

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Fotonikos ir nanotechnologijų institutas

Gailė Litvaitytė

**NATŪRALIŲ ANTIOKSIDANTŲ POVEIKIO CHLORINO E6 FOTOCHEMINIAMS
VIRSMAMS TYRIMAS SKIRTINGO pH VANDENINĖSE MODELINĖSE TERPĖSE**

MAGISTRANTŪROS STUDIJŲ BAIGIAMASIS DARBAS

Fotonikos ir nanotechnologijų magistro studijų programa

Studentas

Gailė Litvaitytė

Leista ginti

2022-05-18

Darbo vadovas

Prof. dr. Saulius Bagdonas

Instituto atstovas

Prof. dr. Ramūnas Aleksiejūnas

Vilnius 2022

TURINYS

Santrumpos	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Arbata.....	7
1.2. Arbatoje esantys antioksidantai ir jų poveikis vėžiui	7
1.3. Arbatoje esantys antioksidantai: katechinai.....	8
1.4. Soret ir Q juostos	9
1.5. Agregatai.....	9
1.6. Chlorinas e6	10
1.7. Singuletinis deguonis ($^1\text{O}_2$).....	11
1.8. Fotodinaminė terapija (FTD)	12
1.9. Medžiagos fotolizė.....	12
1.10. Askorbo rūgštis	13
1.11. Jaučio serumo albumino tirpalas	13
2. TYRIMUI NAUDOJAMA ĮRANGA	14
2.1. UV-Vis spektroskopija	14
2.2. Adityvumo principas.....	15
2.3. Mėlynas diodas	15
3. EKSPERIMENTO METODIKA	16
3.1. Eksperimentuose naudoti buferiai:	16
3.2. Matcha žaliosios arbatos ekstrakto paruošimas	16
3.3. Chlorino e6 tirpalo paruošimas.....	16
3.4. Jaučio serumo albumino tirpalo paruošimas.....	16
3.5. Askorbo rūgšties tirpalo paruošimas.....	17
3.6. Eksperimento tirpalų pagaminimas:	17
3.7. Medžiagų švitinimas	18
4. REZULTATAI.....	20

5. APTARIMAS.....	37
IŠVADOS.....	39
Santrauka	40
Summary.....	41
LITERATŪRA	42

Santrumpos

$^1\text{O}_2$ – Singuletinis deguonis.

Ce6 – Chlorinas e6.

EC – Epikatechinas.

ECG – -Epikatechino galatas.

EGC – Epigalokatechinas.

EGCG – Epigalokatechino galatas.

FDT – Fotodinaminė terapija.

JSA – Jaučio serumo albumino tirpalas.

ROS – Reaktyviosios deguonies formos ir atmainos.

SOG – Singuletinio deguonies generatorius.

ŽSA – Žmogaus serumo albuminas

ĮVADAS

Fotodinaminė terapija (FDT) yra sparčiai vystomas vėžio bei kitų ligų gydymo būdas (Algorri, Ochoa ir kt., 2021).

Ji yra paremta reaktyviosios deguonies rūšies (ROS) aktyvacija ligos atsiradimo vietoje.

Procedūra vyksta taip: fotosensibilizatorius suleidžiamas į paciento kūną. Tada vėžiniuose audiniuose susikaupia ši medžiaga ir yra švitinama spinduliuote, kurios bangos ilgis parenkamas taip, kad atitiktų sensibilizatoriaus absorbcijos juostą ir galėtų prasiskverbti pro žmogaus organus ir pasiekti vėžinius audinius. Sužadintas fotosensibilizatorius reaguoja su $^3\text{O}_2$ ir gaunamas $^1\text{O}_2$ kuris sukelia vėžinių ląstelių apoptozę, pažeidžia mikrovaskuliaciją ir sukelia vietinę uždegiminę reakciją. Klinikiniai tyrimai rodo, kad FDT gali būti itin veiksminga, ypač esant ankstyvos stadijos navikams (Agostinis ir kt., 2011).

Chlorinas e6 (Ce6) plačiai naudojamas FDT, jo absorbcijos juostos yra ties 400–700 nm. Tai nėra stabili medžiaga, bet jos tamsinis toksiškumas yra minimalus (Irmania ir kt., 2020).

Antioksidantai, pavyzdžiui, vitaminas C arba katechinai, yra randami daugelyje maisto produktų. Tyrimai rodo, kad antioksidantai yra labai svarbūs palaikant žmogaus imuninės sistemos homeostazę (Thyagarajan, Sahu, 2018)

Gausus antioksidantų šaltinis yra žalia arbata. Matcha ir kitos jos rūšys yra populiarus gėrimas daugelyje pasaulio šalių. Arbatoje esantys katechinai yra natūralūs antioksidantai.

Taip pat iš publikacijų pastebėta, kad FDT kartu su antioksidantų vartojimu yra daug efektyvesnė slopinant vėžinių ląstelių plitimą ir navikų atsinaujinimą, nei FDT be antioksidantų vartojimo (Raish ir kt., 2010).

Viename iš tyrimų buvo dvi tiriamų pelių grupės, kurioms buvo išgydyti navikai, pirmoje grupėje naudojant FDT+EGCG, antroje tik FDT. Pirmoje grupėje po 30 dienų pas 80% gydytų pelių naujų navikų neatsirado, o kur buvo naudota tik FDT, po 30 dienų tik 50 % pelių neatsirado naujų navikų (Ferrario ir kt., 2011).

Tačiau, kad būtų galima fotosensibilizatoriaus ir antioksidantų mišinius saugiai naudoti žmonių gydymui, pirma reikia išsiaiškinti, kaip šios medžiagos reaguoja į skirtingas pH terpes ir baltymus, kaip chlorinas e6 reaguoja su žalioje arbatoje esančiais antioksidantais. Ir ar katechinai tiesiogiai veikia chlorino e6 fotochemines reakcijas.

Eksperimento tikslas – ištirti chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto spektrines savybes skirtingo pH buferinėse vandeninėse terpėse, taip pat ištirti, kaip keičiasi šios spektrinės savybės pridėjus baltymo arba kitokio antioksidanto, ir koks yra šviesos poveikis tiriamosioms medžiagoms.

Darbo uždaviniai:

- Išmatuoti chlorino e6 ir Matcha žaliosios arbatos ekstrakto, JSA ir askorbo rūgšties tirpalų sugerties spektrinius pokyčius trejose skirtingose buferinėse terpėse.
- Ištirti, spektrinius pokyčius, sumaišius chloriną e6 ir Matcha arbatos ekstraktą, ir kaip jie keičiasi į tirpalą pridėjus jaučio serumo albumino ir askorbo rūgšties.
- Ištirti, ar katechinai apsaugo chloriną e6 nuo blukimo, kai bandiniai yra veikiami mėlyno diodo spinduliuote, vandeninėse terpėse ir modelinėse biologinėse terpėse – į tirpalus įlašinus JSA.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Arbata

Arbata yra gėrimas, gaminamas iš lapų, kurie yra nuskinti nuo atogrąžų visžalio augalo *Camellia sinensis*. Dėl patrauklios ir ryškios spalvos, skonio, aromato ir naudos sveikatai, arbata užima antrąją vietą gausiausiai vartojamų gėrimų pasaulyje sąrašė: vienam gyventojui tenka apytiksliai 120 ml arbatos per dieną. Kiekvienais metais pagaminama ir suvartojama maždaug trys milijardai kilogramų arbatos. Juodoji arbata yra populiariausia, jos suvartojama apie 76–78 %, sek.anti pagal populiarumą yra žalioji arbata – 20–22 %, mažiausiai vartojama ulong arbata <2 % (McKay ir Blumberg, 2002). Juodoji arbata dažniausiai vartojama Šiaurės Amerikoje, Europoje ir Šiaurės Afrikoje, o žalioji ir ulong – Azijoje.

Matcha arbata yra miltelių pavidalo, ryškios žalios spalvos, daugiausia auginama Japonijoje. Matcha yra pagaminama iš šešėlyje užaugintų aukščiausios kokybės arbatos lapų. Prieš arbatos sumalimą arbata yra vadinama Tencha.

Matcha atsirado Kinijoje Tangų dinastijos laikais (618 to 907 AD).

Augantis vakarų pasaulio susidomėjimas „sveikatingumo produktais“ paskatino Matcha populiarumo augimą ne tik vakaruose, bet ir visame pasaulyje.

2016 m. pasaulinės Matcha rinkos dydis buvo vertinamas 2,62 mlrd. JAV dolerių ir tikimasi, kad 2017–2025 m. metinis augimo rodiklis (CAGR) padidės 7,6 % (Grand view research, 2017).

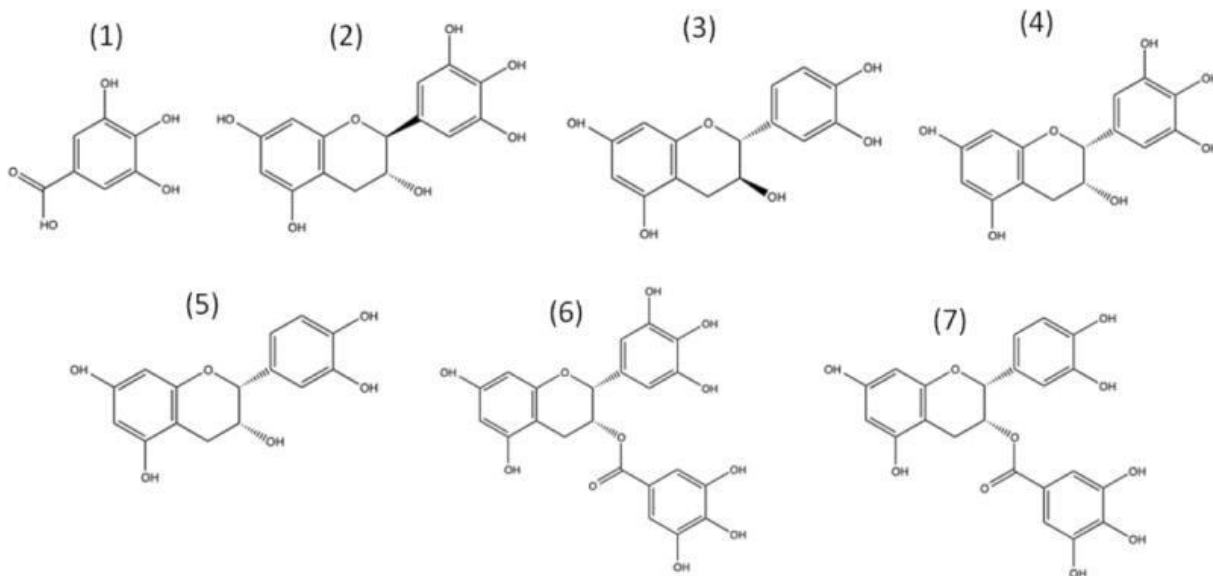
1.2. Arbatoje esantys antioksidantai ir jų poveikis vėžiui

Epidemiologiniai tyrimai rodo, kad arbatos vartojimas turi prevencinį poveikį vėžinių ląstelių atsiradimui (Bushman, 1998; Hollman ir kt., 1999; Yang ir kt., 2002). Sumažėjusi vėžio rizika buvo įrodyta gyvūnų modeliuose, stebint, kaip arbatos vartojimas veikia odos, stemplės, skrandžio, plaučių, kepenų, plonosios žarnos, prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės vėžį bei gleivinės leukoplakiją (lėtinė uždegiminė degeneracinė gleivinės liga) (McKay ir Blumberg, 2002, Yang ir kt., 2000).

Prevenciniai vėžio tyrimai buvo atlikti Amerikos vidurio vakaruose su Ajovos valstijoje gyvenančiomis moterimis, šie tyrimai taip pat patvirtina arbatos gėrimo naudą sveikatai, siekiant užkirsti kelią vėžio vystymuisi (Zheng ir kt., 1996).

1.3. Arbatoje esantys antioksidantai: katechinai

Žaliojoje arbatoje didžiausios koncentracijos fenolio junginiai yra galo rūgštis (GA), (-)-galokatechinas (GC), (+)-katechinai (C), (-)-epikatechinai (EC), (-)-epigalokatechinai (EGC), (-)-Epikatechino galatas (ECG), (-)-Epigalokatechin galatas (EGCG).



Pav. 1.3. Pagrindinių žaliosios arbatos katechinų struktūros: (1) Galo rūgštis, (2)(-)-galokatechinas, (3) (+)-katechinai, (4) (-)-epigalokatechinai, (5) (-)-epikatechinai, (6) (-)-Epikatechino galatas, (7) (-)-Epigalokatechingalatas. Paimta iš: Sarah C. ir kt., 2013.

Arbatoje daugiausia pagal svorį yra EGCG (Baptista ir kt., 1998). Žaliojoje arbatoje yra didžiausia polifenolių koncentracija, lyginant su fermentuotomis arbatomis (Lin ir kt., 2003).

EGCG gali paveikti su vėžiu susijusius įvairius membranos receptorių (Singh ir Katiyar, 2013) arba branduoliui signalizuojančius receptorių (Shankar ir kt., 2012), slopina naviko ląstelių dauginimąsi ir metastazes. Literatūroje taip pat teigiama, kad EGCG moduliuoja signalizuojančias kaskadas, kad sukeltų užprogramuotą ląstelių mirtį, aktyvuodamas baltymų kinazę (Zhu ir kt., 2017).

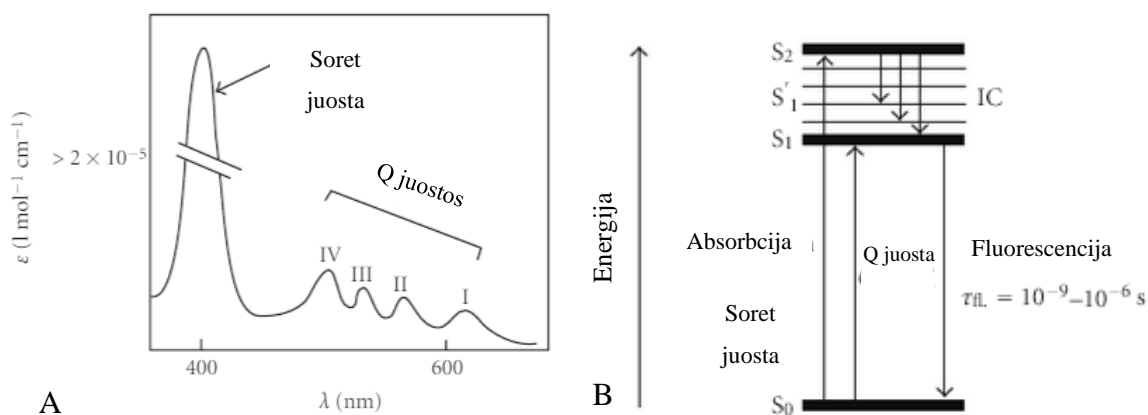
Polifenolių kiekis žaliojoje arbatoje priklauso nuo vandens temperatūros ir to, kiek laiko arbata bus virinama aukštoje temperatūroje (Baptista ir kt., 1998). Tinkama vandens temperatūra itin svarbi arbatos gėrimo ruošimui (Lin ir kt., 2010).

Nustatyta, kad optimali vandens temperatūra naudojama žaliosios arbatos gaminimui yra ~ 85 ° C, tada EGCG kiekis arbatoje buvo didžiausias - 50,69 mg / 100 ml. Pastebėta, kad per pirmąsias 3–5 minutes nuo arbatos užpylimo 85 ° C temperatūros vandeniu, greitai padidėjo katechinų kiekis arbatoje, o pailgėjus virimo laikui jų pradėjo mažėti (Saklar ir kt., 2015).

Žaliosios arbatos polifenoliai gali veikti kaip prooksidantai, generuodami vandenilio peroksidą (Long ir Lan, 1999).

Arbatoje esančių polifenolių kiekio priklausomybę nuo temperatūros galima pamatyti ir kitose žaliosiose arbatose. „Uncle Wandam's Molasses Color Laboratory“ atliktame tyrime buvo tikrinta „Misugi“ regiono žalioji arbata ir palygintas keturių katechinų eliucijos kiekio santykis esant 40° C ir 80° C. Buvo pastebėta, kad arbatoje, užpiltoje karštesniu vandeniu (80° C), buvo išskirta daugiau katechinų (EC: 0,65 / 0,40 = 1,63, ECG: 0,70 / 0,30 = 2,22, EGC: 2,40 / 2,10 = 1,14, EGCG: 3,25 / 1, 10 = 2,95), nei arbatoje, užpiltoje šaltesniu vandeniu (40° C) (Wandam, 2020).

1.4. Soret ir Q juostos



Pav. 1.4. (A) Tipinis porfirino sugerties UV-vis spektras ties 300-700 nm, (B) Modifikuota Jablonskio diagrama atvaizduojanti elektrono energijos virsmus porfirine. Adaptuota iš Leanne B. Josefsen, 2008.

Porfirino Soret juosta kyla iš elektrono kitimo iš nesužadintos būsenos į antrą sužadintą būseną ($S_0 \rightarrow S_2$). O Q juosta atsiranda dėl elektrono kitimo į pirmą sužadintą būseną ($S_0 \rightarrow S_1$) (Josefsen, 2008).

1.5. Agregatai

Batochrominis poslinkis gali rodyti J agregatų susidarymą (J dėl Jelly, vienas iš pirmųjų mokslininkų, kurie ištyrė šiuos sugerties juostos pasislinkimus į ilgabangę pusę). Viena iš priežasčių hipsochrominio poslinkio gali būti H agregatų susidarymas (H dėl angliško žodžio *hypsochromic*, sugerties juostos pasislinkimas į trumpabangę pusę) (Hestand, Spano, 2018).

J ir H agregatų spektroskopiniai skirtumai tradiciškai siejami su eksitonų erdvine priklausomybe nuo tarpmolekulinės elektrostatinės sąveikos. H-agregatuose pereinamieji

dipoliniai momentai išsidėsto *side-by-side*, paraleliai, todėl atsiranda spektrinis poslinkis į trumpabangę pusę, o J-agregatų pereinamieji dipoliniai momentai išsidėsto *head-to-tail*, todėl atsiranda spektrinis poslinkis į ilgabangę pusę (Hestand, Spano, 2015).

