

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Fotonikos ir nanotechnologijų institutas

Kamilė Tulaitė
TIRAPAZAMINŲ JUNGINIŲ OPTINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Energetikos fizikos studijų programa

Studentas

Kamilė Tulaitė

Leista ginti

2020-05-28

Darbo vadovai

dokt. Justina Jovaišaitė
prof. Saulius Antanas Juršėnas

Instituto atstovas

dr. Ramūnas Aleksiejūnas

Vilnius 2020

TURINYS

IVADAS.....	3
1 TEORINIS ĮVADAS	4
1.1 Organinių junginių atominė struktūra	4
1.2 Atominės orbitalės.....	4
1.3 Molekulinės orbitalės	6
1.3.1 Orbitalių sanklota	7
1.3.2 Cheminis ryšys	9
1.3.3 Orbitalių hibridizacijos tipai	10
1.3.4 Elektronų delokalizacija	11
1.4 Sužadinimo ir relaksacijos procesai	12
1.4.1 Elektroniniai šuoliai ir energijos lygmenys	12
1.4.2 Šviesos sugertis	13
1.4.3 Spindulinė ir nespindulinė relaksacija	15
1.4.4 Jablonskio diagrama	15
2 TIRAPAZAMINŲ JUNGINIŲ LITERATŪROS APŽVALGA.....	18
2.1 Vėžio gydymo ir diagnostikos veikimo principas.....	18
2.2 Junginių optinės savybės.....	19
3 BANDINIŲ PARUOŠIMO IR TYRIMO METODIKOS	21
3.1 Tiriamos medžiagos ir bandinių paruošimas.....	21
3.2 Sugerties spektrų matavimas.....	22
3.3 Fluorescencijos spektrų matavimas.....	23
3.4 Fluorescencijos kvantinių našumų nustatymas palyginamuoju metodu	23
3.5 Fluorescencijos gesimo trukmių nustatymas.....	24
3.5.1 TCSPC metodas.....	24
3.5.2 „Streak“ kamera.....	25
4 NAUJI TIRAPAZAMINŲ JUNGINIAI IR JŲ FOTOFIZIKINIŲ SAVYBIŲ CHARAKTERIZAVIMAS.....	27
4.1 Deguonies atomų skaičiaus įtaka tirapazaminų junginių savybėms	27
4.2 Skirtingų pakaitų įtaka tirapazaminų junginių fotofizikinėms savybėms	31
IŠVADOS	36
LITERATŪROS SĄRAŠAS	37
SANTRAUKA	39
SUMMARY	40

IVADAS

Tirapazaminas (TPZ arba 3-amino-1,2,4-benzotriazino 1,4-di-N-oksidas) yra priešvėžinis vaistas, kurio panaudojimas medicinos srityje yra plačiai tiriamas jau kelis dešimtmečius.[1] Šis citotoksinų klasės junginys pasižymi selektyviu elgesiu hipoksinėje (žemo deguonies lygio) aplinkoje, o tokios sąlygos yra aptinkamos solidiniuose navikuose.[2] Navikų hipoksija vis dar yra didelis iššūkis gydant vėžį, nes žemo deguonies lygio regionai yra atsparūs spindulinei terapijai ar kitokių priešvėžinių vaistų poveikiui.[3] Gydomo etape tirapazamino junginys gali prisijungti deguonį ir taip sudaryti radikalą, kuris sukelia viengubos ir dvigubos DNR grandinės pažeidimus. Šiuo metu šis junginys yra III-oje klinikinių tyrimų fazėje.[4]

Deja, tirapazaminų fotofizikinės savybės yra gerokai mažiau tyrinėtos, todėl norint sėkmingai suprasti šių medžiagų modifikacijos ir pritaikymo galimybes, reikia atlikti daugiau TPZ molekulių optinių savybių tyrimų. Šiame darbe buvo ištirtos dvi tirapazaminų junginių grupės. Vieną grupę sudarė pakaito neturinčios molekulės, kurios turėjo skirtingą skaičių deguonies atomų, o antrąją grupę sudarė molekulės turinčios vieną deguonies atomą ir keičiamus pakaitus C8 tirapazamino pozicijoje. Buvo pamatuoti šių molekulių sugerties ir fluorescencijos spektrai, apskaičiuotos fluorescencijos kvantinės išeigos bei gesimo trukmių vertės dvejuose skirtingo poliškumo tirpikliuose. Išsamesni tirapazaminų junginių fotofizikinių savybių tyrimai leistų praplėsti šių junginių pritaikymo galimybes. Tirapazaminai pasižymintys našia fluorescencija galėtų būti naudojami vėžio gydymo stadijų vaizdavime ir stebėjime arba įvairių fermentinių reakcijų vaizdinime.

Šio darbo tikslas buvo ištirti skirtingų pakaitų ir deguonies atomų skaičiaus įtaką tirapazaminų junginių fotofizikinėms savybėms.

1 TEORINIS ĮVADAS

1.1 Organinių junginių atominė struktūra

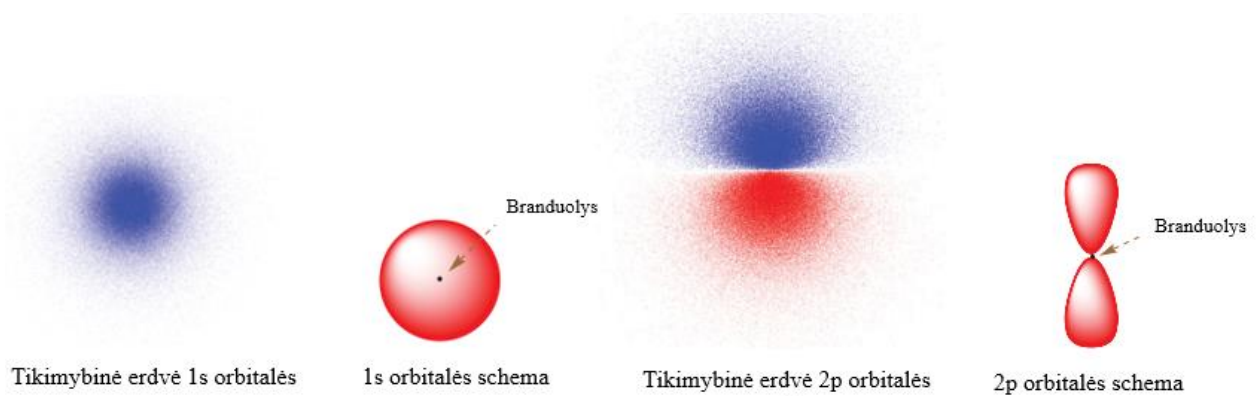
Organinių junginių ryšius, chemines ir fotofizikines savybes lemia elektronai esantys atomo išoriniame sluoksnyje. Kiekviena molekulė išlaiko tam tikrą savo formą dėl ją sudarančių atomų teigiamų branduolių ir neigiamų elektronų kuloninės sąveikos jėgos. Junginių forma nepriklauso nuo atomų skaičiaus, bet ją lemia elektronų skaičius, todėl yra svarbu gebėti aprašyti visus elektronus esančius atomuose.[5] Elektronų būseną atspindi keturi kvantiniai skaičiai:

- n – tai pagrindinis kvantinis skaičius, nusako atomo lygmenų energiją ir kokiame sluoksnyje yra nagrinėjamas elektronas. Jo vertės gali būti visi sveiki skaičiai nuo 1, kurie atitinka atomo energijos lygmenis K, L, M, N.[6]
- l – tai orbitinis kvantinis skaičius, kuris nurodo elektrono orbitinį judesio kiekio momentą ir orbitalių formą. Jo reikšmės gali kisti nuo 0 iki $n - 1$. Kai $l = 0$, tai ši jo reikšmė atitinka s orbitales, jei $l = 1$, tai bus p orbitalės, jei l reikšmė bus 2, tai atitiks d orbitalę, o jei 3, tai f ir pan.[6]
- m_l – magnetinis kvantinis skaičius aprašo orbitalių energijų pokytį dėl išorinio magnetinio lauko ir orbitalių padėtį erdvėje. Šis skaičius priklauso nuo orbitinio kvantinio skaičiaus ir gali įgyti vertes šiame intervale $-l \leq m_l \leq l$. Kiekviena m_l vertė turi atitinkamą pavadinimą, pavyzdžiui, jei m_l įgyja vertes +1, 0, -1, tai atitinka $2p_x$, $2p_z$ ir $2p_y$ orbitales, o indeksai x, y, z atitinkamai parodo kryptį. [7]
- m_s – sukinio magnetinis kvantinis skaičius apibūdina elektrono sukinį. Kadangi sukinio kvantinis skaičius s gali būti tik $\frac{1}{2}$ tai m_s gali įgyti vieną iš dviejų reikšmių $-\frac{1}{2}$ arba $+\frac{1}{2}$. [6]

Remiantis Pauli'o draudimo principu elektronai esantys tame pačiame atome negali turėti vienodų kvantinių skaičių konfigūracijų.[8]

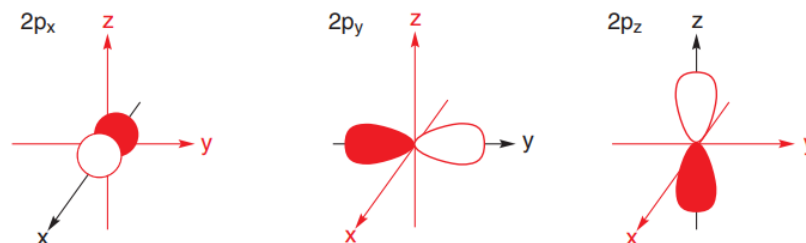
1.2 Atominės orbitalės

Atome esančių elektronų vietą galime nustatyti tik apytiksliai, tai reiškia yra tikimybė, kad aptiksim elektroną tam tikroje vietoje tam tikru laiku.[9] Šių tikimybių suma duoda tikimybines erdves aplink atomo branduolį, kurio vaizdas primena stygos virpesius. Kadangi elektronas gali judėti visomis kryptimis trimatėje erdvėje, tai galimi virpesiai taip pat bus trimačiai, ir juos vadinsime orbitalėmis.[5] Kai nagrinėjame pavienių elektronų esančių viename atome virpesius, orbitales vadiname atominėmis orbitalėmis. Orbitalių formą nusako banginė funkcija. Pati paprasčiausia orbitalės forma, kurią turi vandenilio atomas, yra sfera, o tokia orbitalė vadinama s orbitale.[9] Šios orbitalės schemą vaizduoja 1 paveikslas.



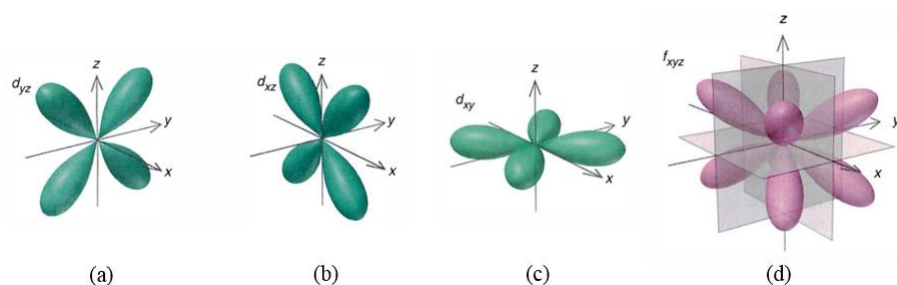
1 pav. Orbitalių s ir p tikimybės erdvės, kuriose galima rasti elektroną, ir schemas. Adaptuota pagal [5].

Aukštesnių energijų atominės orbitalės turi kitokias formas. Aukštesnio lygmens orbitalės, vadinamos p orbitalėmis, (1 pav.) yra sudarytos iš dviejų skirtingose pusėse esančių pūpsnių ir nuo s orbitalių skiriasi tuo, kad yra kryptingos – tai yra jos gali būti orientuotos kuria nors ašimi trimatėje erdvėje. 2 paveikslėlis pavaizduoja p orbitalės orientavimą erdvėje. Abu p orbitalės debesėliai turi didesnę elektronų tankį nei centre, todėl šie debesėliai turės neigiamą krūvį.[9] Egzistuoja didelė tikimybė rasti elektronus tuose debesėliuose, bet taip pat orbitalė turi vietą kurioje tikimybė aptikti elektroną yra lygi nuliui, tai yra orbitalės centras – branduolys.[10]



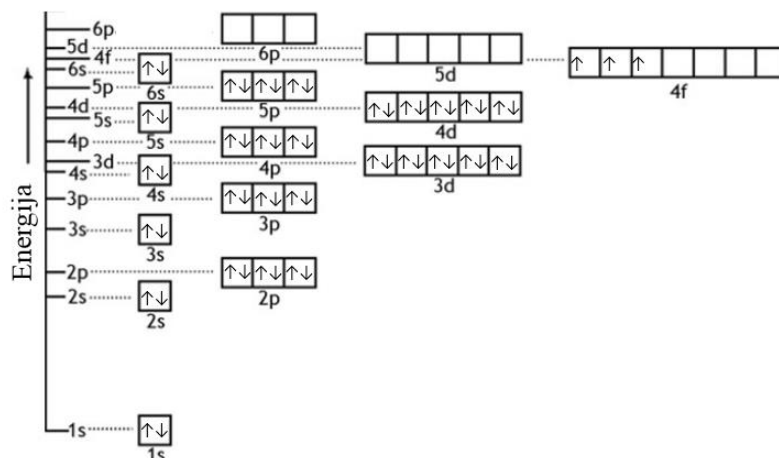
2 pav. p orbitalių orientavimas erdvėje. Adaptuota pagal [5].

Aukštesnių energijų orbitalių kaip d ir f formos tampa gerokai sudėtingesnės, keli galimi šių formų variantai yra schematiškai pavaizduoti 3 pav.



3 pav. d ir f orbitalės. (a), (b) ir (c) vaizduoja 3d orbitalės kelias galimas orientacijas erdvėje, o (d) vaizduoja vieną iš septynių galimų 4f orbitalių.[7]

Kiekvieno cheminio elemento orbitalių ir elektronų jose išsidėstymą galima pavaizduoti schematiškai. 4 paveiksle pateikta prazeodimio (Pr) elektronų konfigūracijos schema.



4 pav. Orbitalių diagramos ir elektronų konfigūracijos lantanoidų grupės Pr (prazeodimio) elementui. Adaptuota pagal [7].

1.3 Molekulinės orbitalės

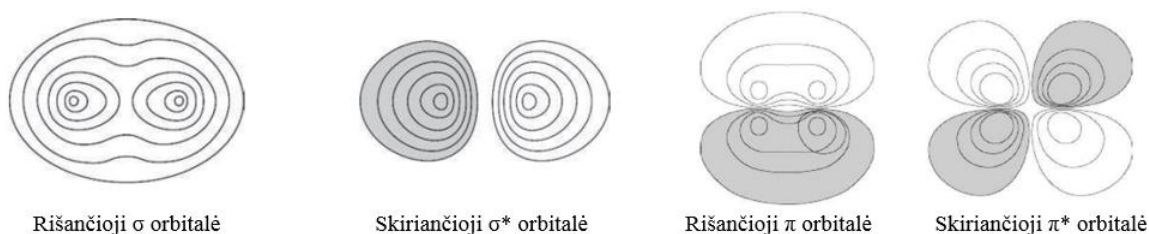
Molekulinės orbitales galima gauti sudedant atomines orbitales. Atominių orbitalės gali susidėti arba atsiimti taip pat kaip paprastos bangos, todėl molekulines orbitales galime skirti į du tipus: rišančiąsias arba skiriančiąsias.[5] Rišančioji orbitalė susidaro tada, kai dviejų suartėjusių atomų banginių funkcijų fazės visiškai sutampa. Tuomet jų banginę funkciją galima užrašyti taip :

$$\psi_{mol} = C_1\psi_1 + C_2\psi_2, \quad (1)$$

(ψ_1, ψ_2 – dviejų susiklojančių atomų orbitalių banginės funkcijos, jei persidengia du vienodi atomai, tai $C_1 = C_2 = \frac{1}{\sqrt{2}}$).[9] Skiriančioji orbitalė gaunama tada, kai atomų banginių funkcijų fazės nesutampa ir bendra banginės funkcijos išraiška yra: [9]

$$\psi_{mol} = C_1\psi_1 - C_2\psi_2, \quad (2)$$

Abiejų orbitalių schemas pateiktos 4 pav.



5 pav. Rišančiosios σ , π orbitalės ir skiriančiosios σ^* , π^* orbitalės schemas. Adaptuota pagal [11].

