

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
FIZIKOS FAKULTETAS  
KVANTINĖS ELEKTRONIKOS KATEDRA  
BIOFOTONIKOS LABORATORIJA

Laboratorinis darbas (PPPAT)

**Porfirininės prigimties pigmentų agregacijos  
tyrimas**

VILNIUS  
2004

## **1. Darbo tikslas:**

Susipažinti su porfirininės prigimties pigmentų agregacijos dėsningumais, išmatuoti agregacijos konstantą ir išsivinti spektroskopines tarpmolekulinės sąveikos tyrimo metodikas.

## **2. Darbo uždutys:**

- 1) Išmatuoti porfirininės prigimties pigmentų sugerties spektrus.
- 2) Keičiant koncentracijas, interpretuoti spektrinius pokyčius, sąlygotus porfirino agregacijos.
- 3) Išmatuoti porfirino Soret juostos sugerties ir skirtuminių sugerties spektrų priklausomybę nuo jo koncentracijos tirpale.
- 4) Apskaičiuoti dimerizacijos konstantą.

## **3. Teorinė dalis**

### **3.1 Chromoforų aplinkos įtaka jų spektrams**

Molekulių, atomų ir kitų kvantinių objektų energijos spektras priklauso nuo juos supančios aplinkos. Tą gerai iliustruoja iš kvantinės mechanikos gerai žinomi Štarko ir Zėmano reiškiniai (šiais atvejais aplinka yra išorinis elektrinis arba magnetinis laukas). Lygiai taip pat į kvantinių objektų energijos spektrą veikia elektromagnetinė sąveika su aplink juos esančiomis kitomis molekulėmis, tačiau ši sąveika statistiniu požiūriu yra netvarki (skirtingai nuo minėtų pavyzdžių), todėl jos įtaką galime įvertinti tik statistikos metodais.

Aplinkos sąlygoti energijos spektro pokyčiai atsispindi ir chromoforų molekulių sugerties spektruose. Labai svarbi tų spektrų priklausomybė nuo chromoforų sąveikos su tirpikliu arba, jei koncentracija yra pakankamai didelė, tarpusavio sąveikos. Dėl tokios sąveikos gali pakisti spektrų intensyvumas, spektrinių juostų forma arba maksimalios sugerties bangos ilgis. Kai laisvieji chromoforai (pavyzdžiui, triptofanas) yra vandeniniame

tirpale, juos supanti aplinka, trumpiau tariant, ir yra vanduo. Jei triptofanas yra ant baltymų molekulės, tai dėl stipraus triptofano hidrofobiškumo jo šoninė grupė bus pasislėpusi baltyminės molekulės viduje, kur aplinka yra artimesnė angliavandeniliniam tirpikliui, o ne vandeniui.

Chromoforo aplinkos keitimas, pavyzdžiui, polinės terpės pakeitimas nepoline, turi didžiulę įtaką atstumui tarp elektroninių energetinių lygmenų, taigi, ir sugerties maksimumo bangos ilgiui. Dažniausiai tirpiklis veikia taip, kad chromoforo kiekvieno lygmens vidutinė energija sumažėja. Sąveika tarp tirpinio ir tirpiklio dažniausiai vyksta tokiose tarpusavio molekulių orientacijose, kurios labiausiai padidina tarpusavio trauką, o ne tose orientacijose, kurios sąlygoja atostumą, nes kiekviena sistema stengiasi pereiti į stabilią būseną su galima žemiausia energija.

Kai chromoforas būna pagrindinėje būsenoje, tirpiklio molekulės išsidėsto taip, kad jų energija būtų mažiausia. Sužadavimo (sistemos sutrikdymo) procesas įvyksta per  $10^{-15}$  s laiką, o tai yra žymiai mažiau nei molekulės charakteringų judesių laikas. Todėl norėdami apskaičiuoti bangos ilgį, kuriam esant vyksta sugertis, reikia žinoti sužadinto chromoforo energiją, tirpiklio molekulėms esant pagrindiniame būvyje. Atliekant tokio tipo skaičiavimus reikia atkreipti dėmesį į du labai svarbius faktorius: dielektrinę skvarbą aukštame dažnyje (nusakančią poliarizuojamumą) bei pastovų dipolinį momentą. Šie faktoriai skiriasi tuo, jog su poliarizuojamumu susiję efektai gana greitai pasireiškia, kai sužadinus sistemą persitvarko elektronai, o su pastoviu dipoliniu momentu susiję efektai yra apibūdinami daug ilgesniais laikais.

Kai didesnę įtaką turi poliarizuojamumo efektai, tai aišku, kad poliniame tirpiklyje visų pirma sumažės energija tos chromoforo elektroninės būsenos, kuri turi didžiausią dipolinį momentą. Kadangi tokią būseną dažniausiai atitinka sužadinta būseną, tai galime padaryti tokią išvadą: poliniuose tirpikliuose sugerties juosta pasislenka į ilgesniųjų bangų pusę.

### **3.2 Eksimeriniai ir monomeriniai chromoforų spektrai**

Kai chromoforai priartėja vienas prie kito pakankamai arti, tarp jų atsiranda elektroninė sąveika. Tokią sąveiką galima stebėti tarp nukleininų rūgščių bazių bei tarp peptidinių baltymų chromoforų.

