може видатися на перший погляд, та залежить від багатьох факторів, зокрема pK_a кислоти та діолу та рН середовища [27] . У роботі [28] досліджено вплив різних замісників на pK_a арилборонових кислот, деякі з них представлено у табл.1.2. Виявлено, що введення акцептора електронів спричиняло зниження значення pK_a , в той час як електродонорні замісники підвищували його, при чому вплив замісників є прогнозованим.

Таблиця 1.2. рК деяких фенілборонових кислот[28]

Фенілборонові кислоти	рК _a
2-метоксифенілборонова кислота	9,0
3-амінофенілборонова кислота	8,8
4-карбоксифенілборонова кислота	8,0
3-ацетилфенілборонова кислота	8,0
4-ацетилфенілборонова кислота	7,7
3-нітрофенілборонова кислота	7,1
2,4,5-трифлуорофенілборонова кислота	6,7
2-флуоро-5-нітрофенілборонова кислота	6,0

У згаданій роботі опубліковано результати дослідження впливу рН на утворення зв'язку між рядом арилборонових кислот та діолами. За попередніми уявленнями, критичним для утворення естерів було значення рН пов'язане із рК відповідної кислоти. Тобто при фізіологічних значеннях рН більш сильні боронові кислоти мали б краще зв'язуватися з аналітом [29]. Натомість, виявилось, що попередні припущення не завжди відповідають дійсності. Незважаючи на те, що 2,5-дифлуорофенілборонова кислота має вище значення рК_a, ніж 3,4,5-трифлуорофенілборонової кислоти, вона також має вищу константу зв'язування з глюкозою при рН=7,5 (47 проти 41). Ще більші розбіжності виявилися при проведенні аналогічного експерименту із фруктозою, що критично обговорено у роботі [28].

1.2.3. Застосування фенілборонових кислот у аналітичній хімії.

Фенілборонові кислоти, також відомі як арилборонові, завдяки своїй реакційній здатності та простоті модифікації шляхом введення замісників стали цінними лігандами для афінної хроматографії [27,29] та капілярного електрофорезу [30] для розділення цис-діольних речовин, включаючи нуклеїнові кислоти, катехоли, глікопротеїни, тощо, що в подальшому стало основою для застосування їх при діагностиці діабету, глікемії, різних видів раку.

Ці реагенти застосовується як у індивідуальному вигляді, так і у системах. Наприклад, у статті [31] опубліковано результати дослідження роботи емнісного (конденцаторного) біосенсора на основі модифікованого амінофенілбороною кислотою (АФБК) золотого електроду, ефективність застосування якого порівняно з деякими іншими відомими методами з використанням боронових кислот представлені у табл.1.3 та роботі [31].

Таблиця 1.3. Використання АФБК у сенсорах

Принцип застосування	Метод підготовки сенсора	Діапазон лінійності, М	Межа виявлення, М
Безензимний потенціометричний сенсор	Електрохімічне виготовлення полі-(3-АРВА-со-3-октилтіофен) органічного електрода	$5-50 \times 10^{-3}$ для глюкози	5×10^{-4}
Флуоресцентне титрування	Флуоресцентна сенсорна мембрана на основі дизайну акрилового мономеру із залишком ФБК, кон'югованої з ароматичною іміногрупою та фенільним кільцем	4.76×10^{-5} – 1.01×10^{-1} для глюкози і фруктози	$3-4 \times 10^{-4}$
Електрохімічна імпедансна спектроскопія	Електрополімеризація 3-АФБК на поверхні золотого електрода	$10^{-9} - 10^{-2}$ для глюкози, $10^{-10} - 10^{-2}$ для фруктози, манітолу, сорбітолу	-
УФ-видиме спектральне вимірювання	Самоскладання азозондів ФБК на поверхні дендримеру поліамідоаміну у воді	$0-1 \times 10^{-3}$ для глюкози, фруктози і галактози	-

Ємнісний біосенсор	Приготування фрагментів АФБК електрополімеризованому тираміном золотому електроді	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³ на для глюкози, 10 ⁻⁸ – 10 ⁻² для фруктози, 10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵ для декстрану	8×10 ⁻¹⁰ для глюкози, 6×10 ⁻¹⁰ для фруктози, 13×10 ⁻¹² для декстрану
--------------------	---	--	---

Здатність п-АФБК окислюватися під дією H₂O₂ до п-амінофенолу, який є електрохімічним реагентом, лягла в основу електрохімічних методів визначення пероксиду водню та деяких оксидаз методом циклічної вольтамперометрії [32]. У більш нових роботах зустрічається включення АФБК у багатошарові плівки та наногелі для селективного детектування H₂O₂, що потенційно може застосовуватися для направленої доставки ліків в тканини, що потерпають від окисного стресу [33] або ж для колориметричного визначення пероксиду водню у природних об'єктах [34].

Селективність фенілборонових реагентів є одним із рушійних факторів для пошуку нових сенсорів з покращеними властивостями. Визначення D-фруктози в комерційних харчових продуктах і біологічних зразках зазвичай передбачає вплив кількох речовин, таких як відновники, спирти та білки. У роботі [35] пропонується селективний флюоресцентний сенсор на основі BODIPY (бордипірометенового барвника) та ФБК (див. рис. 1.13), на роботу якого не впливала присутність альдоз у кількостях 1 ммоль/л.

Рис.1.13. Структурна формула гібридного ФБ-BODIPY сенсора для фруктози[35].

Лінійність флуоресценції та межі виявлення для D-фруктози, D-психози та сорбіту були проаналізовані вченими для 0,5 мкМ РВ-BODIPY в межах 100 – 1000 мкмоль/л. Межі виявлення становили 32 мкмоль/л, 43 мкмоль/л. 85 мкмоль/л відповідно.

Точність методу для визначення фруктози було перевірено шляхом аналізу зразків з відомою концентрацією, отримане значення Recovery (%) лежало в межах 96,9-99,9%, при чому коефіцієнт варіації (CV,%) для вимірювань в межах одного дня та протягом декількох днів не перевищував 3% і 7% відповідно.

Придатність арилборонових кислот для виявлення та визначення неорганічних компонентів висвітлено у ряді робіт, що пропонують флуоресцентні сенсори для визначення іонів ртуті. У табл.1.4 зведені деякі їхні характеристики.

Таблиця 1.4. Опис сенсорів для визначення сполук ртуті.

Тип сенсора	Хімічна взаємодія	Межа виявлення	Досліджені об'єкти аналізу	Джерело
Turn-on флуоресцентний зонд для Hg ²⁺ та CH ₃ Hg ⁺ .	Необоротна реакція заміщення арилборонової	4,02 нМ в дистильованій воді; 1,82 нМ в	Дистильована вода, буферна суміш	[36]

	кислоти іонами ртуті.	водному середовищі буферної суміші pH=7,4 для Hg ²⁺ , 200 ppb для CH ₃ Hg ⁺ .	pH=7,4.	
Turn-off Паперовий флуоресцентний датчик із використанням квантових точок MoS ₂ , функціоналізовані борною кислотою.	Трансметалізація арилборонової кислоти з утворенням ртуть-органічної форми, що не проявляє флуоресценцію.	8 нМ у водному середовищі	Водопровідна вода, озерна вода та промислові стічні води.	[37]
Turn-on флуоресцентний зонд для Hg ²⁺ та CH ₃ Hg ⁺ на основі	Трансметалізація боронової кислоти, що призводить до	20 нМ для Hg ²⁺ , 440 нМ для CH ₃ Hg ⁺ .	Річкова вода.	[38]

Продовження таблиці 1.4

Eu-органічної рамки, функціоналізованої бороновою кислотою.	втрати ефекту «антени» ігандом і почилення червоної флуоресценції.			
Раціометричний флуоресцентний сенсор на основі амінокислоти.	Необоротна реакція заміщення арилборонової кислоти іонами ртуті.	7 Нм	Ґрунтові води, водопровідна вода.	[39]

Таким чином, боронові кислоти є основою функціонування багатьох потенціометричних, спектрофотометричних, колориметричних, флюоресцентних та інших видів сенсорів як для органічних, так і неорганічних речовин, що проявляють високу селективність та точність, а низька токсичність їх похідних дає можливість застосовувати їх для внутрішньоклітинних досліджень. Більше прикладів розроблених в останні роки сенсорів на основі боронових кислот зібрано в огляді [40].

РОЗДІЛ 2**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА****2.1. Правила техніки безпеки в хімічних лабораторіях [41]**

1. До виконання роботи дозволяється приступати тільки після засвоєння її змісту, основних етапів та після з'ясування можливих небезпечних моментів.

2. Роботу виконувати уважно, ретельно і без поспіху, дотримуючись чистоти на робочому місці.

3. В лабораторії забороняється працювати одному – тільки в присутності викладача, інженера чи асистента.

4. Уникати контакту хімічних речовин та розчинів із шкірою, очима, дихальними шляхами. При виконанні робіт халат має бути застібнутий на всі гудзики. Довге волосся повинно бути прибрано (зібрано резинкою) з метою уникнення його контакту із нагрітими поверхнями чи хімікатами.

5. Роботи з концентрованими кислотами та лугами, їдкими і легкозаймистими речовинами та подрібнення твердих речовин слід виконувати у витяжній шафі.

6. Розведення концентрованих кислот та лугів здійснювати шляхом їх внесення у воду, а не навпаки.

7. Відбір реактивів здійснювати тільки призначеними для цього інструментами, при роботі з піпетками заборонено втягувати вміст за допомогою рота, для цього необхідно користуватись тільки резиновими «грушами».

8. Не залишати без нагляду ввімкнені електроприлади, пальники та спиртівки. Після виконання роботи їх відразу вимкнути.

9. Забороняється працювати із легкозаймистими речовинами поблизу відкритого полум'я.