Elektrono esančio molekulinėje orbitalėje energija sudaryta iš dviejų dalių: tai elektrono ryšio energija su branduoliu ir vieno atomo sąveika su kitu atomu. Pirmoji dalis išreiškiama kuloniniu, o antroji pamaininiu integralais:

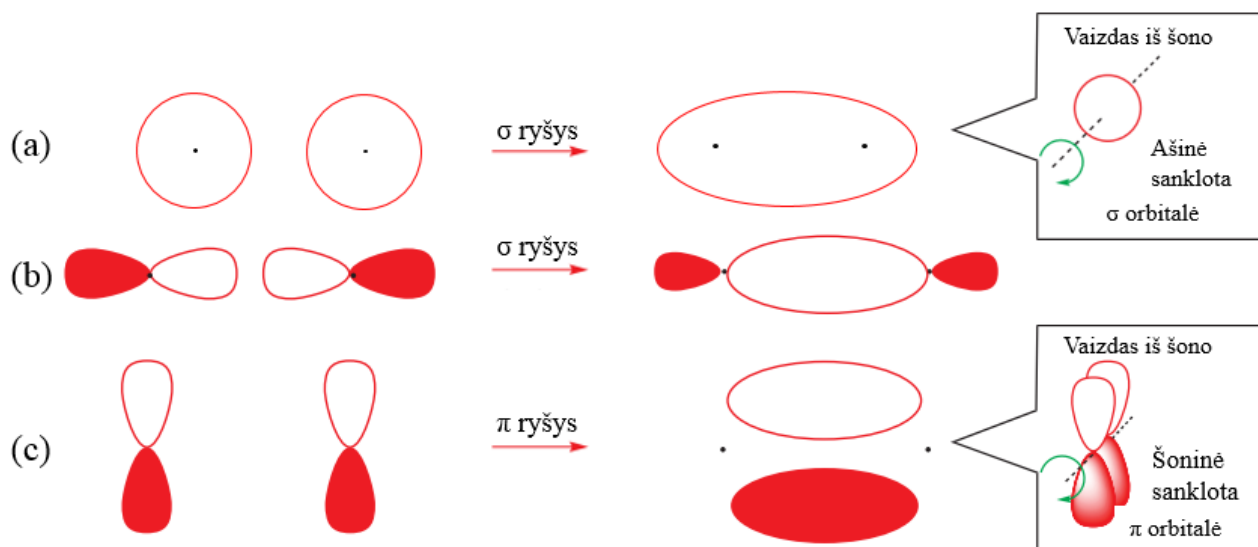
$$\alpha_{1,2} = \int \psi_{1,2} H \psi_{1,2} dv, \quad (3)$$

$$\beta = \int \psi_1 H \psi_2 dv, \quad (4)$$

Pagal šiuos du integralus, galima nustatyti elektrono energiją kai jis yra rišančiojoje orbitalėje $E_{riš} = \alpha + \beta$ ir kai yra skiriančiojoje orbitalėje $E_{riš} = \alpha - \beta$. [9]

1.3.1 Orbitalių sanklota

Susidarant molekuliniam ryšiui dalyvauja tik valentiniai elektronai, kurie juda s arba p orbitalėmis. Atomams pakankamai suartėjus, šie elektronų sluoksniai gali persikloti. s orbitalės persidengia vieninteliu būdu - tai yra ašinė arba σ ryšiu, o p orbitalės persidengdamos sudaro ašinę arba šoninę sanklotą (π ryšį). [9] 6 paveikslėlis vaizduoja s ir p orbitalių sanklotą.

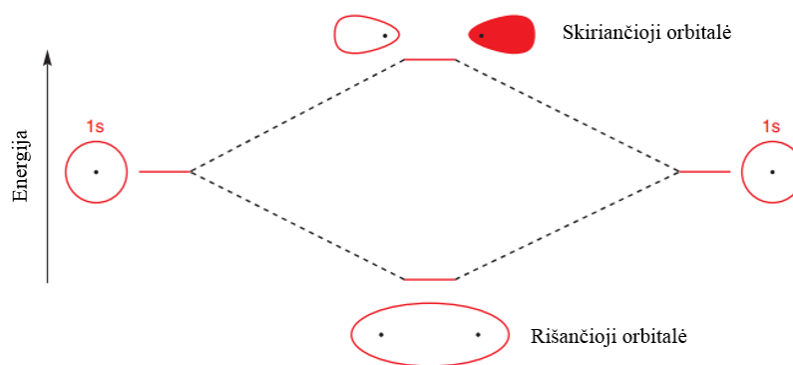


6 pav. Rišančiųjų molekulinų σ ir π orbitalių susidarymas iš dviejų vienodų atominių orbitalių, kurių fazės yra vienodos. (a) dalis vaizduoja s orbitalių ašinę sanklotą, o (b) vaizduoja p orbitalių ašinę sanklotą ir (c) variantas atspindi p orbitalių šoninę sanklotą. Adaptuota pagal [5].

Jei sujungsime dvi s orbitales gausime elipsės formos molekulinę orbitalę, kur elektronai yra išdėstyti tarp atomų branduolių. Rišančioji orbitalė gauta iš s orbitalių, pasižymi ašine simetrija, tai reiškia, kad sukdami ją aplink x ašį matysime tokį patį vaizdą. Rišančiosios orbitalės turinčios ašinę simetriją yra žinomos kaip sigma (σ) orbitalės, o ryšys, kuris atsiranda įdėjus du elektronus į šias orbitales, vadinamas σ ryšiu. Jungiant p orbitales, kurių fazės skiriasi, arba yra kitaip orientuotos,

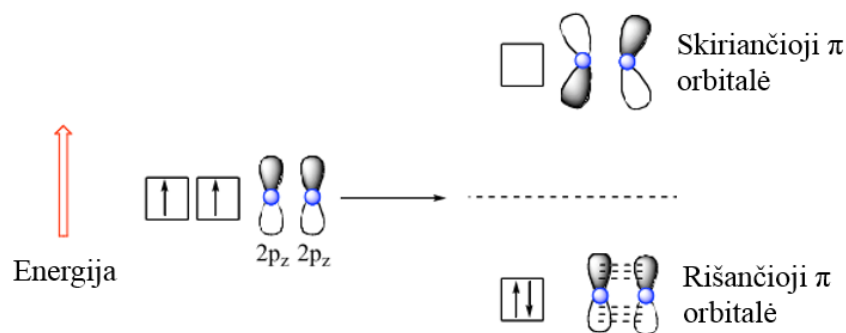
prarandamas anksčiau minėtas simetriškumas. Tokios orbitalės vadinamos π orbitalėmis, o ryšys sukuriamas užpildant šias orbitales vadinamas π ryšiu. [5]

Rišančiosios orbitalės atveju elektronų tankis tarp atomo branduolių padidėja. Turėdami neigiamą krūvį jie trauks teigiamus branduolius taip sukurdami ryšį kuris laikys šiuos du atomus kartu, taip atsiranda cheminis ryšys.[9] Rišančiosios orbitalės energija yra žemesnė nei skiriančiosios ar neutralių pavienių atomų. Skiriančiosios orbitalės atveju elektronai išsidėsto išoriniuose atomų kraštuose, todėl elektronų tankis tarp atomų branduolių smarkiai sumažėja. Šalia esantys teigiami branduoliai stumia vienas kitą ir verčia suartėjusius atomus tolti, o tai lemia cheminio ryšio nutraukimą.[11] Skiriančiosios orbitalės energija yra aukštesnė nei rišančiosios ir pavienių atomų. Kadangi rišančioji molekulinė orbitalė turi mažiausiai energijos, tai tokioje būsenoje esanti molekulė yra stabiliausia. Norint nutraukti tarp molekulės atomų esančius cheminius ryšius reikės šiai sistemai suteikti papildomos energijos.[5] Kitaip tariant, jei perkeltume elektroną iš rišančiosios molekulės orbitalės į skiriančiąją molekulinę orbitalę, to pakaktų, kad būtų suardytas cheminis ryšys. Skiriančiosios ir rišančiosios σ orbitalių energetinis išsidėstymas pavaizduotas 7 paveiksle.



7 pav. Molekulinių σ orbitalių tipų išsidėstymas pagal energijos lygmenis. Adaptuota pagal [5].

Rišančiosios ir skiriančiosios π orbitalių energijos išsidėstymas panašus į σ orbitalių, tai yra rišančiosios energija yra žemiausia, o skiriančiosios – aukščiausia. π orbitalių sanktota stebima tada, kai p atominių orbitalių šonai persikloja išilgai plokštumos, statmenos linijai jungiančiai atomų branduolius. Jei persidengiančių p orbitalių banginių funkcijų fazės sutampa gaunama rišančioji π orbitalė, jei fazės nesutampa, gaunam skiriančiąją.[10] Rišančiojoje π orbitalėje elektronų tankis nėra išsidėstęs tarp branduolių, bet yra pasiskirstęs į dvi puses simetriškai branduolius jungiančiais linijais.[5] π ir σ ryšiai yra kovalentinio ryšio tipai.



8 pav. Molekulinių π orbitalių išsidėstymas pagal energijos lygmenis. Adaptuota pagal [10].

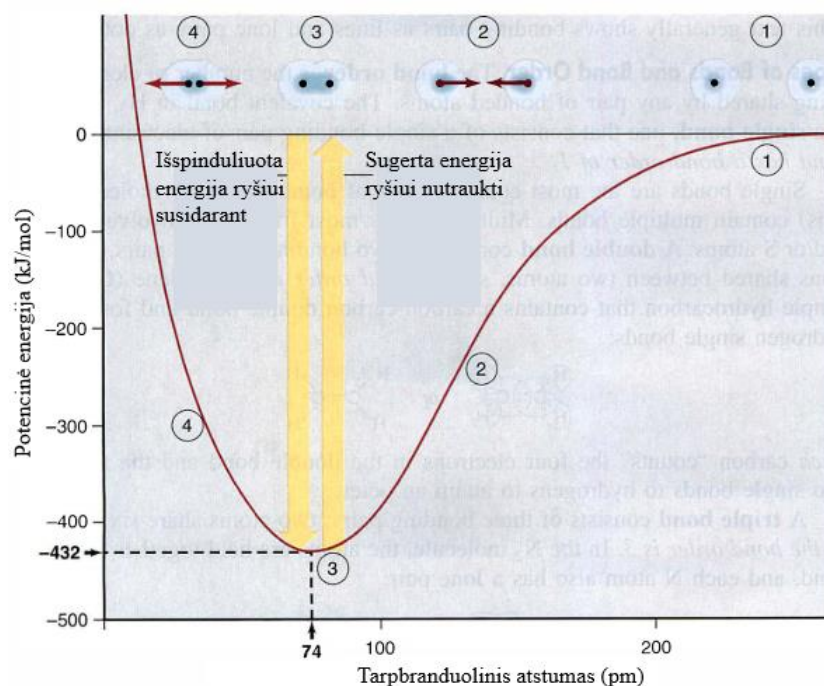
1.3.2 Cheminis ryšys

Sudarant cheminį ryšį tarp atomų dalyvauja tik valentiniai elektronai, tai yra atomo išorinio sluoksnio elektronai, kurie gali būti tik s arba p atominėse orbitalėse.[9] Yra galimi keturi cheminio ryšio tipai: joninis, kovalentinis, vandenilinis ir metališkas. Organinių junginių tyrinėjimui svarbu suprasti kovalentinius ryšius tarp atomų, todėl joninis ir metališkas ryšio tipai šiame darbe nėra aktualūs.[11]

Paprasčiausiai kovalentinio ryšio susidarymą galima paaiškinti nagrinėjant vandenilio H_2 molekulę. Du neutralūs vandenilio atomai artėja vienas į kitą, kol atstumas tarp šių atomų yra didelis, nėra jokios sąveikos tarp jų. Atstumui mažėjant atomų branduoliai pradeda traukti priešingo atomo elektronus, taip vis mažindami bendrą sistemos energiją. Atsiradusi traukos jėga didėja ir toliau artina atomus, tačiau taip pat didėja ir stūmos jėga tarp branduolių. Galiausiai, esant tam tikram atominiam atstumui, tarp šių jėgų nusistovi pusiausvyra ir sistema įgyja mažiausią energiją.[7] Bet koks trumpesnis atstumas padidintų stūmos jėgą tarp atomų ir taip padidintų sistemos potencialinę energiją. Šių jėgų pusiausvyrą apibūdina tarpatominis potencialas, kuris gali būti aprašytas šia formule:[12]

$$\phi(r) = \frac{A}{r^n} - \frac{B}{r^m}, \quad (5)$$

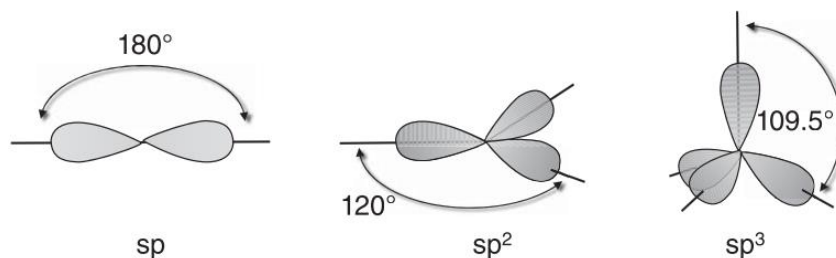
A ir B yra stūmos ir traukos jėgų atitinkamos konstantos, r – atstumas tarp atomų. Jėgų pusiausvyrai nusistovėti reikia, kad laipsnio rodikliai tenkintų sąlygą $n > m$. Kovalentinio ryšio sudarymo schema pavaizduota 9 paveiklėlyje.



9 pav. Kovalentinio ryšio susidarymas vandenilio molekulėje. Adaptuota pagal [7].

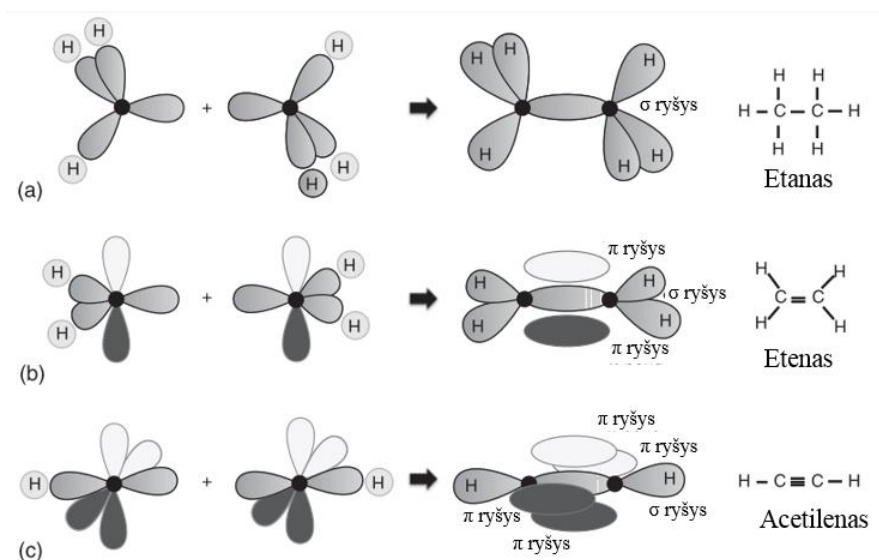
1.3.3 Orbitalių hibridizacijos tipai

Viena iš pagrindinių organinių junginių sudedamoji dalis yra anglies atomas. Šis atomas yra ypatingas, nes turi šešis elektronus iš kurių du yra K sluoksnyje ir keturi L sluoksnyje. K sluoksniu elektronai nedalyvauja ryšio sudaryme, o L sluoksniu struktūra yra $2s^2 2p_x 2p_y$, tai parodo kad likę elektronai yra skirtingose orbitalėse. Dėl šios priežasties anglies atomas gali sudaryti kelių skirtingų rūšių jungtis, o tai lemia didžiulę organinių molekulinį darinių įvairovę.[9] Jungiantis atomams molekulėje gali susidaryti naujos būsenos, kurių neturi pavieniai atomai, tokios būsenos yra hibridai, o hibridų kūrimas - hibridizacija.[9] Yra trys orbitalių hibridizacijos tipai: sp^3 , sp^2 , sp . Kiekvieną hibridizacijos tipą galima atpažinti iš jungčių skaičiaus organiniame darinyje. Pavyzdžiui, vienguba C – C jungtis atitinka sp^3 (visi ryšiai yra σ) hibridizaciją, dviguba C = C jungtis atspindi sp^2 (yra trys σ ir vienas π ryšiai) ir triguba C $\equiv$ C jungtis yra sp (du σ ir du π ryšiai) hibridizacija. Šios hibridizacijos atitinkamai turi savo formas, sp^3 yra tetraedro formos, sp^2 – trikampio, o sp yra tiesinės formos, tai vaizduoja 10 paveiklas.



