

УДК 543.426:546.663:577.112.82:577.336

И.И. Леоненко, Д.И. Александрова, А.В. Егорова, В.П. Антонович, А.А. Карасев

НОВЫЙ КОМПЛЕКС ТЕРБИЯ (III) В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН

Методом флуоресценции исследовано взаимодействие глобулярного белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) с новым водорастворимым комплексным соединением тербия с 6-[(1-гидрокси-3-оксо-6,7-дигидро-3Н,5Н-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-2-карбонил)-амино]-гексановой кислотой (L). Обнаруженное тушение 4*f*-люминесценции комплекса в присутствии БСА объяснено образованием аддукта БСА—Тb(III)—L. В области низких концентраций БСА наблюдается статическое тушение флуоресценции зонда с константой тушения Штерна–Фольмера, равной $(6.1 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Указанный комплекс предложен для определения БСА в интервале 0.1—40.0 мкг/мл. Предел обнаружения составляет 0.03 мкг/мл.

ВВЕДЕНИЕ. Альбумин является одним из важнейших компонентов сыворотки крови, преобладающим среди сывороточных белков по количественному содержанию. Благодаря способности обратимо связывать различные низкомолекулярные вещества экзогенного и эндогенного происхождения (лекарства, яды, продукты метаболизма и т.п.) альбумин осуществляет их транспортировку к различным органам и тканям организма [1, 2]. Установлено, что связывание этих веществ с активными центрами альбумина носит неспецифический характер и осуществляется за счет различных типов взаимодействий — гидрофобных, дипольных, электростатических, посредством ван-дер-ваальсовых сил, водородных связей и др.

В биохимических исследованиях собственная флуоресценция биологических материалов не всегда позволяет получить желаемую информацию об объекте. В таком случае используют искусственные флуорофоры, то есть специально синтезированные вещества, имеющие характерный спектр флуоресценции в свободном состоянии либо при связывании с тем или иным объектом исследования. Флуоресценция таких веществ (зондов) должна отличаться высоким квантовым выходом и достаточно большим временем жизни.

Зондовая флуоресценция чувствительна к структурно-функциональным изменениям в биологических мембранах, микровязкости ее липидного бислоя, связыванию с белками и другими веществами, структурным перестройкам в белках, изменению мембранного потенциала, концентрации внутриклеточного кальция и др. Интенсивность и вре-

мя жизни флуоресценции зонда характеризуют подвижность его сольватной оболочки, поляризация флуоресценции — вращательную подвижность, ориентацию и вязкость микроокружения зонда. Тушение флуоресценции зонда посторонними веществами позволяет установить доступность флуорофора для тушителя, его локализацию в белках и мембранах клеток, а также проницаемость и скорость диффузии тушителей [3].

Широко применяемые спектрофотометрические методы определения белков (биуретовый, Лоури, Бредфорда) [4, 5] имеют ряд ограничений, в том числе по чувствительности. Более чувствительное люминесцентное определение протеинов [6] реализуют с помощью ксантеновых (FAM, TAMRA, R6G, Alexa Fluor) и цианиновых (Cy3, Cy5, Sybr Green) красителей [7, 8], комплексов алюминия с морином [9], сенсibilизированной люминесценции лантанидов в их комплексах с различными лигандами [10—24]. Перспективность использования комплексов европия (III) и тербия (III) для определения белков и их свойств связана не только с высокой чувствительностью, но и характеристичностью спектров 4*f*-люминесценции — наличием в них узких полос, большим стоксовским смещением, длительным временем жизни, что позволяет элиминировать влияние биоматрицы.

При низких концентрациях БСА взаимодействие имеет электростатическую природу в результате связывания координационно ненасыщенных комплексных соединений лантанидов с противоположно заряженными группами белка. При высоких концентрациях белка число связанных мо-

лекул резко возрастает в результате кооперативности процесса, определяющую роль при этом играют гидрофобные взаимодействия. В большинстве работ [13—19] установлено усиление интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$) лантанидных зондов при добавлении белков. Данное увеличение $I_{\text{люм}}$ авторы объясняют двумя типами взаимодействий: вследствие перекрывания спектров поглощения акцептора (лантанидный зонд) и флуоресценции донора (белок) возможен межмолекулярный перенос энергии; при оптимальных условиях эксперимента молекулы белка отрицательно заряжены и легко взаимодействуют с комплексами лантанидов, что приводит к вытеснению молекул воды из внутренней координационной сферы центрального иона и уменьшению потерь энергии за счет vibrational relaxations OH-групп.

