

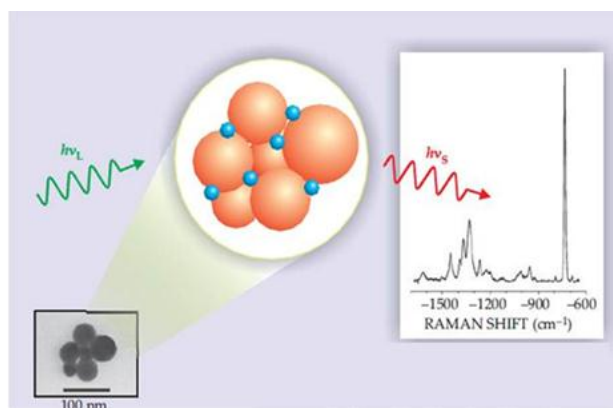


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

«Φασματοσκοπία Raman σε ενώσεις φαρμακευτικού ενδιαφέροντος»

Κοκλιώτη Μαλαματένια



Επιβλέπων Καθηγητής: Κ. Α. Χαριτίδης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Οκτώβριος 2012



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

**«Φασματοσκοπία Raman σε ενώσεις
φαρμακευτικού ενδιαφέροντος»**

Κοκλιώτη Μαλαματένια

Τριμελής επιτροπή

Λ. Ζουμπουλάκης

Δ. Κέκος

Κ.Α. Χαριτίδης

.....
**Επίκουρος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.**

.....
**Καθηγητής
Ε.Μ.Π.**

.....
**Καθηγητής
Ε.Μ.Π.**

Οκτώβριος 2012

Στον μπαμπά μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική εργασία με τίτλο «Φασματοσκοπία Raman σε ενώσεις με φαρμακευτικό ενδιαφέρον» εκπονήθηκε σε συνεργασία της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙΙ και του εργαστηρίου Sol-Gel του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στο να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία, ξεκινώντας από τον επιβλέποντα Καθηγητή Κ. Α. Χαριτίδη. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της μελέτης, τη δυνατότητα συνεργασίας με το εργαστήριο του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς και για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Οφείλω ένα ευχαριστώ στον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και Συνεργαζόμενο Ερευνητή του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» κ. Ι. Καρτσωνάκη, καθώς επίσης και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Sol-Gel του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος για τη συνεργασία που είχαμε, την ανεκτίμητη βοήθειά τους και την στήριξη τους σε όλα τα στάδια της διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του εργαστηρίου Sol-Gel στο ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» Ερευνητή Α' κ. Γ. Κόρδα. Επίσης, πολύτιμη βοήθεια προσέφεραν ο κ. Δ. Νιάρχος, Ερευνητής Α' και ο κ. Α. Σπηλιώτης, Φυσικός, του Εργαστηρίου Επιστήμης Υλικών του ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και όσους με στήριξαν το διάστημα που πραγματοποιούσα την παρούσα διπλωματική εργασία.

Περίληψη

Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη ενώσεων που παρουσιάζουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman. Οι ανθρακυκλίνες (anthracyclines) αποτελούν από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί για την αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου. Η δοξουρουβικίνη (doxorubicin) και η δαουνορουβικίνη (daunorubicin) χαρακτηρίζονται από τα γνωστότερα και δραστικότερα φάρμακα για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Στο πρώτο μέρος της εργασίας, μελετήθηκαν τα φάσματα Raman της δοξουρουβικίνης, των κενών σφαιρών πολυ(γλυσιδλικού μεθυλεστέρα @μεθακρυλικού μεθυλεστέρα-co-διβινυλοβενζολίου-co-ακρυλικού οξέος) – P(GMA @MMA-co-DVB-co-AA), καθώς και σφαιρών που είχαν φορτωθεί με φάρμακο. Επιπλέον, διερευνήθηκαν τα φάσματα που προέκυψαν από την δαουνορουβικίνη, τις κενές σφαίρες πολυ(μεθακρυλικού οξέος) poly(methacrylic acid – PMAA) και πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιου-co-μεθακρυλικού οξέος) poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid – P(NIPAAm-co-MAA), καθώς και σφαίρες στις οποίες έχει εγκλωβιστεί το φάρμακο. Οι εμφανιζόμενες κορυφές χαρακτηρίστηκαν πλήρως δομικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των φασμάτων, επισημάνθηκαν οι μεταξύ τους διαφορές και τελικά διαπιστώθηκε ο εγκλεισμός των δύο τύπων φαρμάκου στα εκάστοτε πολυμερικά συστήματα. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, παρασκευάστηκαν κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου και ένα λεπτό υμένιο αργύρου σε υπόστρωμα βιοοριουριτικού γυαλιού. Το διάλυμα της 4-αμινοθειοφαινόλης προσροφήθηκε στις επιφάνειές τους και παρατηρήθηκε το φαινόμενο της επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, προσομοιάστηκαν οι βελτιστοποιημένες στο χώρο δομές των δύο αντικαρκινικών φαρμάκων που εξετάζονται. Με τη βοήθεια του προγράμματος Gaussian 09W V7, πραγματοποιήθηκε θεωρητικός υπολογισμός των φασμάτων Raman (χωρίς και με συντελεστή διόρθωσης) με τη χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G. Τα θεωρητικά φάσματα που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν πλήρως και καταγράφηκαν όλα τα είδη δονήσεων των κυριότερων κορυφών. Συγκρίθηκαν τα φάσματα από τον θεωρητικό υπολογισμό και την πειραματική διαδικασία και προέκυψε ότι τα αποτελέσματα στο φασματικό εύρος 300-1000 cm^{-1} δεν παρουσιάζουν ομοιότητα με τα πειραματικά, ενώ στην περιοχή 1000-1800 cm^{-1} η προσομοίωση κατέληξε σε αξιόλογα συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά: φασματοσκοπία Raman, αντικαρκινικά φάρμακα, μέθοδος DFT

Abstract

The aim of the Thesis is the study of compounds with pharmaceutical interest using the Raman spectroscopy method. Anthracyclines rank among the most effective drugs ever developed to the treatment of various types of cancer. Doxorubicin and daunorubicin have been reported to be the most popular and essential for the treatment of breast cancer. At first, the Raman spectra of doxorubicin, poly(glycidyl methacrylate-co-methyl methacrylate-co-divinyl benzene-co-acrylic acid – P(GMA-co-MMA-co-DVB-co-AA) hollow nanospheres, loaded with drug polymeric nanocontainers were obtained. Furthermore, the spectra obtained from daunorubicin, poly(methacrylic acid – PMAA) and poly(N-isopropylacrilamide-co-methacrylic acid – P(NIPAAm-co-MAA) hollow nanospheres, and nanospheres encapsulated with the drug, were conducted, too. The peaks were fully characterized, a comparison between the theoretical and the measured spectra was made, their differences were highlighted and finally the encapsulation of drugs examined to each of the polymeric systems was confirmed. Also, in this thesis, a colloidal solution of silver nanoparticles and a silver-coated borosilicate glass were prepared. The solution of 4-aminothiophenol (4-ATP) was absorbed on their surfaces and the surface enhancement of Raman scattering (SERS) was observed. Secondly, the molecular geometry calculations and vibrational frequencies for the doxorubicin and daunorubicin molecule were performed by using Gaussian 09W V7 with standard B3LYP/6-311 basic set. The calculated Raman spectra were characterized and all kinds of principal vibrational modes were assigned. The theoretical and experimental results were compared, reporting the discrepancies that observed. Finally, the results indicated that the calculated spectra have no resemblance to the spectral range of 300-1000 cm^{-1} , while the simulation resulted in remarkable conclusions in the region of 1000-1800 cm^{-1} .

Key words: Raman spectroscopy, anticancer drugs, DFT method

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1^ο	1
1.1 Σκέδαση Raman	1
1.1.1 Εισαγωγή	1
1.1.2 Το φαινόμενο Raman.....	2
1.1.3 Ιστορική αναδρομή στην φασματοσκοπία Raman	5
1.1.3.1 Η κλασσική θεώρηση του φαινομένου Raman.....	5
1.1.3.2 Η κβαντομηχανική θεώρηση του φαινομένου Raman.....	7
1.1.3.3 Η προέλευση του φαινομένου Raman	9
1.1.4 Κανονικοί τρόποι δόνησης	12
1.2 Επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman.....	15
1.2.1 Εισαγωγή	15
1.2.2 Ορισμός του φαινομένου SERS.....	16
1.2.3 Μηχανισμοί του φαινομένου SERS.....	17
1.2.3.1 Ηλεκτροχημικός μηχανισμός ενίσχυσης.....	17
1.2.3.2 Χημικός μηχανισμός ενίσχυσης.....	21
1.3 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (Uv-Vis)	22
1.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης.....	25
Βιβλιογραφία 1 ^{ου} Κεφαλαίου.....	28
Κεφάλαιο 2^ο	30
2.1 Εισαγωγή	30
2.2 Η εξίσωση Schrödinger	32
2.3 Η προσέγγιση Born-Oppenheimer	33
2.4 Η θεωρία Hartee–Fock.....	34
2.5 Θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας	37
2.5.1 Συναρτήσεις Βάσης.....	38
2.5.2 Τροχιακά τύπου Slater και τύπου Gauss.....	39
2.5.3 Σύνολα «Διαχωρισμένης» Στιβάδας Σθένους.....	40
Βιβλιογραφία 2 ^{ου} Κεφαλαίου.....	42
Κεφάλαιο 3^ο	43
3.1 Εισαγωγή	43
3.2 Πολυμερικοί νανοφορείς φαρμάκων	44

3.3 Δοξορουβικίνη και δαουνορουβικίνη	49
Βιβλιογραφία 3 ^{ου} Κεφαλαίου.....	51
Κεφάλαιο 4^ο	53
4.1 Πειραματική Διαδικασία.....	53
4.1.1 Παρασκευή πολυμερικών νανοφορέων φαρμάκων	53
4.1.2 Παρασκευή ενεργών υποστρωμάτων για επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS)	54
4.1.2.1 Παρασκευή κολλοειδούς αργύρου.....	54
4.1.2.2 Παρασκευή λεπτού υμενίου αργύρου.....	54
4.2 Οργανολογία	55
4.2.1 Οργανολογία της φασματοσκοπίας Raman	55
4.2.2 Οργανολογία της φασματοσκοπίας Uv-Vis.....	57
4.3 Θεωρητικός υπολογισμός των φασμάτων Raman της δοξορουβικίνης και της δαουνορουβικίνης	58
Βιβλιογραφία 4 ^{ου} Κεφαλαίου.....	59
Κεφάλαιο 5^ο	60
5.1 Χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων	60
5.1.1.1 Δομικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη με φασματοσκοπία Raman.....	60
5.1.1.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	62
5.1.2.1 Δομικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη με φασματοσκοπία Raman	63
5.1.2.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	66
5.2 Χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων για επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS)	67
5.2.1 Χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων SERS με φασματοσκοπία απορρόφησης Uv-Vis	67
5.2.2 Δομικός χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων SERS με φασματοσκοπία Raman	68
5.2.3 Ενεργά υποστρώματα SERS και η συμβολή τους στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων	72
Βιβλιογραφία 5 ^{ου} Κεφαλαίου.....	74

Κεφάλαιο 6^ο	75
6.1 Θεωρητικός υπολογισμός φασμάτων Raman της δοξορουβικίνης	75
6.1.1 Σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων.....	86
6.2 Θεωρητικός υπολογισμός φασμάτων Raman της δαουνορουβικίνης	87
6.2.1 Σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων.....	97
Βιβλιογραφία 6 ^{ου} Κεφαλαίου.....	99
Κεφάλαιο 7^ο	100
7.1 Συμπεράσματα	100
7.2 Προτάσεις για περαιτέρω μελέτη.....	102

Κεφάλαιο 1^ο

1.1 Σκέδαση Raman

1.1.1 Εισαγωγή

Πριν από 80 χρόνια η φασματοσκοπία Raman έβρισκε εφαρμογή σε διάφορους κλάδους, όπως είναι η Φυσική της συμπκνωμένης ύλης, η οργανική και η ανόργανη Χημεία. Ένα πεδίο όμως στο οποίο τα τελευταία 10 χρόνια έχει βρει μεγάλη εφαρμογή είναι στην Ιατρική, και συγκεκριμένα στον έλεγχο των κυττάρων και των ιστών του ανθρώπου. Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές που στηρίζονται στην εκπομπή φωτονίων, όπως του φθορισμού (fluorescence), η φασματοσκοπία Raman παρουσιάζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

