



Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Κρήτης-Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας

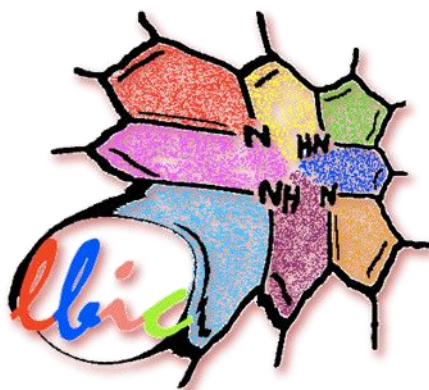
Υπεύθυνος Καθηγητής: Αθανάσιος Γ. Κουτσολέλος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύνθεση πορφυρίνης του αλουμινίου και αλληλεπίδραση της με d-λουσιφερίνη

Μαρτιμιανάκη Γεωργία (ΑΜ: 2574)

Ηράκλειο, 2022



Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή και κυρίως τον Υπεύθυνο Καθηγητή μου Αθανάσιο Γ. Κουτσολέλο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την Διπλωματική μου Εργασία στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας (LBIC) του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Πηγιάκη για την βοήθεια και την αδιάκοπη καθοδήγησή της στην πορεία της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την άποψη συνεργασία μας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη που απαρτίζουν το Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και πιο συγκεκριμένα στην Έλενα Αγαπάκη, στην Μαγδαληνή Τοπούζα, στον Εμμανουήλ Ορφανό, στον Γεώργιο Χαραλαμπίδη, στον Εμμανουήλ Νικολουδάκη και στην Ασπασία Στουμπίδη για την βοήθεια που μου παρείχαν οποτεδήποτε, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν εντός του εργαστηρίου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Ενεργειακή κρίση.....	6
1.2 Φωτοσύνθεση στη φύση.....	6
1.3 Τεχνητή φωτοσύνθεση και φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων.....	7
1.4 Πορφυρίνες.....	9
1.5 D-Λουσιφερίνη και Βιοφωταύγεια	13
2. Μέθοδοι ανάλυσης	16
2.1 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF	16
2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	17
2.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους- ορατού (UV-Vis)	19
2.4 Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	21
3. Πειραματικό Μέρος.....	24
Σύνθεση της [5,10,15,20]-τετράκις-φαινυλο-πορφυρίνης του αλουμινίου με OH- ομάδα ως αξονικό υποκαταστάτη στο αλουμίνιο.....	24
4. Ανάλυση αποτελεσμάτων	26
4.1 Ανάλυση φάσματος Maldi-TOF	26
4.2 Ανάλυση φάσματος μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, ¹ H NMR.....	27
4.3 Ανάλυση φασμάτων απορρόφησης και φθορισμού.....	28
4.3.1 Τετραφαίνυλο πορφυρίνη του αλουμινίου.....	28
4.3.2 D-λουσιφερίνη.....	31
4.3.3 Πορφυρίνη και D-λουσιφερίνη	33
5. Συμπεράσματα	37
6. Βιβλιογραφία.....	38

Περίληψη

Οι συνεχώς αυξανόμενες ενεργειακές ανάγκες του πλανήτη και οι επιπτώσεις της συστηματικής καύσης ορυκτών καυσίμων έχουν θέσει σημαντικά ζητήματα για την προστασία του περιβάλλοντος. Λύση στο ενεργειακό πρόβλημα φαίνεται να είναι η ηλιακή ακτινοβολία, ως μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας που χρησιμοποιείται ήδη στην φύση από βιολογικά συστήματα με σκοπό την αυτοσυντήρηση των ίδιων. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η μελέτη ενός νέου φωτοευαισθητοποιητή με αυξημένη απόδοση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φωτοκαταλυτικά συστήματα παραγωγής ενέργειας. Ο φωτοευαισθητοποιητής που μελετήθηκε αποτελείται από την τετραφαίνυλο πορφυρίνη του αλουμινίου με αξονικό υποκαταστάτη υδροξύλιο ($\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$) και από την d-λουσιφερίνη. Πιο συγκεκριμένα, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε σύνθεση και απομόνωση της $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$. Ακολούθησε μελέτη με φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού τόσο της πορφυρίνης όσο και της λουσιφερίνης ξεχωριστά. Όταν τα δύο χρωμοφόρα συνδυάστηκαν, παρατηρήθηκαν ενδείξεις για την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ και d-λουσιφερίνης που εντείνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον για το σύστημα αυτό. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη κρίνεται απαραίτητη για την εξακρίβωση του μηχανισμού και τις πιθανές εφαρμογές του συστήματος $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ και d-λουσιφερίνης στην παραγωγή ενέργειας.

Λέξεις κλειδιά: ενεργειακό πρόβλημα, φωτοσύνθεση, φωτοευαισθητοποιητής, πορφυρίνη, d-λουσιφερίνη, μεταφορά ενέργειας / ηλεκτρονίων, απορρόφηση, φθορισμός.

1. Εισαγωγή

1.1 Ενεργειακή κρίση

Οι σύγχρονοι πολιτισμοί προϋποθέτουν μεγάλες συγκεντρώσεις ενέργειας για να τροφοδοτήσουν τον σύγχρονο κόσμο και τις μηχανές του. Ο υπερπληθυσμός που επικρατεί εντείνει το φαινόμενο αυτό, με αποτέλεσμα η ανθρωπινή δραστηριότητα να έχει έντονο αποτύπωμα στο περιβάλλον. Τα ορυκτά καύσιμα, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας, δεν μπορεί να θεωρηθούν ως βιώσιμη λύση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται αφενός στην περιορισμένη διαθεσιμότητά τους, και αφετέρου στα ήδη ανησυχητικά επίπεδα CO₂ της ατμόσφαιρας. Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις του ενεργειακού εφοδιασμού έχουν κυρίαρχο ρόλο σε παγκόσμια περιβαλλοντικά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένης της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, της ρύπανσης των υδάτων, της ρύπανσης των ωκεανών και της κλιματικής αλλαγής.

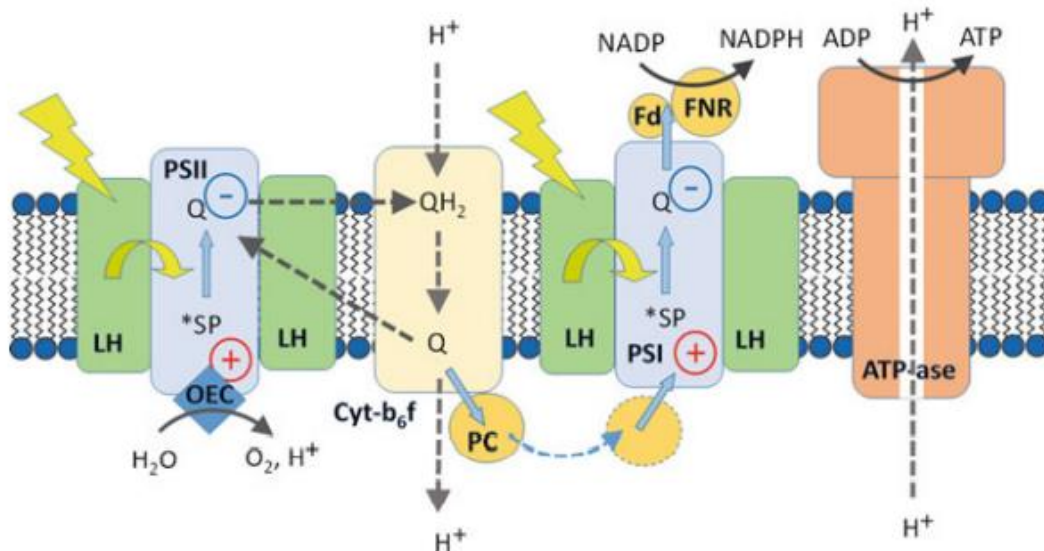
Απέναντι στην απειλή του ενεργειακού προβλήματος, οι ερευνητές στρέφουν το ενδιαφέρον τους στην εύρεση καινοτόμων συστημάτων. Ενεργό κομμάτι επιστημονικής έρευνας αποτελούν τα συστήματα που μιμούνται την φυσική φωτοσυνθετική διαδικασία, καθώς αυτά είναι τα πιο αποτελεσματικά στην αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας. Επιπλέον, το ενδιαφέρον σε εναλλακτικούς φωτοευαίσθητοποιητές για αποδοτικότερα καταλυτικά συστήματα έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Ως φωτοευαίσθητοποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα χρωμοφόρα, όπως οι πορφυρίνες, τα οποία απορροφούν φως και λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων στα καταλυτικά συστήματα.

1.2 Φωτοσύνθεση στη φύση

Οργανισμοί όπως φυτά, φύκια και κυανοβακτήρια, αξιοποιούν την ηλιακή ενέργεια μέσω του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης, για να μετατρέπουν το CO₂ και το νερό σε υδατάνθρακες και οξυγόνο. Η φωτοσύνθεση είναι μια διεργασία μετατροπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας του ηλίου σε χημική ενέργεια, η οποία λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων. Η φωτοσυνθετική πορεία συνοψίζεται στην παρακάτω αντίδραση:



Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης αποτελείται από μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Για την λειτουργία του συστήματος απαιτούνται τα εξής τέσσερα συμπλέγματα: το φωτοσύστημα II, το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b₆f, το φωτοσύστημα I και την διαμεμβρανική αντλία (ΑΤΡαση) πρωτονίων, τα οποία βρίσκονται πάνω στην μεμβράνη του θυλακοειδούς με την σειρά, όπως φαίνονται στην εικόνα 1 που ακολουθεί.



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των κύριων λειτουργικών υπομονάδων μιας οξυγονικής φωτοσυνθετικής μεμβράνης.¹

Ξεκινώντας, το φωτοσύστημα II απορροφά φωτεινή ενέργεια, αποσπά ηλεκτρόνια από το νερό και παράγει οξυγόνο και πρωτόνια. Η διεργασία ονομάζεται φωτόλυση του νερού. Το φωτοσύστημα II μεταβιβάζει τα ηλεκτρόνια αυτά στο σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b_6f . Στην συνέχεια, το φωτοσύστημα I απορροφά φωτεινή ενέργεια, παραλαμβάνει τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b_6f και τα μεταφέρει στο φωσφορικό διουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης ($NADP^+$), το οποίο μετατρέπεται στην ανηγμένη του μορφή, $NADPH$. Ουσιαστικά, τα φωτοσυστήματα λειτουργούν ως συλλέκτες φωτονίων και αντλίες ηλεκτρονίων. Ωστόσο, η φωτόλυση του νερού και η μεταφορά e^- αποδεσμεύουν πρωτόνια στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η ΑΤΡαση πρωτονίων αντλεί τα πρωτόνια και τα μεταφέρει στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Συγχρόνως, προσθέτει φωσφορική ομάδα στη διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και παράγεται τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου. Η διεργασία λέγεται φωτοφωσφορύλιωση του ADP και αποτελεί το τελευταίο στάδιο για την ενεργειακή φόρτιση του κυττάρου.

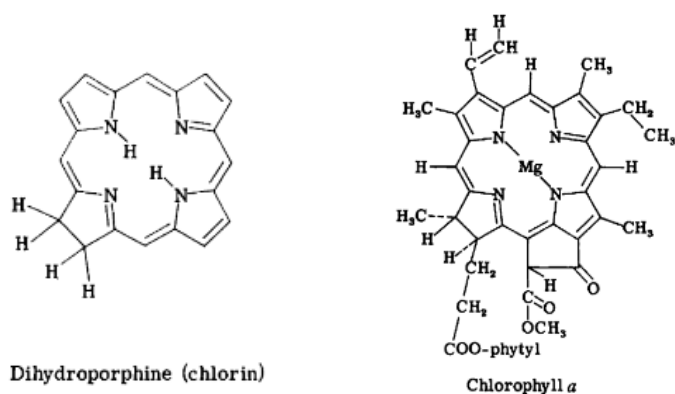
Συμπερασματικά, το φυτό είναι ένας συλλέκτης ηλιακής ενέργειας, ο οποίος διαθέτει σύστημα που μεταφέρει τη δεσμευμένη ενέργεια με την χρήση αντλίων ηλεκτρονίων και πρωτονίων, δίνοντας ενέργεια σε δύο μόρια, το $NADPH$ και το ATP . Αυτά χρησιμεύουν ως καύσιμα για την πραγματοποίηση βιοχημικών αντιδράσεων. Πρόκειται, για μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημικά εκμεταλλεύσιμο δυναμικό οξειδοαναγωγής.

1.3 Τεχνητή φωτοσύνθεση και φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων

Κατά την αναζήτηση μιας συμφέρουσας λύσης στο ενεργειακό πρόβλημα της εποχής, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην φύση. Συστήματα μίμησης της φυσικής διεργασίας της φωτοσύνθεσης βρίσκονται στο επίκεντρο επιστημονικής έρευνας, με σκοπό την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας για την παραγωγή καυσίμων.

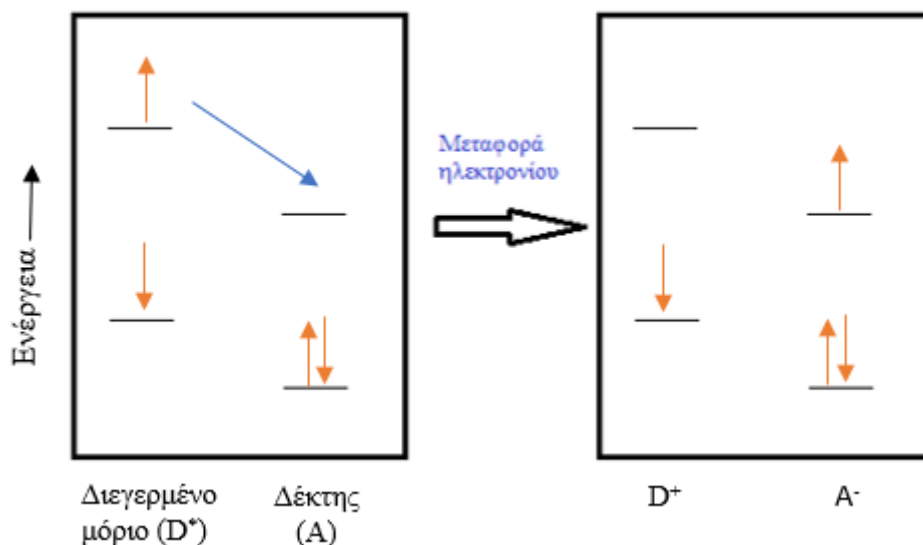
Για την αποτελεσματικότητα τέτοιων μιμητικών συστημάτων απαιτείται (i) ένα σύστημα κεραίας, (ii) ένα σύστημα διαχωρισμού φορτίου και (iii) η παρουσία κάποιου καταλύτη. Το σύστημα κεραίας βασίζεται στην ικανότητα κάποιων χρωμοφώρων να δεσμεύουν φως και να μεταφέρουν την ενέργεια διέγερσης στο κέντρο της αντίδρασης. Το σύστημα διαχωρισμού φορτίου αποτελείται από μια σειρά φωτοεπαγόμενων διεργασιών μεταφοράς ηλεκτρονίων ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδοαναγωγή. Τέλος, ο καταλύτης εξασφαλίζει χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης για τις διεργασίες αυτές.¹

Στην φύση, το φωτοδεκτικό μόριο που απορροφά την ηλιακή ακτινοβολία είναι η χρωστική χλωροφύλλη α, η οποία βρίσκεται στην μεμβράνη των χλωροπλαστών των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Η χλωροφύλλη α είναι μια υποκατεστημένη διυδροπορφυρίνη του μαγνησίου (Εικόνα 1.2). Οι πορφυρίνες, εξαιτίας της ομοιότητάς τους με τις φυσικές χρωστικές της χλωροφύλλης, χρησιμοποιούνται συχνά ως φωτοευαισθητοποιητές (P) σε μιμητικά συστήματα. Η αποτελεσματικότητα των πορφυρινών ως φωτουποδοχείς, αποδίδεται στους εναλλασόμενους μονούς και διπλούς δεσμούς που έχουν.