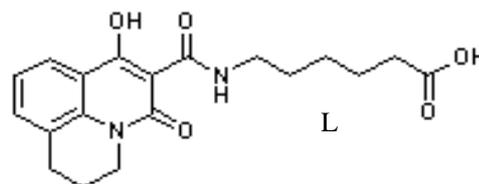
В нескольких работах описано тушение люминесценции комплексных соединений лантанидов в присутствии белков. При этом высказаны некоторые предположения о механизме тушения, который авторы связывают с разрушением комплексов-зондов [20, 21]. Эти гипотезы не подтверждены спектроскопическими данными, вызывают сомнение и требуют проверки.

Цель данной работы состояла в проведении спектрально-люминесцентного изучения свойств нового водорастворимого комплексного соединения тербия с 6-[(1-гидрокси-3-оксо-6,7-дигидро-3Н, 5Н-пиридо[3,2,1-*ij*]-хинолин-2-карбонил)-амино]-гексановой кислотой (L) и его взаимодействия с белками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. В работе использовали реактивы квалификации не ниже ч.д.а. и бидистиллированную воду. Стандартные растворы хлоридов тербия и европия (0.1 моль/л) готовили растворением соответствующих оксидов высокой чистоты, которые предварительно прокалывали в муфельной печи в течение 1 ч при 650—700 °С в концентрированной соляной кислоте с последующим выпариванием ее избытка на водяной бане. Сухой остаток растворяли в дистиллированной воде и разбавляли до необходимого объема. Концентрацию полученных растворов РЗЭ контролировали комплексонометрически с индикатором арсеназо I в уротропиновом буферном растворе при pH 7.0 ± 0.2.

Используемый реагент — 6-[(1-гидрокси-3-оксо-6,7-дигидро-3Н,5Н-пиридо[3,2,1-*ij*]-хинолин-2-карбонил)-амино]-гексановая кислота (L) — был синтезирован, идентифицирован и очищен по мето-

дике [25]. Раствор ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) реагента



получали растворением точной навески в воде с подщелачиванием 0.1 моль/л раствором NaOH до pH 7.0. Рабочие растворы реагентов готовили соответствующим разбавлением водой.

Стандартные растворы (1 мг/мл, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) БСА (белок плазмы крови крупного рогатого скота производства Sigma, молекулярная масса $6.4 \cdot 10^4$ Da) готовили растворением точной навески белка в воде и хранили при температуре 0—4 °С. Рабочие растворы готовили соответствующим разбавлением стандартных растворов.

Значение pH растворов устанавливали с помощью 40 %-го водного раствора уротропина.

Спектры возбуждения люминесценции, а также времена жизни регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian) с ксеноновой лампой 150 W. Все измерения проводили при комнатной температуре (21—23 °С). Спектры люминесценции ионов европия (III) регистрировали в области 560—650 нм с $\lambda_{\text{макс}}$ 580, 590 и 612 нм (переходы $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ и $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ соответственно), тербия (III) — в области 480—620 нм с $\lambda_{\text{макс}}$ 490, 545 и 590 нм (переходы $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ соответственно).

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu) с использованием кварцевых кювет ($l = 1$ см). Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра Lab 850 (Schott Instruments GmbH) со стеклянным электродом, калибровку которого проводили с помощью стандартных буферных растворов. Значения времен жизни возбужденного состояния ионов тербия вычисляли с использованием программного обеспечения Cary Eclipse.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Спектр поглощения лиганда (L) в водном растворе характеризуется наличием трех полос в ультрафиолетовой области спектра (рис. 1, а) с высокими молярными коэффициентами поглощения (ϵ , л·моль⁻¹·см⁻¹): $\epsilon_{334} = 5.1 \cdot 10^3$; $\epsilon_{293} = 1.99 \cdot 10^4$; $\epsilon_{236} = 4.92 \cdot 10^4$, что указывает на эффективное поглощение им световой энергии и возможность передачи ее иону лантанида.

