BỘ CÔNG THƯƠNG

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



NGUYỄN VĂN THỜI

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC CỦA PLUMBAGIN VỚI Cr(III), Ti(IV), Hg(II) VÀ ỨNG DỤNG

Ngành: KỸ THUẬT HOÁ HỌC

Mã ngành: 9520301

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP HỒ CHÍ MINH, NĂM 2025

DRAFT

BỘ CÔNG THƯƠNG

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN VĂN THỜI

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC CỦA PLUMBAGIN VỚI Cr(III), Ti(IV), Hg(II) VÀ ỨNG DỤNG

Ngành: Kỹ thuật Hoá học

Mã ngành: 9520301

NGƯỜI HƯỚNG DẪN

1. GS.TS. Lê Văn Tán

2. PGS.TS. Trần Nguyễn Minh Ân

DRAFT

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án tiến sĩ với đề tài "Nghiên cứu tạo phức của plumbagin với Cr(III), Ti(IV), Hg(II) và ứng dụng" là công trình nghiên cứu khoa học độc lập của tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS Lê Văn Tán và PGS.TS Trần Nguyễn Minh Ân.

Các số liệu, kết quả và tài liệu được trình bày trong luận án là trung thực, có nguồn gốc rõ ràng và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

Tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật và Hội đồng chấm luận án về tính trung thực và toàn vẹn của nội dung nghiên cứu được trình bày trong luận án này.

Họ tên tác giả

Nguyễn Văn Thời

DRAFT

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Lần đầu tiên, phức chất của PLB với Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) được nghiên cứu ở cả dạng dung dịch và rắn, đồng thời đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng trong lĩnh vực phân tích và sinh học. Các phức chất được hình thành với tỷ lệ mol Ti:PLB = 1:2, Cr:PLB = 1:3 và Hg:PLB = 1:2 trong dung môi ethanol–nước. Cơ chế dập tắt hoặc phát huỳnh quang đã được xác định, kèm theo hằng số liên kết tương đối cao ($logK_{Ti(PLB)_2} = 4{,}60$; $logK_{Cr(PLB)_3} = 4{,}52$; $logK_{Hg(PLB)_2} = 4{,}89$). Tính toán DFT cho thấy $\Delta E_{HOMO–LUMO}$ dao động 2.68–3.02 eV và phân cực hướng về ion kim loại, phù hợp với đặc tính điện tử và huỳnh quang thu được. Phức $Ti(PLB)_2$ phát huỳnh quang tại 605 nm khi kích thích ở 500 nm, cho phép định lượng Ti(IV) trong mẫu cát với độ nhạy cao, giá thành thấp và kết quả phù hợp ICP–OES. Phức $Hg(PLB)_2$ được ứng dụng định lượng Hg(II) bằng HPLC–DAD với đường chuẩn tuyến tính (200–20.000 µg/L, $R^2 = 0.9999$), LOD 59.5 µg/L và RSD < 5%. Sắc ký đồ cho thấy PLB và phức được tách hoàn toàn, đảm bảo độ chính xác phân tích.

Phức $Hg(PLB)_2$ thể hiện hoạt tính sinh học trong *vitro* nổi bật với khả năng ức chế *α-glucosidase* mạnh (IC_{50} = 40.68 ± 0.85 µM), vượt trội so với acarbose, và gây độc đáng kể trên dòng tế bào MCF-7 và HepG2 (IC_{50} lần lượt là 2.39 ± 0.21 và 1.13 ± 0.13 µM), hiệu quả hơn PLB tự do và ellipticine. Trong khi đó, $Cr(PLB)_3$ không cho thấy hoạt tính rõ rệt ở các thử nghiệm tương ứng. *Docking* và mô phỏng *dynamics* (100 ns) với các enzyme 1T8I, 3TOP, 4WCU cho thấy tương tác bền vững qua liên kết hydro và kỵ nước, với năng lượng Gibbs từ –10.45 đến –12.25 kcal/mol

Tương tác giữa $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với HSA tuân theo cơ chế dập tắt tĩnh tại vị trí IIA, làm thay đổi cấu trúc bậc hai và vi môi trường Trp214; hằng số liên kết mạnh (K_b = 2.5–3.8 × 10^4) và khoảng cách FRET ~2.5 nm cho thấy tiềm năng gắn kết và vận chuyển sinh học của các phức.

Luận án góp phần cung cấp dữ liệu nền tảng cho việc ứng dụng các phức chất trong phân tích và định hướng phát triển dược chất có nguồn gốc tự nhiên.

Từ khóa: Plumbagin, Cr(III), Hg(II), Ti(IV), Huỳnh quang, DFT, HPLC–DAD, Docking.

DRAFT

ABSTRACT

This dissertation presents the first investigation of plumbagin (PLB) complexes with Ti(IV), Cr(III), and Hg(II), focusing on their structures, interaction mechanisms, photophysical properties, and potential analytical and biomedical applications. The complexes were successfully formed in ethanol–water with molar ratios of Ti:PLB = 1:2, Cr:PLB = 1:3, and Hg:PLB = 1:2. Clear fluorescence quenching or enhancement behaviors were observed, along with relatively high binding constants ($logK_{Ti(PLB)_2} = 4{,}60$; $logK_{Cr(PLB)_3} = 4{,}52$; $logK_{Hg(PLB)_2} = 4{,}89$)

DFT/TD–DFT calculations showed that the $\Delta E_{HOMO–LUMO}$ ranged from 2.68–3.02 eV, and Mulliken charge distribution indicated strong polarization toward the metal ions, consistent with the observed electronic and fluorescence characteristics. $Ti(PLB)_2$ emitted strong fluorescence at 605 nm (λ_{ex} = 500 nm) and was effectively applied to quantify Ti(IV) in sand samples with high sensitivity and good agreement with ICP–OES. $Hg(PLB)_2$ was used for quantitative analysis of Hg(II) by HPLC–DAD, showing a good linear calibration range (200–20,000 µg/L, R^2 = 0.9999), LOD of 59.5 µg/L, and RSD < 5%. The chromatographic signals confirmed complete separation of PLB and its complex, ensuring accurate quantification.

$Hg(PLB)_2$ exhibited potent in *vitro* bioactivity, notably inhibiting *α-glucosidase* (IC_{50} = 40.68 ± 0.85 µM), surpassing acarbose, and showing superior cytotoxicity against MCF-7 and HepG2 cells (IC_{50} = 2.39 ± 0.21 and 1.13 ± 0.13 µM, respectively) compared to free PLB and ellipticine. In contrast, $Cr(PLB)_3$ showed negligible activity. Docking and 100-ns molecular dynamics simulations with enzymes 1T8I, 3TOP, and 4WCU revealed strong, stable interactions via hydrogen bonding and hydrophobic contacts, with Gibbs free energies of –10.45 to –12.25 kcal/mol.

The interaction of $Cr(PLB)_3$ and $Hg(PLB)_2$ with HSA followed a static quenching mechanism at site IIA, altering the secondary structure and Trp214 microenvironment. High binding constants (K_b=2.5–3.8 × 10^4) and a FRET distance of ~2.5 nm indicated strong affinity and potential for biological transport.

The results provide valuable insights into the design and application of novel PLB–metal complexes for analytical chemistry and contribute to the rational development of bioactive agents from natural products.

Keywords: *Plumbagin, Cr(III), Hg(II), Ti(IV), Fluorescence, DFT, HPLC–DAD, Docking.*

DRAFT

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS Lê Văn Tán và PGS.TS Trần Nguyễn Minh Ân, thầy hướng dẫn khoa học đã tận tình định hướng và đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS Nguyễn Văn Cường – Trưởng khoa, cùng quý thầy cô Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh và Phòng Quản lý Sau đại học đã tạo điều kiện thuận lợi, hỗ trợ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn Trung tâm Dịch vụ Phân tích CASE TP. HCM đã hỗ trợ tạo điều kiện cho tôi thực hiện các thí nghiệm; Sở Giáo dục và Đào tạo tỉnh Bến Tre, Ban Giám hiệu và quý thầy cô Trường THPT Chuyên Bến Tre đã tạo điều kiện về thời gian và công tác để tôi hoàn thành chương trình nghiên cứu sinh.

Tôi xin tri ân gia đình, đặc biệt là ba mẹ, anh chị và bạn bè thân thiết, những người luôn động viên, tiếp thêm nghị lực cho tôi vượt qua khó khăn.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến người bạn đời yêu quý – Nguyễn Thị Tuyền, đã luôn sẻ chia, đồng hành và là nguồn động lực lớn lao trong suốt hành trình học tập. Tôi cũng dành tình cảm yêu thương đến hai con – Ngọc Trước và Huỳnh Trước vì sự ngoan ngoãn, nỗ lực và thành tích học tập xuất sắc của các con, chính là niềm tự hào và động lực để tôi hoàn thành tốt luận án này.

Không có sự hỗ trợ quý báu đó, tôi khó có thể hoàn thành công trình này.

DRAFT

MỤC LỤC

Trang

MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
3. Đối tượng nghiên cứu 4
4. Cơ sở khoa học và cách tiếp cận của luận án 4
5. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn 6
CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN VỀ LĨNH VỰC NGHIÊN CỨU 9
1.1 Plumbagin và khả năng tạo phức với kim loại 9
1.1.1 Cấu trúc và đặc điểm của plumbagin 9
1.1.2 Đặc tính quang phổ của plumbagin 10
1.1.3 Vai trò nhóm chức -OH và C=O trong phối trí tạo phức 12
1.1.4 Phức chất của PLB với ion kim loại 13
1.1.5 Ứng dụng của PLB trong phân tích và sinh học 15
1.2 Kim loại chuyển tiếp Ti, Cr, Hg 18
1.2.1 Tính chất đặc trưng của Ti(IV), Cr(III), Hg(II) 18
1.2.2 Vai trò tiềm năng trong dược học 20
1.2.3 Phức chất của Ti(IV), Cr(III), Hg(II) 21
1.3 Phương pháp huỳnh quang trong nghiên cứu phức chất 23
1.3.1 Cơ chế phát và dập tắt huỳnh quang của các phức kim loại 23
1.3.2 Phân tích định lượng bằng phương pháp huỳnh quang 26
1.4 Các kỹ thuật phân tích trong nghiên cứu phức chất 28
1.4.1 Phổ hấp thụ UV–Vis, huỳnh quang, FT-IR, NMR, XPS, MS… 28
1.4.2 Các phương pháp in silico và tính toán lượng tử (DFT) 29
1.4.3 Phương pháp xác định liên kết và hằng số liên kết. 34
1.5 Tổng quan tình hình nghiên cứu 35
1.5.1 Nghiên cứu trong nước 35
1.5.2 Nghiên cứu ngoài nước 35
1.6 Lý do chọn đề tài 36
CHƯƠNG 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 38
2.1 Hoá chất, thiết bị và phần mềm tính toán 38

DRAFT

2.1.1 Hoá chất 38
2.1.2 Thiết bị 38
2.1.3 Phần mềm tính toán, mô phỏng 38
2.2 Phương pháp nghiên cứu thí nghiệm 40
2.2.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn, chất chỉ thị 40
2.2.2 Khảo sát phổ UV–Vis, huỳnh quang 41
2.2.3 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo phức 42
2.2.4 Xác định thành phần phức (phương pháp Job, molar ratio) 43
2.2.5 Tính toán các thông số quang học và nhiệt động 45
2.2.6 Phân tích Ti(IV) trong mẫu cát bằng phương pháp huỳnh quang 46
2.2.7 Phân tích định lượng Hg(II) bằng phương pháp HPLC–DAD 47
2.3 Phương pháp tổng hợp và đặc trưng phức rắn 48
2.3.1 Tổng hợp các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ 48
2.3.2 Phân tích đặc trưng cấu trúc 50
2.4 Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học 51
2.4.1 Thử nghiệm kháng tế bào ung thư (MTT assay) 51
2.4.2 Ức chế enzym α-glucosidase 51
2.4.3 Kháng viêm theo phương pháp ức chế NO (kháng viêm) 51
2.4.4 Đánh giá độc tính tế bào đối với dòng tế bào lành HEK-293A 52
2.5 Mô phỏng và tính toán hóa học 52
2.5.1 Mô phỏng tương tác của phức với các đích tác động 52
2.5.2 Tính toán DFT 54
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 55
3.1 Đặc điểm phức PLB với Cr(III), Hg(II) và Ti(IV) trong dung dịch 55
3.1.1 Phổ UV–Vis 55
3.1.2 Phổ huỳnh quang 57
3.1.3 Điều kiện tối ưu hình thành phức trong dung dịch 60
3.1.4 Các thông số đặc trưng trong điều kiện tối ưu 66
3.2 Nghiên cứu đặc trưng pha rắn, mô phỏng và đề xuất cấu trúc 67
3.2.1 Phân tích phổ FT-IR, NMR, HR MS 67
3.2.2 Phân tích phổ XPS 71
3.2.3 Hình thái và cấu trúc tinh thể (XRD) 77

DRAFT

3.2.4 Phân tích hình thái và cấu trúc bằng SEM–EDX/TEM.....79
3.2.5 Phân tích đặc trưng nhiệt của phức bằng TGA 81
3.2.6 Cấu trúc hình học tối ưu hóa bằng DFT.....83
3.2.7 Các thông số điện tử thu được từ tính toán DFT.....86
3.3 Nghiên cứu cơ chế và đề xuất cấu trúc của phức.....89
3.3.1 Sự hình thành phức và đề xuất cấu trúc 89
3.3.2 Bàn về cơ chế phát xạ và dập tắt huỳnh quang của phức.....91
3.4 Ứng dụng phân tích và đánh giá hoạt tính sinh học.....99
3.4.1 Đánh giá hoạt tính sinh học của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....99
3.4.2 Tương tác với HSA, docking enzyme của phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ 113
3.4.3 Ứng dụng phức $Ti(PLB)_2$ trong phân tích Ti(IV) bằng huỳnh quang....133
3.4.4 Sử dụng PLB trong phân tích định lượng Hg(II) bằng HPLC-DAD 138
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....160
1. Kết luân 160
2. Kiến nghị.....161
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 162
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....164
PHỤ LỤC.....195
LÝ LỊCH TRÍCH NGANG CỦA HỌC VIÊN 252

DRAFT

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1 Cấu trúc của PLB 9

Hình 1.2 Phổ UV–Vis của PLB trong methanol ở ba điều kiện pH: (a) trung tính, (b) acid, (c) kiềm. [17] 10

Hình 1.3 Sự thay đổi cấu trúc phân tử PLB theo điều kiện pH. 10

Hình 1.4 Sơ đồ Jablonski mô tả các quá trình hấp thụ và phát xạ huỳnh quang [67] 23

Hình 1.5 Các kiểu chuyển điện tử (LMCT, MLCT, d–d) trong phức[69]. 25

Trong hóa học phức chất, LMCT (Phối tử-to-Metal Charge Transfer) là hiện tượng electron di chuyển từ orbital giàu điện tử của phối tử (như các cặp electron tự do trên O, N, S, hoặc hệ π mở rộng) sang orbital trống của ion kim loại (Hình 1.5), đặc biệt ở các kim loại có mức oxi hóa cao như Ti(IV), Cr(III) hoặc Fe(III). Quá trình này tạo ra vùng hấp thụ mạnh trong vùng UV–Vis, thường ở khoảng 300–500 nm, và có cường độ cao do moment lưỡng cực thay đổi đáng kể [70]. 25

Hình 1.6 Các thành phần của một trường lực, đại diện cho các tương tác liên kết và không liên kết [114]. 33

Hình 2.1 Sơ đồ chung của sự gắn kết 01 hợp chất (phối tử) vào 01 enzyme 39

Hình 2.2 Mô phỏng MD của cấu dạng tối ưu phức $Hg(PLB)_2$ với enzyme 1T8I (pose 22-1T8I) thực hiện bằng Desmond–Schrödinger trên Linux. 40

Hình 2.3 Sơ đồ tổng hợp phức rắn (a) Phức $Ti(PLB)_2$; (b) phức $Cr(PLB)_3$, (c) Phức $Hg(PLB)_2$ 49

Hình 3.1 Phổ UV–Vis của: (a) PLB trong môi trường acid/base (EtOH–H_2O); (b) PLB và phức $Ti(PLB)_2$ (pH=5); (c) Phức $Ti(PLB)_2$ với nồng độ tăng dần (pH=5); (d) Phổ hấp thụ của PLB, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ (pH=6,5); (e) Phức $Cr(PLB)_3$ với nồng độ tăng dần (pH=6,5); (f) Phức $Hg(PLB)_2$ với nồng độ tăng dần (pH=6,5) 56

Hình 3.2 Phổ huỳnh quang của: (a) PLB, Ti(IV) và $Ti(PLB)_2$ (λ_{ex} = 500 nm, pH = 5); (b) PLB, Cr(III) và $Cr(PLB)_3$ (λ_{ex} = 310 nm, pH = 6,5); (c) PLB, Hg(II) và $Hg(PLB)_2$ (λ_{ex} = 310 nm, pH = 6,5); (d) $Ti(PLB)_2$ nồng độ tăng dần (pH = 5); (e) $Cr(PLB)_3$ nồng độ tăng dần (pH = 6,5); (f) $Hg(PLB)_2$ nồng độ tăng dần (pH = 6,5). 58

Hình 3.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành phức $Ti(PLB)_2$: (a) pH; (b) thời gian; (c) tỉ lệ EtOH–H_2O; (d) loại dung môi; (e) biểu đồ Job; (f) đường chuẩn Benesi–Hildebrand (λ_{ex}= 500 nm, λ_{em} = 605 nm). 60

Hình 3.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến hình thành phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) pH; (b)thời gian; (c)loại dung môi; (d) tỉ lệ EtOH:H_2O; (λ_{ex}=310nm, λ_{em}=436 nm). 62
Hình 3.5 Thành phần và hằng số bền: (a, c) Job's plot của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$; (b, d) Benesi–Hildebrand xác định K của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....63
Hình 3.6 Phổ XPS của phức $Ti(PLB)_2$: (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Ti2p.....72
Hình 3.7 Phổ XPS của phức $Cr(PLB)_3$: (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Cr2p.....73
Hình 3.8 Phổ XPS của phức $Hg(PLB)_2$ (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Hg4f.....74
Hình 3.13 (a) Giản đồ nhiễu xạ XRD của PLB và $Ti(PLB)_2$; (b) Giản đồ XRD của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....77
Hình 3.9 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Ti(PLB)_2$.....79
Hình 3.10 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Cr(PLB)_3$.....79
Hình 3.11 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Hg(PLB)_2$.....80
Hình 3.12 (a) Đường TGA của PLB và phức $Ti(PLB)_2$; (b) Đường TGA của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....81
Hình 3.14 Cấu trúc tối ưu hóa của các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....85
Hình 3.15 Biểu diễn HOMO–LUMO và khoảng cách năng lượng ΔE_{gap} của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ 86
Hình 3.16 Cấu trúc đề xuất của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.....89
Hình 3.17 Liên kết phối trí PLB → M^{n+} theo kiểu LP(O) → d*(M).....89
Hình 3.18 Cơ chế phát huỳnh quang của phức $Ti(PLB)_2$.....91
Hình 3.19 Cơ chế phát và dập huỳnh quang của PLB khi tạo phức với Cr(III) và Hg(II). 93
Hình 3.20 Sơ đồ Jablonski minh họa cơ chế dập huỳnh quang do hiệu ứng nguyên tử nặng của Hg(II) trong phức $Hg(PLB)_2$.....96
Hình 3.21 Tác dụng ức chế tế bào của PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và ellipticine trên dòng tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A (a–b) và ba dòng tế bào ung thư ở người: MCF-7 (c–d), HepG2 (e–f), A549 (g–h). *(a, c, e, g): Tỷ lệ % ức chế theo nồng độ. (b, d, f, h):* Giá trị IC_{50} (μM) tương ứng. 100
Hình 3.22 Hoạt tính ức chế *enzym α-glucosidase* của PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và acarbose 102

DRAFT

Hình 3.23 Khả năng ức chế NO (a) và độc tính tế bào (b) của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ so với dexamethasone trên dòng tế bào RAW 264.7. 103
Hình 3.24 Mô phỏng *docking* phức $Hg(PLB)_2$ với enzyme *1T8I* 105
Hình 3.25 Tương tác giữa $Hg(PLB)_2$ (pose 494) và 3TOP gồm sơ đồ 2D, mô hình 3D, bản đồ tương tác thứ cấp và so sánh với acarbose. 106
Hình 3.26 Tương tác giữa phức $Hg(PLB)_2$ (pose 465) và enzyme 4WCU 107
Hình 3.27 Chồng khớp các pose của $Hg(PLB)_2$ với phối tử chuẩn sau redocking trên *1T8I, 3TOP và 4WCU* 108
Hình 3.28 Mô phỏng MD 100 ns của phức $Hg(PLB)_2$ (pose 223) với enzyme 1T8I 109
Hình 3.29 Phổ UV–Vis của HSA có và không có $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ 113
Hình 3.30 Phổ huỳnh quang của HSA trước và sau khi thêm $Cr(PLB)_3$ (trái) và $Hg(PLB)_2$ (phải) ở các nồng độ tăng dần (λ_{ex} = 280 nm, T = 298 K, pH 7,4)....115
Hình 3.31 Đồ thị Stern–Volmer ở ba nhiệt độ của: (a) $Cr(PLB)_3$-HSA; (b) $Hg(PLB)_2$ -HSA. 116
Hình 3.32 Đồ thị Stern–Volmer hiệu chỉnh ở ba nhiệt độ:(a) HSA–$Cr(PLB)_3$; (b) HSA–$Hg(PLB)_2$. 117
Hình 3.33 Đồ thị log kép tại ba nhiệt độ của: (a) $Cr(PLB)_3$-HAS; (b) $Hg(PLB)_2$ -HSA. 118
Hình 3.34 Đồ thị Van't Hoff của hệ: (a) $Cr(PLB)_3$–HAS; (b) $Hg(PLB)_2$–HSA....119
Hình 3.35 Phổ huỳnh quang đồng bộ ($\Delta\lambda$ = 15 và 60 nm) của HSA khi tương tác với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$, $\Delta\lambda$ = 15 nm; (b) HSA + $Cr(PLB)_3$, $\Delta\lambda$ = 60 nm; (c) HSA + $Hg(PLB)_2$, $\Delta\lambda$ = 15 nm; (d) HSA + $Hg(PLB)_2$, $\Delta\lambda$ = 60 nm....122
Hình 3.36 Chồng lấp phổ huỳnh quang HSA và phổ hấp thụ của các phức: (a) HAS và $Cr(PLB)_3$; (b) HSA và $Hg(PLB)_2$....123
Hình 3.37 Phổ huỳnh quang 3D của HSA khi tương tác với các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) HSA tự do; (b) HSA + $Cr(PLB)_3$; (c) HSA + $Hg(PLB)_2$; (d) So sánh cường độ huỳnh quang tại các peak đặc trưng. 124
Hình 3.38 Biểu đồ thay thế đầu dò ketoprofen và ibuprofen trên HSA khi có mặt các phức: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$; (b) HSA + $Hg(PLB)_2$ 126
Hình 3.39 Phổ Circular Dichroism (CD) của HSA khi tương tác với các phức: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$; (b) HSA + $Hg(PLB)_2$. 127
Hình 3.40 Tương tác giữa $Cr(PLB)_3$ và enzyme 1HA2: (a) Liên kết hydro với Gly190; (b) Sơ đồ 2D các tương tác chính; (c) Mô hình 3D vùng hoạt hóa. 129

DRAFT

Hình 3.41 Tương tác giữa $Hg(PLB)_2$ và enzyme 1HA2: (a) Liên kết hydro với Tyr161; (b) Sơ đồ 2D các tương tác chính; (c) Mô hình 3D vùng hoạt hóa 130

Hình 3.42 Cấu hình pose 577 (màu đỏ) được chồng khớp với cấu hình pose 596 (màu vàng) trong quá trình xác thực mô hình docking 131

Hình 3.43 Tính chọn lọc huỳnh quang của PLB đối với Ti(IV): (a) Ảnh chụp mẫu PLB sau khi thêm các ion kim loại khác nhau; (b) Phổ huỳnh quang của phức Ti(IV)–PLB so sánh với PLB–M^{n+};(c) Biểu đồ so sánh tỉ lệ [M]/[Ti(IV)] gây ảnh hưởng cường độ huỳnh quang của phức $Ti(PLB)_2$.....133

Hình 3.44 Sự phụ thuộc cường độ huỳnh quang của PLB vào nồng độ Ti(IV) 135

Hình 3.45 Phổ UV–Vis và sắc ký HPLC của PLB và phức $Hg(PLB)_2$.....139

Hình 3.46 (a) pH và thời gian lưu; (b) Nhiệt độ cột HPLC; (c) Tỷ lệ H_2O:EtOH; (d) Tỷ lệ H_2O:ACN 141

Hình 3.47 Đánh giá giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại và độ chính xác của phương pháp HPLC-DAD với phức $Hg(PLB)_2$: (a) Tỷ lệ tín hiệu/nhiễu (S/N) theo nồng độ chuẩn (µg/L); (b) Độ lệch chuẩn tương đối (RSD, %); (c) Hệ số tương quan (R) của đường chuẩn; (d) Hiệu suất thu hồi (%) 146

Hình 3.48 Đường chuẩn HPLC–DAD của phức $Hg(PLB)_2$.....148

DRAFT

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2.1 Tỷ lệ mol trong các mẫu Job's plot (thể tích cố định 5,0 mL) 44
Bảng 3.1 Tổng hợp điều kiện tối ưu của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ 64
Bảng 3.2 Các thông số quang học và hóa lý của các phức 66
Bảng 3.3 Tổng kết các tín hiệu đặc trưng của NMR của 3 phức 70
Bảng 3.4 Tổng hợp kết quả phân tích phổ XPS của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ 75
Bảng 3.5 Các thông số cấu trúc hình học tối ưu hóa bằng DFT 83
Bảng 3.6 Các tham số điện tử và tương tác phối trí của các phức từ kết quả tính toán DFT và phân tích NBO. 87
Bảng 3.7 Tóm tắt cơ chế dập huỳnh quang của Cr(III), Hg(II) 95
Bảng 3.8 Kết quả docking nổi bật của các tư thế tốt nhất giữa các phức với các enzyme đích: 1T8I (chống ung thư), 3TOP (ức chế α-glucosidase) và 4WCU (chống viêm) 106
Bảng 3.9 Thông số nhiệt động học ($\Delta H°$, $\Delta S°$, $\Delta G°$) của tương tác giữa $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$, PLB và HSA tại các nhiệt độ khác nhau. 120
Bảng 3.10 Bảng So sánh đặc điểm tương tác với HSA của 2 phức 121
Bảng 3.11 Khoảng cách cho nhận năng lượng giữa HSA và các phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ theo lý thuyết FRET 124
Bảng 3.12 Biến đổi bước sóng đồng bộ và α-helix của HSA khi tạo phức với $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và PLB 127
Bảng 3.13 Kết quả phân tích hàm lượng Ti trong mẫu cát Bình Thuận 136
Bảng 3.14 Các điều kiện tối ưu cho phương pháp HPLC–DAD xác định Hg(II) dựa trên phức $Hg(PLB)_2$ 139
Bảng 3.15 Khảo sát thành phần pha động ảnh hưởng đến phân tích phức $Hg(PLB)_2$ 143
Bảng 3.16 Các thông số phù hợp hệ thống được ghi nhận trong điều kiện tối ưu (tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; nồng độ: 3ppm; bước sóng: 224nm; pH = 6; pha động H_2O:EtOH = 5:5; nhiệt độ: 40°C) 145
Bảng 3.17 Hệ số tương quan R ứng với các khoảng nồng độ khảo sát Hg(II) 147
Bảng 3.18 Kết quả kiểm tra độ lặp lại trong mẫu nước 150
Bảng 3.19 Hiệu suất thu hồi Hg(II) trong mẫu nước sông tại ba mức nồng độ chuẩn thêm (0,5; 1; 2 µg/L) kèm sai số 153

DRAFT

Bảng 3.20 So sánh hiệu quả các phương pháp phân tích Hg(II) 156
Bảng 3.21 Kết quả xác định hàm lượng Hg(II) trong một số mẫu nước mặt. *(Đơn vị: mg/L – theo tiêu chuẩn NF A08-811 và US EPA Method 200.8)*.....157
Bảng 3.22 Tóm tắt các điều kiện tối ưu và đặc tính của phương pháp HPLC–DAD sử dụng phức $Hg(PLB)_2$ trong phân tích Hg(II) 159

DRAFT

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy	Phổ hấp thụ nguyên tử
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity	Hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính
CHEF	Chelation-Enhanced Fluorescence	Huỳnh quang tăng cường nhờ phức hóa
DAD	Diode Array Detector	
DFT	Density Functional Theory	Lý thuyết hàm mật độ
DNA	Deoxyribonucleic Acid – ADN	Acid deoxyribonucleic (ADN)
EDX	Energy Dispersive X-ray	Tán xạ năng lượng tia X
FRET	Förster Resonance Energy Transfer	Truyền năng lượng cộng hưởng Förster
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
HOMO–LUMO	Highest Occupied Molecular Orbital – Lowest Unoccupied Molecular Orbital	Orbital chiếm cao nhất – orbital trống thấp nhất
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao
HSA	Human Serum Albumin	Albumin huyết thanh người
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế 50%
ICT	Intramolecular Charge Transfer	Chuyển điện tích nội phân tử
ISC	Intersystem Crossing	Chuyển hệ

DRAFT

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Liên minh quốc tế hóa học lý thuyết và ứng dụng
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
MD	Molecular Dynamics	Giới hạn định lượng
MLCT	Metal-to-Phối tử Charge Transfer	Chuyển điện tích từ kim loại sang phối tử
NBO	Natural Bond Orbital	Orbital liên kết tự nhiên
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
PDB	Protein Data Bank	Cơ sở dữ liệu Protein
pKa		Hằng số phân ly acid
PLB	Plumbagin	Plumbagin
RMSD	Root Mean Square Deviation	Sai số bình phương trung bình căn bậc hai
SEM	Scanning Electron Microscopy	Hiển vi điện tử quét
TEM	Transmission Electron Microscopy	Hiển vi điện tử truyền qua
TGA	Thermogravimetric Analysis	Phân tích nhiệt trọng lượng
UV–Vis	Ultraviolet–Visible Spectroscopy	Phổ tử ngoại – khả kiến
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy	Phổ quang điện tử tia X
XRD	X-ray Diffraction	Nhiễu xạ tia X

DRAFT

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đã trở thành một trong những trọng tâm nghiên cứu, đặc biệt trong các lĩnh vực hóa dược, sinh học phân tử, khoa học vật liệu và phân tích. Với sự đa dạng về cấu trúc và hoạt tính sinh học phong phú, các hợp chất tự nhiên được xem như nguồn tiền chất quý giá để phát triển các chất điều trị mới, chất đánh dấu sinh học cũng như các vật liệu cảm biến.

Trong số các hợp chất thiên nhiên đó phải kể đến PLB (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) đã thu hút sự chú ý đáng kể nhờ có hoạt tính sinh học nổi bật như kháng tế bào ung thư, kháng viêm và kháng khuẩn. PLB đã được nghiên cứu rộng rãi, tuy nhiên các phức chất của nó với ion kim loại vẫn chưa được khai thác nhiều. Sự phối trí với ion kim loại có thể làm thay đổi đáng kể một số tính chất hóa lý của PLB, đồng thời tạo ra các hiệu ứng quang học đặc trưng có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu và phân tích. Việc hình thành phức chất không chỉ ảnh hưởng đến độ tan và độ bền của PLB, mà còn có thể làm thay đổi hoặc tăng cường hoạt tính sinh học của nó. Trong Hóa phân tích, một số phức chất có tính chất huỳnh quang được sử dụng như đầu dò phát hiện chọn lọc các ion kim loại nặng, hoặc như chất chỉ thị trong phân tích. Do đó, việc nghiên cứu các phức chất này sẽ đóng góp đáng kể vào sự phát triển của ngành dược học và hóa học phân tích. Các phức chất này có thể mang lại những đặc tính vượt trội so với PLB hoặc các ion kim loại riêng lẻ.

Hg(II), Cr(III) và Ti(IV) là các kim loại chuyển tiếp có vai trò lớn trong đời sống, và có ý nghĩa trong các nghiên cứu sinh học cũng như phân tích. Các phức chất Cr(III), như chromium picolinate, được cho là thành phần của yếu tố dung nạp glucose (GTF), có vai trò hỗ trợ insulin bằng cách tăng độ nhạy của tế bào với insulin, từ đó góp phần điều hòa đường huyết hiệu quả [1]. Mặc dù Hg(II) nổi tiếng với độc tính cao, một số phức chất hữu cơ của Hg(II), như thimerosal hoặc calomel, đã từng được sử dụng trong y học cổ điển như thuốc sát trùng, bảo quản

vaccine hoặc thuốc lợi tiểu [2]. Các phức chất Ti(IV), đặc biệt là titanocene dichloride (Cp_2TiCl_2), đã được nghiên cứu như tác nhân kháng ung thư đầy tiềm năng. Trong phân tích, các phức chất của Hg(II), Cr(III) và Ti(IV) được sử dụng rộng rãi làm thuốc thử hoặc chất chỉ thị. Chẳng hạn, phức chất Cr(III) được dùng để định lượng các chất õi hóa mạnh. Phức chất của Hg(II) được ứng dụng trong chuẩn độ kết tủa và tạo phức, đặc biệt là trong việc xác định các ion CN^-. Các phức chất của Ti(IV) thường được sử dụng trong phân tích quang phổ để định lượng hydrogen peroxide hoặc F^- do khả năng tạo phức màu đặc trưng với các chất này.

Hiện nay, việc ứng dụng các công cụ tin học trong nghiên cứu hóa học, đặc biệt là các phương pháp dựa trên cơ học lượng tử (quantum mechanics) và cơ học phân tử (molecular mechanics), ngày càng được quan tâm nhờ khả năng xử lý dữ liệu lớn (big data), hiệu quả kinh tế, độ tin cậy mô hình cao và khả năng mô phỏng thực nghiệm. Trong đó, lý thuyết hàm mật độ (Density Functional Theory – DFT) được sử dụng phổ biến để tính toán các thông số điện tử như năng lượng HOMO, LUMO, từ đó dự báo khả năng phản ứng, hấp thụ hoặc phát xạ của phân tử. Đối với đề tài này, các công cụ *in silico* cũng được áp dụng để khảo sát cơ chế gắn kết của PLB và các phức với các enzyme và protein đích. Phương pháp docking phân tử cho phép mô phỏng sự tương tác của phối tử với các vị trí hoạt hóa, xác định các liên kết quan trọng (hydro, hydrophobic, π–π stacking…), đồng thời dự đoán khả năng ức chế sinh học. Độ chính xác của mô hình *docking* thường được đánh giá thông qua chỉ số sai số bình phương trung bình (RMSD), trong khi đặc tính dược động học được phân tích bằng mô hình ADMET.

Trong định hướng chung, chúng tôi tập trung khai thác khả năng tạo phức của plumbagin (PLB) với các ion kim loại chuyển tiếp nhằm điều chỉnh tính chất quang và mở rộng tiềm năng ứng dụng phân tích cũng như sinh học của phối tử này. Tổng quan tài liệu cho thấy phức chất của PLB đã được nghiên cứu khá rộng, liên quan đến nhiều ion kim loại như Sn(IV), Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II), Mn(II), Ag(I), Mo(VI), Pd(II), Ru(III), W(VI), Pt(II) cùng một số ion đất hiếm như Y(III), La(III),

DRAFT

Nd(III), Gd(III), Sm(III), Eu(III), Er(III)… Tuy vậy, đến thời điểm hiện nay, gần như chưa có công bố hệ thống nào đề cập đến sự tạo phức của PLB với Cr(III), Hg(II) và Ti(IV).

Xuất phát từ yêu cầu vừa đảm bảo tính mới của hệ phức chưa được báo cáo, vừa tìm kiếm các tín hiệu phổ đặc trưng có thể khai thác, chúng tôi tiến hành khảo sát phổ hấp thụ và huỳnh quang của PLB với nhiều ion kim loại khác nhau. Kết quả cho thấy chỉ ba ion Cr(III), Hg(II) và Ti(IV) tạo ra những biến đổi phổ rõ rệt: phức Ti(IV) xuất hiện dải hấp thụ mới và làm tăng huỳnh quang, trong khi các phức Cr(III) và Hg(II) gây dập tắt huỳnh quang theo những cơ chế khác biệt. Sự đối lập về quang học, đồng thời với khoảng trống nghiên cứu nêu trên, tạo cơ sở khoa học để lựa chọn ba ion kim loại Cr, Hg và Ti làm đối tượng chính của luận án. Trên cơ sở này, luận án được thực hiện với đề tài: "Nghiên cứu tạo phức của PLB với Cr(III), Ti(IV), Hg(II) và ứng dụng", với mục tiêu, nội dung và các điểm mới được trình bày cụ thể trong những phần tiếp theo

2.1 Mục tiêu tổng quát

Luận án tổng hợp thành công các phức chất giữa PLB với các ion kim loại Cr(III), Ti(IV) và Hg(II), đồng thời bước đầu làm rõ cấu trúc, cơ chế phản ứng và khả năng ứng dụng của các phức chất trong lĩnh vực phân tích, sinh học và hóa dược.

2.2 Mục tiêu cụ thể

- Tổng hợp và khảo sát điều kiện tối ưu hình thành các phức chất của PLB với Cr(III), Ti(IV) và Hg(II) ở cả hai trạng thái dung dịch và rắn, xác định tỷ lệ phối trí và điều kiện tối ưu cho sự hình thành phức;

- Xác định các tính chất lý hóa của các phức chất;

- Giải thích cơ chế phát huỳnh quang hoặc dập tắt huỳnh quang của các phức chất thông qua phân tích thực nghiệm (Stern–Volmer, UV-Vis, ảnh hưởng môi trường). Mô phỏng lý thuyết (DFT, Mulliken/NBO, HOMO–LUMO);

DRAFT

Đánh giá khả năng tương tác sinh học với protein HSA và enzyme bằng mô hình *docking* phân tử, hoạt tính kháng viêm, kháng tế bào ung thư của các phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$. Ứng dụng vào phân tích Ti(IV) trong mẫu thật bằng phương pháp huỳnh quang, xác định Hg bằng phương pháp HPLC-DAD dựa trên phức $Hg(PLB)_2$.

- Giải thích mối liên hệ giữa cấu trúc, tính chất phức.

3. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là PLB, các ion Cr(III), Ti(IV), Hg(II) và các phức chất tạo thành giữa PLB với các ion kim loại nói trên.

4. Cơ sở khoa học và cách tiếp cận của luận án

4.1 Cơ sở khoa học

Cơ sở khoa học chung của nghiên cứu này là sự hiểu biết về khả năng tạo phức của PLB với các ion kim loại. Sự tạo phức đã làm thay đổi các tính chất hóa học, hóa lý và sinh học của PLB và ion kim loại riêng lẻ. Trên cơ sở đó mở ra định hướng ứng dụng trong dược học và phương pháp phân tích mới dựa trên thuốc thử PLB.

Các cơ sở cụ thể như sau:

PLB có chứa nhóm hydroxyl phenolic và carbonyl, nhóm chức này có khả năng tạo liên kết phối trí với các ion kim loại chuyển tiếp thông qua các nguyên tử O còn đôi điện tử chưa liên kết [3 - 4];

Đặc điểm của các ion kim loại Cr(III), Ti(IV), Hg(II) đều có điện tử trên phân lớp d có khả năng tạo phức với các phối tử chứa O hoặc N. Cr(III) là ion có tính ái lực cao với O [5], Ti(IV) có khả năng tương tác điện tử mạnh [6], và Hg(II) có xu hướng tạo phức bền với các phối tử mềm [7]. Sự khác biệt đặc điểm điện tử làm cơ sở nghiên cứu;

Sự hình thành phức chất là kết quả của sự tương tác acid-base Lewis, phối tử PLB đóng vai trò là base Lewis (cho electron) và ion kim loại đóng vai trò là acid Lewis (nhận electron). Cấu trúc và độ bền của phức phụ thuộc vào bản chất của kim loại,

DRAFT

phối tử, tỷ lệ mol, pH, và dung môi. Trên cơ sở sử dụng các kỹ thuật UV–Vis, huỳnh quang, FT-IR, NMR, HR-MS, XPS, XRD, TGA… cấu trúc, thành phần của phức sẽ được xác nhận;

PLB tạo phức với các ion kim loại, hoạt tính sinh học của phức chất có thể được thay đổi so với phối tử hoặc ion kim loại riêng lẻ. Các nghiên cứu liên quan trước đây phức chất kim loại–quinone đã được chứng minh là có khả năng kháng tế bào ung thư, kháng viêm và ức chế enzym [8 - 9]

Các công cụ tính toán hiện đại, tiêu biểu là *docking* phân tử và mô phỏng động lực học phân tử (MD), đã trở thành nền tảng quan trọng trong hóa học tính toán và dược học. Những phương pháp này không chỉ hỗ trợ dự đoán cấu trúc và năng lượng liên kết của phức chất, mà còn được ứng dụng rộng rãi trong sàng lọc hoạt chất và thiết kế, phát triển thuốc nhờ khả năng dự đoán cơ chế gắn kết giữa phối tử và protein đích, xác định các tương tác quan trọng và ước tính ái lực liên kết [10 -11]. Nhờ vậy, *docking* và các phương pháp *in silico* đã được công nhận là những công cụ khoa học đáng tin cậy, hỗ trợ hiệu quả cho các nghiên cứu thực nghiệm trong lĩnh vực dược học hiện đại.

Trên cơ sở thay đổi các tính chất quang phổ, nghiên cứu các điều kiện tối ưu của phức để tìm kiến khả năng ứng dụng vào phân tích nguyên tố và ngược lai.

4.2 Cách tiếp cận nghiên cứu của luận án

Để đạt được các mục tiêu đề ra, luận án áp dụng cách tiếp cận gồm các bước chính sau:

- Phát hiện ra các tín hiệu hình thành phức dựa trên phổ UV-vis, Huỳnh quang;

- Khảo sát các điều kiện tối ưu tạo phức trong dung dịch (pH, Dung môi, nhiệt độ, thanh phần phức, và hằng số bền phức …);

- Tổng hợp và phân tích đặc trưng cấu trúc bằng các phương pháp hoá lý hiện đại (FT-IR, NMR, HR-MS, XRD, TGA, SEM EDX…);

DRAFT

- Cơ chế và đề xuất cấu trúc trên cơ sở khảo sát cơ chế phát/ dập tắt huỳnh quang kết hợp mô phỏng DFT/TD-DFT để tối ưu cấu trúc;

- Nghiên cứu trong *vitro* hoạt tính kháng khuẩn, kháng tế bào ung thư, kháng viêm, kháng oxy hóa;

- Nghiên cứu tương tác của phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ với HSA trên cơ sở đó biết được khả năng liên kết vào các vị trí trên chuỗi HSA làm cơ sở để nghiên cứu dẫn truyền thuốc cho các nghiên cứu sau luận án.

- Ứng dụng trong phân tích, trên cơ sở các kết quả đã thu được tập trung phát triển các phương pháp phân tích định lượng ion kim loại dựa trên cơ sở phổ huỳnh quang và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC–UV/Vis).

- Tính toán, phân tích và đánh giá hiệu quả *silico* các kết quả hoạt tính sinh học mạnh *vitro* của các phức hợp bằng phương pháp cơ học phân tử: d*ocking*, mô phỏng động phân tử (MD) và dự báo dược động học của thuốc (ADMET).

5. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn

5.1 Ý nghĩa khoa học

Luận án đã góp phần làm cơ sở khoa học về tương tác giữa các ion kim loại chuyển tiếp phân nhóm d (Ti, Cr và Hg) với phối tử hữu cơ là PLB, một hợp chất có cấu trúc khung 1,4-quinone và mang hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu không những chỉ định vị rõ hơn vai trò của các phức với phối tử có nguồn gốc thiên nhiên trong việc phát triển các công cụ phân tích, cảm biến và dược chất điều biến sinh học, mà còn cung cấp các dữ liệu khoa học có giá trị về phân tích hóa lý. Những dữ liệu này có thể được ứng dụng trong giảng dạy ở đào tạo đại học và sau đại học, đặc biệt trong các học phần như: phương pháp phân tích hóa lý, mô phỏng trong công nghệ hóa học và phức chất ứng dụng.

5.2 Ý nghĩa thực tiễn

Việc ứng dụng phức $Ti(PLB)_2$ trong xác định vi lượng Ti(IV) cho thấy tiềm năng phát triển các đầu dò huỳnh quang có cấu trúc đơn giản, độ nhạy cao và hiệu quả, phù hợp

cho phân tích các mẫu môi trường thực. Đặc biệt, việc sử dụng phức $Hg(PLB)_2$ làm chất dẫn phân tích Hg(II) bằng kỹ thuật HPLC–DAD đã chứng minh khả năng tích hợp hệ quinone–kim loại vào các phương pháp phân tích hiện đại, góp phần đa dạng hóa công cụ kiểm nghiệm hàm lượng kim loại nặng độc hại trong mẫu thực phẩm và môi trường.

Các kết quả nghiên cứu trong *vitro* và *silico* chỉ ra rằng một số phức chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng tế bào ung thư và kháng oxy hóa, mở ra định hướng ứng dụng trong phát triển dược chất điều biến sinh học. Ngoài ra, kết quả tương tác giữa phức chất và HSA cho thấy tiềm năng gắn kết sinh học, đồng thời mở ra hướng ứng dụng trong vận chuyển dược chất qua hệ tuần hoàn.

5.3 Dự kiến các kết quả chính của luận án

Các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ sẽ được chứng minh hình thành trong dung dịch và đồng thời tổng hợp, phân lập ở trạng thái rắn. Trong đó, phức $Ti(PLB)_2$ thể hiện phát huỳnh quang mạnh, còn $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ gây dập tắt huỳnh quang của PLB theo cơ chế tĩnh..

Phổ FT-IR cho thấy sự dịch chuyển đặc trưng của vùng hấp thụ OH và C=O, chứng tỏ vai trò của các nhóm này trong phối trí kim loại. Kết quả DFT và phân tích Mulliken xác nhận sự tái phân bố mật độ điện tích trên các nguyên tử oxy, phù hợp với dữ liệu thực nghiệm. Đồng thời, khoảng cách HOMO–LUMO giảm và năng lượng Gibbs (ΔG) âm chứng tỏ sự hình thành phức bền với đặc tính điện tử thuận lợi.

Phức $Ti(PLB)_2$ có thể ứng dụng trong phân tích định lượng Ti(IV), với LOD thấp, độ tuyến tính cao và độ lặp lại tốt. Ngược lại, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ hoạt động như các đầu dò dập tắt huỳnh quang có chọn lọc.

Về hoạt tính sinh học, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ thể hiện tác dụng đa dạng, bao gồm ức chế tế bào ung thư, kháng viêm và ức chế α-glucosidase, được chứng minh bằng thí nghiệm *in vitro* và phân tích *docking* phân tử với năng lượng liên kết thấp và tương tác bền vững tại vị trí hoạt hóa của enzyme/protein đích.

DRAFT

5.4 Những đóng góp mới của luận án

Lần đầu tiên, phức của PLB với ba ion Cr(III), Ti(IV), Hg(II) ở dung dịch và rắn , được nghiên cứu và công bố.

Cơ chế tạo phức của Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) với PLB được nghiên cứu và thảo luận dựa trên các đặc trưng của phương phương pháp quang phổ.

Phản ứng tạo phức $Ti(PLB)_2$ gây phát huỳnh quang đã được định hướng để định lượng Ti(IV) với độ nhạy cao và áp dụng hiệu quả trên mẫu thực. Tương tự, phức của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ dập tắt huỳnh quang cũng định hướng ứng dụng phân tích bằng phương pháp sắc ký HPLC-DAD.

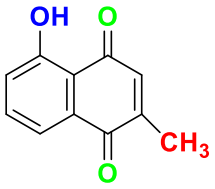
Các nghiên cứu trong *silico* (*docking*, mô phỏng động học MD, dự đoán ADMET) kết hợp với kết quả trong *vitro* cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ có khả năng ức chế enzyme *α-glucosidase*, gây độc tế bào ung thư, định hướng cho các nghiên cứu tiếp sau.

DRAFT

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN VỀ LĨNH VỰC NGHIÊN CỨU

1.1 Plumbagin và khả năng tạo phức với kim loại

1.1.1 Cấu trúc và đặc điểm của plumbagin



Hình 1.1 Cấu trúc của PLB

PLB là một hợp chất tự nhiên thuộc nhóm naphthoquinone, tên gọi IUPAC 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, ngoài ra còn được biết đến với các tên đồng nghĩa như 2-methyljuglone hoặc 2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone. Phân tử PLB gồm một hệ vòng thơm naphthalene mang hai nhóm carbonyl tại vị trí 1 và 4, một nhóm methyl tại vị trí 2 và một nhóm hydroxyl phenolic ở vị trí 5 (Hình 1.1). Công thức phân tử của PLB là $C_{11}H_8O_3$, với khối lượng phân tử khoảng 188,18 g/mol. Cấu trúc của PLB thể hiện một hệ π liên hợp rộng rãi, bao phủ toàn bộ khung vòng naphthoquinon, trong đó các nhóm carbonyl (C=O) và hydroxyl (–OH) có vai trò quan trọng trong điều chỉnh phân bố mật độ electron. Về mặt lý tính**,** Plumbagin là chất rắn tinh thể màu vàng cam, có điểm nóng chảy khoảng 74–76°C, tan tốt trong các dung môi hữu cơ phân cực như ethanol, methanol, DMSO, chloroform, acetonitrile, nhưng không tan trong nước. PLB tương đối nhạy ánh sáng, dễ bị phân hủy trong môi trường có ánh sáng mạnh hoặc pH cao, vì vậy cần bảo quản trong điều kiện tối và mát. Nhóm –OH ở vị trí C-5 có khả năng tham gia vào hiệu ứng cộng hưởng mạnh với hệ liên hợp π, qua đó làm gia tăng mật độ electron cục bộ trên vòng thơm và ảnh hưởng đến tính chất acid–base, khả năng oxi hóa- khử và tính chất phát quang của phân tử [12- 13]. Hai nhóm carbonyl tại C-1 và C-4 là các trung tâm nhận electron mạnh và đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng tạo phức với ion kim loại. Trong môi trường thích hợp (pH trung tính đến kiềm), nhóm hydroxyl phenolic dễ dàng mất proton, tạo thành anion phenolate, một phối tử mạnh có thể phối trí với

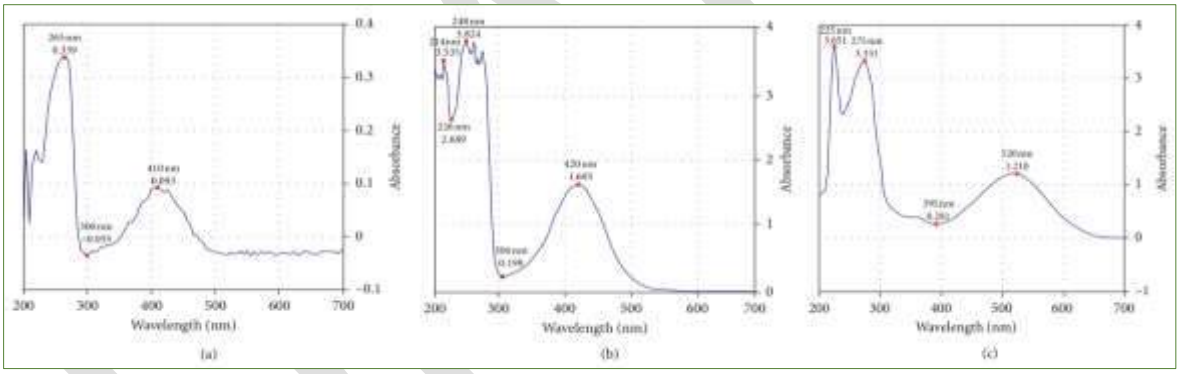
DRAFT

các ion kim loại có ái lực cao với nguyên tử oxy như Cr(III), Ti(IV), hoặc Hg(II). Sự hiện diện đồng thời của nhóm –OH và C=O trên cùng khung vòng tạo điều kiện thuận lợi cho phối trí kiểu vòng 6 cạnh, góp phần làm tăng độ bền phức chất PLB–kim loại [14]. Đặc điểm điện tử của PLB cũng liên quan chặt chẽ đến tính chất phát huỳnh quang và khả năng nhận biết ion kim loại**.** Các chuyển dịch điện tử π → π* và n → π* trong hệ vòng liên hợp có thể bị ảnh hưởng bởi sự phối trí với kim loại, dẫn đến thay đổi cường độ và bước sóng phát xạ trong phổ UV–Vis hoặc huỳnh quang, giúp ứng dụng PLB như một đầu dò phát quang [15 - 16].

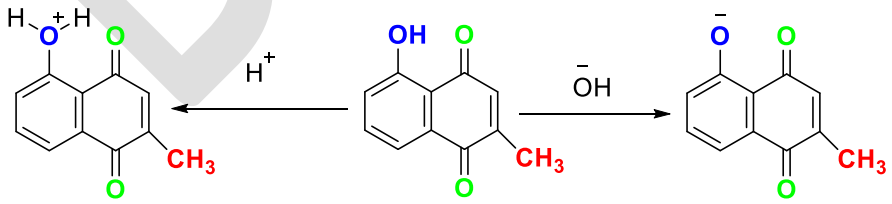
1.1.2 Đặc tính quang phổ của plumbagin

PLB nổi bật với hệ thống liên hợp π rộng và các nhóm chức như hydroxyl và carbonyl, mang lại các đặc tính quang phổ đặc trưng trong vùng tử ngoại-khả kiến (UV-Vis).

1.1.2.1 Đặc tính phổ hấp thụ UV-Vis



Hình 1.2 Phổ UV–Vis của PLB trong methanol ở ba điều kiện pH: (a) trung tính, (b) acid, (c) kiềm. [17]



Hình 1.3 Sự thay đổi cấu trúc phân tử PLB theo điều kiện pH.

Bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{max}) của PLB trong dung môi methanol được ghi nhận tại khoảng 265–268 nm và 410–415 nm, tương ứng với các chuyển dời điện tử π→π* trong hệ vòng thơm liên hợp và n→π* từ cặp electron không liên kết của nhóm

carbonyl [18]. Các vị trí hấp thụ đặc trưng này chịu ảnh hưởng đáng kể bởi điều kiện pH của môi trường. Cụ thể, trong methanol có mặt acid (methanol/HCl), λ_{max} dịch chuyển về khoảng 248 nm và 420 nm, phản ánh sự thay đổi trạng thái proton hóa của nhóm chức. Ngược lại, trong môi trường kiềm (methanol/NaOH), phổ hấp thụ xuất hiện các đỉnh tại 275 nm và 520 nm(Hình 1.2), cho thấy sự khử proton của nhóm hydroxyl(Hình 1.3), dẫn đến mở rộng hệ liên hợp π và sự tăng cường chuyển dời n→π* tại vùng bước sóng dài [17].

Ảnh hưởng của dung môi đến phổ hấp thụ UV-Vis của PLB cũng được ghi nhận rõ rệt. Sự khác biệt về độ phân cực, khả năng hình thành liên kết hydro và hằng số điện môi có thể làm thay đổi vị trí và cường độ của các cực đại hấp thụ. Trong ethanol, phổ hấp thụ của PLB gần tương tự như trong methanol, với λ_{max} lần lượt tại khoảng 265–268 nm (π→π*) và 410–415 nm (n→π*), do tính chất phân cực và khả năng tạo liên kết hydro tương đương [19]. Trong DMSO, phổ hấp thụ cho thấy sự dịch chuyển đỏ với λ_{max} đạt 416 nm, phản ánh sự ổn định của trạng thái kích thích nhờ tương tác hydrogen mạnh giữa nhóm OH và dung môi [20]. Trong chloroform, dung môi không phân cực và ít tương tác hydro hai cực đại hấp thụ được ghi nhận tại 254 nm và 415 nm [21]. Ngoài ra, trong môi trường CO_2 siêu tới hạn ở 40 °C, áp suất 8–20 MPa, phổ hấp thụ của PLB thể hiện sự dao động đáng kể về vị trí và cường độ đỉnh, phản ánh ảnh hưởng của áp suất đến khả năng hòa tan và ổn định quang phổ của phân tử trong môi trường kém phân cực [22].

1.1.2.2 Đặc tính huỳnh quang của PLB

Nhờ hệ liên hợp π–π, PLB có khả năng hấp thụ bức xạ điện từ và phát huỳnh quang, tuy nhiên đặc tính phát xạ bị hạn chế do do sự chi phối của các kênh suy giảm phi bức xạ đặc trưng cho cấu trúc quinon, bao gồm chuyển nội hệ và chuyển trạng thái nội hệ.

Khi được kích thích trong vùng 310–340 nm, PLB cho phát xạ yếu với bước sóng phát xạ dao động từ 420–450 nm, phụ thuộc vào dung môi và pH môi trường. Trong dung môi như methanol, ethanol, hoặc hỗn hợp ethanol nước, cường độ huỳnh quang có thể quan sát được rõ hơn, đặc biệt tại pH trung tính đến hơi acid (4.5–6.0), nơi

DRAFT

phân tử ở trạng thái proton hóa ổn định. Ngược lại, trong môi trường kiềm, sự hình thành anion làm gia tăng quá trình dập tắt huỳnh quang do cơ chế phi bức xạ [23] .

Về cơ chế, đặc tính phát xạ yếu của PLB phần lớn là do quá trình chuyển trạng thái nội hệ (intersystem crossing – ISC) từ trạng thái kích thích singlet (π–π^*) sang trạng thái triplet (3π–π^*), vốn xảy ra dễ dàng ở các hệ naphthoquinon chứa nhóm carbonyl. Quá trình này làm giảm hiệu suất lượng tử huỳnh quang (quantum yield), thường chỉ đạt giá trị nhỏ hơn 0.01 trong dung dịch [24]. Tính chất huỳnh quang của PLB đã được sử dụng để nghiên cứu tương tác với các phân tử sinh học. Ví dụ, PLB có khả năng tương tác với protein huyết thanh người (human serum albumin - HSA), dẫn đến sự thay đổi trong phổ huỳnh quang của HSA, cho thấy sự hình thành phức hợp giữa PLB và HAS [25]. Ngoài ra, PLB cũng được sử dụng để nghiên cứu mức độ tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) trong tế bào, bằng cách đo lường sự thay đổi huỳnh quang của các đầu dò huỳnh quang nhạy cảm với ROS [26].

Tóm lại, mặc dù PLB tự do chỉ thể hiện huỳnh quang yếu, nhưng tính nhạy cảm với môi trường và khả năng điều chỉnh phát xạ thông qua tạo phức với ion kim loại đã mở ra nhiều hướng ứng dụng tiềm năng, đặc biệt trong phân tích huỳnh quang, phát triển đầu dò huỳnh quang chọn lọc hoặc nghiên cứu tương tác sinh học thông qua biến đổi tín hiệu quang học

1.1.3 Vai trò nhóm chức -OH và C=O trong phối trí tạo phức

Các phối tử chứa nhóm hydroxyl (–OH) và carbonyl (C=O) là một trong những loại phối tử phổ biến và hiệu quả nhất trong hóa học phức chất, nhờ khả năng cho điện tử mạnh và khả năng phối trí đa dạng với các ion kim loại. Những nhóm chức này thường có mặt trong nhiều hợp chất thiên nhiên như flavonoid, phenol, naphtoquinone và dẫn xuất acid hữu cơ vốn được biết đến với khả năng tạo phức bền và giàu hoạt tính sinh học.

Nhóm hydroxyl, đặc biệt là hydroxyl phenolic, có thể dễ dàng phân ly proton trong môi trường trung tính đến kiềm nhẹ, tạo thành anion phenolate một phối tử giàu mật độ điện tử và có khả năng tạo liên kết bền với các ion kim loại có ái lực cao với oxy như Cr(III), Ti(IV), Fe(III), Al(III) [27 - 28]. Khả năng phối trí của nhóm –OH được

tăng cường khi liên kết với hệ π liên hợp (như trong naphthoquinon hay flavonoid), giúp ổn định phức chất thông qua hiệu ứng cộng hưởng và sự phân bố mật độ điện tử đều hơn trên hệ vòng thơm. Nhóm carbonyl (C=O), với cặp electron không liên kết trên nguyên tử oxy, có thể đóng vai trò là vị trí cho điện tử (donor site), dễ dàng phối trí với các ion kim loại chuyển tiếp thông qua tương tác với orbital trống của kim loại. Trong các hợp chất có cấu trúc như quinon, diketone hoặc carboxylic acid, nhóm C=O thường tham gia tạo liên kết phối trí với ion kim loại thông qua sự dịch chuyển mật độ điện tử từ nguyên tử oxy đến orbital trống của kim loại, tạo thành các phức chất bền vững về mặt nhiệt động học và cấu trúc [29]. Đặc biệt, khi nhóm –OH và nhóm C=O cùng có mặt trên một phân tử và nằm ở vị trí gần nhau thuận lợi, chúng có thể phối trí đồng thời với ion kim loại, hình thành vòng phối tử hai càng nội phân tử (chelating bidentate), từ đó làm tăng đáng kể độ bền của phức chất. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng sự hiện diện của các nhóm OH và C=O trong các phối tử hữu cơ không chỉ giúp tạo phức bền vững mà còn ảnh hưởng đến tính chất quang học, hoạt tính sinh học và khả năng cảm biến ion kim loại của phức chất. Trong các hệ cảm biến huỳnh quang hoặc hấp thụ UV–Vis, tương tác giữa các ion kim loại và các phối tử có nhóm OH, C=O thường làm thay đổi rõ rệt cường độ tín hiệu, vị trí đỉnh phổ, từ đó được ứng dụng trong phân tích định lượng [30 -31].

1.1.4 Phức chất của PLB với ion kim loại

1.1.4.1 Đặc điểm cấu trúc và khả năng phối trí của PLB

PLB có khả năng phối trí với nhiều ion kim loại thông qua các nhóm chức hydroxyl và carbonyl trong hệ vòng thơm liên hợp. Những nhóm chức này cho phép PLB hoạt động như một phối tử hai càng (bidentate phối tử), tạo thành các vòng sáu cạnh bền vững với ion kim loại. Các ion thường được khảo sát bao gồm kim loại chuyển tiếp như Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II), Mn(II) và các kim loại đất hiếm như La(III), Sm(III), Gd(III), Dy(III), Y(III).

Đặc biệt, phức chất PLB với các ion lanthanide như La(III), Sm(III), Gd(III), Dy(III) và Y(III) đã được Chen và cộng sự tổng hợp dưới dạng $Ln(PLB)_3$ (Ln = La, Sm, Gd,

Dy, Y). Các hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên dòng tế bào ung thư gan người BEL-7404, vượt trội so với PLB tự do, muối kim loại tương ứng và cả thuốc đối chứng cisplatin, cho thấy tiềm năng phát triển như các tác nhân chống ung thư mới [32 - 33].

Bên cạnh đó, việc tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp cũng được chứng minh làm tăng đáng kể hoạt tính sinh học của PLB. Phức chất $Cu(PLB)_2$, chẳng hạn, đã thể hiện hiệu quả chống oxy hóa cao hơn rõ rệt so với PLB đơn thuần thông qua khả năng bắt gốc DPPH và ức chế sự hình thành các loại oxy phản ứng (ROS), góp phần bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do stress oxy hóa [34 - 35].

Ngoài các ion kim loại đơn lẻ, các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy PLB có thể được liên kết với vật liệu nền vô cơ, chẳng hạn như hạt nano bạc (AgNPs), nhằm cải thiện tính chất dược động học. Việc gắn kết PLB trên bề mặt AgNPs giúp tăng độ tan, khả năng hấp thu nội bào, đồng thời làm tăng độc tính chọn lọc đối với dòng tế bào ung thư phổi A549. Hệ nano Ag-PLB này mở ra triển vọng cho các hệ dẫn thuốc thông minh dựa trên nền tảng phức kim loại của PLB [36].

1.1.4.2 Phương pháp tổng hợp phức PLB với ion kim loại

Các phức chất rắn của PLB với ion kim loại thường được tổng hợp thông qua phản ứng giữa dung dịch PLB và muối kim loại tương ứng trong dung môi hữu cơ hoặc nước với ethanol. Nhìn chung, phương pháp tổng hợp được thực hiện theo các bước chính như sau [33 - 35].

(1) PLB thường được hòa tan trong ethanol tuyệt đối hoặc hỗn hợp ethanol–nước theo tỷ lệ thích hợp.

(2) Các muối như $Cu(CH_3COO)_2$, $Ln(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ hoặc các muối kim loại chuyển tiếp khác được hòa tan trong ethanol hoặc nước. Trong trường hợp ion lanthanide, thường sử dụng các muối nitrat hoặc clorua hòa tan trong ethanol hoặc hỗn hợp ethanol–nước.

(3) Dung dịch muối kim loại được thêm dần vào dung dịch PLB khuấy đều ở nhiệt độ phòng hoặc đun nhẹ (thường 60–70°C). Phản ứng được duy trì trong vài giờ (2–4 h) để đảm bảo hoàn tất quá trình tạo phức. Màu sắc dung dịch thường thay đổi rõ rệt cho thấy sự hình thành phức chất. Tỷ lệ kim loại: PLB phổ biến là 1:2 hoặc 1:3, tương ứng với kiểu phối trí hai càng của PLB qua nhóm –OH và >C=O.

(4) Sau phản ứng, dung dịch được làm nguội, và phần kết tủa được lọc hoặc ly tâm để thu phức rắn. Sản phẩm sau đó được rửa bằng dung môi lạnh (ethanol hoặc ether) để loại bỏ tạp chất chưa phản ứng và sấy khô trong chân không ở 50–60°C.

(5) Các phức chất được xác định thành phần và cấu trúc bằng các phương pháp: phổ IR, UV–Vis, phổ khối, phân tích nguyên tố (CHN), phân tích nhiệt (TGA), và đặc biệt là phổ NMR, XRD và XPS.

1.1.5 Ứng dụng của PLB trong phân tích và sinh học.

1.1.5.1 Đánh giá hoạt tính sinh học

PLB đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ vào tìm năng các hoạt tính sinh học. Cấu trúc chứa hệ vòng thơm liên hợp và các nhóm chức phản ứng cao như carbonyl và hydroxyl đã tạo điều kiện cho PLB tương tác hiệu quả với các cấu trúc sinh học trong cơ thể sống, từ đó phát huy vai trò trong dược học và y sinh.

Một trong những hoạt tính nổi bật và được nghiên cứu nhiều nhất của PLB là khả năng ức chế sự tăng sinh và cảm ứng chết tế bào theo chương trình (apoptosis) trong nhiều dòng tế bào ung thư như ung thư vú, phổi, đại trực tràng, tuyến tiền liệt và bạch cầu [37]. PLB gây ra stress oxy hóa nội bào thông qua việc tạo các loại gốc tự do (ROS), từ đó kích hoạt các con đường apoptotic như caspase-3, p53 và giảm biểu hiện của các protein chống apoptotic như Bcl-2 [38]. Ngoài ra, PLB còn ức chế quá trình di cư và xâm lấn tế bào ung thư thông qua tác động lên các phân tử như MMP-9, NF-κB và STAT3 [39] PLB cũng cho thấy hiệu quả kháng viêm rõ rệt thông qua khả năng ức chế sự biểu hiện của các cytokine gây viêm (TNF-α, IL-1β, IL-6) và các enzym gây viêm như iNOS và COX-2 [40]. Cơ chế chống viêm của PLB được cho

là liên quan đến việc ức chế hoạt hóa các yếu tố phiên mã như NF-κB và MAPK, từ đó làm giảm sự tổng hợp các chất trung gian gây viêm trong tế bào miễn dịch [41].

Nhờ vào cấu trúc quinon có khả năng nhận điện tử, PLB hoạt động như một chất gây rối loạn màng vi khuẩn và tạo stress oxy hóa, dẫn đến ức chế sự phát triển của cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, bao gồm *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis*, và một số chủng *Candida* gây bệnh [42]. Khả năng ức chế enzyme topoisomerase, làm tổn thương DNA vi khuẩn cũng góp phần vào hoạt tính này.

Mặc dù PLB có khả năng tạo ROS khi tương tác trong hệ sinh học, nhưng ở nồng độ thấp, nó cũng thể hiện khả năng quét gốc tự do và bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa [43]. Điều này được lý giải bởi đặc tính redox linh hoạt của phân tử, cho phép PLB phản ứng với các gốc hydroxyl, superoxide và peroxyl trong mô hình in vitro. Tính chất này giúp PLB có thể điều hòa cân bằng nội môi oxy hóa trong các bệnh lý mạn tính như viêm, ung thư hoặc thoái hóa thần kinh.

1.1.5.2 Ứng dụng trong phân tích hóa học

Mặc dù hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu trực tiếp công bố việc ứng dụng PLB như một chất phản ứng hoặc đầu dò trong phân tích hóa học, nhưng cấu trúc đặc trưng của phân tử này với hệ liên hợp π rộng, cùng các nhóm chức hoạt động như hydroxyl phenolic và carbonyl cho thấy tiềm năng lớn trong việc phát triển các phương pháp phân tích dựa trên cơ chế tạo phức với ion kim loại.

Các dẫn xuất gần với PLB như lawsone, juglone và lapachol đã được nghiên cứu khá nhiều và chứng minh có khả năng tạo phức với nhiều ion kim loại chuyển tiếp và đất hiếm như Cu(II), Ni(II), Fe(III), Mn(II), La(III), Gd(III), v.v. Khi hình thành phức, các hệ này thường thể hiện sự thay đổi rõ rệt trong phổ UV–Vis hoặc huỳnh quang, tạo cơ sở cho các ứng dụng trong phân tích định tính và định lượng [34] [32][44].

Theo các cơ chế đã ghi nhận ở các dẫn xuất trên, tín hiệu hấp thụ hoặc phát xạ thường tăng (hiệu ứng "turn-on") hoặc giảm (hiệu ứng "quenching") đáng kể khi có sự hiện diện của ion kim loại, cho phép khai thác như một công cụ phân tích nhạy và chọn

lọc. Do có cấu trúc tương tự, plumbagin được kỳ vọng cũng có thể ứng dụng trong các hệ phân tích quang học hoặc điện hóa khi tạo phức với kim loại, đặc biệt là các ion có ái lực cao với nhóm oxy như Ti(IV), Cr(III), hoặc Hg(II).

Như vậy, dù chưa có công bố trực tiếp về việc ứng dụng plumbagin trong phân tích hóa học, nhưng các đặc điểm cấu trúc và tính chất của phân tử này cũng như bằng chứng từ các hệ tương đồng cho thấy đây là một hướng nghiên cứu tiềm năng, đáng được quan tâm và phát triển trong các nghiên cứu tiếp theo.

1.1.5.3 Ứng dụng trong phân tích sắc ký

Phân tích sắc ký là một trong những kỹ thuật hiện đại được ứng dụng rộng rãi để tách, định tính và định lượng các hợp chất vô cơ và hữu cơ trong nhiều loại mẫu. Trong đó, việc sử dụng các phối tử hữu cơ để tạo phức với ion kim loại trước khi phân tích bằng các hệ sắc ký như HPLC–UV, HPLC–DAD, hoặc HPLC–FL đang được nghiên cứu và phát triển mạnh, nhằm tăng độ chọn lọc và độ nhạy cho phép đo [45].

Mặc dù chưa có nhiều báo cáo trực tiếp liên quan đến ứng dụng PLB trong phân tích sắc ký, tuy nhiên phân tích sắc ký (ví dụ như HPLC–UV, HPLC–DAD) ngày càng được áp dụng rộng trong việc xác định các dẫn xuất naphthoquinone tự nhiên như lawsone, juglone bao gồm cả mục đích phân biệt và định lượng chúng trong mẫu thực vật. Ví dụ: Babula cùng cộng sự. (2005) đã phát triển thành công phương pháp HPLC–UV để xác định đồng thời 1,4-naphthoquinon, lawsone, juglone và plumbagin trong mô cây *Dionaea muscipula*, với giới hạn phát hiện lần lượt là 50–75 ng/mL, cho thấy phương pháp có độ nhạy cao và độ đặc hiệu tốt [46]. Nour cùng cộng sự. (2013) cũng đã áp dụng HPLC–DAD để phân tích song song các phenol, flavonoid và juglone trong lá óc chó (*walnut leaves*), chứng minh hiệu quả của phương pháp này trong việc phân tích dẫn xuất naphthoquinon [47].

Như vậy, mặc dù các dẫn xuất naphthoquinone chưa được khai thác rộng rãi trong vai trò phối tử tạo phức, nhưng đã cho thấy khả năng được phân tích trực tiếp bằng HPLC–UV/DAD với độ nhạy và độ phân giải cao. Điều này cho thấy bản thân các

hợp chất như PLB, tương tự lawsone và juglone có tiềm năng ứng dụng trong các phương pháp phân tích sắc ký đơn giản nhưng hiệu quả.

1.2 Kim loại chuyển tiếp Ti, Cr, Hg

1.2.1 Tính chất đặc trưng của Ti(IV), Cr(III), Hg(II)

Các ion kim loại Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) đều thuộc nhóm nguyên tố chuyển tiếp, mang đặc điểm điện tử và hóa học riêng biệt, ảnh hưởng mạnh mẽ đến khả năng tạo phức và ứng dụng trong phân tích, cảm biến hoặc sinh học.

1.2.1.1 Titanium(Ti)

Ti là nguyên tố thuộc nhóm 4B trong bảng tuần hoàn, với cấu hình điện tử cơ bản là [Ar] $3d^2 4s^2$. Khi mất đi bốn electron lớp ngoài, ion Ti(IV) đạt được cấu hình bền [Ar]$3d^0$. Điều này đồng nghĩa với việc ion Ti(IV) không có electron d, dẫn đến không có từ tính và được xếp vào loại chất kháng từ (diamagnetic) [48]. Ngoài ra, do không có electron d, các phức chất của Ti(IV) không xảy ra các chuyển d–d đặc trưng như ở nhiều ion kim loại chuyển tiếp khác, dẫn đến khả năng hấp thụ vùng khả kiến kém và thường có màu nhạt hoặc không màu [49].

Với bán kính ion khoảng 0.74 Å và điện tích +4, Ti(IV) có mật độ điện tích cao, dẫn đến khả năng phân cực mạnh và tương tác mạnh với các phối tử có mật độ electron cao[50]. Theo thuyết acid–base cứng–mềm (HSAB), Ti(IV) được xếp vào nhóm acid cứng do có kích thước nhỏ, điện tích cao và độ phân cực thấp. Do đó, Ti(IV) có xu hướng tạo phức bền với các base cứng như nhóm –OH, C=O, CO_3^{2-}, PO_4^{3-} [51], [52].

Trong các phức chất, Ti(IV) thường có hình học bát diện (octahedral) khi phối trí với sáu phối tử. Tuy nhiên, trong một số điều kiện, Ti(IV) cũng có thể tạo thành các phức có hình học tứ diện (tetrahedral) hoặc hình học khác, tùy thuộc vào bản chất của phối tử và môi trường phản ứng [52]. Do cấu hình d^0, các phức của Ti(IV) không có các chuyển d–d, dẫn đến màu sắc nhạt hoặc không màu. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, các phức của Ti(IV) có thể hiển thị màu sắc do các chuyển điện tích (charge transfer) giữa kim loại và phối tử [53]. Ti(IV) có khả năng bị khử thành Ti(III) trong

một số điều kiện, điều này có thể ảnh hưởng đến tính chất điện hóa và hoạt tính của các phức chất chứa Ti(IV).

1.2.1.2 Chromium(Cr)

Chromium là một nguyên tố chuyển tiếp nhóm VI B với cấu hình electron nguyên tử là [Ar] $3d^5 4s^1$. Khi mất ba electron hóa trị để tạo thành ion Cr(III), cấu hình electron trở thành [Ar]$3d^3$, với ba electron chưa ghép đôi trong phân lớp d. Điều này khiến Cr(III) có từ tính mạnh (paramagnetic), thể hiện rõ qua mômen từ riêng đặc trưng cho các ion kim loại chuyển tiếp chưa bão hòa electron [54]. Cr(III) là một cation có bán kính nhỏ và điện tích cao, cho phép nó tạo ra các tương tác điện tĩnh mạnh với các phối tử giàu electron như nhóm –OH, $–COO^-$ hoặc $–NH_2$. Trong dung dịch nước, Cr(III) có xu hướng tạo thành các phức chất bát diện ổn định, với sáu phối tử bao quanh trung tâm kim loại [54]. Phức Cr(III) thường trơ về mặt động học, tức phản ứng trao đổi phối tử xảy ra rất chậm, đặc biệt trong các hệ có cấu trúc bền vững như $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$ hoặc $[Cr(en)_3]^{3+}$ [54]. Ngoài ra, các phức chất Cr(III) còn hấp thụ mạnh ánh sáng trong vùng khả kiến (300–700 nm) do các chuyển tiếp điện tử nội phân lớp d–d. Đây là đặc trưng điển hình của các ion kim loại chuyển tiếp có cấu hình d^3 trong môi trường trường điện trường bát diện (*octahedral phối tử field*), và là nguyên nhân tạo ra các màu sắc như tím, xanh lục hoặc tím xanh của các phức Cr(III) [54].

Đặc biệt, Cr(III) có thể gây ra hiện tượng dập tắt huỳnh quang khi phối trí với các hợp chất phát quang. Cơ chế dập tắt bao gồm LMCT (Phối tử-to-Metal Charge Transfer), electron từ orbital π hoặc n của phối tử bị chuyển đến orbital d trống của Cr(III), khiến năng lượng kích thích bị tiêu tán dưới dạng phi bức xạ [54]. ISC (Intersystem Crossing) mômen từ lớn của Cr(III) làm tăng khả năng chuyển từ trạng thái singlet (S_1) sang trạng thái triplet (T_1), từ đó làm giảm hiệu quả phát xạ huỳnh quang [55].

1.2.1.3 Thủy ngân (Hg)

Thủy ngân (Hg) là một nguyên tố thuộc nhóm IIB, chu kỳ 6 trong bảng tuần hoàn, có cấu hình electron nguyên tử là [Xe] $4f^{14}\ 5d^{10}\ 6s^2$. Khi bị oxy hóa thành ion Hg(II), hai electron lớp ngoài bị loại bỏ, tạo ra cấu hình [Xe] $4f^{14}\ 5d^{10}$. Với lớp vỏ d đã bão hòa,

Hg^{2+} không có electron độc thân và do đó không có từ tính, cũng không có các chuyển tiếp d–d, dẫn đến tính chất quang phổ rất yếu [54]. Hg(II) là một ion có bán kính lớn**,** dễ phân cực và được xếp vào loại acid mềm theo nguyên lý HSAB. Do đó, nó có xu hướng tạo các phức chất ổn định với phối tử mềm có chứa lưu huỳnh (–SH, –SR), phosphine (PR_3), hoặc các base π mềm như arene, alkyne [55]. Tuy nhiên, trong một số điều kiện, Hg^{2+} vẫn có thể phối trí với phối tử chứa oxy hoặc nitơ (ví dụ: H_2O, NH_3), đặc biệt trong môi trường phối trí hỗn hợp. Dù các phức chất Hg(II) thường không bền nhiệt, nhưng chúng có thể tạo liên kết bền nhờ hiệu ứng spin–quỹ đạo (spin–orbit coupling). Do nằm ở hàng thứ ba của khối d, ion Hg(II) có hằng số spin–orbit rất lớn, ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính điện tử và quang phổ của phức chất [55].

1.2.2 Vai trò tiềm năng trong dược học

Ti(IV) được xem là một ứng viên thay thế tiềm năng cho cisplatin trong điều trị ung thư, nhờ độc tính thấp đối với tế bào lành và khả năng tương tác chọn lọc với tế bào ung thư. Một số phức chất Ti(IV), tiêu biểu như titanocene dichloride (Cp_2TiCl_2), đã cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* và *in vivo***,** kể cả các dòng kháng thuốc [56]. Cơ chế chống ung thư của các phức Ti(IV) có thể bao gồm tạo liên kết với DNA hoặc protein trong nhân tế bào, làm gián đoạn quá trình sao chép; Tạo phức với catechol hoặc transferrin**,** từ đó vận chuyển chọn lọc vào tế bào ung thư; Tăng cường tạo gốc tự do hoặc thay đổi trạng thái oxy hóa khử nội bào, từ đó kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis) [56].

Cr(III) có liên quan đến chuyển hóa glucose và lipid, được xem là chất điều hòa tiềm năng cho bệnh tiểu đường typ2. Một số nghiên cứu cho thấy Cr(III) có khả năng tăng độ nhạy của thụ thể insulin, giúp cải thiện hấp thu glucose; Tham gia vào phức chất chromodulin, hỗ trợ truyền tín hiệu insulin nội bào; Ức chế các enzyme tham gia chuyển hóa carbohydrate, như *α-glucosidase***,** từ đó làm chậm quá trình tăng đường huyết sau ăn [57][58]. Ngoài ra, các phức chất Cr(III) còn được nghiên cứu trong lĩnh vực enzyme inhibition, chất chống oxy hóa, và tương tác protein, cho thấy tiềm năng trong điều trị các bệnh chuyển hóa và viêm mãn tính.

Trái ngược với Ti(IV) và Cr(III), Hg(II) là một trong những ion kim loại nặng độc hại nhất đối với hệ thần kinh và hệ miễn dịch. Hg(II) có thể dễ dàng xâm nhập vào tế bào, liên kết với các nhóm thiol trong protein (–SH), làm thay đổi cấu trúc và chức năng của enzyme. Mặc dù Hg(II) là ion của kim loại nặng độc hại, nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng khi được phối trí với các hợp chất hữu cơ tự nhiên, đặc biệt là dẫn xuất naphthoquinone, các phức chất Hg(II) có thể biểu hiện hoạt tính kháng ung thư và ức chế enzyme chuyển hóa. Cơ chế tác động có thể liên quan đến tương tác chọn lọc với DNA hoặc enzyme như α-glucosidase, kết hợp với hiệu ứng quang học đặc trưng như dập tắt huỳnh quang thông qua các cơ chế PET hoặc ISC [59], [60].

1.2.3 Phức chất của Ti(IV), Cr(III), Hg(II)

Nhiều nghiên cứu trước đây đã tập trung vào khả năng tạo phức và ứng dụng sinh học của các ion kim loại chuyển tiếp như Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) thông qua sự phối trí với các hợp chất hữu cơ chứa nhóm chức –OH, C=O hoặc nhóm Schiff base (–CH=N–). Nhờ vào khả năng phối trí đa dạng và cấu trúc linh hoạt, nhiều hệ phức chất đã được tổng hợp thành công và cho thấy đặc tính quang học, kháng khuẩn, tương tác DNA hoặc cảm biến sinh học đầy tiềm năng.

Các phối tử Schiff base có cấu trúc kiểu ONO, ONOO hoặc ONNO với sự phối hợp của nhóm imine và nhóm hydroxyl/carbonyl đã được nghiên cứu rộng rãi trong việc tạo phức chất Ti(IV) có tính chất quang học và sinh học nổi bật. Trong một nghiên cứu điển hình, phức Ti(IV) có được tổng hợp từ $TiO(acac)_2$ với phối tử Schiff base tridentate đã được đặc trưng bằng UV-Vis, IR, NMR và đánh giá tương tác với DNA, BSA. Phức cho thấy tính ổn định và tiềm năng kháng khuẩn đáng kể [61]. Bên cạnh đó, tổng quan mới nhất từ *Ganesan M* và cộng sự đã hệ thống hơn 300 phức Schiff base Ti(IV) cho thấy xu hướng ứng dụng trong điều trị ung thư, kháng khuẩn, cảm biến sinh học [62].

Do cấu hình d^3 và tính trơ động học, Cr(III) dễ tạo phức bát diện bền vững với Schiff base mang nhóm –OH, –COOH hoặc $–NH_2$. Các phức Cr(III) từ L-phenylalanine, cho thấy hoạt tính kháng khuẩn cao và khả năng chống oxy hóa [63]. Ngoài ra, các

Schiff base khác như 2-hydroxyacetophenone khi đi với Cr(III) cũng được chứng minh có hoạt tính quang học và ổn định trong dừng dịch.

Không giống như Ti(IV) và Cr(III), ion Hg(II) có bản chất là acid Lewis mềm, thể hiện ưu tiên phối trí với các phối tử chứa lưu huỳnh (S), nitơ (N) hoặc oxy trong hệ π liên hợp. Một ví dụ nổi bật là cảm biến huỳnh quang "turn-off" được thiết kế từ Schiff base kết hợp khung quinoline–thiophene: khi phối trí với Hg(II), phức gây dập tắt huỳnh quang thông qua cơ chế photon–electron transfer (PET). Hệ này không chỉ có độ nhạy cao (Giới hạn phát hiện ~23 nM), mà còn thể hiện độ chọn lọc tốt và khả năng ứng dụng ngay cả trong tế bào HeLa cũng như mẫu môi trường [64]. Ngoài cảm biến dựa trên Schiff base, curcumin một dẫn xuất tự nhiên chứa nhóm β-diketon – cũng được nghiên cứu rộng rãi trong lĩnh vực cảm biến ion kim loại. Một hệ complex curcumin/β-cyclodextrin đã được phát triển như một cảm biến huỳnh quang "turn-off" nhạy trong việc nhận diện ion Hg(II) trong dung dịch nước, với đặc điểm chọn lọc rõ rệt và giảm huỳnh quang ngay khi có sự hiện diện của ion Hg(II) [65][66].

Tổng quan các nghiên cứu về phức chất của Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) cho thấy ba ion kim loại này có khả năng tạo thành các hệ phức ổn định với nhiều loại phối tử hữu cơ, đặc biệt là các hợp chất chứa nhóm hydroxyl, carbonyl hoặc Schiff base. Nhờ vào đặc điểm điện tử và hóa học riêng biệt như cấu hình d^0 của Ti(IV), tính trơ động học của Cr(III), hay hiệu ứng nguyên tử nặng đặc trưng của Hg(II) các phức chất tạo thành không chỉ thể hiện tính chất quang học nổi bật (UV–Vis, huỳnh quang), mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa, cảm biến hoặc tương tác DNA.

Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu hiện nay tập trung vào phối tử Schiff base hoặc dẫn xuất flavonoid, trong khi nhóm naphthoquinone, điển hình như PLB lại ít được khai thác, mặc dù nó có chứa đồng thời hai nhóm chức –OH và C=O thuận lợi cho phối trí. Việc nghiên cứu sự hình thành phức của PLB với ba ion Ti(IV), Cr(III) và Hg(II), từ đó khảo sát đặc điểm quang học, khả năng ứng dụng trong phân tích và

DRAFT

sinh học, là hướng tiếp cận mới mẻ, có tiềm năng mở rộng cả về lý thuyết phối trí lẫn ứng dụng thực tiễn.

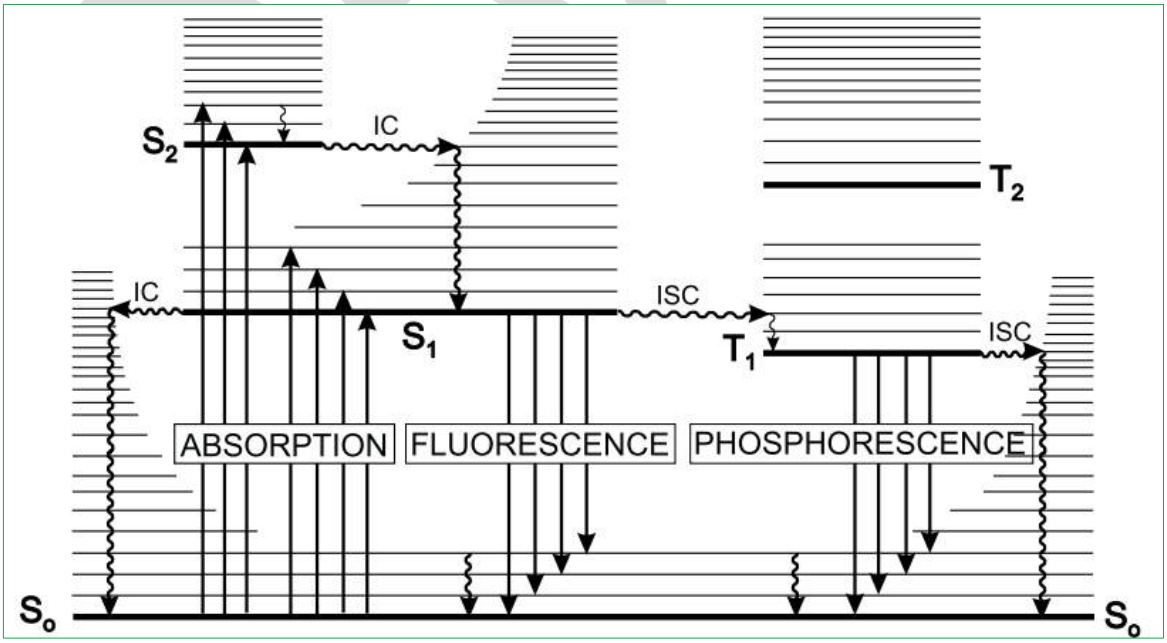
Chính từ những cơ sở này, luận án tập trung nghiên cứu chuyên sâu sự hình thành và đặc điểm của các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, qua đó góp phần làm sáng tỏ cơ chế tương tác, đặc tính phát xạ và triển vọng ứng dụng phân tích, sinh học của các hệ phức này.

1.3 Phương pháp huỳnh quang trong nghiên cứu phức chất

1.3.1 Cơ chế phát và dập tắt huỳnh quang của các phức kim loại

Huỳnh quang là hiện tượng quang học xảy ra khi một phân tử hấp thụ năng lượng (thường là ánh sáng tử ngoại hoặc khả kiến) và sau đó phát ra ánh sáng ở bước sóng dài hơn. Cơ chế phát xạ này được mô tả trong sơ đồ năng lượng Jablonski, bao gồm các quá trình cơ bản như kích thích (excitation), chuyển trạng thái nội phân tử (internal conversion), phát xạ huỳnh quang (fluorescence), hoặc tiêu tán năng lượng không bức xạ thông qua các quá trình như ISC (intersystem crossing), PET (photoinduced electron transfer) hay LMCT (phối tử-to-metal charge transfer) [67][68].

1.3.1.1 Cơ chế phát huỳnh quang (Fluorescence emission)



Hình 1.4 Sơ đồ Jablonski mô tả các quá trình hấp thụ và phát xạ huỳnh quang [67]

Cơ chế huỳnh quang (fluorescence) và lân quang (phosphorescence) được mô tả trong sơ đồ Jablonski (Hình 1.4). Sau khi hấp thụ photon, electron trong phân tử chuyển từ trạng thái cơ bản singlet (S_0) lên các mức kích thích singlet (S_1, S_2…). Tại đây xảy ra các quá trình: Chuyển mức nội năng giữa các trạng thái singlet (IC); tiêu tán năng lượng không bức xạ. Khi electron từ S_1 trở về S_0 và phát ra photon, ta thu được huỳnh quang. Đây là quá trình rất nhanh (10^{-9}–10^{-8} s), và thời gian sống ngắn làm cho huỳnh quang tắt ngay khi tắt nguồn kích thích.

Bên cạnh đó, electron có thể chuyển từ trạng thái singlet S_1 sang trạng thái triplet T_1 thông qua một quá trình chuyển mức khác spin ISC (intersystem crossing). Khi electron từ trạng thái T_1 trở về S_0 và phát ra photon, ta thu được lân quang (phosphorescence). Do chuyển mức khác spin nên quá trình này chậm hơn nhiều (10^{-3} s đến vài giây), dẫn đến hiện tượng "phát sáng kéo dài" sau khi tắt nguồn kích thích.

Sự khác biệt giữa hai cơ chế là huỳnh quang thì chuyển mức $S_1 \rightarrow S_0$ và phát xạ nhanh, còn lân quang thì chuyển mức $T_1 \rightarrow S_0$ dẫn đến phát xạ chậm và bền hơn.

Trong các phức chất kim loại, đặc biệt với ion kim loại nặng như Cr(III) hoặc Hg(II), hiệu ứng tương tác spin–quỹ đạo mạnh thúc đẩy quá trình ISC, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng phát xạ của hệ. Tùy vào bản chất phối tử và ion kim loại, quá trình này có thể: tăng huỳnh quang (turn-on) do hạn chế các cơ chế dập tắt nội năng; hoặc dập tắt huỳnh quang (quenching) thông qua tăng tốc ISC hoặc LMCT, làm giảm xác suất phát xạ từ trạng thái S_1.

