

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

JUSTĖ TAMOŠIŪNAITĖ

(Biofizikos studijų programa)

Magistro baigiamasis darbas

**KONCENTRACINIS GESINIMAS CHLOROFILO IR CINKO
FTALOCIANINO TIRPALUOSE BEI PLĖVELĖSE**

Studentė _____
(parašas)

Darbo vadovė Dr. Simona Streckaitė

(parašas)

Vilnius, 2022

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Fluorescencijos parametrai	6
1.2 Fluorescencijos gesinimas	8
1.3 Koncentracinis fluorescencijos gesinimas	9
1.4 Chlorofilai. Chlorofilas a.	9
1.5 Koncentracinis chlorofilų gesinimas.....	10
1.6 Ftalocianinai. Cinko ftalocianinas.	12
1.7 Ftalocianinų ir chlorofilų panašumai	13
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	14
2.1 Mėginių paruošimas	14
2.2 Įranga	15
2.3 Plėvelių gaminimo metodas	16
2.4 Rezultatų patikimumas.....	17
2.4.1 TB-ZnPC plėvelių degradavimas.....	18
3. TYRIMŲ REZULTATAI.....	21
3.1 Tirpalų mėginiai.....	21
3.2 Plonų plėvelių mėginiai	25
4. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS.....	31
IŠVADOS.....	33
SANTRAUKA	34
SANTRAUKA ANGLŲ KALBA	35
AUTORĖS DALYVAVYMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE	36
LITERATŪRA.....	37
PADĖKA.....	42

SANTRUMPOS

Chl – chlorofilas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

ET – energijos pernaša;

IRF – instrumento atsako funkcija;

MCA – daugiakanalis analizatorius;

MeOH – metanolis;

MPc – metalo ftalocianinas;

Pc – ftalocianinas;

PMMA – polimetilmetakrilatas;

TAC – laiko ir amplitudės keitiklis;

TB-ZnPC – cinko 2,9,16,23-tetra-tert-butil-29H,31H-ftalocianinas;

TCSPC – laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas;

ZnPc – cinko ftalocianinas.

ĮVADAS

Fluorescencijos gesinimas, apibūdinamas kaip bet koks procesas, sumažinantis tiriamo objekto fluorescencijos intensyvumą bei kvantinį našumą. Jį gali sukelti molekulinės sąveikos, tokios kaip sužadintos būsenos reakcijos, molekuliniai persitvarkymai, energijos pernaša, nefluorescuojančių kompleksų susidarymas ir molekulių susidūrimai (Eftink, 2002). Kuomet emisijos intensyvumas stipriai mažėja, didėjant molekulių koncentracijai, vyksta fluorescencijos koncentracinis gesinimas (Watson & Livingston, 1950). Tačiau koncentracinio gesinimo vyksmas vis dar nėra visiškai suprantamas. Tyrimų rezultatai rodo, kad gesinimą lemia pigmento molekulių dimerizacija, energijos pernaša į nefluorescuojančius dimerus ir molekulių susidūrimai (Bae et al., 2021; Hamann et al., 2002). Dėl porfirinų taikymo molekulinį elektroninių prietaisų gamyboje, ypač saulės ir dirbtiniuose fotosintetiniuose prietaisuose, kur reikalinga didelė molekulių koncentracija efektyviam šviesos surinkimui, svarbu tirti šių molekulių savigesinimo reiškinį (Chen, 2004; Ghosh et al., 2013).

Koncentracinis gesinimas aktualus ir biologijoje (Watson & Livingston, 1950). Pastebėta, jog chlorofilo molekulių tirpalų tyrimuose fluorescencijos intensyvumas ypač priklauso nuo jų koncentracijos. Molekulinėse sistemose naudojant chloroplastuose esančią 0,1 M chlorofilo koncentraciją, *in vitro* tyrimai parodė ženklų fluorescencijos intensyvumo sumažėjimą, lyginant su *in vivo* tyrimų rezultatais. Viena iš hipotezių, paaiškinanti chlorofilų koncentracinį gesinimą, yra statistinių porų modelis. Jame laikoma, kad dvi artimai išsidėsčiusios molekulės gali sąveikauti, kuomet bent viena iš jų yra sužadinama, taip sudarant statistinę porą, kuri gali elgtis kaip gesinimo centras (Beddard & Porter, 1976; Knox, 1994; Shi et al., 2013).

Chlorofilų molekulės yra brangios ir labai jautrios aplinkos veiksniams. Dėl šių priežasčių, molekulių tyrimams patogiau taikyti modelinę sistemą, kuri leistų atlikti išsamesnę chlorofilo molekulių sistemos analizę. Atsižvelgus į molekulės struktūrą ir spektrinius parametrus, tyrimams buvo pasirinkta cinko ftalocianino molekulė. Šie pigmentai plačiai tyrinėjami įvairiose srityse – nuo optoelektronikos (Chaabene et al., 2019) iki biomedicininos (Sekkat et al., 2012).

Molekulių koncentraciniam gesinimui tirti buvo pasirinktos dvi sistemos – tirpalai ir plonos plėvelės. Nors plonų plėvelių storis yra žymiai mažesnis, tačiau jose tirpiklis būna išgaravęs ir molekulės išsidėsto daug mažesniais atstumais. Atlikus abiejų sistemų spektroskopinius matavimus chlorofilo ir cinko ftalocianino molekulėms gauti šviesos sugerties ir fluorescencijos spektrai bei fluorescencijos kinetikos, kurie buvo palyginti. Be to, kinetikoms aprašyti buvo taikoma ištemptoji eksponentinė funkcija, kas leido patogiai charakterizuoti daugiaeksponentinį gesinimą.

Darbo tikslas: ištirti ir palyginti chlorofilo a ir cinko ftalocianino koncentracinį gesinimą skirtingose molekulių aplinkose – tirpaluose ir plėvelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino šviesos sugertį tirpaluose ir plėvelėse;
2. Nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino fluorescencijos spektrus tirpaluose ir plėvelėse;
3. Nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino fluorescencijos kinetikas tirpaluose ir plėvelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Fluorescencijos parametrai

Liuminescencija, tai šviesos spinduliavimas fluoroforų turinčioje medžiagoje, vykstantis iš elektroniškai sužadintų būsenų, kuri, priklausomai nuo sužadintos būsenos pobūdžio, skirstoma į fluorescenciją ir fosforescenciją. Pastaroji vyksta iš žemiausios sužadintos tripletinės būsenos, o fluorescencija – iš žemiausios sužadintos singuletinės būsenos. Pagrindinės būsenos orbitalės elektronas būna suporuotas su kitu priešingo sukinio elektronu ir sužadintas jis peršoka į sužadintą singuletinę būseną. Grįžimas iš sužadintos į pagrindinę būseną yra leistinas ir vyksta greitai (sparta – 10^8 s^{-1}) išspinduliuojant fotoną (Lakowicz & Masters, 2008, p. 1).

Fluorescencija apibūdinama tokiais parametrais kaip intensyvumas, kvantinis našumas ir gyvavimo trukmė. Tam tikro bangos ilgio fluorescencijos intensyvumas I_F lygus emisijos metu išspinduliuojamų fotonų skaičiui n , padaugintam iš fotono energijos E :

$$I_F = nE. \quad (1)$$

Fluorescencijos kvantinis našumas Φ_F yra lygus fluorescencijos spinduliuojamų fotonų skaičiui, padalintam iš sugertų fotonų skaičiaus, tad Φ_F ir I_F yra proporcingi vienas kitam. Kuo didesnis kvantinis našumas, tuo intensyvesnė emisija (Lakowicz & Masters, 2008, p. 9). Pagal (2) lygtį, Φ_F gali būti išreikštas pasinaudojus relaksacijos sparta k_r ir nespindulinės relaksacijos sparta k_{nr} , apimančiomis galimus konkuruojančius vyksmus, tokius kaip vidinė konversija, interkombinacinė konversija bei kitus tarpmolekulinius gesinimo mechanizmus (Sauer et al., 2011).

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}. \quad (2)$$

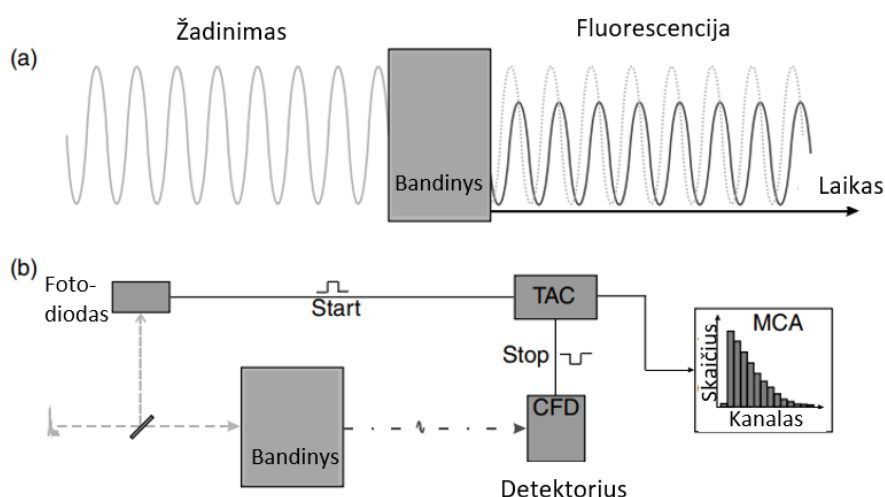
Fluorescencijos gyvavimo trukmė τ_F nurodo charakteringą laiką (3), kuri fluoroforas praleidžia sužadintoje būsenoje. Fluoroforo fluorescencijos gyvavimo trukmę galima apibūdinti ir kaip sužadintų fluoroforų skaičiaus sumažėjimą, praėjus tam tikram laikui po optinio sužadinimo be galo trumpu šviesos impulsu (δ impulsu). Konkrečiau, fluorescencijos gyvavimo trukmę galima nustatyti išmatuojant laiką, per kurį fluorescencijos intensyvumas pasiekia $1/e$ pradinės I_F ($t = 0$) vertės, kai optiniam sužadinimui naudojamas δ impulsas. (Albani, 2004; Sauer et al., 2011).

$$\tau_F = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \quad (3)$$

Du pagrindiniai fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimo metodai yra impulsų arba fotonų skaičiavimas ir fazės moduliacija. Vietoje sužadinimo šviesos impulsais, kurių trukmė žymiai trumpesnė už mėginio fluorescencijos gyvavimo laiką, fazės moduliacijos metodo metu mėginys sužadinamas šviesa, kurios intensyvumas moduluojamas sinusoidiškai. Mėginio stimuliuota emisija tiesiogiai seka sužadinimo moduliaciją, o dėl ribotos fluorescencijos trukmės spinduliuotės

moduliavimo fazė šiek tiek vėluoja, lyginant su sužadiniu. Kadangi fazės moduliavimo metodai neveikia matuojant fluorescencijos trukmę pavienėms molekulėms, dažniausiai naudojamas impulsinis metodas (Sauer et al., 2011).

Impulsinis metodas, tai laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas (TCSPC), pasižymi dideliu jautrumu. Pagrindinis aparatūros komponentas yra laiko ir amplitudės keitiklis arba TAC. Šis prietaisas aptinka ateinantį impulsą iš sužadavimo šviesos, ir šiek tiek vėliau antrą impulsą – emisijos metu išspinduliuotą fotoną. TAC konvertuoja laiką tarp gautų abiejų impulsų į įtampą. Išėjęs įtampos signalas naudojamas daugiakanaliniame analizatoriuje MCA, kur registruojamas signalų skaičius pagal gautą įtampą. MCA naudoja kintamą kanalų skaičių, dažniausiai nuo 512 iki 4096 kanalų, kurie nustato kanalus, pagal iš TAC gautą įtampą, ir juose aptinkamus skaičius. Kai TAC aptinka kitą impulsų porą, skaičius registruojamas kitame arba tame pačiame kanale, priklausomai nuo laiko skirtumo tarp impulsų. Procesas kartojamas, kol aptinkama vis daugiau impulsų porų ir taip gaunama laiko pasiskirstymo histograma (Jameson, 2014; Sauer et al., 2011).



1.1 pav. Fluorescencijos gyvavimo laikų registravimo metodų veikimo principai. a) fazės moduliacija; b) laike koreliuotas vieno fotonų skaičiavimas (TCSPC). Adaptuota pagal (Sauer et al., 2011).

Akivaizdu, kad gyvavimo trukmės nustatymo tikslumas priklausys nuo bendro atkeliausių signalų skaičiaus, užregistruotų MCA. Dėl to gali prireikti net kelių tūkstančių signalų, tiksliai rezultatams gauti. Idealiu atveju mėginio skleidžiamas fluorescencijos intensyvumas turėtų būti labai mažas, tai yra, kas kelis šimtus sužadavimo lazerio impulsų stebimas vienas emisijos fotonas, kad būtų išvengta susikaupimo efektų. TCSPC matavimų skiriamąją gebą riboja perėjimų laiko sklaida detektoriuje, detektoriaus impulsų priimančio diskriminatoriaus laiko tikslumas ir laiko matavimų tikslumas (Jameson, 2014; Sauer et al., 2011).

1.2 Fluorescencijos gesinimas

Neretai pasitaikantis reiškinys – fluorescencijos gesinimas, kuris apibūdinamas, kaip bet koks procesas, kurio metu sumažėja tiriamo objekto fluorescencijos intensyvumas, o taip pat ir kvantinis našumas. Šį reiškinį gali sukelti įvairios molekulinės sąveikos, kaip sužadintos būsenos reakcijos, molekuliniai persitvarkymai, energijos pernaša (Eftink, 2002). Papildomų išorinių molekulių įtraukimas į fluorescencinę sistemą, gali nuslopinti fluorescencijos intensyvumą, taigi ir kvantinį našumą. Šios pridėtinės molekulės sumažina emisijos intensyvumą susidūrusios su fluoroforu arba sudarydamos nefluorescuojantį kompleksą su juo. Pirmuoju atveju kalbama apie dinaminį gesinimą, o antruoju – apie statinį gesinimą (Albani, 2004).

Pavyzdžiui, tiriamas tirpalas turi nekintantį fluoroforų kiekį, o fluorescencijos gyvavimo trukmė yra vienoda visoms tirpale esančių fluoroforų molekulėms. Kuomet stebimas statinis gesinimas, kai kurios fluoroforo molekulės prisijungia prie kitų tirpalo molekulių, nors tiesioginė fizinė sąveika tarp fluoroforo ir gesinimą lemiančių molekulių nėra būtina, o susidaręs kompleksas nefluorescuoja. Gaunasi, jog molekulių, kurios vis dar fluorescuoja, ir nėra komplekso dalis, skaičius mažesnis nei prieš komplekso susidarymą. Tačiau net ir po komplekso susidarymo visų tirpalo molekulių fluorescencijos gyvavimo trukmė išlieka tokia pati. Taigi, vykstant statiniam gesinimui, fluorescencijos intensyvumas ir kvantinis našumas mažėja, o fluorescencijos gyvavimo laikas nesikeičia. (Albani, 2004).

Fluoroforo ir gesiklio susidūrimas lemia fluoroforo energijos praradimą. Taigi, dinaminis gesinimas sukelia dalinį energijos praradimą fluoroforo molekulėms, kurios susiduria su gesiklio molekulėmis, o tai lemia jų fluorescencijos trukmės sumažėjimą, lyginant su molekulėmis, nedalyvaujančiomis dinaminiam procese. Todėl vidutinė fluorescencijos trukmė, išmatuota esant dinaminiam gesinimui, bus mažesnė nei vidutinė gyvavimo trukmė be šio proceso. Bendrai tariant, dinaminio gesinimo metu sumažėja fluorescencijos intensyvumas, kvantinis našumas ir gyvavimo trukmė (Albani, 2004).

Fluorescenciniam gesinimui vykti reikalingos artimo atstumo tarpmolekulinės sąveikos. Todėl gesinimo mastas priklauso nuo molekulinų veiksmų, lemiančių sąveikos trukmę ir tikimybę. Tačiau rezonansinė energijos pernaša, sąveika vykstanti per didesnius atstumus, nėra jautri šiems veiksmams (Lakowicz & Masters, 2008, p. 331). Šis reiškinys taip pat vadinamas fluorescencijos arba Fiersterio energijos pernaša (FRET), kuomet energijos pernaša (ET) per atstumą vyksta tarp dviejų molekulių – donoro (sužadinto fluoroforo) ir akceptoriaus (chromoforo arba fluoroforo). Energija perduodama rezonanso būdu, tai yra sužadintos molekulės elektronas indukuoja osciluojantį elektrinį lauką, kuris sužadina akceptorinius elektronus. Dėl šio energijos perdavimo sumažėja fluorescencijos intensyvumas ir kvantinis našumas, tad tai laikoma dinaminio gesinimo tipu (Albani, 2004).