10 pav. sp , sp^2 ir sp^3 hibridinės orbitalės.[13]

Sujungdami s ir p orbitales sukuriame hibridus. Kai apjungiam visas keturias orbitales, tai yra vieną 2s ir tris 2p, gauname keturias hibridines $2sp^3$ orbitales.[13] Banginė funkcija tokioje orbitalėje pasikeičia, tai yra didesniai pūpsnyje jos vertė išauga, o mažesniame sumažėja.[7] Trys sp^2 hibridinės orbitalės susidaro tada, kai 2s orbitalė susijungia su dviem 2p orbitalėmis (pavyzdžiui su $2p_x$ ir $2p_y$) ir jos yra išdėstytos xy plokštumoje. Šiai plokštumai yra stati likusi nepakitusi $2p_z$ orbitalė. Galiausiai sujungus 2s orbitalę su viena 2p orbitale gaunamos dvi sp hibridinės orbitalės.[13] Hibridizacijų susidarymo pavyzdžiai pateikti 11 paveikslėlyje.



11 pav. Hibridinių orbitalių sudarymo pavyzdžiai. (a) atitinka sp^3 hibridizaciją, (b) – sp^2 ir (c) – sp . Adaptuota pagal [13].

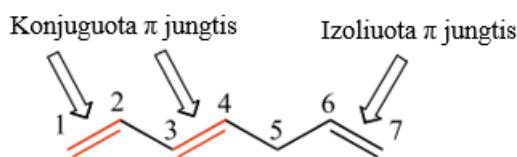
1.3.4 Elektronų delokalizacija

Patogu įsivaizduoti atomines orbitales kaip rinkinį kažkokių galimų elektrono energijos verčių. Tie energijos lygmenys gali būti užpildyti, kai juose yra elektronas, arba laisvi, kai juose nėra elektronų. Kiekviena orbitalė gali turėti nulį, vieną arba du elektronus, bet niekada daugiau nei du. Taip pat, jei du elektronai yra tame pačiame energijos lygmenyje, tai jų sukiniai turi būti nukreipti priešingomis kryptimis. Kai žemiausias energijos lygmuo yra užpildomas maksimaliai dviem elektronais, likusieji elektronai išsidėstys aukštesniuose energijos lygmenyse.[5] Toks elektronų išdėstymas orbitalėse yra vadinamas elektronų delokalizacija, o jai augant energijos skirtumas tarp gretimų orbitalių mažėja.[9] Kai molekulė yra pagrindinėje būsenoje, jos orbitalėse elektronai yra suporuoti, tokios būsenos vadinamos singuletinėmis.

Dažniausiai sutinkama organinių molekulių struktūra yra benzeno žiedas. Visame žiede žemiausios energijos orbitalės banginės funkcijos fazė yra tokia pati. Aukštesnės energijos banginės funkcijos turi dvi skirtingas fazes, o dar aukštesnė energijos – po keturis. Kadangi žemiausios

energijos orbitalėje gali būti tik du elektronai, tai aukštesnėse būsenose elektronų gali būti po keturis. Šiso būsenos yra vadinamos „išsigimusiomis“.[9]

Organinių junginių pagrindą sudaro anglies ir vandenilio atomai. Anglies atomai gali sudaryti viengubus (σ) ir dvigubus (σ ir π) ryšius, taip sudarydami konjuguojančią sistemą. Konjuguota molekulė susidaro tada, kai statmenai persikloja p tipo orbitalės. Tokiu būdu išorinio sluoksnio elektronai tampa delokalizuoti ir gali vykti elektronų pernaša per šią π tipo sanklotą.[10] Paprasčiausias konjuguotos sistemos pavyzdys yra 1,3-butadieno molekulė, kuri pavaizduota 12 paveikle.



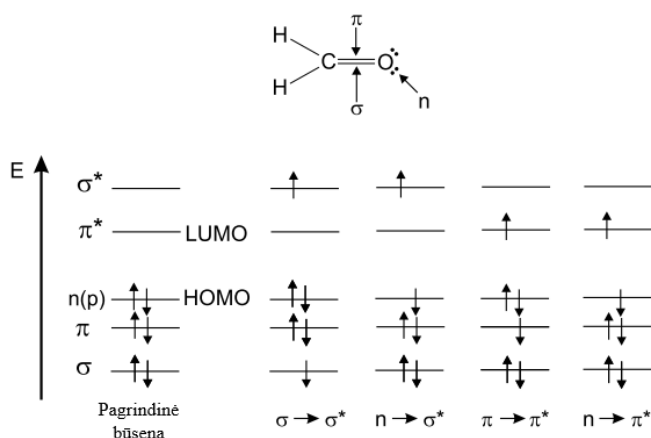
12 pav. 1,3-butadieno molekulė. Adaptuota pagal [10].

Molekulė yra konjuguota tada, kai turi dvi ar daugiau π ryšių tarpusavyje atskirtų tik viena vienguba jungtimi.

1.4 Sužadinimo ir relaksacijos procesai

1.4.1 Elektroniniai šuoliai ir energijos lygmenys

Elektronų šuoliai yra kvantuoti, tai reiškia, jie gali vykti tik tarp diskrečių energijos lygmenų. Kad atome esantis elektronas galėtų pereiti iš pagrindinės energijos būsenos į sužadintąją, sugerto fotono kvanto $h\nu$ energija turi būti lygi sužadintos ir pagrindinės būsenų energijų skirtumui. [6]



13 pav. Formaldehido molekulinė orbitalių energijos lygmenys ir galimi elektronų šuoliai. HOMO viršutinė užpildyta molekulinė orbitalė (angl. Highest Occupied Molecular Orbitals) ir LUMO žemiausia neužpildyta molekulinė orbitalė (angl. Lowest Unoccupied Molecular Orbitals). Adaptuota pagal [14].

13 paveikslėlyje pavaizduoti formaldehido molekulos orbitalių energijos lygmenys ir galimi elektronų šuoliai į laisvas molekulinės orbitales. Simboliais σ^* ir π^* žymimos skiriančiosios orbitalės, kurios yra molekulos sužadintosios būsenos. Simbolis n žymi nesudarančią jungties molekulinę orbitalę, kurios atominių orbitalių sanklotos metu vienoje srityje jų banginės funkcijos vienodos, o kitoje skirtingos.[9] Pagal energijas orbitalės išsidėsto tokia tvarka $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$, todėl visi galimi šuoliai yra $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$. [6] Kad įvyktų šuolis $\sigma \rightarrow \sigma^*$, elektronui esančiam σ ryšyje reikia suteikti daug energijos, pavyzdžiui apšviesti tolimąją UV spinduliuote, kad šis galėtų pereiti į aukštesnės energijos skiriančiąją orbitalę. Elektronų šuoliui $\pi \rightarrow \pi^*$ reikia žymiai mažiau energijos nei $\sigma \rightarrow \sigma^*$, nes elektronai sudarantys π ryšį yra silpniau traukiami branduolio, todėl yra labiau delokalizuoti. [6] Iš ryšio nesudarančios orbitalės elektrono šuolis į skiriančiąją $n \rightarrow \pi^*$ yra galimas. Nagrinėjamo pavyzdžio atveju sužadintas deguonies atome esantis elektronas iš ryšio nesudarančios orbitalės yra perkeliamas į π^* orbitalę ir atsiduria tarp anglies ir deguonies atomų branduolių. Toks elektroninis šuolis pasižymi krūvio pernaša, nes stebimas dipolinio momento pakitimas.[14]. Jei organinė molekulė turi nepadalytų elektronų kaip pateiktame pavyzdyje, tai sukuria būdą vykti kitokiems šuoliams, kaip $n \rightarrow \sigma^*$. Atomo išorinio sluoksnio elektronai, kurie yra suporuoti, bet molekulėje nesudaro cheminio ryšio yra vadinami nepadalyta elektronų pora. Tokie elektronai yra nerišančioje n orbitalėje. Ši orbitalė nei riša nei skiria ir jos energija yra didesnė nei σ , π orbitalių, bet mažesnė nei σ^* , π^* . [6]

1.4.2 Šviesos sugertis

Šviesos sugertį stebime tada, kai į molekulę pataiko tam tikros energijos fotonas. Sugerto fotono energija atitinka energijų skirtumą tarp šuolio lygmenų. Tada šviesos kvanto energija yra perduodama molekulos elektronams, o šie būdami sužadinti pereina į aukštesnį energijos lygmenį.[9] Šviesos sugertį galima išreikšti Bugerio dėsnio: [9]

$$I = I_0 e^{-al}, \quad (6)$$

(I_0 pradinis šviesos intensyvumas, a sugerties koeficientas, l atstumas kurį nusklido šviesa).[9]

Molekulos būvimą stacionarioje būsenoje aprašo banginė funkcija, kuri gaunama išsprendus Šriodingerio lygtį

$$H_0 \psi_i = E \psi_i. \quad (7)$$

Jei molekulė yra veikiamą elektromagnetinės spinduliuotės, tai yra šviesa, tuomet Šriodingerio lygties hamiltonianas tampa priklausantis nuo laiko ir lygtis išsprendžiama naudojantis trikdžių teorija. Iš kvantinės mechanikos žinoma, kad šuolio tikimybė yra proporcinga šuolio momento kvadratui, tačiau šią tikimybę taip pat galima įvertinti remiantis osciliatoriaus stipriu. Osciliatoriaus stipris yra tiesiogiai susijęs su molinės sugerties koeficientu ϵ tokiu integralu:

$$f = 4,32 \cdot 10^{-9} \int \varepsilon dv, \quad (8)$$

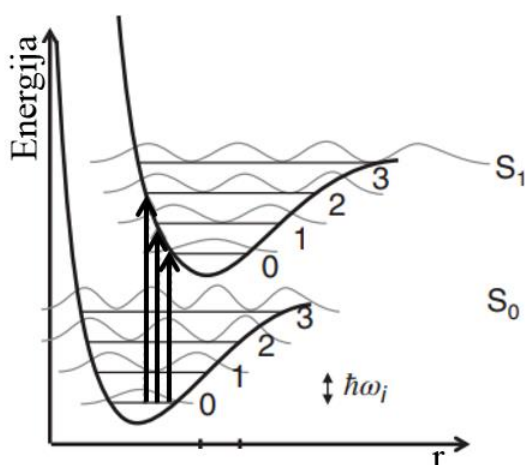
Idealaus osciliatoriaus stipris yra lygus realaus ir elektrono emisijos intensyvumų santykiui, o tai lygu vienetai ir aprašo visos sugerties juostos integrinį intensyvumą. Šiame darbe šviesos sugertis vaizduojama moliniu sugerties koeficientu ε arba kitaip ekstinkcijos koeficientu, kurio matavimo vienetai yra $\text{lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Šis koeficientas yra išvedamas iš Lamberto-Bero (angl. Beer-Labert law) dėsnio, kuris teigia jog monochromatinės šviesos pluoštas, sklindantis medžiagoje, silpsta didėjant medžiagos sluoksnio storiui l . [14] Dėsnis yra išreiškiamas taip:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cl}, \quad (9)$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon cl, \quad (10)$$

I_0 krintančios šviesos intensyvumas, I praėjusios šviesos intensyvumas, l optinis kelias, A optinis tankis. Molinės sugerties koeficientas apibūdina molekulės, esančios kokiame nors tirpiklyje, savybę sugerti šviesą ir nuo osciliatoriaus stiprio skiriasi tuo, kad nusako sugertį esant konkrečiam šviesos bangos ilgiui.

Kadangi šviesa yra elektromagnetinė banga, tai sąveika tarp atomų branduolių, elektronų bus klasikinio osciliatoriaus analogas. Ta energija atiteks elektronų ir branduolių virpesiams arba kitaip pereis į elektroninių debesėlių ar branduolių svyravimus. Pirmu artiniu tokius molekulės virpėjimus galime aproksimuoti harmoniniu osciliatoriumi, o tokios sistemos potencialinės energijos priklausomybė nuo atstumo tarp branduolių vadinama potencialine kreive. [6] Ši kreivė atspindi sugerties juostos formą ir plotį. Vienas iš galimų pagrindinės ir sužadintos būsenų potencialinių paviršių tarpusavio išsidėstymas yra pateiktas 14 paveiksle.



14 pav. Pagrindinės ir sužadintosios būsenų potencialiniai paviršiai. Adaptuota pagal [13].

Kol molekulė yra nesusužadintoje būsenoje, jos branduoliai yra arti potencialinės kreivės dugno, todėl yra pusiausviri. Sužadinus molekulę, gali įvykti elektroninis šuolis iš pagrindinės būsenos

potencialinės kreivės dugno į sužadintosios būsenos kreivės kraštą, kadangi tokio proceso metu branduolio greitis ir padėtis negali pasikeisti, tai galimi tik vertikalūs šuoliai.[9] Sugerties spektro plotis, forma ir sandara stipriai priklauso nuo sužadinimo metu gautos perteklinės vibracinės energijos. Jei viršutinė ir apatinė kreivių minimumai yra tiesiai vienas virš kito, tai sugerties spektras yra siauras, asimetrinis ir vibracinės sandaros. Organinėse molekulėse dažniau sužadinta potencialinė kreivė yra pastumta į dešinę, o tokiu atveju sugerties spektras yra išplitęs ir simetrinis. Sugerties juostos išplitimas yra siejamas su molekulės, esančios sužadintoje būsenoje, tarpbranduolinių atstumų padidėjimu.[6]

1.4.3 Spindulinė ir nespindulinė relaksacija

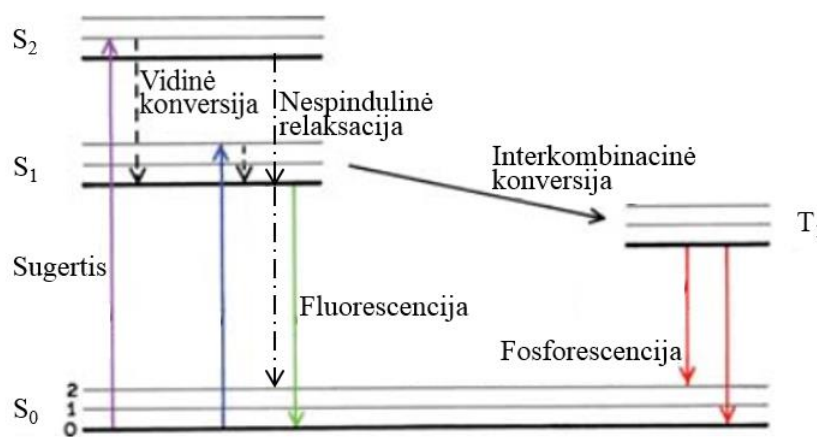
Organinės molekulės sužadintas elektronas iš aukštesnės energijos lygmens į žemesnę būseną gali relaksuoti spinduliniu arba nespinduliniu būdu. Spindulinę relaksaciją stebime tada, kai iš sužadintos būsenos molekulė sugrįžta į pagrindinę būseną, o to proceso metu perteklinė energija išspinduliuojama šviesos pavidalu. Medžiagų, kurios pasižymi spinduline relaksacija yra nedaug, tačiau yra kur kas daugiau medžiagų, kurios iš sužadintos būsenos relaksuoja nespinduliniu būdu.

Spindulinė relaksacija arba liuminescencijos reiškinyje gali pasireikšti trimis būdais: fluorescencija, fosforescencija ir uždelstą fluorescencija.[6] Fluorescencija pasireiškia vykstant greitai spindulinei relaksacijai tarp vienodų multiplietiško būsenų, tai reiškia, kad elektrono šuolis vyksta iš pirmos sužadintos singuletinės būsenos į pagrindinę $S_1 \rightarrow S_0$. Šio proceso sparta yra $10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$. [8] Pagal Franko-Kondono principą, fluorescencija bus intensyviausia, jei įvykus šuoliui nepakis tarpbranduoliniai atstumai. Taip pat yra žinoma, kad nepoliniuose tirpikliuose junginių sugerties ir fluorescencijos spektrai pasižymi veidrodine simetrija, o poliniuose tirpikliuose šie spektrai yra nutolę vienas nuo kito. Toks nutolimas atsiranda, nes dažniausiai poliniai tirpikliai geriau stabilizuoja sužadintąją būseną nei pagrindinę. Tokia spindulinė relaksacija vyksta organinių junginių molekulėse, kuriose yra π ryšių.[6]

Nespindulinės relaksacijos perteklinė energija perduodama molekulės virpesiams, o tai galiausiai virsta šiluma.[9] Nespinduliniai šuoliai gali vykti dviem būdais tai vidinė arba interkombinacine konversijom. Tokių šuolių metu kvantinės sistemos energija nepasikeičia todėl nėra išspinduliuojamas šviesos kvantas, taip pat šie šuoliai vyksta tarp išsigimusios energijos lygmenų.

1.4.4 Jablonskio diagrama

Molekulių energijos lygmenis, elektronų šuolius tarp skirtingų energijos būsenų ir sužadinimo bei relaksacijos procesus patogų vaizduoti Jablonskio diagrama. Šios diagramos pavyzdys pateiktas 15 paveikslėlyje.