Εικόνα 1.2: Μοριακή δομή διυδροπορφυρινών και χλωροφύλλης α.²

Η λειτουργία του φωτοευαισθητοποιητή είναι να απορροφά φως, με αποτέλεσμα να διεγείρεται ηλεκτρόνιο του από την θεμελιώδη κατάσταση σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Αν το φωτοδιεγερτικό μοριακό συστατικό συνδέεται με έναν δέκτη ηλεκτρονίων, τότε το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μετακινηθεί από το αρχικό μόριο σε έναν μόριο-δέκτη. Θετικό φορτίο δημιουργείται στον φωτοευαισθητοποιητή λόγω απώλειας ενός ηλεκτρονίου και αρνητικό φορτίο στον μόριο δέκτη, λόγω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου. Η διεργασία αυτή ονομάζεται φωτοεπαγόμενος διαχωρισμός φορτίων.³

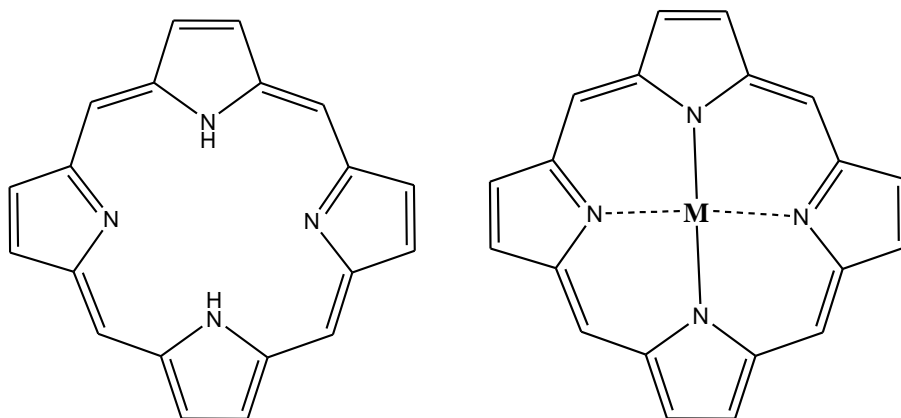


Εικόνα 1.3: Φωτοεπαγόμενος διαχωρισμός φορτίων (D=μόριο δότης, A=μόριο δέκτης).

1.4 Πορφυρίνες

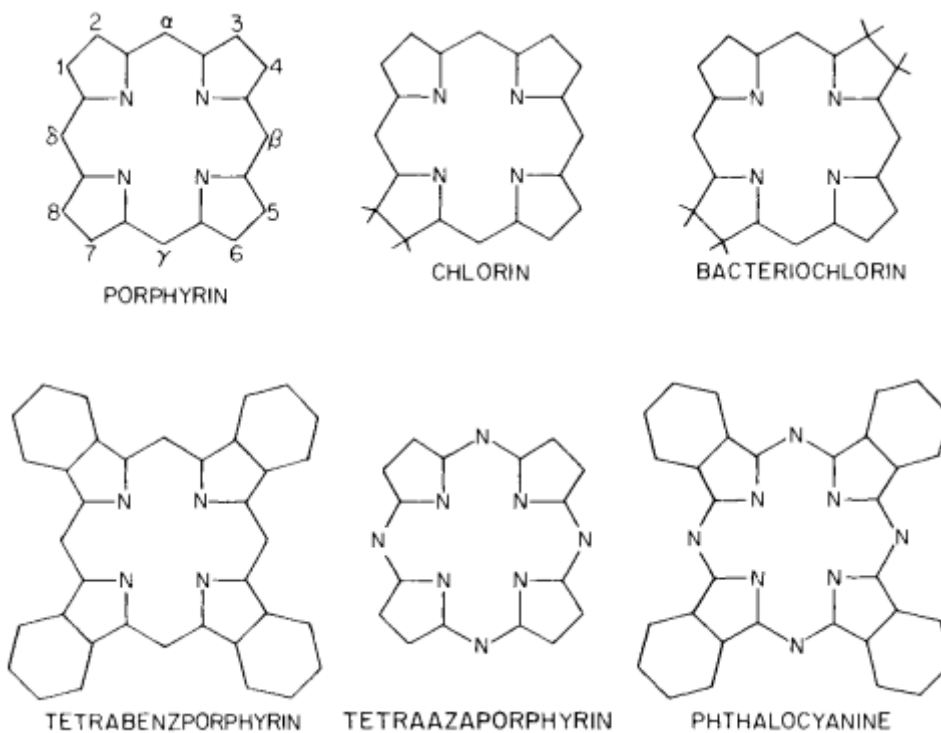
Οι πορφυρίνες είναι μια ομάδα ετεροκυκλικών μακροκυκλικών ενώσεων που αποτελούνται από τέσσερις τροποποιημένες υπομονάδες πυρρόλης συνδεδεμένες στα «α» άτομα άνθρακα μέσω μεθινικών γεφυρών (= CH-). Το σύστημα δακτυλίου πορφυρίνης είναι αρωματικό με 18 π-ηλεκτρόνια και παρουσιάζει υψηλής τάξεως συζυγίας. Το μόριο της πορφυρίνης θεωρείται επίπεδο, όμως δύο από τους πυρρολικούς δακτυλίους είναι ελαφρώς στραμμένοι προς τα πάνω και δύο ελαφρώς στραμμένοι προς τα κάτω, ούτως ώστε τα τέσσερα άτομα αζώτου να είναι ελαφρώς εκτός επιπέδου.⁴

Το κέντρο της δομής της πορφυρίνης αποτελεί ένα τετραδραστικό υποκαταστάτη, με διαθέσιμο χώρο για να συναρμοστεί κάποιο μέταλλο μέγιστης διαμέτρου περίπου 3.7×10^{-8} εκατοστά.⁵ Στις αμετάλλωτες πορφυρίνες, δηλαδή χωρίς την παρουσία μετάλλου, πρωτόνια βρίσκονται συνδεδεμένα στα δυο από τα τέσσερα άζωτα. Οι περισσότερες μεταλλοπορφυρίνες περιλαμβάνουν μεταλλικά ιόντα με αριθμό συναρμογής τέσσερα. Μερικές έχουν μεταλλικά ιόντα με αριθμό συναρμογής πέντε και δομή τετραγωνικής πυραμίδας ή αριθμό συναρμογής έξι και παραμορφωμένη οκταεδρική δομή. Παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο υψηλού spin Fe(III)-πορφυρίνη και τα πορφυρινικά σύμπλοκα με Co(II) και Mn(II).⁴



Εικόνα 1.4: Δομή αμετάλλωτου(αριστερά) και μεταλλωμένου (δεξιά) πορφυρινικού δακτυλίου.

Παράγωγα πορφυρίνης προκύπτουν και με την αντικατάσταση των εξωτερικών δρογόνων 1,2,...,8 ή των μεθινικών α , β , γ , δ υδρογόνων του πορφυρινικού δακτυλίου με διάφορους οργανικούς υποκαταστάτες.⁶ Στις φυσικές μεταλλοπορφυρίνες και οι οκτώ θέσεις των πυρρολικών ατόμων άνθρακα είναι υποκατεστημένες. Η φύση των πλευρικών ομάδων αυτών, είναι σημαντική καθώς επιδρά στις ιδιότητες των πορφυρινών που προκύπτουν. Η παρουσία υποκαταστατών δεκτών ηλεκτρονίων, όπως αρυλομάδων, ελαττώνει την βασικότητα των αζώτων-δοτών ηλεκτρονίων της πορφυρίνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η ταχύτητα συναρμογής των μεταλλικών ιόντων. Τα παράγωγα πορφυρίνης έχουν βασικό ρόλο σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, η μεταφορά και αποθήκευση διοξυγόνου.



Εικόνα 1.5: Δομές της πορφυρίνης και διάφορων παραγώγων της.⁶

1.4.1 Οξειδοαναγωγικές ιδιότητες πορφυρινών

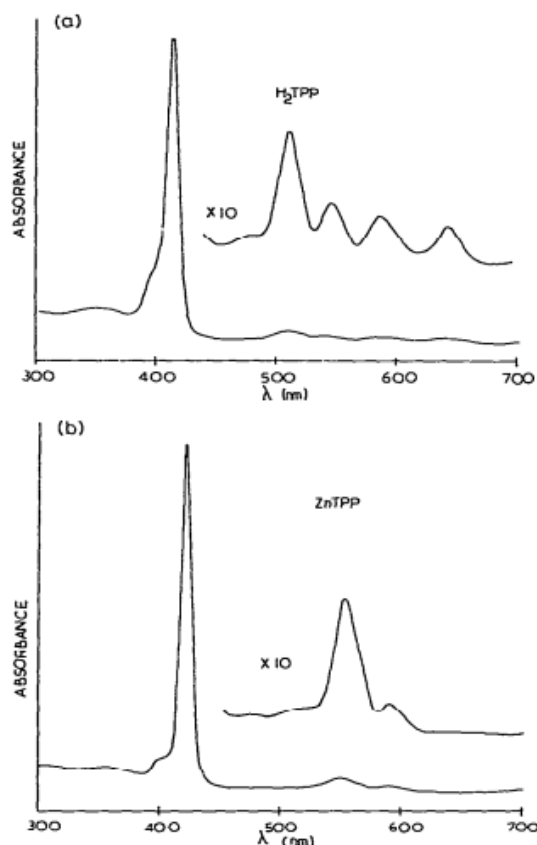
Μεταλλικά σύμπλοκα πορφυρινών χρησιμοποιούνται σε μια ποικιλία εφαρμογών, συχνά ως μοντέλα για μεταφορά ηλεκτρονίων. Η ικανότητα δράσης ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων οφείλεται στις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των μεταλλοπορφυρινών. Ένας υποκαταστάτης που έχει την ικανότητα να πολώνεται, όπως η πορφυρίνη, έχει επίσης την δυνατότητα να δράσει ως αγωγός (κανάλι) μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αγωγιμότητα του μορίου αυξάνεται με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων που αυξάνουν την πολικότητα του ίδιου, επιδρώντας σημαντικά στο δυναμικό οξειδώσεως. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στα βιολογικά συστήματα είναι τα κυτοχρώματα, δηλαδή ενώσεις της αιματίνης που συμμετέχουν σε αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Η μεταφορά ηλεκτρονίων οφείλεται στην παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους Fe(III)-Fe(II).⁴

1.4.2 Φωτοφυσικές ιδιότητες πορφυρινών

Οι πορφυρίνες και τα παράγωγα πορφυρινών αποτελούν αντικείμενο έντονου φωτοφυσικού και φασματοσκοπικού ενδιαφέροντος. Τα κύρια οπτικά φαινόμενα είναι η απορρόφηση της βασικής κατάστασης και η εκπομπή διεγερμένης κατάστασης, τα οποία αποδίδονται στις $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις του πορφυρινικού δακτυλίου.⁶

Φασματοσκοπία απορρόφησης

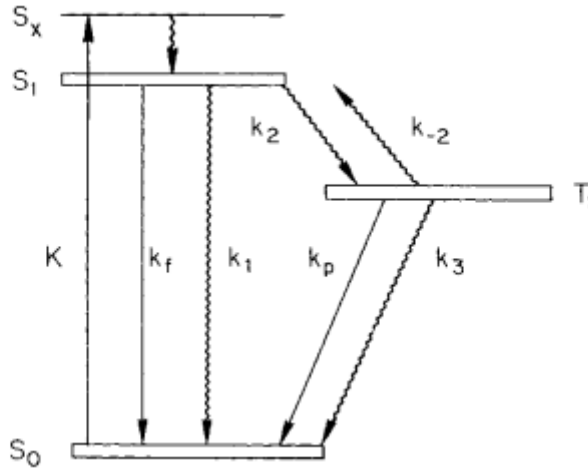
Αποτέλεσμα της υψηλής τάξεως συζυγίας του συστήματος των πορφυρινών είναι ότι τα ηλεκτρόνια των δεσμών π δεν εντοπίζονται μεταξύ δύο διαδοχικών πυρηνών ατόμων, συνεπώς οι πορφυρίνες απορροφούν έντονα στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Τα ηλεκτρονικά τους φάσματα δείχνουν μια μεγάλης έντασης ταινία στα 380-420nm, η λεγόμενη ταινία Soret, η οποία οφείλεται σε μετάπτωση ηλεκτρονίων από την θεμελιώδη κατάσταση S_0 στην δεύτερη διεγερμένη κατάσταση υψηλού σπιν (S_2). Όταν η πορφυρίνη μεταλλωθεί, η ταινία αυτή ενδέχεται να μετατοπιστεί προς το ερυθρό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Σε φάσματα απορρόφησης πορφυρινών παρατηρούνται και οι χαμηλότερης έντασης ταινίες Q, οι οποίες οφείλονται στην μετάβαση από την διεγερμένη κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη χαμηλού σπιν ($S_0 \rightarrow S_1$) και εμφανίζονται στην περιοχή των 500-700nm. Οι ζώνες Q αποτελούνται από τέσσερις ζώνες για την πορφυρίνη χωρίς συναρμοσμένο μέταλλο. Για τις πορφυρίνες μετάλλων εμφανίζονται δύο ζώνες, επειδή η συμμετρία τους είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την αμετάλλωτη πορφυρίνη άρα υπάρχουν λιγότερες δυνατές μεταβάσεις. Οι Q μπάντες είναι ενδεικτικές των δονητικών χαρακτηριστικών της διεγερμένης κατάστασης S_1 . Αυτό συμβαίνει γιατί τα ηλεκτρόνια καθώς διεγείρονται από τη θεμελιώδη κατάσταση κατανέμονται στα διάφορα δονητικά επίπεδα της S_1 , όχι μόνο στο πρώτο, επομένως η ενέργεια απορρόφησης είναι ενδεικτική της ενέργειας των δονητικών επιπέδων της πρώτης θεμελιώδης κατάστασης.