1.3 Koncentracinis fluorescencijos gesinimas

Koncentracijos gesinimas, arba agregacijos sukeltas gesinimas, vyksta, kuomet padidinus fluoroforo koncentraciją, sistemos fluorescencijos kvantinis našumas žymiai sumažėja (Dexter & Schulman, 1954). Koncentracijos gesinimas gali vykti įvairiose sistemose, pavyzdžiui, kristaluose, stikluose, skystuose dažų tirpaluose ir kt. Bendrai tariant, tai vyksta išsklaidant sužadavimo energiją, jai migruojant per sistemą, kurioje yra priemaišų centrų. Sužadavimo energija migruoja tarp sistemoje esančių molekulių ir atsitiktinai bei tolygiai pasiskirsto kietoje arba skystoje terpėje. Dėl to palengvėja sužadavimo ET link svetimų priemaišų – akseptorių, kurios šiuo atveju yra veiksmingi gesikliai. Didėjant donorų centrų koncentracijai, mažėja atstumas tarp jų, sustiprėja sąveika, atsakinga už FRET. Tai pagreitina sužadavimo migraciją ir sumažina laiką, reikalingą pasiekti akseptorių, kuriam energija perduodama negrįžtamai. Šie vyksmai lemia sužadavimo trukmės monotonišką mažėjimą, didėjant sužadamųjų centrų koncentracijai (Burshtein, 1984).

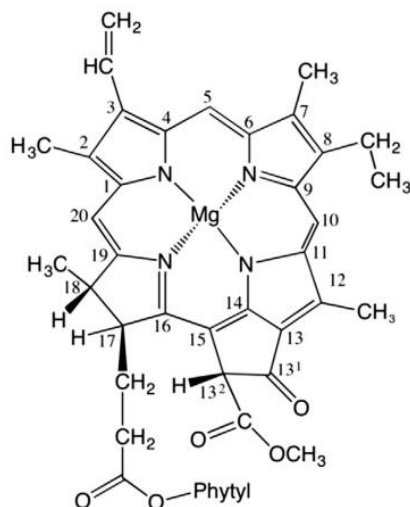
Elektroninis atomų ir jonų sužadimas, sužadintų molekulių singuletinės ir tripletinės būsenos, jų virpesiniai sužadimai ir sukimosi sužadimai praskiestuose paramagnetinių dalelių tirpaluose demonstruoja koncentracinį gesinimą. Priklausomai nuo sužadavimo pobūdžio, jo energijos perdavimas vykdomas ilgo nuotolio (daugiapolinę) arba trumpojo nuotolio (pamainine) sąveika tarp centrų. Paprastai sąveika yra pakankamai silpna, kad ET tarp dviejų centrų būtų laikoma nekoherentine, tai yra pernašos sparta kvadratiškai priklauso nuo sąveikos stiprio (Burshtein, 1984).

Didelių koncentracijų tirpaluose fluoroforai dažnai agreguojasi, kas paveikia fluorescencijos intensyvumą dėl vykstančio savigesinimo. Agregatai, lyginant su monomerais, turi trumpesnes spinduliavimo spartas arba ilgesnes nespindulinės relaksacijos spartas. Nepaisant to, kokybinis gesinimo padidėjimas, didėjant koncentracijai, gali rodyti gesinimo rūšių pobūdį – dimerai, trimerai, n-merai. Taip pat, reiškinį identifikuoti padeda spektriniai pokyčiai. Gesinimo būdas – sumažėjęs spinduliuotės intensyvumas arba padidėjusi nespindulinė relaksacija, atpažįstama pagal tripletų susidarymo našumą ir gyvavimo laikus (Gutschick, 1978).

1.4 Chlorofilai. Chlorofilas a.

Žalią spalvą augalams suteikia pigmentai chlorofilai (Chl), kurių pagrindinė struktūra yra uždaras porfirino žiedas su magnio jonu (Mg^{2+}) centre, kaip parodyta 1.2 pav. Augaluose ir fotosintetiniuose organizmuose randamos penkios Chl formos, tačiau augalų karalystėje dažniausiai randama – Chl a. Chl a gali sugerti regimąją šviesą iš mėlynos ir iš raudonos spektro srities. Pagrindinis cheminio junginio skirtumas, lyginant su antru dažniausiai randamu gamtoje Chl, yra

7-oje padėtyje esanti $-\text{CH}_3$ grupė, dėl kurios šis pigmentas yra mėlynai žalios spalvos (Aramrueang et al., 2019; Mandal & Dutta, 2020; Morançais et al., 2018).



1.2 pav. Pigmento chlorofilo a cheminė struktūra (Marquez and Sinnecker, 2008).

Chl yra lipiduose tirpūs, pirminiai fotosintezės pigmentai. Paprastai Chl išsidėstę chloroplastuose, laikomi fosfolipidų membranoje, iš kurios juos galima išgauti naudojant tinkamus tirpiklius ir ekstrakcijos metodus. Chl molekulės yra labai jautrios aplinkos pokyčiams ir gali lengvai suirti ir pakeisti spalvą, kai Chl veikiami šilumos, šviesos, deguonies, rūgščių ar fermentų (Aramrueang et al., 2019; Morançais et al., 2018).

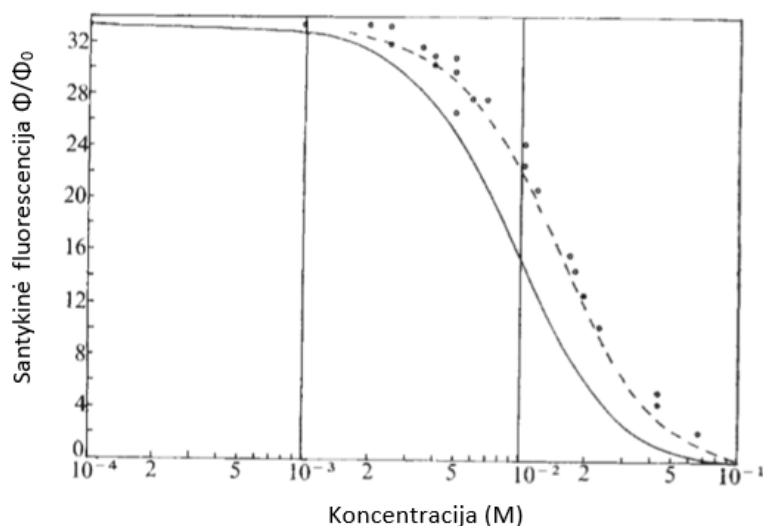
1.5 Koncentracinis chlorofilų gesinimas

Chl molekulės atlieka du esminius vaidmenis žaliųjų augalų ir daugumos dumblių fotosintezės procese. Pirma, dauguma Chl kartu su baltymais dalyvauja antenos sistemoje, kuri surenka saulės energiją ir perduoda ją į reakcijos centrus. Antra, speciali Chl a molekulių poroje įvyksta krūvio atsiskyrimas, inicijuojant energijos konversijos procesą (Sanders et al., 1996).

Priimta laikyti, jog pirminiuose augalų fotosintezės procesuose efektyvi energijos migracija vyksta tarp 300 Chl a molekulių, ir tada energija surenkama cheminėse gaudyklėse. Tiriant Chl a molekules *in vitro*, nepaisant ar tai yra tirpalų mėginiai (Watson & Livingston, 1950), vienasluoksnės (Agrawal et al., 1985; Tweet et al., 1964) ar daugiasluoksnės (Kelly & Porter, 1970) sistemos, kietos polimetilmetakrilato (PMMA) matricos ar dvisluoksnės lipidų vezikulės (Beddard et al., 1976), sužadintose būsenose buvo stebimas koncentracinio gesinimo reiškinys. Chloroplastuose esančio Chl koncentracijai siekiant 0,1 M, nė vienoje *in vitro* sistemoje fluorescencijos našumas nebuvo toks didelis, kaip tiriant *in vivo* sistemas, ypač kuomet fotocheminės gaudyklės buvo uždarytos. Kadangi

koncentracinis gesinimas vyksta tolygiai lakiuose ir skystuose skysčiuose, galima atmesti difuzinius procesus bei buvo pastebėta, jog Chl savigesinimo koncentracijų intervalas poliniuose tirpikliuose nurodo Fiorsterio tipo rezonansinio perdavimo tarp Chl molekulių įtaką (Beddard & Porter, 1976).

1.3 pav. pavaizduotame grafike su apskaičiuotais duomenimis, kur FRET R_0 laikomas 70 Å, o atstumas tarp gaudyklių yra 14 Å ir 10 Å. Matoma, jog eksperimentinius Watson ir Livingston duomenis labiau atitinka, kuomet atstumai yra mažesni (Beddard & Porter, 1976).



1.3 pav. Chlorofilo a santykinio fluorescencijos našumo priklausomybė nuo molekulių koncentracijos.

• ,rodo (Watson & Livingston, 1950) eksperimentinius duomenis; —, apskaičiuoti duomenys, kai $R_0 = 70$ Å ir gaudyklė = 14 Å; - - -, apskaičiuoti duomenys, kai $R_0 = 70$ Å ir gaudyklė = 10 Å (Beddard & Porter, 1976).

Chl *in vivo* egzistuoja tik komplekse su baltymais. Agregato formą lemia tiek sąveika su baltymo matrica, tiek su kitomis Chl molekulėmis. Įvairių formų spektroskopinėms savybėms įtaką daro baltymų komplekse esančių molekulių skaičius ir ligandų, suderintų su Chl molekulės Mg atomu, skaičius ir tipas (Sanders et al., 1996).

Monomeriniai Chl randami tik *in vitro* ypač praskiestuose tirpaluose, kuriuose jų spektroskopinės savybės labai priklauso nuo tirpiklio, tačiau didėjanti Chl koncentracija gali lemti agregatų susidarymą, kurie pasireiškia kitomis spektroskopinėmis savybėmis nei monomerinė Chl forma. Todėl spektroskopiniai matavimai suteikia informacijos ne tik apie pigmentų tarpusavio sąveiką, bet ir apie sąveiką su jų aplinka (Sanders et al., 1996).

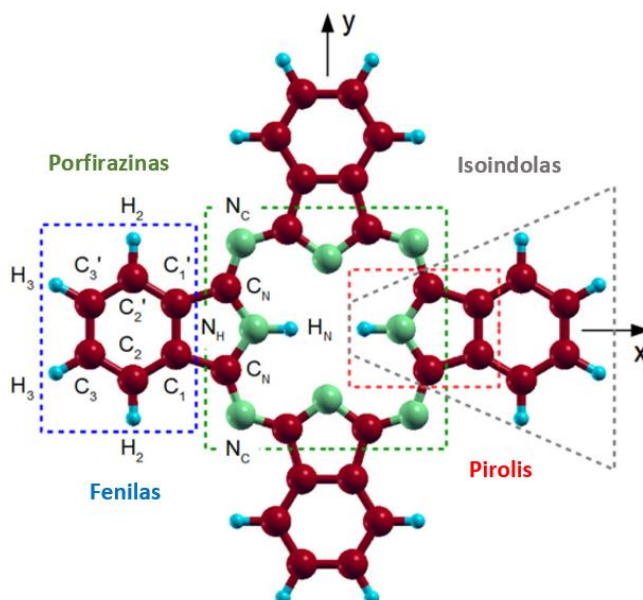
Tilakoidinė membrana yra anizotropinė terpė, kurioje yra įterpti Chl-baltymų kompleksai. Jai būdingos skystųjų kristalų savybės, bet nehomogeniška šoninė struktūra. Kompleksai išdėstyti membranoje taip, kad vyktų ET procesas. Jo efektyvumas priklauso nuo Chl orientacijos ir atstumo kompleksuose, taip pat ir nuo membranoje esančio atstumo tarp kompleksų. Membranos struktūros

poveikį ET procesams galima imituoti dirbtinai, įterpiant Chl molekules į įvairias orientaciniu požiūriu anizotropines terpes. Polimerinė plėvelė gana patogi tokiam tyrimui, nes tempimo metu įterpta medžiaga tampa makroskopiškai išlygiuota, o molekulinis judėjimas nuslopinamas, tačiau dėl to molekulės gali tolygiai paskirstyti polimero matricoje ir taip nesudaryti agregatų (Sanders et al., 1996).

Fluorescencijos gesinimas *in vitro* turi kvadratinę priklausomybę nuo tūrinės Chl koncentracijos ir tai rodo, kad gesinimo mechanizmas gali apimti ET iš sužadintų monomerų į silpnai fluorescuojančius arba nefluorescuojančius dimerus. Gerai žinoma, kad tokius dimerus Chl sudaro nepoliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip anglies tetrachloridas, benzenas ir toluenas dėl koordinacinės sąveikos, apimančios vieno Chl ketokarbonilo grupę ir kito centrinį Mg atomą (Yuen et al., 1980).

1.6 Ftalocianinai. Cinko ftalocianinas.

Ftalocianino (Pc) molekulės yra makrocikliniai junginiai, sudaryti iš vidinio porfirazino žiedo, jungiančio keturias izoindolo grupes. Porfirazino žiedas struktūriškai panašus į porfirino žiedą, tačiau Pc turi keturis papildomus azoto atomus vidinėje šerdyje ir keturis papildomus arenus išorėje. Formose, neturinčiose pakaitalų arba esančiose be metalo, porfirazino žiedo centras susideda iš dviejų H atomų (2H-Pc), kurie vadinami pirolio H atomais. Pirolio H atomai gali būti pakeisti metalo (M) jonu. Daugelis metalinių elementų gali sudaryti koordinacinius kompleksus su ftalocianiniais (MPc) per *d* ryšius tarp M ir pirolio N atomų (Abd-El-Aziz & Dalgakiran, 2012; Kröger et al., 2018).



1.4 pav. Ftalocianino struktūrinė geometrija, su nurodytomis Dekarto koordinatėmis x ir y bei pažymėtomis konkrečiomis molekulių grupėmis ir atomais. Adaptuota pagal (Kröger et al., 2018).

MPc molekulės, ypač cinko ftalocianino (ZnPc) kompleksai, sulaukė didelio susidomėjimo dėl jų intensyvios šviesos sugerties raudonoje regimosios šviesos srityje, ilgų tripletinių būsenų gyvavimo trukmių, intensyvesnės fluorescencijos ir singuletinio deguonies gamybos savybių, kurios leidžia juos naudoti navikų aptikimui ir gydymui fotodinaminės terapijos metu. Dėl terminio stabilumo, mažo reaktyvumo bei tirpumo MPc pradėti plačiai naudoti kaip dažai ir pigmentai tekstilės, spausdinimo ir dažų pramonėse. Be to, dėl jau minėtų savybių MPc taikomos netiesinės optikos medžiagų, fotocheminių reakcijų sensibilizatorių, sensorių, elektronikos įrenginių, fotovoltinių elementų srityse (Kakade et al., 2012; Mack & Kobayashi, 2011; Ogunsipe et al., 2004).

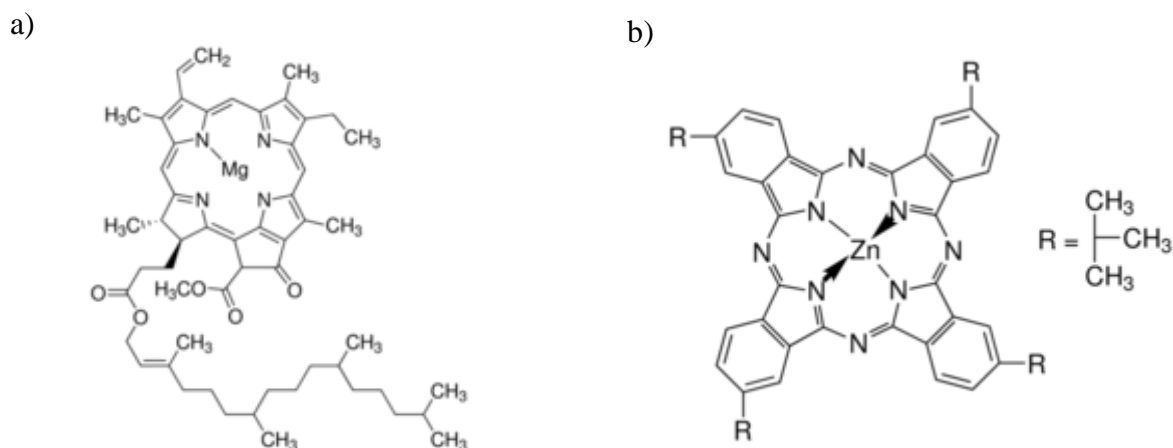
1.7 Ftalocianinų ir chlorofilų panašumai

Praeitame amžiuje atsitiktinai atrastos Pc molekulės vis labiau didina mokslininkų susidomėjimą šia junginių grupe. Priežastis, kodėl jie taip plačiai tyrinėjami, yra panašumai su gamtoje esančiais porfiriniais, kurie sudaro daugelio biologiškai svarbių sistemų pagrindą. Pavyzdžiui, hemoglobina bei Chl tyrėjai nuolat bando imituoti žmogaus sukurtuose įrenginiuose. Unikali fizikinė ir cheminė Pc savybė, tokia kaip jų struktūros panašumas į šias biologines molekules, cheminė struktūros įvairovė (centriniai atomai, pakaitai), artimųjų infraraudonųjų spindulių šviesos sugertis, dideli ekstincijos koeficientai (paprastai $>10^5 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ir natūralus gebėjimas sudaryti savitvarkes sistemas lemia molekulių panašumus (Bidermane, 2014; Brozek-Pluska et al., 2020). ZnPc ne tik struktūriškai, bet ir spektroskopiškai panašus į Chl, yra santykinai pigus, stabilus, molekules galima įsigyti pakankamai gerai išgrynintas (Bohn & Walczyk, 2004).