15 pav. Jablonskio diagrama. Adaptuota pagal [15].

Storos juodos horizontalios linijos žymi molekulės energijos lygmenis (S_0 , S_1 , S_2). Plonomis pilkomis horizontaliomis linijomis pažymėti virpesiniai energijos lygmenys su atitinkamais skaičiais 0, 1, 2.[15] S_0 atitinka nesužadintos molekulės išorinių elektronų HOMO lygmenį, o S_1 , atitinka sužadintos molekulės LUMO lygmenį, tai S_2 – LUMO+1 lygmenį..

Sužadinus molekulę elektronai tampa nesuporuoti ir atsiduria skirtingose orbitalėse. Vadinasi, sužadinus molekulę elektronas gali peršokti į aukštesnę singuletinę arba tripletinę būseną. Dėl sąveikaujančių elektronų sukinių tripletinių būsenų energija yra žemesnė. Singuletinių ir tripletinių energijų būsenų skirtumas priklauso kaip sąveikaus sukinių.[9] Jei jų orbitalės užima panašias vietas erdvėje, tai sukinių stipriai sąveikaus ir energijų skirtumas bus didelis, tačiau jei šių orbitalių padėtys erdvėje yra skirtingos, tai energijų skirtumas bus mažesnis.[9] Diagramoje fotono sugerties procesą vaizduoja vertikalios aukštyn nukreiptos mėlyna ir violetinės rodyklės. Jei sužadinimas įvyksta į bet kurią singuletinę būseną, tai pirmiausiai molekulė nespinduliniu būdu, dažniausiai vidine konversija, greitai relaksuoja į žemiausią sužadintą singuletinę būseną, o iš čia tolimesnė relaksacija gali vykti trimis skirtingais būdais: fluorescencija, interkombinacinė konversija arba nespinduline relaksacija.[9] Molekulė būdama sužadintoje singuletinėje ar tripletinėje būsenoje gali dar kartą sugerti šviesos kvantą ir pereiti į aukštesniąją sužadintą būseną.[9]

Vidinės konversijos, kuri diagramoje pažymėta vertikaliomis punktyrinėmis rodyklėmis žemyn, metu vyksta nespindulinė relaksacija tarp vienodo multiplietiško būsenų. Vidinei konversijai vykstant tarp aukštų energijos sluoksnių nespinduliniai šuoliai yra labai greiti, tačiau tarp žemų energijų šis vyksmas yra lėtas.[6] Vidinei konversijai atsirasti reikalingas potencinių paviršių suartėjimas arba susikirtimas, tai reiškia, kad vidinės konversijos įvykio tikimybė mažėja didėjant energijos tarpui tarp gretimų lygmenų.[6] Kadangi vidinės konversijos tikimybė tarp $S_1 \rightarrow S_0$ yra maža, todėl stebimas spindulinis elektrono šuolis – fluorescencija. Dėl to vidinė konversija iš S_1 į S_0

gali konkuruoti su fluorescencija ir interkombinacine konversija į tripletinę būseną. Vidinės konversijos greitis yra 10^{11} - 10^{13}s^{-1} eilės.[14]

Interkombinacinė konversija vyksta tarp skirtingų multipletiškumo būsenų, tai reiškia, kad šuoliai gali vykti tarp singuletinės ir tripletinės arba tripletinės ir singuletinės būsenų.[6] Toks šuolis galėtų būti iš sužadintos S_1 singuletinės būsenos į T_1 sužadintą tripletinę būseną.[15] Interkombinacinė konversija šiais $S_1 \rightarrow T_1$, $S_1 \rightarrow T_n$ kanalais gali būti pakankamai greita, kad konkuruotų su fluorescencija šiuo kanalu $S_1 \rightarrow S_0$. [14] Tai yra draudžiamas šuolis, tačiau elektrono sukinys gali pasikeisti dėl stiprios sąveikos tarp sukinio ir orbitos.

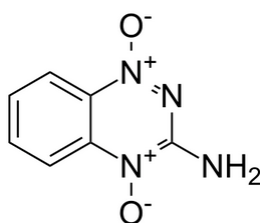
Fosforescencija priešingai nei fluorescencija yra spindulinė relaksacija tarp skirtingų multipletiškumo būsenų, taip pat, jo spektras yra labiau pastumtas ilgųjų bangų pusėn. Dažniausias šuolis yra tarp pirmos tripletinės ir pagrindinės singuletinės būsenų $T_1 \rightarrow S_0$. Tokio vyksmo greitis yra mažesnis nei fluorescencijos 10^{-2} - 10^4s^{-1} , nes toks šuolis yra draudžiamas dėl elektrono sukinio.[6] Normaliai molekulių elektronai yra suporuoti taip, kad jų sukiniai yra priešingų krypčių, o vienam iš elektronų pereinant į aukštesnę energijos lygmenį jo sukinys nepakinta, tačiau gali atsitikti taip, kad elektronas keliaudamas į aukštesnės energijos orbitalę pakeis savo sukinio kryptį. Tokiu būdu du elektronai tampa nesuporuoti ir su tokia pačia sukinio kryptimi tik skirtingose orbitalėse.[16] Fosforescencija kambario temperatūroje yra labai reta, nes tripletinės būsenos neišgyvena ilgai, kad vyktų toks procesas, dėl daugelio susidūrimų su tirpiklio molekulėmis.[14] Gana dažnai stebima tai, kad organiniuose junginiuose fosforescencija trunka žymiai ilgiau nei fluorescencija išjungus žadinančią spinduliuotę.

Dar vienas spindulinės relaksacijos būdas yra uždelstoji fluorescencija. Šio proceso metu šviesos kvanto emisija vyksta iš to paties S_1 lygmens, bet vyksta lėčiau nei normali fluorescencija. Vienas iš kriterijų pastebėti uždelstąją fluorescenciją yra tada, kai elektronas peršoka iš sužadintos tripletinės būsenos T_1 į pirmą sužadintą singuletinę būseną S_1 . Jei T_1 yra pakankamai ilga, kad atsirastų tikimybė molekulei iš aplinkos gauti papildomos energijos, tada interkombinacinės konversijos būdu elektronas gali sugrįžti į S_1 būseną. Iš čia elektronas toliau gali relaksuoti nespinduliniu būdu arba gali įvykti uždelstoji fluorescencija.

2 TIRAPAZAMINŲ JUNGINIŲ LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Vėžio gydymo ir diagnostikos veikimo principas

Tirapazaminas yra organinė molekulė, kurios struktūrą vaizduoja 16 paveikslėlis. Šios molekulės pagrindinis taikymas yra medicinos srityje kaip priešvėžinis vaistas, kuris, esant labai mažam deguonies lygiui (hipoksijai), redukuojamas išskiria toksinį radikalą.

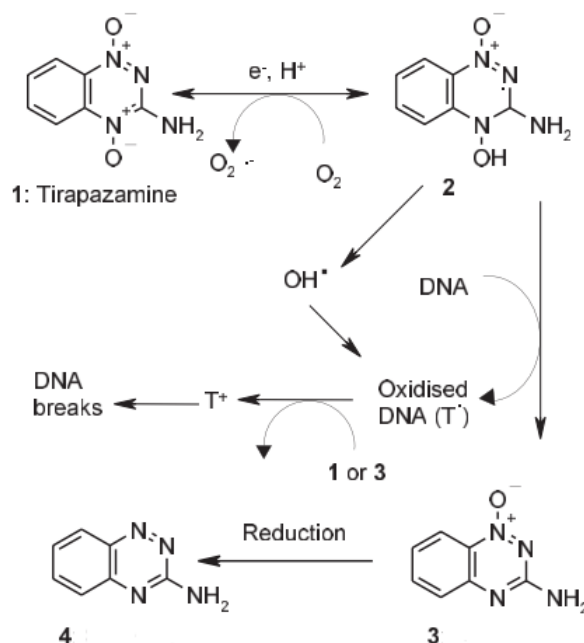


16 pav. Tirapazamino molekulė.[17]

Hipoksija yra įprastas reiškinys, stebimas žmogaus solidiniuose navikuose. Tokių piktybinių navikų gydymas yra sudėtingas procesas dėl to, kad šios auglio sritys yra menkai aprūpintos kraujagyslėmis, o tai riboja citotoksinių preparatų poveikį. [18] Tirapazaminų veikimas yra pagrįstas tuo, kad jie yra nereaktyvūs tol, kol nepasiekė skurdžiai deguonimi aprūpintos srities. Tirapazamino molekulei atsидūrus hipoksinėje zonoje įvyksta deguonies redukcijos reakcija, kurios produktas yra toksinis radikalas. Šis radikalas suardo vėžinės ląstelės DNR grandines.[19] Nuo 2006 metų vykdomi tirapazaminų III fazės medicininiai tyrimai su pacientais, turinčiais galvos ir kaklo auglius.[20] Ankstesniuose klinikiniuose tyrimuose buvo nustatyta, kad gryną tirapazaminų efektyvumas gydyme yra gana ribotas, todėl dabar, siekiant sustiprinti šio preparato priešvėžines savybes, yra kuriami nauji junginiai tirapazaminų pagrindu.[21]

Tirapazamino veikimo schema hipoksinėje aplinkoje yra pateikta 17 paveiksle. Pirmiausiai tirapazaminas 1 yra redukuojamas ląsteliniu fermentu, prisijungdamas elektroną ir sudarydamas deguoniui jautrų radikalą 2. Šis radikalas bedeguoninėje aplinkoje suyra prisijungdamas protoną ir išskiria citotoksinių DNR pažeidžiantį radikalą (hidroksilo radikalą).[22] Vandenilio atomas išplėšiamas iš ląstelės molekulių, sukeliant DNR molekulės oksidacijos reakciją, dėl kurios atsiranda viengubos ir dvigubos DNR grandinės pažeidimai ir chromosomų aberacijos.[1] Vykstant šiems procesams radikalas 3 toliau yra redukuojamas į 4 molekulę. Viena iš šio darbo dalių yra skirta išnagrinėti 1, 3 ir 4 molekulių fotofizikines savybes.

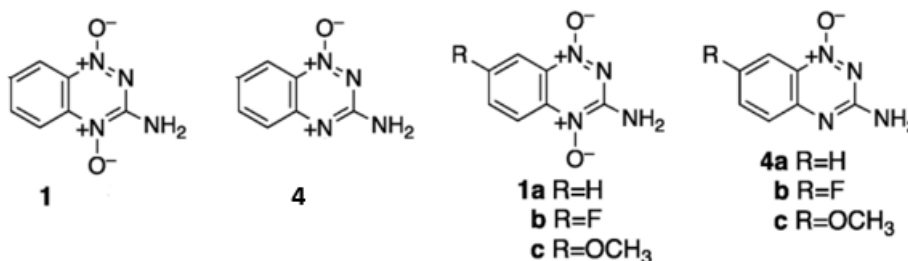
Tirapazamino citotoksiškumui pasireikšti reikalinga hipoksinė aplinka, todėl toksiniam radikalui atsидūrus aplinkoje, kurioje yra daug deguonies, jis oksiduojamas atgal į pradinę molekulę, taip išvengiant sveikų ne vėžinių ląstelių pažeidimų.[2]



17 pav. Schema, vaizduojanti tirapazaminų veikimą esant hipoksinėms aplinkos sąlygoms.[3]

2.2 Junginių optinės savybės

Tirapazaminų junginiai yra gerai žinomi ir plačiai tyrinėjami medicinoje ir biologijoje, tačiau šių junginių fotofizikinių tyrimų yra gana mažai. Dažniausiai tyrinėtų šių organinių junginių struktūros pateiktos 18 pav.[16]



18 pav. Tyrinėtų tirapazaminų junginių molekulinės struktūros. Adaptuota pagal [22].

Remiantis tankio funkcijos laikinės priklausomybės teorijos skaičiavimais yra žinoma, kad elektronų šuoliai vyksta tarp orbitalių $\pi \rightarrow \pi^*$. [23] Junginio 1 fotofizikinės savybės nustatytos naudojant tirpiklį vandenį, o atlikus spektroskopinius tyrimus apskaičiuota, kad šio junginio kvantinis našumas, gautas remiantis palyginamuoju metodu, yra mažiau nei 0,2% bei fluorescencijos gesimo trukmė yra lygi 98 ps. Šis tirapazaminas, ištirpintas vandenyje, gana stipriai sugeria UV srityje ties 266 nm, o silpnė sugertis stebima regimojoje zonoje ties 461 nm. Taip pat yra pastebėta, kad sugerties spektro maksimumo padėtis gana stipriai priklauso nuo tirpiklio poliškumo ir esant aukštesnei pH vertei regimas poslinkis į raudonąją spektro pusę. [23] Junginių 1 ir 4 savybių tyrimas taip pat buvo atliktas acetonitrilo tirpiklyje. 1 junginio fluorescencijos maksimumas užfiksuotas ties 432 nm, o 4 – 422 nm. Junginio 4 sugerties maksimumas nustatytas 404 nm acetonitrile, o vandenyje

jis yra 413 nm. Taip pat pastebėta, kad fluorescencija 4 junginio yra žymiai intensyvesnė nei 1, taip pat, stipriai skiriasi kvantiniai našumai: 1 medžiagos našumas acetonitrilo tirpiklyje yra 0,2%, o 4 yra 12%.[24] Tirapazaminų junginių fotolizė iš principo atitinka pirmąjį tirapazaminų suaktyvinimo etapą in vivo. Tai leistų simuliuoti šio junginio veikimą gyvame organizme laboratorinėmis sąlygomis. Toks metodas, kada yra gerai apibrėžtos aplinkos sąlygos, gali būti potencialiai naudingas toliau tyrinėjant tirapazaminų savybes.[23]

Tolimesni tyrimai buvo vykdomi su 1abc ir 4abc medžiagomis, kurių rezultatai pateikti 1 lentelėje. Junginį žymi stulpelis compd, λ_{abs} atitinka sugerties maksimumą, ϵ yra ekstinkcijos koeficientas, λ_{em} – fluorescencijos maksimumas, Φ_f – kvantinis našumas. Indeksas d žymi duomenis acetonitrilo tirpiklyje, o indeksas e – vandenyje. Pastebima, kad junginių, turinčių vieną deguonies atomą, kvantiniai našumai stipriai išauga acetonitrilo tirpiklyje. [22] Taip pat, kiekvieno junginio našumai kinta tiek acetonitrilo, tiek vandens tirpikliuose priklausomai nuo pakaito. Esant OCH_3 pakaitui, prijungtam C8 tirapazamino molekulės pozicijoje, našumas 4 ir 1 junginio yra didesnis nei esant H arba F pakaitui. 1abc oksidų fluorescencijos kvantinės išeigos buvo silpnos ir atitinkamai kito intervaluose 0,6 – 2,2% acetonitrile ir 0.3 – 1.2% vandenyje. Mono-N-oksidai (4abc) pasižymėjo žymiai stipresne fluorescencija, tad jų našumai atitinkamai yra 16 – 47% acetonitrile ir 2 - 8% vandenyje. Be to, pastebimas didelis Stokso poslinkis, kur junginių 4abc sugerties ir emisijos spektrų maksimumų skirtumas yra 71, 76 ir 79 nm acetonitrile, o vandenyje 104, 106 ir 106 nm. [22] Matome, kad tirapazaminų junginių fotofizikinės savybės didelę įtaką turi deguonies atomų skaičius ir pakaitai. Remiantis [24] šaltinio duomenimis tokias molekulių savybes galėjo nulemti deguonies ciklicizacija, po kurios susidaro naujas produktas.