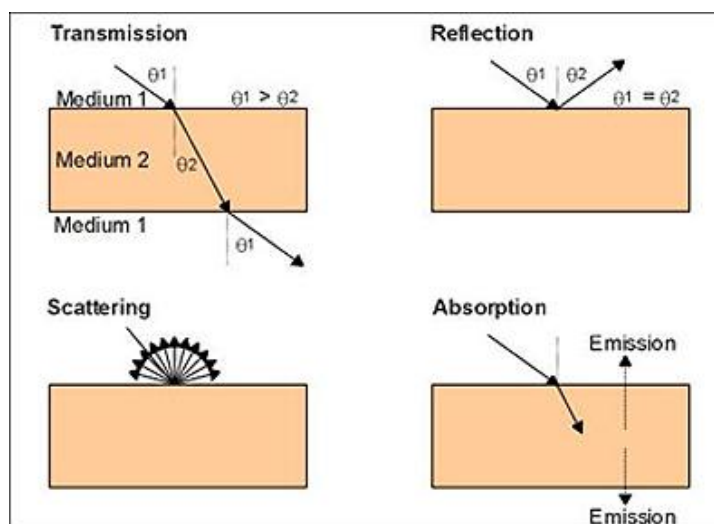
- Οι δονήσεις που προκαλούνται είναι μία εγγενής ιδιότητα που χαρακτηρίζει όλα τα μόρια, και έτσι τα αποτελέσματα που προκύπτουν δεν χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.
- Ο αριθμός των δονήσεων μπορεί να υπολογιστεί με βάση τον αριθμό των ατόμων N του μορίου, από τον τύπο $3N-6$.
- Στα φάσματα Raman, οι ζώνες που προκύπτουν είναι στενότερες, σε σχέση με αυτές που προκύπτουν από μετρήσεις στο IR. Οι ζώνες αυτές μπορούν να αναλυθούν περισσότερο και να δώσουν λεπτομερείς πληροφορίες αναφορικά με τη χημική σύνθεση και δομή των δειγμάτων.
- Δίνει τη δυνατότητα της άμεσης διάγνωσης των δειγμάτων *in vivo* και ταυτόχρονα συμβάλλει στη μείωση του αριθμού των βιοψιών.
- Είναι μη καταστρεπτική μέθοδος και λίγες ποσότητες απαιτούνται (της τάξης των μικρογραμμαρίων ή νανογραμμαρίων) για τη λήψη δείγματος [1.1,1.2,1.3].

Επιπλέον, συγκρίνοντας με τη μέθοδο IR, οι μοριακές δονήσεις μπορούν να προκύψουν με απορρόφηση ακτινοβολίας στο μέσο υπέρυθρο μήκος κύματος μεταξύ των 2,5 και 25 μm . Ωστόσο, οι προοπτικές της φασματοσκοπίας Raman είναι πολύ περισσότερες σε σχέση με αυτές της IR, λόγω της ευκολότερης προετοιμασίας του δείγματος. Το σημαντικότερο στοιχείο στη φασματοσκοπία Raman για τη μελέτη των κυττάρων και των ιστών έγκειται στο γεγονός ότι οι ασθένειες και άλλες παθολογικές ανωμαλίες προκαλούν χημικές και δομικές αλλαγές σε μοριακό επίπεδο. Οι αλλαγές αυτές έχουν την ιδιότητα να μεταβάλλουν το φάσμα, ώστε στη συνέχεια να δύναται να χρησιμοποιηθεί ως ένας ευαίσθητος φαινοτυπικός δείκτης (sensitive phenotypic marker) [1.1,1.4,1.5].

1.1.2 Το φαινόμενο Raman

Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη μπορεί να επάγει μια σειρά από φαινόμενα τα οποία είναι ικανά να δώσουν μια πληθώρα πληροφοριών σε σχέση με την δομή των μορίων που την αποτελούν.

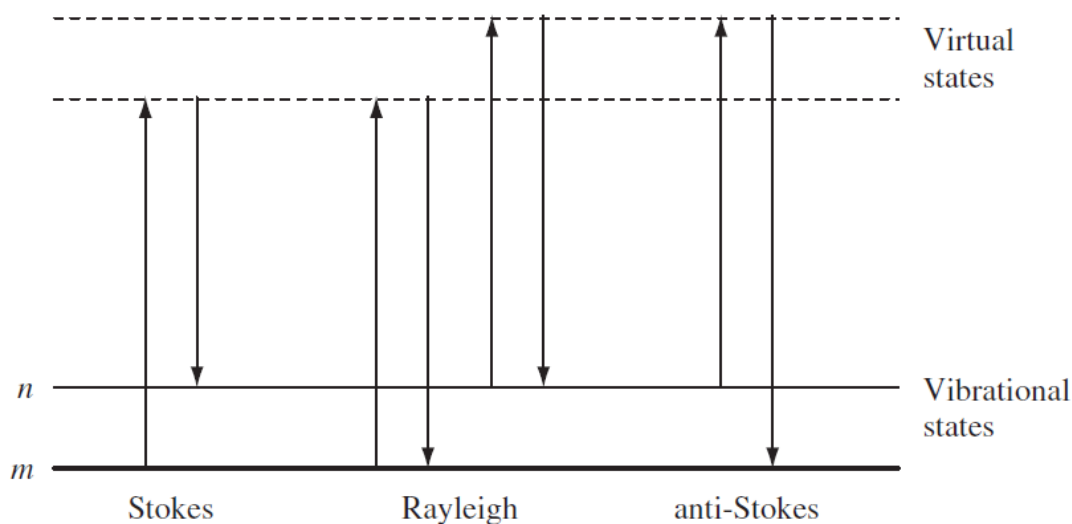
Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα στερεό μέσο παρατηρούνται οι εξής διαδικασίες: α) ένα ποσοστό της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ανακλάται (reflection) στην επιφάνειά του, β) ένα ποσοστό απορροφάται (absorption) στο εσωτερικό του και παράγει θερμότητα στο μέσο ή/και επανεκπέμπεται μέσω της φωτοφωταύγειας, γ) ένα ποσοστό θα διαπεράσει (transmission) το μέσο, ενώ δ) ένα ποσοστό της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα σκεδαστεί (scattering) προς όλες τις διευθύνσεις. Τα σκεδαζόμενα φωτόνια στην συντριπτική πλειοψηφία τους θα σκεδαστούν ελαστικά, δηλαδή με την ίδια συχνότητα με τα προσπίπτοντα φωτόνια (σκέδαση Rayleigh). Ένα πολύ μικρό ποσοστό (περίπου 1 στα 10^6 - 10^8) θα σκεδαστεί με διαφορετική συχνότητα από αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας οδηγώντας στη σκέδαση Raman [1.6].



Εικόνα 1.1 Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη

Στο επόμενο σχήμα παρουσιάζονται οι βασικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια που ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη, δηλαδή κατά τη δημιουργία μιας δόνησης στο μόριο. Σε συνήθη θερμοκρασία, τα περισσότερα μόρια, όχι όλα, βρίσκονται στο χαμηλότερο επίπεδο δονητικής ενέργειας. Καθώς οι δονητικές (virtual) ενεργειακές καταστάσεις δεν είναι πραγματικές, αλλά δημιουργούνται όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με τα ηλεκτρόνια και προκαλέσει πόλωση (polarization), η ενέργεια αυτών των καταστάσεων καθορίζεται από τη συχνότητα της φωτεινής πηγής που χρησιμοποιείται. Η σκέδαση Rayleigh είναι μια πιο έντονη διαδικασία, δεδομένου ότι τα περισσότερα φωτόνια σκεδάζονται με αυτόν τον τρόπο. Δεν συνεπάγεται μεταβολή της ενέργειας και κατά συνέπεια, η ακτινοβολία επιστρέφει στην ίδια ενεργειακή στάθμη. Όσον αφορά τη σκέδαση Raman, το μόριο από την θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση m (ground vibrational state) μεταπίπτει σε μια υψηλότερη διηγευμένη δονητική κατάσταση n ,

μηχανισμός που ονομάζεται σκέδαση Stokes. Ωστόσο, λόγω της θερμικής ενέργειας, υπάρχουν μόρια που μπορεί να βρίσκονται ήδη σε διηγευμένη κατάσταση, όπως η n. Η σκέδαση που πραγματοποιείται από αυτές τις ενεργειακές στάθμες προς τη θεμελιώδη κατάσταση m, λέγεται anti-Stokes και αφορά μεταφορά ενέργειας στα σκεδαζόμενα φωτόνια [1.7].

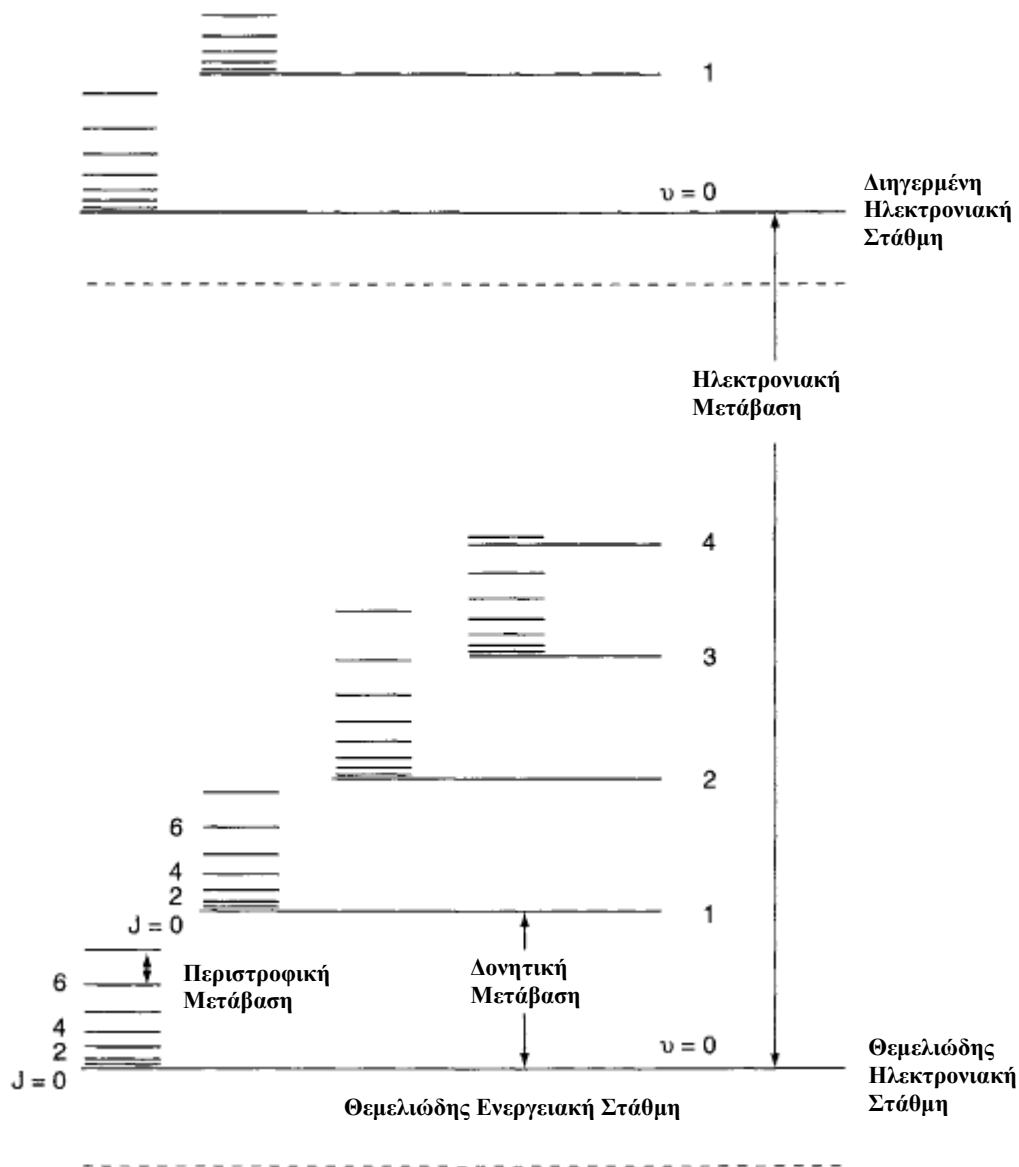


Εικόνα 1.2 Διαγραμματική περιγραφή των μηχανισμών σκέδασης Raman και Rayleigh [1.7]

Η ενεργειακή κατάσταση, E, ενός μορίου συνίσταται από το άθροισμα της περιστροφικής του ενέργειας E_r (περιστροφή αυτού γύρω από το κέντρο μάζας του), της δονητικής του E_v στις διάφορες μορφές δόνησης των ατόμων του (περιοδικές μετατοπίσεις των ατόμων του γύρω από τις θέσεις ισορροπίας) και της ηλεκτρονιακής, E_e από την κίνηση των ηλεκτρονίων στο μόριο:

$$E = E_r + E_v + E_e \quad (1.1)$$

Το διάγραμμα των ενεργειακών επιπέδων ενός μορίου θα είναι λοιπόν προσδιορισμένο με τη γνώση των κβαντικών αριθμών περιστροφής J, δόνησης v και ηλεκτρονιακής του κατάστασης n. Πηγή των φασματικών γραμμών στη μοριακή φασματοσκοπία είναι η εκπομπή, η απορρόφηση ή η σκέδαση ενός φωτονίου όταν μεταβάλλεται η ενέργεια του μορίου. Στην ενεργειακή αυτή μεταβολή εμπλέκονται μεταπτώσεις μεταξύ των διαφόρων περιστροφικών, δονητικών και ηλεκτρονιακών καταστάσεων των μορίων. Στο επόμενο σχήμα φαίνονται τα ενεργειακά επίπεδα ενός διατομικού μορίου καθώς και μερικές πιθανές ενεργειακές μεταβάσεις. Βέβαια, δεν είναι όλες οι μεταπτώσεις μεταξύ των διαφόρων ενεργειακών επιπέδων επιτρεπτές. Για να διαπιστωθεί αν μια μετάπτωση είναι επιτρεπτή ή όχι πρέπει να εξετασθούν οι κατά περίπτωση ισχύοντες ειδικοί κανόνες επιλογής.