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1 Mėginių paruošimas

Tyrimė naudojamos Chl a ir cinko 2,9,16,23-tetra-tert-butil-29H,31H-ftalocianino (TB-ZnPC; dažų kiekis ~ 96 %) molekulės, buvo pirktos iš Sigma Aldrich. Pasirinktas tirpiklis toluenas (99,8 %), taip pat pirktas iš Sigma Aldrich. Gaminant plonas plėveles buvo naudojamas polimeras polistirenas (Sigma Aldrich), kurio molekulinis svoris buvo 90900 g/mol.



2.1 pav. Tyrimė naudotų molekulių cheminės struktūros. a) Chlorofilo a (Chl a) molekulė (Sigma-Aldrich, 2022a); b) Cinko 2,9,16,23-tetra-tert-butil-29H,31H-ftalocianino (TB-ZnPC) molekulė (Sigma-Aldrich, 2022b).

Chl a tirpalų mėginiai gaminti su toluenu, padarius pradinį 1,86 mM koncentracijos tirpalą, kurį praskiedus buvo gauti kiti nuo 0,06 mM iki 0,6 mM koncentracijos tirpalai. TB-ZnPC su toluenu tirpalų mėginiais daryti pirmiausia pagamintas pradinis tirpalas. Į tolueną įdėjus atitinkamą kiekį molekulių, kad tirpalo koncentracija siektų 2,5 mM, mėginys buvo kaitintas 60 °C temperatūroje 20 minučių, kad iširptų medžiaga. Vėliau pradinis tirpalas praskiedžiamas, tokiu būdu gaunant kitus nuo 0,07 mM iki 1,2 mM koncentracijų tirpalus. Tirpalų mėginių matavimams buvo naudojama 0,1 mm optinio kelio apvali kvarcinė kiuvetė, į kurią buvo pilama iki 10 μL tirpalo ir šonai aptepami nagų laku, jog būtų išvengta tirpiklio išgaravimo.

Plonų plėvelių mėginiai buvo gaminami ant ~ 13 mm × 13 mm dydžio mikroskopinio stiklo plokštelių. Plokštelės buvo kruopščiai nuvalytos, naudojant kempinę ir indų ploviklį bei kelis kartus nuplautos su distiliuotu vandeniu, acetonu ir izopropanoliu. Po plovimo užsilikęs skystis nupučiamas aukšto spaudimo oro srove, toliau plokštelės 10 minučių valomos plazma ir iškart naudojamos plonų plėvelių gamybai.

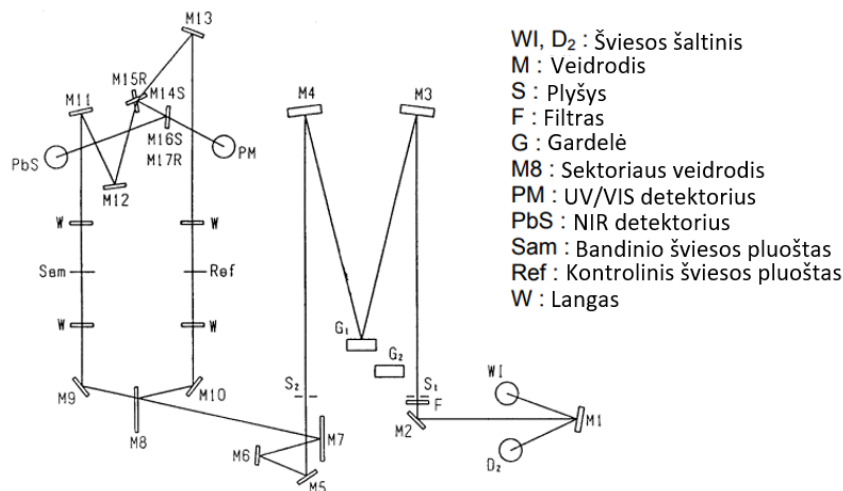
Plonų plėvelių mėginiai buvo gaminti inertinėje N₂ dujų aplinkoje, jog būtų išvengta oksidavimosi proceso. Pirmiausia buvo pagamintas 33 mM koncentracijos polistireno tirpalas toluene

(PS-toluenas). Į tirpalą dedamas Chl a pigmentas, gaunant 10 mM Chl a molekulių koncentraciją tirpale (pradinis Chl a tirpalas). Gautas pradinis Chl a tirpalas praskiedžiamas su PS-tolueno tirpalu, ir taip gaunami kitų nuo 0,6 mM iki 5 mM koncentracijų mėginiai, kuriuose kinta tik Chl a molekulių koncentracija. Plonoms plėvelėms su TB-ZnPC gaminti naudojamas tas pats PS-tolueno tirpalas, padarant 2,5 mM molekulių koncentracijos pradinį tirpalą (pradinis TB-ZnPC tirpalas). Jis buvo kaitinamas 60 °C temperatūroje 20 minučių. Siekiant gauti mažesnių nuo 0,03 mM iki 1,2 mM koncentracijų tirpalus, pradinis TB-ZnPC tirpalas buvo skiedžiamas, tad kito tik TB-ZnPC koncentracija. Tiek Chl a, tiek TB-ZnPC įvairių koncentracijų plėvelės buvo daromos pasitelkus sukimo – dengimo (angl. spin-coating) iš tirpalo metodą, kai ant stiklo plokštelės užlašinamas 50 µL tirpalas, kuri 3 sekundes sukama 3000 rpm greičiu, su 3000 rpm/s pagreičiu. Tirtų plonų Chl a plėvelių kiekvienos koncentracijos bandinių buvo padaryta po vieną, o TB-ZnPC bandinių – po tris.

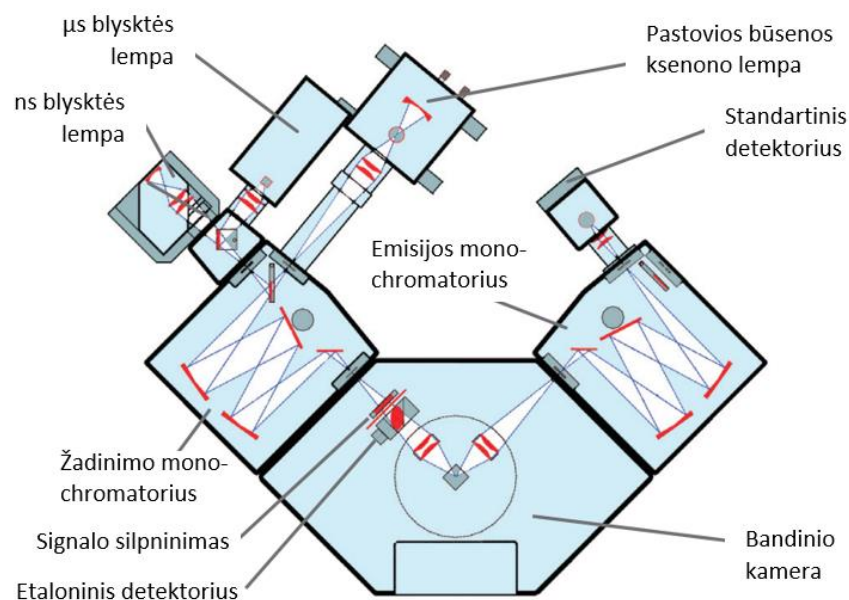
Plonų Chl a plėvelių bandinių koncentracijos pasirinktos kiek įmanoma didesnės, nei tirpalų mėginiuose, nes buvo siekiama pamatyti agregavimosi požymius. Agregatų spektrinės savybės skiriasi nuo monomerų, kurie turėtų pasireikšti naujų sugerties juostų atsiradimu, išplatėjimu, ar poslinkiu (Siggel et al., 1996). TB-ZnPC molekulių bandiniuose koncentracija buvo pasirinkta didžiausia, kurią pavyko ištirpinti tolueno tirpiklyje, tad pradinis tirpalas buvo 2,5 mM koncentracijos. Tiriant šių molekulių plonas plėveles pastebėta, jog ne visos plėvelės yra identiškos, todėl gaminti ir išmatuoti 3 vienetai bandinių. Apie rezultatų patikimumą žr. 2.4 poskyrį.

2.2 Įranga

UV-VIS šviesos sugerties spektrams matuoti buvo naudojamas Jasco V-670 spektrofotometras diapazone nuo 300 nm iki 800 nm. Tirpalų matavimuose aplinkos fonu buvo laikoma išmatavus kvarcinę 0,1 mm optinio kelio kiuvetę su toluenu, o plonų plėvelių matavimuose – stiklo plokštelė. Šie spektrai buvo atitinkamai atimami iš matuojamų tirpalų ir plonų plėvelių bandinių.



2.2 pav. Jasco V-670 spektrofotometro optinio išdėstymo schema. Adaptuota pagal (Jasco, 2010).

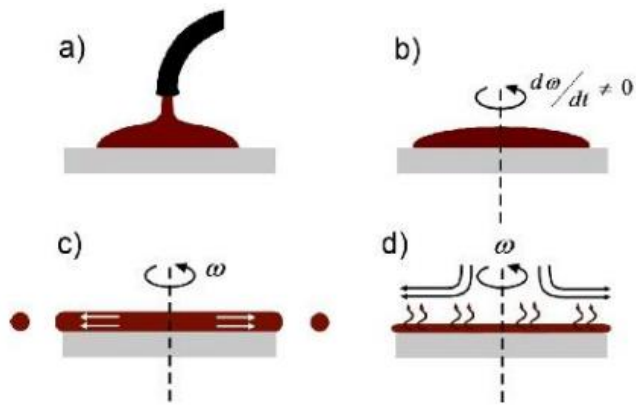


2.3 pav. Edinburgh Instruments fluorescencijos spektrometras FL920. Adaptuota pagal (Edinburgh Instruments, 2011).

Emisijai ir fluorescencijos kinetikų matavimams buvo naudojamas Edinburgh Instruments fluorescencijos spektrometras FL920. Mėginių sužadimui buvo naudojamas pikosekundinis impulsinis diodinis lazeris EPL-375, generuojantis apie 70 ps trukmės 375 nm bangos ilgio impulsus 5 MHz (200 ns) dažniu. Tarp bandinio ir detektoriaus statomas 400 nm filtras, kuris blokuoja žadinančią lazerio spinduliuotę, o tarp lazerio ir bandinio statomas nukirtimo (angl. short pass) 550 nm filtras. Tiek tirpalų, tiek plonų plėvelių mėginiai buvo statomi 45° kampu detektoriaus atžvilgiu. Fluorescencijos relaksacijos kinetikos buvo išmatuotos naudojant laike koreliuotą pavienių fotonų skaičiavimo (TCSPC) metodą. Fluorescencijos spektrai buvo registruojami nuo 640 nm iki 800 nm diapazone, mėginių fluorescencijos relaksacijos kinetikos išmatuotos ties fluorescencijos juostų maksimumais.

2.3 Plėvelių gaminimo metodas

Sukimo – dengimo iš tirpalo metodas naudojamas vienalytėms plonomis plėvelėms padengti ant plokščių pagrindų. Įprastas procesas apima mažo kiekio skysčio užliejimą ant pagrindo centro ir substrato sukimą dideliu greičiu. Dėl išcentrinės jėgos skystis pasklis į pagrindo kraštą ir galiausiai nukris, paliekant ploną skysčio plėvelę ant paviršiaus. Galutinis plėvelės storis ir kitos savybės priklausys nuo skysčio pobūdžio (klampumo, džiūvimo greičio, kietųjų dalelių kiekio, paviršiaus įtempimo ir kt.) ir sukimo procesui pasirinktų parametru. Tokie veiksniai kaip sukimosi greitis, pagreitis prisideda prie dengiamų plėvelių savybių (Tyona, 2013).



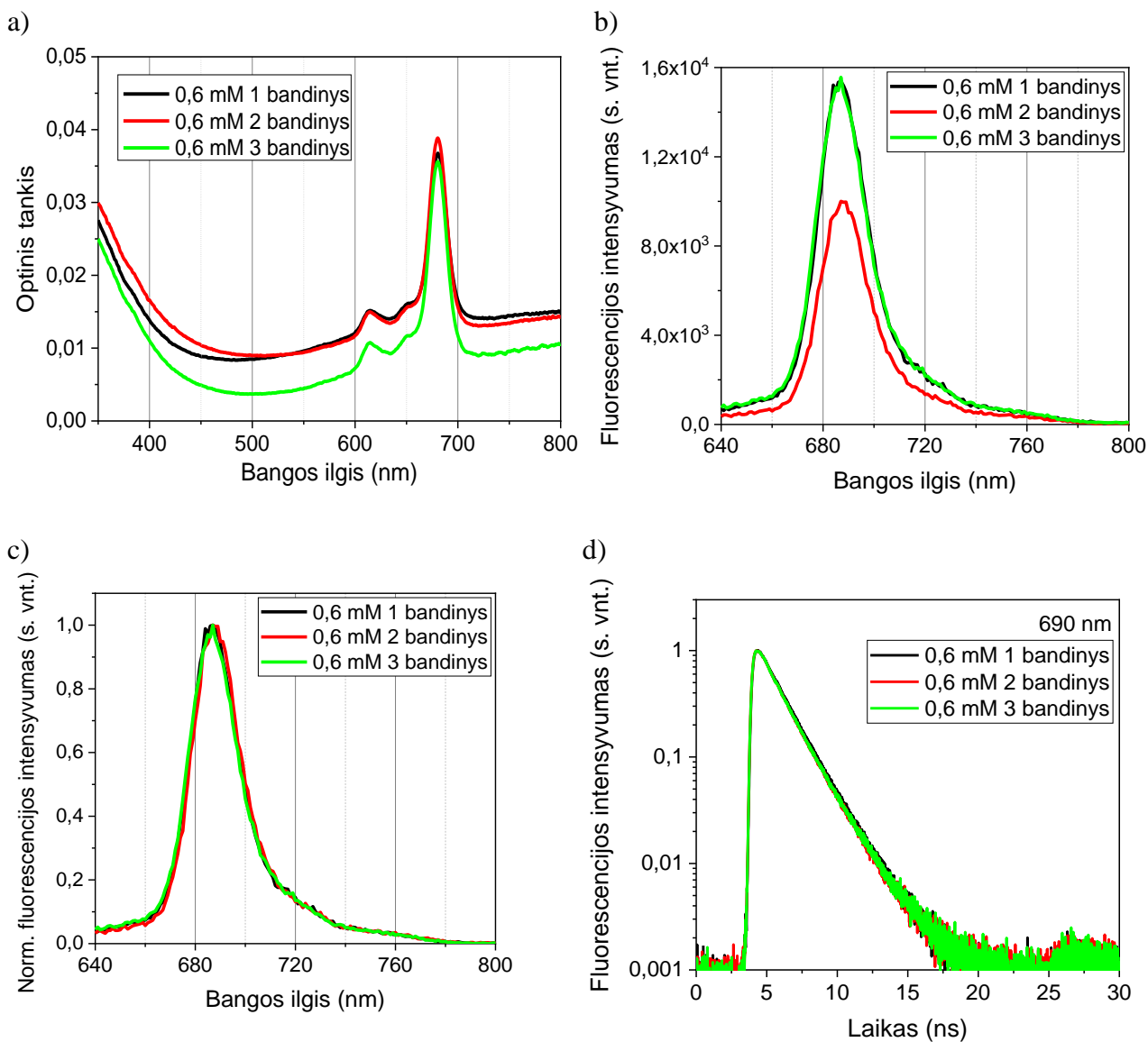
2.4 pav. Sukimo – dengimo metodo etapai. a) skysčio užliejimas; b) sukimosi greitėjimas; c) sukimasis; d) tirpiklio nugaravimas (Hellstrom, 2007).

Sukimas tęsiamas, kol skystis nuteka nuo pagrindo kraštų, ir kol pasiekiamas norimas plėvelės storis. Taigi, kuo didesnis kampinis sukimosi greitis, tuo plonesnė plėvelė. Plėvelės storis taip pat priklauso nuo tirpalo ir tirpiklio koncentracijos. Naudojamas tirpiklis paprastai būna lakus ir greitai išgaruojantis (Tyona, 2013).