10. Після відпрацювання легкозаймисті та горючі сполуки (розчинники), кислоти, луги чи інші їдкі та небезпечні речовини зливати у спеціальний посуд із написом «Зливи...».

11. При змішуванні реактивів чи нагріванні сумішей забороняється заглядати у посуд (з відкритого боку, з отвору).

12. При роботі зі скляним обладнанням не прикладати значних механічних зусиль, обережно поводитись із тонкостінним мірним посудом та термометрами).

13. Перед роботою з електрообладнання обов'язково переконатись у його заземленні та справності. У випадку виявлення пошкоджень слід доповісти черговому інженеру (лаборанту) чи викладачу.

14. При нещасних випадках надати першу медичну допомогу потерпілому. За найменшої підозри про можливість враження електричним струмом – знеструмити місце події, і тільки після цього можна торкатись потерпілого руками. При попаданні на оголені ділянки шкіри, в очі чи рот їдких та невідомого походження речовин якнайшвидше промити великою кількістю води, після чого звернутись до викладача, інженера та викликати лікаря. При запамороченні – вивести постраждалого на свіже повітря, розстебнути верхні гудзики одягу (звільнити шию), перевірити пульс та надати допомогу.

15. Дотримуватись правил протипожежної безпеки. При пожежі в хімічній лабораторії студенти негайно повинні покинути лабораторію.

2.2 Обладнання та реактиви

2.2.1. Обладнання: спектрофотометри Shimadzu UV 2600, Spekol-11, рН-метр рН-150МІ.

РХ-МС (LC-MS) аналіз здійснено провідним науковим співробітником кафедри аналітичної хімії Університету Палацького у м. Оломоуц Володимиром Пауком з використанням наступного обладнання: Acquity I-Class UPLC(рухома фаза вода (А) – ацетонітрил (В) з 0.2% HCOOH, швидкість потоку 0.4 мл/хв), підключеному до мас-спектрометра Synapt G2-S з джерелом іонізації Z-Spray , що працював у скануючому режимі в діапазоні m/z 50-1000.

Термічний аналіз проведено науковим співробітником інституту Геотехніки САН у м. Кошице, к.х.н. Галиною Янкович на приладі STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Німеччина) з одночасним записом кривих ТГ і ДТГ (швидкість нагріву: 7 °С / хв, діапазон температур: 30–800 °С).

Диференційний термічний аналіз було проведено на установці ДТА кафедри неорганічної хімії УжНУ науковим співробітником к.х.н. Погодіним Артемом.

Рентгенівська фотоемісійна спектроскопія (XPS) проведена на приладі SPECS (SPECS GmbH, Німеччина) Інституту Природних Ресурсів Словацької Академії Наук у м. Кошице.

ІЧ-спектроскопічні дослідження проводили в Інституті геотехніки Словацької Академії Наук в м. Кошице на спектрометрі Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Німеччина).

2.2.1. Реактиви та реагенти. Для досліджень використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а. Вихідний спиртовий розчин 8-ГХФБ концентрацією 1.07×10^{-3} моль/л готували шляхом розчинення точної наважки барвника у етанолі. Буферні розчини (див. табл.2.1) готували за загальновідомими методиками, використовуючи реактиви, приготовані на дистильованій та бідистильованій воді.

Таблиця 2.1. Буферні розчини, використані для досліджень протолітичних властивостей 8-ГХФБ

Буфер	Реактиви	Діапазон рН
Аміачний	NH ₄ OH	6.6 – 10.3
	HCl	
фосфатний	NaOH	1.6 – 12.5;
	H ₃ PO ₄	
гліциновий	NaOH	6.46 – 11.17
	NH ₂ CH ₂ COOH+ 7.5% 0.1 M HCl	
ацетатний	CH ₃ COOH	6.6 – 11.5

	NaOH	
--	------	--

Продовження таблиці 2.1

Цитратно-фосфатний	Na ₃ Citr H ₃ PO ₄	3.5 – 12
Цитратний	Na ₃ Citr (0.02 моль/л) H ₃ Citr (0.01 моль/л) H ₃ PO ₄ (0.01 моль/л)	2.9 – 11.2

Розчини солей металів з діапазоном концентрацій 10^{-1} - 10^{-5} моль/л готували послідовним розведенням вихідних розчинів буферною сумішшю. Вихідні розчини готували шляхом розчинення наважки відповідної солі у дистильованій воді, так щоб концентрація солі бура рівна 0.1 моль/л. Стандартний розчин нікелю готували із NiSO₄×7H₂O ч.д.а. та стандартизували комплексометрично з використанням мурексиду як індикатора.

2.3. Методика синтезу 8-ГХФБ

До 1.37 ммоль 3-амінофенілборонової кислоти, розчиненої в 2,5-3 мл хлоридної кислоти 1:3 охолоджували до 0°C на сольовій льодяній бані. До холодного розчину по краплях поступово протягом 30 хвилин додавали 5 мл розчину що містив 1.45 ммоль натрій нітриту, надлишок нітриту усували додаванням кристаликів сечовини, присутність окисника контролювали йод-крохмалевим папірцем. Одержаний розчин перемішували 45 хвилин та при постійному охолодженні додавали до 1.37 ммоль 8-гідроксінноліну, розчиненого в 40 мл 5%-ого водного розчину калій гідроксиду з інтенсивним перемішуванням та контролем рН реакційної суміші близько 8. Суміш перемішували протягом 1 години, після чого нейтралізували оцтовою

кислотою до рН 5-6. Кінцевий продукт відфільтрували, промивали на фільтрі водою та висушували на повітрі.

2.4. Визначення рК гідроксилування та рК протонування барвника

При визначенні рК протонування розчини з різним рН отримували шляхом поступового приливання до розчину барвника приготованого на відповідній кислоті порцій розчину барвника такої ж концентрації, приготовленого на відповідному лузі або солі згідно таблиці 2.1. Вимірювання оптичної густини проводили при $\lambda=375$ нм у проточній кюветі з товщиною світлопоглинаючого шару 2 см на спектрофотометрі. Досліджувані розчин затягували у кювету з допомогою шприца через під'єднані фторопластові трубки після встановлення бажаного значення рН. Значення оптичних густин при різному рН використовували для розрахунку рК_a.

рК гідроксилування визначали аналогічним способом, але розчини з різним рН отримували шляхом поступового приливання до розчину барвника приготовленого на відповідному лузі чи розчині солі порцій розчину барвника такої ж концентрації приготованого на відповідній кислоті. Оптичну густину вимірювали при 472 нм.

2.5. Дослідження здатності 8-ГХФБ до реакцій з катіонами металів

Для крапельних реакцій у лунках планшету змішували по 0.02 мл розчинів солі досліджуваного металу з різною концентрацією, 0.02 мл буферу та 0.02 мл вихідного розчину 8-ГХФБ, обережно перемішували та наносили на хроматографічні пластинки (Silufol). Забарвлення суміші фіксували одразу після нанесення, після висушування над розігрітою електроплиткою та після обробки парами хлороформу у хроматографічній камері.

2.6. Дослідження взаємодії 8-ГХФБ з нікелем

2.6.1. Встановлення оптимальних умов проведення реакції. Для дослідження кінетики розвинення забарвлення у пробірках змішували 0.5 мл стандартного розчину NiSO₄ ($C_{Ni} = 10^{-4}$ моль/л) 4 мл ацетатно-аміачного буферу і 0.5 мл спиртового розчину 8-ГХФБ та одразу починали вимірювати

оптичну густину у кюветах з $l=1$ см при $\lambda=550$ нм відносно бідистильованої води кожні 30 секунд протягом 20 хвилин, а потім кожні 15-30 хвилин до сумарного часу в 2 години.

Для встановлення оптимального рН готували серію розчинів таким же чином, використовуючи буфер з різними значеннями рН. Через 10-15 хвилин вимірювали оптичну густину відносно розчину порівняння, що готували аналогічно досліджуванім, замінивши розчин солі нікелю на бідистильовану воду.

Для дослідження стійкості забарвлення розчини центрифугували протягом 10-15 хвилин при 1500-3000 об/хв або залишали на ніч та знову вимірювали оптичну густину. На основі одержаних значень ΔA робили висновок про оптимальні умови утворення комплексу нікелю з 8-ГХФБ.

2.6.2. Встановлення складу комплексу методом молярних відношень. Для приготування серії розчинів у пробірках до 0.5 мл стандартного розчину $NiSO_4$ додавали 3 мл ацетатно-аміачного буферу з рН=3.5, бідистильовану воду та при постійному перемішуванні краплями вводили різну кількість розведеного вихідного розчину 8-ГХФБ (10^{-4} М). Об'єм води та барвника підбирали так, щоб загальний об'єм розчину становив 5мл. Паралельно готували серію холостих розчинів. Отриману оптичну густину розчинів використовували для побудови залежності за методом молярних відношень.

2.6.3. Дослідження впливу ПВС. Для вибору порядку додавання реагентів у пробірки вносили по 0.2 мл стандартного розчину $NiSO_4$, 3 мл ацетатно-аміачного буферу з рН=3.5 та 0.8 мл бідистильованої води. Далі внесли 0.1 мл 1% розчину ПВС (полівінілового спирту), добре перемішали та додали 1 мл вихідного розчину 8-ГХФБ, також ПВС вносили після додавання барвника. Для виявлення впливу порядку зливання на стійкість забарвлення вимірювали оптичну густину протягом 1 години 30 хвилин.

Оптимальну концентрацію ПВС для стабілізації розчинів визначали шляхом вимірювання оптичної густини максимальної точки калібровки за

умов різного вмісту ПВС протягом 2 годин . також контролювали розсіювання світла у пробірках опромінюючи їх.