Nagrinėdami eksitoninę sąveiką, tarsime, jog monomerinis chromoforas turi tik dvi elektronines būsenas,  $0$  ir  $a$ . Paprastumo dėlei, sugerties spektrą tegul charakterizuos tik viena

sugerties linija, atitinkanti dažnį  $\nu_{0a} = (E_a - E_0)/h$ . Pagrindinę būseną atitinka banginė funkcija  $\phi_0$ , o sužadintą būseną –  $\phi_a$ . Šios funkcijos yra ortogonalios ir normuotos į vienetą. Monomero sugerties intensyvumas bus apskaičiuojamas pagal šuolio momento kvadratą  $|\langle \phi_0 | \mu | \phi_0 \rangle|^2$ .

Iš pradžių aprašysime dimerą, kuris yra sudarytas iš dviejų monomerų, esančių pagrindinėje būsenoje. Kiekvieno monomero būseną yra  $\phi_{10}$  ir  $\phi_{20}$  atitinkamai. Taigi, viso monomero būseną aprašys tokia banginė funkcija  $\Psi_0 = \phi_{10}\phi_{20}$ . Dimeras, kuriame yra sužadintas tik vienas monomeras bus aprašomas  $\Psi_{1a} = \phi_{1a}\phi_{20}$  arba  $\Psi_{2a} = \phi_{10}\phi_{2a}$ . Reikėtų pastebėti, kad šios dvi būsenos yra ortogonalios. Ir paskutinė galima būseną bus ta, kai abu monomerai bus sužadintoje būsenoje  $\phi_{1a}\phi_{2a}$ .

### 3.2.1 Dimeras, sudarytas iš nesąveikaujančių monomerų

Iš pradžių aprašysime dimero būseną, kai nėra sąveikos tarp monomerų. Pagrindinė dimero būseną yra tokia, kai abu dimerą sudarantys monomerai yra pagrindinėje būsenoje. Kaip žinome, dimero banginė funkcija yra lygi dimerą sudarančių monomerų banginių funkcijų sandaugai. Todėl pagrindinės dimero būsenos banginė funkcija bus  $\Psi_0 = \phi_{10}\phi_{20}$ . Dimeras, esantis pirmoje sužadintoje būsenoje bus sudarytas iš vieno monomero, esančio  $a$  lygmenyje, o kito –  $0$ -niame. Todėl gausime dvi būsenas:  $\Psi_{1a} = \phi_{1a}\phi_{20}$  ir  $\Psi_{2a} = \phi_{10}\phi_{2a}$ . Reikia pastebėti, jog pastarosios dvi būsenos yra ortogonalios, t.y.  $\langle \phi_{1a}\phi_{20} | \phi_{10}\phi_{2a} \rangle = 0$ . Antroji sužadinta būseną yra aprašoma bangine funkcija  $\phi_{1a}\phi_{2a}$ . Šios būsenos energija bus dvigubai didesnė nei būsenų, kurias aprašo banginės funkcijos  $\Psi_{1a}$  ir  $\Psi_{2a}$ , energija. Sugertes juostos, atsiradusios dėl šuolio iš pagrindinės būsenos į sužadintą, maksimumas bus labai trumpų bangų srityje, ir todėl šis šuolis nebus čia nagrinėjamas.

Skirtingų dimero būsenų energijos yra skaičiuojamos kaip tikrinės jų hamiltonianų vertės, t.y.  $H = H_1 + H_2$ , čia  $H_1$  ir  $H_2$  – 1 ir 2, atitinkamai, monomero hamiltonianai. Yra gaunamos tokios lygtys:

$$H_1 \phi_{10} = E_0 \phi_{10}, \quad H_1 \phi_{1a} = E_a \phi_{1a} \quad (1)$$

$$H_2 \phi_{20} = E_0 \phi_{20}, \quad H_2 \phi_{2a} = E_a \phi_{2a} \quad (2)$$

Iš to išplaukia, kad dimero energija bus lygi:

dimero pagrindinė būseną (banginė funkcija  $\psi_{1a}$ ):

$$\text{energija} = \langle \phi_{10}\phi_{20} | H_1 + H_2 | \phi_{10}\phi_{20} \rangle$$

$$= \langle \phi_{20} | \phi_{20} \rangle \langle \phi_{10} | \mathbf{H}_1 | \phi_{10} \rangle + \langle \phi_{10} | \phi_{10} \rangle \langle \phi_{20} | \mathbf{H}_2 | \phi_{20} \rangle = E_0 + E_0 = 2 E_0, \quad (3)$$

sužadinta būseną (banginė funkcija  $\psi_{1a}$ ):

$$\begin{aligned} \text{energija} &= \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 | \phi_{1a} \phi_{20} \rangle \\ &= E_a + E_0, \end{aligned} \quad (4)$$

sužadinta būseną (banginė funkcija  $\psi_{2a}$ ):

$$\begin{aligned} \text{energija} &= \langle \phi_{10} \phi_{2a} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle \\ &= E_0 + E_a. \end{aligned} \quad (5)$$

Abi sužadintos būsenos, kurių banginės funkcijos yra  $\Psi_{1a}$  ir  $\Psi_{2a}$ , turi vienodą energiją. Energijų skirtumas tarp pagrindinio lygmens ir bet kurio iš jų tik paminėtųjų yra  $E_0 + E_a$ . Iš to išplaukia, kad dimero sugerties dažnis bus toks pats kaip ir monomero, tiktai dimero sugerties intensyvumas bus dvigubai didesnis nei monomero. Galima surasti sugerties intensyvumą, kuris yra proporcingas šuolio momento kvadratui, pasinaudojus dimero dipolinio momento operatoriumi:  $\mu = \mu_1 + \mu_2$ . Pavyzdžiui,

$$|\langle \Psi_{10} | \mu | \Psi_{1a} \rangle|^2 = |\langle \phi_{10} \phi_{20} | \mu_1 + \mu_2 | \phi_{1a} \phi_{20} \rangle|^2 = |\langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle|^2 = D_{0a}. \quad (6)$$