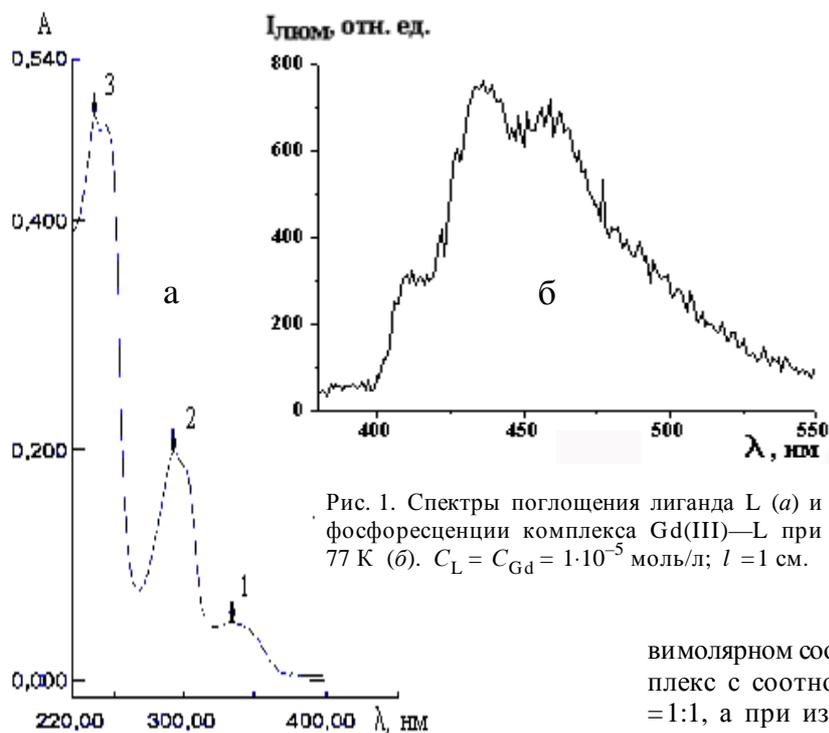


Рис. 1. Спектры поглощения лиганда L (а) и фосфоресценции комплекса Gd(III)—L при 77 К (б). $C_L = C_{Gd} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $l = 1$ см.

Энергия триплетного уровня изученного лиганда, рассчитанная [26] из спектра фосфоресценции его комплекса с ионом гадолиния (III) при 77 К (22200 см^{-1}) (рис. 1, б), значительно выше энергии уровней первого возбужденного состояния ионов Tb(III) (20500 см^{-1}) и Eu(III) (17300 см^{-1}).

Наличие полос поглощения в УФ-области спектра с высокими молярными коэффициентами поглощения, а также величина энергии триплетного уровня лиганда позволяют предположить, что в

комплексах ионов лантанидов с указанным лигандом может осуществляться эффективный перенос энергии от органической части молекулы к иону лантанида.

Поскольку взаимодействие Ln(III) с лигандом L ранее не было описано в литературе, нами установлены условия комплексообразования и изучены некоторые спектрально-люминесцентные свойства образующихся комплексов.

Было установлено, что для достижения максимальной $I_{\text{люм}}$ необходим 5-кратный избыток реагента по отношению к иону лантанида. По люминесцентным данным методом ограниченного логарифмирования установлено, что в недостатке лиганда или при эк-

вимоларном соотношении Tb(III) : L образуется комплекс с соотношением компонентов Tb(III) : L = 1:1, а при избытке лиганда — с соотношением 1:2. Комплексообразование лиганда с ионами Tb(III) протекает в широком интервале значений pH — от 3.5 до 10.0 с максимумом люминесценции при pH 7.5—8.5.

Максимумы спектра возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) изученного комплекса (рис. 2, а) находятся в УФ-области спектра при 240 и 300 нм. Наиболее интенсивной в спектрах люминесценции комплекса тербия (III) является полоса, соответствующая переходу $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ с максимумом при 545 нм (рис. 2, б).