2.6.4. Побудова градувального графіку та оцінка метрологічних характеристик. Готували серію розчинів, котрі містили від 0.10 до 5.8 мкг Ni^{2+} шляхом додавання стандартного розчину. Далі вносили відповідну кількість води, 2.5 мл буферної суміші та 0.5 мл 1 % розчину ПВС з таким розрахунком, щоб сумарний об'єм становив 4 мл. Після перемішування у пробірку вносили 1 мл спиртового розчину 8-ГХФБ із одночасним перемішуванням вмісту пробірки. Оптичну густину вимірювали після стояння розчинів протягом оптимального часу для розвинення забарвлення у кварцових кюветах з товщиною світлопоглинаючого шару 1 см на спектрофотометрі при оптимальній довжині хвилі.

Межу виявлення LOD та межу визначення LOQ розраховували згідно відомих рекомендацій[42]

Для оцінки селективності розчини готували за принципом, описаним вище, замінивши розчин солі нікелю на розчини солей різних металів з розрахунком, щоб кінцева молярна концентрація катіонів у кожній була однаковою. Отримані розчини досліджували спектрофотометрично у межах 300-800 нм.

РОЗДІЛ 3

Обговорення результатів

Одним із обмежуючих факторів застосування різних сполук в якості молекулярно розмірних сенсорів є межі рН за яких реагент знаходиться в реакційно здатній формі та може ефективно вступати в реакцію з аналітом. Задля встановлення цих характеристик було досліджено спектральні та протолітичні властивості 8-ГХФБ, одержаного на основі адаптованої методики [43].

3.1. Характеристика 8-ГХФБ, його чистоти та будови

Цільовий продукт реакції діазосполучення – порошкоподібна речовина цегляного кольору, добре розчинна в етанолі, погано розчинна в метанолі та практично не розчинна у воді. Сполука містить два реакційні центри – 8-гідроксифенілоліновий та фенілбороновий (рис.3.1), перспективи використання яких розглянуто у розділі 1.

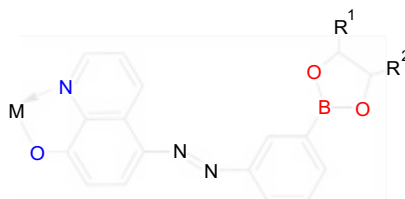
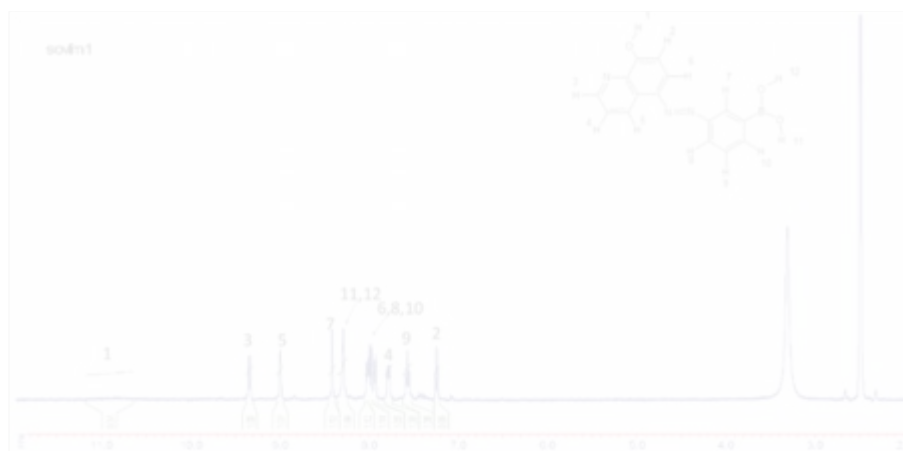


Рис.3.1. Структурна формула 8-ГХФБ та перспективи його аналітичного застосування при визначенні іонів металів та органічних сполук здатних до комплексоутворення по фенілбороновому заміснику.

Стійкість фрагменту $-B(OH)_2$ за присутності сильного окисника в реакційному середовищі, що згідно з літературними даними є проблематичним[32]. Тому доведення наявності боронового фрагменту у досліджуваній сполуці різними методами було критичним. Як видно з 1H -ЯМР спектру (див.рис.3.2), кількість та характер піків збігається із очікуваними із врахуванням сигналів магнітно-еквівалентних ядер.

Рис.3.2.Спектр ¹H-ЯМР для 8-ГХФБ.

Додатково чистоту та структуру барвника було підтверджено за результатами хроматомас-спектроскопії. З хроматограми (див.рис.3.3) видно, що сполука була добре відділена від реагентів та ефективно іонізована в позитивному режимі, $t_R = 2.19$ хв..

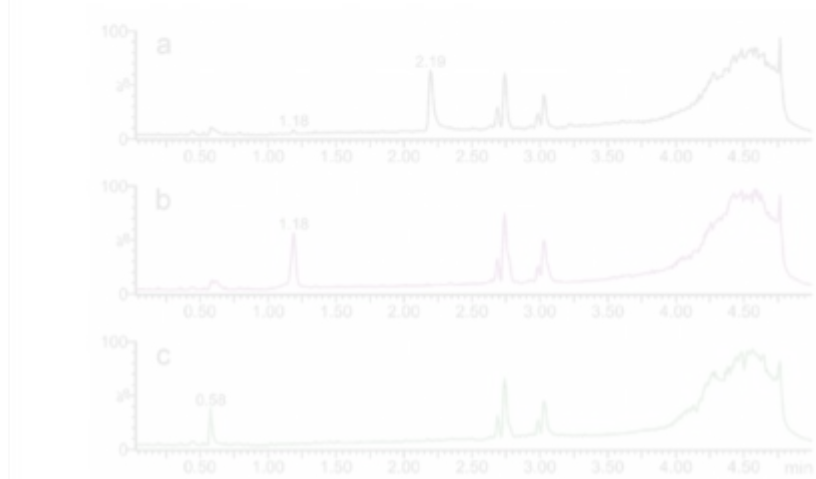


Рис.3.3. Хроматограми повного іонного струму у позитивному режимі: а- 8-ГХФБ, б- 8-ГХ, с- 3-АФБК.

Рухома фаза – А: H₂O + HCOOH 0.2%; В: AcN + HCOOH 0.2%. Колонка – Kinetex XB-C18 1.7 мкм 100×2.1 мм

На full-scan мас-спектрі піку при $t_R = 2.19$ хв (див. рис.3.4) присутній інтенсивний молекулярний пік, що відповідає досліджуваній сполуці: розраховане для $C_{15}H_{13}BN_3O_3^+$ значення $m/z=294.1044$, знайдене – $m/z=294.1035$, що додатково підтверджує наявність боронової групи у структурі. Пік з $m/z=145.0512$ відповідає 8-ГХ, що скоріше за утворився в наслідок іонізації речовини.

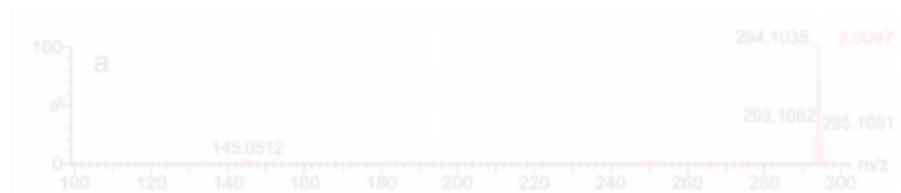


Рис.3.4. Full-scan мас-спектр 8-ГХФБ у позитивному режимі.

Результати LC-MS досліджень у негативному режиму приведено у Додатку А.

На спектрі XPS (рис.3.5) видно сигнали валентних електронів оксигену, нітрогену, карбону та бору, що також свідчить про наявність цих елементів у досліджуваній сполуці.

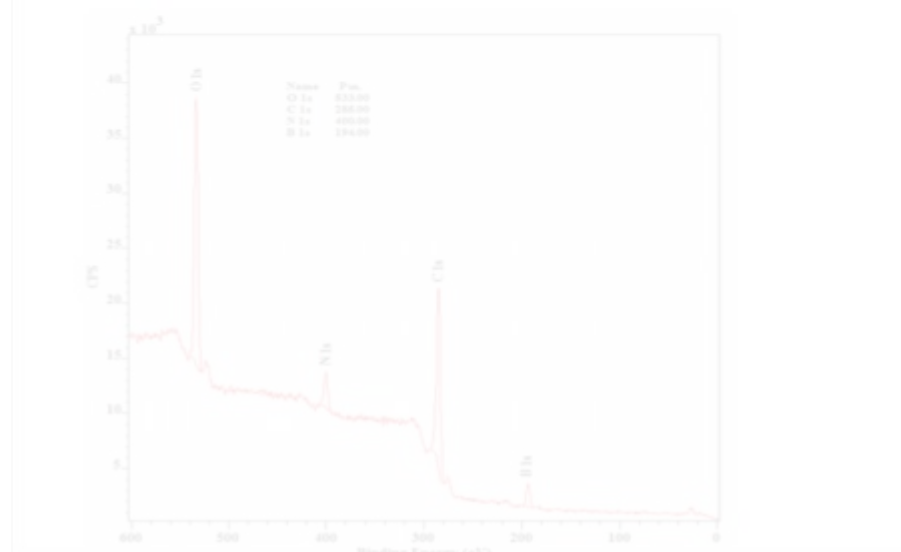


Рис.3.5. XPS спектр 8-ГХФБ.

Для оцінки термічних властивостей речовину аналізували методом термогравіметрії (ТГ) та диференційного термічного аналізу (ДТА). Як видно з термограми (рис.3.6.), 8-ГХФБ є стійким до $t=399.5^{\circ}\text{C}$ (перший пік при $t\approx 100-140^{\circ}\text{C}$ може відповідати втраті зразком конституційної та кристалізаційної води).