Εικόνα 1.6: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis 300-700nm α) τετραφαίνυλο πορφυρίνης και β)μεταλλωμένης με Zn τετραφαίνυλο πορφυρίνης.⁷

Φασματοσκοπία εκπομπής

Μετά απο διεγέρσεις των πορφυρινών σε υψηλότερες ενεργειακά καταστάσεις ακολουθούν αποδιεγέρσεις, οι οποίες δεν συνοδεύονται πάντα απο εκπομπή ακτινοβολίας. Οι μη ακτινοβολικές διεργασίες μπορεί να είναι η εσωτερική μετατροπή ($S_x \rightarrow S_1$), η διασυστηματική διασταύρωση μέσω της οποίας πληθύνεται η τριπλή κατάσταση T_1 ($S_2 \rightarrow T_1$, $S_1 \rightarrow T_1$), ή ακόμη και η δονητική χαλάρωση στα δονητικά επίπεδα της S_2 , εξαιτίας της διέγερσης του πληθυσμού στα ανώτερα δονητικά της επίπεδα ($\lambda_{exc} = 395 \text{ nm}$). Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, ένα μόριο μπορεί να επιστρέψει με μη ακτινοβολικές διαδικασίες στην πρώτη διεγερμένη S_1 . Απο την κατάσταση S_1 παρατηρείται το φαινόμενο του φθορισμού, με την επιστροφή ηλεκτρονίων στην θεμελιώδη κατάσταση S_0 εκπέμποντας ακτινοβολία.⁸



Εικόνα 1.7: Διάγραμμα Jablonski για τα φαινόμενα φθορισμού και φωσφορισμού. (Οι αποδιεγέρσεις που συνοδεύονται με εκπομπή ακτινοβολίας εμφανίζονται με ευθείες γραμμές, ενώ εκείνες χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας φαίνονται με κυματιστές γραμμές. Με k συμβολίζεται η σταθερά ταχύτητας κάθε διαδικασίας)⁶

Απο την κατάσταση S_1 παρατηρείται το φαινόμενο του φθορισμού, με την επιστροφή ηλεκτρονίων στην θεμελιώδη κατάσταση S_0 εκπέμποντας ακτινοβολία. Σε φάσματα φθορισμού πορφυρινών καταγράφονται δυο χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στις μεταβάσεις: $S_1(U=0) \rightarrow S_0(U=1)$ και $S_1(U=0) \rightarrow S_0(U=0)$. Ωστόσο, οι πορφυρίνες έχουν αμελητέο φθορισμό από την S_2 σε σχέση με αυτόν που προέρχεται από την S_1 . Ακόμη, απο την διεγερμένη κατάσταση S_1 μέρος του πληθυσμού μεταφέρεται στην κατάσταση υψηλού σπιν T_1 , μέσω του φαινομένου της διασυστηματικής διασταύρωσης. Απο εκεί ακολουθεί αποδιέγερση προς την S_0 με εκπομπή ακτινοβολίας, δηλαδή πραγματοποιείται φωσφορισμός.

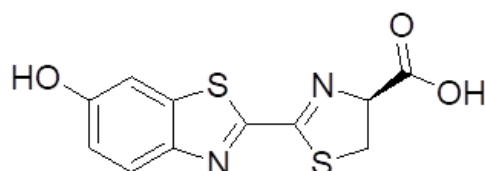
1.5 D-Λουσιφερίνη και Βιοφωταύγεια

Η φύση είναι γεμάτη οργανισμούς που έχουν την ικανότητα να λάμπουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πυγολαμπίδες, οι οποίες προσελκύουν τους συντρόφους και προειδοποιούν τα αρπακτικά με τη λάμψη τους. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος των οργανισμών με την ιδιότητα του φθορισμού κρύβονται βαθιά μέσα στους ωκεανούς, όπως οι μέδουσες που φωτίζουν για αυτοάμυνα και δελεασμό της λείας τους.



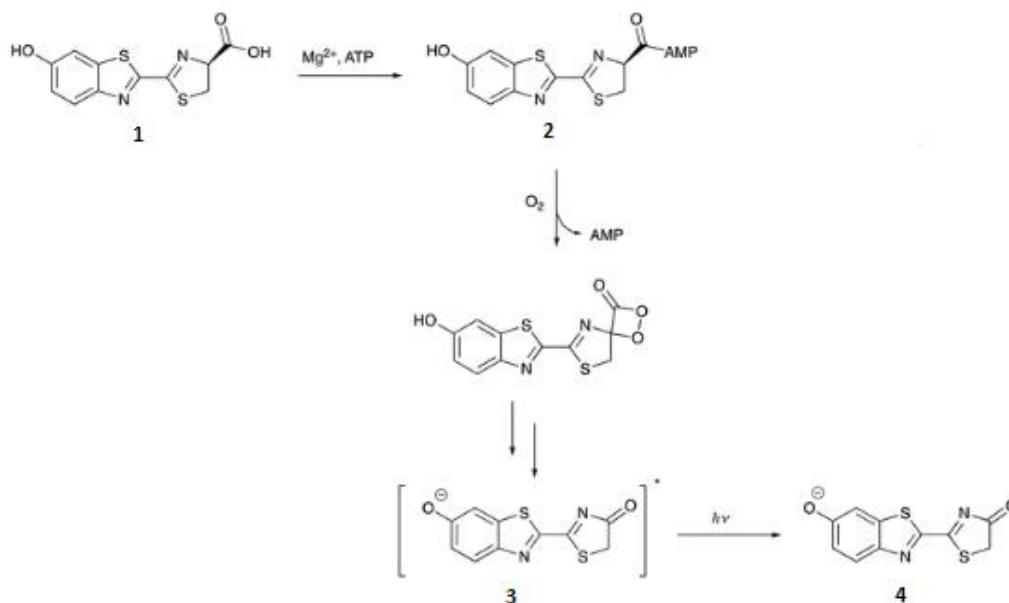
Εικόνα 1.8: Βιοφωταύγεια πυγολαμπίδων. Χημικά παραγόμενο φως στην κοιλιά των οργανισμών.

Η ικανότητα φυσικής εκπομπής φωτός από ζωντανούς οργανισμούς οφείλεται στο φαινόμενο της βιοφωταύγειας. Η βιοφωταύγεια συμβαίνει μέσω μιας χημικής αντίδρασης που παράγει φωτεινή ενέργεια μέσα στο σώμα ενός οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για την οξείδωση της d-λουσιφερίνης παρουσία ενζύμου λουσιφεράσης και οξυγόνου. Ο μοριακός τύπος της D-λουσιφερίνης είναι $C_{14}H_{10}N_2O_4S_2$ και η δομή της φαίνεται στην εικόνα 1.9 που ακολουθεί.



Εικόνα 1.9: Δομή D-λουσιφερίνης.

Στην περίπτωση των πυγολαμπίδων, η οξείδωση της d-λουσιφερίνης πραγματοποιείται στο στομάχι των οργανισμών και πρόκειται για μια αντίδραση δύο σταδίων τα οποία καταλύονται από το ένζυμο λουσιφεράση. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο είναι η αντίδραση της D-λουσιφερίνης LH_2 (1) με την τριφωσφορική αδενοσίνη ATP, προς τον σχηματισμό του ενδιάμεσου LH_2 -AMP (2). Απαραίτητος συμπαράγοντας είναι τα ιόντα μαγνησίου και το ATP, το λειτουργεί ως ενεργοποιητής του υποστρώματος της λουσιφερίνης. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, με την οξείδωση και αποκαρβοξυλίωση του συμπλέγματος LH_2 -AMP προς σχηματισμό οξυλουσιφερίνης σε ανιοντική μορφή (3). Το προϊόν (3) είναι οξυλουσιφερίνη σε διεγερμένη κατάσταση. Οπότε σε διάστημα νανοδευτερολέπτων επιστρέφει στη βασική του κατάσταση (4) εκπέμποντας τη δεσμευμένη ενέργεια με μορφή φωτονίου, διαδικασία η οποία αποτελεί φθορισμό (Εικόνα 1.10).



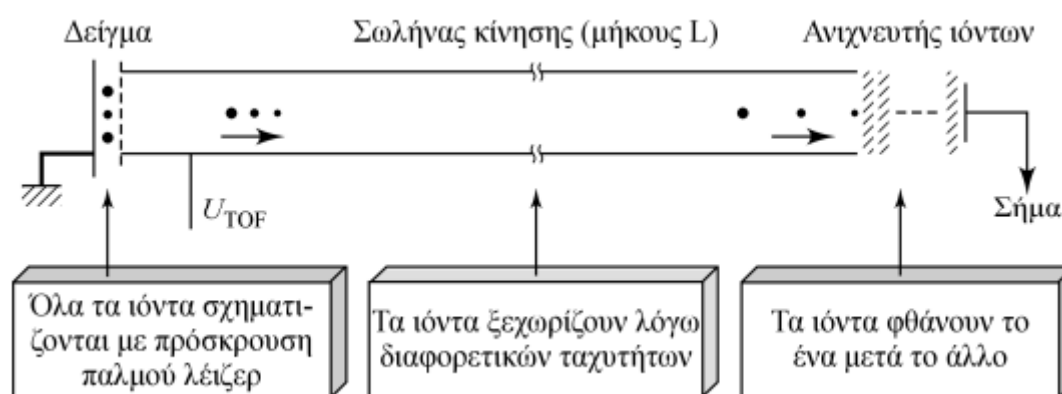
Εικόνα 1.10: Ο μηχανισμός της βιοφωταύγειας της πυγολαμπίδας.⁹

Η κρυσταλλική λουσιφερίνη βρέθηκε να είναι φθορίζουσα, απορροφώντας το υπεριώδες φως με κορυφή σε μήκος κύματος $\lambda=327$ nm και εκπέμποντας φως με κορυφή σε μήκος κύματος $\lambda= 530$ nm. Οι ιδιότητες αυτές, καθώς και η ικανότητα της λουσιφερίνης να συνδέεται με ATP, καθιστούν δυνατές πολυάριθμες εφαρμογές στον τομέα της ιατρικής, βιολογίας, φυσικής και βιοτεχνολογίας. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για το φαινόμενο της βιοφωταυγείας αυξάνεται συνεχώς, καθώς το ίδιο αποτελεί έμπνευση για πολλές καινοτόμες ιδέες.

2. Μέθοδοι ανάλυσης

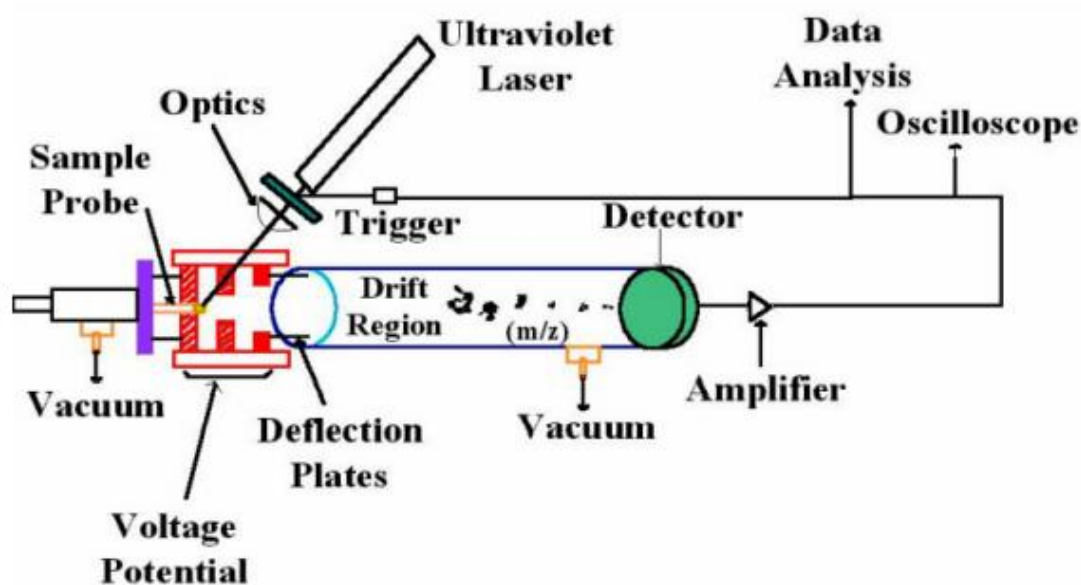
2.1 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Η γενική αρχή της φασματομετρίας μάζας είναι να παράγει, να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ιόντα αέριας φάσης. Συνήθως, οι μέθοδοι θερμικής εξάτμισης χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά μορίων στην αέρια φάση. Πιο συγκεκριμένα, στη τεχνική MALDI-TOF, το δείγμα ενσωματώνεται στην κρυσταλλική δομή μικρών οργανικών ενώσεων (μήτρα) και εναποτίθεται σε ένα αγώγιμο υπόστρωμα δείγματος. Οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται με μια δέσμη λέιζερ. Η ενέργεια του λέιζερ προκαλεί δομική αποσύνθεση του ακτινοβολημένου κρυστάλλου και δημιουργεί ένα νέφος σωματιδίων (το νέφος) από το οποίο εξάγονται ιόντα με ένα ηλεκτρικό πεδίο. Μετά την επιτάχυνση μέσω του ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα παρασύρονται μέσω μιας διαδρομής χωρίς πεδίο και τελικά φτάνουν στον ανιχνευτή TOF (time of flight). Οι μάζες ιόντων (αναλογίες μάζας προς φορτίο $[m/z]$) υπολογίζονται τυπικά μετρώντας το 'χρόνο πτήσης' τους, δηλαδή τον χρόνο που χρειάστηκε ένα ιόν να διανύσει τον θάλαμο κενού για να φτάσει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος πτήσης είναι μεγαλύτερος για μεγαλύτερα μόρια από ό,τι για μικρότερα.¹⁰



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της περιοχής πτήσης των ιόντων και εξήγηση του τρόπου διαχωρισμού των ίδιων.¹¹

Η χρήση μήτρας είναι απαραίτητη στην συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική, καθώς η ίδια συμβάλει στην απορρόφηση της ενέργειας της ακτίνας του λέιζερ, και επομένως την αποφυγή αποικοδόμησης του δείγματος. Επίσης, συμμετέχει στην δημιουργία των ιόντων είτε σαν μέσο πρωτονίωσης (ανίχνευση κατιόντων) ή μέσο αποπρωτονίωσης (ανίχνευση ανιόντων). Επειδή δημιουργούνται κυρίως μονοφορισμένα, μη τεμαχισμένα ιόντα, οι μάζες ιόντων μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν από το προκύπτον φάσμα χωρίς την ανάγκη περίπλοκης επεξεργασίας δεδομένων. Επομένως, έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πραγματικά σημαντική τεχνική για την ποιοτική ταυτοποίηση της επιθυμητής ένωσης με ανίχνευση του αντίστοιχου μοριακού ιόντος. Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2.2) παρουσιάζεται πιο αναλυτικά η διάταξη της φασματοσκοπικής τεχνικής.



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης MALDI-TOF.

Αριστερά της εικόνας το δείγμα εισέρχεται σε θάλαμο κενού στη θέση του δειγματολήπτη (sample probe). Η δέσημ λείζερ (συνήθως στην υπέρυθρης ή υπεριώδους ακτινοβολία), η οποία είναι ευθυγραμμισμένη μέσω οπτικών φακών, ενεργοποιείται και χτυπάει το δείγμα (trigger). Το δείγμα ιονίζεται και εισέρχεται σε θάλαμο υψηλού δυναμικού τάσεως (κόκκινος θάλαμος) που το οδηγεί προς τις πλάκες εκτροπής (deflection plates). Αυτές εκτρέπουν το δείγμα καταλλήλως και τα διάφορα συστατικά αυτού μεταβαίνουν στην περιοχή πτήσης (drift region) όπου και διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζα/φορτίο (m/z). Όπως είναι διαχωρισμένο το δείγμα στα συστατικά του φτάνει στον ανιχνευτή (detector). Απαιτείται η παρεμβολή ενισχυτή σήματος (amplifier) και παλμοσκοπίου (oscilloscope), για την εξασφάλιση ισχυρού σήματος σε ψηφιακή μορφή. Έπειτα τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν σε μορφή φάσματος.