В пользу заключения об эффективности пере-

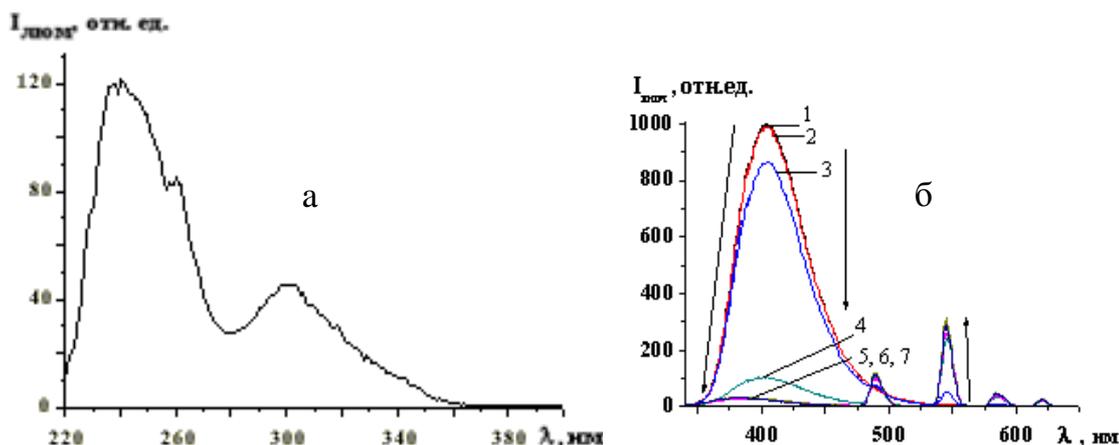


Рис. 2. Спектр возбуждения комплекса Tb(III)—L ($C_{Tb(III)} = C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); тушение собственной люминесценции L и увеличение $I_{\text{люм}}$ Tb(III) (б) в присутствии различных концентраций ионов Tb(III), моль/л: 1 — 0; 2 — $1 \cdot 10^{-7}$; 3 — $1 \cdot 10^{-6}$; 4 — $1 \cdot 10^{-5}$; 5 — $1 \cdot 10^{-4}$; 6 — $1 \cdot 10^{-3}$; 7 — $1 \cdot 10^{-2}$.

дачи энергии возбуждения от органического лиганда к иону лантанида свидетельствует тот факт, что по мере прибавления к раствору реагента (с концентрацией $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) растворов Tb(III) в различных концентрациях ($(1 \cdot 10^{-7}—1 \cdot 10^{-2})$ моль/л) наблюдается снижение интенсивности молекулярной люминесценции лиганда (рис. 2, б).

Одной из основных характеристик люминесценции является ее длительность, которая определяется временем жизни возбужденного состояния (τ). Кинетика затухания люминесценции для полос с максимумом при 545 нм для Tb(III) (5D_4) является экспоненциальной и может быть охарактеризована τ , которое для комплекса Tb(III) : L = 1:1 составляет 680 мкс.

В данной работе нами изучено влияние БСА на интенсивность люминесценции ионов тербия (III) в комплексе с L. Взаимодействие в тройной системе Tb—L—белок протекает в широком интервале значений pH — от 3.5 до 10.0 с максимумом люминесценции при pH 7.5—8.5. Изучено влияние концентраций тербия (III) и L на $I_{\text{люм}}$. Установлено, что оптимальными являются равные концентрации тербия и L ($1 \cdot 10^{-6}$ М), которые использовались нами для дальнейших исследований.

Обнаружено резкое тушение $I_{\text{люм}}$ комплекса при добавлении различных концентраций БСА (рис. 3).

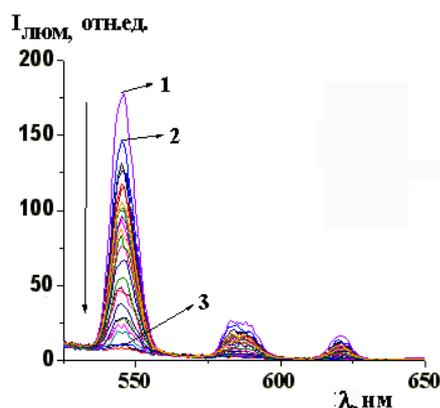


Рис. 3. Спектры люминесценции комплекса Tb(III)—L в присутствии различных концентраций БСА: 1 — 0; 2 — 0.5; 3 — 40 мкг/мл. $C_{\text{Tb}}=C_{\text{L}}=1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Белки обладают амфолитной природой и представляют собой цвиттер-ионы, которые в зависимости от pH раствора несут положительный или отрицательный избыточный заряд [27]. При оптимальных для проявления люминесценции компле-

кса Tb(III)—L значениях pH 7.5—8.5 молекулы белка несут отрицательный заряд и способны электростатически взаимодействовать с положительно заряженным ионом тербия. С другой стороны, карбоксильная группа молекулы лиганда при данном значении pH ионизирована и способна присоединяться по протонированным аминогруппам белка. Это подтверждается изменением спектров поглощения свободного лиганда и БСА (рис. 4) по сравнению с их спектрами при совместном присутствии L—БСА, что указывает на взаимодействие