Reikia pastebėti, kad narinėjant dimerą,  $\mathbf{H}$  ir  $\mu$  yra paprasčiausiai atskirų monomerų operatorių sumos. Banginės funkcijos  $\Psi_{1a}$  ir  $\Psi_{2a}$  aprašo dimero būseną, kurio sužadavimo energija yra lokalizuota ant vieno iš monomerų. Sužadintą monomero būseną taip pat galime aprašyti, pasinaudojant banginėmis funkcijomis  $C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}$ , tuo pačiu teigdami, kad mums yra nežinoma sužadavimo struktūra. Tokia banginė funkcija taipogi bus Šrėdingerio lygties sprendinys dimerui:

$$(\mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2)(C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}) = (E_1 + E_2)(C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}). \quad (7)$$

Tačiau, matuodami sugertį ties dažniu  $\nu_{0a} = (E_a - E_0) / h$ , negalėsime pasakyti, kuris iš dimerų pereina į sužadintą būseną.

### **3.2.2. Dimeras, sudarytas iš sąveikaujančių monomerų**

Kadangi galime parinkti tokią monomerų koncentraciją tirpale, kad jie būtų pakankamai arti vienas kito, tarp šių monomerų atsiras sąveika. Tokią sąveiką galime aprašyti dimero hamiltonianu:

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + \mathbf{V} \quad (8)$$

čia  $\mathbf{H}_1$  ir  $\mathbf{H}_2$  yra monomerų hamiltonianai, tokie patys kaip ir nesąveikaujančių monomerų, o  $V$  - dipol-dipolinę sąveiką aprašantis operatorius:

$$V = (\mu_1 \cdot \mu_2) \mathbf{R}_{12}^{-3} - 3 (\mu_1 \cdot \mathbf{R}_{12}) (\mathbf{R}_{12} \cdot \mu_2) \mathbf{R}_{12}^{-5} \quad (9)$$

čia  $\mu_1$  ir  $\mu_2$  - 1 ir 2 monomero dipolinių momentų operatoriai, atitinkamai, o  $\mathbf{R}_{12}$  - atstumas tarp monomerų.

Norint rasti dimero elektronines būsenas, t.y. nustatyti jo spektrą, reikia išspręsti Šredingerio lygtį, įstatant į ją mūsų turimą hamiltonianą. Tarsime, kad sužadintos būsenos tikrinės funkcijos būtų stacionarios. Tai reiškia, kad hamiltonianas neturi uždrausti šuolių tarp sužadintų būsenų. Jei dimerai nesąveikauja tarpusavyje, tai:

$$\langle \Psi_{1a} | \mathbf{H} | \Psi_{2a} \rangle = \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = (E_0 + E_a) (\langle \phi_{1a} | \phi_{10} \rangle) = 0 \quad (10)$$

o jei sąveikauja:

$$\langle \Psi_{1a} | \mathbf{H} | \Psi_{2a} \rangle = \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \mathbf{H}_1 | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = V_{12} \quad (11)$$

Kai atsiranda trikdys  $V$  banginės funkcijos  $\Psi_{1a}$  ir  $\Psi_{2a}$  jau nėra stacionarios. Vyksta greitai šuoliai iš vienos būsenos į kitą. Šie šuoliai vyksta dėl sąveikos tarp abiejų monomerų šuolių momentų. Vieno monomero elektrinio lauko (o taip pat ir magnetinio lauko, bet sąveikos su juo mes čia nenagrinėsime) virpesiai persiduoda kitam, ir taip yra pernešamas sužadėjimas.

Kadangi mes norime naudotis banginėmis funkcijomis  $\Psi_{1a}$  ir  $\Psi_{2a}$ , tai ieškosime tokių tiesinių kombinacijų ( $C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}$ ) ir ( $C_1' \Psi_{1a} + C_2' \Psi_{2a}$ ) kurios atitinka normuotumo, ortogonalumo bei stacionarumo sąlygas. Tokios funkcijos yra tiktai dvi:

$$\begin{aligned} \Psi_{A+} &= (1/\sqrt{2}) (\Psi_{1a} + \Psi_{2a}) \\ \Psi_{A-} &= (1/\sqrt{2}) (\Psi_{1a} - \Psi_{2a}) \end{aligned} \quad (12)$$

Dabar skirtingų dimero būsenų energiją galime surasti, apskaičiuavę tikrines hamiltoniano  $\mathbf{H} = \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + V$  vertes.

Pagrindinė būseną:

$$\langle \Psi_0 | \mathbf{H} | \Psi_0 \rangle = \langle \phi_{10} \phi_{20} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + V | \phi_{10} \phi_{20} \rangle = 2 E_0 \quad (13)$$

Sužadintos būsenos  $A+$  ir  $A-$ :

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{A+} | \mathbf{H} | \Psi_{A+} \rangle &= (1/2) \langle \phi_{1a} \phi_{20} + \phi_{10} \phi_{2a} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + V | \phi_{1a} \phi_{20} + \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= E_a + E_0 + V_{12} \end{aligned} \quad (14)$$

ir

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{A-} | \mathbf{H} | \Psi_{A-} \rangle &= (1/2) \langle \phi_{1a} \phi_{20} - \phi_{10} \phi_{2a} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + V | \phi_{1a} \phi_{20} - \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= E_a + E_0 - V_{12} \end{aligned} \quad (15)$$

Taigi, gauname, kad dvi būsenos turi skirtingas energijas. Yra sakoma, jog trikdys  $\Psi$  suskaido sužadintą būseną į dvi. Skirtumas tarp suskilusių būsenų yra  $2 \cdot V_{12}$ .  $V_{12}$  yra atstumo tarp monomerų funkcija ir ji priklauso nuo tų monomerų tarpusavio orientacijos.