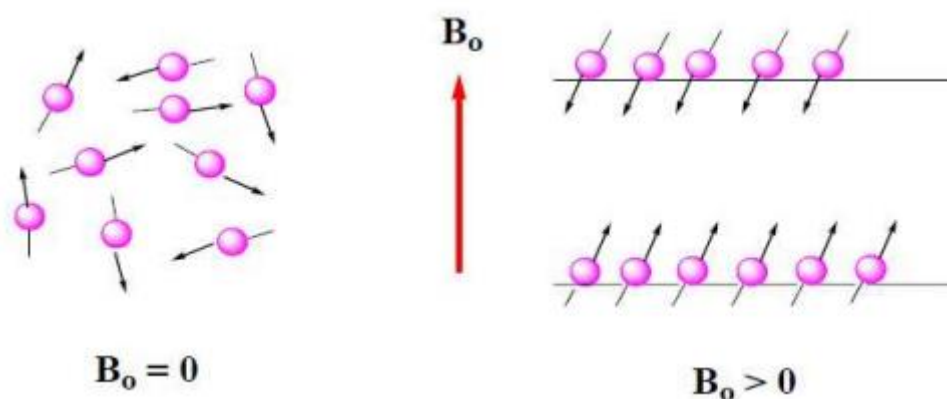
Το φάσμα μάζας που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία λήφθηκε από ένα Bruker Microflex LRF20 (MALDI-TOF) χρησιμοποιώντας DCTB (trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile) ως μήτρα.

2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός είναι μία μορφή φασματοσκοπίας απορρόφησης όπου το δείγμα, ευρισκόμενο με τις προσανατολιζόμενες ιδιοπεριστροφές (spin) του μέσα σε μαγνητικό πεδίο, απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συχνότητες, που το χαρακτηρίζουν. Η απορρόφηση εξαρτάται από τον παρατηρούμενο πυρήνα. Ένα φάσμα NMR αποτελείται από μία πληθώρα κορυφών, οι οποίες συντονίζονται σε διάφορες συχνότητες.

Η τεχνική NMR αποτελεί μια μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια αυτής της φασματοσκοπικής τεχνικής δύναται η καταγραφή του σκελετού ανθράκων και υδρογόνων σε ένα μόριο. Οι πυρήνες που

μπορούν να μελετηθούν είναι αυτοί με περιττό αριθμό πρωτονίων ή νετρονίων, οι οποίοι εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Οι περισσότεροι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από κάποιο νοητό άξονα. Ένα φορτισμένο αντικείμενο που έχει κίνηση δημιουργεί μαγνητικό πεδίο γύρω του. Συνεπώς οι θετικά φορτισμένοι πυρήνες ενός ατόμου που περιστρέφονται αποτελούν μικροσκοπικούς μαγνήτες. Παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες αυτοί προσανατολίζονται είτε ομόρροπα είτε αντίρροπα με τη φορά του πεδίου αυτού (Εικόνα 2.3). Ο αντίρροπος προσανατολισμός είναι υψηλότερος ενεργειακά απο τον ομόρροπο. Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλη ενέργεια, ο πυρήνας απορροφά αυτή την ενέργεια και μεταβαίνει στην αντιπαράλληλη κατάσταση μιας και έχει κερδίσει ενέργεια. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η μεταβολή από την ενεργειακά χαμηλότερη στην υψηλότερη κατάσταση οι πυρήνες έχουν «συντονιστεί» με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία.

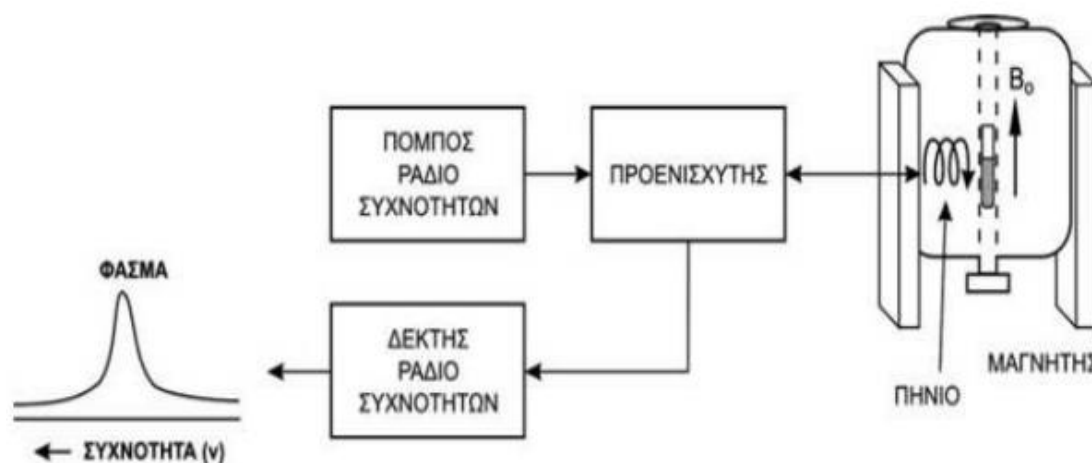


Εικόνα 2.3: Απουσία μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες έχουν τυχαία κίνηση άξονα (αριστερή εικόνα). Παρουσία μαγνητικού πεδίου προσανατολίζονται είτε ομόρροπα είτε αντίρροπα με τη φορά του μαγνητικού πεδίου. Τα βέλη των αξόνων των πυρήνων είναι στην πλειοψηφία τους ομόρροπα του πεδίου, λόγω χαμηλότερης ενέργειας.¹²

Ο φασματογράφος αποτελείται λοιπόν από ένα μαγνήτη σωληνοειδούς μορφής που περιέχει υπεραγωγίμο υλικό. Η μαγνήτιση τον υπεραγωγίμων υλικών είναι μόνιμη και επιτυγχάνεται με τη διατήρησή τους σε περιβάλλον υγρού ηλίου και υγρού αζώτου. Η ένταση του πεδίου προσδιορίζει και την διακριτικότητα των φασμάτων, που λαμβάνονται. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση, τόσο αυξάνεται η διακριτικότητα. Στο κέντρο του συστήματος, που περιγράφηκε, τοποθετείται ο αισθητήρας (probe). Αυτός περιλαμβάνει τον απαραίτητο εξοπλισμό για την εκπομπή υψίσυχων παλμών προς το δείγμα, ώστε να διεγερθούν οι παρατηρούμενοι πυρήνες και να γίνει η λήψη της κυματομορφής αποδιέγερσης.

Η αποδιέγερση των πυρήνων επάγει στο πηνίο παρατήρησης, ένα ρεύμα το οποίο ενισχύεται και καταλήγει στο δέκτη. Στη συνέχεια, αφού ληφθεί και ψηφιοποιηθεί, υπόκειται σε μετασχηματισμό κατά Fourier. Με την μαθηματική αυτή επεξεργασία λαμβάνεται στο πεδίο συχνοτήτων το φασματικό περιεχόμενο του συστήματος που εξετάζεται. Τέλος, γίνεται βελτίωση του ληφθέντος φάσματος. Η ολοκλήρωση των

κορυφών δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων της εξεταζόμενης ένωσης (σε φάσματα πρωτονίων). Περιληπτικά αυτή η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 2.4 που ακολουθεί.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας λήψης ενός φάσματος NMR.¹²

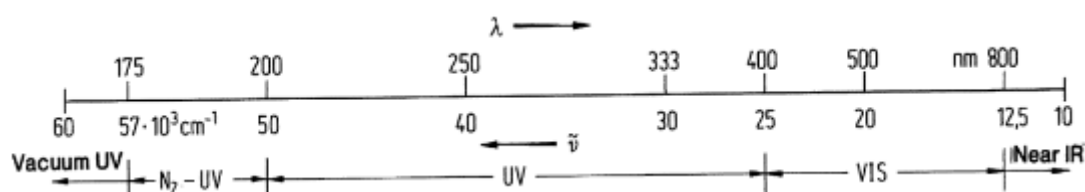
Σε ένα φάσμα NMR ο άξονας των x αποδίδει τη μετατόπιση των κορυφών των πυρήνων (σε μονάδες ppm) σε σχέση με του πυρήνες ενός πρότυπου μορίου (π.χ. τετραμεθυλοσιλάνιο, TMS) ,ενώ ο άξονας των y αποδίδει την ένταση των κορυφών αυτών (αυθαίρετες μονάδες). Επίσης είναι δυνατός ο υπολογισμός της αφθονίας σε πρωτόνια κάθε κορυφής στο φάσμα, με τον υπολογισμό του εμβαδού της. Σε ένα μόριο, θα αναμέναμε όλοι οι ομοειδείς ενεργοί πυρήνες να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα υπό την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Ωστόσο λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος κάθε ατόμου του μορίου και κατ' επέκταση του ηλεκτρονιακού νέφους που το περιβάλλει, η ένταση του μαγνητικού πεδίου που αντιλαμβάνεται ο πυρήνας είναι διαφορετική και επομένως εμφανίζει διαφορετικό σήμα σε ένα φάσμα NMR (χημική μετατόπιση). Η χημική μετατόπιση εξαρτάται από τα μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια των γειτονικών υποκαταστατών. Όταν το πεδίο των ηλεκτρονίων είναι αντίρροπο από το εξωτερικό πεδίο, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται προστασία των πυρήνων ενώ όταν το πεδίο είναι ομόρροπο ονομάζεται αποπροστασία. Στην περίπτωση της αποπροστασίας αντιστοιχούν μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις, ενώ στην περίπτωση της προστασίας αντιστοιχούν μικρότερες χημικές μετατοπίσεις.

Το φάσμα ^1H NMR που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία λήφθηκε σε φασματομέτρο Bruker DPX-300 MHz.

2.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους- ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού βασίζεται στον τρόπο με τον οποίο η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη. Το φασματοφωτόμετρο είναι όργανο το οποίο μετρά την ένταση μιας επιλεγμένης συχνότητας ακτινοβολίας και χρησιμοποιείται για την φασματοσκοπία UV-Vis. Το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται κυμαίνεται στην φασματική περιοχή των 200-800

nm. Η απορρόφηση ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας από ένα μόριο προκαλεί τη διέγερση ηλεκτρονίων από ηλεκτρονιακές καταστάσεις χαμηλότερης σε καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας. Δεδομένου ότι τα ηλεκτρονιακά επίπεδα είναι κβαντισμένα, απαιτείται ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί η εκάστοτε μετάβαση. Το ποσό της απαιτούμενης ενέργειας εξαρτάται κυρίως από τη φύση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των ατόμων του μορίου και σχετίζεται με την ενεργειακή διαφορά των τροχιακών που συμμετέχουν στους δεσμούς.



Εικόνα 2.5: Το εύρος της ορατής και υπέρυθρης περιοχής ηλεκτρονικού φάσματος.¹³

Η απορρόφηση φωτονίων στην περιοχή UV-VIS μπορεί να αποδοθεί στη διέγερση συγκεκριμένων ηλεκτρονίων σε μια συγκεκριμένη ομάδα ενός συστήματος, που ονομάζεται χρωμοφόρο και είναι υπεύθυνο για το χρώμα της αντίστοιχης ένωσης. Κατά την διάρκεια ανάλυσης με φασματοφωτόμετρο UV-Vis, το δείγμα ακτινοβολείται από μια σειρά μήκων κύματος, ξεκινώντας από την περιοχή του ορατού μέχρι και την υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Κάθε μήκος κύματος αντιστοιχεί σε μία τιμή ενέργειας που δίνεται στο σύστημα. Όταν ανιχνευτεί απορρόφηση σε κάποιο μήκος κύματος, σημαίνει ότι η αντίστοιχη ενέργεια που δόθηκε είναι ίση με την διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο ηλεκτρονικών καταστάσεων της ένωσης. Μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων, πραγματοποιείται διέγερση ηλεκτρονίου. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον τύπο που ακολουθεί, όπου E_2 και E_1 οι ενέργειες της υψηλότερης και χαμηλότερης ενεργειακά ηλεκτρονικής κατάστασης του μορίου αντίστοιχα, h η σταθερά Planck και C η ταχύτητα φωτός.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \nu = \frac{h C}{\lambda}$$

Η φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιεί το νόμο Beer-Lambert, σύμφωνα με το οποίο η απορρόφηση ακτινοβολίας από ένα δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του.

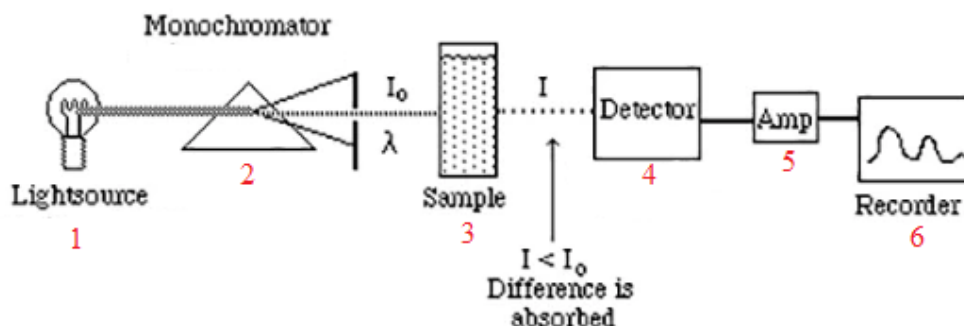
Ειδικότερα: $A = \epsilon \times b \times C$,

- όπου A είναι η απορρόφηση
- ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) είναι η γραμμομοριακή απορροφητικότητα
- b (cm) είναι το μήκος διαδρομής, που αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας
- C (M) είναι η συγκέντρωση του δείγματος

Υπάρχουν προϋποθέσεις για να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert. Πιο συγκεκριμένα, η ακτινοβολία πρέπει να είναι μονοχρωματική, το μοναδικό φαινόμενο να είναι η

απορρόφηση, ο όγκος του διαλύματος να είναι ομοιόμορφος και κάθε σωματίδιο του δείγματος να απορροφά ανεξάρτητα.

Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2.6) παρουσιάζονται τα βασικά μέρη της διάταξης ενός φασματοφωτόμετρου UV-Vis.



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ενός φασματοφωτόμετρου UV-Vis.¹³

1. Πηγή φωτός. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από την πηγή παραγωγής ακτινοβολίας. Η πηγή φωτός είναι μια λάμπα πυράκτωσης βολφραμίου για την ορατή ακτινοβολία και μια λυχνία δευτερίου για την παραγωγή υπεριώδης ακτινοβολίας.

2. Μονοχρωμάτορας ή φίλτρο. Το δεύτερο τμήμα του φασματοφωτομέτρου, είναι αυτό που διαχωρίζει το επιθυμητό μήκος κύματος από τα υπόλοιπα που παράγει η πηγή, μετατρέποντας έτσι το συνεχές φάσμα που εκπέμπεται από τις λάμπες σε μονοχρωματική ακτινοβολία.

3. Θήκη κυβέτας. Στην θήκη αυτή τοποθετείται η κυψελίδα με το δείγμα προς ανάλυση. Στην περιοχή του υπεριώδους χρησιμοποιούνται αποκλειστικά κυψελίδες από χαλαζία, καθώς οι γυάλινες/ πλαστικές απορροφούν στο συγκεκριμένο εύρος μήκους κύματος. Στην περιοχή του ορατού δεν υπάρχει αντίστοιχος περιορισμός.

4. Ανιχνευτής. Ο μετρητής της ακτινοβολίας που τελικά δεν απορροφάται από το δείγμα.