Σχήμα 1.1 Ενεργειακά επίπεδα ενός διατομικού μορίου

Οι μεταπτώσεις μεταξύ των περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων λαμβάνουν χώρα σε μικρές συχνότητες μεταξύ 1 και 10^2 cm^{-1} . Αμιγή περιστροφικά φάσματα παρατηρούνται στην περιοχή των μικροκυμάτων και το άπω υπέρυθρο. Οι αντίστοιχες δονητικές μεταπτώσεις παρατηρούνται σε υψηλότερες συχνότητες μεταξύ 10^2 και 10^4 cm^{-1} , μιας και η ταχύτητα δόνησης των πυρήνων είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα περιστροφής του μορίου και ο διαχωρισμός των δονητικών επιπέδων είναι μεγαλύτερος. Αμιγή δονητικά φάσματα παρατηρούνται στο υπέρυθρο. Οι ηλεκτρονιακές τέλος μεταπτώσεις παρατηρούνται σε ακόμα υψηλότερες συχνότητες μεταξύ 10^4 και 10^5 cm^{-1} (η ταχύτητα των ηλεκτρονίων είναι ακόμα μεγαλύτερη της ταχύτητας δόνησης των πυρήνων). Αμιγή ηλεκτρονιακά φάσματα παρατηρούνται στο ορατό και το υπεριώδες.

Τα φάσματα ταλάντωσης ή δονητικά φάσματα συνήθως μετρώνται πειραματικά ως φάσματα υπέρυθρου και φάσματα Raman. Οι δύο αυτοί τύποι των

δονητικών φασμάτων έχουν διαφορετική φυσική προέλευση. Δηλαδή, ενώ τα φάσματα υπερύθρου προέρχονται από μεταπτώσεις μεταξύ δύο γειτονικών ενεργειακών σταθμών του μορίου λόγω απορρόφησης ή εκπομπής υπερύθρου ακτινοβολίας, τα φάσματα Raman οφείλονται στη σκέδαση της ακτινοβολίας (συνήθως ορατού, υπεριώδους ή εγγύς υπερύθρου) λόγω ηλεκτρονιακής πόλωσης του μορίου.

1.1.3 Ιστορική αναδρομή στην φασματοσκοπία Raman

Το φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης του φωτός είχε πρώτα αναφερθεί από τον Smekal το 1923 [1.8] και παρατηρήθηκε πειραματικά από τους Raman και Krishnan το 1928 [1.9]. Από τότε, το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως φασματοσκοπία Raman. Στο αρχικό πείραμα, η ηλιακή ακτινοβολία εστιάστηκε σε ένα δείγμα που ήταν καθαρό υγρό. Ένας δεύτερος φακός τοποθετήθηκε δίπλα από το υλικό για να συλλέγει τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία. Ένα σύστημα οπτικών φίλτρων χρησιμοποιήθηκε για να αποδείξει την ύπαρξη της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας διαφορετικής συχνότητας από αυτή του προσπίπτοντος φωτός, πράγμα που αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό της φασματοσκοπίας Raman. Ο Sir Chandrasekhra Venkata Raman, δηλαδή, χρησιμοποίησε το μάτι του σαν ανιχνευτή (detector), την ηλιακή ακτινοβολία σαν φωτεινή πηγή (source) και το τηλεσκόπιο ως δέκτη (receiver). Βραβεύτηκε το 1930 με το βραβείο Nobel και το όνομά του έχει συνδεθεί από τότε με το φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης των φωτονίων [1.10,1.11].

Σταδιακά, υπήρξαν βελτιώσεις στις διάφορες διατάξεις που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση και μελέτη του φαινομένου Raman. Τα πρώτα βήματα προς αυτή την κατεύθυνση αφορούσαν στην κατασκευή και εξέλιξη των διαθέσιμων πηγών ακτινοβολίας. Η αρχή πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή λαμπών διαφόρων στοιχείων (π.χ. ηλίου, βισμούθιου, μολύβδου, ψευδαργύρου κτλ.). Η ένταση, όμως, της ακτινοβολίας τους ήταν χαμηλή και γι' αυτό το λόγο η ανάπτυξη βελτιωμένων διατάξεων ήταν απαραίτητη. Η πραγματική επανάσταση για την χρήση της φασματοσκοπίας Raman ήρθε με την ανακάλυψη των ισχυρών πηγών ακτινοβολίας laser στις αρχές της δεκαετίας του '60. Οι κυριότερες πηγές laser που χρησιμοποιούνται είναι Ar^+ (351.1 – 514.5 nm), Kr^+ (337.4 – 676.4 nm) και πιο πρόσφατα Nd – YAG (1064 nm) [1.10].

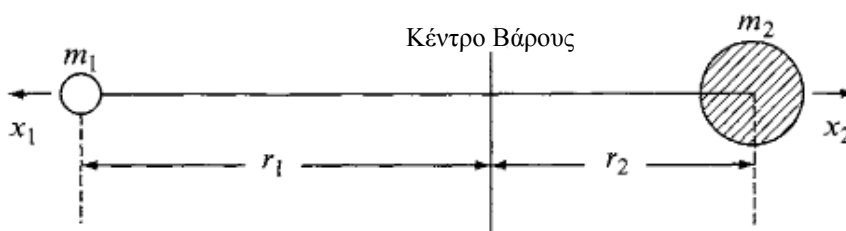
1.1.3.1 Η κλασική θεώρηση του φαινομένου Raman

Κάθε μόριο αποτελείται από άτομα, που καθένα χαρακτηρίζεται από διάφορες ηλεκτρονιακές καταστάσεις, δονητικές και περιστροφικές. Σε ένα διατομικό μόριο, για παράδειγμα, υπάρχουν ελκτικές και απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ελεύθερων ηλεκτρονίων και των πρωτονίων του πηρήνα που δημιουργούν την κατάσταση ισορροπίας. Η κατάσταση αυτή που χαρακτηρίζεται από την θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη, έχει ως συνέπεια τη σταθεροποίηση του μήκους δεσμού μεταξύ των δύο ατόμων.

Όταν το μόριο δονείται π.χ. από μια δόνηση έκτασης (stretching mode), λόγω επίδρασης μιας δέσμης laser, το μήκος δεσμού (interatomic distance) του θα μεταβάλλεται, όπως συμβαίνει κατά την αρμονική κίνηση που εκτελεί ένα ελατήριο. Ο χημικός δεσμός, δηλαδή, που συνδέει τα δύο άτομα θεωρείται ως ελατήριο που υπακούει στο νόμο του Hooke, όπου η δύναμη επαναφοράς εκφράζεται από την παρακάτω σχέση:

$$F = -K(x_1 + x_2) \quad (1.2)$$

όπου, K είναι η σταθερά της δύναμης επαναφοράς, r η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων και r_{eq} η απόσταση από τη θέση ισορροπίας.



Σχήμα 1.2 Αναπαράσταση ενός διατομικού μορίου

Στο παραπάνω σχήμα αναπαριστώνται οι μάζες m_1 και m_2 τριών δύο ατόμων και οι αποστάσεις r_1 και r_2 από το κέντρο βάρους. Κατά συνέπεια, η απόσταση ισορροπίας του συστήματος είναι η $r_1 + r_2$ και οι x_1 και x_2 είναι οι μετατοπίσεις των δύο ατόμων από τις θέσεις ισορροπίας τους αντίστοιχα.

Οι σχέσεις διατήρησης για το κέντρο βάρους του μορίου στην περίπτωση αυτή είναι:

$$m_1 r_1 = m_2 r_2 \quad (1.3)$$

$$m_1 (r_1 + x_1) = m_2 (r_2 + x_2) \quad (1.4)$$

Με συνδυασμό των δύο παραπάνω εξισώσεων λαμβάνονται οι εξής εκφράσεις για τα x_1 και x_2 :

$$x_1 = (m_1 / m_2) x_2 \quad (1.5)$$

$$x_2 = (m_1 / m_2) x_1 \quad (1.6)$$

Συνδυάζοντας τις παραπάνω σχέσεις, προκύπτουν οι εξισώσεις κίνησης για το μελετούμενο σύστημα, οι οποίες είναι:

$$m_1 d^2 x_1 / dt^2 = -K(m_1 + m_2 / m_2) x_1 \quad (1.7)$$

$$m_2 d^2 x_2 / dt^2 = -K(m_1 + m_2 / m_1) x_2 \quad (1.8)$$

Με πρόσθεση των παραπάνω δύο σχέσεων και την εισαγωγή της ανηγμένης μάζας μ και της μετατόπισης q , μπορεί να προκύψει η εξίσωση κίνησης στην τελική της μορφή:

$$m d^2 / dt^2 = -Kq \quad (1.9)$$

$$\text{όπου, } \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \text{ και } q = x_1 + x_2 \quad (1.10, 1.11)$$

Τέλος, η λύση της παραπάνω εξίσωσης είναι:

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1.12)$$

όπου, q_0 είναι το πλάτος της ταλάντωσης, ϕ η φάση και ν_0 η συχνότητα δόνησης που δίνεται από τη σχέση:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (1.13)$$

Ο υπολογισμός της ολικής ενέργειας ενός απλού αρμονικού ταλαντωτή χωρίς τριβές πραγματοποιείται εύκολα λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι όταν ένα σύστημα κινείται, τότε η ολική ενέργεια είναι το άθροισμα της κινητικής και της δυναμικής ενέργειας. Στην περίπτωση του υπό μελέτη συστήματος η δυναμική ενέργεια είναι:

$$V = \frac{1}{2} Kq^2 = 2\pi^2 \nu_0^2 \mu q_0^2 \sin^2(2\pi\nu_0 t + \phi) \quad (1.14)$$

Και η κινητική ενέργεια είναι του συστήματος είναι:

$$T = \frac{1}{2} \mu (dq / dt)^2 = 2\pi^2 \nu_0^2 \mu q_0^2 \cos^2(2\pi\nu_0 t + \phi) \quad (1.15)$$

Ενώ η ολική του ενέργεια δίνεται από τη σχέση:

$$E = T + V = 2\pi^2 \nu_0^2 \mu q_0^2 = \text{σταθερή} \quad (1.16)$$

Το ταλαντικό αυτό σύστημα στην κλασσική του θεώρηση καλείται *αρμονικός ταλαντωτής* [1.12, 1.13].