Sugerties juostų, atitinkančių šuolius  $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$  ir  $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$  dažniai yra tokie:

$$\begin{aligned} \nu_+ &= (1/h) (E_a + E_0 + V_{12} - 2 E_0) = \nu_{0a} + V_{12}/h \\ \nu_- &= (1/h) (E_a + E_0 - V_{12} - 2 E_0) = \nu_{0a} - V_{12}/h \end{aligned} \quad (16)$$

Toks juostų suskilimas yra vadinamas eksitoniniu suskilimu.

Dabar patyrinėkime šuolių, kurių dažniai yra  $\nu_+$  ir  $\nu_-$ , intensyvumą. Tam reikalui reikia surasti šuolių kvadratinis momentus. Galime rasti  $D_{0A+}$  ir  $D_{0A-}$  vienu metu, viršutinį ženklą priskirdami pirmajam atvejui, o apatinį - antrajam:

$$\begin{aligned} D_{0A*} &= |\langle \Psi_0 | \mu_1 + \mu_2 | \Psi_{A*} \rangle|^2 = |(1/\sqrt{2}) \langle \phi_{10} \phi_{20} | \mu_1 + \mu_2 | \phi_{1a} \phi_{20} \pm \phi_{10} \phi_{2a} \rangle|^2 = \\ &= (1/2) |\langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle \pm \langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle|^2 = \\ &= (1/2) [ |\langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle|^2 + |\langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle|^2 \pm 2 \langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle \langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle ] \end{aligned} \quad (17)$$

Pirmieji du dėmenys yra ne kas kita, o monomerų  $D_{0a}$  dipolių jėgos. Kadangi mes žinome, jog  $|\langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle| = |\langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle| = \sqrt{D_{0a}}$ , tai galime išreikšti dipolines dipolio jėgas per stebimas monomero spektrines savybes:

$$D_{0A} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (18)$$

čia  $\theta$  – kampas tarp šuolių momentų, atitinkančių atskirų monomerų 1 ir 2 sugertį. Iš pastarosios formulės yra aišku, kad santykinis dviejų sugerties juostų intensyvumas susietas su dimero geometrija labai paprastu sąryšiu. Taip pat matosi, jog pilnas integralinis dimero sugerties intensyvumas nepriklauso nuo to dimero geometrijos ir yra lygus  $D_{0A+} + D_{0A-} = 2 D_{0a}$ , t.y. dvigubam monomero sugerties intensyvumui.

Būsenoms  $A+$  ir  $A-$  galima suteikti gana paprastą fizikinę prasmę. Šuolis  $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$  vyksta tada, kai monomerai yra sužadinami fazėje. Tai reiškia, jog jų šuolių momentai kinta sinfaziškai. O šuolis  $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$  vyksta, kai monomerai yra sužadinami priešingoje fazėje. Jei sulyginsime monomerų šuolių momentų kryptis, kuriuos jie turi kiekvienas savo koordinacių sistemoje, tai pasirodys, kad šios kryptys yra nukreiptos į priešingas puses. Suminis spektras priklauso nuo kampo tarp šuolių momentų (apsprendžiamų dimero geometrijos) bei bendros jų sužadinimo fazės (kuri priklauso nuo to, į kokią būseną,  $A+$  ar  $A-$ , vyksta šuolis).

### **3.3. Kaip analizuoti dimero spektra**

Kaip jau buvome paminėję, kiekviena monomero juosta formuojantis dimerui suskyla į dvi. Skirtumas tarp šių juostų dažnių priklauso ir nuo atstumo tarp monomerų, ir nuo jų tarpusavio orientacijos. Juostų intensyvumai,  $D_{0A+}$  ir  $D_{0A-}$ , yra funkcijos, kurios priklauso tikrai nuo kampo tarp monomerų šuolio momentų. Šiuos intensyvumus galima išreikšti per laisvojo monomero sugerties intensyvumą  $D_{0a}$ .

Būsenų  $A^+$  ir  $A^-$  fizikinė prasmė yra tokia. Vykstant šuoliui  $\psi_0 \rightarrow \psi_{A+}$  monomerai yra sužadunami, būdami toje pačioje fazėje. Tai reiškia, kad šuolio momentai kinta sinfaziškai. Vykstant šuoliui  $\psi_0 \rightarrow \psi_{A-}$ , monomerai yra sužadunami, esant priešingai fazei. Jeigu palyginsime monomerų šuolio momentų kryptis, kurias jie turi savo koordinačių sistemoje, tai pasirodys, kad šios kryptys yra priešingos. Suminis spektras priklauso nuo kampo tarp šuolių momentų (kuris yra apsprendžiamas dimero geometrija) ir nuo tarpusavio sužadavimo fazės (priklausančios nuo to, į kokią būseną,  $A^+$  ar  $A^-$ , vyksta šuolis).