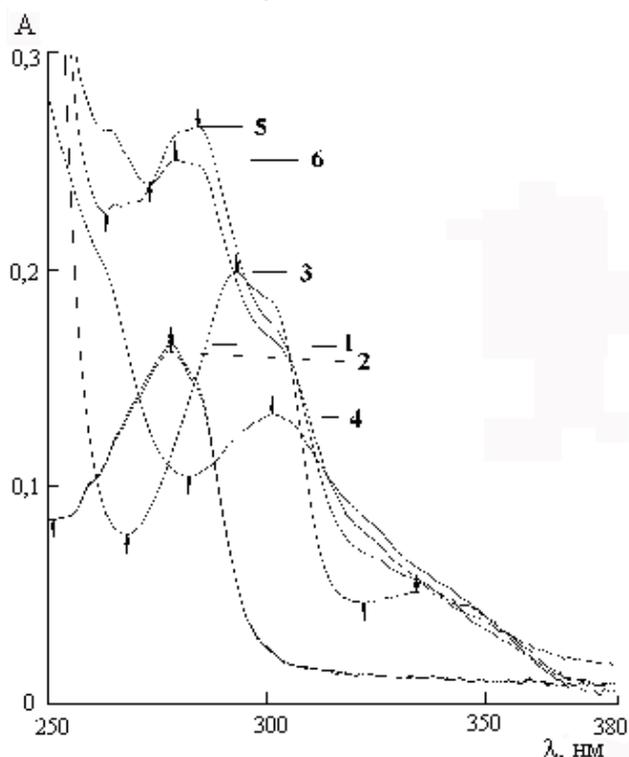


Рис. 4. Спектры поглощения: 1 — раствора БСА; 2 — раствора БСА в присутствии ионов Tb(III); 3 — раствора лиганда L; 4 — раствора комплекса Tb(III)—L; 5 — раствора БСА в присутствии лиганда; 6 — раствора БСА в присутствии комплекса Tb(III)—L. $C_{\text{Tb}}=C_{\text{L}}=1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C_{\text{БСА}}=200$ мкг/мл.

L—белок, которое возможно приводит к передаче энергии от лиганда к БСА. Также о переносе энергии свидетельствует перекрывание спектра поглощения реагента со спектрами поглощения и люминесценции белка. В результате этого происходит уменьшение передачи энергии от лиганда к иону тербия, что объясняет уменьшение интенсивности люминесценции Tb(III) в системе Tb—L—белок.

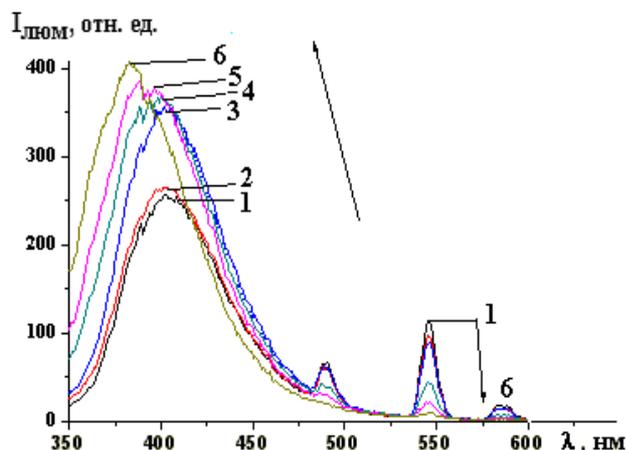


Рис. 5. Спектры люминесценции комплекса Tb(III)—L и лиганда в присутствии различных концентраций БСА: 1 — 0; 2 — 3; 3 — 5; 4 — 20; 5 — 30; 6 — 50 мкг/мл. $C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Как видно из рис. 5, при добавлении различных концентраций БСА к комплексу Tb(III)—L происходит увеличение $I_{люм}$ а также гипсохромное смещение (20 нм) максимума флуоресценции полосы лиганда. Увеличение интенсивности флуоресценции можно объяснить процессом обратного переноса энергии от иона тербия к лиганду, что связано с небольшим зазором между энергиями триплетного уровня лиганда (22200 см^{-1}) и возбужденного уровня тербия (III) 5D_4 (20500 см^{-1}). Установлено также, что в случае комплекса Eu(III)—L не наблюдается изменения $I_{люм}$ в присутствии белка и, следовательно, не реализуется процесс обратного переноса энергии, что связано со значительной разницей между энергиями триплетного уровня лиганда (22200 см^{-1}) и возбужденного уровня европия (III) 5D_0 (17300 см^{-1}). В то же время гипсохромное смещение максимума флуоресценции полосы лиганда является дополнительным свидетельством взаимодействия лиганда с белком.