5. Ενισχυτής. Εκεί, το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής ενισχύεται μέσω ενός ηλεκτρονικού κυκλώματος.

6. Καταγραφικό. Μπορεί να είναι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής, όπου γίνεται η ανάγνωση του τελικού σήματος.

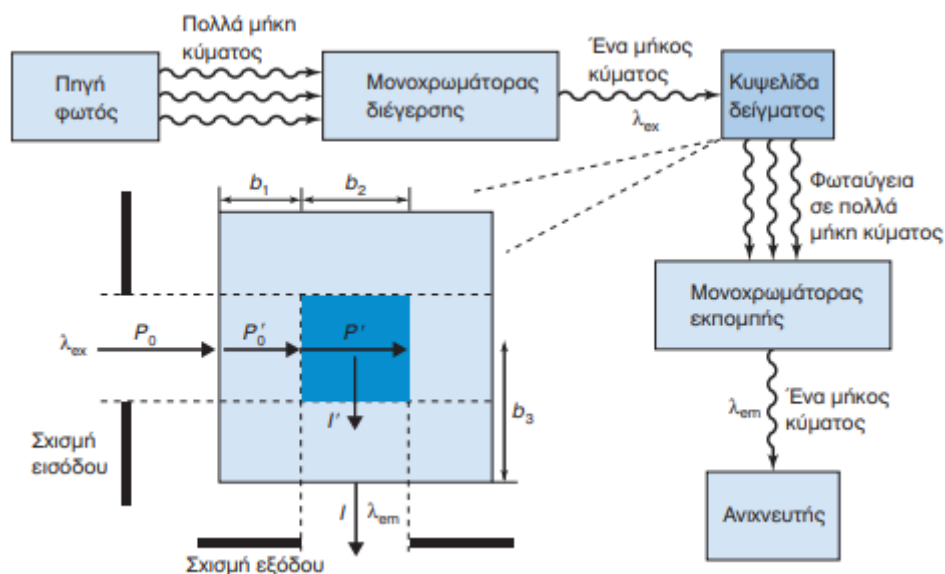
Για να ληφθούν τα φάσματα UV-Vis που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο PharmaSpect UV-1700.

2.4 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Το φαινόμενο του φθορισμού περιγράφεται ως μια διεργασία εκπομπής φωτονίων που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μοριακής αποδιέγερσης από ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Επομένως, για να είναι δυνατή η μέτρηση του φθορισμού πρέπει να προηγηθεί η διέγερση του προς ανάλυση μορίου. Στην φασματοσκοπία φθορισμού το

δείγμα ακτινοβολείται με λέιζερ σε μήκος κύματος που επιλέγει ο χρήστης του οργάνου. Καθώς το μόριο επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάσταση, καταγράφεται από το όργανο η ενέργεια που απελευθερώνει. Η αναλυτική τεχνική αυτή χρησιμοποιείται σε πολυάριθμες βιοχημικές δοκιμασίες, καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό της παρουσίας φθοροφόρων και των συγκεντρώσεών τους. Επίσης, το φάσμα φθορισμού είναι πολύ ευαίσθητο στο βιοχημικό περιβάλλον του μορίου που φθορίζει, με αποτέλεσμα να είναι ενδεικτικό για πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια που το περιβάλλουν.

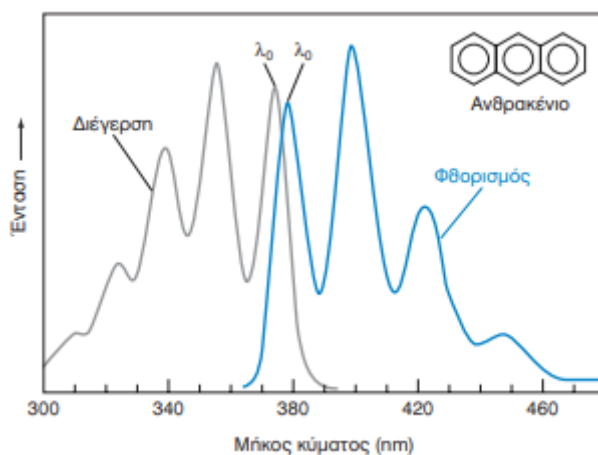
Ένα τυπικό όργανο για την μέτρηση του φθορισμού περιλαμβάνει μια πηγή φωτός, έναν θάλαμο δειγμάτων με ενσωματωμένα οπτικά εξαρτήματα και ανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας. Η πιο κοινή πηγή φωτός είναι οι λαμπτήρες τόξου xenon. Οι λαμπτήρες αυτοί παρέχουν μια σχετικά ομοιόμορφη ένταση σε ένα ευρύ φάσμα φάσματος από το υπεριώδες έως το κοντινό υπέρυθρο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.7 η οπτική διαδρομή της διέγερσης και η διαδρομή φωτός ανίχνευσης βρίσκονται σε ορθογώνια διάταξη. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η ελάχιστη διαρροή φωτός διέγερσης στην πλευρά ανίχνευσης. Χρησιμοποιούνται συνήθως φωτοανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας, όπως φωτοπολλαπλασιαστές.¹⁴



Εικόνα 2.7: Τα βασικά μέρη πειράματος φθορισμού. Το δείγμα ακτινοβολείται με κάποιο μήκος κύματος και η εκπομπή παρακολουθείται σε ένα εύρος μηκών κύματος. Ο μονοχρωμάτορας διέγερσης επιλέγει το μήκος κύματος διέγερσης (λ_{ex}) και ο μονοχρωμάτορας εκπομπής επιλέγει ένα μήκος κύματος (λ_{em}) που παρακολουθείται κάθε φορά.¹⁵

Για την λήψη μιας φασματικής μέτρησης, τοποθετούνται οπτικά στοιχεία διαμόρφωσης δέσμης και ευθυγράμμισης, όπως φίλτρα, στις οδούς φωτός διέγερσης και εκπομπής για την επιλογή μιας συγκεκριμένης φασματικής ζώνης. Υπάρχουν δύο κατηγορίες φασμάτων που μπορούν να προκύψουν από την μέτρηση του φθορισμού μιας ουσίας, το φάσμα διέγερσης και το φάσμα εκπομπής. Το φάσμα διέγερσης αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού που μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος διέγερσης σε σταθερό μήκος κύματος εκπομπής. Ενώ, το φάσμα εκπομπής ορίζεται ως

η ένταση φθορισμού που μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος εκπομπής σε σταθερό μήκος κύματος διέγερσης. Ένα φάσμα διέγερσης (το γράφημα της έντασης εκπομπής ως προς το μήκος κύματος διέγερσης) είναι παρόμοιο με το φάσμα απορρόφησης (το γράφημα της απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος). Ένα φάσμα εκπομπής (το γράφημα της έντασης εκπομπής ως προς το μήκος κύματος εκπομπής) παρατηρείται σε χαμηλότερες ενέργειες από το φάσμα απορρόφησης και έχει την τάση να είναι το οπτικό είδωλο του φάσματος απορρόφησης (Εικόνα 2.8).



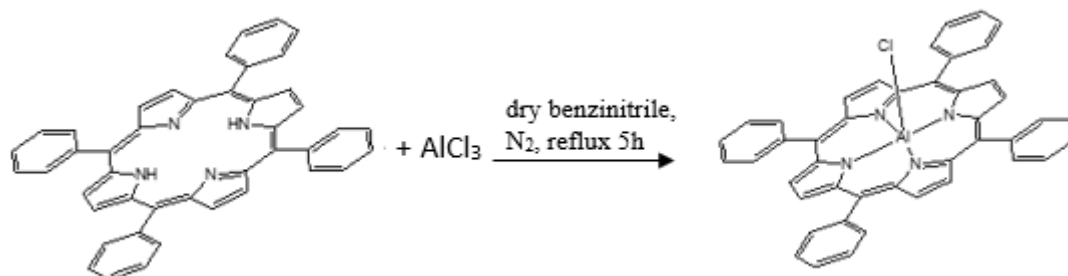
Εικόνα 2.8: Τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής του ανθρακενίου, τα οποία έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου.¹⁵

Τα φάσματα εκπομπής που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία λήφθηκαν με φασματοφθορόμετρο Jasco FP-6500.

3. Πειραματικό Μέρος

Σύνθεση της [5,10,15,20]-τετράκις-φαινυλο-πορφυρίνης του αλουμινίου με OH-ομάδα ως αζονικό υποκαταστάτη στο αλουμίνιο.¹⁰

3.1. Αντίδραση μετάλλωσης της H₂TPP.



Πίνακας 3.1: Πειραματικά δεδομένα των αντιδρώντων της αντίδρασης μετάλλωσης της H₂TPP, όπου παρουσιάζονται οι ποσότητες, τα μοριακά βάρη, τα mmol και τα χημικά ισοδύναμα αυτών.

Αντιδρώντα	Μάζα αντιδρώντων	Μοριακό βάρος (Mr)	mmol	Ισοδύναμα
H ₂ TPP	200mg	614.74 gr/mol	0.325	1
AlCl ₃	300mg	133.34 gr/mol	2.25	7

Πειραματική Διαδικασία:

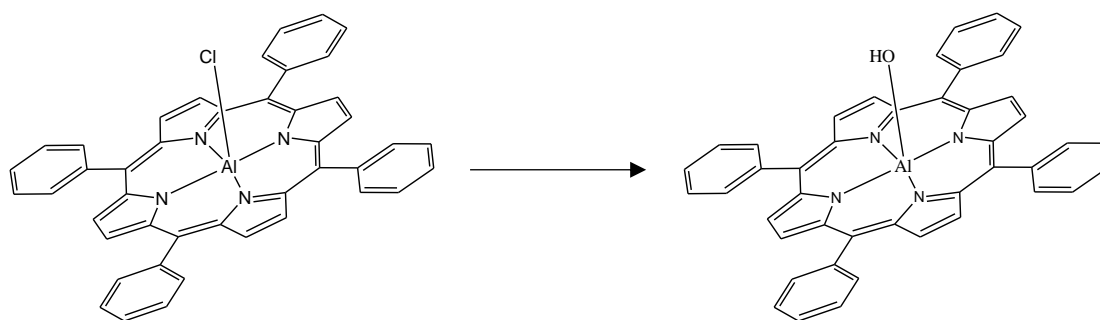
Σε δύλαμη σφαιρική φιάλη προσαρμόστηκαν ένας κάθετος ψυκτήρας και μία στρόγγυλα threeway, η οποία συνδέεται με αντλία κενού - αζώτου. Στη φιάλη πραγματοποιήθηκε κενό και έπειτα διοχετεύτηκε άζωτο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Έπειτα στη φιάλη, έχοντας ανοιχτή τη ροή αερίου N₂, τοποθετήθηκε μαγνήτης ανάδευσης, το στερεό αντιδραστήριο της τετραφαινυλο-πορφυρίνης (200mgr, 0.325mmol) και το αλάτι AlCl₃ (300mgr, 2.25mmol), αφού το τελευταίο είχε διαλυθεί σε μικρή ποσότητα διαλύτη με ανάδευση. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 40ml διαλύτη ξηρό βενζονιτρίλιο και το σύστημα και η ροή αερίου N₂ έκλεισε. Στο επάνω μέρος του ψυκτήρα τοποθετήθηκε πώμα septum με μπαλονάκι που περιέχει αέριο N₂. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε θερμοαντική φωλιά. Από τη στιγμή που άρχισε ο βρασμός απαιτήθηκαν 5 ώρες σε συνθήκες reflux για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Η πορεία της μετάλλωσης ελέγχθηκε αρκετές φορές με χρήση φασματοσκοπίας υπεριώδους - ορατού (UV-Vis). Το σύστημα αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό, όπου στο χωνί παρέμεινε η περίσσεια του AlCl₃. Στο διήθημα προστέθηκαν περίπου 60ml εξάνιου και ελάχιστη μεθανόλη οπότε το προϊόν καταβυθίστηκε. Πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ιζήματος και εκπλύσεις αυτού με εξάνιο. Το στερεό διαλύθηκε σε 15ml



Εικόνα 3.1: Πειραματική διάταξη αντίδρασης μετάλλωσης της H₂TPP.

μεθανόλης και έπειτα έγινε διήθηση υπό κενό, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας του άλατος που είχε παραμείνει, και εκπλύσεις του χωνιού με περίπου 40ml μεθανόλη. Στο διήθημα προστέθηκαν περίπου 200ml διαλύματος HCl 3M, και παρατηρήθηκε σχηματισμός ιζήματος. Το ίζημα διηθήθηκε υπό κενό και έγιναν εκπλύσεις αυτού με περίπου 100ml διαλύματος HCl 3M. Το στερεό TPPAI-Cl·H₂O αφέθηκε υπο κενό ολονυχτίς, για να στεγνώσει όσο το δυνατό περισσότερο.

3.2 Αλλαγή αξονικού υποκαταστάτη

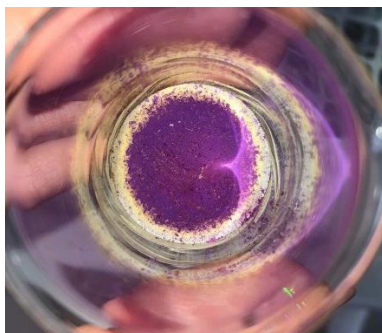


Πειραματική Διαδικασία:

Για την αντικατάσταση του χλωρίου με OH-ομάδα ως αξονικό υποκαταστάτη πραγματοποιήθηκε διάλυση του στερεού TPPAI-Cl·H₂O σε μίγμα CH₃Cl - MeOH αναλογίας 100 - 10ml. Το διάλυμα ανακινήθηκε με περίπου 30ml διαλύματος AgNO₃ 0,1%. Στην υδατική φάση καταβύθιστηκε το AgCl (σκούρο καφέ ίζημα). Η οργανική φάση απομακρύθηκε και προστέθηκε σ' αυτήν 7ml μεθανόλης και 10ml CH₃Cl. Το διάλυμα ανακινήθηκε πάλι με 30ml διαλύματος AgNO₃ 0,1% και η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι τη στιγμή που δεν παρατηρήθηκε επιπλέον καταβύθιση AgCl. Έπειτα στην οργανική φάση, στην οποία είχε προστεθεί ποσότητα διαλύματος CH₃Cl - MeOH (100:10), έγιναν 4-5 εκχυλίσεις με νερό. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση της οργανικής φάσης σε χωνί, στο οποίο είχε τοποθετηθεί ποσότητα ξηραντικού Na₂SO₄. Κατόπιν, προστέθηκε σ' αυτήν περίπου 100ml εξάνιο με σκοπό την καταβύθιση του προϊόντος. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και εκπλύσεις του προϊόντος, TPPAI-OH, με εξάνιο. Το ίζημα τοποθήθηκε στον φούρνο για ξύραση και τέλος ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας.