1.6. Chlorinas e6

Organinėje chemijoje chlorinai yra tetrapiroalai (Moss, 1988).

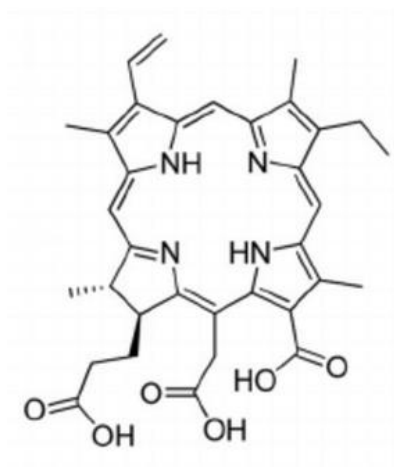
Kaip galima spręsti iš pavadinimo, tetrapiroalus sudaro keturi pirolo žiedai, linijiniu arba cikliniu būdu sujungti metino tilteliais (Layer, Jahn ir kt., 2010).

Chlorino pavadinimas kilęs iš chlorofilo. Chlorofilai yra magnio turintys chlorinai ir aptinkami kaip fotosintetinantys pigmentai chloroplastuose.

Įvairūs sintetinių chlorinų tipai, tokie kaip m-tetrahidroksifenilchlorinas (mTHPC) ir mono-L-aspartilo chlorinas e6, veiksmingai naudojami eksperimentinėje fotodinaminėje terapijoje kaip fotosensibilizatoriai (Spikes, 1990).

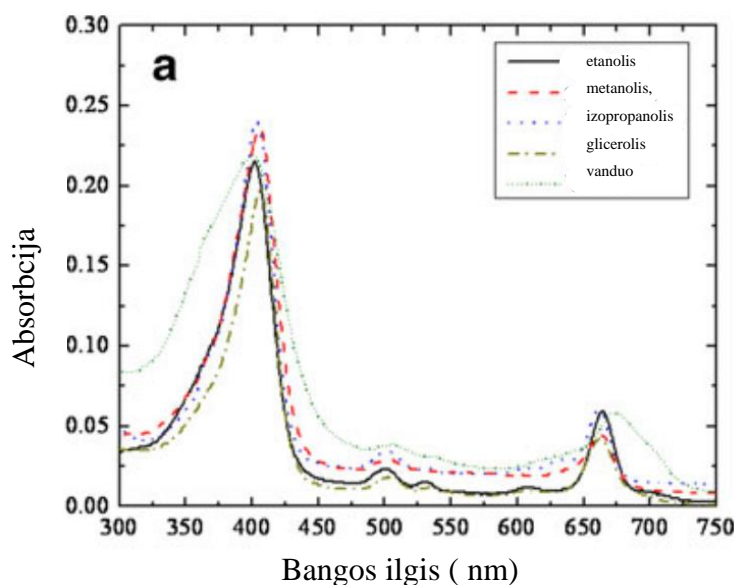
Chlorinas e6 yra antros kartos fotosensibilizatorius, plačiai naudojamas klinikinėje praktikoje ir biofarmacijos tyrimuose (Torkhovskaya, Kostryukova, 2021).

Skirtumas tarp pirmos ir antros kartos fotosensibilizatorių yra toks, kad lyginant su pirmosios kartos fotosensibilizatoriumi, antrosios kartos fotosensibilizatoriaus sudėtis ir struktūra yra paprastesnė, o absorbcijos spektras siauresnis ir audinių selektyvumas yra specifiškesnis (J. Kou, D. Dou ir kt., 2017)



Pav. 1.6.1. Chlorino e6 struktūra adaptuota iš Haitao Guo ir kt., 2011.

Nustatyta, kad didžiausias sugerties intensyvumas buvo šarminės terpės atveju. Taip pat pastebėta, kad mažėjant tirpalo pH, slenkasi Q(I) sugerties smailės maksimumas nuo 645 nm iki 660 nm (Jain ir kt., 2021).



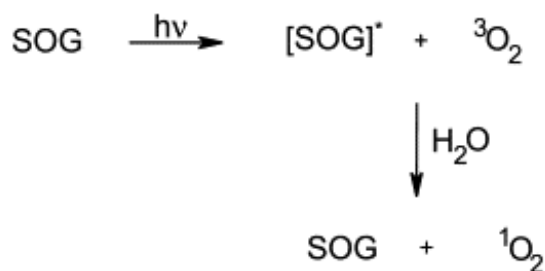
Pav. 1.6.2. Chlorino e6 sugerties UV-vis spektras ties 300-750 nm. Skirtingose terpėse: etanolio, metanolio, izopropanolio, glicerolio ir vandenyje. Adaptuota iš Paul, Heng and Chan, 2013.

1.7. Singuletinis deguonis ($^1\text{O}_2$)

Singuletinis deguonis yra gaunamas fotocheminiu, terminiu, cheminiu arba fermentiniu būdu aktyvinant O_2 . Singuletinis deguonis (sutrumpintai - $^1\text{O}_2$) reiškia sužadintą O_2 būseną, kai vieno iš nesuporuotų elektronų sukinyš pakeičiamas į priešingą pusę lyginant su nesužadintoje būsenoje esančiais elektronais (Hrycay ir Bandiera, 2015).

Singuletinis deguonis nėra laisvasis radikalas, tačiau $^1\text{O}_2$ gali susidaryti vykstant kai kurioms laisvųjų radikalų reakcijoms ir gali sukelti laisvųjų radikalų susidarymą (Maldred, 2009). Svarbiausias singuletinio deguonies generatoriaus (SOG) panaudojimas yra fotodinaminėje terapijoje (FDT).

Singuletinio deguonies generatorius yra fotoaktyvi medžiaga, kurios elektronai, šviesos sužadinti, pereina į aukštesnę energijos lygmenį, reaguoja su tripletiniu deguonimi ($^3\text{O}_2$) perduoda jam energiją ir $^3\text{O}_2$ pereina į sužadintą būseną, kuri yra labai reaktyvi, – singuletinį deguonį ($^1\text{O}_2$) (Pav. 1.7.) (Gregory, 2003).



Pav. 1.7. Sužadintas singuletinio deguonies generatorius (SOG) perduoda energija tripletiniui deguoniui (${}^3\text{O}_2$), kad grįžtų į nesužadintą būseną ir ${}^3\text{O}_2$ pereina į sužadintą būseną -singuletinį deguonį (${}^1\text{O}_2$) Iš Gregory, 2003.

1.8. Fotodinaminė terapija (FTD)

Fotodinaminės terapijos (FDT) terminas buvo suformuotas, daugiau nei prieš 100 metų. Hermann von Tappeiner panaudojo terminą „fotodinaminė reakcija“ tyrinėjant mikroorganizmus. Kai jo studentas Oscaras Raabas pademonstravo oranžinio akridino tirpalo, veikiamo šviesa, toksišką poveikį klumpelėms (iš lot. *Paramecium*). Oranžinio akridino tirpalo toksiškumas klumpelėje priklausė tiek nuo dažų koncentracijos, tiek nuo apšvietimo intensyvumo (Eber ir kt., 2021). Dvidešimto amžiaus pradžioje fotodinaminė terapija buvo pradėta taikyti gydant infekcijas (Dai, Huang, 2009), odos ligas ir tam tikrų rūšių vėžinius susirgimus (P. Agostinis, Berg, 2011). Selektyvus fotosensibilizatoriaus aktyvavimas, tam tikro bangos ilgio šviesa, užtikrina tikslesnę vaisto dozavimo kontrolę, lyginant su įprastais sisteminiiais vaistais ir tai sumažina galimą šalutinį poveikį. (Henderson, Dougherty, 1992).

JAV maisto ir vaistų administracija (FDA) nuo 2018 yra patvirtinus keletą fotosensibilizuojančių medžiagų tam tikroms vėžio formoms ar priešvėžinėms ligoms gydyti (Baskaran, Lee ir kt., 2018)

Pavyzdžiui, tokia medžiaga kaip natrio porfimeras (Photofrin). Jis yra suaktyvinamas raudona šviesa. FDA patvirtino jo naudojimą pacientams, sergantiems tam tikros rūšies stemplės arba plaučių vėžiu gydyti.

1.9. Medžiagos fotolizė

Medžiagos fotolizė gali būti apibrėžiama kaip medžiagos kietoje, pusiau kietoje arba skystoje būsenoje reagavimas į saulės, ultravioletinį (UV) arba regimosios šviesos poveikį, kai dėl spinduliuotės atsiranda fizinių ar cheminių pokyčių medžiagoje. (Ahmad, Ahmed, 2016).

1.10. Askorbo rūgštis

L-askorbo rūgštis dar vadinama vitaminu C, yra vandenyje tirpus vitaminas, kuris yra aptinkamas kai kuriuose maisto produktuose, tokiuose kaip citrinos, kiviai, pomidorai. Askorbo rūgštis reikalinga kolageno sintezei ir tam tikrų hormonų biosintzei, todėl yra būtinas maisto komponentas, nes žmonės, kitaip nei dauguma gyvūnų, negali endogeniškai sintetinti vitamino C. (Li, 2007).

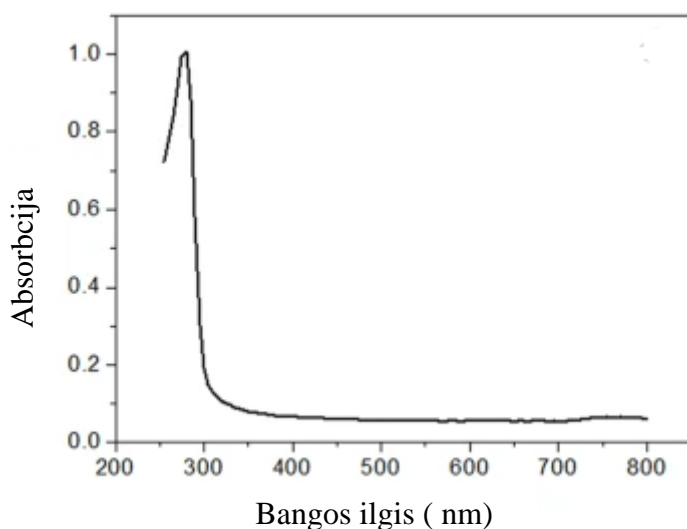
Tačiau, kad šis vitaminas veiksmingai veiktų kaip antioksidantas (arba prooksidantas), organizme turi būti palaikomas gana didelis jo kiekis (Carr, 1999).

Askorbo rūgšties pagrindiniai oksidacijos produktai yra askorbo radikalas ir dehidroaskorbo rūgštis (Steinberg, Rucker, 2013).

Askorbo rūgštis praradus pirmą elektroną (dėl oksidacijos), sudaro laisvą radikalą - askorbo radikalą, radikalų daugiau susidaro šarminėje terpėje, arba gali prarasti ir antrą elektroną (dėl oksidacijos) ir susidaryti dehidroaskorbo rūgštį. Kadangi vitaminas C praranda du elektronus, jis pradeda veikti kaip antioksidantas (Padayatty, Levine, 2016).

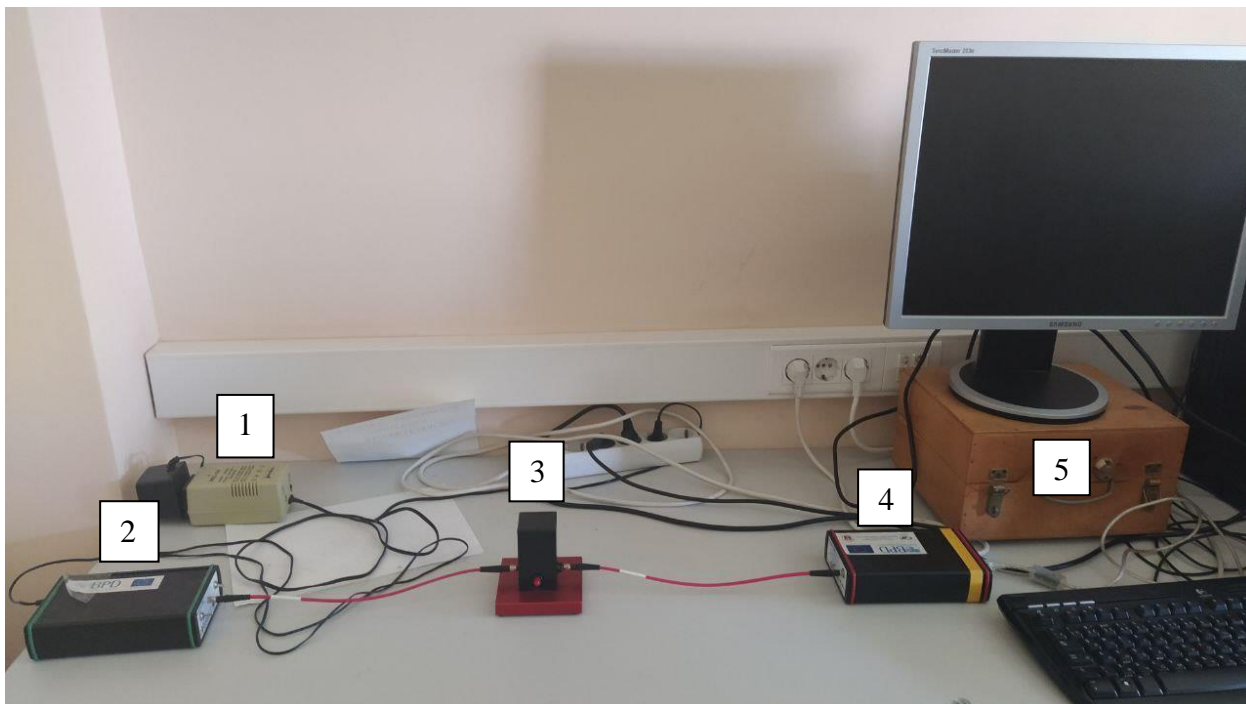
1.11. Jaučio serumo albumino tirpalas

Albuminas yra globulinis baltymas, kuris reikalingas palaikant kraujo plazmos slėgį. Įvairūs junginiai sudaro kompleksą su JSA ir yra pernešami kraujyje. Be to, žmogaus sveikata yra glaudžiai susijusi su albumino koncentracija kraujo plazmoje ar kituose biologiniuose skysčiuose. Dėl didelio struktūrinio panašumo į žmogaus serumo albuminą (ŽSA), jaučio serumo albuminas (JSA) įvairiose srityse plačiai naudojamas kaip modelinis baltymas (Jahanban-Esfahlan, 2019).



Pav. 1.11. JSA tirpalo UV-vis spektras vandeniame tirpale, smailės maksimumas yra ties 279 nm. Adaptuota iš Ma, 2016.

2. TYRIMUI NAUDOJAMA ĮRANGA



Pav. 2.1. UV-Vis spektrometro dalys ir jų išdėstymas. 1 – lempos maitinimo šaltinis, 2 – šviesos šaltinis (AvaLight-DHc Full-range Compact Light Source), 3 – kiuretės laikiklis, 4 – šviesolaidinis spektrometras (AvaSpec-ULS2048 StarLine), 5 – kompiuteris.

2.1. UV-Vis spektroskopija

Ultravioletinės-regimosios spinduliuotės (UV-Vis) spektroskopija yra plačiai naudojama daugelyje sektorių, pradedant bakterijų auginimu, vaistų ar medžiagų identifikavimu, baigiant gėrimų pramonės produktų kokybės kontrole ir cheminiais tyrimais.

UV-Vis spektroskopija yra analizės metodas, kai mėginys apšviečiamas ultravioletinių (UV) ir regimųjų (Vis) bangų ilgio elektromagnetiniais spinduliais, o spektrometras išmatuoja kiek šviesos praleidžia medžiaga šviečiant nuo 200 nm iki 800 nm bangos ilgio šviesa. Kai šviesa praeina pro mėginį ir patenka į detektorius, šviesos signalas yra konvertuojamas į elektroninį signalą ir gaunamas tai medžiagai būdingas sugerties spektras. Medžiagos išmatuotas sugerties spektras yra lyginamas su etaloninio mėginio ar tuščios kiuretės spektru. Gaunamą spektrą nulemia mėginio sudėtis, spektras gali suteikti informacijos apie tai, kas yra mėginyje ir kokia nežinomos medžiagos koncentracija (Tom, 2021).

Paprastai UV-vis spektroskopija naudojama kiekybiškai nustatyti medžiagos koncentraciją tirpale pagal Lamberto-Bero dėsnį:

$$A = \text{Log}_{10}(I_0/I) = \epsilon c L,$$

kur A yra absorbcija arba išmatuotas optinis tankis, I_0 – krentančios, į bandinį, šviesos intensyvumas tam tikram bangos ilgiui, I – pro medžiaga praleistos šviesos intensyvumas, L –

kiuvetės plotis matuojamas – cm , c – sugeriančios medžiagos koncentracija, matuojama moliais litre – M , ϵ yra matas, rodantis, kaip stipriai medžiaga sugeria tam tikro bangos ilgio šviesą, arba kitaip medžiagos molinis ekstinkcijos koeficientas matuojamas $M^{-1} cm^{-1}$.

Paprastai kiekybinėje analizėje naudojamas ϵ , kuris būna parenkamas ties didžiausios sugerties bangos ilgiu (λ_{max}). Žinant ϵ galima apskaičiuoti nežinomos medžiagos koncentraciją c , kai L yra fiksuota, o I_0 ir I matuojami (Huaiyu Wang ir kt., 2013).

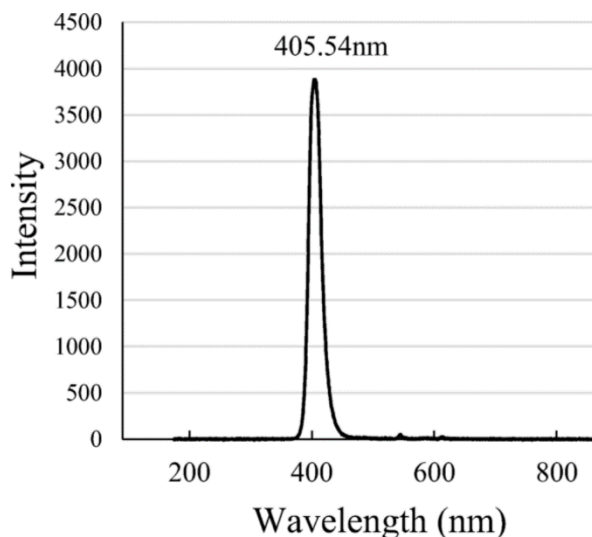
2.2. Adityvumo principas

Adityvumo principas teigia, kad tarpusavyje nereaguojančių medžiagų mišinio spektras yra toks pats, kaip susumuotas iš atskirai išmatuotų komponentų spektro.

$$A_{1+2}=A_1+A_2$$

2.3. Mėlynas diodas

Ekperimentams naudotas mėlynas matricinis diodas, λ_{max} ties $405 nm \pm 3 nm$.