1 lentelė. Tyrinėtų tirapazaminų junginių fotofizikinės savybės. [22]

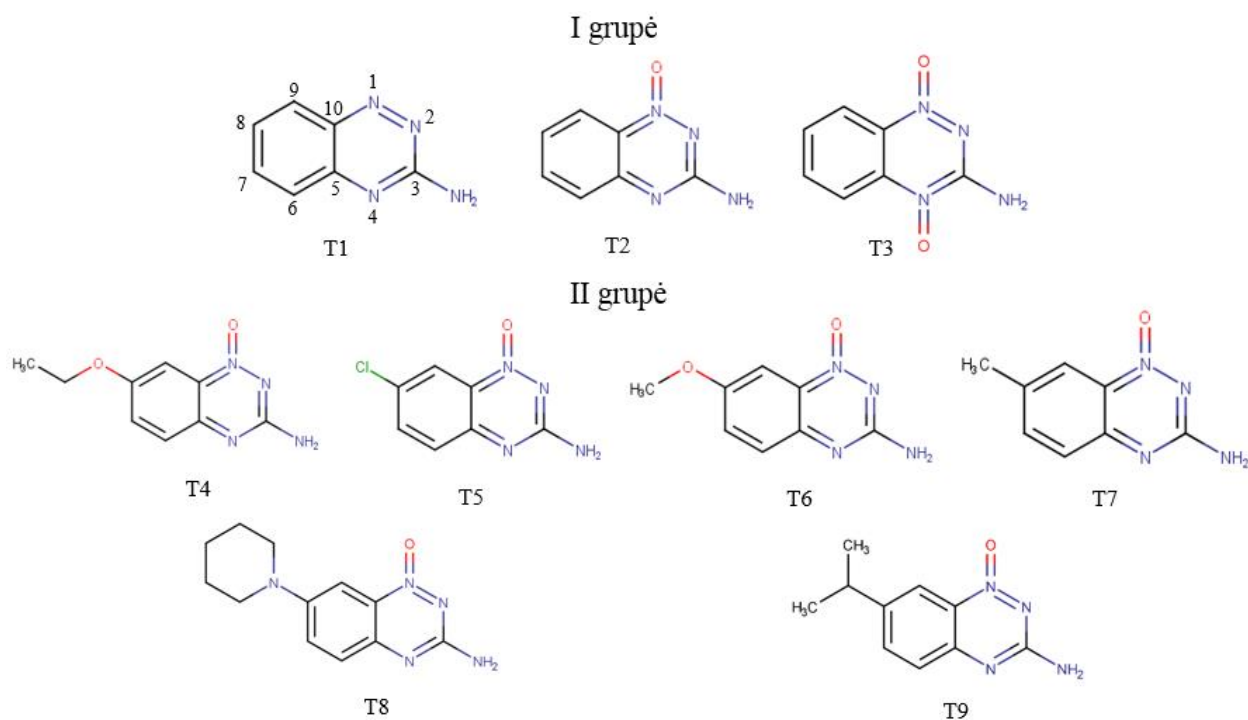
compd	λ_{abs} (nm)	$\log_{10} \epsilon^a$	λ_{em}^b (nm)	Φ_f^c (%)
4a ^d	407	3.747	478	16.86 ± 1.40
4b ^d	415	3.807	491	29.94 ± 2.09
4c ^d	430	3.646	509	47.22 ± 5.07
4a ^e	415	3.751	521	3.67 ± 0.21
4b ^e	422	3.749	526	2.44 ± 0.21
4c ^e	441	3.655	547	8.68 ± 1.00
1a ^d	477	3.867	505	0.60 ± 0.01
1b ^d	489	3.853	573	0.77 ± 0.02
1c ^d	432	3.684	510	2.27 ± 0.35
1a ^e	457	3.786	545	0.33 ± 0.01
1b ^e	468	3.807	562	0.30 ± 0.01
1c ^e	440	3.765	542	1.24 ± 0.16

3 BANDINIŲ PARUOŠIMO IR TYRIMO METODIKOS

Tirapazaminų junginių optinių savybių tyrimams buvo naudojami keli skirtingi spektroskopijos metodai. Mažos medžiagų koncentracijos tirpalų šviesos sugerties spektrai buvo išmatuoti Perkin-Elmer spektrometru Lambda 950. Tų pačių junginių fluorescencijos spektrai išmatuoti naudojant CCD spektrometrą Hamamatsu PMA-11, žadinti bandinius naudojant plataus spektro ksenoninę lempą, o reikiamą bangos ilgį parenkant monochromatoriumi. Nagrinėjamų junginių fluorescencijos kvantinis našumas apskaičiuotas naudojant du metodus: palyginamąjį ir integruojančios sferos. Fluorescencijos gyvavimo trukmės užfiksuotos taip pat dviem metodais - tai laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo (TCSPC) būdu su sistema PicoQuant PicoHarp 300 ir naudojant fotoelektronų kamerą (streak camera). Gautų duomenų apdorojimas ir analizė atlikta su OriginPro 8.5 ir MATLAB programomis.

3.1 Tiriamos medžiagos ir bandinių paruošimas

Šiame darbe tiriami tirapazaminų junginiai buvo susintetinti Biochemijos institute, Gyvybės mokslų centre (dr. Jonas Šarlauskas). Junginius dėl aiškumo galima skirstyti į dvi grupes. Pirmąją grupę sudaro tirapazamininiai dariniai (T1 - 3-Amino-1,2,4-benzotriazine, T2 - 3-Amino-1,2,4-benzotriazine 1-oxide ir T3 - 3-Amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide), neturintys pakaito C8 pozicijoje. Tarpusavyje pastarosios molekulės skiriasi deguonies atomų skaičiumi – T1 molekulė deguonies atomų neturi, T2 turi vieną dvigubą jungtį prijungtą deguonies atomą N1 pozicijoje, o T3 – du deguonies atomus N1 ir N4 pozicijose. Antrąją grupę sudaro molekulės T2 dariniai, turintys skirtingus pakaitus C8 pozicijose. 7-ethoxy-1-oxo-1,2,4-benzotriazin-3-amine atitinka T4 molekulę, 7-chloro-1-oxo-1,2,4-benzotriazin-3-amine (T5), 7-methoxy-1-oxo-1,2,4-benzotriazin-3-amine (T6), 7-methyl-1-oxo-1,2,4-benzotriazin-3-amine (T7), 1-oxo-7-(piperidin-1-yl)-1,2,4-benzotriazin-3-amine (T8) ir 1-oxo-7-(propan-2-yl)-1,2,4-benzotriazin-3-amine (T9). Šių junginių molekulės pateiktos 19 paveiksle.

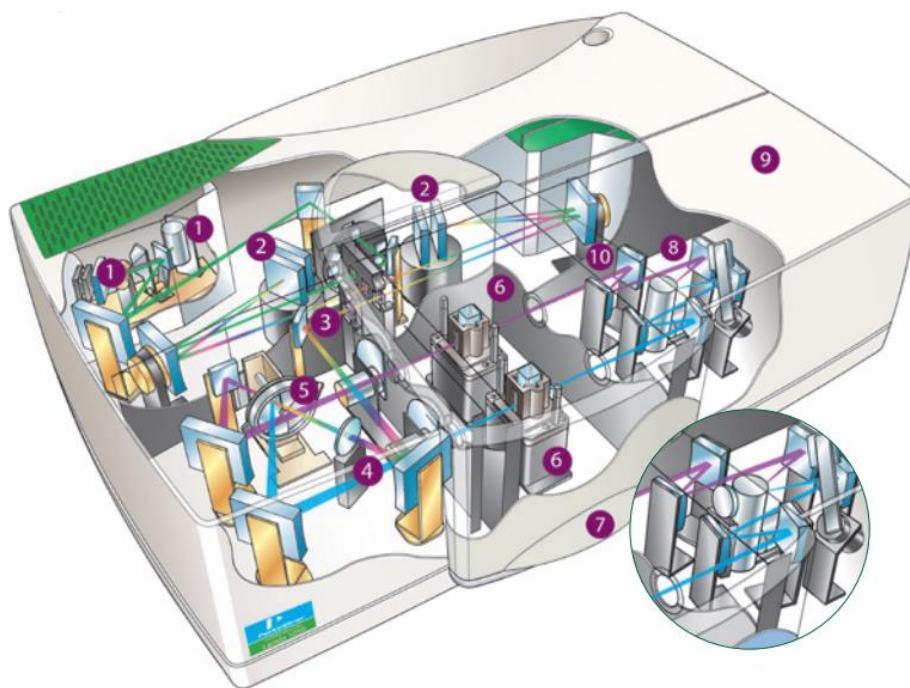


19 pav. Darbe tiriamų tirapazaminų junginių molekulinės struktūros.

Bandinių paruošimui buvo naudojami šie tirpikliai: etilacetatas EAT ($\epsilon = 6.02$), acetonitrilas ACN ($\epsilon = 37.5$) bei 1 v/v% dimetil-sulfoksido DMSO ($\epsilon = 46.7$) ir vandens H_2O ($\epsilon = 80.1$) mišinys. Visi naudoti tirpikliai buvo gauti iš Sigma-Aldrich (dabartinis Merck). Skliausteliuose pateiktos ϵ vertės – tai tirpiklių dielektrinės konstantos, nurodančios tirpiklių poliškumą. Medžiagų koncentracijos matuojant fluorescencijos kvantinius našumus buvo parinktos taip, kad optinis tankis OD būtų apytiksliai lygus tokiam intervalui 0.03 – 0.08. Bendrai naudotos koncentracijos neviršijo $5 \cdot 10^{-5}$ M.

3.2 Sugerties spektrų matavimas

Tirapazaminų junginių sugerties spektrų matavimai atlikti su spektrometru PerkinElmer Lambda 950. Šio spektrometro veikimas paremtas pro bandinį praėjusios ir kritusios monochromatinių spindulių intensyvumo skirtumu. Spinduliuotės šaltinis – tai deuterio (UV diapazonas) ir volframo (VIS-NIR diapazonas) lempos pasižyminčios plataus spektro emisijos juostomis. Signalas registruojamas priklausomai nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio: fotodaugintuvu (175-860 nm), InGaAs jutikliu (860-1800 nm) bei PbS jutikliu (860-3300 nm). Spektrometro veikimo schema pavaizduota 20 pav.



20 pav. Perkin-Elmer Lambda 950 veikimo schema. [25]

3.3 Fluorescencijos spektrų matavimas

Fluorescencijos matavimai atlikti parenkant tinkamiausią žadinimo bangos ilgį, pagal tiriamų bandinių sugerties maksimumą. Reikiamas bangos ilgis gaunamas naudojant monochromatorių, o bandinio išspinduliuota šviesa fiksuojama šviesolaidžiu, kuris yra pastatomas 90° kampu nuo žadinančiojo spindulio. Bandinių spinduliuotė patenka į spektrometrą Hamamatsu PMA-11 CCD, kuriame ji yra užfiksuojama ir analizuojama. Fluorescencijos intensyvumas registruojamas santykiniais vienetais (s. v.).

3.4 Fluorescencijos kvantinių našumų nustatymas palyginamuoju metodu

Fluorescencijos kvantinis našumas yra apibrėžiamas kaip išspinduliuotų ir sugertų fotonų skaičiaus santykis. Iš principo kvantinis našumas nurodo spindulinių ir nespindulinių procesų konkurencijos spartą.[26] Kvantinį našumą galima apskaičiuoti naudojantis palyginamuoju metodu. Tokio metodo principas remiasi tuo, kad pasirenkama etaloninė medžiaga, kurios kvantinis našumas yra gerai žinomas. Taip pat, matuojant tokiu metodu svarbu užtikrinti vienodus žadinančios spinduliuotės parametrus, matavimo sąlygas, o bandinių ir etaloninės medžiagos optiniai tankiai turi būti suderinti (atitinka intervalą 0,03-0,08) bei svarbu atsižvelgti į tirpiklių lūžio rodiklius. Išmatuojami etaloninės ir tiriamosios medžiagos sugerties ir fluorescencijos spektrai. Iš gautų matavimo duomenų kvantinis našumas apskaičiuojamas pagal šią formulę:

$$QY = \frac{QY_R I O D_R n^2}{I_R O D n_R^2}, \quad (11)$$

kur I yra spektriškai integruojamas intensyvumas, n – lūžio rodiklis, OD – atitinkamas optinis tankis pagal žadinančio spindulio bangos ilgį, QY – kvantinis našumas, indeksas R žymi etaloninės medžiagos atitinkamą parametą.[27]

Šiame darbe medžiagų T1, T2, T4, T5, T6 fluorescencijos kvantiniams našumams nustatyti buvo pasirinkta etaloninė medžiaga chinino sulfatas, o medžiagoms T3, T7 etalonas $Ru(bpy)_3^{2+}$.

3.5 Fluorescencijos gesimo trukmių nustatymas

3.5.1 TCSPC metodas

Fluorescencijos gesimo trukmių matavimai buvo atliekami naudojant laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo techniką (angl. k. time-correlated single-photon counting, TCSPC).[28] Tokio metodo veikimas pagrįstas tuo, kad žadinant bandinį po kažkurio laiko yra emituojamas fotonas. Šį veiksmą kartojant daug kartų ir stebint laiką iki fotono emitavimo, gaunamas fluorescencijos kitimas laike. Laike koreliuotų fotonų skaičiavimo technika padeda nustatyti fluorescencijos laikinę evoliuciją. 21 paveiksle yra pavaizduota tokio matavimo schema. Pirmiausiai bandinys yra sužadinamas trumpu lazerio impulsu, kuris įjungia matavimo laikmatį.[29] Tinkamam interferencinio filtro veikimui užtikrinti naudojantis pirmu lęšiu sukuriamas lygiagretus spindulių pluoštas. Spinduliuotės spektro ilgabangė dalis nukerpama su filtru esančiu prieš bandinį, o antrojo lęšio pagalba sufokusuojamas sklindantis šviesos srautas į bandinį. Iš bandinio išspinduliuotų fotonų suformuojamas jų lygiagretus srautas, kuris keliauja į monochromatorių. Antras interferencinis filtras yra reikalingas tam, kad nepraleistų iš šviestuko atkeliaujančių fotonų į monochromatorių. Monochromatoriaus pagalba yra išskiriamas tiriamasis bangos ilgis, kuris patenka į detektorį. Prasidėjus šviesos impulsui keitiklyje įjungiamo įtampa, kuri didėja tiesiškai tol, kol sistema užfiksuoja fotoną, o tada įtampos augimas sustabdomas.[29] Gauta įtampos vertė patenka į daugiakanalį analizatorių, kuris rezultatus suskirsto į kanalus ir juos susumuoja pateikdamas duomenis kaip fotonų skaičiaus nuo laiko priklausomybę. Fotonai yra išspinduliuojami atsitiktinai, todėl fluorescencijos evoliuciją laike aprašo eksponentinis gesimas. Logaritminėje skalėje eksponentė yra tiesė, tad nustačius tiesės parametrus galima sužinoti gesimo trukmę. Eksponentinį gesimą aprašo ši formulė:

$$n(t) = Ae^{-\frac{t}{T}}, \quad (12)$$

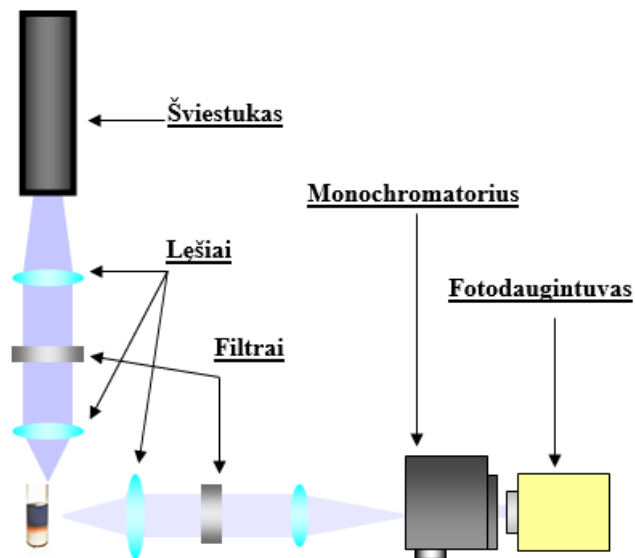
kur n – fotonų skaičius tam tikru laiko momentu t , A – pradinis fotonų skaičius, T – gesimo trukmė. Išlogaritmavus šią formulę, gausime kad T yra tiesės krypties koeficientas ir taip nustatome gesimo trukmę. Ši formulė tinka tada, kai gesimo trukmė yra žymiai ilgesnė nei žadinančios spinduliuotės (lazerio) impulso trukmė, bet jei jos yra trumpos, tada reikia tarti, kad žadinančio signalo funkcija yra

daug δ -funkcijų amplitudžių, kurios kiekviena atskirai sužadina bandinį, o gauta kreivė yra daugelio eksponenčių suma.[29] Norint nustatyti ieškomą funkciją reikia atlikti dekonvoliuciją. Tolimesnis duomenų apdorojimas ir gesimo trukmių skaičiavimas atliekamas Matlab programa. Spindulinės ir nespindulinės gesimo trukmės suskaičiuojamos naudojantis šiomis formulėmis:

$$\tau_{rad} = \frac{\tau}{QY''} \quad (13)$$

$$\tau_{norad} = \frac{\tau}{1 - QY''} \quad (14)$$

kur QY yra medžiagos kvantinis našumas, τ_{rad} – spindulinė gesimo trukmė, τ_{norad} – nespindulinė gesimo trukmė, τ atitinka gesimo trukmės vertę gautą iš matavimų.