4. Ανάλυση αποτελεσμάτων

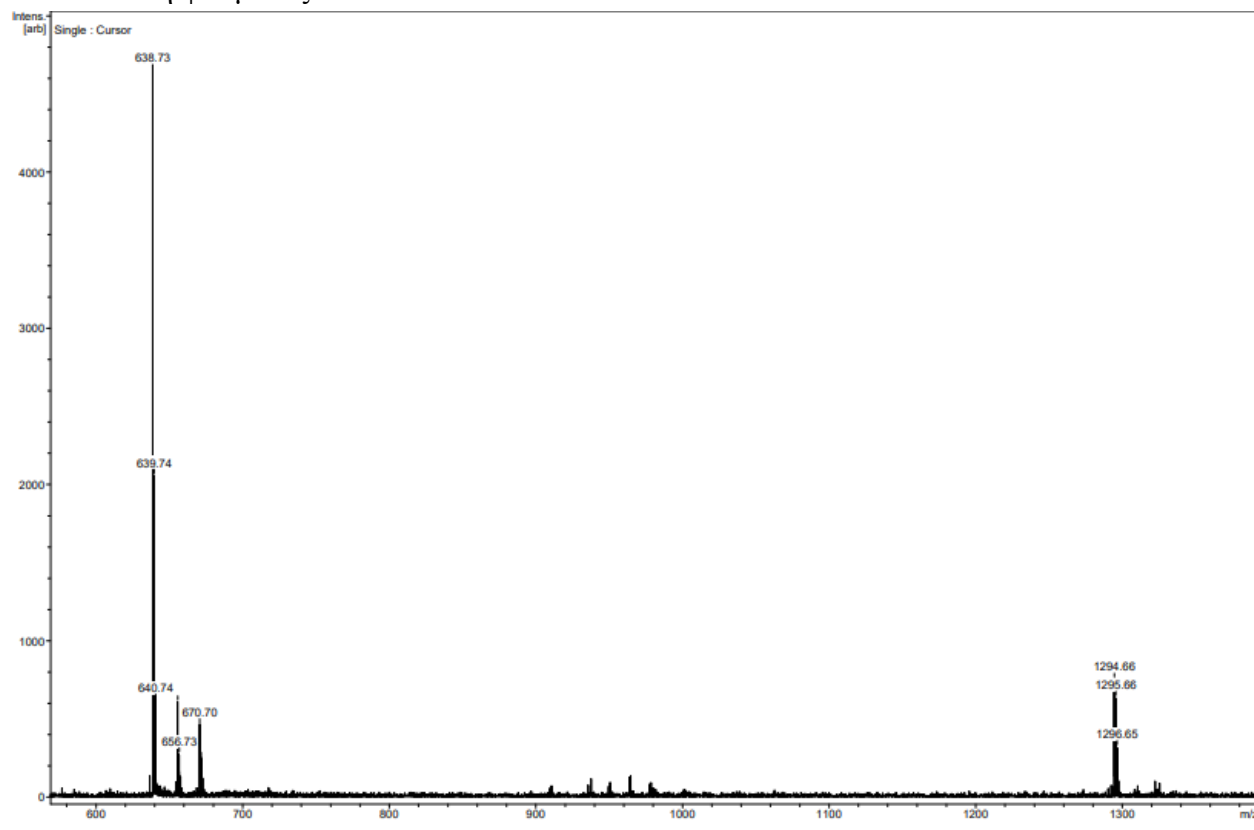
Η σύνθεση του προϊόντος $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 της παρούσας εργασίας. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ζυγίστηκαν 150mg προϊόντος, όμως εν τέλει απομονώθηκαν 93mg $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ λόγω απώλειας στον φούρνο ξήρανσης. Το τελικό προϊόν $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ απομονώθηκε με απόδοση 44%.



Εικόνα 4.1: Τελικό προϊόν $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$, πάνω σε ηθμό διήθησης.

Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές Maldi-TOF και ^1H NMR για την ταυτοποίηση της μοριακής μάζας και της δομής του προϊόντος $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$, αντίστοιχα. Περαιτέρω μελέτη του προϊόντος έγινε με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis και φθορισμού. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές που αναφέρθηκαν εφαρμόστηκαν και σε δείγματα d-λουσιφερίνης, καθώς και σε μίγματα πορφυρίνης-λουσιφερίνης.

4.1 Ανάλυση φάσματος Maldi-TOF



Εικόνα 4.2: Φάσμα Maldi-TOF της Al-TPP .

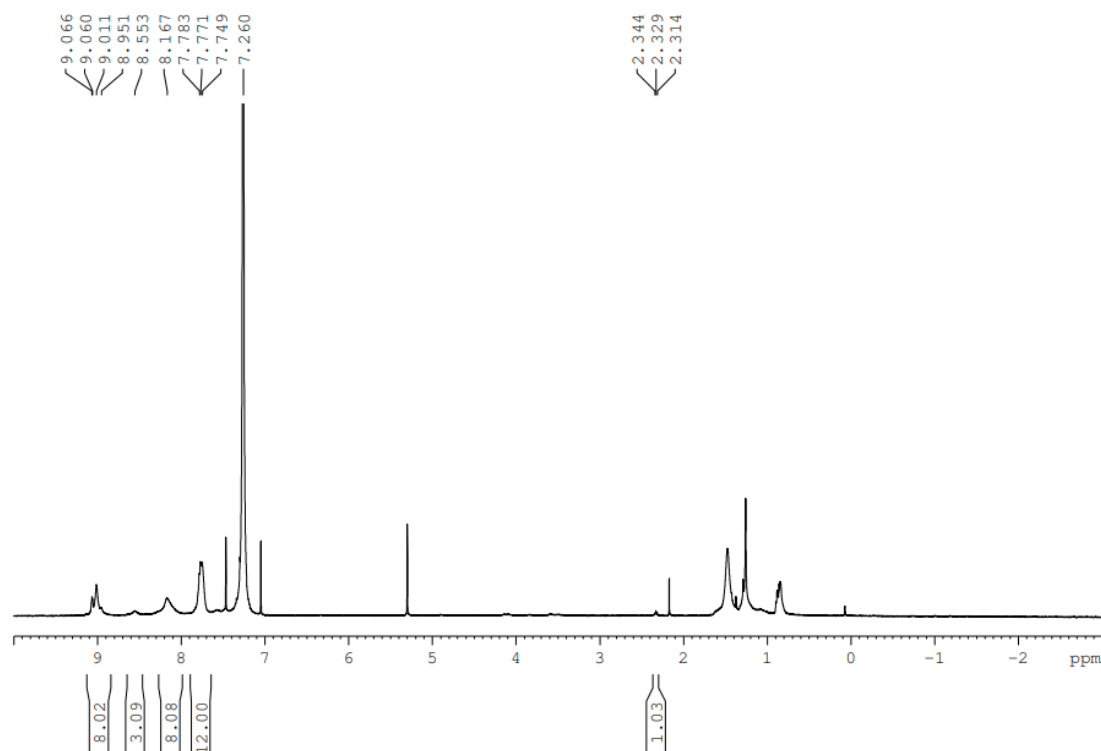
Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε μέσω της τεχνικής Maldi-TOF, όπου καταγράφεται το μοριακό βάρος των ιόντων της ένωσης.

Πίνακας 4.1: Πειραματικά δεδομένα φάσματος Maldi-TOF σε αντιστοιχία με τις βιβλιογραφικές τιμές μοριακών βαρών των ιόντων της τετραφαίνυλο πορφυρίνης του αλουμινίου.

Μοριακά ιόντα	Μοριακό βάρος	Κορυφές φάσματος Maldi-TOF
Al-TPP	639,21 amu	638,73
		639,74
		640,74
Al(OH)TPP	656,22 amu	656,73
Al(Cl)TPP	674,18 amu	670,7

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.1 που προηγήθηκε, οι κορυφές έντονης έντασης στα 638/639/640 amu του φάσματος Maldi-TOF αποδίδονται στο θραύσμα της τετραφαίνυλο πορφυρίνης του αλουμινίου χωρίς αξονικό υποκαταστάτη. Η σχάση αυτή οφείλεται στον τρόπο λειτουργίας του οργάνου. Η κορυφή του φάσματος στα 656,73 amu αντιστοιχεί στο σύμπλοκο της πορφυρίνης με αξόνικο υποκαταστάτη χλώριο, ενώ η κορυφή στα 670,7 amu αποδίδεται στο σύμπλοκο με αξονικό υποκαταστάτη υδροξύλιο. Οι κορυφές του φάσματος στα 1295 amu οφείλονται σε διμερισμό της πορφυρίνης.

4.2 Ανάλυση φάσματος μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, ^1H NMR

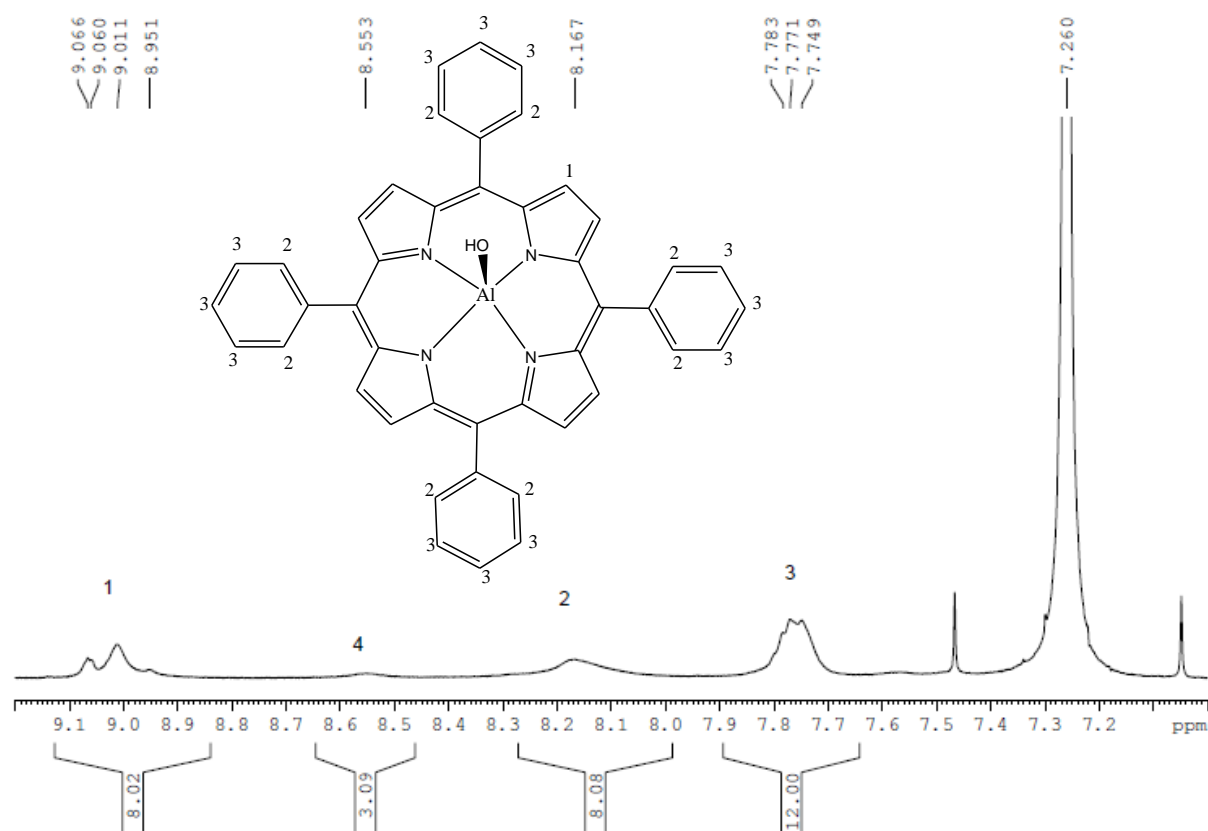


Εικόνα 4.3: Φάσμα ^1H NMR της πορφυρίνης Al-TPP-OH.

Το φάσμα ^1H NMR της πορφυρίνης ελήφθη σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την κορυφή στα 7.260 ppm του

φάσματος, η οποία είναι χαρακτηριστική για την πρωτονιωμένη μορφή, CHCl_3 , του διαλύτη αυτού. Η κορυφή στα 2.329 ppm αποδίδεται στο υδροξύλιο (-OH) που υπάρχει ως αξονικός υποκαταστάτης στο μέταλλο της πορφυρίνης. Η κορυφή είναι απλή διότι δεν υπάρχουν γειτονικά υδρογόνα που να προκαλούν σχάση της κορυφής. Η ολοκλήρωση της είναι 1.03 διότι υπάρχει ένα μόνο υδροξύλιο, άρα και ένα μόνο πρωτόνιο.

Οι υπόλοιπες κορυφές βρίσκονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος και παρουσιάζονται στην εικόνα 4.4 που ακολουθεί. Η κορυφή 4 του φάσματος δεν αντιστοιχεί σε πρωτόνιο της πορφυρίνης και αποδίδεται σε κάποιο παραπροϊόν, υποδηλώνοντας ότι το δείγμα δεν είναι εντελώς καθαρό.

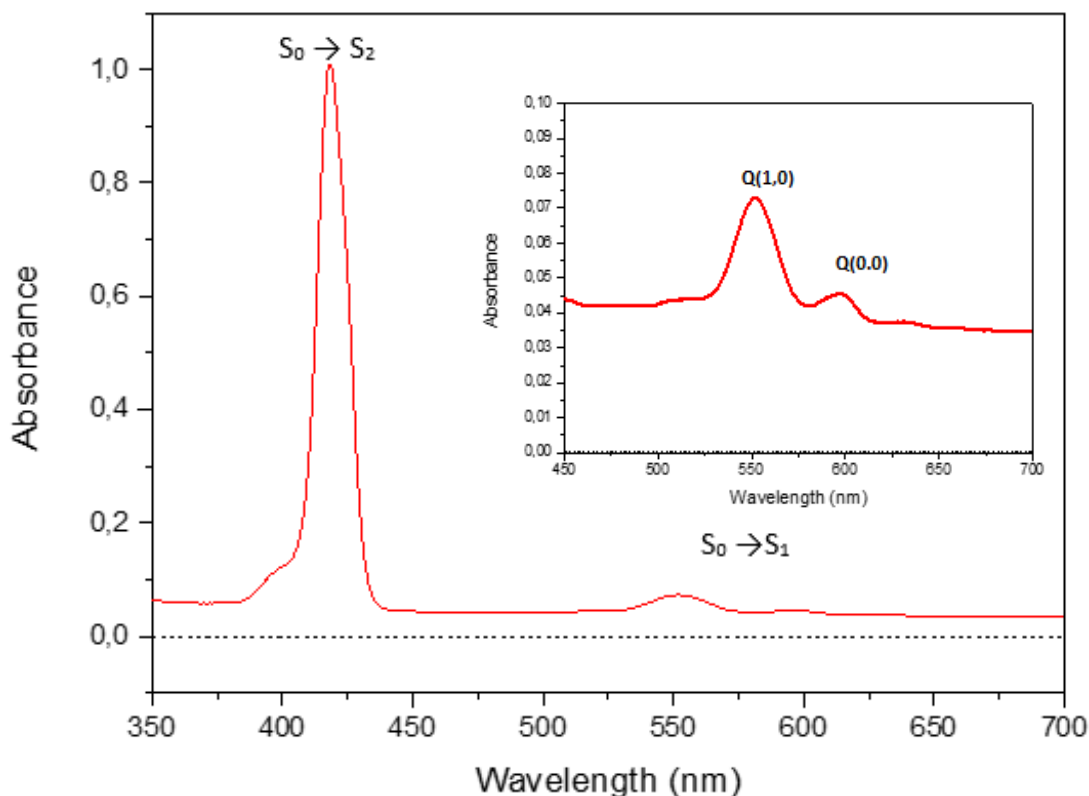


Εικόνα 4.4: Φάσμα ^1H NMR της Al-TPP-OH σε μεγένθυση. Παρουσιάζονται αριθμημένες κορυφές πρωτονίων σε αντιστοιχία με τις θέσεις των πρωτονίων αυτών στο μόριο της πορφυρίνης.