Như vậy, cả huỳnh quang và lân quang đều là các quá trình bức xạ nhưng khác nhau về bản chất spin, đường chuyển mức và thời gian sống. Điều này đóng vai trò quan trọng trong việc phân tích cơ chế phát xạ của các phức chất PLB nghiên cứu trong luận án.

1.3.1.2 Chuyển điện tử cảm ứng ánh sáng (PET)

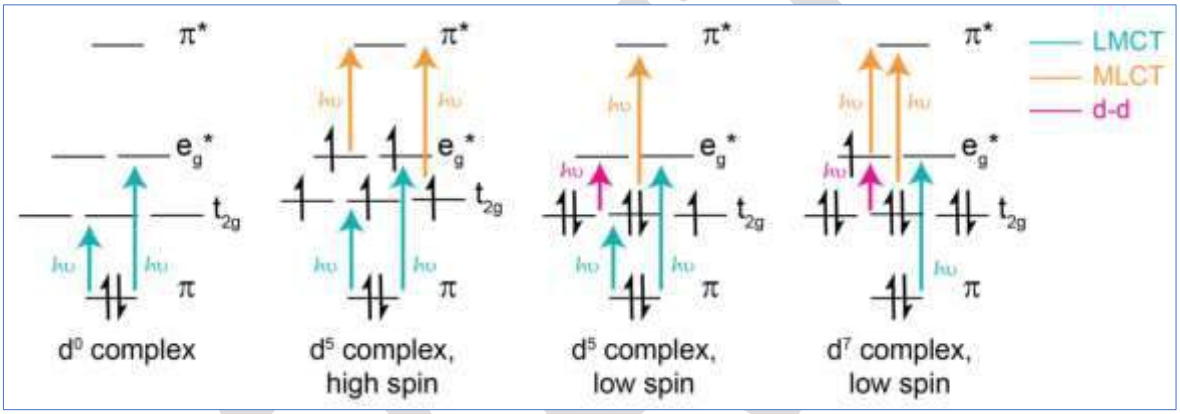
PET là một cơ chế quan trọng thường gặp trong các hệ cảm biến huỳnh quang. Trong các phân tử có cấu trúc cho – nhận electron (donor–acceptor), sau khi chất huỳnh quang bị kích thích, electron từ vùng HOMO của nhóm cho electron (ví dụ: OH, NH_2,

DRAFT

C=O...) có thể chuyển sang vùng nhận (acceptor), làm tiêu tán năng lượng kích thích không phát ra ánh sáng đó là quá trình dập tắt huỳnh quang.

Tuy nhiên, khi nhóm cho electron (donor) bị phối trí với ion kim loại, quá trình chuyển điện tử cảm ứng ánh sáng (PET) bị ức chế, dẫn đến sự khôi phục phát xạ huỳnh quang. Cơ chế này được gọi là "PET bị khóa" (PET turn-off inhibition) hay thường được mô tả là hiệu ứng huỳnh quang "bật sáng" (turn-on). Đây là nguyên lý phổ biến trong thiết kế đầu dò huỳnh quang sử dụng các ion kim loại như Ti(IV) hoặc Zn(II) [68][67].

1.3.1.3 Chuyển điện tử từ phối tử sang kim loại (LMCT)



Hình 1.5 Các kiểu chuyển điện tử (LMCT, MLCT, d–d) trong phức[69].

Trong hóa học phức chất, LMCT (Phối tử-to-Metal Charge Transfer) là hiện tượng electron di chuyển từ orbital giàu điện tử của phối tử (như các cặp electron tự do trên O, N, S, hoặc hệ π mở rộng) sang orbital trống của ion kim loại (Hình 1.6), đặc biệt ở các kim loại có mức oxi hóa cao như Ti(IV), Cr(III) hoặc Fe(III). Quá trình này tạo ra vùng hấp thụ mạnh trong vùng UV–Vis, thường ở khoảng 300–500 nm, và có cường độ cao do moment lưỡng cực thay đổi đáng kể [70].

Khác với chuyển d–d thường bị giới hạn bởi quy tắc Laporte (quy tắc cấm các chuyển điện tử giữa hai orbital có cùng đối xứng không gian trong các hệ có tâm đối xứng) chuyển điện tử kiểu LMCT thường là được phép, do liên quan đến sự chuyển electron từ orbital phối tử sang orbital kim loại [71]. Nhờ vậy, phổ hấp thụ LMCT thường có cường độ mạnh, sắc nét và dễ quan sát hơn so với các vùng hấp thụ mờ nhạt đặc trưng cho chuyển d–d. Ngoài ra, LMCT còn thúc đẩy các hiện tượng phát quang hoặc dập

tắt huỳnh quang (fluorescence quenching), do khi electron được chuyển lên orbital kim loại, sự tái phát xạ có thể bị ức chế nếu trạng thái singlet bị rò rỉ qua trạng thái triplet (ISC) hoặc hệ electron hồi phục qua cơ chế phi bức xạ.

Trong phức chất có PLB, với các nhóm –OH và C=O liên hợp rộng, khi tạo phức với các ion như Ti(IV) hoặc Cr(III), LMCT trở thành cơ chế chính đem lại sự thay đổi đặc trưng trong phổ UV–Vis và ảnh hưởng mạnh đến tính chất phát xạ là nền tảng cho các ứng dụng phân tích và cảm biến trong nghiên cứu luận án.

1.3.1.4 Chuyển trạng thái singlet–triplet (ISC – Intersystem Crossing)

ISC (Intersystem Crossing) là quá trình chuyển điện tử phi bức xạ từ trạng thái kích thích singlet (S_1) sang trạng thái triplet (T_1), do thay đổi cấu hình spin. Quá trình này thường bị cấm theo quy tắc spin (spin-forbidden), nhưng có thể xảy ra với xác suất cao hơn khi hệ chứa các nguyên tử nặng như Hg, Pt hoặc Ir, nhờ vào hiệu ứng spin–quỹ đạo mạnh (heavy atom effect), từ đó thúc đẩy ISC và làm giảm huỳnh quang, ISC là cơ chế chính gây dập tắt phát xạ trong các hệ có mặt ion kim loại nặng [72].

Trong các phức kim loại chuyển tiếp, ISC là nguyên nhân chính gây dập huỳnh quang hoặc chuyển sang phát xạ lân quang. Cơ chế này đã được xác nhận qua các phép đo thời gian sống phát xạ và phổ tại nhiệt độ thấp [73].

Việc hiểu rõ cơ chế chuyển trạng thái nội hệ (ISC) đóng vai trò quan trọng trong việc lý giải các đặc tính quang học của phức $Hg(PLB)_2$, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học cho định hướng thiết kế các vật liệu phát quang hoặc đầu dò sinh học có hiệu suất cao.

1.3.2 Phân tích định lượng bằng phương pháp huỳnh quang

Phương pháp huỳnh quang hiện là một công cụ phân tích định lượng ion kim loại rất hiệu quả, nhờ độ nhạy cao với giới hạn phát hiện ở mức nano- đến picomol, khả năng đo nhanh và không phá hủy mẫu [74]. Đồng thời, kỹ thuật này dễ dàng tích hợp vào các thiết bị cầm tay cũng như cảm biến sinh học [75]. Nguyên lý cơ bản dựa trên sự thay đổi cường độ phát xạ huỳnh quang của các phối tử khi tương tác với ion kim loại, thông qua các cơ chế huỳnh quang “turn-off” hoặc “turn-on” [76].

1.3.2.1 Các loại đầu dò huỳnh quang và cơ chế nhận biết ion kim loại

Các đầu dò huỳnh quang được thiết kế dựa trên các hợp chất huỳnh quang (fluorophore) như rhodamine, coumarin, curcumin, flavonoid và quinon. Chúng thường chứa các nhóm chức như –OH, C=O, $–NH_2$, cho phép tạo phức với ion kim loại, dẫn đến thay đổi trong tính chất huỳnh quang. Rhodamine là một fluorophore phổ biến trong thiết kế đầu dò huỳnh quang nhờ vào độ nhạy cao và khả năng thay đổi cấu trúc khi tương tác với ion kim loại. Cơ chế phát hiện thường dựa trên sự mở vòng spirolactam, dẫn đến sự thay đổi màu sắc và tín hiệu huỳnh quang. Các đầu dò dựa trên rhodamine đã được sử dụng để phát hiện các ion như Al^{3+}, Cr^{3+} và Fe^{3+} với độ chọn lọc và độ nhạy cao [77]. Coumarin là một fluorophore có khả năng phát xạ mạnh và được sử dụng rộng rãi trong thiết kế đầu dò huỳnh quang, các dẫn xuất coumarin đã được phát triển để phát hiện các ion kim loại như Fe^{3+}, Cu^{2+} và Hg^{2+} thông qua cơ chế dập tắt hoặc tăng cường huỳnh quang [78][79][80]. BODIPY (boron-dipyrromethene) là một fluorophore có độ ổn định cao và khả năng phát xạ mạnh. Các đầu dò dựa trên BODIPY đã được thiết kế để phát hiện các ion kim loại như Fe^{3+}, Au^{3+} và Cu^{2+} với độ nhạy và độ chọn lọc cao [81][82]. Flavonoid là một nhóm hợp chất polyphenol tự nhiên có khả năng phát xạ huỳnh quang. Các đầu dò dựa trên flavonoid đã được phát triển để phát hiện các ion kim loại như Al^{3+} và Fe^{3+} thông qua cơ chế dập tắt hoặc tăng cường huỳnh quang [83][84][85]. Quinon và các dẫn xuất của nó có khả năng tạo phức với các ion kim loại thông qua các nhóm carbonyl. Các đầu dò dựa trên quinon đã được sử dụng để phát hiện các ion như Cu^{2+} và Hg^{2+} với độ nhạy và độ chọn lọc cao [86][87].

1.3.2.2 Ứng dụng huỳnh quang trong phân tích định lượng

Phân tích định lượng ion kim loại bằng phương pháp huỳnh quang là dựa trên sự thay đổi cường độ huỳnh quang của đầu dò khi tương tác với ion kim loại mục tiêu. Sự thay đổi này có thể là tăng cường (turn-on) hoặc dập tắt (turn-off) huỳnh quang, cho phép xây dựng đường chuẩn tuyến tính giữa tín hiệu huỳnh quang và nồng độ ion kim loại.

DRAFT

Đầu dò rhodamine định lượng Al^{3+}, Cr^{3+} và Fe^{3+} một nghiên cứu đã phát triển đầu dò huỳnh quang dựa trên rhodamine để phát hiện Al^{3+}, Cr^{3+} và Fe^{3+} với độ nhạy cao và độ chọn lọc tốt [77]. Đầu dò coumarin định lượng Cu^{2+} Một đầu dò huỳnh quang dựa trên coumarin đã được thiết kế để phát hiện Cu^{2+} với độ nhạy cao, giới hạn phát hiện ở mức nanomolar[88]. Một dẫn xuất BODIPY đã được phát triển để phát hiện Fe^{3+} và Cu^{2+} với giới hạn phát hiện lần lượt là 0.82 µM và 0.63 µM, phù hợp với tiêu chuẩn của WHO và EPA [89]. Đầu dò flavonoid định lượng Al^{3+} một đầu dò huỳnh quang dựa trên flavonoid đã được sử dụng để phát hiện Al^{3+} trong môi trường nước, với giới hạn phát hiện là 1.8×10^{-8} mol/L và độ thu hồi trên 96%[90]. Các đầu dò huỳnh quang đã được áp dụng thành công trong phân tích định lượng ion kim loại trong các mẫu thực tế như: Mẫu nước (nước máy, sông, nước thải công nghiệp) phân tích Fe^{3+}, Cr^{3+}, Al^{3+} với độ chính xác cao. Mẫu thực phẩm và dược phẩm xác định hàm lượng kim loại vết để kiểm soát chất lượng. Mẫu sinh học huyết thanh, nước tiểu, dịch sinh học để giám sát nồng độ kim loại liên quan đến bệnh lý. Kết quả phân tích thường được so sánh với các kỹ thuật chuẩn như ICP-OES, AAS hoặc HPLC-DAD, cho thấy độ chính xác tương đương nhưng chi phí thấp và thời gian ngắn hơn.

Phân tích định lượng ion kim loại bằng huỳnh quang là một hướng nghiên cứu tiềm năng với các ưu điểm: Độ nhạy và độ chọn lọc cao, thao tác đơn giản, không cần thiết bị phức tạp, phù hợp cho phân tích vết và cực vết kim loại, khả năng ứng dụng thực tiễn cao, từ phòng thí nghiệm đến hiện trường.

1.4 Các kỹ thuật phân tích trong nghiên cứu phức chất

1.4.1 Phổ hấp thụ UV–Vis, huỳnh quang, FT-IR, NMR, XPS, MS…

Các kỹ thuật hóa lý hiện đại hiện đại đóng vai trò quan trọng trong việc khảo sát sự hình thành phức chất, xác định cấu trúc, đặc điểm tương tác phối tử–kim loại cũng như các thay đổi liên quan đến môi trường xung quanh tâm kim loại. Phổ UV–Vis cho phép theo dõi các chuyển điện tử đặc trưng, như chuyển d–d (trong Cr(III)), LMCT (phối tử-to-metal charge transfer trong Ti(IV), Hg(II)), từ đó xác

định được sự hình thành phức chất, môi trường phối trí và cấu trúc điện tử [91]. Ngoài ra, phổ UV–Vis còn hữu ích để xây dựng đường chuẩn định lượng và theo dõi động học phản ứng phức hóa [92]. Phổ huỳnh quang (Fluorescence spectroscopy) đặc biệt nhạy để phát hiện sự thay đổi của tín hiệu phát xạ khi phối tử tạo phức với ion kim loại, cho phép đánh giá cơ chế dập tắt huỳnh quang (PET, LMCT, ISC), và dùng trong phát triển cảm biến huỳnh quang [93]. Phổ FT-IR hỗ trợ định danh các nhóm chức tham gia phối trí, qua sự dịch chuyển của tần số dao động đặc trưng như ν(C=O), ν(C–O), ν(M–O), v.v. Việc so sánh phổ IR giữa phối tử tự do và phức chất giúp xác nhận vị trí phối trí. Phổ NMR (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) cung cấp thông tin về môi trường hóa học xung quanh các nguyên tử trong phối tử. XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) được dùng để xác định trạng thái oxy hóa, thành phần nguyên tố bề mặt và năng lượng liên kết (binding energy) của các nguyên tử liên quan. MS (Mass spectrometry) đặc biệt với HR-MS (High-Resolution MS) có thể xác định chính xác khối lượng phân tử của phức chất, từ đó khẳng định thành phần phối trí và công thức phân tử….

Những kỹ thuật trên khi được kết hợp chặt chẽ cho phép đặc trưng toàn diện phức chất ở cả mức độ nguyên tử và điện tử, đồng thời là nền tảng quan trọng để đánh giá ứng dụng tiếp theo như cảm biến hoặc hoạt tính sinh học.

1.4.2 Các phương pháp in silico và tính toán lượng tử (DFT)

Tương tác phối tử (phối tử) và enzyme trong silico (hóa học tính toán): phân tử mục tiêu- target molecule, các phương pháp tính toán cơ học lượng tử, cơ học phân tử đã trở thành công cụ thiết yếu để dự báo tương tác, phân tích sâu các tương tác trong silico để giải thích tại sao các phân tử mục tiêu có hoạt tính sinh học mạnh trong in vitro, các công cụ hiệu quả đã được sử dụng: docking, giá trị của mô hình docing (RMSD), đánh giá độ bền của phức hợp trong môi trưởng thực (như trong cơ thể người) được gọi mô phỏng động phân tử (MD) và dự báo dược động học như thuốc của hợp chất đích.

DRAFT

1.4.2.1 Mô phỏng docking phân tử (Molecular Docking)

Phương pháp mô phỏng *docking* sự gắn kết giữa phối tử và tâm kim loại (hoặc protein), giúp tiên đoán cách thức liên kết và cường độ tương tác. AutoDock/AutoDock Vina là các nền tảng được sử dụng rộng rãi để đánh giá năng lượng liên kết và các kiểu liên kết như hydrogen bonding, góp phần hiểu rõ tính chọn lọc phối tử [94].

Docking hay gọi là gắn kết nhằm mục đích lắp ghép chính xác cấu trúc của phối tử (phối tử) vào đúng vị trí liên kết của thụ thể (receptor) và đánh giá chính xác cường độ liên kết. Khi vị trí liên kết không được biết rõ trong cấu trúc protein đích hoặc enzyme đích, trong trường hợp này, gắn kết mù rất hữu ích vì toàn bộ cấu trúc protein được coi là vùng gắn kết, trong khi nếu vị trí liên kết được biết rõ, gắn kết vị trí đặc hiệu hữu ích để dự đoán bản chất tương tác của enzyme/protein và phối tử. Nhìn chung, kết quả của gắn kết mù kém chính xác hơn và tốn nhiều thời gian và bộ nhớ hơn so với gắn kết vị trí đặc hiệu vì nó chỉ nhắm vào các gốc amin acid được chọn lọc có trong khoang gắn kết. Tuy nhiên, phần lớn các tài liệu hiện có đều là các nghiên cứu điển hình trong đó gắn kết phân tử được sử dụng để giải quyết các vấn đề cụ thể liên quan đến thiết kế phối tử hoặc nhận dạng mục tiêu [95]. Các phần mềm gắn kết phân tử được trích dẫn nhiều trong quá trình khám phá thuốc đã được liệt kê trong Bảng 1.1.

DRAFT

Bảng 1.1 Tóm tắt các phần mềm gắn kết phân tử được sử dụng nhiều trong quá trình khám phá thuốc

Stt	Phần mềm	Mục đích	Website	TLTK
1	AutoDock	Được sử dụng để gắn kết phân tử. Nó dự đoán ái lực liên kết và vị trí của một phân tử nhỏ với một protein/enzyme mục tiêu có cấu trúc 3D.	https://autodock.scripps.edu/	[96]
2	AutoDock Vina	Sử dụng để sàng lọc ảo và ghép nối phân tử	https://ccsb.scripps.edu/projects/visualization/	[97]
3	Glide Schrodinger	Một gói hoàn chỉnh cho mô hình hóa phân tử và khám phá thuốc bằng máy tính (CADD)	https://www.schrodinger.com/release-download/	[98]
4	Hex	Sử dụng cho nghiên cứu docking	Hex Protein Docking	[99]
5	Molecular operating environment (MOE)	Một gói hoàn chỉnh cho mô hình hóa phân tử và khám phá thuốc bằng máy tính	Molecular Operating Environment (MOE) | MOEsaic | PSILO	[100]

DRAFT

1.4.2.2 Mô phỏng động lực học phân tử (Molecular Dynamics – MD)

❖ Giới thiệu về mô phỏng động phân tử (MD)

Các đại phân tử sinh học, bao gồm protein và các phức của chúng, có nhiều cấu hình liên quan đến chức năng sinh học của chúng. Mặc dù một số tính không đồng nhất về cấu trúc có thể được nghiên cứu bằng các phương pháp như tinh thể học tia X, NMR, hoặc kính hiển vi điện tử, nhưng các phương pháp này không thể giải thích chi tiết các chuyển đổi cấu dạng và động lực học. Các trạng thái cấu trúc động trong protein được bao phủ ở cấp độ từ 10^{-11} đến 10^{-6} m và thang thời gian từ 10^{-12} giây đến 10^{-5} giây. Để phân tích toàn diện về động lực học phân tử sinh học, mô phỏng động lực học phân tử (MD) đã phát triển thành kỹ thuật mạnh mẽ nhất. Với sự ra đời của sức mạnh tính toán cao cấp, mô phỏng MD có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ μs đến ms, có thể mô tả chính xác động lực học của bất kỳ hệ thống nào. Nhiều trường lực khác nhau như GROMOS, AMBER và CH ARMM đã được phát triển cho mô phỏng MD. Các công cụ như GROMACS, AMBER, CHARMM-GUI và NAMD là những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để mô phỏng MD, có thể cung cấp thông tin chính xác về chuyển động và tính linh hoạt của protein, góp phần vào động lực tương tác của các phức hợp protein-phối tử. Mô phỏng MD có một số ứng dụng thực tế khác trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nhau, bao gồm ghép nối phân tử và thiết kế thuốc, tinh chỉnh dự đoán cấu trúc protein và nghiên cứu quá trình mở ra con đường của một protein. Việc kết hợp mô phỏng MD với các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm đã trở thành một phần bổ sung không thể thiếu trong việc nghiên cứu một số quá trình sinh học quan trọng và phức tạp. Nhiều công cụ như phân tích thành phần chính, phân tích tương quan chéo và phân tích mạng tương tác giữa các gốc là những phương pháp hữu ích bổ sung để phân tích dữ liệu MD.

MD mô phỏng sự vận động của hệ phân tử theo thời gian, cung cấp thông tin về độ ổn định cấu trúc phức, tác động của dung môi và biến động tương tác phối trị. Ví dụ, Quản cùng cộng sự. (2025) mô phỏng hệ Ni(II), Co(II), Cd(II) chỉ ra tính ổn định liên kết dựa trên các phép đo RMSD và độ bền cấu trúc theo thời gian. Chế độ MD cũng

thường được dùng kết hợp với *docking* để phản ánh chính xác hơn sự linh động của phức trong môi trường sinh học [101].

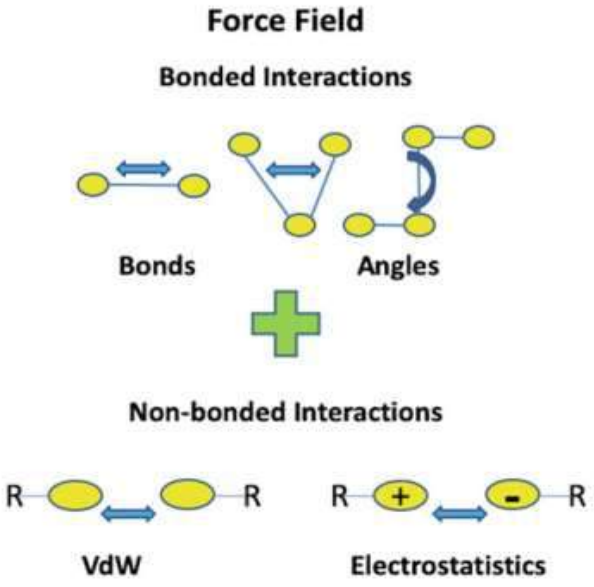
❖ Qui luật của mô phỏng động

Nguyên lý cơ bản của mô phỏng MD dựa trên định luật Newton về cơ học phân tử. Đối với nghiên cứu tính toán về động lực học phân tử sinh học, mô phỏng MD là kỹ thuật quan trọng nhất đã được xác lập[102]. Trong mô phỏng MD, tương tác giữa các nguyên tử và phân tử được kiểm tra trong một khoảng thời gian bằng cách xấp xỉ các thuộc tính vật lý đã biết [103][104].

Hiện nay, việc mô phỏng các phân tử sinh học đã đạt được những tiến bộ đáng kể. Đến nay, chúng ta có thể kiểm tra chuyển động của các nguyên tử, cấu trúc chuỗi bên của các gốc, và dự đoán cấu trúc và miền thứ cấp trong một protein, cũng như kiểu liên kết của acid nucleic và màng lipid [105]. Năng lượng tự do liên kết và sự thay đổi cấu hình của các hệ thống cũng có thể được dự đoán bằng mô phỏng MD vì chúng dựa trên cơ học thống kê. Vì lý do này, mô phỏng MD cũng đã được sử dụng trong lĩnh vực thiết kế thuốc [106]. Sử dụng trường lực, độ dịch chuyển của các hạt và giá trị năng lượng trong mỗi bước thời gian được tính toán để xác định vị trí mới của nguyên tử. Các đóng góp liên kết (góc và liên kết nguyên tử) và không liên kết được đưa vào trường lực dưới dạng hàm năng lượng trong mô phỏng MD cổ điển, Hình 1.6. Những đóng góp sau này chủ yếu đến từ tương tác van der Waals, được xây dựng dựa trên thế năng 6 lớp Lennard-Jones [107]. Định luật Coulomb được sử dụng để tính toán tương tác tĩnh điện [108]. Một số thuật toán liên quan đến mô phỏng Monte Carlo (MC), động lực học Langevin, và MD với các đặc điểm và ưu điểm tương ứng của chúng đã được báo cáo [109]. Các tham số trường lực được thiết kế và các phương trình được xác định là phù hợp tốt và có thể tái tạo dữ liệu từ các phép tính hoặc/và thí nghiệm cấp cao hơn. Hầu hết các phân tử sinh học, bao gồm protein, acid nucleic, lipid và đường, đều được tham số hóa tốt trong trường lực để sử dụng chung [106]. Các tham số của trường lực cho các phối tử mới có thể được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp hóa học lượng tử, cùng với nhiều máy chủ web, như PRODRG

DRAFT

[110][111], trình xây dựng cấu trúc ATP có thể tạo ra cấu trúc của phối tử [112][113]. Độ dài liên kết, góc lưỡng diện liên kết, góc hóa trị liên kết và các tương tác không liên kết như tương tác van der Waals và tương tác tĩnh điện đóng góp vào tổng năng lượng của hệ thống [114]. Một số trường lực, như AMBER, GROMOS và CHARMM, cũng đã được phát triển [115]. Mỗi trường lực có một đặc tính riêng, và người dùng định nghĩa trường lực theo lựa chọn của mình dựa trên mục tiêu của công việc [116][117]. Sau khi trường lực và quá trình solvat hóa của protein trong mô phỏng MD được cố định, người dùng cũng thiết lập một số tham số, được định nghĩa tóm tắt dưới đây.



Hình 1.7 Các thành phần của một trường lực, đại diện cho các tương tác liên kết và không liên kết [114].

1.4.2.3 Lý thuyết phiếm hàm mật độ (Density Functional Theory – DFT)

Lý thuyết phiếm hàm mật độ (DFT) là một công cụ tính toán hóa lượng tử mạnh mẽ, cho phép xác định các đặc tính điện tử của hệ phân tử một cách hiệu quả. Phương pháp này được ứng dụng phổ biến trong việc tối ưu hình học phân tử và xác định cấu trúc bền vững; Tính toán phổ hấp thụ UV–Vis thông qua các phần mở rộng như TD–DFT (Time-Dependent DFT); Ước tính năng lượng liên kết, từ đó đánh giá độ bền của phức chất; Dự đoán các orbital biên, đặc biệt là HOMO (Highest Occupied

Molecular Orbital) và LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), giúp làm rõ khả năng tương tác điện tử và hoạt tính hóa học tiềm năng của hệ nghiên cứu. Nhiều công trình gần đây áp dụng DFT (B3LYP/Def2TZVP, CAM-B3LYP) để xác định hình học minh xác của phối tử và phức, cùng với dự đoán tính chất quang và tương tác sinh học như kết quả *docking* [118].

1.4.3 Phương pháp xác định liên kết và hằng số liên kết.

1.4.3.1 Phương pháp biến thiên liên tục (Job's plot)

Job's plot, hay còn gọi là phương pháp biến thiên liên tục (method of continuous variations), là một công cụ được sử dụng phổ biến để xác định tỷ lệ giữa phối tử và ion kim loại trong quá trình tạo phức. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên việc giữ tổng nồng độ phối tử và ion kim loại không đổi, đồng thời thay đổi tỷ lệ mol giữa hai thành phần, sau đó theo dõi sự biến thiên của tín hiệu phổ hấp thụ (UV–Vis) hoặc huỳnh quang. Khi vẽ đồ thị biểu diễn giá trị tín hiệu theo phần mol của một trong hai thành phần, điểm cực đại trên đường cong tương ứng với tỷ lệ mol tạo phức. Ví dụ: Phức có tỷ lệ 1:1 sẽ cho cực đại tại phần mol 0.5; Phức 1:2 (M:L) sẽ cực đại tại 0.33 (hoặc 0.67 tuỳ quy ước); Phức 1:3 sẽ xuất hiện cực đại tại khoảng 0.25 [119]. Phương pháp Job's plot được đánh giá là đơn giản, trực quan và hiệu quả trong việc xác định thành phần phức chất trong dung dịch, đặc biệt trong các hệ phức hữu cơ–vô cơ.

1.4.3.2 Phương trình Stern–Volmer

Phương pháp Stern–Volmer thường dùng trong phân tích dập tắt huỳnh quang để phân biệt giữa dập tắt tĩnh và dập tắt động. Theo biểu thức $F_0/F = 1 + K_{sv}$ [Q], hệ số K_{sv} phản ánh cường độ dập tắt do chất quenchers (ví dụ: ion kim loại). Khi kết hợp với Benesi–Hildebrand plot hoặc Job's plot, có thể thu được thông tin đa chiều về tỉ số phối trí, hằng số liên kết và cơ chế dập tắt [120].

DRAFT

1.5 Tổng quan tình hình nghiên cứu

1.5.1 Nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, các nghiên cứu liên quan đến PLB chủ yếu tập trung vào chiết tách, định tính và định lượng hợp chất này từ dược liệu bạch hoa xà (Plumbago zeylanica L.). Một số công trình đã tiến hành khảo sát hoạt tính sinh học ban đầu của plumbagin, như tác dụng kháng khuẩn và kháng viêm, qua đó khẳng định tiềm năng ứng dụng của hợp chất thiên nhiên này trong y dược học. Tuy nhiên, cho đến nay, các nghiên cứu trong nước về phức chất plumbagin–kim loại chuyển tiếp còn rất hạn chế. Hầu như chưa có công trình nào đi sâu vào việc tổng hợp, đặc trưng phổ học, phân tích tính chất điện tử bằng phương pháp tính toán, cũng như ứng dụng các phức chất này trong phân tích định lượng hoặc đánh giá cơ chế tương tác sinh học. Điều này cho thấy lĩnh vực nghiên cứu về phức chất PLB–kim loại tại Việt Nam vẫn còn bỏ ngỏ và cần được quan tâm phát triển nhằm khai thác tiềm năng ứng dụng rộng rãi của hợp chất này trong phân tích cũng như dược học.

1.5.2 Nghiên cứu ngoài nước

Nhờ nhóm hydroxyl C-5, plumbagin có khả năng tạo thành chelate rất bền với một số kim loại vết có liên quan đến sinh học, và những tương tác như vậy được cho là một trong những cơ chế có thể có của các hoạt động sinh học của nó. Trên thế giới, PLB đã được nghiên cứu rộng rãi về cơ chế tác động sinh học, đặc biệt kháng tế bào ung thư, kháng viêm. Nhiều công trình kết hợp giữa thực nghiệm và mô phỏng in silico đã chỉ ra các đích tác động phân tử và kiểu gắn kết của PLB với nhiều protein tín hiệu quan trọng như PI3Kγ, AKT1, Bcl-2, NF-κB, STAT3, qua đó làm sáng tỏ cơ sở phân tử cho những hiệu ứng sinh học đã quan sát được [121]. Ngoài nghiên cứu trên phối tử tự do, các phức chất PLB với kim loại chuyển tiếp cũng đã được tổng hợp và đặc trưng bằng nhiều phương pháp phổ học (FT-IR, UV–Vis, NMR) và phân tích nhiệt. Kết quả cho thấy PLB thường phối trí thông qua nhóm hydroxyl (–OH) và carbonyl (C=O). Nhiều ví dụ điển hình như phức Cu–PLB đã được nghiên cứu, đồng thời thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh và cơ chế cảm ứng chết tế bào. Một số nghiên cứu so sánh cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa PLB tự do và phức Cu(II)–

PLB về đặc tính chống oxy hóa [122][123]. Phức của PLB với kim loại rất ít sự chú ý cho đến gần đây. Trước đây, có rất ít nghiên cứu được báo cáo về phản ứng màu của PLB với các ion sắt, niken và đồng[124] [125]. Một nghiên cứu có hệ thống về các phức chất kim loại của PLB đã được thực hiện bắt đầu với các hợp chất của các ion kim loại chuyển tiếp hàng đầu tiên[126], sau đó được mở rộng để bao gồm các ion lanthanide [127][128]. Hầu hết các phức chất kim loại chuyển tiếp đều thể hiện tỷ lệ thành phần 1:2 (trừ các ion sắt có tỷ lệ 1:3), có hình học bát diện bị biến dạng với mức độ solvat hóa khác nhau. Hằng số ổn định điện thế của plumbagin với một số ion kim loại chuyển tiếp cũng đã được báo cáo [124][129]. Độc tính tế bào tăng lên được thể hiện bởi các phức hợp kim loại, và điều này cho thấy sự hiệp đồng của các hợp chất với các ion kim loại [130][131][132].

Tóm lại, một số nhóm nghiên cứu đã tổng hợp một số phức chất của PLB và ion kim loại đã cho thấy các hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn, nhưng hướng nghiên cứu ứng dụng phân tích không may bị dừng lại do những lợi ích mang lại cho các ứng dụng sinh học là quá lớn.

1.6 Lý do chọn đề tài

Mặc dù các ion kim loại chuyển tiếp như Ti, Cr và Hg đã được nghiên cứu rộng rãi trong hóa học phức chất, đặc biệt với các phối tử chứa nhóm Schiff base, flavonoid hoặc curcumin, tuy nhiên PLB, một hợp chất có cấu trúc tương đối đơn giản nhưng giàu hoạt tính sinh học vẫn chưa được khai thác đầy đủ trong vai trò phối tử tạo phức với các ion này. Hiện nay, phần lớn các nghiên cứu về PLB chủ yếu tập trung vào đặc tính sinh học của dạng tự do, trong khi khả năng tạo phức, đặc tính quang học (đặc biệt là huỳnh quang), cảm biến, cũng như cơ chế tương tác sinh học ở cấp độ phân tử với protein hoặc enzyme vẫn chưa được khảo sát một cách hệ thống. Do đó, việc nghiên cứu toàn diện mối liên hệ giữa cấu trúc, tính chất, ứng dụng của các phức PLB với Ti(IV), Cr(III), Hg(II) là cần thiết, nhằm mở rộng tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực phân tích và dược học phân tử.

DRAFT

Các yếu tố quan trọng như đặc điểm quang phổ, thành phần phối trí, độ bền phức, cơ chế phát xạ hoặc dập tắt huỳnh quang, cũng như mối liên hệ giữa cấu trúc với chức năng của các phức chất trong môi trường sinh học, vẫn còn là khoảng trống cần được làm rõ. Đặc biệt, việc tích hợp các phương pháp mô phỏng hiện đại như *docking* phân tử, mô phỏng động lực học phân tử (MD) và lý thuyết phiếm hàm mật độ (DFT) để lý giải cơ chế tương tác ở cấp độ phân tử giữa phức và các enzyme/protein sinh học, cho đến nay vẫn chưa được triển khai một cách đầy đủ. Trên cơ sở đó, luận án này được thực hiện với các mục tiêu chính sau:

Tổng hợp và đặc trưng các phức chất PLB với Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) ở cả trạng thái dung dịch và rắn;

Làm rõ các đặc tính quang học và cơ chế phát xạ huỳnh quang khi tạo phức, thông qua phổ UV–Vis, huỳnh quang và các phương pháp phân tích liên kết như Job's plot, Stern–Volmer;

Đánh giá hoạt tính sinh học của các phức chất thông qua các thử nghiệm *in vitro* (ức chế enzyme, độc tính tế bào) và *in silico* (docking, MD, DFT);

Đề xuất tiềm năng ứng dụng của các phức trong phân tích định lượng kim loại, cũng như định hướng phát triển thành các vật liệu cảm biến hoặc tác nhân điều trị trong lĩnh vực y sinh học.

DRAFT

CHƯƠNG 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hoá chất, thiết bị và phần mềm tính toán

2.1.1 Hoá chất

PLB được mua từ Sigma-Aldrich (Singapore). Các dung môi và hóa chất khác như ethanol, $Ti(NH_4)_2F_6$, HNO_3, HCl, NaOH, $CrCl_3$, $Hg(NO_3)_2$ và các muối kim loại được mua từ Merck. HSA (Albumin huyết thanh người) không chứa acid béo (A3782), warfarin (258016), ibuprofen (I110) được cung cấp bởi Sigma-Aldrich. Tất cả các hóa chất và dung môi đều đạt chuẩn phân tích và được kiểm tra độ tinh khiết trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.1.2 Thiết bị

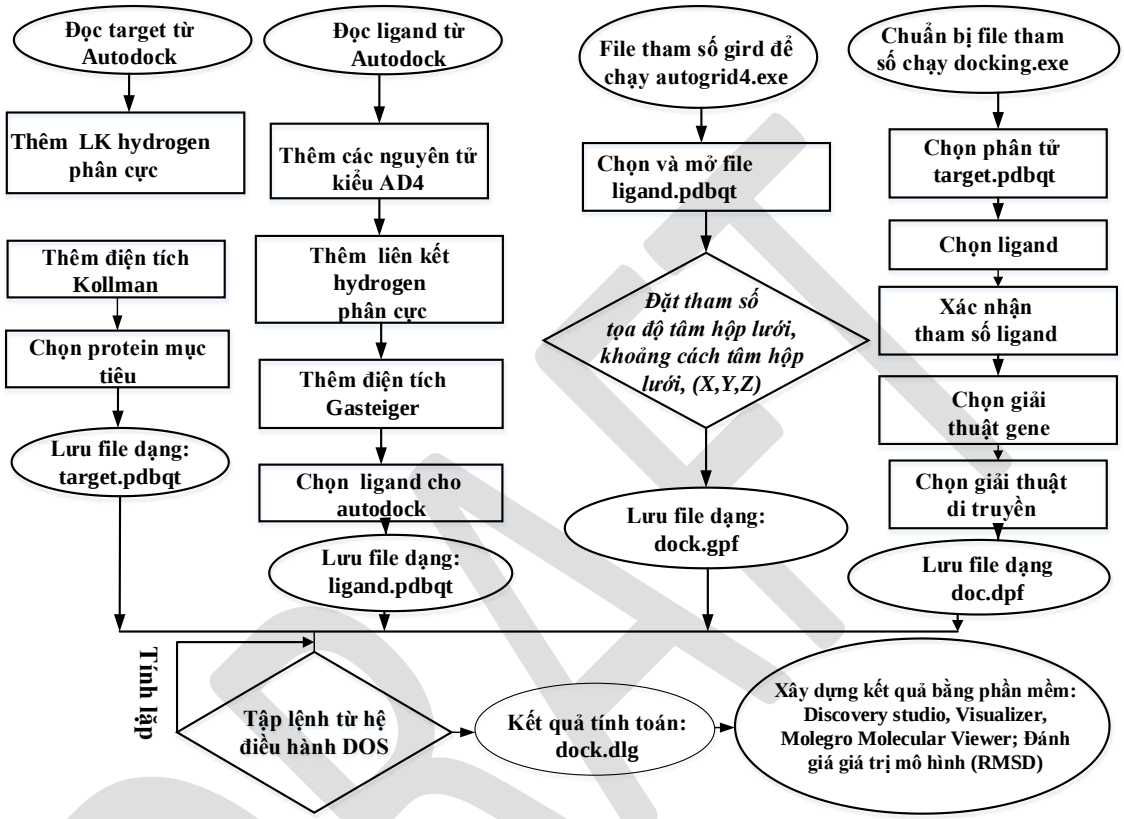
Phổ hấp thụ UV-VIS, huỳnh quang, FT-IR, và lưỡng sắc tròn (CD) lần lượt được đo trên các thiết bị HITACHI UH5300, HITACHI F-2700 (Nhật Bản), Tensor 27 (Bruker, Đức), và Chirascan (Applied Photophysics Ltd., Vương quốc Anh) sử dụng cuvet thạch anh ở nhiệt độ phòng. Phổ khối lượng phân giải cao (HR-MS) được thu thập bằng Agilent 6500 series Q-TOF (Mỹ), và giá trị pH của các dung dịch được đo bằng máy đo pH Hanna HI 2210.

Hệ thống HPLC– DAD (Agilent 1260 Infinity), cột C18 (ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm), máy lọc siêu tinh khiết, máy ly tâm, bơm tiêm thủy tinh.

2.1.3 Phần mềm tính toán, mô phỏng

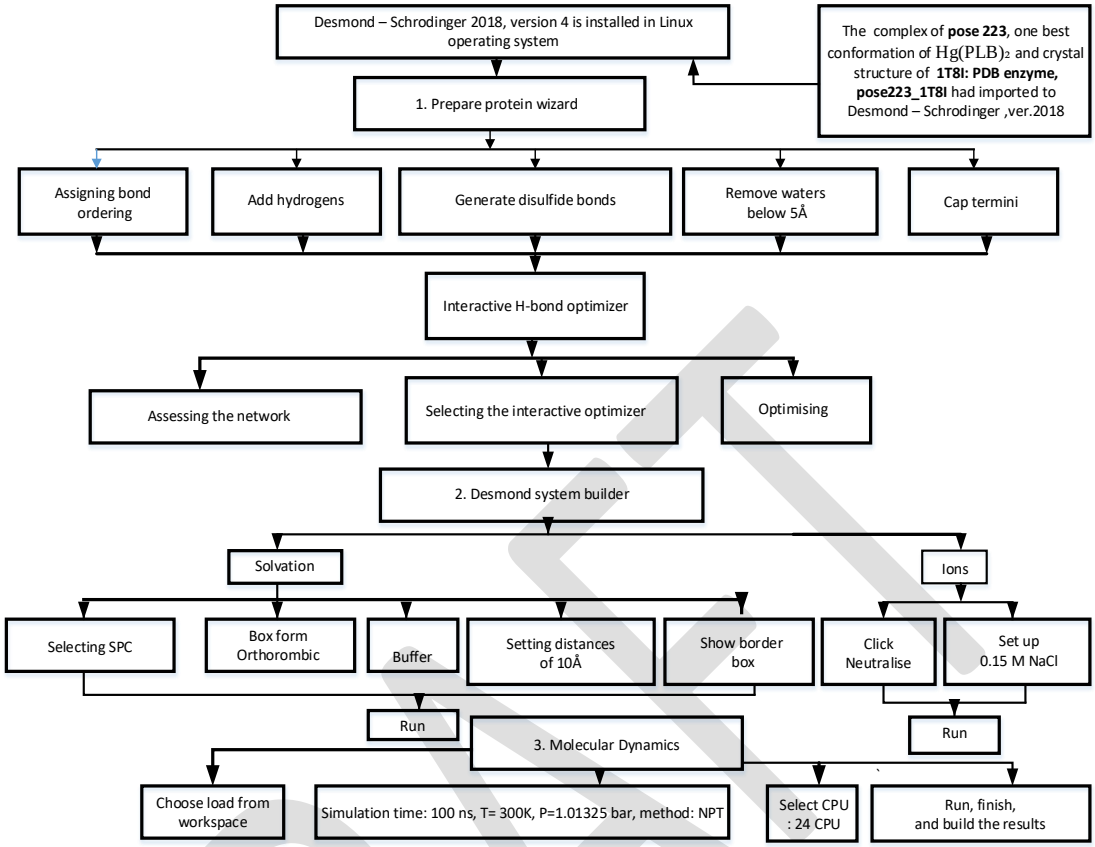
Gaussian 09 dùng để tối ưu hình học và tính toán năng lượng liên kết, phân bố điện tích Mulliken, HOMO–LUMO theo phương pháp DFT. GaussView 6.0 hỗ trợ xây dựng cấu trúc ban đầu và trực quan hóa kết quả từ Gaussian (hình học tối ưu, orbital, phổ). BIOVIA Discovery Studio 2020 Client để chuẩn bị phối tử, protein, khảo sát vị trí hoạt động, và trực quan hóa kết quả docking. AutoDock Tools 1.5.7 và AutoDock Vina tính toán docking phân tử giữa phức (phối tử) và các enzyme mục tiêu (1T8I, 3TOP và 4WCU: PDB file được thu thập tử ngân hàng dữ liệu protein: https://www.rcsb.org/structure/3TOP). Việc tính toán gắn kết giữa 1 phức vào

enzyme hoạt tính có thể thực hiện theo Hình 2.1, tuy nhiên việc tính toán 01 phức gắn kết vào xúc tác men hay enzyme phức tạp hơn và phải chuẩn bị các tham số cho các ion kim loại trước khi tính. Bốn file đó bao gồm: AD4.1_bound.dat, AD4.1_compact.dat, AD4.1_extended.dat và AD4_parameters.dat [114].



Hình 2.1 Sơ đồ chung của sự gắn kết 01 hợp chất (phối tử) vào 01 enzyme

Phần mềm Schrödinger–Desmond v2022-4 mô phỏng động lực học phân tử MD simulation được sử dụng đề tính toán độ bền phức hợp của phức-enzyme trong môi trường thực. Việc tính toán này được thực hiện theo Hình 2.2.



Hình 2.2 Mô phỏng MD của cấu dạng tối ưu phức $Hg(PLB)_2$ với enzyme 1T8I (pose 22-1T8I) thực hiện bằng Desmond–Schrödinger trên Linux.

2.2 Phương pháp nghiên cứu thí nghiệm

2.2.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn, chất chỉ thị

Dung dịch chuẩn của PLB được pha bằng cách cân chính xác 0,0188 g PLB (tương ứng với $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol) vào cốc thủy tinh, hòa tan hoàn toàn trong ethanol bằng khuấy từ và siêu âm 1 phút. Sau đó, dung dịch được chuyển vào bình định mức 100 mL và định mức đến vạch bằng ethanol tuyệt đối để thu được dung dịch gốc $1{,}0 \times 10^{-3}$ mol/L. Dung dịch này được bảo quản ở 0–4 °C, tránh ánh sáng và sử dụng trong vòng 48 giờ để đảm bảo độ ổn định.

Dung dịch chuẩn các ion kim loại Cr(III), Ti(IV), Hg(II) được pha từ các muối $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, $Ti(NH_4)_2F_6$ và $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (Merck, Đức), với nồng độ gốc 1,0 ×

10^{-2} mol/L trong nước cất hai lần. Các dung dịch này được pha loãng đến nồng độ làm việc theo từng khảo sát trong dung dịch nền phù hợp.

Các dung dịch đệm Tris–HCl 0.01 mol/L (có pH từ 6 - 9) được sử dụng trong các nghiên cứu phổ UV–Vis, huỳnh quang và tương tác với protein huyết thanh người (HSA) tùy theo các yêu cầu cụ thể. Để điều chỉnh biến động pH nhỏ dùng các dung dịch HCl/NaOH rất loãng kết hợp với kiểm tra bằng máy đo pH điện cực thủy tinh đã hiệu chuẩn.

Dung dịch gốc của albumin huyết thanh người (HSA) được pha trong đệm phosphate 10 mM (pH 7,4) với nồng độ 300 µM. Dung dịch gốc của các chất đánh dấu vị trí gắn trên protein như warfarin và ibuprofen được pha trong ethanol đạt chuẩn HPLC với nồng độ 6 mM.

Các phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được hòa tan trong DMSO để tạo dung dịch gốc $1{,}0\times10^{-3}$ mol/L (tương ứng 0,006 g/10 mL). Các dung dịch gốc trên đều được bảo quản lạnh (0–4 °C), tránh ánh sáng và sử dụng nhanh (trong thời gian ngắn) để đảm bảo phức ổn định.

2.2.2 Khảo sát phổ UV–Vis, huỳnh quang

2.2.2.1 Phổ hấp thụ UV–Vis của PLB ở các điều kiện pH khác nhau

Dung dịch PLB gốc được pha bằng cách hòa tan PLB tinh khiết trong ethanol tuyệt đối để thu được nồng độ $1{,}0 \times 10^{-3}$ mol/L. Sau đó pha loãng đến 16,0 µM bằng hỗn hợp EtOH:H_2O (7:3, v/v) để sử dụng cho khảo sát phổ. Giá trị pH được điều chỉnh về 5 và 9 bằng HCl 0,01 M hoặc NaOH 0,01 M. Phổ hấp thụ được đo trong vùng bước sóng 200–800 nm bằng cuvet thạch anh 1 cm.

2.2.2.2 Phổ huỳnh quang của PLB và các phức

Dung dịch PLB 30 µM được chuẩn bị trong hỗn hợp EtOH:H_2O (7:3, v/v), pH được điều chỉnh bằng dung dịch đệm tùy theo điều kiện khảo sát. Mẫu được đo phổ huỳnh quang nhằm xác định bước sóng phát xạ đặc trưng.

DRAFT

Phổ huỳnh quang của dung dịch được ghi nhận để xác định λ_{em} đặc trưng, sau đó cường độ huỳnh quang tại bước sóng này được theo dõi theo các điều kiện khảo sát:

Đối với phức $Ti(PLB)_2$: Lấy 2,0 mL dung dịch PLB 100 µM thêm 0,1 mL dung dịch Ti(IV) 1000 µM, sau đó định mức thành 10 mL bằng hỗn hợp EtOH:H_2O (7:3, v/v) và điều chỉnh pH = 5,0. Mẫu được để ổn định 5 phút trước khi đo huỳnh quang tại λ_{ex} = 500 nm và λ_{em} = 605 nm.

Đối với phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: Lấy 2,0–3,0 mL dung dịch PLB 100 µM thêm 0,1 mL dung dịch Cr(III) hoặc Hg(II), sau đó định mức đến 10 mL bằng hỗn hợp EtOH:H_2O (7:3, v/v), điều chỉnh pH = 6,5 bằng dung dịch đệm Tris–HCl. Mẫu được để ổn định trong 3 phút trước khi đo tại λ_{ex} = 310 nm và λ_{em} = 436 nm. Các phổ huỳnh quang được ghi nhận trên máy quang phổ huỳnh quang Hitachi F-2700 (Nhật Bản), sử dụng cuvet thạch anh 1 cm, tốc độ quét 1200 nm/phút, điện áp PMT 700 V, khe phổ 5 nm cho cả bước sóng kích thích và phát xạ. Mẫu được đo ở điều kiện phòng thí nghiệm.

2.2.3 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo phức

2.2.3.1 Ảnh hưởng pH

Đối với phức $Ti(PLB)_2$: Lấy 2,0 mL dung dịch PLB (100 µM) thêm vào 0,1 mL dung dịch Ti(IV) (1000 µM), pha loãng đến 10 mL bằng hỗn hợp EtOH–H_2O (7:3, v/v). Khảo sát pH của dung dịch trong khoảng 2,0–8,0. Sau khi điều chỉnh pH, lắc đều dung dịch và để yên 5 phút. Đo huỳnh quang với bước sóng kích thích và phát xạ tương ứng λ_{ex} = 500 nm, λ_{em} = 605 nm.

Đối với phức $Cr(PLB)_3$: Lấy 3,0 mL dung dịch PLB (100 µM) và 0,1 mL dung dịch $Cr(NO_3)_3$ (1000 µM), pha loãng đến 10 mL bằng hỗn hợp EtOH–H_2O (7:3, v/v). Điều chỉnh trong khoảng 5,0–9,0 bằng dung dịch đệm Tris–HCl. Đo huỳnh quang với bước sóng kích thích và phát xạ tương ứng λ_{ex} = 310 nm, λ_{em} = 436 nm.

Đối với phức $Hg(PLB)_2$: Lấy 2,0 mL dung dịch PLB (100 µM) và 0,1 mL dung dịch $HgCl_2$ (1000 µM), pha loãng đến 10 mL bằng hỗn hợp EtOH–H_2O (7:3, v/v). Điều

DRAFT

chỉnh trong khoảng 6,0–9,0 bằng dung dịch đệm Tris–HCl. Đo huỳnh quang với bước sóng kích thích và phát xạ tương ứng λ_{ex} = 310 nm, λ_{em} = 436 nm.

2.2.3.2 Ảnh hưởng thời gian tạo phức

Dung dịch các hệ phức được chuẩn bị giống như ở mục trên. Cường độ huỳnh quang được đo tại các thời điểm khác nhau: 0, 1, 3, 5, 10, 15 và 20 phút sau khi pha trộn. Điều kiện đo huỳnh quang giống như trên.

2.2.3.3 Ảnh hưởng của dung môi và tỷ lệ EtOH:H_2O

Dung môi khảo sát EtOH, MeOH, BuOH (nồng độ PLB giữ 20–30 µM); Tỷ lệ EtOH:H_2O khảo sát: 10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5 (v/v). Các dung dịch được điều chỉnh pH phù hợp (pH = 5 đối với Ti(IV); pH = 6.5 đối với Cr(III) và Hg(II)). Cường độ huỳnh quang được đo sau khi để yên 3–5 phút. Mục tiêu là lựa chọn dung môi và tỷ lệ EtOH:H_2O cho tín hiệu huỳnh quang cao và ổn định nhất.

2.2.3.4 Khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại

Dung dịch PLB (20 µM) được pha phối hợp với ion (Ti(IV), Cr(III), Hg(II)) cùng với các ion kim loại khảo sát như: Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, v.v., ở nồng độ gấp 10 đến 100 lần. Các mẫu được chuẩn bị trong EtOH–H_2O (7:3), pH được điều chỉnh như các khảo sát trước. Cường độ huỳnh quang được đo tại λ_{ex} và λ_{em} tương ứng cho từng hệ, để đánh giá tính chọn lọc và ảnh hưởng của ion cạnh tranh đến tín hiệu huỳnh quang.

2.2.4 Xác định thành phần phức (phương pháp Job, molar ratio)

2.2.4.1 Xác định thành phần phức bằng phương pháp Job's plot

Phương pháp Job (continuous variation method) là một kỹ thuật phổ biến để xác định tỷ lệ phối trí giữa phối tử và ion kim loại trong phức chất. Nguyên tắc dựa trên việc giữ tổng nồng độ của hai thành phần không đổi, trong khi thay đổi tỷ lệ mol giữa chúng, sau đó ghi nhận tín hiệu (cường độ huỳnh quang hoặc hấp thụ) tương ứng với mỗi tỷ lệ. Giá trị x tại cực đại của đồ thị $I_{FL} \times x$ (với x = [PLB]/([PLB] + [M])) sẽ xác định tỷ lệ phối trí [133].

Dung dịch PLB và ion kim loại được pha ở nồng độ 1,0 × 10^{-3} mol/L (1000 µM). Tổng nồng độ [PLB] + [ion kim loại] trong mỗi mẫu là 100 µM**,** thể tích tổng 5,0 mL. pH được điều chỉnh phù hợp: pH = 5,0 cho phức $Ti(PLB)_2$, pH = 6,5 cho phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.

Dung dịch sau khi pha được để yên 5 phút (Ti(IV)) hoặc 3 phút đối với (Cr(III), Hg(II)) ở nhiệt độ phòng. Sau khi chuẩn bị, đo huỳnh quang với: λ_{ex}=500 nm, λ_{em} = 605 nm đối với phức $Ti(PLB)_2$, λ_{ex} = 310 nm, λ_{em} = 436 nm đối với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Dữ liệu được dùng để vẽ đồ thị I_{FL} × x, từ đó xác định tỷ lệ phối trí trong phức chất tương ứng với giá trị x tại cực đại.

Bảng 2.1 Tỷ lệ mol trong các mẫu Job's plot (thể tích cố định 5,0 mL)

$\boldsymbol{x = \frac{[PLB]}{[PLB]+[M]}}$	**[PLB] (µM)**	**[M] (µM)**	**V(PLB) 1.0 mM (mL)**	**V(M) 1.0 mM (mL)**
0	0	100	0	0,50
0,1	10	90	0,05	0,45
0,2	20	80	0,10	0,40
0,3	30	70	0,15	0,35
0,4	40	60	0,20	0,30
0,5	50	50	0,25	0,25
0,6	60	40	0,30	0,20
0,7	70	30	0,35	0,15
0,8	80	20	0,40	0,10
0,9	90	10	0,45	0,05
1	100	0	0,50	0,00

2.2.4.2 Xác định hằng số liên kết bằng phương pháp Benesi–Hildebrand

Phương pháp Benesi–Hildebrand là một phương pháp phổ biến để xác định hằng số liên kết (K) và bậc phản ứng (n) của sự tạo phức trong dung dịch. Phương pháp này được áp dụng dựa trên sự thay đổi cường độ huỳnh quang (hoặc hấp thụ) theo nồng độ ion kim loại [134], [135].

DRAFT

Nguyên lý phương pháp là dựa trên phương trình tuyến tính dạng:

$$\log(\frac{F-F_0}{F_m-F}) = logK + nlog[M] \quad (2.1)$$

Trong đó: F_0 là cường độ huỳnh quang ban đầu của PLB (không có ion kim loại); F là cường độ huỳnh quang sau khi thêm một lượng [M] cụ thể; F_m là cường độ cực đại (khi tạo phức hoàn toàn); K là hằng số liên kết; n là bậc phản ứng (liên quan đến số phân tử phối tử/phức chất).

Dữ liệu được xử lý bằng cách vẽ đồ thị $\log(\frac{F-F_0}{F_m-F})$ theo $\log [M]$ từ đó xác định được hệ số góc (n) và tung độ gốc (log K).

Dung dịch PLB (20–30 μM) tùy theo hệ phức, thêm các thể tích phù hợp để đạt [M] từ 0 đến 10 μM, đảm bảo tỷ lệ M: PLB nhỏ hơn 1:2 hoặc 1:3. Dung môi EtOH–H_2O (7:3, v/v); pH = 5,0 với hệ $Ti(PLB)_2$, pH = 6,5–7,5 với phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$;

2.2.5 Tính toán các thông số quang học và nhiệt động

Các thông số quang học bao gồm bước sóng phát xạ cực đại (λ_{em}), hệ số dập huỳnh quang Stern–Volmer (K_{sv}), hằng số tốc độ dập huỳnh quang (K_q), và giới hạn phát hiện (LOD) được tính toán dựa trên dữ liệu phổ huỳnh quang của các phức với các nồng độ ion kim loại thay đổi.

Phương trình Stern–Volmer tuyến tính

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.2)$$

Trong đó: F_0: cường độ huỳnh quang của HSA tự do, F: cường độ huỳnh quang của hệ HSA–phức chất, K_{SV} : hằng số Stern–Volmer, [Q]: nồng độ phức chất.

Hằng số tốc độ dập tắt va chạm theo phương trình $K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0}$ (2.3) trong đó τ_0 là thời gian sống huỳnh quang.

Giới hạn phát hiện (LOD) được tính theo công thức: $LOD = \frac{3\sigma}{K}$ (2.4)

DRAFT

Trong đó, σ là độ lệch chuẩn của tín hiệu nền (blank), và K là độ dốc của đường tuyến tính giữa tín hiệu huỳnh quang và nồng độ ion kim loại.

Ngoài ra, các thông số nhiệt động học (hằng số liên kết K_a, enthalpy ΔH, entropy ΔS, và năng lượng Gibbs tự do ΔG) được xác định từ dữ liệu huỳnh quang.

Khi giả định rằng enthalpy (ΔH°) không thay đổi nhiều trong vùng nhiệt độ khảo sát, phương trình Van't Hoff được áp dụng:

$$lnK = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \qquad (2.5)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\,\Delta S^\circ \qquad (2.6)$$

Trong đó: K là hằng số liên kết tại nhiệt độ tương ứng, R là hằng số khí, T nhiệt độ (K).

2.2.6 Phân tích Ti(IV) trong mẫu cát bằng phương pháp huỳnh quang

Mẫu cát được thu tại xã Chí Công, huyện Tuy Phong, tỉnh Bình Thuận. Mẫu được nghiền mịn, bảo quản trong túi PE và tiến hành xác định hàm lượng Ti(IV).

2.2.6.1 Quá trình xử lý mẫu

Mẫu cát sau khi thu được sấy khô ở 105 °C trong 2 h, sau đó được nghiền bằng máy nghiền bi (ball mill) trong 15 phút và rây qua rây chuẩn ASTM số 200 (kích thước hạt < 75 μm) trước khi tiến hành phân tích. Cân chính xác 0,13 g mẫu, cho vào chén bạch kim, thêm 10 mL HF đậm đặc và 2 mL $HClO_4$ đậm đặc. Sau đó nung trong bể cát đến khi khói trắng biến mất. Sau khi làm nguội, dung dịch được cho thêm 5 mL HCl đậm đặc và đun nhẹ cho đến khi mẫu tan hoàn toàn. Dung dịch trong thu được điều chỉnh pH = 5 bằng NH_3 đậm đặc và định mức đến 50 mL bằng nước cất hai lần.

2.2.6.2 Thuốc thử

Dung dịch PLB $1{,}0\times10^{-4}$ mol/L trong ethanol tuyệt đối (bảo quản 0–4 °C, tránh sáng). Dung dịch chuẩn Ti(IV) $1{,}0\times10^{-3}$ mol/L. Điều chỉnh pH**:** NaOH/HCl loãng.

2.2.6.3 Chuẩn bị đường chuẩn

Cho 2,0 mL dung dịch PLB ($1{,}0\times10^{-4}$ M) vào bình định mức 10 mL, thêm lượng thích hợp dung dịch chuẩn Ti(IV) để thu vùng nồng độ $0{,}1–0{,}8\times10^{-5}$ M. Điều chỉnh pH = 5, định mức đến vạch, lắc đều và để yên 5 phút. Đo cường độ huỳnh quang và lập đường chuẩn F = f(C). Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định theo công thức LOD = 3σ/S, LOQ = 10σ/S.

2.2.6.4 Điều kiện đo huỳnh quang

Đo trên máy quang phổ huỳnh quang với bước sóng kích thích λ_{ex} = 500 nm, bước sóng phát xạ λ_{em} = 605 nm, cuvet thạch anh 1 cm; độ rộng khe kích thích 10 nm và khe phát xạ 5 nm.

2.2.6.5 Quy trình định lượng

Lấy một phần thể tích xác định của dung dịch mẫu đã xử lý, cho vào bình định mức 10 mL, thêm 2,0 mL dung dịch PLB ($1{,}0\times10^{-4}$ M), điều chỉnh pH = 5, định mức đến vạch bằng nước cất, lắc đều và để yên 5 phút. Đo cường độ huỳnh quang tại điều kiện trên, tính nồng độ Ti(IV) trong dung dịch từ phương trình đường chuẩn, sau đó quy đổi về hàm lượng trong mẫu rắn ban đầu.

2.2.6.6 Đánh giá độ chính xác và độ lặp lại

Độ chính xác được kiểm tra bằng thí nghiệm thêm chuẩn, tính hiệu suất thu hồi (%) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%). Độ tin cậy được so sánh với phương pháp chuẩn ICP-OES.

2.2.7 Phân tích định lượng Hg(II) bằng phương pháp HPLC–DAD

2.2.7.1 Nguyên tắc

Phân tích định lượng Hg(II) được thực hiện dựa trên phản ứng tạo phức giữa PLB và ion Hg(II) trong môi trường ethanol–nước. Phức $Hg(PLB)_2$ tạo thành có khả năng hấp thụ mạnh trong vùng UV, cho phép phát hiện và định lượng bằng hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò UV (HPLC–DAD). Kết quả được so sánh với phương pháp chuẩn ICP–MS nhằm đánh giá độ chính xác và độ tin cậy.

Chuẩn bị mẫu phân tích HPLC

Dung dịch PLB gốc ($1{,}0 \times 10^{-3}$ mol/L) được pha trong ethanol. Dung dịch Hg(II) chuẩn pha loãng từ dung dịch 1000 mg/L bằng nước siêu tinh khiết. Dung dịch phản ứng, trộn PLB (50 µM) với các nồng độ Hg(II) khác nhau (5–50 µM) trong đệm Tris–HCl, EtOH:H_2O (7:3, v/v), định mức 10 mL. Dung dịch được ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng trước khi lọc qua màng 0,22 µm để tiêm lên hệ HPLC.

2.2.7.2 Điều kiện phân tích HPLC– DAD

Pha động**:** EtOH:H_2O (5:5, v/v).

Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút

Nhiệt độ cột: 40°C

Bước sóng phát hiện: 224 nm

Thời gian chạy: 2-10 phút

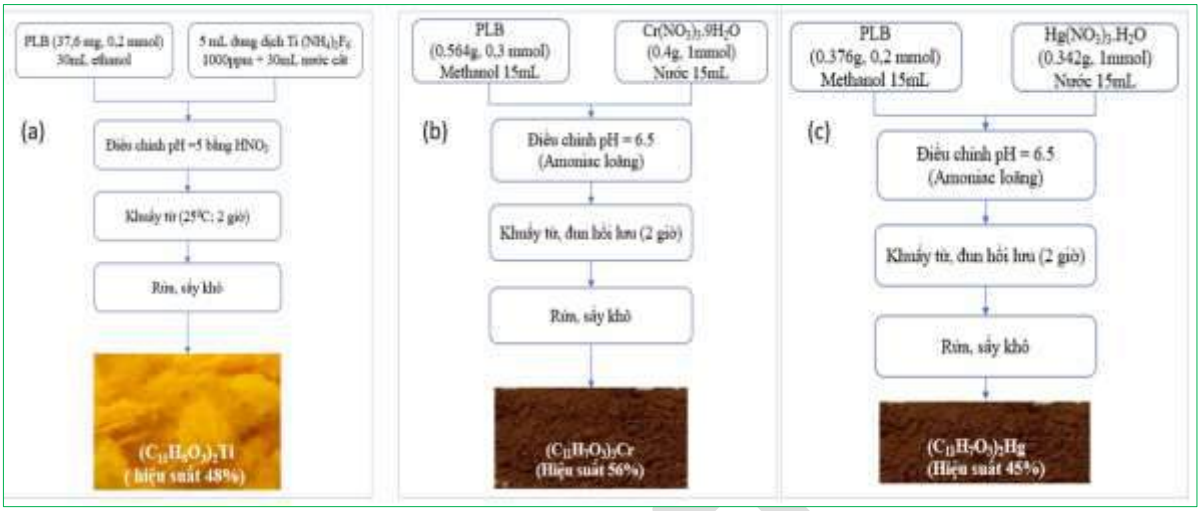
Đồ thị đường chuẩn được xây dựng bằng cách vẽ diện tích pic theo nồng độ Hg(II), tính toán các thông số LOD, LOQ, R^2, độ lặp lại (RSD%).

2.3 Phương pháp tổng hợp và đặc trưng phức rắn

2.3.1 Tổng hợp các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$

Các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được tổng hợp bằng phản ứng phối trí giữa phối tử PLB và muối kim loại tương ứng trong dung môi ethanol hoặc methanol, trong điều kiện khuấy hồi lưu. Sau thời gian phản ứng, sản phẩm được lọc, rửa và sấy chân không. Quá trình tổng hợp được xây dựng dựa trên các nghiên cứu đã công bố về sự tạo phức giữa PLB và các ion kim loại chuyển tiếp hoặc đất hiếm [122][136], đồng thời được điều chỉnh nhằm tối ưu hiệu suất và tính tinh khiết sản phẩm.

DRAFT



Hình 2.3 Sơ đồ tổng hợp phức rắn (a) Phức $Ti(PLB)_2$; (b) phức $Cr(PLB)_3$, (c) Phức $Hg(PLB)_2$

(a) Đối với phức $Ti(PLB)_2$: Cân 37,6 mg PLB (0,2 mmol) vào bình tam giác, thêm 30 mL ethanol để hòa tan hoàn toàn. Thêm 5 mL dung dịch chuẩn Ti(IV) 1000 ppm (đã hòa tan sẵn trong 30 mL nước cất). Điều chỉnh pH của hỗn hợp về pH = 5,0 bằng HNO_3 loãng. Khuấy từ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 2 giờ. Lọc kết tủa, rửa bằng methanol và sấy khô.

(b) Đối với phức $Cr(PLB)_3$: Cân 0,564 g PLB (0,3 mmol) vào bình tam giác, thêm 15 mL methanol để hòa tan. Thêm 0,4 g $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (1,0 mmol) đã hòa tan sẵn trong 15 mL nước. Điều chỉnh pH của hỗn hợp về pH = 6,5 bằng dung dịch NH_3 loãng. Khuấy từ và đun hồi lưu trong 2 giờ. Lọc kết tủa, rửa bằng methanol và sấy khô.

(c) Tổng hợp phức $Hg(PLB)_2$. Cân 0,376 g PLB (0,2 mmol) vào bình tam giác, thêm 15 mL methanol**.** Thêm 0,342 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (1,0 mmol) đã hòa tan trong 15 mL nước. Điều chỉnh pH của hỗn hợp về pH = 6,5 bằng NH_3 loãng. Khuấy từ và đun hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi phản ứng, để nguội, lọc trên phễu thủy tinh, rửa bằng nước cất đến khi hết ion nitrat, sau đó rửa lại bằng methanol. Sấy 40 °C chân không qua đêm.

DRAFT

2.3.2 Phân tích đặc trưng cấu trúc

Sau khi tổng hợp thành công, các phức chất rắn được gửi đi phân tích bằng các phương pháp phổ và kỹ thuật hiện đại để xác định cấu trúc và tính chất vật lý. Cụ thể như sau:

Phổ hồng ngoại đo bằng máy Bruker Tensor 27 trong khoảng 4000–400 cm^{-1}. Phân tích sự dịch chuyển các vùng dao động đặc trưng như O–H, C=O, C–O và sự xuất hiện vùng mới của liên kết M–O để xác định tương tác phối trí.

TGA thực hiện trên thiết bị Mettler Toledo TGA/DSC 1. Mẫu được nung từ 25°C đến 800°C với tốc độ 10°C/phút trong khí N_2. Nhằm xác định độ ổn định nhiệt và thành phần cặn vô cơ sau phân hủy.

Đo phổ nhiễu xạ tia X trên máy Bruker D8 Advance**.** Sử dụng nguồn Cu–Kα (λ = 1,5406 Å), quét từ 5° đến 80° (2θ) với tốc độ 0,02°/s. Mục đích là khảo sát sự thay đổi trong cấu trúc tinh thể của phức so với PLB tự do.

Đo XPS bằng hệ thống Kratos Axis Ultra DLD (Anh). Phân tích các vùng phổ: C1s, O1s, và vùng đặc trưng Ti2p, Cr2p, Hg4f tùy từng mẫu. Chuẩn năng lượng dựa trên đỉnh C1s tại 284,6 eV. Tính toán FWHM, diện tích peak và phần trăm nguyên tử để đánh giá trạng thái oxi hóa và môi trường hóa học.

Phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC và HMBC đo bằng máy Bruker Avance III (500 MHz) trong dung môi DMSO-d_6. Xác định vị trí liên kết và các tương quan proton–carbon, hỗ trợ xác định cấu trúc.

Phổ HR-MS đo bằng thiết bị Orbitrap Thermo Scientific, nhằm xác định chính xác khối lượng phân tử của các phức thông qua ion $[M+H]^+$.

Phân tích SEM–EDX để quan sát hình thái bề mặt và xác định thành phần nguyên tố (C, O, Ti, Cr, Hg) kèm tỷ lệ nguyên tử.

Dựa vào dữ liệu từ FT-IR, XPS, NMR, HMBC, HR-MS và SEM–EDX**,** cấu trúc các phức PLB–M được đề xuất sử dụng phần mềm ChemDraw, phù hợp với hóa trị và đặc điểm quang phổ.

DRAFT

2.4 Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.4.1 Thử nghiệm kháng tế bào ung thư (MTT assay)

Khả năng ức chế tăng sinh của các dòng tế bào ung thư HepG2, MCF-7 và A549 của PLB, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đã được đánh giá bằng phương pháp MTT. Tế bào được gieo và nuôi trồng trong đĩa 96 giếng, ủ trong môi trường DMEM bổ sung FBS 10%. Sau khi ủ mẫu với các nồng độ hợp chất (2,5; 5; 10; 20; 50; 100 µM) trong 48h, 10 µL dung dịch MTT (5 mg/mL) được thêm vào và ủ 4h. Tinh thể formazan tạo ra được hòa tan bằng DMSO, đo độ hấp thụ OD ở 540 nm bằng đọc ELISA. Tỷ lệ sống tế bào được tính theo công thức: % sống = (ODở mẫu/Đối chứng) × 100. Giá trị IC_{50} được tính từ đồ thị liều lượng - ứng dụng TableCurve 2Dv4 [137], [138], [139].

2.4.2 Ức chế enzym α-glucosidase

Khả năng ức chế enzym α-glucosidase được xác định theo phương pháp vi đĩa 96 giếng [140][141] với cơ chất p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (pNPG). Mẫu được hòa tan trong DMSO (20 mg/mL) rồi pha loãng trong dung dịch phosphate buffer (pH 6,8) tạo dãi nồng độ (4; 20; 100; 500 µg/mL). Cho 50 µL mẫu, 20 µL enzym (0,5 U/mL) và 130 µL buffer vào giếng, ủ 37°C trong 15 phút, sau đó thêm 50 µL pNPG (5 mM), ủ tiếp 60 phút. Dừng phản ứng bằng 80 µL Na_2CO_3 (0,2M), đo OD 405 nm. % ức chế enzym tính theo công thức: % ức chế = 100 - [(ODmẫu/ODđối chứng) × 100]. Giá trị IC_{50} tính bằng phần mềm TableCurve2Dv4 [142], [143], [144].

2.4.3 Kháng viêm theo phương pháp ức chế NO (kháng viêm)

Hoạt tính chống viêm được xác định theo khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264,7 kích thích bởi LPS [145][146][147]. Tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng (2×10^5 tb/giếng), nuôi 24 giờ. Sau khi thay môi trường không FBS 3h, mẫu nghiên cứu được thêm và ủ 2 giờ trước khi kích thích bằng LPS (10 µg/mL) trong 24h. Sau đó thu môi trường và đo hàm lượng NO (NO_2^-) theo bộ kit Griess, OD đo tại 540 nm. Tính % ức chế theo công thức: % ức chế = 100 - (NOmẫu / NOLPS) × 100. Giá trị IC_{50} xác định bằng TableCurve 2Dv4 [148].

2.4.4 Đánh giá độc tính tế bào đối với dòng tế bào lành HEK-293A

Nhằm đánh giá độ độc tế bào không đặc hiệu và độ chọn lọc sinh học của các hợp chất, dòng tế bào HEK-293A (tế bào thận gốc phôi ở người) đã được sử dụng để xem xét khả năng gây độc lên tế bào lành. Phép thử được thực hiện theo phương pháp SRB (Sulforhodamine B), một kỹ thuật đo hàm lượng protein để phản ánh mức độ sống sót của tế bào sau khi xử lý.

Các tế bào HEK-293A được nuôi trong môi trường MEME bổ sung 10% FBS, penicillin/streptomycin và glutamine, sau đó được gieo vào đĩa 96 giếng (190 µL/giếng) và ủ 18–20 giờ để ổn định. Mẫu thử (dung dịch DMSO) được pha thành dãy nồng độ (20; 4; 0,8; 0,16; 0,032 µg/mL) và thêm 10 µL vào mỗi giếng. Sau 48 giờ, tế bào được cố định bằng dung dịch TCA 20%, nhuộm bằng thuốc SRB 0,4% và rửa bằng acid acetic 1%, sau đó giải hấp bằng Tris base 10 mM.

Đo OD ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc ELISA, giá trị phần trăm sống sót được tính theo công thức: % sống = (ODmẫu / ODđối chứng) × 100.

Giá trị IC_{50} được tính bằng phần mềm TableCurve 2Dv4. Dung dịch ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương, DMSO 1% làm đối chứng âm. Tiêu chí hoạt tính tốt được tham khảo theo Hughes cùng cộng sự. (2011) [137]: chất tinh khiết có $IC_{50} \leq 5$ µM.

Toàn bộ các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

2.5 Mô phỏng và tính toán hóa học

2.5.1 Mô phỏng tương tác của phức với các đích tác động

Ba enzyme được lựa chọn cho nghiên cứu mô phỏng bao gồm: 1T8I enzyme liên quan đến cơ chế gây ung thư; 3TOP α-glucosidase – mục tiêu điều trị tiểu đường type II; 4WCU – enzyme điều hòa sản sinh NO, liên quan đến phản ứng viêm. Các enzyme này đều có cấu trúc tinh thể đã được xác định rõ ràng trong Cơ sở Dữ liệu PDB (Protein Data Bank) và là các đích phân tử quan trọng được nghiên cứu rộng rãi trong lĩnh vực phát triển thuốc. Mục tiêu chính của phần này là đánh giá khả năng tương

tác giữa các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với ba enzyme đích thông qua mô phỏng docking và mô phỏng động lực học phân tử (MD), từ đó xác định tiềm năng ứng dụng dược lý của các phức chất.

2.5.1.1 Mô phỏng docking phân tử

Cấu trúc của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được tối ưu hóa bằng phương pháp DFT (B3LYP/LANL2DZ cho nguyên tử kim loại và 6-311G(d,p) cho nguyên tử phi kim) trong dung môi ethanol bằng phần mềm Gaussian 09W. Các cấu trúc tối ưu sau đó được chuyển đổi sang định dạng *.mol và *.pdbqt bằng GaussView 5.0.8**,** OpenBabel

Phối tử được thêm hydrogen, xác định trạng thái tích điện và các liên kết tự do để mô phỏng linh hoạt.

Cấu trúc tinh thể của 1T8I, 3TOP và 4WCU được tải từ RCSB-PDB dưới định dạng *.pdb. Quá trình tiền xử lý được thực hiện bằng PyMOL và AutoDockTools**,** bao gồm: Loại bỏ nước, ion, và phối tử nội tại, thêm hydrogen phân cực, chuyển đổi sang định dạng *.pdbqt để sẵn sàng mô phỏng.

Mô phỏng được tiến hành bằng phần mềm AutoDock Vina 1.1.2 trong môi trường Linux (Ubuntu 20.04). Hộp tìm kiếm (grid box) được thiết lập bao phủ toàn bộ vị trí hoạt động của enzyme. Các thông số bao gồm tọa độ trung tâm và kích thước hộp được xác định bằng phần mềm AutoDockTools. Thông số mô phỏng**:** exhaustiveness = 8; số cấu hình (poses) = 10; cấu hình có ΔG thấp nhất được chọn để phân tích.

Kết quả được trực quan hóa bằng PyMOL 2.5 và Discovery Studio Visualizer**.** Các thông tin phân tích bao gồm: Năng lượng liên kết Gibbs tự do ($\Delta G_binding$), Vị trí và số lượng liên kết hydro, Các tương tác Van der Waals, π–π stacking, và kỵ nước.

2.5.1.2 Mô phỏng động lực học phân tử

Để kiểm tra độ ổn định của phức hợp enzyme–phối tử trong điều kiện sinh học mô phỏng, mô phỏng động lực học phân tử được tiến hành với các cấu hình docking tốt nhất đã chọn.

Mô phỏng được thực hiện bằng phần mềm Desmond–Schrödinger Suite trên hệ điều hành Ubuntu 20.04. Phức hợp enzyme–phối tử được hòa tan trong hộp nước TIP3P với biên hộp hình chữ nhật và khoảng cách đệm 10 Å. Hệ thống được trung hòa bằng cách thêm ion Na^+/Cl^- tương ứng với nồng độ 0,15 M. Lực trường sử dụng: OPLS_2005.

Tối ưu hóa năng lượng hệ thống trước mô phỏng.

Giai đoạn thích nghi: mô phỏng NPT 1 ns để ổn định áp suất và nhiệt độ.

Giai đoạn sản xuất: mô phỏng NPT 100 ns ở 300 K và 1 atm.

Ghi dữ liệu mỗi 100 ps cho phân tích.

Phân tích biến thiên RMSD, RMSF, năng lượng toàn hệ thống**,** và số liên kết hydro theo thời gian. Biểu diễn dữ liệu bằng phần mềm Simulation Interaction Diagram và VMD.

2.5.2 Tính toán DFT

Các tính toán hóa lượng tử được thực hiện nhằm khảo sát đặc điểm điện tử và phân bố mật độ điện tích trong các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$, bao gồm năng lượng của các orbital biên (HOMO–LUMO), độ chênh lệch năng lượng (ΔE_{gap}), tích điện Mulliken và phân tích orbital liên kết tự nhiên (NBO).

2.5.2.1 Dựng cấu trúc và tối ưu hóa hình học

Cấu trúc 3D ban đầu của PLB và các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được dựng bằng phần mềm GaussView 6.0, sau đó tối ưu hình học không ràng buộc bằng phương pháp DFT trong Gaussian 09.

2.5.2.2 Điều kiện tính toán

Phương pháp tính DFT với hàm B3LYP (Becke’s 3-parameter hybrid functional kết hợp với hàm tương quan Lee–Yang–Parr).

Hàm cơ sở LANL2DZ cho nguyên tử kim loại chuyển tiếp (Ti, Cr, Hg) bao gồm giả thế hiệu dụng (ECP); 6-31G (d, p) cho các nguyên tử còn lại (C, H, O).

DRAFT

Spin Tùy thuộc vào trạng thái oxi hóa và cấu hình điện tử của ion kim loại (ví dụ: Cr(III) – high spin d^3, Hg(II) – d^{10}).

2.5.2.3 Các thông số được trích xuất

Năng lượng orbital HOMO và LUMO (eV), từ đó tính toán $\Delta E_{gap} = E_{LUMO} - E_{HOMO}$, giúp đánh giá độ ổn định điện tử của phức chất cũng như khả năng tham gia các quá trình chuyển điện tử và hoạt tính hóa học của chúng.

Tích điện Mulliken trên nguyên tử trung tâm kim loại và các nguyên tử phối trí, cho thấy sự phân bố điện tích và mức độ phân cực liên kết.

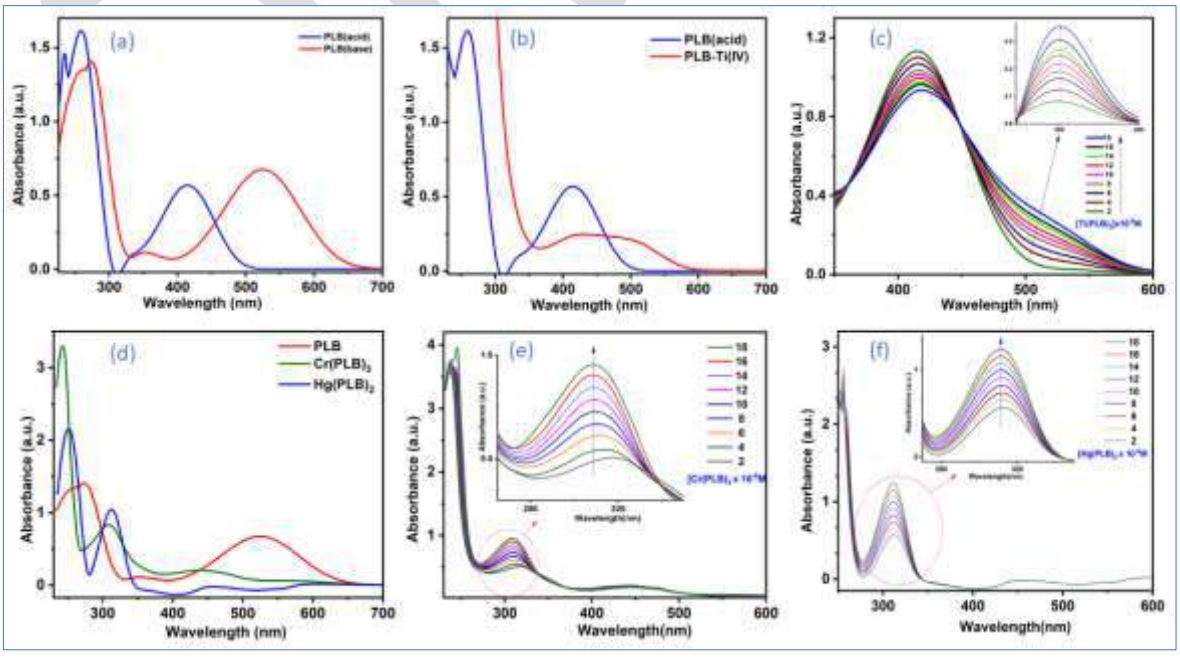
Phân tích NBO (Natural Bond Orbital) nhằm xác định các tương tác liên kết, độ lai hóa, và khả năng tương tác donor–acceptor giữa PLB và ion kim loại.

Các dữ liệu đầu ra được phân tích và trực quan hóa bằng GaussView 6.0, xuất bảng giá trị bằng Notepad hoặc Excel để trích thông tin HOMO–LUMO và phân bố điện tích.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm phức PLB với Cr(III), Hg(II) và Ti(IV) trong dung dịch

3.1.1 Phổ UV–Vis



Hình 3.1 Phổ UV–Vis của: (a) PLB trong môi trường acid/base (EtOH–H_2O); (b) PLB và phức $Ti(PLB)_2$ (pH=5); (c) Phức $Ti(PLB)_2$ với nồng độ tăng dần (pH=5); (d) Phổ hấp thụ của PLB, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ (pH=6,5); (e) Phức $Cr(PLB)_3$ với nồng độ tăng dần (pH=6,5); (f) Phức $Hg(PLB)_2$ với nồng độ tăng dần (pH=6,5)

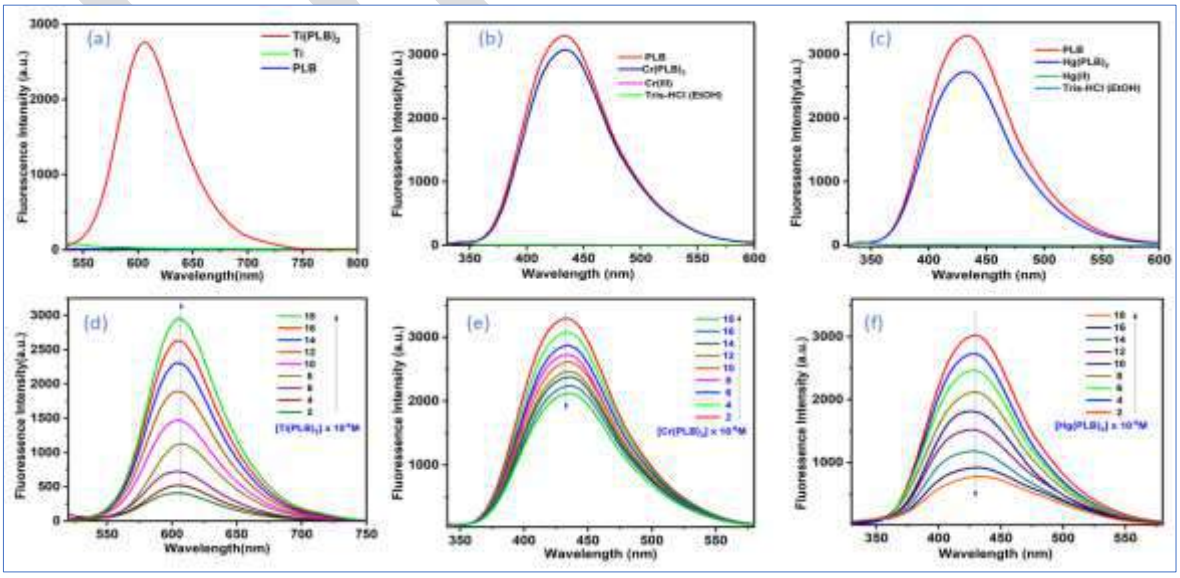
Trong môi trường acid, phổ UV–Vis của PLB (Hình 3.1a) có ba đỉnh hấp thụ tại 236 và 264 nm tương ứng với các vùng chuyển dời điện tử π–π* trong hệ vòng liên hợp và một đỉnh xung quanh vùng 400–420 nm liên quan đến sự chuyển dời điện tử n–π* đây là vùng cho biết khả năng rất nhạy với sự tạo phức[149]. Trong môi trường kiềm, ngoài đỉnh hấp thụ tại 275 nm, phổ UV–Vis của PLB còn xuất hiện một đỉnh dịch đỏ rõ rệt tại vùng 500–520 nm. Hiện tượng này phản ánh sự thay đổi trong cấu trúc điện tử của phân tử. Nguyên nhân có thể do nhóm hydroxyl (–OH) trên PLB bị khử proton, tạo thành anion phenolate ($–O^-$). Quá trình này làm tăng mật độ điện tử và làm giảm độ chênh lệch năng lượng HOMO–LUMO, dẫn đến sự dịch đỏ (red shift) trong phổ hấp thụ. Như vậy sự thay đổi pH dẫn đến sự thay đổi trạng thái proton hóa của PLB, kéo theo sự thay đổi trong cấu trúc điện tử, và điều này ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng phối trí với các ion kim loại.

Hình 3.1b trình bày phổ hấp thụ UV–Vis của PLB và phức $Ti(PLB)_2$ ở pH = 5. Kết quả cho thấy bước sóng hấp thụ thay đổi về bước sóng và cường độ, chứng tỏ đã có sự tương tác giữa PLB và ion Ti(IV). Để khẳng định quá trình tạo phức, một dãy dung dịch hỗn hợp Ti(IV)–PLB với nồng độ tăng dần được chuẩn bị tại cùng điều kiện pH = 5. Hình 3.1c biểu diễn phổ hấp thụ của dãy dung dịch này. Kết quả cho thấy có sự xuất hiện rõ rệt của một vùng hấp thụ mới trong vùng 450–550 nm, với cực đại khoảng 500 nm, thuộc vùng ánh sáng xanh lục. Theo quy tắc màu bù, khi dung dịch hấp thụ mạnh ở vùng này, phức $Ti(PLB)_2$ biểu hiện màu cam–đỏ cam đặc trưng trong vùng ánh sáng khả kiến. Cường độ tăng dần theo nồng độ Ti(IV). Sự hình thành vùng mới này là bằng chứng thực nghiệm thuyết phục về quá trình tạo phức giữa PLB và Ti(IV). Hiện tượng này có thể được giải thích do sự phối trí của nhóm carbonyl (C=O) trong cấu trúc PLB với ion Ti(IV), làm thay đổi cấu trúc điện tử của phân tử PLB và dẫn đến sự xuất hiện chuyển dời điện tử π→π* hoặc n→π* trong hệ liên hợp.

Hình 3.1d là phổ hấp thụ của PLB tự do với các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ ở pH = 6,5. Kết quả cho thấy cả hai phức đều có sự thay đổi về bước sóng và cường độ hấp thụ so với PLB ban đầu, đặc biệt ở vùng gần 310 nm. Đây là vùng hấp thụ nằm ngoài vùng khả kiến, do đó dù phổ thay đổi rõ rệt, màu dung dịch của các phức Cr(III) và Hg(II) trong ánh sáng thường chỉ biến đổi nhẹ hoặc gần như không đổi so với PLB, Điều này phù hợp với việc cả hai phức không xuất hiện dải hấp thụ mạnh trong vùng 400–600 nm, nên không tạo màu rõ rệt như phức $Ti(PLB)_2$. Kết quả cho thấy có sự tương tác giữa PLB với Cr(III) và Hg(II). Để khẳng định quá trình tạo phức, một dãy dung dịch Cr(III)–PLB với nồng độ tăng dần được chuẩn bị ở pH = 6,5. Hình 3.1e thể hiện phổ hấp thụ của dãy dung dịch này, kết quả có sự tăng dần cường độ hấp thụ tại bước sóng 310nm khi nồng độ Cr(III) tăng. Sự thay đổi phổ này chứng tỏ sự hình thành phức $Cr(PLB)_3$ trong dung dịch. Tương tự, Hình 3.1f biểu diễn phổ hấp thụ của dãy dung dịch Hg(II)–PLB với nồng độ Hg(II) tăng dần tại pH = 6,5. Kết quả cũng cho thấy có sự tăng cường độ hấp thụ theo nồng độ Hg(II), là bằng chứng rõ ràng cho quá trình tạo phức $Hg(PLB)_2$.

Như vậy, kết hợp kết quả ở Hình 3.1b–f, có thể khẳng định PLB tạo phức với cả ba ion kim loại Ti(IV), Cr(III) và Hg(II) trong dung dịch, với đặc trưng quang phổ khác biệt, là cơ sở cho các khảo sát huỳnh quang và phân tích định lượng ở các phần tiếp theo.

3.1.2 Phổ huỳnh quang



Hình 3.2 Phổ huỳnh quang của: (a) PLB, Ti(IV) và $Ti(PLB)_2$ (λ_{ex} = 500 nm, pH = 5); (b) PLB, Cr(III) và $Cr(PLB)_3$ (λ_{ex} = 310 nm, pH = 6,5); (c) PLB, Hg(II) và $Hg(PLB)_2$ (λ_{ex} = 310 nm, pH = 6,5); (d) $Ti(PLB)_2$ nồng độ tăng dần (pH = 5); (e) $Cr(PLB)_3$ nồng độ tăng dần (pH = 6,5); (f) $Hg(PLB)_2$ nồng độ tăng dần (pH = 6,5).