2.4 Rezultatų patikimumas

Nors patys Pc junginiai yra stabilūs ir tirpalų mėginiai normaliomis sąlygomis išlieka nepakitę kelias savaites (Ghani et al., 2012), plėvelių bandiniai degraduoja dėl oksidacijos. Nustatyta, kad plona plėvelė palikus 3 paras normaliomis laboratorijos sąlygomis, tiek apsaugotas, tiek neapsaugotas nuo šviesos, bandinių spektrai žymiai pakito. Mėginių optinis tankis sumažėjo, jog jo negalėjo aptikti aparatūra, fluorescencijos intensyvumas (2.4.1 pav. a)) sumažėjo kelis kartus bei pailgėjo fluorescencijos kinetika (2.4.1 pav. c)). Todėl plonos plėvelės buvo daromos po vieną ir iškart nešamos matuoti, jų ilgai nelaikant šviesoje bei deguonies turinčioje aplinkoje.

2.5 paveikslo pavyzdžiuose pateikti 0,6 mM koncentracijos TB-ZnPC plonų plėvelių trijų bandinių spektrai, tačiau panašūs skirtumai pastebėti visų koncentracijų plonose plėvelėse. Buvo pastebėta, jog ne visi tos pačios koncentracijos bandiniai vienodai sugeria šviesą (2.5 pav. a)), ar fluorescuoja vienodu intensyvumu (2.5 pav. b)). Todėl buvo nuspręsta daryti po kelis bandinius ir pateikti gautų rezultatų vidurkį. Žiūrint į normuotus spektrus, jų forma skiriasi labai minimaliai (2.5 pav. c)). Išmatavus visų bandinių fluorescencijos kinetikas ir nenustačius skirtumų (2.5 pav. d)), buvo nutarta matuoti tik vieno bandinio gyvavimo trukmes.



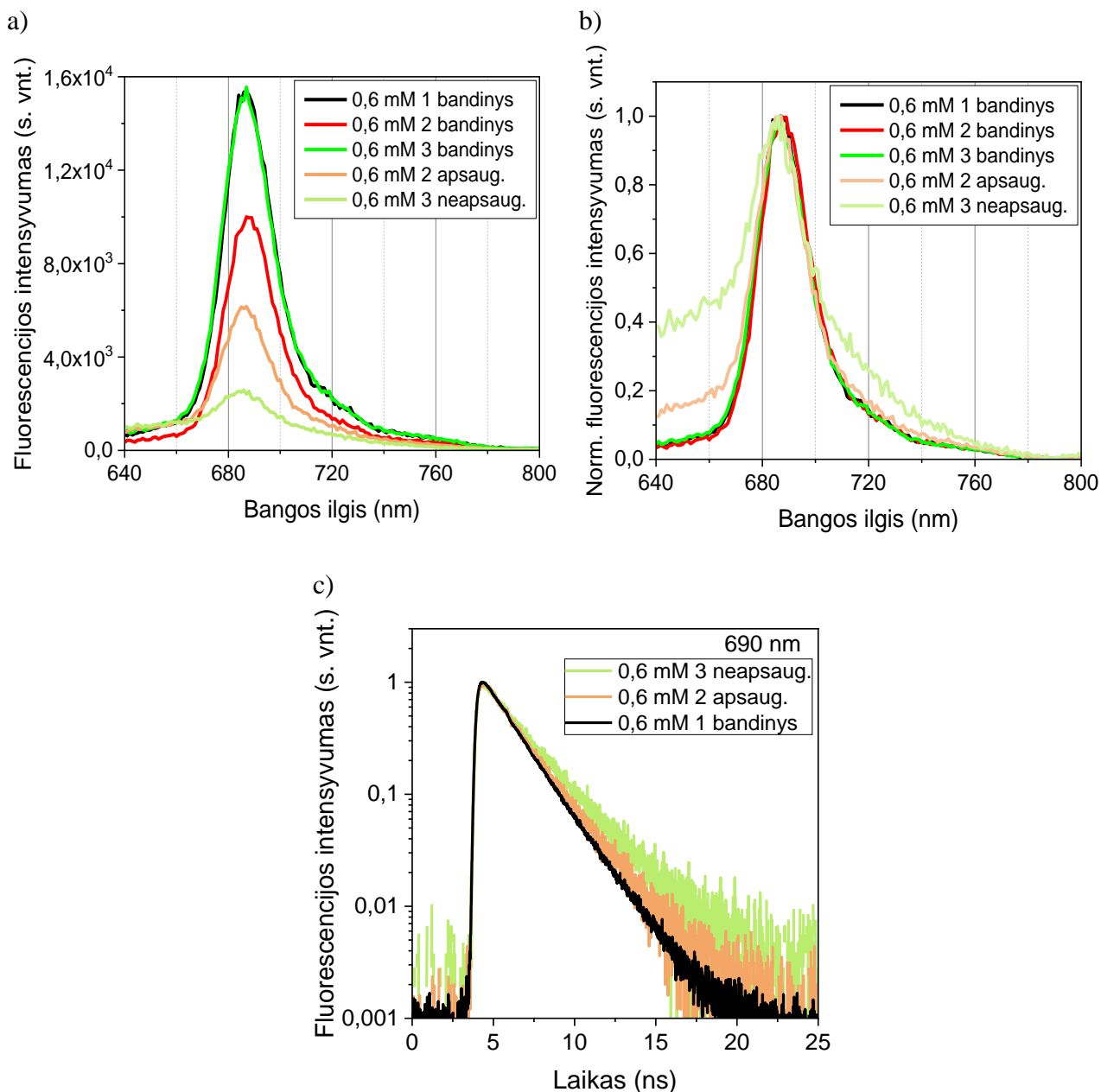
2.5 pav. TB-ZnPC plonų plėvelių 0,6 mM koncentracijos bandinių spektrų palyginimas. a) šviesos sugertis; b) fluorescencijos intensyvumas; c) normuotas nuo 0 iki 1 fluorescencijos intensyvumas; d) fluorescencijos kinetikos.

Mėginių matavimai buvo patikrinti, ar nevyksta anihiliacija, sumažinus sužadinimo lazerio intensyvumą maždaug per pusę, ir nustatyta, kad nevyko jokie pakitimai fluorescencijos spektruose bei kinetikose. Kelis kartus atlikus tą patį eksperimentą rezultatai atsikartojo.

2.4.1 TB-ZnPC plėvelių degradavimas

Pc molekulės priskiriamos fotosensibilizatoriams – tai molekulių grupė, įskaitant porfiriną, Pc ir bakteriochlorino darinius, kurios gali generuoti reaktyvųjį singuletinį deguonį (1O_2), juos apšvietus tam tikrais bangos ilgiais (Wu & Dong, 2020). Kadangi plonų plėvelių bandiniuose, paliktuose normaliomis sąlygomis, šviesos sugertis sumažėjo iki neišmatuojamo lygio, galima įtarti, jog įvyko

fotobalinimas, kuris lemia chromoforų šviesos sugerties praradimą, juos veikiant šviesa. Daugumos fotosensibilizatorių fotobalinimas vyksta dėl deguonies, tarpininkaujant $^1\text{O}_2$, kuris gali prisidėti prie dvigubų jungčių atsiradimo molekulės makrocikle (Tasso et al., 2019).



2.4.1 pav. TB-ZnPC plonų plėvelių 0,6 mM koncentracijos bandinių spektrų po degradacijos palyginimas, kuomet bandinys nr. 1 yra nedegradavęs, bandinys nr. 2 laikytas normaliomis sąlygomis, bet apsaugotas nuo šviesos, ir bandinys nr. 3 laikytas normaliomis sąlygomis ir neapsaugotas nuo šviesos.

a) fluorescencijos spektrai prieš degradaciją ir po; c) fluorescencijos spektrai, normuoti nuo 0 iki 1;
 c) fluorescencijos kinetikos ties 690 nm.

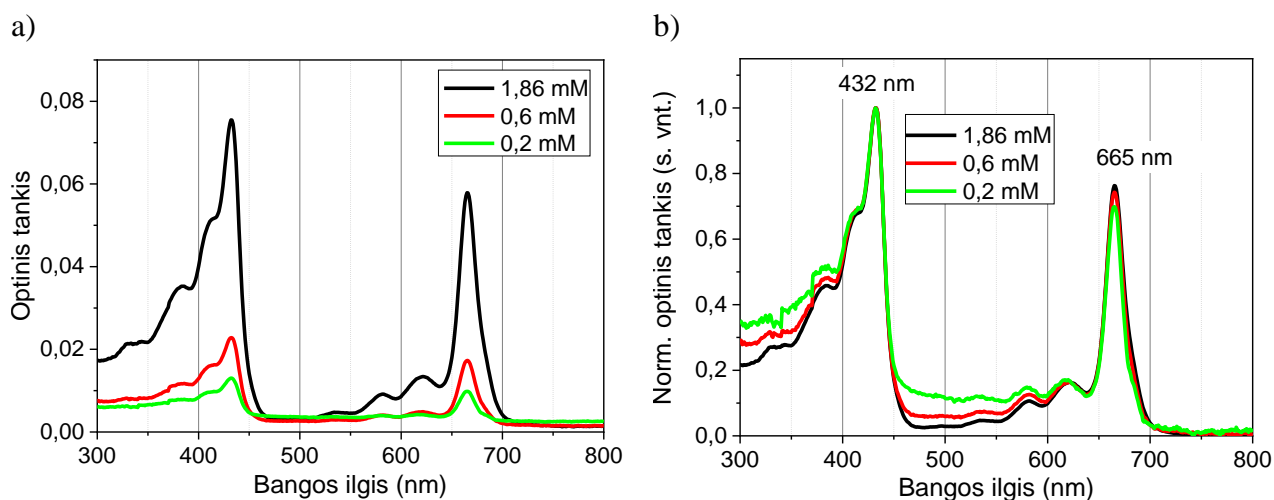
Plonų plėvelių degradacija tikrinta, jog išsiaiškinti, kokią įtaką bandiniams turi aplinkos sąlygos ir kaip tai paveiktų koncentracinio gesinimo tyrimą. Iš 2.4.1 paveiksle matomų fluorescencijos spektrų ir kinetikų, galima pasakyti, aplinkoje esantis deguonis lėmė plonų plėvelių oksidaciją. Tačiau, šviesa suaktyvintas fotosensibilizatorius ir tai padarė įtaką intensyvesnei mėginio

degradacijai. Bandinio fluorescencija sumažėjo ~ 7 kartais, kai jis buvo laikytas šviesoje, o apsaugotame nuo šviesos tik ~ 1,5 karto. Abiejų degradavusių bandinių fluorescencijos kinetikos tapo ilgesnės, tačiau neapsaugotame bandinyje pokytis buvo didesnis.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

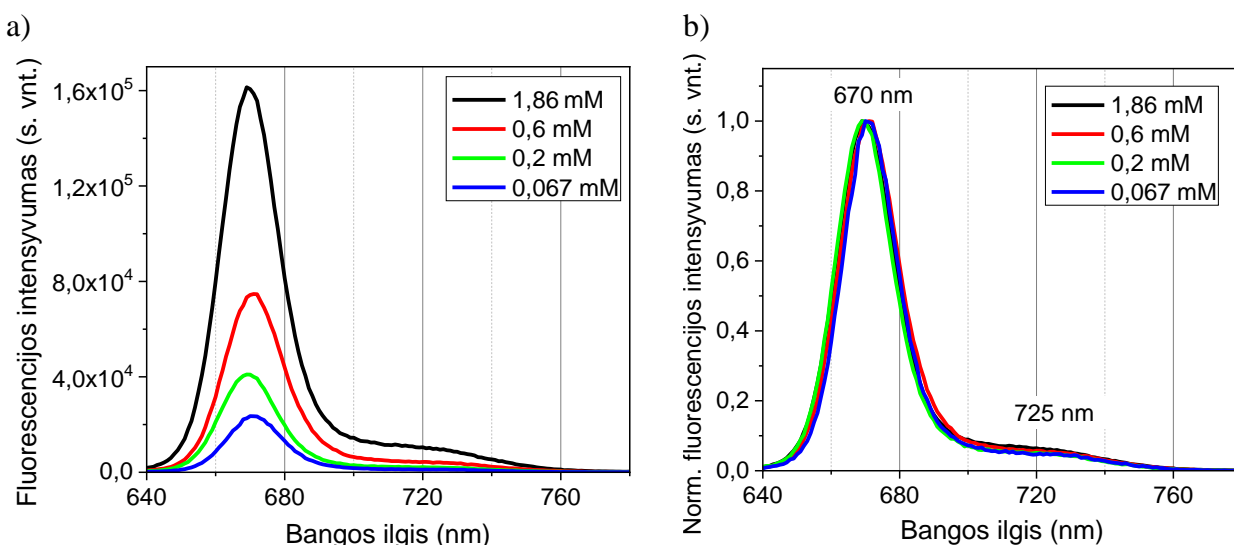
3.1 Tirpalų mėginiai

3.1 pav. pateikti skirtingų Chl a molekulių koncentracijų, ištirpintų toluene, šviesos sugerties spektrai. Soret juostos maksimumas yra ties 432 nm bangos ilgiu ir Q_y maksimali sugertis – ties 665 nm. Didelių šviesos sugerties pokyčių tarp skirtingų koncentracijų tirpalų neaptinkama. Juostų kilimas, esantis nuo 300 nm iki 400 nm bei nuo 450 nm iki 600 nm atsirado dėl spektrofotometro jautrumo trūkumo, kadangi tirtų mėginių optinis tankis nėra didelis. Bandinių optinis tankis, neviršintis 0,1 vertės, leidžia išvengti reabsorbcijos ir kitų vidinio filtro procesų.



3.1 pav. a) Chl a tirpalų šviesos sugerties spektrai; b) Chl a tirpalų šviesos sugerties spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

3.2 paveiksluose pateikiami toluene ištirpintų skirtingų koncentracijų Chl a fluorescencijos spektrai. Maksimali kreivių vertė yra ties 670 nm, o mažesniojo peties iš raudonosios pusės – 725 nm. Normuotame grafike (3.2 pav. b)) tarp skirtingų koncentracijų bandinių, spektriniai skirtumai nėra žymūs.



3.2 pav. a) Chl a tirpalų fluorescencijos spektrai; b) Normuoti Chl a tirpalų fluorescencijos spektrai, nuo 0 iki 1.

Fluorescencijos kinetikos matuotos ties emisijos maksimumų bangos ilgiais. Gyvavimo trukmių rezultatai pateikti 3.3 pav., o suskaičiuotos gesimo trukmės 3.1 lentelėje, kurie buvo gauti pritaikius ištemptosios eksponentės funkciją. Nors kinetikoms aprašyti dažniausiai taikoma eksponentinė funkcija (4), tačiau dėl gaunamų daugiaeksponenčių kinetikų plonų plėvelių rezultatuose, ir vis dar netikslių kreivių pritaikymo, plonų plėvelių tyrimo rezultatams analizuoti naudojama ištemptoji eksponentė (6). Ši funkcija neturi aiškios fizikinės prasmės, tačiau sumažina kintamųjų kiekį bei palengvina rezultatų interpretavimą (Berberan-Santos et al., 2005).

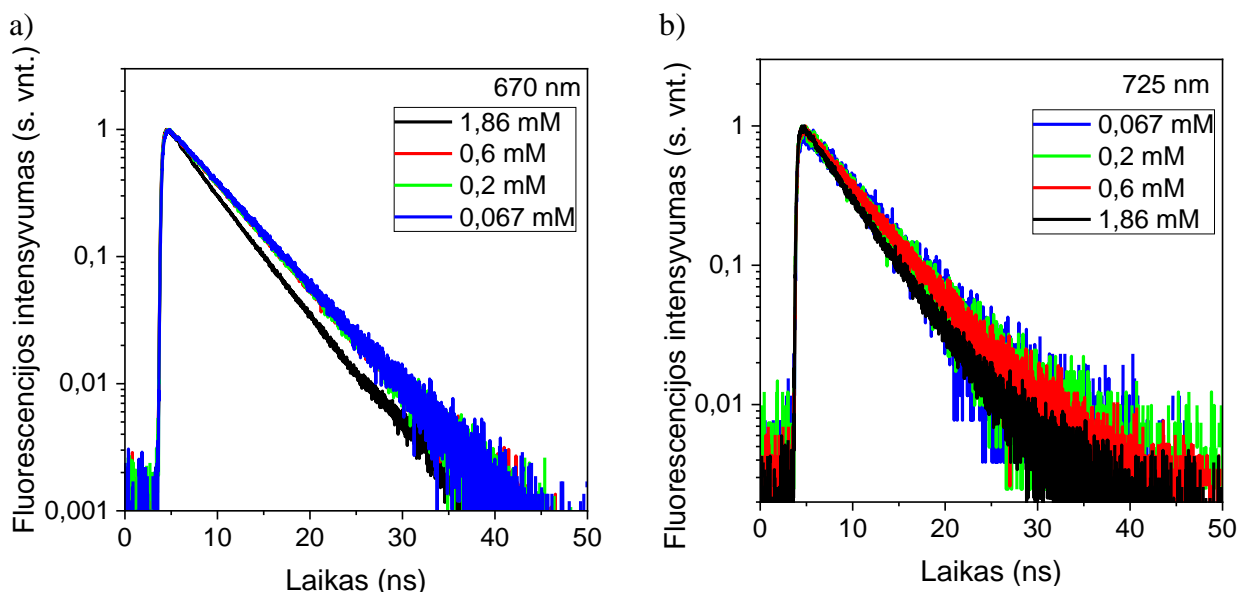
$$I_F(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right), \quad (4)$$

$$\tau_{decay} = \int_0^{\infty} dt a \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau}\right)^b\right), \quad (5)$$

$$K(t) = a \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau}\right)^b\right) * IRF(t). \quad (6)$$

Čia IRF – instrumento atsako funkcija. Jos pilnas plotis ties pusės maksimumo verte yra 0,415 ns.