Зависимость $I_{люм}$ комплекса Tb(III)—L от концентрации БСА представлена на рис. 6, а. Градуировочный график в координатах Штерна–Фольмера представлен на рис. 6, б.

Тушение $I_{люм}$ комплекса Tb(III)—L происходит за счет как динамического, так и статического механизма, о чем свидетельствует характерное отклонение вверх и вогнутость по отношению к оси ординат графика Штерна–Фольмера [28] на рис. 6, б. В обоих случаях зависимость относительной интенсивности люминесценции от концен-

трации тушителя описывается уравнением Штерна–Фольмера:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q], \quad (1)$$

где I_0 , I — интенсивность флуоресценции флуорофора в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно; $[Q]$ — концентрация тушителя; K_{SV} — константа тушения Штерна–Фольмера.

При тушении по статическому механизму K_{SV} представляет собой константу равновесия образования комплекса в основном состоянии, то есть константу комплексообразования (связывания). Полученные экспериментальные данные в области низких концентраций БСА (0.1—10.0 мкг/мл) проа-

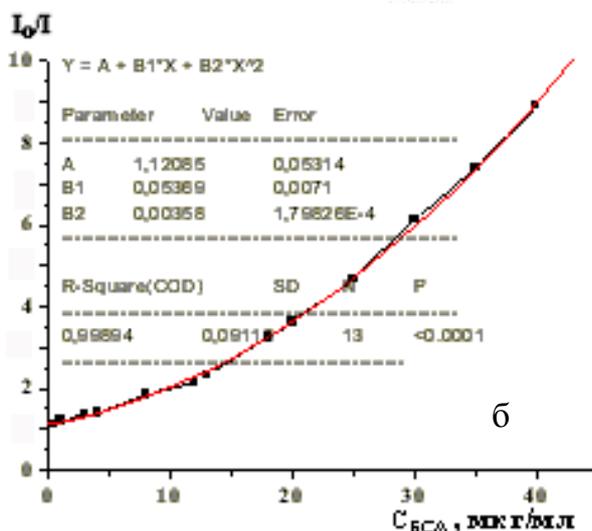
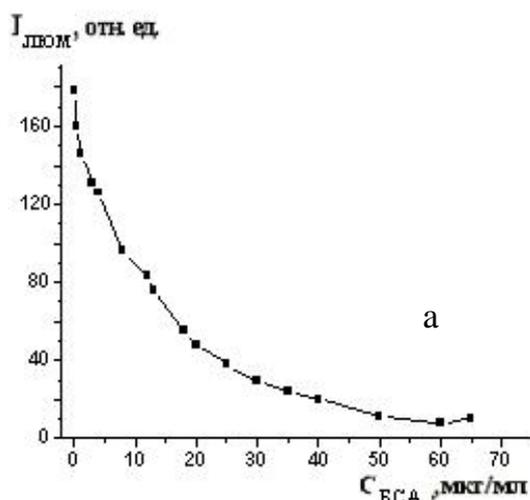


Рис. 6. Зависимость интенсивности люминесценции комплекса Tb(III)—L от концентрации БСА (а) и градуировочный график в координатах Штерна–Фольмера (б). $C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

нализированы в рамках уравнения Штерна–Фольмера. Линейный характер зависимости интенсивности флуоресценции комплекса Tb(III)–L от концентрации БСА свидетельствует об образовании аддукта Tb(III)–L–БСА. Константа образования аддукта, вычисленная по уравнению (1), равна $(6.1 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, и сопоставима с соответствующей величиной для зонда на основе комплекса Eu(III)–доксциклин [17], что характеризует близкую степень связывания данных флуоресцентных зондов с молекулами белков.

Время жизни люминесценции комплекса Tb(III)–L в присутствии различных концентраций БСА остается неизменным (рис. 7). На основании этого можно сделать вывод о существенном вкладе статической составляющей в механизм тушения, которое происходит в результате образования в основном состоянии нефлуоресцирующего аддукта Tb(III)–L–белок.