Pav.2.3. Mėlyno diodo sugerties spektras su smaile ties 405 nm. Paimta iš: Chiaki Tsutsumi-Arai ir kt., 2019.

3. EKSPERIMENTO METODIKA

3.1. Eksperimentuose naudoti buferiai:

Fosfatiniai buferiai buvo padaryti:

pH 6	50 ml 0,2 M KH ₂ PO ₄ + 5,6 ml 0,2 M NaOH + 144,4 ml distiliuoto H ₂ O
pH 7	50 ml 0,2 M KH ₂ PO ₄ + 29,1 ml 0,2 M NaOH + 120,9 ml distiliuoto H ₂ O
pH 8	50 ml 0,2 M KH ₂ PO ₄ + 46,1 ml 0,2 M NaOH + 103,9 ml distiliuoto H ₂ O

3.2. Matcha žaliosios arbatos ekstrakto paruošimas

Matcha arbata yra iš Japonijos, piršta iš „Terre Exotique“ kompanijos.

Matcha pradinis koncentratas (50ml H₂O + 1g Matcha žaliosios arbatos miltelių).

Nepanaudoti arbatos milteliai laikomi sausoje tamsioje vietoje.

Eksperimentams naudojamas šviežiai padarytas arbatos ekstraktas.

Ant svarstyklių atsveriamas ir įdedama 1g Matcha arbatos miltelių. Į 50ml indelį įpilamas karštas vanduo (~ 80°C). Maišoma su šaukštuku, kol viršuje pradeda atsirasti putos (Weiss, Anderton, 2003). Tada arbata išpilstoma į mažesnius indelius ir įdedama į centrifūgą (Corning LSE Mini, mikro centrifuga, 6000 Rpm). Mėginiai sukami, kol Matcha milteliai nusės ant dugno ir skystis bus skaidrus. Pasinaudojant pipete, arbatos supernatantas iš indelių su tirščiais pipetuojamas į kitą indelį.

3.3. Chlorino e6 tirpalo paruošimas

Chlorinas e6 yra pirktas iš „Frontier Scientific“ kompanijos.

Chlorino e6 ϵ_{654} : 49411 cm⁻¹/M , molinė masė - 596,7g/mol, molinė koncentracija:

$$(0,00838 \text{ g}/596,7 \text{ g/mol})/0,0015 \text{ L} = 9,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Chlorino e6 pradinis koncentratas (20μl NaOH+ 0,00838g Ce6 + 1,5ml H₂O)

Ant svarstyklių atsveriamas 0,00838 g chlorino e6 miltelių, kurie yra įdedami į 2 ml indelį apsuktą aliuminio folija. Į indelį su chlorinu e6 įpilama 20μl NaOH ir maišoma, kol ištirps, tada į kiuvetę įpilama 1,3ml H₂O ir gerai išmaišoma, kad neliktų nuosėdų.

3.4. Jaučio serumo albumino tirpalo paruošimas

Jaučio serumo albuminas yra pirktas iš „Sigma-Aldrich“ kompanijos.

JSA ϵ_{279} : 43824 cm⁻¹M⁻¹ , molinė masė: 67000 g/mol,

Molinė koncentracija: (0,0047 g /67000 g/mol)/ 0,001402 L=5*10⁻⁵ M

Jaučio serumo albumino tirpalas (0,047 g JSA + 1,402 ml H₂O)

Ant svarstyklių atsveriami 0,047 g JSA miltelių, kurie yra įdedami į 4 ml indelį. Į indelį su JSA įpilama 300 µl H₂O ir maišoma, kol ištirps, tada į kiuvetę įpilama 1,1 ml H₂O ir išmaišoma, kol neliks nuosėdų.

3.5. Askorbo rūgšties tirpalo paruošimas

Askorbo rūgštis yra pirktas iš „Sigma-Aldrich“ kompanijos.

Askorbo rūgšties molinė masė: 176,12 g/mol, molinė koncentracija: $(0,0176 \text{ g}/176,12 \text{ g/mol})/0,01 \text{ L} = 10^{-2} \text{ M}$

Askorbo rūgšties pradinis koncentratas (0,0176g Askorbo rūgšties + 10ml H₂O)

Ant svarstyklių atsveriami 0,0176 g askorbo rūgšties miltelių, kurie yra įdedami į 10 ml indelį. Į indelį su askorbo rūgštimi įpilama 2 ml H₂O ir maišoma, kol ištirps, tada į kiuvetę įpilama 8 ml H₂O ir gerai išmaišoma, kad neliktų nuosėdų.

3.6. Eksperimento tirpalų pagaminimas:

Lentelė 3.6. Eksperimente naudoti tirpalų tūriai.

	pH 6 , pH 7 , pH 8 buferis
arbata	20 µl (Matcha) + 980 µl (buferio)
chlorinas e6 ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)	20 µl (Ce6)($9,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) + 980 µl (buferio)
Jaučio serumo albumino tirpalas(10^{-6} M)	20 µl (JSA)($5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) + 980 µl (buferio)
askorbo rūgštis($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)	20 µl (askorbo)(10^{-2} M) + 980 µl (buferio)
chlorinas e6 + arbata	20 µl (Ce6) + 20 µl (Matcha) + 940 µl (buferio)
chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalas	20 µl (JSA) + 20 µl (Ce6) + 940 µl (buferio)
chlorinas e6 + arbata + Jaučio serumo albumino tirpalas	20 µl (Ce6) + 20 µl (Matcha) + 20 µl (JSA) + 920 µl (buferio)
chlorinas e6 + askorbo rūgštis	20 µl (Ce6) + 20 µl (askorbo rūgšties) + 940 µl (buferio)
chlorinas e6 + arbata + askorbo rūgštis	20 µl (Ce6) + 20 µl (Matcha) + 20 µl (askorbo) + 920 µl (buferio)
chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalas + askorbo rūgštis	20 µl (Ce6) + 20 µl (JSA) + 20 µl (askorbo) + 920 µl (buferio)
chlorinas e6 + arbata + Jaučio serumo albumino + askorbo rūgštis	20 µl (Ce6) + 20 µl (Matcha) + 20 µl (JSA) + 20 µl (askorbo) + 900 µl (buferio)

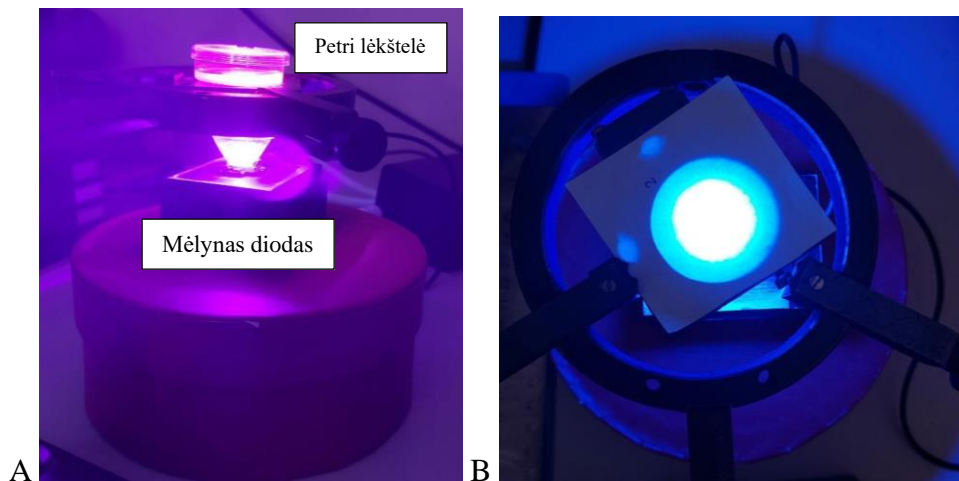
Lentelėje 3.6. pateikti tirpalų tūriai buvo pasirinkti tokie, kad matuojant su šviesolaidiniu UV-vis spektroskopu išmatuotos medžiagos sugerties spektro smailės neviršytų vieno optinio tankio vieneto (Jim Clark, 2007).

3.7. Medžiagų švitinimas

Bandiniai yra švitinami mėlyno diodo spinduliuote iš apačios Petri lėkštelėje (2 ml) (Pav.3.7.), lentelėse nurodytą laiką (Lentelė 3.7) stebimi sugerties spektrų pokyčiai, matuojant po kiekvieno švitinimo sugerties spektrą, kai terpės pH 6 -pH 8.

Lentelė 3.7. Chlorino e6 švitinimo trukmė mėlyno diodo spinduliuote.

	pH 6	pH 7	pH 8
Chlorinas e6	1*7+2 min	1*7+2 min	1*7 min
Chlorinas e6 + Matcha arbata	1*7+2 min	1*7+2 min	1*6+2 min
Chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalo	30 sek.*6+1 min	30 sek.*5+1 min	30 sek.*6+1 min
Chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalo + Matcha arbata	30 sek.*6+1 min	30 sek.*6+1 min	30 sek.*6+1 min
Chlorinas e6 + askorbo rūgštis	1 min*7	1 min*7	30 sek.*7+1 min*2
Chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalo + askorbo rūgštis	10 sek.*6+30 sek.*2	30 sek.*6	10sek.*10+30sek.*2
Chlorinas e6 + askorbo rūgštis + Matcha arbata	1 min*5+2 min*3 +3 min*2	30 sek.+1 min*7	1 min*5+2 min*4
Chlorinas e6 + Jaučio serumo albumino tirpalo + askorbo rūgštis + Matcha arbata	10 sek.*6 +30 sek.*2	30 sek.+10*4 +20sek.+30sek.	10sek.*9 +30sek.*2



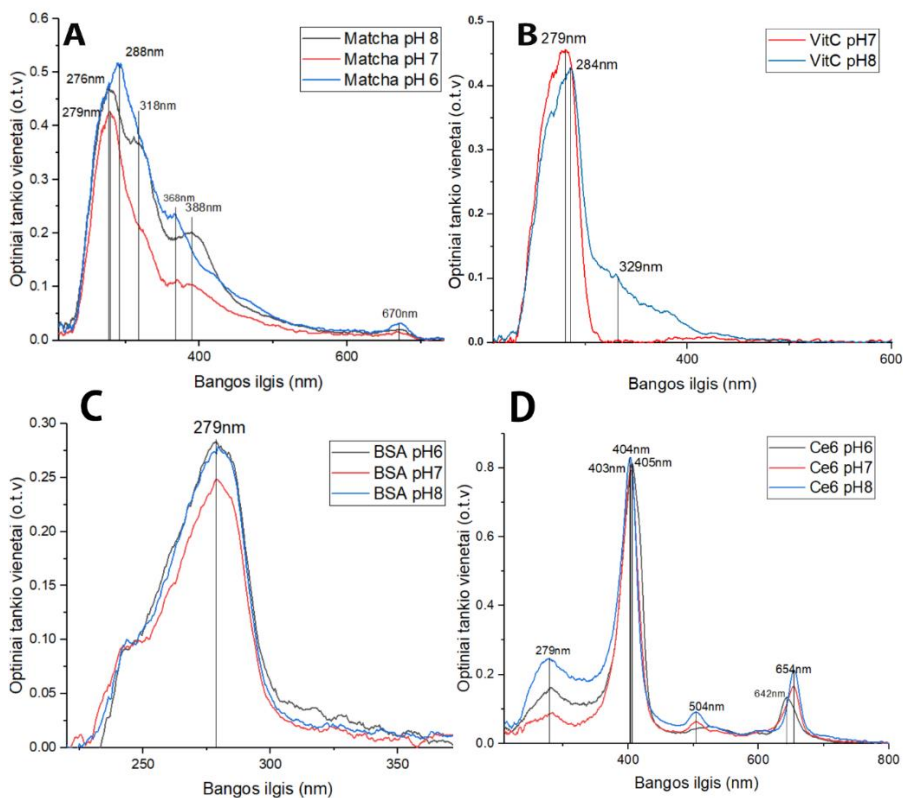
Pav.3.7. Bandinio švitinimo schema, (A) iš šono, (B) iš viršaus.

Bandiniai yra švitinami iš apačios mėlyno šviestuko spinduliuote (50mW), Petri lėkštelėje (2ml).

Kad tarp šviestuko ir mėginių išliktų vienodas atstumas, mėginiai dedami ant metalinio stovo, po kuriuo yra padėtas šviestukas (Pav.3.7.(A)), prieš kiekvieną mėginio švitinimą ant stovo uždedamas baltas lapas, kad patikrinti, ar spinduliuotė yra sutelkta ties viduriu (Pav.3.7.(B)).

4. REZULTATAI

Pirmi eksperimentai buvo skirti išmatuoti chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto, askorbo rūgšties ir jaučio serumo albumino sugerties spektrai trijose buferinėse terpėse, prieš mėginius sumaišant ir paveikiant mėlyno diodo spinduliuote.



Pav.4.1. Matcha žaliosios arbatos ekstrakto (Matcha) (A), askorbo rūgšties ($2 \cdot 10^{-4}$ M) (VitC) (B), jaučio serumo albumino (10^{-6} M) (BSA) (C) ir chlorino e6 ($7,5 \cdot 10^{-5}$ M) (Ce6) (D) sugerties spektrai, ties 210-800 nm, pH 6, pH 7, pH 8 (A,C,D), pH 7, pH 8 (B) buferinėse terpėse.

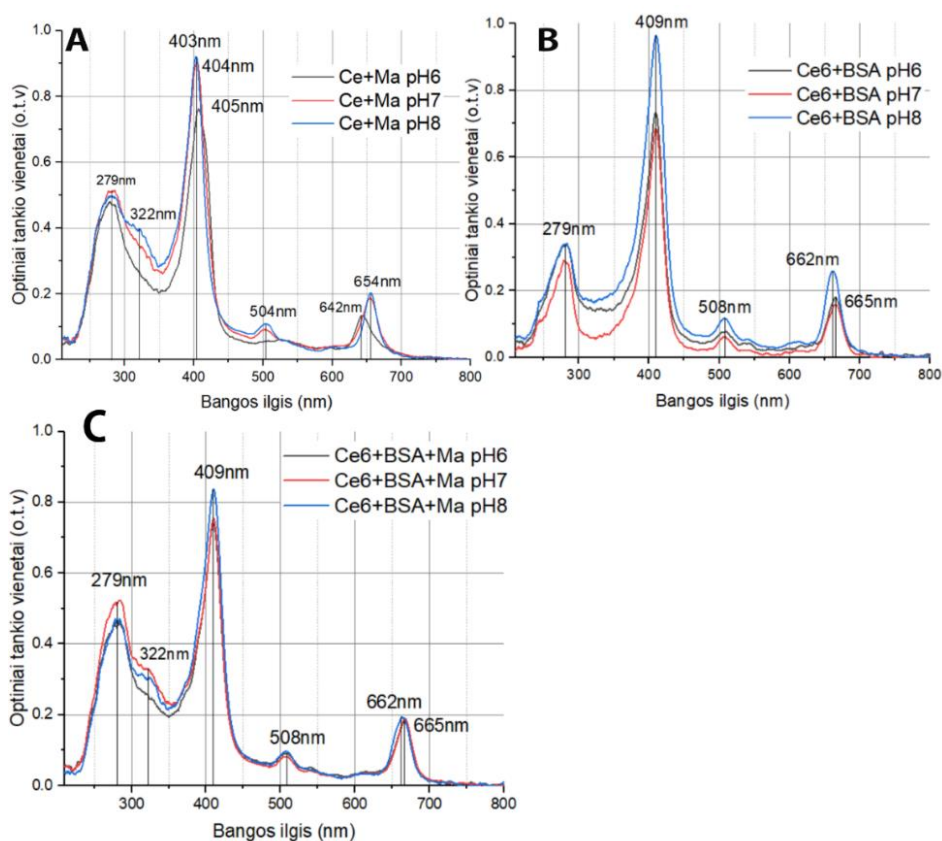
Arbatos ekstrakto sugerties intensyvumo juostos smailė priklauso nuo terpės pH, kai pH yra rūgštinis (pH 6), smailės yra ties 288 nm ir 368 nm. Buferinę terpę pakeitus į bazinę, pirma smailė ties 279 nm slenkasi į mėlynąją pusę, smailė ties 368 nm išlieka nepakitusi, lyginant su arbatos ekstraktu rūgštinėje terpėje. Kai arbata yra šarminėje terpėje (pH 8), pagrindinė smailė yra ties 276 nm, dar labiau pasislinkusi į mėlynąją pusę, atsiranda dvi smailės ties 318 nm ir 388 nm, lyginant su arbatos ekstraktu pH 6 ir pH 7 buferinėse terpėse (Pav. 4.1.(A)).

Askorbo rūgšties sugerties spektro maksimumas yra ties 284 nm kai terpės pH yra šarminė (pH 8). Kai buferinė terpė yra pH 6, pagrindinis maksimumas yra ties 279 nm (Pav. 4.1.(B)).

Jaučio serumo albumino sugerties spektro maksimumas ties 279 nm yra nepriklausomas nuo terpės pH, nuo 6 pH iki 8 pH (Pav. 4.1.(C)).

Priklausomybė nuo terpės pH taip pat pastebima ir chlorino e6 tirpaluose (Pav. 4.1.(D)). Kai terpė yra rūgštinė, Soret juostos maksimumas yra ties 405 nm, Q(I) – 642 nm. Kai buferinė terpė bazinė arba šarminė, chlorino e6 Soret juostos maksimumas slenkasi į trumpabangę pusę, pH 7 – 404 nm, pH 8 – 403 nm, o Q(I) maksimumas į ilgabangę pusę, pH 7 ir pH 8 – 654 nm. Šarminėje ir neutralioje terpėje taip pat stebimas padidėjęs Q(IV) smailės maksimumas – 504 nm (Pav. 4.1.(D)).