Pirmuose dviejuose atvejuose (A ir B) kampas  $\theta$  yra lygus  $0^\circ$  ir, reiškia, kad  $\cos \theta = 1$ ; iš to išplaukia, kad  $D_{0A+} = 2 D_{0a}$ , o  $D_{0A-} = 0$ . Sugerties intensyvumą apsprendžia tikrai šuolis  $\psi_0 \rightarrow \psi_{A+}$ . Šio šuolio dažnis yra apsprendžiamas dydžiu  $V_{12}$ . Jei monomerai yra išsidėstę vienoje tiesėje - "uodega prie galvos" - tai dydis  $V_{12}$  yra neigiamas. Tokioje orientacijoje monomerai traukia vienas kitą, kaip ir klasikiniai dipoliai. Iš ankščiau parašytų lygčių aišku, kad monomero atveju dažnis  $\nu_+$  yra mažesnis negu  $\nu_{0a}$ . Todėl bus stebimas sugerties juostų poslinkis į raudonąją pusę. B atveju dydis  $V_{12}$  yra teigiamas, ir sugertis bus stebima, esant dažniui  $\nu_+$ , t.y. didesniai negu monomerui.

Kituose dviejuose atvejuose (C ir D)  $\theta = 180^\circ$   $\cos \theta = -1$ , ir iš to išplaukia, kad  $D_{0A} = 2 D_{0a}$ , o  $D_{0A+} = 0$ . Monomerai yra sužadunami priešingose fazėse. Sugerties intensyvumą apsprendžia šuolis  $\psi_0 \rightarrow \psi_{A-}$ . Kai monomerai išsidėsto "uodega prie galvos" (atvejis C), tai dydis  $V_{12}$  yra teigiamas (stūma), o antiparaleliniu atveju (atvejis D)  $V_{12} < 0$  ir todėl monomerai traukia vienas kitą. Atveju C sugerties juostos dažnis  $\nu_+$  bus didesnis nei monomerui, o atveju D - mažesnis. Tokiu būdu, atvejo C sugerties spektras bus toks pats kaip ir atveju A, o atvejo D - kaip ir C, nors jų būsenų prigimtis ir skiriasi. Reikia pastebėti, kad visais šiais atvejais nėra stebimas joks spektrų suskilimas, o tik sugerties juostos maksimumo poslinkis. Tačiau, jei kampas nėra lygus  $0^\circ$  arba  $180^\circ$ , tai paprastai yra stebimos dvi spektrinės juostos.



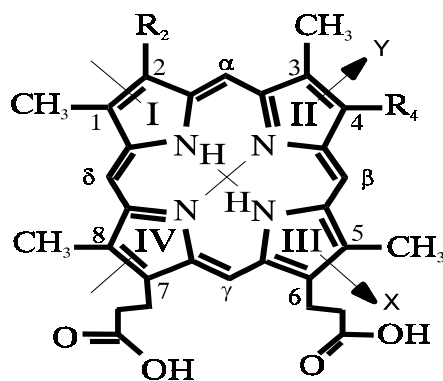
Atvejuje E yra parodytas dimeras, kuris yra sudarytas iš vienas virš kito esančių monomerų, kurie sudaro tarpusavyje  $90^\circ$  kampą ( $\cos \theta$  yra lygus nuliui), o šuoliai iš būsenos  $0$  į būsenas  $A^+$  ir  $A^-$  vyksta su vienoda tikimybe. Tačiau, esant tokiai geometrijai,  $V_{12}$  yra lygus nuliui. Kadangi nėra eksitoninio suskilimo, tai gaunamas lygiai toks pats spektras, kaip ir dviejų monomerų atveju. Atvejuje F tarp monomerų irgi yra  $90^\circ$  kampas, tačiau jie abu yra vienoje plokštumoje. Esant tokiai geometrijai  $\cos \theta$  vėl yra lygus nuliui, bet šiuo atveju  $V_{12}$  yra neigiamas. Iš to išplaukia, kad bus stebimos dvi vienodos spektrinės sugerties juostos - viena su mažesniu dažniu  $\nu_+$ , o kita su didesniu  $\nu_-$ . Jei atvejis yra palankus, kaip ir pastarasis, tai pasiseka išmatuoti santykinius intensyvumus ir suskilimo dydį. O iš šių dydžių galime surasti atstumą tarp chromoforų ( $R_{12}$ ) bei kampą  $\theta$ . Praktikoje juostų suskilimas ( $V_{12}$ ) dažnai yra daug mažesnis nei juostų plotis. Ir dėl to atrodo, kad juosta pasislenka, o iš tikrųjų pati juosta suskyla.

**Intensyvumas**

1 pav. Dydis  $V_{12}$  ir schematiniai sugerties spektrai šešioms galimiems piridino dimerų tipams.

### 3.4 Porfirinų struktūra ir spektrai

Porfirinų struktūros pagrindas – 18 narių makrociklas (2 pav.). Svarbi jo ypatybė – pasikartojančių dvigubų jungčių (konjuguota) sistema, sudaranti chromoforinės sistemos branduolį ir sąlygojanti molekulės plokščią pavidalą bei aromatiškumą. Aromatinį porfirino ciklą sudaro keturi (I, II, III, IV) pirolo žiedai, sujungti metiniais (-CH=) tilteliais  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ir  $\delta$ . Įvairūs porfirinai susidaro pakeičiant vandenilio atomus pirolo žieduose (1-8 padėtyse) ir/arba tarpinėse ( $\alpha$ - $\delta$ ) padėtyse, tačiau nepažeidžiant molekulės  $\pi$ - $e^-$  sistemos bei tiltelių jungčių.



2 pav. Porfirino struktūra.