Проверена возможность определения БСА по

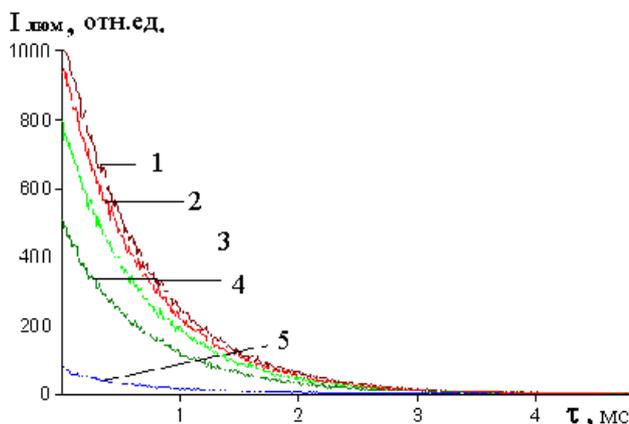


Рис. 7. Кривые затухания люминесценции комплекса Tb(III)–L в присутствии различных концентраций БСА, мкг/мл: 1 — 0 (681 мкс); 2 — 0.5 (694 мкс); 3 — 1.0 (684 мкс); 4 — 2.0 (696 мкс); 5 — 5.0 (671 мкс). $C_{\text{Tb}} = C_{\text{L}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

тушению интенсивности люминесценции комплексного соединения Tb(III)–L.

При оптимальных условиях тушение $I_{\text{люм}}$ Tb(III) в изученном комплексе наблюдается в интервале концентраций БСА 0.1–40.0 мкг/мл. Предел обнаружения составляет 0.03 мкг/мл.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ. В мерные колбы объемом 10 мл вносили по 0.5, 2.0, 5.0 мл рабочего раствора БСА (100 мкг/мл) (5 параллельных измерений). В каждую колбу прибавляли по 1.0 мл рабочих растворов хлоридов калия, натрия, каль-

Результаты определения БСА методом введено–най- дено в модельных растворах ($P=0.95$, $n=5$)

Посторонние вещества*	БСА, мкг/мл		S_r
	Введено	Найдено	
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ ,	5.0	5.2 ± 0.3	0.048
глюкоза, L-	20.0	19.4 ± 0.5	0.022
аланин	50.0	50.2 ± 1.1	0.018

* $C_{\text{Me}}^{n+} = 1 \cdot 10^{-5}$, $C_{\text{глюкоза}} = 1 \cdot 10^{-5}$, $C_{\text{L-аланин}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

ция и глюкозы ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); по 0.5 мл рабочего раствора L-аланина ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Далее в каждую колбу добавляли по 1.0 мл $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л раствора хлорида тербия, 1.0 мл $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л раствора L, 0.4 мл 40 %-го раствора уротропина. Параллельно готовили раствор контрольной пробы, который содержит все компоненты, кроме белка. Растворы доводили до 10.0 мл водой и перемешивали. Через 5 мин измеряли $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{эмис}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{возб}} = 300$ нм).

Аналитические характеристики методики: интервал линейности 0.1–40.0 мкг/мл; уравнение в координатах Штерна–Фольмера $I_0/I = 1.12 + 0.054C + 0.004C^2$, где C — концентрация БСА, мкг/мл; коэффициент корреляции $R=0.9989$. Предел обнаружения (0.03 мкг/мл) рассчитывали по 3s-критерию ($n=5$). Результаты определения БСА в модельных растворах представлены в таблице.

Предлагаемая методика характеризуется удовлетворительными метрологическими характеристиками и простотой выполнения.

ВЫВОДЫ. Обнаружено тушение бычьим сывороточным альбумином люминесценции комплекса тербия (III) с 6-[(1-гидрокси-3-оксо-6,7-дигидро-3Н,5Н-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-2-карбонил)-амино]-гексановой кислотой. Установлен смешанный механизм тушения с преобладанием статического в результате взаимодействия белка с лигандом и образования аддукта Tb(III)–L–БСА. Комплекс Tb(III)–L может быть использован в качестве флуоресцентного зонда для высокочувствительного определения БСА, а также для изучения связывания лекарственных препаратов с белками плазмы крови.