Hình 3.2a trình bày phổ huỳnh quang của PLB, ion Ti(IV) và phức $Ti(PLB)_2$ trong điều kiện pH 5 và bước sóng kích thích λ_{ex} = 500 nm. Kết quả cho thấy PLB tự do và ion Ti(IV) riêng lẻ gần như không phát huỳnh quang. Trong khi đó phức $Ti(PLB)_2$ phát huỳnh quang rất mạnh tại bước sóng 605 nm. Kết quả này cho thấy có sự tương tác giữa PLB và Ti(IV) tạo ra phức phát huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang này tăng dần theo nồng độ Ti(IV), phản ánh quá trình tạo phức hiệu quả giữa PLB và ion kim loại này (Hình 3.2d). Sự tăng cường độ huỳnh quang có thể được lý giải bởi sự hình thành phức $Ti(PLB)_2$ có cấu trúc ổn định, giúp ngăn chặn sự mất năng lượng phi bức xạ, từ đó làm tăng hiệu suất huỳnh quang của phức. Việc Ti(IV) phối trí với PLB theo kiểu hai càng (bidentate) tạo nên một cấu trúc cứng hơn (rigidified complex), từ đó làm giảm dao động nội phân tử và tăng thời gian sống của trạng thái kích thích. Cơ chế này tương tự như đã quan sát trong các hệ Zn–GSH [150]và các nghiên cứu mô phỏng lý thuyết, nơi cấu trúc phức cứng góp phần làm giảm chuyển động phi bức xạ và tăng cường huỳnh quang. Ngoài ra, sự dịch đỏ (bathochromic shift) cũng phản ánh sự thay đổi phân bố điện tử trong hệ PLB-Ti(IV), xác nhận có sự tương tác điện tử giữa PLB và Ti(IV). Những đặc điểm này cho thấy PLB có tiềm năng được khai thác như một đầu dò huỳnh quang chọn lọc để phát hiện ion Ti(IV) thông qua cơ chế phát huỳnh quang (turn-on fluorescence).

Hình 3.2b và 3.2c trình bày phổ huỳnh quang của PLB, Cr(III), Hg(II) và các phức tương ứng trong dung dịch đệm Tris–HCl/EtOH ở pH 6,5 với bước sóng kích thích λ_{ex} = 310 nm. PLB tự do phát huỳnh quang mạnh tại 436 nm, trong khi Cr(III) và Hg(II) riêng lẻ không phát huỳnh quang. Khi tạo phức, cường độ huỳnh quang giảm rõ rệt, chứng tỏ có sự hình thành $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ trong dung dịch. Hiện tượng dập tắt huỳnh quang này được giải thích do thay đổi cấu trúc điện tử hoặc quá trình chuyển electron trong phức, làm giảm hiệu quả phát xạ. Kết quả Hình 3.2e và 3.2f cho thấy cường độ huỳnh quang của PLB tại bước sóng 436 nm giảm tuyến tính khi

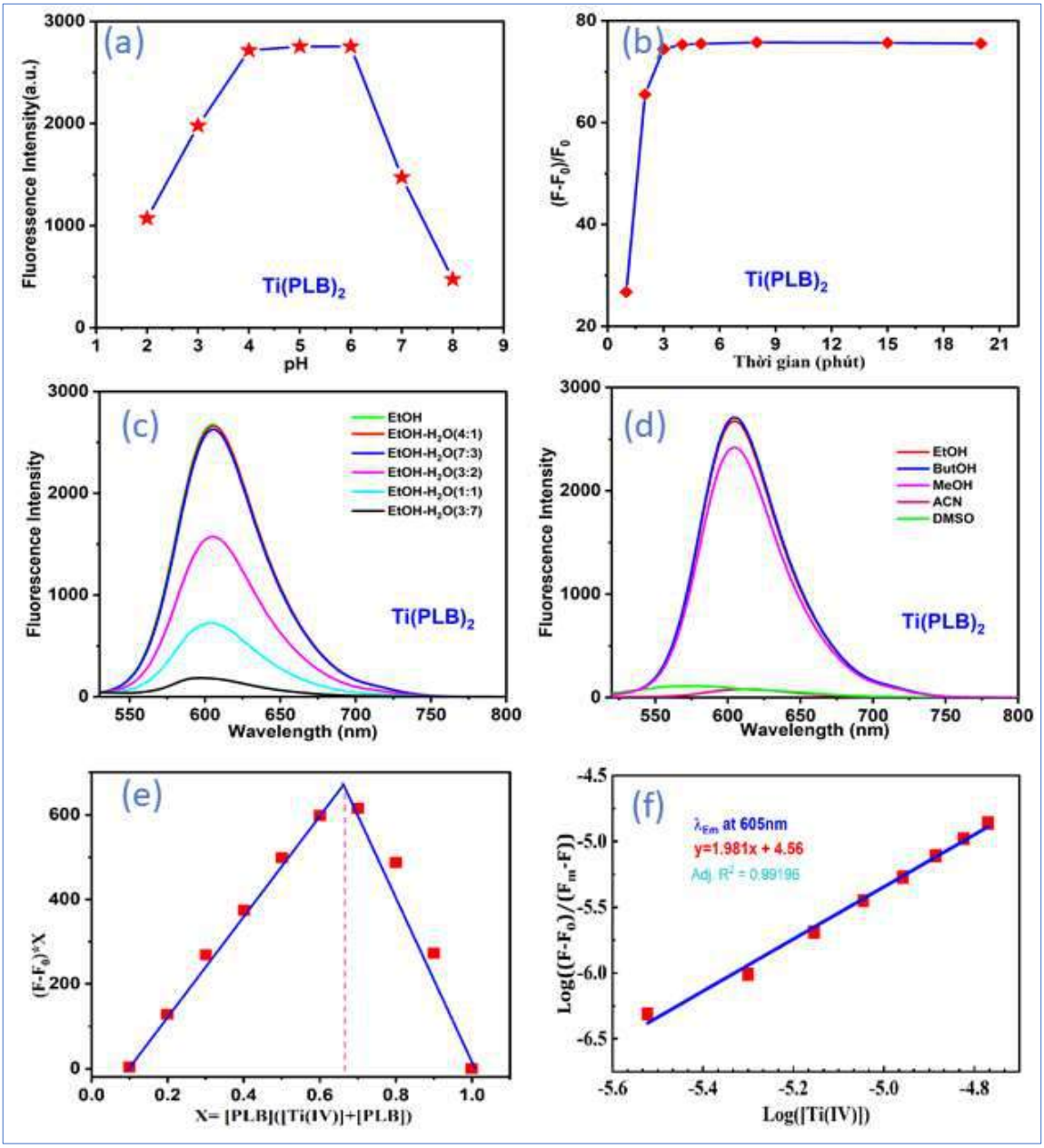
nồng độ Cr(III) hoặc Hg(II) tăng dần. Xu hướng giảm tuyến tính này là bằng chứng rõ ràng cho sự hình thành phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ trong dung dịch, đồng thời khẳng định rằng chính các phức này đã gây ra hiệu ứng dập tắt huỳnh quang. Hiện tượng dập tắt huỳnh quang này là kết quả của sự tương tác giữa ion kim loại với các nhóm chức trên PLB, làm thay đổi cấu trúc điện tử của hệ. Về cơ chế, Cr(III) và Hg(II) có thể đóng vai trò là tác nhân nhận electron thúc đẩy quá trình dập tắt huỳnh quang thông qua chuyển electron cảm ứng bởi ánh sáng (PET – Photoinduced Electron Transfer). Ngoài ra, sự hình thành phức còn có thể kích hoạt các cơ chế phi bức xạ khác như chuyển điện tử nội phân tử (ICT – Intramolecular Charge Transfer). Riêng Hg(II), do là ion kim loại nặng, có thể gây dập tắt huỳnh quang thông qua hiệu ứng nguyên tử nặng (heavy atom effect), làm tăng xác suất chuyển trạng thái nội hệ (ISC – intersystem crossing) [151][152][153].

Những kết quả trên không chỉ khẳng định PLB có khả năng tương tác với Cr(III) và Hg(II), mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng của PLB như một đầu dò huỳnh quang chọn lọc để phát hiện, định lượng các ion kim loại này. Cơ chế dập tắt huỳnh quang sau khi tạo phức đóng vai trò then chốt trong việc nhận biết sự có mặt của ion, góp phần định hướng phát triển các hệ cảm biến huỳnh quang nhạy và chọn lọc dựa trên nền PLB.

DRAFT

3.1.3 Điều kiện tối ưu hình thành phức trong dung dịch

3.1.3.1 Điều kiện tối ưu với phức $Ti(PLB)_2$



Hình 3.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành phức $Ti(PLB)_2$: (a) pH; (b) thời gian; (c) tỉ lệ EtOH–H_2O; (d) loại dung môi; (e) biểu đồ Job; (f) đường chuẩn Benesi–Hildebrand (λ_{ex}= 500 nm, λ_{em} = 605 nm).

Để đánh giá ảnh hưởng của pH đến đặc tính phát xạ của phức $Ti(PLB)_2$, các thí nghiệm được thực hiện trong khoảng pH từ 2 đến 8, với bước sóng kích thích λ_{ex} = 500 nm và bước sóng phát xạ λ_{em} = 605 nm. Kết quả được trình bày trong Hình 3.3a

cho thấy cường độ huỳnh quang đạt cực đại trong khoảng pH 4–6, sau đó giảm đáng kể khi pH tăng cao hơn. Phát xạ tăng trong môi trường acid có thể bắt nguồn từ trạng thái proton hóa thuận lợi của PLB, tạo điều kiện cho quá trình phối trí hiệu quả với ion Ti(IV), dẫn đến hình thành phức $Ti(PLB)_2$ có khả năng phát xạ mạnh. Ngược lại, ở pH kiềm hơn, Ti(IV) có xu hướng thủy phân tạo thành các dạng hydroxo như $[Ti(OH)]^{3+}$ hoặc TiO^{2+}, làm giảm khả năng phối trí với PLB, từ đó dẫn đến suy giảm cường độ huỳnh quang [154]. Dựa trên kết quả này, pH 5 được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các khảo sát tiếp theo liên quan đến hệ $Ti(PLB)_2$.

Kết quả Hình 3.3b cường độ huỳnh quang của hệ $Ti(PLB)_2$ tăng nhanh trong 2–5 phút đầu, sau đó đạt trạng thái ổn định, cho thấy quá trình tạo phức diễn ra nhanh chóng và ổn định trong thời gian khảo sát. Kết quả này phản ánh động học hình thành phức nhanh và ổn định của hệ, phù hợp cho các ứng dụng phân tích nhanh hoặc phân tích vết trong thực tế.

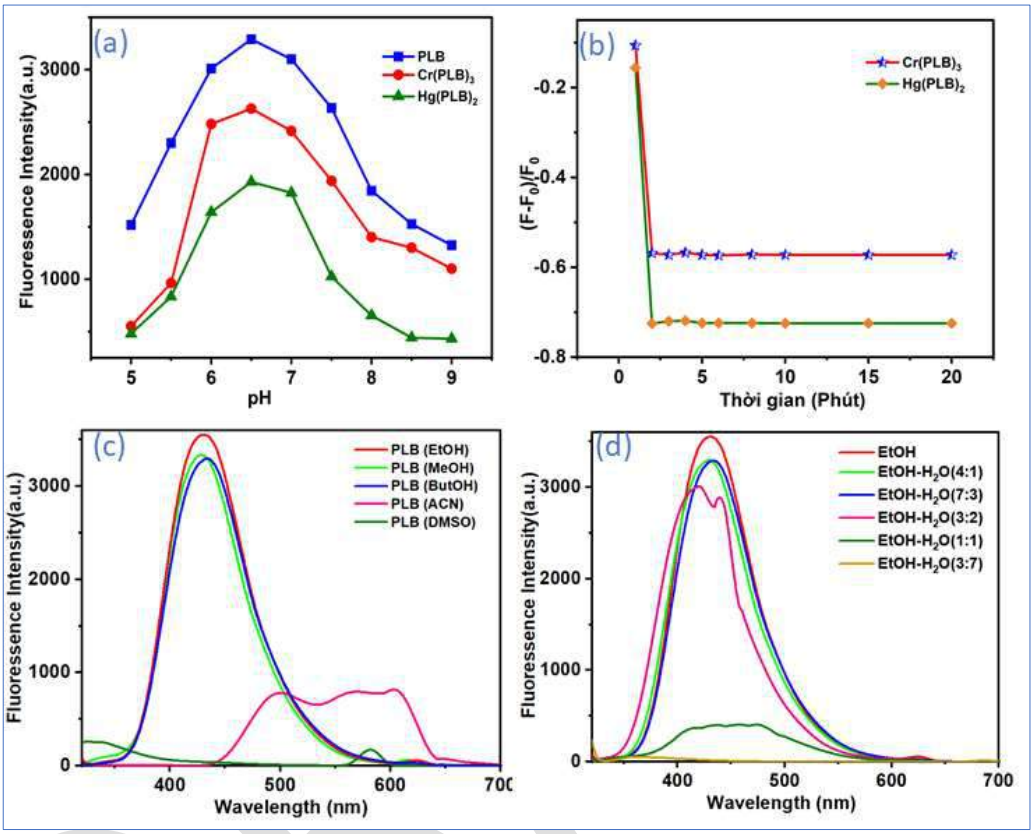
Dung môi là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến đặc tính huỳnh quang, đặc biệt trong quá trình tạo phức. Hình 3.3d thể hiện kết quả ảnh hưởng của các loại dung môi khác nhau đến cường độ phát xạ của phức $Ti(PLB)_2$ tại pH 5 (λ_{ex} = 500 nm, λ_{em} = 605 nm). Trong các dung môi khảo sát, ethanol (EtOH) cho tín hiệu huỳnh quang cao nhất, tiếp theo là methanol (MeOH) và butanol (BuOH). Mặc dù MeOH và BuOH cũng cho cường độ phát xạ tương đối mạnh, EtOH được lựa chọn làm dung môi tối ưu nhờ độc tính thấp hơn, phổ biến trong thực hành phân tích, và thân thiện với các ứng dụng sinh học.

Hình 3.3c là kết quả của quá trình khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ $EtOH:H_2O$ đến cường độ phát xạ. Tỷ lệ $EtOH:H_2O$ = 7:3 (v/v) cho cường độ huỳnh quang cao và tương đương với các tỷ lệ EtOH cao hơn như 4:1 hoặc EtOH nguyên chất. Tuy nhiên, trong các ứng dụng phân tích hoặc sinh học, việc duy trì tỷ lệ nước cao hơn có thể thuận lợi hơn cho hòa tan mẫu thực và tương thích sinh học. Do đó, tỷ lệ $EtOH:H_2O$ = 7:3(v/v) được lựa chọn như một điều kiện cân bằng giữa độ nhạy và khả năng ứng dụng thực tế.

Dựa trên các điều kiện tối ưu trên, thành phần của phức $Ti(PLB)_2$ được xác định bằng phương pháp Job's plot. Kết quả (Hình 3.3e) cho thấy tỷ lệ phối trí giữa Ti(IV) và PLB là 1:2. Hằng số bền (K) được tính theo phương pháp Benesi–Hildebrand từ phổ

huỳnh quang (Hình 3.3f), với giá trị log K = 4,56, tương ứng K ≈ 3,63 × 10^4, cho thấy ái lực liên kết mạnh giữa Ti(IV) và PLB trong dung dịch.

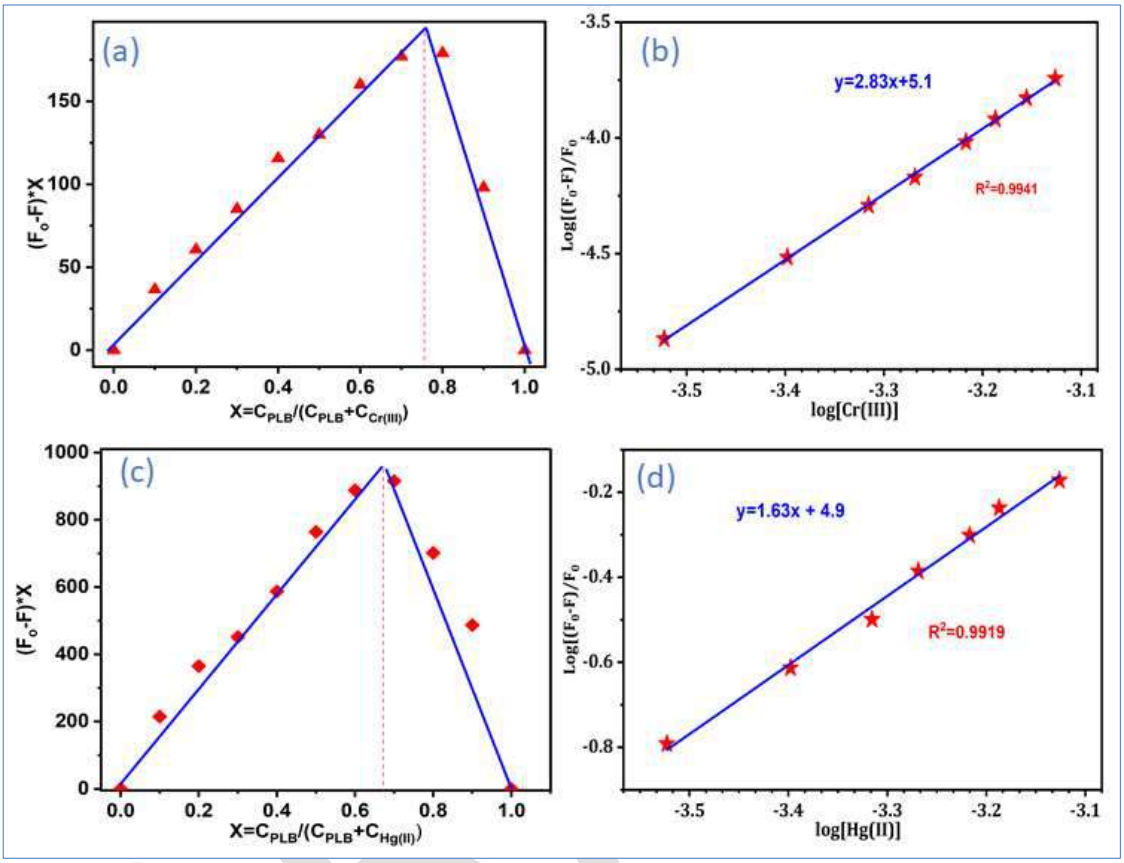
3.1.3.2 Điều kiện tối ưu hình thành phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$



Hình 3.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến hình thành phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) pH; (b)thời gian; (c)loại dung môi; (d) tỉ lệ EtOH:H_2O; (λ_{ex}=310nm, λ_{em}=436 nm).

Ảnh hưởng pH đến cường độ huỳnh quang của PLB, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được trình bày ở Hình 3.4a. Kết quả cho thấy cả ba hệ đều có sự phụ thuộc rõ rệt của phát xạ huỳnh quang vào pH, với cường độ cực đại đạt được tại khoảng pH ≈ 6,5. Sự giảm cường độ huỳnh quang ở pH cao hơn có thể liên quan đến sự hình thành các dạng hydroxo của Cr(III) và Hg(II), làm giảm khả năng phối trí với PLB. Do đó, pH 6,5 được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các khảo sát tiếp theo. Hình 3.4b là kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian tạo phức, cho thấy cường độ huỳnh quang ổn định sau khoảng 3 phút, chứng tỏ quá trình tạo phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ xảy ra nhanh và bền trong dung dịch. Hình 3.4c là kết quả ảnh hưởng của dung môi đến tín hiệu huỳnh quang. Trong số các dung môi khảo sát EtOH cho tín hiệu mạnh nhất, cho thấy

đây là dung môi phù hợp nhất cho khảo sát huỳnh quang. Hình 3.4d đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ EtOH:H_2O (v/v) đến cường độ phát xạ. Tín hiệu huỳnh quang mạnh nhất được ghi nhận ở tỉ lệ 3:7 (EtOH:H_2O).



Hình 3.5 Thành phần và hằng số bền: (a, c) Job's plot của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$; (b, d) Benesi–Hildebrand xác định K của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.

Hình 3.5a và 3.5c là biểu đồ Job xác định tỉ lệ phối trí của Cr(III):PLB và Hg(II):PLB lần lượt là 1:3 và 1:2, tương ứng với sự hình thành phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$. Kết quả Hình 3.5b và 3.5d cho thấy hằng số bền của các phức trong dung dịch của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ lần lượt là $1{,}26\times10^5$ và $7{,}94\times10^4$.

Bảng 3.1 Tổng hợp điều kiện tối ưu của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Phức / **Điều kiện**	**$Ti(PLB)_2$**	**$Cr(PLB)_3$**	**$Hg(PLB)_2$**
pH	5	6,5	6,5
Dung môi (EtOH:H_2O)	7:3	7:3	7:3
λ_{ex} (nm)	500	310	310
λ_{em} (nm)	605	436	436
Thời gian tạo phức	5 phút	3 phút	3 phút
Thành phần phức	1:2	1:3	1:2
Hằng số bền	$3,63 \times 10^4$	$1,26 \times 10^5$	$7,94 \times 10^4$

DRAFT

Các kết quả tổng hợp trong Bảng 3.1 phản ánh rõ nét các điều kiện thích hợp của ba phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$.Cả ba phức đều được hình thành trong môi trường EtOH:H_2O (7:3), tuy nhiên pH tối ưu khác nhau cho thấy sự khác biệt về bản chất acid–base trong quá trình phối trí, phức $Ti(PLB)_2$ tối ưu ở pH 5, trong khi $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ ổn định ở pH 6,5, cho thấy vai trò của trạng thái proton hóa trong hình thành phức.

$Ti(PLB)_2$ có bước sóng hấp thụ đặc trưng tại 500 nm phát huỳnh quang mạnh tại bước sóng 605 nm. Trong khi đó, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ hấp thụ bước sóng 310 và gây tắt huỳnh quang tại bước sóng 436nm.

Phức $Cr(PLB)_3$ có hằng số liên kết cao nhất ($1,26 \times 10^5$), cho thấy tương tác mạnh giữa Cr(III) và phối tử. Tuy nhiên, do Cr(III) là ion d^3 có spin cao, hiệu ứng tương tác spin–quỹ đạo mạnh khiến huỳnh quang bị dập tắt nhanh chóng. Tương tự, phức $Hg(PLB)_2$ cũng làm suy giảm huỳnh quang rõ rệt do hiệu ứng nguyên tử nặng (heavy atom effect), có hằng số liên kết tương đối lớn ($7,94 \times 10^4$). Ngược lại, Ti(IV) với cấu hình d^0 không sở hữu các mức d–d cho quá trình dập tắt, nhờ đó trạng thái kích thích của phức được ổn định và phát huỳnh quang. Hằng số liên kết tương đối cao ($3,63 \times 10^4$), cho thấy sự phối trí ổn định giữa PLB và Ti(IV), góp phần tăng cường độ bền và khả năng phát xạ.

Từ những kết quả trên có thể rút ra rằng, khả năng phát hay tắt huỳnh quang và độ ổn định của phức không chỉ phụ thuộc vào độ bền liên kết mà còn liên quan chặt chẽ đến đặc điểm điện tử của ion trung tâm.

DRAFT

3.1.4 Các thông số đặc trưng trong điều kiện tối ưu

Bảng 3.2 Các thông số quang học và hóa lý của các phức

Phức / Thông số	**$Ti(PLB)_2$**	**$Cr(PLB)_3$**	**$Hg(PLB)_2$**
ε ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	$12,5 \times 10^3$	$9,80 \times 10^3$	$11,2 \times 10^3$
log K	4,56	5,10	4,89
Ksv (M^{-1})	—	$16,8 \times 10^3$	$20,2 \times 10^3$
ΔG (Kcal/mol)	–6,21	-6,96	-6,67
LOD (μM)	0,34	0,29	0,25

Bảng 3.2 tổng hợp các thông số đặc trưng về quang học và đại lượng hóa lý của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$,

Phức $Cr(PLB)_3$ có logK cao nhất (5,10), phản ánh ái lực phối trí mạnh giữa ion Cr(III) và phối tử PLB. Mặc dù Cr(III) có điện tích lớn, nhưng việc tạo phức với ba phân tử PLB giúp phân tán mật độ điện tích, từ đó ổn định cấu trúc phức thông qua các tương tác phối trí. Cấu hình điện tử d^3 của Cr(III) và tính acid cũng góp phần tạo nên liên kết bền vững với các nhóm cho điện tử trên PLB. Nhờ đó, $Cr(PLB)_3$ thể hiện giá trị log K cao nhất và ΔG âm nhất, phản ánh độ bền nhiệt động học tốt hơn so với hai phức còn lại. Phức $Hg(PLB)_2$ có log K là 4,89, thể hiện khả năng phối trí vừa phải, phù hợp với bản chất ion mềm của Hg(II). Ngược lại, $Ti(PLB)_2$ có log K thấp nhất (4,56), cho thấy mức độ tạo phức kém hơn so với hai ion còn lại.

Giá trị năng lượng tự do Gibbs (ΔG), được tính theo công thức $\Delta G = -RT \ln K$, lần lượt là –6,97 kcal/mol đối với $Cr(PLB)_3$, –6,67 kcal/mol đối với $Hg(PLB)_2$, và –6,21 kcal/mol đối với $Ti(PLB)_2$. Các số liệu này cho thấy $Cr(PLB)_3$ là phức có độ bền nhiệt

DRAFT

động học cao nhất, tiếp theo là $Hg(PLB)_2$, và $Ti(PLB)_2$ là kém bền nhất trong ba hệ đã khảo sát.

❖ Nhận xét chung:

Qua các kết quả khảo sát phổ UV–Vis và huỳnh quang, kết hợp với các thông số quang học và hóa lý đặc trưng, có thể khẳng định rằng PLB là một đầu dò có khả năng chọn lọc cao đối với các ion kim loại chuyển tiếp, thông qua việc phát/dập tắt huỳnh quang. PLB khi tạo phức với Ti(IV) phát huỳnh quang mạnh và bị dập tắt huỳnh quang khi phối trí với Cr(III) hoặc Hg(II). Những kết quả này tạo nền tảng khoa học vững chắc cho việc phân tích cơ chế cảm biến và ứng dụng phân tích định lượng trong các bước nghiên cứu tiếp theo.

3.2 Nghiên cứu đặc trưng pha rắn, mô phỏng và đề xuất cấu trúc

Các phức chất $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$ đã được tổng hợp thành công thông qua phản ứng phối trí giữa PLB và các muối kim loại tương ứng trong môi trường ethanol hoặc methanol. Điều kiện phản ứng được tối ưu về pH, nhiệt độ và thời gian khuấy để thu được sản phẩm rắn với hiệu suất tương đối cao (từ 45–56%).

Sản phẩm sau phản ứng được lọc, rửa, sấy khô và được đặc trưng bằng các phương pháp hóa lý hiện đại như FT-IR, ^{1}H-NMR, HR-MS, XRD, SEM–EDX và mô phỏng lý thuyết để làm rõ cấu trúc. Các kết quả được trình bày chi tiết ở các mục dưới đây.

3.2.1 Phân tích phổ FT-IR, NMR, HR MS

3.2.1.1 Phổ FT-IR của phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$

Phổ hồng ngoại (FT-IR) được sử dụng nhằm xác nhận sự hình thành phức chất giữa ion kim loại và phối tử PLB, đồng thời đánh giá các tương tác phối trí thông qua sự thay đổi đặc trưng của các nhóm chức. Dữ liệu phổ được ghi nhận trong khoảng 4000–400 cm^{-1}. Đối với phức $Ti(PLB)_2$, vùng hấp thu đặc trưng cho dao động kéo giãn của nhóm hydroxyl (O–H) trong PLB tự do (Phụ lục 1) xuất hiện tại 3442 cm^{-1} đã dịch chuyển lên 3460 cm^{-1} trong phức $Ti(PLB)_2$ (Phụ lục 2), cho thấy sự ảnh hưởng của quá trình phối trí. Ngoài ra, dao động C–H mạch hở và vòng thơm ở 3046, 2771

cm^{-1} (PLB) cũng có sự dịch nhẹ đến 3115, 3022 và 2781 cm^{-1} trong phức, phản ánh sự thay đổi về môi trường hóa học xung quanh các nhóm này. Đặc biệt, vùng dao động của nhóm carbonyl (C=O) ở PLB (1646 và 1610 cm^{-1})[131] vẫn hiện diện trong phức nhưng có sự dịch chuyển nhẹ (1644 và 1609 cm^{-1}), cho thấy nhóm C=O có thể tham gia vào tương tác phối trí với ion Ti(IV), dù mức độ ảnh hưởng không lớn. Quan trọng nhất là sự xuất hiện rõ rệt của một vùng mới tại 577 cm^{-1} trong phổ của $Ti(PLB)_2$, không có trong phổ của PLB tự do. Vùng này được gán cho dao động kéo giãn Ti–O, là bằng chứng trực tiếp cho sự hình thành liên kết giữa ion Ti(IV) và nguyên tử oxy từ PLB.

So với PLB tự do, phổ FT-IR của $Cr(PLB)_3$ (Phụ lục 3) cho thấy các biến đổi đáng kể về vị trí và cường độ một số vùng hấp thụ, phản ánh sự hình thành phức chất giữa PLB và ion Cr(III). Vùng dao động C=O đặc trưng xuất hiện tại 1633 cm^{-1}, có sự dịch chuyển nhẹ so với PLB tự do, cho thấy nhóm carbonyl đã tham gia phối trí với ion Cr(III). Đáng chú ý, vùng hấp thụ O–H rộng đặc trưng tại vùng 3400–3440 cm^{-1} của PLB tự do không còn xuất hiện, chứng tỏ nhóm hydroxyl đã bị khử proton, tạo thành nhóm phenolat $–O^-$ để phối trí với Cr(III). Ngoài ra, các vùng mới tại 523 cm^{-1} được ghi nhận, đặc trưng cho dao động Cr–O, là bằng chứng rõ ràng cho sự hình thành liên kết kim loại–oxy trong cấu trúc phức chất $Cr(PLB)_3$.

Phức $Hg(PLB)_2$ (Phụ lục 4), Phổ FT-IR của phức $Hg(PLB)_2$ cho thấy vùng O–H ~3442 cm^{-1} của PLB tự do biến mất, chứng tỏ nhóm hydroxyl đã mất proton và tham gia phối trí với ion Hg(II). Vùng C=O dịch chuyển xuống 1635 cm^{-1}, cho thấy nhóm carbonyl cũng góp phần vào sự tạo phức. Các vùng C–O tại vùng 1311–1318 cm^{-1} vẫn hiện diện, phản ánh vai trò phối trí của nhóm phenol. Đặc biệt, sự xuất hiện vùng mới tại 535 cm^{-1}, đặc trưng cho dao động Hg–O, là bằng chứng rõ ràng cho sự hình thành liên kết Hg–O trong cấu trúc phức chất $Hg(PLB)_2$.

Kết quả phổ FT-IR cung cấp bằng chứng rõ ràng cho sự hình thành phức thông qua sự dịch chuyển của vùng dao động C=O và sự xuất hiện các dao động đặc trưng cho

DRAFT

liên kết kim loại–oxy (Ti–O, Cr–O, Hg–O). Cả ba phức đều cho thấy sự phối trí của PLB thông qua nhóm carbonyl và phenol.

3.2.1.2 Phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC, HMBC

Phổ NMR một chiều (^{1}H, ^{13}C) và hai chiều (HSQC, HMBC) đã được sử dụng nhằm xác nhận cấu trúc và làm rõ kiểu phối trí của các nguyên tử trong các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, đồng thời cung cấp thông tin về sự thay đổi môi trường điện tử so với PLB tự do.

Phổ ^{1}H-NMR của $Ti(PLB)_2$ (Phụ lục 16) ghi nhận các tín hiệu thơm trong khoảng 6,98–7,75 ppm và tín hiệu –OH tại 11,79 ppm, cho thấy nhóm hydroxyl chưa bị khử proton. Phổ ^{13}C-NMR (Phụ lục 18) thể hiện các tín hiệu carbon carbonyl trong vùng 190–160 ppm và carbon thơm trong vùng 149–118 ppm, phản ánh hệ liên hợp π được bảo toàn. Phổ 2D-NMR (HSQC, HMBC) cho thấy các tương quan H–C trực tiếp và tương quan dài từ proton thơm đến carbon carbonyl. Dữ liệu chi tiết được trình bày tại Phụ lục 21–25.

Phổ ^{1}H-NMR của phức $Cr(PLB)_3$ trong DMSO-d_6 (Phụ lục 27) ghi nhận 12 tín hiệu thơm riêng biệt trong vùng 6,99–7,75 ppm, phù hợp với hệ vòng thơm từ ba phối tử PLB. Không ghi nhận tín hiệu –OH (~11,79 ppm), cho thấy nhóm hydroxyl đã bị khử proton để tham gia phối trí. Kết hợp với dữ liệu ^{13}C-NMR và phổ 2D-NMR (HSQC, HMBC) xác nhận sự phối trí của ion Cr(III) với ba phân tử PLB. Các phổ minh họa chi tiết được trình bày tại Phụ lục 30–35.

Phổ ^{1}H-NMR của $Hg(PLB)_2$ trong DMSO-d_6 (Phụ lục 37) ghi nhận 8 tín hiệu thơm trong vùng 6,98–7,75 ppm, phản ánh hệ vòng thơm được bảo toàn. Không quan sát thấy tín hiệu –OH (~11,8 ppm), cho thấy nhóm hydroxyl đã bị khử proton để tham gia phối trí. Kết hợp với phổ ^{13}C-NMR và 2D-NMR (HSQC, HMBC) xác nhận sự phối trí của ion Hg(II) với hai phân tử PLB. Các tín hiệu chi tiết được trình bày tại Phụ lục 42–46.

DRAFT

Bảng 3.3 Tổng kết các tín hiệu đặc trưng của NMR của 3 phức

Đặc điểm	**$Ti(PLB)_2$**	**$Cr(PLB)_3$**	**$Hg(PLB)_2$**
Số lượng tín hiệu thơm (1H)	~8 tín hiệu từ 6,98–7,75 ppm	~12 tín hiệu từ 6,99–7,76 ppm	~8 tín hiệu từ 6,99–7,75 ppm
Tín hiệu –OH phenol (~11,97 ppm)	~11,80 ppm), cho thấy PLB tạo phức không bị khử proton	Không xuất hiện, chứng tỏ PLB đã khử proton khi tạo phức	Không còn xuất hiện, chứng tỏ PLB đã khử proton khi tạo phức
Phần vùng aliphatic	2,1 – 3,4 ppm (DMSO, CH_2; có thể lẫn tạp nhẹ)	2,1 – 2,5 ppm (DMSO, CH_2)	2,1 – 2,5 ppm (DMSO, CH_2)
^{13}C NMR	190,07 → 15,92 ppm	190,07 → 15,92 ppm	190,07 → 15,92 ppm
Vị trí C=O / C-O	~190 ppm và ~160 ppm (có)	~190 ppm và ~160 ppm (có)	~190 ppm và ~160 ppm (có)
HSQC	Tín hiệu tương quan H–C rõ ở cả vùng thơm (~7,0 ppm) và aliphatic (~2,1–3,5 ppm)	Tương quan H–C rõ trong vùng 7,3–7,7 ppm ↔ 120–135 ppm	Quan sát tương quan vùng thơm (~7 ppm) và tín hiệu CH_3 (~39 ppm)
HMBC	Tương quan dài (^2JCH, ^3JCH; đôi khi ^4JCH	Nhiều tương quan từ H vòng thơm đến C=O và carbon nội vòng	Tương quan dài từ H vòng thơm đến carbon sp^2 và carbonyl

DRAFT

3.2.1.3 Phổ HR-MS

Phổ HR-MS (+ESI) của phức $Ti(PLB)_2$ (Phụ lục 25) ghi nhận đỉnh chính tại m/z = 425,0523, tương ứng với ion $[M + H]^+$ và rất gần với giá trị lý thuyết (425,0478), cho thấy độ chính xác cao và xác nhận khối lượng phân tử của phức. Ngoài ra, một đỉnh phụ tại m/z = 489,1295 được ghi nhận, phù hợp với ion $[M + 2MeOH + H]^+$. Đây là dạng ion phối hợp đặc trưng khi sử dụng methanol làm dung môi trong kỹ thuật ESI^+. Kết hợp với phổ NMR, các dữ liệu này phù hợp với mô hình phức $Ti(PLB)_2$, trong đó ion Ti(IV) phối trí với hai phân tử PLB thông qua nhóm phenolat ($-O^-$) và nhóm carbonyl (C=O).

Phổ HR-MS (+ESI) của phức $Cr(PLB)_3$ (Phụ lục 35) ghi nhận đỉnh chính tại m/z = 614,0718, tương ứng với ion $[M + H]^+$, gần như trùng khớp với giá trị lý thuyết tính toán là 614,0669 cho thấy độ chính xác cao. Kết quả này xác nhận khối lượng phân tử của phức chất phù hợp với công thức phân tử $Cr(PLB)_3$. Đồng thời, dữ liệu thu được cũng củng cố giả thiết rằng ion Cr(III) có số phối trí bằng 6, liên kết với ba phối tử PLB thông qua nhóm phenol và carbonyl.

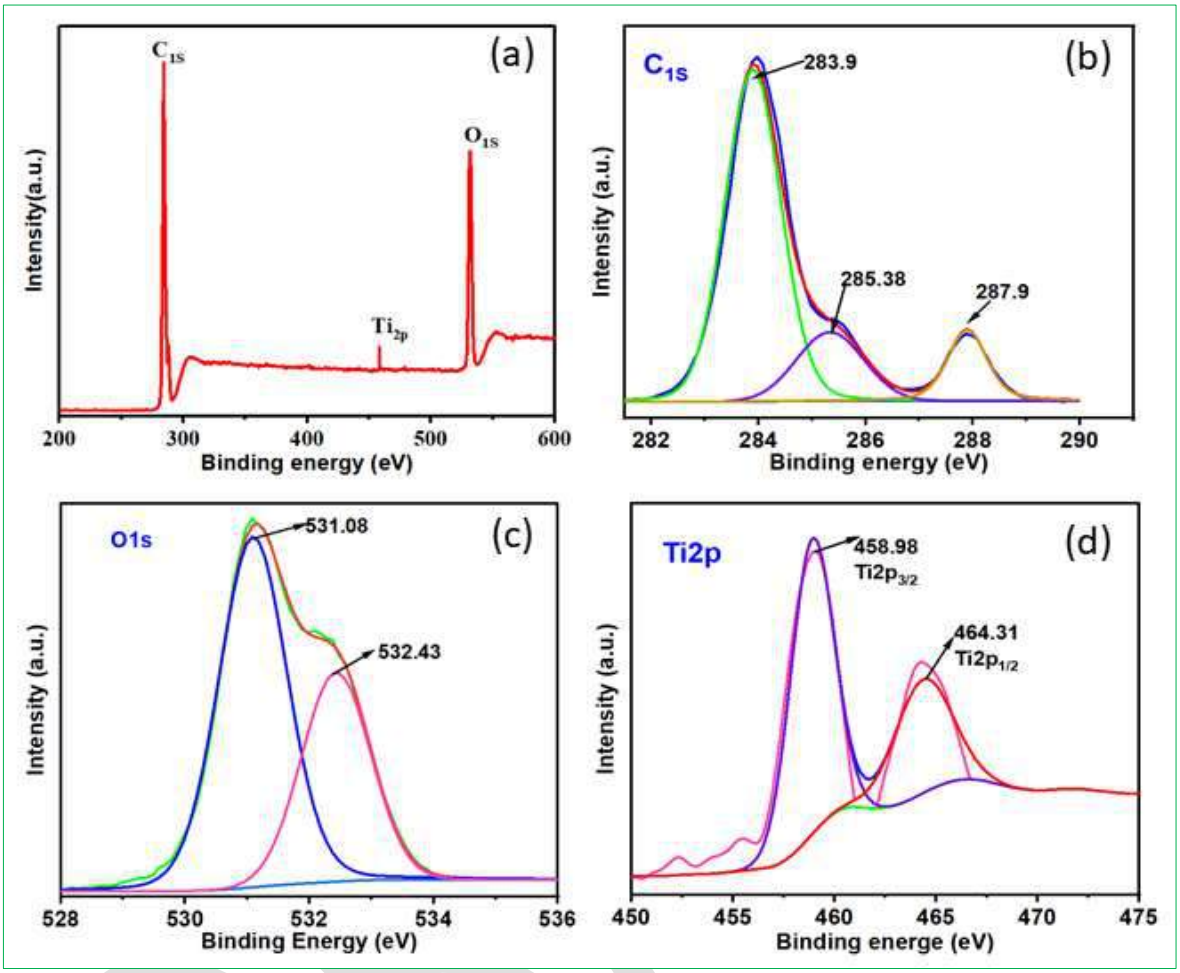
Phổ HR-MS (+ESI) của phức $Hg(PLB)_2$ ghi nhận đỉnh chính tại m/z = 579,0748 (Phụ lục 46), tương ứng với ion $[M + H]^+$ và gần như trùng khớp với khối lượng lý thuyết được tính toán là 579,0731 cho công thức phân tử $C_{22}H_{14}HgO_6$ cho thấy độ chính xác cao. Kết quả này xác nhận sự hiện diện của phức $Hg(PLB)_2$ với tỷ lệ phối trí 1:2 giữa ion Hg(II) và phối tử PLB. Dữ liệu này kết hợp với các kết quả hóa lý hiện đại khác (IR, NMR…) hỗ trợ mạnh mẽ cho mô hình cấu trúc đề xuất, trong đó ion Hg(II) phối trí thông qua nhóm phenol và carbonyl của hai phân tử PLB.

3.2.2 Phân tích phổ XPS

Phổ XPS được sử dụng nhằm xác định trạng thái oxi hóa và mức độ phối trí của các nguyên tử trong phối tử, đồng thời cung cấp bằng chứng trực tiếp cho sự hình thành liên kết kim loại với PLB trong các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$. Các vùng phổ khảo sát bao gồm: C1s, O1s và vùng lõi đặc trưng của các ion kim loại trung tâm (Ti2p, Cr2p, Hg4f).

DRAFT

Phức $Ti(PLB)_2$

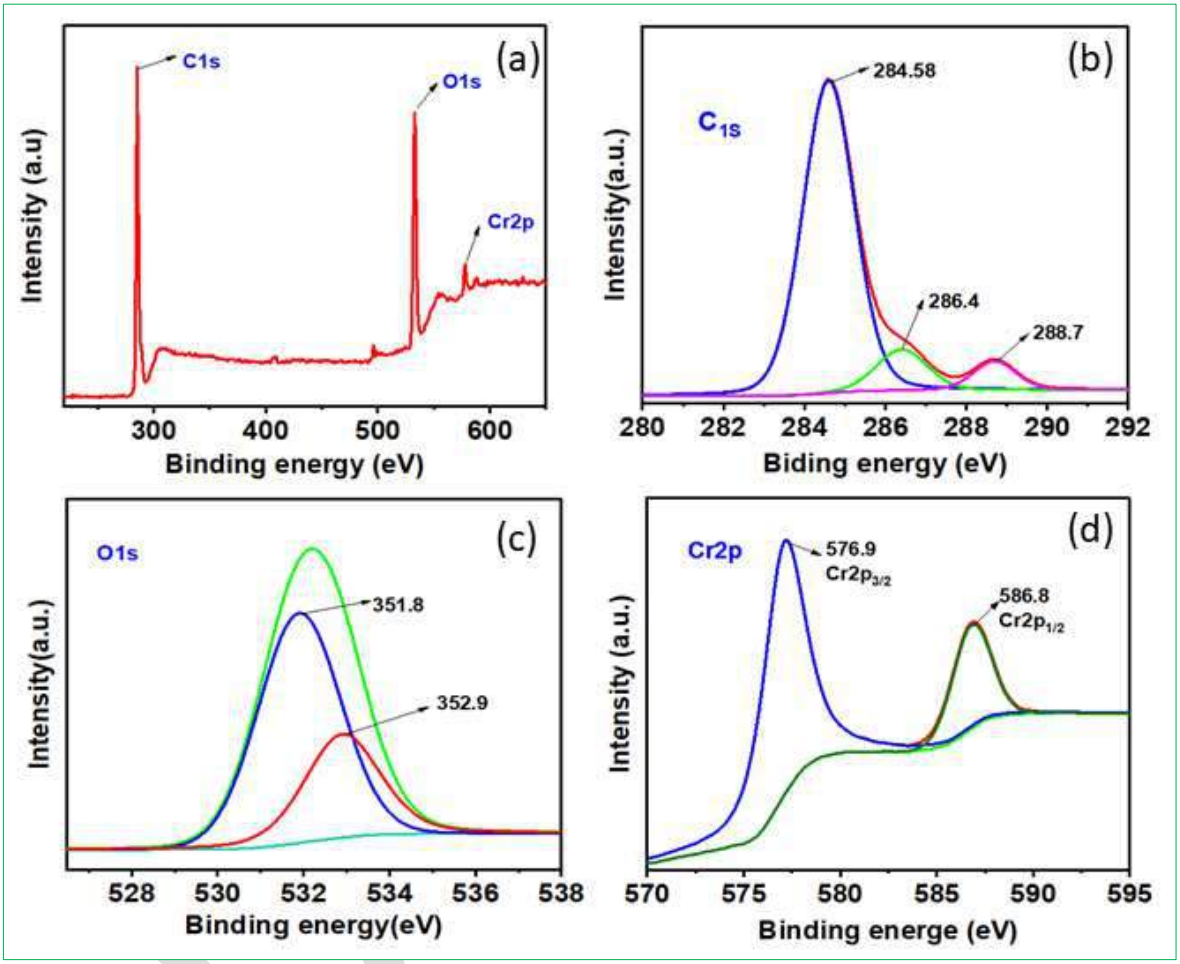


Hình 3.6 Phổ XPS của phức $Ti(PLB)_2$: (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Ti2p.

Hình 3.6 trình bày phổ XPS của phức $Ti(PLB)_2$, bao gồm phổ khảo sát toàn phần và các vùng lõi chi tiết của các nguyên tố C, O và Ti. Phân tích phổ C1s (Hình 3.6b) cho thấy ba tín hiệu chính tại 283,9 eV; 285,38 eV; và 287,9 eV, lần lượt liên quan đến các liên kết C–C/C=C**,** C–OH, và C=O trong cấu trúc của phối tử PLB [155]. Các đỉnh này thể hiện rõ sự tương tác của phối tử với ion kim loại, đặc biệt là sự thay đổi điện tích cục bộ quanh nhóm carbonyl khi tạo phức. Phổ O1s (Hình 3.6c) hiển thị hai đỉnh riêng biệt tại 531,08 eV và 532,43 eV, trong đó đỉnh có năng lượng thấp hơn được gán cho liên kết O–Ti, cho thấy sự phối trí trực tiếp giữa ion Ti(IV) và nguyên tử oxy trong nhóm carbonyl. Đỉnh có năng lượng cao hơn được cho là do oxy bị hấp phụ trên bề mặt phức chất, thường xuất hiện trong các vật liệu chứa kim loại chuyển tiếp [156]. Phổ Ti2p (Hình 3.6d) thể hiện hai đỉnh rõ rệt tại

458,98 eV ($Ti2p_{3/2}$) và 464,31 eV ($Ti2p_{1/2}$), đặc trưng cho trạng thái oxi hóa Ti(IV) trong cấu trúc phức. Các giá trị này phù hợp với thông tin trong tài liệu về các phức vô cơ chứa Ti(IV), xác nhận rằng nguyên tử Ti tồn tại trong trạng thái oxi hóa cao [157][158].

Phức $Cr(PLB)_3$

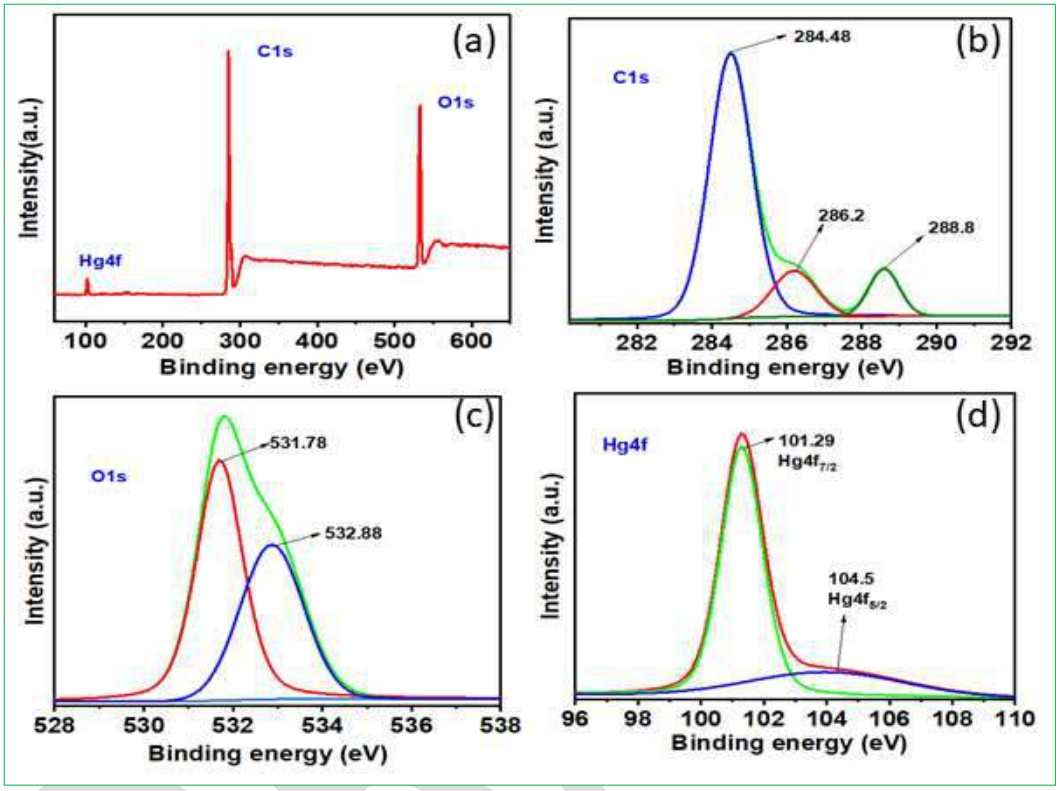


Hình 3.7 Phổ XPS của phức $Cr(PLB)_3$: (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Cr2p.

Hình 3.7 thể hiện phổ XPS của phức $Cr(PLB)_3$. Trong phổ Cr2p (Hình 3.7d), hai đỉnh tại 576,9 eV ($Cr2p_{3/2}$) và 586,8 eV ($Cr2p_{1/2}$) là đặc trưng cho trạng thái oxi hóa Cr(III)[159]. Phổ O1s (Hình 3.7c) hiển thị hai đỉnh tại 531,8 và 532,9 eV, tương ứng với hai trạng thái hóa học của nguyên tử oxy. Đỉnh tại 531,8 eV được gán cho oxy liên kết O–Cr, trong khi đỉnh tại 532,9 eV liên quan đến oxy hấp phụ [160]. Điều này cho thấy nguyên tử oxy trong nhóm carbonyl đã trực tiếp tham gia vào quá trình phối trí với ion Cr(III). Phổ C1s (Hình 3.7b) cho ba đỉnh tại 284,58, 286.4 và 288,7 eV, lần lượt tương

ứng với các liên kết C–C/C=C, C–O và C=O. Các tín hiệu này phản ánh sự hiện diện của các nhóm chức đặc trưng trong cấu trúc PLB và sự thay đổi môi trường điện tử khi nhóm carbonyl và hydroxyl tham gia phối trí với Cr(III).

Phức $Hg(PLB)_2$



Hình 3.8 Phổ XPS của phức $Hg(PLB)_2$ (a) Khảo sát toàn phần; (b) Vùng C1s; (c) Vùng O1s; (d) Vùng Hg4f.

Phổ XPS của phức $Hg(PLB)_2$ (Hình 3.8) xác nhận sự hiện diện của các nguyên tố C, O và Hg, phù hợp với thành phần lý thuyết. Hai đỉnh tại 101,29 eV và 104,5 eV trong phổ Hg4f (Hình 3.8d) đặc trưng cho trạng thái oxi hóa Hg(II), xác nhận sự hình thành phức với PLB thông qua liên kết Hg–O [161]. Phổ C1s (Hình 3.8b) ghi nhận các đỉnh tại 284,48 eV, 286,2 eV và 288.8 eV, lần lượt ứng với liên kết C–C/C=C, C–O và C=O, cho thấy sự tương tác điện tử giữa PLB và Hg(II). Phổ O1s (Hình 3.8c) có hai tín hiệu tại 531,78 eV (Hg–O) và 532,88 eV (oxy hấp phụ)[160]. Nhìn chung, các tín hiệu dịch chuyển trong vùng C1s và O1s cho thấy có tương tác điện tử và khẳng định PLB đã phối trí với ion Hg(II) qua nguyên tử oxy, tạo thành phức chất ổn định.

Bảng 3.4 Tổng hợp kết quả phân tích phổ XPS của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Phức chất	Nguyên tố	Năng lượng liên kết (eV)	FWHM (eV)	Diện tích Peak (CPS·eV)	Thành phần nguyên tố (%)	Trạng thái oxi hoá của ion trung tâm	Nhận xét
$Ti(PLB)_2$	C1s	283,98	1,29	71.256,60	75,81	Ti(IV)	Tín hiệu mạnh; liên kết dπ–pπ; phối tử O ổn định; nền hữu cơ rõ
	Ti2p	459,00	1,57	3.290,54	0,61		
	O1s	531,23	1,40	5.3561,94	23,58		
$Cr(PLB)_3$	Cr2p	576,93	2,84	6.874,38	1,34	Cr(III)	Tín hiệu kim loại rõ; tương tác vừa phải; nền hữu cơ ổn định
	C1s	284,56	1,49	39.965,97	74,21		
	O1s	532,13	2,66	31.807,99	24,44		
$Hg(PLB)_2$	Hg4f	101,75	1,64	3.121,62	0,20	Hg(II)	Tín hiệu yếu; dịch chuyển nhỏ; liên kết yếu
	C1s	284,59	1,33	49.522,43	76,70		
	O1s	531,90	2,33	36.034,41	23,09		

DRAFT

Phân tích XPS cho thấy các nguyên tố đặc trưng gồm C1s, O1s và các ion kim loại trung tâm (Ti2p, Cr2p, Hg4f) đều được phát hiện rõ trong các phức chất (Bảng 3.4). Trong cả ba hệ, thành phần nguyên tố C chiếm ưu thế (74–77%), phản ánh nền hữu cơ chiếm ưu thế từ phối tử PLB. Tín hiệu O1s dao động từ 23,09–24,44%, góp phần xác nhận vai trò của nhóm carbonyl và hydroxyl trong việc hình thành liên kết phối trí.

Phức $Ti(PLB)_2$ có năng lượng liên kết Ti2p là 459,00 eV, cao hơn một chút so với giá trị chuẩn của oxit Ti(IV) (TiO_2), thường dao động trong khoảng 458,5–458,7 eV[162] [163], cho thấy sự dịch chuyển đáng kể về phía năng lượng cao đặc trưng cho tương tác mạnh giữa Ti(IV) và phối tử, có thể thông qua kiểu liên kết dπ–pπ. Tín hiệu Ti2p xuất hiện rõ ràng với diện tích peak 3.290,54 CPS eV, cùng với tín hiệu O 1s mạnh và FWHM hẹp (1,40 eV), cho thấy sự phối trí hiệu quả của các nguyên tử oxy với Ti(IV).

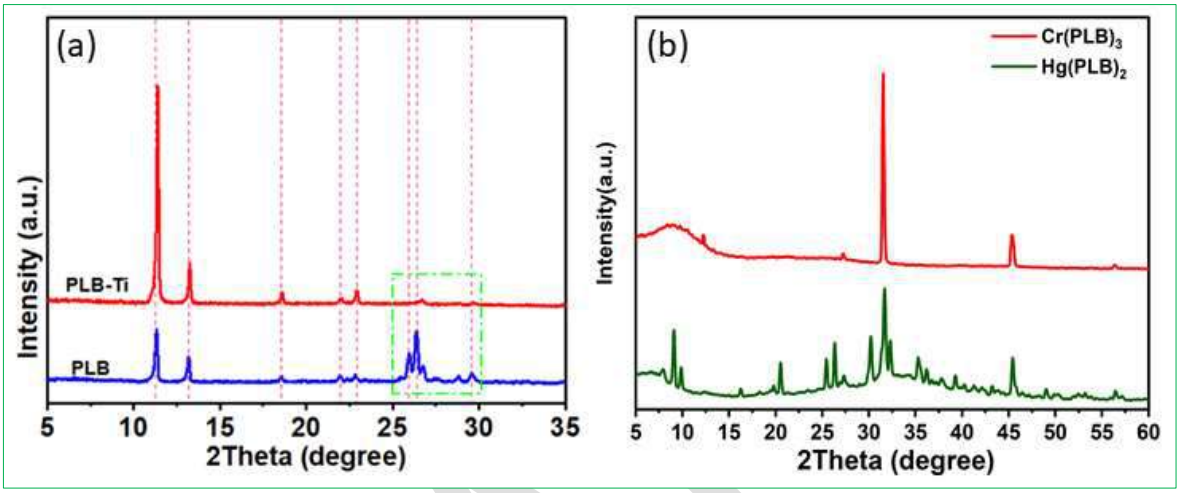
Ngược lại, phổ XPS của $Hg(PLB)_2$ cho thấy tín hiệu Hg4f yếu **(**3.121,62 CPS eV, chiếm chỉ 0,2% nguyên tử), và năng lượng liên kết 101,75 eV gần giá trị chuẩn của muối Hg(II), phản ánh mức độ tương tác phối trí yếu và không có đặc trưng định hướng rõ nét giữa ion Hg(II) và phối tử. Điều này phù hợp với đặc tính cấu hình d^{10} của Hg(II), vốn ít tham gia xen phủ orbital.

Phức $Cr(PLB)_3$ cho tín hiệu $2p_{3/2}$ tại 576,93 eV, phù hợp với giá trị điển hình của Cr(III) trong các hợp chất phức. Cường độ đỉnh rõ ràng và tách biệt với nền cho thấy hàm lượng Cr đáng kể và trạng thái oxi hóa ổn định, phản ánh sự tạo phức hiệu quả với phối tử PLB. Năng lượng liên kết $Cr2p_{3/2}$ của phức $Cr(PLB)_3$ được ghi nhận tại 576,93eV, cao hơn chút ít so với giá trị tham chiếu của Cr_2O_3 (~576,1–576,5 eV)[164], cho thấy mức độ phối trí ổn định vừa phải giữa Cr(III) và PLB. Điều này phù hợp với cấu hình điện tử d^3 của Cr(III). Bên cạnh đó, phổ XPS cho thấy tín hiệu C1s chiếm đến 74,21% tổng nguyên tử, phản ánh rõ rệt sự hiện diện bền vững của nền hữu cơ từ phối tử PLB trong phức $Cr(PLB)_3$.

DRAFT

3.2.3 Hình thái và cấu trúc tinh thể (XRD)

Phổ XRD được sử dụng để đánh giá độ kết tinh, sự thay đổi pha tinh thể và ảnh hưởng của ion kim loại đến cấu trúc rắn của các phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$ so với phối tử PLB tự do.



Hình 3.9 (a) Giản đồ nhiễu xạ XRD của PLB và $Ti(PLB)_2$; (b) Giản đồ XRD của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.

Phổ nhiễu xạ tia X (XRD) của PLB và phức $Ti(PLB)_2$ được thể hiện trong Hình 3.13a. Các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của PLB tự do xuất hiện rõ tại các góc 2θ = 11,32°; 13,18°; 18,59°; 21,94°; 25,98°; 26,38°; 26,48° và 26,82°, phản ánh bản chất bán kết tinh của chất này. Sau khi tạo phức với ion Ti(IV), phổ nhiễu xạ thay đổi đáng kể, với các đỉnh mới xuất hiện tại 11,41°; 13,24°; 18,61° và 22,94°, đồng thời các đỉnh ở vùng 25,98° và 26,38° bị suy giảm hoặc biến mất. Sự thay đổi này cho thấy quá trình phối trí với Ti(IV) đã làm gián đoạn trật tự tinh thể ban đầu của PLB, có thể do hình thành các liên kết mới làm phá vỡ cấu trúc sắp xếp đều đặn. Điều này cũng cho thấy sự tương tác giữa Ti(IV) và các nhóm chức trong PLB là đủ mạnh để tạo thành cấu trúc phức ổn định với đặc điểm nhiễu xạ riêng biệt.

Phổ XRD của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ (Hình 3.13b) thể hiện những thay đổi rõ rệt về cấu trúc tinh thể so với PLB tự do. Đối với phức $Cr(PLB)_3$, một số đỉnh mới xuất hiện tại các góc 2θ = 9,87°; 27,3°; 31,4°; 33,6°; 45,6°; 58.4° và 66,3° phản ánh sự tái sắp xếp cấu trúc mạng tinh thể do quá trình phối trí giữa ion Cr(III) và các phân

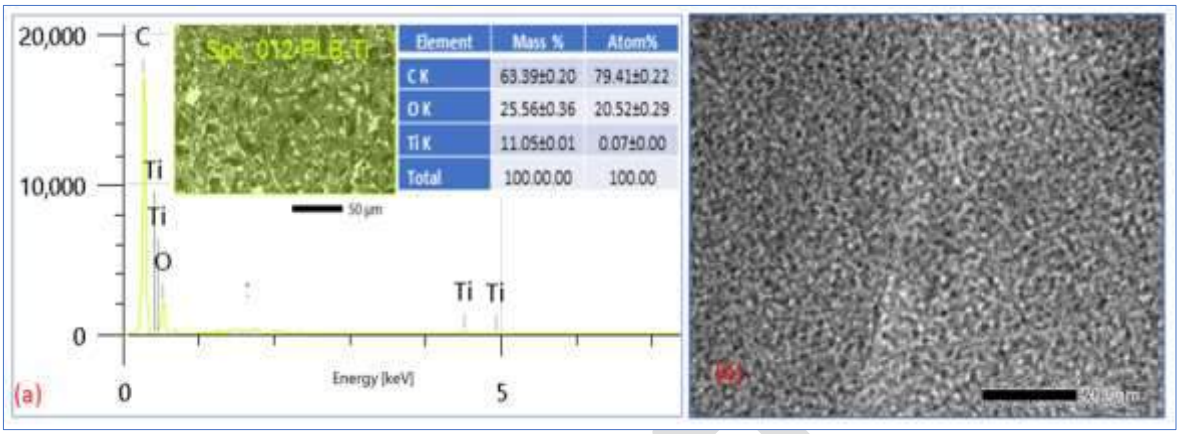
tử PLB. Điều này cho thấy việc hình thành phức chất đã tạo ra một pha tinh thể mới khác biệt với cấu hình ban đầu của PLB với mô hình phối trí bát diện ổn định thường thấy ở các phức kim loại chuyển tiếp[166][167]. Tương tự, phổ XRD của $Hg(PLB)_2$ cũng cho thấy nhiều đỉnh nhiễu xạ đặc trưng tại $2\theta = 9{,}12°$; 20,61°; 26,86°; 31,6°, 45,54° và 56,6°, gợi ý rằng quá trình phối trí với ion Hg(II) đã làm biến đổi đáng kể cấu trúc tinh thể. Các thay đổi này có thể bắt nguồn từ sự khác biệt về kích thước ion, điện tích và khả năng phối trí của hai ion kim loại. Việc xuất hiện các đỉnh mới cùng sự thay đổi về vị trí và cường độ các đỉnh nhiễu xạ cho thấy khả năng hình thành các mạng phối trí mới với cấu trúc sắp xếp khác biệt.

Phổ XRD xác nhận sự hình thành các pha phối trí mới khác biệt so với PLB tự do. Trong ba hệ, $Cr(PLB)_3$ thể hiện cấu trúc tinh thể rõ nét nhất, $Ti(PLB)_2$ có xu hướng vô định hình, trong khi $Hg(PLB)_2$ cho thấy mức độ kết tinh trung bình với sự tồn tại đồng thời của các vùng tinh thể và vô định hình. Sự khác biệt này phản ánh ảnh hưởng của bán kính ion, cấu hình điện tử và kiểu phối trí của các ion trung tâm đến cấu trúc mạng tinh thể của phức chất. Như vậy, mặc dù chưa thu được dữ liệu XRD đơn tinh thể, nhưn sự nhất quán giữa các kết quả FT-IR, HR-MS, XPS, TGA và DFT trong nghiên cứu cho phép chúng tôi khẳng định hợp lý về sự hình thành và kiểu phối trí của các phức, đảm bảo độ tin cậy khoa học của phần kết luận.

Nhằm hiểu rõ hơn bản chất liên kết giữa PLB và các ion kim loại, cũng như giải thích xu hướng phát xạ huỳnh quang hoặc bị dập tắt huỳnh quang đã quan sát, các tính toán hóa học lượng tử đã được thực hiện và sẽ được trình bày trong phần tiếp theo.

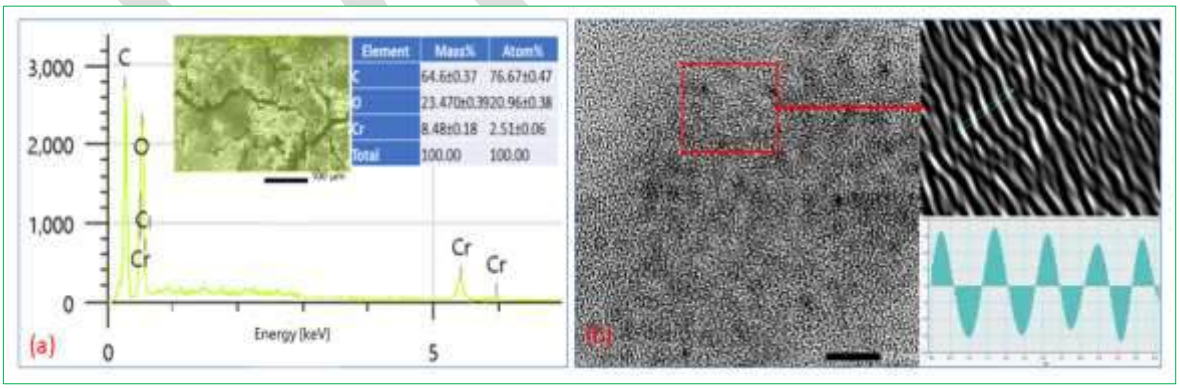
DRAFT

3.2.4 Phân tích hình thái và cấu trúc bằng SEM–EDX/TEM



Hình 3.10 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Ti(PLB)_2$.

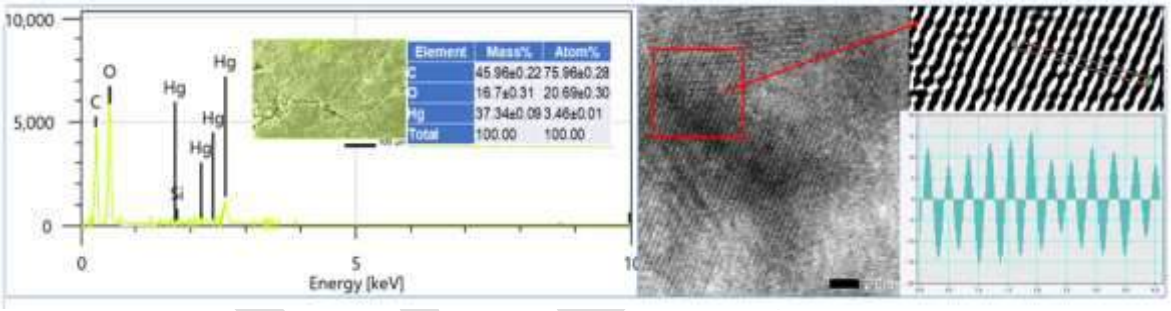
Hình thái bề mặt và thành phần nguyên tố của phức $Ti(PLB)_2$ được phân tích bằng kỹ thuật EDS (Hình 3.9a) và HR-HR-TEM (Hình 3.9b). Kết quả EDS cho thấy sự hiện diện rõ rệt của ba nguyên tố chính C (63,39%), O (25,56%) và Ti (11,05%), phù hợp với cấu trúc hữu cơ của phức $Ti(PLB)_2$ chứa nhóm carbonyl và hydroxyl của phối tử PLB, cũng như sự phối trí với ion Ti(IV). Phổ EDS xác nhận sự hình thành phức chất một cách rõ ràng. Trong khi đó, ảnh HR-HR-TEM cho thấy phức có hình thái phân bố đồng đều với cấu trúc rõ nét. Kích thước hạt dao động ở mức nanomet (tầm 20–30 nm), cho thấy sự kết tinh tốt và hình thái tương đối đồng nhất của phức rắn $Ti(PLB)_2$, phù hợp với đặc trưng của các phức chất vô cơ-hữu cơ tổng hợp trong môi trường $EtOH:H_2O$ [165].



Hình 3.11 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Cr(PLB)_3$

DRAFT

Phổ EDS (Hình 3.10a) xác nhận sự hiện diện của ba nguyên tố chính là C (66,60%), O (23,41%) và Cr (8,48%). Hàm lượng Cr bề mặt tương đối thấp nhưng phù hợp với tỷ lệ mol 1:3 giữa ion Cr(III) và ba phân tử phối tử PLB, trong đó khối lượng phần hữu cơ chiếm ưu thế. Thành phần nguyên tố giàu C và O phản ánh cấu trúc của PLB có chứa nhiều nhóm carbonyl và hydroxyl đóng vai trò phối trí với Cr(III). Hình ảnh SEM cho thấy hình thái hạt kết tụ nhẹ. Ảnh HR-TEM (Hình 3.10b) cho thấy sự tồn tại của các vùng tinh thể rõ rệt với vân sọc đều đặn. Phóng đại khu vực chọn lọc cho thấy các sọc tinh thể có khoảng cách ~0,34 nm, chứng tỏ phức có cấu trúc tinh thể bền vững. Điều này cho thấy $Cr(PLB)_3$ có mức độ kết tinh cao, có thể là kết quả của sự sắp xếp trật tự giữa các nhóm chức của phối tử PLB với ion Cr(III) trong quá trình tạo phức.



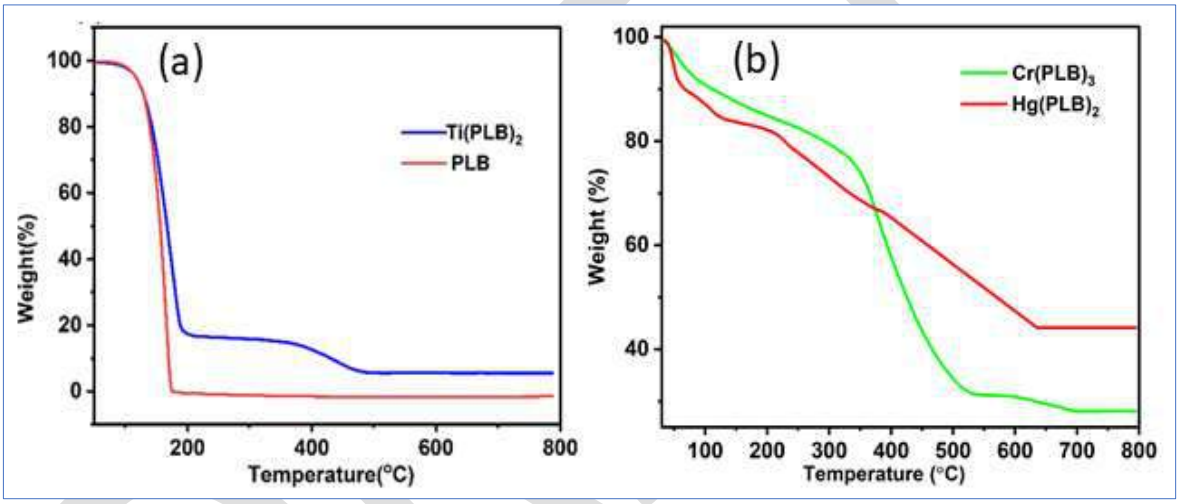
Hình 3.12 Phổ EDS/ảnh SEM (a) và ảnh HR-TEM (b) của phức rắn $Hg(PLB)_2$

Phân tích EDS (Hình 3.11a) xác nhận sự hiện diện của ba nguyên tố chính C (48,96%), O (13,74%) và Hg (37,30%). Hàm lượng Hg tương đối cao, phản ánh tỷ lệ mol 1:2 giữa ion Hg(II) và phối tử PLB. Hình ảnh SEM cho thấy bề mặt phức rắn có hình thái dạng cụm không đều, cấu trúc khối rời rạc, đặc trưng cho các hệ phức hữu cơ, vô cơ được tổng hợp trong dung môi hỗn hợp ethanol–nước. Hình ảnh HR-TEM (Hình 3.11b) cho thấy các vùng cấu trúc tinh thể rõ nét, với các sọc vân song song đặc trưng cho sự sắp xếp trật tự cao. Phóng to khu vực chọn lọc cho thấy khoảng cách khoảng 0,27 nm. Những đặc điểm này cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ có khả năng kết tinh cao, phản ánh sự tương tác mạnh giữa ion Hg(II) và các phối tử PLB, góp phần tạo nên mạng phối trí bền vững ở cấp độ nano.

Nhìn chung, kết quả phân tích EDS và ảnh HR-TEM đã xác nhận thành phần nguyên tố và cấu trúc hình thái đặc trưng của 3 phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$. Phổ

EDS cho thấy sự hiện diện rõ ràng của ba nguyên tố chính là C, O và kim loại trung tâm, với hàm lượng phù hợp với tỷ lệ phối trí lý thuyết, phản ánh sự phối hợp hiệu quả giữa PLB và ion kim loại. Ảnh HR-TEM cung cấp bằng chứng trực quan về đặc điểm cấu trúc tinh thể của các phức, trong đó $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ thể hiện cấu trúc tinh thể rõ ràng với vân tinh thể đều đặn và khoảng cách mặt tinh thể phù hợp (~0,27 nm), trong khi $Ti(PLB)_2$ cho thấy dạng hạt lớn hơn, hình ống, phù hợp với xu hướng kết tinh của các phức Ti bền cấu trúc. Những đặc điểm này góp phần khẳng định sự hình thành phức chất thành công và đặc điểm kết tinh riêng biệt tùy theo bản chất của ion trung tâm.

3.2.5 Phân tích đặc trưng nhiệt của phức bằng TGA



Hình 3.13 (a) Đường TGA của PLB và phức $Ti(PLB)_2$; (b) Đường TGA của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Phân tích nhiệt (TGA) được sử dụng để đánh giá độ ổn định nhiệt của các phức chất $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$. Phổ TGA của các mẫu được đo từ 50°C đến 800–800°C được trình bày ở Hình 3.12.

Hình 3.12a là đường cong TGA của PLB tự do và phức $Ti(PLB)_2$. Trên hình có thể thấy PLB tự do phân hủy mạnh mẽ từ 80°C đến 200°C, mất gần như hoàn toàn khối lượng do bản chất hữu cơ không bền nhiệt. Phức $Ti(PLB)_2$ thấy rõ ba giai đoạn: giai đoạn mất khối lượng nhẹ ở nhiệt độ 110°C (mất nước kết tinh); giai đoạn phân hủy chính xảy ra từ 200-450°C cuối cùng là phần cặn ổn định còn lại được cho là oxit TiO_2 (ổn định nhiệt cao). Phức $Hg(PLB)_2$ (Hình 3.12b) thể hiện quá trình phân hủy diễn ra từ từ và liên tục trong khoảng 100–600 °C, đặc trưng cho cơ chế phân ly phối

tử từng phần theo nhiệt độ, không xảy ra theo các giai đoạn rõ rệt như ở các phức khác. Phần khối lượng còn lại sau 600 °C đạt khoảng 40–45%, có thể quy cho sự tạo thành HgO ổn định. Phức $Cr(PLB)_3$ (Hình 3.12b) thể hiện ba giai đoạn phân hủy nhiệt rõ rệt. Giai đoạn (50–100 °C) mất khoảng 5–7% khối lượng, có thể do bay hơi nước hấp phụ hoặc tách nước kết tinh. Giai đoạn (100–300 °C) mất thêm ~10–12%, phản ánh sự phân hủy từng phần các nhóm chức dễ bị phá vỡ như carbonyl hoặc hydroxyl. Giai đoạn (~300–480 °C) mất mạnh nhất với ~45–50% khối lượng, liên quan đến sự phân hủy khung naphthoquinon hữu cơ chính của phối tử. Phần cặn ổn định còn lại ~27–28% được quy cho Cr_2O_3, phù hợp với lý thuyết. Kết quả này cho thấy phức $Cr(PLB)_3$ có độ bền nhiệt tốt và phân hủy theo nhiều bước rõ ràng.

DRAFT

3.2.6 Cấu trúc hình học tối ưu hóa bằng DFT

Bảng 3.5 Các thông số cấu trúc hình học tối ưu hóa bằng DFT

Thông số cấu trúc	**$Ti(PLB)_2$ (Ti(IV), d^0)**	**$Cr(PLB)_3$ (Cr(III), d^3)**	**$Hg(PLB)_2$ (Hg(II), d^{10})**	**Ghi chú**
Số phối tử	2	3	2	Số phân tử PLB
Liên kết M–O (Å)	1,982–2,022	1,830–1,847	2,178–2,186	Trung bình
Góc O–M–O (°)	71,5–115,4	82,0–167,5	107,3–110,6	Theo các phối tử
Kiểu hình học	Tứ diện biến dạng	Bát diện biến dạng	Tứ diện biến dạng	Theo góc và cấu trúc
Tổng năng lượng (Hartree)	-1.689,237	-1.910,451	-2.311,883	Năng lượng tối ưu hóa
Phân bố điện tích trên kim loại (Mulliken)	+1,26	+1,41	+1,18	

DRAFT

Cấu trúc hình học của ba phức chất sau khi tối ưu hóa bằng phương pháp DFT cho thấy sự khác biệt đáng kể, phụ thuộc vào bản chất của ion kim loại trung tâm.

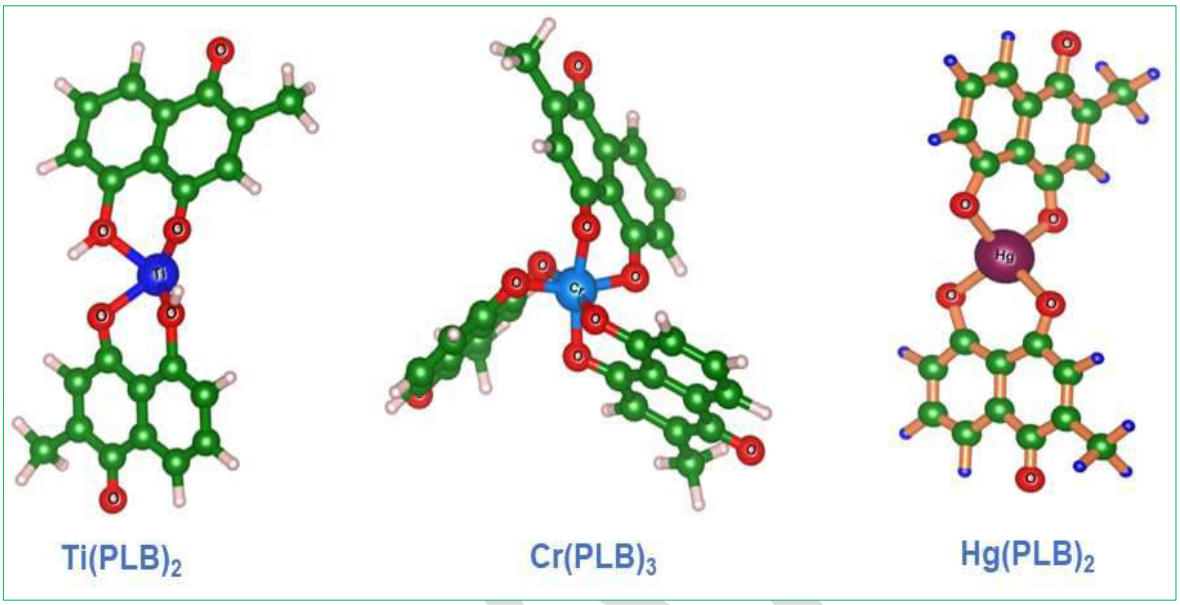
Việc tối ưu hóa cấu trúc được thực hiện với hàm B3LYP, sử dụng bộ hàm cơ sở 6-31G(d,p) cho các nguyên tử nhẹ (C, H, O) và giả thế hiệu dụng (ECP) kết hợp với bộ hàm LANL2DZ cho nguyên tử nặng (Hg, Cr, Ti). Mô phỏng được tiến hành trong môi trường nước thông qua mô hình solvat hóa liên tục PCM (Polarizable Continuum Model) nhằm phản ánh điều kiện gần với thực nghiệm.

Kết quả tối ưu hóa cho thấy các ion kim loại tạo phức với phối tử PLB thông qua các nguyên tử oxy thuộc nhóm hydroxyl và carbonyl. Các thông số như độ dài liên kết M–O, số phối tử, góc phối trí và kiểu hình học được trích xuất từ đầu ra của mô phỏng và được tổng hợp trong Bảng 3.5 và Phụ lục 50 đến Phụ lục 55.

Kết quả tính toán DFT cung cấp cái nhìn rõ nét về đặc điểm hình học và điện tử của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, đồng thời hỗ trợ mạnh mẽ cho mô hình cấu trúc thu được từ thực nghiệm. Về hình học, mỗi phức thể hiện kiểu cấu trúc đặc trưng phù hợp với bản chất ion trung tâm, $Ti(PLB)_2$ có hình học tứ diện biến dạng (d^0), $Cr(PLB)_3$ dạng bát diện biến dạng (d^3), còn $Hg(PLB)_2$ (d^{10}) mang hình tứ diện biến dạng do ảnh hưởng của cặp electron không liên kết. Độ dài liên kết M–O giảm dần theo thứ tự Hg(II) > Ti(IV) > Cr(III), với giá trị trung bình từ 1,83–2,19 Å, phản ánh sự khác biệt về bán kính ion và độ bền liên kết giữa kim loại và phối tử. Biên độ dao động lớn của góc O–M–O (71,5–167,5°) cho thấy sự biến dạng hình học đáng kể, phụ thuộc vào số phối tử và kiểu liên kết đặc trưng của từng ion kim loại

Giá trị điện tích Mulliken trên ion kim loại lần lượt là +1,41 (Cr), +1,26 (Ti) và +1,18 (Hg), cho thấy mức độ chia sẻ electron từ phối tử đến kim loại mạnh nhất

với Cr(III), góp phần rút ngắn liên kết và ổn định phức. Mặc dù tổng năng lượng tối ưu của hệ tăng theo khối lượng và số phối tử, giá trị này không được dùng để so sánh trực tiếp độ bền giữa các hệ do sự khác biệt đáng kể về bản chất và độ phức tạp cấu trúc.

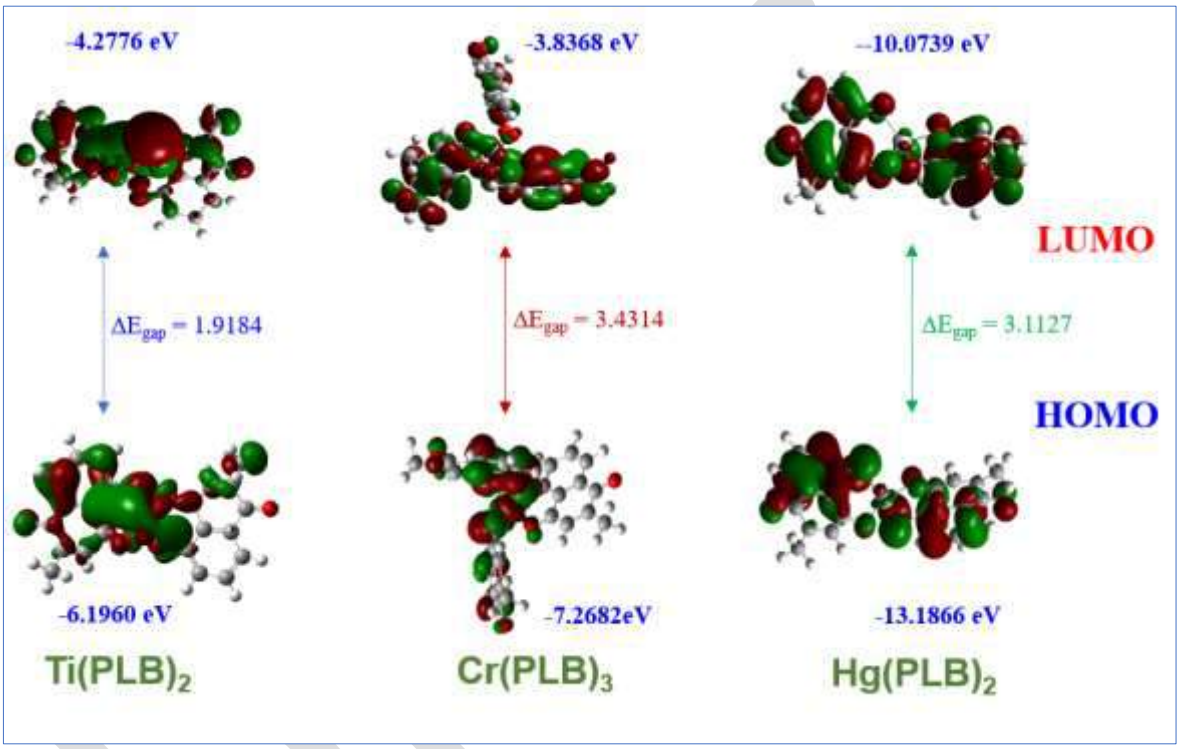


Hình 3.14 Cấu trúc tối ưu hóa của các phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Nhìn chung, các kết quả DFT hoàn toàn nhất quán với các phân tích thực nghiệm trước đó như phổ FT-IR, XPS và SEM–EDX, qua đó củng cố mô hình cấu trúc của các phức chất $Cr(PLB)_3$, $Ti(PLB)_2$, $Hg(PLB)_2$. Dữ liệu tính toán cũng cho thấy xu hướng tương tác giữa phối tử PLB và các ion kim loại theo thứ tự: Cr(III) > Ti(IV) > Hg(II), xét trên các khía cạnh độ dài liên kết M–O, mức độ phân cực điện tử và hình học phối trí. Kết quả này không chỉ làm sáng tỏ sự khác biệt cấu trúc giữa các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ ở mức độ lượng tử, mà còn đặt nền tảng cho việc định hướng thiết kế các phối tử dẫn xuất từ PLB nhằm điều chỉnh cấu trúc và tính chất phức theo yêu cầu. Trên cơ sở đó, mô hình cấu trúc ba chiều được đề xuất như thể hiện trong Hình 3.14.

3.2.7 Các thông số điện tử thu được từ tính toán DFT

Nhằm đánh giá bản chất điện tử và khả năng chuyển điện tử của các phức, các tính toán năng lượng vân đạo (orbital) phân tử (MO) đã được thực hiện. Cấu trúc tối ưu của ba phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được sử dụng để xác định năng lượng của các vân đạo (orbital) HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) và LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).



Hình 3.15 Biểu diễn HOMO–LUMO và khoảng cách năng lượng ΔE_{gap} của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.

Khoảng cách năng lượng HOMO–LUMO (ΔEgap) phản ánh độ ổn định điện tử và khả năng chuyển điện tử của phân tử. Kết quả cho thấy $Cr(PLB)_3$ có ΔEgap lớn nhất (3,4314 eV), tiếp theo là $Hg(PLB)_2$ (3,1127 eV) và $Ti(PLB)_2$ (1,9184 eV). Tuy nhiên, ΔEgap lớn không nhất thiết đồng nghĩa với độ bền phối trí cao, do còn phụ thuộc vào bản chất tương tác giữa phối tử với ion trung tâm

Bảng 3.6 Các tham số điện tử và tương tác phối trí của các phức từ kết quả tính toán DFT và phân tích NBO.

Thông số \ Phức	**$Ti(PLB)_2$**	**$Cr(PLB)_3$**	**$Hg(PLB)_2$**
E_{HOMO} (eV)	-6,196	-7.2682	-13,1866
E_{LUMO} (eV)	-4,2776	-3.8368	-10.0739
ΔE_{gap} (eV)	1,9184	3,4314	3,1127
Loại chuyển điện tử	Phối tử → Metal (LMCT)	Phối tử → Metal	Phối tử → Metal
λ_{em} (thực nghiệm/TD-DFT)	605/646nm	436/382nm	436/400 nm
Điện tích Mulliken trên ion kim loại	+1,26	+1,41	+1,18
Số lượng tương tác NBO (donor → acceptor)	4	6	4
E(2) trung bình (kcal/mol)	18,5	14,2	16,8
Kiểu tương tác chính	LP(O) → d*(Ti)	LP(O) → d*(Cr)	LP(O) → d*(Hg)
Kết luận	Phối trí mạnh, bền, dễ phát xạ	Phối trí yếu, dễ dập tắt huỳnh quang do chuyển trạng thái triplets	Phối trí trung bình, dễ dập tắt huỳnh quang mạnh do hiệu ứng nguyên tử nặng

DRAFT

Phân tích Mulliken và NBO cho thấy $Cr(PLB)_3$ có số tương tác donor → acceptor nhiều nhất (6), nhưng năng lượng tương tác E(2) thấp nhất (14,2 kcal/mol) và điện tích dương trên Cr(III) cao nhất (+1,41), cho thấy mức chia sẻ electron hạn chế và liên kết yếu. Ngược lại, $Ti(PLB)_2$ có E(2) cao nhất (18,5 kcal/mol) và Mulliken thấp hơn (+1,26), phản ánh tương tác phối trí hiệu quả hơn, nhất quán với kiểu cho nhận LP(O) → d*(Ti). Phức $Hg(PLB)_2$ có ΔE_{gap} = 3,1127 eV, E(2) = 16,8 kcal/mol và điện tích Mulliken +1,18. Tuy nhiên, hiệu ứng tương đối tính (relativistic effect) của ion Hg(II) và kiểu phối trí mềm LP(O) → d*(Hg) có thể làm giảm độ bền cấu trúc và dễ gây dập phát xạ qua cơ chế ISC.

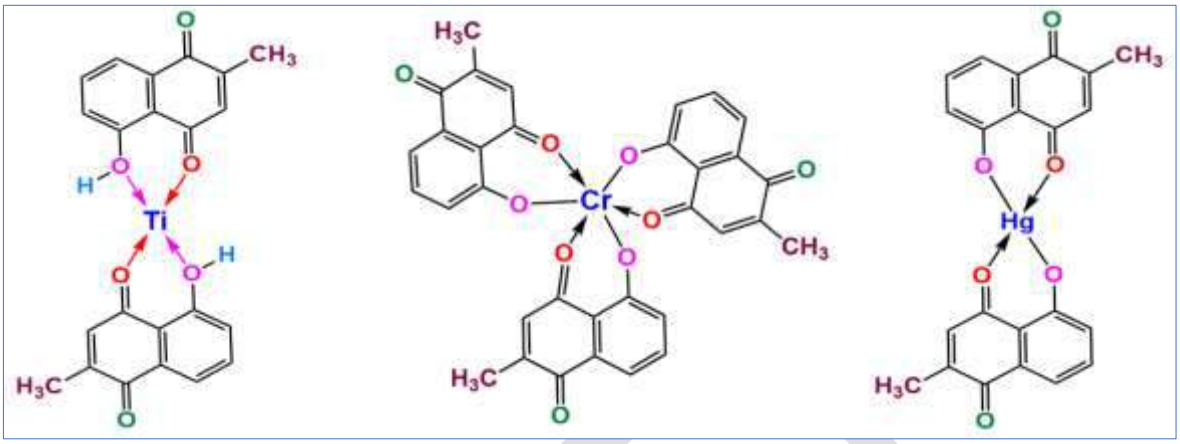
Tổng hợp các yếu tố, mức độ phối trí bền vững được đánh giá theo thứ tự Ti(IV) > Hg(II) > Cr(III), phù hợp với kết quả thực nghiệm từ phổ FT-IR, XPS, hình học DFT và dữ liệu huỳnh quang. Các thông số chi tiết được trình bày tại Bảng 3.6, còn Hình 3.15 minh họa trực quan phân bố vân đạo (orbital) HOMO–LUMO của các hệ.

Các phương pháp phân tích hiện đại như FT–IR, HR-MS, XRD, SEM–EDX, XPS và TGA đã được triển khai đồng bộ để đặc trưng toàn bộ phức chất rắn $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$. Kết quả FT–IR và XPS khẳng định sự phối trí của các nhóm chức chính trong phối tử PLB với ion kim loại, trong khi HR-MS xác nhận khối lượng phân tử của phức. Sự thay đổi hình thái học và đặc điểm nhiễu xạ XRD chứng minh sự hình thành cấu trúc mới sau khi tạo phức. Ngoài ra, phân tích TGA làm rõ độ bền nhiệt và quá trình phân hủy của phức. Tổng hợp các kết quả trên cho thấy ba phức chất đã được hình thành thành công ở trạng thái rắn, với cấu trúc bền vững và có đặc điểm phù hợp với các hệ phức hữu cơ–vô cơ. Những dữ liệu này đồng thời tạo nền tảng vững chắc cho các khảo sát chuyên sâu về cơ chế cảm biến huỳnh quang và định hướng ứng dụng sau này.