1.1.3.2 Η κβαντομηχανική θεώρηση του φαινομένου Raman

Στην περίπτωση του αρμονικού ταλαντωτή η κινητική ενέργεια είναι μηδενισμένη τη χρονική στιγμή της απομάκρυνσης, $r - r_{\text{eq}} = \Delta r$ και η συνολική ενέργεια είναι μόνο η δυναμική, που δίνεται από την εξίσωση που περιγράφηκε προηγουμένως. Αξίζει, όμως, να σημειωθεί ότι η ενέργεια αυτή είναι κβαντισμένη και για κάθε σύστημα μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση Schrödinger. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική θεώρηση του ταλαντούμενου συστήματος, η δόνηση ενός διατομικού συστήματος μπορεί να περιγραφεί ως η κίνηση ενός ατόμου μάζας μ και δυναμικής ενέργειας, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η εξίσωση Schrödinger για ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\frac{d^2\psi}{dq^2} + \frac{8\pi^2\mu}{h^2} \left(E - \frac{1}{2} Kq^2 \right) \psi = 0 \quad (1.17)$$

Οι ιδιοτιμές που προκύπτουν για την ενέργεια από την λύση της παραπάνω εξίσωσης είναι:

$$E = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (1.18)$$

όπου, $n=0,1,2, \dots$ είναι ο κβαντικός αριθμός (quantum number) και ν είναι η συχνότητα δόνησης $\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}}$. Για την θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, $n=0$, η ενέργεια του απλού αρμονικού ταλαντωτή ονομάζεται ενέργεια μηδενικού σημείου (zero-point energy).

Όπως φαίνεται παραπάνω, η συχνότητα δόνησης ενός διατομικού μορίου τόσο στην κλασική όσο και στην κβαντομηχανική θεώρηση είναι η ίδια. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θεωριών. Στην κλασική θεώρηση, η ολική ενέργεια E του συστήματος μηδενίζεται όταν μηδενίζεται η ποσότητα q . Στην κβαντομηχανική θεώρηση, η χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη αντιστοιχεί για $n=0$ και η ενέργεια είναι ίση με $1/2h\nu$, η οποία προκύπτει από την αρχή αβεβαιότητας του Heisenberg. Επίσης, στην πρώτη περίπτωση η ενέργεια του ταλαντωτή μπορεί να μεταβάλλεται συνεχόμενα, σε αντίθεση με την δεύτερη περίπτωση που η ενέργεια αλλάζει κατά συγκεκριμένα κβάντα $h\nu$.

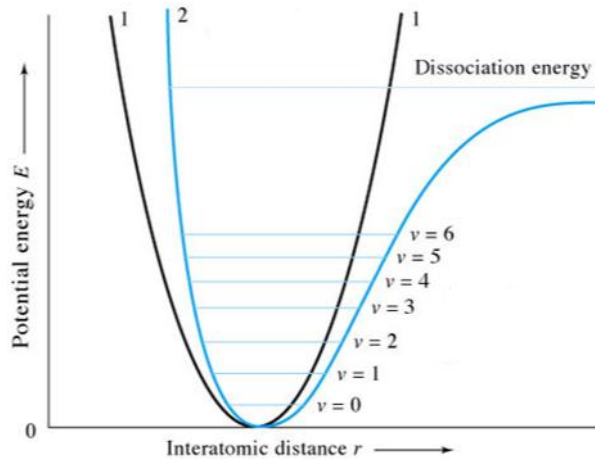
Στα πραγματικά, όμως, μόρια η δόνηση που προκαλείται δεν είναι αρμονική και το δυναμικό προσεγγίζεται από την εξίσωση Morse:

$$V = D_e \left(1 - e^{-\beta q} \right)^2 \quad (1.19)$$

όπου D_e είναι η ενέργεια διάστασης (dissociation energy), δηλαδή η ενέργεια που απαιτείται για τη διάσπαση του δεσμού και β είναι ένα μέτρο της καμπυλότητας. Αν η εξίσωση Schrödinger λυθεί με αυτό το δυναμικό τότε προκύπτει:

$$E_v = hc\bar{\nu}_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - hc\bar{\chi}_e \bar{\nu}_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 + \dots \quad (1.20)$$

όπου $\bar{\nu}_e$ είναι ο κυματαριθμός διορθωμένος για την μη αρμονική ταλάντωση και το γινόμενο $\bar{\chi}_e \bar{\nu}_e$ υποδεικνύει το πόσο απέχει το σύστημα από την αρμονικότητα. Η εξίσωση αυτή διαφέρει από την προηγούμενη του απλού αρμονικού ταλαντωτή, εξαιτίας της προσθήκης του δεύτερου παράγοντα και δείχνει ότι η διαφορά μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων μειώνεται σταθερά καθώς αυξάνεται ο n .



Εικόνα 1.3 Ενεργειακά διαγράμματα, (1) αρμονικού και (2) μη αρμονικού ταλαντωτή σε συνάρτηση με το μήκος δεσμού

Σύμφωνα με την κβαντομηχανική, μόνο εκείνες οι μεταβάσεις που αφορούν $\Delta n = \pm 1$ επιτρέπονται για έναν αρμονικό ταλαντωτή. Αν η δόνηση δεν είναι αρμονική αντιστοιχεί σε μεταβάσεις με $\Delta n = \pm 2, \pm 3$ (υπέρτονοι τρόποι δόνησης, overtones), είναι ασθενής και καθορίζεται από τους κανόνες επιλογής (selection rules). Μεταξύ των μεταβάσεων με $\Delta n = \pm 1$, αυτές που είναι από $n=0 \leftrightarrow 1$ (θεμελιώδεις, fundamental) εμφανίζονται πολύ έντονα στα φάσματα Raman. Αυτό προκύπτει από την κατανομή Maxwell-Boltzmann, κατά την οποία η αναλογία πληθυσμού των $n=1$ και $n=0$ καταστάσεων δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{P_{n=1}}{P_{n=0}} = e^{-\Delta E/kT} \quad (1.21)$$

Όπου ΔE είναι η ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων, k η σταθερά του Boltzmann και T η θερμοκρασία [1.12,1.13].

1.1.3.3 Η προέλευση του φαινομένου Raman

Στην φασματοσκοπία Raman το υπό εξέταση υλικό ακτινοβολείται από ισχυρές δέσμες laser στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού φάσματος και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία συλλέγεται για να καταγραφεί το φάσμα Raman. Όπως αναφέρθηκε, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία αποτελείται από δύο κύριους τύπους. Ο ένας είναι η σκέδαση Rayleigh, η οποία είναι ισχυρή και έχει την ίδια συχνότητα με αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο άλλος τύπος είναι η σκέδαση Raman, η οποία είναι πολύ ασθενής ($\sim 10^{-5}$ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) και έχει συχνότητες $\nu_0 \pm \nu_m$. Οι γραμμές που παρατηρούνται με συχνότητα $\nu_0 + \nu_m$ καλούνται anti-Stokes και με $\nu_0 - \nu_m$ Stokes.

Σύμφωνα με την κλασσική θεωρία, όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλής συχνότητας αλληλεπιδράσει με ένα μόριο, τότε τα ηλεκτρόνια του τείνουν να κινηθούν με την παλλόμενη ηλεκτρονική συνιστώσα E της ακτινοβολίας:

$$\mu = \alpha E \quad (1.22)$$

όπου, η σταθερά αναλογίας α είναι ο τανυστής της ηλεκτρονιακής πολωσιμότητας του μορίου.



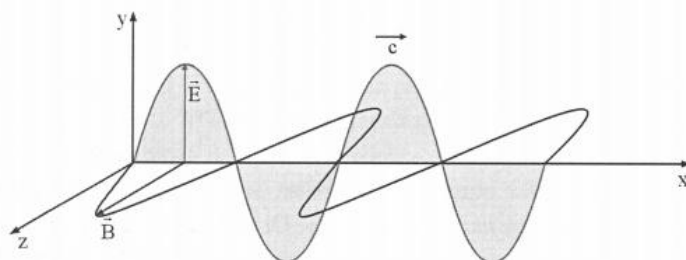
Εικόνα 1.4 Δημιουργία διπολικής ροπής από το ηλεκτρικό πεδίο του ηλεκτρομαγνητικού κύματος

Η διπολική ροπή είναι διάνυσμα με διεύθυνση πάνω στην ευθεία που ενώνει το κέντρο βάρους του θετικού φορτίου με το κέντρο βάρους του αρνητικού φορτίου ενός μορίου. Η πολωσιμότητα είναι τανυστής και επομένως η παραπάνω εξίσωση μπορεί να εκφραστεί και υπό την μορφή πινάκων ως εξής:

$$\begin{bmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (1.23)$$

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου E του ηλεκτρομαγνητικού κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (δέσμη laser) εξαρτάται από τον χρόνο και δίνεται από την εξίσωση:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1.24)$$



Εικόνα 1.5 Αναπαράσταση του κύματος μιας επίπεδα πολωμένης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

όπου E_0 είναι το πλάτος της έντασης και ν_0 η συχνότητα του laser. Έτσι, όταν ένα μόριο βρίσκεται μέσα σε ένα στατικό ηλεκτρικό πεδίο υφίσταται ένα είδος ελαστικής παραμόρφωσης του σχήματος της δομής του. Λόγω των δυνάμεων που αναπτύσσονται, τα θετικά φορτισμένα πρωτόνια του πυρήνα έχουν την τάση να έλκονται προς τον αρνητικό πόλο του πεδίου και τα ελεύθερα ηλεκτρόνια μετατοπίζονται προς τον αρνητικό. Η μετατόπιση των κέντρων των φορτίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας επαγωγικής διπολικής ροπής (induced electric dipole moment) και το μόριο λέγεται ότι είναι πολωμένο. Η τιμή του επαγόμενου διπόλου, P , εξαρτάται από το μέγεθος του εφαρμοζόμενου πεδίου και από την τάση που έχει το μόριο να μεταβάλλει το σχήμα του [1.14]. Η επαγόμενη διπολική ροπή παίρνει την ακόλουθη μορφή:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1.25)$$

όπου α είναι η πολωσιμότητα (polarizability) του μορίου που εκφράζει την ευκολία με την οποία πολώνεται το ηλεκτρονιακό νέφος υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Όταν το μόριο δονείται με τη συχνότητα δόνησης ν_m (vibration frequency) η μετατόπιση του πυρήνα (nuclear displacement) εκφράζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_m t \quad (1.26)$$

όπου q_0 είναι το πλάτος της μετατόπισης. Για μικρές μετατοπίσεις, η πολωσιμότητα είναι γραμμική εξίσωση της q , όπως περιγράφεται παρακάτω.

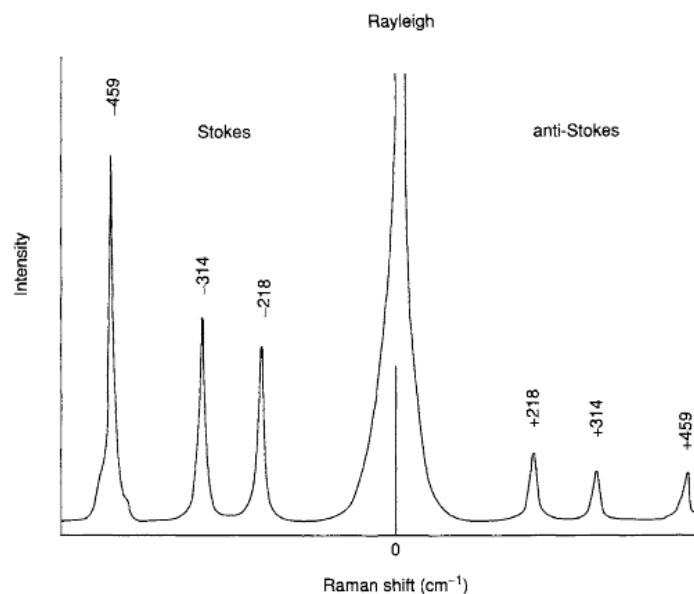
$$a = a_0 + \left(\frac{\partial a}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad (1.27)$$

όπου a_0 είναι η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας και $(\partial a / \partial q)_0$ είναι ο ρυθμός μεταβολής της πολωσιμότητας ως προς την μετατόπιση (q) στη θέση ισορροπίας των ατόμων που απαρτίζουν το μόριο. Έτσι, συνδυάζοντας τις τρεις τελευταίες εξισώσεις προκύπτει:

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\ P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial a}{\partial q} \right)_0 q E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \\ P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial a}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \cos 2\pi\nu_m t \\ P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial a}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 [\cos \{2\pi(\nu_0 + \nu_m)t\} + \cos \{2\pi(\nu_0 - \nu_m)t\}]. \end{aligned} \quad (1.28)$$

Σύμφωνα με την κλασσική θεωρία, ο πρώτος όρος αντιπροσωπεύει ένα ταλαντούμενο δίπολο που εκπέμπει ακτινοβολία συχνότητας ν_0 (σκέδαση Rayleigh), ενώ ο δεύτερος αντιστοιχεί στη σκέδαση Raman με δονήσεις συχνότητας $\nu_0 + \nu_m$ (anti-Stokes) και $\nu_0 - \nu_m$ (Stokes). Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι αν $(\partial a / \partial q)_0 = 0$ η δόνηση δεν είναι ενεργή, με αποτέλεσμα να μην εκπέμπεται ακτινοβολία Raman. Συνεπώς, για να προκύψει φάσμα Raman, θα πρέπει ο ρυθμός μεταβολής της πολωσιμότητας a κατά τη διάρκεια της δόνησης να μην είναι μηδέν [1.12, 1.13].