Išmatavus pradinius spektrus, chlorino e6 tirpalas buvo sumaišytas su Matcha arbatos ekstraktu ir jaučio serumo albuminu, ir išmatuoti mišinių sugerties spektrai trejose buferinėse terpėse.



Pav.4.2. chlorino e6 ir Matcha žaliosios arbatos ekstrakto (Ce+Ma) (A), chlorino e6 ir jaučio serumo albumino (Ce6+BSA) (B), chlorino e6, jaučio serumo albumino ir Matcha žaliosios arbatos ekstrakto (Ce6+BSA+Ma) (C) sugerties spektrai, ties 210-800 nm, pH 6 , pH 7, pH 8 buferinėse terpėse.

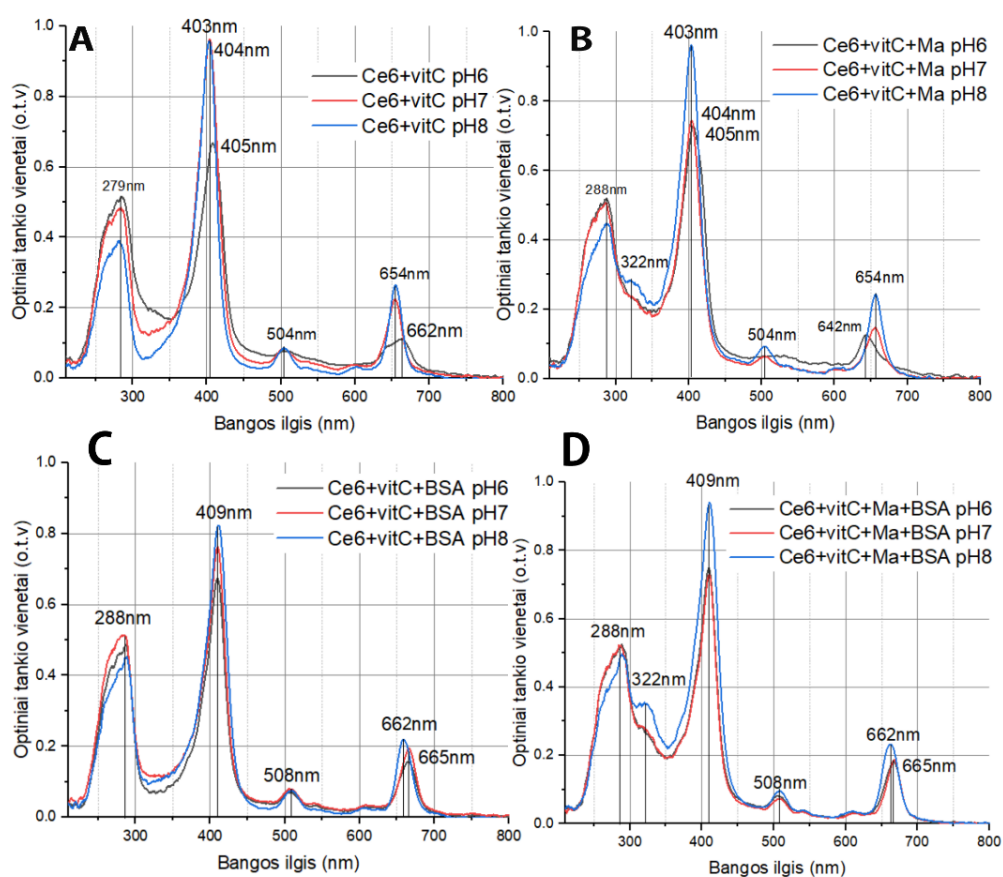
Matcha arbatos ekstraktą sumaišius su chlorinu e6, iš spektrų matosi, kad medžiagos reaguoja viena su kita. Lyginant su atskiras Matcha ekstrakto sugerties spektrais (Pav.4.1.(A)) mišinio Matcha ekstrakto pagrindinė smailė keičiant terpės pH išlieka ties 279 nm, tai atitinka

pradinį Matcha arbatos spektrą, kai terpės pH 7 (Pav.4.1.(A)). Kai terpė šarminė yra nauja smailė ties 322 nm (Pav.4.2.(A)).

Į chlorino e6 tirpalą įlašinus jaučio serumo albumino, visos chlorino e6 juostos slenkasi į ilgabangę pusę, lyginant su pradiniais spektrais (Pav.4.1.(D)), tad matosi, kad chlorinas e6 ir JSA formuoja kompleksą (Pav.4.2.(B)).

Sumaišius visas tris medžiagas į mišinį ir keičiant terpę į rūgštinę, sugerties spektre stebima, kad išauga tik viena smailė ties 322 nm (Pav.4.2.(C)).

Išmatavus chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto ir JSA mišinio sugerties spektrus, buvo paruošti kiti šių medžiagų mišiniai, į kuriuos buvo įdėta askorbo rūgšties ir išmatuoti sugerties spektrai.



Pav.4.3. chlorino e6 ir askorbo rūgšties (Ce6+vitC) (A), chlorino e6, askorbo rūgšties ir Matcha ekstrakto (Ce6+vitC+Ma) (B), chlorino e6, askorbo rūgšties ir jaučio serumo albumino (Ce6+vitC+BSA) (C), chlorino e6, askorbo rūgšties, jaučio serumo albumino ir Matcha žaliosios arbatos ekstrakto (Ce6+vitC+Ma+BSA) (D) sugerties spektrai, nuo 210 nm iki 800 nm, pH 6, pH 7, pH 8 buferinėse terpėse.

Chlorino e6 ir askorbo rūgšties mišinio sugerties spektruose visi smailių maksimumai išlieka nepakitę, išskyrus Q(I) maksimumą, kai pH 6, jis pasislenka į raudoną pusę – 662 nm

(Pav.4.3.(A)), lyginant su chlorino e6 (Pav.4.1.(D)) ir askorbo rūgštis (Pav.4.1.(B)) pradiniais spektrais.

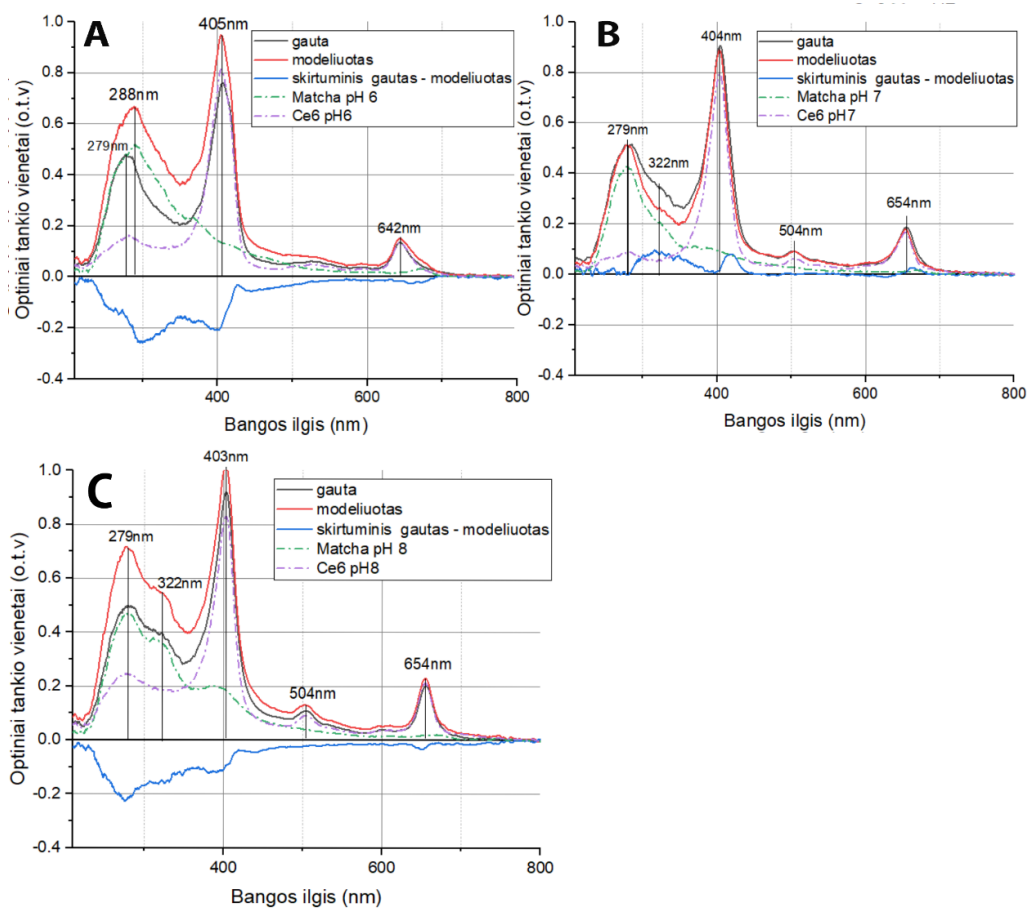
Į chlorino e6 ir Matcha ekstrakto tirpalą sulašinus vitamino C, rūgštėja terpė ir Matcha smailė, kuri buvo ties 279 nm (Pav.4.2. (A)) pasislenka į ilgabangę pusę – 288 nm (Pav.4.3.(B)) ir atitinka Matcha ekstrakto sugerties smailę, kai terpės pH 8 (Pav.4.1.(A)).

Keičiant tirpalo terpę į bazinę, Matcha ir askorbo rūgštis mišinio smailė išlieka ties 288 nm ir smailė ties 322 nm sunyksta (Pav.4.3.(B)). Chlorino e6 ir Matcha ekstrakto tirpale be askorbo rūgštis, terpę pakeitus į bazinę smailė ties 322 nm išlieka (Pav.4.2.(A)), bet terpę pakeitus į šarminę, smailė ties 322 nm atsiranda (Pav.4.3.(B)).

Pridėjus askorbo rūgštis į chlorino e6 ir jaučio serumo albumino mišinį, stebimas askorbo rūgštis sugerties smailės poslinkis į ilgabangę pusę, iš to galima teigti, kad vyksta sąveika tarp medžiagų. Lyginant su atskirai išmatuotais askorbo rūgštis (Pav.4.1.(B)) ir chlorino e6 (Pav.4.1.(D)) spektrais, smailės yra pasislinkusios į ilgabangę pusę (Pav.4.3.(C)), ir terpės pH neturi įtakos smailių maksimumams.

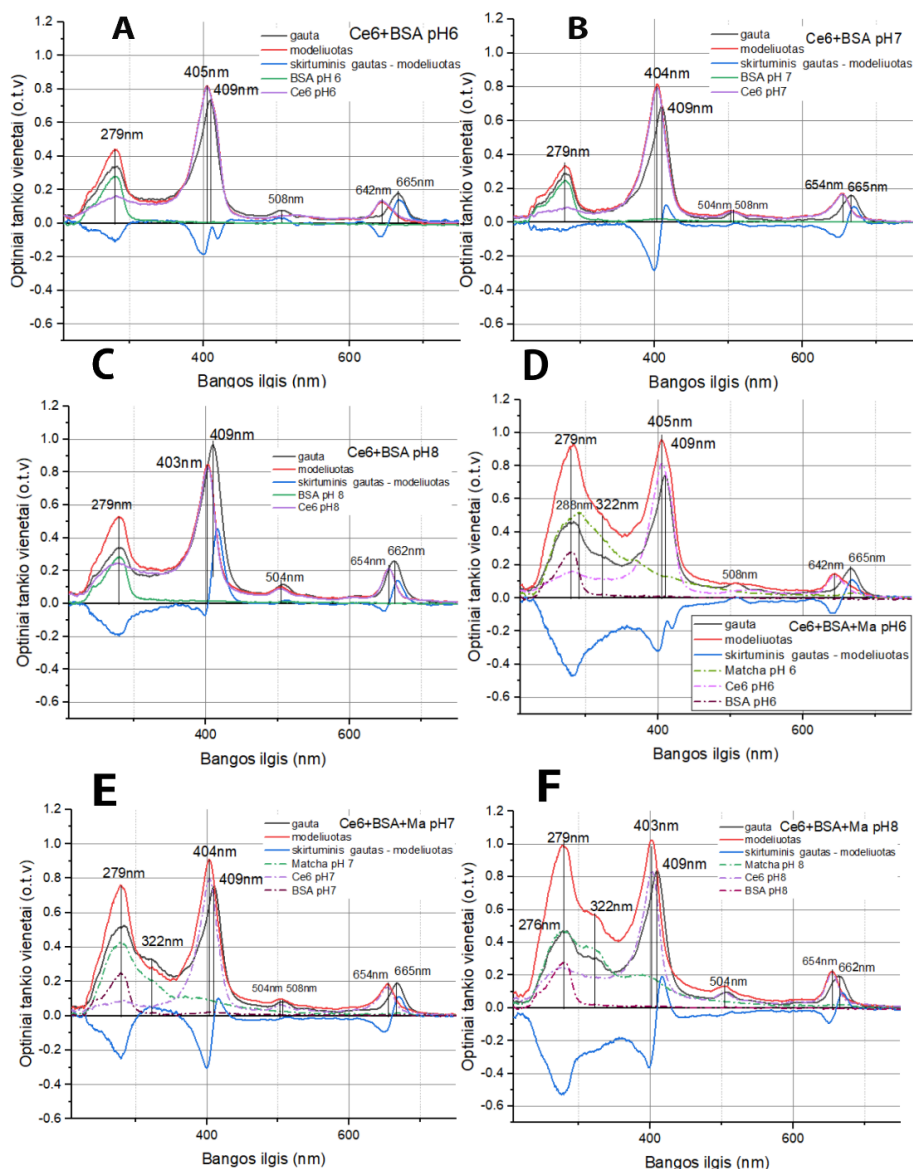
Į chlorino e6, JSA ir askorbo rūgštis mišinį įlašinus Matcha arbatos ekstrakto, smailių maksimumai išlieka nepakitę, lyginant su chlorino e6, askorbo rūgštis ir JSA mišiniu (Pav.4.3.(C)), išskyrus ties 322 nm, ten yra iškilusi nauja smailė (Pav.4.3.(D)). Kai terpės pH 8, atsiranda smailės maksimumas ties 322 nm (Pav.4.3.(D)), ir Q(I) smailės maksimumas pasislenka iš 660 nm (Pav.4.3.(C)) į 662 nm (Pav.4.3.(D)).

Išmatavus chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto, JSA ir askorbo rūgštis mišinių sugerties spektrus, išmatuoti ir modeliuoti spektrai atvaizduoti viename grafike. Modeliuoti spektrai gauti susumavus eksperimente išmatuotus medžiagų spektrus (Pav.4.1(A-D)). Atėmus laboratorijoje išmatuotus spektrus iš modeliuotų, jeigu medžiagos esančios tirpale tarpusavyje nereaguoja, gautas skirtuminis spektras turėtų būti tiesi linija.



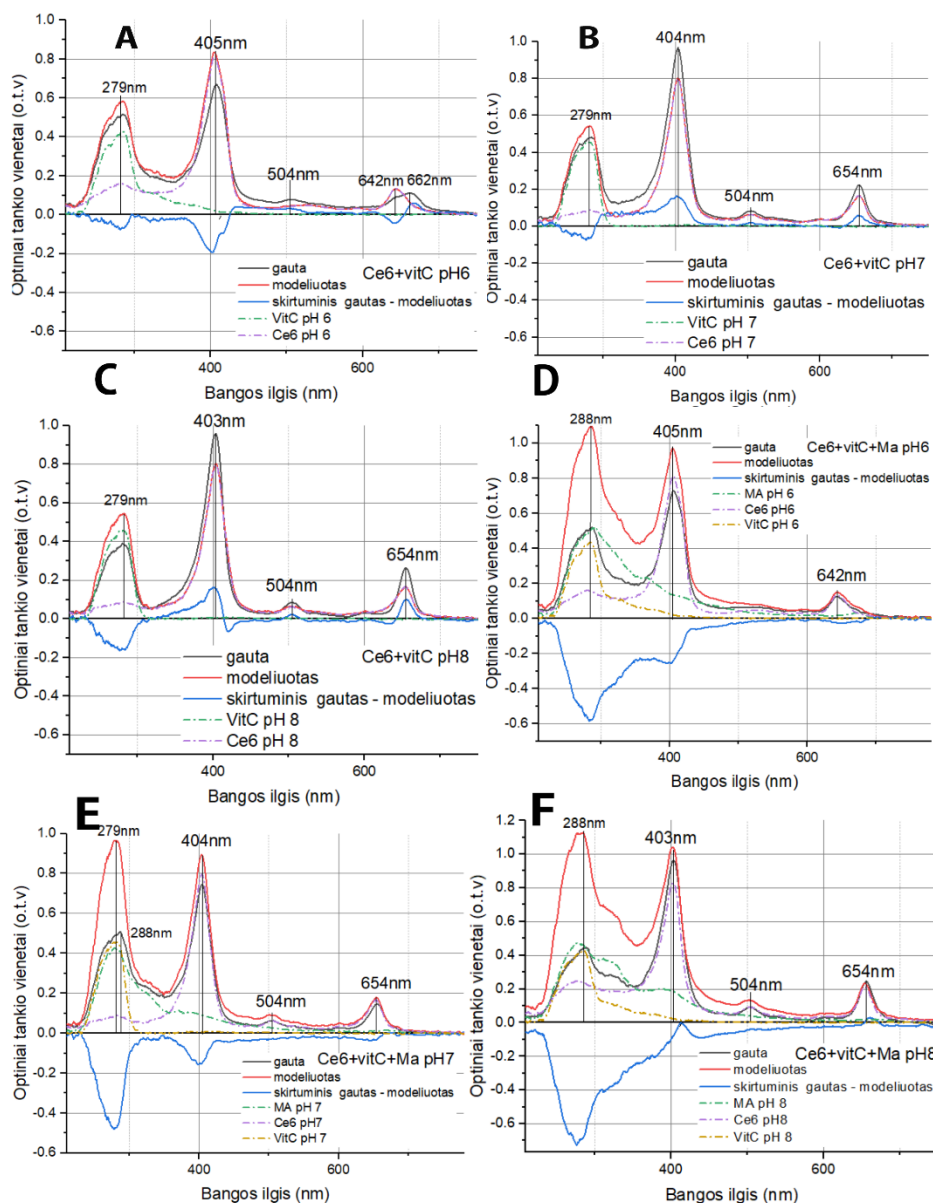
Pav.4.4. Chlorino e6 ir Matcha ekstrakto pH 6 (A), pH 7 (B), pH 8 buferinėje terpėje (C), išmatuoti (gauta), modeliuoti sugerties spektrai ir skirtuminiai spektrai, gauti atėmus eksperimente išmatuotą spektrą iš modeliuoto, nuo 210 nm iki 800 nm.