4.3 Ανάλυση φασμάτων απορρόφησης και φθορισμού

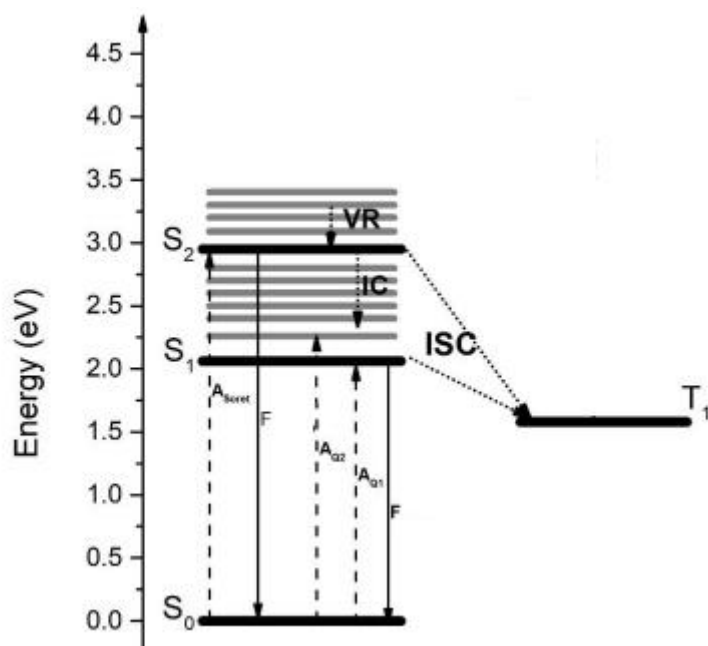
4.3.1 Τετραφαίνυλο πορφυρίνη του αλουμινίου

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis και φθορισμού της Al-TPP που λήφθηκαν, παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.5 και Εικόνα 4.7 αντίστοιχα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα καταγράφονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 4.2.



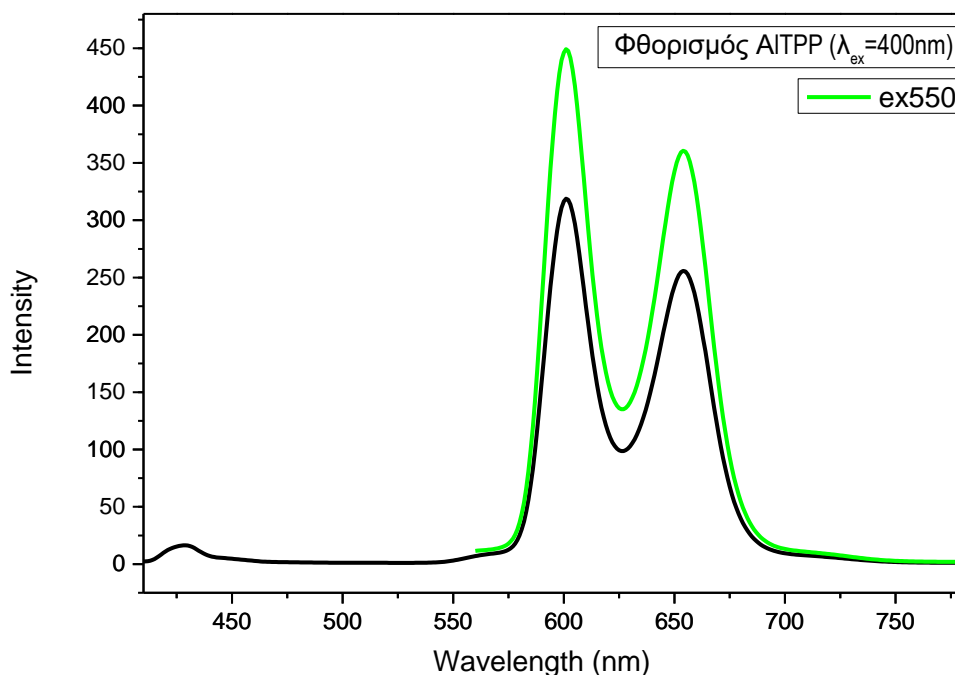
Εικόνα 4.5: Φάσμα απορρόφησης σε φασματικό εύρος 350-750nm της Al-TPP σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο ($\epsilon_{\max}=527 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁷ / [AlTPP]= 1,9 mM. Σε μεγέθυνση παρουσιάζονται οι Q μπάντες $\lambda=450\text{-}700\text{nm}$ του φάσματος.

Στο ενεργειακό διάγραμμα Jablonski που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.6, απεικονίζονται όλες οι δυνατές, ακτινοβολικές και μη ακτινοβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των επιπέδων των πορφυρινών. Οι μη ακτινοβολικές διεργασίες αποτελούνται από τη δονητική χαλάρωση (VR), την εσωτερική μετατροπή (IC) και την συστηματική διασταύρωση (ISC). Σύμφωνα με το ενεργειακό διάγραμμα η Soret ταινία ($\lambda = 418 \text{ nm}$) της πορφυρίνης αντιστοιχεί στην μετάβαση από την θεμελιώδη στην δεύτερη διεγερμένη κατάσταση του μορίου ($S_0 \rightarrow S_2$). Η πρώτη χαμηλότερης ενέργειας Q_1 ταινία ($\lambda = 597 \text{ nm}$) της Al-TPP αναφέρεται στην μετάβαση από το πρώτο δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης στο πρώτο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης $Q(0, 0)$, ενώ η υψηλότερη ενεργειακά κορυφή ($\lambda = 551 \text{ nm}$) αντιστοιχεί στην μετάβαση από το πρώτο δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους στο δεύτερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης $Q(1, 0)$. Από το πλήθος των Q-bands συμπεραίνεται ότι η πορφυρίνη έχει όντως μεταλλωθεί και η αντίδραση έγινε επιτυχώς.



Εικόνα 4.6: Ενεργειακό διάγραμμα Jablonski των ενεργειακών και δονητικών επιπέδων της ΑΙΤΡΡ. Τα βέλη σημειώνουν τις ακτινοβολικές (διακεκομμένα και συνεχή βέλη) και μη ακτινοβολικές (βέλη από τελείες) διεργασίες του μορίου.¹⁸

Στο φάσμα φθορισμού της $\text{Al}(\text{OH})\text{TPP}$ (Εικόνα 4.7), με διέγερση σε μήκος κύματος $\lambda = 400 \text{ nm}$ εμφανίζονται τρεις κορυφές, οι οποίες είναι αντίστοιχες αυτών της απορρόφησης. Έτσι, ο φθορισμός από την δεύτερη διεγερμένη κατάσταση εμφανίζεται με κέντρο τα $\lambda = 428 \text{ nm}$, ενώ ο φθορισμός από την πρώτη διεγερμένη κατάσταση εμφανίζεται στα $\lambda = 601 \text{ nm}$ και $\lambda = 654 \text{ nm}$ αναλόγως το δονητικό επίπεδο εκκίνησης του φθορισμού. Διακριτή είναι επίσης η διαφορά της έντασης των κορυφών στα φάσματα φθορισμού της Εικόνας 4.7. Διεγείροντας στην S_2 κατάσταση, η ένταση του φθορισμού μειώνεται σε σχέση με την διέγερση στην S_1 . Η μείωση στην ένταση είναι ισχυρή ένδειξη ότι ο πληθυσμός της S_2 διοχετεύεται σε μη ακτινοβολικά μονοπάτια που δεν περιλαμβάνουν την S_1 . Έτσι, το κανάλι $S_1 \rightarrow S_0$ έχει σημαντικά λιγότερο πληθυσμό που φθορίζει, όταν η διέγερση του μορίου γίνεται στην S_2 κατάσταση.



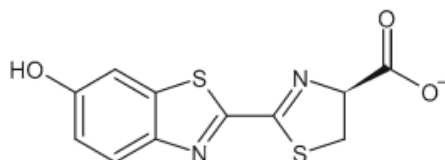
Εικόνα 4.7: Φάσμα φθορισμού της ΑΙΤΡΡ στο φασματικό εύρος 410-800 nm. Το φάσμα παρατηρήθηκε με μήκος κύματος διέγερσης τα $\lambda_{exc} = 400$ nm.

Πίνακας 4.2: Δεδομένα φασματοσκοπίας απορρόφησης και φθορισμού για την ΑΙΤΡΡ πορφυρίνη.

Φασματοσκοπικά δεδομένα της ΑΙΤΡΡ σε διχλωμεθάνιο		
Κορυφές φάσματος	Απορρόφηση	Φθορισμός
Soret ταινία	418 nm	428 nm
Q-ταινίες	551 nm	601 nm
	597 nm	654 nm

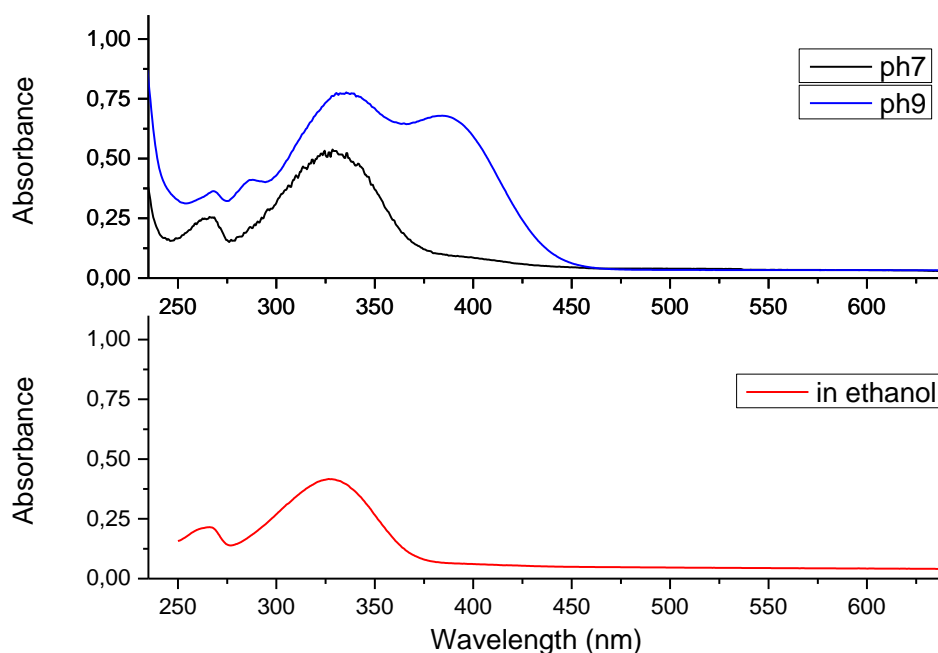
4.3.2 D-λουσιφερίνη

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα φάσματα απορρόφησης της λουσιφερίνης είναι ευαίσθητα σε αλλαγές pH.¹⁹ Η λουσιφερίνη όταν διαλυθεί σε νερό το τμήμα καρβοξυλικού οξέος του μορίου αποπρωτιώνεται σε έναν βαθμό. Όταν αλλάζει το pH, αλλάζει και το ποσοστό της ανιοντικής μορφής της λουσιφερίνης που υπάρχει στο δείγμα. Ο διαμοριακός δεσμός υδρογόνου έχει βαθιά επίδραση στις φωτοχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες των χρωμοφόρων.



Εικόνα 4.8: Αποπρωτονιωμένη μορφή d-λουσιφερίνης.²⁰

Λήφθηκαν φάσματα απορρόφησης της d-λουσιφερίνης σε διαλύτη νερό και αιθανόλη, τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 4.9.

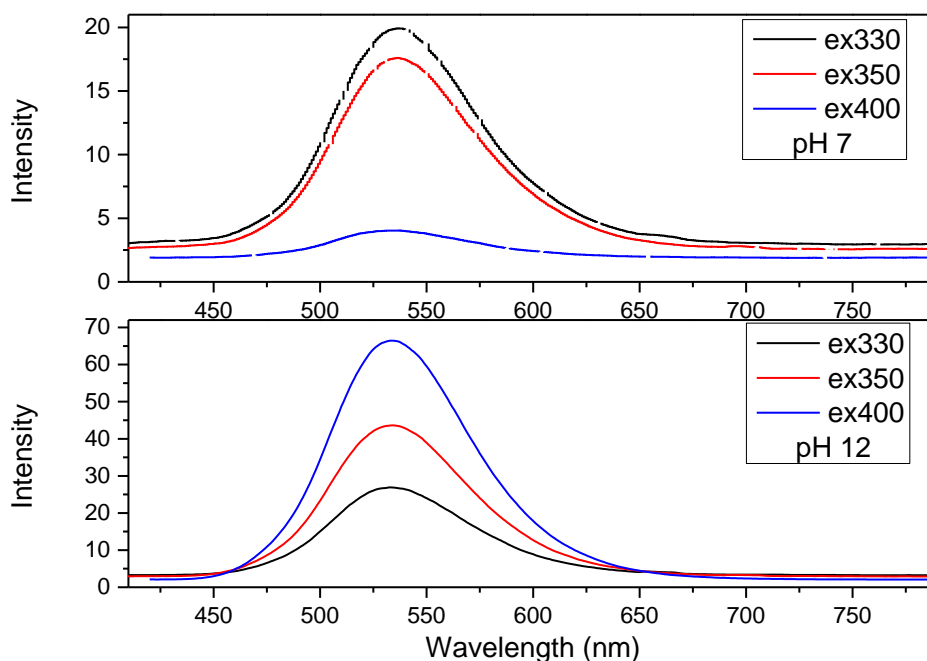


Εικόνα 4.9: Φάσματα απορρόφησης d-λουσιφερίνης 235-640 nm σε διαλύτη νερό (σε pH 7 και 9) και σε διαλύτη αιθανόλη.

Τα φάσματα απορρόφησης σε νερό εμφανίζουν κάποιες διαφορές οι οποίες οφείλονται στις διαφορετικές τιμές pH των δειγμάτων. Σε pH 7 η κύρια κορυφή του φάσματος ανιχνεύεται σε μήκος κύματος $\lambda = 329$ nm ($S_0 \rightarrow S_1$) και παρατηρείται άλλη μια κορυφή μικρότερης απορροφητικότητας σε μήκος κύματος $\lambda = 265$ nm ($S_0 \rightarrow S_3$). Σε pH 9 η κύρια κορυφή μετατοπίζεται προς το ερυθρό κατά 6 nm ($\lambda = 335$ nm), ενώ η κορυφή στα $\lambda = 265$ nm παραμένει. Ωστόσο, εμφανίζονται δύο νέες κορυφές, μία σε μήκος κύματος $\lambda = 383$ nm και μία μικρότερης απορροφητικότητας σε μήκος κύματος $\lambda = 287$ nm. Οι νέες κορυφές αυτές αποδίδονται στην αποπρωτονιωμένη μορφή της d-λουσιφερίνης.

Το φάσμα σε διαλύτη αιθανόλη παρουσιάζει τις ίδιες κορυφές με το φάσμα σε νερό με pH 7. Αυτό συμβαίνει γιατί η αιθανόλη, ως διαλύτης με τάση να δώσει πρωτόνια, εμποδίζει την ύπαρξη της αρνητικά φορτισμένης μορφής της λουσιφερίνης. Άρα, επικρατεί η πρωτονιωμένη μορφή, όπως και στο δείγμα σε νερό με pH 7, με αποτέλεσμα τα φάσματα να είναι ίδια.