Porfirinai pasižymi charakteringais šviesos absorbcijos ir fluorescencinės emisijos spektrais, kurių pobūdis ypač priklauso nuo molekulės struktūros pokyčių bei jos fizikinės-cheminės būsenos.

Porfirinų sugertis UV srityje prasideda juosta ties 280 nm, tačiau tiriant molekulių struktūrą, ji beveik neregistruojama. Sugerties pokyčiai joje gali būti svarbūs.

Visų porfirinų spektrams būdinga intensyvi sugerties juosta artimoje UV srityje ties 400 nm, vadinama Soret arba B juosta ( $\epsilon \sim 10^5$  l/mol/cm). Mažesnio intensyvumo (1/10 Soret juostos) smailės yra stebimos regimojoje spektro srityje (490 – 640 nm) ir vadinamos Q juostomis. Jų skaičius priklauso nuo imino (-NH-) grupių bei tretinio azoto atomų (-N=) esančių tetrapiroliniame cikle, protonizacijos (prijungtų H atomų skaičiaus).

### 3.5 Porfirinų agregacija

Įrodinėjama, jog svarbiausias faktorius, lemias dimerizaciją – vandeninės aplinkos priešinimasis molekulės hidrofobinių dalių ardomajam poveikiui. Todėl porfirinų molekulės

formuoja struktūras su minimaliu sąveikos paviršiumi. Remiantis šia prielaida buvo pasiūlyta galima „sumuštinio“ tipo (molekulės išsidėstę viena virš kitos) dimerinė struktūra, stabilizuota porfirino žiedų  $\pi$ - $\pi$  sąveika - I-as pirolo žiedas virš III-io ir II-as virš IV-o.

Jau seniai pastebėta, kad vandeniniuose tirpaluose daugelio porfirinų Soret juosta smarkiai pasislenka trumpųjų bangų link. Tai liudija apie „sumuštinio“ tipo dimerų susiformavimą. Jų spektruose pastebėti tokie charakteringi ypatumai:

1. Q juostų padėtis nepriklauso nuo dimerą sudarančių molekulių tarpmolekulinio atstumo. Daugeliu atvejų stebimas nedidelis jų poslinkis ilgųjų bangų kryptimi ( $100 - 300 \text{ cm}^{-1}$ );

2. Soret sugerties juostai būdingas ryškus ( $800-1800 \text{ cm}^{-1}$ ) poslinkis trumpabange kryptimi ir žymus jos išplitimas;

3. Soret juostos raudonajame krašte aptinkamos išplitusios sugerties juostos su ekstinkcijos koeficientu  $10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (raudonasis šešėlis).

Viršijus pusiausvyrą koncentraciją, vyksta tolimesnė porfirinų agregacija, pastebimos net struktūros, primenančios micles. Ir atvirkščiai: skiedžiant tirpalą, stebimas dimerų skilimas į monomerus.

Be fizikinių agregatų („sumuštinio“ tipo), porfirinai gali sudaryti ir cheminius agregatus (plokštuminius dimerus, bei oligomerus), stabilizuotus porfirinio žiedo šoninėmis grandimis. Sugretinus kovalentinėmis jungtimis stabilizuotų molekulių spektrinius-liuminescencinius ir energetinius parametrus, pastebėta:

1. Agregatų Q juostos pasislenka ilgųjų bangų link  $1-10 \text{ nm}$  monomerinių Q juostų atžvilgiu; poslinkis ypač jautrus atstumui tarp molekulių dimere. Tačiau, jei kovalentiškai sujungtos molekulės lieka vienoje plokštumoje, regimasis sugerties spektras išsaugo individualias monomerų ypatybes; stebimas tik nedidelis ( $1-4 \text{ nm}$ )  $Q_y(0-0)$  ir  $Q_x(0-0)$  juostų poslinkis ta pačia kryptimi;

2. Soret juosta išplinta, kartais pastebimas jos suskilimas ir raudonasis poslinkis;

3. Dimerizacijos metu ryškus vibracinių juostų  $Q(0,1)$  santykinio intensyvumo išaugimas.

Iš principo elektroninių spektrų pokyčius, nulemtus dimerizacijos, būtų galima apskaičiuoti kvantmechaniniais metodais, tiksliai žinant dimero struktūrą. Tačiau net sintetiniams dimerams praktiškai nėra tikslių rentgenostruktūrinės analizės duomenų, todėl patys sugerties ir liuminescencijos spektrai kartu su EPR ir BMR spektroskopiniais duomenimis naudojami dimerų struktūrai tirti.

Agregatų-monomerų virsmų kryptį, esant pastoviai tirpalo koncentracijai, nulemia išoriniai veiksniai:

a) tirpiklis;

Žinoma, jog neutraliuose organiniuose tirpikliuose, taip pat ir etilo alkoholyje, dominuoja porfirinų monomerai, o vandeniniuose tirpikliuose – agregatai. Be to, į tokį tirpalą primaišius detergentų (NDS, Tritono X-100), stebimas ryškus A / M pusiausvyros poslinkis link monomerų. Parodyta, jog Tritonas X-100 deagreguoja koncentruotą ( $10^{-4}$  M) Hp tirpalą, Soret juostai pasislenkant link 399 nm;

b) temperatūra;

Keliant tirpalo temperatūrą 10-35°C ribose, Hp Soret juostos maksimumas pasislenka nuo 375 nm (agregatų sugertis) link monomerų sugerčiai būdingos srities arti 400 nm (buferiniuose neutraliuose tirpaluose);

c) tirpalo joninė jėga;

Buferintų porfirinų tirpalų sugerties spektrai skiriasi nuo nebuferintų, esant mažoms pH vertėms;

e) tirpalo rūgštingumas.