Κατά την διέγερση από τη βασική κατάσταση και την αποδιέγερση από μια δυνητική ενεργειακή κατάσταση, τα ηλεκτρόνια μπορεί να βρεθούν στην πρώτη δονητική στάθμη και να δώσουν τις γραμμές Stokes, ενώ αντίθετα ηλεκτρόνια που ήδη βρίσκονται σε διηγευμένη κατάσταση να επιστρέψουν στην θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση δίνοντας τις γραμμές anti-Stokes. Λόγω της κατανομής Maxwell-Boltzmann είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα να συμβεί η Stokes σκέδαση Raman, οι γραμμές αυτές είναι πιο ισχυρές στο φάσμα Raman. Ένα τυπικό φάσμα Raman για το μόριο του CCl_4 φαίνεται στην επόμενη εικόνα:



Εικόνα 1.6 Φάσμα Raman του CCl_4 με χρήση laser ακτινοβολίας 488 nm

Σύμφωνα με την κλασσική θεωρία, προκύπτει ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με την τέταρτη δύναμη της συχνότητας και του τετραγώνου της μέγιστης τιμής του ηλεκτρικού πεδίου E_0^2 . Η ένταση Rayleigh της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη του α_0^2 και η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman είναι ανάλογη του $(\partial\alpha/\partial Q)^2$. Το κύριο πρόβλημα της κλασσικής προσέγγισης της σκέδασης Raman είναι ότι προβλέπει λάθος τιμή για τον λόγο των εντάσεων των κορυφών anti-Stokes (AS) προς τις αντίστοιχες κορυφές Stokes (S). Η σωστή εκτίμηση του λόγου αυτού δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \frac{(\nu + \nu_m)^4}{(\nu - \nu_m)^4} e^{-\frac{h\nu_m}{kT}} \quad (1.29)$$

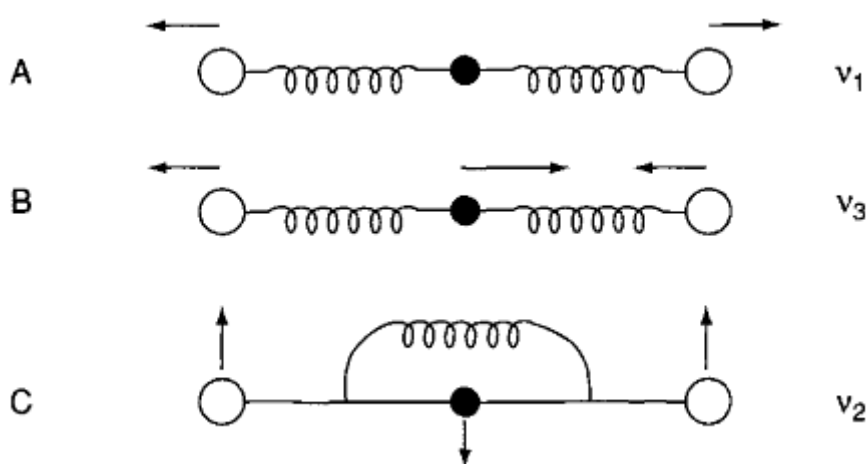
Στην κλασσική θεωρία ο εκθετικός όρος δεν υπάρχει. Ο εκθετικός όρος προκύπτει από την κβαντομηχανική θεωρία και συμφωνεί απόλυτα με τα πειραματικά αποτελέσματα.

1.1.4 Κανονικοί τρόποι δόνησης

Στην περίπτωση των διατομικών μορίων, η δόνηση εμφανίζεται μόνο κατά μήκος του χημικού δεσμού που συνδέει τους πυρήνες. Στα πολυατομικά μόρια, η κατάσταση περιπλέκεται γιατί όλοι οι πυρήνες των ατόμων των μορίων εκτελούν τη δική τους ταλάντωση. Ωστόσο, μπορεί να αποδειχθεί ότι οποιαδήποτε από αυτές τις «περίπλοκες» δονήσεις ενός μορίου μπορεί να εκφράζεται ως υπέρθεση ενός αριθμού των «κανονικών τρόπων δόνησης» (normal vibrational modes) που είναι εντελώς ανεξάρτητοι μεταξύ τους [1.12].

Για την καλύτερη κατανόηση των τρόπων δόνησης, ας θεωρηθεί το μηχανικό μοντέλο του μορίου του CO_2 . Τα άτομα του C και του O παριστάνονται με τρεις

μπάλες, βάρους ανάλογο με τα ατομικά βάρη τους και συνδέονται με ελατήρια κατάλληλης δύναμης. Έστω ότι στους δεσμούς C–O ασκείται τάση (stretch), τότε στη συνέχεια τα άτομα θα κινούνται μπροστά και πίσω στην διεύθυνση του δεσμού, όπως δείχνει το σχήμα 1.3. Αυτή είναι μία από τους κανονικούς τρόπους δόνησης και ονομάζεται συμμετρική (στο επίπεδο) δόνηση τάσης (symmetric in-phase stretching vibration). Η συχνότητα της δόνησης αυτής είναι $\nu_1=1340\text{ cm}^{-1}$. Στην περίπτωση B, ασκείται τάση μόνο στον ένα δεσμό C–O ενώ ο άλλος συρρικνώνεται. Ο τρόπος αυτός δόνησης καλείται αντισυμμετρική (εκτός επιπέδου) δόνηση τάσης (antisymmetric out-of-plane stretching vibration) και η συχνότητά της είναι $\nu_3=2350\text{ cm}^{-1}$. Και τέλος, υπάρχει και η περίπτωση C, στην οποία όλα τα άτομα κινούνται κάθετα, κανονική δόνηση που ονομάζεται συμμετρική δόνηση κάμψης (symmetric bending vibration) και εμφανίζεται σε συχνότητα $\nu_2=667\text{ cm}^{-1}$.

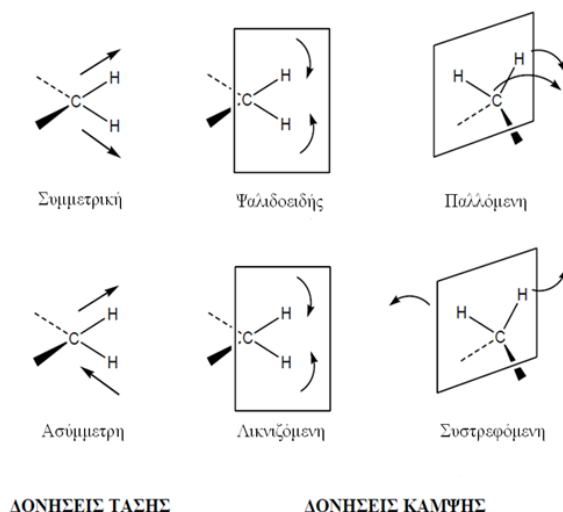


Σχήμα 1.3 Οι κανονικοί τρόποι δόνησης του μορίου CO₂

Στην γενική περίπτωση, η κίνηση των μορίων είναι αποτέλεσμα των χαρακτηριστικών δονήσεων, οι οποίες περιγράφονται από 3N-6 και 3N-5 εσωτερικούς βαθμούς ελευθερίας (β.ε., internal degrees of freedom) για μη γραμμικά και γραμμικά μόρια αντίστοιχα. Οι βαθμοί ελευθερίας ορίζουν N αριθμό ατόμων, καθένα από τα οποία έχει 3 βαθμούς ελευθερίας στις διευθύνσεις x,y και z, καταλήγοντας σε 3N β.ε.. Τρεις από αυτούς αντιστοιχούν στην μεταφορική κίνηση και άλλοι τρεις περιγράφουν την περιστροφική κίνηση. Επομένως, οι 3N-6 (μη γραμμικά μόρια) αφορούν τη μεταβολή του μήκους δεσμού ή τη γωνία μεταξύ των δεσμών. Ένα παράδειγμα αποτελεί το νερό H₂O, το οποίο έχει 3(3)-6=3 βαθμούς ελευθερίας. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα παραδείγματα γραμμικών μορίων (3N-5) είναι H₂, N₂ και O, τα οποία έχουν 3(2)-5=1 βαθμός ελευθερίας, που είναι μια δόνηση έκτασης (stretching vibration) [1.12,1.15].

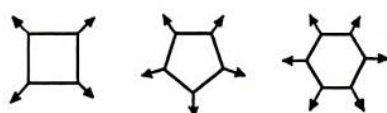
Οι δονήσεις χωρίζονται σε δονήσεις τάσης ή εκτατικές δονήσεις (ν) και δονήσεις κάμψης (δ). Η δόνηση έκτασης χαρακτηρίζεται από μια συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Η δόνηση κάμψης χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δυο δεσμών και μπορεί να είναι τεσσάρων ειδών: ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) και συστρεφόμενη (twisting) [1.16,1.17]. Η ψαλιδοειδής και η

λικνιζόμενη λέγονται εντός επιπέδου δονήσεις κάμψης (in-plane deformations), καθώς όπως φαίνεται και από το σχήμα, τα άτομα κινούνται στο ίδιο επίπεδο. Αντίθετα, η παλλόμενη και η συστρεφόμενη ονομάζονται εκτός επιπέδου δονήσεις κάμψης (out-of-plane deformations), διότι τα άτομα κινούνται σε διαφορετικό επίπεδο και μεταξύ τους (συστρεφόμενη) αλλά και σε σχέση με το κεντρικό άτομο (παλλόμενη). Για ένα μόριο το οποίο αποτελείται από περισσότερα από δύο άτομα, είναι πιθανά όλα τα παραπάνω είδη δονήσεων. Ακόμα μπορεί να υπάρχει αλληλεπίδραση ή σύζευξη των δονήσεων, όταν οι δονήσεις προέρχονται από άτομα με δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο.



Εικόνα 1.7 Τρόποι δόνησης των μορίων

Η συμμετρική έκταση των δεσμών σε κυκλικά συστήματα, όπως είναι το βενζόλιο και η πυριδίνη (pyridine), αναφέρονται ως έκταση του δακτυλίου (ring stretching) ή δόνηση «αναπνοής» του δακτυλίου (ring breathing mode) [1.18].



Εικόνα 1.8 Δόνηση έκτασης του δακτυλίου [1.18]

1.2 Επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman

1.2.1 Εισαγωγή

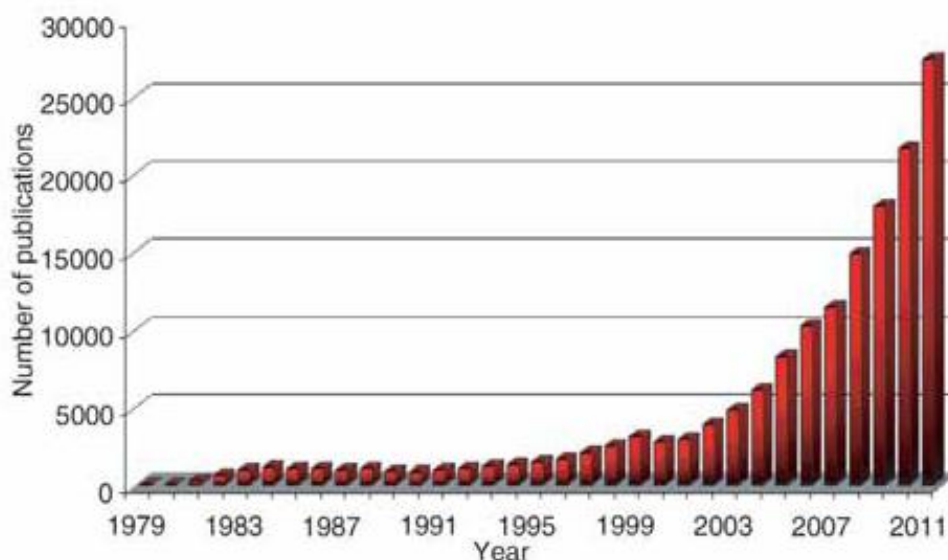
Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, αρκετές ερευνητικές ομάδες προσπαθούσαν να μελετήσουν πιθανούς τρόπους για την παρατήρηση μορίων από επιφάνειες μονομοριακών στρωμάτων. Ο στόχος αυτός είχε ήδη επιτευχθεί με τη χρήση άλλων οπτικών τεχνικών (όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου). Ωστόσο, οι επιστήμονες της εποχής αυτής υπέθεταν ότι η παρατήρηση της σκέδασης Raman μονομοριακών στρωμάτων πάνω σε επιφάνειες δεν θα ήταν μια εφικτή επιλογή, εξαιτίας του χαμηλού σήματος Raman και της περιορισμένης ευαισθησίας των φασματομέτρων Raman που χρησιμοποιούνταν.