DRAFT

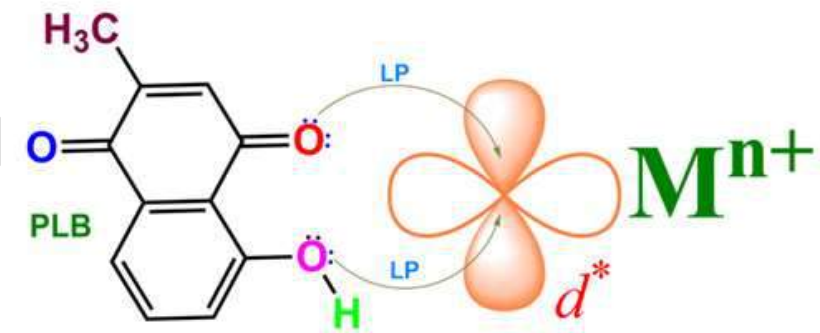
3.3 Nghiên cứu cơ chế và đề xuất cấu trúc của phức.

3.3.1 Sự hình thành phức và đề xuất cấu trúc



Hình 3.16 Cấu trúc đề xuất của các phức $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Phản ứng của PLB khi tương tác với ion kim loại được minh họa cơ chế hình thành liên kết phối trí giữa phối tử PLB với ion kim loại Ti(IV), Cr(III), Hg(II) thông qua tương tác cho–nhận electron kiểu LP(O) → d*(M). Các cặp electron tự do (LP) trên nguyên tử oxy của nhóm carbonyl và hydroxyl trong PLB được chuyển đến vân đạo (orbital) d trống (d*) của ion kim loại, hình thành liên kết phối trí M–O bền vững (Hình 3.17).



Hình 3.17 Liên kết phối trí PLB → M^{n+} theo kiểu LP(O) → d*(M)

Dựa trên phân tích NBO từ kết quả tính toán DFT, các liên kết giữa phối tử PLB và ion kim loại trong ba phức chất được xác định là tương tác cho nhận (donor–acceptor) đặc trưng, Donor chính là cặp electron không liên kết (lone pair, LP) trên nguyên tử

oxy của các nhóm hydroxyl (–OH) và carbonyl (C=O) trong cấu trúc PLB và acceptor là các orbital d chưa chiếm chỗ (d*) trên ion kim loại trung tâm (Ti(IV), Cr(III), Hg(II)).

Tương tác kiểu *LP(O) → d(M)** là loại chi phối chính, đóng vai trò then chốt trong việc hình thành và ổn định cấu trúc phức. Tùy thuộc vào tính chất điện tử của từng ion kim loại, năng lượng tương tác E(2) cho thấy mức độ mạnh yếu của liên kết. Ti(IV) có cấu hình d^0, toàn bộ obitan d đều trống, nên tương tác LP(O) → d*(Ti) diễn ra mạnh mẽ, với E(2) cao (~18,5 kcal/mol), tạo liên kết ổn định và tăng khả năng phát xạ. Cr(III) có cấu hình d^3, các obitan d đã bị chiếm một phần, làm suy giảm khả năng nhận electron → E(2) thấp (~14,2 kcal/mol), tương tác yếu hơn và dễ xảy ra chuyển trạng thái triplet. Hg(II) mặc dù có khả năng nhận electron, nhưng do ảnh hưởng của hiệu ứng kim loại nặng và cấu hình đầy (d^{10}), tương tác LP(O) → d*(Hg) đạt mức trung bình (~16,8 kcal/mol), tuy nhiên lại dễ bị dập huỳnh quang do hiệu ứng nguyên tử nặng.

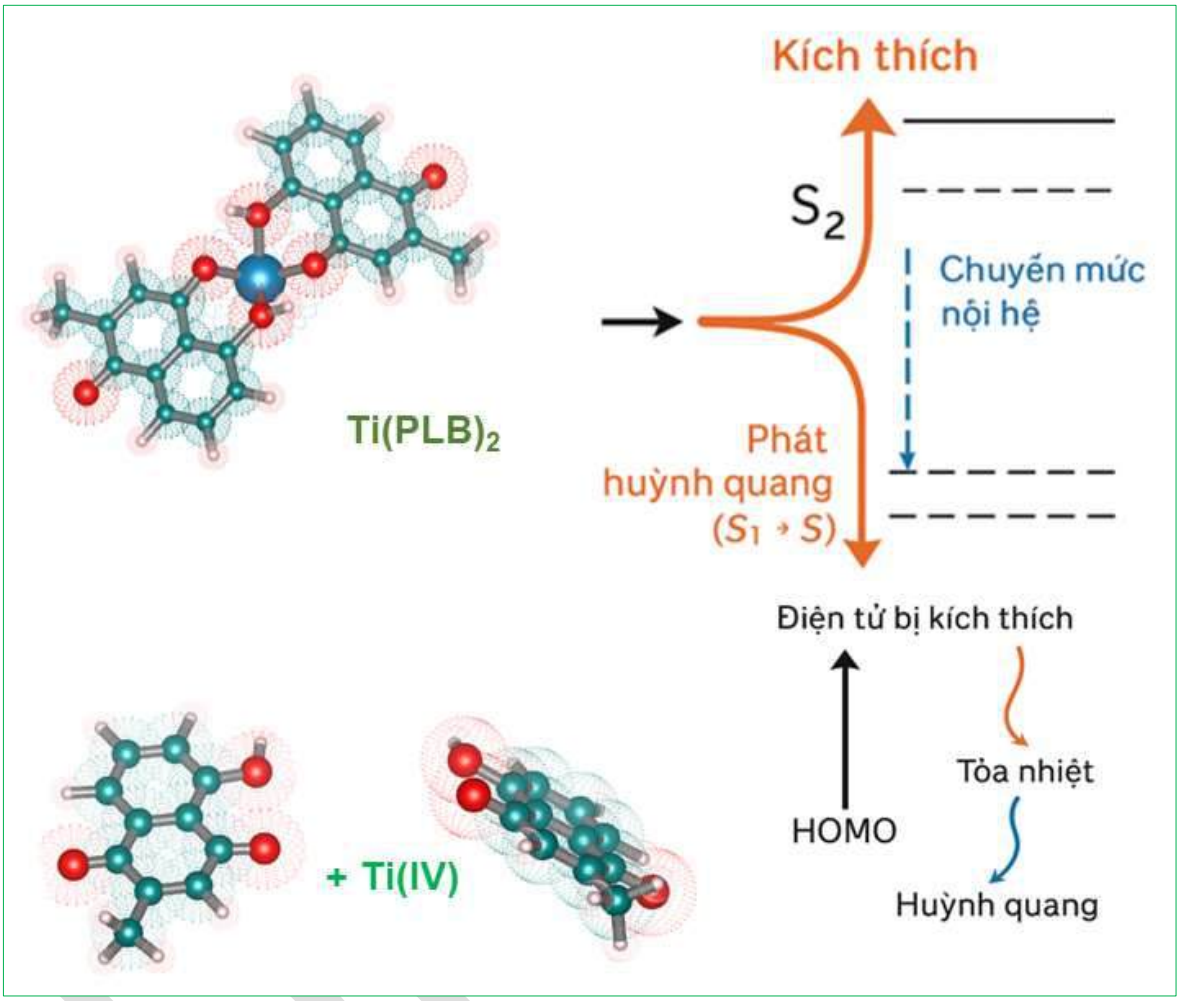
Giá trị điện tích Mulliken lớn trên ion kim loại (dao động từ +1,18 đến +1,41) cũng phản ánh rõ xu hướng hút electron của các ion kim loại này, cho thấy sự phân cực trong liên kết và củng cố đặc trưng phối trí.

Các phân tích DFT/NBO đã làm rõ bản chất liên kết trong phức là những tương tác cho–nhận điện tử, đóng vai trò trung tâm trong việc thiết lập cấu trúc hình học của phức và ảnh hưởng trực tiếp đến tính chất của phức. Những đặc điểm này đóng vai trò nền tảng cho các đánh giá quang học và tương tác sinh học ở các phần sau.

DRAFT

3.3.2 Bàn về cơ chế phát xạ và dập tắt huỳnh quang của phức

3.3.2.1 Cơ chế phát xạ huỳnh quang của phức Ti(PLB)₂



Hình 3.18 Cơ chế phát huỳnh quang của phức Ti(PLB)₂

Phức Ti(PLB)₂ phát huỳnh quang mạnh nhờ sự kết hợp của các yếu tố điện tử và cấu trúc phân tử**.** Cơ chế phát xạ này bắt nguồn từ sự hấp thụ ánh sáng chủ yếu qua chuyển mức π–π* trong phối tử PLB. Theo tính toán TD-DFT (TPSSH/LANL2DZ//def2-SVPD), các chuyển mức HOMO–1 → LUMO+1 tương ứng với bước sóng kích thích khoảng 500 nm. Sau khi hấp thụ photon, các electron ở trạng thái kích thích không phát xạ ngay mà trải qua tái phân bố năng lượng và cấu trúc, thông qua các quá trình phi bức xạ như dao động nội phân tử (vibrational relaxation) và chuyển mức nội hệ (internal conversion). Phát xạ huỳnh quang xảy ra từ trạng thái singlet kích thích S_1 về trạng thái cơ bản S_0, tương ứng với λ_{em} trong vùng 600–646 nm. Sự chênh lệch

lớn giữa λ_{ex} và λ_{em} phản ánh hiệu ứng dịch Stokes mạnh, là đặc trưng của các hệ phát huỳnh quang có cấu trúc liên hợp mở rộng và linh động.

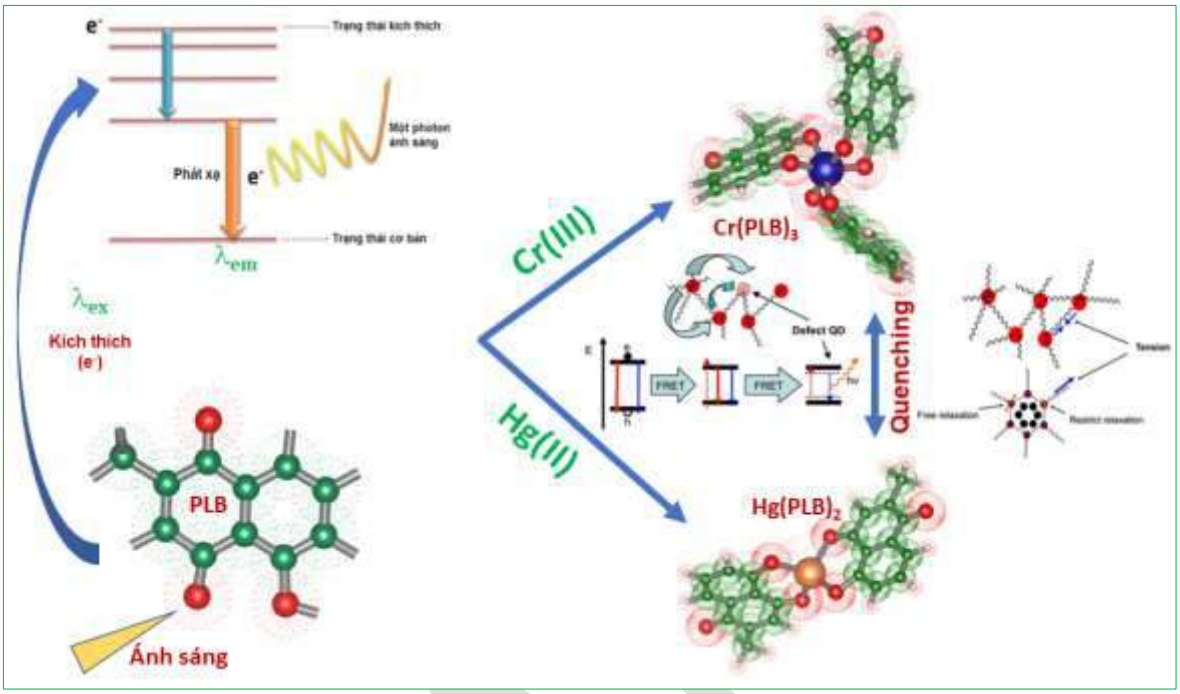
Đặc biệt, phức $Ti(PLB)_2$ còn cho thấy hiệu ứng phát huỳnh quang mạnh do phức hóa (Chelation-Enhanced Fluorescence – CHEF)**.** Khi phối tử PLB tạo phức với ion Ti(IV), cấu trúc trở nên cứng hơn, làm giảm dao động nội phân tử và ức chế quá trình mất năng lượng phi bức xạ [168][169]. Đồng thời, quá trình phối trí cũng góp phần ổn định hóa hệ π–liên hợp, giúp tăng mật độ điện tử ở các orbital phát xạ hiệu quả.

Ion Ti(IV), với cấu hình d^0 (không có electron độc thân) và không mang từ tính, còn đóng vai trò như một "lá chắn điện tử", giúp bảo vệ trạng thái kích thích khỏi sự dập tắt huỳnh quang do tương tác với các phân tử dung môi phân cực như ethanol hoặc nước những yếu tố thường gây suy giảm phát xạ trong nhiều chất phát huỳnh quang [170].

Những quan sát thực nghiệm hoàn toàn phù hợp với kết quả tính toán lý thuyết. Tại mức tính toán TPSSH/LANL2DZ//def2-SVPD, khoảng cách năng lượng HOMO–LUMO (ΔE_{gap}) của phức $Ti(PLB)_2$ được xác định trong khoảng 1,92–2,15 eV, tương ứng với vùng hấp thụ ánh sáng đỏ (500–640 nm). Phân tích phân bố orbital cho thấy HOMO tập trung chủ yếu tại vùng liên hợp π của phối tử PLB, trong khi LUMO lan rộng trên toàn bộ hệ thống phân tử, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chuyển mức điện tử bất đối xứng là yếu tố góp phần tăng khả năng phát xạ huỳnh quang. Bên cạnh vai trò là trung tâm phối trí, ion Ti(IV) còn được xác định là nhân tố điều biến điện tử hiệu quả, góp phần ổn định trạng thái kích thích và hạn chế cơ chế dập huỳnh quang. Cơ chế phát huỳnh quang phức chất được minh họa trong Hình 3.18.

DRAFT

3.3.2.2 Cơ chế dập huỳnh quang của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$



Hình 3.19 Cơ chế phát và dập huỳnh quang của PLB khi tạo phức với Cr(III) và Hg(II).

Trái ngược với Ti(IV), các ion Cr(III) và Hg(II) gây ra hiện tượng dập tắt huỳnh quang đáng kể khi tạo phức với phối tử PLB. Cơ chế dập tắt huỳnh quang của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ có thể được lý giải dựa trên ba yếu tố chính:

(1) Bản chất điện tử và phân bố orbital phân tử

Theo kết quả tính toán DFT, các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều có khoảng cách năng lượng HOMO–LUMO tương đối lớn (ΔE_{gap} = 3,43 eV và 3,11 eV). Sự phân tách năng lượng lớn này làm giảm khả năng chuyển điện tử kích thích từ HOMO lên LUMO, qua đó hạn chế quá trình phát xạ huỳnh quang. Phân bố orbital cho thấy HOMO và LUMO bị đan xen và phân tán trên toàn phân tử, làm giảm mật độ điện tử tập trung tại các vị trí phát xạ hiệu quả, gây suy yếu khả năng phát huỳnh quang[171].

(2) Ảnh hưởng từ cấu trúc và bản chất ion kim loại

Trong phức $Cr(PLB)_3$, ion Cr(III) có điện tích Mulliken cao nhất trong ba phức (+1,41), gây phân cực mạnh trong liên kết giữa kim loại với phối tử. Điều này có thể

dẫn đến biến dạng hình học và mất ổn định trạng thái kích thích, làm gia tăng khả năng tiêu tán năng lượng qua con đường phi bức xạ. Ngoài ra, cấu trúc hình học gần bát diện của phức Cr(III) với ba phối tử cũng góp phần làm giảm hiệu quả phát xạ.

Đối với $Hg(PLB)_2$, ion Hg(II) là nguyên tử nặng có hiệu ứng spin–quỹ đạo (spin–orbit coupling) mạnh, làm tăng xác suất xảy ra chuyển trạng thái nội hệ (intersystem crossing – ISC) từ trạng thái singlet kích thích (S_1) sang trạng thái triplet (T_1). Đây là con đường phi bức xạ phổ biến trong các phức kim loại nặng, góp phần quan trọng vào dập tắt huỳnh quang.

(3) Cơ chế dập tắt huỳnh quang tĩnh (static quenching)

Các kết quả thực nghiệm từ phương pháp Stern–Volmer cho thấy các giá trị hằng số K_{sv} và tốc độ dập tắt K_q của cả hai phức đều rất cao, vượt xa giới hạn khuếch tán (~10^9 $M^{-1}\cdot s^{-1}$). Điều này loại trừ cơ chế dập tắt động do va chạm trong trạng thái kích thích, đồng thời khẳng định bản chất của quá trình dập tắt là dập tắt tĩnh, xảy ra thông qua sự hình thành phức không phát xạ ngay sau khi tương tác giữa PLB với ion kim loại.

Tất cả các yếu tố nêu trên góp phần lý giải rõ ràng cơ chế suy giảm huỳnh quang của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, và được tóm tắt trong Bảng 3.7 dưới đây.

DRAFT

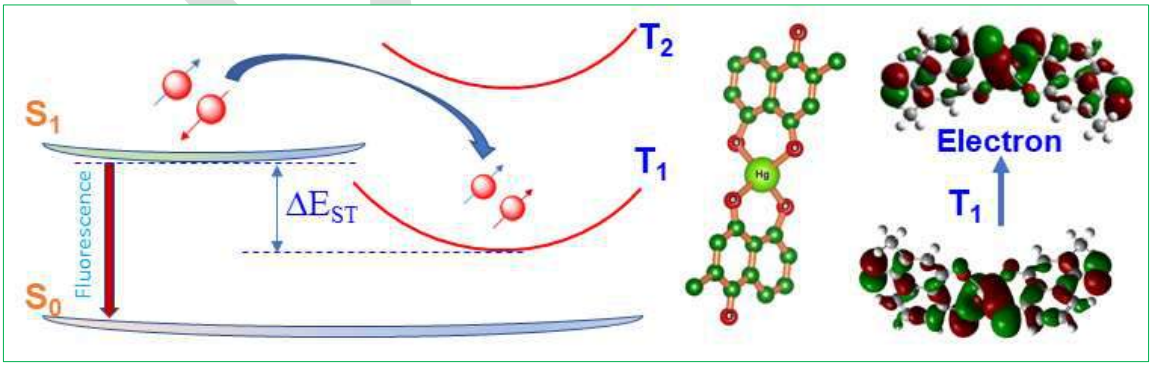
Bảng 3.7 Tóm tắt cơ chế dập huỳnh quang của Cr(III), Hg(II)

Ion kim loại	**Đặc điểm điện tử và cấu trúc**	**Cơ chế dập huỳnh quang**
Cr(III)	ΔE_{gap} lớn, điện tích cao, cấu hình d^3, trạng thái kích thích kém bền	Chuyển điện tử khó xảy ra, dễ tiêu tán năng lượng qua con đường phi phát xạ
Hg(II)	Hiệu ứng spin–quỹ đạo mạnh, cấu hình d^{10}, không có orbital trống thuận lợi.	ISC xảy ra mạnh, electron chuyển sang trạng thái triplet và quay về trạng thái cơ bản qua con đường không phát xạ

DRAFT

Hình 3.19 là sơ đồ minh họa quá trình phát huỳnh quang điển hình của phân tử PLB và sự thay đổi trạng thái phát xạ khi PLB tạo phức với các ion kim loại Cr(III) và Hg(II). Trước tiên, dưới tác động của ánh sáng kích thích (λ_{ex}), electron trong phân tử PLB được chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Sau khi trải qua một khoảng thời gian sống ngắn (τ), electron quay trở lại trạng thái cơ bản, đồng thời phát ra photon ánh sáng với bước sóng λ_{em} quá trình này được gọi là huỳnh quang (fluorescence).

Tuy nhiên, khi PLB phối trí với các ion kim loại như Cr(III) và Hg(II), hiện tượng dập tắt huỳnh quang xảy ra do sự thay đổi điện tử nội phân tử. Trong trường hợp $Cr(PLB)_3$, cấu trúc ba càng tạo thành mạng phối trí bền nhưng đồng thời gây biến dạng cấu trúc phân tử. Sự xuất hiện của ion Cr(III), một kim loại chuyển tiếp có spin cao thúc đẩy quá trình chuyển hệ spin (ISC) từ trạng thái singlet phát xạ sang trạng thái triplet không phát xạ, từ đó ngăn cản huỳnh quang. Ngoài cơ chế ISC, trong phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ còn xảy ra quá trình truyền năng lượng không bức xạ theo cơ chế FRET. Trong cơ chế này, PLB đóng vai trò donor còn ion kim loại đóng vai trò acceptor. Do phổ hấp thụ của phức Cr(III) và Hg(II) chồng lấn đáng kể với phổ phát xạ của PLB, năng lượng kích thích của PLB được truyền trực tiếp sang ion kim loại qua tương tác lưỡng cực mà không phát ra photon. Hệ quả của quá trình FRET là làm giảm đáng kể cường độ phát xạ, giảm thời gian sống trạng thái S_1*, và cạnh tranh trực tiếp với quá trình phát huỳnh quang, dẫn đến sự dập tắt huỳnh quang quan sát được.



Hình 3.20 Sơ đồ Jablonski minh họa cơ chế dập huỳnh quang do hiệu ứng nguyên tử nặng của Hg(II) trong phức $Hg(PLB)_2$

Đối với phức $Hg(PLB)_2$, cơ chế dập tắt huỳnh quang chủ yếu chịu tác động bởi hiệu ứng nguyên tử nặng. Hg(II) có tương tác spin–quỹ đạo mạnh, làm tăng xác suất chuyển trạng thái nội hệ (ISC) từ singlet (S_1) sang triplet (T_1) tương tự Cr(III), nhưng không tuân theo cơ chế định hướng spin rõ ràng. Ngoài ra, sự bó cứng cấu trúc phối tử quanh ion Hg(II) làm giảm dao động nội phân tử và hạn chế khả năng giải phóng năng lượng sau khi kích thích, từ đó thúc đẩy quá trình tiêu tán năng lượng qua các con đường phi phát xạ. Hình 3.20 minh họa hiệu ứng nguyên tử nặng trong sơ đồ Jablonski, cho thấy sự tăng cường chuyển ISC cạnh tranh với phát xạ huỳnh quang, dẫn đến dập tắt tín hiệu huỳnh quang. Bên phải là cấu trúc tối ưu của phức $Hg(PLB)_2$ và phân bố orbital ở trạng thái triplet T_1, cho thấy sự phân ly điện tích giữa vùng cho và vùng nhận điện tử.

Như vậy, cả hai phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều dập tắt huỳnh quang rõ rệt so với PLB tự do, thông qua các cơ chế khác nhau. Cr(III) thúc đẩy quá trình chuyển hệ spin do moment từ cao, trong khi Hg(II) tăng cường ISC nhờ hiệu ứng kim loại nặng. Cả hai cơ chế đều dẫn đến chuyển trạng thái kích thích phát xạ (S_1) sang các trạng thái triplet không phát xạ (T_1). Sơ đồ này cung cấp minh họa trực quan cho cơ chế điện tử nền tảng giải thích sự thay đổi phổ huỳnh quang khi chuyển từ phối tử PLB tự do sang các phức kim loại tương ứng.

❖ Kết luận phần nghiên cứu tạo phức của PLB với Cr(III), Ti(IV) và Hg(II)

Tổng hợp các kết quả từ khảo sát trong dung dịch, phân tích đặc trưng phức rắn và tính toán lý thuyết cho thấy PLB có khả năng tạo phức bền với các ion kim loại Cr(III), Ti(IV) và Hg(II), với đặc điểm phối trí, cấu trúc và tính chất điện tử khác biệt. Trong dung dịch, sự hình thành phức được xác nhận thông qua phổ UV–Vis, huỳnh quang, phương pháp Job, cho thấy tỷ lệ phối trí lần lượt là 1:3 đối với Cr(III) và 1:2 đối với Ti(IV), Hg(II). Các phức chất hình thành ổn định ở điều kiện tối ưu về pH, dung môi và thời gian, với hằng số liên kết cao và ΔG âm, phản ánh tính tự phát và bền vững của quá trình tạo phức.

DRAFT

Các phức chất rắn đã được tổng hợp thành công và đặc trưng bằng các phương pháp hoá lý hiện đại FT-IR, XRD, HR-MS, TGA, XPS, SEM–EDX và NMR. Kết quả phân tích cho thấy các nhóm chức –OH và C=O trên PLB đều tham gia phối trí, cấu trúc phức có dạng hình học phù hợp với đặc điểm điện tử của từng ion kim loại. Ti(IV) (d^0) và Hg(II) (d^{10}) đều tạo phức có hình học gần tứ diện biến dạng với hai phối tử PLB; Cr(III) (d^3) với khả năng phối trí cao, hình thành cấu trúc bát diện biến dạng với ba phối tử.

Phân tích lý thuyết DFT/NBO và khảo sát phổ huỳnh quang cho thấy cơ chế phát/dập huỳnh quang của các phức có sự khác biệt rõ rệt. Phức $Ti(PLB)_2$ thể hiện đặc tính phát xạ mạnh nhờ hiệu ứng phát huỳnh quang khi tạo phức và trạng thái kích thích ổn định. Ngược lại, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ có xu hướng dập tắt huỳnh quang mạnh do cơ chế chuyển trạng thái nội hệ, với Cr(III) mang spin cao và Hg(II) bị chi phối bởi hiệu ứng nguyên tử nặng. Các kết quả Stern–Volmer khẳng định quá trình dập tắt xảy ra theo cơ chế tĩnh. Các thông số tính toán như khoảng cách năng lượng HOMO–LUMO, điện tích Mulliken, năng lượng tương tác và phân bố orbital đã cho thấy phù hợp với các cơ chế tương tác được đề xuất, góp phần củng cố mô hình lý thuyết và thực nghiệm.

Quá trình tạo phức giữa PLB và các ion kim loại chuyển tiếp không chỉ làm thay đổi rõ rệt cấu trúc và tính chất điện tử của phức, mà còn tạo cơ chế phát xạ hay dập huỳnh quang một cách có chọn lọc. Những kết quả này không chỉ cung cấp hiểu biết sâu về bản chất tương tác giữa PLB với ion kim loại mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực cảm biến huỳnh quang, phân tích vết và nghiên cứu sinh học.

❖ Định hướng nghiên cứu tiếp theo

Những kết luận nêu trên là cơ sở quan trọng cho các ứng dụng trong lĩnh vực hóa phân tích, hóa sinh và cảm biến. Dựa trên đặc điểm huỳnh quang, khả năng ảnh hưởng đến cường độ phát xạ và xu hướng phối trí chọn lọc với các ion kim loại khác nhau, các phức chất có thể được phát triển theo các hướng sau:

DRAFT

Khảo sát ảnh hưởng của hiệu ứng spin–quỹ đạo mạnh của ion kim loại nặng như Hg(II) trong tương tác với protein sinh học (ví dụ HSA), nhằm làm rõ cơ chế liên kết và định hướng ứng dụng vào hệ vận chuyển sinh học hoặc gắn chọn lọc với enzyme chứa nhóm thiol.

Phát triển đầu dò huỳnh quang có độ chọn lọc cao để nhận diện ion Ti(IV) trong môi trường; đồng thời khai thác cơ chế dập tắt huỳnh quang đặc trưng để định tính hoặc định lượng Cr(III) và Hg(II) với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

3.4 Ứng dụng phân tích và đánh giá hoạt tính sinh học

3.4.1 Đánh giá hoạt tính sinh học của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

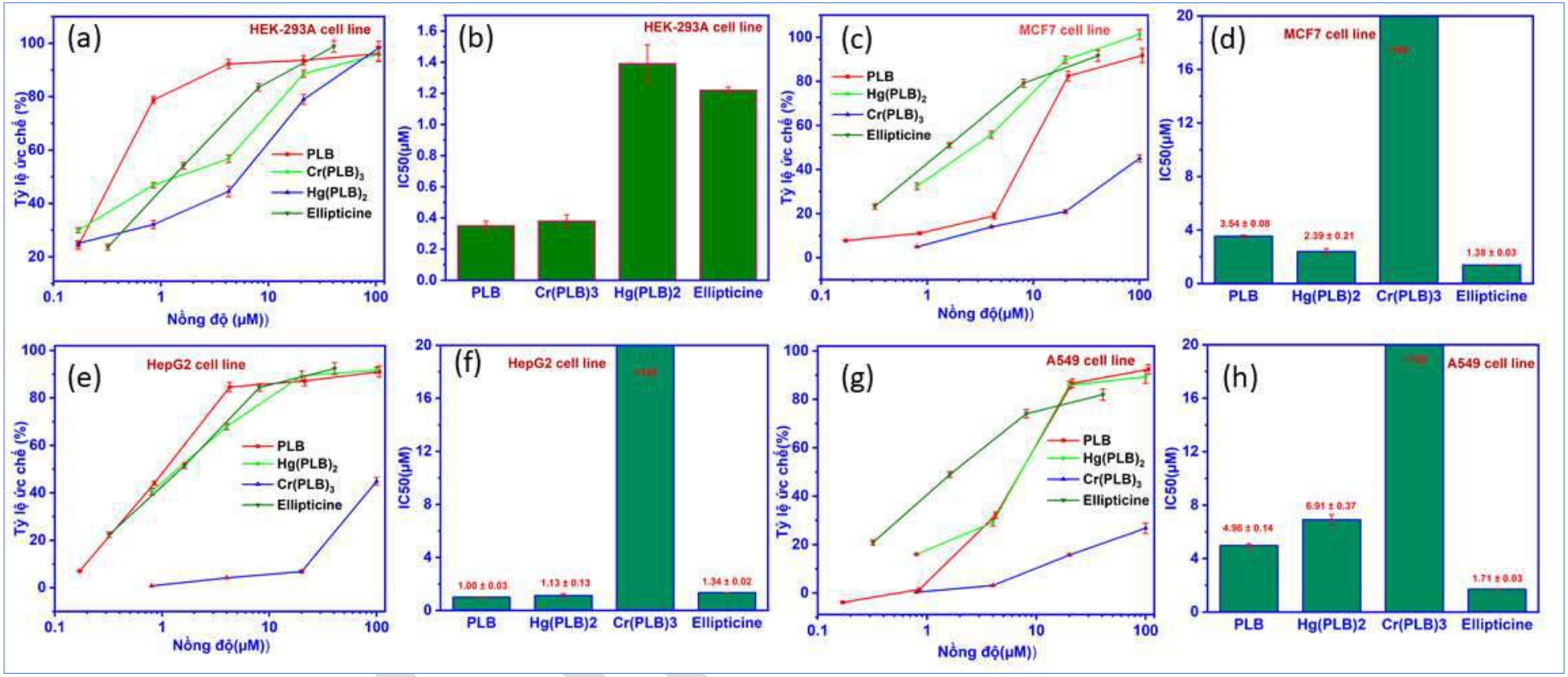
3.4.1.1 Đánh giá hoạt tính sinh học in vitro

Như đã trình bày ở các mục trước, hai phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đã được tổng hợp và xác định cấu trúc, với sự phối trí giữa ion kim loại trung tâm và các nhóm chức chứa oxy trong PLB. Quá trình hình thành phức không chỉ cải thiện độ ổn định hóa học mà còn làm thay đổi đáng kể tính chất điện tử và khả năng tương tác sinh học của hợp chất.

Việc khảo sát hoạt tính sinh học của các phức chất này là cần thiết nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng trong y sinh học. Nghiên cứu tập trung vào ba hướng chính:

- Khả năng gây độc tế bào ung thư trên các dòng HepG2, MCF-7 và A549;
- Hiệu quả chống viêm thông qua ức chế tạo sản sinh nitric oxide (NO) trên dòng tế bào RAW 264.7;
- Khả năng ức chế xúc tác men α-glucosidase mục tiêu quan trọng trong định hướng phát triển thuốc điều trị bệnh tiểu đường type II.

DRAFT



Hình 3.21 Tác dụng ức chế tế bào của PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và ellipticine trên dòng tế bào thận gốc phôi ở người HEK-293A (a–b) và ba dòng tế bào ung thư ở người: MCF-7 (c–d), HepG2 (e–f), A549 (g–h). *(a, c, e, g): Tỷ lệ % ức chế theo nồng độ. (b, d, f, h):* Giá trị IC_{50} (μM) tương ứng.

❖ Hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên các dòng HepG2, MCF-7 và A549

Để đánh giá tiềm năng ứng dụng của các phức chất trong lĩnh vực điều trị ung thư, các hợp chất PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và ellipticine (đối chứng dương) đã được khảo sát trên bốn dòng tế bào: HEK-293A (tế bào lành thận phôi người), MCF-7 (ung thư vú), HepG2 (ung thư gan) và A549 (ung thư phổi). Kết quả thể hiện trong Hình 3.21.

Hình 3.21a–b cho thấy cả PLB và $Cr(PLB)_3$ đều có khả năng ức chế mạnh trên dòng tế bào HEK-293A, với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,35 ± 0,03 và 0,38 ± 0,04 μM. Trong khi đó, $Hg(PLB)_2$ (1,39 ± 0,12 μM) và ellipticine (1,22 ± 0,02 μM) có độc tính thấp hơn, phản ánh mức độ an toàn sinh học cao hơn. Kết quả này chỉ ra rằng $Cr(PLB)_3$ và PLB có thể gây độc đáng kể trên tế bào lành ở nồng độ thấp, trong khi $Hg(PLB)_2$ tỏ ra ít độc hơn.

Hình 3.21c–d cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ có hiệu quả ức chế đáng kể trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7, với giá trị IC_{50} = 2,39 ± 0,21 μM, tốt hơn so với PLB tự do (3,54 ± 0,08 μM), tuy vẫn chưa vượt qua đối chứng ellipticine (1,38 ± 0,03 μM), $Hg(PLB)_2$ thể hiện ưu thế nổi bật về độ an toàn. Điều này cho thấy sự phối trí với ion Hg(II) đã cải thiện đáng kể hiệu quả sinh học so với PLB tự do. Như vậy, phức $Hg(PLB)_2$ không những tăng hoạt tính ức chế tế bào ung thư mà còn giảm độc tính trên tế bào lành, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các hệ dẫn thuốc hướng đích với độ chọn lọc cao.

Theo Hình 3.21e–f, cả PLB, $Hg(PLB)_2$ và ellipticine đều thể hiện mức ức chế tế bào HepG2 tương đương với IC_{50} lần lượt là 1,00 ± 0,03; 1,13 ± 0,13 và 1,34 ± 0,02 μM. Trong khi đó, $Cr(PLB)_3$ không có tác dụng ức chế, có thể liên quan đến đặc tính bền, khó khuếch tán qua màng và hạn chế trong việc tiếp cận đích sinh học đã được ghi nhận với nhiều phức Cr(III)[172][173]. Hình 3.21g–h cho thấy ellipticine có hoạt tính ức chế tế bào A549 cao nhất với IC_{50} = 1,71 ± 0,03 μM, tiếp theo là PLB (4,98 ± 0,14 μM), $Hg(PLB)_2$ (6,91 ± 0,37 μM), trong khi $Cr(PLB)_3$ tiếp tục không có tác dụng (IC_{50} > 100 μM). Sự suy giảm hoạt tính của $Hg(PLB)_2$ ở dòng tế bào này cho thấy tác dụng tăng cường từ Hg(II) không đồng đều trên tất cả các loại tế bào ung thư.

DRAFT

Như vậy dựa trên giá trị IC_{50} và tỷ lệ % ức chế (Hình 3.21), có thể sắp xếp hiệu quả tác động theo từng dòng tế bào như sau:

MCF-7: ellipticine > $Hg(PLB)_2$ > PLB >> $Cr(PLB)_3$;

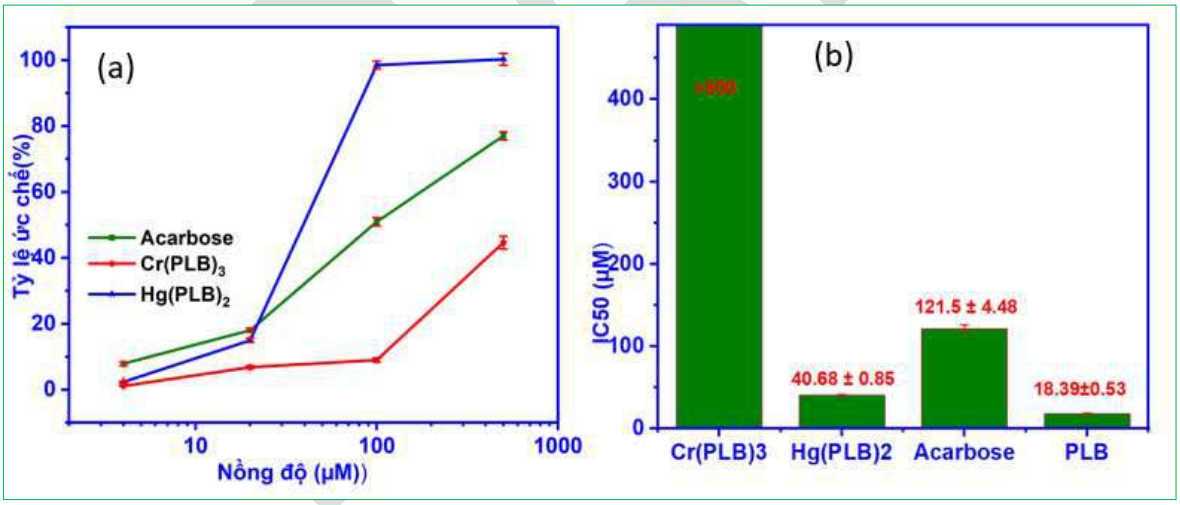
HepG2: PLB ≈ $Hg(PLB)_2$ ≈ ellipticine >> $Cr(PLB)_3$;

A549: ellipticine > PLB > $Hg(PLB)_2$ >> $Cr(PLB)_3$;

HEK-293A (tế bào lành): $Cr(PLB)_3$ ≈ PLB > ellipticine > $Hg(PLB)_2$.

Phức chất $Hg(PLB)_2$ nổi bật về hiệu quả với MCF-7 và cho độc tính thấp hơn trên tế bào lành so với PLB. Trong khi đó, $Cr(PLB)_3$ mặc dù có độc tính cao trên HEK-293A nhưng gần như không ức chế hiệu quả các dòng ung thư khảo sát, cho thấy vai trò của ion trung tâm có thể tác động trái chiều đến hoạt tính sinh học, phụ thuộc vào cơ chế tương tác phân tử cụ thể.

❖ Khả năng ức chế *enzym α-glucosidase*



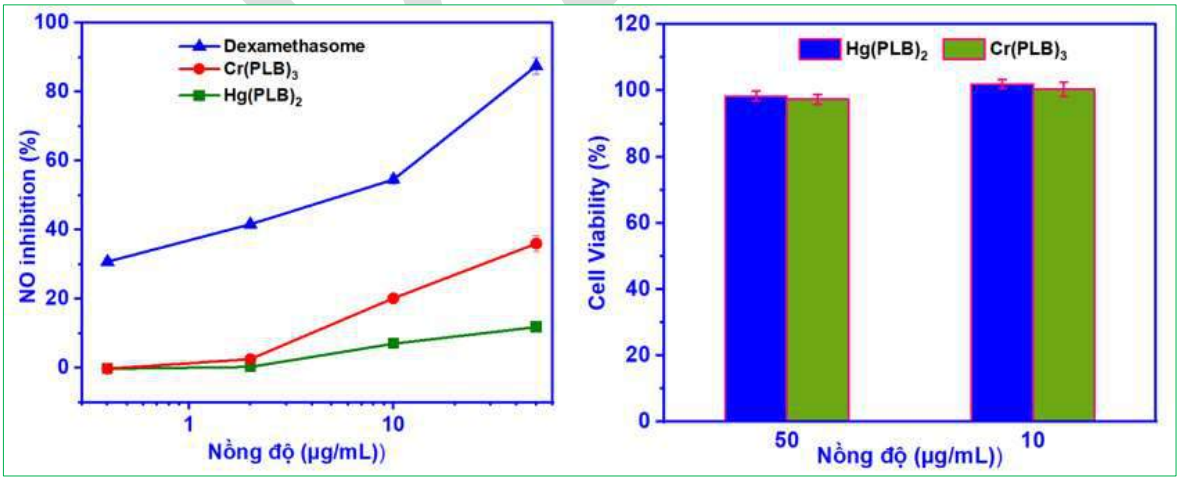
Hình 3.22 Hoạt tính ức chế *enzym α-glucosidase* của PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và acarbose

Hiệu quả ức chế enzyme *α-glucosidase* của các hợp chất PLB, $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ so với thuốc đối chứng dương acarbose được trình bày ở Hình 2.22. Kết quả cho thấy phức chất $Hg(PLB)_2$ thể hiện hoạt tính ức chế vượt trội, với giá trị IC_{50} thấp hơn đáng kể so với $Cr(PLB)_3$ và *acarbose*. Cụ thể, $Hg(PLB)_2$ đạt tỷ lệ ức chế cao ngay ở nồng

độ thấp, phản ánh ái lực mạnh giữa phức chất này với trung tâm hoạt động của enzyme. Trong khi đó, $Cr(PLB)_3$ chỉ đạt mức ức chế đáng kể ở nồng độ cao, cho thấy hoạt tính yếu hơn đáng kể. Mặc dù *acarbose* là thuốc chuẩn trong điều trị đái tháo đường type II thông qua ức chế *α-glucosidase*, kết quả thu được cho thấy $Hg(PLB)_2$ có hiệu quả cao hơn *acarbose*, cho thấy tiềm năng thay thế hoặc hỗ trợ điều trị. Ngoài ra, PLB tự do cũng cho giá trị IC_{50} thấp, phản ánh vai trò quan trọng của cấu trúc naphtoquinon trong cơ chế ức chế enzyme. Trình tự hiệu quả ức chế theo giá trị IC_{50} được sắp xếp như sau: PLB > $Hg(PLB)_2$ > acarbose >> $Cr(PLB)_3$. Trong đó, $Hg(PLB)_2$ được xem là hệ có hoạt tính mạnh, kết hợp ưu điểm của PLB với sự điều biến hoạt tính nhờ phối trí ion Hg(II).

Kết quả này cho phép hướng đến nghiên cứu ứng dụng của $Hg(PLB)_2$ như một chất ức chế α-glucosidase có hiệu quả, cần được tiếp tục nghiên cứu về cơ chế tác động và độc tính trong các mô hình in vivo nhằm phát triển thành tác nhân điều trị tiểu đường type II có nguồn gốc bán tổng hợp từ tự nhiên.

❖ Khả năng ức chế nitric oxide (NO)



Hình 3.23 Khả năng ức chế NO (a) và độc tính tế bào (b) của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ so với dexamethasone trên dòng tế bào RAW 264.7.

Kết quả hoạt tính chống viêm thông qua ức chế tạo nitric oxide được thể hiện Hình 3.23 của các phức chất $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và thuốc đối chứng dexamethasone trên dòng tế bào RAW264.7 kích thích bằng LPS. Trong ba hợp

chất khảo sát, dexamethasone cho thấy hiệu quả ức chế cao nhất ở toàn bộ vùng nồng độ (10–50 µg/mL), phản ánh đúng vai trò thuốc chống viêm điển hình.

Đối với các phức chất nghiên cứu, $Cr(PLB)_3$ cho thấy mức độ ức chế NO vượt trội hơn $Hg(PLB)_2$ trong toàn bộ nồng độ khảo sát, với tỷ lệ ức chế đạt gần 40% ở 50 µg/mL, trong khi $Hg(PLB)_2$ chỉ đạt khoảng 15%. Kết quả này cho thấy mặc dù $Hg(PLB)_2$ có hiệu quả tốt trong ức chế tế bào ung thư, nhưng khả năng ức chế NO lại hạn chế. Ngược lại, $Cr(PLB)_3$ dù không cho thấy hiệu quả rõ rệt trong thử nghiệm ung thư nhưng lại có tiềm năng kháng viêm cao hơn.

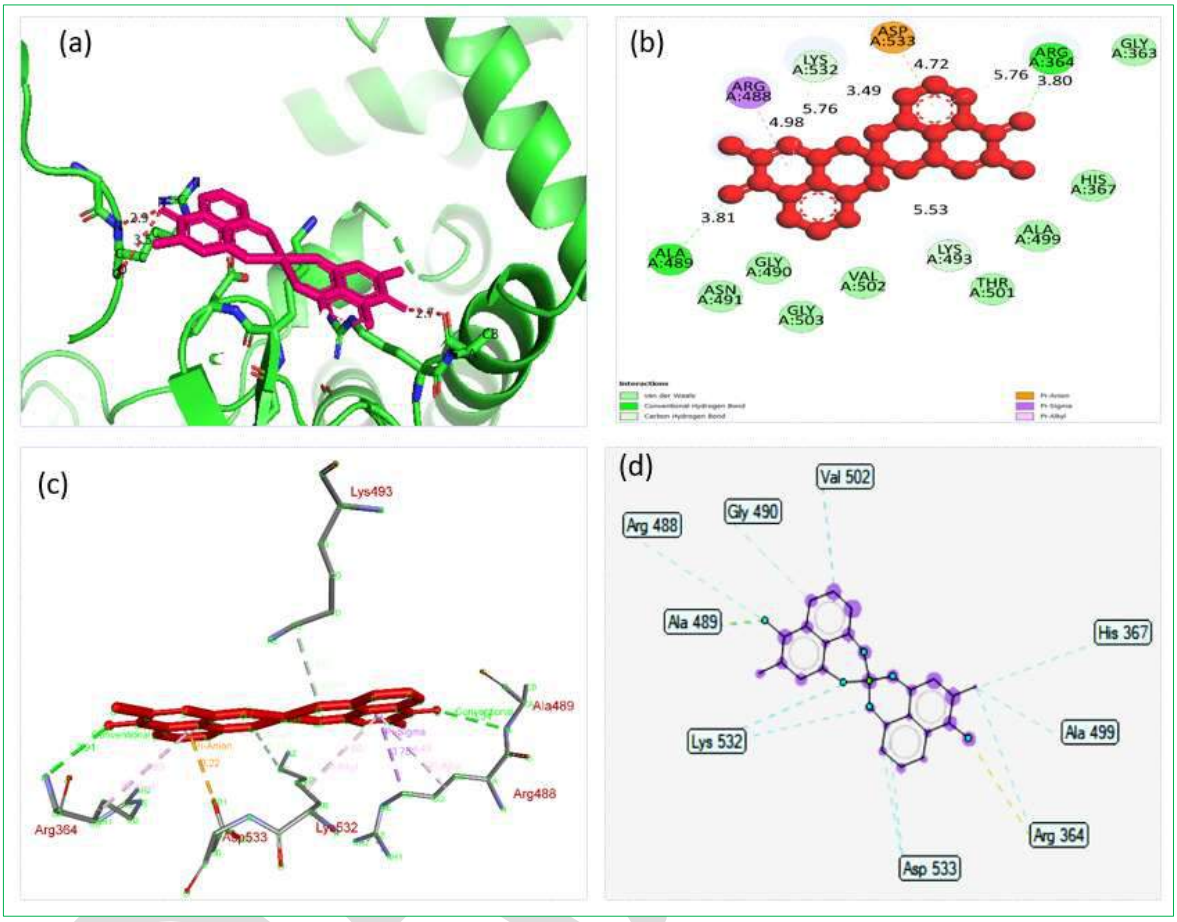
Hình 3.23b cũng cho thấy cả hai phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều không gây độc tế bào rõ rệt ở cả hai mức 10 và 50 µg/mL, với tỷ lệ sống trên 95%, khẳng định tính an toàn sinh học ban đầu trên mô hình tế bào miễn dịch. Điều này đặc biệt có ý nghĩa khi đánh giá tiềm năng ứng dụng của các phức chất làm tác nhân chống viêm mà không ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng sống của tế bào.

Mặc dù hiệu quả ức chế NO của cả hai phức chất còn ở mức khiêm tốn so với dexamethasone, kết quả ban đầu cho thấy $Cr(PLB)_3$ là ứng viên tiềm năng hơn trong hướng phát triển chất chống viêm mới từ nguồn bán tự nhiên. Trong khi đó, $Hg(PLB)_2$ dù hiệu quả kém hơn về mặt ức chế NO nhưng vẫn đáng chú ý nhờ độc tính thấp và hiệu lực trên một số dòng ung thư cụ thể, mở ra hướng khai thác phân lập hoạt tính chọn lọc hoặc kết hợp với các tác nhân hỗ trợ chống viêm.

DRAFT

3.4.1.2 Mô phỏng docking với enzyme đích: 1T8I, 3TOP, 4WCU

❖ *In silico* ức chế tế bào ung thư – *Docking* với *enzyme 1T8I*



Hình 3.24 Mô phỏng *docking* phức $Hg(PLB)_2$ với enzyme *1T8I*

Cấu dạng pose 223, một cấu dạng bền nhất giữa 1000 cấu dạng của phức $Hg(PLB)_2$ tương tác với xúc tác men 1T8I: PDB được sử dụng để giải thích tại sao phức hợp có khả năng ức chế tế bào ung thư mạnh trong *vitro*, sự gắn kết của phức này vào khoang hoại tính của xúc tác men có năng lượng Gibbs là –8,30 $kcal.mol^{-1}$, tương ứng với một hằng số ức chế Ki = 0,821 µM được trình bày trong bảng Bảng 3.8[174][175]. Giá trị năng lượng này khá âm cho thấy phản ứng gắn kết vào khoang của xúc tác men rất tốt, và cũng trong Bảng 3.8 cho thấy có 3 liên kết hydro hình thành Ala 489 → O (ketone) (2,7 Å), Arg364 →O (ketone) (3,5 Å), Arg364 →O (ketone) (2,9 Å) và cho thấy phức hợp này khá phân cực và liên kết Ala 489 → O (ketone) (2,7 Å) là bền nhất.

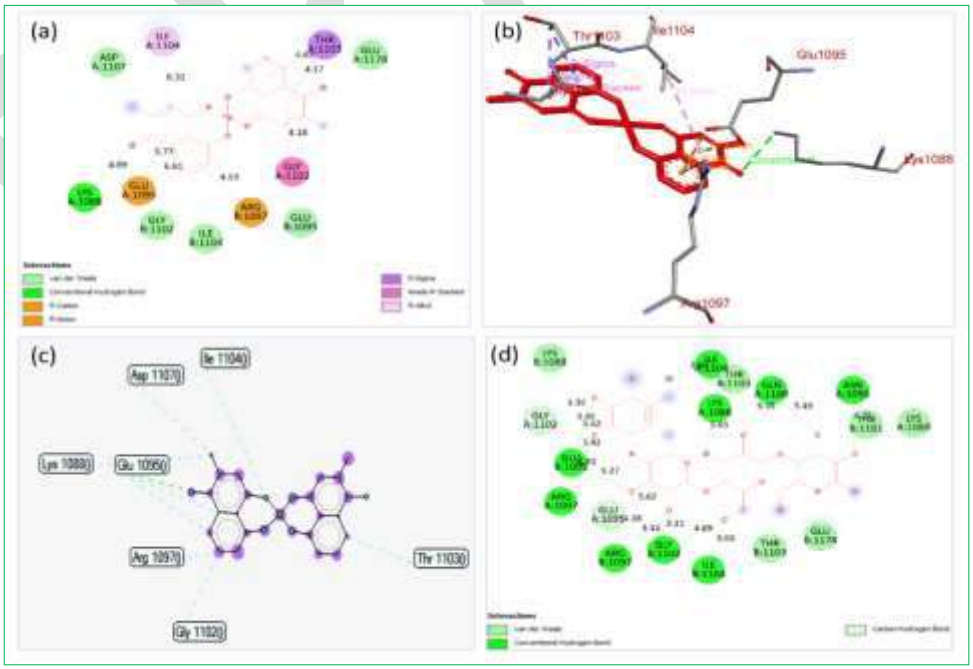
Bảng 3.8 Kết quả docking nổi bật của các tư thế tốt nhất giữa các phức với các enzyme đích: 1T8I (chống ung thư), 3TOP (ức chế α-glucosidase) và 4WCU (chống viêm)

Xúc tác men	**Hợp chất**	**Cấu dạng bền**	**Năng lượng Gibbs tự do (kcal/mol)**	**Ki (μM)**	**Số liên kết hydrogen**	**Đặc điểm và độ dài liên kết hydro**
1T8I	$Hg(PLB)_2$	223	-8,3	0,821	3	Ala489 → O(ketone) (2.7 Å); Arg364 →O (ketone) (3.5 Å); Arg364 →O (ketone) (2.9 Å)
1T8I	Camptothecin	10	-8,51	0,575	2	—
α-glucosidase: 3TOP	$Hg(PLB)_2$	494	-7,27	4,66	1	Lys1088:N → O (3.2 Å)
α-glucosidase: 3TOP	Acarbose	154	-8,96	0,296	0	Không có liên kết hydrogen
Chống viêm: *4WCU*	$Hg(PLB)_2$	465	-9,84	0,061	0	Không có liên kết hydrogen
4WCU	LEO 29102	96	-8,3	0,83	1	Pose 96:H → Tyr59:OH

DRAFT

Hình 3.24a cho thấy pose 223 tạo ba liên kết hydro: Ala489 – O (ketone) của phối tử 2,7 Å, Arg364 – O (ketone) 3,5 Å và N–H:O (ketone) 2,9 Å; Tương tác 2D (Hình 3.24b): Hydrogen bonding, pi-cation (Asp533), pi-alkyl (Arg364), pi-sigma (Arg488), pi-alkyl (Lys532). Tương tác 3D (Hình 3.24c): Bổ sung các tương tác steric từ Arg488, Gly490, Val502, His367, Ala499. Bản đồ phối tử (Hình 3.24d): Cho thấy tương tác mạnh tại vị trí nguyên tử Hg(II) và nhóm carbonyl. Tương tác giữa phức $Hg(PLB)_2$ (pose 223) với enzyme 1T8I không chỉ thể hiện qua ba liên kết hydrogen chính (Ala489 và Arg364) mà còn bao gồm nhiều tương tác không cộng hóa trị khác như tương tác kỵ nước (pi-alkyl, pi-anion, pi-sigma), liên kết Van der Waals và carbon–hydrogen bonds. Những tương tác này được phân bố đầy đủ trên 3 kiểu: capping group (CA), connecting unit (CU) và functional group (FG), thể hiện khả năng tương tác đầy đủ [175]. Đặc biệt, bản đồ phối tử (Hình 3.24d) giúp minh họa rõ các tương tác thứ cấp tại các vị trí then chốt như Ala489, Gly490, Val502, Arg488, Lys532 và Asp533. Sự tập trung tương tác mạnh quanh nguyên tử Hg(II) và nhóm carbonyl đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định tương tác với trung tâm hoạt động của enzyme. Những kết quả này hỗ trợ giải thích cho hoạt tính chống ung thư nổi bật của phức $Hg(PLB)_2$ trên dòng tế bào HepG2 được ghi nhận trong phần *in vitro*

b) *In silico* ức chế *α-glucosidase – Docking* với enzyme 3TOP

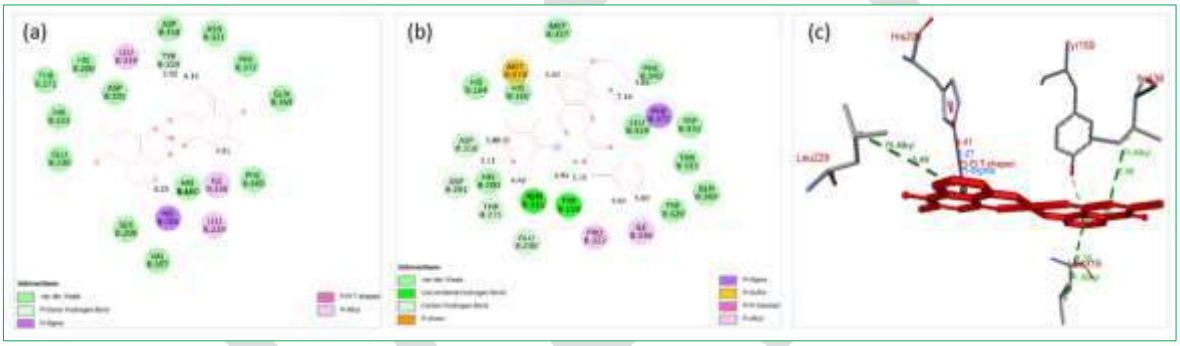


Hình 3.25 Tương tác giữa $Hg(PLB)_2$ (pose 494) và 3TOP gồm sơ đồ 2D, mô hình 3D, bản đồ tương tác thứ cấp và so sánh với acarbose.

Phức $Hg(PLB)_2$ (pose 494) gắn vào enzyme *3TOP* với ΔG = –7.27 kcal/mol và K_i = 4.66 µM (Bảng 3.8). Tạo liên kết hydro *Lys1088*:N – O (phối tử) 3.2 Å.

Tương tác 2D (Hình 3.25a): Liên kết hydrogen từ *Lys1088*; CA gồm pi-cation/anions từ *Glu1095*, *Arg1097*; CU: pi-sigma (*Thr1103*), amide-pi stacked (*Gly1102*). Tương tác 3D (Hình 3.25b) và bản đồ phối tử (Hình 3.25c): Tương tác với *Gly1102*, *Ile1104*, *Arg1097*, *Glu1095*, *Lys1088*... Đối chứng – *Acarbose* (pose 154): ΔG = –8,96 kcal/mol, K_i = 0,296 µM; tương tác mạnh hơn, nhưng phức Hg vẫn có khả năng ức chế (Hình 3.25d).

c) *In silico* ức chế viêm – *Docking* với *enzyme 4WCU*



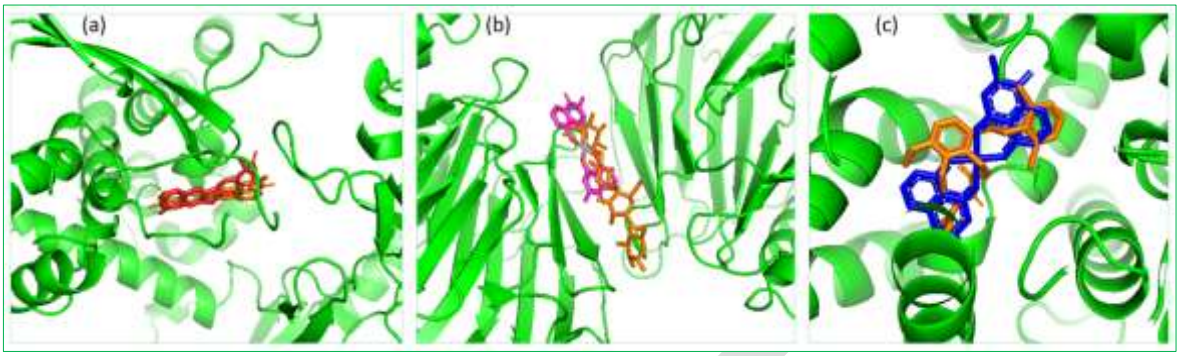
Hình 3.26 Tương tác giữa phức $Hg(PLB)_2$ (pose 465) và enzyme 4WCU

Hình 3.26a sơ đồ 2D minh họa các tương tác chính giữa phối tử và vùng hoạt động enzyme: bao gồm tương tác pi-alkyl với *Leu229, Tyr159, Ile336 và Leu319*; pi–pi T-shaped với *His204*. Không hình thành liên kết hydro, cho thấy cơ chế chủ yếu là tương tác kỵ nước. Hình 3.26b Tương tác của phối tử đối chứng với các gốc amino acid như *Tyr59, Asn321, Met273*. Hình 3.27c Mô hình 3D tương tác giữa $Hg(PLB)_2$ và enzyme *4WCU* – chủ yếu là tương tác kỵ nước.

Phức $Hg(PLB)_2$ (pose 465) có ΔG = –9,84 kcal/mol, Ki = 0,061 µM, nhưng không tạo liên kết hydro với *enzyme 4WCU*. Tương tác chính Pi-alkyl (*Leu229, Tyr159, Ile336, Leu319*), pi-pi T shaped (*His204*). Các tương tác chủ yếu là tương tác kỵ nước.

DRAFT

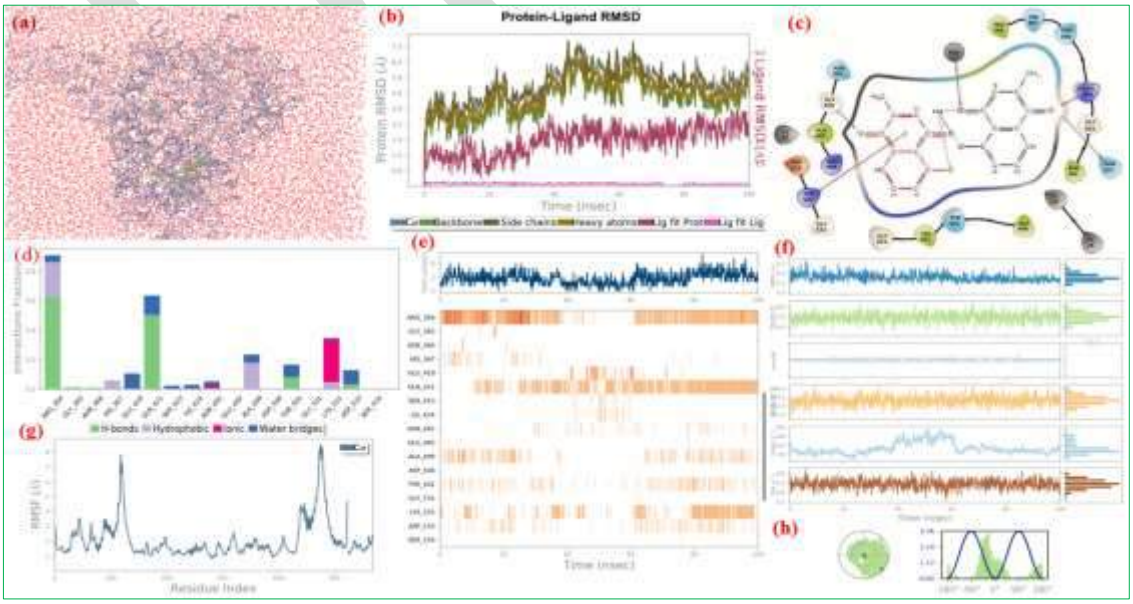
d) Giá trị mô hình gắn kết



Hình 3.27 Chồng khớp các pose của $Hg(PLB)_2$ với phối tử chuẩn sau redocking trên *1T8I, 3TOP và 4WCU*

Đối với quá trình gắn kết của pose 223, phức hợp $Hg(PLB)_2$ vào khoang gắn kết của xúc tác men 1T8I: PDB được trình bày trong Hình 3.27b cho thấy sự thay đổi cấu dạng của pose 223 gắn vào 1T8I ít thay đổi cấu dạng và sự thay đổi này biến thiên trong phạm vi từ 0,8 đến 2,4 Å và phức hợp này bền trong khoảng 60 ns và không bền từ trên 60 ns đến 100 ns. Sự mô phỏng động này cho phép đánh giá giá trị của mô hình docking rất tốt và hiệu quả so với các tính toán RMSD giữa cấu dạng quan tâm và cấu dạng redocking. Các giá trị RMSD của các cặp phối tử/pose (tham chiếu) nhỏ hơn 2 Å chứng tỏ mô hình gắn kết giữa pose 223 và 1T8I là đúng về thông số gắn kết, khoan gắn kết và giá trị gắn kết [176][177].

3.4.1.3 Mô phỏng động lực học phân tử (MD) – phức $Hg(PLB)_2$–1T8I



Hình 3.28 Mô phỏng MD 100 ns của phức $Hg(PLB)_2$ (pose 223) với enzyme 1T8I

Mô phỏng động lực học phân tử trong môi trường nước của phức $Hg(PLB)_2$ với enzyme 1T8I (pose 223) được thực hiện trong 100 ns bằng phần mềm Desmond (Schrödinger) trên hệ điều hành Ubuntu/Linux, nhằm đánh giá sự ổn định của phức chất trong điều kiện sinh lý. Mô hình mô phỏng toàn hệ thống được trình bày ở Hình 3.28a, trong đó phối tử và enzyme (màu xám) được bao quanh bởi 27,349 phân tử nước (màu đỏ) ở nhiệt độ 300 K. Hệ thống chứa tổng cộng 91,728 nguyên tử với điện tích tổng bằng 0 và được thiết lập theo điều kiện NPT. Protein 1T8I gồm một chuỗi (A) với 568 gốc amino acid, trong đó thành phần cấu trúc bậc hai chiếm 38,48% α-helix và 9,49% β-strand.

Biểu đồ RMSD của protein và phối tử (Hình 3.28b) cho thấy độ lệch chuẩn cấu trúc (Cα, backbone, side chain, heavy atoms) của enzyme dao động trong khoảng 0,8–3,0 Å, duy trì ổn định từ 40 đến 100 ns, khẳng định hệ thống đạt trạng thái cân bằng sau khoảng 40 ns. Đường cong RMSD của phối tử so với chính nó duy trì ổn định quanh giá trị 0,2 Å trong suốt quá trình mô phỏng, cho thấy phối tử gần như không có sự biến đổi về cấu dạng.

Hình 3.28c trình bày mô hình tương tác 2D giữa phối tử và các gốc amino acid của 1T8I, cho thấy sự hiện diện của các vùng tích điện dương (xanh đậm), phân cực nhẹ (xanh nhạt), kỵ nước (xanh lục nhạt) và vùng chưa xác định (đen). Các gốc amino acid có vai trò tương tác đáng chú ý gồm Arg364, Gln421, Lys532 và Gly490.

Hình 3.28d biểu diễn biểu đồ cột tần suất tương tác giữa phối tử và các gốc amino acid trong toàn bộ chuỗi mô phỏng. Trong đó, Arg364 có tần suất tương tác gần 90% thời gian mô phỏng với các kiểu liên kết hydrogen, tương tác kỵ nước và cầu nước. Gln421 tương tác ổn định thông qua liên kết hydro và cầu nước từ khoảng 60 ns, trong khi Lys532 duy trì tương tác ion và cầu nước ở khoảng 30 ns. Một số gốc khác như Glu418, Ala499, Thr501, Asp533 có tần suất tương tác thấp hơn hoặc ngắn hơn.

DRAFT

Hình 3.28e cung cấp bản đồ tương tác theo thời gian giữa các gốc amino acid và phối tử trong từng khung mô phỏng. Trong đó, Arg364 tương tác rõ rệt từ 0–40 ns và 60–100 ns; Gln421 từ 25–100 ns; Ala499 từ 0–30 ns và 60–100 ns; Lys532 từ 60–100 ns.

Các đặc trưng hình học của phối tử được trình bày ở Hình 3.29f gồm: RMSD (0,1–0,2 Å), bán kính quán tính (2,55–2,60 Å), diện tích bề mặt phân tử (MolSA, chưa ghi rõ), diện tích tiếp xúc dung môi SASA (60–240 $Å^2$) và diện tích bề mặt phân cực PSA (120–126 $Å^2$). Các thông số này cho thấy phối tử giữ được hình thái ổn định trong suốt mô phỏng.

Biểu đồ RMSF (Hình 3.28g) mô tả dao động của từng gốc amino acid theo thời gian, cho thấy dao động mạnh tập trung tại vùng không có cấu trúc thứ cấp rõ ràng và hai đầu N- và C-terminal. Trong khi đó, các vùng α-helix và β-strand ổn định hơn, phản ánh sự bền vững nội tại của cấu trúc enzyme.

Cuối cùng, Hình 3.28h thể hiện sự biến thiên năng lượng xoắn (torsion) của các liên kết trong phân tử phối tử. Trong số các liên kết, nhóm carbonyl (C=O) tại vị trí C-1 có năng lượng xoắn cao nhất (3,36 kcal/mol), với hai góc xoắn ưu tiên khoảng ±90°, là vị trí có khả năng xoay mạnh nhất trong hệ.

Như vậy, kết quả mô phỏng động lực học phân tử 100 ns đã xác nhận độ ổn định cao của hệ phức $Hg(PLB)_2$–1T8I trong môi trường nước. Enzyme 1T8I duy trì trạng thái bền vững với RMSD dao động nhỏ và phối tử giữ cấu trúc gần như không biến đổi trong suốt quá trình mô phỏng. Các gốc amino acid chủ chốt như Arg364, Gln421 và Lys532 hình thành tương tác bền vững với phối tử thông qua liên kết hydro, tương tác ion và cầu nước. Ngoài ra, các thông số hình học ổn định và phân tích RMSF cho thấy cấu trúc enzyme không bị biến động lớn trong vùng lõi. Những kết quả này cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ có tiềm năng tương tác mạnh và ổn định với enzyme đích, củng cố khả năng ứng dụng sinh học, đặc biệt trong vai trò chất ức chế enzyme hoặc tác nhân điều hòa phân tử.

DRAFT

3.4.1.4 Mối liên hệ cấu trúc với hoạt tính sinh học của các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Các dữ liệu *in vitro, in silico* và tính toán DFT cho thấy mối liên hệ giữa đặc điểm cấu trúc điện tử của hai phức chất và hoạt tính sinh học, tuy nhiên vẫn chưa đủ cơ sở để rút ra quy luật tổng quát. Việc tạo phức với ion kim loại đã làm biến đổi đáng kể tính chất sinh học của phối tử PLB, thông qua ba cơ chế chính: điều chỉnh hình học phân tử, tái phân bố mật độ điện tích, và tái thiết lập các mức năng lượng điện tử.

Xét về mối liên hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học, sự khác biệt về dạng hình học phối trí và đặc điểm điện tử của hai phức chất đóng vai trò then chốt trong khả năng tương tác với enzym đích. Cụ thể, phức $Cr(PLB)_3$ có cấu trúc bát diện biến dạng, với ion Cr(III) mang điện tích dương cao (theo phân tích Mulliken), tạo nên mạng phối trí ổn định và bền vững. Tính ổn định này phù hợp với cơ chế tương tác tĩnh với enzym như iNOS[178]; tuy nhiên, sự thiếu linh hoạt hình học có thể hạn chế khả năng thích nghi không gian với vùng hoạt động của enzyme, dẫn đến hoạt tính sinh học tương đối yếu. Ngược lại, $Hg(PLB)_2$ sở hữu hình học tứ diện biến dạng và linh động hơn, phù hợp với đặc điểm mềm. Đồng thời, hiệu ứng nguyên tử nặng không chỉ giúp thúc đẩy tương tác π với vùng giàu electron mà còn tăng xác suất tương tác với enzyme ung thư có chứa vùng liên kết thiol (như topoisomerase I). Sự linh hoạt cấu trúc và khả năng phân bố điện tử bất đối xứng giúp phức $Hg(PLB)_2$ xâm nhập và gắn hiệu quả hơn vào túi hoạt động của enzyme, lý giải cho hoạt tính sinh học vượt trội so với $Cr(PLB)_3$.

Các đặc tính điện tử và hình học của phức chất có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tương tác với enzyme mục tiêu. Phức $Cr(PLB)_3$ thể hiện điện tích Mulliken dương cao (+1,41), phản ánh tính phân cực mạnh, thuận lợi cho các tương tác tĩnh với vùng hoạt động chứa các acid amin phân cực hoặc tích điện âm. Ngược lại, $Hg(PLB)_2$ có điện tích lan tỏa và khả năng cảm ứng phân cực cao, tạo điều kiện thuận lợi cho các tương tác yếu như liên kết hydro, tương tác π–π với DNA hoặc các enzym liên quan đến ung thư như topoisomerase. Phân bố điện tử không đối xứng của $Hg(PLB)_2$ cũng góp phần nâng cao khả năng xâm nhập và gắn kết linh hoạt trong môi trường sinh học.

DRAFT

Về mối liên hệ giữa đặc tính điện tử và hiệu quả cảm ứng sinh học, cả hai phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều gây hiện tượng dập tắt huỳnh quang của PLB tại bước sóng 436 nm. Điều này phản ánh quá trình truyền năng lượng không bức xạ (non-radiative decay), cho thấy sự tương tác điện tử mạnh giữa phối tử và ion kim loại trung tâm. Đây là yếu tố có vai trò quan trọng trong hoạt tính sinh học cho thấy khả năng tương tác nội phân tử hiệu quả. Bên cạnh đó, giá trị ΔE_{gap} được tính toán bằng phương pháp DFT cho hai phức trong khoảng 3,10–3,43 eV, tương đối thấp so với nhiều hệ hấp thu UV thông thường. Khoảng năng lượng này tạo điều kiện thuận lợi cho sự chuyển electron và cảm ứng điện tử trong quá trình tương tác với enzym đích. Như vậy, các đặc tính điện tử được xác định từ mô phỏng lý thuyết không chỉ góp phần lý giải cơ chế dập tắt huỳnh quang, mà còn hỗ trợ việc hình thành các tương tác sinh học hiệu quả, thông qua cơ chế truyền tín hiệu ở mức phân tử.

Về phương diện xác thực chức năng thông qua dữ liệu thực nghiệm và mô phỏng, sự khác biệt về hoạt tính sinh học giữa hai phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ hoàn toàn phù hợp với các đặc trưng điện tử và hình học đã phân tích trước đó. Cụ thể, $Cr(PLB)_3$ thể hiện hiệu quả ức chế NO đáng kể với giá trị IC_{50} khoảng 18 μM, đồng thời cho thấy khả năng gắn kết bền vững với enzym iNOS theo kết quả *docking* phân tử. Ngược lại, $Hg(PLB)_2$ thể hiện hoạt tính chống ung thư nổi bật, đặc biệt trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và dòng ung thư gan HepG2, đồng thời ít gây độc với tế bào lành HEK-293A, cho thấy tiềm năng ứng dụng dược lý và khả năng chọn lọc cao, tương ứng với ái lực liên kết cao với enzym topoisomerase I (1T8I), và duy trì ổn định trong môi trường mô phỏng sinh học theo mô phỏng động lực học phân tử (MD) kéo dài 100 ns. Những kết quả này củng cố mối liên hệ giữa cấu trúc và đặc tính điện tử với tác dụng sinh học quan sát được, đồng thời hỗ trợ định hướng phát triển các phức chất theo mục tiêu điều trị cụ thể.

Từ các phân tích đã trình bày, có thể khẳng định rằng sự khác biệt về hoạt tính sinh học giữa hai phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ không mang tính ngẫu nhiên, mà phản ánh trực tiếp các yếu tố nền tảng về hình học phối trí, phân bố điện tích và đặc tính năng lượng điện tử đặc trưng của từng phức. Quá trình phối trí với ion kim loại đã tái lập

sâu sắc đặc tính sinh học nội tại của phối tử PLB, từ đó định hướng hoạt tính theo mục tiêu cụ thể, đây cũng là nguyên lý cốt lõi trong thiết kế dược chất dựa trên phức kim loại hiện đại.

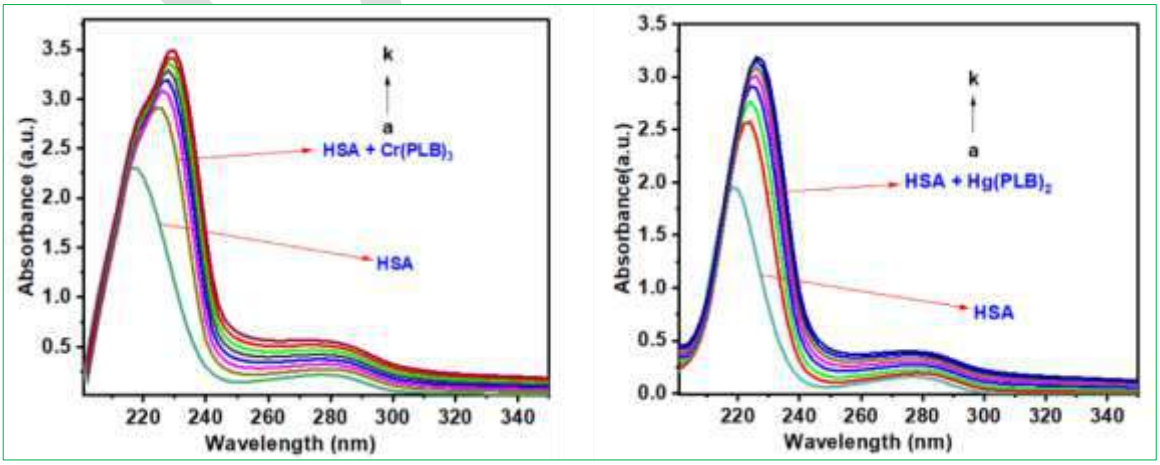
Tổng hợp các dữ liệu từ thực nghiệm (*in vitro*) và mô phỏng (*in silico*) đã củng cố nguyên lý "cấu trúc quyết định chức năng", cho thấy lựa chọn ion trung tâm không chỉ điều chỉnh đặc tính hóa học của phức chất, mà còn định hình lại toàn bộ đặc tính sinh học của phức. Những kết quả này là cơ sở quan trọng cho định hướng phát triển các tác nhân đa mục tiêu trên nền tảng phức kim loại.

3.4.2 Tương tác với HSA, docking enzyme của phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$

Human Serum Albumin (HSA) là protein chiếm tỷ lệ cao nhất trong huyết tương người, đóng vai trò quan trọng trong vận chuyển các chất nội sinh (hormone, acid béo) và ngoại sinh (thuốc, kim loại, chất độc…)[179]. Do đó, nghiên cứu sự tương tác giữa các phức với HSA là một hướng đi cần thiết để đánh giá khả năng vận chuyển, phân phối sinh học, độc tính và tính bền trong môi trường sinh lý.

Trong nghiên cứu này, các phức $Cr(PLB)_2$ và $Hg(PLB)_2$ được khảo sát khả năng tương tác với HSA thông qua phổ huỳnh quang và mô phỏng *docking*, nhằm đánh giá cơ chế tắt huỳnh quang, vị trí gắn kết, loại tương tác, từ đó rút ra định hướng ứng dụng trong sinh học và y dược.

3.4.2.1 Phân tích phổ UV–Vis, FT-IR, ^{1}H-NMR và huỳnh quang



Hình 3.29 Phổ UV–Vis của HSA có và không có $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$

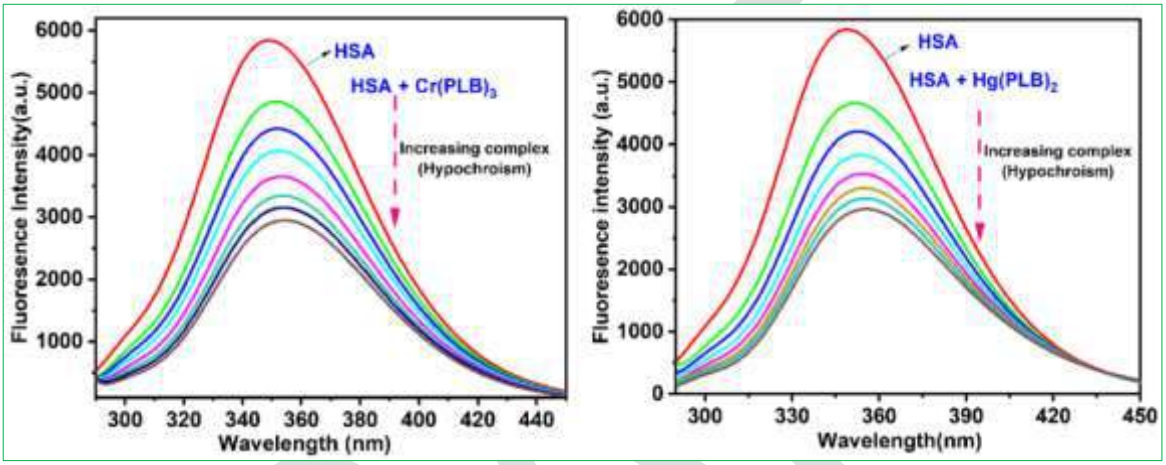
Phổ hấp thụ UV–Vis được sử dụng để theo dõi sự thay đổi cấu trúc bậc hai của protein HSA [180] khi tương tác với các phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$. Kết quả thể hiện trong Hình 3.29 cho thấy, HSA tự do thể hiện hai đỉnh hấp thụ đặc trưng tại 218 nm và 278 nm. Trong đó, đỉnh tại 218 nm tương ứng với chuyển dời điện tử $n \rightarrow \pi^*$ của khung peptid, trong khi vùng quanh 278 nm phản ánh các chuyển dời $\pi \rightarrow \pi^*$ của các acid amin thơm (tryptophan, tyrosine, phenylalanine)[181].

Sau khi thêm $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, đỉnh hấp thụ tại 218 nm của HSA có xu hướng dịch đỏ, lần lượt đến khoảng 230 nm đối với $Cr(PLB)_3$ và 234 nm đối với $Hg(PLB)_2$. Sự dịch chuyển này chứng tỏ có sự thay đổi nhất định trong cấu trúc cục bộ của HSA, do liên quan đến sự hình thành phức giữa protein với các phức. Những thay đổi về phổ hấp thụ này là bằng chứng ban đầu cho thấy HSA đã tương tác trực tiếp với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, từ đó dẫn đến các biến đổi cấu trúc ở cấp độ phân tử.

Kết quả phổ FT-IR thể hiện trong Phụ lục 46, vùng amide I của HSA tự do xuất hiện tại 1634 cm^{-1}. Sau khi tạo phức, vùng này dịch đỏ lần lượt đến 1640 cm^{-1} với $Cr(PLB)_3$ và 1637 cm^{-1} với $Hg(PLB)_2$, tương ứng với độ dịch chuyển là 6 cm^{-1} và 3 cm^{-1}. Sự dịch chuyển này phản ánh sự hình thành tương tác giữa các phức chất và các nhóm amino acid trong cấu trúc protein, đặc biệt là những thay đổi liên quan đến mạng lưới liên kết hydro và khả năng ảnh hưởng đến vùng cấu trúc *α-helix*.

Phổ ^{1}H-NMR được sử dụng để đánh giá những thay đổi hóa học trong môi trường proton của các acid amin trong HSA khi tương tác với các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$. Phổ ^{1}H-NMR của HSA tự do, HSA–PLB, HSA-$Cr(PLB)_3$ và HSA-$Hg(PLB)_2$ được thể hiện trong Phụ lục 47. Trong phổ HSA tự do, vùng δ = 6,3–7,5 ppm thể hiện các tín hiệu đặc trưng của proton thơm từ các acid amin như phenylalanine (δ = 7,0–7,5 ppm), tyrosine và tryptophan (δ = 6,8–7,2 ppm). Các tín hiệu này có thể bị ảnh hưởng mạnh khi xảy ra sự thay đổi trong môi trường liên kết hydrogen hoặc khi có sự tương tác với các tác nhân ngoại sinh. So sánh phổ của các hệ HSA–PLB, HSA–$Cr(PLB)_3$ và HSA–$Hg(PLB)_2$ với phổ HSA trong vùng δ = 6–8 ppm cho thấy có sự dịch chuyển rõ rệt của các tín hiệu proton thơm. Sự thay đổi này

là do có những biến đổi trong môi trường xung quanh các dư lượng phenylalanine, tyrosine và tryptophan do tương tác với các phức chất. Ngoài ra, các tín hiệu trong vùng δ = 0–2 ppm, vốn đại diện cho proton của các nhóm methyl (–CH_3) và methylene (–CH_2–) trong các acid amin mạch thẳng, cũng có sự dịch chuyển đáng kể. Điều này cho thấy sự thay đổi trong vi môi trường aliphatic của protein, phản ánh các biến đổi cấu trúc bậc ba hoặc tiếp xúc trực tiếp giữa các phần kỵ nước của HSA với các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$.



Hình 3.30 Phổ huỳnh quang của HSA trước và sau khi thêm $Cr(PLB)_3$ (trái) và $Hg(PLB)_2$ (phải) ở các nồng độ tăng dần (λ_{ex} = 280 nm, T = 298 K, pH 7,4).

Phổ huỳnh quang được sử dụng để đánh giá sự tương tác giữa các phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và HSA thông qua hiện tượng dập tắt huỳnh quang và sự dịch chuyển bước sóng phát xạ. Các phổ được ghi nhận tại 298 K trong đệm Tris-HCl (pH 7,4), với bước sóng kích thích cố định λ_{ex} = 280 nm.

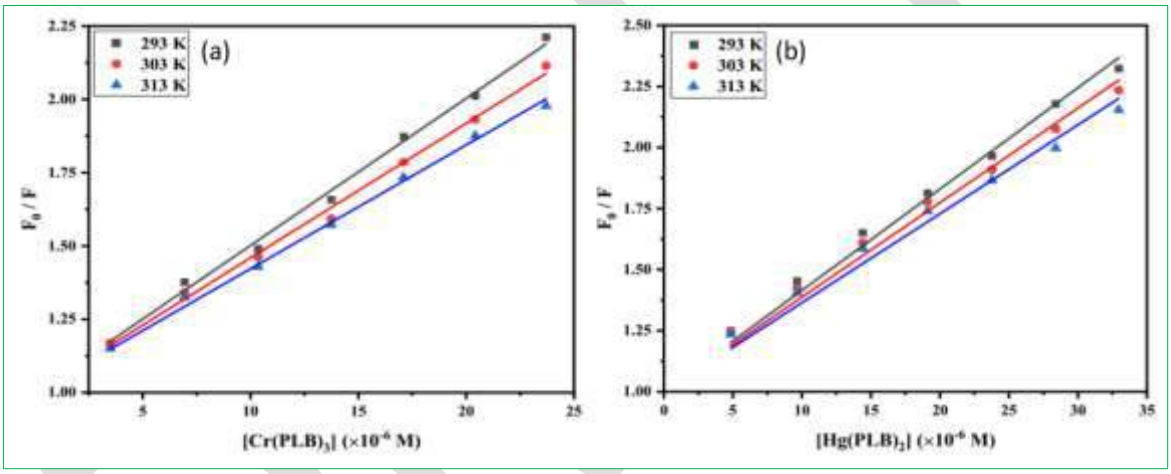
Như thể hiện trong Hình 3.30, HSA tự do có phổ huỳnh quang phát xạ mạnh với cực đại tại λ_{em} = 348 nm. Khi thêm $Cr(PLB)_3$ vào hệ, phổ huỳnh quang của HSA suy giảm dần theo nồng độ phức chất tăng và đỉnh phát xạ dịch đỏ từ 348 nm đến 353,5 nm ($\Delta\lambda$ = +5,5 nm). Tương tự, với hệ HSA–$Hg(PLB)_2$, bước sóng phát xạ dịch đến 356 nm ($\Delta\lambda$ = +8,0 nm) cùng với sự giảm đáng kể cường độ huỳnh quang. Các kết quả này cho thấy đã có sự thay đổi trong vi môi trường xung quanh các nhóm amino acid thơm, đặc biệt là tryptophan, do tương tác giữa phức chất và protein. Sự dịch đỏ của đỉnh phát xạ và giảm cường độ huỳnh quang được giải thích là do tăng độ phân cực

tại vùng lân cận của các dư lượng tryptophan, gợi ý rằng phức chất đã tương tác tại hoặc gần các vị trí phát huỳnh quang của HSA. Dạng dập tắt này có thể do hai cơ chế dập tắt tĩnh hoặc dập tắt động.

Để xác định cơ chế chính xác (tĩnh hay động), các thông số Stern–Volmer và hằng số liên kết sẽ được phân tích ở các phần tiếp theo cùng với dữ liệu nhiệt động học. Tuy nhiên, sự dập tắt huỳnh quang kèm dịch đỏ ở cả hai hệ HSA-$Cr(PLB)_3$ và HSA-$Hg(PLB)_2$ là bằng chứng rõ ràng cho thấy đã hình thành tương tác đặc hiệu giữa protein và các phức chất.

3.4.2.2 Phân tích nhiệt động học và bản chất tương tác

a) Phương trình Stern–Volmer tuyến tính



Hình 3.31 Đồ thị Stern–Volmer ở ba nhiệt độ của: (a) $Cr(PLB)_3$-HSA; (b) $Hg(PLB)_2$ -HSA.

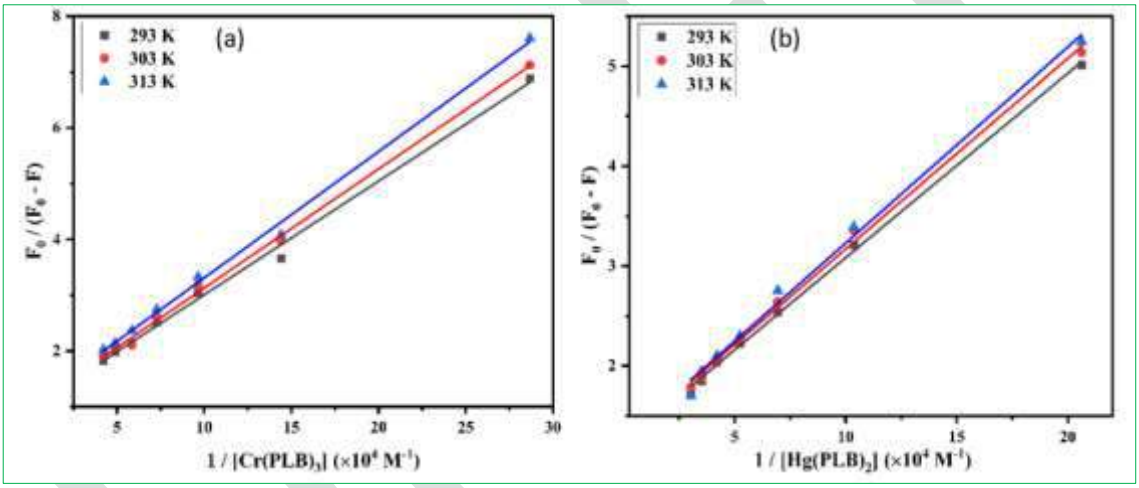
Kết quả được thể hiện trong Hình 3.31, và các giá trị hằng số Stern–Volmer (K_{SV}) được trình bày trong Phụ lục 56. Ở cả hai hệ $Cr(PLB)_3$–HSA và $Hg(PLB)_2$–HSA, giá trị K_{SV} giảm dần khi nhiệt độ tăng. Xu hướng này cho thấy quá trình dập tắt huỳnh quang diễn ra theo cơ chế tĩnh.

So với PLB tự do, các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ có giá trị K_{SV} thấp hơn, cho thấy ái lực liên kết với HSA yếu hơn so với phối tử đơn lẻ. Điều này là hợp lý vì cấu trúc cồng kềnh của phức chất có thể hạn chế tiếp cận các vị trí gắn trên HSA.

Ngoài ra, hằng số tốc độ dập tắt huỳnh quang K_q cũng được tính toán và cho kết quả tương tự: giảm theo nhiệt độ, củng cố thêm cho cơ chế dập tắt tĩnh. Điều này chứng tỏ $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ tạo liên kết hóa học ổn định với HSA. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng, các liên kết này trở nên kém bền hơn, dẫn đến giảm hằng số liên kết, đồng nghĩa với việc thuốc có thể dễ dàng được giải phóng hơn trong điều kiện sinh lý

Các kết quả phân tích cho thấy cả hai phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ tương tác với HSA theo cơ chế dập tắt huỳnh quang tĩnh, hình thành phức ổn định ở trạng thái cơ bản. Tuy nhiên, độ bền liên kết có xu hướng giảm khi nhiệt độ tăng, điều này ảnh hưởng đến khả năng vận chuyển và lưu giữ thuốc trong huyết tương.