Iš fluorescencijos kinetikų išsiskiria didžiausios tirtos koncentracijos tirpalas, kurio koncentracija 1,86 mM. Šios mėginio fluorescencijos kinetika buvo greitesnė nuo 17,2 % iki 21,2 % nei visų kitų. Tarp 0,067 mM ir 0,6 mM koncentracijos tirpalų kinetikų skirtumas buvo < 5 %. Vertės b kintamas nuo 0,98 iki 1,07 abiejuose bangos ilgiuose, leidžia patvirtinti vykstančią vienekspontinę relaksaciją. 3.1 lentelėje lyginant tų pačių koncentracijų mėginius tarp 670 nm ir 725 nm bangos ilgių, 0,067 mM ties 725 nm kinetika lėtesnė 1,7 %, 0,6 mM – 3,9 %, 1,86 mM – 2,2 %. Tačiau 0,2 mM koncentracijos tirpale ties 725 nm kinetika yra 1,2 % greitesnė už ties 670 nm bangos ilgiu išmatuotą vertę.

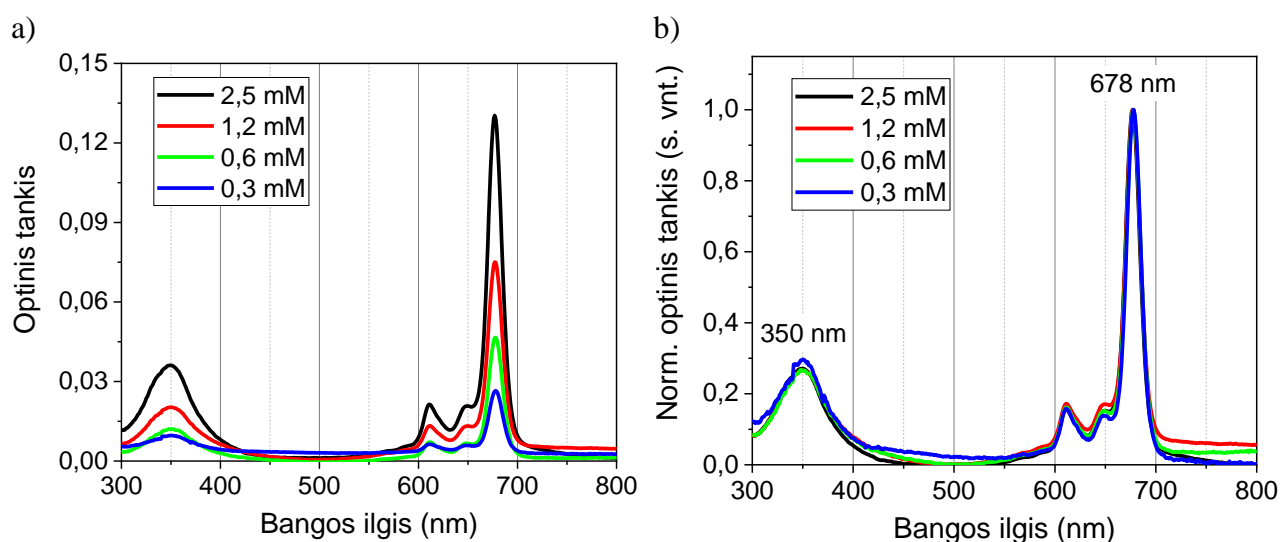


3.3 pav. Chl a tirpalų fluorescencijos kinetikų grafikai: a) ties 670 nm; b) ties 725 nm.

3.1 lentelė. Chl a fluorescencijos kinetikų gesimo laikai ties 670 nm ir 725 nm bangos ilgiais.

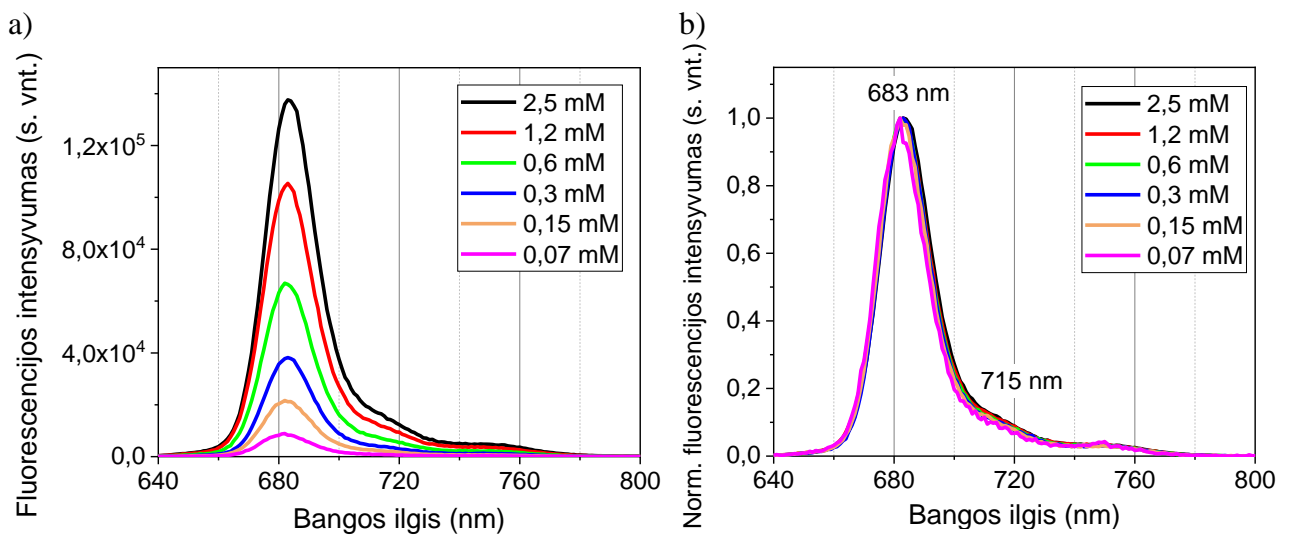
Koncentracija, mM	670 nm			725 nm		
	τ , ns	b	τ_{decay} , ns	τ , ns	b	τ_{decay} , ns
0,067	5,71	1,06	5,59	5,85	1,07	5,69
0,2	5,51	1,04	5,42	5,41	1,03	5,35
0,6	5,38	1,03	5,32	5,62	1,04	5,53
1,86	4,36	0,98	4,4	4,5	1	4,5

Apačioje aptariami TB-ZnPC molekulių, ištirpintų toluene, skirtingų koncentracijų bandinių rezultatai. 3.4 paveiksle pateikti mėginių šviesos sugerties spektrai. Juose Soret juosta yra ties 350 nm, o maksimalios šviesos sugerties Q_y juosta ties 678 nm bangos ilgiais. Šių tirpalų šviesos sugerties spektruose, pagal normuotame paveiksle (3.4 pav. b)) pateiktus rezultatus, didelių pokyčių neaptinkama.



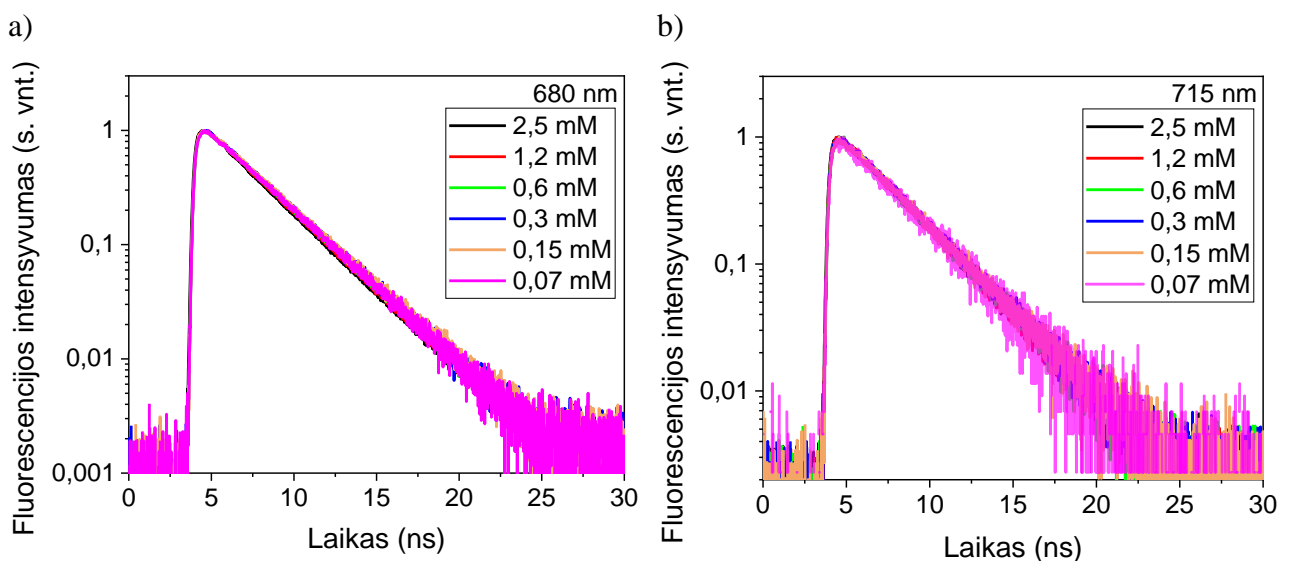
3.4 pav. a) TB-ZnPC tirpalų šviesos sugerties spektrai; b) TB-ZnPC tirpalų šviesos sugerties spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

3.5 paveiksle pateikiami TB-ZnPC tirpalų fluorescencijos spektrai. Čia emisijos maksimumas yra ties 683 nm bangos ilgiu, bei mažesnio intensyvumo petys yra maždaug ties 715 nm. Normuotame spektre (3.5 pav. b)) matoma, jog mažėjant tirpalų koncentracijai, juostos šiek tiek slenkasi į mėlynąją spektro pusę, kur poslinkis yra apie 1 nm, tačiau kitų skirtumų neaptinkama.



3.5 pav. a) TB-ZnPC tirpalų fluorescencijos spektrai; b) TB-ZnPC tirpalų fluorescencijos spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

Fluorescencijos kinetikų matavimuose taip pat buvo pasirinkti du bangos ilgiai, pagal fluorescencijos spektro maksimumą ir greta jo išskylančią petį – 680 nm ir 715 nm. Relaksacijos trukmėms gauti buvo pritaikyta ištempioji eksponentė, kur b vertė kinta nuo 1,04 iki 1,08, tad ir čia vyrauja vienksonentinės kinetikų kreivės. 3.6 paveiksle pateiktuose spektruose pokyčių tarp skirtingų koncentracijų tirpalų nesimato, tačiau 3.2 lentelės duomenys parodo, kad didėjant tirpalų koncentracijai nuo 0,07 mM iki 2,5 mM kinetikos pagreitinėja ~ 0,24 ns ties 680 nm bangos ilgiu, tai yra 7,5 %, ir ~ 0,16 ns ties 715 nm bangos ilgiu – 4,8 %. Mažesnio intensyvumo kreivėje ties 715 nm fluorescencijos relaksacija vyko lėčiau, nei ties 680 nm bangos ilgiu. Lyginant to paties bandinio matavimus, nuo mažiausios koncentracijos mėginio 0,07 mM kinetikų pokytis buvo mažas – 0,5 %. Didėjant mėginių koncentracijoms, pokytis tarp bangos ilgių augo, kur 0,15 mM kinetikos sulėtėjo 0,8 %, 0,3 mM – 1,1 %, 0,6 mM – 1,2 %, 1,2 mM – 1,8 %, 2,5 mM – 3,2 %.



3.6 pav. TB-ZnPC tirpalų fluorescencijos kinetikų grafikai: a) ties 680 nm; b) ties 715 nm.

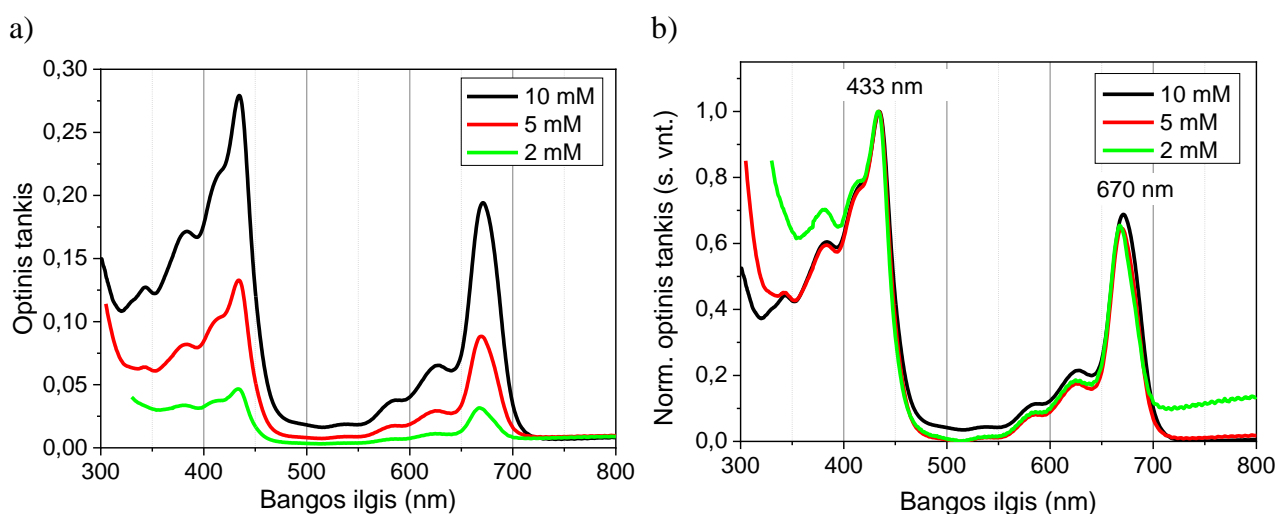
3.2 lentelė. TB-ZnPC fluorescencijos kinetikų laikai ties 680 nm ir 715 nm bangos ilgiais.

Koncentracija, mM	680 nm			715 nm		
	τ , ns	b	τ_{decay} , ns	τ , ns	b	τ_{decay} , ns
0,07	3,52	1,07	3,43	3,53	1,06	3,45
0,15	3,59	1,07	3,49	3,62	1,08	3,52
0,3	3,55	1,07	3,46	3,6	1,08	3,5
0,6	3,43	1,06	3,36	3,49	1,07	3,4
1,2	3,33	1,05	3,27	3,4	1,06	3,33
2,5	3,24	1,04	3,19	3,36	1,06	3,29

Bendrai tariant, tirtuose Chl a ir TB-ZnPC molekulių tirpaluose didelių pokyčių tarp skirtingų koncentracijų mėginių šviesos sugerties, fluorescencijos ir jos kinetikų spektruose neaptinkama. Chl a 1,86 mM koncentracijos kinetika buvo apie 1 ns greitesnė, o visų kitų bandinių pokyčiai buvo minimalūs. Lyginant abiejų molekulių mėginių elgseną, tarp Chl a ir TB-ZnPC Q_y juostų bei emisijos maksimumų yra 13 nm atstumas, relaksacija visuose bangos ilgiuose ir koncentracijose vyksta vienksoponentiškai, kur Chl a mėginių kinetikos yra ~ 2,1 ns lėtesnės.