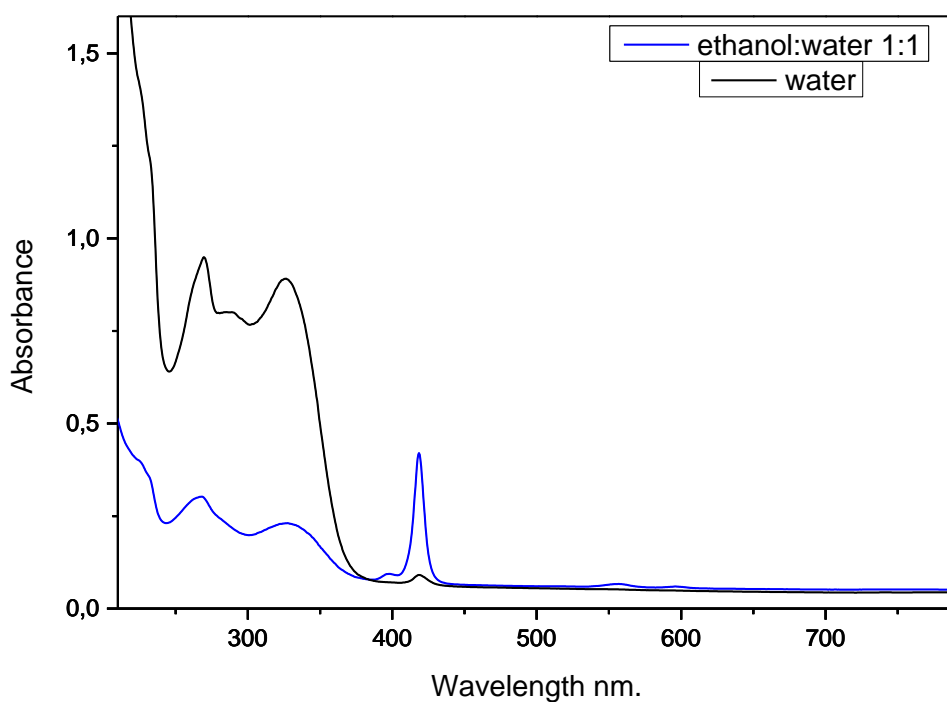
Για την μελέτη του φθορισμού της λουσιφερίνης διεγέρθηκαν υδατικά διαλύματα λουσιφερίνης με pH 7 και 12, σε μήκη κύματος $\lambda=330, 350$ και 400 nm. Σύμφωνα με τα φάσματα (Εικόνα 4.10), η λουσιφερίνη φθορίζει σε μήκος κύματος 530 nm ($S_1 \rightarrow S_0$) ανεξάρτητα από το pH ή το μήκος κύματος στο οποίο διεγείρεται. Η κορυφή αυτή αποδίδεται στον φθορισμό της αποπρωτονιωμένης μορφής της λουσιφερίνης.



Εικόνα 4.10: Φάσματα φθορισμού μετά από διέγερση σε $\lambda=330, 350$ και 400 nm υδατινών διαλυμάτων λουσιφερίνης με pH 7 και 12.

4.3.3 Πορφυρίνη και D-λουσιφερίνη

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης με την d-λουσιφερίνη παρασκευάστηκαν μίγματα των δύο σε νερό και σε νερό:αιθανόλη 1:1. Τα δείγματα αυτά μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα του πίνακα 4.3, στο φάσμα απορρόφησης (εικόνα 4.11) ανιχνεύονται οι χαρακτηριστικές κορυφές και των δύο συστατικών, με μετατόπιση ένα ή δύο νανομέτρων προς το ερυθρό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Με διαλύτη νερό ανιχνεύεται ακόμα και η αποπρωτονιωμένη μορφή λουσιφερίνης σε μήκος κύματος $\lambda=288$ nm.



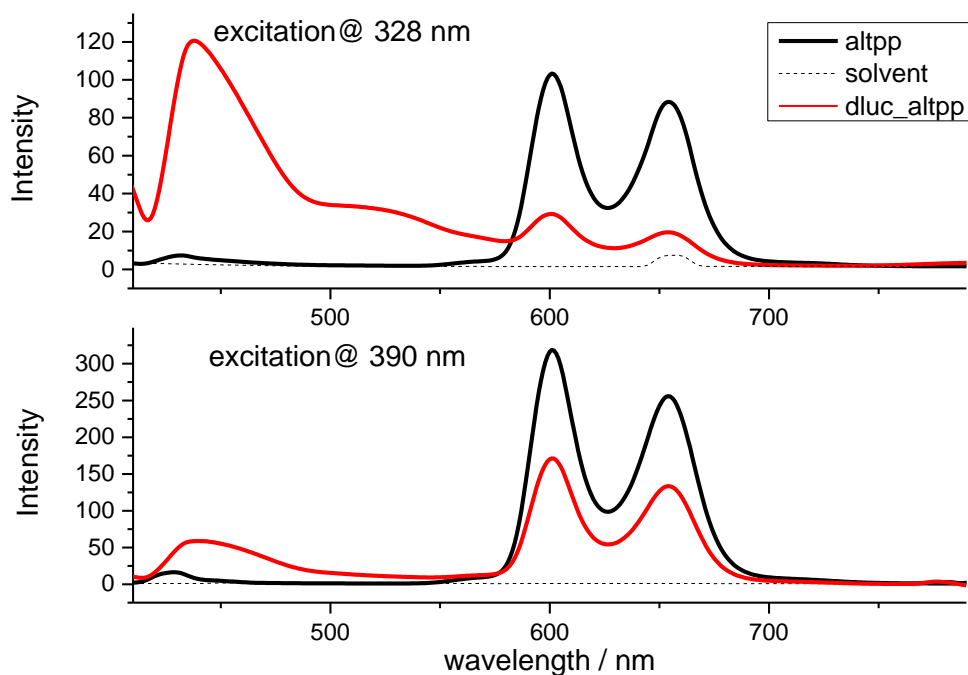
Εικόνα 4.11: Φάσματα απορρόφησης 210-790 nm μιγμάτων Al-TPP/D-λουσιφερίνη σε διαλύτη νερό και σε νερό:αιθανόλη 1:1.

Πίνακας 4.3: Δεδομένα φασματοσκοπίας απορρόφησης για το μίγμα Al-TPP/D-λουσιφερίνης.

Μίγμα Al-TPP/ D- λουσιφερίνη	Σε διαλύτη νερό	Σε διαλύτη νερό:αιθανόλη 1:1	Απόδοση κορυφών
	269 nm	267 nm	d-λουσιφερίνη
288 nm	-	Αποπρωτονιωμένη μορφή d- λουσιφερίνης	
326 nm	324 nm	d-λουσιφερίνη	
419 nm	420 nm	Soret μάντα πορφυρίνης	

Ακόμη, μετρήθηκε ο φθορισμός του μίγματος πορφυρίνης-λουσιφερίνης σε διαλύτη νερό μετά από διέγερση σε διάφορα μήκη κύματος. Παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού με διέγερση σε μήκη κύματος $\lambda = 328$ και 390 nm (Εικόνα 4.12). Και στα δύο φάσματα παρατηρείται ότι οι κορυφές στα 600 και 650 nm έχουν μικρότερη ένταση στο μίγμα (κόκκινη καμπύλη στο φάσμα) από ότι σε δείγμα που περιέχει μόνο πορφυρίνη (μαύρη καμπύλη στο φάσμα). Άρα, η ένταση του φθορισμού της

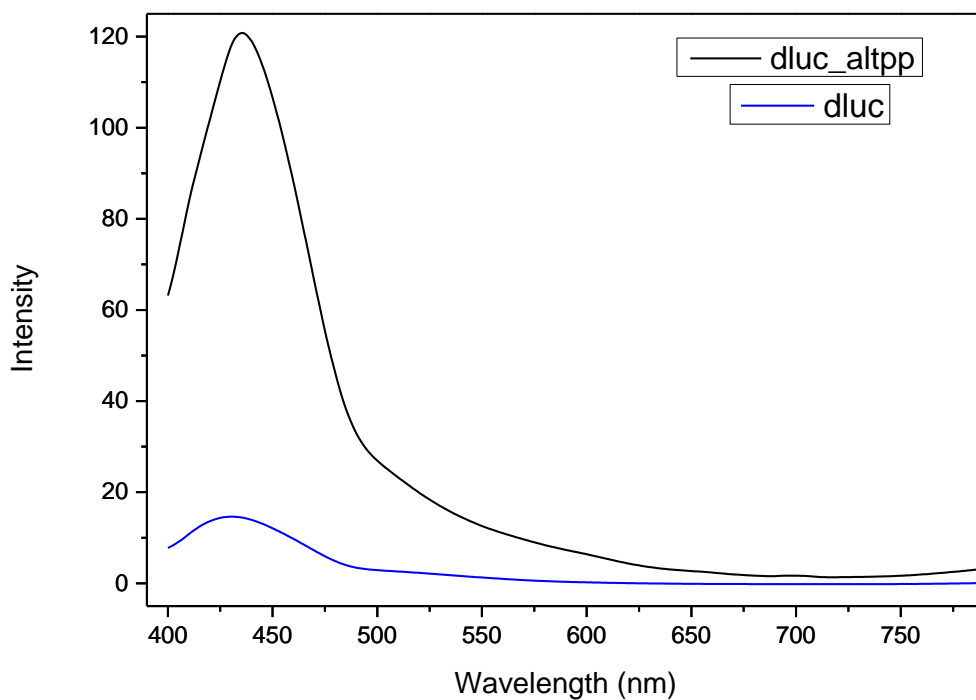
πορφυρίνης μειώνεται παρουσία λουσιφερίνης, γεγονός που σημαίνει ότι η πορφυρίνη χάνει πληθυσμό, με πιθανή μεταφορά αυτού στην λουσιφερίνη.



Εικόνα 4.12: Φάσματα φθορισμού μίγματος πορφυρίνης-λουσιφερίνης σε διαλύτη νερό μετά από διέγερση σε $\lambda = 328$ nm και 390 nm, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φάσματα σκέτης πορφυρίνης.

Με διέγερση σε μήκος κύματος $\lambda = 350$ nm, στο αντίστοιχο φάσμα (εικόνα 4.13) ανιχνεύεται φθορισμός σε μήκος κύματος $\lambda = 435$ nm, ο οποίος αποδίδεται στην πρωτονιωμένη μορφή της d-λουσιφερίνης. Μετά απο σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα φθορισμού δείγματος που περιέχει μόνο d-λουσιφερίνη, παρατηρείται ότι η ένταση του φθορισμού της λουσιφερίνης αυξάνεται παρουσία της πορφυρίνης. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της λουσιφερίνης με την πορφυρίνη. Πιο συγκεκριμένα, στην πιθανή μεταφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας απο

τα υψηλότερα δονητικά επίπεδα της S_2 ή από την S_3 κατάσταση της πορφυρίνης στην S_1 κατάσταση της d-λουσιφερίνης, από όπου παρατηρείται ο φθορισμός.



Εικόνα 4.13: Φάσμα φθορισμού μίγματος Al-TPP/D-λουσιφερίνης μετά από διέγερση σε μήκος κύματος 350nm (μαύρη γραμμή), σε σύγκριση με το φάσμα φθορισμού λουσιφερίνης στα αντίστοιχα νανόμετρα (μπλε γραμμή).

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, ο πρωταρχικός στόχος που επετεύχθη ήταν η σύνθεση της τετραφαίνυλο πορφυρίνης του αλουμινίου με αξονικό υποκαταστάτη υδροξύλιο, Al(OH)TPP. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε με την τεχνική Maldi-TOF και τις φασματοσκοπίες NMR, UV-Vis και φθορισμού.

Παράλληλα, μελετήθηκαν οι φωτοχημικές ιδιότητες της d-λουσιφερίνης, μέσα από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis και φθορισμού που λήφθηκαν σε διαφορετικές τιμές pH. Οι φασματοσκοπίες απορρόφησης UV-Vis και φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν και για μίγμα πορφυρίνης Al(OH)TPP με λουσιφερίνη, που δημιουργήθηκε με σκοπό την μελέτη τυχόν αλληλεπίδρασης των δύο χρωμοφώρων. Τα φάσματα φθορισμού του μίγματος αποτελούν ένδειξη πιθανής ενεργειακής μεταφοράς από την πορφυρίνη προς την d-λουσιφερίνη. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την εξακρίβωση της λειτουργίας του συστήματος και τις πιθανές εφαρμογές του στην παραγωγή ενέργειας.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Mirco Natali and Franco Scandola, "Supramolecular Artificial Photosynthesis", 2016, Chapter 1.
- [2] Vernon, Leo P., and Gilbert R. Seely, eds. "The chlorophylls". Academic press, 2014.
- [3] Berg, Tymoczko, Gatto, Stryer, "Βιοχημεία", Κεφάλαιο 19.
- [4] Δημήτρης Κεσίσσογλου, Γεώργιος Ψωμάς, "Βιοανόργανη Χημεία", Κεφάλαιο 4.
- [5] Biesaga, Magdalena, Krystyna Pyrzyńska, and Marek Trojanowicz. "Porphyrins in analytical chemistry. A review." *Talanta* 51.2 (2000): 209-224.
- [6] Gouterman, Martin. "Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings." *The porphyrins* 3 (1978).
- [7] James Darwent, Peter Douglas, Anthony Harriman, George Porter and Marie-Claude Richoux, "Metal Phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen", *Coordination Chemistry Reviews*, 44 (1982) 83-126.
- [8] Vaidhyathan Ramamurthy, Kirk Schanze, *Organic Photochemistry and Photophysics*, Chapter 1 , 2006.
- [9] Aisha J. Syed, James C. Anderson, 'Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond', *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50, 5668.
- [10] Jurinke, Christian, Paul Oeth, and Dirk van den Boom. "MALDI-TOF mass spectrometry." *Molecular biotechnology* 26.2 (2004): 147-163.
- [11] Apostolos Spyros, University of Crete, Department of Chemistry, Σημειώσεις μαθήματος Polymer Chemistry.
- [12] Apostolos Spyros, University of Crete, Department of Chemistry, Σημειώσεις μαθήματος NMR Spectroscopy.
- [13] Perkampus Heinz-Helmut, "UV-VIS Spectroscopy an its Applications", Springer Science & Business Media, 2013.
- [14] So Peter TC, and Chen Y. Dong. "Fluorescence spectrophotometry." *e LS* ,2001.
- [15] Daniel C. Harris, «Ποσοτική χημική ανάλυση», Τόμος Β, Κεφάλαιο 18.
- [16] Μπαγάκη Ανθούλα, Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Χημείας, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης, Ηράκλειο Ιούλιος 2017.
- [17] Yo Shimizu, Jun-Ya Matsuno, Masaru Miya and Akira Nagata, 'The First Aluminium Discotic Metallomesogen: Hydroxo[5,10,15,20-tetrakis(4-n-dodecylphenyl)porphyrinato]aluminium(III)', *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994.

[18] Πηγιάκη Μαρία, Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Χημείας, Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, Ηράκλειο 2021.

[19] Frederick I. Tsuji, 'The Absorption Spectrum of Reduced and Oxidized Cypridina Luciferin', *Archives of biochemistry and biophysics* 69, 452-464 (1995).

[20] Christina Kjær, James N. Bull, Eduardo Carrascosa, Steen Brøndsted Nielsen, and Evan J. Bieske, 'Action spectroscopy of isomer-selected luciferin anions', *Eur. Phys. J. D* (2021) 75:72.