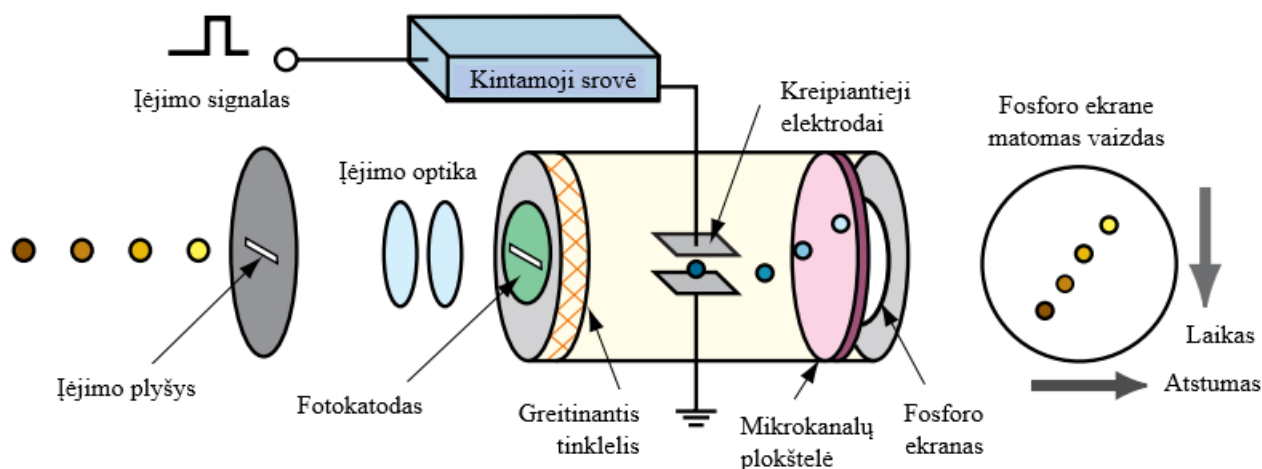
21 pav. Tyrimo metodikos principinė optinė schema.

3.5.2 „Streak“ kamera

Informacija apie medžiagoje vykstančius sužadinimo relaksacijos procesus gauta naudojant fotoelektronų kamerą (angl. streak camera). Šis metodas yra pranašesnis už anksčiau aptartą TCSPC metodą, nes leidžia išmatuoti žymiai trumpesnes gesimo trukmes. TCSPC metodu naudojamas nanosekundinis impulsas žadinimo signalui gauti, todėl jei tiriamos medžiagos gesimo trukmė yra labai panaši arba trumpesnė nei žadinantis impulsas, tiksliai išmatuoti gesimo vertės negalime. Trumpesnių nei nanosekundžių fluorescencijos gesimo trukmių nustatymui naudojama fotoelektronų kamera, kadangi žadinantis impulsas yra generuojamas pikosekundiniais arba femtosekundiniais lazeriais. Fotoelektronų kameros veikimo struktūrinė schema pateikta 22 pav.

Polichromatorius išskleidžia bandinio išskiriamą šviesą horizontalia kryptimi. Išskleisti fotonai keliauja pro įėjimo optikos elementus, kol pasiekia fotokatodą.[30] Jame fotonai išmuša elektronus iš katodo medžiagos, kurie yra įgreitinami ir juda link anodo. Kreipiančiuosiuose elektroduose sukuriama statmenas elektronų judėjimo kryptiai kintantis elektrinis laukas. Elektronai skirtingu

laiku praėję pro kreipiančiuosius elektrodus yra paveikiami skirtingo elektrinio lauko ir todėl skirtingai nukreipiami. Tokie išskleisti elektronai skrieja pro mikrokanalų plokštę, yra padauginami ir galiausiai pataiko į fosforo ekraną.[30] Šiame ekrane sukuriamas dvimatis vaizdas, kuris atspindi elektronų spektrinį ir laikinį pasiskirstymą. Toliau vaizdas užfiksuojamas CCD kamera ir perduodamas kompiuteriui, kuriame vyksta tolimesnis duomenų apdorojimas ir analizė. Pagrindinę eksperimentinę įrangą sudaro Hamamatsu CI0627 fotoelektronų kamera su CCD kamera C9300. Bandinių žadinimui naudojamas femtosekundinis lazeris YbiKGW Šviesos konversija Pharos-SP, lazerio spinduliuotės stiprintuvas (OPA) Orpheus. Lazerio poliarizaciją galima keisti Bereko poliarizaciniu konceptoriumi BC1. Polichromatorius – Princeton instruments acton SP2300. Žadinančios spinduliuotės galia matuojama OPHIR PD-300-UV.



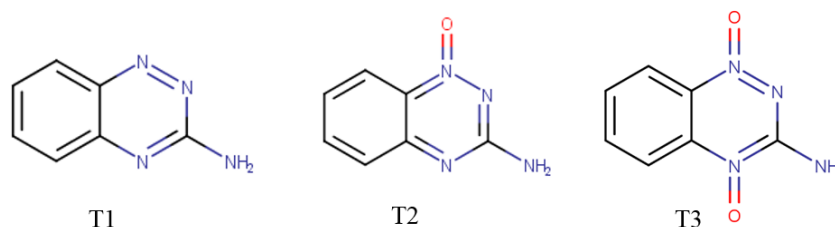
22 pav. Fotoelektronų kameros principinė veikimo ir struktūrinė schema. Adaptuota pagal [30].

4 NAUJI TIRAPAZAMINŲ JUNGINIAI IR JŲ FOTOFIZIKINIŲ SAVYBIŲ CHARAKTERIZAVIMAS

Šio darbo metu buvo tirtos dvi skirtingų tirapazaminų junginių grupės, siekiant išsiaiškinti jų fotofizikines savybes, esant skirtingam deguonies atomų skaičiui bei skirtingiems pakaitams molekulėse. Dalis pirmos tirapazaminų junginių grupės fotofizikinių savybių jau buvo aptartos šaltiniuose [22–24], tačiau šiame darbe pateiksime platesnį gautų junginių rezultatų aptarimą ir palyginimą. Toliau yra detalai aptarta kiekviena grupė.

4.1 Deguonies atomų skaičiaus įtaka tirapazaminų junginių savybėms

Pirmąją tirapazaminų junginių grupę sudaro dariniai (T1, T2 ir T3), neturintys pakaito C8 pozicijoje ir tarpusavyje besiskiriantys deguonies atomų skaičiumi. Kaip pateikta 23 paveiksle, T1 molekulė deguonies atomų neturi, T2 turi vieną deguonies atomą, o T3 – du deguonies atomus.



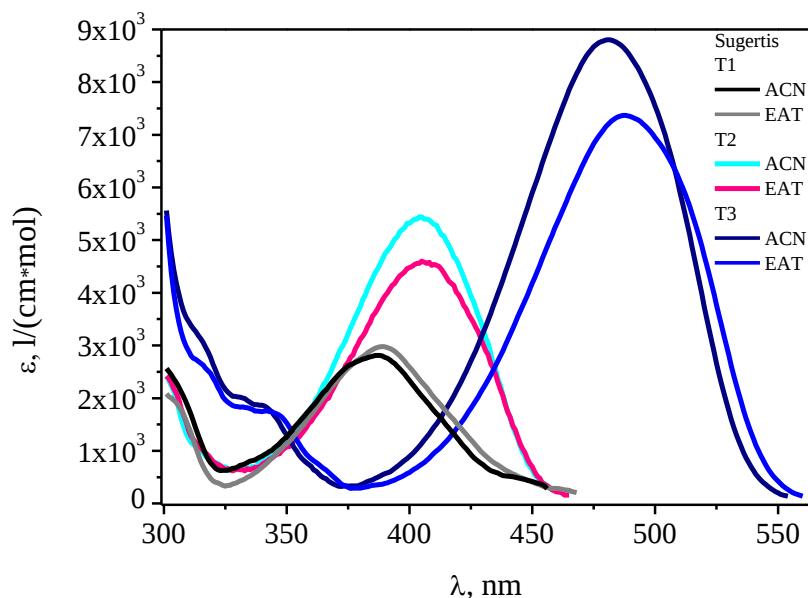
23 pav. Pirmosios tirapazaminų darinių grupės molekulinės struktūros.

Šios grupės darinių fotofizikinių savybių tyrimai buvo atlikti skirtingo poliškumo tirpikliuose: etilacetate (EAT, $\epsilon = 6,02$) ir acetonitrile (ACN, $\epsilon = 37,5$). Atliktų eksperimentų rezultatai pateikti 2 lentelėje, o sugerties ir fluorescencijos spektrai pavaizduoti 24 ir 25 paveikslėliuose.

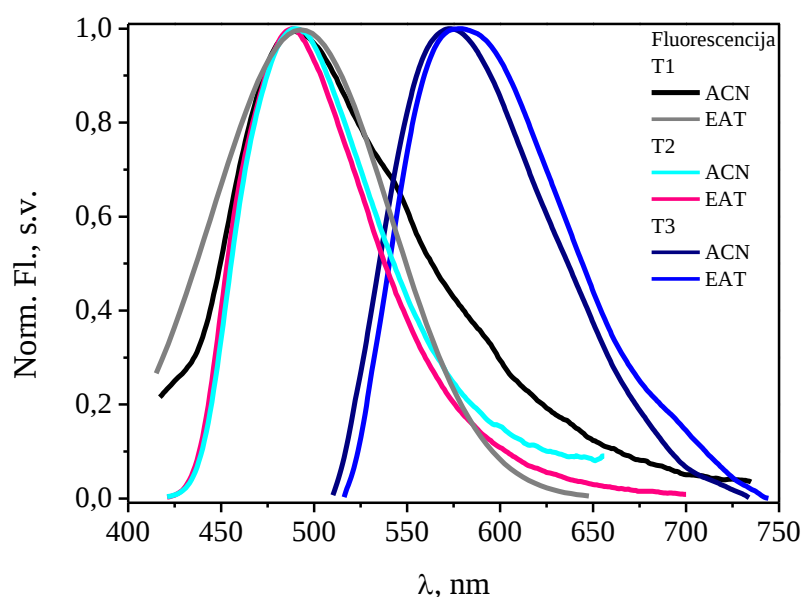
2 lentelė. Pirmos grupės tirapazaminų junginių fotofizikinės charakteristikos.

Medž.	Tirpk.	ϵ^1 , l/(mol*cm)	λ_{sug}^2 , nm	λ_{fl}^3 , nm	QY ⁴ , %	τ^5 , ns	f ⁶ , %	τ_{rad}^7 , ns	τ_{norad}^8 , ns
T1	ACN	2987	389	489	0,33	0,94 4,27	31 69	-	-
	EAT	2987	389	493	0,20	0,19 2,3	13 87	-	-
T2	ACN	5538	405	490	16,22	5,6	100	36,79	6,61
	EAT	4599	406	487	7,42	4,3	100	57,95	4,64
T3	ACN	8895	482	572	0,28	0,11*	100	39,29	0,11
	EAT	7418	488	580	0,23	<1	<1	<1	<1

* Nurodyta vertė yra paimta iš [24] šaltinio. ¹ Molinis ekstinkcijos koeficientas, ² sugerties intensyviausia vertė, ³ fluorescencijos intensyviausia vertė, ⁴ fluorescencijos kvantinis našumas, ⁵ fluorescencijos gesimo trukmė, ^{7,8} spindulinė bei nespindulinė fluorescencijos gesimo trukmės.



24 pav. T1, T2 ir T3 sugerties spektrai acetonitrilo (ACN) ir etilacetato (EAT) tirpikliuose.



25 pav. T1, T2, T3 medžiagų fluorescencijos spektrai acetonitrilo (ACN) ir etilacetato (EAT) tirpikliuose. T1 junginio fluorescencijos spektras etilacetato tirpiklyje buvo papildomai apdorotas Origin Gauss fit funkcija, o T1 (ACN) ir T3 (ACN bei EAT) junginių spektrai buvo papildomai apdoroti Origin Smooth funkcija.

Visų trijų darinių sugerties spektrams (24 paveikslas) būdinga aiški tendencija: deguonies atomų nebuvimas lemia silpnesnę sugertį. Taip pat, papildomų deguonies atomų skaičius molekulėje sukelia sugerties spektro raudonąją poslinkį. T1 molekulės sugerties intensyviausia vertė yra 389 nm (acetonitrile ir etilacetate), tačiau T2 junginio sugerties spektras yra pasislinkęs į raudonąją pusę per 20 nm, o T3 – net per 100 nm. T2 darinio ekstinkcijos koeficientas yra 1,5 – 1,8 karto, o T3 darinio

net 2,5 – 3 karto didesnis nei T1 molekulės. Iš šių rezultatų aiškiai matome, kad papildomas deguonies atomų skaičius mažina šuolio $S_0 \rightarrow S_1$ energiją, bet padidina šuolio oscilatoriaus stiprį.

Tirpiklio poliškumas neturi jokios reikšmingos įtakos T1 junginio sugerčiai, tačiau matomi nežymūs pakitimai T2 ir T3 spektruose. Šių dviejų molekulių ekstinkcijos koeficientas auga didėjant tirpiklio poliškumui. Bendrai sugerties spektrai acetonitrilo tirpiklyje yra paslinkti keliais nanometrais į mėlynąją pusę, jei lygintume su spektrais, gautais etilacetate.

Bendros fluorescencijos spektrų kitimų tendencijos atitinka sugerties spektrus. Fluorescencijos spektrų padėtys nepriklauso nuo tirpiklio poliškumo, tačiau yra jautrios deguonies atomų skaičiui molekulėse. T3 junginio fluorescencijos intensyviausios vertės ACN ir EAT tirpikliuose yra ilgabangėje regimojo spektro dalyje 573 - 578 nm, o T1 ir T2 emisijų maksimumai sutampa ir yra ties 490 nm. Abu T1 ir T3 junginiai pasižymi labai silpna fluorescencija - junginių fluorescencijos kvantiniai našumai siekia vos 0,2 – 0,3%. T2 molekulė labiausiai išsiskiria, nes jos kvantinis našumas acetonitrilo tirpiklyje yra net 16%. Pastebėtas neįprastas šios molekulės elgesys, nes mažiau polinis tirpiklis (etilacetatas) sumažina fluorescencijos kvantinį našumą iki 7,4%. Tokia netipinė savybė yra būdinga ir kitame skyrelyje aptariamoms molekulėms.

Nustatytos šios grupės darinių fluorescencijos gesimo trukmės. T2 medžiagos fluorescencinis gesimas yra aproksimuotas viena eksponente, kas parodo, kad egzistuoja vienas pagrindinis sužadintos būsenos relaksacijos kanalas. Bendra fluorescencijos gyvavimo trukmė etilacetate yra 4,3 ns, o acetonitrile šiek tiek ilgesnė 5,6 ns. Nustatyta, kad T1 ir T3 molekulių relaksacijos mechanizmas yra žymiai sudėtingesnis. Galime pastebėti, kad T1 molekulė turi dvi eksponentinio gesimo komponentes, vieną trumpą 0,2 – 0,9 ns, o kitą ilgesnę apie 2,3 – 4,3 ns, atitinkamai EAT ir ACN. Matome, kad T3 junginyje egzistuoja greita relaksacija apie 0,11 ns acetonitrile. Rezultatai aiškiai parodo, kad kiekvienos molekulės sužadinimo relaksacijos kelias yra skirtingas.

Papildomi deguonies atomai stipriai pakeičia tirapazaminų molekulių fotofizikines savybes. Gauti eksperimentiniai rezultatai atskleidė tris pagrindinius šios grupės junginių skirtumus: deguonies atomai sąlygoja sugerties spektro raudonąjį poslinkį, vienas deguonies atomas molekulėje sukelia stiprų kvantinio našumo išaugimą ir bendrai mažiau polinis tirpiklis lemia kvantinio našumo sumažėjimą. Iš atliktų matavimų rezultatų analizės galime pasakyti, kad T1 molekulės dominuojantis šuolis yra $\pi \rightarrow \pi^*$, tačiau prijungus deguonies atomą prie šios molekulės matome, kad stipriai pasikeičia šuolio prigimtis. Deguonis elgiasi kaip akceptorius ir turi nesuporuotą elektronų porą, dėl to dominuojantis šuolis galimai tampa $n \rightarrow \pi^*$, o dėl šuolio prigimties pokyčio sugerties bei fluorescencijos spektrai pasislenka į raudonąją pusę. Taip pat iš sugerties spektrų aiškiai matome, jog stebime ne krūvio pernašos (angl. Charge Transfer, CT) būseną, kadangi CT būsenos atveju oscilatoriaus stipris būtų didesnis mažiau poliniame (etilacetato) tirpiklyje. Siekiant paaiškinti ir kitas

netipines tirapazaminų junginių T1, T2, ir T3 savybes buvo pasinaudota kvantcheminių skaičiavimų duomenimis, kurie buvo atlikti Teorinės fizikos ir astronomijos institute, Nacionaliniame fizinių ir technologijos mokslų centre (dr. Jelena Tamulienė).