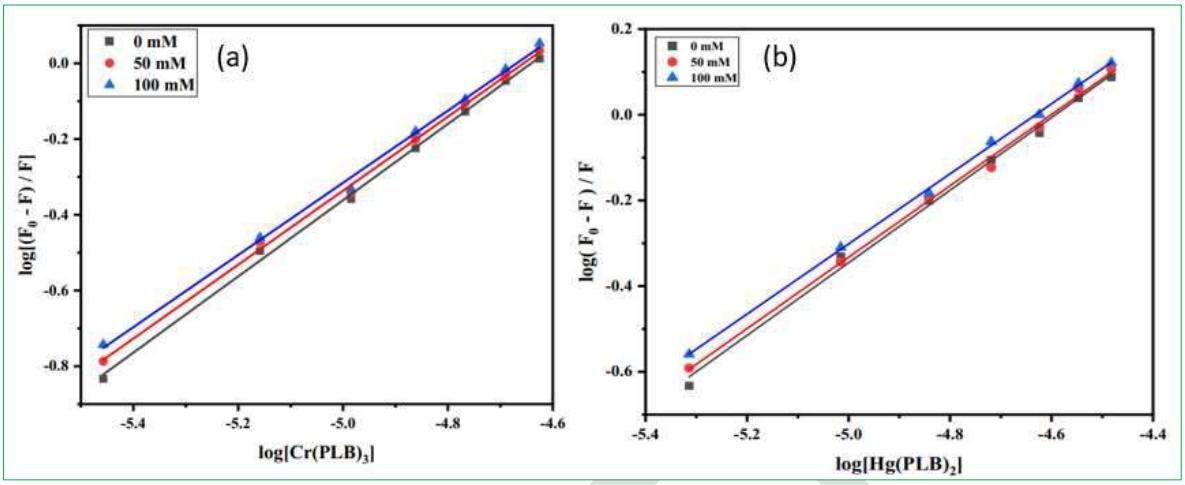
b) Phương trình Stern–Volmer hiệu chỉnh



Hình 3.32 Đồ thị Stern–Volmer hiệu chỉnh ở ba nhiệt độ:(a) HSA–$Cr(PLB)_3$; (b) HSA–$Hg(PLB)_2$.

Các giá trị K_a và f_a của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với HSA tại ba nhiệt độ khác nhau được thể hiện ở Hình 3.32 thống kê trong Phụ lục 57. Kết quả cho thấy K_a đều giảm nhẹ khi nhiệt độ tăng, điều này củng cố thêm cơ chế dập tắt huỳnh quang là tĩnh. Đồng thời, fa của $Cr(PLB)_3$ (~1,03–0,96) cao hơn $Hg(PLB)_2$ (~0,81–0,79), cho thấy $Cr(PLB)_3$ dễ tiếp cận các fluorophore hơn, dẫn đến khả năng dập tắt hiệu quả hơn. Điều này cũng hàm ý rằng $Cr(PLB)_3$ gây biến đổi cấu trúc HSA (mở xoắn) nhiều hơn so với $Hg(PLB)_2$, phù hợp với kết quả từ các phương pháp FT-IR và CD.

c) Hằng số liên kết và số vị trí gắn kết



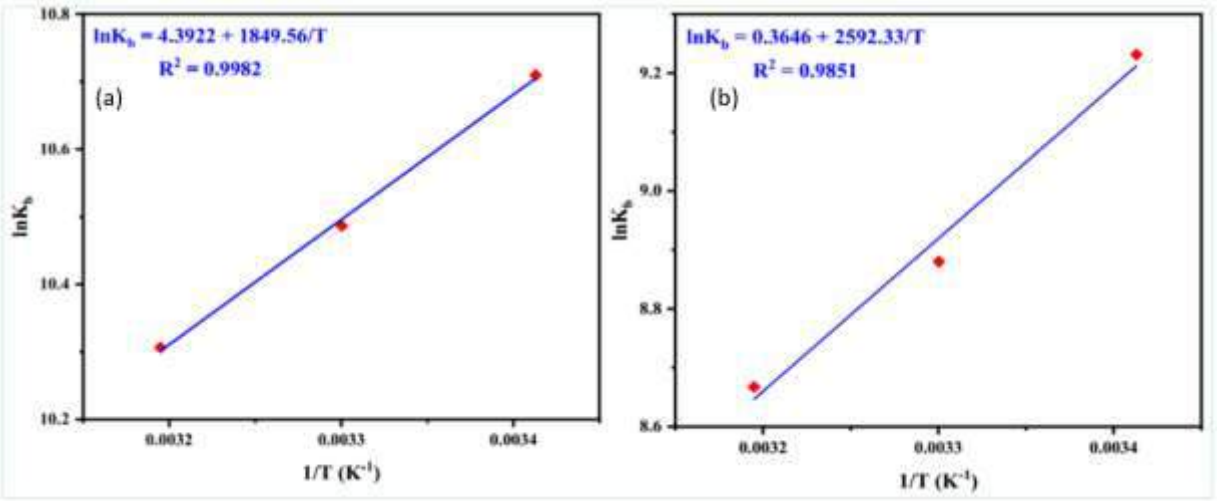
Hình 3.33 Đồ thị log kép tại ba nhiệt độ của: (a) $Cr(PLB)_3$-HAS; (b) $Hg(PLB)_2$ - HSA.

Hình 3.33 minh họa các đồ thị log–log, từ đó giá trị K_b và n được tính và trình bày trong Phụ lục 58. Ở cả hai hệ, K_b giảm theo nhiệt độ, xác nhận rằng tương tác phức–HSA là ổn định ở nhiệt độ thấp và giảm dần khi nhiệt độ tăng. Giá trị n ~1 cho thấy mỗi phân tử HSA chủ yếu gắn một phân tử $Cr(PLB)_3$ hoặc $Hg(PLB)_2$. So sánh cho thấy $Cr(PLB)_3$ có hằng số liên kết cao hơn $Hg(PLB)_2$ tại cùng điều kiện, phản ánh tương tác mạnh hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng, cả hai hệ đều kém ổn định, cho thấy tính chất liên kết không bền vững ở điều kiện nhiệt cao.

Các kết quả thu được từ phương trình Stern–Volmer hiệu chỉnh và phân tích log–log cho thấy cả $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều có khả năng gắn kết với HSA thông qua liên kết không cộng hóa trị (liên kết hydro, lực van der Waals, tương tác tĩnh điện). Tuy nhiên, $Cr(PLB)_3$ có mức độ ảnh hưởng lớn hơn đến cấu trúc protein và khả năng dập tắt huỳnh quang nội tại.

DRAFT

d) Thông số nhiệt động học và bản chất của lực tương tác



Hình 3.34 Đồ thị Van't Hoff của hệ: (a) $Cr(PLB)_3$–HAS; (b) $Hg(PLB)_2$–HSA.

Từ đồ thị Van't Hoff (Hình 3.34) và dữ liệu trong Bảng 3.12, các thông số ΔH°, ΔS°, ΔG° của các hệ HSA-$Cr(PLB)_3$, HSA-$Hg(PLB)_2$ và HSA-PLB được xác định.

So sánh hai phức chất cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ gây tắt huỳnh quang mạnh hơn so với $Cr(PLB)_2$. Điều này phản ánh ái lực lớn hơn của Hg(II) đối với các nhóm chức trong HSA, đặc biệt là các nhóm –SH, –COOH. Các số liệu được dẫn ra và tổng kết ở Bảng 3.9 Các giá trị ΔG âm cho thấy quá trình gắn kết giữa phức chất và HSA là tự phát. ΔS dương cho thấy tương tác chủ yếu là lực kỵ nước và Van der Waals. ΔH âm nhưng nhỏ, phản ánh sự hiện diện của liên kết hydro yếu hoặc phối trí nhẹ, thay vì liên kết ion mạnh[183][184].

Phức $Cr(PLB)_3$ có ái lực liên kết cao hơn rõ rệt so với $Hg(PLB)_2$, với hằng số liên kết K_a lớn hơn khoảng 4 lần. Khoảng cách truyền năng lượng (r) từ Trp214 trong HSA đến $Cr(PLB)_3$ nhỏ hơn, cho thấy vị trí gắn gần trung tâm huỳnh quang và nằm sâu trong túi liên kết đặc hiệu. Kết quả *docking* cho thấy $Cr(PLB)_3$ hình thành 3–4 liên kết hydro và tương tác π–π với các acid amin thơm (*Phe149, Tyr138*), trong khi $Hg(PLB)_2$ chỉ tạo 1–2 liên kết yếu hơn. Cả hai tương tác theo cơ chế dập huỳnh quang tĩnh, tức hình thành phức ngay ở trạng thái cơ bản, không phải do va chạm động học.

DRAFT

Bảng 3.9 Thông số nhiệt động học (ΔH°, ΔS°, ΔG°) của tương tác giữa $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$, PLB và HSA tại các nhiệt độ khác nhau.

Nhiệt độ (K)	**$Cr(PLB)_3$**				**$Hg(PLB)_2$**				**PLB**			
	$\Delta H^{[a]}$	$\Delta S^{[b]}$	$\Delta G^{[a]}$	R^2	$\Delta H^{[a]}$	ΔS	ΔG	R^2	$\Delta H^{[a]}$	$\Delta S^{[b]}$	$\Delta G^{[a]}$	R^2
293	-3,6750	0,0087	-6,2321	0,9982	-5,1509	0,00724	-5,3632	0,9851	-3,6700	0,0093	-6,4000	0,9876
303			-6,3194				-5,3704				-6,4900	
313			-6,4067				-5,3777				-6,5800	

[a]: $kCal.mol^{-1}$, [b]: $kcal.mol.K^{-1}$

DRAFT

Bảng 3.10 Bảng So sánh đặc điểm tương tác với HSA của 2 phức

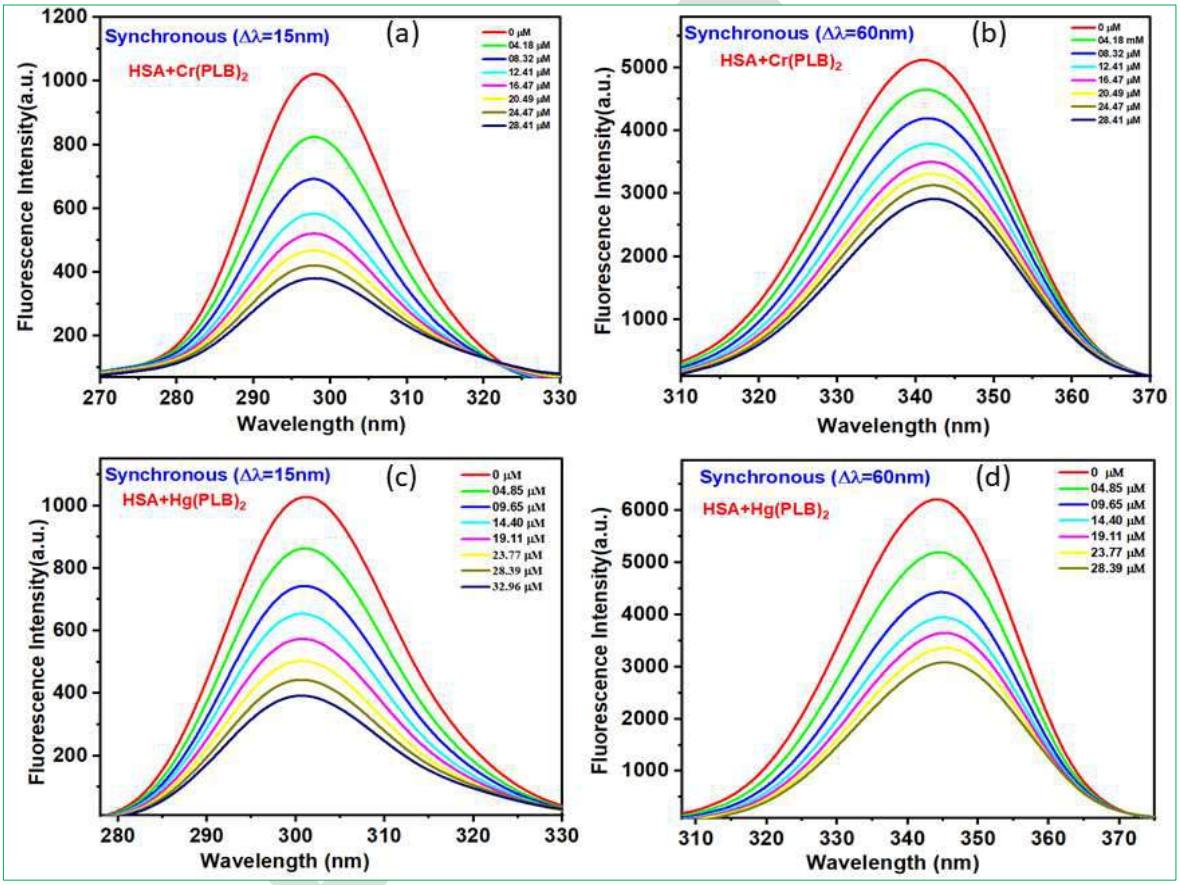
Thông số	**$Cr(PLB)_3$**	**$Hg(PLB)_2$**	**Ghi chú**
K_{sv}	$1,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	Hằng số Stern–Volmer
K_a	$9,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	Hằng số liên kết
n (số vị trí gắn)	0,98	1,01	Phương trình Benesi–Hildebrand
ΔG ($kJ \cdot mol^{-1}$)	–28,3	–30,8	Tính từ phương trình Gibbs
ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)	–4,1	–6,4	Tính từ Van't Hoff
ΔS ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)	81,2	81,7	Tính từ Van't Hoff
Khoảng cách FRET (nm)	2,95	3,06	Từ mô hình FRET
Vị trí gắn (site)	Site IIA	Site IIA	Cạnh tranh với Ketoprofen
Kiểu tương tác	Hydrogen bonding, π–π stacking	Hydrogen bonding, Van der Waals	Dựa trên kết quả docking

DRAFT

Phân tích định lượng bằng phương trình Stern–Volmer và các thông số nhiệt động học xác nhận rằng tương tác giữa $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và HSA là dạng dập tắt huỳnh quang tĩnh, xảy ra ở trạng thái cơ bản. Các hằng số liên kết (K_a), số vị trí liên kết (n) và thông số $\Delta G°$ âm chứng minh quá trình tạo phức xảy ra tự phát, với lực tương tác chủ yếu là liên kết hydro, lực van der Waals và tương tác kỵ nước.

3.4.2.3 Phân tích cơ chế kiểu gắn kết

a) Phổ huỳnh quang đồng bộ (Synchronous Fluorescence Spectroscopy)



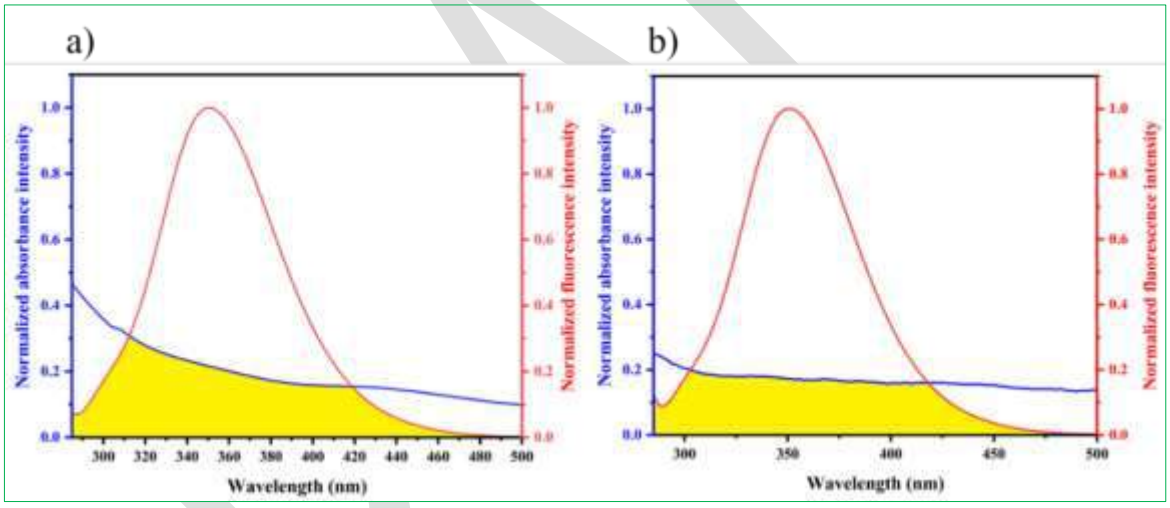
Hình 3.35 Phổ huỳnh quang đồng bộ (Δλ = 15 và 60 nm) của HSA khi tương tác với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$, Δλ = 15 nm; (b) HSA + $Cr(PLB)_3$, Δλ = 60 nm; (c) HSA + $Hg(PLB)_2$, Δλ = 15 nm; (d) HSA + $Hg(PLB)_2$, Δλ = 60 nm

Kết quả trên Hình 3.35 cho thấy sự thay đổi rõ rệt về vị trí và cường độ huỳnh quang của HSA khi tạo phức với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$. Tại Δλ = 15 nm, so với mẫu HSA–PLB, tín hiệu huỳnh quang dịch nhẹ 0,5 nm (tới 286,5 nm) khi thêm $Cr(PLB)_3$ và

dịch mạnh hơn 3 nm (xuống 286 nm) với $Hg(PLB)_2$. Ở $\Delta\lambda$ = 60 nm, bước sóng phát xạ dịch 2 nm (341,5 nm) với $Cr(PLB)_3$ và 0,5 nm (344,5 nm) với $Hg(PLB)_2$. Đồng thời, cường độ huỳnh quang cũng biến đổi đáng kể ở cả hai $\Delta\lambda$, phản ánh sự thay đổi trong hiệu suất lượng tử hoặc số lượng fluorophore có khả năng phát xạ.

Những thay đổi này cho thấy cả hai phức chất đã ảnh hưởng đến cấu trúc bậc hai hoặc vi môi trường quanh các acid amin thơm của HSA, trong đó $Cr(PLB)_3$ thể hiện mức độ tác động mạnh hơn $Hg(PLB)_2$. Ngoài ra, các kết quả từ phổ FRET, huỳnh quang 3D và phổ đồng bộ cũng xác nhận sự biến đổi môi trường vi mô quanh tryptophan và tyrosine, với khoảng cách HSA–phức nằm trong giới hạn FRET, cho thấy sự chuyển năng lượng hiệu quả và cơ chế dập tắt tĩnh. Điều này khẳng định sự tương tác không gian rõ rệt của phức chất với cấu trúc HSA.

b) Chuyển năng lượng từ HSA đến phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$



Hình 3.36 Chồng lấp phổ huỳnh quang HSA và phổ hấp thụ của các phức: (a) HAS và $Cr(PLB)_3$; (b) HSA và $Hg(PLB)_2$

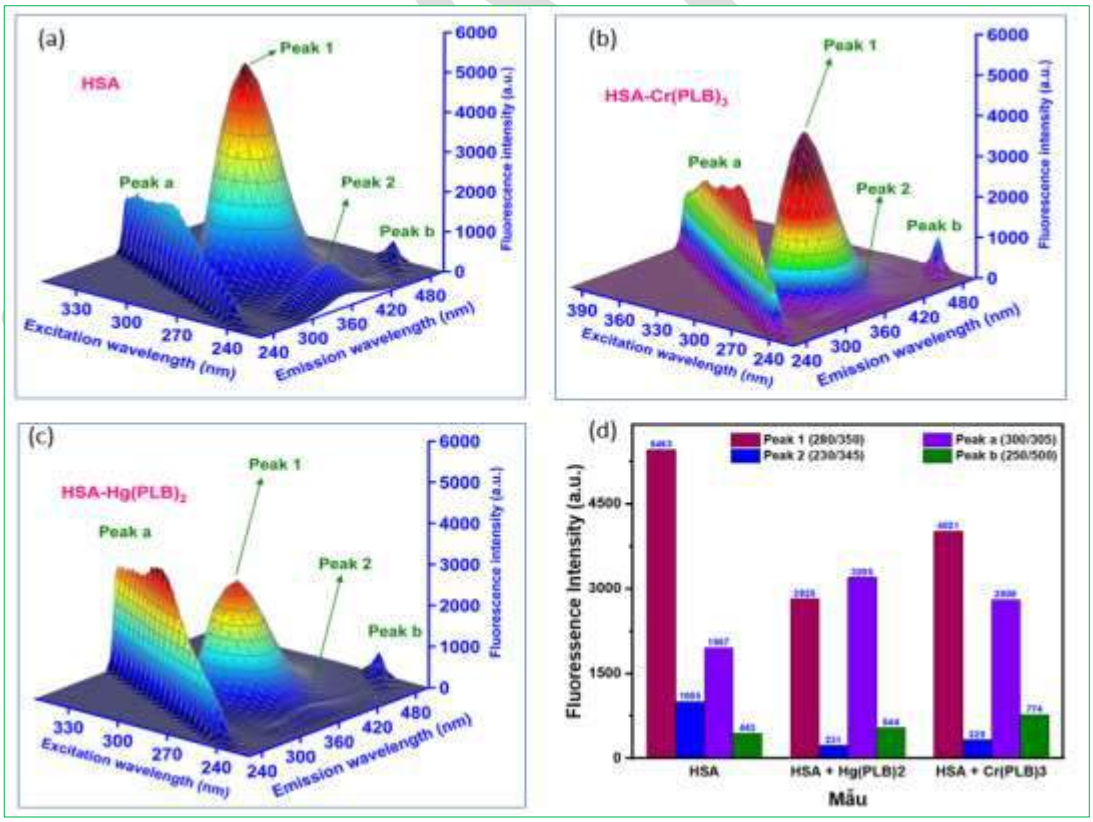
Phân tích phổ trong Hình 3.36 cho thấy tại tỷ lệ mol HSA : phức là 1:1, có sự chồng phổ tương đối rõ giữa phổ huỳnh quang của HSA và phổ hấp thụ của $Cr(PLB)_3$ hoặc $Hg(PLB)_2$. Điều này xác nhận khả năng xảy ra hiện tượng FRET. Từ phần mềm PhotochemCAD, giá trị tích phân chồng phổ J tính được là $3{,}424 \times 10^{-15}$ cm^3 L mol^{-1} cho hệ $Cr(PLB)_3$–HAS và $6{,}501 \times 10^{-15}$ cm^3 L mol^{-1} cho hệ $Hg(PLB)_2$–HSA[185].

Bảng 3.11 Khoảng cách cho nhận năng lượng giữa HSA và các phức $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ theo lý thuyết FRET

Hệ phức	E	R_0 (nm)	r (nm)
$Cr(PLB)_3$–HAS	0,117	2,11	2,954
$Hg(PLB)_2$–HAS	0,194	2,348	3,061

Các giá trị r thu được đều < 7 nm và nằm trong khoảng $0,5R_0 < r < 1,5R_0$, thỏa mãn điều kiện chuyển năng lượng theo cơ chế FRET [186]. Điều này chứng tỏ $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ nằm gần vùng chứa fluorophore Trp214 của HSA, xác nhận tương tác không gian gần trong phức. Ngoài ra, việc $r > R_0$ cũng củng cố giả thuyết cơ chế dập tắt huỳnh quang tĩnh, phù hợp với kết quả từ biểu đồ Stern–Volmer.

3.4.2.4 Phân tích huỳnh quang ba chiều (3D Fluorescence)



Hình 3.37 Phổ huỳnh quang 3D của HSA khi tương tác với các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$: (a) HSA tự do; (b) HSA + $Cr(PLB)_3$; (c) HSA + $Hg(PLB)_2$; (d) So sánh cường độ huỳnh quang tại các peak đặc trưng.

Phổ huỳnh quang ba chiều (3D) là công cụ hiệu quả để phân tích sự thay đổi cấu trúc bậc hai và bậc ba của protein khi tương tác với các phân tử nhỏ, điển hình là thuốc hoặc phối tử kim loại. Trong phổ 3D của HAS (Hình 3.37a), đỉnh 1 thường là do hiện tượng tán xạ Rayleigh, trong khi đỉnh 2 phản ánh tính chất của các amino acid thơm như tryptophan, tyrosine và phenylalanine[187][188]. Khi các phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ được thêm vào dung dịch HSA (Hình 3.37b, Hình 3.37c), cường độ huỳnh quang tại cả hai đỉnh chính đều giảm đáng kể, đồng thời xuất hiện sự dịch chuyển đỏ ở cả bước sóng kích thích và phát xạ. Điều này cho thấy đã xảy ra sự tương tác phối trí giữa HSA và các phức kim loại, gây thay đổi vi môi trường và cấu trúc không gian của chuỗi polypeptide trong protein.

Kết quả phổ 3D Hình 3.37d đỉnh 1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} \approx 280/350$ nm) liên quan đến huỳnh quang của tryptophan và tyrosine. Sau khi thêm $Cr(PLB)_3$, cường độ giảm từ 5.463 xuống 4.021; với $Hg(PLB)_2$, giảm xuống còn 2.825. Đồng thời xuất hiện dịch chuyển đỏ 5 nm cho thấy sự tăng tính phân cực của môi trường quanh fluorophore. Đỉnh 2 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} \approx 230/345$ nm) phản ánh cấu trúc khung xương peptit. Cường độ đỉnh này cũng giảm mạnh từ 1.005 xuống 329,9 (Cr) và 231 (Hg), cùng với sự dịch chuyển 5 nm, chứng tỏ có sự "duỗi" chuỗi protein và biến đổi cấu trúc bậc hai của HSA.

Đỉnh a và đỉnh b tương ứng với tán xạ bậc nhất và bậc hai ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$ và $\lambda_{em} = 2\lambda_{ex}$), có liên quan đến chuyển dời điện tử $\pi \rightarrow \pi^*$ trong nhóm carbonyl của chuỗi peptit [189]. Khi tạo phức với $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$, cường độ các đỉnh tán xạ này tăng lên, có thể do sự gia tăng kích thước phân tử HSA sau khi tạo phức [190].

Nhận xét:

Phức $Cr(PLB)_3$ gây ra sự thay đổi rõ rệt hơn trong phổ huỳnh quang so với $Hg(PLB)_2$, phản ánh khả năng tương tác mạnh hơn giữa ion Cr(III) với các nhóm chức trong protein.

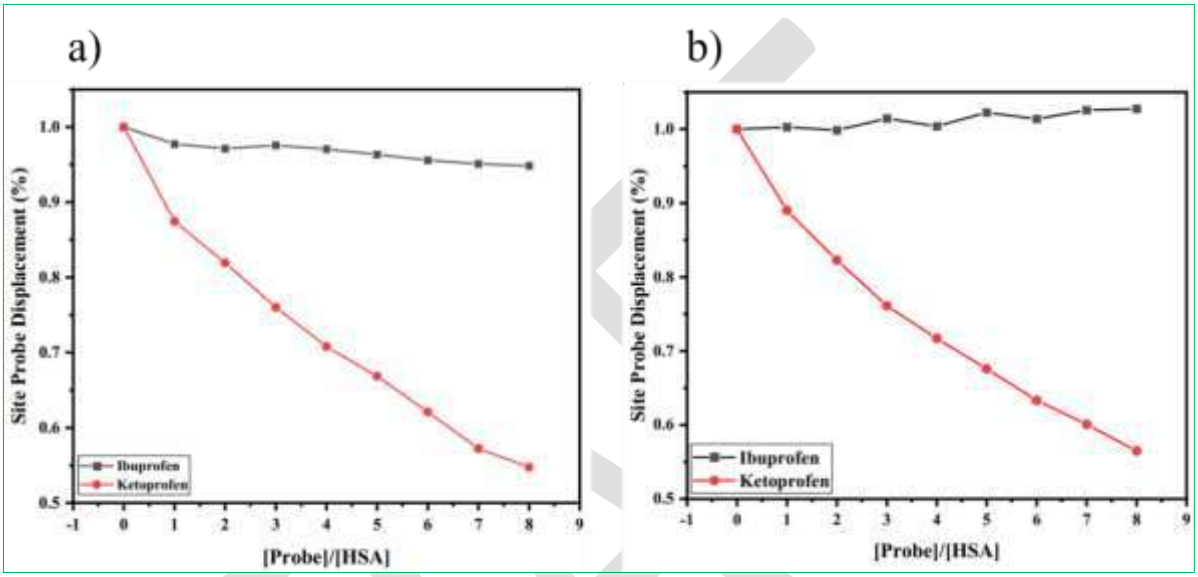
Sự giảm cường độ huỳnh quang cùng với dịch chuyển bước sóng cho thấy có sự biến đổi đáng kể trong cấu trúc bậc hai và bậc ba của HSA, đặc biệt là ở các vùng chứa amino acid thơm.

DRAFT

Cả hai phức chất đều có khả năng tạo phức với HSA, tuy nhiên cơ chế tương tác có thể khác nhau. $Cr(PLB)_3$ có thể tham gia vào liên kết cộng hóa trị hoặc tương tác phi cộng hóa trị mạnh hơn so với $Hg(PLB)_2$.

3.4.2.5 Xác định vị trí và mức độ ảnh hưởng đến cấu trúc

a) Định vị vị trí gắn kết bằng chất đánh dấu



Hình 3.38 Biểu đồ thay thế đầu dò ketoprofen và ibuprofen trên HSA khi có mặt các phức: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$; (b) HSA + $Hg(PLB)_2$.

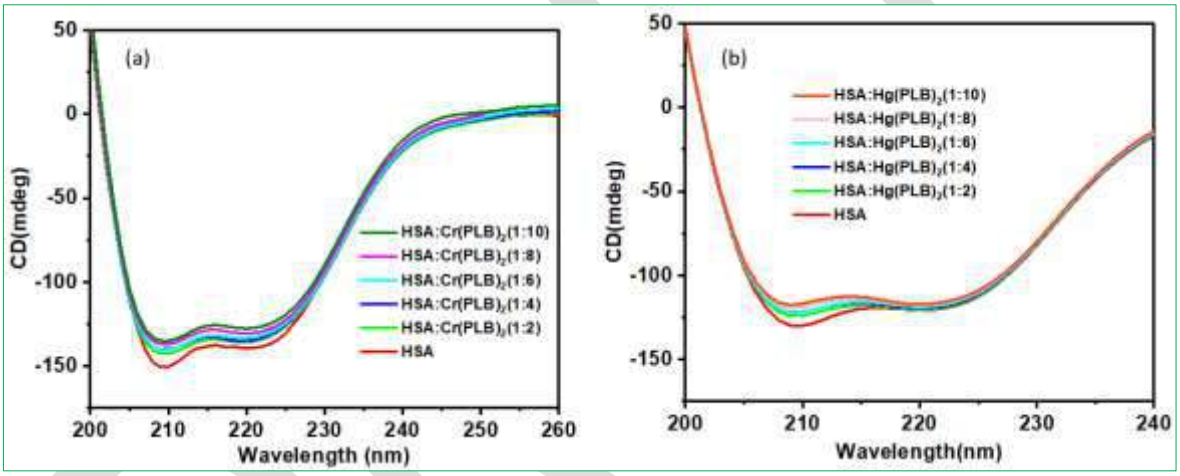
Nhiều nghiên cứu về cấu trúc tinh thể của HSA, điển hình là của Sudlow và cộng sự, đã xác định rằng HSA sở hữu ít nhất ba vị trí gắn kết phân tử nhỏ, trong đó vị trí I (Sudlow's Site I) và vị trí II (Sudlow's Site II) là hai vị trí quan trọng nhất có khả năng gắn với phần lớn thuốc và phối tử với ái lực từ vừa đến cao[191] [192][193].

Để xác định vị trí cụ thể mà các phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ gắn kết trên phân tử HSA, hai chất đánh dấu chọn lọc đã được sử dụng là ketoprofen đánh dấu vị trí I và ibuprofen đánh dấu vị trí II.

Kết quả được thể hiện ở Hình 3.38. Sau khi thêm ketoprofen, cường độ huỳnh quang của cả hai hệ phức giảm rõ rệt, trong khi ibuprofen hầu như không gây ảnh hưởng đáng kể. Điều này cho thấy $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ có xu hướng gắn tại vị trí I (Sudlow's Site I) trên HSA vốn là vị trí thường gắn thuốc trong huyết tương. Cả hai

phức chất đều có khả năng cạnh tranh vị trí gắn kết với các thuốc đã biết, chứng minh rằng chúng có thể được vận chuyển bởi HSA giống như các dược chất khác. Tuy cả $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều tương tác tại cùng một vị trí, nhưng mức độ cạnh tranh và ái lực có thể khác nhau tùy thuộc vào loại ion kim loại và cấu trúc không gian của phức. Điều này ảnh hưởng đến khả năng gắn kết và vận chuyển của thuốc hoặc chất ngoại sinh khi cùng tồn tại với các phức chất kim loại này trong huyết tương. Tương tự như phối tử tự do PLB, sự tạo phức với ion kim loại có thể làm thay đổi đặc tính dược động học của các thuốc đồng thời có mặt trong huyết tương, từ đó tác động đến hiệu quả điều trị hoặc độc tính.

3.4.2.6 Phân tích Circular Dichroism (CD)



Hình 3.39 Phổ Circular Dichroism (CD) của HSA khi tương tác với các phức: (a) HSA + $Cr(PLB)_3$; (b) HSA + $Hg(PLB)_2$.

Bảng 3.12 Biến đổi bước sóng đồng bộ và α-helix của HSA khi tạo phức với $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và PLB

Điều kiện	**Δλ = 15 nm (nm)**	**Δλ = 60 nm (nm)**	**Giảm α-helix (%)**
$Cr(PLB)_3$–HSA	286,5 (↓0,5)	341,5 (↓2,0)	73,37 → 64,65
$Hg(PLB)_2$–HSA	286,0 (↓3,0)	344,5 (↓0,5)	62,24 → 56,35
PLB–HAS	295	340	57,99 → 47,29

Kết quả Hình 3.39 và Bảng 3.12 cho thấy cả hai phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều làm giảm tỷ lệ α-helix trong HSA. Cụ thể, hàm lượng α-helix của HSA giảm từ 73,37% xuống 64,65% khi tạo phức với $Cr(PLB)_3$ và từ 62,24% xuống 56,35% khi tạo phức với $Hg(PLB)_2$. Trong khi đó, PLB đơn thuần cũng làm giảm hàm lượng α-helix nhưng ở mức độ thấp hơn (từ 57,99% xuống còn 47,29%).

Sự kết hợp giữa kết quả phổ CD và phổ huỳnh quang đồng bộ ($\Delta\lambda$ = 15 và 60 nm) cho thấy phức $Cr(PLB)_3$ gây ra sự thay đổi mạnh mẽ hơn đối với cấu trúc protein so với $Hg(PLB)_2$. Điều này chứng tỏ $Cr(PLB)_3$ có khả năng tương tác và gây biến đổi cấu trúc bậc hai của HSA rõ rệt hơn.

Kết quả phổ CD cho thấy sự hình thành phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đã làm thay đổi cấu trúc bậc hai của protein huyết thanh người HSA, với xu hướng giảm α-helix đặc trưng cho sự biến đổi cấu trúc protein. Những biến đổi này có thể ảnh hưởng đến chức năng sinh học của HSA, và cũng góp phần lý giải cơ chế tương tác sinh học hoặc độc tính của các kim loại nặng khi gắn với protein đích[194].

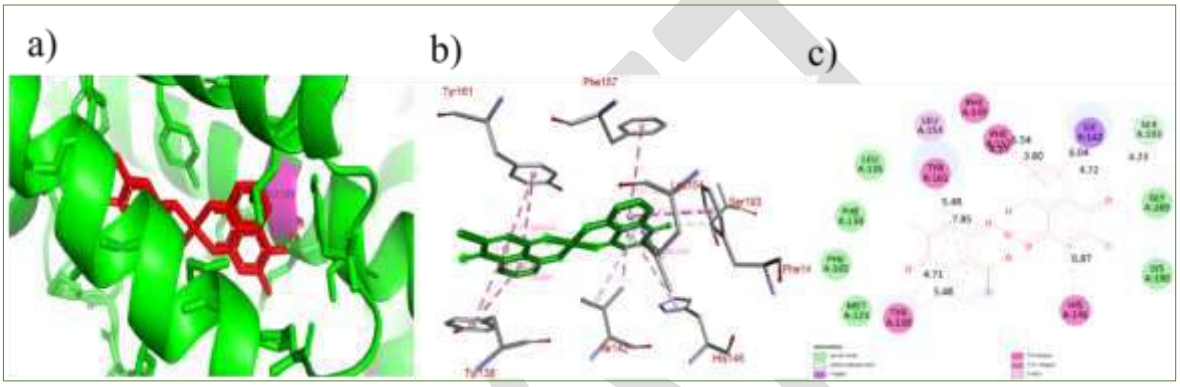
Tổng hợp các kết quả từ UV–Vis, FT–IR, huỳnh quang, ^{1}H-NMR, CD, FRET và các phân tích nhiệt động học cho thấy cả $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đều hình thành phức bền với HSA, thông qua các tương tác không cộng hoá trị như liên kết hydro, van der Waals và kỵ nước. Cả hai phức đều gắn tại vị trí Sudlow I vị trí chủ yếu để vận chuyển thuốc trong huyết tương. Đặc biệt, phức $Hg(PLB)_2$ không chỉ có hoạt tính sinh học mạnh mẽ trên các dòng tế bào ung thư, enzyme *α-glucosidase*, mà còn cho thấy sự tương tác hiệu quả với HSA, với các chỉ số liên kết ổn định, khoảng cách FRET phù hợp, và mức độ ảnh hưởng cấu trúc vừa phải. Những yếu tố này cho thấy $Hg(PLB)_2$ có tiềm năng ứng dụng thực tế như một tác nhân điều trị hoặc hệ mang thuốc sinh học, có thể vận chuyển hiệu quả trong huyết tương. Trong khi đó, phức $Cr(PLB)_3$, dù không thể hiện hiệu lực sinh học cao, lại cho thấy khả năng gây biến đổi mạnh đến cấu trúc bậc hai của HSA, đặc biệt là làm giảm đáng kể hàm lượng α-helix và dịch chuyển fluorophore nội sinh. Điều này phản ánh mức độ phối trí cao của ion Cr(III)

DRAFT

với protein, góp phần làm sáng tỏ cơ chế liên kết giữa ion kim loại d^3 và protein huyết thanh.

Nhìn chung, các kết quả trong mục này không chỉ cung cấp cái nhìn toàn diện về mức độ và cơ chế tương tác giữa HSA với các phức chất, mà còn giúp định hướng đánh giá tính khả dụng sinh học và chọn lọc kim loại phù hợp trong thiết kế hệ phức chất ứng dụng trong y sinh.

3.4.2.7 Mô phỏng docking phân tử



Hình 3.40 Tương tác giữa $Cr(PLB)_3$ và enzyme 1HA2: (a) Liên kết hydro với Gly190; (b) Sơ đồ 2D các tương tác chính; (c) Mô hình 3D vùng hoạt hóa.

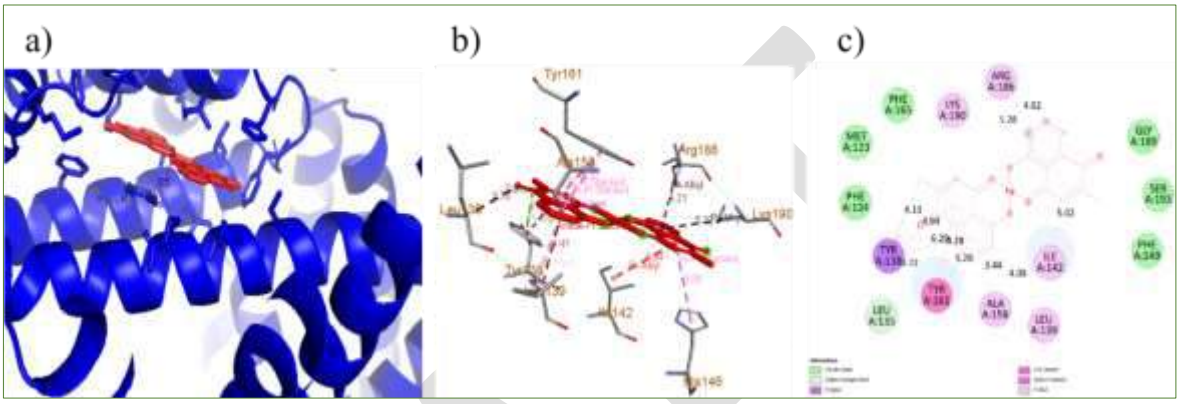
❖ Phức $Cr(PLB)_3$–1HA2

Kết quả mô phỏng *docking* cho thấy cấu hình pose 577 là trạng thái liên kết ổn định nhất trong số 1000 cấu hình khảo sát khi gắn với enzyme 1HA2 (PDB ID: 1HA2). Phức $Cr(PLB)_3$ thể hiện năng lượng tự do Gibbs âm sâu (-12,25 kcal/mol) cùng hằng số ức chế thấp (1,04 μM), cho thấy ái lực liên kết mạnh tại vị trí hoạt động của enzyme. Tại vị trí này, hình ảnh 3D (Hình 40a) cho thấy sự hình thành liên kết hydro bền giữa nhóm hydroxyl của Gly189 và nhóm carbonyl trên phức $Cr(PLB)_3$, với khoảng cách ngắn 2,6 Å. Các tương tác phối tử–enzyme khác chủ yếu là tương tác kỵ nước và liên kết π, bao gồm: Tương tác π–σ giữa ILE142 và hệ π của vòng phenyl trong phức; Tương tác π–π (stacked và T-shaped) với các dư lượng Phe149, Phe157, Tyr138 và Tyr161; Tương tác π–alkyl từ Leu154 và Ile142 đến hệ π của các vòng quinon; Một số tương tác π–π và π–σ khác tại vùng hoạt động của enzyme. Hệ thống phối tử thể hiện liên kết toàn diện với enzyme tại ba vùng chính theo mô hình CG–

DRAFT

CU–FG: vùng nhận diện protein (CG), đoạn liên kết (CU– gồm mạch thơm/aliphatic), và nhóm chức năng (FG – gồm liên kết hydrogen). Phân tích trên mô hình 3D (Hình 13c) xác nhận rõ các tương tác π–π stacking, π–π T-shaped, π–alkyl, π–σ và liên kết hydrogen là nền tảng cho sự gắn kết ổn định của hệ Cr(PLB)$_3$–1HA2.

❖ Hg(PLB)$_2$ – 1HA2



Hình 3.41 Tương tác giữa Hg(PLB)$_2$ và enzyme 1HA2: (a) Liên kết hydro với Tyr161; (b) Sơ đồ 2D các tương tác chính; (c) Mô hình 3D vùng hoạt hóa

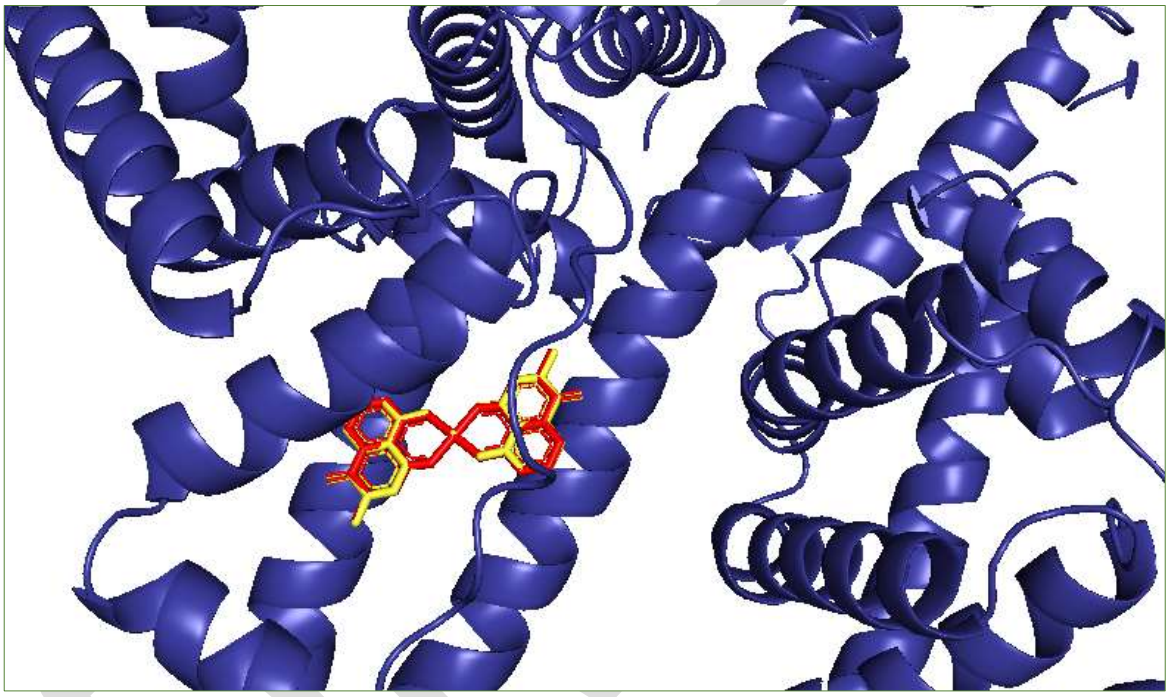
Trong mô phỏng docking với enzyme đích 1HA2, phức Hg(PLB)$_2$ đạt được cấu hình liên kết tối ưu tại pose 596, với năng lượng Gibbs là –11,68 kcal/mol và giá trị Ki là 2,72 µM. Điều này cho thấy phối tử có khả năng gắn mạnh vào vị trí hoạt động của enzyme thông qua các tương tác phối tử–protein đặc hiệu.

Mô hình 3D (Hình 3.41a) cho thấy sự hình thành liên kết hydro giữa nhóm hydroxyl của Tyr161 và nhóm carbonyl trên phân tử Hg(PLB)$_2$, với khoảng cách liên kết là 3,5 Å. Các tương tác chính quan sát được gồm: Tương tác π–π stacking và π–π T-shaped giữa các vòng thơm của phối tử với Tyr161, Tyr138; Tương tác π–alkyl giữa các nhóm vòng và các acid amin như Leu139, Ala158, Lys190, Arg186; Tương tác π–sigma từ Tyr138 đến nhóm methyl trên phối tử; Một số tương tác qua hệ electron π liên hợp trên các vòng quinon và phenyl. Các tương tác này được phân bố ở cả ba vùng là nhóm nhận diện (capping group), đoạn liên kết (linker) và vùng chức năng. Trên sơ đồ không gian 3D (Hình 3.41c), các tương tác π–π, π–alkyl, π–sigma và liên

kết hydro xuất hiện rõ rệt tại nhiều vị trí acid amin, đặc biệt là các residue như Tyr161, Arg186, Lys190, His146 và Leu139.

Tổng thể, hệ phối tử $Hg(PLB)_2$ thể hiện tương tác vững chắc với vùng hoạt động của enzyme 1HA2 thông qua mạng lưới tương tác kỵ nước và hydro, gợi mở tiềm năng ứng dụng trong thiết kế chất điều biến enzyme sinh học.

❖ Xác thực mô hình docking



Hình 3.42 Cấu hình pose 577 (màu đỏ) được chồng khớp với cấu hình pose 596 (màu vàng) trong quá trình xác thực mô hình docking

Hình 3.42 trình bày sự chồng khớp giữa pose 577 (màu đỏ) và pose 596 (màu vàng) trong vùng hoạt hóa của 1HA2. Giá trị RMSD = 0.078 Å (< 4 Å) chứng minh rằng hai cấu trúc có định hướng tương tự trong vùng liên kết, xác nhận tính ổn định và hợp lý của mô hình docking, cũng như độ tin cậy của lưới docking và thông số thiết lập.

$Cr(PLB)_3$ có khả năng liên kết mạnh hơn $Hg(PLB)_2$, thể hiện qua: ΔG âm lớn hơn, Ki nhỏ hơn, mạng lưới tương tác đa điểm (hydrogen + hydrophobic). Mức độ tương tác phù hợp với dữ liệu huỳnh quang và FRET đã thu được, đồng thời giúp giải thích sự khác biệt trong tương tác với protein ở mức phân tử.

Kết quả mô phỏng docking giữa hai phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với enzyme 1HA2 cho thấy cả hai đều có khả năng gắn kết tốt tại vị trí hoạt hóa của enzyme, với giá trị năng lượng tự do Gibbs (ΔG) lần lượt là –12,25 kcal/mol (Cr) và –11,68 kcal/mol (Hg), kèm theo hằng số ức chế Ki ở mức μM thấp (1,04 μM và 2,72 μM, tương ứng). Điều này phản ánh ái lực tương tác mạnh giữa các phức chất và enzyme đích.

Các tương tác được quan sát bao gồm: Liên kết hydro với các amino acid đặc hiệu, Tương tác kỵ nước đa dạng: π–π stacking, π–π T-shaped, π–alkyl, π–sigma. Những tương tác này đều tập trung tại vùng Sudlow site I hoặc túi hoạt hóa của enzyme – vốn là vị trí điển hình cho các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

Đặc biệt, $Cr(PLB)_3$ tạo được mạng lưới tương tác hydrophobic dày đặc hơn, trong khi $Hg(PLB)_2$ có giá trị K_i thấp và bền hơn về mô hình cấu trúc, cho thấy sự khác biệt cơ chế gắn kết dù cả hai có mức năng lượng tương đương.

Từ những kết quả này, có thể khẳng định rằng: Cả hai phức chất đều có tiềm năng sinh học rõ rệt dưới dạng chất ức chế enzyme, $Hg(PLB)_2$ nổi bật hơn về mặt cân bằng giữa hiệu quả và tính chọn lọc, đặc biệt nếu xét thêm yếu tố giảm độc tính trên dòng tế bào lành (HEK-293A) như đã chứng minh trong các thử nghiệm sinh học. Do đó, phức $Hg(PLB)_2$ được đánh giá là ứng viên đầy tiềm năng cho các nghiên cứu phát triển thuốc hướng đích enzyme, trong khi $Cr(PLB)_3$ có thể cung cấp mô hình tương tác tham chiếu hữu ích trong thiết kế phối tử mới.

3.4.2.8 Định hướng ứng dụng và giá trị nghiên cứu

Dù mới là bước đầu nghiên cứu tương tác giữa các phức chất $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với HSA nhưng đã hé lộ ứng dụng phong phú của phức trong lĩnh vực y sinh.

$Cr(PLB)_3$ được đánh giá là phức có tiềm năng cho hệ dẫn truyền thuốc thông minh, với khả năng gắn kết chọn lọc và bền vững tại vị trí hoạt động của HSA. Cơ chế gắn mạnh vào HSA giúp kéo dài thời gian lưu hành, giảm đào thải và cải thiện khả năng hoạt chất được hấp thu và phát huy tác dụng trong cơ thể.

DRAFT

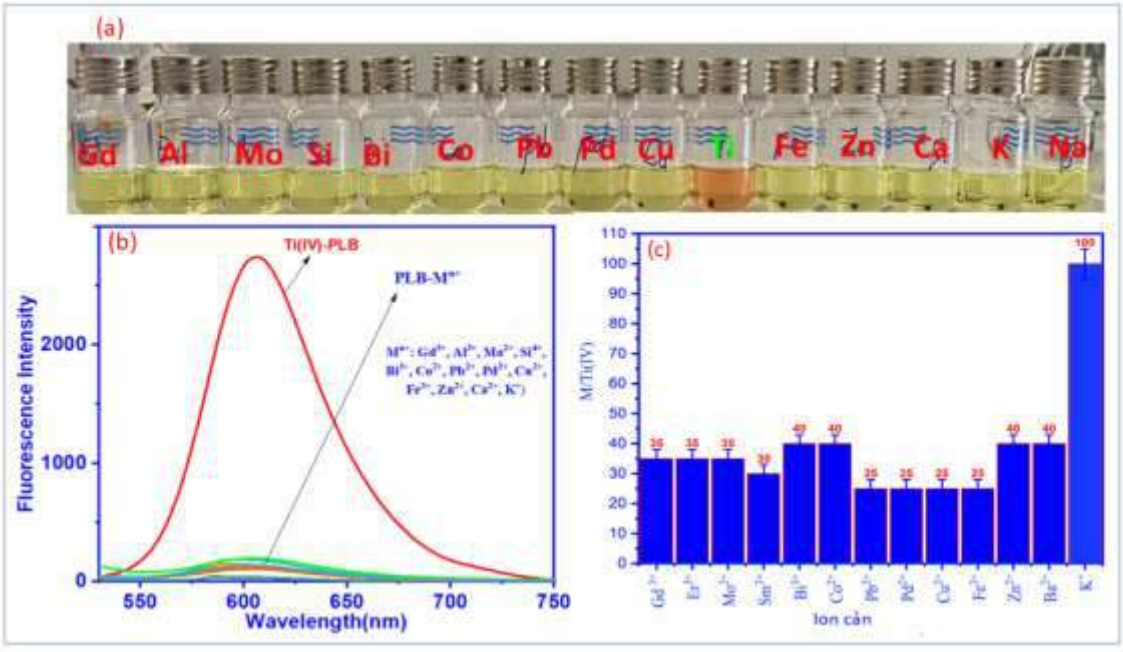
Mặc dù tương tác yếu hơn với HSA nhưng phức $Hg(PLB)_2$ lại tạo hiệu ứng tắt huỳnh quang, cho phép ứng dụng như một cảm biến nhạy cho ion kim loại nặng hoặc biến đổi vi môi trường protein. Đặc tính phát hiện nhạy và tương tác linh động với protein mở ra hướng đi mới trong phát triển đầu dò sinh học và giám sát độc chất môi trường.

Việc nghiên cứu bước đầu này không chỉ giúp làm sáng tỏ ảnh hưởng của phối trí kim loại đến tương tác sinh học, mà còn mở ra một cánh cửa mới cho thiết kế các chất hữu cơ–kim loại đa mục tiêu, phù hợp với điều trị viêm, ung thư và phát hiện môi trường đó là những thách thức lớn của y học và sinh học hiện đại.

3.4.3 Ứng dụng phức $Ti(PLB)_2$ trong phân tích Ti(IV) bằng huỳnh quang

Phức chất $Ti(PLB)_2$ được hình thành trong môi trường ethanol–nước (7:3, v/v) tại pH 5 đây là điều kiện tối ưu đã được xác lập ở phần trước. Phức phát huỳnh quang ổn định tại 605 nm khi kích thích ở 500 nm, tỉ lệ 1:2 (Ti:PLB) và hằng số liên kết $K = 3{,}98 \times 10^4$. Các thông số này dùng làm cơ sở cho ứng dụng trong phân tích mẫu thực.

3.4.3.1 Ảnh hưởng ion lạ



Hình 3.43 Tính chọn lọc huỳnh quang của PLB đối với Ti(IV): (a) Ảnh chụp mẫu PLB sau khi thêm các ion kim loại khác nhau; (b) Phổ huỳnh quang của phức Ti(IV)–PLB so sánh với PLB–M^{n+};(c) Biểu đồ so sánh tỉ lệ [M]/[Ti(IV)] gây ảnh hưởng cường độ huỳnh quang của phức $Ti(PLB)_2$

Hình 3.43b cho thấy chỉ riêng hệ $Ti(PLB)_2$ phát huỳnh quang mạnh tại 605 nm, trong khi các ion kim loại khác (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Co^{2+}, Pd^{2+}, Bi^{3+}, Si^{4+}, Mo^{2+}, Al^{3+}, Gd^{3+}) hầu như không tạo được tín hiệu huỳnh quang khi phối hợp với PLB. Kết quả này khẳng định tính chọn lọc huỳnh quang rất cao của PLB đối với Ti(IV).

Hình 3.43c cho thấy các ion kiềm, kiềm thổ và đất hiếm (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Gd^{3+}…) chỉ gây thay đổi cường độ huỳnh quang không đáng kể ngay cả khi nồng độ gấp 100 lần so với Ti(IV). Một số ion chuyển tiếp như Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} bắt đầu gây suy giảm cường độ đáng kể ở tỉ lệ [M]/[Ti] từ 25–40 lần, cho thấy có thể xảy ra tương tác yếu hoặc tạo phức không đặc hiệu với PLB. Riêng K^+ không gây ảnh hưởng ngay cả ở tỉ lệ 100 lần, chứng tỏ phức $Ti(PLB)_2$ có độ chọn lọc rất tốt ngay cả trong nền chứa nhiều muối kiềm.

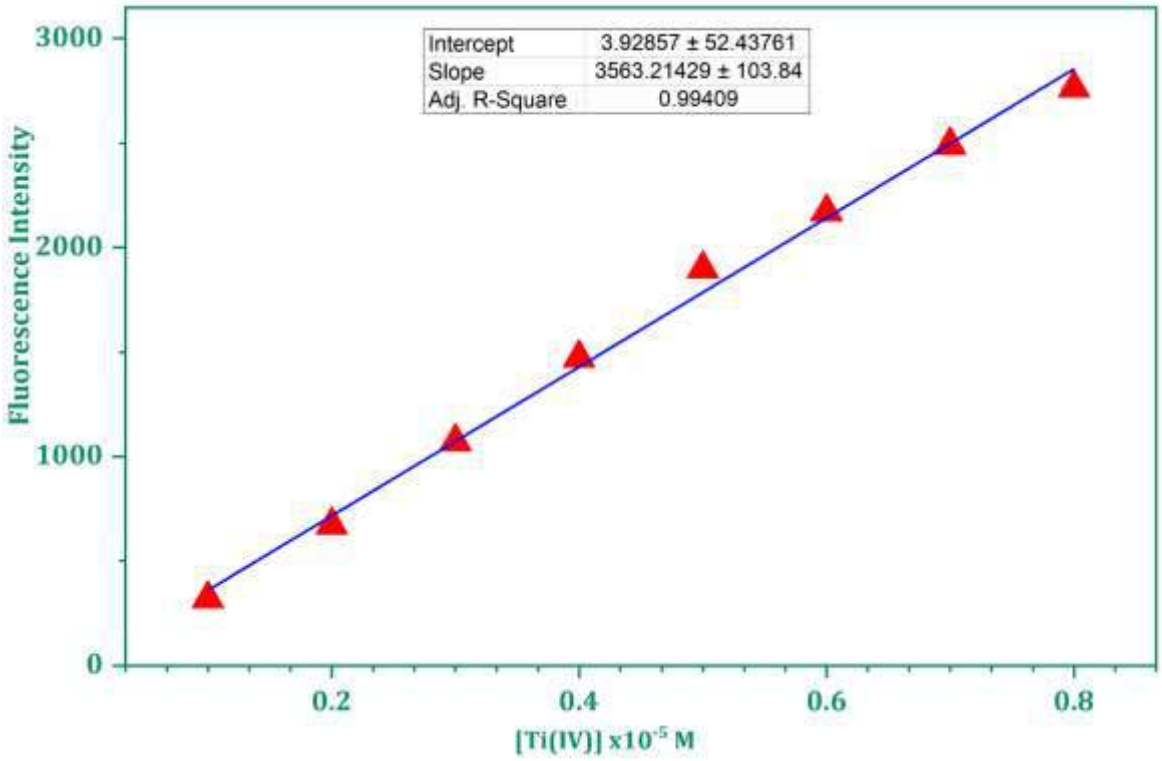
Trong thực tế trong thành phần mẫu cát thường chứa Si (60-80%, Al 10-20%, Fe 1-5%, Ca, K, Na, Mg tổng từ 1-5%. So sánh với biểu đồ gây nhiễu ở Hình 3.43b các ion như Fe^{3+}, Al^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}... đều hiện diện trong cát nhưng gây nhiễu thấp, đặc biệt Fe chỉ ~25%, càng củng cố khả năng định lượng chọn lọc Ti trong mẫu cát. Phương pháp có tính chọn lọc cao, khả năng kháng nhiễu tốt.

3.4.3.2 Xác định LOD, LOQ của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) và độ tái lập của phương pháp đã được xác định. Trên cơ sở 20 phép đo lặp lại với mẫu thêm chuẩn ion Ti(IV) có nồng độ $1{,}0\times10^{-6}$ M, nồng độ trung bình thu được là $1{,}03\times10^{-6}$ M, với độ lệch chuẩn (SD) $0{,}0105\times10^{-5}$ M và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 4,09%. Giá trị này tương ứng với độ thu hồi 103%, chứng tỏ độ chính xác của phương pháp là chấp nhận được.

Kết quả phổ huỳnh quang và tín hiệu thu được cho phép xác định các giá trị LOD và LOQ lần lượt là $2{,}0\times10^{-7}$ M và $6{,}69\times10^{-7}$ M, với hệ số tương quan $R^2 = 0{,}9962$. Những số liệu này chứng minh phương pháp có độ chọn lọc cao, phù hợp cho việc phân tích định lượng Ti(IV) trong các điều kiện tối ưu, đồng thời đảm bảo yêu cầu về độ nhạy và độ chính xác.

DRAFT



Hình 3.44 Sự phụ thuộc cường độ huỳnh quang của PLB vào nồng độ Ti(IV)

Đường chuẩn có dạng được đo trong khoảng nồng độ từ $0,1\times10^{-5}$ M đến $0,8\times10^{-5}$ M. Phương trình hồi quy F = 3.563,214C + 3,928, với hệ số tương quan R^2 là 0,99409. Các giá trị LOD, LOQ cũng như RSD lần lượt là: $2,0\times10^{-7}$ M, $7,0 \times 10^{-7}$ M và 4,09%.

3.4.3.3 Ứng dụng phân tích mẫu cát thực tế

Để đánh giá khả năng ứng dụng thực tế, phương pháp huỳnh quang sử dụng phức $Ti(PLB)_2$ được áp dụng phân tích hàm lượng Ti(IV) trong các mẫu cát thu thập tại huyện Tuy Phong, tỉnh Bình Thuận. Kết quả thu được được đối chiếu với phương pháp tham chiếu ICP-OES. Bảng 3.16 trình bày nồng độ Ti(IV) xác định bằng hai phương pháp cùng với sai số tương đối giữa chúng.

Bảng 3.13 Kết quả phân tích hàm lượng Ti trong mẫu cát Bình Thuận

Mẫu	Phương pháp đề xuất (µM)	Phương pháp ICP-OES* (µM)	Sai số tương đối (%)
BT1	3,13 ± 0,02	3,05 ± 0,04	+2,62 %
BT2	3,00 ± 0,07	3,11 ± 0,06	–3,54 %
BT3	3,25 ± 0,04	3,17 ± 0,02	+2,52 %
BT4	3,32 ± 0,06	3,35 ± 0,06	–0,90 %
BT5	3,08 ± 0,03	3,12 ± 0,06	–1,28 %

(*Kết quả phân tích được thực hiện tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích CASE, Thành phố Hồ Chí Minh)

Kết quả tại Bảng 3.13 cho thấy hàm lượng Ti(IV) trong năm mẫu cát Bình Thuận được xác định bằng phương pháp huỳnh quang sử dụng thuốc thử PLB tương đương với kết quả từ phương pháp chuẩn ICP-OES. Độ lệch giữa hai phương pháp nhỏ (0,04–0,11 µM) và nằm trong giới hạn sai số cho phép. Điều này chứng tỏ phương pháp huỳnh quang đề xuất có độ chính xác cao, khả năng lặp lại tốt và hoàn toàn phù hợp để ứng dụng trong phân tích thực tế hàm lượng Ti(IV) trong các mẫu môi trường nền rắn như cát.

3.4.3.4 Đánh giá tiêu chí phân tích xanh của phương pháp đề xuất

Kết quả đánh giá mức độ phân tích xanh của phương pháp xác định Ti(IV) bằng huỳnh quang sử dụng thuốc thử PLB (Phụ lục 59), dựa trên 10 tiêu chí GAC theo đề xuất của Płotka-Wasylka và cộng sự (2018) [195].

Kết quả cho thấy phương pháp tương ứng với mức "phân tích xanh tốt". Cụ thể, phương pháp sử dụng dung môi EtOH–H_2O thân thiện, không sử dụng thuốc thử độc hại trong quá trình đo, thời gian phản ứng ngắn (~3 phút), không cần gia nhiệt hay bước tách pha, đồng thời lượng mẫu và hóa chất sử dụng nhỏ (<5 mL). Các yếu tố này giúp giảm thiểu chất thải, tiết kiệm năng lượng và tăng tính an toàn. Tuy nhiên,

điểm hạn chế là việc sử dụng HF và $HClO_4$ trong bước tiền xử lý mẫu mặc dù không ảnh hưởng đến bước đo huỳnh quang nhưng vẫn được xem là không thân thiện với môi trường. Ngoài ra, thiết bị huỳnh quang dù có mức tiêu thụ năng lượng thấp, nhưng vẫn thuộc nhóm chuyên dụng, chưa phổ biến rộng trong các phòng thí nghiệm cơ bản, do đó tiêu chí này được đánh giá 0,5 điểm.

Nhìn chung, phương pháp được đánh giá là thân thiện với môi trường, có tiềm năng ứng dụng trong các chương trình giám sát môi trường, đào tạo đại học và phát triển các công nghệ phân tích sạch.

Trong tương lai, cần tiếp tục phát triển và cải tiến phương pháp theo hướng thân thiện hơn với môi trường và mở rộng khả năng ứng dụng. Nghiên cứu thay thế HF bằng các hỗn hợp acid ít độc hơn như HNO_3/HCl, kết hợp với kỹ thuật hỗ trợ như vi sóng hoặc chiết pha rắn nhằm giảm độc tính, tăng hiệu suất và phù hợp hơn với định hướng phân tích xanh. Phát triển hệ thống đầu dò huỳnh quang dựa trên PLB và các dẫn xuất của nó để tạo thành các phức chất tương ứng với nhiều ion kim loại khác nhau (như Fe^{3+}, Cu^{2+}, …). Việc kết hợp các phối tử này với các kỹ thuật phân tích bổ trợ như UV–Vis, HPLC hoặc huỳnh quang có thể hướng tới xây dựng phương pháp phân tích đa nguyên tố trên cùng một nền mẫu. Tích hợp hệ thống huỳnh quang mini hoặc cảm biến điện hóa di động sẽ góp phần nâng cao tính bền vững, khả năng triển khai thực địa và tính thân thiện môi trường của quy trình phân tích titan trong các chương trình giám sát môi trường quy mô lớn.

3.4.3.5 Đánh giá ưu, nhược điểm phương pháp đề xuất

❖ Ưu điểm

Phương pháp huỳnh quang sử dụng phức chất $Ti(PLB)_2$ cho thấy độ nhạy cao, với LOD = $2{,}0 \times 10^{-7}$ M (tương đương 9,6 µg/L Ti(IV)) và LOQ = $6{,}69 \times 10^{-7}$ M (≈ 32 µg/L), đảm bảo yêu cầu về độ nhạy và độ chính xác, đáp ứng được yêu cầu phân tích trong thực tế. Đặc biệt, tính chọn lọc cao đạt được nhờ sự tạo phức chọn lọc giữa PLB và ion Ti(IV), hạn chế nhiễu từ các ion kim loại khác. Thiết bị huỳnh quang được sử dụng đơn giản, dễ vận hành hơn so với các thiết bị như ICP-MS, đồng thời phù hợp

với các ứng dụng tại hiện trường nhờ điều kiện đo không đòi hỏi phức tạp. Ngoài ra, phương pháp có thể triển khai hiệu quả trong các hoạt động nghiên cứu, đào tạo, và kiểm nghiệm nhanh trong môi trường học thuật hoặc ứng dụng thực tiễn.

❖ Nhược điểm

Độ nhạy phụ thuộc vào độ tinh khiết và ổn định của phức. Có thể bị ảnh hưởng bởi chất nhiễu nếu không kiểm soát tốt môi trường mẫu. Đang còn một số tiêu chí chưa đạt tiêu chí xanh.

Tóm lại, phức $Ti(PLB)_2$ thể hiện tín hiệu huỳnh quang mạnh và ổn định, cho phép ứng dụng hiệu quả phân tích định lượng Ti(IV) trong các mẫu thật. Phương pháp được xây dựng có độ nhạy, độ chọn lọc và tính khả thi cao, có thể áp dụng trong phân tích mẫu thực tế và là tiền đề cho các nghiên cứu mở rộng sau này trong phân tích môi trường hoặc vật liệu chứa Ti(IV).

3.4.4 Sử dụng PLB trong phân tích định lượng Hg(II) bằng HPLC-DAD

Dựa trên khả năng tạo phức ổn định và đặc hiệu giữa ion Hg(II) và phối tử PLB, nghiên cứu này đã phát triển phương pháp phân tích định lượng Hg(II) sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp đầu dò diode array (DAD). Phương pháp được thiết kế nhằm xây dựng hệ đo có tính chọn lọc và độ nhạy cao, đồng thời đáp ứng yêu cầu ứng dụng thực tiễn trong phân tích môi trường và sinh học. Phương pháp này dựa trên sự tạo phức giữa PLB và Hg(II) với tỉ lệ mol 1:2. Phức này có khả năng hấp thụ mạnh trong vùng UV, với cực đại tại 224 nm, cho phép phát hiện chính xác bằng đầu dò DAD. Các điều kiện tối ưu được trình bày ở Bảng 3.14.

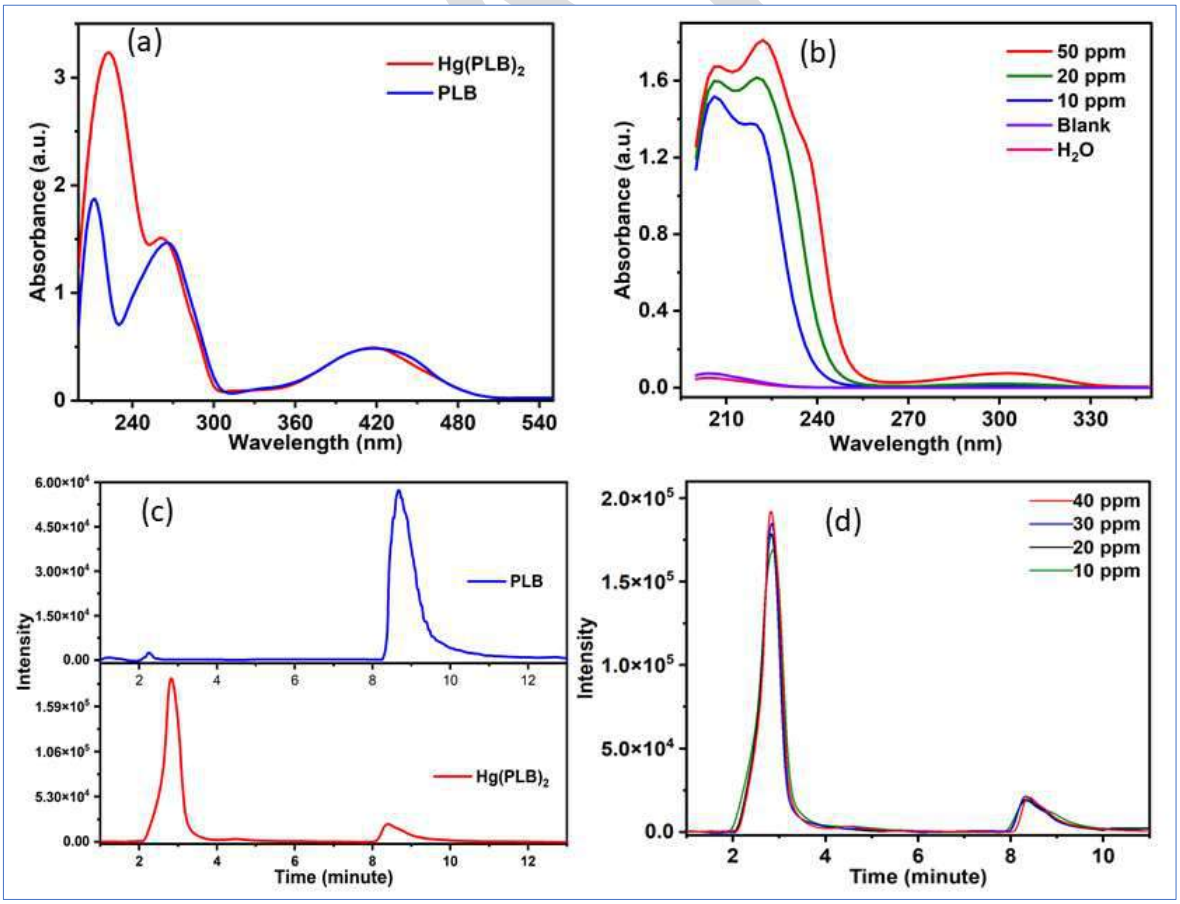
DRAFT

Bảng 3.14 Các điều kiện tối ưu cho phương pháp HPLC–DAD xác định Hg(II) dựa trên phức $Hg(PLB)_2$

Điều kiện	**Giá trị tối ưu**
Cột HPLC	C18 RP (reverse-phase)
Pha động	H_2O: EtOH = 5:5 (v/v)
Tốc độ dòng	0,8 mL/phút
Bước sóng phát hiện	224 nm
pH	6
Nhiệt độ cột	40°C
Thời gian chạy	2–10 phút

3.4.4.1 Các bước tiến hành quy trình phân tích

a) Phổ UV vis

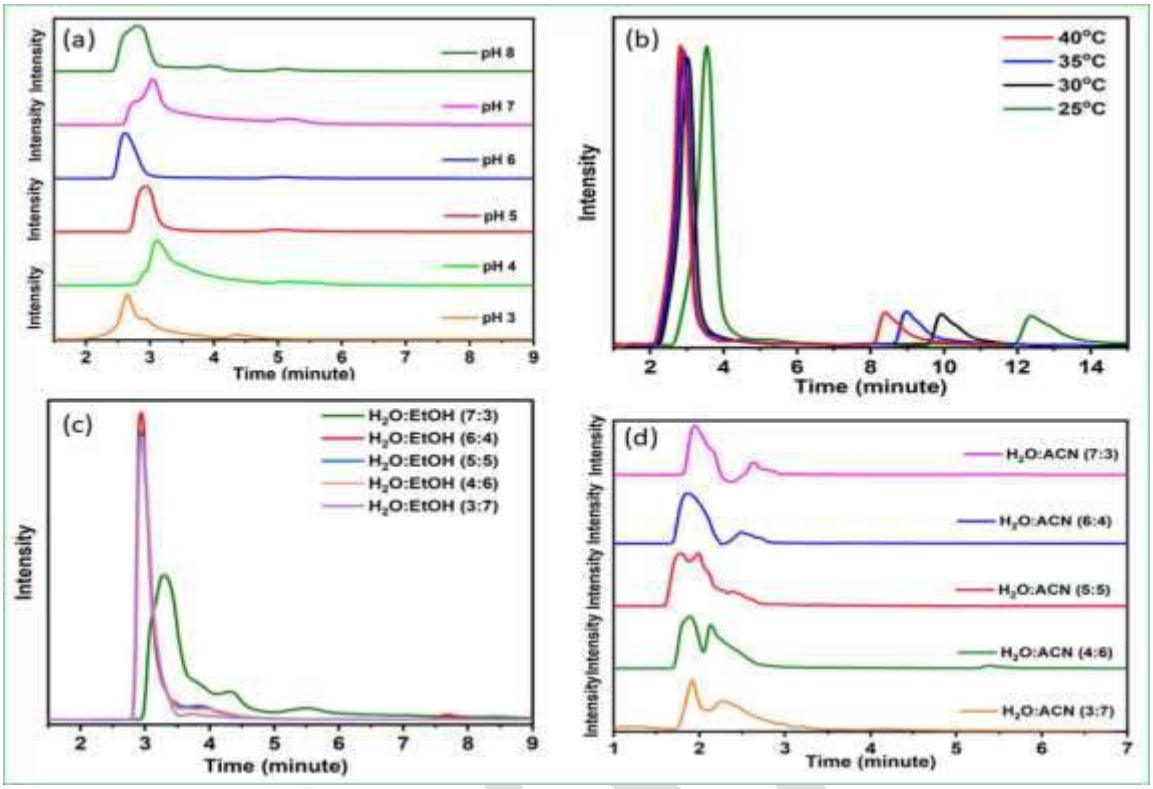


Hình 3.45 Phổ UV–Vis và sắc ký HPLC của PLB và phức $Hg(PLB)_2$.

Phổ UV–Vis của phức $Hg(PLB)_2$ trong ethanol tại pH 6,0–7,0 xuất hiện các đỉnh đặc trưng tại 226, 310 và 420 nm (Hình 3.45a), xác nhận sự hình thành phức chất. Phức có tỉ lệ phối trí 1:2, ổn định sau 3 phút và bền theo thời gian, với hằng số bền $K = 7{,}94 \times 10^4$. Cấu trúc phức đã được đặc trưng bằng các phương pháp quang học hiện đại, đồng thời hoạt tính sinh học cũng được khảo sát. Sự dịch chuyển phổ hấp thụ là bằng chứng cho quá trình tạo phức và là cơ sở cho việc phát triển phương pháp HPLC-DAD. Hình 3.45b cho thấy phức $Hg(PLB)_2$ có đỉnh hấp thụ cực đại tại 224 nm, được chọn làm bước sóng phân tích cho HPLC–DAD nhờ tín hiệu hấp thụ mạnh, ổn định và đường nền sạch. So với bước sóng ngắn hơn (206 nm), bước sóng 224 nm giúp giảm nhiễu nền, cải thiện tỷ lệ tín hiệu/nhiễu (S/N) và tạo đỉnh phân tích đối xứng hơn. Đồng thời, bước sóng này ít chịu ảnh hưởng từ dung môi $EtOH/H_2O$, phù hợp cho phân tích mẫu thực và nâng cao độ tin cậy của phép đo. Sắc ký đồ HPLC-DAD trong Hình 3.46c cho thấy nếu sử dụng PLB đơn chất, tín hiệu xuất hiện ở thời gian lưu khoảng 8–10 phút. Trong khi đó, sau khi tạo phức $Hg(PLB)_2$ trong điều kiện tối ưu xuất hiện một peak tách biệt ở khoảng 2–4 phút đó là tín hiệu đặc trưng của phức $Hg(PLB)_2$. Tuy nhiên, vẫn còn một peak nhỏ ở 8–10 phút, có thể do lượng PLB chưa tham gia phản ứng hoàn toàn để tạo thành phức. Hình 3.46d cho thấy khi nồng độ phức tăng lên, độ cao peak cũng tăng tương ứng. Thời gian lưu của phức $Hg(PLB)_2$ được xác định nằm trong khoảng 2–4 phút, trong khi PLB có thời gian lưu trong khoảng 8–9 phút. Kết quả này chứng minh phương pháp HPLC–DAD có thể được sử dụng để tách và định lượng ion Hg(II) thông qua tín hiệu của phức $Hg(PLB)_2$.

DRAFT

b) Ảnh hưởng của pH



Hình 3.46 (a) pH và thời gian lưu; (b) Nhiệt độ cột HPLC; (c) Tỷ lệ H_2O:EtOH; (d) Tỷ lệ H_2O:ACN

pH đóng vai trò then chốt trong quá trình tạo phức và ảnh hưởng đến tương tác phân bố giữa chất phân tích và pha tĩnh C18 trong sắc ký HPLC. Kết quả khảo sát (Hình 3.46a) cho thấy tại pH 6, peak của phức $Hg(PLB)_2$ có hình dạng đối xứng nhất, cường độ cao và thời gian lưu ổn định. Trong khi đó, ở các giá trị pH khác (3–5 hoặc 7–8), peak có hiện tượng kéo đuôi, lan rộng hoặc bất đối xứng. Ngoài ra, để đảm bảo độ bền của cột C18, khoảng pH hoạt động an toàn được khuyến cáo nằm trong khoảng 4–8. Do đó, pH 6 được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các khảo sát tiếp theo.

c) Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ cột ảnh hưởng đến tốc độ khuếch tán và khả năng rửa giải của chất phân tích. Khi nhiệt độ tăng từ 25°C lên 40°C (Hình 3.46b), thời gian lưu của thuốc thử PLB giảm rõ rệt (từ 12 phút xuống 9 phút), trong khi phức $Hg(PLB)_2$ vẫn duy trì được peak rõ nét, đối xứng với thời gian lưu hợp lý (2,823 phút). Ở 40°C, peak của phức

đạt diện tích lớn (5,25 triệu), chiều cao cao (183.590), hệ số đối xứng tốt (0,852) và không có hiện tượng kéo đuôi phù hợp cho phân tích định lượng. Do đó, nhiệt độ 40°C được chọn là điều kiện tối ưu.

d) Ảnh hưởng của thành phần và tỉ lệ pha động

Pha động ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tách và độ nhạy của hệ HPLC. Hai hệ dung môi H_2O:EtOH và H_2O:ACN đã được khảo sát ở các tỉ lệ khác nhau (Hình 3.46c, 3.46d). Với H_2O:EtOH, tỉ lệ 45:55 cho tín hiệu sắc nét (~1,15 triệu), peak $Hg(PLB)_2$ rõ ràng, không chồng lấp, phù hợp cho định lượng. Tỉ lệ 50:50 và 55:45 cũng cho kết quả tốt, trong khi 60:40 gây kéo đuôi và 30:70 cho tín hiệu yếu, nhiều peak phụ. Với H_2O:ACN, tỉ lệ 50:50 cho tín hiệu cao nhưng một số tỉ lệ khác xuất hiện hiện tượng kéo đuôi hoặc tách peak, ảnh hưởng độ chính xác.

Do đó, tỉ lệ H_2O:EtOH = 45:55 được xem là tối ưu. Tuy nhiên, để rút ngắn thời gian phân tích mà vẫn đảm bảo độ phân giải, tỉ lệ 50:50 được chọn làm điều kiện chính thức cho các phép đo HPLC–DAD tiếp theo.

DRAFT

Bảng 3.15 Khảo sát thành phần pha động ảnh hưởng đến phân tích phức $Hg(PLB)_2$

Thành phần pha động	**Tỉ lệ pha động**	**Thời gian lưu**		**Chiều cao peak**	**Đối xứng**	**Độ sắt nét**
		$Hg(PLB)_2$	**PLB**			
H_2O:EtOH	9:1	3,113	10,373	380.116	2,981	Kéo đuôi
	8:2	3,080	10,977	436.903	2,279	Kéo đuôi
	7:3	3,103	10,057	587.179	2,417	Đỉnh không đối xứng
	6:4	2,947	10,630	959.015	1,509	Đỉnh đối xứng
	5:5	2,977	10,320	1.024.786	1,670	Đỉnh đối xứng
	4:6	3,057	10,057	729.231	2,133	Chẻ peak
	3:7	3,050	10,070	800.156	1,808	Chẻ peak

DRAFT

3.4.4.2 Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích

a) Đánh giá độ phù hợp hệ thống

Kết quả trong Bảng 3.19 cho thấy hệ thống HPLC-DAD hoạt động ổn định và đáng tin cậy. Thời gian lưu của phức $Hg(PLB)_2$ dao động từ 2,533–2,577 phút, trong khi PLB dao động 8,113–8,127 phút, đều ổn định và phù hợp cho phân tích nhanh. %RSD của thời gian lưu $Hg(PLB)_2$ là 0,710%; PLB là 0,072% cho thấy độ lặp lại rất tốt. Diện tích peak dao động từ 4.615.857 đến 4.659.220 kết quả này cho thấy độ nhạy cao với %RSD = 0,364% (<2%) và điều này chứng minh khả năng lặp lại tốt của hệ đo. Số đĩa lý thuyết (N) dao động từ 2.468–2.555, đều >2.000 cho thấy hiệu suất cột tốt.

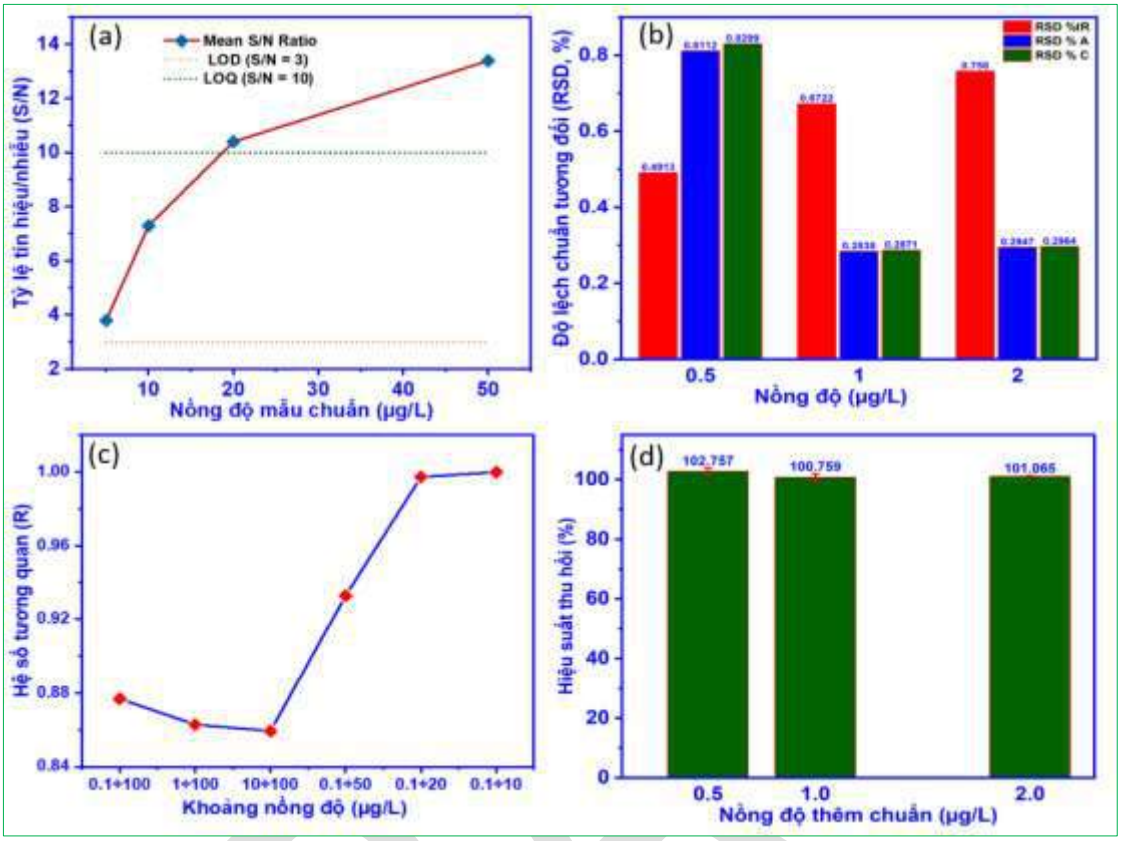
DRAFT

Bảng 3.16 Các thông số phù hợp hệ thống được ghi nhận trong điều kiện tối ưu
(tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; nồng độ: 3ppm; bước sóng: 224nm; pH = 6; pha động H_2O:EtOH = 5:5; nhiệt độ: 40°C)

$C_{Hg(II)}$ (ppm)	**Thời gian lưu**		**Diện tích peak**	**Số đĩa lý thuyết**	**RSD% thời gian lưu**		**RSD% Peak area**
	$Hg(PLB)_2$	**PLB**			**$Hg(PLB)_2$**	**PLB**	
1	2,533-2,577	8,127-8,113	4.615.857-4.659.223	2.468- 2.527	0,710	0,072	0,364

DRAFT

b) Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)



Hình 3.47 Đánh giá giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại và độ chính xác của phương pháp HPLC-DAD với phức $Hg(PLB)_2$: (a) Tỷ lệ tín hiệu/nhiễu (S/N) theo nồng độ chuẩn (µg/L); (b) Độ lệch chuẩn tương đối (RSD, %); (c) Hệ số tương quan (R) của đường chuẩn; (d) Hiệu suất thu hồi (%)

Tín hiệu và nhiễu nền tại vị trí thời gian lưu của phức $Hg(PLB)_2$ được đo lặp lại 3–4 lần để tính LOD và LOQ. Kết quả thể hiện trong Phụ lục 60. Giá trị thu được là LOD = 5,0 µg/L; LOQ = 20,0 µg/L. Phương pháp đạt độ nhạy cao ở mức ppb, cho phép phát hiện và định lượng $Hg(PLB)_2$ ở nồng độ rất thấp, đáp ứng yêu cầu của các ứng dụng phân tích vết trong môi trường, thực phẩm và y sinh.

Hình 3.47a trình bày đồ thị biểu diễn sự gia tăng tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) theo nồng độ mẫu chuẩn Hg(II). Từ đồ thị cho thấy nồng độ thấp nhất có thể phát hiện được (S/N ≥ 3) là 5,0 µg/L, trong khi mức có thể định lượng chính xác (S/N ≥ 10) là 20,0 µg/L. Tỷ lệ S/N tăng tuyến tính theo nồng độ Hg, từ 3,8 tại 5,0 µg/L đến 13,4 tại 50,0 µg/L, phù hợp với các ngưỡng LOD và LOQ đã xác định.

Kết quả này chứng minh rằng phương pháp phân tích bằng HPLC-DAD có độ nhạy cao, hoàn toàn phù hợp với các yêu cầu giám sát Hg(II) ở nồng độ vết trong môi trường nước.

3.4.4.3 Xác định khoảng tuyến tính

Từ dữ liệu thu được, các khoảng nồng độ 100–10.000 µg/L và 100–20.000 µg/L đều có hệ số tương quan R > 0,995, trong khi các khoảng khác có R < 0,995. Do đó, khoảng tuyến tính chính thức được lựa chọn là từ 100–20.000 µg/L.

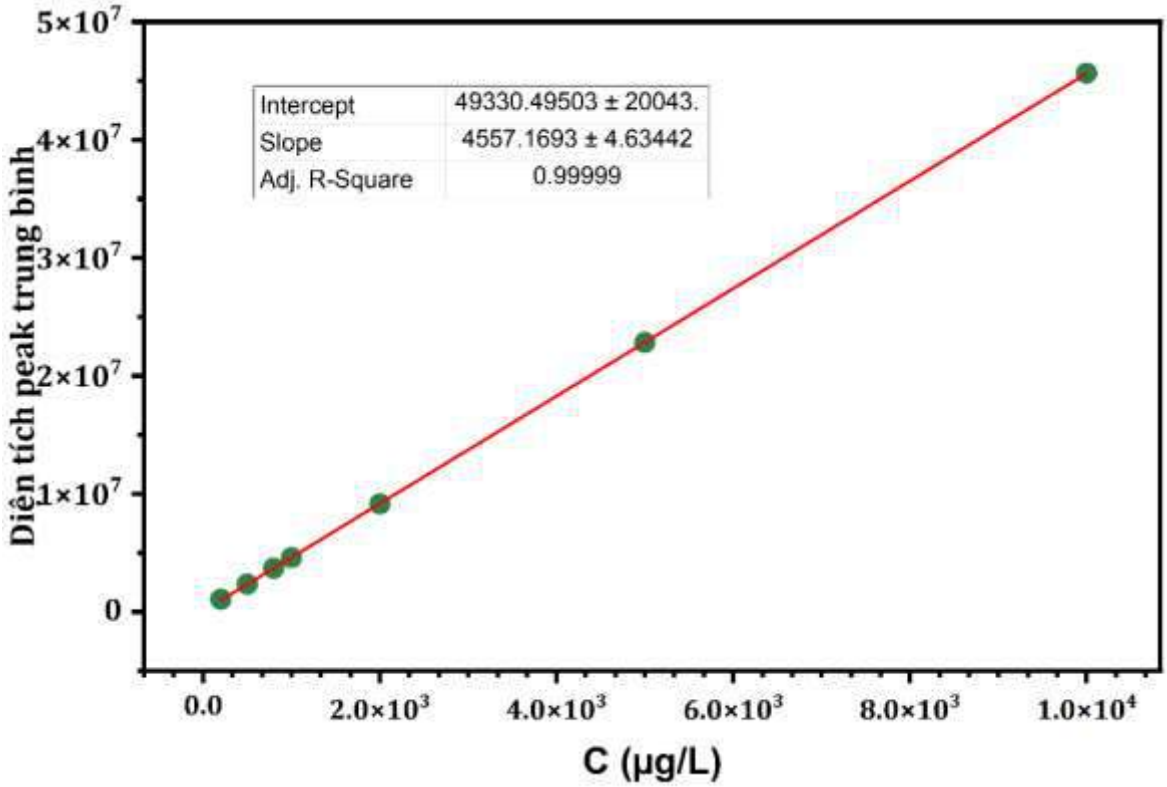
Trong các khảo sát riêng như 500–2.000 µg/L và 500–5.000 µg/L, giá trị R^2 tiệm cận 1, cho thấy mức độ tuyến tính cao và độ ổn định tốt của phương pháp (Bảng 3.20 và Hình 3.47c). Ngược lại, ở các khoảng quá rộng (ví dụ: 100–100.000 µg/L), giá trị R giảm xuống còn khoảng 0,86–0,88, phản ánh độ tuyến tính suy giảm do sự phân tán dữ liệu tăng ở nồng độ cao. Trong khi đó, ở các khoảng hẹp và trung bình, như 100–10.000 µg/L, giá trị R tiến gần 1,000, cho thấy phương pháp có tuyến tính rất tốt ở vùng nồng độ thấp và trung bình. Đường xu hướng cho thấy sự suy giảm rõ rệt và ổn định của R theo chiều tăng của khoảng nồng độ khảo sát, đặc biệt ở vùng cao.