РЕЗЮМЕ. Методом флуоресценції досліджено взаємодію глобулярного білка бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з новою водорозчинною комплексною

сполукою тербію з 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3Н, 5Н-піридо[3,2,1-*ij*]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексановою кислотою (L). Виявлене гасіння 4f-люмінесценції комплексу в присутності БСА пояснене утворенням аддукту БСА—Tb(III)—L. В області низьких концентрацій БСА спостерігається статичне гасіння флуоресценції зонду з константою гасіння Штерна—Фольмера, яка дорівнює $(6.1 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Вказаний комплекс запропонований для визначення БСА в інтервалі 0.1—40.0 мкг/мл. Межа виявлення складає 0.03 мкг/мл.

SUMMARY. The interaction between bovine serum albumin (BSA) and the new water-soluble terbium complex with 6-[(1-hydroxy-3-oxo-6,7-dihydro-3H,5H-pyrido[3,2,1-*ij*]quinoline-2-carbonyl)-amino]-hexanoic acid (L) has been investigated by fluorescence method. 4f-Luminescence quenching of the complex in the presence of BSA has been explained by formation of BSA—Tb(III)—L adduct. Fluorescence static quenching of the probe has been observed in the range of low BSA concentrations with a Stern—Volmer quenching constant equal to $(6.1 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. The complex has been offered for determination of BSA in the range of 0.1—40.0 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit is 0.03 $\mu\text{g/ml}$.

1. Сорокина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. -Киев: Виш. шк., 1990.
2. Peters T. // Adv. Protein Chem. -1985. -**37**. -P. 161—245.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. - М.: Наука, 1989.
4. Альтшуллер Б.Ю., Раков С.С., Ткачев Г.А. // Вопросы мед. химии. -2001. -**47**, № 4. -С. 426—438.
5. Загребельный С.Н., Пупкова В.И. Количественные методы определения белка. Обзорная информация ВНИИ СЭНТИ. -М., 1986.
6. Sun C., Yang J., Li L. et al. // J. Chromatography B. -2004. -**803**. -P. 173—190.
7. Ярмолюк С.М. // Біополімери і клітина. -2000. -**16**, № 3. -С. 236—238.
8. Tatars A.L., Fedyunayeva I.A., Dyubko T.S. et al.

- // Anal. Chim. Acta. -2006. -**570**, № 2. -P. 214—223.
9. Wang F., Yang J., Wu X. et al. // Talanta. -2005. -**67**. -P. 836—842.
 10. Золін В.Ф., Коренева Л.Г. Редкоземельный зонд в химии и биологии. -М.: Наука, 1980.
 11. Li A., Zhao H., Jin. L. // Luminescence. -2007. -**22**, № 1. -P. 9—14.
 12. Courrol L.C., Monteiro A.M., Silva F.R.O. et al. // Optics Express. -2007. -**15**, № 11. - P. 7066—7074.
 13. Wang Y.H., Feng L., Jiang C.Q. // Spectrochim. Acta, Pt A. -2005. -**61**. -P. 2909—2914.
 14. Changying G., Xia W., Jinghe Y. et al. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. -2006. -**181**. -P. 50—55.
 15. Jia Zh., Yang J., Wu X. et al. // J. Luminescence. -2006. -**121**. -P. 535—543.
 16. Tang J., Lian N. // Anal. Sci. -2009. -**25**. -P. 1237—1242.
 17. Jiang C., Luo L. // Anal. Chim. Acta. -2004. -**506**. -P. 171—175.
 18. Liu S., Yang J., Wu X. et al. // Luminescence. -2004. -**19**. -P. 352—357.
 19. Jiang C., Luo L. // Anal. Lett. -2004. -**37**, № 6. -P. 1129—1137.
 20. Wu X., Zheng J., Guo Ch. Y. et al. // J. Luminescence. -2007. -**126**. -P. 171—176.
 21. Gao F., Luo F., Tang L. et al. // Ibid. -2008. -**128**. -P. 462—468.
 22. Harri H., Lars D., Sari P. et al. // Anal. Chem. -2008. -**80**, № 24. -P. 9781—9786.
 23. Sculimbrene B.R., Imperiali B. // J. Amer. Chem. Soc. -2006. -**128**, № 22. -P. 7346—7352.
 24. Becker C., Clayton D., Shapovalov G. et al. // Bioconjugate Chem. -2004. -**15**, № 5. -P. 1118—1124.
 25. Kutyrev A., Kappe T. // J. Heterocycl. Chem. -1997. -**34**, № 3. -P. 969—972.
 26. Паркер С. Фотолюмінесценція розчинів. -М.: Мир, 1972.
 27. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. -М.: Мир, 1985.
 28. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., 1999.