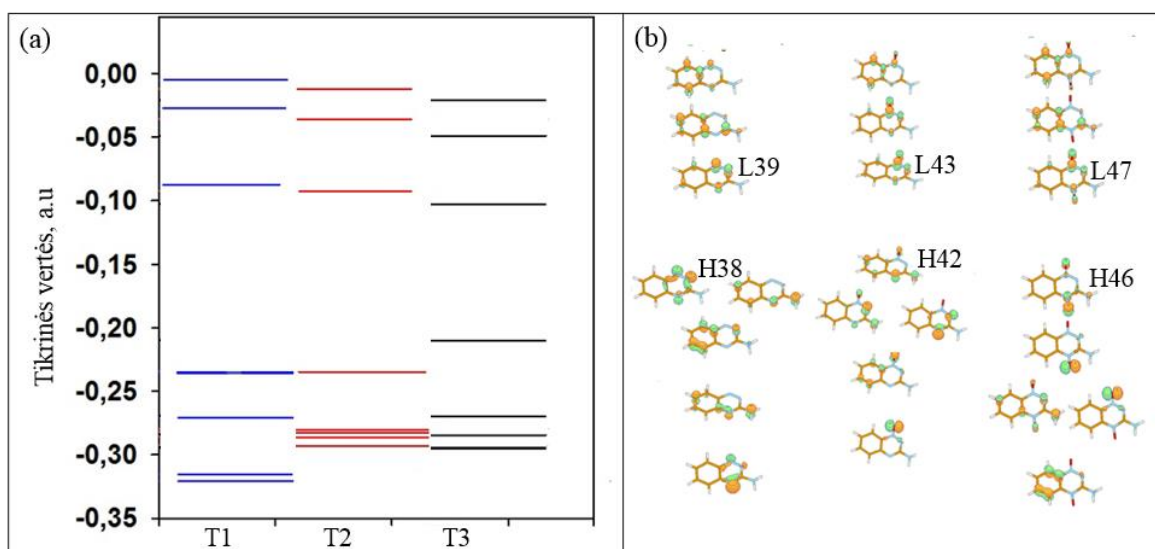
Teorinių skaičiavimų duomenys, kaip junginių dipolinis momentas (vakuume, acetonitrile ir etilacetate) pateikti 3 lentelėje, o sugerties juostos su osciliatoriaus stipriais pateiktos 4 lentelėje. Šios grupės darinių HOMO-LUMO lygmenų išsidėstymas bei molekulinės orbitalės pavaizduoti 26 paveiksle a ir b dalyse.

3 lentelė. Pirmos grupės tirapazaminų junginių dipoliniai momentai.

	T1			T2			T3		
	Vak.	ACN	EAT	Vak.	ACN	EAT	Vak.	ACN	EAT
Dx	0,97	1,48	1,38	0,39	0,88	0,8	0,25	0,57	0,46
Dy	-1,27	-1,70	-1,61	-2,94	-3,64	-3,47	-2,07	-2,63	-2,37
Dz	0,34	0,40	0,39	0,37	0,55	0,53	0,37	0,52	0,49
Viso:	1,65	2,29	2,16	2,99	3,78	3,6	2,12	2,46	2,74

4 lentelė. Tirapazaminų darinių teorinio skaičiavimo duomenys.

	T1			T2			T3		
	$\lambda_{\text{sug.}}$	Osc.	Orbi.	$\lambda_{\text{sug.}}$	Osc.	Orbi.	$\lambda_{\text{sug.}}$	Osc.	Orbi.
	nm	stipris	šuočiai	nm	stipris	šuočiai	nm	stipris	šuočiai
Vak.	460,77	0,0025	38-39	363,97	0,0682	42-43	443,95	0,0837	46-47
	353,96	0,0507	37-39	311,93	0,0017	40-43	335,70	0,0445	46-48
	282,35	0,0450	36-39			41-43,			42-47,
				283,45	0,0042	42-44,	287,77	0,0315	44-47,
ACN						39-43			46-49
	447,88	0,0033	37-39	382,02	0,0889	42-43	443,41	0,1232	46-47
	371,94	0,0671	38-39	312,63	0,0023	40-43	323,35	0,0305	46-48
	289,52	0,0816	36-39	290,70	0,0244	41-43	293,60	0,0223	43-47,
									44-47
EAT				252,83	0,1354	39-43	271,01	0,5074	43-47
									44-47
									46-48
	449,50	0,0033	37-39	379,54	0,0919	42-43	445,20	0,1245	46-47
	368,11	0,0684	38-39	312,54	0,0015	38-43,	325,46	0,0382	46-48
						40-43			
	288,74	0,0837	36-39	312,15	0,0009	40-43,			43-47,
						38-43	292,59	0,0294	44-47,
				389,40	0,0219	41-43			46-49

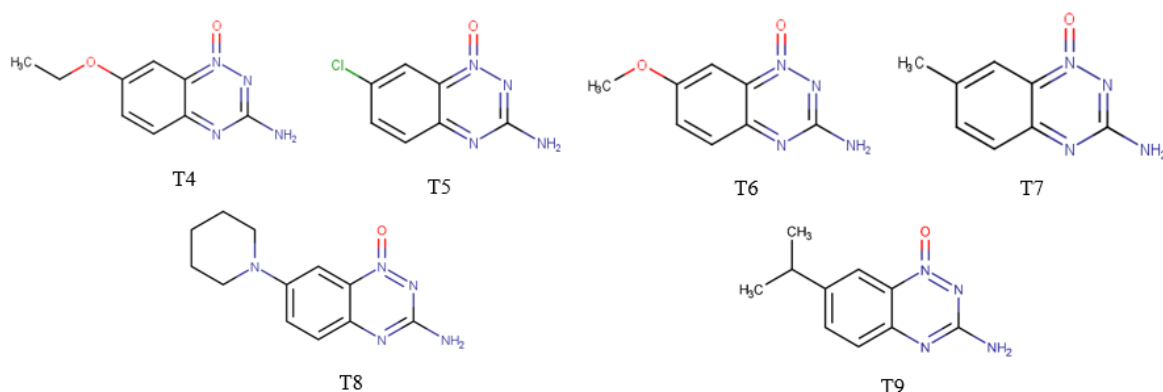


26 pav. T1, T2 ir T3 molekulių (a) HOMO-LUMO energijos lygmenų išsidėstymas ir (b) molekulinės orbitalės.

Preliminarūs skaičiavimai, optimizuojant pagrindines ir sužadintas molekulių būsenas, nepatvirtino anksčiau minėtą hipotezės [24], kad tokias skirtingas junginių savybes nulemia deguonies ciklicizacija. 3 lentelėje matome, kad T2 molekulės dipolinis momentas yra didžiausias, todėl ji su tirpikliu turėtų labiausiai sąveikauti, tačiau matavimų rezultatai parodė, kad skirtingi tirpikliai turi minimalią įtaką šių junginių fotofizikinėms savybėms. Remiantis 4 lentelėje pateiktais duomenimis ir atsižvelgiant į 26 paveiksle pavaizduotus energijos lygmenis, matome, kad T1 molekulės HOMO lygmuo yra išsigimęs, nes dviejų orbitalių energijos beveik sutampa, o tai sąlygoja labai mažą osciliatoriaus stiprį. Skirtingas visų trijų molekulių savybes gali nulemti pačių HOMO-LUMO lygmenų prigimtis. 26 paveikslėlyje galime pastebėti energijos lygmenų siaurėjimą didėjant deguonies atomų skaičiui molekulėse. Eksperimentų rezultatai sutampa su kvantcheminiais skaičiavimais, o 26 pav. (b) dalis patvirtina deguonies atomų aktyvų dalyvavimą.

4.2 Skirtingų pakaitų įtaka tirapazaminų junginių fotofizikinėms savybėms

Antrąją tirapazaminų junginių grupę sudaro molekulės (T4, T5, T6, T7, T8 ir T9), turinčios vieną deguonies atomą ir keičiamus pakaitus C8 pozicijoje. Prie T2 molekulės buvo pridėti skirtingi poliniai pakaitai siekiant tikslingai keisti šio junginio fotofiziką. Šių junginių molekulių schemas yra pavaizduotos 27 paveikslėlyje.

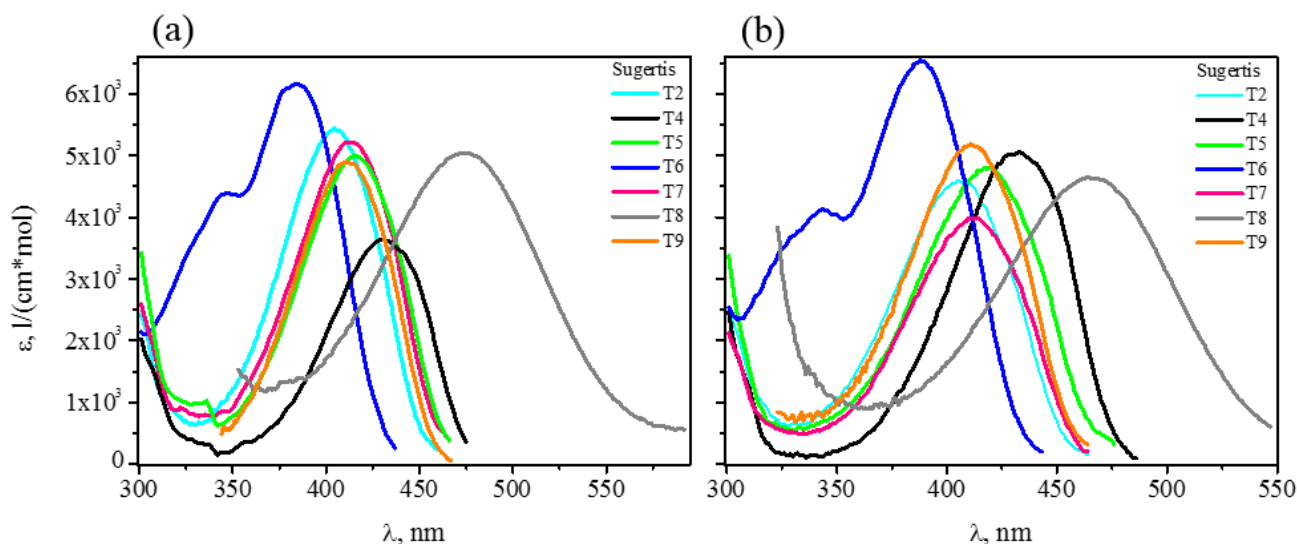


27 pav. Antros tirapazaminų junginių grupės molekulinės struktūros.

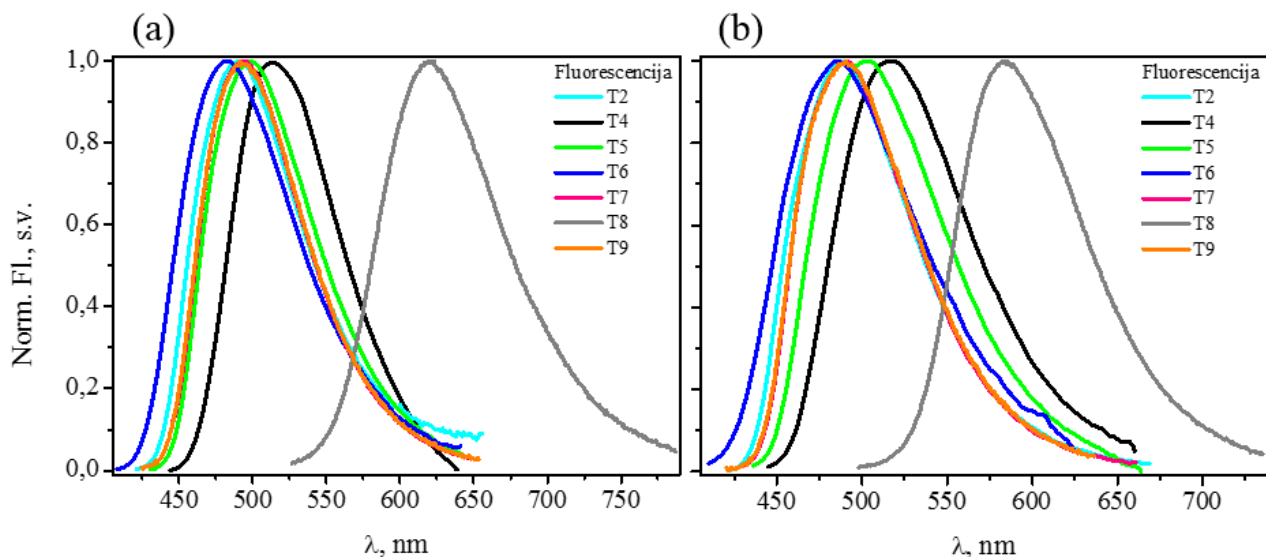
Šios grupės darinių fotofizikinių savybių tyrimai buvo atlikti skirtingo poliškumo tirpikliuose: etilacetate (EAT, $\varepsilon = 6,02$), acetonitrile (ACN, $\varepsilon = 37,5$) bei T4, T7 ir T9 medžiagų savybės papildomai buvo ištirtos 1 v/v% dimetil-sulfoksido DMSO ($\varepsilon = 46,7$) ir vandens H_2O ($\varepsilon = 80,1$) mišinyje. Palyginimui prie antros grupės junginių rezultatų yra pateikti T2 darinio, kuris neturi pakaito, duomenys. Atliktų eksperimentų rezultatai pateikti 5 lentelėje (H_2O^* žymi, kad DMSO koncentracija tirpale buvo padidinta iki 2,5%), o sugerties ir fluorescencijos spektrai pavaizduoti 28 ir 29 paveikslėliuose.

5 lentelė. Antros grupės tirapazaminų junginių fotofizikinės charakteristikos

Medž.	Tripk.	ε , l/(mol*cm)	$\lambda_{sug.}$, nm	$\lambda_{fl.}$, nm	QY, %	τ , ns	f, %	τ_{rad} , ns	τ_{norad} , ns
T2	ACN	5538	405	490	16,22	5,6	100	36,79	6,61
	EAT	4599	406	487	7,42	4,3	100	57,95	4,64
T4	ACN	3640	436	513	43,19	18,7	100	43,30	32,92
	EAT	5002	433	517	26,31	15,5	100	58,91	21,03
	H_2O	4889	445	554	18,62	-	-	-	-
	H_2O^*	5216	445	554	17,16	-	-	-	-
T5	ACN	5332	416	499	29,08	11,6	100	39,89	16,36
	EAT	4825	417	503	16,51	9,3	100	56,33	11,14
T6	ACN	6179	382	482	7,45	3,2	100	42,95	3,46
	EAT	6598	388	486	3,95	2,5	100	63,29	2,60
T7	ACN	5332	416	494	31,89	8,9	100	18,43	17,21
	EAT	4027	412	491	25,15	6,7	100	18,06	10,05
	H_2O	4450	423	532	7,64	3,7	100	48,43	4,01
T8	ACN	4959	477	620	41,21	12,3	93	-	-
						86,9	7		
						19,7	94		
T9	ACN	4779	411	492	24,95	103,1	6	-	-
						8,1	100		
						6,1	100		
	EAT	5017	411	492	20,21	-	-	-	-
	H_2O	4639	424	534	7,04	-	-	-	-



28 pav. T2, T4, T5, T6, T7, T8 ir T9 medžiagų sugerties spektrai (a) acetonitrilo ir (b) etilacetato tirpikliuose.



29 pav. T2, T4, T5, T6, T7, T8 ir T9 medžiagų fluorescencijos spektrai (a) acetonitrilo ir (b) etilacetato tirpikliuose.

Nagrinėjant junginių sugerties spektrus, akivaizdu kad junginys T6 išsiskiria savo spektrine padėtimi, kadangi metoksi grupės pakaitas (CH_3O) nulemia mėlynąjį sugerties spektro poslinkį apie 20 nm ir dar vieną sugerties juostą ties 344 nm abiejuose tirpikliuose lyginant su T2 junginiu. Šis pakaitas padidina šuolio $S_0 \rightarrow S_1$ energiją ir sumažina šuolio osciliatoriaus stiprį. T5, T7 ir T9 junginių chloro (Cl), metilo (CH_3) ir izopropilo (C_3H_7) grupių pakaitai turi minimalią įtaką sugerties spektrams, tai yra nežymiai sumažėja ekstinkcijos koeficientas ir stebimas minimalus raudonasis poslinkis. Tuo tarpu, T4 ir T8 molekulės su etoksi ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) ir piperidinylo ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$) grupių pakaitais sugerties spektrai atitinkamai yra pasislinkę į raudonąją pusę per 30 nm ir 60-70 nm

etilacetate ir acetonitrile. molekulių sugerties spektro raudonąjį poslinkį T6 ir T8 darinių ekstinkcijos koeficientai išauga 1,1 – 1,5 karto, lyginant su pakaito neturinčios T2 molekulės spektru. Bendrai tirpiklio poliškumas turi nedidelę įtaką šių molekulių sugerties spektrams tai yra T4, T5, T6, T8 ir T9 atveju ekstinkcijos koeficientas auga mažėjant tirpiklio poliškumui, o T2 ir T7 atveju stebime atvirkščią procesą.