Η ιστορία του φαινομένου της επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman (Surface-Enhanced Raman Scattering – SERS) ξεκίνησε από την μελέτη των Fleischmann et al, το 1974 [1.19], οι οποίοι παρατήρησαν ενίσχυση της σκέδασης Raman από μόρια πυριδίνης (pyridine) που ήταν προσροφημένα σε ηλεκτρόδια αργύρου ηλεκτροχημικώς εκτραχυμένα. Το κίνητρο για τη μελέτη αυτή ήταν η ανάπτυξη ειδικών φασματοσκοπικών ανιχνευτών, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη ηλεκτροχημικών διεργασιών *in situ*. Η προσέγγιση του Fleischmann είχε ως σκοπό την αύξηση της τραχύτητας του ηλεκτροδίου, δηλαδή της επιφάνειας επαφής, η οποία θα οδηγούσε στην αύξηση των προσροφημένων μορίων προς μελέτη [1.20].

Ωστόσο, υπήρχαν πολλά αναπάντητα ερωτήματα που δεν μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή την απλή υπόθεση [1.21]. Ανάμεσά τους, υπήρχαν παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες το σήμα δεν ενισχυόταν υπό αυξηση της τραχύτητας κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Δύο ανεξάρτητες μελέτες των Jeanmaire & Van Duyne [1.22] και Albrecht & Creighton [1.23], υποστήριξαν ότι η παρατηρούμενη ενίσχυση του σήματος δεν θα μπορούσε να ερμηνευθεί από την αύξηση της ενεργούς επιφάνειας. Οι μελέτες αυτές, λοιπόν, πρότειναν πως ένας διαφορετικός παράγοντας ενίσχυσης θα πρέπει να έχει επιδράσει για την εμφάνιση του φαινομένου αυτού. Οι Jeanmaire και Van Duyne πρότειναν διστακτικά ότι ο μηχανισμός ενίσχυσης οφείλεται στο ηλεκτρικό πεδίο, ενώ οι Albrecht & Creighton υποστήριξαν πως η ενίσχυση της σκέδασης Raman προέρχεται από την αλληλεπίδραση του μορίου με την μεταλλική επιφάνεια. Όπως αποδείχθηκε αργότερα, και οι δύο πλευρές είχαν δίκιο στην ιδέα, αλλά όχι όμως στη λεπτομέρεια. Μέχρι το 1985, οι πειραματικές μελέτες είχαν συγκλίνει όσον αφορά τα σημαντικά χαρακτηριστικά του μηχανισμού ενίσχυσης [1.20].

Την τελευταία δεκαετία, το επιστημονικό ενδιαφέρον για το SERS έχει αυξηθεί καθώς πολλά γεγονότα έχουν συντελέσει προς αυτή την κατεύθυνση. Κατ' αρχάς, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές βελτιώσεις όσον αφορά στην οργανολογία Raman, καθώς επίσης αποτελεί πλέον μια φασματική μέθοδο εύκολα διαθέσιμη σε μια ευρύτερη κοινότητα επιστημόνων που προέρχονται από διάφορους τομείς, όπως Φυσική, Χημεία, Βιολογία και Μηχανική. Επίσης, η εντυπωσιακή ανάπτυξη της νανο-επιστήμης και νανο-τεχνολογίας έχει επηρεάσει σημαντικά όσον αφορά τον σχεδιασμό και την κατασκευή των υποστρωμάτων SERS. Τέλος, η αυξανόμενη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τα πλασμόνια και τις ιδιότητές τους, είναι άρικτα συνδεδεμένη με πολλές βασικές και εφαρμοσμένες πτυχές του φαινομένου SERS. Συνεπώς, το SERS ολοένα επεκτείνεται σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Παρά το γεγονός ότι σημαντική μελέτη πραγματοποιείται ακόμα όσον αφορά τη

θεμελιώδη κατανόηση του φαινομένου, όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις έχουν σχέση με τις εφαρμογές του, είτε ως ερευνητικό εργαλείο είτε ακόμα και για την εμπορευματοποίησή του [1.21].



Εικόνα 1.9 Δημοσιεύσεις από το Web of Science σχετικά με τον όρο "surface enhanced Raman" σε συνάρτηση του έτους δημοσίευσης [1.24]

1.2.2 Ορισμός του φαινομένου SERS

Ουσιαστικά, το φαινόμενο SERS αναφέρεται στην ενίσχυση της έντασης Raman (σχεδόν αποκλειστικά από μόρια) κατά αρκετές τάξεις μεγέθους. Η ενίσχυση του σήματος προέρχεται κυρίως από την ηλεκτρομαγνητική αλληλεπίδραση του φωτός με το μέταλλο, η οποία παράγει μεγάλες ενισχύσεις του ηλεκτρικού πεδίου μέσω διεγέρσεων που είναι γνωστές με τον όρο συντονισμός πλασμονίων (plasmon resonance). Η ονομασία του φαινομένου SERS συνοψίζεται παρακάτω:

- **Surface (S):** το φαινόμενο SERS αποτελεί μία επιφανειακή φασματοσκοπική μέθοδο (surface spectroscopy technique), στην οποία τα μόρια θα πρέπει να είναι πάνω (ή κοντά) στην επιφάνεια. Αυτό είναι ένα σημαντικό στοιχείο για τις εφαρμογές του SERS. Θα πρέπει τα μόρια που πρόκειται να ανιχνευθούν να συνδέονται στη επιφάνεια του μετάλλου. Η μεταφορά των μορίων από έναν συγκεκριμένο όγκο σε μία επιφάνεια είναι μείζον θέμα και πρόβλημα στις πρακτικές εφαρμογές του SERS.
- **Enhanced (E):** το ενισχυμένο σήμα προέρχεται από τον συντονισμό των πλασμονίων της μεταλλικής επιφάνειας. Ο όρος «συντονισμός πλασμονίων» προέρχεται στην πραγματικότητα από μια οικογένεια φαινομένων που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα μέταλλα. Περαιτέρω ανάλυση του όρου αυτού θα πραγματοποιηθεί στη συνέχεια. Επίσης, τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται στο SERS είναι νανοδομημένα, δηλαδή περιλαμβάνουν μια σειρά διαφορετικών υποστρωμάτων, από

μεταλλικά κolloειδή (metallic colloids) σε διάλυμα μέχρι υποστρώματα κατασκευασμένα με νανολιθογραφία (nanolithography) ή αυτο-οργάνωση (self-organization).

- Raman (R): Η τεχνική συνίσταται στην μέτρηση φασμάτων Raman. Όπως έχει αναφερθεί, η φασματοσκοπία Raman είναι η μελέτη της ανελαστικής σκέδασης του φωτός και παρέχει μια εικόνα για τη χημική δομή του μορίου.
- Scattering ή Spectroscopy (S): Το τελευταίο γράμμα προέρχεται από τη λέξη Scattering ή Spectroscopy, ανάλογα με το αν θέλει κάποιος να δώσει έμφαση στο οπτικό φαινόμενο (scattering) ή στη μέθοδο και τις εφαρμογές της (spectroscopy) [1.21].

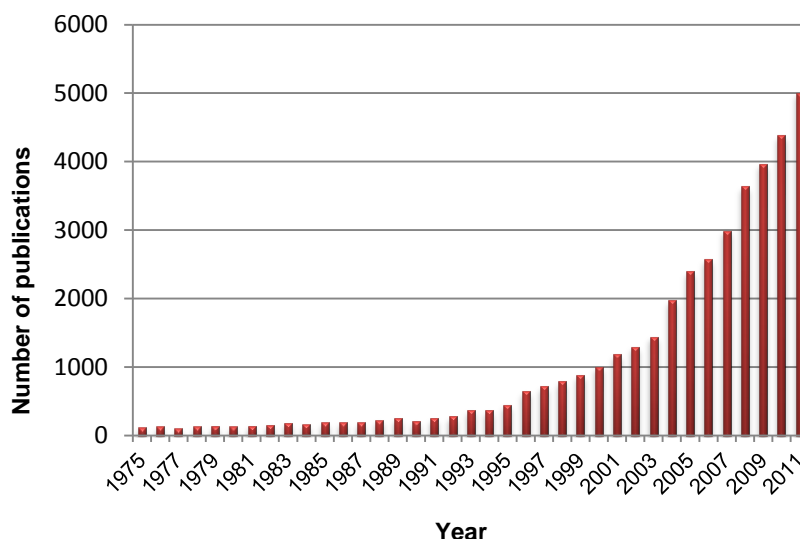
1.2.3 Μηχανισμοί του φαινομένου SERS

Πολλοί μηχανισμοί για την εξήγηση του φαινομένου SERS έχουν προταθεί κατά καιρούς. Ένας μεγάλος αριθμός από αυτούς αποδείχθηκε λανθασμένος και από αυτούς που αποδείχθηκαν ορθοί, γρήγορα ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες μηχανισμών, ο πρώτος ονομάζεται ηλεκτροχημικός και ο δεύτερος χημικός μηχανισμός. Όπως υποδηλώνουν οι ονομασίες τους, ο πρώτος μηχανισμός επικεντρώνεται στην ενίσχυση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου από τις μεταλλικές επιφάνειες κατάλληλης μορφολογίας και ο δεύτερος αναφέρεται σε αλλαγές της ηλεκτρονιακής δομής των μορίων που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία της προσρόφησης και οδηγούν σε ενίσχυση της σκέδασης Raman.

1.2.3.1 Ηλεκτροχημικός μηχανισμός ενίσχυσης

Τα μέταλλα, όπως είναι ο χρυσός (Au), ο άργυρος (Ag) και το αλουμίνιο (Al), είναι γνωστά για τις διαφορετικές οπτικές τους ιδιότητες σε σχέση με τα υπόλοιπα διηλεκτρικά υλικά. Τα μέταλλα αυτά, για παράδειγμα, έχουν μεγάλη ανακλαστική ικανότητα στην περιοχή του ορατού, καθιστώντας τα κατάλληλα υλικά για διάφορους τύπους καθρεπτών. Αυτές οι οπτικές ιδιότητες και σε συνδυασμό με πολλές φυσικές ιδιότητες, όπως είναι η θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, έχουν την ίδια φυσική προέλευση, δηλαδή την παρουσία των ελεύθερων ηλεκτρονίων [1.21].

Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια κινούνται σε έναν ευρύτερο χώρο, στον οποίο βρίσκονται και τα θετικά φορτία που έχουν καταλάβει συγκεκριμένες θέσεις, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται συνολικό μηδενικό φορτίο. Αυτός ο χώρος ονομάζεται πλάσμα (plasma), αλλά μπορεί να αναφερθεί και ως πλάσμα ελεύθερων ηλεκτρονίων (free-electron plasma) ή πλάσμα στερεάς κατάστασης (solid-state plasma) [1.25]. Αν η διέγερση περιορίζεται στην επιφάνεια, τότε τα πλασμόνια ονομάζονται πλασμόνια επιφανείας (surface plasmon). Τα επιφανειακά πλασμόνια μπορούν να είναι είτε πολλαπλασιαστικά (propagating) επί της επιφανείας ενός πλέγματος είτε εντοπισμένα (localized) στην επιφάνεια ενός σφαιρικού σωματιδίου. Η οπτική απόκριση του πλάσματος των ελεύθερων ηλεκτρονίων διέπει όλες τις οπτικές ιδιότητες των μετάλλων, τουλάχιστον όσον αφορά την ορατή περιοχή του οπτικού φάσματος, στην οποία εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ενέργειες απορρόφησης των μετάλλων.



Εικόνα 1.10 Αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν τα πλάσμονια

Η μελέτη της οπτικής απόκρισης του πλάσματος των ελεύθερων ηλεκτρονίων καθορίζεται από τις καταστατικές εξισώσεις και προσδιορίζουν το φορτίο στο πλάσμα υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Η κατάστρωση όμως των καταστατικών εξισώσεων εμπεριέχει πολλές παραμέτρους και καθιστά δύσκολη την κατανόηση των ιδιοτήτων των μετάλλων. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιείται ένα απλουστευμένο μοντέλο, το μοντέλο Drude.