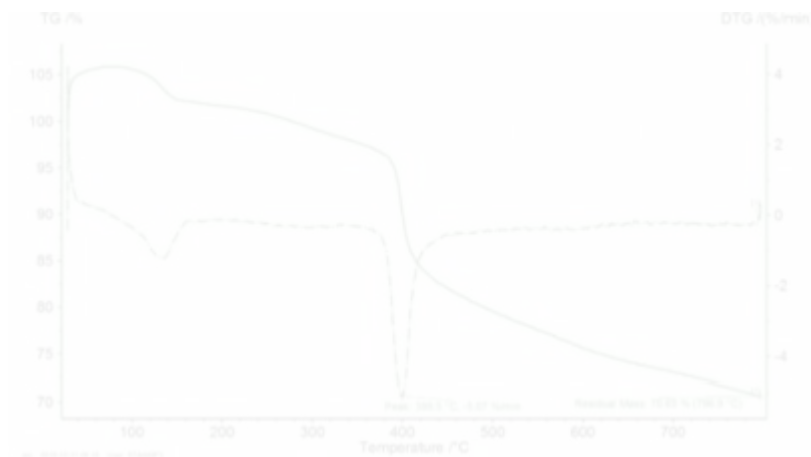


Рис.3.6. ТГ та ДТГ для 8-ГХФБ.

Після 400°C відбувається різка втрата маси аж до 29.35%, яка згідно з ДТА (рис.3.7) відповідає екзотермічному процесу, що може означати розклад речовини з подальшим окисненням продуктів.



Рис.3.7. ДТА 8-ГХФБ.

3.2. Вплив різних факторів на визначення рК

Спектрофотометричний метод визначення рК завдяки своїй простоті, невисокій вартості, можливості працювати з невеликими порціями аналіту є одним із найбільш застосовуваних та добре вивчених методів встановлення протолітичних характеристик речовин [44,45], проте незалежно від обраного методу, ефект матриці, зокрема природа буферу та іонна сила, чистота розчинника, тощо, має значний вплив на отриманий результат [46].

З метою вибору оптимальних умов визначення рК нами було попередньо досліджено спектри світлопоглинання барвника з використанням ацетатного, аміачного, глікоколевого та фосфатного буферів. Виявилось, що при $5 \leq \text{pH} \leq 8.5$ незалежно від обраного буферу відбувається швидке утворення осаду, яке спричиняло сильне світлорозсіяння, видне на спектрах у вигляді «плечей» (рис.3.8) та «розмивало» очікувану ізобестичну точку. Адекватна оцінка рК за таких умов була неможливою.

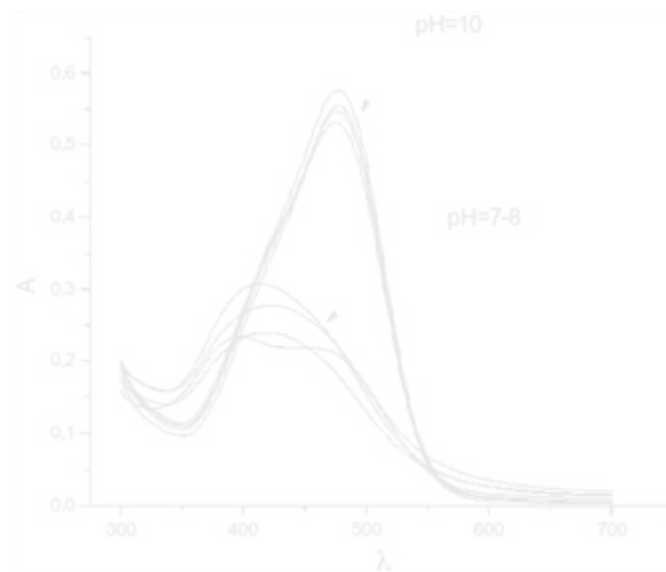


Рис.3.8. Фрагмент спектрів світлопоглинання 8-ГХФБ у присутності різних буферів.

Варто відмітити, що у вказаній області рН можлива низька розчинність сполуки може супроводжуватися осадженням фрагментом 8-ГХ деяких катіонів металів [47], зокрема таких, що можуть залишатися в дистильованій воді в процесі її виготовлення. Щоб дослідити вплив цього фактору, зняли спектри світлопоглинання розчинів барвника, приготованих на фосфатному буфері з використанням деіонізованої і бідистильованої воді. Утворення осаду сповільнилося в обох випадках. В наступних дослідженнях використовували бідистильвану воду рис.3.9.

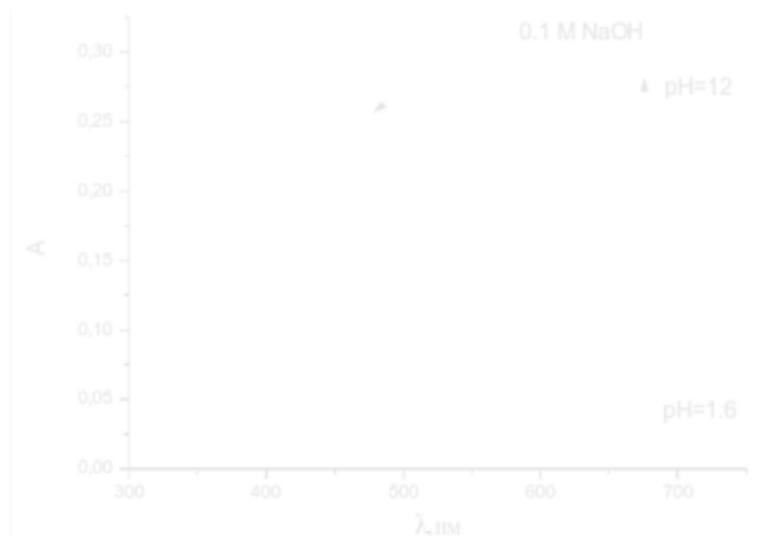


Рис.3.9. Спектри світлопоглинання 8-ГХФБ у фосфатному буфері, приготованому на бідистильованій воді.

На спектрі видна тенденція до утворення ізобестичної точки при 407нм. У табл.2.1 представлені коефіцієнти світлопоглинання (ϵ) для відповідних максимумів.

Таблиця 2.1. Спектрофотометричні характеристики 8-ГХФБ у фосфатному буфері

$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , л/моль×см	Колір розчину
472	2740	помаранчевий
476	2452	помаранченвий
375	1389	Жовтий

Порядок зливання розчинів також відзначився на зміні оптичної густини відносно рН середовища: при переході від кислого розчину барвника до лужного оптична густина змінювалася повільніше починаючи від рН=7 (рис.3.10. а), що ймовірно пояснюється різною швидкістю процесів утворення та розчинення нейтральної форми барвника, а використання

розчинів, змішування яких не призводило до утворення буферної суміші, тільки підтвердило це припущення (рис.3.10. б).

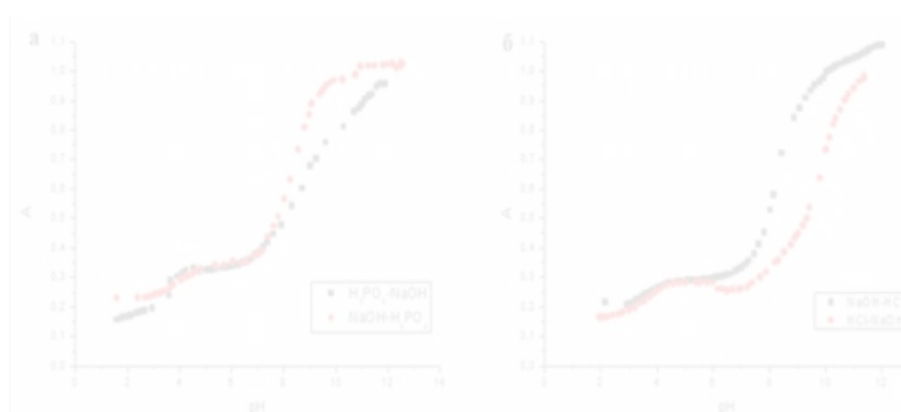


Рис.3.10. Зміна оптичної густини розчинів барвника при різному рН в системі а – фосфатного буферу, б – натрій гідроксид-хлоридна кислота.

Справедливо, що для знаходження pK_a ФБ-складової при $\lambda=472$ нм, що очікувалася в області рН=8 оптимальним було додавання кислого розчину барвника до лужного так, щоб процеси розчинення нейтральної форми барвника не накладались на оптичну густину гідроксильованої форми (RHOH) за рахунок розсіювання.

Окрім того, в середовищі буфера добре помітний третій стрибок титрування, біля рН 10, що узгоджується із pK_a 8-ГХ (9,7) і незважаючи на низьку інтенсивність, може означати присутність ще однієї форми барвника – депротонованої (ROH^{2-}) по гідроксильній групі гідроксифінолінового фрагменту, непомітної на спектрах світлопоглинання.

Враховуючи ці фактори, було досліджено характер зміни світлопоглинання від рН середовища з використанням фосфатного і цитратно-фосфатного буферів з концентрацією основної складової 0.2 моль/л та визначено рК гідроксильовання ФБ-фрагменту. Виявилось, що значення відрізняються між собою на 0.2. Щоб з'ясувати причину такої відмінності було досліджено системи зі зменшеною концентрацією цитрату натрію. У цьому випадку знайдені графічно значення рК (рис.3.11) були близькими до

одержаних з використанням фосфатного буферу (8,25; 8,31 та 8,28 відповідно).