Bảng 3.17 Hệ số tương quan R ứng với các khoảng nồng độ khảo sát Hg(II)

Khoảng nồng độ (µg/L)	**Hệ số tương quan R**
100÷100.000	0,8768
1000÷100.000	0,8628
10.000÷100.000	0,8594
100÷50.000	0,9328
100÷20.000	0,9972
100÷10.000	0,9999

DRAFT

3.4.4.4 Đường chuẩn hiệu chuẩn (Calibration Curve)



Hình 3.48 Đường chuẩn HPLC–DAD của phức $Hg(PLB)_2$

Sau khi tiến hành phân tích các mẫu chuẩn $Hg(PLB)_2$ với các nồng độ Hg lần lượt là: 200 µg/L, 500 µg/L, 800 µg/L, 1.000 µg/L, 2.000 µg/L, 5.000 µg/L và 10.000 µg/L trong điều kiện tối ưu đã khảo sát, kết quả cho thấy diện tích peak tăng tuyến tính theo nồng độ, thể hiện rõ mối tương quan giữa tín hiệu và nồng độ chất phân tích. Mối quan hệ tuyến tính được thể hiện rõ trong Hình 3.48 và bảng ở Phụ lục 61.

Việc phân tích các mẫu chuẩn $Hg(PLB)_2$ với nồng độ từ 100–100.000 µg/L bằng phương pháp HPLC–DAD cho thấy: Từ 200–20.000 µg/L peak đối xứng, diện tích peak tăng đều theo nồng độ đảm bảo tính tuyến tính cao, phù hợp cho định lượng. Tại 100 µg/L peak bị tách, độ phân giải kém không phù hợp để định lượng. Từ 50.000 µg/L trở lên xuất hiện tượng kéo đuôi peak, có thể do quá tải cột hoặc ảnh hưởng từ ma trận mẫu. Vì vậy, khoảng tuyến tính đáng tin cậy được xác định là từ 200–20.000 µg/L. Phương trình đường chuẩn tuyến tính thu được là:

$$S = 4.557{,}17 \times C + 49.330{,}49 \quad (R^2 = 0{,}9999)$$

Trong đó:

S là diện tích peak; *C* là nồng độ Hg(II) (µg/L)

Khoảng nồng độ từ 200–10.000 µg/L được chọn để xây dựng đường chuẩn, vì trong khoảng này peak đối xứng, ổn định; Hệ số tương quan R^2 = 0,9999 đã đạt mức tối ưu cho hiệu chuẩn.

Phụ lục 57 trình bày dữ liệu đường chuẩn, bao gồm diện tích peak trung bình và độ lệch chuẩn, được xử lý theo phân bố T-student với độ tin cậy 95% theo công thức:

$$S^2 = \sum_{i=1}^{3} \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$$

với n = 3

3.4.4.5 Đánh giá độ lặp lại của phương pháp phân tích

Để kiểm tra độ lặp lại của phương pháp HPLC–DAD, các phép đo lặp (n = 6) được thực hiện tại ba mức nồng độ: 20 µg/L, 40 µg/L, và 100 µg/L. Kết quả (Bảng 3.18) cho thấy %RSD của thời gian lưu, diện tích pic và nồng độ tính toán đều < 2%, đáp ứng tiêu chí chấp nhận cho độ lặp lại của phép đo định lượng.

DRAFT

Bảng 3.18 Kết quả kiểm tra độ lặp lại trong mẫu nước

(Trong điều kiện tối ưu: tốc độ dòng 0,8 mL/phút; bước sóng 224 nm; nhiệt độ 40°C; pH = 6; pha động H_2O:EtOH = 5:5)

Content	**t_R (Min)**	**Peak area**	**C**	**RSD % t_R**	**RSD % A**	**RSD %C**
0,5	2,237	2.345.398	0,503	0,4913	0,8112	0,8299
0,5	2,240	2.308.571	0,495			
0,5	2,227	2.289.713	0,493			
0,5	2,233	2.292.658	0,492			
0,5	2,223	2.310.581	0,496			
0,5	2,210	2.322.774	0,498			
1,0	2,537	4.553.957	0,988	0,6722	0,2838	0,2871
1,0	2,560	4.551.635	0,992			
1,0	2,580	4.579.212	0,994			
1,0	2,572	4.580.922	0,994			

DRAFT

1,0	2,584	4.565.184	0,990			
1,0	2,575	4.576.640	0,993			
2,0	2,689	9.148.627	1,996	0,7580	0,2947	0,2964
2,0	2,693	9.159.422	1,999			
2,0	2,710	9.151.900	1,997			
2,0	2,725	9.196.756	2,007			
2,0	2,737	9.215.959	2,011			
2,0	2,744	9.180.961	2,003			

DRAFT

3.4.4.6 Hiệu suất thu hồi của mẫu

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp HPLC–DAD trong xác định Hg(II), các thí nghiệm thêm chuẩn được tiến hành trên mẫu nền nước sông không chứa Hg(II). Ba mức nồng độ thêm chuẩn lần lượt: 200 µg/L, 400 µg/L và 1000 µg/L. Mỗi mức nồng độ được phân tích lặp lại 4 lần.

Kết quả (Bảng 3.23) cho thấy hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 95,2–103,4%, với độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) dao động từ 1,8–3,6%. Các giá trị này đều đáp ứng tiêu chí chấp nhận của AOAC và ICH (70–120% đối với thu hồi, %RSD < 15%)[196], chứng tỏ phương pháp HPLC–DAD có độ chính xác và độ tin cậy cao khi áp dụng cho phân tích Hg(II) trong mẫu nước sông.

DRAFT

Bảng 3.19 Hiệu suất thu hồi Hg(II) trong mẫu nước sông tại ba mức nồng độ chuẩn thêm (0,5; 1; 2 µg/L) kèm sai số

TT	Sample	C (µg/L)	DT peak	Hàm lượng Hg thực tế	HS thu hồi (%)	$\bar{X} \pm \varepsilon$ (%)
1	Sample	0	274.826	0,048		
2	Sample	0	248.663	0,042		
3	Sample	0	244.507	0,041		
4	Sample	0	267.388	0,046		
5	Sample+Sandard 1	200	2.615.648	207,144	103,46	102,757±1,018
6	Sample +Sandard 1	200	2.589.485	204,744	102,31	
7	Sample +Sandard 1	200	2.585.329	204,344	102,13	
8	Sample +Sandard 1	200	2.608.210	206,344	103,13	
9	Sample +Sandard 2	400	4.870.428	404,744	101,22	100,759±1,136
10	Sample +Sandard 2	400	4.814.265	399,944	99,99	

DRAFT

11	Sample +Sandard 2	400	4.830.109	401,544	100,33	
12	Sample +Sandard 2	400	4.882.990	405,944	101,49	
13	Sample +Sandard 3	1000	9.483.928	1.012,419	101,24	101,065±0,254
14	Sample +Sandard 3	1000	9.457.765	1.009,419	100,95	
15	Sample +Sandard 3	1000	9.453.609	1.008,919	100,91	
16	Sample +Sandard 3	1000	9.476.490	1.011,419	101,16	

DRAFT

3.4.4.7 So sánh với các phương pháp phân tích khác

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp HPLC–DAD sử dụng phức $Hg(PLB)_2$, phương pháp được so sánh với một số kỹ thuật phân tích phổ biến khác trong phân tích Hg(II), bao gồm: UV–Vis, AAS, ICP–MS, fluorescence probes, v.v. Kết quả so sánh trình bày trong Bảng 3.20 dưới đây.

Quan sát Bảng 3.20 có thể so với các phương pháp phân tích thủy ngân truyền thống như ICP–MS, AAS, hay các kỹ thuật điện hóa, phương pháp HPLC–DAD sử dụng phức $Hg(PLB)_2$ trong nghiên cứu này thể hiện nhiều ưu điểm nổi bật: Thời gian phân tích ngắn (2–3 phút) phù hợp cho các ứng dụng yêu cầu kết quả nhanh. Độ nhạy cao (LOD = 5,0 µg/L) và tính chọn lọc tốt, cho phép phát hiện Hg(II) ở nồng độ vết, đồng thời đơn giản hóa quy trình chuẩn bị mẫu. Chi phí vận hành thấp hơn đáng kể so với ICP–MS thích hợp cho các phòng thí nghiệm có ngân sách hạn chế hoặc triển khai ngoài hiện trường.

Tuy vẫn tồn tại một số hạn chế nhất định, như xử lý mẫu có phần phức tạp hơn so với các đầu dò huỳnh quang hay phương pháp đo màu, nhưng về độ chính xác và khả năng ứng dụng rộng, phương pháp này vẫn là một công cụ phân tích hiệu quả và đáng tin cậy để xác định Hg(II) trong môi trường và mẫu sinh học.

DRAFT

Bảng 3.20 So sánh hiệu quả các phương pháp phân tích Hg(II)

Phương pháp	**LOD (µg/L)**	**Thời gian**	**Chuẩn bị mẫu**	**Độ chọn lọc/ độ nhạy**	**Nhận xét, TLTK**
Nghiên cứu này (HPLC-DAD)	5,0	2–3 phút	Đơn giản, phản ứng với PLB	Cao/Cao	Nhanh, chọn lọc, chi phí thấp; phù hợp với phòng thí nghiệm tại hiện trường [197]
ICP-MS	0,1–0,5	~10 phút/mẫu	Phức tạp	Rất cao/Rất cao	Kỹ thuật tham chiếu; chi phí cao, không phải lúc nào cũng sẵn có[198]
AAS (CV-AAS, ETAAS)	0,5–10,0	5–15 phút	Thường yêu cầu xử lý trước	Cao/Trung bình	Được sử dụng rộng rãi; chi phí thấp hơn ICP-MS nhưng độ nhạy thấp hơn [199], [200]
Voltammetry	1,0–10,0	~15 phút	Often requires pretreatment	High/Medium	Nhạy, di động; có thể bị nhiễu do nền mẫu [201], [202]
Cảm biến huỳnh quang	1,0–100	<5 phút	Đơn giản (đầu dò + đệm)	Cao/Cao	Tiềm năng cao; thường bị hạn chế bởi độ ổn định/chọn lọc của đầu dò [203]
Phương pháp đo màu	>10	<10 phút	Đơn giản (thuốc thử + đệm)	Thấp–Trung bình / Thấp	Đơn giản và nhanh; độ chính xác và chọn lọc hạn chế [204], [205]

DRAFT

3.4.4.8 Ứng dụng phân tích mẫu thực

Bảng 3.21 Kết quả xác định hàm lượng Hg(II) trong một số mẫu nước mặt. *(Đơn vị: mg/L – theo tiêu chuẩn NF A08-811 và US EPA Method 200.8)*

STT	Mẫu	ICP-MS	Nghiên cứu này (HPLC-DAD)
1	R1	0,034 ± 0.002	0,044 ± 0,002
2	R2	0,030 ± 0.001	0,033 ± 0,001
3	R3	0,032 ± 0.001	0,035 ± 0,001
4	R4	0,036 ± 0.001	0,036 ± 0,001

Mẫu nước mặt (R1–R4) có hàm lượng Hg(II) dao động từ 0,030–0,044 mg/L. Kết quả phân tích bằng phương pháp HPLC–DAD so sánh với ICP–MS cho thấy độ sai lệch nhỏ (ví dụ: 0,034 so với 0,044 mg/L ở mẫu R1), chứng tỏ phương pháp đề xuất có độ chính xác và khả năng áp dụng thực tiễn tốt. Khoảng nồng độ Hg thu được gần như không chênh lệch đáng kể giữa hai phương pháp, cho thấy tính tin cậy của quy trình phân tích.

Khi so sánh với giới hạn tối đa cho phép của Hg trong nước uống theo tiêu chuẩn WHO (0,006 mg/L), các mẫu nước mặt này đều vượt ngưỡng nhiều lần, phản ánh các nguồn nước này không phù hợp cho mục đích sinh hoạt nếu chưa xử lý, đồng thời gây nguy cơ tiềm ẩn cho sức khỏe cộng đồng và môi trường. Điều này chứng minh phương pháp HPLC–DAD không chỉ có độ nhạy và độ chính xác cao, mà còn hoàn toàn khả thi để áp dụng trong giám sát chất lượng nước và đánh giá rủi ro môi trường.

3.4.4.9 Đánh giá mức độ "xanh" của phương pháp

Phương pháp phân tích Hg sử dụng phức $Hg(PLB)_2$ bằng HPLC–DAD đáp ứng rất tốt tiêu chí hóa học xanh như không độc hại, tiêu thụ ít dung môi, hiệu suất cao, chi phí thấp, an toàn với người vận hành và môi trường. Đây là giải pháp phân tích xanh,

bền vững, và có tiềm năng triển khai rộng rãi, đặc biệt trong kiểm tra môi trường, nước thải công nghiệp và chất thải điện tử.

Dựa theo bộ tiêu chuẩn đề xuất bởi Tobiszewski cùng cộng sự, 2015 [206] thường dùng trong GAC tổng điểm 10/12 (hai tiêu chí tái chế, và phân tích tại hiện trường chưa đạt mức tốt) tiêu chí đạt mức "tốt" hoặc "rất tốt". Phương pháp phân tích Hg bằng HPLC–DAD qua tạo phức $Hg(PLB)_2$ đáp ứng rất tốt tiêu chuẩn của hóa học phân tích xanh, vừa nhạy, chính xác, lại thân thiện môi trường, an toàn, và thực tiễn.

❖ Kết luận

Phần nghiên cứu này đã phát triển thành công một phương pháp phân tích HPLC–DAD dựa trên phức $Hg(PLB)_2$, cho phép xác định nhanh và hiệu quả hàm lượng Hg(II) trong các mẫu môi trường. Các điều kiện sắc ký tối ưu và các thông số đánh giá hiệu năng phương pháp đã được xác lập, như thể hiện trong Bảng 3.22 dưới đây.

DRAFT

Bảng 3.22 Tóm tắt các điều kiện tối ưu và đặc tính của phương pháp HPLC–DAD sử dụng phức $Hg(PLB)_2$ trong phân tích Hg(II)

Tiêu chí	Nội dung
Tên phương pháp	HPLC–DAD sử dụng phức $Hg(PLB)_2$
Mục đích áp dụng	Xác định Hg(II) trong mẫu môi trường
Điều kiện sắc ký tối ưu	- Bước sóng phát hiện: 224 nm - pH: 6,0 - Pha động: H_2O:EtOH = 1:1 (v/v) - Nhiệt độ cột: 40°C
Đặc tính phương pháp	- LOD: 5,0 µg/L; - LOQ: 20,0 µg/L - Tính tuyến tính cao: $R^2 > 0,994$ - Độ lặp lại tốt, phù hợp tiêu chuẩn AOAC
So sánh với ICP–MS	Sai lệch thấp, kết quả nhất quán
Ưu điểm nổi bật	- Thân thiện môi trường - Thời gian phân tích ngắn (~2–3 phút) - Chi phí thấp, phù hợp với phòng thí nghiệm ngân sách hạn chế hoặc ứng dụng ngoài hiện trường
Ứng dụng thực tế	- Phân tích mẫu nước mặt - Pin nút áo; Bóng đèn huỳnh quang
Kết luận tổng quát	Là phương pháp thay thế hiệu quả, đáng tin cậy cho ICP–MS trong phân tích Hg(II)

Phương pháp này không chỉ đáp ứng các tiêu chí kỹ thuật như độ nhạy, độ chính xác và tính lặp lại, mà còn phù hợp với xu hướng phân tích xanh, tiết kiệm chi phí và thời gian. Do đó, nó có thể được đề xuất như một giải pháp thay thế hiệu quả cho ICP–MS trong các ứng dụng phân tích môi trường hoặc ngoài hiện trường.

DRAFT

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luân

Luận án đã nghiên cứu sự tạo phức giữa PLB với các ion kim loại Cr(III), Hg(II) và Ti(IV). Các kết quả chính có thể tóm tắt như sau:

- Lần đầu tiên đã tổng hợp thành công ba phức chất $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và $Ti(PLB)_2$. Thành phần phối trí được xác định là 1:3 (Đối với phức Cr), 1:2 (đối với phức Hg(II), Ti(IV)) với PLB, thông qua các phương pháp nghiên cứu phổ biến trong PTN;

- Cơ chế tương tác của PLB với ion kim loại đã được nghiên cứu và làm rõ. Phức $Ti(PLB)_2$ phát xạ mạnh nhờ làm cứng cấu trúc và hạn chế dao động phi bức xạ, phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ gây dập tắt tĩnh, được xác nhận qua biểu đồ Stern–Volmer, phổ UV–Vis và DFT. Phân tích trạng thái rắn và mô phỏng DFT cho thấy sự phối trí qua nhóm –OH và =O của PLB, hình thành cấu trúc bát diện biến dạng (Cr(III)) hoặc tứ diện biến dạng (Ti(IV), Hg(II));

- Ứng dụng sinh học được chứng minh với kết quả *in vitro*, khẳng định tiềm năng kháng ung thư và kháng tiểu đường các kết quả này phù hợp với mô phỏng *docking* và MD, thể hiện sự gắn kết bền với vị trí Trp214 trên HSA và các enzyme đích (Topoisomerase, Bcl-2, α-glucosidase);

- Phức $Ti(PLB)_2$ gây hiệu ứng phát huỳnh quang, mở ra hướng ứng dụng trong phân tích định lượng. Đã xây dựng quy trình phân tích định lượng dựa trên tạo phức: Phức $Ti(PLB)_2$ cho phép định lượng Ti(IV) với độ nhạy cao (LOD ~10^{-7} M), ứng dụng thành công trên mẫu cát;

Phức $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ gây dập tắt huỳnh quang, thể hiện sự hình thành phức và có thể khai thác cho mục tiêu sinh học và đầu dò huỳnh quang. Phức $Hg(PLB)_2$ được ứng dụng định lượng Hg(II) bằng HPLC–DAD, thời gian lưu ổn định, LOD 0,25 µM, độ lặp lại tốt (RSD < 2%), độ chọn lọc cao. Ngoài ra, hiệu ứng dập huỳnh quang còn hỗ trợ xác định tương tác với protein HSA, cho thấy tiềm năng vận dụng phản ứng HSA với phức Cr(III), Hg(II) vào mục đích nghiên cứu dẫn truyền thuốc.

DRAFT

❖ Đóng góp mới của luận án

Lần đầu tiên, ba phức chất $Ti(PLB)_2$, $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ đã được tổng hợp và đặc trưng thành công ở cả dung dịch và rắn, bằng cách kết hợp đồng bộ các phương pháp thực nghiệm (UV–Vis, huỳnh quang, FT-IR, XRD, XPS...) và mô phỏng lý thuyết (DFT, docking, MD);

Phát hiện tiềm năng sinh học của các phức chất, đặc biệt là hoạt tính kháng tế bào ung thư và kháng tiểu đường, đồng thời định hướng cho nghiên cứu dẫn truyền và gắn kết với protein vận chuyển dược chất;

Ứng dụng thành công phương pháp huỳnh quang và HPLC–DAD trong định lượng chọn lọc và chính xác các ion kim loại Ti(IV)) và Hg(II) thông qua các phức tương ứng, mở ra hướng phát triển đầu dò hóa học và phân tích dấu vết kim loại.

2. Kiến nghị

Trong khuôn khổ luận án chỉ tiến hành một số tính chất và hướng ứng dụng của phức, nếu được tiếp tục phát triển sau luận án sẽ mở rộng các hướng chính sau đây:

- Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sinh học, thực hiện thử nghiệm trong *vitro* (gắn kết với tế bào, enzyme thật) để đánh giá tác động kháng viêm và chống ung thư của các phức;

- Mô phỏng thêm tương tác với các mục tiêu sinh học cụ thể (VD: DNA, albumin người, thụ thể tế bào ung thư) nhằm xác định rõ cơ chế hoạt động ở cấp độ phân tử;

- Nghiên cứu sử dụng PLB như các đầu dò nhạy phát hiện Cr(III), Hg(II);

- Thiết kế dẫn xuất PLB mới, biến đổi cấu trúc PLB (methyl hóa, halogen hóa...) để khảo sát ảnh hưởng của nhóm thế đến khả năng tạo phức, tính chọn lọc và phát xạ.Từ đó phát triển các thuốc thử có cấu trúc cải tiến, tối ưu hơn về độ nhạy và ứng dụng sinh học;

- Xây dựng sensor rắn (màng mỏng hoặc giấy) tích hợp $Ti(PLB)_2$ hoặc đầu dò Cr/Hg hướng đến đo nhanh tại hiện trường bằng thiết bị huỳnh quang cầm tay, phục vụ ứng dụng trong phân tích môi trường và y sinh.

DRAFT

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

I. Tạp chí trong nước

01. Tran Nguyen Minh An, **Nguyen Van Thoi***, Nguyen Thi Kim Anh, Le Van Tan, "Applicability of analysis, prediction of antidiabetic activity in silico docking-admet model and bioactivity based on $Ti(PLB)_2$ complex," *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*. Tập 30, Số 01, 2024.

II. Tạp chí quốc tế (WoS/Scopus)

01. **Nguyen Van Thoi** , Tran Nguyen Minh An* , Nguyen Quoc Hung, Pham Van Tat , Le Van Tan*, "The spectroscopic properties and capability of a new and selective complex of Ti-PLB for analyzing titanium in sand samples," *Microchemical Journal*, Vol. 194, pp. 109221, 2023. https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109221 (**Q1, IF=4.9**).

02. **Nguyen Van Thoi**, Do Thi Thao, Tran Nguyen Minh An*, Le Van Tan* (2025), "Synthesis, characterization and preliminary biological evaluation of novel Hg(PLB)2 and Cr(PLB)3 complexes," *Inorganic Chemistry Communications*, Vol. 177, pp. 114333, 2025. https://doi.org/10.1016/j.inoche.2025.114333 **(Q1, IF=4.4**).

03. **Nguyen Van Thoi**, Tran Khanh Luan, Tran Phuoc Vy, Tran Nguyen Minh An*, Le Van Tan*, "Binding mechanism of $Cr(PLB)_3$ and $Hg(PLB)_2$ complexes with human serum albumin: spectroscopic, thermodynamic, and molecular docking investigations," *Results in Chemistry*, Vol. 16, pp. 102429, 2025. (**Q2**) https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102429.

DRAFT

II. Hội nghị quốc tế

Le Van Tan, **Nguyen Van Thoi**, Tran Nguyen Minh An, "Inhibition of antidiabetic properties, biological activity and combination with prediction in silico Docking-Admet model base on $Ti(PLB)_2$ complex," *International Conference on Biomedical Chemistry and Applications - (ICBCA-24), Incheon, Sounth Korea*, 2024.

III. Hội nghị trong nước

Nguyen Van Thoi, Tran Nguyen Minh An, Le Van Tan, "Novel Hg(II) -Plumbagin complexes: synthesis, properties, *in vitro* anti-cancer, anti-inflammatory, and alphaglucosidase inhibition activities and in silico study," *Hoá học xanh miền trung Tây nguyên lần thứ 2*, 2024.

Nguyen Van Thoi, Tran Nguyen Minh An, Le Van Tan, "Khả năng ứng dụng phân tích, dự báo hoạt tính kháng tiểu đường trong silico docking- Mô hình ADMET và hoạt tính sinh học dựa trên phức $Ti(PLB)_2$, *Hội thảo khoa học khao công nghệ Hoá học và Đại học Khoa học Huế*, 2024.

IV. Đề tài khoa học

STT	Tên đề tài	Mã số	Cấp	Vai trò	Thời gian thực hiện
1	Nghiên cứu phức chất của Plumbagin với Ti(IV) trong dung dịch và ứng dụng	22/2HHSV01	Trường	Chủ nhiệm đề tài	Năm 2023
2	Phức chất của Plumbagin với Hg(II), Cr(III): tổng hợp, tính chất phức, hoạt tính sinh học và nghiên cứu in silico docking phân tử và mô phỏng	24.1/HHSV05	Trường	Chủ nhiệm đề tài	Năm 2024

DRAFT

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Havel and Peter J, "A scientific review: the role of chromium in insulin resistance," *The Science of Diabetes Self-Management and Care, Suppl(3 SUPPL.)*, no. 2635–0106, pp. 2–14, 2004.

[2] T. W. Clarkson *et al.*, "The Toxicology of Mercury-Current Exposures and Clinical Manifestations," 2003. [Online]. Available: www.nejm.org

[3] S. Salunke-Gawali *et al.*, "Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone," Nov. 15, 2017, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.molstruc.2017.06.130.

[4] K. Satheeshkumar *et al.*, "Prospects of Plumbago rosea L. hairy root culture in traditional preparations: A phytochemical comparison with tuberous roots," *Plant Root*, vol. 8, pp. 13–23, Sep. 2014, doi: 10.3117/plantroot.8.13.

[5] A. A. Gesawat and F. Shakeel, "Synthesis and characterization of ternary complexes of chromium(III) with L-histidine and various diols," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. S2575–S2579, May 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.09.032.

[6] M. Scarpi-Luttenauer *et al.*, "Synthesis, structure and functions of discrete titanium-based multinuclear architectures," *Coord Chem Rev*, vol. 459, p. 214439, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214439.

[7] T. Hajiashrafi *et al.*, "Hg(II) coordination complexes containing the tris(2-pyridylmethyl)amine phối tử: Synthesis, characterization and crystal structure analysis," *Polyhedron*, vol. 119, pp. 260–266, 2016, doi: 10.1016/j.poly.2016.09.015.

DRAFT

[8] G. Navarro-Tovar *et al.*, "The Relevance and Insights on 1,4-Naphthoquinones as Antimicrobial and Antitumoral Molecules: A Systematic Review," *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 4, p. 496, Mar. 2023, doi: 10.3390/ph16040496.

[9] C.-H. Leung *et al.*, "Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses," *Chem Sci*, vol. 6, no. 2, pp. 871–884, 2015, doi: 10.1039/C4SC03094J.

[10] D. B. Kitchen *et al.*, "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, no. 11, pp. 935–949, Nov. 2004, doi: 10.1038/nrd1549.

[11] E. Lionta *et al.*, "Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances," *Curr Top Med Chem*, vol. 14, no. 16, pp. 1923–1938, Oct. 2014, doi: 10.2174/1568026614666140929124445.

[12] M. D. Vasudevarao *et al.*, "Naphthoquinone-mediated inhibition of lysine acetyltransferase KAT3B/p300, basis for non-toxic inhibitor synthesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 11, pp. 7702–7717, Mar. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.486522.

[13] D. Sajan *et al.*, "Vibrational spectra and density functional theoretical calculations on the antitumor drug, plumbagin," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 36, no. 10, pp. 1001–1011, 2005, doi: 10.1002/jrs.1398.

[14] S. Salunke-Gawali *et al.*, "Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone," Nov. 15, 2017, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.molstruc.2017.06.130.

[15] E. B. A. Adusei *et al.*, "Investigation of acid-base indicator property of plumbagin from plumbago zeylanica linn," *Int J Anal Chem*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4061927.

DRAFT

[16] C. Padumadasa *et al.*, "DNA intercalation and cleavage studies of plumbagin and phenanthroline-based Cu(II) complex, [Cu(PLN)(PHEN)]NO3," *~ 87 ~ International Journal of Chemical Studies*, vol. 4, no. 4, 2016.

[17] E. B. A. Adusei *et al.*, "Investigation of acid-base indicator property of plumbagin from plumbago zeylanica linn," *Int J Anal Chem*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4061927.

[18] M. Thiruchenduran *et al.*, "'Synergistic anticancer effect of combined use of (plumbagin, cis-Isoshinanolone, 3'-O-β-glucopyranosyl plumbagic acid) isolated from *Plumbago zeylanica* , induces cell death through apoptosis in human HepG2 cancer cells,'" Mar. 25, 2025. doi: 10.1101/2025.03.21.644655.

[19] L.-O. Klotz *et al.*, "1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling," *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 14902–14918, Sep. 2014, doi: 10.3390/molecules190914902.

[20] S. D. Shahida Parveen *et al.*, "Synthesis, Characterization, and DNA Binding Studies of Nanoplumbagin," *J Nanomater*, vol. 2014, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.1155/2014/179149.

[21] K. Satheeshkumar *et al.*, "Prospects of Plumbago rosea L. hairy root culture in traditional preparations: a phytochemical comparison with tuberous roots," *Plant Root*, vol. 8, no. 0, pp. 13–23, 2014, doi: 10.3117/plantroot.8.13.

[22] S. V. Rodrigues *et al.*, "UV/Vis spectra and solubility of some naphthoquinones, and the extraction behavior of plumbagin from Plumbago scandens roots in supercritical CO2," *Anal Bioanal Chem*, vol. 385, no. 5, pp. 895–900, Jul. 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0502-6.

[23] G. Pereira *et al.*, "Determination of Plumbagin in Plant Extracts and Polyherbal Formulations by High-Performance Liquid Chromatography with

DRAFT

Fluorescence Detection," *Anal Lett*, vol. 48, no. 18, pp. 2811–2818, Dec. 2015, doi: 10.1080/00032719.2015.1052973.

[24] J. Sunny *et al.*, "Unveiling the intersystem crossing dynamics in N-annulated perylene bisimides," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 25, no. 41, pp. 28428–28436, Oct. 2023, doi: 10.1039/d3cp03888b.

[25] F. A. Qais *et al.*, "Deciphering the interaction of plumbagin with human serum albumin: A combined biophysical and molecular docking study," *J King Saud Univ Sci*, vol. 32, no. 6, pp. 2854–2862, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jksus.2020.07.008.

[26] F. A. Qais *et al.*, "Deciphering the interaction of plumbagin with human serum albumin: A combined biophysical and molecular docking study," *J King Saud Univ Sci*, vol. 32, no. 6, pp. 2854–2862, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jksus.2020.07.008.

[27] S. P. Santoso *et al.*, "Unlocking the Potential of Gallic Acid-Based Metal Phenolic Networks for Innovative Adsorbent Design," Mar. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules30061218.

[28] V. S. Fedenko *et al.*, "Metallophenolomics: A Novel Integrated Approach to Study Complexation of Plant Phenolics with Metal/Metalloid Ions," Oct. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms231911370.

[29] B. I. Kharisov *et al.*, "Review: Coordination chemistry of o-quinone complexes," 2002, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/0095897022000001511.

[30] A. L. Chibac-Scutaru and G. Roman, "Fluorescence sensing of metal ions in solution using a morpholine-containing phenolic Mannich base of 1′-hydroxy-2′-acetonaphthone," *RSC Adv*, vol. 14, no. 52, pp. 38590–38604, Dec. 2024, doi: 10.1039/d4ra07200f.

[31] B. Anupama, “Comparative sensor studies for metal ion detection by Schiff base,” 2020.

[32] N. S. Chundawat *et al.*, “Lanthanide complexes as anticancer agents: A review,” Oct. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.poly.2021.115387.

[33] Z. F. Chen *et al.*, “Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity evaluation of five Lanthanide(III)-Plumbagin complexes,” *J Inorg Biochem*, vol. 105, no. 3, pp. 426–434, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.003.

[34] S. Mukherjee *et al.*, “Copper-Plumbagin Complex Produces Potent Anticancer Effects by Depolymerizing Microtubules and Inducing Reactive Oxygen Species and DNA Damage,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 3, pp. 3221–3235, Jan. 2023, doi: 10.1021/ACSOMEGA.2C06691.

[35] M. Tan *et al.*, “Antioxidant activities of plumbagin and its Cu (II) complex,” *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/898726.

[36] P. Appadurai and K. Rathinasamy, “Plumbagin-silver nanoparticle formulations enhance the cellular uptake of plumbagin and its antiproliferative activities,” *IET Nanobiotechnol*, vol. 9, no. 5, pp. 264–272, Oct. 2015, doi: 10.1049/iet-nbt.2015.0008.

[37] A. Roy, “Plumbagin: A Potential Anti-cancer Compound,” *Mini Rev Med Chem*, vol. 20, Nov. 2020, doi: 10.2174/1389557520666201116144421.

[38] A. A. Powolny and S. V. Singh, “Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species,” *Pharm Res*, vol. 25, no. 9, pp. 2171–2180, Sep. 2008, doi: 10.1007/s11095-008-9533-3.

[39] S. K. Sandur *et al.*, “Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-κB activation and NF-κB-regulated gene products through modulation of p65 and IκBα kinase activation, leading to

DRAFT

potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 25, pp. 17023–17033, Jun. 2006, doi: 10.1074/jbc.M601595200.

[40] T. Wang *et al.*, "Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264.7 cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 64, pp. 177–183, 2014, doi: 10.1016/j.fct.2013.11.027.

[41] Y. Su *et al.*, "Inhibition o. The TLR/NF- κ B Signaling Pathway and Improvement of Autophagy Mediates Neuroprotective Effects of Plumbagin in Parkinson's Disease," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/1837278.

[42] X. Chen *et al.*, "Synergistic effect and mechanism of plumbagin with gentamicin against carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae," *Infect Drug Resist*, vol. 13, pp. 2751–2759, 2020, doi: 10.2147/IDR.S265753.

[43] S. A. Pai *et al.*, "Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation and oxidative stress," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 111, pp. 686–694, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.139.

[44] S. Salunke-Gawali *et al.*, "Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone," Nov. 15, 2017, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.molstruc.2017.06.130.

[45] H. Rekhi *et al.*, "A Review on Recent Applications of High-Performance Liquid Chromatography in Metal Determination and Speciation Analysis," Nov. 02, 2017, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/10408347.2017.1343659.

[46] P. Babula *et al.*, "Simultaneous determination of 1, 4-naphtoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection," *Biomed paper*, vol. 149, no. 1, p. 25, 2005.

DRAFT

[47] V. Nour *et al.*, “HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves,” *J Chromatogr Sci*, vol. 51, no. 9, pp. 883–890, Oct. 2013, doi: 10.1093/chromsci/bms180.

[48] N. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*. Butterworth-Heinemann: Elsevier, 2012.

[49] B. N. Figgis and M. A. Hitchman, *Phối tử field theory and its applications*, 1st ed., vol. N/A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999.

[50] F. C. Hawthorne and O. C. Gagné, “New ion radii for oxides and oxysalts, fluorides, chlorides and nitrides,” *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater*, vol. 80, no. Pt 4, pp. 326–339, Aug. 2024, doi: 10.1107/S2052520624005080.

[51] R. G. Pearson, “Hard and soft acids and bases,” *J Am Chem Soc*, vol. 85, no. 22, pp. 3533–3539, 1963.

[52] E. Wiberg and N. Wiberg, *Inorganic chemistry*. Academic press, 2001.

[53] B. Henderson and G. F. Imbusch, *Optical spectroscopy of inorganic solids*, vol. 44. Oxford University Press, 2006.

[54] C. E. Housecroft and A. G. Sharpe, *Inorganic Chemistry*, 2nd ed., vol. 628. Harlow: UK: Pearson Education, 2005. [Online]. Available: www.pearsoned.co.uk/housecroft

[55] Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. New York: Springer: Springer US, 2006. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.

[56] S. Gómez-Ruiz *et al.*, “Cytotoxic studies of substituted titanocene and ansa-titanocene anticancer drugs,” *J Inorg Biochem*, vol. 102, no. 8, pp. 1558–1570, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.JINORGBIO.2008.02.001.

DRAFT

[57] J. B. Vincent, “Chromium: is it essential, pharmacologically relevant, or toxic?,” *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, pp. 171–198, 2013.

[58] R. A. Anderson, “Chromium in the prevention and control of diabetes,” *Diabetes Metab*, vol. 26, no. 1, pp. 22–28, 2000.

[59] B. Musikavanhu *et al.*, “A simple quinoline-thiophene Schiff base turn-off chemosensor for Hg2+ detection: spectroscopy, sensing properties and applications,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 264, p. 120338, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.SAA.2021.120338.

[60] S. P. Cao *et al.*, “An ultrasensitive electrochemiluminescence resonance energy transfer biosensor for divalent mercury monitoring,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 856, p. 113494, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.JELECHEM.2019.113494.

[61] H. Kargar *et al.*, “Titanium(IV) complex containing ONO-tridentate Schiff base phối tử: Synthesis, crystal structure determination, Hirshfeld surface analysis, spectral characterization, theoretical and computational studies,” *J Mol Struct*, vol. 1241, p. 130653, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2021.130653.

[62] M. Ganesan and S. Arockiasamy, “A review of titanium (IV) complexes of Schiff base phối tửs and their derivatives containing the donor atoms ONO, ONON, ONNO, and heterocyclic exhibiting biological activity covered over two decades along with the significance of molecular docking,” *Discover Chemistry*, vol. 2, no. 1, Jan. 2025, doi: 10.1007/s44371-024-00064-0.

[63] E. Uddin *et al.*, “Emerging pharmaceutically active drugs: synthesis and pharmacology of Schiff base phối tửs with their metal complexes,” *Discover Chemistry*, vol. 2, no. 1, Jun. 2025, doi: 10.1007/s44371-025-00228-6.

DRAFT

[64] B. Musikavanhu *et al.*, “A simple quinoline-thiophene Schiff base turn-off chemosensor for Hg2+ detection: spectroscopy, sensing properties and applications,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 264, p. 120338, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.SAA.2021.120338.

[65] S. Prabu and S. Mohamad, “Curcumin/beta-cyclodextrin inclusion complex as a new ‘turn-off’ fluorescent sensor system for sensitive recognition of mercury ion,” *J Mol Struct*, vol. 1204, p. 127528, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127528.

[66] F.-Y. Wu *et al.*, “Curcumin as a colorimetric and fluorescent chemosensor for selective recognition of fluoride ion,” *J Lumin*, vol. 130, no. 2, pp. 304–308, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jlumin.2009.09.007.

[67] Bernard. Valeur, *Molecular fluorescence : principles and applications*. Wiley-VCH, 2002.

[68] K. P. Carter *et al.*, “Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems,” Apr. 23, 2014, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/cr400546e.

[69] A. M. May and J. L. Dempsey, “A new era of LMCT: leveraging phối tử-to-metal charge transfer excited states for photochemical reactions,” Apr. 17, 2024, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d3sc05268k.

[70] A. M. May and J. L. Dempsey, “A new era of LMCT: leveraging phối tử-to-metal charge transfer excited states for photochemical reactions,” Apr. 17, 2024, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d3sc05268k.

[71] C. E. Housecroft and A. G. Sharpe, “Inorganic Chemistry,” Pearson Education, 2005. [Online]. Available: www.pearsoned.co.uk/housecroft

[72] N. A. Romero and D. A. Nicewicz, “Organic Photoredox Catalysis,” *Chem Rev*, vol. 116, no. 17, pp. 10075–10166, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00057.

DRAFT

[73] C. Daniel, “Photochemistry and photophysics of transition metal complexes: Quantum chemistry,” *Coord Chem Rev*, vol. 282–283, pp. 19–32, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.CCR.2014.05.023.

[74] C. E. McGhee *et al.*, “DNAzyme sensors for detection of metal ions in the environment and imaging them in living cells,” Jun. 01, 2017, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.copbio.2017.03.002.

[75] Y. Shi *et al.*, “Fluorescent Sensors for Detecting and Imaging Metal Ions in Biological Systems: Recent Advances and Future Perspectives,” *Chemosensors*, vol. 11, no. 4, p. 226, Apr. 2023, doi: 10.3390/chemosensors11040226.

[76] Pooja and P. Chowdhury, “Functionalized CdTe fluorescence nanosensor for the sensitive detection of water borne environmentally hazardous metal ions,” *Opt Mater (Amst)*, vol. 111, p. 110584, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.optmat.2020.110584.

[77] J. Mandal *et al.*, “Two rhodamine-azo based fluorescent probes for recognition of trivalent metal ions: crystal structure elucidation and biological applications,” *Dalton Transactions*, vol. 51, no. 40, pp. 15555–15570, 2022, doi: 10.1039/D2DT00399F.

[78] N. M. Sarih *et al.*, “Furo[3,2-c]coumarin-derived Fe3+ Selective Fluorescence Sensor: Synthesis, Fluorescence Study and Application to Water Analysis,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63262-7.

[79] S. Zehra *et al.*, “Coumarin Derived ‘Turn on’ Fluorescent Sensor for Selective Detection of Cadmium (II) Ion: Spectroscopic Studies and Validation of Sensing Mechanism by DFT Calculations,” *J Fluoresc*, vol. 29, no. 4, pp. 1029–1037, Jul. 2019, doi: 10.1007/s10895-019-02416-x.

DRAFT

[80] S.-D. He *et al.*, "A Novel Coumarin-Based Fluorescence Turn-On Probe for Highly Sensitive and Selective Detection of Hg2+ in Water Samples," 2025. doi: 10.2139/ssrn.5102641.

[81] J. Nootem *et al.*, "BODIPY-Pyridylhydrazone Probe for Fluorescence Turn-On Detection of Fe3+ and Its Bioimaging Application," *Chemosensors*, vol. 9, no. 7, p. 165, Jul. 2021, doi: 10.3390/chemosensors9070165.

[82] M. ÜÇÜNCÜ, "A BODIPY based probe for the reversible 'turn on' detection of Au(III) ions," *Turk J Chem*, vol. 46, no. 2, pp. 523–529, Jan. 2022, doi: 10.55730/1300-0527.3325.

[83] C. An *et al.*, "A highly selective and sensitive flavonoid fluorescent probe for the detection of Al3+ in aqueous environments and its application in cellular imaging," Sep. 12, 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-3326484/v1.

[84] C. S. Abeywickrama *et al.*, "A bright red-emitting flavonoid for Al^{3+} detection in live cells without quenching ICT fluorescence," *Chemical Communications*, vol. 55, no. 49, pp. 7041–7044, 2019, doi: 10.1039/C9CC02322D.

[85] S. K. Sahoo and G. Crisponi, "Recent Advances on Iron(III) Selective Fluorescent Probes with Possible Applications in Bioimaging.," *Molecules*, vol. 24, no. 18, Sep. 2019, doi: 10.3390/molecules24183267.

[86] S. Gharami *et al.*, "A Phenanthraquinone Based Fluorescent Probe for Sequential Detection of Cu2+ and SO3 2−," *J Fluoresc*, vol. 26, no. 6, pp. 2113–2118, Nov. 2016, doi: 10.1007/s10895-016-1907-z.

[87] Y. Shinohara *et al.*, "A fluorescent turn-on probe for Hg2+ with a high contrast designed by manipulating functional groups tethered to naphthalimide," *J Photochem Photobiol A Chem*, vol. 371, pp. 407–413, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.jphotochem.2018.11.034.

DRAFT

[88] P. Srisuwan *et al.*, “Highly sensitive and selective coumarin-based fluorescent chemosensor for Cu2+ detection,” *J Photochem Photobiol A Chem*, vol. 427, p. 113841, May 2022, doi: 10.1016/j.jphotochem.2022.113841.

[89] S. C. S. Pinto *et al.*, “Colorimetric Chemosensor for Cu2+ and Fe3+ Based on a meso-Triphenylamine-BODIPY Derivative,” *Sensors*, vol. 23, no. 15, p. 6995, Aug. 2023, doi: 10.3390/s23156995.

[90] C. An *et al.*, “Flavonoid Compounds as Fluorescent Probes for High Sensitivity and Selectivity for the Detection of Al3+ Ions,” 2023. doi: 10.2139/ssrn.4425392.

[91] M. C. Romeu *et al.*, “Synthesis, crystal structure, ATR-FTIR, FT-Raman and UV spectra, structural and spectroscopic analysis of (3E)-4-[4-(dimethylamine)phenyl]but-3-en-2-one,” *J Mol Struct*, vol. 1264, p. 133222, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2022.133222.

[92] D. C. Grills *et al.*, “Kinetic studies of the photoinduced formation of transition metal–dinitrogen complexes using time-resolved infrared and UV–vis spectroscopy,” *Coord Chem Rev*, vol. 250, no. 13–14, pp. 1681–1695, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.CCR.2006.01.002.

[93] M. H. Keefe *et al.*, “Luminescent sensor molecules based on coordinated metals: a review of recent developments,” *Coord Chem Rev*, vol. 205, no. 1, pp. 201–228, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0010-8545(00)00240-X.

[94] N. Georgiou *et al.*, “Docking, MD Simulations, and DFT Calculations: Assessing W254’s Function and Sartan Binding in Furin,” *Curr Issues Mol Biol*, vol. 46, no. 8, pp. 8226–8238, Jul. 2024, doi: 10.3390/cimb46080486.

[95] D. B. Singh, *Computer-Aided Drug Design*. Springer Singapore, 2020. doi: 10.1007/978-981-15-6815-2.

DRAFT

[96] M. Goyal *et al.*, "Development of dual inhibitors against Alzheimer's disease using fragment-based QSAR and molecular docking," *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/979606.

[97] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J Comput Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, Jan. 2010, doi: 10.1002/jcc.21334.

[98] R. A. Friesner *et al.*, "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy," *J Med Chem*, vol. 47, no. 7, pp. 1739–1749, Mar. 2004, doi: 10.1021/jm0306430.

[99] D. W. Ritchie, "Evaluation of Protein Docking Predictions Using Hex 3.1 in CAPRI Rounds 1 and 2," 2003. [Online]. Available: http://capri.ebi.ac.uk

[100] S. Vilar *et al.*, "Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery," *Curr Top Med Chem*, vol. 8, 2008.

[101] P. C. Agu *et al.*, "Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40160-2.

[102] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, "Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 19, pp. 6665–6670, May 2005, doi: 10.1073/pnas.0408037102.

[103] M. Levitt and A. Warshel, "Computer simulation of protein folding," *Nature*, vol. 253, no. 5494, pp. 694–698, Feb. 1975, doi: 10.1038/253694a0.

DRAFT

[104] M. Karplus and J. Kuriyan, “Molecular dynamics and protein function,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 19, pp. 6679–6685, May 2005, doi: 10.1073/pnas.0408930102.

[105] J. R. Perilla *et al.*, “Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes,” *Curr Opin Struct Biol*, vol. 31, pp. 64–74, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.sbi.2015.03.007.

[106] E. Paquet and H. L. Viktor, “Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review,” *Biomed Res Int*, vol. 2015, pp. 1–18, 2015, doi: 10.1155/2015/183918.

[107] J. E. Jones, “On the determination of molecular fields. —II. From the equation of state of a gas,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 106, no. 738, pp. 463–477, Oct. 1924, doi: 10.1098/rspa.1924.0082.

[108] W. D. Cornell *et al.*, “A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules,” *J Am Chem Soc*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, May 1995, doi: 10.1021/ja00124a002.

[109] S. A. Adcock and J. A. McCammon, “Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins,” *Chem Rev*, vol. 106, no. 5, pp. 1589–1615, May 2006, doi: 10.1021/cr040426m.

[110] A. W. Schüttelkopf and D. M. F. van Aalten, “PRODRG : a tool for high-throughput crystallography of protein–phối tử complexes,” *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 60, no. 8, pp. 1355–1363, Aug. 2004, doi: 10.1107/S0907444904011679.

[111] D. M. F. van Aalten *et al.*, “PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules,” *J Comput Aided Mol Des*, vol. 10, no. 3, pp. 255–262, Jun. 1996, doi: 10.1007/BF00355047.

DRAFT

[112] A. K. Malde *et al.*, “An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0,” *J Chem Theory Comput*, vol. 7, no. 12, pp. 4026–4037, Dec. 2011, doi: 10.1021/ct200196m.

[113] V. Zoete, M. A. Cuendet *et al.*, “SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules,” *J Comput Chem*, vol. 32, no. 11, pp. 2359–2368, Aug. 2011, doi: 10.1002/jcc.21816.

[114] M. Hernández-Rodríguez *et al.*, “Current Tools and Methods in Molecular Dynamics (MD) Simulations for Drug Design,” *Curr Med Chem*, vol. 23, no. 34, pp. 3909–3924, Nov. 2016, doi: 10.2174/0929867323666160530144742.

[115] A. D. MacKerell *et al.*, “All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins,” *J Phys Chem B*, vol. 102, no. 18, pp. 3586–3616, Apr. 1998, doi: 10.1021/jp973084f.

[116] J. W. Ponder and D. A. Case, “Force Fields for Protein Simulations,” 2003, pp. 27–85. doi: 10.1016/S0065-3233(03)66002-X.

[117] F. R. Salsbury Jr, “Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery,” *Curr Opin Pharmacol*, vol. 10, no. 6, pp. 738–744, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.coph.2010.09.016.

[118] I. Waziri *et al.*, “Synthesis, Characterization, Biological Evaluation, DFT Calculations, and Molecular Docking Study of Transition Metal Complexes Derived From a Schiff Base Phối tử,” *Chem Biodivers*, Jun. 2025, doi: 10.1002/cbdv.202500940.

[119] J. S. Renny *et al.*, “Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, no. 46, pp. 11998–12013, Nov. 2013, doi: 10.1002/anie.201304157.

DRAFT

[120] K. Sakthikumar *et al.*, "Spectro-electrochemical assessments of DNA/BSA interactions, cytotoxicity, radical scavenging and pharmacological implications of biosensitive and biologically active morpholine-based metal(II) complexes: a combined experimental and computational investigation," *RSC Adv*, vol. 9, no. 25, pp. 14220–14241, 2019, doi: 10.1039/C8RA09218D.

[121] M. S. Jamal *et al.*, "Anticancer compound plumbagin and its molecular targets: A structural insight into the inhibitory mechanisms using computational approaches," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, Feb. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087309.

[122] S. Mukherjee *et al.*, "Copper-Plumbagin Complex Produces Potent Anticancer Effects by Depolymerizing Microtubules and Inducing Reactive Oxygen Species and DNA Damage," *ACS Omega*, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c06691.

[123] M. Tan *et al.*, "Antioxidant activities of plumbagin and its Cu (II) complex," *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/898726.

[124] A. C. M. Dangalla and A. Ileperuma, "PREPARATION AND PROPERTIES OF 'SOME METAL COMPLEXES OF PLUMBAGIN," 1985.

[125] S. Padhye *et al.*, "Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs," *Med Res Rev*, vol. 32, no. 6, pp. 1131–1158, Nov. 2012, doi: 10.1002/med.20235.

[126] V. K. Devi *et al.*, "Synthesis, characterisation, thermal stability and antimicrobial activities of transition metal complexes of plumbagin and its azo derivatives," *Journal of the Indian Chemical Society*, vol. 88, pp. 483–490, Apr. 2011.

[127] Z. F. Chen *et al.*, "Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity evaluation of five Lanthanide(III)-Plumbagin complexes," *J Inorg*

DRAFT

Biochem, vol. 105, no. 3, pp. 426–434, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.003.

[128] N. S. Chundawat *et al.*, "Lanthanide complexes as anticancer agents: A review," Oct. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.poly.2021.115387.

[129] MUKESH KUMAR* and ANITA KAMRA and NIRANJAN SINGH RATHEET, "Thermodynamic Studies of Y(III), La(III), Ce(III) and Sm(III)".

[130] Z.-F. Chen *et al.*, "Cytotoxicity of the traditional chinese medicine (TCM) plumbagin in its copper chemistry," *Dalton Transactions*, no. 48, p. 10824, 2009, doi: 10.1039/b910133k.

[131] Z.-F. Chen *et al.*, "Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity evaluation of five Lanthanide(III)–Plumbagin complexes," *J Inorg Biochem*, vol. 105, no. 3, pp. 426–434, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.003.

[132] H.-Q. Zhang *et al.*, "Copper(II) complexes with plumbagin and bipyridines target mitochondria for enhanced chemodynamic cancer therapy," *J Inorg Biochem*, vol. 251, p. 112432, 2024, doi: https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112432.

[133] F. Ulatowski *et al.*, "Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host-Guest Interactions in Supramolecular Chemistry," Mar. 04, 2016, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.joc.5b02909.

[134] A. Farhi *et al.*, "A quinoline-based fluorescent probe for selective detection and real-time monitoring of copper ions-a differential colorimetric approach," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 18, no. 12, pp. 3008–3015, 2019, doi: 10.1039/c9pp00247b.

DRAFT

[135] D. M. Nguyen *et al.*, "Selective fluorescence sensing of zinc and mercury ions with hydrophilic 1,2,3-triazolyl fluorene probes," *Chemistry of Materials*, vol. 22, no. 11, pp. 3472–3481, Jun. 2010, doi: 10.1021/cm100599g.

[136] Z. F. Chen *et al.*, "Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity evaluation of five Lanthanide(III)-Plumbagin complexes," *J Inorg Biochem*, vol. 105, no. 3, pp. 426–434, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.003.

[137] J. P. Hughes *et al.*, "Principles of early drug discovery," Mar. 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.

[138] A. Monks *et al.*, "ARTICLES Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines," 1991. [Online]. Available: https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/83/11/757/889634

[139] M. C. Alley *et al.*, "Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay1," 1988. [Online]. Available: http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/48/3/589/2434239/cr0480030589.pdf

[140] S. Kumar *et al.*, "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes," Jan. 2011. doi: 10.4103/0973-7847.79096.

[141] B. Elya *et al.*, "Screening of α-glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/281078.

[142] H. Chen *et al.*, "A new method for screening α-glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms," *Pharm Biol*, vol. 42, no. 6, pp. 416–421, Sep. 2004, doi: 10.1080/13880200490885987.

DRAFT

[143] F. Moradi-Afrapoli *et al.*, “In vitro α-glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of Polygonum hyrcanicum,” 2012. [Online]. Available: http://www.darujps.com/content/20/1/37

[144] W. Hakamata *et al.*, “Design and Screening Strategies for-Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information,” 2009.

[145] H. Liao *et al.*, “Effect of Honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α-glucosidase activity,” *Journal of Traditional Chinese Medicine*, vol. 34, no. 3, pp. 362–368, Jun. 2014, doi: 10.1016/S0254-6272(14)60103-5.

[146] S. Combet *et al.*, “A specific method for measurement of nitric oxide synthase enzymatic activity in peritoneal biopsies,” *Kidney Int*, vol. 57, no. 1, pp. 332–338, Jan. 2000, doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00839.x.

[147] N. R. Bernardes *et al.*, “Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of Schinus terebinthifolius,” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 24, no. 6, pp. 644–650, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.bjp.2014.10.012.

[148] P.-J. Tsai *et al.*, “Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea,” *Food Chem*, vol. 103, no. 1, pp. 181–187, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.013.

[149] E. B. A. Adusei *et al.*, “Investigation of acid-base indicator property of plumbagin from plumbago zeylanica linn,” *Int J Anal Chem*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4061927.

[150] H.-Y. Huang *et al.*, “Coordination-induced emission enhancement in gold-nanoclusters with solid-state quantum yields up to 40% for eco-friendly, low-reabsorption nano-phosphors,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 4053, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-40706-3.

DRAFT

[151] X. Li, M. Zhou *et al.*, "A rapid and highly sensitive fluorescent probe for Hg+ detection in environmental samples and living organisms," *J Mol Liq*, vol. 437, p. 128340, Nov. 2025, doi: 10.1016/j.molliq.2025.128340.

[152] D. Wu *et al.*, "Sensitive Hg^{2+} Sensing via Quenching the Fluorescence of the Complex between Polythymine and 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl) Porphyrin (TMPyP)," *Sensors*, vol. 18, no. 11, p. 3998, Nov. 2018, doi: 10.3390/s18113998.

[153] Q. Li and Y. Zhou, "Recent advances in fluorescent materials for mercury(ii) ion detection," Jun. 27, 2023, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d3ra02410e.

[154] L. Mangold *et al.*, "New insights for titanium(iv) speciation in acidic media based on UV-visible and 31P NMR spectroscopies and molecular modeling.," *RSC Adv*, vol. 11, no. 43, pp. 27059–27073, Aug. 2021, doi: 10.1039/d1ra04284j.

[155] S. Liyanaarachchi *et al.*, "Magnetite-Functionalized Plumbagin for Therapeutic Applications," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 9, no. 3, pp. 1361–1372, 2021.

[156] V. V. Atuchin *et al.*, "Ti2p and O1s core levels and chemical bonding in titanium-bearing oxides," *J Electron Spectros Relat Phenomena*, vol. 152, no. 1–2, pp. 18–24, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.elspec.2006.02.004.

[157] Y. Gong *et al.*, "Synthesis of highly dispersed and versatile anatase TiO2 nanocrystals on graphene sheets with enhanced photocatalytic performance for dye degradation," *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, vol. 28, no. 24, pp. 18883–18890, Dec. 2017, doi: 10.1007/s10854-017-7841-2.

[158] M. C. Biesinger *et al.*, "Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and

DRAFT

Zn," *Appl Surf Sci*, vol. 257, no. 3, pp. 887–898, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.07.086.

[159] A. Kadari *et al.*, "XPS and morphological properties of Cr2O3 thin films grown by thermal evaporation method," *Results Phys*, vol. 7, pp. 3124–3129, 2017, doi: 10.1016/j.rinp.2017.08.036.

[160] D. V. Sivkov *et al.*, "Quantitative Characterization of Oxygen-Containing Groups on the Surface of Carbon Materials: XPS and NEXAFS Study," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 15, p. 7744, Aug. 2022, doi: 10.3390/app12157744.

[161] Y.-X. Yang *et al.*, "Fluorescent polydopamine nanoparticles as a nanosensor for the sequential detection of mercury ions and <scp>l</scp> -ascorbic acid based on a coordination effect and redox reaction," *RSC Adv*, vol. 10, no. 47, pp. 28164–28170, 2020, doi: 10.1039/D0RA02031A.

[162] T. Potlog *et al.*, "XRD and XPS Analysis of TiO 2 Thin Films Annealed in Different Environments," 2014.

[163] D. P. Sahu and S. N. Jammalamadaka, "Detection of bovine serum albumin using hybrid TiO2 + graphene oxide based Bio – resistive random access memory device," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 16141, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52522-w.

[164] M. C. Biesinger *et al.*, "Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni," *Appl Surf Sci*, vol. 257, no. 7, pp. 2717–2730, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.10.051.

[165] M. Maček Kržmanc *et al.*, "The Morphology Control of $BaTiO_3$ Particles Synthesized in Water and a Water/Ethanol Solvent," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 96, no. 11, pp. 3401–3409, Nov. 2013, doi: 10.1111/jace.12607.

DRAFT

[166] D. V. West *et al.*, "Structural disorder, octahedral coordination and two-dimensional ferromagnetism in anhydrous alums," *J Solid State Chem*, vol. 181, no. 10, pp. 2768–2775, 2008, doi: 10.1016/j.jssc.2008.07.006.

[167] U. Tecnológica *et al.*, "Study of Structural, Thermic, μ-Raman and Optic Transformation of PVA/TiO 2 Polymeric Membranes," *Scientia et Technica Año XXIII*, vol. 23, no. 4, pp. 543–552, 2018, [Online]. Available: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84959055014

[168] D. Wu *et al.*, "Fluorescent chemosensors: the past, present and future," *Chem Soc Rev*, vol. 46, no. 23, pp. 7105–7123, 2017, doi: 10.1039/C7CS00240H.

[169] H. N. Kim *et al.*, "A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions," *Chem Soc Rev*, vol. 37, no. 8, p. 1465, 2008, doi: 10.1039/b802497a.

[170] Q. Zhao *et al.*, "Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging," *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 5, p. 2508, 2011, doi: 10.1039/c0cs00114g.

[171] G. Colombo *et al.*, "Driving the Emission Towards Blue by Controlling the HOMO-LUMO Energy Gap in BF_2 -Functionalized 2-(Imidazo[1,5- *a*]pyridin-3-yl)phenols," *Chemistry – A European Journal*, vol. 27, no. 48, pp. 12380–12387, Aug. 2021, doi: 10.1002/chem.202101520.

[172] A. Levina and P. A. Lay, "Chemical Properties and Toxicity of Chromium(III) Nutritional Supplements," *Chem Res Toxicol*, vol. 21, no. 3, pp. 563–571, Mar. 2008, doi: 10.1021/tx700385t.

[173] R. A. Anderson, "Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes," *J Am Coll Nutr*, vol. 17, no. 6, pp. 548–555, Dec. 1998, doi: 10.1080/07315724.1998.10718802.

DRAFT

[174] I. Choi *et al.*, "Binding mode analysis of topoisomerase inhibitors, 6-arylamino-7-chloro-quinazoline-5,8-diones, within the cleavable complex of human topoisomerase I and DNA," *Arch Pharm Res*, vol. 30, no. 12, pp. 1526–1535, Dec. 2007, doi: 10.1007/BF02977321.

[175] L. Auzzas *et al.*, "Non-Natural Macrocyclic Inhibitors of Histone Deacetylases: Design, Synthesis, and Activity," *J Med Chem*, vol. 53, no. 23, pp. 8387–8399, Dec. 2010, doi: 10.1021/jm101092u.

[176] M. N. Sibanyoni *et al.*, "Isolation, in vitro evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae," *Fitoterapia*, vol. 146, p. 104650, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.fitote.2020.104650.

[177] K. Sargsyan *et al.*, "How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations," *J Chem Theory Comput*, vol. 13, no. 4, pp. 1518–1524, Apr. 2017, doi: 10.1021/acs.jctc.7b00028.

[178] F. DeRosa *et al.*, "Chromium(III) Complexes for Photochemical Nitric Oxide Generation from Coordinated Nitrite: Synthesis and Photochemistry of Macrocyclic Complexes with Pendant Chromophores, trans-[Cr(L)(ONO)2]BF4," *Inorg Chem*, vol. 44, no. 12, pp. 4157–4165, Jun. 2005, doi: 10.1021/ic048311o.

[179] G. De Simone *et al.*, "Serum Albumin: A Multifaced Enzyme," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 18, p. 10086, Sep. 2021, doi: 10.3390/ijms221810086.

[180] A. A. Salem *et al.*, "Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques," *Biochem Biophys Rep*, vol. 20, p. 100670, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100670.

DRAFT

[181] A. Technologies, “Peptide and Amino Acid Quantification Using UV Fluorescence in Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader,” 2006. [Online]. Available: www.biotek.com

[182] F. A. Qais *et al.*, “Deciphering the interaction of plumbagin with human serum albumin: A combined biophysical and molecular docking study,” *J King Saud Univ Sci*, vol. 32, no. 6, pp. 2854–2862, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jksus.2020.07.008.

[183] M. Kumari *et al.*, “Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 138, pp. 27–35, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.009.

[184] E. Jalali *et al.*, “Mechanistic insights into the interaction of anxiolytic drugs with human serum albumin in a ternary system utilizing spectroscopic and molecular modeling approaches,” *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 25480, Oct. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-76544-1.

[185] M. Taniguchi *et al.*, “PhotochemCAD 3: Diverse Modules for Photophysical Calculations with Multiple Spectral Databases,” *Photochem Photobiol*, vol. 94, no. 2, pp. 277–289, Mar. 2018, doi: 10.1111/php.12862.

[186] S. M. Müller *et al.*, “Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells,” *Front Plant Sci*, vol. 4, 2013, doi: 10.3389/fpls.2013.00413.

[187] A. Bortolotti *et al.*, “On the purported ‘backbone fluorescence’ in protein three-dimensional fluorescence spectra,” *RSC Adv*, vol. 6, no. 114, pp. 112870–112876, 2016, doi: 10.1039/C6RA23426G.

[188] P. YANG Hui *et al.*, “Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and,” 2015.

DRAFT

[189] X. Ma *et al.*, "Spectroscopy study and co-administration effect on the interaction of mycophenolic acid and human serum albumin," *Int J Biol Macromol*, vol. 77, pp. 280–286, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.052.

[190] G. Kalaiarasi *et al.*, "An investigation on 3-acetyl-7-methoxy-coumarin Schiff bases and their Ru(II) metallates with potent antiproliferative activity and enhanced LDH and NO release," *RSC Adv*, vol. 8, no. 3, pp. 1539–1561, 2018, doi: 10.1039/C7RA12104K.

[191] G. Sudlow *et al.*, "The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin.," *Mol Pharmacol*, vol. 11, no. 6, pp. 824–32, Nov. 1975.

[192] A. A. Bhattacharya *et al.*, "Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin 1 1Edited by R. Huber," *J Mol Biol*, vol. 303, no. 5, pp. 721–732, Nov. 2000, doi: 10.1006/jmbi.2000.4158.

[193] S. Liberi *et al.*, "Structural Analysis of Human Serum Albumin in Complex with the Fibrate Drug Gemfibrozil.," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23031769.

[194] D. Wu, J. Wang *et al.*, "Computational and spectroscopic analysis of interaction between food colorant citrus red 2 and human serum albumin," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 1615, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-38240-9.

[195] J. Płotka-Wasylka, "A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index," *Talanta*, vol. 181, pp. 204–209, May 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.013.

[196] I. C. H. H. T. Guideline, "Validation of analytical procedures: text and methodology," *Q2 (R1)*, vol. 1, no. 20, p. 05, 2005.

DRAFT

[197] Z. Gao and X. Ma, “Speciation analysis of mercury in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography,” *Anal Chim Acta*, vol. 702, no. 1, pp. 50–55, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.06.019.

[198] D. Amico *et al.*, “Recent applications and novel strategies for mercury determination in environmental samples using microextraction-based approaches: A review,” *J Hazard Mater*, vol. 433, p. 128823, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2022.128823.

[199] C. S. Provete *et al.*, “Comparison of the Performance of ICP-MS, CV-ICP-OES, and TDA AAS in Determining Mercury in Marine Sediment Samples,” *ACS Omega*, Dec. 2024, doi: 10.1021/acsomega.4c06144.

[200] L. Yang *et al.*, “Ultra-trace determination of mercury in water by cold-vapor generation isotope dilution mass spectrometry,” *J Anal At Spectrom*, vol. 20, no. 11, pp. 1226–1231, Nov. 2005, doi: 10.1039/b506695f.

[201] L. Chirita *et al.*, “Mercury determination in various environmental, food and material complex matrices using unified operating conditions for a cold vapor generation high-resolution continuum source quartz tube atomic absorption spectrometry method,” *Analytical Methods*, vol. 15, no. 45, pp. 6294–6301, Nov. 2023, doi: 10.1039/d3ay01468a.

[202] T. T. K. Nguyen *et al.*, “Determination of Total Mercury in Solid Samples by Anodic Stripping Voltammetry,” *J Chem*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/8888879.

[203] Q. Li and Y. Zhou, “Recent advances in fluorescent materials for mercury(ii) ion detection,” Jun. 27, 2023, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d3ra02410e.

[204] W. Chen *et al.*, “A Simple Paper-Based Colorimetric Device for Rapid Mercury(II) Assay,” *Sci Rep*, vol. 6, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31948.

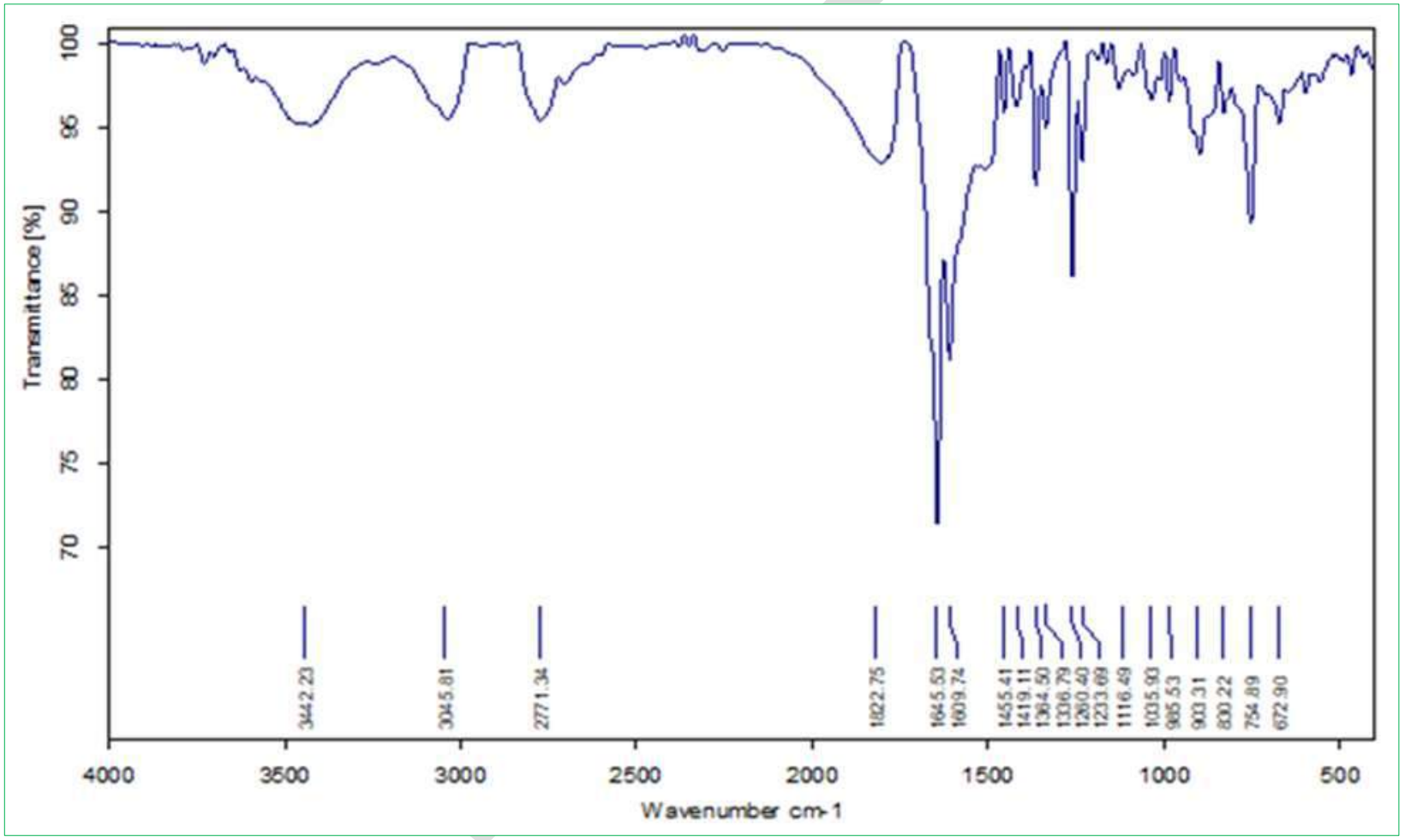
DRAFT

[205] S. S. Nadumane *et al.*, “Eco-friendly colorimetric detection of lead and mercury using l-cysteine-functionalized gold nanoparticles: a step towards greening the exposome,” *RSC Adv*, vol. 15, no. 15, pp. 11573–11579, Apr. 2025, doi: 10.1039/d5ra01445j.

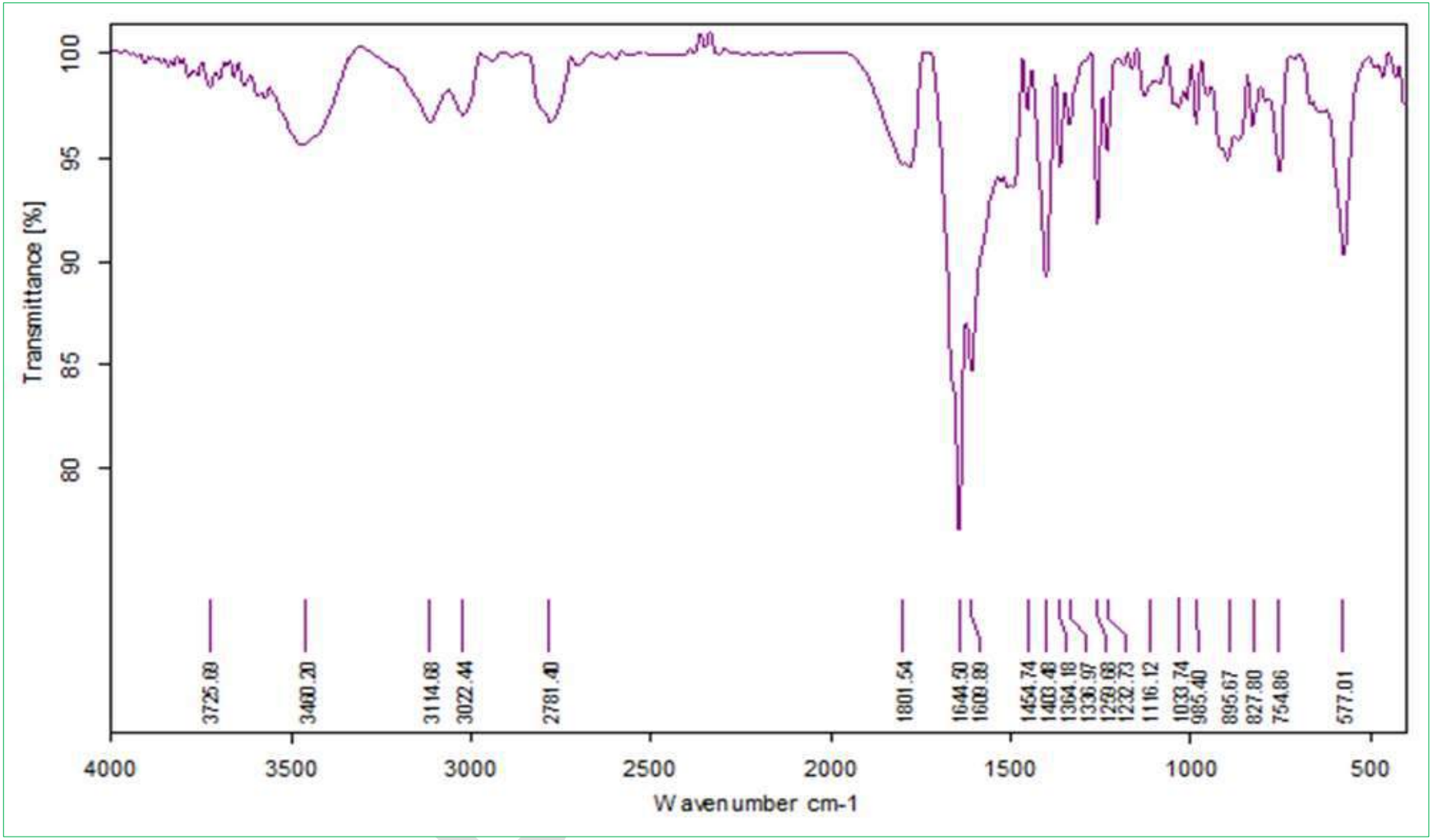
[206] M. Tobiszewski *et al.*, “Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry,” *Molecules*, vol. 20, no. 6, pp. 10928–10946, Jun. 2015, doi: 10.3390/molecules200610928.

DRAFT

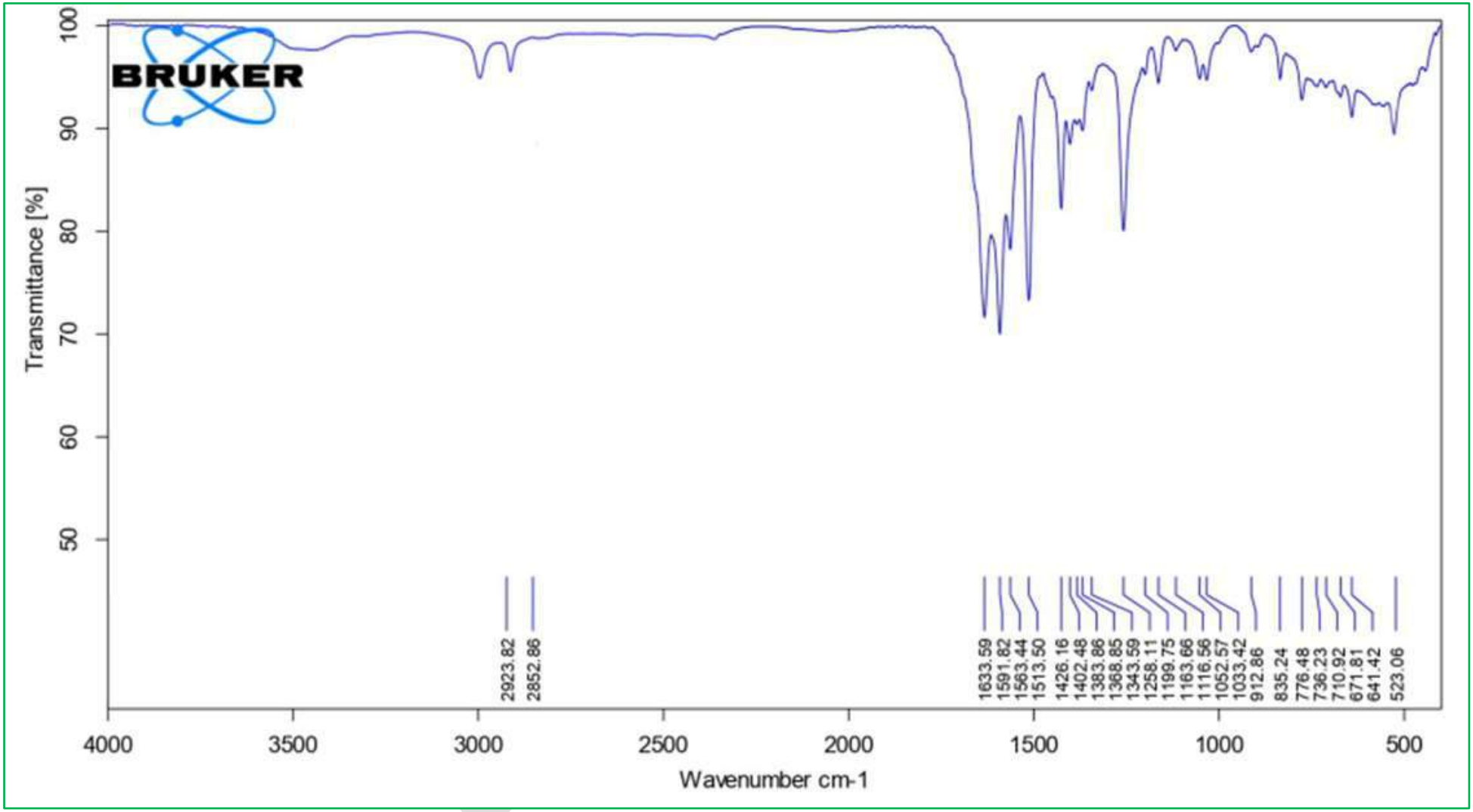
PHỤ LỤC



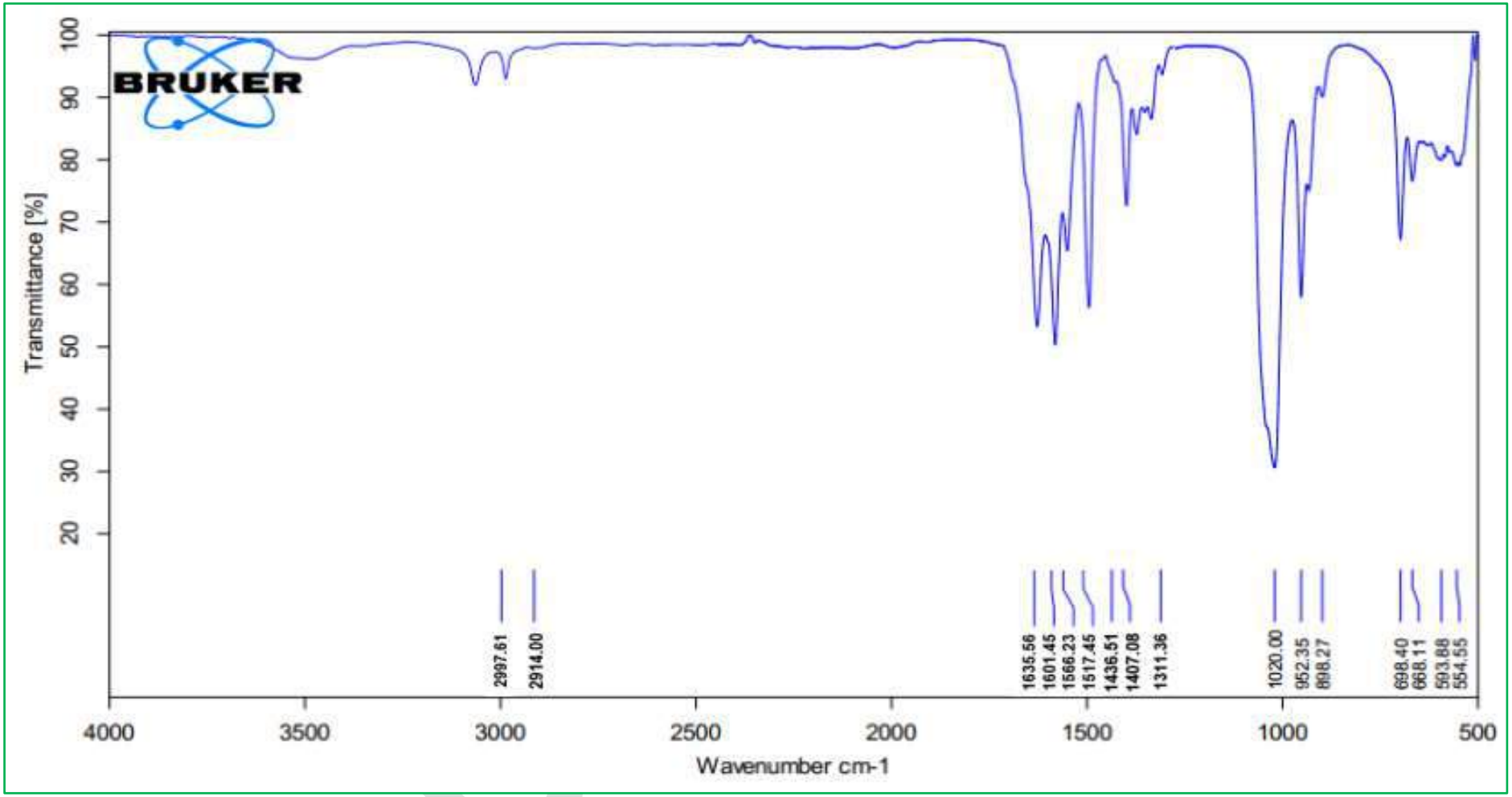
Phụ lục 1. Phổ FT-IR của PLB



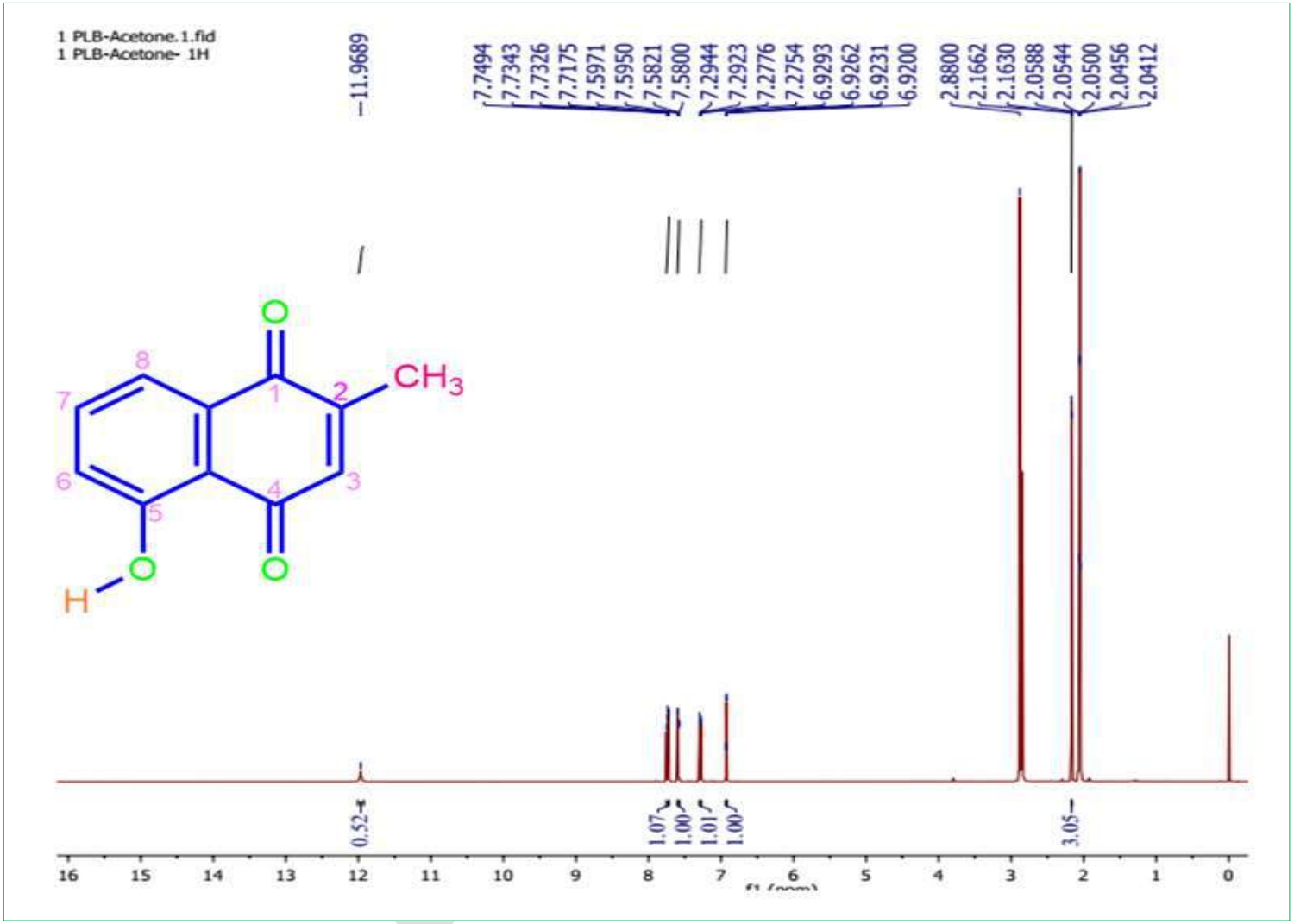
Phụ lục 2. Phổ FT-IR của $Ti(PLB)_2$



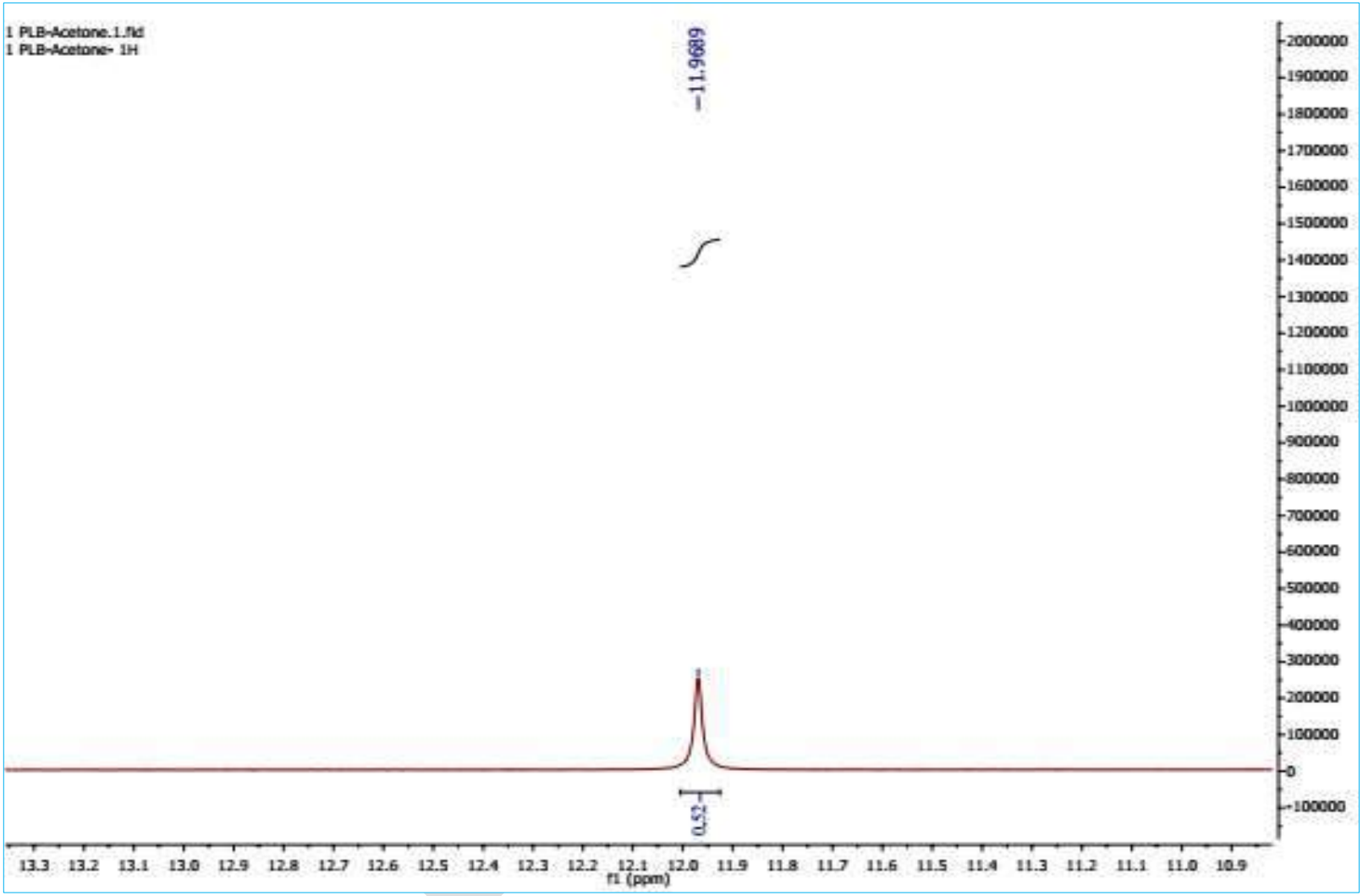
Phụ lục 3. Phổ FT-IR của phức $Cr(PLB)_3$



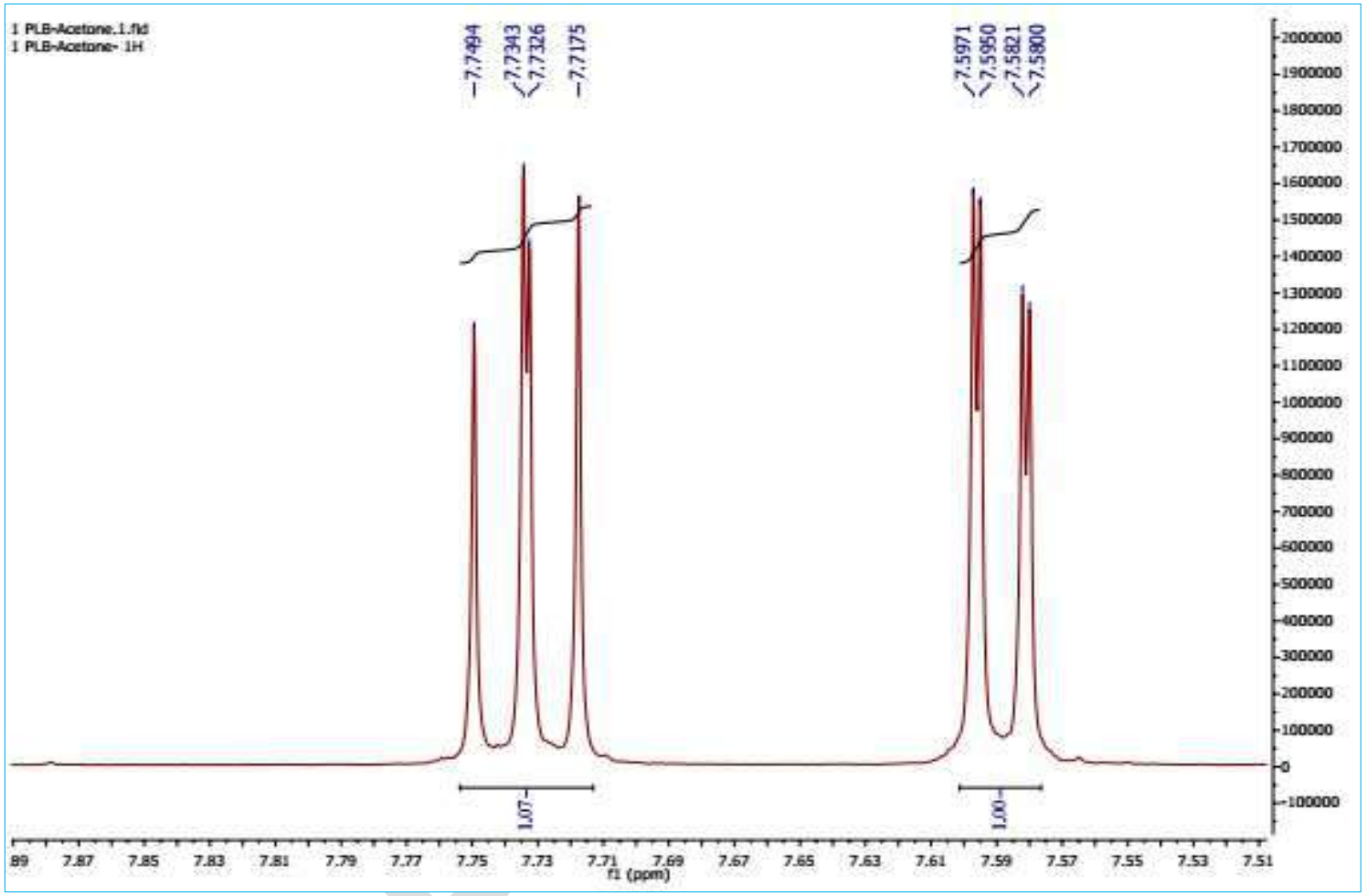
Phụ lục 4. Phổ FT-IR của phức $Hg(PLB)_2$