Didžiausi skirtumai tarp modeliuoto ir eksperimente gauto sugerties spektro stebimi ties 279 nm - 322 nm (Pav.4.4. (A-C)). Ten yra Matcha ekstrakto sugerties smailės, kurios reaguoja į pH pokyčius (Pav.4.1(A)), bet Matcha sumaišius su chlorinu ir išmatavus mišinio sugerties spektrus, matosi, kad medžiagos viena su kita reaguoja, ir, keičiantis pH, Matcha smailės išlieka ties 279 nm.



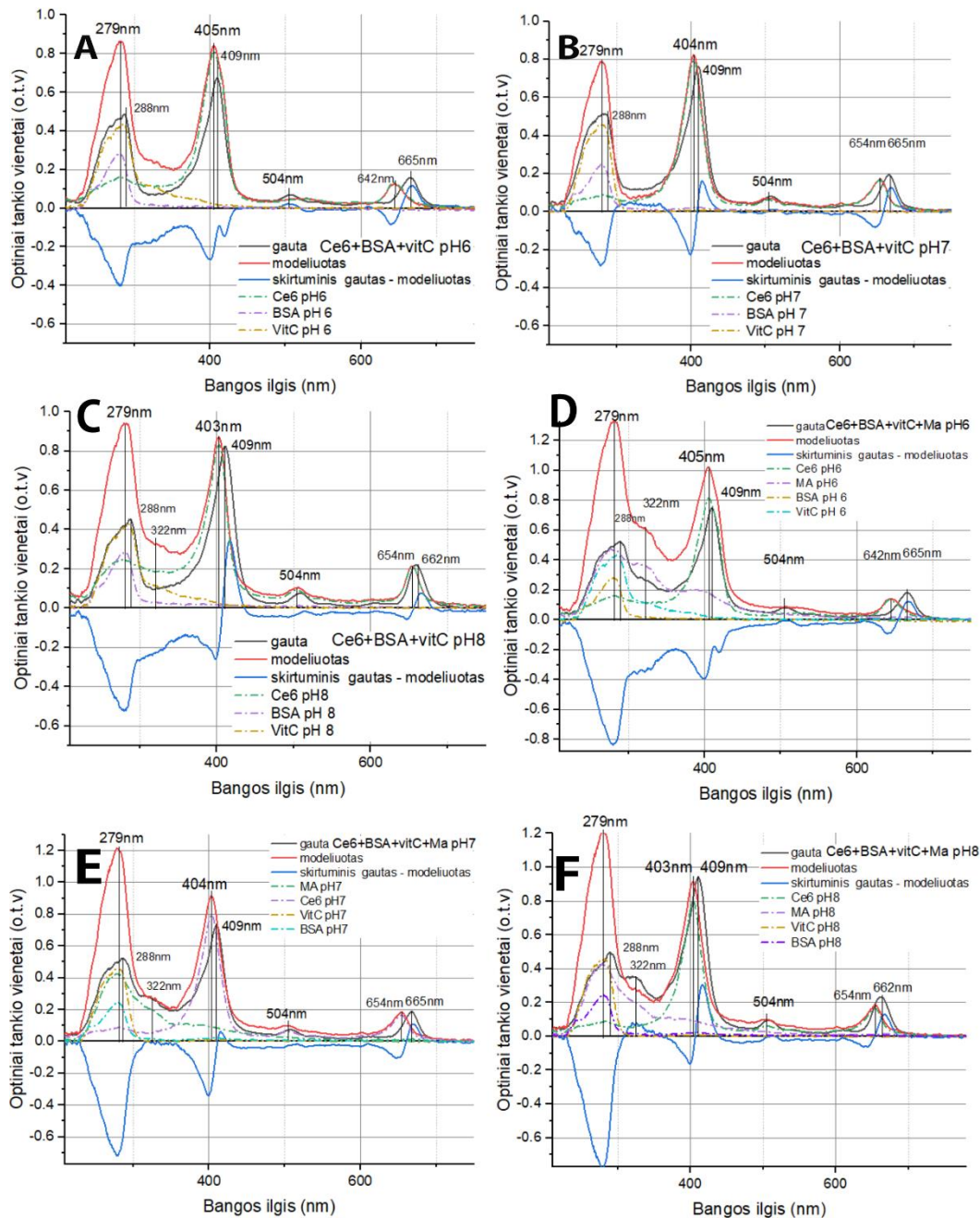
Pav.4.5. Chlorino e6 ir jaučio serumo albumino pH 6 (A), pH 7 (B), pH 8 buferinėje terpėje (C), chlorino e6, jaučio serumo albumino, Matcha ekstrakto pH 6 (D), pH 7 (E), pH 8 buferinėje terpėje (F), išmatuoti (gauta) ir modeliuoti sugerties spektrai, ir skirtuminiai spektrai, nuo 210 nm iki 780 nm.

Iš chlorino e6 ir JSA skirtuminių spektrų matosi, kad medžiagos neatitinka adityvumo principo (Pav.4.5. (A-C)). Chlorino e6 smailių maksimumai keičiant terpės pH lieka nepakitę ir, lyginant su modeliuotais spektrais, smailės yra pasislinkusios į raudoną pusę (Pav.4.5. (A-C)). Kai į chlorino e6 ir baltymo mišinį yra įlašinama Matcha ekstrakto, grafikuose stebimas didesnis adityvumo principo neatitikimas (Pav.4.5. (D-F)). Lyginant su modeliuotais spektrais, gautuosiuose ties 279 nm-322 nm yra sumažėjęs optinio tankio intensyvumas, Matcha arbatos ekstrakto smailės maksimumai išlieka ties 279 nm (Pav.4.5. (D-F)).



Pav.4.6. Chlorino e6 ir askorbo rūgšties pH 6 (A), pH 6 (B), pH 8 buferinėje terpėje (C), chlorino e6, askorbo rūgšties, Matcha ekstrakto pH 6 (D), pH 6 (E), pH 8 buferinėje terpėje (F), išmatuoti (gauta) ir modeliuoti sugerties spektrai skirtuminiai, nuo 210 nm iki 780 nm.

Kai terpės pH 8 askorbo rūgštis sureaguoja į šarminę terpę, optinis tankis sumažėja ties 279 nm, ir išauga chlorino e6 smalių optinis tankis (Pav.4.6.(A-C)). Į chlorino e6 ir askorbo rūgšties mišinį sulašinus Matcha ekstrakto, modeliuotame spektre ties 220 nm – 390 nm optinis tankis yra išaugęs virš 1 o.t.v, bet išmatuotose sugerties spektruose optinis tankis pasiekia tik iki 0,5 o.t.v, keičiant terpės pH nėra smalių poslinkio, tai rodo, kad medžiagos tarpusavyje reaguoja.

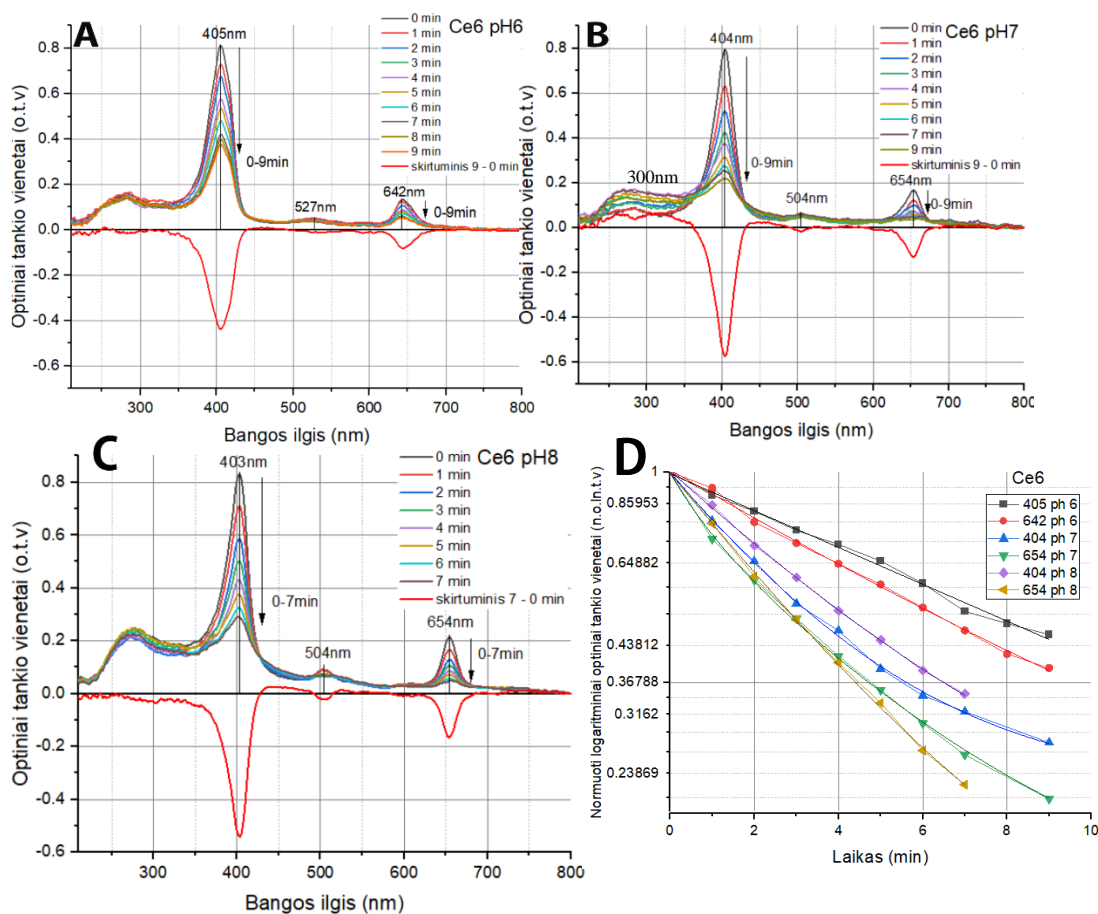


Pav.4.7. Chlorino e6, jaučio serumo albumino ir askorbo rūgšties pH 6 (A), pH 6 (B), pH 8 buferinėje terpėje (C), chlorino e6, jaučio serumo albumino, askorbo rūgšties, Matcha ekstrakto pH 6 (D), pH 6 (E), pH 8 buferinėje terpėje (F), išmatuoti (gauta) ir modeliuoti sugerties spektrai, skirtuminiai spektrai, nuo 210 nm iki 780 nm.

Į Chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalą įlašinus JSA, smailės pasislenka į raudoną pusę lyginant su modeliuotais spektrais (Pav.4.7. (A-C)), taip pat sumažėjęs optinio tankio intensyvumas ties 220 nm – 390 nm. Lyginant su modeliuotais spektrais, smailių optinio tankio sumažėjimas ties 220 nm – 390 nm, ir pasislinkimas į ilgabangę pusę, irgi stebimas, kai į chlorino e6, JSA ir askorbo rūgšties mišinį įlašinama Matcha ekstrakto (Pav.4.7. (D-F)).

Terpei šarmėjant – auga smailė ties 322 nm, kai terpės pH 8 – optinis tankis yra didesnis nei modeliuoto spektro smailės ties 322 nm (Pav.4.7. (D-F)).

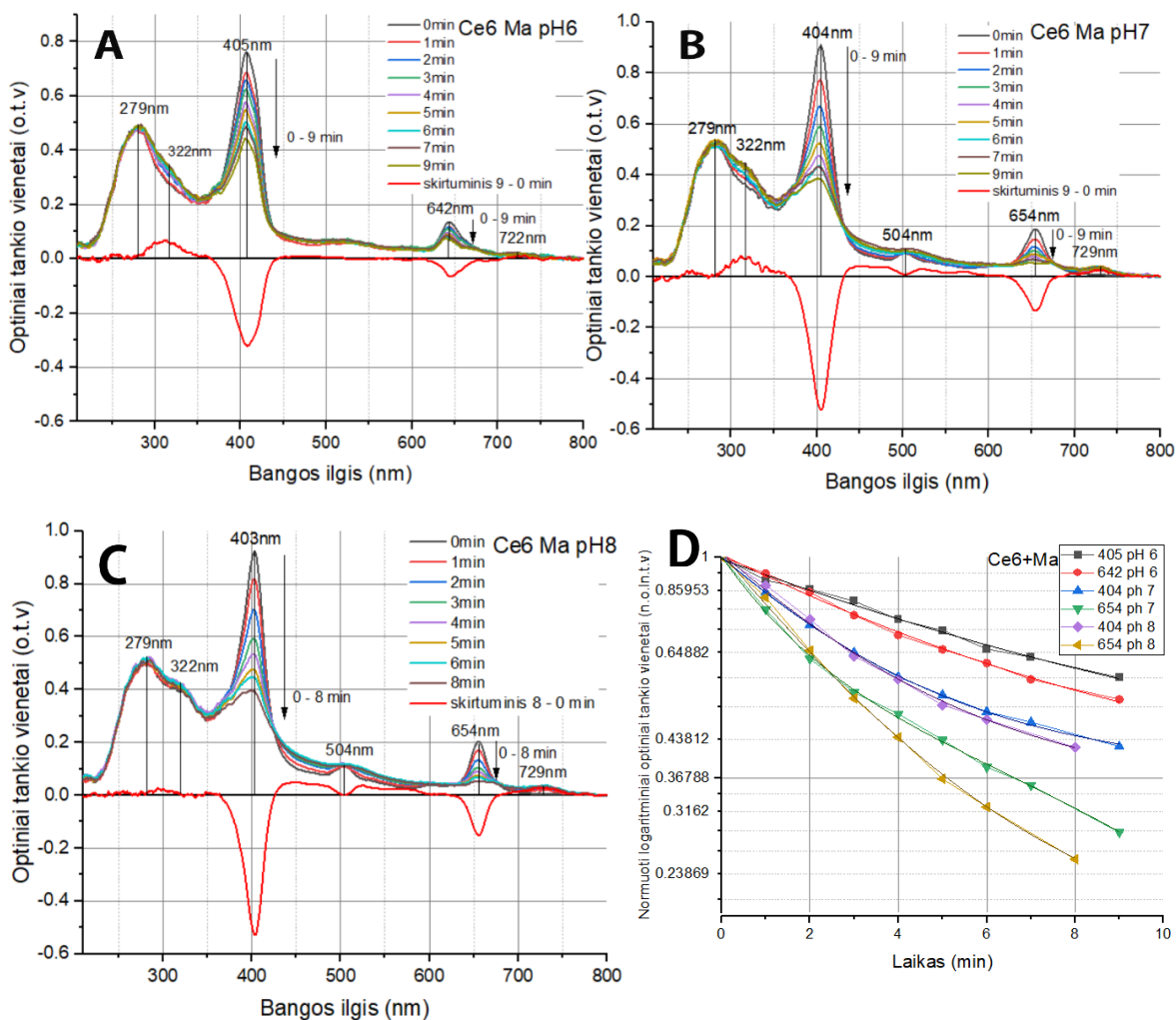
Išmatavus chlorino e6, Matcha ekstrakto, askorbo rūgšties, JSA mišinių sugerties spektrus prieš švitinimą, šie mišiniai buvo švitinami mėlyno diodo spinduliuote, ir stebima, kaip tai keičia sugerties spektrus. Kad būtų lengviau įvertinti pokyčius, buvo gauti skirtuminiai spektrai, iš nešvitinto spektro atėmus paskutinį gautą sugerties spektrą po švitinimo.



Pav.4.8. Chlorino e6 sugerties spektrų, ties 210-800 nm bangos ilgiu, pH 6 (A), pH 7 (B), pH 8 (C) buferinėse terpėse, pokyčiai švitinant mėlyno diodo spinduliuote per 9 minutes (A,B), 7 minutes (C). Raudona linija - skirtuminis spektras: iš ilgiausiai švitintos medžiagos spektro atimtas prieš švitinimą išmatuotas sugerties spektras (0 min). Chlorino e6 kinetikos logaritminėje skalėje, ties Soret ir ties Q(I) smailės maksimumu (D).

Chlorino e6 spektriniai pokyčiai pastebimi jau po vienos minutės tirpalo švitinimo mėlyno diodo spinduliuote (Pav.4.8.(A-C)). Po minutės, greičiausiai pradeda nykti chlorino e6 Q(I) juosta, pH 7 buferinėje terpėje, – 0,72 %, bet lyginant su šarmine terpe, po 5 minučių, stebimas nykimo sulėtėjimas, pH 8 – 0,33 %, pH 7 – 0,35 % (Pav.4.8.(D)).