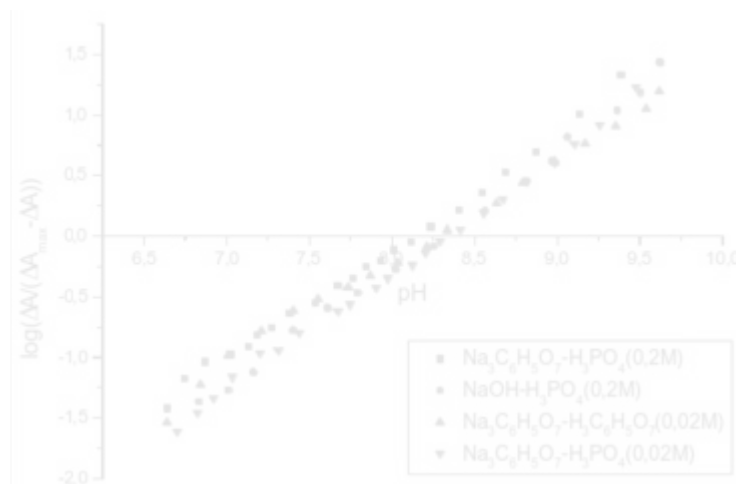


Рис.3.11. Графічний спосіб спектрофотометричного визначення рК барвника у системах з різною концентрацією цитрату натрію при $\lambda=472$ нм та $l=1$ см $C_{8-ГХФБ}=1 \times 10^{-4}$ моль/л.

Таким чином, передумовою різних значень рК була висока концентрація цитрату натрію. Зважаючи на структуру лимонної кислоти, її солей та одержані результати, можна припустити що у використаних неіндиферентних системах іонна сила розчину впливає на значення рК внаслідок реакції із досліджуваним барвником.

Для розрахунку рК протонування нітрогену 8-ГХ користувалися значеннями, виміряними при 375 нм, що відповідало $\lambda_{\text{макс}}$ на спектрах світлопоглинання кислих розчинів барвника. Щоб уникнути сильного впливу світлорозсіювання нейтральною формою, змінювали pH від кислого до лужного. Досліджуючи вплив природи буфера, знову зіткнулися із труднощами при використанні цитратного буферу – характер одержаних кривих титрування на цитратному та фосфатному буферах зовсім не узгоджувався між собою (рис.3.12).

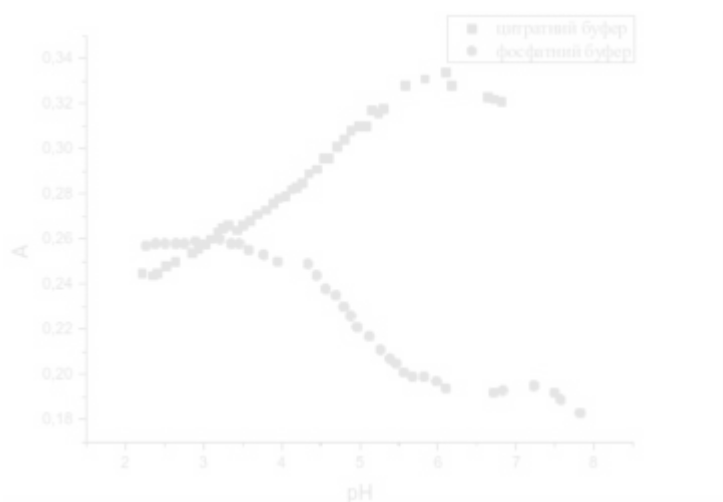


Рис.3.12. Порівняння зміни оптичної густини кислого розчину 8-ГХФБ при додаванні лужного за утворення фосфатної та цитратної буферної суміші. $\lambda=375$ нм та $l=1$ см; $C_{8-ГХФБ}=1 \times 10^{-5}$ моль/л.

У області, що відповідає рК (рН=4-6) спостерігається ріст світлопоглинання, що узгоджується з утворенням комплексної сполуки між 8-ГХФБ та лимонною кислотою [48] та унеможливорює застосування цього буферу для встановлення рК протонування навіть при концентрації цитрату 0,02 моль/л.

Одержані графічним методом та обраховані рК приведено у табл.2.2.

Таблиця 2.2. Значення рК 8-ГХФБ.

Середовище	рК гідроксилування (графічно)	Розрахункове рК гідроксилування	рК протонування (графічно)	Розрахункове рК протонування
NaOH (0,2 M) – H ₃ PO ₄ (0,1 M)	8,28	8,27±0,11	4,87	4,87±0,05
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (0,2 M) – H ₃ PO ₄ (0,1 M)	8,09	8,10±0,06	Не можливо визначити	
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (0,02 M) – H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (0,01M)	8,25	8,26±0,07		
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (0,02 M) – H ₃ PO ₄ (0,01 M)	8,31	8,30±0,07		

Отже, у водних розчинах існують як мінімум чотири форми барвника, орієнтовні рівноваги між якими зображено на рис.3.13

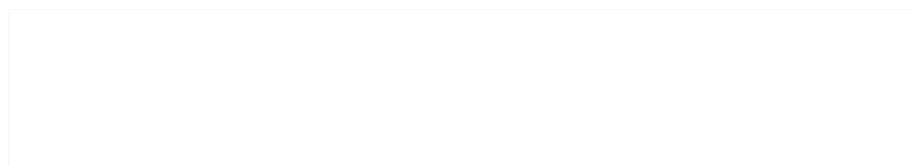
3.3 Тестові реакції із катіонами металів.

Згідно з літературними даними 8-ГХ та його похідні реагує з металами в широких межах рН. Для дослідження здатності 8-ГХФБ до реакції з металами обрали солі таких металів, що вступають у реакцію з 8-ГХ або у кислому, або в лужному середовищі, через низьку розчинність досліджуваної сполуки у нейтральному середовищі.

Щоб обрати найбільш оптимальний спосіб проведення тестових крапельних реакцій, досліди проводили з використанням різних підкладок. Спробували фільтрувальний та офісний папір, хроматографічні пластинки на пластиковій та алюмінієвій основі. З огляду на те, що деякі реакції вимагали нагрівання, найбільш зручними виявилися пластинки на алюмінієвій основі.

При реакції комплексоутворення металів із 8-ГХ кислотність середовища змінюється, що очікувалося і для досліджуваної сполуки, як показано на схемі 3.1.

[Схема 3.1](#)



Попередній експеримент показав, що скоріше за все, відбувається протонування частини барвника, яка не вступила у реакцію комплексоутворення. Це призводило до появи червонуватих плям і накладання сигналу на сигнал від кольорової реакції з металом. Істинний результат було помітно після обробки пластини парами аміаку (рис. 3.14). Тому використання буферної суміші для підтримання сталого рН в реакційному середовищі є обов'язковим. Вибираючи склад буферів, враховували хімічні властивості боронових кислот та зупинилися аміачних та ацетатних сумішах.

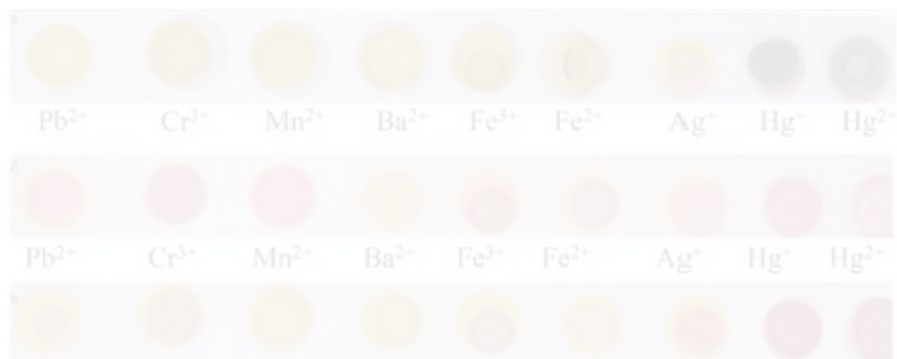


Рис.3.14. Вигляд крапельних реакцій на хроматографічній пластині: а - одразу після нанесення; б - після просушування над електроплиткою; в - після дії парами аміаку

Крім того, дослідили різні способи нанесення крапель аналіту: на просочену у хроматографічній камері пластинку, по чергове нанесення крапель барвника та розчинів аналітів, нанесення попередньо приготованої у планшетах суміші. З одного боку, нанесення розчинів металів на просочену пластинку мало б давати відтворювані результати, проте з іншого – вимагали попереднього використання великої кількості барвника. На результати дослідів з по черговим нанесенням крапель впливав час між нанесенням крапель, точність попадання в центр утвореної барвником зони, тощо, тому для експерименту обрали метод попереднього приготування сумішей у планшетах. Результати реакцій наведено у табл.3.3.

Таблиця 3.3. Результати крапельних реакцій

Катіон	Сигнал в лужному середовищі			Сигнал в середовищі без буферної суміші			Сигнал в кислому середовищі		
	Одра t°C зу	Після проявни ка (пари хлороформу)	Після проявни ка (пари хлороформу)	Одр t°C	Після проявни ка (пари хлороформу)	Після проявни ка (пари хлороформу)	Одра t°C	Після проявни ка (пари хлороформу)	Після проявни ка (пари хлороформу)
Al ³⁺	-	-	+	-	+		+(**)	+	+(**)
Ni ²⁺	-	+	+	-	+(*)		+	+	+
Co ²⁺	+(*)	+(*)	+(*)	-	+(*)		+	+	+
Cu ²⁺	+(*)	+(*)	+(*)	-	+(*)		-	-	-

Продовження таблиці 3.3

Zn ²⁺	-	-	-	-	-	-	+(**)	+(**)	+(**)
Mn ²⁺	-	+(*)	+(*)				+	+(**)	+(**)
Ga ³⁺	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	+	+	+
Eu ³⁺	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	+(*)	-	-	-
Pb ²⁺	+(**)	+	+(**)	-	-	-	-	-	-
Mg ²⁺	+(**)	+	+(**)				-	-	+(**)
Ag ⁺				+	+		+(*)	+(*)	+(*)
Ca ²⁺	-	-	-				-	-	-
Ba ²⁺	-	-	-				-	-	-
Fe ³⁺	+(*)	+(*)	+(*)				+(*)	+(*)	+(*)
Fe ²⁺	+(*)	+(*)	+(*)				+(*)	+(*)	+(*)
Hg ⁺	+(*)	+(*)	+(*)						
Hg ²⁺	+(*)	+(*)	+(*)						

* - ефект помітний тільки при високих концентраціях металу (10^{-2} – 10^{-1} M) і може бути викликаний іншими процесами: вивільнення H^+ , випадання гідроксиду, тощо;

** - ефект малопомітний при будь-яких концентраціях (утворюється осад відтінків жовтого).

Найбільш помітним виявився кольоровий перехід для Ni^{2+} в широких межах рН – від жовтого до червоного у кислому середовищі та малинового після обробки парами хлороформу, як у кислому, так і в лужному (рис.3.15а), Co^{2+} у кислому середовищі (рН~4) – від жовтого до червонувато-бурого та фіалкового після парів хлороформу (рис.3.15.б) та Ag^+ з утворенням червонуватого осаду (рис.3.15.в).