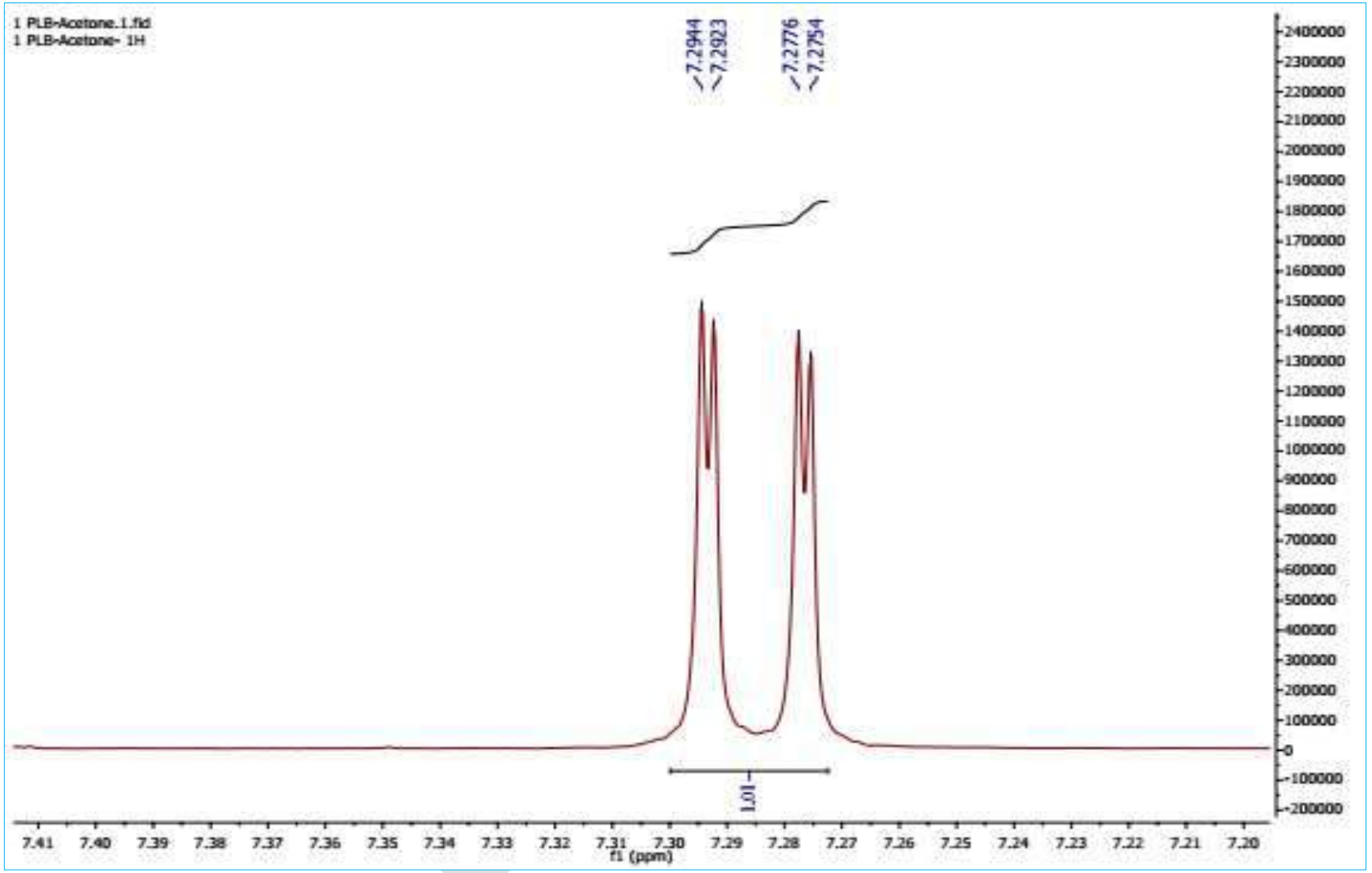
Phụ lục 5. Phổ ^{1}H- NMR của Plumbagin



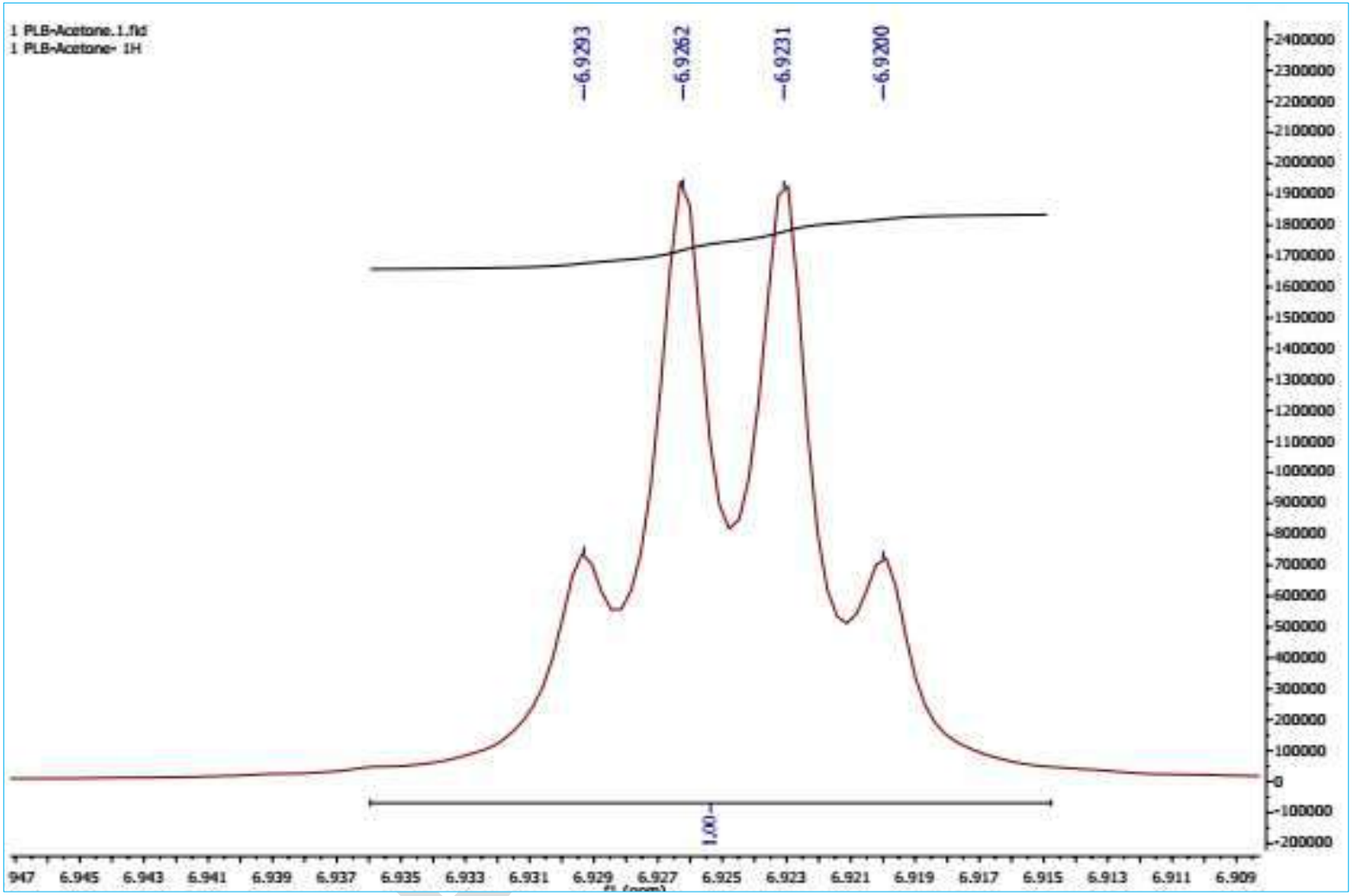
Phụ lục 6. phổ ^{1}H- NMR của plumbagin giản rộng từ 13.3 đến 10.9 ppm



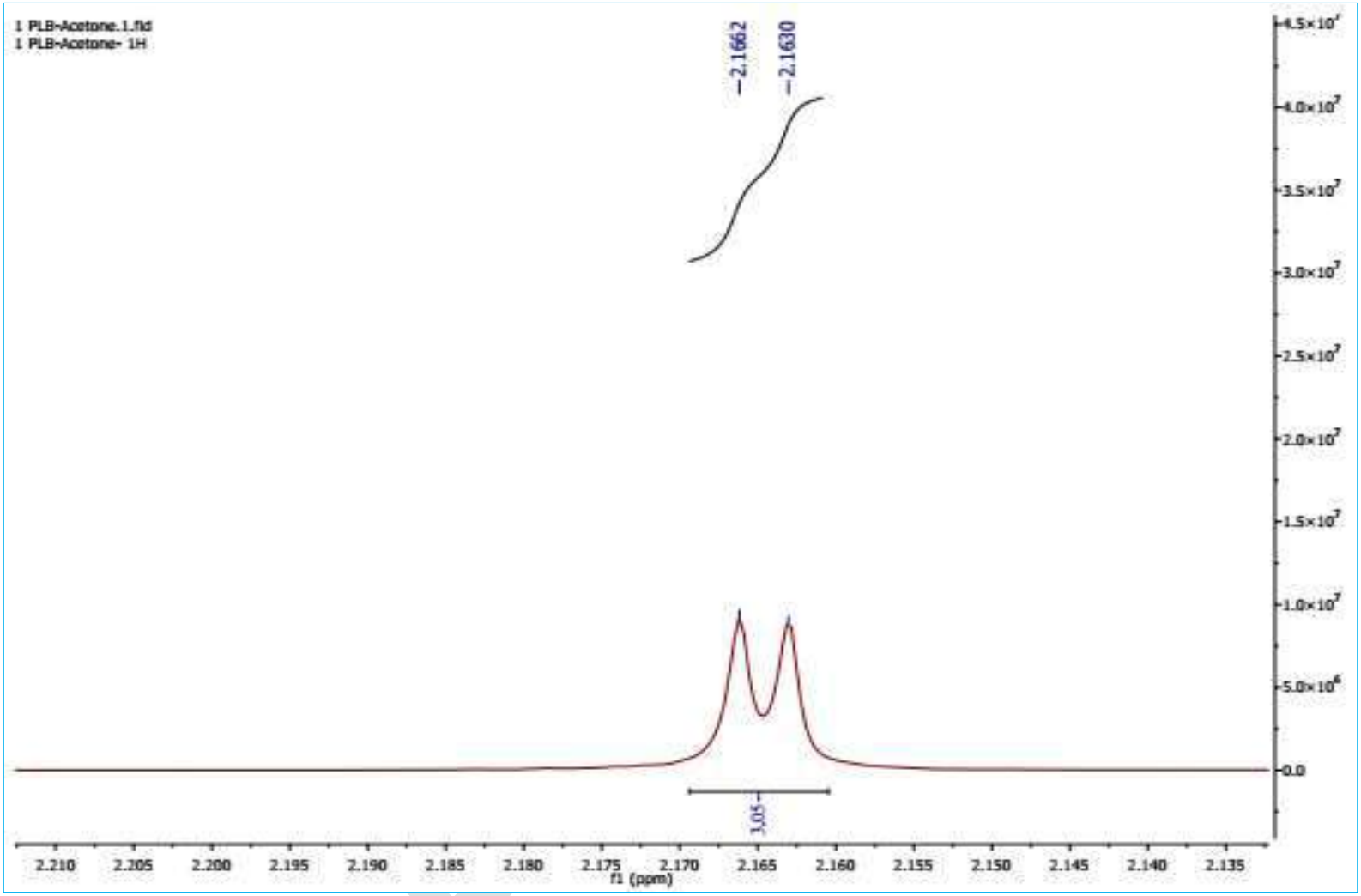
Phụ lục 7. Phổ ^{1}H- NMR của Plumbagin giản rộng từ 7.57 đến 7.77 ppm



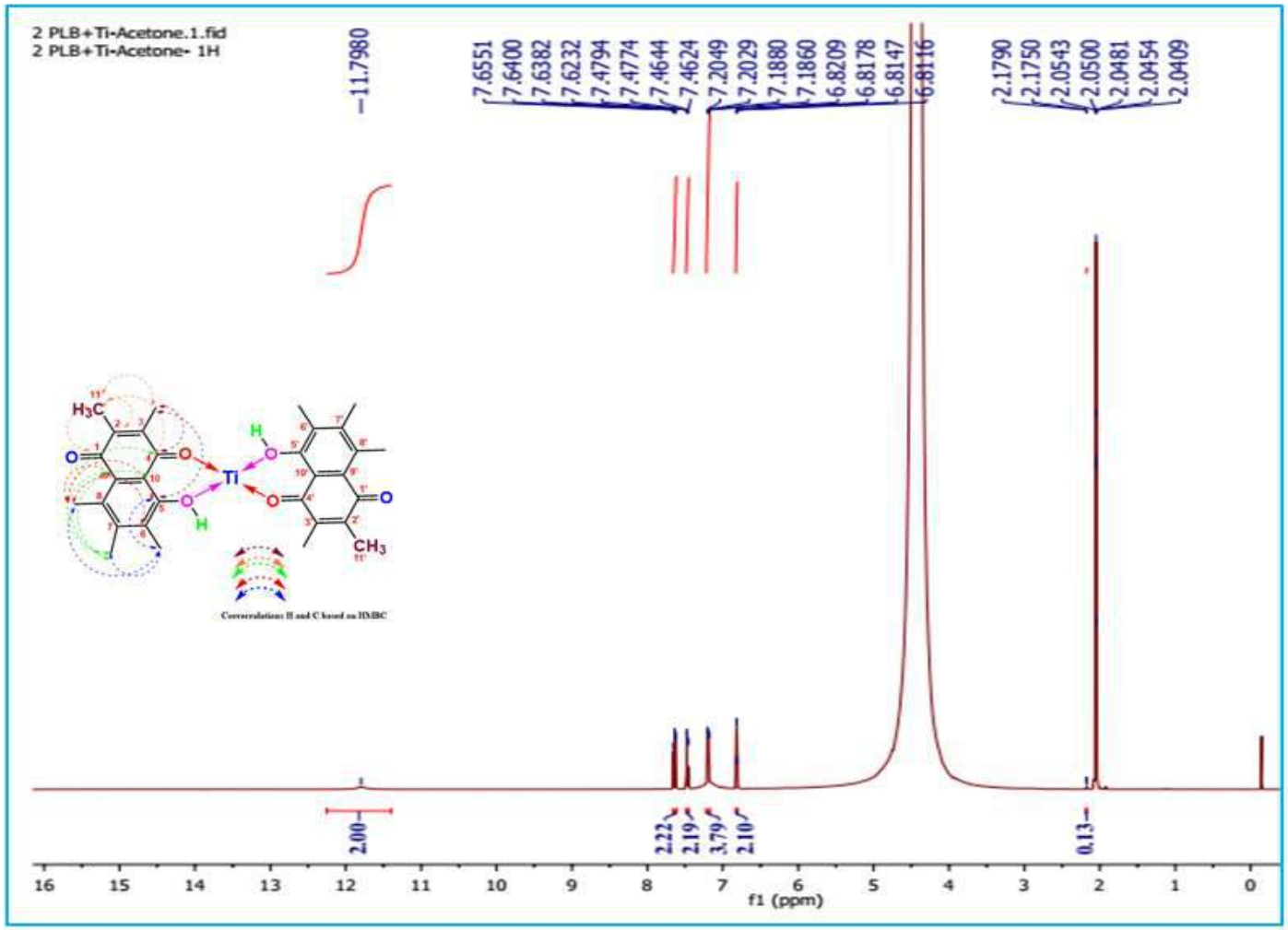
Phụ lục 8. Phổ ^{1}H- NMR của Plumbagin giản rộng 7.25 đến 7.31 ppm



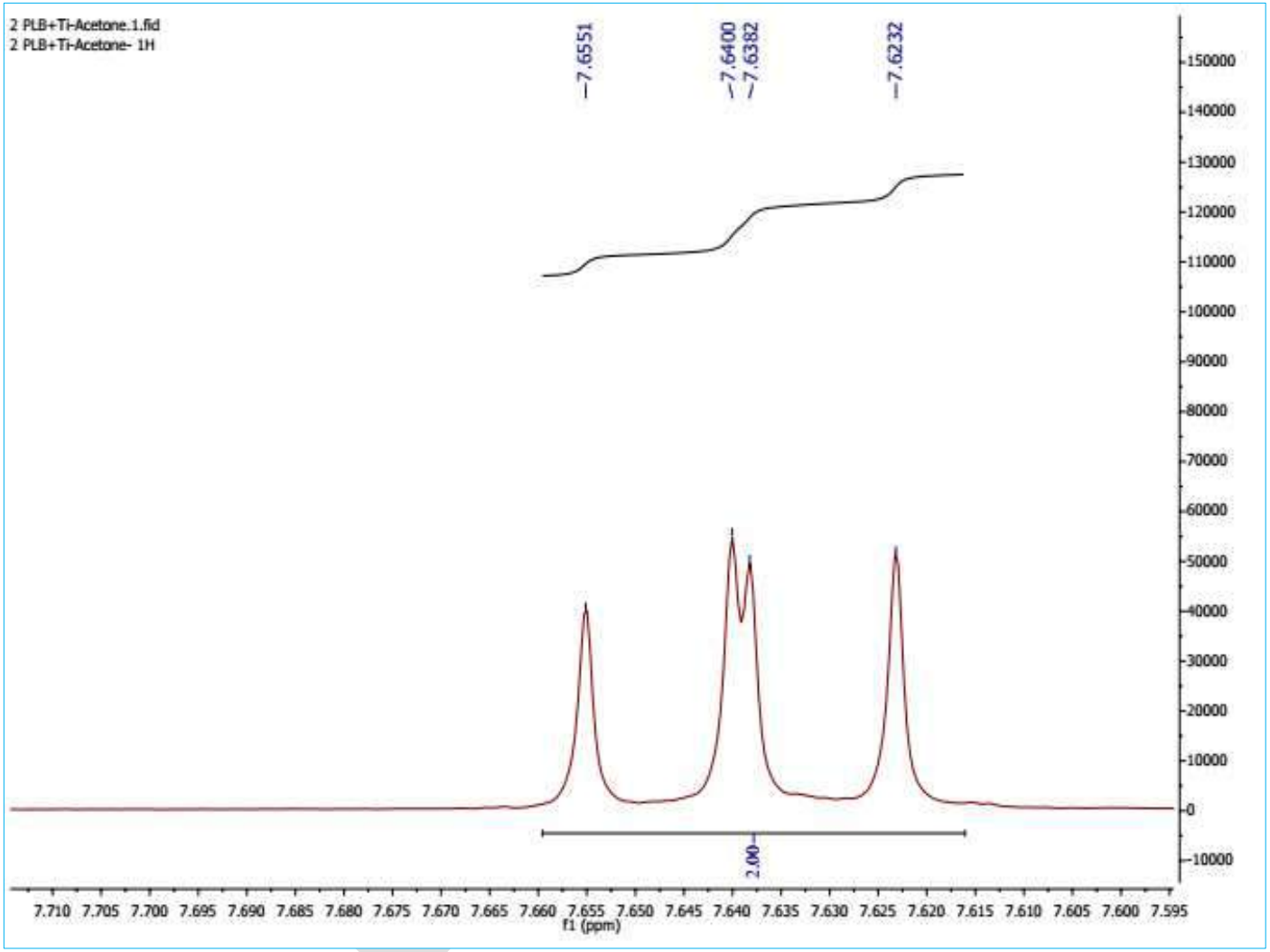
Phụ lục 9. Phổ ^{1}H- NMR của Plumbagin giản rộng từ 6.91 đến 6.94 ppm



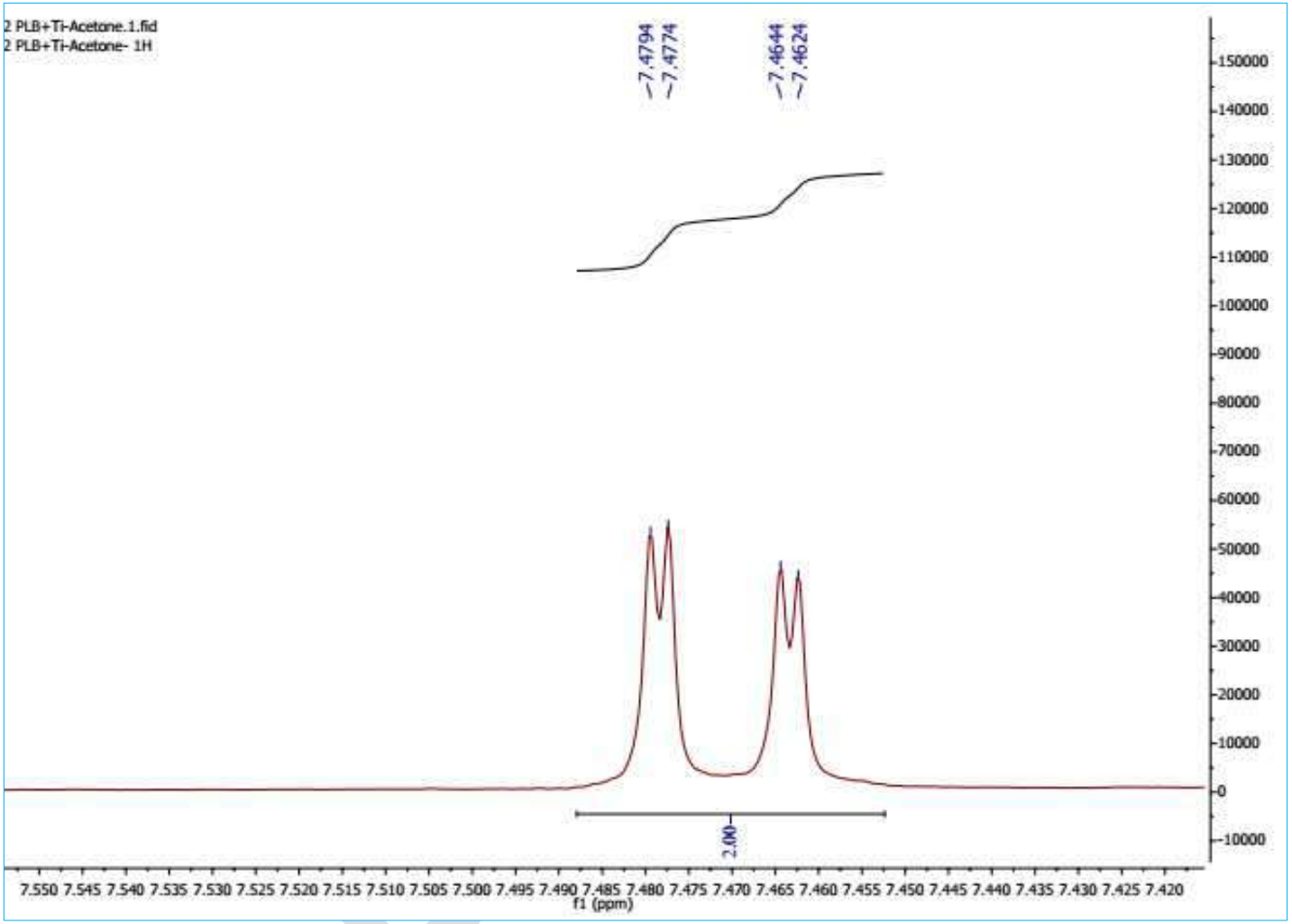
Phụ lục 10. Phổ ^{1}H- NMR của Plumbagin giản rộng từ 2.16 đến 2.17 ppm



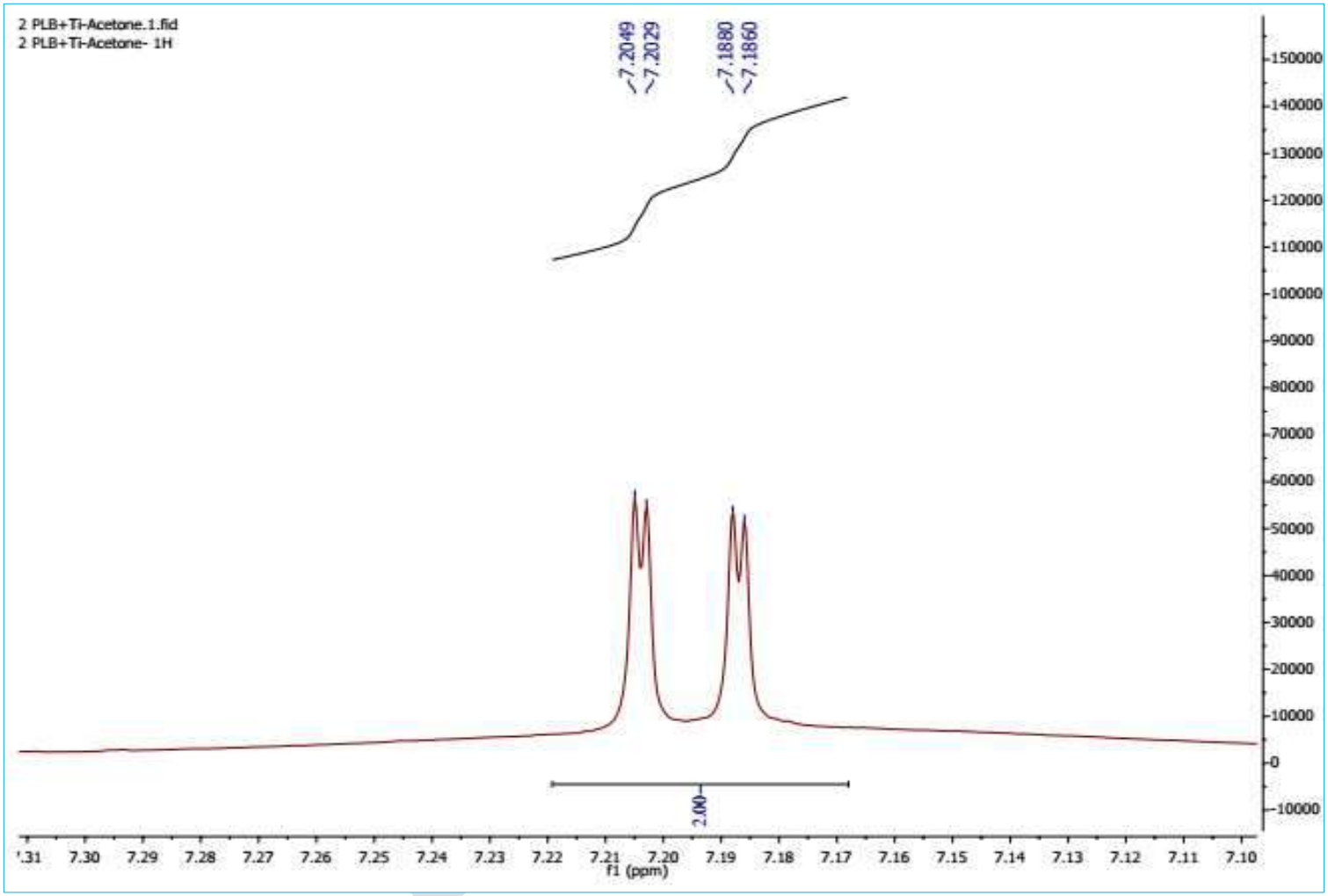
Phụ lục 11. Phổ ^{1}H- NMR của phức Ti(IV)-PLB trong dung dịch



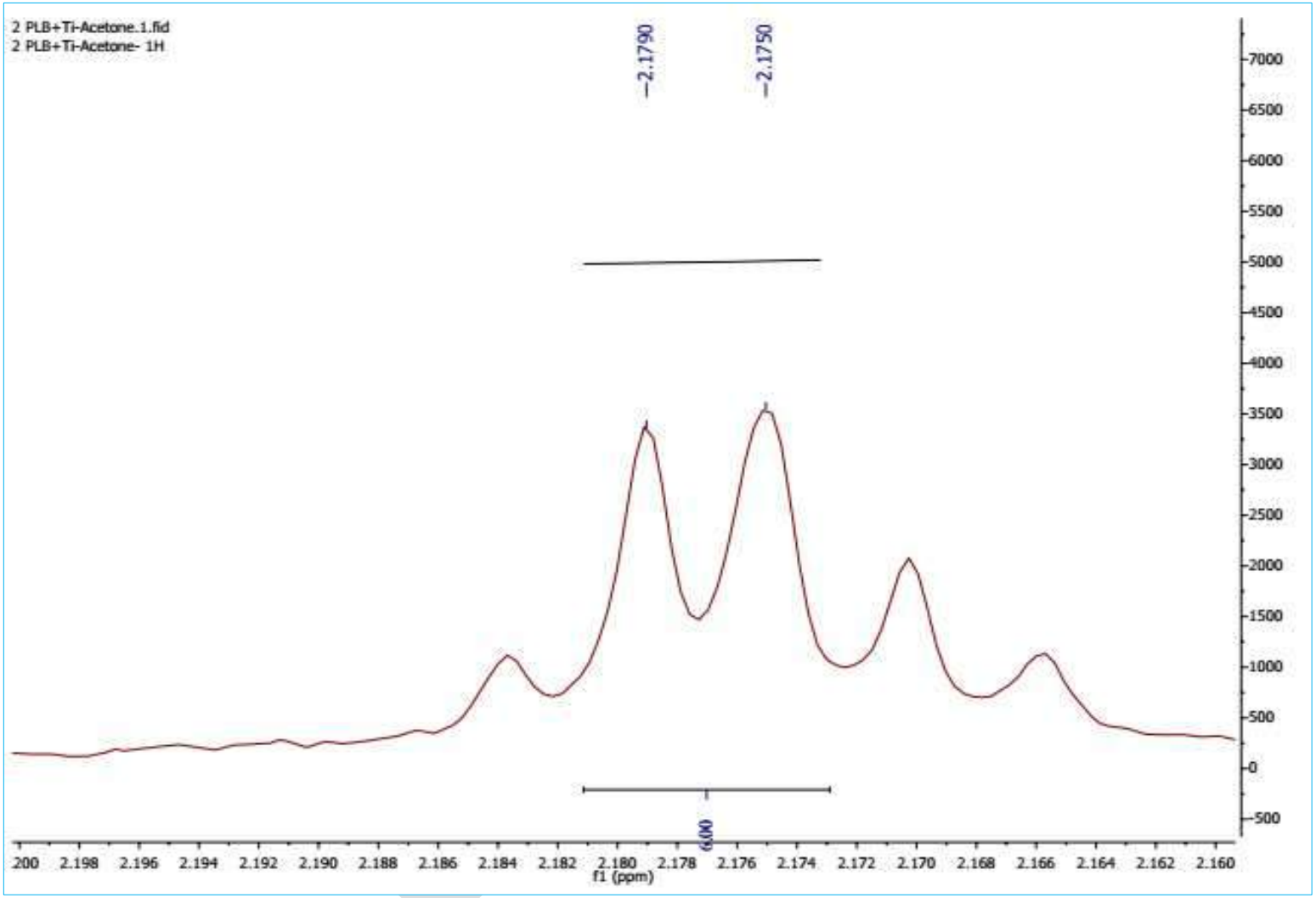
Phụ lục 12. Phổ ^{1}H- NMR của phức Ti(IV)-PLB trong dung dịch giản rộng từ 7.61 đến 7.67 ppm.



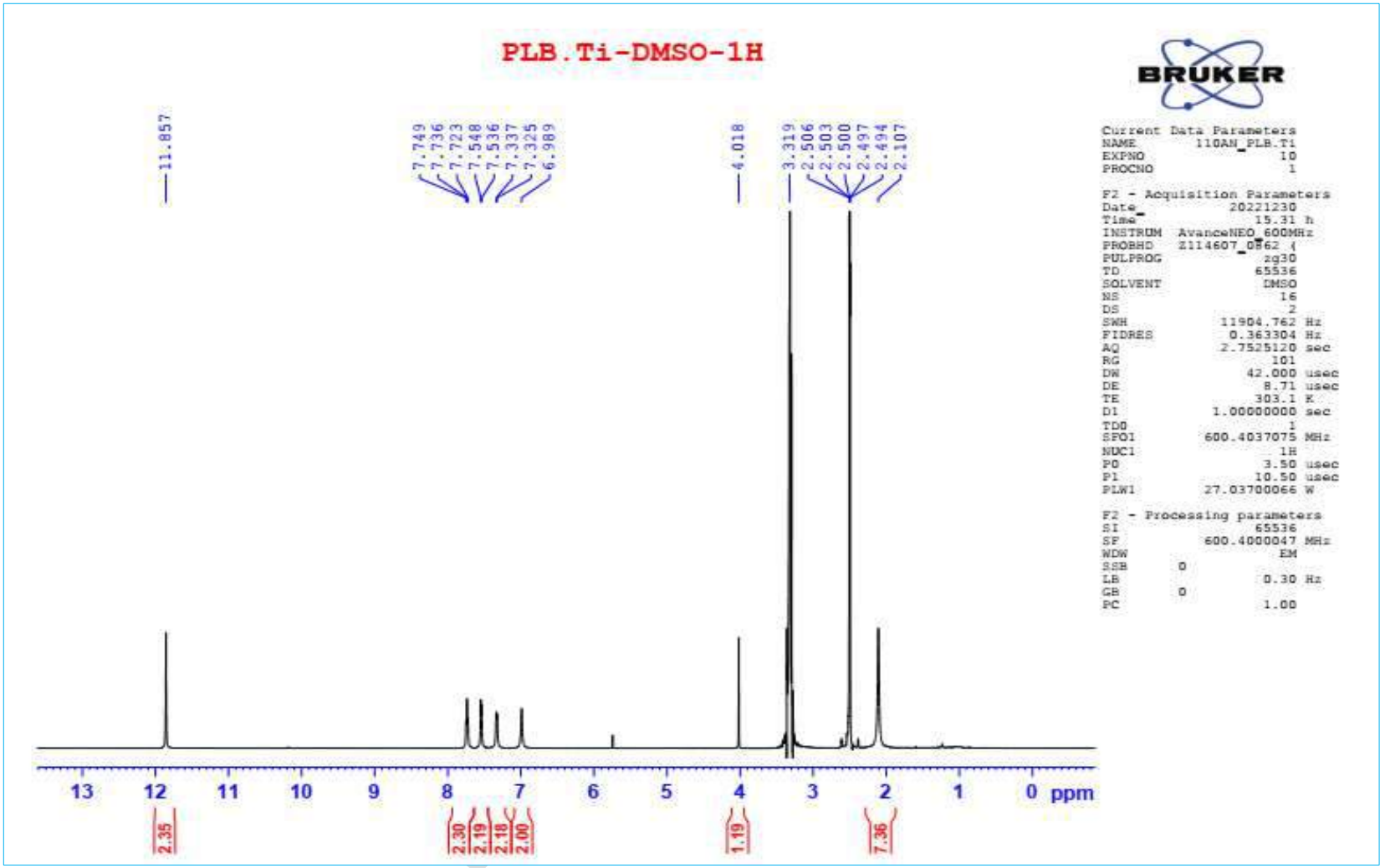
Phụ lục 13. Phổ ^{1}H- NMR của phức Ti(IV)-PLB trong dung dịch giản rộng từ 7.45 đến 7.50 ppm.



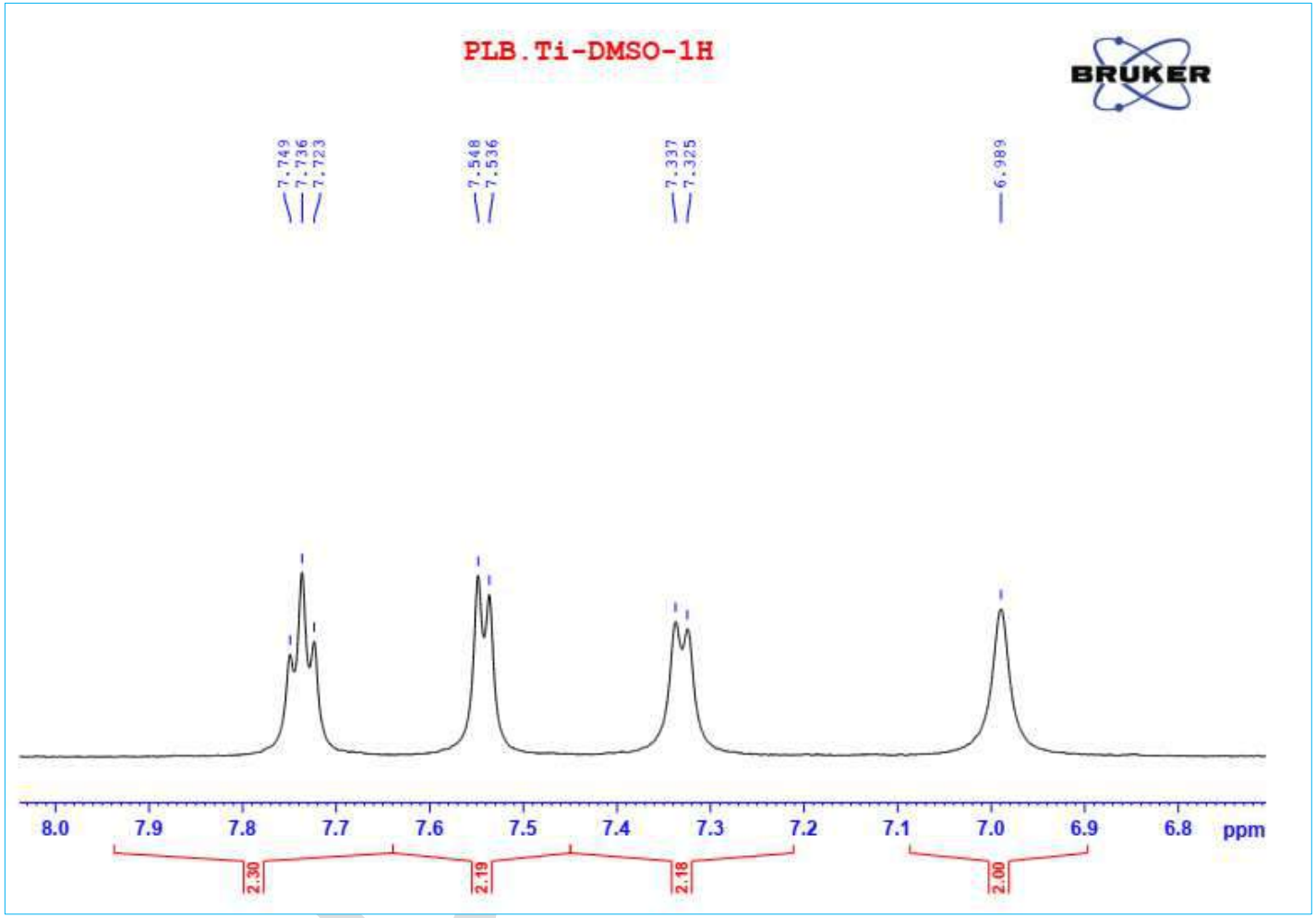
Phụ lục 14. Phổ ^{1}H- NMR của phức Ti(IV)-PLB trong dung dịch giản rộng từ 6.81 đến 6.83 ppm.



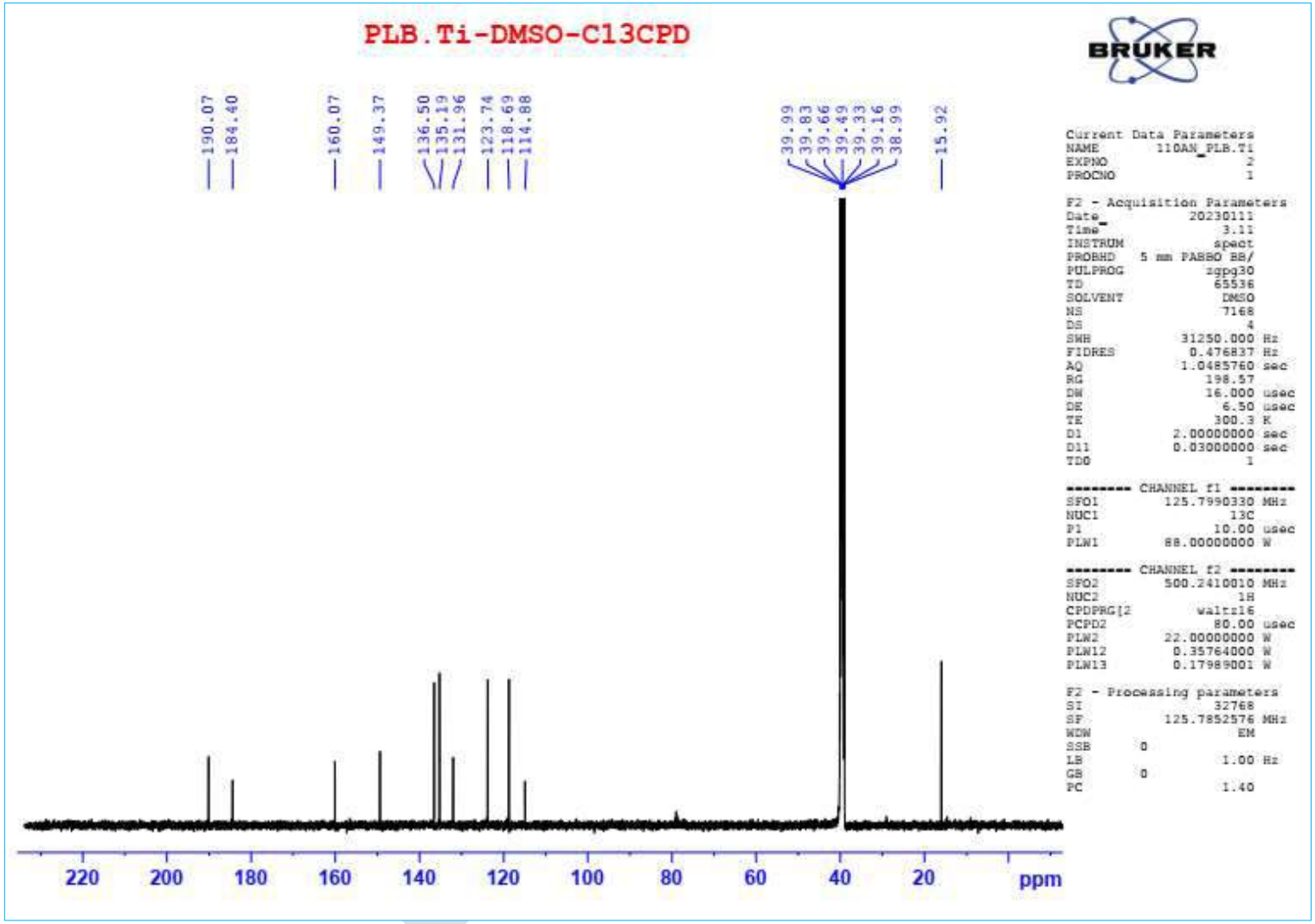
Phụ lục 15. Phổ ^{1}H- NMR của phức Ti(IV)-PLB trong dung dịch giản rộng từ 2.16 đến 2.19 ppm.



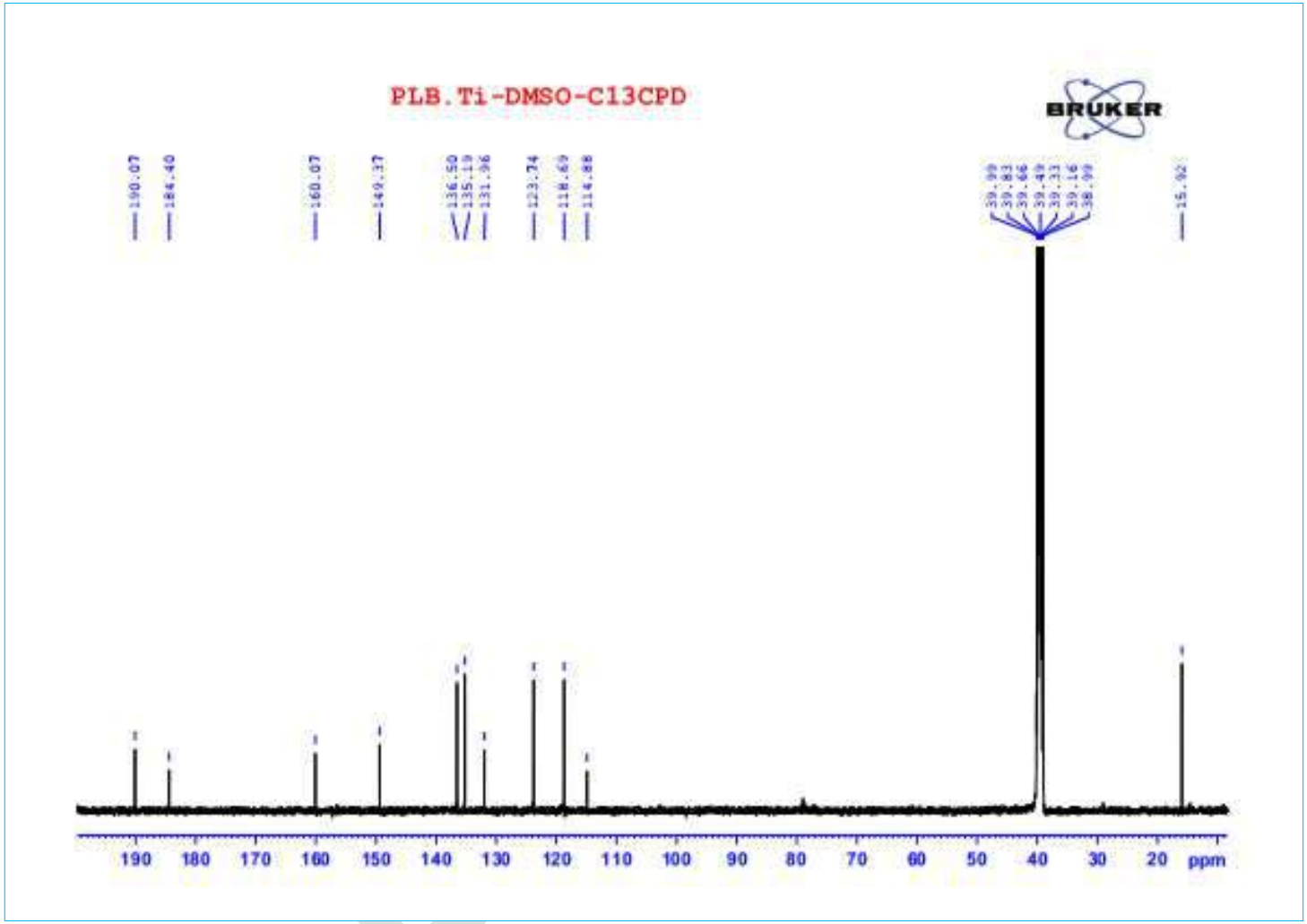
Phụ lục 16. Phổ ^{1}H-NMR của Ti(PLB)$_2$



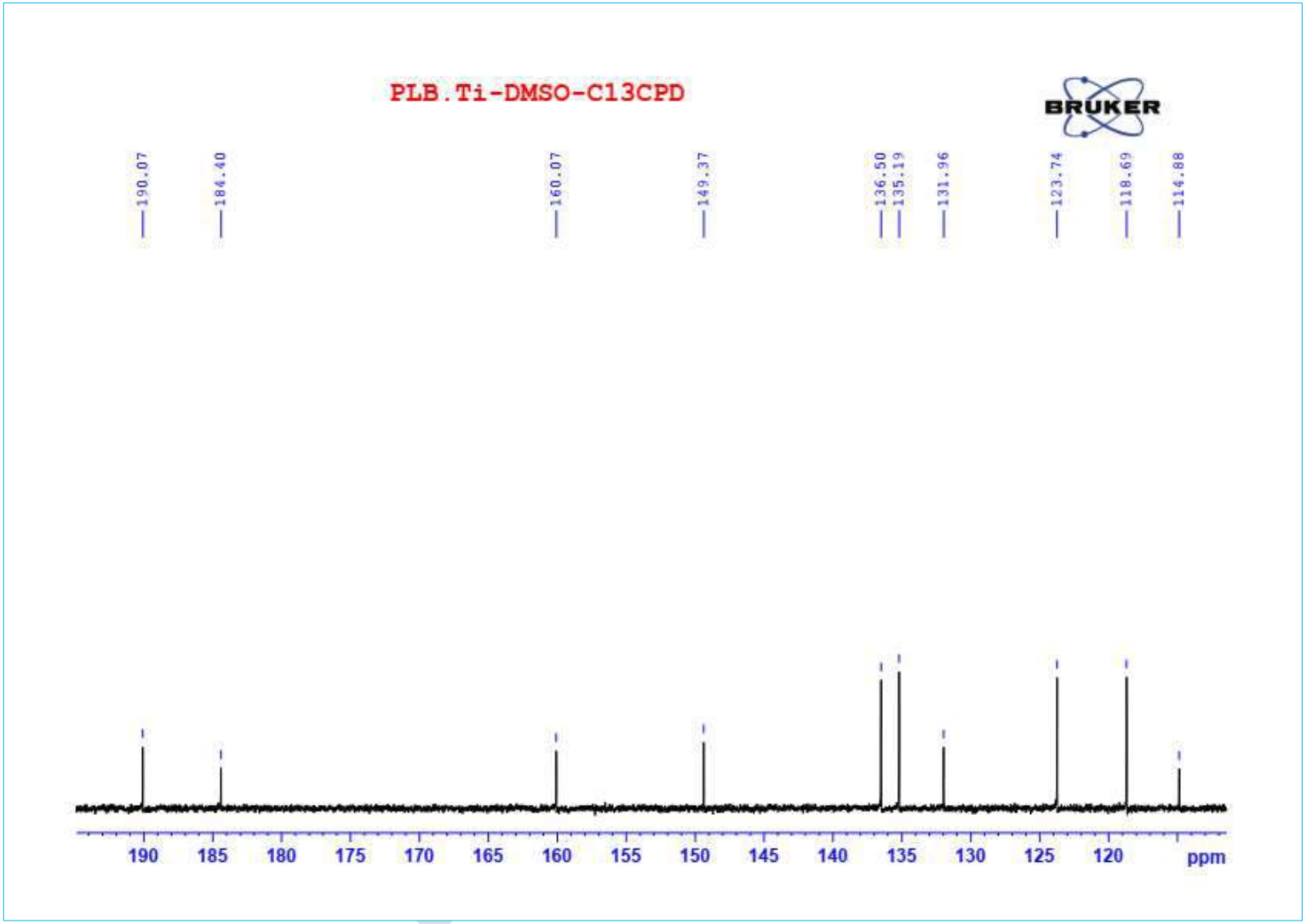
Phụ lục 17. Phổ ^{1}H-NMR mở rộng khoản 6.8 đến 8.0 ppm



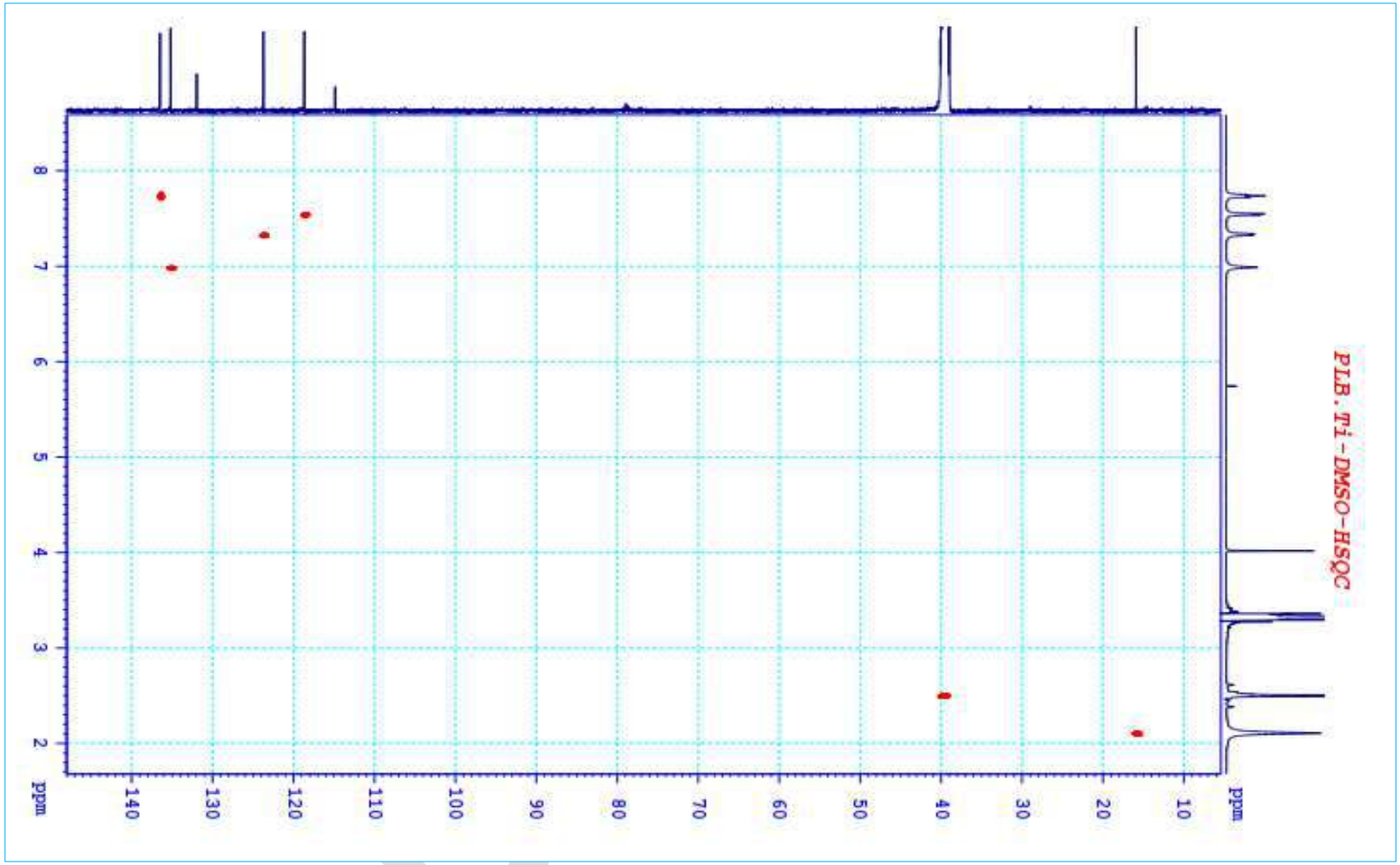
Phụ lục 18. Phổ ^{13}C-NMR của Ti(IV)-PLB



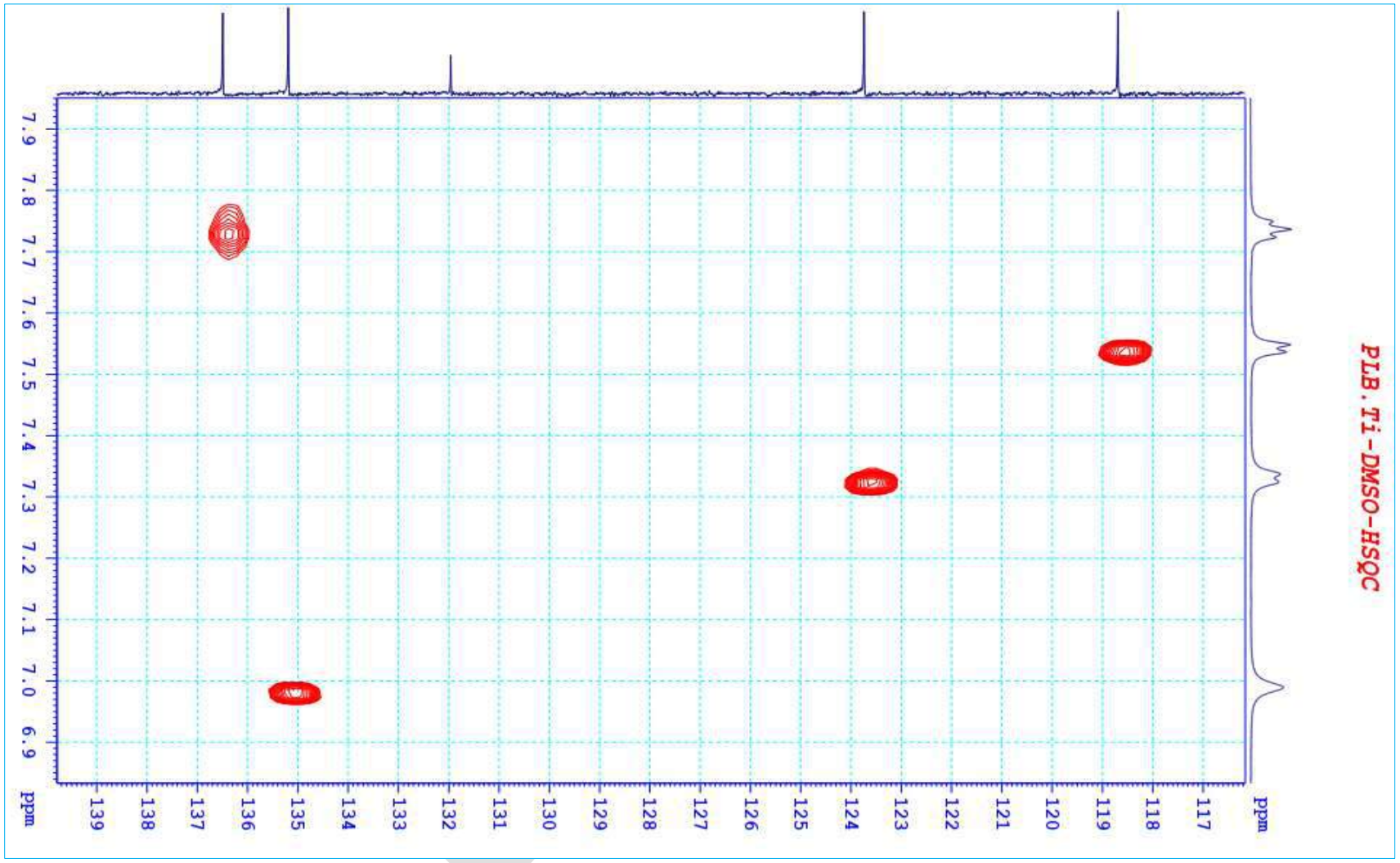
Phụ lục 19. Phổ ^{13}C-NMR của Ti(IV)-PLB từ 20-190 ppm



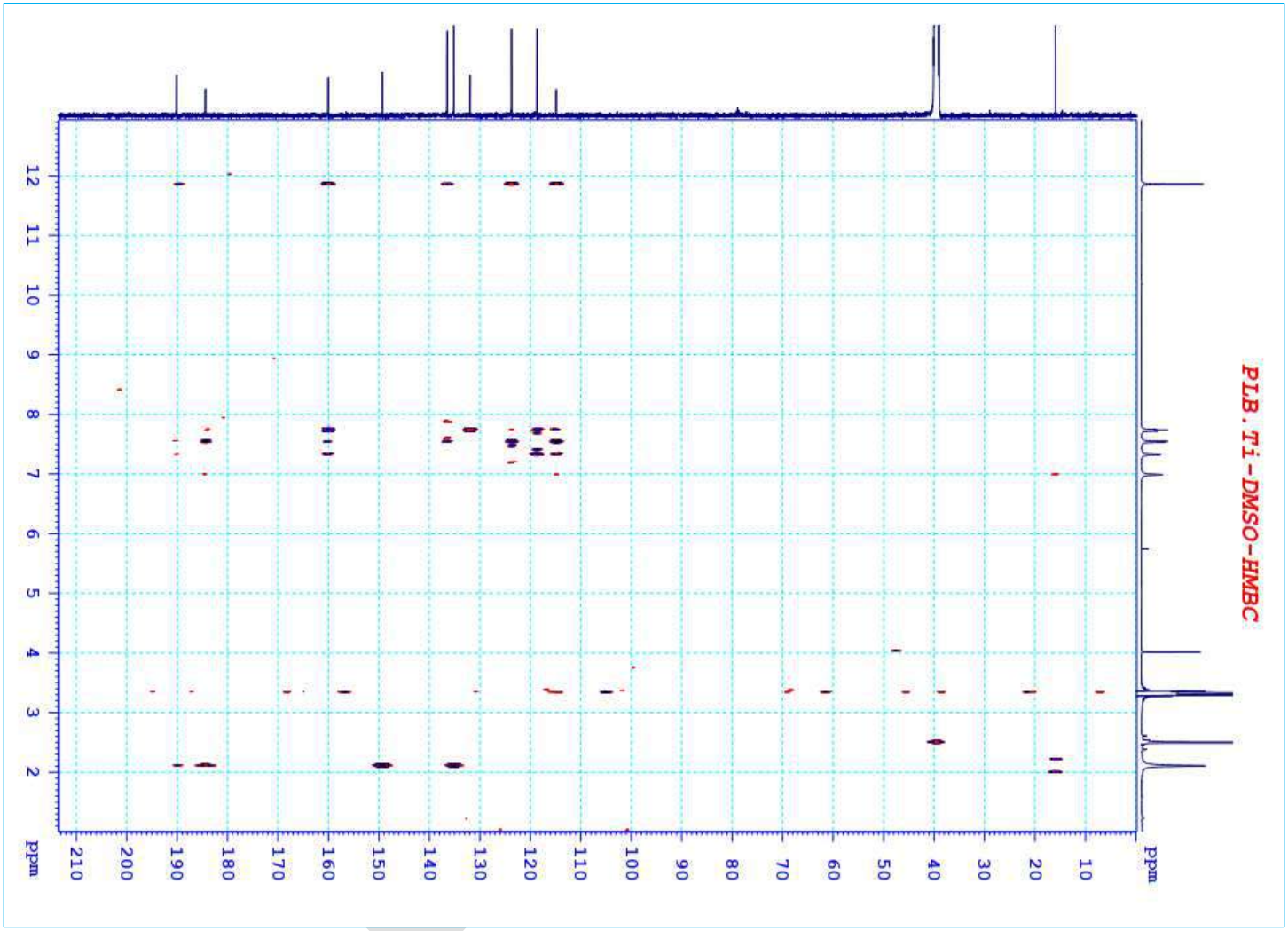
Phụ lục 20. Phổ ^{13}C-NMR của Ti(IV)-PLB từ 120-190 ppm



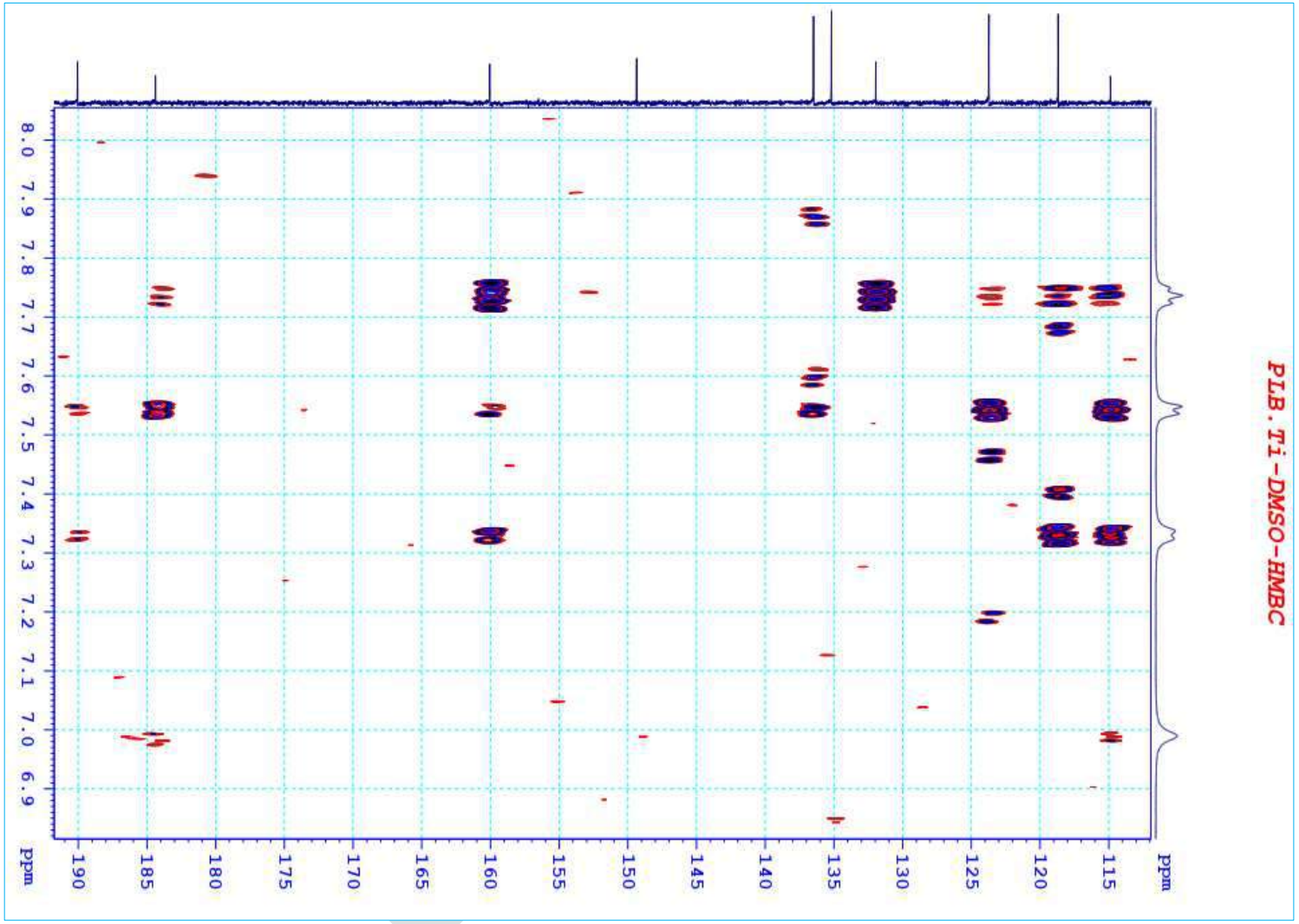
Phụ lục 21. Phổ 2D- HSQC of Ti- PLB



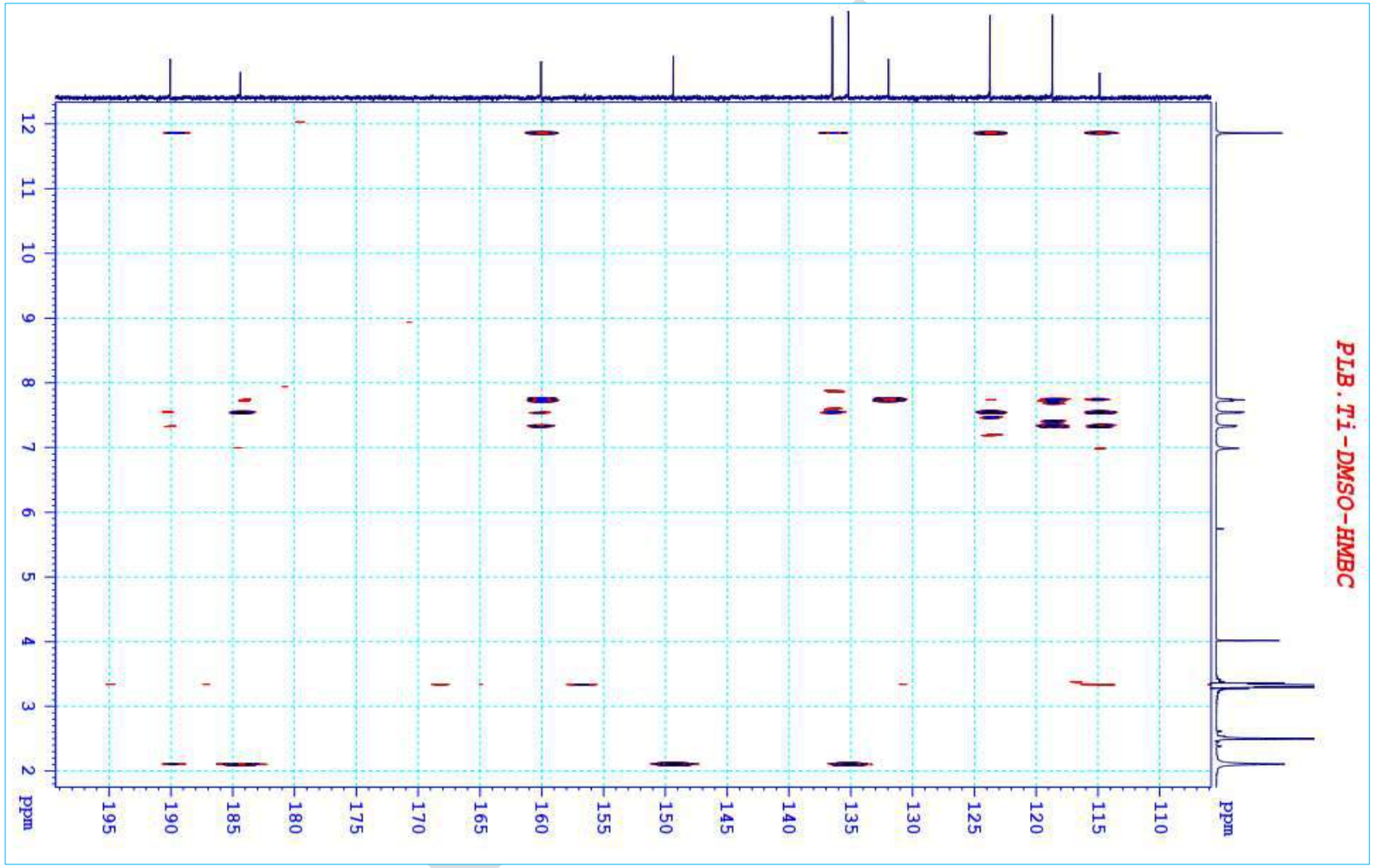
Phụ lục 22. Phổ 2D- HSQC của Ti(IV)- PLB từ 139 đến 190 và 6.9 đến 7.9 ppm



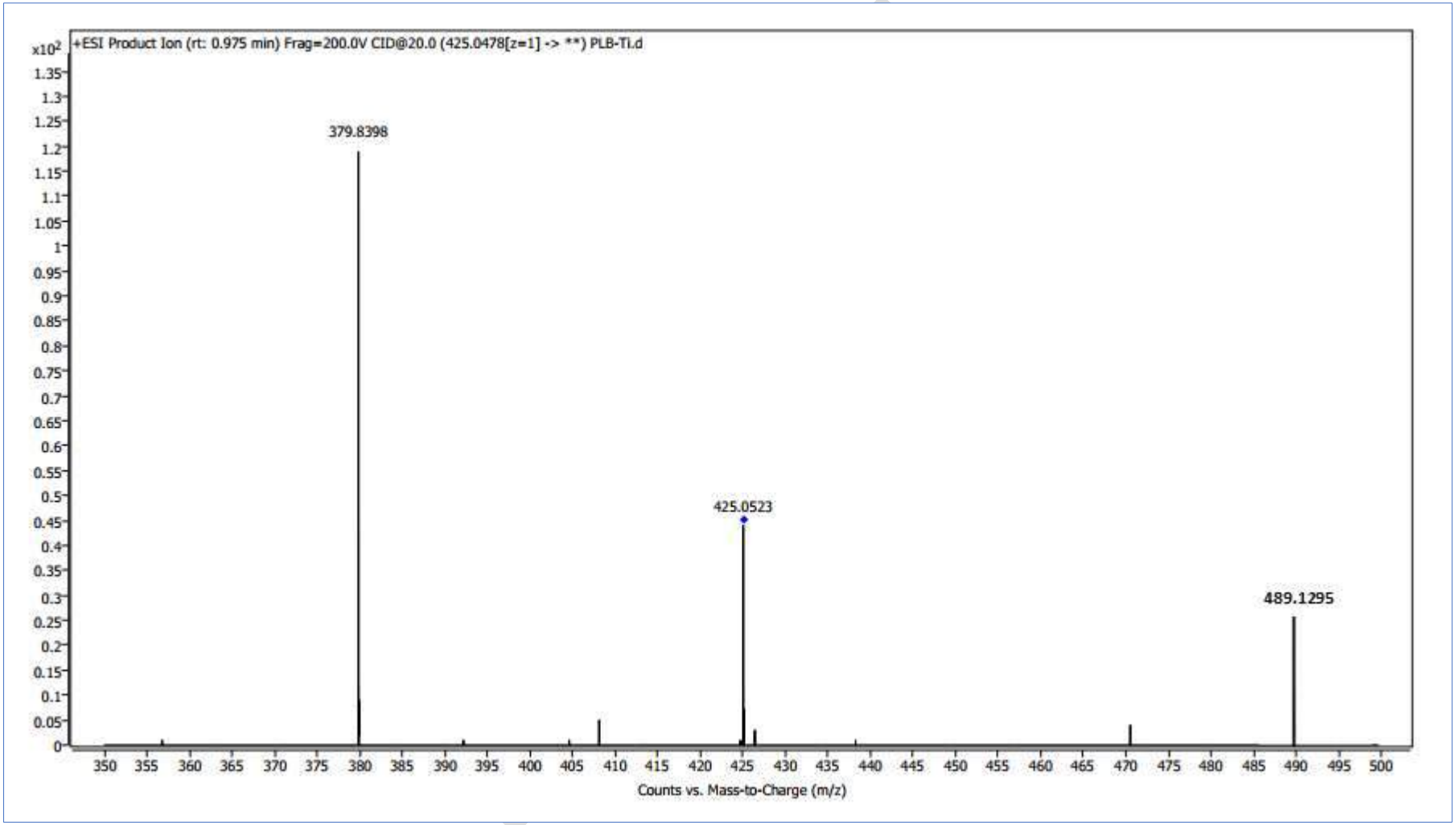
Phụ lục 23. Phổ 2D- HMBC của Ti(IV)- PLB



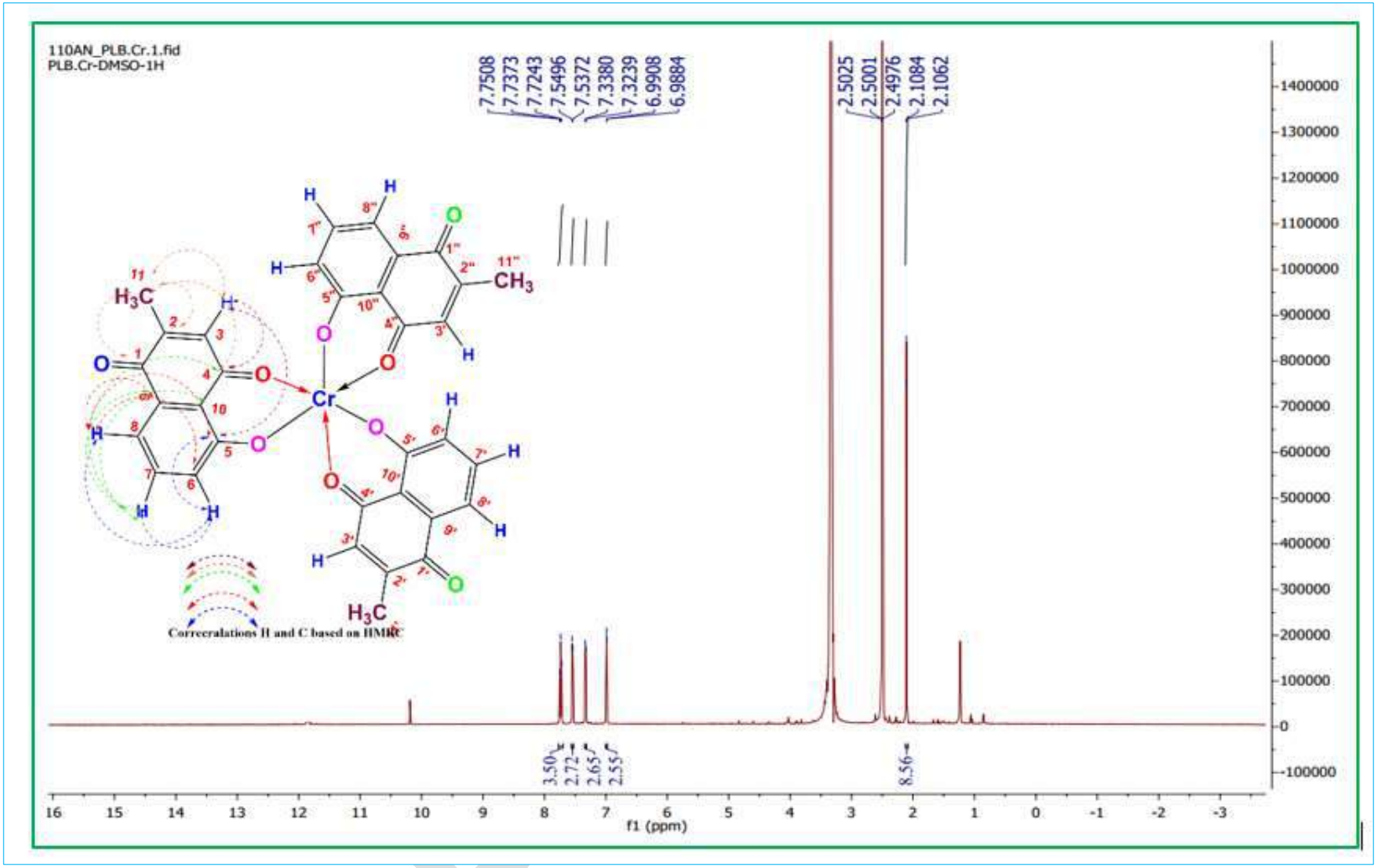
Phụ lục 24. Phổ 2D- HMBC của Ti(IV) - PLB từ 110 đến 195 ppm và 2 đến 12 ppm



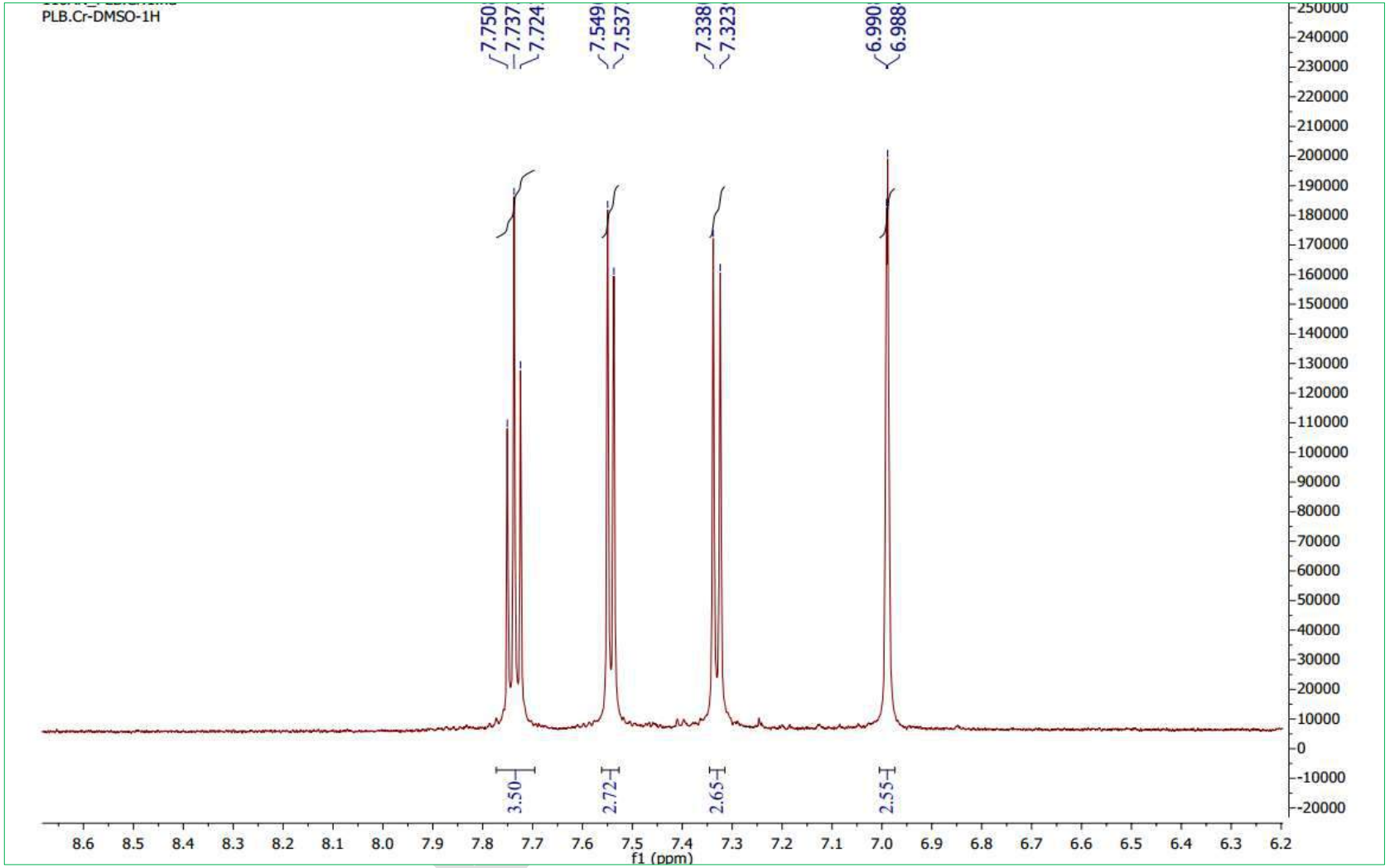
Phụ lục 25. Phổ 2D- HMBC của Ti(IV)- PLB từ 110 đến 195 ppm và 6.0 đến 8.0 ppm



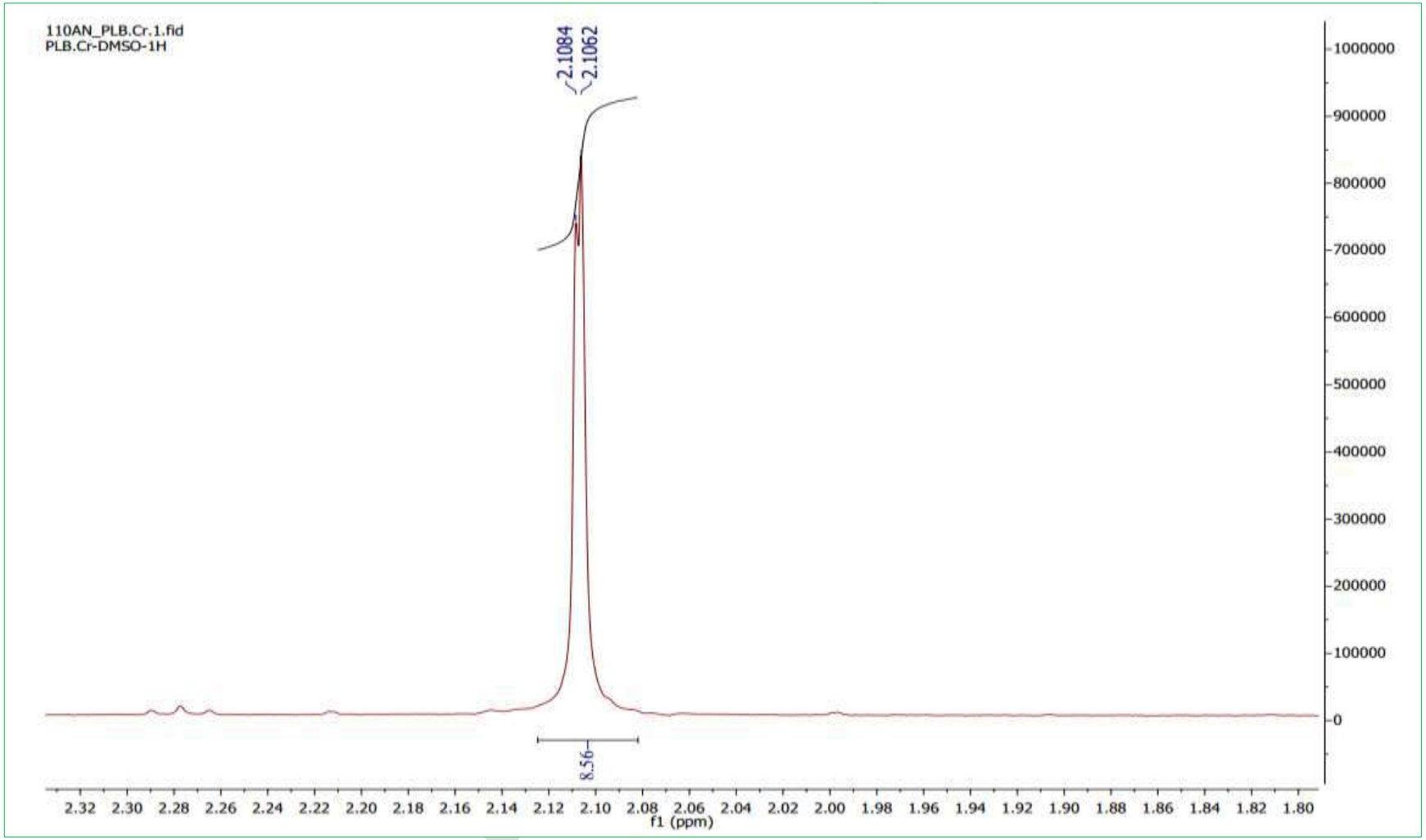
Phụ lục 26. Phổ HR -MS của $Ti(PLB)_2$



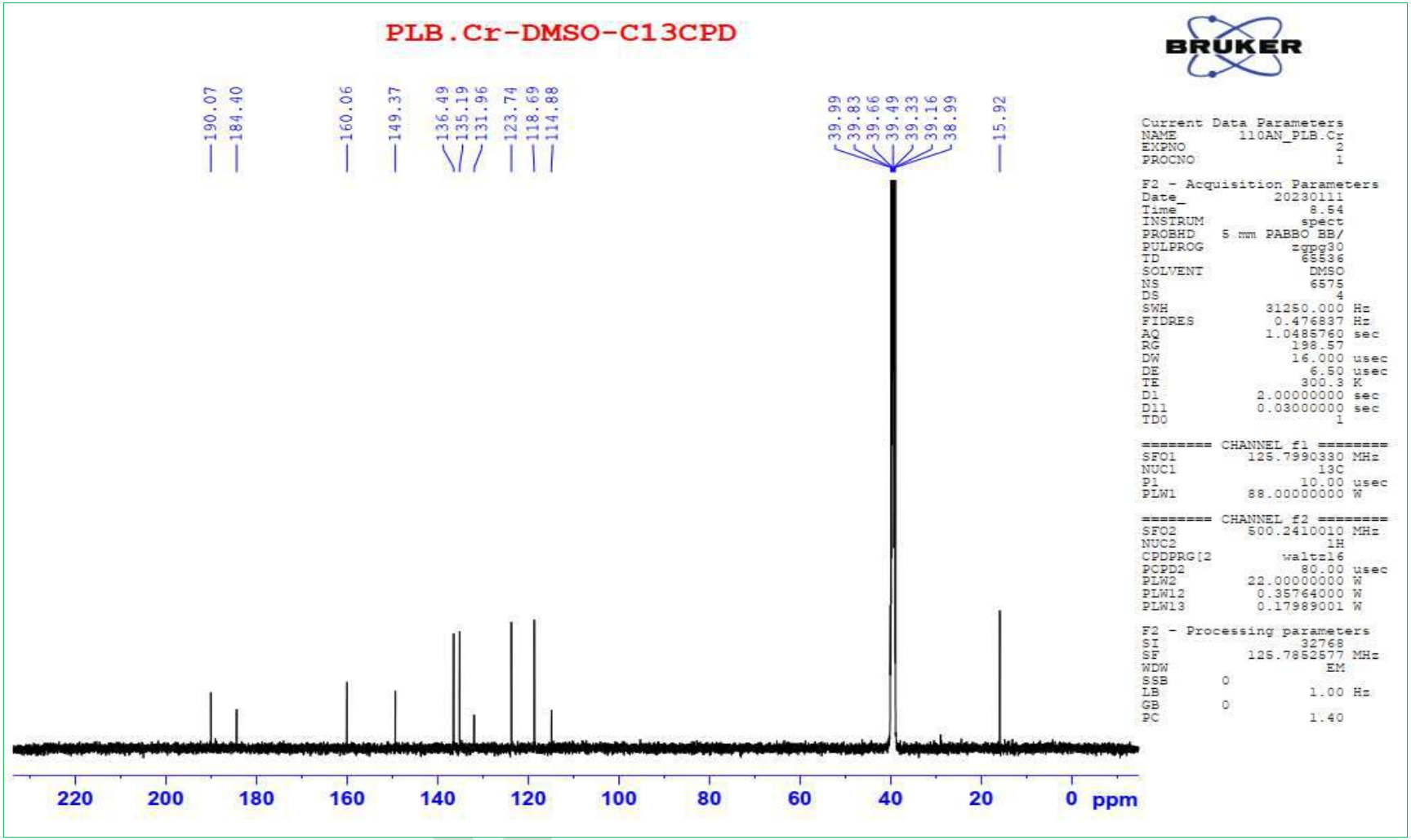
Phụ lục 27. Phổ 1H-NMR của phức $Cr(PLB)_3$



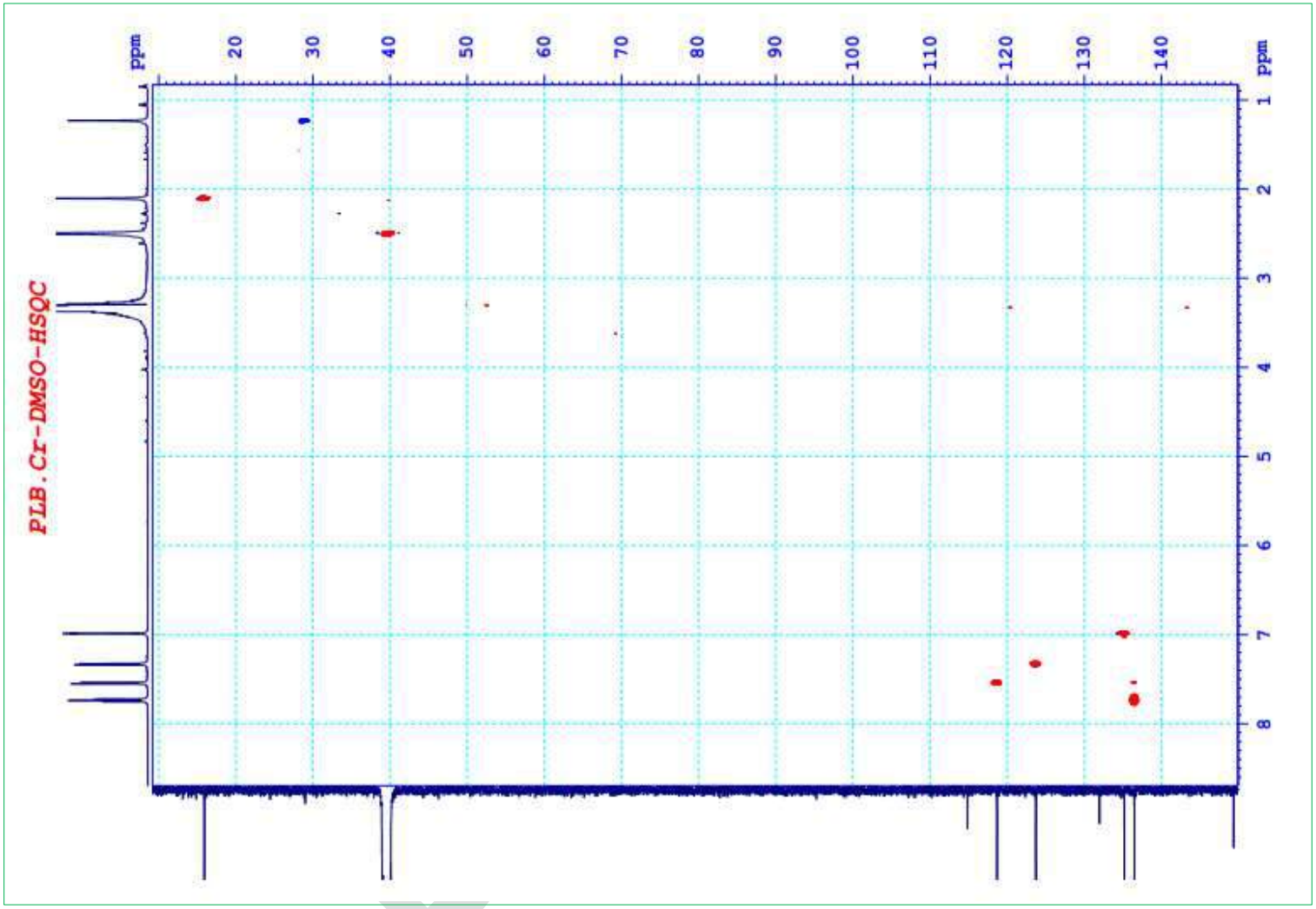
Phụ lục 28. Phổ 1H-NMR của $Cr(PLB)_3$ mở rộng từ 6.9ppm đến 7.8ppm