Το μοντέλο του Drude περιγράφει την οπτική απόκριση ενός ηλεκτρονίου ενός ατόμου ή μορίου, που είναι συνδεδεμένο με μια δύναμη επαναφοράς με συχνότητα συντονισμού ω_0 . Στα ελεύθερα ηλεκτρόνια των μετάλλων δεν επενεργεί η δύναμη επαναφοράς, επομένως μπορεί να θεωρηθεί $\omega_0 \approx 0$. Επιπλέον, επειδή τα ελεύθερα ηλεκτρόνια είναι κατανεμημένα ομοιόμορφα και τυχαία μέσα στο μέταλλο, θεωρείται ότι η συνεισφορά τους στην οπτική επιδεκτικότητα είναι το άθροισμα των πολωσιμοτήτων του καθενός από αυτά. Έτσι, η διηλεκτρική σταθερά ενός μετάλλου που προκύπτει σύμφωνα με το μοντέλο Drude δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{ne^2}{m\varepsilon_0} \frac{1}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \quad (1.30)$$

όπου n είναι ο αριθμός των ελεύθερων ηλεκτρονίων ανά μονάδα όγκου και m είναι η μάζα τους. Ο παράγοντας απόσβεσης, γ_0 , εκφράζει τις συγκρούσεις των ελεύθερων ηλεκτρονίων με τον κρύσταλλο ή τις προσμίξεις. Η παρουσία και η επίδραση των θετικών ιόντων αγνοείται. Σε μια πρώτη προσέγγιση (που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι και σωστή), αυτό συντελεί στην ύπαρξη ενός σταθερού υποβάθρου με διηλεκτρική συνάρτηση $\varepsilon_\infty \geq 1$. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται η οπτική απόκριση του κρυστάλλου και η δυναμική των ελεύθερων ηλεκτρονίων. Αν η παραπάνω προσέγγιση ενσωματωθεί στο μοντέλο του Drude προκύπτει η πλήρης έκφραση για τον υπολογισμό του $\varepsilon(\omega)$:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \right) \quad (1.31)$$

όπου ω_p είναι:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\varepsilon_0\varepsilon_{\infty}}} \quad (1.32)$$

Όταν δεν υπάρχει κάποια εξωτερική διαταραχή, η πυκνότητα φορτίου του πλάσματος είναι ομοιογενής και μηδενική. Μπορεί να αποδειχθεί ότι το ω_p είναι η συχνότητα ταλάντωσης του πλάσματος (plasma frequency) των ελεύθερων ηλεκτρονίων. Χωρίζοντας το πραγματικό και το φανταστικό μέρος της προηγούμενης έκφρασης έχουμε:

$$\text{Re}(\varepsilon(\omega)) = \varepsilon_{\infty} \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma_0^2} \right) \quad (1.33)$$

και

$$\text{Im}(\varepsilon(\omega)) = \frac{\varepsilon_{\infty}\omega_p^2\gamma_0}{\omega(\omega^2 + \gamma_0^2)} \quad (1.34)$$

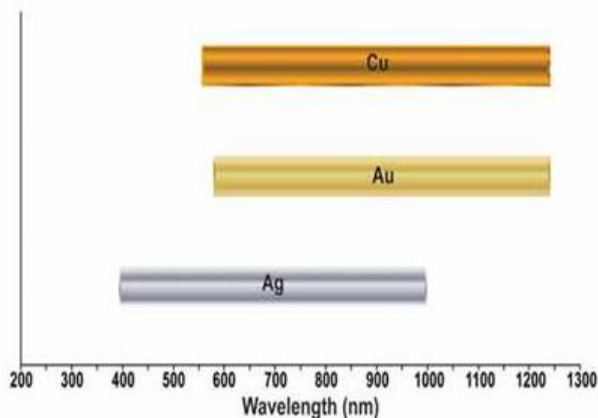
όπου το πραγματικό μέρος εκφράζει τη σκέδαση Rayleigh, ενώ το φανταστικό την απορρόφηση. Έχοντας ως δεδομένο ότι η απόσβεση γ_0 είναι μικρό μέγεθος σε σχέση με το ω για ένα πλάσμα ηλεκτρονίων που περιγράφεται από το μοντέλο του Drude, η συχνότητα του πλάσματος μπορεί να υπολογιστεί από την συνθήκη $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) \approx 0$. Παρατηρείται επιπλέον ότι στην περιοχή όπου $\omega < \omega_p$ (μήκος κύματος μεγαλύτερο από το $\lambda_p = 2\pi c/\omega_p$) έχουμε $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) < 0$. Επιπλέον, εάν το ω δεν είναι πολύ μικρό, η απορρόφηση που εκφράζεται από το $\text{Im}(\varepsilon(\omega))$ θα είναι και αυτή μικρή στην περιοχή αυτή. Είναι αυτές οι δύο συνθήκες, [$\text{Re}(\varepsilon(\omega)) < 0$ και μικρό $\text{Im}(\varepsilon(\omega))$], που πρέπει να ικανοποιούνται για να παρατηρηθεί απορρόφηση πλασμονίων (plasmon resonance). Η παραπάνω περιγραφή, παρότι χρησιμοποιήθηκαν πολλές παραδοχές, είναι αρκετά επιτυχής στην εξήγηση των οπτικών ιδιοτήτων πολλών μετάλλων [1.21].

Το αρνητικό πραγματικό μέρος στην περιοχή του ορατού φάσματος και συγκεκριμένα $-20 \leq \text{Re}(\varepsilon(\omega)) \leq -1$, αποτελεί την προέλευση για πολλές οπτικές ιδιότητες των μετάλλων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που σχετίζονται με την έννοια του πλάσματος. Για την περαιτέρω κατανόηση του φαινομένου, θεωρείται μια μικρή μεταλλική σφαίρα, η οποία αλληλεπιδρά με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η πιο απλή αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είναι η μελέτη μιας σφαίρας πολύ μικρότερης από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι, το πρόβλημα ισοδυναμεί με την ηλεκτροστατική προσέγγιση μιας σφαίρας, σε ένα μέσο σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς ε_M και σε ένα ομοιόμορφο ηλεκτρικό πεδίο. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται μέσα στη σφαίρα μπορεί να θεωρηθεί σταθερή και ανάλογη με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας E_0 [1.26]:

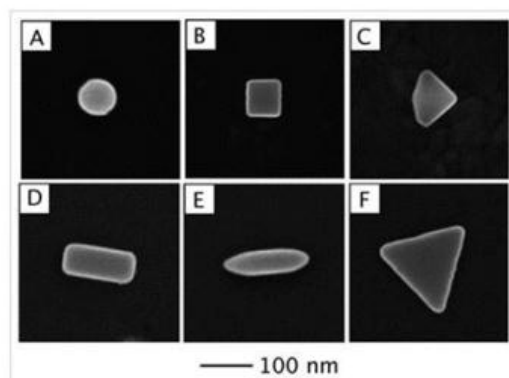
$$E_m = \frac{3\varepsilon_M}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_M} E_0 \quad (1.35)$$

Το σημαντικό μέρος αυτής της σχέσης είναι ο παρονομαστής. Αν ο παρονομαστής τείνει το μηδέν ($\varepsilon(\omega) \approx -2\varepsilon_M$), τότε το ηλεκτρικό πεδίο στο εσωτερικό της σφαίρας θα έτεινε στο άπειρο. Αυτό θεωρείται αδύνατο για τα συνήθη διηλεκτρικά υλικά, καθώς το ε λαμβάνει τιμές από το 1 έως το 10. Ωστόσο, όσον αφορά τα μέταλλα, η παραπάνω συνθήκη μπορεί να ικανοποιηθεί αν η απορρόφηση είναι μικρή ($\text{Im}(\varepsilon(\omega)) \approx 0$) στο μήκος κύματος για το οποίο ισχύει $\text{Re}(\varepsilon(\omega)) \approx -2\varepsilon_M$. Στην περίπτωση αυτή, συμβαίνει το φαινόμενο του συντονισμού (resonance), στο οποίο σημαντικό ρόλο παίζει η γεωμετρία των μεταλλικών δομών.

Όπως έχει αναφερθεί, η εμφάνιση του φαινομένου SERS εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των μορίων και της επιφάνειας των νανο-δομημένων μετάλλων. Τα τυπικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι από χρυσό, άργυρο και χαλκό. Στην πραγματικότητα, ο χρυσός και ο άργυρος είναι τα συνήθη μέταλλα, καθώς δεν αντιδρούν με τον ατμοσφαιρικό αέρα, ενώ ο χαλκός αντιδρά πολύ εύκολα. Και τα τρία μέταλλα διαθέτουν πλασμόνια, τα οποία καλύπτουν το ορατό και το εγγύς υπέρυθρο φάσμα, περιοχές που οι περισσότερες μετρήσεις Raman πραγματοποιούνται. Τα τελευταία 30 χρόνια, οι ερευνητές προσπαθούν να βελτιώσουν την κατασκευή των υποστρωμάτων και να τα διαμορφώσουν με τρόπο τέτοιο ώστε να μεγιστοποιούνται οι παράγοντες ενίσχυσης (enhancement factors). Πρόσφατες προσπάθειες έχουν γίνει για την κατασκευή καινούριων πλασματικών υλικών, διαφορετικών σχημάτων που να μπορούν να ενισχύσουν την σκέδαση Raman [1.27-1.29].



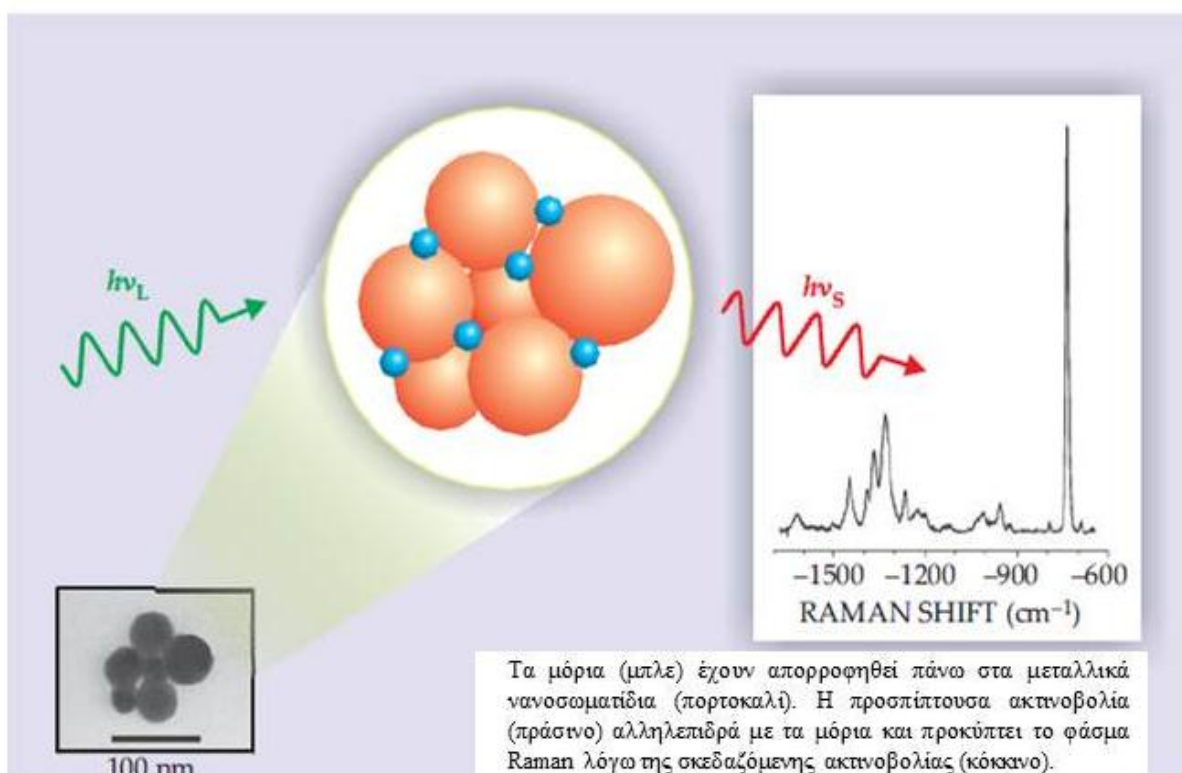
Εικόνα 1.11 Τα μήκη κύματος στα οποία ο άργυρος, ο χρυσός και ο χαλκός μπορούν να δημιουργήσουν SERS



Εικόνα 1.12 Εικόνες SEM διάφορων σχημάτων νανοσωματιδίων αργύρου [1.30]

Το μέγεθος των νανοδομών που χρησιμοποιούνται για να πραγματοποιηθεί το φαινόμενο SERS θα πρέπει να είναι αρκετά πιο μικρό από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή το μέγεθος θα πρέπει να κυμαίνεται από 5–100nm. Ωστόσο, οι διαστάσεις αυτές δεν μπορεί να είναι μικρότερες από ένα κατώτερο όριο, το οποίο συνηθίζεται να είναι το μέσο μέγεθος του μορίου που μελετάται, ενώ το μέγιστο καθορίζεται από το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Στην περίπτωση που οι νανοδομές είναι μεγαλύτερες από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας δε δημιουργούνται

δίπολα πλασμονίων, που είναι υπεύθυνα για το επαγόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, αλλά πολύπολα τα οποία δεν επάγουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Στην αντίθετη περίπτωση που οι νανοδομές είναι πολύ μικρές, η αγωγιμότητα των μετάλλων μειώνεται λόγω ηλεκτρονιακής σκέδασης στην επιφάνεια των νανοδομών, με συνέπεια την αισθητή ελάττωση της έντασης του επανεκπεμπόμενου πεδίου [1.21,1.31]. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι για την εμφάνιση της σκέδασης Raman, τα πλασμόνια των μετάλλων θα πρέπει να είναι κάθετα στην επιφάνεια, καθώς αν βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο δεν συμβαίνει το φαινόμενο. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο τα υποστρώματα (substrates) παρουσιάζουν τραχύτητα και στην περίπτωση των νανοσωματιδίων, αυτά θα πρέπει να διευθετούνται στο χώρο, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εμφάνιση του SERS στην εκάστοτε πειραματική διαδικασία [1.32].