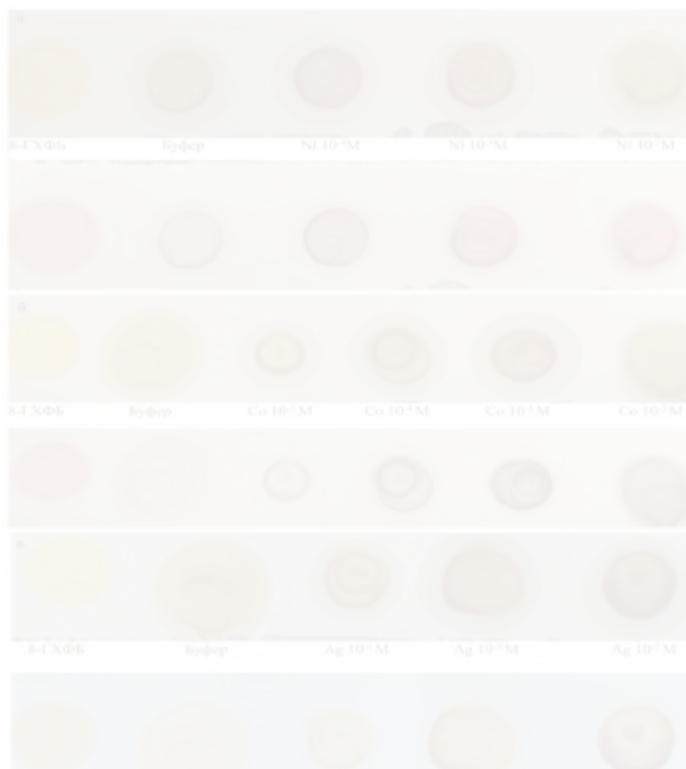


Рис.3.15. Крапельні реакції 8-ГХФБ та деяких металів при різній концентрації металу та pH=4

Як видно із фото, інтенсивність забарвлення плям відрізняється зі зміною концентрації. Цю властивість надалі можна використати для розробки кольорових шкал і тест-смужок для відповідних металів. Проте насиченість забарвлення може сильно залежати від властивостей середовища, тому наступним кроком у дослідженні став пошук оптимальних умов проведення реакції на прикладі взаємодії 8-ГХФБ та Ni^{2+} .

3.4. Дослідження реакції між 8-ГХФБ та Ni^{2+}

3.4.1. Вплив pH. Як було зазначено раніше, робоче pH з огляду на стабільність водних розчинів 8-ГХФБ має бути в межах $5 \leq \text{pH} \leq 8.5$. Зважаючи на більш помітний кольоровий перехід при реакції у кислому середовищі, досліджували розчини з $\text{pH}=2-4.5$.

При використанні ацетатно-аміачного буферу проявлення забарвлення відбувалося протягом 30 секунд після приготування відповідного розчину способом послідовного зливання компонентів і перемішування після додавання останнього складника (8-ГХФБ) та ставало постійним після 10-15 хвилин витримки, що видно з рис.3.16.

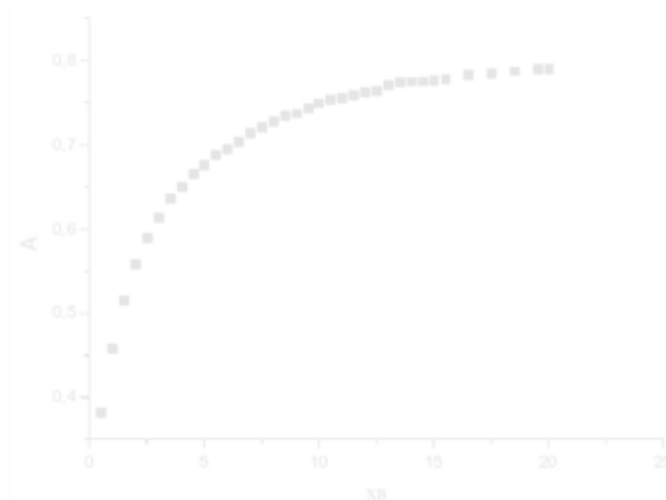


Рис.3.16. Дослідження кінетики зміни забарвлення розчину внаслідок утворення комплексної сполуки.

$\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{Ni}=1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8-ГХФБ}=1 \times 10^{-4}$ моль/л

Одержані розчини не є істинними про що свідчило значне розсіювання світла, що вказувало на необхідність дослідження стабільності системи при різному рН поруч із різницею світлопоглинання холостого та робочого розчинів (рис.3.17) .

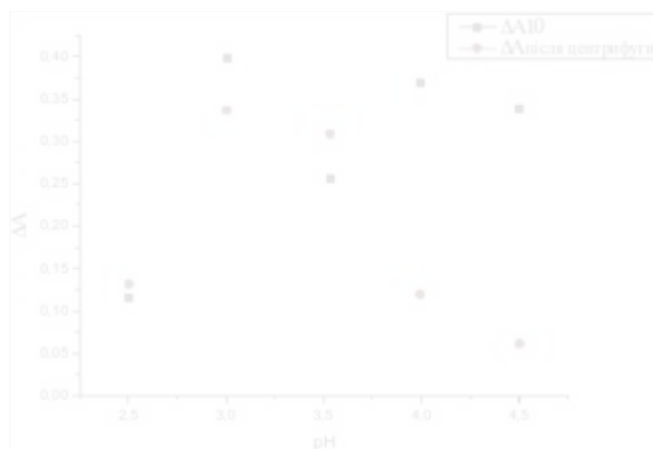


Рис.3.17. Вибір оптимального рН проведення реакції на основі дослідження зміни оптичної густини від рН в системі CH_3COOH (0.1 моль/л) - NH_4OH (0.1 моль/л) на приладі Spekol-11 при $\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{\text{Ni}}=1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8\text{-ГХФБ}}=1 \times 10^{-4}$ моль/л

Як видно з графічної залежності найвища стабільність сумішей в поєднанні із високою оптичною проявилася в діапазоні $\text{pH}=3.0 - 3.5$ у 0.1 М ацетатно-аміачному буфері.

3.4.2. Техніка приготування розчинів. Так як реакція протікає за участю реагентів, приготованих у різних розчинниках (буфер – бідистильована вода, 8-ГХФБ – етанол) на швидкість утворення та розмір частинок накладається кінетичний фактор утворення твердої фази. Для того щоб зрозуміти на скільки техніка приготування аналізованих розчинів впливає на одержані результати приготували серію з тим самим рН, але при постійному перемішуванні вмісту пробірок у момент приливання компонентів. З одержаного графіку видно, що спосіб перемішування мало вплинув на характер отриманих кривих в порівнянні з попереднім дослідом, в якому вміст пробірок інтенсивно перемішували тільки після додавання всіх компонентів, проте стійкість розчинів виросла (рис.3.18).

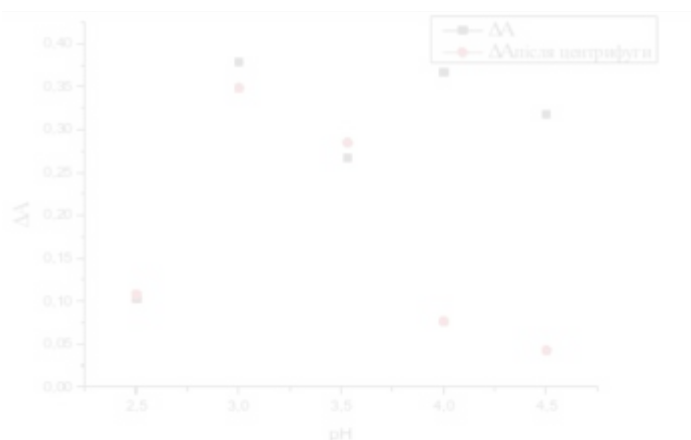


Рис.3.18. Дослідження впливу способу приготування аналізованих розчинів на ΔA .

Буфер: CH_3COOH (0.1 моль/л) - NH_4OH (0.1 моль/л), прилад Spekol-11, $\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{\text{Ni}}=1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8\text{-ГХФБ}}=1 \times 10^{-4}$ моль/л.

3.4.3. Вплив іонної сили середовища. Як відомо, часто на процес комплексоутворення впливає іонна сила середовища, тому використання буферу з вищою концентрацією складників могла б вплинути на одержаний сигнал. Щоб перевірити це, провели дослід, аналогічний попередньому, замінивши 0.1 М буфер на 1 М, результати зображено на рис.3.19.