Iškarto galime pastebėti, kad tyrinėtų antros grupės tirapazaminų junginių elgesys skirtingose aplinkose yra gana netipinis. Pirmiausiai dėl to, kad šios molekulės yra mažos, todėl jų fluorescencija turėtų būti mėlynojoje regimojo šviesos spektro srityje, bet remiantis šio darbo rezultatais jų emisijos spektras yra raudonoje dalyje. Tai gerai matome T8 molekulėje, kurios fluorescencijos maksimumas siekia 620 nm (acetonitrile) ir 584 nm (etilacetate). Antros grupės molekulių fluorescencijos spektro kitimai atitinka sugerties spektrus. Fluorescencijos spektro padėtys kinta nežymiai dėl konkurencijos tarp tirpiklio ir pakaito įtakos. Matome, kad pridėdami skirtingus pakaitus galime plačiai keisti T2 molekulės emituojamą spalvų spektrą nuo 480 nm iki 620 nm. Junginio T6 emisija yra mėlyniausia, taip pat šios molekulės spindulinio gesimo trukmė beveik sutampa su pakaito neturinčios molekulės T2 gesimo trukme, tačiau nespinduliniai gesimai (žr. 5 lentelę) skiriasi du kartus. T6 darinio nespindulinio gesimo trukmė yra per pus mažesnė nei T2, tai reiškia, kad T6 molekulė pasižymi stipria nespindulinės rekombinacijos sparta. Galime pastebėti, kad visų šios grupės junginių spindulinio gesimo trukmės yra artimos T2 dariniui, tačiau nespindulinio gesimo trukmės stipriai kinta. Akivaizdu, kad sužadavimo relaksacijos valdantysis kanalas yra nespindulinis ir lemia šių junginių kvantinio našumo vertes, tad norint gauti reikiamas tirpazaminų savybes reikia ieškoti šios nespindulinės relaksacijos prigimties. Beveik visų šios grupės junginių fluorescencijos gesimo spektrus pavyko aproksimuoti viena eksponente, o tai parodo, kad egzistuoja vienas pagrindinis sužadintos būsenos relaksacijos kanalas. T2, T4, T5 ir T6 medžiagų spindulinio gesimo trukmės yra ilgesnės mažiau poliniame tirpiklyje, tai rodo, jog etilacetate efektyvesnis yra nespindulinio gesimo kanalas. T8 molekulės emisija yra raudoniausia iš visų šios grupės junginių taip pat jos gesimą pavyko aproksimuoti dviem eksponentėmis, o tai rodo, kad egzistuoja sudėtingesnis sužadintos būsenos relaksacijos procesas. Viena iš priežasčių, kodėl egzistuoja tokios ilgos gyvavimo trukmės yra ta, kad po sužadavimo vyksta stipri branduolių reorganizacija, kurios metu pasislenka potencialinės kreivės..

Dar vienas netipinis nagrinėtų tirapazaminų molekulių bruožas yra tas, kad jų kvantinis našumas išauga polinėje aplinkoje. Dažniausiai užfiksuojamas atvirkščias reiškinys, būdingas CT medžiagoms, kada molekulių našumas didėja mažėjant tirpiklio poliškumui. Tirtų molekulių šuolio prigimtį galime sieti su $n \rightarrow \pi^*$ tipo šuoliu, o tai leidžia numanyti, kad našumai labiau išauga būtent poliniame tirpiklyje. Visi šios grupės junginiai pasižymi našia fluorescencija, o ypač išsiskiria T4 ir T8 junginiai: dėl atitinkamų $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ir $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$ pakaitų acetonitrilo tirpiklyje jų našumai siekia

43% ir 41%, kurie yra 2,6 karto didesni nei T2 molekulės. T5, T7 ir T8 molekulių našumai išaugo dėl skirtingų pakaitų įtakos ir atitinkamai yra 29%, 32% bei 25%. T6 molekulės, kurios pakaitas yra CH_3O , užfiksuotas kvantinis našumas yra beveik per pus mažesnis nei T2 junginio. Tai dar kartą parodo, kad tirapazaminų junginių fotofizikines savybes galime kontroliuoti parenkant atitinkamus pakaitus.

Norint išsiaiškinti platesnes tirapazaminų pritaikymo galimybes (pavyzdžiui, fermentinių reakcijų stebėjimas) T4, T7 ir T9 medžiagų savybės buvo ištirtos 1 v/v% dimetil-sulfoksido DMSO ir vandens H_2O mišinyje. Šiame mišinyje stebimas visų trijų molekulių sugerties spektrų poslinkis į raudonąją sritį apie 10 nm, lyginant su intensyviausiomis sugerties vertėmis mažiausiai poliniame tirpiklyje. T7 darinio ekstinkcijos koeficientas išaugo 1,1 karto, o T4 ir T9 ekstinkcijos beveik tiek pat kartų sumažėjo, vertinant pagal etilacetate gautas vertes. Kaip ir sugertis, šių trijų molekulių fluorescencijos spektrai taip pat atsidūrė ilgabangėje spektro srityje ir atitinkamai yra 554 nm, 532 nm ir 534 nm. Stebėtina tai, kad našumai T4, T7 ir T9 sumažėjo 2 – 4 kartus lyginant su gautais acetonitrilo tirpiklyje ir atitinkamai yra 19%, 8% bei 7%, o tai reiškia, kad fluorescencija yra nugesinama stipriai polinėje aplinkoje. Tačiau tokie našumai yra pakankami, kad būtų galima naudoti šiuos junginius fermentinių reakcijų stebėjimui. DMSO koncentraciją mišinyje galima didinti iki 2,5%, nes šioje aplinkoje vis dar yra palankios sąlygos, kad vyktų fermentinės reakcijos. Todėl įvertintas T4 medžiagos našumas tokiam mišinyje, kuris yra 17%. Matome, jog DMSO tirpiklio koncentracijos didinimas šiuo atveju našumo didėjimui įtakos neturėjo.

Skirtingas tirapazaminų junginių fotofizikines savybes nulemia skirtingi pakaitai, esantys C8 pozicijoje. Pasirenkant tinkamus pakaitus būtų galima geriau kontroliuoti molekulių savybes, o tai praplėstų jų pritaikymo galimybes. Taip pat norint detaliai išsiaiškinti, kodėl pakaitai lemia kvantinio našumo išaugimą arba sumažėjimą, būtina atlikti teorinius skaičiavimus.

IŠVADOS

1. Pirmos grupės tirapazaminų T2 ir T3 junginių raudonasis poslinkis į 405 nm ir 485 nm yra susijęs su dominuojančių šuolių, dėl nepadalytos elektronų poros, prigimties kitimu.
2. Tirapazaminų junginių, turinčių vieną deguonies atomą N1 pozicijoje, bet neturinčių pakaitų C8 pozicijoje, našumas išauga iki 7% (etilacetate) ir iki 16% (acetonitrile) lyginant su junginio be deguonies atomų ir su junginio turinčiu du deguonies atomus našumais.
3. Tirtų junginių fluorescencijos kvantinės išeigos išaugimas didesnio poliškumo tirpiklyje (acetonitrile) siejamas su $n \rightarrow \pi^*$ šuolio prigimtimi.
4. Tirapazaminų junginių, turinčių vieną deguonies atomą N1 pozicijoje, fotofizikines savybes galima valdyti naudojant skirtingus pakaitus C8 pozicijoje bei nespindulinės rekombinacijos pagalba.
5. Skirtingų pakaitų pagalba C8 tirapazamino pozicijoje, galime keisti Junginio T2 emisijos spalvas plačiame 480-620 nm intervale.
6. Junginys T4 su pakaitu $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ rodo 43% (acetonitrilo tirpiklyje) ir 18% (1 v/v% dimetil-sulfoksido ir vandens mišinyje) fluorescencijos kvantinį našumą, todėl labiausiai tinka fermentinių reakcijų stebėjimui vandenyje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] J. M. Brown, SR 4233 (Tirapazamine): A new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours, *Br. J. Cancer*, 67(6), 1163–1170, (1993).
- [2] M. J. Done ir kiti, Tumor-specific, schedule-dependent interaction between tirapazamine (SR 4233) and cisplatin, *Cancer Res.*, 53(19), 4633–4636, (1993).
- [3] W. A. Denny ir kiti, Tirapazamine: a bioreductive anticancer drug that exploits tumour hypoxia, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 9(12), 2889–2901, (2000).
- [4] D. Rischin ir kiti, Journal of clinical oncology: Tirapazamine , cisplatin and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02 . 02 , HeadSTART): A phase III trial of the trans-tasman radiation oncology group, 28(18), 2989–2996, (2010).
- [5] J. Clayden ir kiti, *Organic Chemistry*, Oxford university press, (2012).
- [6] A. Undzėnas, *Organinių junginių fotonikos pagrindai*. Vilnius, (1999).
- [7] M. S. Silberberg, *Principles of general chemistry*, McGraw-Hill, (2007)
- [8] E. T. Stewart, *Quantum Chemistry*, University science books, (1970).
- [9] V. Gulbinas, *Šviesos sukelti molekuliniai vyksmai ir jų lazerinė spektroskopija*, TEV, (2008).
- [10] S. Tim, “Organic chemistry with a Biological Emphasis,” *Chem. Libr.*, 2, (2019).
- [11] I. Fleming, *Molecular orbitals and organic chemical reactions*, Wiley, (2010).
- [12] P. Hofmann, *Solid State Physics*, Wiley-VCH, (2008).
- [13] A. Köhler ir kiti, *Electronic processes in organic semiconductors*, Wiley-VCH, (2015).
- [14] B. Valeur, *Molecular fluorescence principles and applications*, Wiley-VCH, (2001).
- [15] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, (2006).
- [16] A. Sharma, *Introduction to fluorescence spectroscopy*, Wiley, (1999)
- [17] J. C. Mason ir kiti, Heterocyclic N-oxides. Part VI. Synthesis and nuclear magnetic resonance spectra of 3-aminobenzo-1,2,4-triazines and their mono- and di-N-oxides, *J. Chem. Soc. B Phys. Org.*, 911, (1970).
- [18] S. B. Reddy ir kiti, Tirapazamine: A novel agent targeting hypoxic tumor cells, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(1), 77–87, (2009).
- [19] J. M. Brown ir kiti, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437–447, (2004).
- [20] W. A. Denny, Prospects for hypoxia-activated anticancer drugs, *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 4(5), 395–399, (2004).
- [21] M. P. Hay ir kiti, Tricyclic [1,2,4]triazine 1,4-dioxides as hypoxia selective cytotoxins, *J. Med. Chem.*, 51(21), 6853–6865, (2008).
- [22] X. Shen ir kiti, Exploiting the inherent photophysical properties of the major tirapazamine metabolite in the development of profluorescent substrates for enzymes that catalyze the

- bioelective activation of hypoxia-selective anticancer prodrugs, *J. Org. Chem.*, 83(6), 3126–3131, (2018)
- [23] J. S. Poole ir kiti, Photochemical electron transfer reactions of tirapazamine, *Photochem. Photobiol.*, 75(4), 339–345, (2007).
- [24] X. Shi ir kiti, Time-resolved spectroscopy of the excited singlet states of tirapazamine and desoxytirapazamine, *J. Phys. Chem. A*, 109(8), 1491–1496, (2005).
- [25] PerkinElmer pardavėjo internetinis puslapis: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_LAMBDA8509501050.pdf. [Žiūrėta: 2020.04.28]
- [26] J. G. Highfield, Determination of the absolute quantum efficiency of luminescence of solid materials employing photoacoustic spectroscopy, (1980).
- [27] HORIBA pardavėjo internetinis puslapis: https://www.horiba.com/en_en/applications/materials/material-research. [Žiūrėta: 2020.04.23].
- [28] I. Science ir kiti, Time correlated single-photon counting (tcspc) using laser excitation, (2014)
- [29] G. Boas, Time-correlated single-photon counting on a chip, *Biophotonics Int.*, 14(11), 15–16, (2007).
- [30] HAMAMATSU pardavėjo internetinis puslapis: <https://www.hamamatsu.com/resources>. [Žiūrėta: 2020.04.28]

Kamilė Tulaitė

Tirapazaminų junginių optinių savybių tyrimas

Vienas iš priešvėžiniams vaistams gaminti tinkamų citotoksinų klasės junginių yra tirapazaminas, kuris pasižymi selektyviu elgesiu hipoksinėje aplinkoje. Nors ir medicinos srityje šis junginys yra plačiai ištirtas, tačiau detalių fotofizikinių savybių tyrimų yra mažai. Gilesnės žinios apie tirapazaminų fotofizines savybes praplėstų jų pritaikymo galimybes, vėžio gydymo stadijų, fermentinių reakcijų vaizdinime bei stebėjime.

Šio darbo tikslas buvo ištirti deguonies atomų skaičiaus ir skirtingų pakaitų įtaką tirapazaminų junginių fotofizikinėms savybėms.

Šiame darbe tirtų tirapazaminų junginiai buvo suskirstyti į dvi grupes. Pirmoji grupė atspindi deguonies atomų skaičiaus įtaką tirapazaminų fotofizikinėms savybėms, o antroji – skirtingų pakaitų įtaką. Nustatytos pagrindinės abiejų tirapazaminų darinių grupių fotofizikinės savybės atlikus sugerties ir fluorescencijos matavimus, apskaičiavus fluorescencijos kvantines išeigas bei įvertinus gesimo trukmių vertės skirtingo poliškumo tirpikliuose. Pirmos grupės junginių elgesiui paaiškinti buvo atlikti kvantcheminiai skaičiavimai.

Nustatėme, kad pirmos grupės tirapazaminų junginių atliktų matavimų rezultatai dera su kvantcheminių skaičiavimų rezultatais, o T2 ir T3 molekulių stebimas raudonasis poslinkis į 405 nm ir 485 nm yra susijęs su dominuojančių šuolių dėl nepadalytos elektronų poros, prigimties kitimu. Taip pat T2 molekulės našumas išauga iki 7% (etilacetate) ir iki 16% (acetonitrile) lyginant su T1 ir T3 darinių našumais. Junginio T2 fotofizikines savybes galima valdyti naudojant skirtingus pakaitus bei nespindulinę rekombinaciją. Taip pat keičiant pakaitus galima keisti šio darinio emisijos spalvas plačiame 480-620 nm intervale. Bendras abiejų grupių junginių fluorescencijos kvantinės išeigos išaugimas didesnio poliškumo tirpiklyje (acetonitrile) siejamas su $n \rightarrow \pi^*$ šuolio prigimtimi. Junginys T4 su etoksi grupės pakaitu pademonstravo 43% (acetonitrilo tirpiklyje) ir 18% (1 v/v% dimelitisulfoksido ir vandens mišinyje) fluorescencijos kvantinį našumą, todėl labiausiai tinka fermentinių reakcijų stebėjimui vandenyje.

SUMMARY

Kamilè Tulaitè

Photophysical study of tirapazamine based compounds

One of the main compounds of the cytotoxin class suitable for cancer treatment is tirapazamine, which exhibits selective behavior in a hypoxic environment. The use of tirapazamine derivatives in medicine has been widely investigated for several decades. However, the photophysical examination of these compounds remains scarce. In order, to successfully understand their usability, more studies of tirapazamine optical properties need to be performed.

The aim of this study was to investigate the influence of the number of oxygen atoms and different substituents on the photophysical properties of tirapazamine compounds.

The tirapazamine compounds studied in this work were divided into two groups. The first group was meant to determine how oxygen atoms affect tirapazamine photophysical properties and the second – the influence of different substituents. Various characterization techniques, such as steady-state absorption and fluorescence and time-resolved fluorescence spectroscopy, were employed in solvents of different polarity. Theoretical calculations were performed to explain the behavior of the first group of compounds.

We found that the experimental results of the first group of tirapazamine compounds are consistent with the results of theoretical calculations, and the observed redshifts of T2 and T3 molecules at 405 nm and 485 nm are related to changes in the nature of dominant transition due to undivided electron pair. Also, the quantum yield of the molecule T2 increases to 7% (ethyl acetate) and up to 16% (acetonitrile) compared to the quantum yield of T1 and T3 derivatives. The photophysical properties of the compound T2 can be controlled by using different substituents and non-radiation recombination. Due to the substituents we can change the emission color of this derivative in a wide range of 480-620 nm. The overall increase in fluorescence quantum yield of both groups in a higher polarity solvent (acetonitrile) is related to the nature of the $n \rightarrow \pi^*$ transition. Compounds T4 with an ethoxy group substituent showed a quantum efficiency of 43% (acetonitrile) and 18% (1 v/v% dimethyl sulfoxide/water mixture), making it the most suitable for monitoring enzymatic reactions in water.