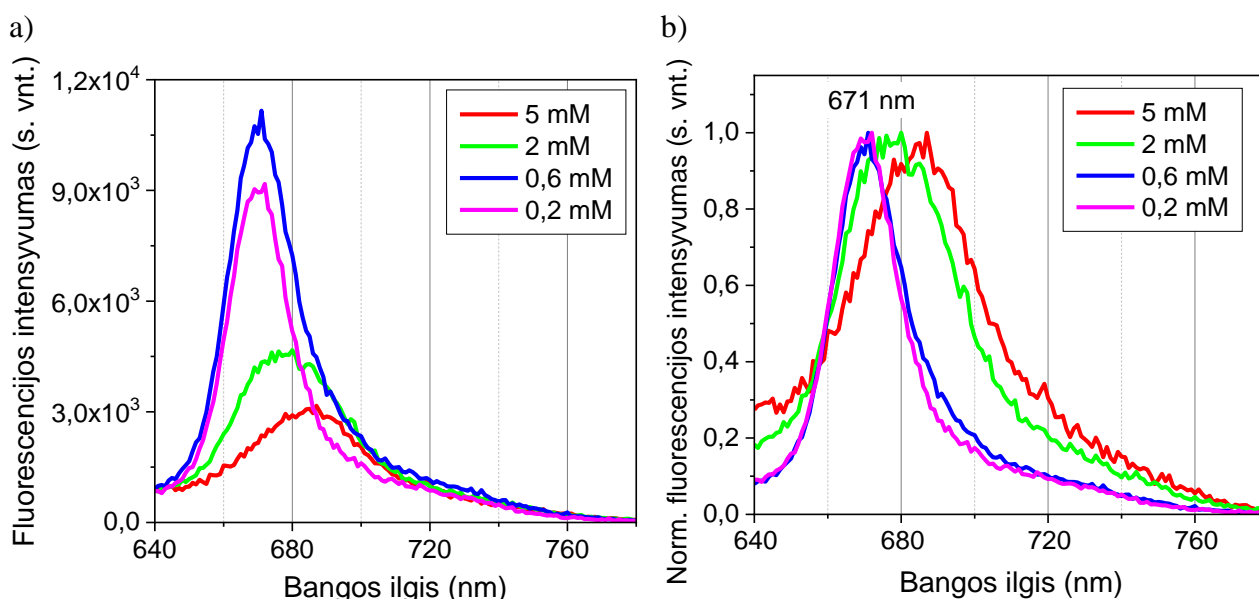
3.2 Plonų plėvelių mėginiai

Tirpalų mėginiuose neaptikus didelių spektrinių pokyčių buvo nuspręsta tirti plonas plėveles. Plonų Chl a plėvelių su polistirenu šviesos sugerties spektrai pateikti 3.7 pav. Soret juosta yra ties 433 nm bangos ilgiu, o Q_y – ties 670 nm. Normuoto optinio tankio grafikas (3.7 pav. b)) rodo, jog žymių skirtumų tarp skirtingų koncentracijų plėvelių nėra net išmatavus 10 mM koncentracijos plėvelę, kurios tolimesnių fluorescencijos matavimų negalima atlikti dėl per didelio optinio tankio.



3.7 pav. a) plonų Chl a plėvelių su polistirenu šviesos sugerties spektrai; b) plonų Chl a plėvelių su polistirenu šviesos sugerties spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

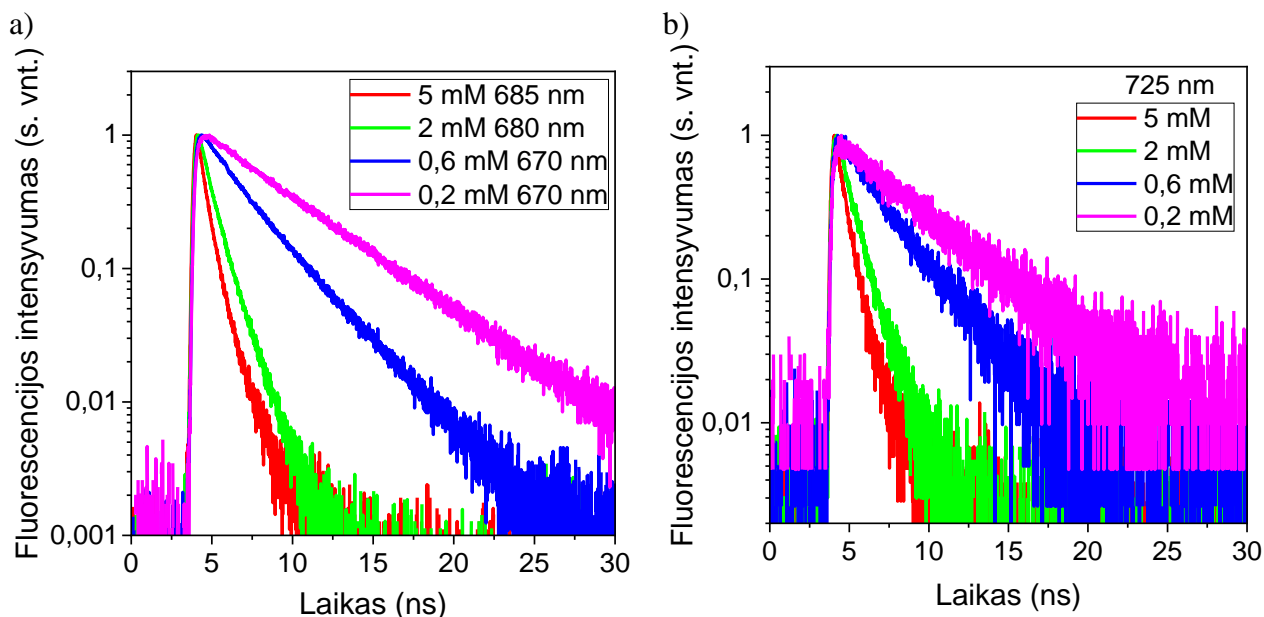
3.8 pav. pateikti plonų plėvelių fluorescencijos spektrai, kuriuose matomas fluorescencijos intensyvumo didėjimas, mažėjant koncentracijai, kas leidžia įtarti, jog vyksta koncentracinis gesinimas. Be to, didesnių koncentracijų plonose plėvelėse įvyko batochrominis poslinkis, kur 5 mM bandinio fluorescencijos maksimumas buvo ties 685 nm ir 2 mM – ties 678 nm. Dažniausiai didelių koncentracijų mėginiuose poslinkis į raudonąją pusę vyksta dėl reabsorbcijos reiškinių. Juostų pokylis ties 640 nm bangos ilgiu, kur fluorescencija nėra ties 0, lyginant su tirpalų rezultatais, vyksta dėl stiklo plokštelės fluorescencijos. Tai turi įtakos 3.8 pav. b) esantiems normuotiems spektrams, nes dėl skirtingo intensyvumo fluorescencijos ir normavimo nuo 0 iki 1 kreivės atitinkamai pakyla intervale nuo 640 nm iki 680 nm.



3.8 pav. a) plonų Chl a plėvelių su polistirenu fluorescencijos spektrai; b) plonų Chl a plėvelių su polistirenu fluorescencijos spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

Fluorescencijos kinetikos, išmatuotos ties fluorescencijos maksimumais bei ties 725 nm bangos ilgiu, pagal Chl a tirpalų kinetikų matavimus. 3.9 pav. pateiktuose kinetikų spektruose aiškiai matosi, kad mažėjant koncentracijai, relaksacijos trukmės ilgėja. O 3.3 lentelėje esančios suskaičiuotos relaksacijos trukmių vertės, pritaikius ištemptąją eksponentę, tik patvirtina tai. Plonoje plėvelėje, kurios koncentracija 0,2 mM vyksta vienkisponentinė relaksacija ir tik šiame bandinyje išmatuotame fluorescencijos maksimume ties 670 nm kinetika buvo lėtesnė nei 725 nm bangos ilgyje per 0,22 ns (4,4 %). Koncentracijai padidėjus 3 kartus iki 0,6 mM, kinetikos trukmė ties 670 nm sumažėjo per pusę – 51 % ir beveik nesiskyrė nuo 725 nm bangos ilgyje išmatuotos kinetikos vertės. Molekulių koncentraciją padidinus 10 kartų nuo žemiausios, iki 2 mM, kinetikų trukmė sumažėjo per 4,57 ns, tai yra 91,4 %. Relaksacijų trukmė ties 725 nm tapo ilgesnė per 0,13 ns, tai yra 30,2 %, nei ties 680 nm. Lyginant mažiausią ir 25 kartus už ją didesnę molekulių koncentracijų kinetikas jų fluorescencijos maksimaliose vertėse, trukmė pagreitėjo 97,8 %, o 725 nm – pagreitėjo 96,4 %. 5 mM

koncentracijos mėginio kinetika ties 725 nm pailgėjo 54,5 %. Iš teorinės dalies žinoma, jog kinetikos trukmės kinta dinaminio gesinimo metu. Tačiau plonose plėvelėse dinaminio gesinimo įtaka turėtų būti minimali, todėl manoma, kad energija prarandama kitais keliais.



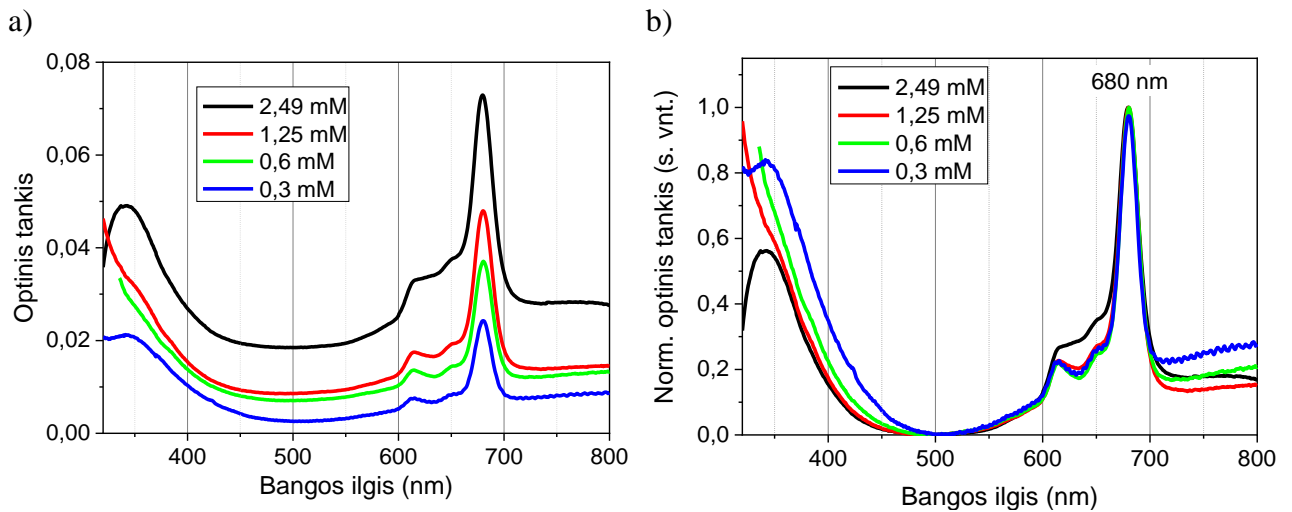
3.9 pav. Chl a plonų plėvelių kinetikos: a) ties fluorescencijos maksimumais, priklausomai nuo spektro; b) ties 725 nm.

3.3 lentelė. Chl a plonų plėvelių fluorescencijos kinetikų laikai ties fluorescencijos maksimumais ir 715 nm.

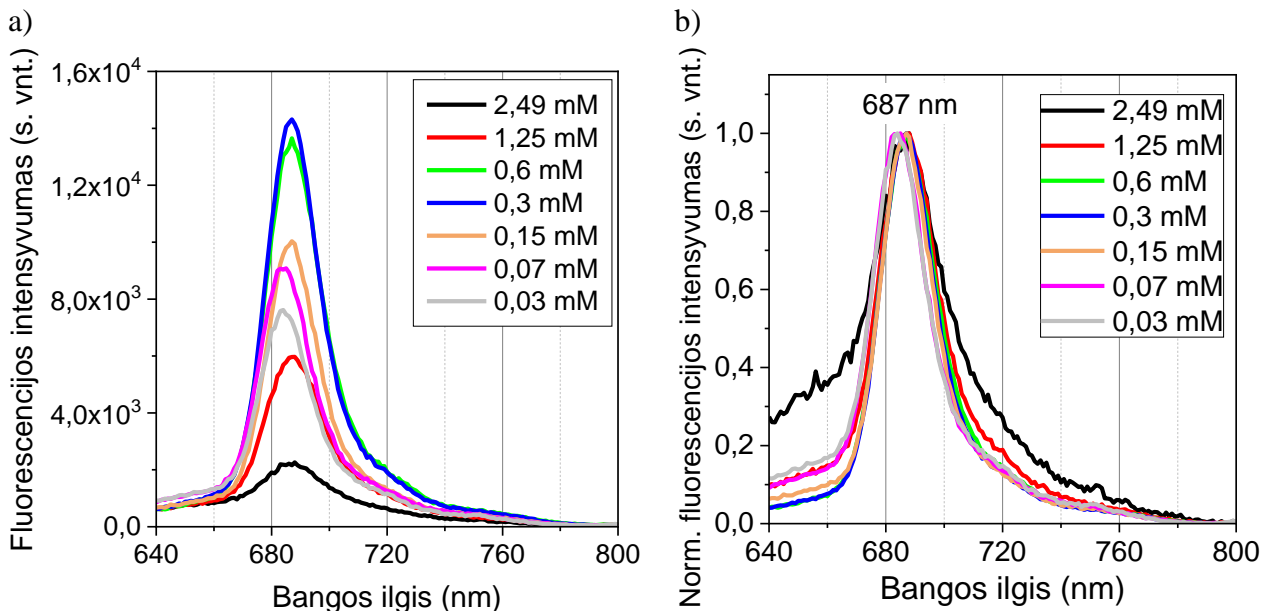
Koncentracija, mM	Bangos ilgis, nm	τ , ns	b	τ_{decay} , ns	Bangos ilgis, nm	τ , ns	b	τ_{decay} , ns
0,2	670	4,98	0,99	5	725	4,67	0,95	4,78
0,6		2,24	0,85	2,45		2,2	0,83	2,44
2	680	0,27	0,58	0,43		0,4	0,64	0,56
5	685	0,03	0,37	0,11		0,06	0,43	0,17

Apacioje aptariami TB-ZnPC su polistirenu plonų plėvelių rezultatai. 3.10 paveiksle matomi tirtų mėginių šviesos sugerties spektrai, kuriuose Q_y kreivės maksimumas yra ties 680 nm. 3.10 b) grafike didžiausios tirtos 2,49 mM koncentracijos bandinyje šviesa sugerama intensyviau, nei mažesnių koncentracijų mėginių plėvelėse, intervale nuo 620 nm iki 660 nm.

3.11 pav. a) pateiktuose plonų plėvelių fluorescencijos spektruose matomas koncentracinio gesinimo reiškinys, kuomet didėjant molekulių koncentracijai, fluorescencijos intensyvumas mažėja. Žiūrint nuo mažiausios koncentracijos, intensyvumas auga iki tam tikros ribos, kuomet didėja fluoroforų kiekis, o paskui dėl gesinimo jis pradeda mažėti. Fluorescencijos maksimumas yra ties 687 nm, o juostų pakilimą ties 640 nm ir normuoto spektro pasiskirstytą, kaip Chl a plonų plėvelių bandiniuose, taip ir čia lemia stiklo plokštelės fluorescencija.



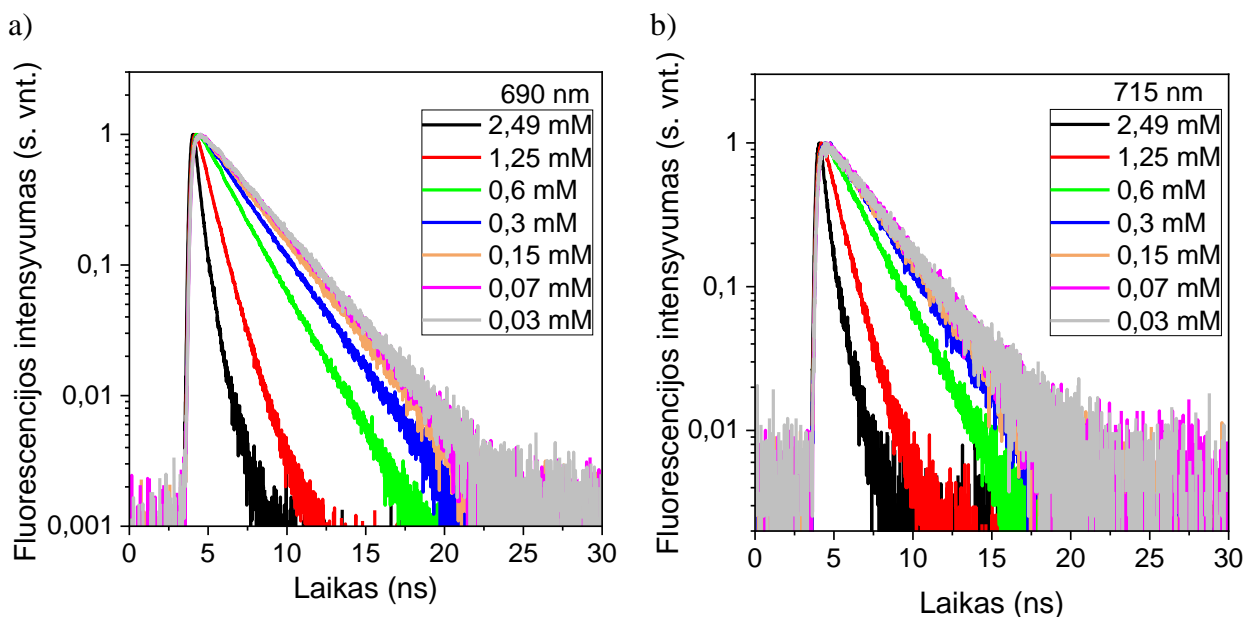
3.10 pav. a) plonų TB-ZnPC plėvelių su polistirenu šviesos sugerties spektrai; b) plonų TB-ZnPC plėvelių su polistirenu šviesos sugerties spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.