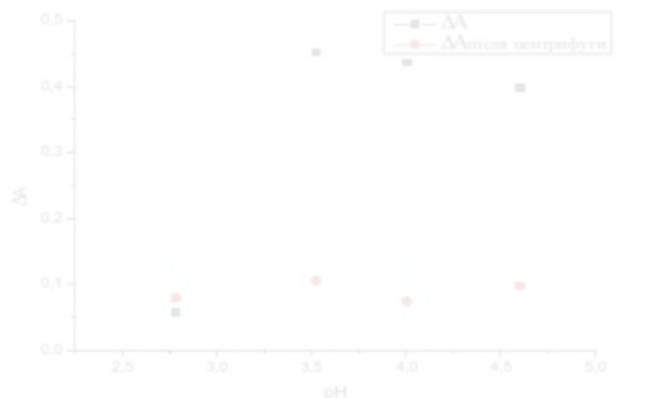


Рис.3.19. Дослідження зміни оптичної густини від pH в системі CH_3COOH (1 моль/л) - NH_4OH (1 моль/л) на приладі Spekol-11 при $\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{\text{Ni}}=1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8\text{-ГХФБ}}=1 \times 10^{-4}$ моль/л

Дана серія також характеризувалася високою стабільністю розчинів після приготування, осадження не спостерігалось більш, ніж 2 години, а сигнал від утвореної сполуки був інтенсивнішим, ніж у попередньому досліді.

Проте, розчини одержані після центрифугування на наступний день, показали лише незначне світлопоглинання, при тому, що і холості, і досліджувані розчини були практично безбарвними. Натомість очікувалося забарвлення, спровоковане залишком від барвника. Це явище може пояснюватися утворенням агрегатів [48], що є однією із властивостей боронових кислот та вказує на необхідність проведення вимірів до моменту коагуляції частинок золю або введення стабілізаторів.

3.4.4. Встановлення складу комплексу. Згідно з літературними даними [49], координаційне число для Ni^{2+} рівне 4 або 6, тому кількісний склад комплексу вимагає додаткового дослідження. Метод ізомольних серій (зустрічається ще за назвою job's plot method) [50,51] та метод молярних відношень [52-54] дають змогу дізнатися співвідношення між складовими. На кривій оптичної густини розчинів при сталій концентрації Ni^{2+} та зміні кількості 8-ГХФБ, одержаних за методом молярних відношень, видно злам, що відповідає елементарному складу комплексу NiL_2 рис.3.20, що узгоджується з результатами досліджень комплексів нікелю з похідними 8-ГХ [55,56].

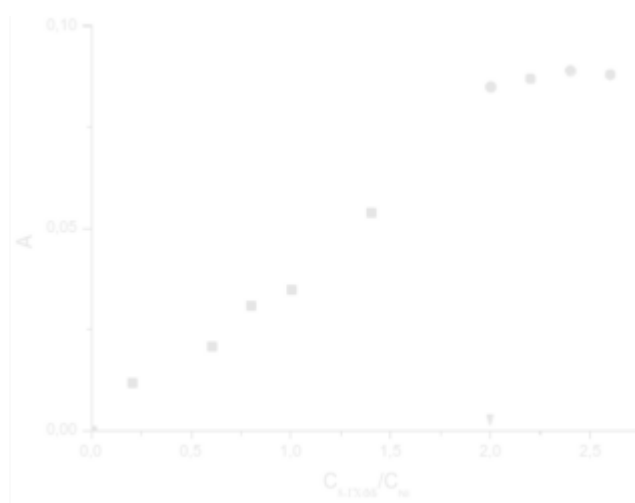


Рис.3.20. Встановлення співвідношення між компонентами комплексу методом молярних відношень на фоні 1М ацетатно-аміачного буферу. Прилад Spekol-11, $\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{Ni}=1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8-ГХФБ}=2 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$ моль/л.

3.4.5. Вплив ПВС на стабільність розчину комплексу. Досліджувані

раніше колоїди були стійкими приблизно 2 години, проте при спробі перейти до більших концентрацій барвника час до моменту видимої коагуляції різко скоротився до трохи більше, ніж 30 хв. Стабільність колоїдних розчинів залежить від багатьох факторів, деякі з них було розглянуто вище. Часто для уникнення коагуляції гідрозолі стабілізують введенням ВМС (високомолекулярних сполук) або ПАР (поверхнево активних речовин), таких як желатин, гліцерин, ПВС (полівініловий спирт). Останній із згаданих відомий також своєю здатністю до утворення гідрогелів із бороновими кислотами [57], що робить його вплив на розчин комплексу цікавим для дослідження. Ми розглянули 2 варіанти введення 1%-го розчину ПВС: перед розчином 8-ГХФБ та в останню чергу. Виявилося, що в обох випадках стабільність розчинів візуально покращилася, проте як бачимо на рис.3.21, характер утворення забарвлення у випадку додавання ПВС перед барвником узгоджується із раніше отриманим для розчину без ПВС, в той час як додавання ПВС після всіх реагентів призвело до пришвидженої появи

кольору, але і до появи каламуті, видної при просвічуванні розчинів з ліхтарика, що супроводжувалося стрибками оптичної густини.

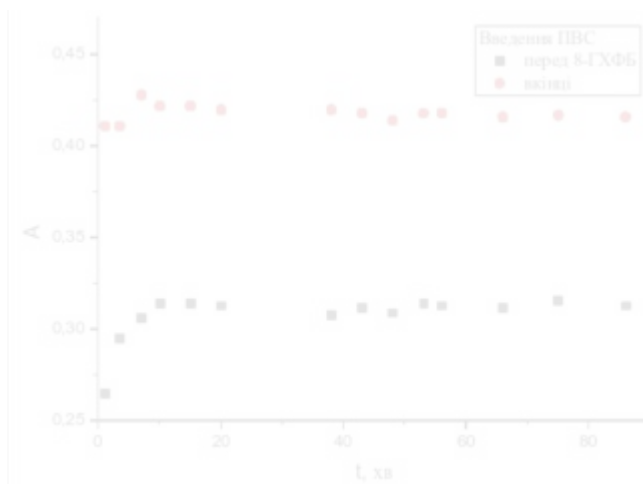


Рис.3.21. Кінетична крива утворення забарвлення внаслідок реакції між 8-ГХФБ та Ni^{2+} при $\text{pH}=3.5$ в присутності ПВС. Spegol-11 при $\lambda=550$ нм, $l=1$ см; $C_{\text{Ni}}=4 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_{8\text{-ГХФБ}}=2 \times 10^{-4}$ моль/л. Додано ПВС 0.02%

Проте, кількість ПВС, обрана для попереднього дослідження може бути недостатньою для більших концентрацій утвореного комплексу. Для порівняння зробили серію розчинів із $C_{\text{Ni}}=1.8 \times 10^{-5}$ моль/л при тій же концентрації 8-ГХФБ та додаючи 0; 0.1; 0.4; 0.6 мл 1% ПВС. Після 15 хвилин витримки оптичні густини розчинів становили відповідно: 1.508; 1.051; 1.064; 1.092, стан розчинів через 60 хвилин зображено на рис.3.22.



Рис.3.22. Зображення розчинів комплексу 8-ГХФБ та Ni^{2+} в присутності 0-0.12% ПВС через 60 хвилин після приготування.

Як бачимо, додавання ПВС покращило стабільність розчинів у всіх трьох випадках, проте у пробірці з 0.1 мл ПВС спостерігається більше світлорозсіювання, ніж у інших. Разом з тим, більший вміст стабілізатора супроводжувався також більшим значенням оптичної густини, що вказує на необхідність введення 0.08-0.12% ПВС.

3.4.6. Перспектива аналітичного застосування реакції 8-ГХФБ та Ni^{2+} . Незважаючи на широке застосування нікелю у техніці та біологічну роль в організмі людини, цей метал, як і інші перехідні метали є токсичним та може викликати низку порушень, таких як: зниження активності деяких металочутливих ферментів, порушення у синтезі білків, професійні захворювання, тощо. Поширені сьогодні спектрофотометричні методи визначення вмісту Ni^{2+} часто супроводжуються попередньою екстракцією органічними екстрагентами, наприклад, у методі визначення з диметилглюксимом використовують хлороформ у доволі великих об'ємах (декілька десятків мілілітрів). Важливим кроком до зменшення використання органічних розчинників стала розробка мікроекстракційних методик [58], проте повна відмова від токсичних реагентів поки що є проблематичною.

Зважаючи на стабільність досліджуваних раніше розчинів комплексу нікелю та 8-ГХФБ, цікаво дослідити можливість застосування реакції його

утворення для безекстракційної спектрофотометричної методики визначення іонів Ni^{2+} .

Для цього зняли спектри світлопоглинання розчинів, що містять від 0.12 до 5.87 мкг Ni^{2+} та десятикратний надлишок 8-ГХФБ відносно найбільш концентрованого розчину нікелю. Як видно на рис.3.23, характер зміни оптичної густини барвника також відповідає утворенню комплексу 1:2 (на лінії \blacktriangleleft , що відповідає концентрації Ni^{2+} – барвник 1:20, відбувається зменшення оптичної густини піку барвника на 13% при очікуваних 10%).