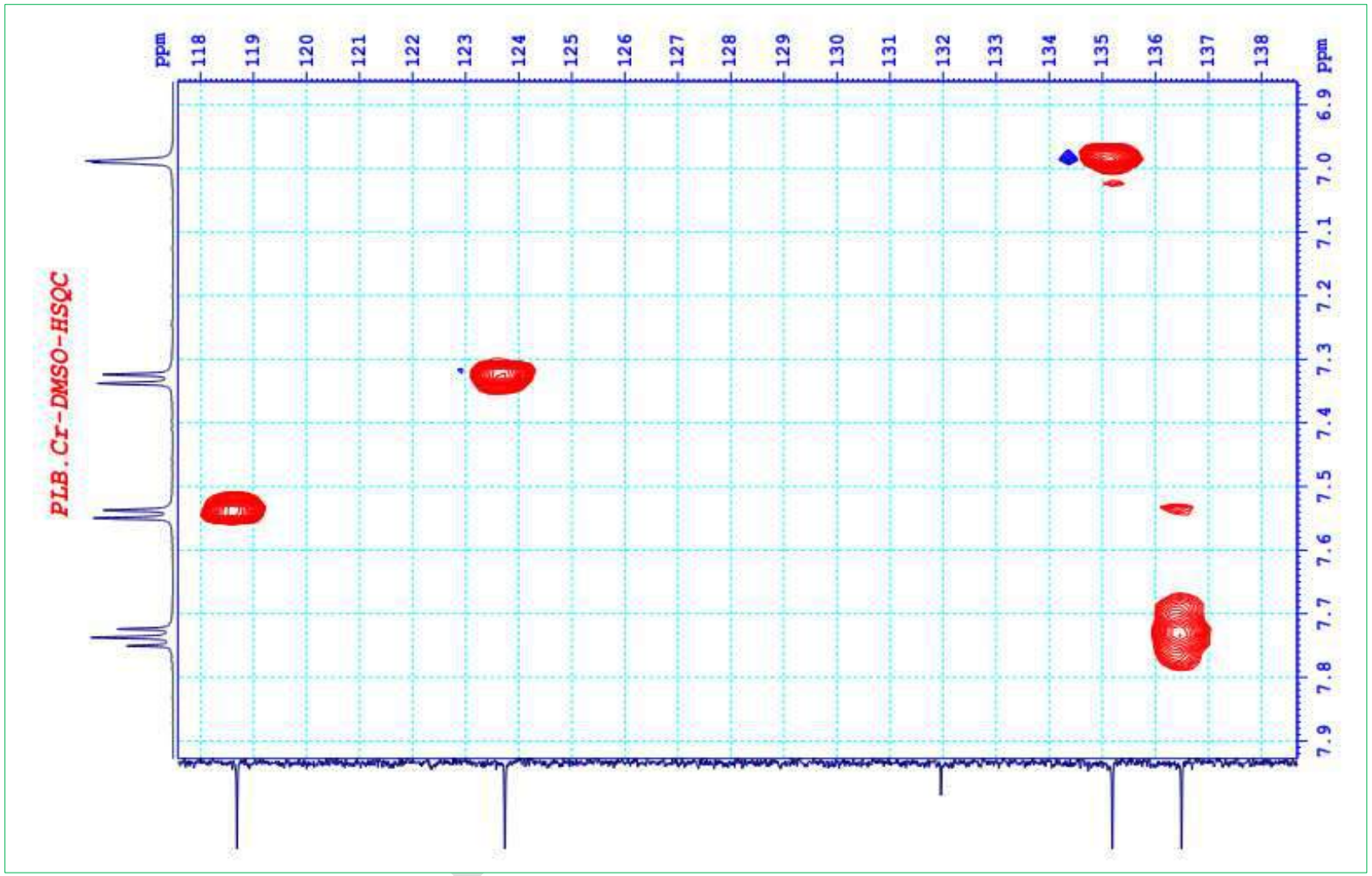
Phụ lục 29. Phổ ^{1}H- NMR của $Cr(PLB)_3$ mở rộng từ 2.08 đến 2.13 ppm



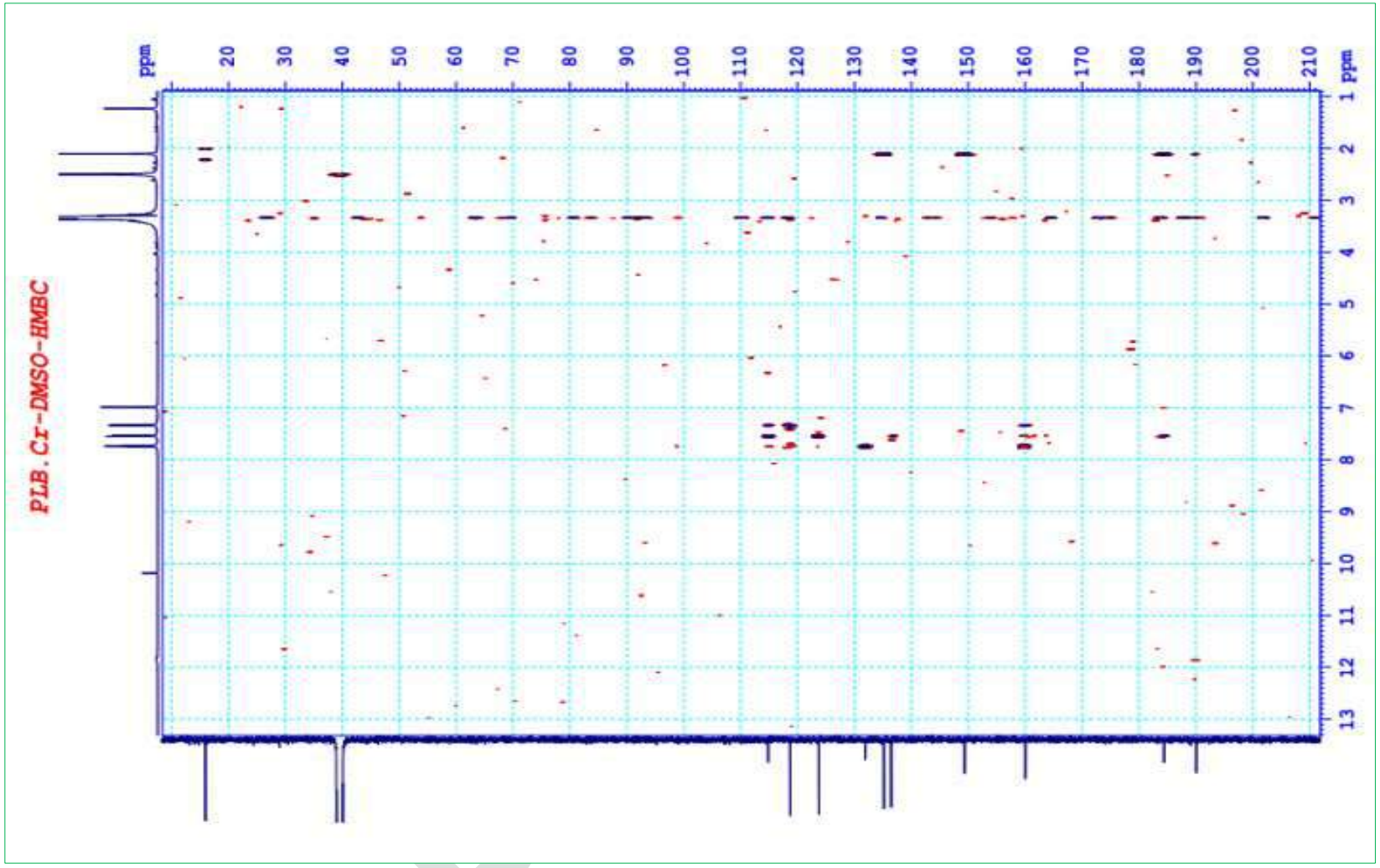
Phụ lục 30. Phổ ^{13}C -NMR của $Cr(PLB)_3$



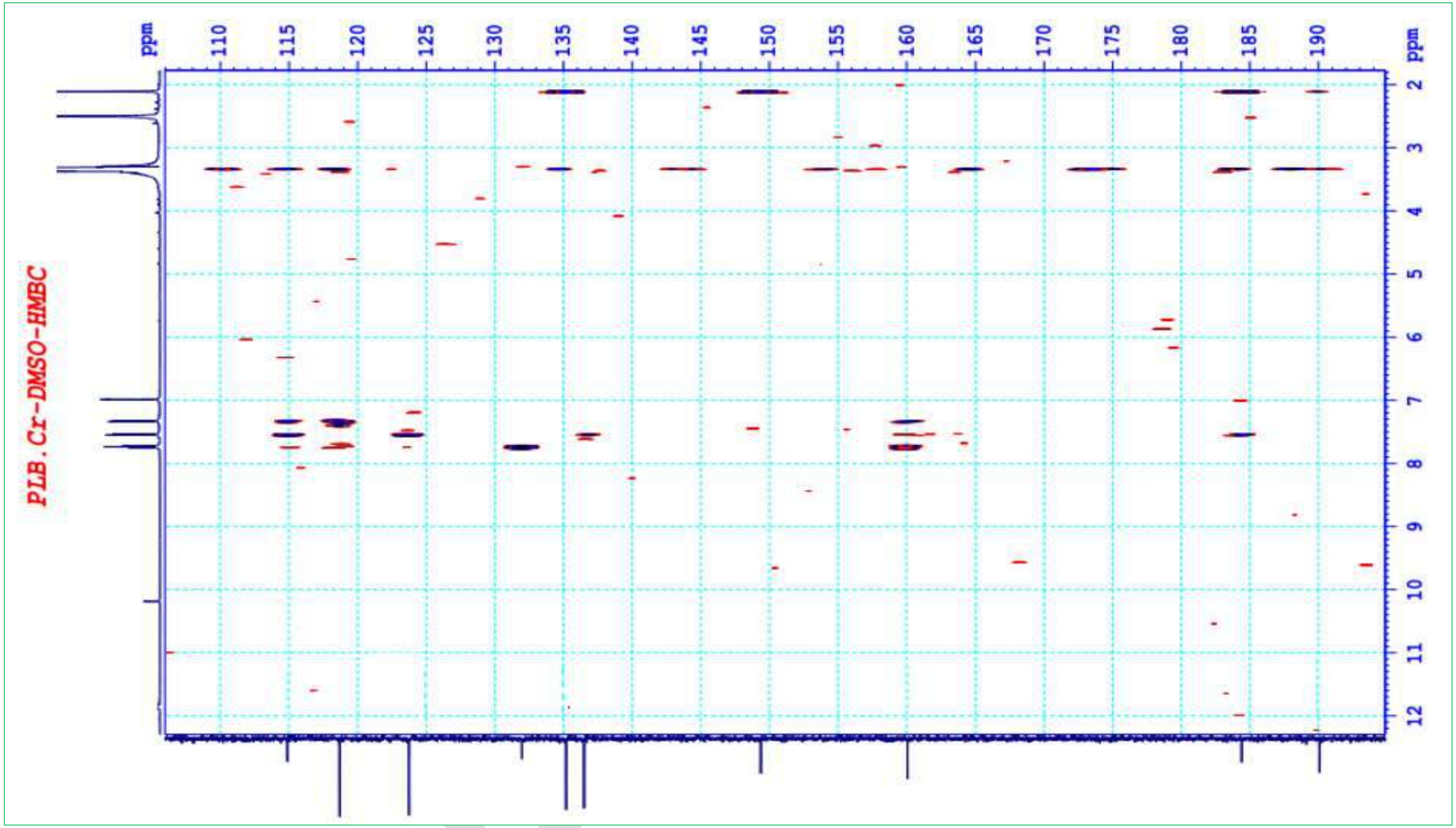
Phụ lục 31. Phổ 2D- HSQC của $Cr(PLB)_3$ từ 20.0 đến 140.0 và 1.0 đến 8.0 ppm



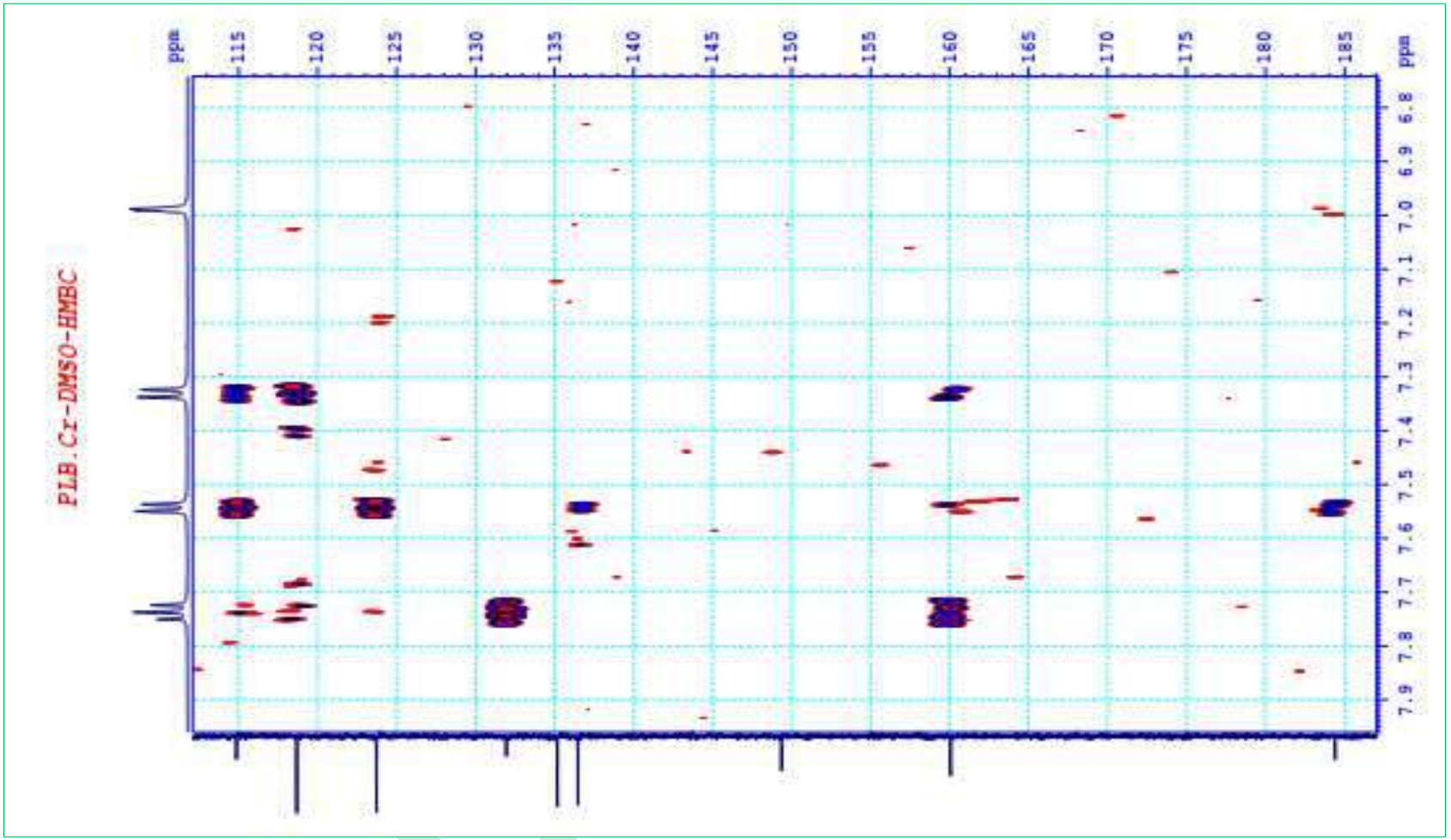
Phụ lục 32. Phổ 2D- HSQC của $Cr(PLB)_3$ từ 118 đến 138 và 6.9 đến 7.9 ppm



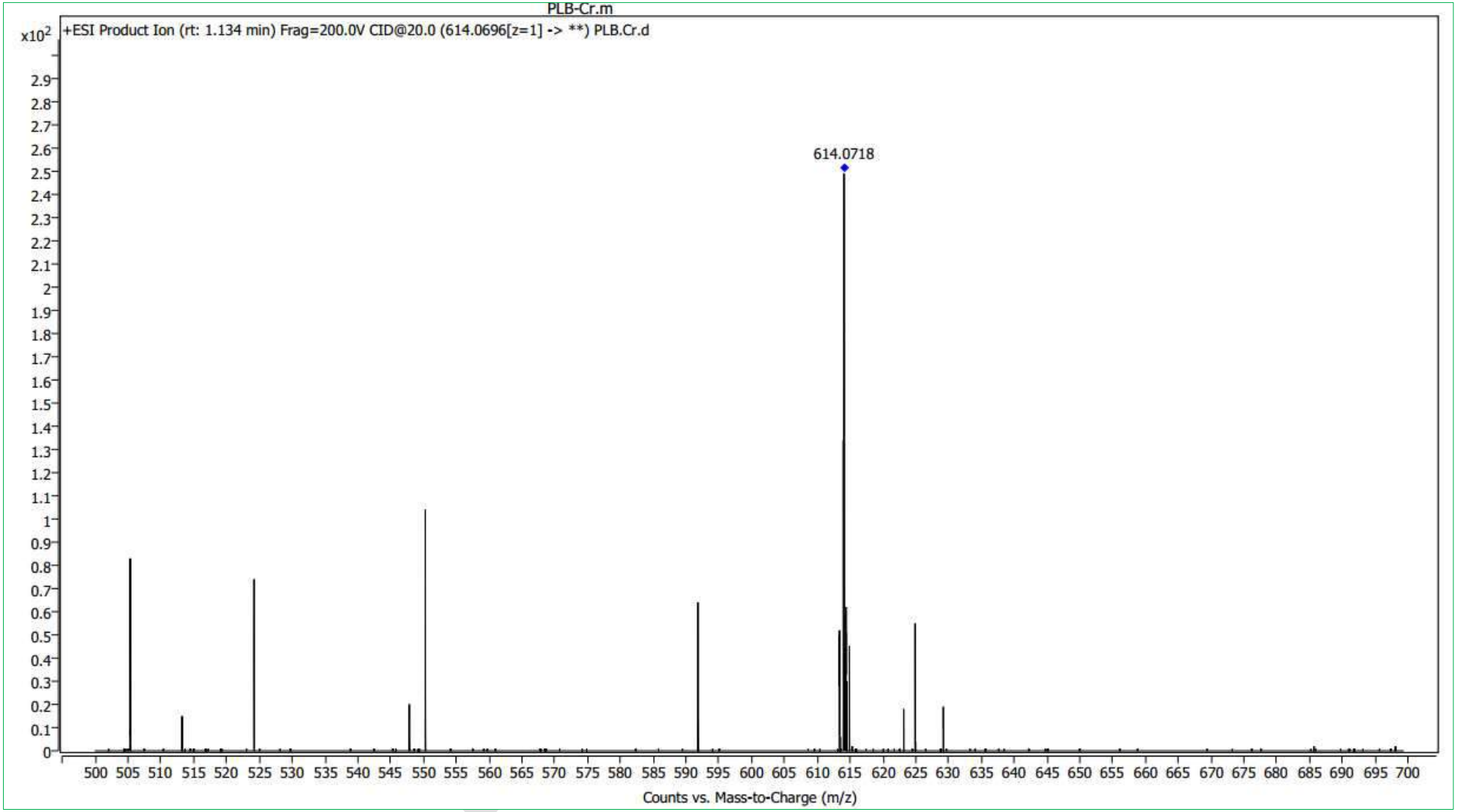
Phụ lục 33. Phổ 2D- HMBC của $Cr(PLB)_3$ từ 20 đến 210 ppm và 1 đến 13 ppm



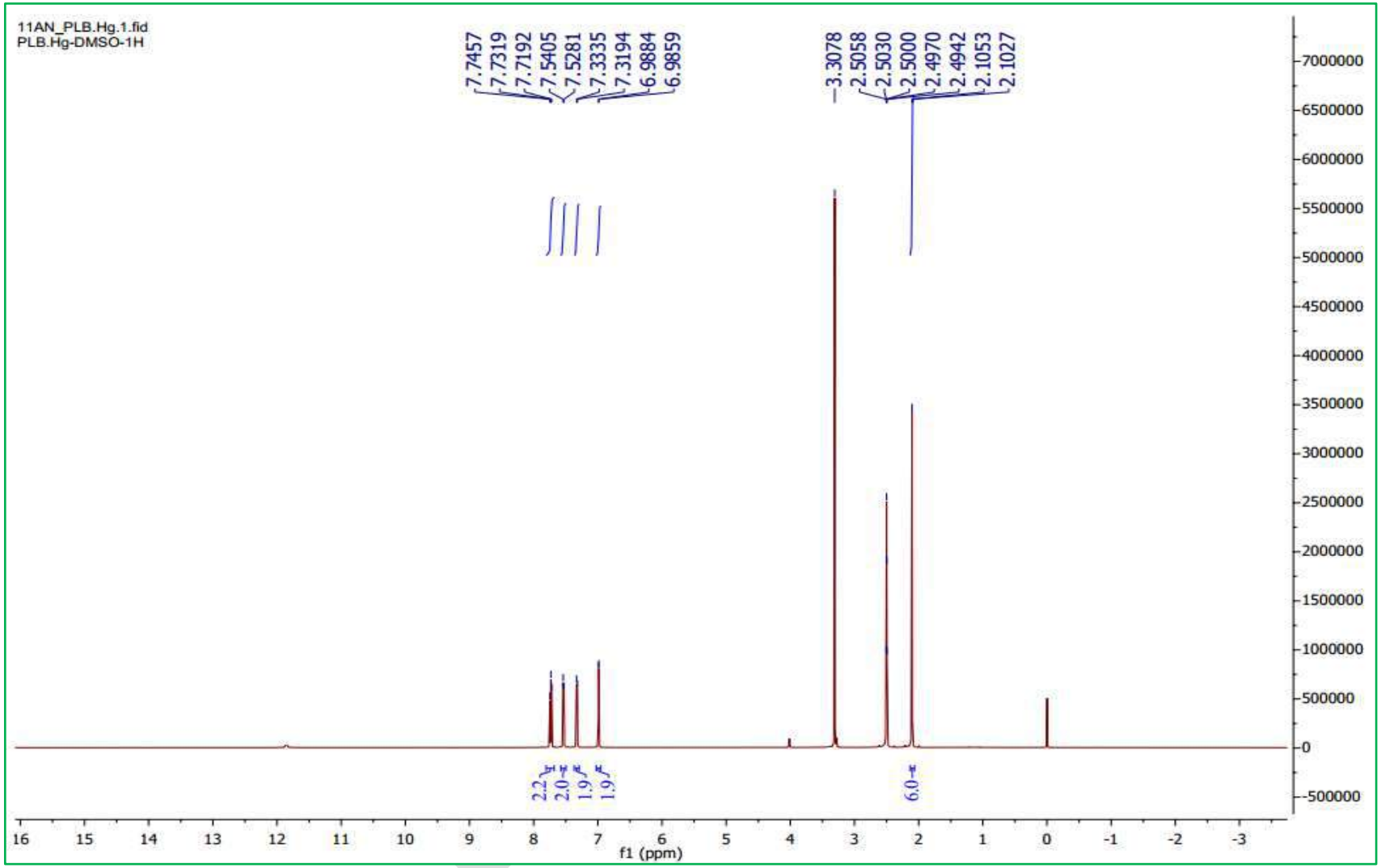
Phụ lục 34. Phổ 2D- HMBC của $Cr(PLB)_3$ từ 110 đến 190 ppm và 2 đến 12 ppm



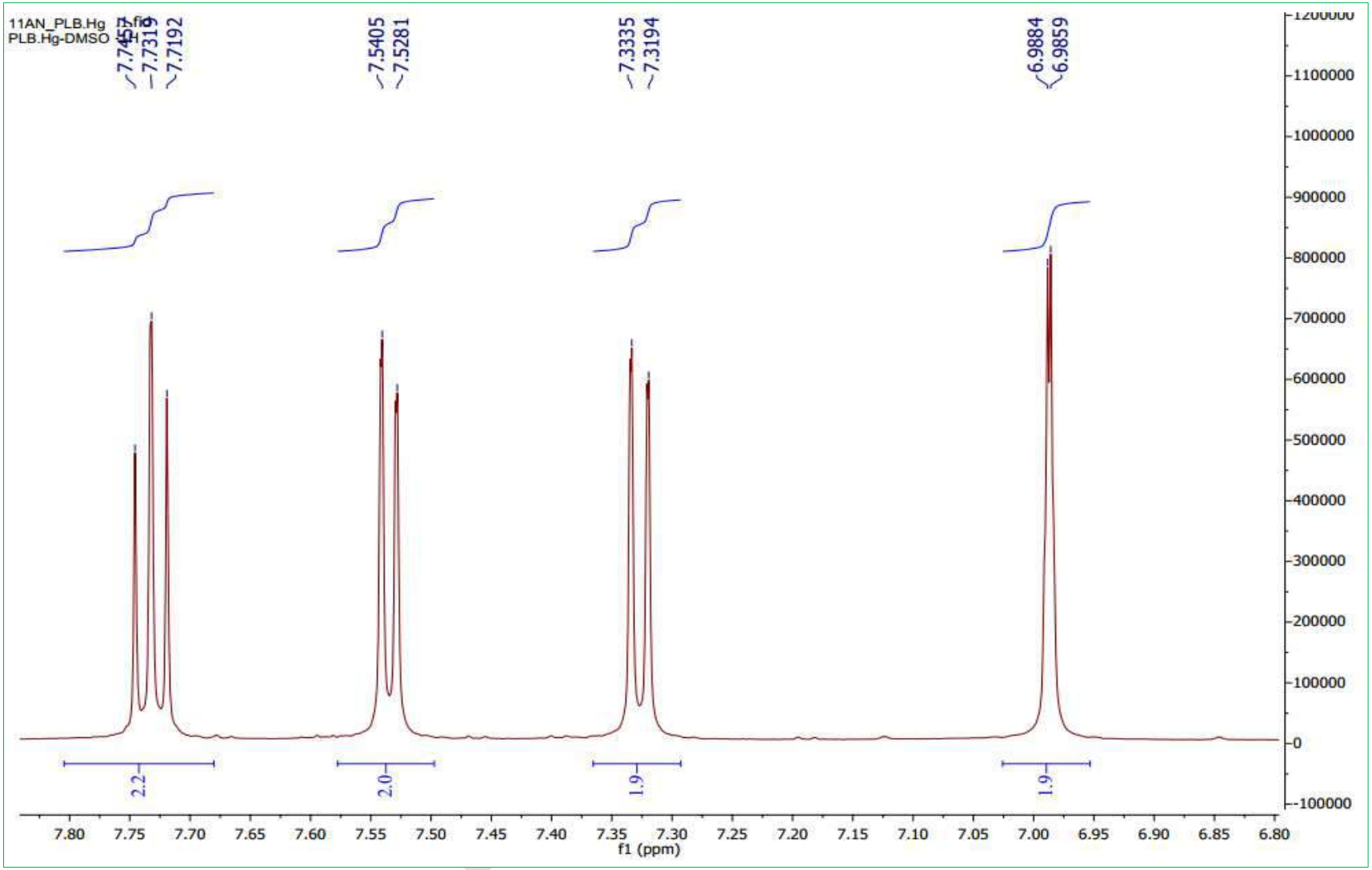
Phụ lục 35. Phổ 2D- HMBC của Cr(PLB)$_3$ từ 110 đến 190 ppm và 6.8 đến 7.9 ppm



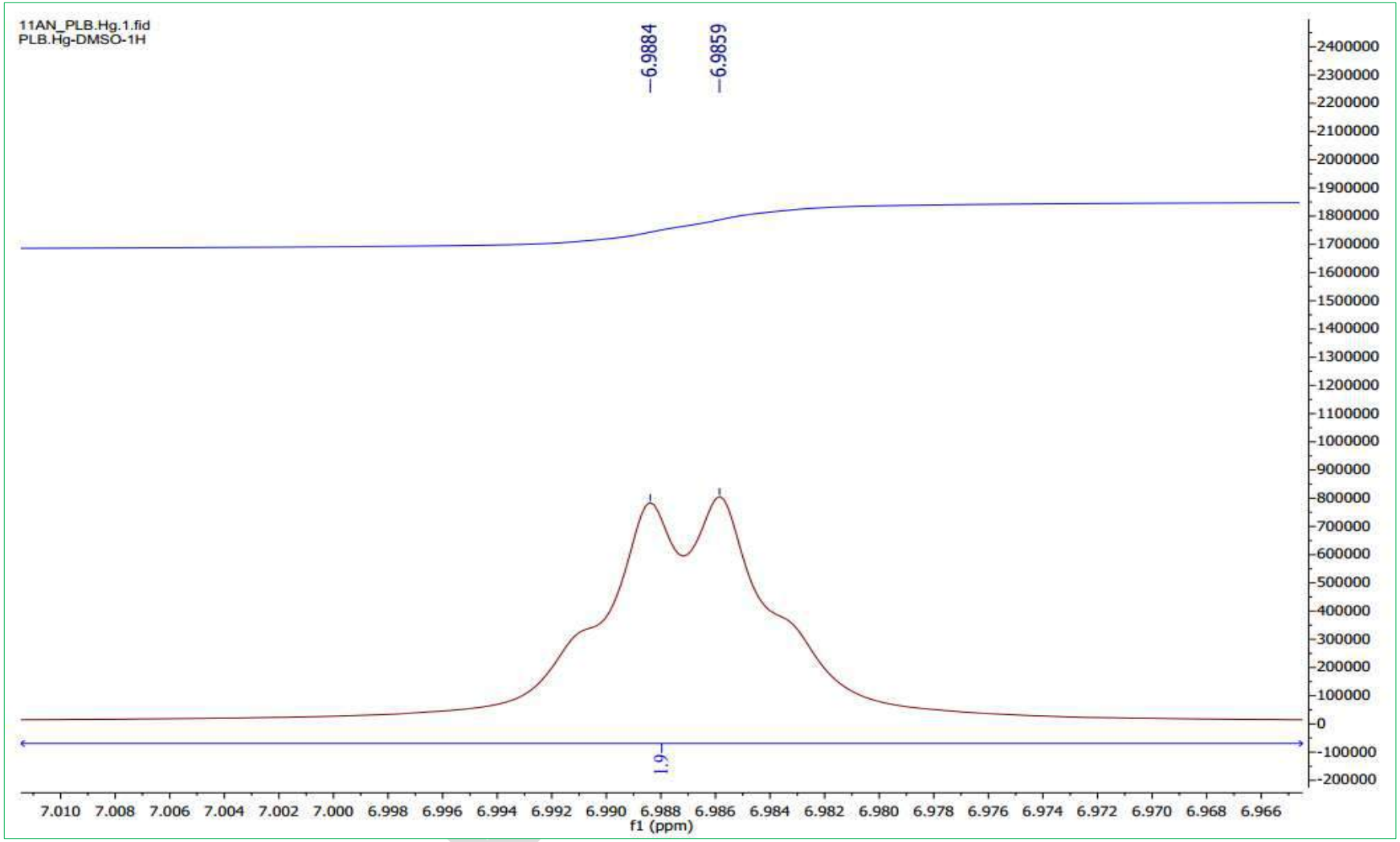
Phụ lục 36. Phổ HR-MS của phức $Cr(PLB)_3$.



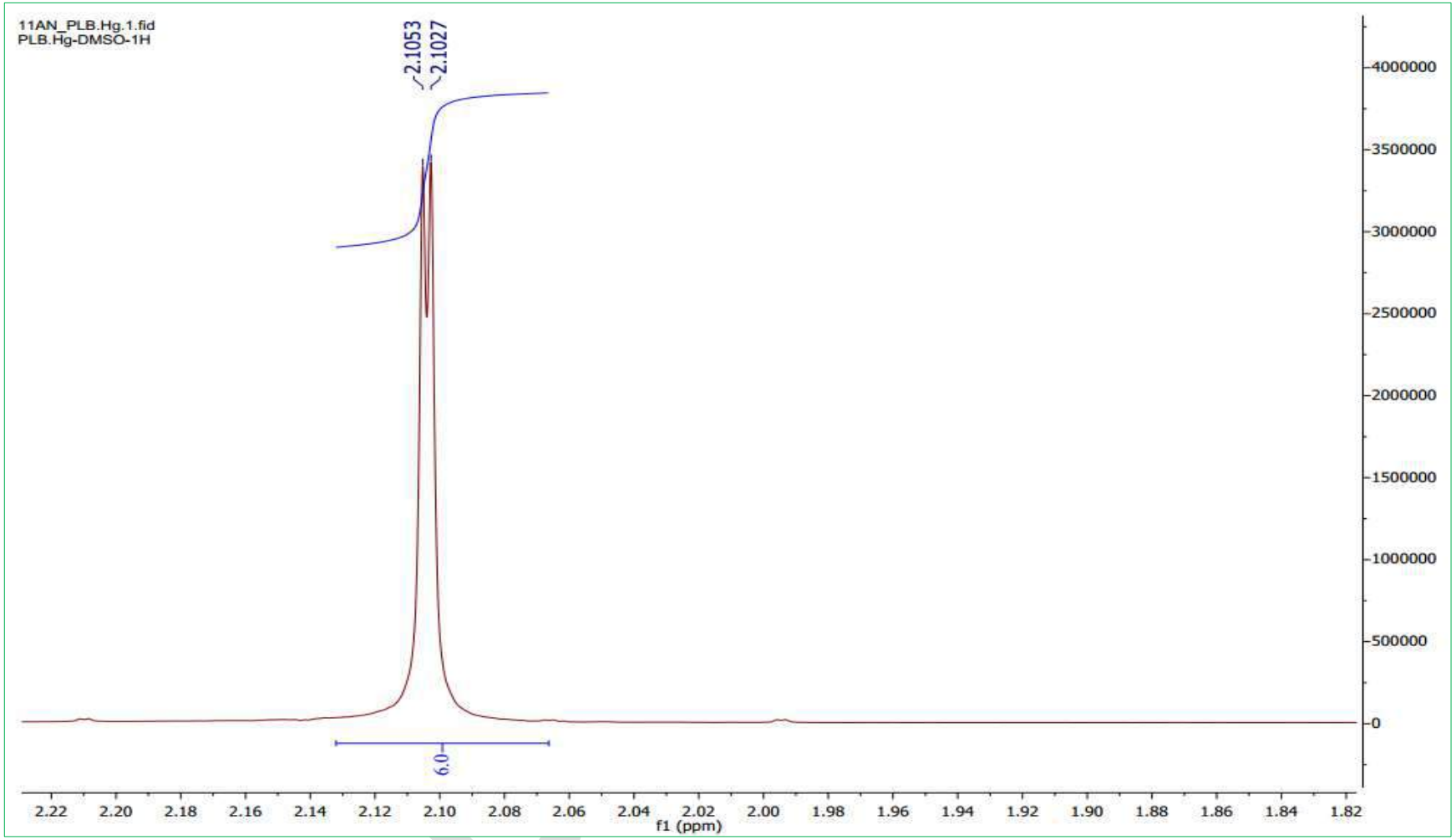
Phụ lục 37. Phổ ^{1}H -NMR của phức $Hg(PLB)_2$



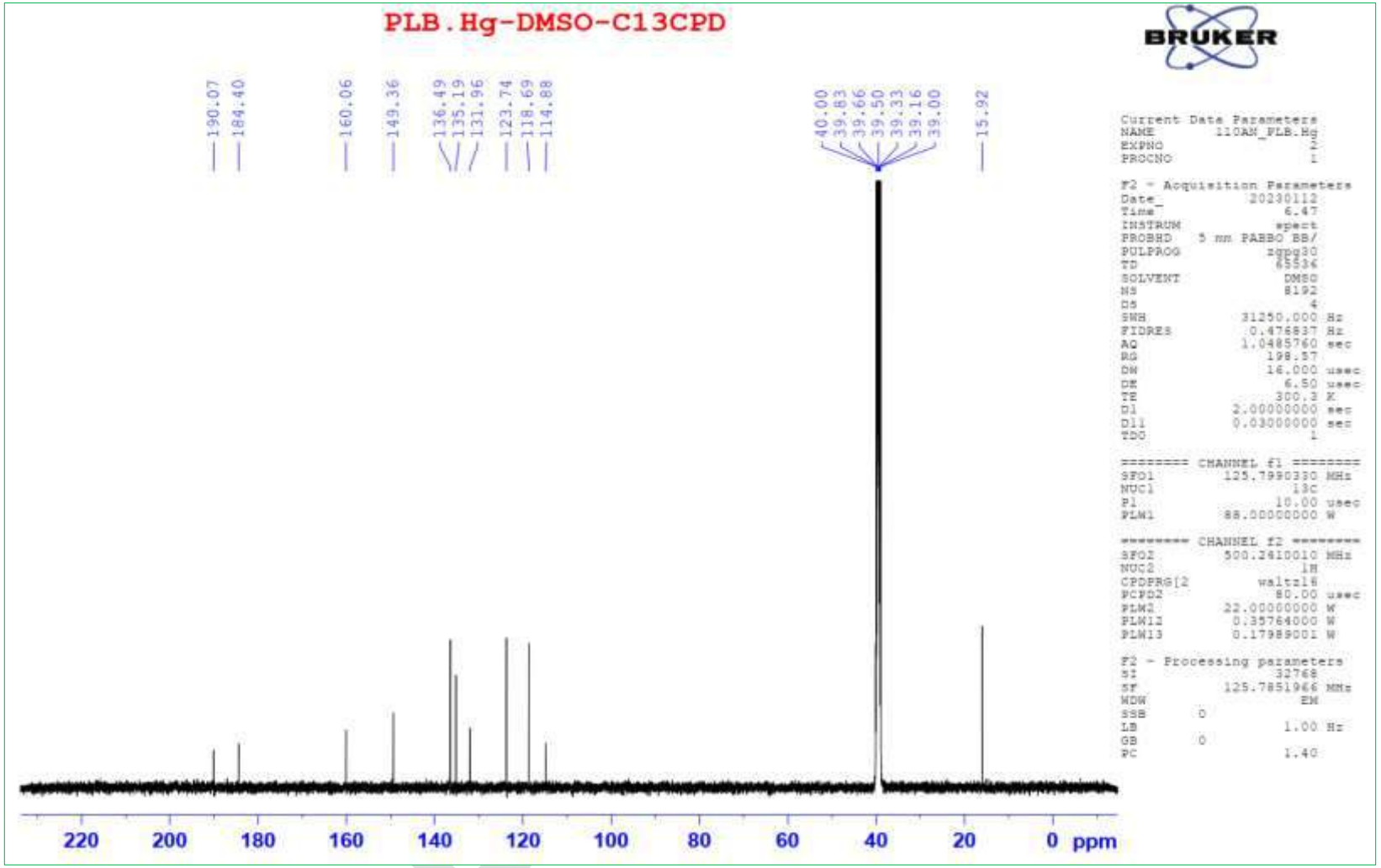
Phụ lục 38. Phổ ^{1}H -NMR của $Hg(PLB)_2$mở rộng từ 7.8 đến 6.8 ppm



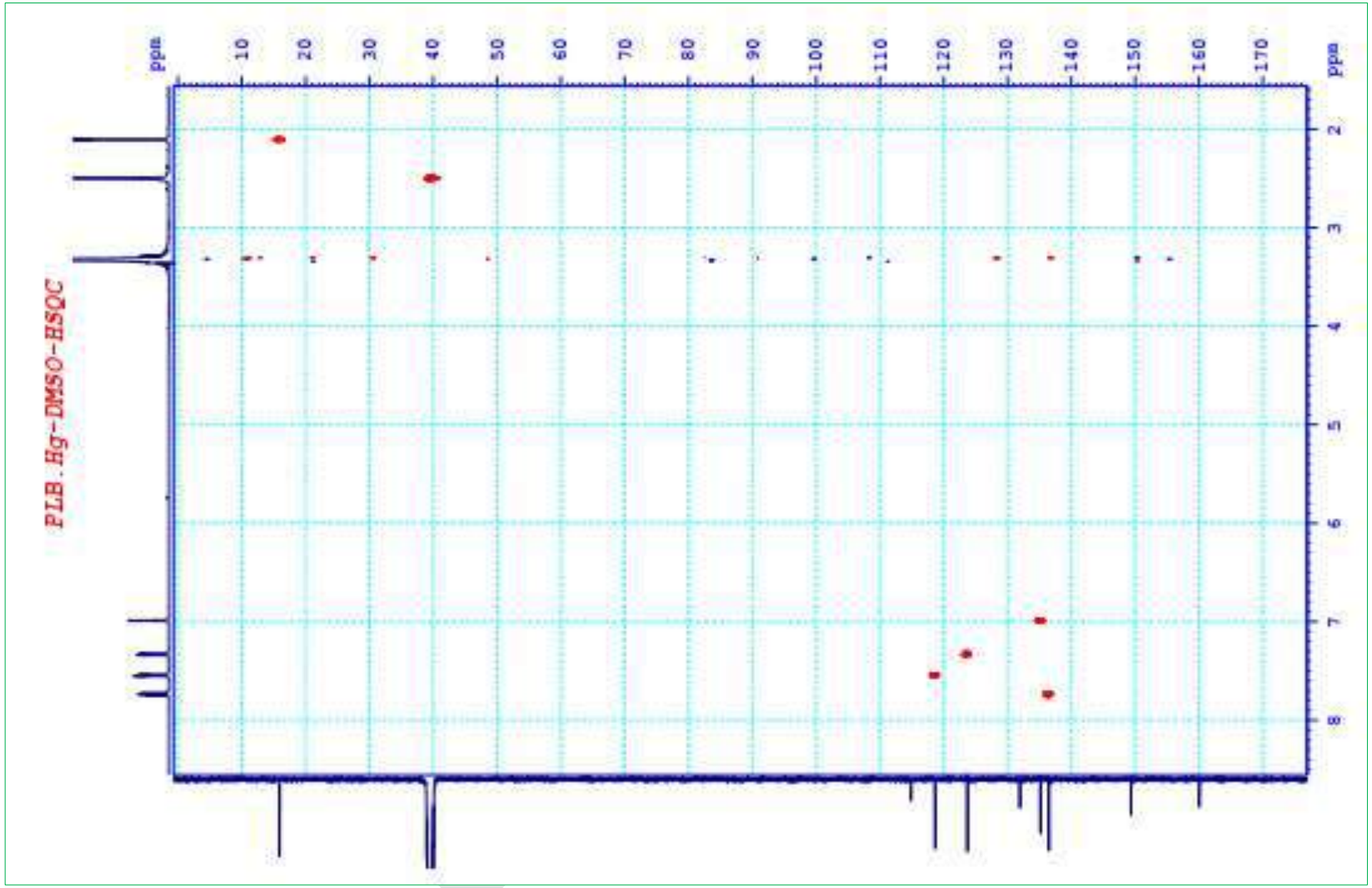
Phụ lục 39. Phổ ^{1}H -NMR của $Hg(PLB)_2$mở rộng từ 6.9 đến 7.0 ppm



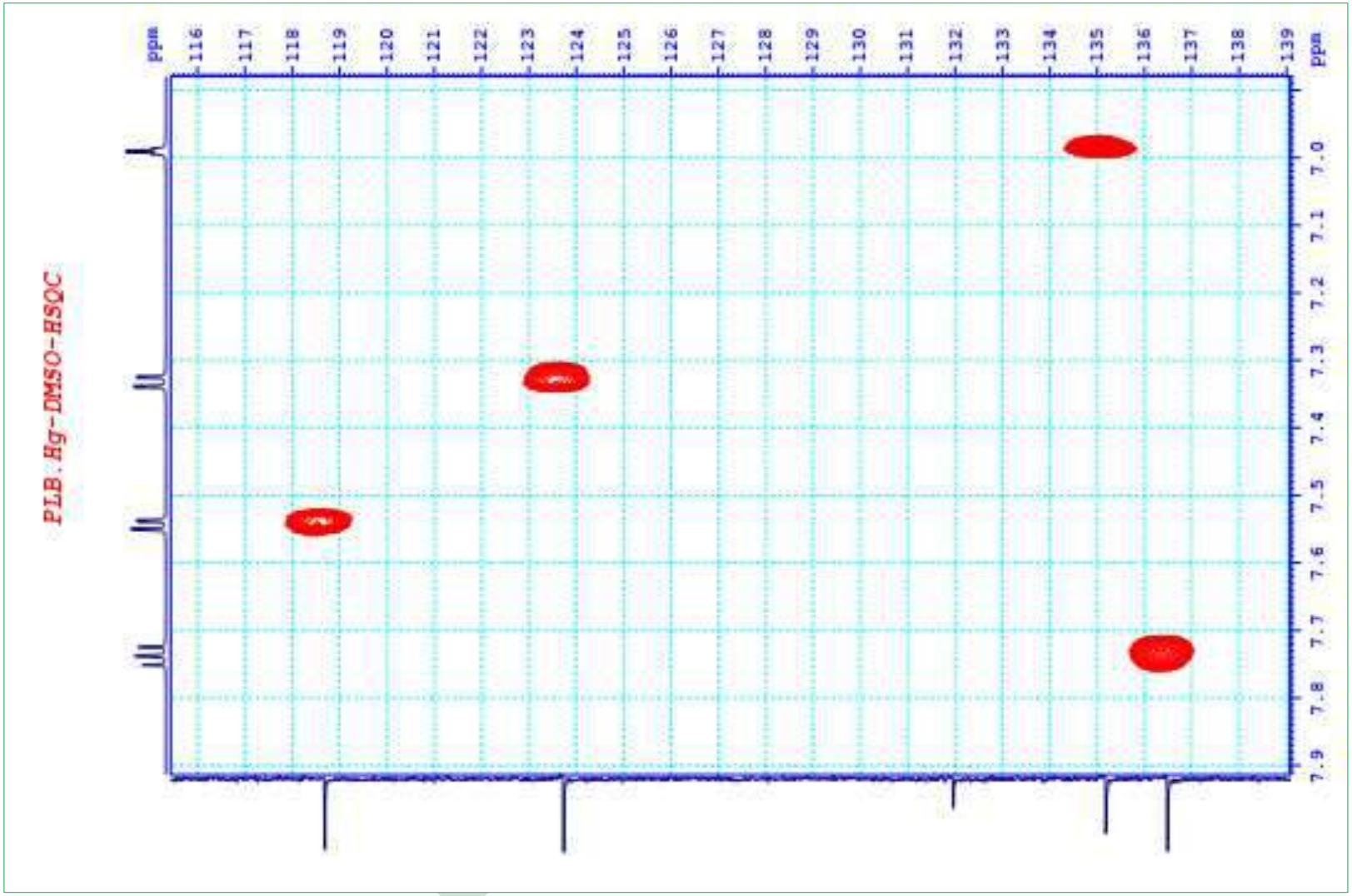
Phụ lục 40. Phổ ^{1}H -NMR của $Hg(PLB)_2$mở rộng từ 1.8 đến 2.2 ppm



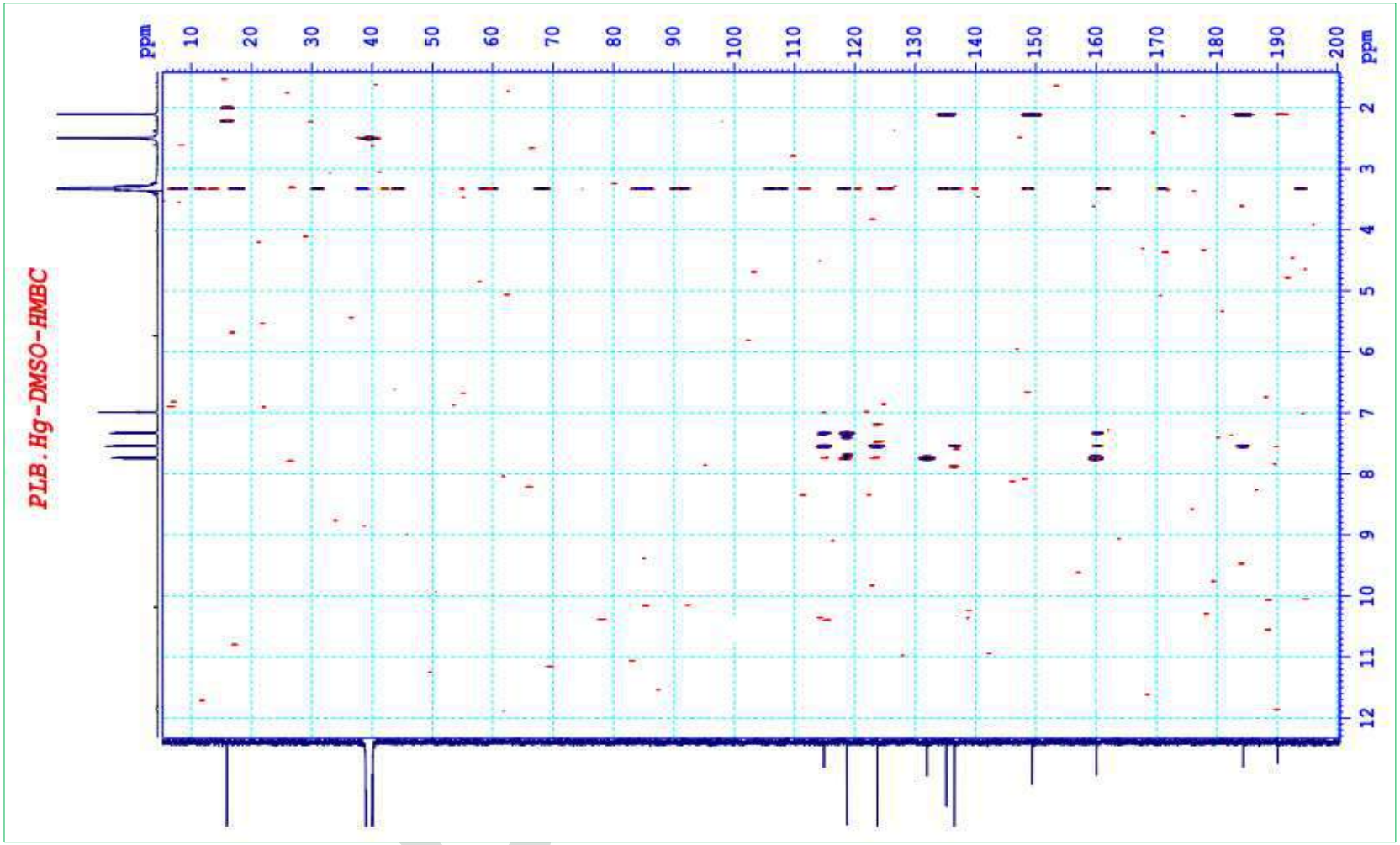
Phụ lục 41. Phổ 13C -NMR của phức Hg(PLB)3



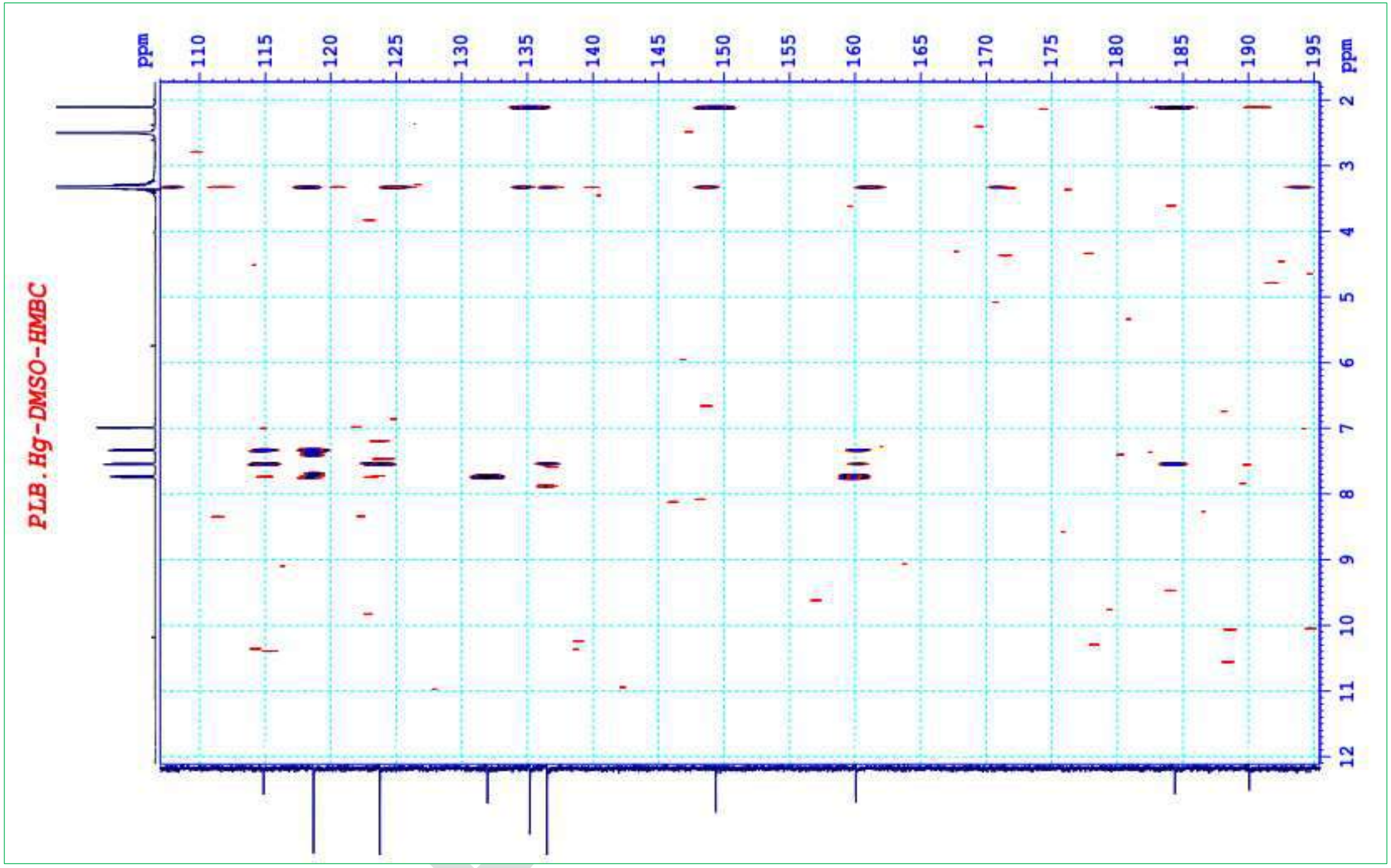
Phụ lục 42. Phổ 2D- HSQC của $Hg(PLB)_2$ từ 10.0 đến 170.0 và 2.0 đến 8.0 ppm



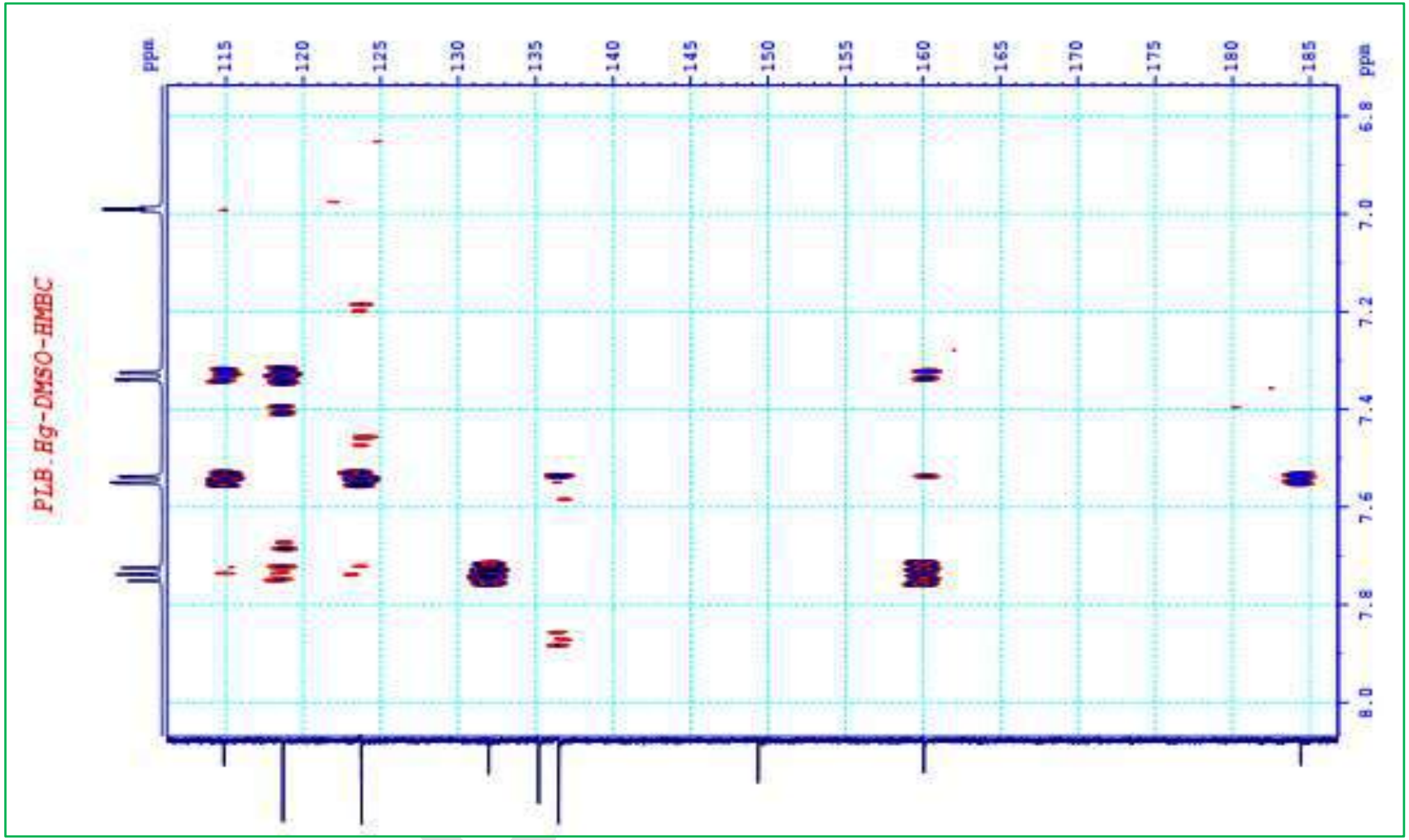
Phụ lục 43. Phổ 2D- HSQC $Hg(PLB)_2$ từ 116.0 đến 139.0 và 7.0 đến 7.9 ppm



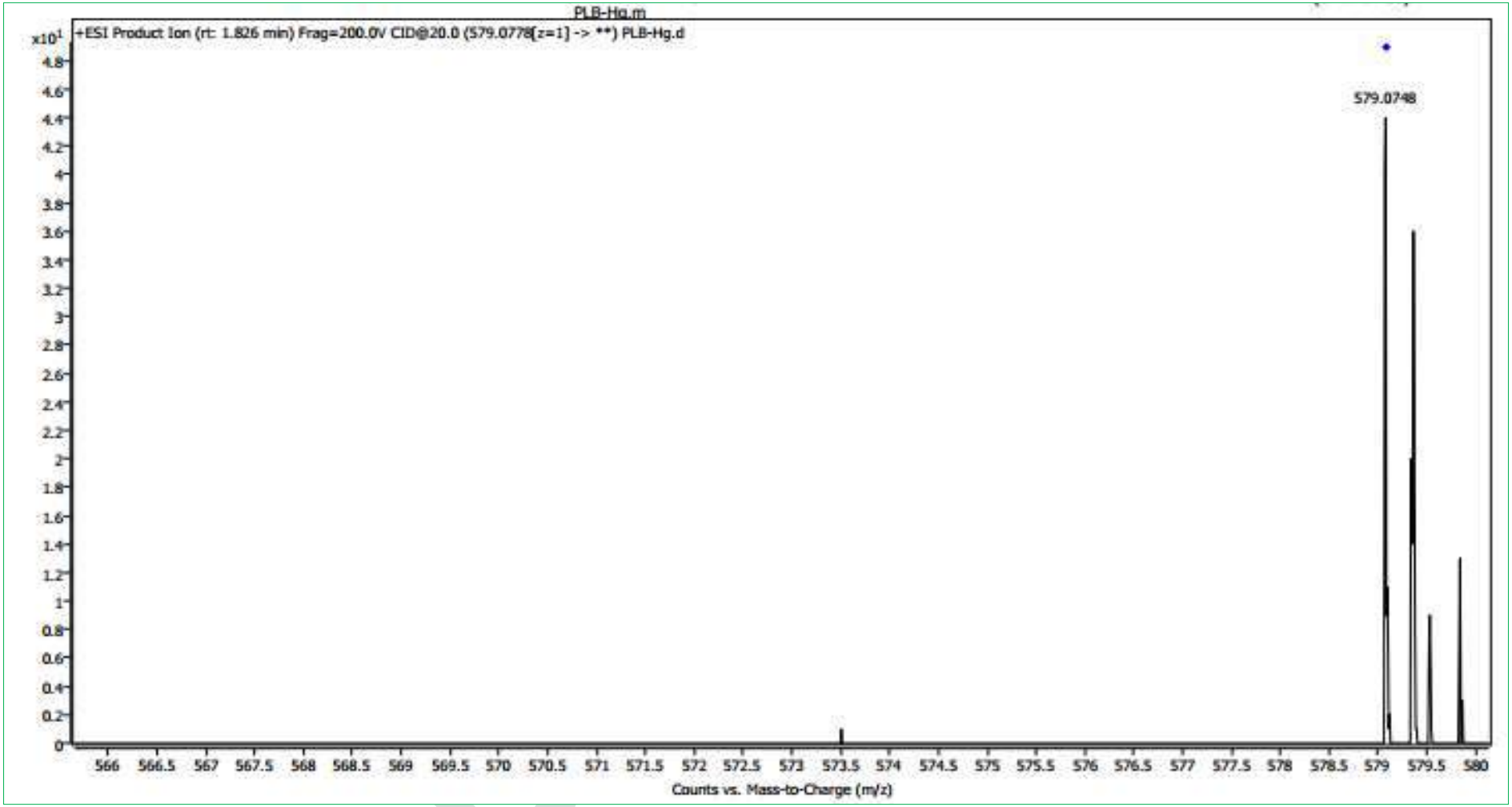
Phụ lục 44. Phổ 2D- HMBC của $Hg(PLB)_2$ từ 10.0 đến 200.0 và 2.0 đến 12 ppm



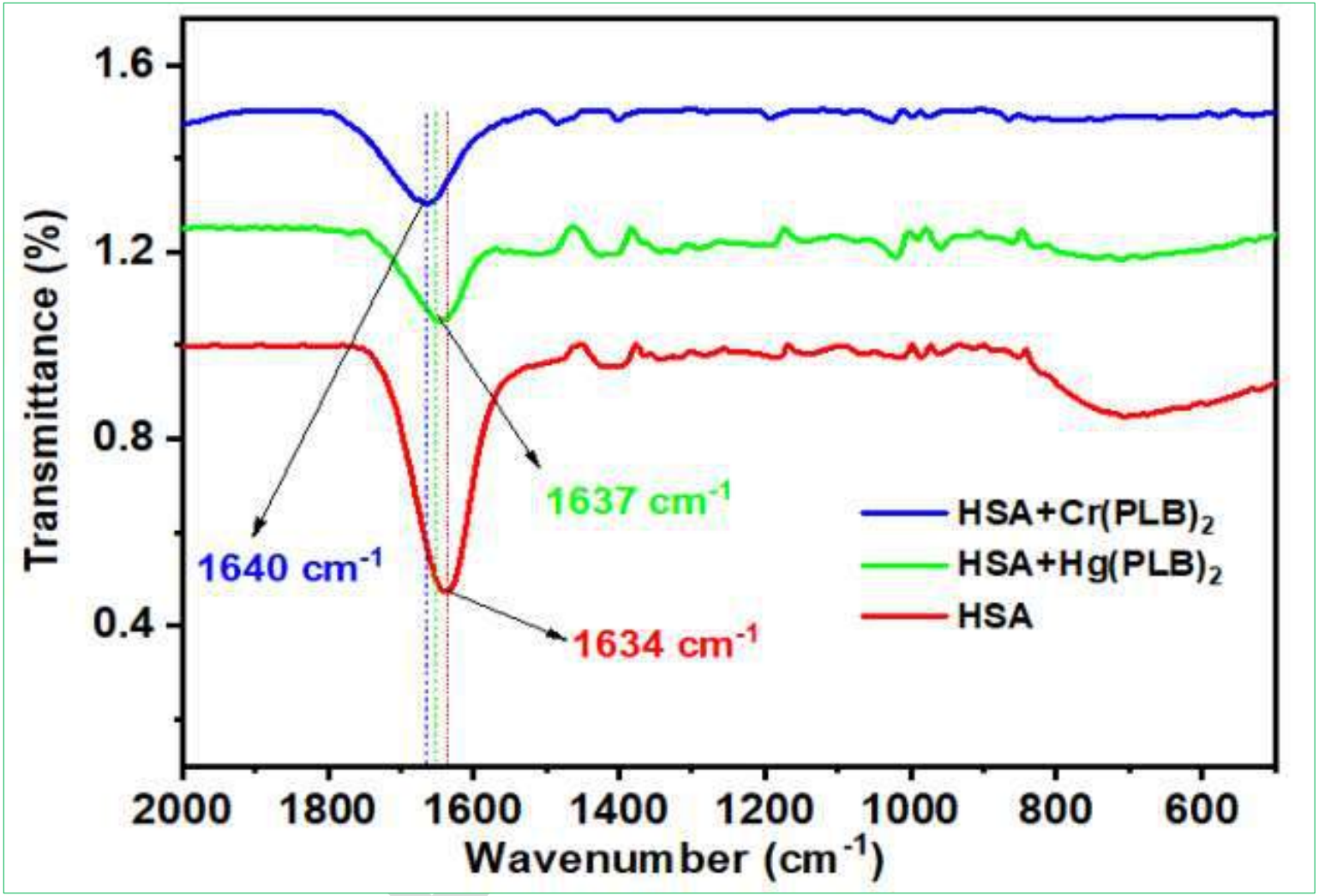
Phụ lục 45. Phổ 2D- HMBC $Hg(PLB)_2$ từ 110.0 đến 195.0 và 2.0 đến 12 ppm



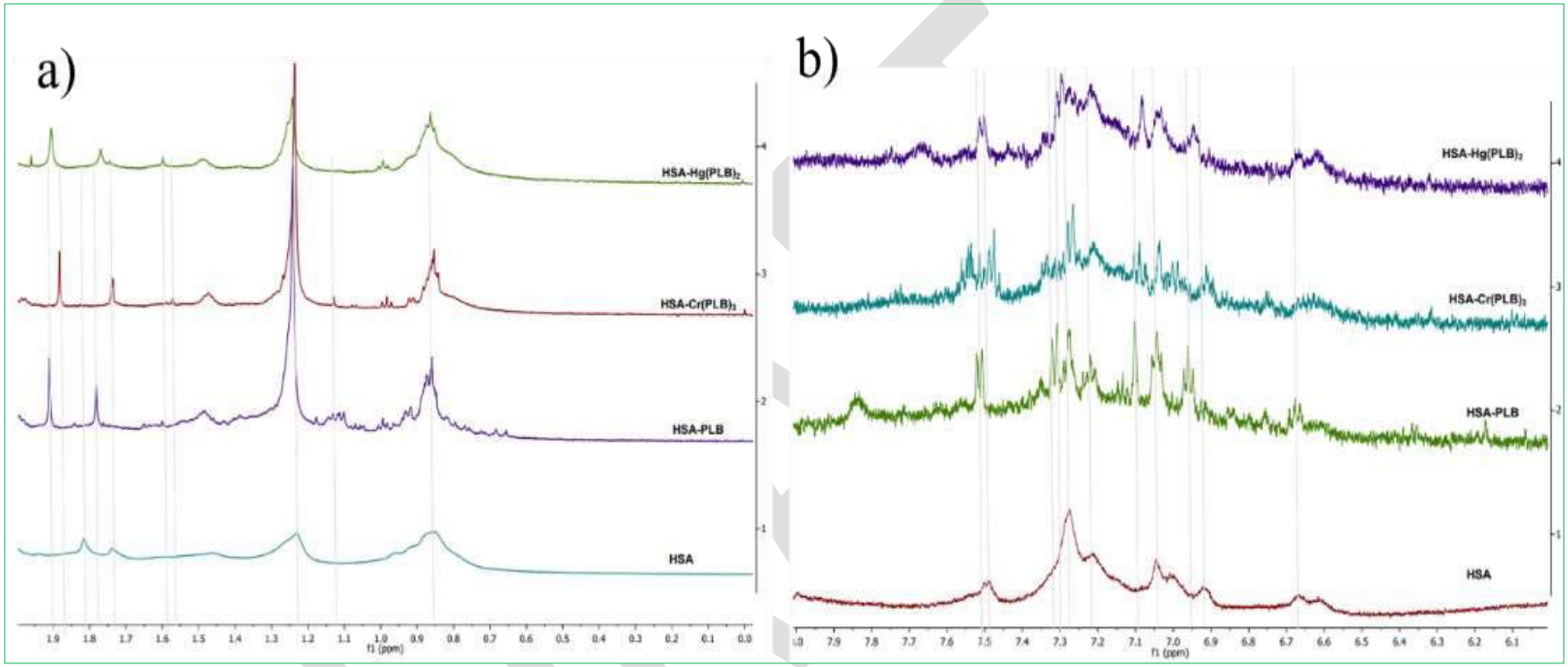
Phụ lục 46. Phổ 2D- HMBC $Hg(PLB)_2$ từ 115.0 đến 185.0 và 6.8 đến 8 ppm



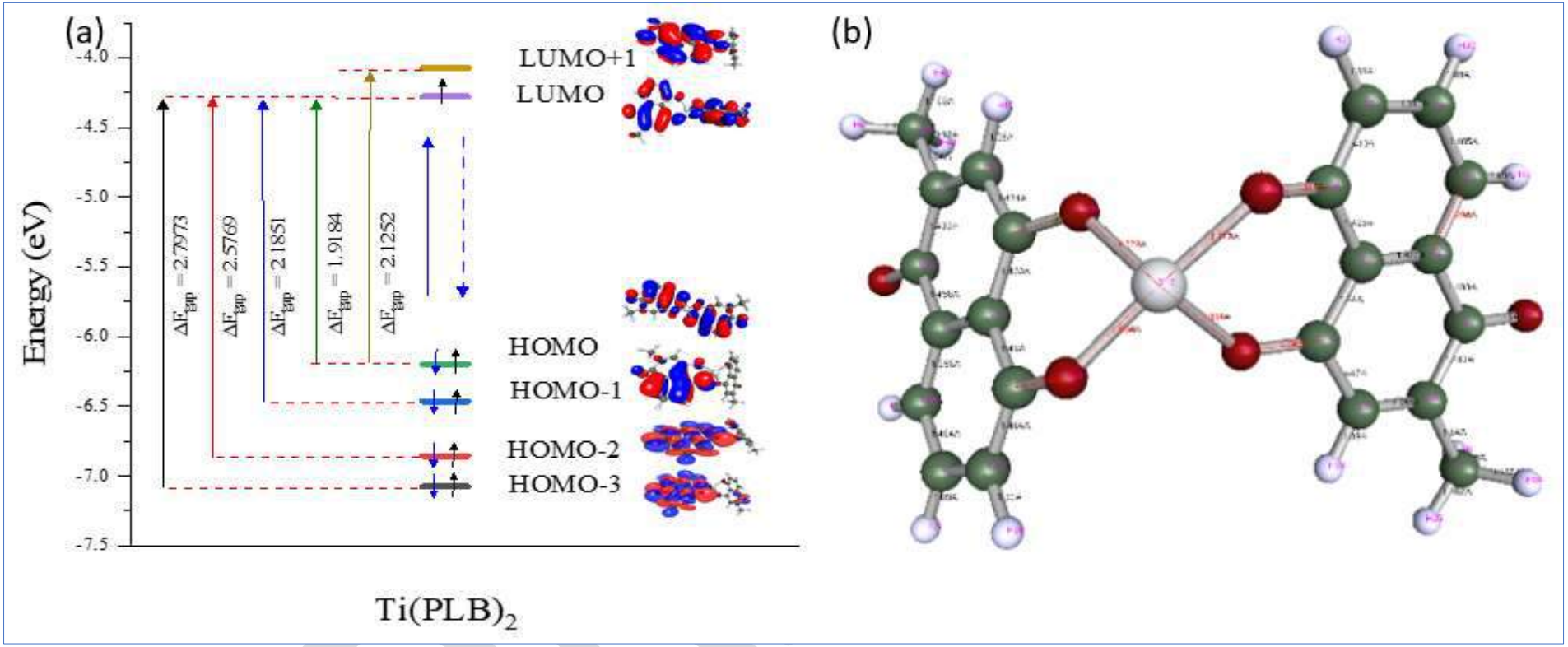
Phụ lục 47. Phổ HR-MS của $Hg(PLB)_2$.



Phụ lục 48. Phổ FT-IR của HAS, HAS + $Hg(PLB)_2$, HAS + $Cr(PLB)_3$



Phụ lục 49 (a) Phổ ^{1}H NMR của HSA và các hệ HSA–PLB, HSA–Cr(PLB)$_3$ và HSA–Hg(PLB)$_2$ trong vùng δ = 0–2 ppm (proton aliphatic); (b) Phổ ^{1}H NMR tương ứng trong vùng δ = 6–8 ppm (proton thơm)

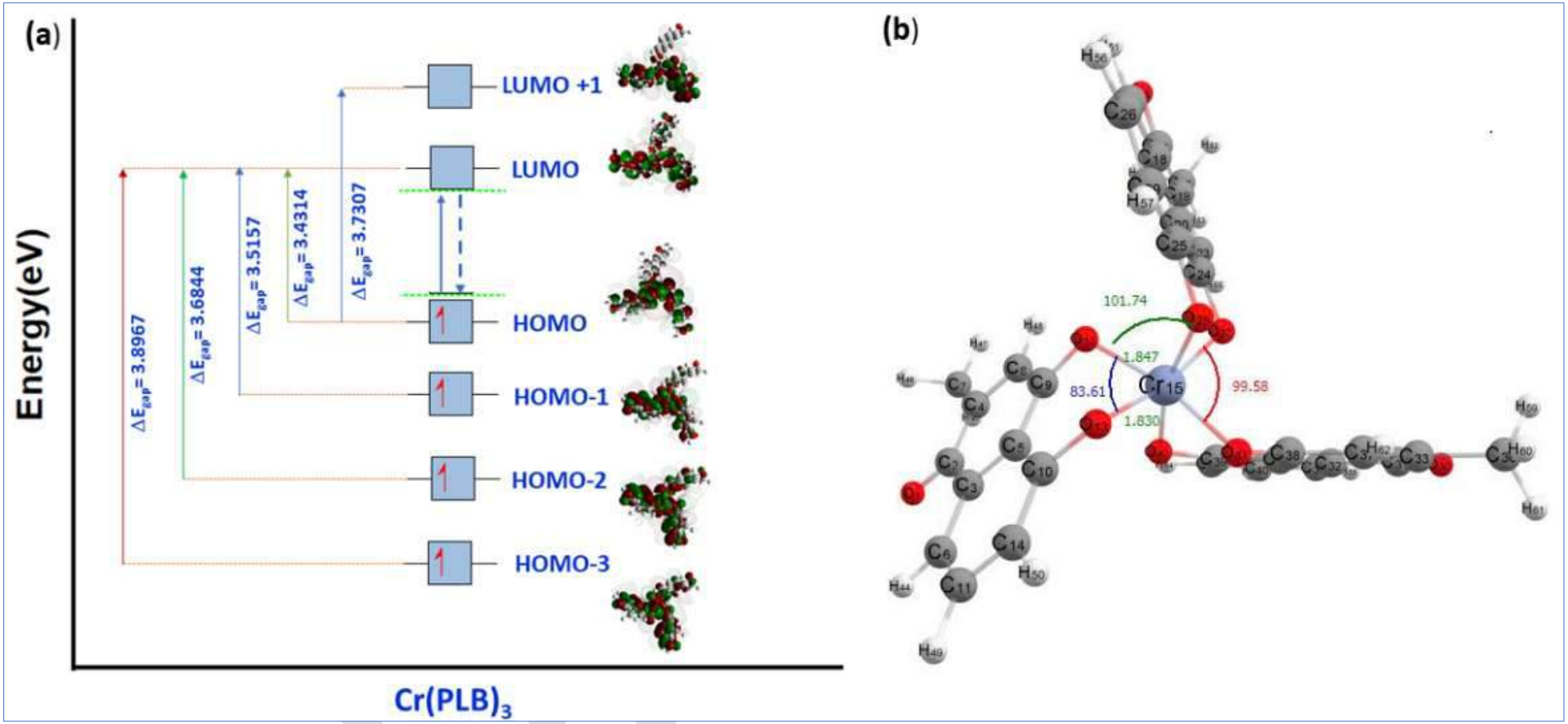


Phụ lục 50. Sơ đồ mức năng lượng các obitan biên và chuyển electron của phức $Ti(PLB)_2$

Phụ lục 51. Năng lượng kích thích và các obitan phân tử tham gia vào quá trình kích thích điện tử của phức $Ti(PLB)_2$ tính toán ở mức lý thuyết TPSSH/LANL2DZ (Ti)//def2-SVPD (C, O, H)

MOs	**Electron transition MO**	**E_{HOMO}, eV**	**E_{LUMO}, eV**	**ΔE_{gap}, eV**	**Wavelength, λ (nm)**	**Energy, kcal.mol^{-1}**
108 → 109	HOMO → LUMO	-6.1960	-4.2776	1.9184	646.2885	44.2394
107 → 109	HOMO-1 → LUMO	-6.4627	-4.2776	2.1851	567.4065	50.3896
106 → 109	HOMO-2 → LUMO	-6.8545	-4.2776	2.5769	481.1362	59.4247
105 → 109	HOMO-3 → LUMO	-7.0750	-4.2776	2.7974	443.2273	64.5073
108 → 110	HOMO → LUMO+1	-6.1960	-4.0708	2.1252	583.4055	49.0078
107 → 110	HOMO-1 → LUMO+1	-6.4627	-4.0708	2.3919	518.3494	55.1585

DRAFT

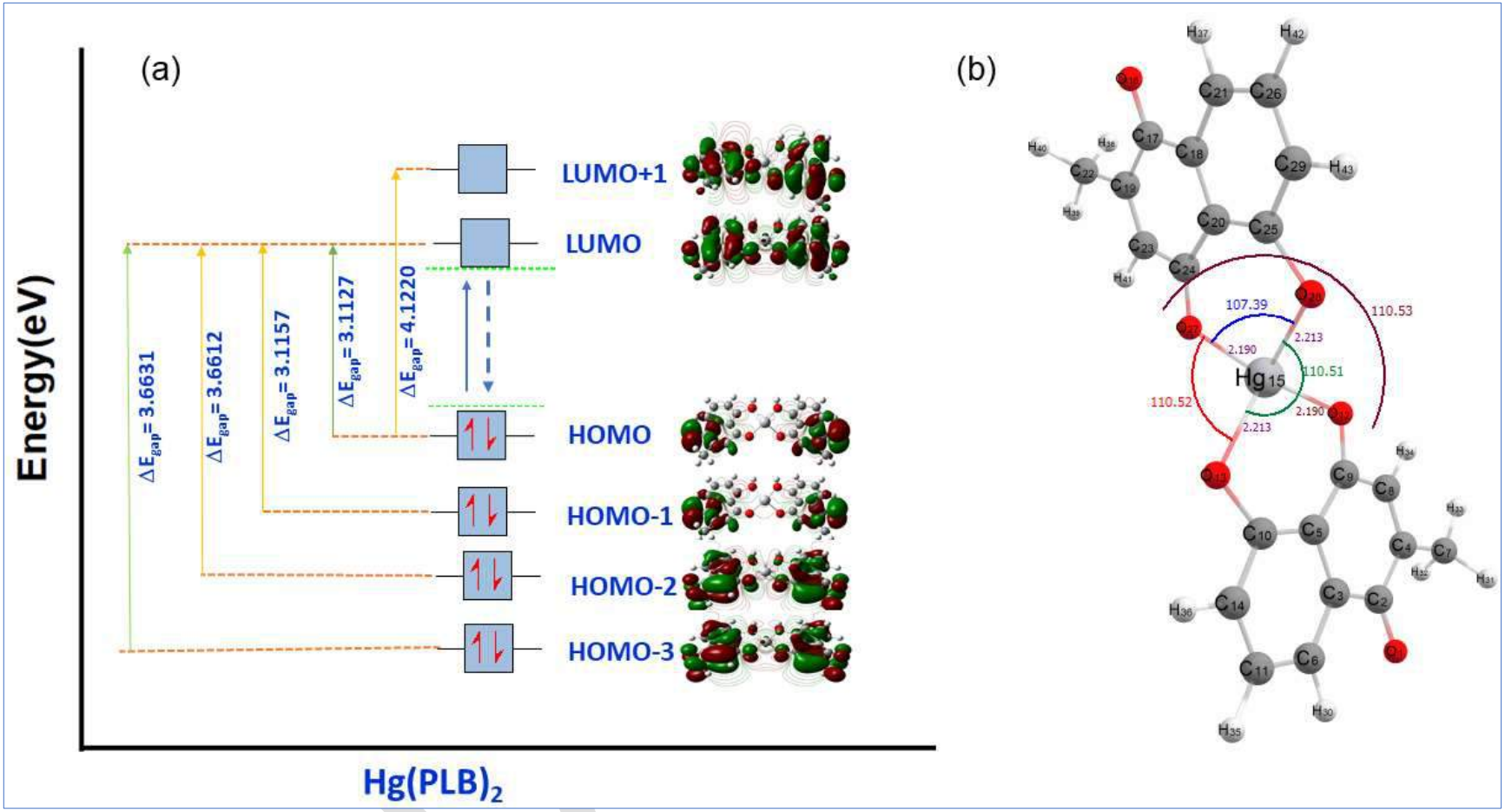


Phụ lục 52. Sơ đồ mức năng lượng các obitan biên và chuyển electron của phức Cr(PLB)3

Phụ lục 53. Bảng năng lượng kích thích và các obitan phân tử tham gia vào quá trình kích thích điện tử của phức $Hg(PLB)_2$, tính toán ở mức lý thuyết B3LYP/LANL2DZ (Br)//6-31G (C, O, H)

Mos	**Electron transition MO**	**E_{HOMO}, eV**	**E_{LUMO}, eV**	**ΔE_{Gap}, eV**	**Wavelength, λ(nm)**	**Energy, kcal.mol^{-1}**
153 → 154	HOMO → LUMO	-7.2682	-3.8368	3.4314	361.373	79.1271
152 → 154	HOMO-1 → LUMO	-7.3525	-3.8368	3.5157	352.7023	81.0723
151 → 154	HOMO-2 → LUMO	-7.5212	-3.8368	3.6844	336.552	84.9628
150 → 154	HOMO-3 → LUMO	-7.7334	-3.8368	3.8967	318.2202	89.8573
153 → 155	HOMO → LUMO+1	-7.2681	-3.5375	3.7307	332.3788	86.0295
152 → 155	HOMO-1 → LUMO+1	-7.3525	-3.5375	3.815	325.0295	87.9748

DRAFT



Phụ lục 54. Sơ đồ mức năng lượng các obitan biên và chuyển electron của phức $Hg(PLB)_2$

Phụ lục 55. Bảng năng lượng kích thích và các obitan phân tử tham gia vào quá trình kích thích điện tử của phức $Hg(PLB)_2$, tính toán ở mức lý thuyết B3LYP/LANL2DZ (Hg)//6-31G (C, O, H)

MOs	Electron transition MO	E_{HOMO}, eV	E_{LUMO}, eV	ΔE_{gap}, eV	Wavelength, λ(nm)	Energy, $kcal.mol^{-1}$
103 → 104	HOMO → LUMO	-13.1866	-10.0739	3.1127	398.368	71.7789
102 → 104	HOMO-1 → LUMO	-13.1896	-10.0739	3.1157	397.9844	71.848
101 → 104	HOMO-2 → LUMO	-13.7352	-10.0739	3.6613	338.6775	84.4296
100 → 104	HOMO-3 → LUMO	-13.7371	-10.0739	3.6632	338.5019	84.4734
103 → 105	HOMO → LUMO+1	-13.1866	-9.0647	4.1219	300.8321	95.051
102 → 105	HOMO-1 → LUMO+1	-13.1896	-9.0647	4.1249	300.6133	95.1202

DRAFT

Phụ lục 56 Giá trị hằng số Stern–Volmer và hằng số tốc độ dập tắt huỳnh quang của $Cr(PLB)_3$, $Hg(PLB)_2$ và PLB với HSA tại các nhiệt độ khác nhau (pH = 7,4)

	$Cr(PLB)_3$			**$Hg(PLB)_2$**			**PLB** [182]		
Nhiệt độ (K)	K_{SV} ($\times 10^4\ M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13}\ M^{-1}\ s^{-1}$)	R^2	K_{SV} ($\times 10^4\ M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13}\ M^{-1}\ s^{-1}$)	R^2	K_{SV} ($\times 10^4\ M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13}\ M^{-1}\ s^{-11}$)	R^2
293	5,017	0,502	0,9956	4,116	0,412	0,9879	13,12	2,28	0,9901
303	4,593	0,459	0,9958	3,871	0,387	0,9834	11,51	1,99	0,9921
313	4,223	0,422	0,9970	3,644	0,364	0,9755	09,67	1,67	0,9948

DRAFT

Phụ lục 57 Các giá trị K_a và f_a từ phương trình Stern–Volmer hiệu chỉnh.

	$Cr(PLB)_3$			**$Hg(PLB)_2$**		
Nhiệt độ (K)	K ($\times 10^4$ M^{-1})	f_a	R^2	K ($\times 10^4$ M^{-1})	f_a	R^2
293	4,743	1,034	0,9955	6,681	0,810	0,9985
303	4,654	1,001	0,9987	6,596	0,794	0,9969
313	4,595	0,960	0,9981	6,439	0,791	0,9938

Phụ lục 58 Các giá trị hằng số liên kết và số vị trí gắn kết (n) của $Cr(PLB)_3$ và $Hg(PLB)_2$ với HSA tại ba nhiệt độ khác nhau.

	$Cr(PLB)_3$			**$Hg(PLB)_2$**		
Nhiệt độ (K)	K_b ($\times 10^4$ M^{-1})	n	R^2	K_b ($\times 10^4$ M^{-1})	n	R^2
293	4,478	0,991	0,9937	1,021	0,869	0,9993
303	3,583	0,978	0,9964	0,719	0,841	0,9994
313	2,993	0,968	0,9967	0,581	0,829	0,9993

DRAFT

Phụ lục 59 Đánh giá mức độ phân tích xanh của phương pháp xác định Ti(IV) bằng huỳnh quang sử dụng đầu dò PLB theo tiêu chí GAC

Tiêu chí GAC	Đánh giá	Điểm (0–1)
Sử dụng dung môi thân thiện môi trường	EtOH–H_2O không độc hại	1
Hạn chế sử dụng thuốc thử nguy hiểm	Không dùng thuốc thử độc trong bước đo	1
Hạn chế sử dụng acid mạnh	Có dùng HF, $HClO_4$ ở bước tiền xử lý mẫu	0
Tiết kiệm năng lượng	Máy huỳnh quang tiêu thụ điện thấp	1
Thời gian phân tích ngắn	3 phút tạo phức, đo trực tiếp	1
Lượng mẫu và thuốc thử tiêu thụ nhỏ	<5 mL/mẫu	1
Không tạo ra chất thải nguy hại trong bước đo	Không tạo khí độc hay cặn phức khó xử lý	1
Thiết bị đơn giản, dễ tiếp cận	Thiết bị chưa phổ biến rộng	0.5
Không cần chuẩn độ, không cần bước tách phức tạp	Không cần tách pha, phân tách, chiết	1
Phân tích chọn lọc, chính xác, phù hợp với môi trường nền thực	So sánh tốt với ICP–OES, độ lệch thấp	1

DRAFT

Phụ lục 560. Giới hạn phát hiện và định lượng của hệ phân tích ($Hg(PLB)_2$ 3 ppm, λ = 224 nm, pH 6, pha động H_2O:EtOH = 5:5, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, 30 °C; hệ thống đạt độ phù hợp cao).

Mẫu chuẩn (ppmHg)	**Lần**	**Chiều cao tín hiệu (S)**	**Chiều cao nền (N)**	**S/N**	**Giá trị TB S/N**
0,050	1	20038	1495,37	13,4	13,4
	2	20511	1553,86	13,2	
	3	23787	1762,00	13,5	
	4	20441	1525,45	13,4	
0,020	1	8881	853,94	10,4	10,4
	2	9261	882,00	10,5	
	3	8977	863,17	10,4	
	4	8681	851,08	10,2	
0,010	1	3275	454,86	7,2	7,3
	2	5106	690,00	7,4	
	3	4883	668,90	7,3	
	4	3722	516,94	7,2	
0,005	1	1415	393,06	3,6	3,8
	2	1447	401,94	3,6	
	3	1675	429,49	3,9	
	4	1669	427,95	3,9	

DRAFT

DRAFT

Phụ lục 61. Thiết lập đường chuẩn hiệu chuẩn cho phức $Hg(PLB)_2$

C (µg/L)	Chuẩn	Diện tích peak	DT peak trung bình	SD
200µ	Standard 1	998427	1035499,0	74970,93
	Standard 2	1060413		
	Standard 3	1047658		
500	Standard 1	2333752	2326844,0	10462,23
	Standard 2	2331973		
	Standard 3	2314807		
800	Standard 1	3688165	3675713,0	65134,88
	Standard 2	3605251		
	Standard 3	3733723		
1000	Standard 1	4574629	4584177,8	14510,18
	Standard 2	4587728		
	Standard 3	4558752		
2000	Standard 1	9140421	9136103,3	38511,46
	Standard 2	9095615		
	Standard 3	9172274		
5000	Standard 1	22845130	22810627,0	53043,42
	Standard 2	22837202		
	Standard 3	22749549		
10000	Standard 1	45705309	45641151,3	96707,97
	Standard 2	45529919		
	Standard 3	45688226		

DRAFT

LÝ LỊCH TRÍCH NGANG CỦA HỌC VIÊN

I. LÝ LỊCH SƠ LƯỢC:

Họ và tên: Nguyễn Văn Thời Giới tính: Nam

Ngày, tháng, năm sinh: 12/11/1978 Nơi sinh: Vĩnh Long (Bến Tre cũ)

Email: nvthoi318@gmail.com Điện thoại:0918928318

II. QUÁ TRÌNH ĐÀO TẠO:

1. Đại học

Hệ đào tạo: Chính Quy; Thời gian học: Từ năm 1997 đến năm 2001.

Nơi học (trường, thành phố): Đại học sư phạm Tp.HCM

Ngành học: Sư phạm hóa

Tên đồ án, luận án, hoặc các môn thi tốt nghiệp chủ yếu: Thi tốt nghiệp

Điểm trung bình tốt nghiệp: 6.68 xếp loại tốt nghiệp: Trung bình.

2. Cao học:

Thời gian học: Từ năm 2006 đến 2009 tại (trường, viện, nước): trường Đại học sư phạm Huế

Tên luận văn: Thành phần hóa học của bưởi da xanh ở Bến Tre.

Ngày và nơi bảo vệ: Tháng 9 năm 2009

Điểm bảo vệ luận văn: 9.2; Điểm trung bình tốt nghiệp: 7.42

Người hướng dẫn: TS. Trịnh Đình Chính.

3. Trình độ ngoại ngữ: Cử nhân Anh Văn.

DRAFT

III. QUÁ TRÌNH CÔNG TÁC CHUYÊN MÔN:

Thời gian	Công tác chuyên môn	Nơi công tác
Năm 2001 đến 2011	Giáo viên giảng dạy môn Hóa học	Trường THPT Nguyễn Huệ, huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre
Năm 2011 đến nay	Giáo viên giảng dạy môn Hóa học	Trường THPT Chuyên Bến Tre, tỉnh Bến Tre

Tp. HCM, ngày ..... tháng ..... Năm 20...

Người khai

(Ký tên)

DRAFT