3.11 pav. a) plonų TB-ZnPC plėvelių su polistirenu fluorescencijos spektrai; b) plonų TB-ZnPC plėvelių su polistirenu fluorescencijos spektrai, normuoti nuo 0 iki 1.

Fluorescencijos kinetikos (3.12 pav.) pasižymi trukmės ilgejimu, kai mažėja bandinių koncentracija. 3.4 lentelėje pateiktos tikslios jų trukmės, pritaikius ištemptąją eksponentinę funkciją. Bandiniuose su TB-ZnPC koncentracija nuo 0,03 mM iki 0,6 mM relaksacija vyksta vienkسونentiškai ties abiejais bangos ilgiais. Lyginant plonų plėvelių trukmes tarp 690 nm ir 715 nm, 0,03 mM koncentracijoje pokytis labai mažas – trukmė ties 715 nm ilgesnė tik ~ 0,6 %, tačiau pokytis didėja: 0,07 mM – 1,2 %, 0,15 mM – 2,4 %, 0,3 mM – 7,9 %, 0,6 mM – 11,2 %. Tik didžiausios koncentracijos bandiniuose kinetikos yra daugiaeksponentinės funkcijos. 1,25 mM koncentracijos bandinio kinetika ties 715 nm buvo 20 % ilgesnė, o 2,49 mM plonos plėvelės – 33,3 %.

Žiūrint nuo mažiausios iki didžiausios koncentracijų bandinių relaksacijos trukmės, jos sumažėjo 98,1 % ties 690 nm ir 97,5 % ties 715 nm.



3.12 pav. TB-ZnPC plonų plėvelių kinetikos: a) ties 690 nm; b) ties 715 nm.

3.4 lentelė. TB-ZnPC plonų plėvelių fluorescencijos kinetikų laikai ties 690 nm ir 715 nm.

Koncentracija, mM	690 nm			715 nm		
	τ , ns	b	τ_{decay} , ns	τ , ns	b	τ_{decay} , ns
0,03	3,28	1,05	3,21	3,3	1,06	3,23
0,07	3,26	1,06	3,18	3,29	1,06	3,22
0,15	2,94	1,02	2,91	3,04	1,05	2,98
0,3	2,52	1,01	2,51	2,78	1,06	2,71
0,6	1,82	0,95	1,86	2,09	1,02	2,07
1,25	0,56	0,78	0,65	0,71	0,84	0,78
2,49	0,01	0,37	0,06	0,02	0,38	0,08

Chl a ir TB-ZnPC plonų plėvelių bandinių rezultatuose buvo matomas fluorescencijos koncentracinis gesinimas, žvelgiant į emisijos spektrus ir gyvavimo laikus. Kinetikos matuotos ties raudonuoju pečiu beveik visais atvejais buvo ilgesnės, nei matuojant ties fluorescencijos maksimumu. Didesnių koncentracijų bandiniuose įvyko daugiaeksponentis relaksacijos kitimas.

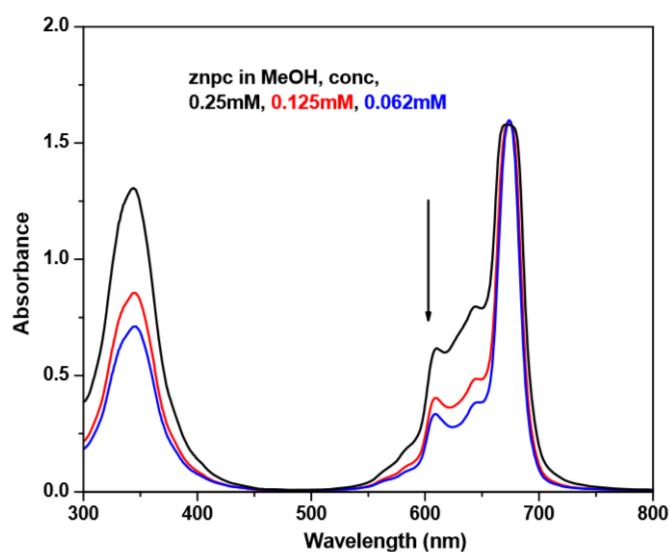
Susumuojant rezultatus galima teigti, jog tirpaluose pokyčių beveik nebuvo, nenustatytas koncentracinio gesinimo reiškiny, kuris įvyko plonose plėvelėse. Chl a bandinių šviesos sugerties maksimumas plonose plėvelėse pasislinko 5 nm į raudonąją pusę, lyginant su tirpalų mėginiais, fluorescencijos maksimumas pasislinko 1 nm į raudonąją pusę, nepaisant didesnių koncentracijų plonų plėvelių bandinių, kur vyksta batochrominis poslinkis, o tirpalų gyvavimo trukmės buvo nuo 0,42 ns iki 4,29 ns ilgesnės, lyginant panašių koncentracijų mėginius. TB-ZnPC plonų plėvelių

šviesos sugerties maksimali vertė pasislinko 2 nm į raudonąją, lyginant su tirpalais, fluorescencijos maksimumas pasislinko 4 nm į raudonąją pusę, o gyvavimo trukmės pailgėjo nuo 0,25 ns iki 3,13 ns tų pačių koncentracijų bandiniuose.

4. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS

Chl a tirpalų mėginiai tarp skirtingų molekulių koncentracijų neparodė didelių spektrinių skirtumų, dėl vis dar per mažų koncentracijų savigesinimui aptikti. Nors buvo manoma, jog Chl tirpalai gali demonstruoti savigesinimą esant 0,1 mM molekulių koncentracijai (Weiss & Weill-Malherbe, 1944), tyrimai įrodė, kad savigesinimas spektroskopiniais metodais negali būti aptinkamas mažesniuose molekulių koncentracijų tirpaluose nei 1 mM, o tampa aiškiai matomas nuo 2 mM ir daugiau (Watson & Livingston, 1950). Didžiausios Chl a molekulių koncentracijos tirpalas buvo 1,86 mM, tad ryškaus savigesinimo rezultatai neparodė.

Įvairių koncentracijų TB-ZnPC molekulių tirpalų rezultatuose nesimato jokių aiškių pokyčių tarp mėginių. Buvo atlikti tyrimai su TB-ZnPC molekulėmis metanolyje (MeOH) ir dimetilsulfoksido (DMSO), kur tirti 0,05 mM koncentracijos tirpalai. Atitinkamai, šviesos sugertis Q_y maksimume buvo 678 nm ir 673 nm. Tačiau sugertis srityje nuo 550 nm iki 650 nm suintensyvėjo, didinant TB-ZnPC koncentraciją MeOH nuo 0,062 mM iki 0,25 mM, kas leidžia įtarti, kad ZnPC molekulės agreguojasi MeOH tirpale esant didesnėms tirpios medžiagos koncentracijoms (Kakade et al., 2012). Lyginant panašias koncentracijas su pateiktomis straipsnyje, šiame darbe jokių agregacijos požymių nesimato. Įtakos galėjo turėti tirpiklio poliškumas, kadangi tolueno poliškumas yra 0,099, MeOH – 0,762, o DMSO – 0,444 (Dutkiewicz, 1990), tačiau apie šviesos sugerties pokyčius pastarajame tirpiklyje keičiant TB-ZnPC koncentraciją duomenų nepateikta. Fluorescencijos spektrų maksimumas MeOH tirpiklyje buvo 689 nm ir 694 nm – DMSO, kinetinių trukmės 3,53 ns ir 3,37 ns (Kakade et al., 2012). Mažėjanti fluorescencijos gyvavimo trukmė pasireiškia vykstant difuziniam gesinimui, tačiau rezultatuose matomas pokytis yra < 8 %, tad jo nepaisoma.



4.1 pav. Skirtingų TB-ZnPC koncentracijų MeOH tirpiklyje šviesos sugerties spektrai. Santykiniai sugerties spektrų aukščiai buvo normuoti ties 673 nm (Kakade et al., 2012).

Polimerinių matricių naudojimas Chl tyrimams turi kelis privalumus. Dažniausiai šiomis sistemomis siekiama atkurti panašų standumą turinčią *in vivo* aplinką, kaip fotosintetinėse šviesorankos antenose (Wong et al., 1978). Taip pat, atstumas tarp molekulių priklauso nuo Chl koncentracijos, kurią galima keisti, išvengiant agregatų susidarymo. Dėl to, polimerinės plėvelės naudingos energijos pernašos tyrimuose, nes jose pigmento molekulės būna tolygiai pasiskirsčiusios (Zandvoort et al., 1995). Vacek ir kt. (1977) tyrė Chl molekules polistireno matricioje, kur šviesos sugerties kreivių maksimumai 0,23 mM koncentracijos plėvelėje buvo ties 432 nm Soret juostos ir 669 nm Q_y juostos kambario temperatūroje. Atrodo, jog spektras pasislinkęs per 1 nm į mėlynąją pusę, nei šiame darbe pateiktuose rezultatuose, kas galėjo nutikti dėl acetono, kaip tirpiklio, naudojamo. Straipsnyje taip pat minima, jog bandinių koncentracijoms esant < 0,4 mM relaksacijos trukmė yra ~ 5,5 ns, o koncentraciją padidinus iki 2,7 mM, fluorescencijos gyvavimo trukmė ženkliai sumažėja (Wong et al., 1978).

Plonos TB-ZnPC plėvelės 2,49 mM koncentracijos bandiniui, išsiskyrus iš kitų koncentracijų normuotuose šviesos sugerties spektruose (3.10 b) pav.), ir kreivę palyginus su 4.1 pav. pateiktais rezultatais, galima įtarti, kad šiame mėginyje yra dalis dimerų ar kitų agregatų. Pc molekulės turi polinkį agreguotis, sudarydamos π - π sanglaudos struktūras, pasireiškiančias platesne šviesos sugerties juosta, pasislinkusia į mėlyną pusę Q juostos atžvilgiu. Šiame darbe tirtos TB-ZnPC molekulės turi keturias tretines butilo grupes, prijungtas prie ZnPC šerdies struktūros, trukdančias formuotis π - π sanglaudos struktūroms, taip sumažinant agregaciją ir pagerinant tirpumą įprastuose organiniuose tirpikliuose (Shankar et al., 2009).

Beddard ir kt. (1976) straipsnyje pasiūlė koncentracinio gesinimo mechanizmą, kai tarp panašių molekulių vyksta Fiorsterio tipo rezonansinė energijos migracija, kuri sugaunama molekulių poroje, išsidėsčiusioje arčiau nei kritinis atstumas, vadinamojoje statistinės poros gaudyklėje. Statistinė pora yra bet kurios dvi Chl molekulės, kurios atsitiktiniu pasiskirstymu yra atskirtos mažiau nei 10 Å atstumu. Be to, jos pagrindinėje būsenoje sąveikauja nepastebimai, tačiau sąveikauja stipriai, kai viena iš molekulių sužadinama, sudarydama eksimerą arba kitokį kompleksą, kuris nefluorescuoja monomerinėje būsenoje (Beddard et al., 1976). Kadangi, fluorescencijos ir gyvavimo laikų pokyčiai vyksta tik plonose plėvelėse, kur molekulės išsidėsčiusios mažesniais atstumais, nei tirpaluose, statistinių porų modelis tiktų paaiškinti vykstantį koncentracinį gesinimą. Kuo didesnė koncentracija, tuo didesnė tikimybė susidaryti statistinėms poroms. Dėl to 2,49 mM ar 1,25 mM koncentracijų mėginiuose jų kiekis yra didesnis už 0,03 mM ar mažesnių koncentracijų bandinius. Kadangi statistinės poros nefluorescuoja, tai paaiškintų, kodėl fluorescencijos intensyvumas labai sumažėja didėjant molekulių koncentracijoms bandiniuose. Taip pat, esant didesniam statistinių porų gaudyklių skaičiui, migracijos metu sužadinimo energijai žymiai lengviau pakliūti į jas. Taip prarasta energija lemia gyvavimo trukmės mažėjimą.

IŠVADOS

1. Santykinis šviesos sugerties juostos ties 650 nm padidėjimas, rodantis tam tikrą agregacijos laipsnį esant didesnėms mėginių koncentracijoms, matomas tik didžiausios koncentracijos cinko ftalocianino plėvelėje.
2. Plonų plėvelių fluorescencijos intensyvumas ženkliai mažėja didėjant molekulių koncentracijoms greičiausiai dėl labai mažų atstumų tarp molekulių. Tai rodo koncentracinio gesinimo vyksmą mėginiuose.
3. Tirpalų ir mažesnių koncentracijų plonų plėvelių fluorescencijos kinetikos rodo vienkسونentinį kitimą, o tuo tarpu didesnių koncentracijų plėvelėse stebimas daugiaeksonentis kinetikų kitimas, kuriam aprašyti naudojama ištemptoji eksonentinė funkcija. Tai rodo, kad plėvelėse žymiai didesnę vaidmenį vaidina sužadavimo pernaša tarp molekulių.

JUSTĖ TAMOŠIŪNAITĖ
Magistro baigiamasis darbas

KONCENTRACINIS GESINIMAS CHLOROFILO IR CINKO FTALOCIANINO TIRPALUOSE BEI PLĖVELĖSE

SANTRAUKA

Koncentracinis gesinimas vyksta, kuomet didėjant molekulių koncentracijai, fluorescencijos intensyvumas mažėja. Tačiau dar nėra iki galo išsiaiškinta, kaip šis reiškinys vyksta. Reiškinyms pastebėtas ir chlorofilo a *in vitro* tyrimuose. Išsiaiškinti chlorofilo a molekulių vyksmus koncentracinio gesinimo procese, kaip modelinė sistema, buvo naudojamos cinko ftalocianino molekulės, dėl savo struktūrinių ir spektrinių savybių panašumo.

Šio magistro baigiamojo darbo tikslas: ištirti ir palyginti chlorofilo a ir cinko ftalocianino koncentracinį gesinimą skirtingose molekulių aplinkose – tirpaluose ir plėvelėse. Darbo uždaviniai: nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino šviesos sugertį tirpaluose ir plėvelėse; nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino fluorescencijos spektrus tirpaluose ir plėvelėse; nustatyti skirtingų koncentracijų chlorofilo a ir cinko ftalocianino fluorescencijos kinetikas tirpaluose ir plėvelėse.

Molekulių koncentraciniam gesinimui tirti taikytos sistemos – tirpalai ir plonos plėvelės. Tirpalai gaminti tolueno tirpiklyje ir skirtingų koncentracijų molekulių bandiniai matuoti naudojant 0,1 mm optinio kelio apvalią kiuvetę. O plonos plėvelės darytos ant stiklo plokštelės, naudojant sukimo dengimo iš tirpalo metodą, kur tirpalą sudaro polistirenas, toluenas ir skirtingos tiriamų molekulių koncentracijos.

Šviesos sugerties spektrai neparodė jokių didelių skirtumų, tarp skirtingų koncentracijų mėginių, išskyrus cinko ftalocianino ploną 2,5 mM koncentracijos plėvelę, kur spektras rodo santykinę šviesos sugerties padidėjimą esant ~ 615 nm ir ~ 650 nm juostoms, kas įrodo tam tikrą agregacijos laipsnį esant didesnėms koncentracijoms. Tirpalų fluorescencijos spektrai skiriasi nežymiai, o plonose plėvelėse matomas žymus fluorescencijos intensyvumo mažėjimas, didėjant molekulių koncentracijoms, kas įrodo koncentracinio gesinimo vyksmą mėginiuose. Tirpalų ir mažesnių koncentracijų plonų plėvelių fluorescencijos kinetikos rodo vieneksponentinį kitimą, o tuo tarpu didesnių koncentracijų plėvelėse stebimas daugiaeksponentis kinetikų kitimas, kuriam aprašyti naudojama ištemptoji eksponentinė funkcija.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

JUSTĖ TAMOŠIŪNAITĖ

Master thesis

CONCENTRATION QUENCHING IN SOLUTIONS AND THIN FILMS OF CHLOROPHYLL AND ZINC PHTHALOCYANINE

SUMMARY

Concentration quenching occurs when fluorescence intensity decreases with increasing molecular concentration. However, it is not fully understood how this phenomenon works. It has also been observed in *in vitro* studies with chlorophyll. Zinc phthalocyanine molecules were used as a model system to elucidate the processes of concentration quenching of chlorophyll a molecules.