## **4. Tyrimų metodika**

### **4.1 Sugerties ir skirtuminių sugerties spektrų matavimų metodikos**

Sugerties spektroskopijos metodas yra plačiai taikomas medžiagų analizėje. Jis yra pagrįstas tuo, kad skirtingos medžiagos, priklausomai nuo jų fiziko-cheminės būsenos, skirtingai sugeria matomą, ultravioletinę bei infraraudoną šviesą.

Kiekybinė spektrometrinė analizė yra pagrįsta Bugerio-Lamberto dėsnio pritaikymu:

$$\frac{I}{I_0} = T = \exp(-Snl), \quad (19)$$

čia  $I$  ir  $I_0$  - kritusios ir praėjusios bandinį šviesos intensyvumas;  $T$  – pralaidumo koeficientas;  $S$  – efektyvus šviesos pagavos skerspjūvis;  $n$  – molekulių koncentracija;  $l$  – kiuvetės storis.

Optinį tankį nusakanti išraiška, naudojant plačiau paplitusią molinę koncentraciją  $c$  (mol/l), yra tokia:

$$A = -\log T = \varepsilon cl, \quad (20)$$

čia  $\varepsilon$  yra vadinamasis ekstinkcijos koeficientas.

Optinis tankis yra adityvus dydis, t.y. mišinio optinis tankis yra lygus atskirų komponentų optinių tankių sumai:

$$D_{1+2} = D_1 + D_2. \quad (21)$$

#### 4.2 Molekulių dimerizacijos koeficiento skaičiavimas

Dimerizacijos procesą schematiškai galima pavaizduoti taip:



$$\frac{d[D]}{dt} = k_1[D] - k_2[M][M] \quad (23)$$

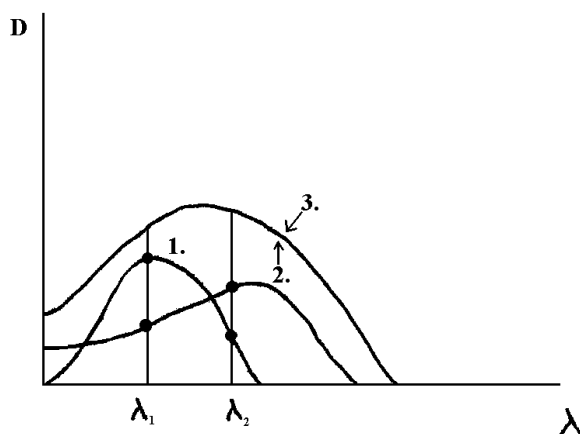
čia  $[M]$  – monomero koncentracija, o  $[D]$  – dimero koncentracija. Esant pusiausvyros sąlygai  $\frac{d[D]}{dt} = 0$ , randame disociacijos konstantą:

$$K_d = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (24)$$

Disociacijos konstantą galime apskaičiuoti, suradus dimerų ir monomerų koncentracijas iš spektrų, remdamiesi adityvumo principu  $D = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l$ . Dviems skirtingiems bangų ilgiams yra rašoma tokia sistema:

$$D(\lambda_1) = \varepsilon_1(\lambda_1) c_1 l + \varepsilon_2(\lambda_1) c_2 l, \quad (24a)$$

$$D(\lambda_2) = \varepsilon_1(\lambda_2) c_1 l + \varepsilon_2(\lambda_2) c_2 l. \quad (24b)$$

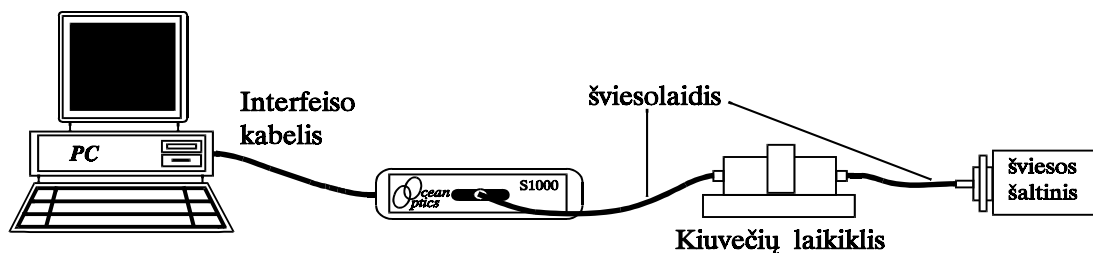


3 Pav. Adityvumo principo pritaikymas siekiant rasti dimerų ir monomerų koncentracijas mišinyje.

1 ir 2 kreivės priklauso atskiroms komponentėms. Iš jų randame  $\varepsilon_1$  ir  $\varepsilon_2$ . Mišinio spektras – 3.

## 5. Eksperimentas

Šiame darbe naudojamas šviesolaidinis spektrometras „Ocean Optics“ PC1000. Jis sudarytas iš šviesos šaltinio, kiuvečių laikiklio ir kompiuteryje įmontuotos plokštės (3 pav.). Kompiuterinėje plokštėje yra sumontuota difrakcinė gardelė, kuri šviesos signalą išskleidžia į spektrą. Tokiu būdu visas bandinio spektras yra išmatuojamas vienu laiku.



3 pav. Spektrofotometras Ocean Optics S1000.