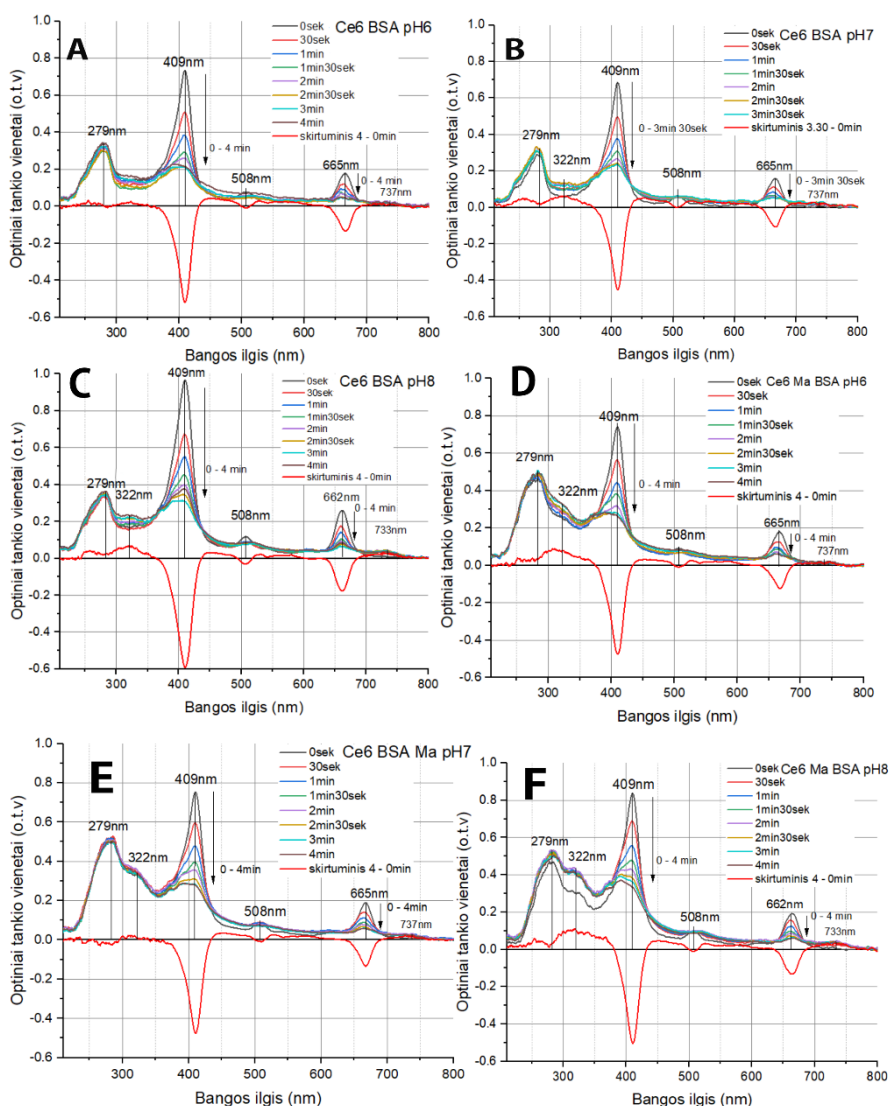
Kai terpės pH 7, smailė ties 279 nm auga (Pav.4.8.(B)). Po 9 minučių, kai terpės pH 6 Q(I) smailės yra sunykusios iki 0,39 %, Soret juosta dar vis įžiūrima, bet lyginant su pradiniu chlorino e6 spektru (1 %), yra sumažėjusi – 0,46 % ((Pav.4.8.(A,D)). Soret ir Q juostos išblunka greičiau – per 7 minutes, kai terpė yra šarminė. (Pav.4.8.(C)).



Pav.4.9. Chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto sugerties spektrų, nuo 210 nm iki 800nm, pH 6 (A), pH 7 (B), pH 8 buferinėse terpėse, pokyčiai švitinant mėlyno diodo spinduliuote per 9 minutes (A,B), 8 minutes (C). Raudona linija – skirtuminis spektras. Chlorino e6 ir Matcha mišinio kinetikos logaritminėje skalėje, ties Soret ir ties Q(I) smailės maksimumu (D).

Rūgštinėje terpėje chlorino e6 Soret ir Q juostos išblunka lėčiausiai, šarminėje greičiausiai (Pav.4.9.(A,C,D)). Po 5 minučių švitinimo mėlyno diodo spinduliuote, rūgštinėje terpėje, Soret juosta sumažėja tik iki 0,71 %, o Q(I) – 0,65 %, o terpę pakeitus į šarminę Soret juosta sumažėja iki 0,51 %, Q(I) – 0,36 % (Pav.4.9.(D)). Kai terpės pH 6 arba pH 7, švitinant chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto mišinį, stebima auganti smailė ties 322 nm ir 722 nm

(pH 6), 729 nm (pH 7,01) (Pav.4.9.(A,B)). O esant šarminei terpei smailės augimas yra tik ties 729 nm (Pav.4.9.(C)).

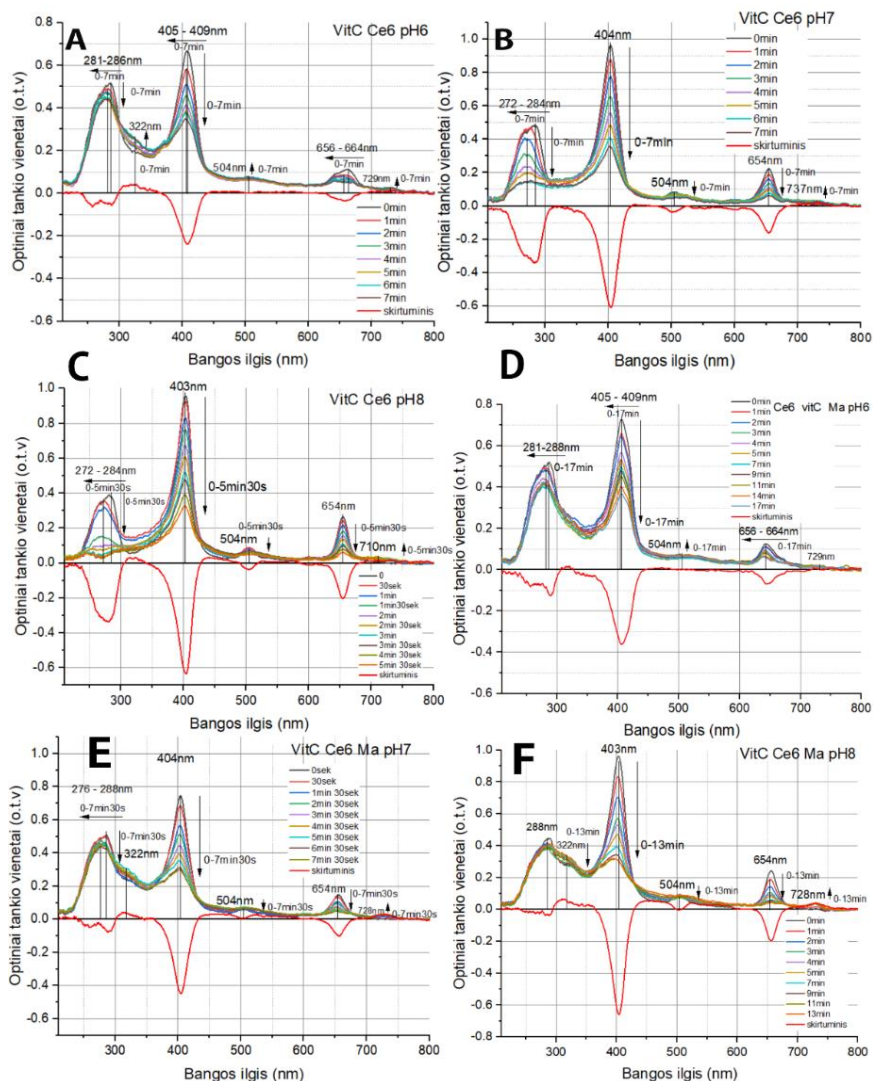


Pav.4.10. Chlorino e6 ir jaučio serumo albumo sugerties spektrų, pH 6 (A), pH 7 (B), pH 8 buferinėse terpėse (C), chlorino e6, jaučio serumo albumo, Matcha arbatos ekstrakto sugerties spektrų, pH 6 (D), pH 7 (E), pH 8 (F), buferinėse terpėse, pokyčiai švitinant mėlyno diodo spinduliuote 4 minutes (A,C-F), 3 minutes 30 sekundžių (B). Raudona linija - skirtuminis spektras.

Chlorino e6 ir JSA mišinyje, po švitinimo, stebimas Soret ir Q juostų blukimas (Pav.4.10.(A-C)), kuris vyksta greičiau, pH 6 terpėje po 3 minučių, Soret sunyksta iki – 0,30 %, Q(I) juosta – 0,26 % (Pav.4.15.(A)), nei švitinant chlorino e6 tirpalą mėlyna diodo spinduliuote Soret sunyksta iki – 0,76 %, Q(I) – 0,71 % (Pav.4.8.(D)). Kai terpės pH 7 arba pH 8, matosi fotoproducto smailės augimas ties 322 nm. Taip pat fotoproducto smailė

formuojasi, kai terpės pH 8 ties – 733 nm, kai pH 6, pH 7 – 737 nm (Pav.4.10.(A-F)), kurios nebuvo švitinant chlorino e6 tirpalą (Pav.4.8.(A-C)).

Įlašinus Matcha ekstrakto į chlorino e6 ir JSA mišinį, fotoprodukto sugerties smailės augimas ties 322 nm matomas tik kai terpės pH 6 (Pav.4.10.(D)). Švitinant mėlyno diodo spinduliuote 4 minutes, smailė ties 279 nm išlieka, sunyksta tik Soret ir Q juostos (Pav.4.10.(D-F)).

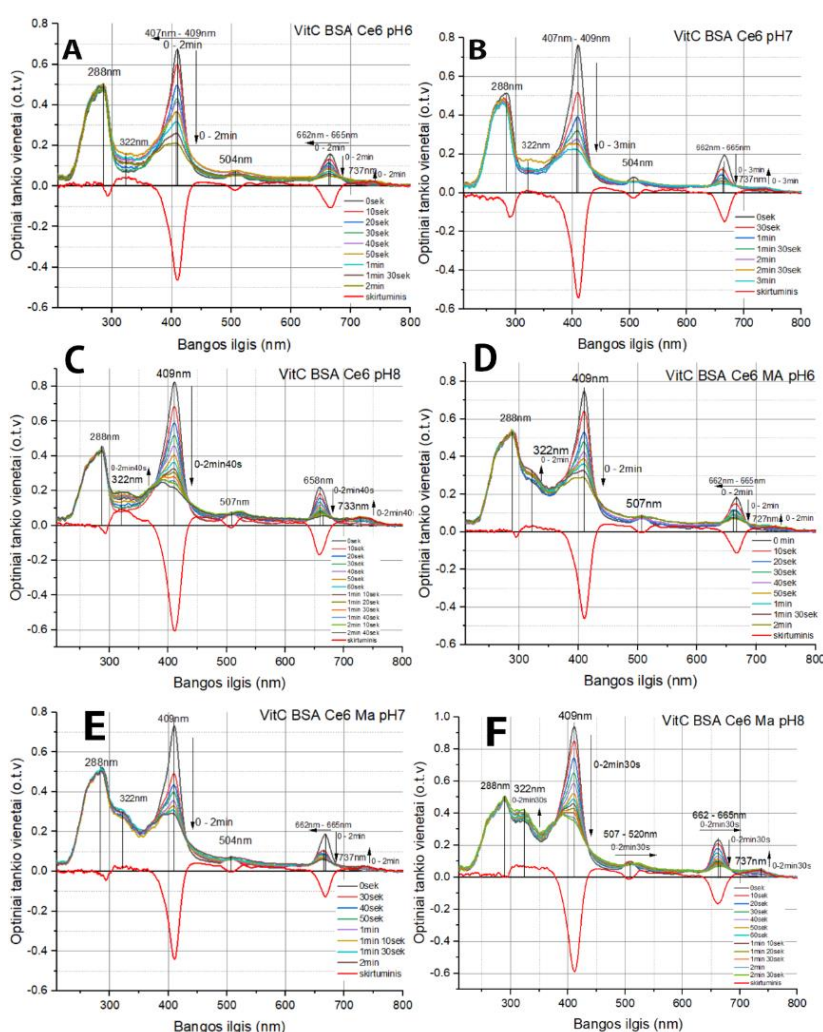


Pav.4.11. Chlorino e6, askorbo rūgšties sugerties spektrų, pH 6 (A), pH 6 (B), pH 8 buferinėse terpėse (C), chlorino e6, askorbo rūgšties, Matcha arbatos ekstrakto sugerties spektrų, pH 6 (D), pH 6 (E), pH 8 (F), buferinėse terpėse, pokyčiai švitinant mėlyno diodo spinduliuote 7 minutes (A-B), 5 minutes 30 sekundžių (C), 17 minučių (D), 7 minutes 30 sekundžių (E), 13 minučių (F). Raudona linija - skirtuminis spektras.

Sumaišius chloriną e6 tirpalą su askorbo rūgštimi, ir mišinį švitinant mėlyno diodo spinduliuote, po 1 minutės stebimas smailės maksimumo ties 284 nm (kai pH 6), 286 nm (kai pH 7 arba pH 8) pasislinkimas į trumpabangę pusę (Pav.4.11.(A-C)). Kai terpės pH 6,

švitinant didėja sugerties smailė ties 322 nm ir 729 nm (Pav.4.11.(A)). Terpę pakeitus bazinę arba rūgštinę, ir švitinant mišinį, kartu su chlorino e6 smailėmis sunyksta ir askorbo rūgšties smailė ties – 284nm, didėja tik fotoprodukto smailė ties 737 nm (pH 7), 710 nm (pH 8) (Pav.4.11.(B,C)).

Mėlyno diodo spinduliuote švitinant chlorino e6, askorbo rūgšties ir Matcha ekstrakto mišinį, sugerties smailė yra ties 288 nm ir slenkasi į trumpabangę pusę (Pav.4.11.(D,E)). Taip pat, švitinant, smailės optinis tankis sumažėja per 0,05 o.t.v, kai terpė yra rūgštinė arba bazinė (Pav.4.11.(D,E)). Švitinant chlorino e6, askorbo rūgšties ir Matcha ekstrakto mišinį, kai terpė rūgštinė, formuojasi smailė ties 728 nm, o pakeičiant į bazinę arba šarminę auga dvi sugerties juostos ties 322 nm ir 729 nm (Pav.4.11.(D-F)).

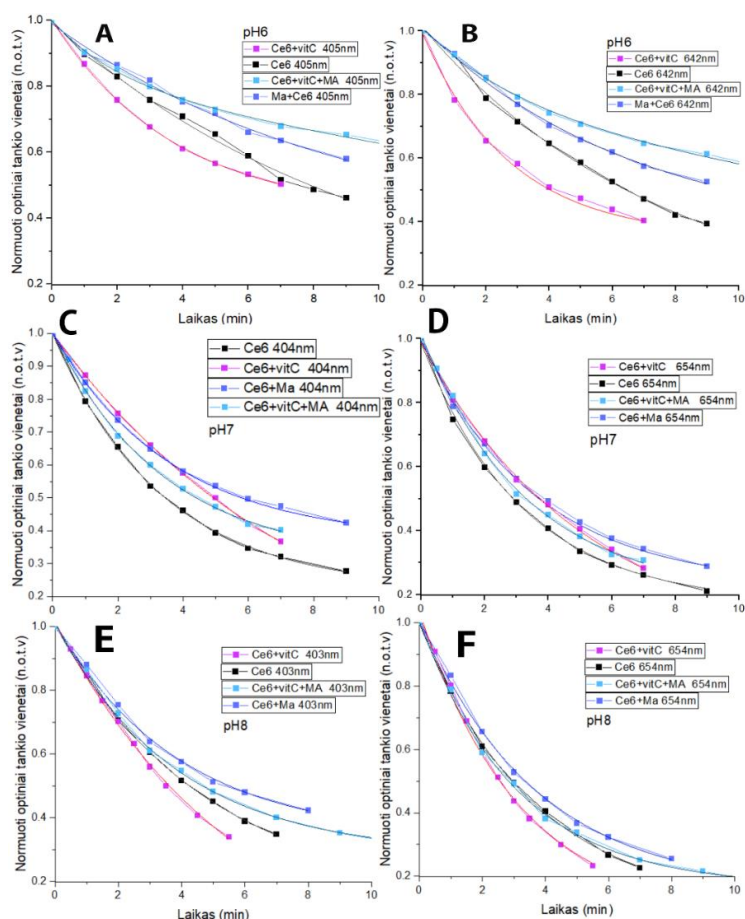


Pav.4.12. Chlorino e6, askorbo rūgšties ir jaučio serumo albumo sugerties spektrų, pH 6 (A), pH 6 (B), pH 8 (C) buferinėse terpėse, chlorino e6, askorbo rūgšties, jaučio serumo albumo ir Matcha arbatos ekstrakto sugerties spektrų, pH 6 (D), pH 6 (E), pH 8 (F), buferinėse terpėse, pokyčiai švitinant mėlyno diodo spinduliuote 2 minutes (A,D,E), 3 minutes (B), 2 minutes 40 sekundžių (C), 2 minutes 30 sekundžių (F). Raudona linija - skirtuminis spektras.

Į chlorino e6 ir askorbo rūgšties mišinį sulašinus JSA tirpalo ir mišinį švitinant mėlyno diodo spinduliuote, matosi tokia pati tendencija, kaip ir švitinant chloriną e6 su JSA (Pav.4.10(A-C)) – chlorino e6 smailės sunyksta greičiau, kai terpės pH 6 arba pH 7. Kai terpės pH 6 arba pH 7, fotoproduktas formuojasi ties 737 nm, kai pH 8 – 733 nm (Pav.4.12(A-C)). Chlorino e6 ir askorbo rūgšties ir JSA mišinyje taip pat yra kylanti fotoprodukto smailė ties 322 nm (Pav.4.12(A-C)). Kai terpė rūgštinė arba bazinė, švitinant Soret ir Q juostos slenkasi į trumpabangę pusę (Pav.4.12(A-C)).

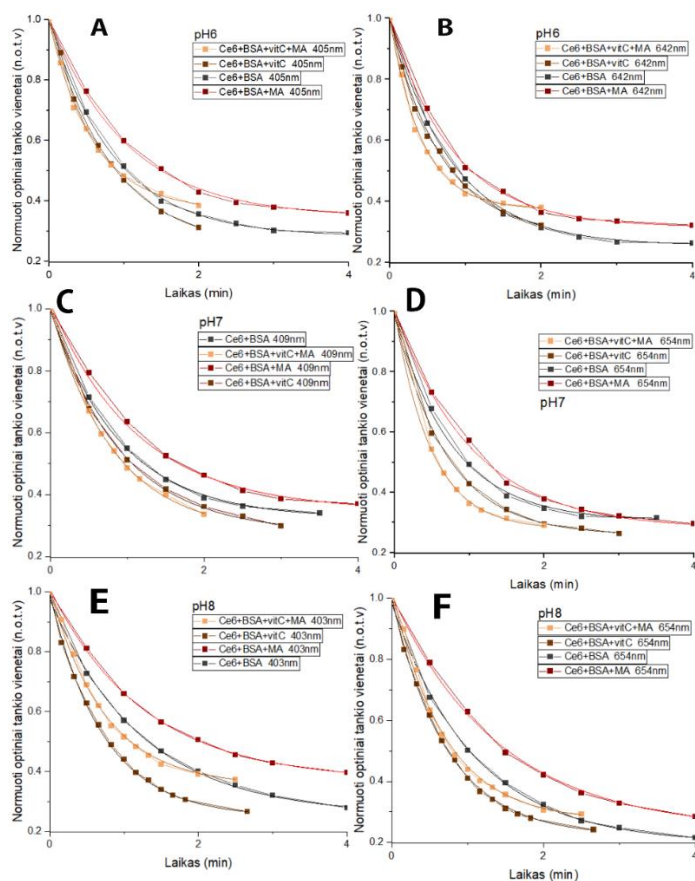
Į chlorino e6, askorbo rūgšties ir JSA tirpalo, dar įlašinus ir Matcha arbatos ekstrakto ir mišinį švitinant, stebima, kad Soret juosta nebesislenka į trumpabangę pusę, ir stebimas smailės augimas ties 322 nm, tik kai terpės pH 8 (Pav.4.12(D-F)).