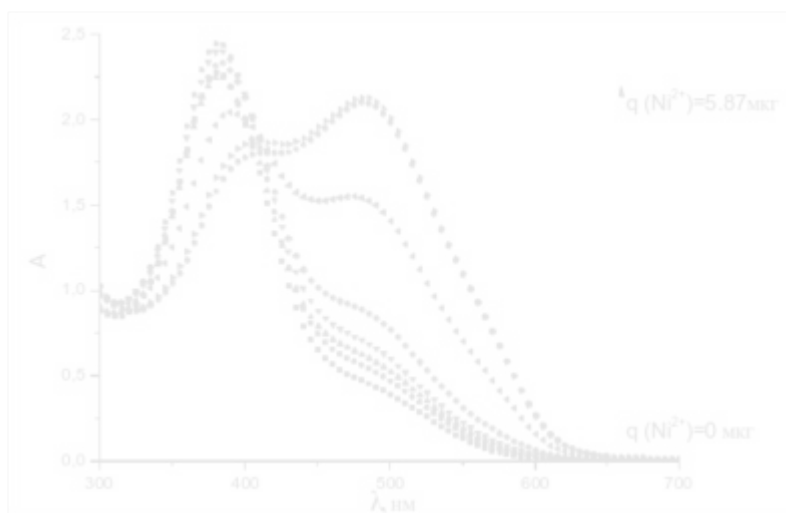


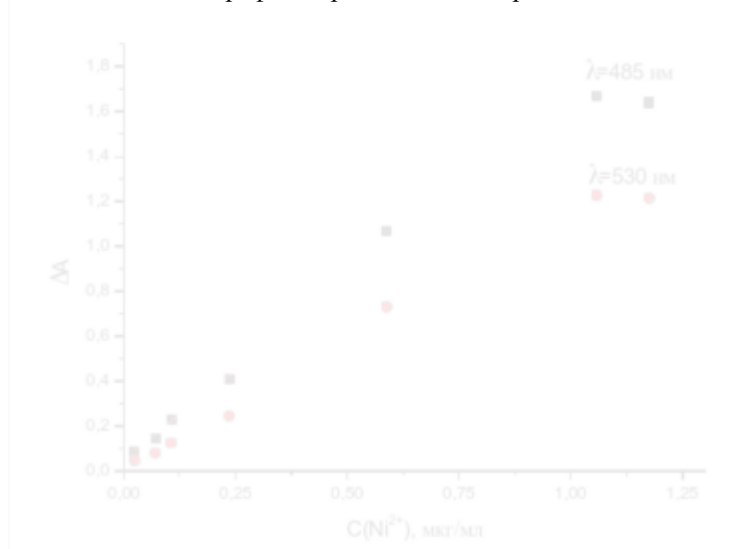
Рис.3.23. Спектри світлопоглинання розчинів з різною концентрацією Ni^{2+} при 10-кратному надлишку 8-ГХФБ; $l=1\text{ см}$

Одержані дані при $\lambda_{\text{макс}} \pm 50$ нм використали для побудови графічних залежностей між концентрацією Ni^{2+} та оптичною густиною, виміряною відносно холостого розчину. У табл.3.4 зведено результати обробки відповідних спектрофотометричних даних.

Таблиця 3.4. Параметри лінійної регресії оптичної густини від концентрації нікелю при різних довжинах хвилі

λ , нм	435	455	475	485	510	530	550
A	0,866	1,277 5	1,54	1,569 5	1,427	1,172	0,927
b	0,097 6	0,084	0,068 5	0,059 4	0,028 6	0,005 4	- 0,0051
R ²	0,985 3	0,990 9	0,993 4	0,994 2	0,996 3	0,997 1	0,997

Вибір оптимальної довжини хвилі для побудови калібрувального графіку становить певні труднощі, оскільки базується на поєднанні високої чутливості (a) та коефіцієнту кореляції (R²). З таблиці видно, що найчутливішим є вимірювання при 485 нм, проте коефіцієнт кореляції у нього нижче, ніж при 530 нм. Також вплив оптичної густини холостого розчину (b) у випадку 485 нм у 10 разів перевищує цей же параметр для 530 нм. Вигляд відповідних графіків представлено на рис.3.24.

Рис.3.24. Градувальні залежності оптичної густини від концентрації Ni²⁺ при різних довжинах хвиль

Діапазон лінійності для досліджуваної реакції від 2×10^{-2} до 1,17 мкг/мл Ni²⁺. Межа виявлення та межа визначення для вимірювань при 385 нм

становлять: $LOD_{385} = 2.6 \times 10^{-2}$ мкг/мл, $LOQ_{385} = 8.6 \times 10^{-2}$ мкг/мл, а при 430 нм – $LOD_{430} = 1 \times 10^{-2}$ мкг/мл, $LOQ_{430} = 3.3 \times 10^{-2}$ мкг/мл.

Фотометричному визначенню нікелю часто заважають іони інших металів, зокрема Cu^{2+} та Co^{2+} . Для попередньої оцінки селективності реакції (рис.3.24) обрали катіони, що давали кольоровий відгук із 8-ГХФБ під час крапельних реакцій. Найбільший вплив прослідковується для Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} та трохи менший для Ag^+ , що свідчить про необхідність дослідження впливу різних маскуючих агентів для покращення селективності.

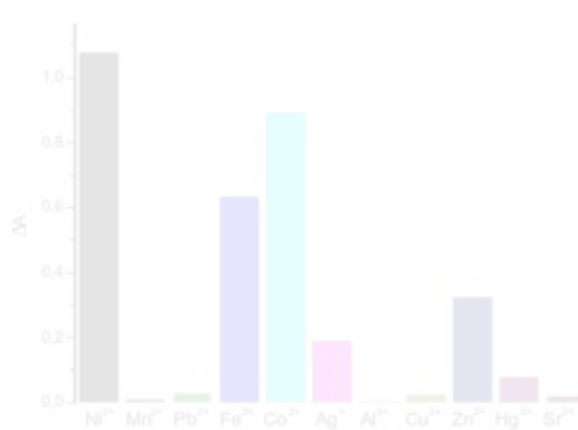


Рис.3.24. Оцінка селективності реакції 8-ГХФБ та Ni^{2+} .
 $C_{металу} = 1.8 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_{8-ГХФБ} = 2 \times 10^{-4}$ моль/л.

Отже, завдяки високій чутливості та низькій межі виявлення та визначення, реакція між 8-ГХФБ та Ni^{2+} в майбутньому може бути використана для розробки безекстракційної фотометричної методики визначення нікелю.

ВИСНОВКИ

Показано актуальність досліджень аналітичного застосування нового реагенту котрий містить реакційні аналітичні угруповання атомів різної природи на прикладі азобарвника 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату. Зроблено короткий огляд сучасного стану аналітичного застосування похідних 8-гідроксихіноліну та фенілборонових кислот, що зумовлені їх унікальними хімічними властивостями. Незважаючи на ґрунтовну вивченість даних реагентів у аналітичній практиці їх модифікація залишається цікавим напрямком досліджень науковців різних галузей.

В результаті виконання магістерської роботи було систематично досліджено протолітичні та спектрофотометричні характеристики 8-гідроксихінолін-азо-фенілборонату для чого:

- 1) синтезовано азопохідне 8-гідроксихіноліну та 3-амінофенілборної кислоти з використанням реакції азосполучення;
- 2) доведено структуру отриманого реагенту із використанням сучасних фізико-хімічних та фізичних методів дослідження;
- 3) проведено скрінінгове дослідження направлене на пошук потенційних аналітів із числа катіонів металів;
- 4) показано перспективність аналітичного застосування синтезованого молекулярного сенсора для безекстракційного спектрофотометричного визначення Ni^{2+} з достатньою селективністю.

SUMMARY

The results of the investigation of the analytical application of a new analytical reagent containing reactive analytical groups with different types of atoms - 8-hydroxyquinoline-azo-phenylboronate, are presented. Despite the thorough investigation of 8-hydroxyquinoline and phenylboronic acids in analytical practice, their modification remains an interesting research direction for scientists from various fields. The combination of these reactive centers in a single molecule has the potential to serve as a pathway for obtaining molecular sensors with regulated properties. In this work, the azo derivative of 8-hydroxyquinoline and 3-aminophenylboronic acid was synthesised using a modified method of azo coupling. The structure of the obtained reagent was confirmed using modern physicochemical and physical investigation methods (HNMR, FTIR, XPS, LC-MS, DTA, DTG). The protolytic equilibria of the dye were spectrophotometrically studied using buffers of different nature, revealing that the molecule can exist in four various forms depending on the pH of the environment. The corresponding protonation constants were determined. A screening study of potential analytes among metal cations demonstrated the promising analytical application of the synthesized molecular sensor for the extraction-free spectrophotometric determination of Ni²⁺.

Keywords: molecular sensor, azo dye, 8-hydroxyquinoline, phenylboronic acids, spectrophotometry, nickel determination.

Схожість

Джерела з Інтернету

327

1	https://www.uzhnu.edu.ua/uk/infocentre/get/8877	5 джерел	2.7%
2	https://www.uzhnu.edu.ua/uk/infocentre/get/41129	122 джерела	0.68%
3	https://www.uzhnu.edu.ua/en/infocentre/get/18767	62 джерела	0.32%
4	https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/bitstream/lib/41118/1/%d0%b0%d0%bd%d0%b0%d0%bb%d1%96%d1%82%d0%b8	2 джерела	0.29%
5	https://www.uzhnu.edu.ua/uk/cat/fchemistry-ximalalytics/science		0.25%
6	https://www.escholar.manchester.ac.uk/api/datastream?datastreamId=FULL-TEXT.PDF&publicationPid=uk-ac-man-sc	30 джерел	0.19%
7	http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1370/1/T-SENESCYT-00521.pdf		0.19%
8	https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/ra/c8ra07495j	20 джерел	0.17%
9	http://inorgchem.nuph.edu.ua/?page_id=1703	16 джерел	0.12%
10	http://referatu.net.ua/referats/%207569/154539	30 джерел	0.1%
11	http://www.library.univ.kiev.ua/ukr/host/10.23.10.100/db/ftp/visnyk/himiya_51_2015.pdf		0.1%
12	https://studfile.net/preview/8171769	8 джерел	0.1%
13	https://www.rsc.org/suppdata/ra/c3/c3ra44843f/c3ra44843f.pdf		0.1%
14	https://repository.sspu.edu.ua/bitstream/123456789/11847/1/%d0%9a%d0%b2%d0%b0%d0%bb%d1%96%d1%84%d1	3 джерела	0.1%
15	http://docplayer.ru/91901397-Visnik-doneckogo-nacionalnogo-universitetu-ser-a-prirodnichi-nauki-2011-1.html	9 джерел	0.09%
16	https://epdf.pub/-6c1554c5a2a4d4ecb99c43a6e625408d30061.html	8 джерел	0.09%
17	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35198583	5 джерел	0.09%
18	https://acikerisim.sakarya.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12619/98453/T10160.pdf?isAllowed=y&sequence=1	2 джерела	0.09%
19	https://www.uzhnu.edu.ua/uk/infocentre/get/8907		0.09%