The aim of this master's thesis is to investigate and compare the concentration quenching of chlorophyll a and zinc phthalocyanine in different molecular environments - solutions and thin films. Tasks: to investigate the light absorption of different concentrations of chlorophyll a and zinc phthalocyanine in solutions and thin films; to investigate the fluorescence spectra of different concentrations of chlorophyll a and zinc phthalocyanine in solutions and thin films; to investigate the fluorescence kinetics of different concentrations of chlorophyll a and zinc phthalocyanine in solutions and thin films.

The systems used for the concentration quenching of molecules are solutions and thin films. Solutions were prepared in a toluene solvent and samples of different concentrations were measured using a 0.1 mm optical path disc cuvette. Thin films were made on a glass plate using a spin coating method, where the solution consists of polystyrene, toluene, and different concentrations of the molecules under study.

The light absorption spectra did not show any significant differences between the samples at different concentrations, except for the zinc phthalocyanine 2.5 mM thin film, where the spectrum shows a relative increase in light absorption at the ~ 615 nm and ~ 650 nm bands, demonstrating some degree of aggregation at higher concentrations. The fluorescence spectra of the solutions differ very slightly, however a significant decrease of fluorescence intensity is observed in the thin films with increasing concentration of the molecules, which demonstrates concentration quenching in the samples. Fluorescence kinetics of solutions and lower concentration thin films show a mono-exponential decay, while higher concentration films show a multi-exponential decay kinetics, which is described by the stretched exponential function.

AUTORĖS DALYVAVYMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

1. Justė Tamošiūnaitė, Simona Streckaitė (2021). CONCENTRATION QUENCHING OF ZINC-PHTHALOCYANINE IN SOLUTIONS. March 16-19, Vilnius, Lithuania. p. 494 (http://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2021/03/Abstract_book_2021S.pdf)
2. Justė Tamošiūnaitė, Simona Streckaitė, Jevgenij Chmeliov, Andrius Gelžinis, Leonas Valkūnas (2021). CONCENTRATION QUENCHING OF ZINC-PHTHALOCYANINE IN THIN FILMS. Chemistry and chemical technology 2021. September 24, Vilnius, Lithuania. p. 101 (<http://cct2021.ftmc.lt/wp-content/uploads/2021/09/CCT2021-Book-of-abstracts.pdf>)
3. Justė Tamošiūnaitė, Simona Streckaitė, Jevgenij Chmeliov, Andrius Gelžinis, Leonas Valkūnas (2021). Koncentracinio gesinimo matavimai plonose cinko ftalocianino plėvelėse. 44-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, 2021 m. spalio 6-8 d., Vilnius. p. 117 (<http://lnfk.ftmc.lt/wp-content/uploads/2021/11/LNFK-44-pranesimu-medziaga-2021-spalio-6-8-Vilnius.pdf>)
4. Justė Tamošiūnaitė, Simona Streckaitė, Jevgenij Chmeliov, Andrius Gelžinis, Leonas Valkūnas (2022). CONCENTRATION QUENCHING OF CHLOROPHYLL A AND ZINC PHTHALOCYANINE IN THIN POLYSTYRENE FILMS. 65TH INTERNATIONAL CONFERENCE FOR STUDENTS OF PHYSICS AND NATURAL SCIENCES. March 15-18, Vilnius, Lithuania. p. 278 (http://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2022/03/Abstract_book_2022S.pdf)

LITERATŪRA

Abd-El-Aziz, A. S., & Dalgakiran, S. S. (2012). Metal-Containing Macromolecules. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 637–688). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00155-2>

Agrawal, M. L., Chauvet, J. P., & Patterson, L. K. (1985). Effects of molecular organization on photophysical behavior: Lifetime and steady-state fluorescence of chlorophyll a singlets in monolayers of dioleoylphosphatidylcholine at the nitrogen-water interface. *The Journal of Physical Chemistry*, 89(14), 2979–2982. <https://doi.org/10.1021/j100260a005>

Albani, J. R. (2004). Light Absorption By A Molecule. In *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies* (pp. 1–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044451449-3/50001-0>

Aramrueang, N., Asavasanti, S., & Khanunthong, A. (2019). Leafy Vegetables. In *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* (pp. 245–272). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00010-1>

Bae, W., Yoon, T.-Y., & Jeong, C. (2021). Direct evaluation of self-quenching behavior of fluorophores at high concentrations using an evanescent field. *PLOS ONE*, 16(2), e0247326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247326>

Beddard, G. S., Carlin, S. E., & Porter, G. (1976). Concentration quenching of chlorophyll fluorescence in bilayer lipid vesicles and liposomes. *Chemical Physics Letters*, 43(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(76\)80749-X](https://doi.org/10.1016/0009-2614(76)80749-X)

Beddard, G. S., & Porter, G. (1976). Concentration quenching in chlorophyll. *Nature*, 260(5549), 366–367. <https://doi.org/10.1038/260366a0>

Berberan-Santos, M. N., Bodunov, E. N., & Valeur, B. (2005). Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential). *Chemical Physics*, 315(1–2), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.04.006>

Bidermane, I. (2014). Structure and Electronic Properties of Phthalocyanine Films on Metal and Semiconductor Substrates. Doktoro disertacija. Pierre ir Marie Curie Universitetas. Paryžius, Prancūzija. Uppsala universitetas. Uppsala, Švedija. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01020786>

Bohn, T., & Walczyk, T. (2004). Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. *Journal of Chromatography A*, 1024(1–2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.067>

Brozek-Pluska, B., Jarota, A., Kania, R., & Abramczyk, H. (2020). Zinc Phthalocyanine Photochemistry by Raman Imaging, Fluorescence Spectroscopy and Femtosecond Spectroscopy in

Normal and Cancerous Human Colon Tissues and Single Cells. *Molecules*, 25(11), 2688. <https://doi.org/10.3390/molecules25112688>

Burshtein, A. I. (1984). Concentration quenching of noncoherent excitation in solutions. *Soviet Physics Uspekhi*, 27(8), 579. <https://doi.org/10.1070/PU1984v027n08ABEH004062>

Chaabene, M., Gassoumi, B., Mignon, P., Ben Chaâbane, R., & Allouche, A.-R. (2019). New zinc phthalocyanine derivatives for nitrogen dioxide sensors: A theoretical optoelectronic investigation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 88, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.01.008>

Chen, C.-T. (2004). Evolution of Red Organic Light-Emitting Diodes: Materials and Devices. *Chemistry of Materials*, 16(23), 4389–4400. <https://doi.org/10.1021/cm049679m>

Dexter, D. L., & Schulman, J. H. (1954). Theory of Concentration Quenching in Inorganic Phosphors. *The Journal of Chemical Physics*, 22(6), 1063–1070. <https://doi.org/10.1063/1.1740265>

Dutkiewicz, M. (1990). Classification of organic solvents based on correlation between dielectric β parameter and empirical solvent polarity parameter ENT. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 86(12), 2237–2241. <https://doi.org/10.1039/FT9908602237>

Edinburgh Instruments. (2011). [internetinè svetainè]. The FLS920 Series. [žiūrèta 2022-05-17]. Adresas: http://www.lao.cz/data/ke-stazeni/FLS920_brochure.pdf

Eftink, M. R. (2002). Fluorescence Quenching: Theory and Applications. In J. R. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles* (pp. 53–126). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-47058-6_2

Ghani, F., Kristen, J., & Riegler, H. (2012). Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(2), 439–449. <https://doi.org/10.1021/je2010215>

Ghosh, M., Nath, S., Hajra, A., & Sinha, S. (2013). Fluorescence self-quenching of tetraphenylporphyrin in liquid medium. *Journal of Luminescence*, 141, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jlum.2013.03.025>

Gutschick, V. P. (1978). Concentration quenching in chlorophyll-a and relation to functional charge transfer in vivo. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 10(5), 153–170. <https://doi.org/10.1007/BF00743105>

Hamann, S., Kiilgaard, J. F., Litman, T., Alvarez-Leefmans, F. J., Winther, B. R., & Zeuthen, T. (2002). Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching. *Journal of Fluorescence*, 12(2), 139–145. <https://doi.org/10.1023/A:1016832027325>

Hellstrom, S. L. (2007). [Paskaitų medžiaga]. Basic Models of Spin Coating. Professor Robert B. Laughlin, Department of Physics, Stanfordo Universitetas. Kalifornija, JAV. [žiūrèta 2022-05-17] Adresas: <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>

Jameson, D. M. (2014). Introduction to Fluorescence. *CRC Press*.
<https://doi.org/10.1201/b16502>

Jasco Corporation. (2010). Model V-630/650/660/670 Spectrophotometer. Vadovas. Japonija. [Žiūrėta 2022-05-16]. Prieiga per internetą:
<https://static1.squarespace.com/static/5876205e2e69cfaf7c9fe5a4/t/5a577b7fec212d24a8bb1f70/1515682692881/V-600+Series+Hardware+Function+Manual.pdf>

Kakade, S., Ghosh, R., & Palit, D. K. (2012). Excited State Dynamics of Zinc–Phthalocyanine Nanoaggregates in Strong Hydrogen Bonding Solvents. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(28), 15155–15166. <https://doi.org/10.1021/jp304369r>

Kelly, A. R., & Porter, G. (1970). Model systems for photosynthesis I. Energy transfer and light harvesting mechanisms. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, 315(1521), 149–161. <https://doi.org/10.1098/rspa.1970.0034>

Knox, R. S. (1994). Spectral Effects of Exciton Splitting in “Statistical Pairs.” *The Journal of Physical Chemistry*, 98(30), 7270–7273. <https://doi.org/10.1021/j100081a006>

Kröger, J., Néel, N., Berndt, R., Wang, Y. F., & Gopakumar, T. G. (2018). Exploring the Organic–Inorganic Interface With a Scanning Tunneling Microscope. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (pp. 81–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14144-7>

Lakowicz, J. R., & Masters, B. R. (2008). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2), 029901. <https://doi.org/10.1117/1.2904580>

Mack, J., & Kobayashi, N. (2011). Low Symmetry Phthalocyanines and Their Analogues. *Chemical Reviews*, 111(2), 281–321. <https://doi.org/10.1021/cr9003049>

Mandal, R., & Dutta, G. (2020). From photosynthesis to biosensing: Chlorophyll proves to be a versatile molecule. *Sensors International*, 1, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100058>

Marquez, U.M.L., Sinnecker, P. (2008). Chlorophylls in foods: sources and stability food colorants. In: Socaciu, C. (Ed.), *Chemical and Functional Properties*. CRC Press, Boca Raton, pp. 195–212.

Morançais, M., Mouget, J.-L., & Dumay, J. (2018). Proteins and Pigments. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 145–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00007-4>

Ogunsipe, A., Chen, J.-Y., & Nyokong, T. (2004). Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine derivatives—Effects of substituents and solvents. *New Journal of Chemistry*, 28(7), 822–827. <https://doi.org/10.1039/B315319C>

Sanders, R., Zandvoort, M. A. M. J., Draaijer, A., Levine, Y. K., & Gerritsen, H. C. (1996). Confocal Fluorescence Lifetime Imaging of Chlorophyll Molecules in Polymer Matrices.

Photochemistry and Photobiology, 64(5), 817–820. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb01840.x>

Sauer, M., Hofkens, J., & Enderlein, J. (2011). Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From *Single Molecules to Ensembles*. <https://doi.org/10.1002/9783527633500>

Sekkat, N., Bergh, H. van den, Nyokong, T., & Lange, N. (2012). Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *Molecules*, 17(1), 98–144. <https://doi.org/10.3390/molecules17010098>

Shankar, K., Feng, X., & Grimes, C. A. (2009). Enhanced Harvesting of Red Photons in Nanowire Solar Cells: Evidence of Resonance Energy Transfer. *ACS Nano*, 3(4), 788–794. <https://doi.org/10.1021/nn900090x>

Shi, W.-J., Barber, J., & Zhao, Y. (2013). Role of Formation of Statistical Aggregates in Chlorophyll Fluorescence Concentration Quenching. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(15), 3976–3982. <https://doi.org/10.1021/jp311821t>

Siggel, U., Bindig, U., Endisch, C., Komatsu, T., Tsuchida, E., Voigt, J., & Fuhrhop, J.-H. (1996). Photophysical and photochemical properties of porphyrin aggregates. *Berichte Der Bunsengesellschaft Fur Physikalische Chemie*, 100(12), 2070–2075. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19961001225>

Sigma-Aldrich. (2022a). [internetinè svetainè] Chlorophyll a analytical standard 479-61-8. [žiūrèta 2022-05-15]. Adresas: <https://www.sigmaaldrich.com/LT/en/product/sial/96145/>

Sigma-Aldrich. (2022b). [internetinè svetainè]. Zinc 2,9,16,23-tetra-tert-butyl-29H,31H-phthalocyanine Dye content 96 39001-65-5. [žiūrèta 2022-05-15]. Adresas: https://www.sigmaaldrich.com/LT/en/product/aldrich/430994?gclid=CjwKCAjws8yUBhA1EiwAiptEVxGiSnEVcSNx2d_vd4Su7vGBcx_Gb9ptkKU8t3vCya83BAE_j8LZR0CE4YQAvD_BwE

Tasso, T. T., Schlothauer, J. C., Junqueira, H. C., Matias, T. A., Araki, K., Liandra-Salvador, É., Antonio, F. C. T., Homem-de-Mello, P., & Baptista, M. S. (2019). Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrazine Photosensitizers. *Journal of the American Chemical Society*, 141(39), 15547–15556. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b05991>

Tweet, A. G., Bellamy, W. D., & Gaines, G. L. (1964). Fluorescence Quenching and Energy Transfer in Monomolecular Films Containing Chlorophyll. *The Journal of Chemical Physics*, 41(7), 2068–2077. <https://doi.org/10.1063/1.1726207>

Tyona, M. D. (2013). A theoretical study on spin coating technique. *Advances in Materials Research*, 2(4), 195–208. <https://doi.org/10.12989/AMR.2013.2.4.195>

K. Vacek*, D. Wong and Govindjeet. (1977). ABSORPTION AND FLUORESCENCE PROPERTIES OF HIGHLY ENRICHED REACTION CENTER PARTICLES OF PHOTOSYSTEM I AND OF ARTIFICIAL SYSTEMS. *Photochemistry and Photobiology*, 1977, Vol. 26. pp. 269-216. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1977.tb07484.x

Watson, W. F., & Livingston, R. (1950). Self-Quenching and Sensitization of Fluorescence of Chlorophyll Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 18(6), 802–809. <https://doi.org/10.1063/1.1747779>

Weiss, J., & Weill-Malherbe, H. (1944). 151. Some observations on the photochemistry of fluorescent substances. Part II. Concentration quenching (self-quenching) of fluorescence. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 544. <https://doi.org/10.1039/jr9440000544>

Wong, D., Govindjee, Merkelo, H., & Vacek, K. (1978). Excitation Energy Transfer among Chlorophyll a Molecules in Polystyrene: Concentration Dependence of Quantum Yield, Polarization and Lifetime of Fluorescence. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 33(11–12), 863–869. <https://doi.org/10.1515/znc-1978-11-1211>

Wu, X., & Dong, C.-M. (2020). Chapter 4 - Near-infrared-responsive gold nanoparticle-based photothermal agents: From synthesis to anticancer applications. In S. ki Choi (Ed.), *Photonanotechnology for Therapeutics and Imaging* (pp. 83–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817840-9.00004-7>

Yuen, M. J., Shipman, L. L., Katz, J. J., & Hindman, J. C. (1980). CONCENTRATION QUENCHING OF FLUORESCENCE FROM CHLOROPHYLL-A, PHEOPHYTIN-A, PYROPHEOPHYTIN-A AND THEIR COVALENTLY-LINKED PAIRS*. *Photochemistry and Photobiology*, 32(3), 281–296. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1980.tb03765.x>

Zandvoort, M. A. M. J. van, Wróbel, D., Lettinga, P., Ginkel, G. van, & Levine, Y. K. (1995). CHLOROPHYLLS IN POLYMERS. I. STATE OF CHLOROPHYLL a IN UNSTRETCHED POLYMER SYSTEMS. *Photochemistry and Photobiology*, 62(2), 279–289. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05270.x>

PADĖKA

Už gautas fluorescencijos kinetikų relaksacijos trukmes, pritaikius ištemptą eksponentinę funkciją dėkoju Dr. Andriui Gelžiniui.