Kai terpė yra šarminė, švitinant chlorino e6, askorbo rūgšties, JSA ir Matcha ekstrakto mišinį, stebimas Q juostų poslinkis į ilgabangę pusę (Pav.4.12(F)).



Pav.4.13. Chlorino e6, askorbo rūgšties (Ce6+vitC), chlorino e6 (Ce6), Matcha arbatos ekstrakto, chlorino e6 (Ma+Ce6) ir chlorino e6, askorbo rūgšties, Matcha arbatos ekstrakto (Ce6+vitC+Ma) kinetikos, ties Soret smailės maksimumu (A,C,E) ir ties Q(I) smailės maksimumu (B,D,F), per 10 minučių, pH 6 (A,B), pH 7(C,D), pH 8(E,F) buferinėse terpėse.

Lyginant su kitomis kinetikomis, pH 6 ir pH 8 terpėse chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalo sugerties smailės išblunka greičiausiai, po 4 minučių švitinimo Soret juosta sumažėja iki 0,60 % (pH 6), 0,45 % (pH8), o Q(I) – 0,50 % (pH 6), 0,34 % (pH 8), tuo tarpu kai terpės pH 7, greičiausiai išblunka chlorino e6 tirpalas (Pav.4.15.(B)). Tačiau į chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalą įlašinus Matcha ekstrakto, pastebima, kad kai terpė yra rūgštinė, tas mišinys išblunka lėčiausiai, po 5 minučių švitinimo Soret sunyksta iki 0,71 %, Q(I) – 0,70 %, lyginant su kitomis kinetikomis, o kai terpės pH 7 arba pH 8, lėčiausiai blunka chlorino e6 ir Matcha ekstrakto tirpalas (Pav.4.15.(E)). Tad galima teigti, kad askorbo rūgštis pagreitina arba sulėtina chlorino e6 smailių nykimą, priklausomai nuo terpės pH.

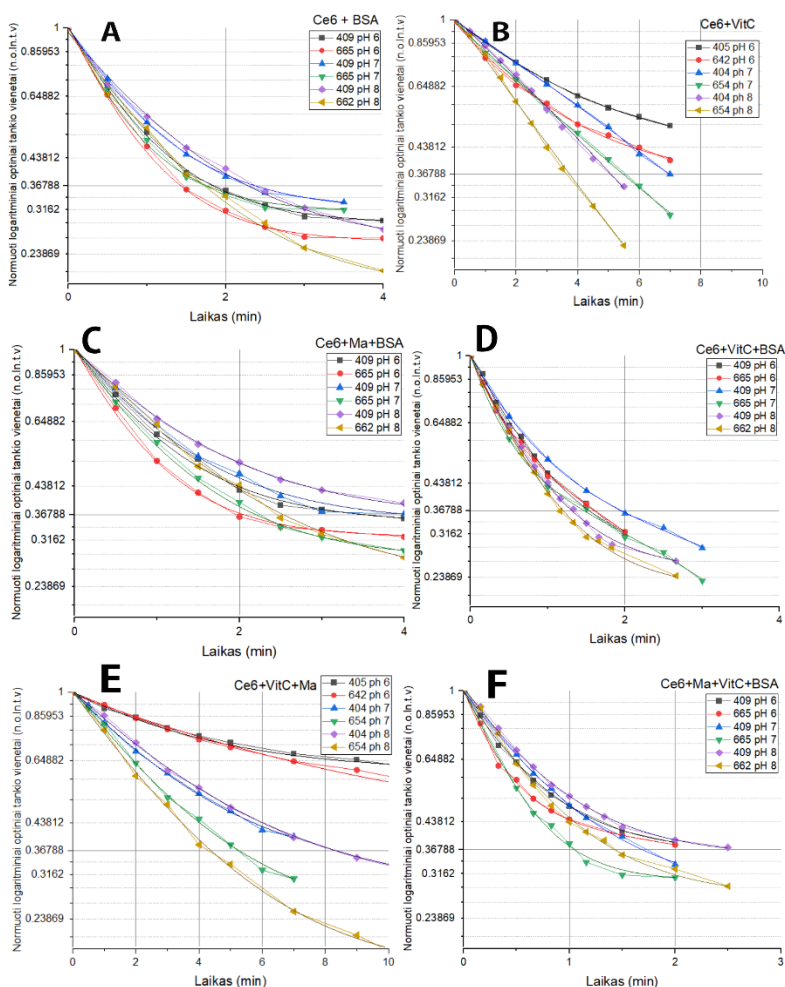


Pav.4.14. Chlorino e6, jaučio serumo albumino, askorbo rūgšties (Ce6+BSA+vitC), chlorino e6, jaučio serumo albumino (Ce6+BSA), chlorino e6, jaučio serumo albumino, Matcha arbatos ekstrakto (Ce6+BSA+MA) ir chlorino e6, jaučio serumo albumino, askorbo rūgšties, Matcha arbatos ekstrakto (Ce6+BSA+vitC+MA) kinetikos, ties Soret smailės maksimumu (A,C,E) ir ties Q(I) smailės maksimumu (B,D,F), per 4 minutes, pH 6 (A,B), pH 7(C,D), pH 8(E,F) buferinėse terpėse.

Sulašinus JSA į mišinius, stebimas medžiagų greitesnis blukimas, vietoje 10 minučių (Pav.4.13.(A-F)) mišiniai išblunka per 4 minutes (Pav.4.14.(A-F)).

Kai tirpale yra baltymo, bazinėje ir rūgštinėje terpėse greičiausiai išblunka mėginiai su chlorinu e6, askorbo rūgštimi ir Matcha arbatos ekstraktu, Soret sunyksta iki 0,39 % (kai pH6), 0,33 % (kai pH 7), o Q(I) – 0,37 % (pH6), 0,29 % (pH7) (Pav.4.14.(A-D)), priešinga tendencija matosi, kai tirpale nėra baltymo ir terpės pH 6 (Pav.4.13.(A,B)).

Į šarminėje buferinėje terpėje, esantį chlorino e6 ir askorbo rūgšties mišinį, įlašinus baltymo ir mišinį švitinant, jis išblunka greičiausiai lyginant su kitomis kinetikomis (Pav.4.14.(E,F)).



Pav.4.15. Chlorino e6, jaučio serumo albumino (Ce6+BSA), chlorino e6, askorbo rūgšties (Ce6+VitC), chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto, jaučio serumo albumino (Ce6+Ma+BSA), chlorino e6, askorbo rūgšties, jaučio serumo albumino (Ce6+VitC+BSA), chlorino e6, askorbo rūgšties, Matcha arbatos ekstrakto (Ce6+vitC+Ma) ir chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto, askorbo rūgšties, jaučio serumo albumino (Ce6+Ma+VitC+BSA) kinetikos logaritminėje skalėje, ties Soret ir Q(I) smailėmis, per 10 minučių (B,E), 4 minutes (A,C,D) ir 3 minutes (F), pH 6 - pH 8 buferinėse terpėse.

Iš kinetikos grafikų matosi, kad kai mišiniuose, terpei šarmėjant atstumas tarp Soret ir Q(I) kinetikų didėja – jos blunka netolygiai, (Pav.4.8(D), Pav.4.9(D), Pav.4.15(A-F)).

Mažiausias skirtumas tarp Soret ir Q(I) juostų yra chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto ir askorbo rūgšties tirpale, ir chlorino e6 askorbo rūgšties tirpale, rūgštinėje terpėje. Švitinant 5 minutes, chlorino e6, Matcha arbatos ekstrakto ir askorbo rūgšties tirpalą, Soret juosta sunyksta iki Soret sunyksta iki 0,71 %, Q(I) – 0,70 % , bet tirpalą švitinant ilgiau atsiranda didesnis skirtumas tarp Soret ir Q(I) juostų, po 9 minučių švitinimo Soret juosta sumažėja iki 0,65 %, o Q(I)- 0,61 % (Pav.4.15.(E)). Švitinant rūgštinėje terpėje, Chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalą po 30 sekundžių Soret juosta sunyksta iki 0,63 % , Q(I) – 0,61 % , švitinant 2 minutes Soret juosta sunyksta iki 0,31 % , o Q(I) iki 0,32 % (Pav.4.15.(D)).

5. APTARIMAS

Ištirus mėginius pastebėta pH įtaka Matcha žaliosios arbatos ekstrakto, chlorino e6 ir askorbo rūgšties spektrinėms charakteristikoms, JSA sugerties spektro smailės, keičiantis pH, nekinta (Pav.4.1.(A-D)).

Literatūroje teigiama, kad katechinų sugerties smailės maksimumai distiliuotam vandenyje yra ties – EGCG – 273,6 nm, ECG – 276,8 nm, EGC – 269,6 nm ir EC – 278,4 nm (Atomssa ir kt., 2015). Šiame eksperimente tirto Matcha arbatos ekstrakto pagrindinė sugerties smailė, skirtingose pH, yra ties - 288 nm (pH 6), 279 nm (pH 7), 276 nm (pH 8) (Pav.4.1.(A)). Tai rodo, kad arbatos ekstrakto yra katechinų bei kitų vandenyje tirpių medžiagų. Chlorofilo a sugerties spektro smailės yra ties 430 nm ir 662 nm etanolyje (Ustin ir kt., 2009). Išmatuotame Matcha arbatos spektre sugerties smailė yra ties 670 nm (Pav.4.1.(A)), kas gali būti dėl to, kad arbatos ekstraktas yra matuotas vandeninėje terpėje.

Paveikslėlyje 4.1. (D), kai terpės pH 7, chlorino e6 Soret juosta yra ties 404 nm, Q(I) ties 654 nm. Tokie pat rezultatai pateikiami ir literatūroje. Chlorino e6 smailės fosfato buferyje (pH 7) yra ties 404 nm, 654 nm (Skripka, Dapkutė ir kt., 2019).

Taip pat, kai buferinė terpė šarmėja, yra stebimas Soret ir Q(IV) juostos poslinkis į trumpabangę pusę, o Q(I) juosta pasislenka į ilgabangę pusę (Pav. 4.1.(D)). Lyginant su šarmine terpe, rūgštinėje terpėje yra stebimas sugerties smailių optinio tankio sumažėjimas (Pav. 4.1.(D)). Literatūroje teigiama, kad šie pokyčiai rodo, kad chlorinas e6 rūgštinėje terpėje pradeda formuoti agregatus (Čunderlíková, Gangeskar ir Moan, 1999).

Chlorinas e6 nėra fotostabili medžiaga – literatūroje teigiama, kad po penkių minučių medžiagos švitinimo stebimas didelis sugerties smailių optinio tankio sumažėjimas (Bhatta ir kt., 2019). Tai matosi ir eksperimente, kai chlorinas e6 yra pH 6 -8 buferinėje terpėje (Pav.4.8.(A-C)).

Sulašinus Matcha žaliosios arbatos ekstraktą į chlorino e6 tirpalą ir išmatavus mišinio sugerties spektrus skirtingose buferinėse terpėse. Iš skirtuminių spektrų matosi, kad tirpaluose esančios medžiagos neatitinka adityvumo principų (Pav.4.4.(A-C)).

Iš mišinių švitinimo kinetikų matosi Matcha arbatos ekstrakto esančių medžiagų sąveika su chlorinu e6 (Pav.4.13.(A-F)). Švitinant chloriną e6, jo sugerties spektro smailės išblunka sparčiau, nei chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto mišinio sugerties smailės (Pav.4.13.(A-F)). Iš kinetikų matosi, kad arbatos ekstrakto esantys katechinai apsaugo chloriną e6 nuo fotoblukimo.

Paveikslėlyje 4.2. (A) iš grafiko stebima, kad Matcha žaliojoje arbatoje esantys katechinai sąveikauja su chlorinu e6, keičiant terpės pH, Matcha arbatos smailės išlieka ties 279 nm, tik terpei šarmėjant auga sugerties smailė ties 322nm.

Iš logaritminių grafikų matosi, terpei šarmėjant chlorino e6 Soret ir Q(I) juostos blunka netolygiai (Pav.4.8(D), Pav.4.9(D), Pav.4.15(A-F)). Chlorinas e6 geriausiai tirpsta šarme, o ne vandeninėse terpėse (Paul, Heng ir kt., 2018). Chlorinas e6 rūgštinėje terpėje agreguoja, švitinant chloriną e6, Soret juosta nyksta, bet agregatai irgi skyla papildydami Soret juosta, dėl to skirtumas tarp Q(I) ir Soret kinetikų yra mažiausias.

pH 7 buferinėje terpėje gali vykti tarpiniai procesai, švitinant chloriną e6 arba chlorino e6 ir antioksidantų mišinį, pastebima, kad Soret ir Q(I) juostos pradeda nykti greitai kaip ir pH 8 buferinėje terpėje, bet po to pradeda lėtėti ir kinetika tampa panašesnė į pH 6 (Pav.4.8(D). Pav.4.15(E))

Į chlorino e6 tirpalą įlašinus JSA tirpalo, šios medžiagos tarpusavyje sąveikauja ir formuoja kompleksą – chlorino e6 Soret ir Q juostos slenkasi į ilgabangę pusę (Pav.4.5(A-C)) ir jų maksimumai nesikeičia, keičiant terpės pH (Pav.4.2(B)).

Kai terpė rūgštinė arba bazinė ir mišinyje yra JSA, chlorino e6, Matcha ekstrakto, askorbo rūgšties mišinys išblunka greičiausiai, švitinant 2 minutes Soret sumažėja iki 0,38 % (pH 6), 0,33 % (pH 7), o Q(I) – 0,37 % (pH 6), 0,30 % (pH 7) Pav.4.14.(A-D)).

Kai tirpale nėra JSA ir terpės pH 6 iš kinetikų galime spręsti, kad chlorino e6, askorbo rūgšties ir Matcha ekstrakto mišinys sunyksta lėčiausiai (Pav.4.13.(A-B)). Bet pakeitus terpę į šarminę arba sulašinus į JSA tirpalo, askorbo rūgštis tampa ne tokia stabili ir greičiau oksiduojasi, ir tai greitina chlorino e6 sugerties smailų fotoblukimą (Pav.4.13.(C-F)), Pav.4.14.(A-F)).

Askorbo rūgštis pH 8 buferinėje terpėje turi dar vieną smailę ties 329 nm tai gali būti oksidacinė kreivė. Literatūroje teigiama, kad askorbo rūgštį laikant modeliniame vyne (pH 3,4), kai ji oksiduojasi mažėja smailė ties 245 nm ir auga smailė ties 300 nm (Bradshaw, 2001). Šarminėje terpėje askorbo rūgšties sugerties spektro smailų blukimas vyksta dar greičiau, nes vitaminas C yra rūgštis.

IŠVADOS

Išmatavus fotosensibilizatoriaus chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto, askorbo rūgšties ir jaučio serumo albumino atskirų tirpalų ir jų mišinio sugerties spektrus pH 6, pH 7, pH 8 buferiniuose tirpaluose nustatyta, kad:

Katechinai geriausiai apsaugo chloriną e6 nuo blukimo, kai terpė neutrali, šarminė arba tirpale yra JSA.

Kai terpė rūgštinė, askorbo rūgštis skatina chlorino e6 redukciją, o į chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalą įmaišius Matcha ekstrakto, katechinai sąveikauja su askorbo rūgštimi ir apsaugo chloriną e6 nuo oksidacijos, geriau nei vieni katechinai.

pH 7 terpėje, katechinai sulėtina chlorino e6 oksidaciją, kaip ir askorbo rūgštis, bet chloriną e6, Matcha ekstraktą ir askorbo rūgštį sumaišius kartu, mišinys chloriną e6 apsaugo mažiau, nei vieni katechinai.

Šarminėje terpėje askorbo rūgštis pagreitina chlorino e6 fotoblukimą, o katechinai sulėtina. Chlorino e6, vitamino C ir Matcha ekstrakto mišinyje, katechinai sąveikauja su vitaminu C bandant jį neutralizuoti ir apsaugoti chloriną e6 nuo oksidacijos.

Kai tirpale yra JSA, chlorino e6 oksidacija vyksta greičiau nei chlorino e6 vandeninėse terpėse. Visuose trejuose pH katechinai apsaugo chloriną nuo oksidacijos. Į chlorino e6, JSA mišinį įdėjus askorbo rūgšties, stebima, kad askorbo rūgštis greitina chlorino e6 fotoblukimą. O kai į chlorino e6, JSA, ir askorbo mišinį įdedama Matcha ekstrakto pH 8 buferinėje terpėje, katechinai sąveikauja su askorbo rūgštimi, ir bando apsaugoti chloriną e6 nuo oksidacijos.

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Fotonikos ir nanotechnologijų institutas

Gailė Litvaitytė

NATŪRALIŲ ANTIOKSIDANTŲ POVEIKIO CHLORINO E6 FOTOCHEMINIAMS VIRSMAMS TYRIMAS SKIRTINGO pH VANDENINĖSE MODELINĖSE TERPĖSE

MAGISTRANTŪROS STUDIJŲ BAIGIAMASIS DARBAS

Fotonikos ir nanotechnologijų magistro studijų programa

Santrauka

UV-Vis sugerties spektroskopija yra fizikinis metodas skirtas tirti skaidrių tirpalų savybes. Iš išmatuotų sugerties spektrų galima nustatyti, kiek ir kokių medžiagų yra tirpale, kaip jos sąveikauja tarpusavyje arba reaguoja į vandeninę modelinę terpę.