Norint išmatuoti medžiagų sugerties spektrus pirmiausiai paliedžiama programa „OOI base32“, kuri programiškai aptarnauja spektrofotometrą. Komanda File DARK užrašome tamsinį triukšmą (šviesos šaltinis išjungtas, arba optinis kelias uždarytas). Įjungus šviesos šaltinį, į kiuvečių laikiklį statoma kiuvetė su buferiniu tirpikliu ir komanda File REFERENCE užrašomas atraminis spektras. Pereinama į sugerties matavimo režimą View ABSORBANCE MODE bei išmatuojama iš anksto paruoštos, reikiamos koncentracijos medžiagos tirpalo sugertis. Duomenų išsaugojimui naudojama komanda File EXPORT SPECTRUM. Bandinio spektras bus įrašomas į ASCII formato failą, kurį galima apdoroti pvz. programa ORIGIN.

Šiame darbe yra matuojami skirtingų koncentracijų hematoporfirino (Hp) arba mezo-tetra(4sulfonatofenil)porfino (TPPS<sub>4</sub>) vandeninių tirpalų sugerties spektrai. Esant koncentracijų kitimo riboms – nuo 10<sup>-4</sup> M iki 10<sup>-7</sup> M užregistruojama apie 15 spektrinių kreivių.

Nubraižoma Soret juostos smailės priklausomybė nuo tiriamos medžiagos koncentracijos. Randama ekstinkcijos koeficiento, o taip pat ir Soret juostos pusplotio priklausomybė nuo koncentracijos.

Jei medžiagos fiziko-cheminė būseną nepriklauso nuo koncentracijos, tada gauname tiesinę sugerties intensyvumo priklausomybę nuo koncentracijos ties kiekvienu bangos ilgiu. Tai atitinka Bugerio-Lamberto dėsnį  $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l$ . Todėl, vienoje koordinatinių ašyje atidėjus sugerties intensyvumą ties bet kokių bangos ilgiu, o kitoje ašyje – koncentraciją, rezultatas

būtų tiesė. Jei tiesė negaunama – tai reiškia, kad priklausomai nuo koncentracijos, keičiasi medžiagos ekstinkcijos koeficientas (t.y. sugerties savybės). Šis koeficientas gali keistis dėl aplinkos įtakos pasikeitimo arba dėl medžiagos molekulių agregacijos. Kintant ekstinkcijos koeficientui ties skirtingais bangos ilgiais, gali keistis ir bendras spektro vaizdas, t.y. gali atsirasti naujų sugerties juostų, o ankstesniosios gali išnykti, kai kurios juostos gali išplatėti arba pasislinkti.

Kartais iš būdingų ryškių spektrinių pokyčių galime identifikuoti pigmento agregaciją. Tokie spektro pokyčiai dėl agregacijos turėtų būti grįžtami.

Jei pokyčiai nėra tokie ryškūs, tai yra naudojamas skirtuminės sugerties spektroskopijos metodas. Skirtuminis spektras yra gaunamas iš sunormuotų įvairių koncentracijų medžiagų sugerties spektrų. Paprastai normuojama į maksimumą tos sugerties juostos, kurios pokyčius norime pastebėti, pvz., į Soret juostos maksimumą. Tada išryškėja skirtingų juostų formos pokyčiai, išplatėjimai arba spektrinės juostos poslinkiai į vieną ar kitą pusę. Tokie pokyčiai gali būti sąlygoti agregacijos.

Dimerizacijos konstantą skaičiuojame iš  $H_p$  arba  $TPPS_4$  tirpalo sugerties priklausomybės nuo jo koncentracijos grafiko. Jei nebūtų agregacijos, tai pagal Bugerio-Bero dėsnį gautume šiame grafike tiesę. O esant agregacijai, gautą kreivę galima aproksimuoti keliomis tiesėmis. Prie mažų koncentracijų tirpale dominuos monomerai. Didėjant koncentracijai, padaugės dimerų, ir prie didesnių koncentracijų dimerai dominuos. Taigi, pirmosios tiesės polinkis daugiausiai bus sąlygotas monomerų ekstinkcijos koeficiento, antrosios tiesės – dimerų, o kitos tiesės - aukštesnių agregatų.

Dimerų disociacijos konstantą galima rasti iš dimerų ir monomerų tiesių susikirtimo taško (6 pav. a,b). Šiame taške monomerų ir dimerų koncentracijos bus vienodos, todėl galios tokia disociacijos konstantos išraiška

$$K_d = 1 / C_0 \quad (25)$$

čia  $C_0$  yra tirpalo koncentracija ties tiesių susikirtimo tašku. Šis metodas leidžia apskaičiuoti dimerizacijos konstantą eilės tikslumu.



## **6. Kontroliniai klausimai**

1. Porfirininės prigimties pigmentų sugerties spektrų interpretacija ir jų ryšys su molekulių struktūra.
2. Porfirininės prigimties molekulių agregacija. Jėgos, sąlygojančios molekulių sąveiką tirpaluose.
3. Sugerties ir skirtuminių sugerties spektrų matavimo metodikos. Tiriamų molekulių koncentracijos, ekstinkcijos koeficientų skaičiavimai iš sugerties spektrų. Adityvumo principas spektroskopijoje.
4. Molekulių dimerizacijos konstanta ir jos apskaičiavimas iš sugerties spektrų.
5. Porfirininės prigimties molekulių agregatų stereometrija.

## **7. Literatūros sąrašas**

1. Кантор Ч, Шиммел П. Биофизическая химия. Т. 2-3. М., Мир, 1984.
2. S. B. Brown, M. Shillcock. Equilibrium and Kinetic Studies of the Aggregation of Prphyrins in Aqueous Solution. Biochem. J. (1976) 153, 279-285.