Taip pat matuojant tirpalo sugerties spektrą po kiekvieno švitinimo, galima stebėti, kaip medžiagos reaguoja į spinduliuotę ir kaip jos tarpusavyje sąveikauja.

Tyrimo tikslas buvo nustatyti, kokios yra chlorino e6 ir Matcha arbatos ekstrakto spektrinės savybės, ir kaip jos keičiasi skirtingo pH buferinėse vandeninėse terpėse, taip pat ištirti, kaip keičiasi šios spektrinės savybės pridėjus jaučio serumo albumino ir askorbo rūgšties, ir koks yra mėlyno diodo spinduliuotės poveikis tiriamosioms medžiagoms.

Ištirta, kad katechinai geriausiai apsaugo chloriną e6 nuo blukimo, kai terpė bazinė, šarminė arba tirpale yra JSA.

Kai terpė rūgštinė, askorbo rūgštis skatina chlorino e6 redukciją, o į chlorino e6 ir askorbo rūgšties tirpalą įmaišius Matcha ekstrakto, katechinai sąveikauja su askorbo rūgštimi ir apsaugo chloriną e6 nuo oksidacijos, geriau nei vieni katechinai.

Vilnius University
Faculty of Physics
Institute of Photonics and Nanotechnology

Gailė Litvaitytė

**STUDY OF THE EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON PHOTOCHEMICAL
TRANSFORMATIONS OF CHLORIN e6 IN AQUEOUS MODEL MEDIA OF
DIFFERENT pH**

MASTER THESIS

Master's degree programme in Photonics and Nanotechnology

Summary

UV-Vis absorption spectroscopy is a physical technique for studying the properties of transparent solutions. From the measured absorption spectra, it is possible to determine how much and what substances are present in a solution, how they interact with each other or react with an aqueous model medium.

Also, by measuring the absorption spectrum of the solution after each irradiation, it is possible to observe how the substances react to the radiation and how they interact with each other.

The aim of the study was to determine the spectral properties of chlorin e6 and Matcha tea extract and how they change in aqueous buffered media at different pH, to investigate how these spectral properties change with the addition of bovine serum albumin and ascorbic acid, and to investigate the effect of blue diode irradiation on the test substances.

It was found that catechins provide the best protection against photobleaching of chlorin e6 when the medium is basic, alkaline or contains BSA in solution.

When the medium is acidic, ascorbic acid aids in the reduction of chlorin e6, with the addition of Matcha extract to the solution of chlorin e6 and ascorbic acid allows the catechins to interact with the ascorbic acid and protect chlorin e6 from oxidation, better than catechins alone.

LITERATŪRA

1. *Absorption Spectroscopy - What is Absorption Spectroscopy* (2019) Ibsen Photonics A/S Ryttermarken. Available at: <https://ibsen.com/applications/spectroscopy/absorption-spectroscopy/> (Accessed: 17 June 2021).
2. Agostinis, P. *et al.* (2011) 'Photodynamic therapy of cancer: An update', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Wiley, 61(4), pp. 250–281. doi: 10.3322/caac.20114.
3. Atomssa, T., & Gholap, A. V. (2015) 'Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer', *academicjournals.org*, 7(1), pp. 22–31. Available at: <https://academicjournals.org/journal/JETR/article-abstract/08795B549703> (Accessed: 6 January 2022).
4. Baptista, J. A. B., Tavares, J. F. d. P. and Carvalho, R. C. B. (1998) 'Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 31(10), pp. 729–736. doi: 10.1016/S0963-9969(99)00052-6.
5. Bark, K. M. *et al.* (2011) 'Spectroscopic studies on the oxidation of catechin in aqueous solution', *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(9), pp. 3443–3447. doi: 10.5012/bkcs.2011.32.9.3443.
6. Baskaran, R., Lee, J. and Yang, S. G. (2018) 'Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications', *Biomaterials Research*. BioMed Central, 22. doi: 10.1186/S40824-018-0140-Z.
7. Bhatta, A. *et al.* (2019) 'Chlorin e6 decorated doxorubicin encapsulated chitosan nanoparticles for photo-controlled cancer drug delivery', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 136, pp. 951–961. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.06.127.
8. Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D. and Scollary, G. R. (2001) 'Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), pp. 934–939. doi: 10.1021/JF000782F.
9. Carr, A. C. and Frei, B. (1999) 'Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans', *The American journal of clinical nutrition*. Am J Clin Nutr, 69(6), pp. 1086–1107. doi: 10.1093/AJCN/69.6.1086.
10. Chakrawarti, L. *et al.* (2016) 'Therapeutic effects of EGCG: a patent review', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor and Francis Ltd, 26(8), pp. 907–916. doi: 10.1080/13543776.2016.1203419.
11. Clark, J. (2016) *absorption spectra - the Beer-Lambert Law*. Available at: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html> (Accessed: 8 May 2022).
12. Čunderlíková, B., Gangeskar, L. and Moan, J. (1999) 'Acid-base properties of chlorin e6: Relation to cellular uptake', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 53(1–3), pp. 81–90. doi: 10.1016/S1011-1344(99)00130-X.
13. Dai, T., Huang, Y. Y. and Hamblin, M. R. (2009) 'Photodynamic therapy for localized infections-State of the art', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Photodiagnosis Photodyn Ther, pp. 170–188. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
14. Douillard, S., Olivier, D. and Patrice, T. (2009) 'In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy', *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry, 8(3), pp. 405–413. doi: 10.1039/b817175k.
15. Eber, A. E. *et al.* (2021) 'Photodynamic Therapy For The Eye', *Lasers in dermatology and medicine: dermatologic applications*. StatPearls Publishing, pp. 261–273. doi: 10.1007/978-3-319-76118-3_16.

16. Ferrario, A. *et al.* (2011) 'Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness', *Lasers in surgery and medicine*. Lasers Surg Med, 43(7), pp. 644–650. doi: 10.1002/LSM.21081.
17. Forester, S. C. and Lambert, J. D. (2011) 'The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention', *Molecular Nutrition and Food Research*. NIH Public Access, pp. 844–854. doi: 10.1002/mnfr.201000641.
18. Gold, M. H. (2016) 'A Historical Look at Photodynamic Therapy', in, pp. 1–7. doi: 10.1159/000439327.
19. Granja, A., Pinheiro, M. and Reis, S. (2016) 'Epigallocatechin gallate nanodelivery systems for cancer therapy', *Nutrients*. MDPI AG, p. 307. doi: 10.3390/nu8050307.
20. Gregory, P. (2004) 'Metal Complexes as Speciality Dyes and Pigments', in *Comprehensive Coordination Chemistry II*. Elsevier Ltd, pp. 549–579. doi: 10.1016/B0-08-043748-6/09013-7.
21. Guo, H. *et al.* (2011) 'Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses, filoviruses, and arenaviruses', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), pp. 478–486. doi: 10.1128/AAC.00989-10.
22. Henderson, B. W. and Dougherty, T. J. (1992) 'How does photodynamic therapy works?', *Photochemistry and Photobiology*. Photochem Photobiol, pp. 145–157. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
23. Herbig, A. L. and Renard, C. M. G. C. (2017) 'Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 220, pp. 444–451. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.012.
24. Hestand, N. J. and Spano, F. C. (2015) 'Interference between Coulombic and CT-mediated couplings in molecular aggregates: H- to J-aggregate transformation in perylene-based π -stacks', *The Journal of chemical physics*. J Chem Phys, 143(24). doi: 10.1063/1.4938012.
25. Hestand, N. J. and Spano, F. C. (2018) 'Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 118(15), pp. 7069–7163. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.7B00581.
26. Hrycay, E. G. and Bandiera, S. M. (2015) 'Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer', in *Advances in Pharmacology*. Academic Press Inc., pp. 35–84. doi: 10.1016/bs.apha.2015.03.003.
27. Irmania, N. *et al.* (2020) 'Manganese-doped green tea-derived carbon quantum dots as a targeted dual imaging and photodynamic therapy platform', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. John Wiley and Sons Inc., 108(4), pp. 1616–1625. doi: 10.1002/jbm.b.34508.
28. Jahanban-Esfahlan, A. *et al.* (2019) 'Recent developments in the detection of bovine serum albumin', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 138, pp. 602–617. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.096.
29. Jain, R. *et al.* (2021) 'Fluorescence-based method for sensitive and rapid estimation of chlorin e6 in stealth liposomes for photodynamic therapy against cancer', *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 244. doi: 10.1016/J.SAA.2020.118823.
30. Josefsen, L. B. and Boyle, R. W. (2008) 'Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers', *Metal-Based Drugs*, 2008. doi: 10.1155/2008/276109.
31. Jung, Shin *et al.* (2019) 'Hyaluronic Acid-Conjugated with Hyperbranched Chlorin e6 Using Disulfide Linkage and Its Nanophotosensitizer for Enhanced Photodynamic Therapy of Cancer Cells', *Materials*. MDPI AG, 12(19), p. 3080. doi: 10.3390/ma12193080.

32. Kou, J., Dou, D. and Yang, L. (2017) 'Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(46), p. 81591. doi: 10.18632/ONCOTARGET.20189.
33. Kwak, S. Y. *et al.* (2007) 'Photodynamic therapy in combination with green tea polyphenol including EGCG enhances antitumor efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells', *Cancer Research*, 67(9 Supplement).
34. Layer, G. *et al.* (2010) 'Biosynthesis of heme and Vitamin B12', *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 7, pp. 445–499. doi: 10.1016/B978-008045382-8.00144-1.
35. Lee, H. L. *et al.* (1999) 'Generation of hydrogen peroxide by "antioxidant" beverages and the effect of milk addition. Is cocoa the best beverage?', *Free Radical Research*. Free Radic Res, 31(1), pp. 67–71. doi: 10.1080/10715769900300611.
36. Li, Y. and Schellhorn, H. E. (2007) 'New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C', *The Journal of nutrition*. J Nutr, 137(10), pp. 2171–2184. doi: 10.1093/JN/137.10.2171.
37. Lin, S. D. *et al.* (2010) 'Antioxidant properties of water extracts from parching green tea', *Journal of Food Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 34(3), pp. 477–500. doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00293.x.
38. Lin, Y. S. *et al.* (2003) 'Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 51(7), pp. 1864–1873. doi: 10.1021/jf021066b.
39. Ma, X. *et al.* (2016) 'A Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and In Vivo Biodegradation Tracking and Modeling', *Scientific Reports 2016 6:1*. Nature Publishing Group, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep19370.
40. 'Matcha Market Size, Share | Global Industry Trends Report, 2018 - 2025' (no date). Available at: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/matcha-market> (Accessed: 14 March 2021).
41. McKay, D. L. and Blumberg, J. B. (2002) 'The Role of Tea in Human Health: An Update', *Journal of the American College of Nutrition*. Routledge, 21(1), pp. 1–13. doi: 10.1080/07315724.2002.10719187.
42. Ota, M. and Yokoyama, M. (2010) 'Comprehensive Natural Products II', *Comprehensive Natural Products II*, pp. 317–349. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453828007280> (Accessed: 7 May 2022).
43. Padayatty, S. J. and Levine, M. (2016) 'Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks', *Oral Diseases*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(6), pp. 463–493. doi: 10.1111/ODI.12446.
44. Patwardhan, B. and Vaidya, A. D. B. (2010) 'Natural products drug discovery: Accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches', *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(3), pp. 220–227. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453828007280> (Accessed: 1 May 2022).
45. Paul, S. *et al.* (2013) 'Elucidation of monomerization effect of PVP on chlorin e6 aggregates by spectroscopic, chemometric, thermodynamic and molecular simulation studies', *Journal of Fluorescence*, 23(5), pp. 1065–1076. doi: 10.1007/s10895-013-1236-4.
46. Paul, S., Heng, P. W. S. and Chan, L. W. (2013) 'Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy', *Journal of Fluorescence*. Springer, 23(2), pp. 283–291. doi: 10.1007/s10895-012-1146-x.
47. Paul, S., Heng, P. W. S. and Chan, L. W. (2018) 'Improvement in dissolution rate and photodynamic efficacy of chlorin e6 by sucrose esters as drug carrier in

- nanosuspension formulation: optimisation and in vitro characterisation', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Oxford Academic, 70(9), pp. 1152–1163. doi: 10.1111/JPHP.12947.
48. Qi, H. *et al.* (2014) '(-)-epigallocatechin-3-gallate ameliorates photodynamic therapy responses in an in vitro T lymphocyte model', *Phytotherapy Research*. Phytoter Res, 28(10), pp. 1486–1491. doi: 10.1002/ptr.5152.
 49. Raish, M. *et al.* (2010) 'Photodynamic therapy in combination with green tea polyphenol EGCG enhances antitumor efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells', *Journal of Applied Research*, 10(2), pp. 58–67. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/221705944> (Accessed: 16 June 2021).
 50. Ranatunga, M. *et al.* (2021) 'NIR Spectroscopic Determination of Polyphenol Content in Teas and Tea Extract at 2142 nm', *Sensors and Materials*, 33, p. 1. doi: 10.18494/SAM.2021.3087.
 51. S, S. (1933) 'Free radicals', *Nature*. Elsevier, 132(3339), pp. 665–667. doi: 10.1038/132665a0.
 52. Saklar, S. *et al.* (2015) 'Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions', *Journal of Food Science and Technology*. Springer India, 52(10), pp. 6639–6646. doi: 10.1007/s13197-015-1746-y.
 53. Sarkar, D., Das, S. and Pramanik, A. (2014) 'A solution spectroscopy study of tea polyphenol and cellulose: Effect of surfactants', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 4(68), pp. 36196–36205. doi: 10.1039/c4ra04171b.
 54. Shankar, S., Marsh, L. and Srivastava, R. K. (2013) 'EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHRL1/FOXO3a and neuropilin', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer, 372(1–2), pp. 83–94. doi: 10.1007/s11010-012-1448-y.
 55. Singh, T. and Katiyar, S. K. (2013) 'Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in human skin cancer cells by targeting β -catenin signaling', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Academic Press, 273(2), pp. 418–424. doi: 10.1016/j.taap.2013.09.021.
 56. Skripka, A. *et al.* (2018) 'Impact of Quantum Dot Surface on Complex Formation with Chlorin e6 and Photodynamic Therapy', *Nanomaterials 2019, Vol. 9, Page 9*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(1), p. 9. doi: 10.3390/NANO9010009.
 57. Song, Q. *et al.* (2014) 'Enhanced uptake and transport of (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate in niosomal formulation by human intestinal caco-2 cells', *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd., 9(1), pp. 2157–2165. doi: 10.2147/IJN.S59331.
 58. Spikes, J. D. (1990) 'New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 6(3), pp. 259–274. doi: 10.1016/1011-1344(90)85096-F.
 59. Steinberg, F. M. and Rucker, R. B. (2013) 'Ascorbic Acid'. doi: 10.1201/b15413-15.
 60. Thyagarajan, A. and Sahu, R. P. (2018) 'Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization', *Integrative Cancer Therapies*. SAGE Publications, 17(2), p. 210. doi: 10.1177/1534735416681639.
 61. Torkhovskaya, T. I. *et al.* (2021) 'Chlorin e6 embedded in phospholipid nanoparticles equipped with specific peptides: Interaction with tumor cells with different aminopeptidase N expression', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l., 134, p. 111154. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111154.
 62. Tsutsumi-Arai, C. *et al.* (2019) 'Effectiveness of 405-nm blue LED light for degradation of Candida biofilms formed on PMMA denture base resin', *Lasers in Medical Science*. Springer London, 34(7), pp. 1457–1464. doi: 10.1007/S10103-019-02751-2.
 63. Ustin, S. L. *et al.* (2009) 'Retrieval of foliar information about plant pigment systems

- from high resolution spectroscopy', *Ustin, S L; Gitelson, A A; Jacquemoud, S; Schaepman, Michael; Asner, G P; Gamon, J A; Zarco-Tejada, P (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. Remote Sensing of Environment, 113(1):S67-S77. Elsevier, 113(1), pp. S67–S77. doi: 10.1016/J.RSE.2008.10.019.*
64. 'UV-Visible Spectroscopy' (2006) in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. doi: 10.1002/0470862106.id827m.
 65. Wandam (2020) 361 緑茶の紫外可視吸収スペクトル. Available at: <http://wandam.sakura.ne.jp/korekushon/361ryokuchaspectrum.html> (Accessed: 21 April 2021).
 66. Wang, C. *et al.* (2019) 'Bacteria-activated chlorin e6 ionic liquid based on cation and anion dual-mode antibacterial action for enhanced photodynamic efficacy', *Biomaterials Science*. The Royal Society of Chemistry, 7(4), pp. 1399–1410. doi: 10.1039/c8bm00990b.
 67. Wang, H. and Chu, P. K. (2013) 'Surface Characterization of Biomaterials', *Characterization of Biomaterials*. Academic Press, pp. 105–174. doi: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00004-8.
 68. Weiss, D. J. and Anderton, C. R. (2003) 'Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1011(1–2), pp. 173–180. doi: 10.1016/S0021-9673(03)01133-6.
 69. Xie, C. *et al.* (2017) 'Wnt/ β -catenin pathway mediates (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 482(1), pp. 15–21. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.038.
 70. Yang, C. S. *et al.* (2000) 'Tea and tea polyphenols in cancer prevention', in *Journal of Nutrition*. American Institute of Nutrition. doi: 10.1093/jn/130.2.472s.
 71. Yang, J. and Liu, R. H. (2013) 'The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea', *International Journal of Food Science & Technology*. John Wiley & Sons, Ltd, 48(1), pp. 163–171. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03173.x.
 72. Zhao, L. *et al.* (2016) 'Efficient delivery of chlorin e6 into ovarian cancer cells with octalysine conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for effective photodynamic therapy', *Journal of Materials Chemistry B*. Royal Society of Chemistry, 4(47), pp. 7741–7748. doi: 10.1039/C6TB01988A.
 73. Zheng, W. *et al.* (1996) 'Tea consumption and cancer incidence in a prospective cohort study of postmenopausal women', *American Journal of Epidemiology*, 144(2), pp. 175–182. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008905.