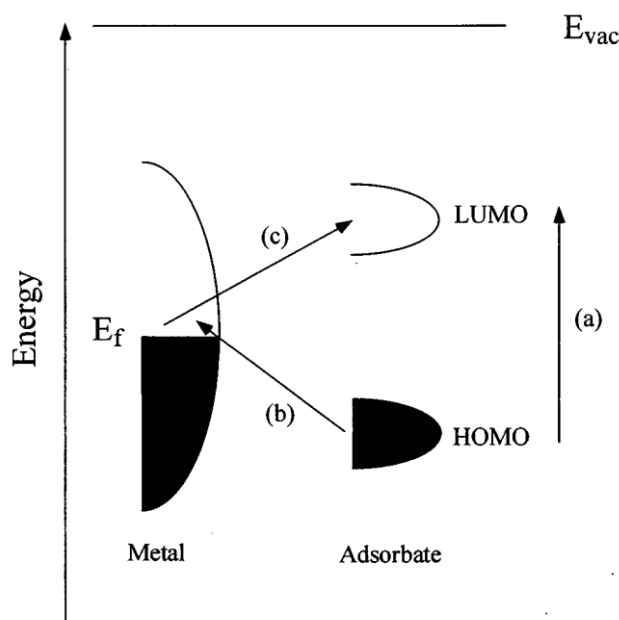
Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου SERS. Το φάσμα Raman προκύπτει από 10^{-9} mol/L αδενίνης πάνω σε νανοσωματίδια αργύρου [1.33]

1.2.3.2 Χημικός μηχανισμός ενίσχυσης

Ενώ η θεωρία της ηλεκτρομαγνητικής ενίσχυσης μπορεί να εφαρμοστεί ανεξάρτητα από το μόριο το οποίο μελετάται, δεν εξηγεί πλήρως το μέγεθος της ενίσχυσης που παρατηρείται σε ορισμένα συστήματα. Πολλά μόρια που έχουν μονήρη ηλεκτρόνια και μπορούν να συνδεθούν με την επιφάνεια, εμφανίζουν μια διαφορετική κατηγορία μηχανισμού ενίσχυσης, η οποία δεν περιλαμβάνει τα πλασμόνια επιφάνειας. Αυτός, λοιπόν, ο χημικός μηχανισμός αφορά την μεταφορά φορτίου μεταξύ της χημικά απορροφημένης

ουσίας και της μεταλλικής επιφάνειας. Ο χημικός μηχανισμός εμφανίζεται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις και σε συνδυασμό με τον ηλεκτροχημικό μηχανισμό ενίσχυσης [1.34,1.35].

Για πολλά μόρια, η μετάβαση από το υψηλότερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Highest Occupied Molecular Orbital) HOMO στο χαμηλότερο μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) LUMO απαιτεί πολύ περισσότερη ενέργεια από την ενέργεια της ακτινοβολίας που εκπέμπει στο ορατό ή στο υπέρυθρο και η οποία χρησιμοποιείται στις μετρήσεις Raman. Δεν είναι ασυνήθιστο το HOMO και το LUMO τροχιακό να βρίσκονται συμμετρικά πάνω και κάτω από τη στάθμη Fermi του μετάλλου. Σε αυτή τη περίπτωση, μπορεί να συμβεί μεταφορά φορτίου είτε από το μέταλλο στο μόριο είτε αντιστρόφως με τη μισή ενέργεια από αυτή που θα χρειαζόταν για να γίνει αυτή η μετάβαση απουσία μετάλλου-η μεταλλική επιφάνεια δρα ως μέσω μεταφοράς φορτίου. Έτσι, μια μετάβαση που κανονικά θα πραγματοποιούταν στην υπεριώδη περιοχή, τώρα θα πραγματοποιηθεί στο ορατό.



Εικόνα 1.14 Τυπικό ενεργειακό διάγραμμα ενός μορίου, το οποίο έχει προσροφηθεί σε μια μεταλλική επιφάνεια και στο οποίο φαίνονται οι πιθανές ενεργειακές μεταβάσεις [1.20]

1.3 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (Uv-Vis)

Στην φασματοσκοπία Uv-Vis απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από 190-800nm από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις και γι' αυτό η φασματοσκοπία Uv-Vis ονομάζεται και μοριακή φασματοσκοπία απορρόφησης.

Τα ορατά και τα υπεριώδη φάσματα μιας ένωσης δεν χαρακτηρίζουν το μόριο ως σύνολο, αλλά δίνουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες ατόμων μέσα στο μόριο. Ενώσεις που έχουν αυτές τις ομάδες ατόμων μετρούνται στη φασματοσκοπία Uv-Vis ποσοτικά με μεγάλη ακρίβεια σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer (εξίσωση 1.36).

Στο υπεριώδες φάσμα διακρίνονται δύο περιοχές:

(α) το εγγύς υπεριώδες (400-190nm) και

(β) το άπω υπεριώδες (190-100nm).

Η συνήθης οργανολογία περιορίζεται στο εγγύς υπεριώδες, διότι η ακτινοβολία κάτω από τα 190nm απορροφάται από α) τον ατμοσφαιρικό αέρα, επομένως οι μετρήσεις θα έπρεπε να γίνονταν σε κενό και β) το χαλαζία, από τον οποίο κατασκευάζονται οι κυψελίδες και τα άλλα οπτικά εξαρτήματα των οργάνων. Οι μετρήσεις απορρόφησης βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ανόργανων και οργανικών ουσιών [1.34].

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας T , ή της απορρόφησης A διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b cm. Συνήθως, η συγκέντρωση c ενός αναλυτή που απορροφάει συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση η οποία αποτελεί τη μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer:

$$A = -\log T = \log P_0/P = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1.36)$$

Όπου ϵ η γραμμική απορροφητικότητα και P_0 , P η ισχύς της ακτινοβολίας μετά τη διέλευσή της από την κυψελίδα που περιέχει τον διαλύτη και τον αναλυτή, αντίστοιχα.

Ο νόμος του Beer περιγράφει με επιτυχία την απορρόφηση υλικών που περιέχουν σχετικά μικρές συγκεντρώσεις αναλυτή. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, η μέση απόσταση μεταξύ των απορροφούντων μορίων, μειώνεται σε σημείο που κάθε μόριο επηρεάζει την κατανομή φορτίου των γειτονικών του. Η αλληλεπίδραση αυτή με τη σειρά της, μπορεί να μεταβάλλει την ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία ενός δεδομένου μήκους κύματος. Επειδή το μέγεθος της αλληλεπίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση, η εμφάνιση αυτού του φαινομένου προκαλεί αποκλίσεις από τη γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης.

Συνήθως, η απορρόφηση της ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας οφείλεται στη διέγερση δεσμικών ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια τα μήκη κύματος των απορροφήσεων μπορούν να συσχετιστούν με τους τύπους των σωματιδίων. Έτσι, η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο.

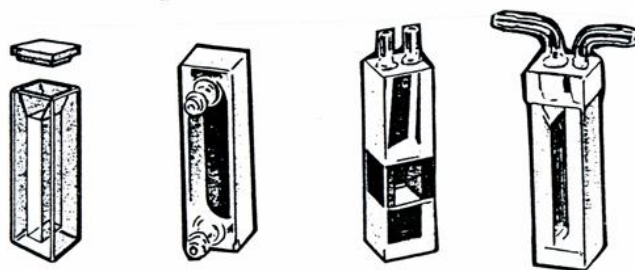
Τα αποτελέσματα της μοριακής απορρόφησης εμφανίζονται στο φάσμα απορρόφησης που είναι η απεικόνιση της A ή της T συναρτήσεως του μήκους κύματος λ ή του κυματαριθμού ν . Τα φάσματα αυτά μας παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την δομή της ένωσης που απορροφά.

Οι συνηθέστερες παράμετροι που επηρεάζουν το φάσμα απορρόφησης μιας ουσίας είναι η φύση του διαλύτη, το pH του διαλύματος, η θερμοκρασία, οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ηλεκτρολυτών και η ύπαρξη παρεμποδίσεων [1.6].

Τα αποτελέσματα της μοριακής απορρόφησης εμφανίζονται στο φάσμα απορρόφησης που είναι η απεικόνιση της A ή της T συναρτήσεως του μήκους κύματος λ ή του κυματαριθμού ν . Τα φάσματα αυτά μας παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την δομή της ένωσης που απορροφά.

Τα νεώτερα φασματοόμετρα UV-VIS αποτελούνται από την πηγή ακτινοβολίας (λάμπα δευτερίου για UV και λάμπα μη νήμα βολφραμίου για VIS). Η ανομοιογενής

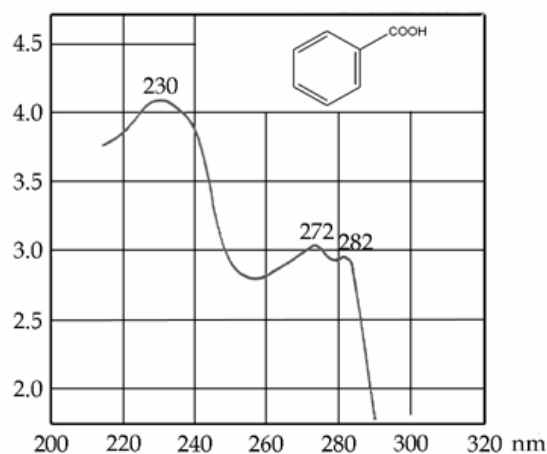
ακτινοβολία που παράγεται περνάει μέσα από ένα μονοχρωμάτορα που επιλέγει τα διάφορα μήκη κύματος και συνδέεται άμεσα με το καταγραφικό (ηλεκτρονική οθόνη). Η δέσμη του φωτός, μετά το μονοχρωμάτορα, διαχωρίζεται σε δύο παράλληλες δέσμες, από τις οποίες η μία περνάει μέσα από την κυψελίδα του δείγματος (sample cell) που περιέχει το διάλυμα της ουσίας στο διαλύτη και η δεύτερη μέσα από μια παρόμοια κυψελίδα που περιέχει μόνο διαλύτη. Οι εντάσεις των δύο δεσμών φωτός μετά την απορρόφηση συγκρίνονται ηλεκτρονικά. Οι κυψελίδες του δείγματος για το ορατό φάσμα κατασκευάζονται από γυαλί, ενώ για την περιοχή του υπεριώδους, επειδή οι προσμίξεις του γυαλιού απορροφούν μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας, χρησιμοποιούνται κυψελίδες κατασκευασμένες από κρυσταλλικό πυρίτιο.



Εικόνα 1.15 Διάφορα είδη και μεγέθη κυψελίδων γυαλιού και quartz για UV

Τα περισσότερα φασματόμετρα UV-VIS λειτουργούν στην περιοχή 190-750 nm. Η ορατή περιοχή είναι μεταξύ 400-750 nm (ιώδες-ερυθρό) και η υπεριώδης περιοχή από 190-400 nm. Για την περιοχή κάτω των 190 nm (στην πραγματικότητα οι απορροφήσεις είναι ικανοποιητικές μέχρι τα 220 nm) οι κυψελίδες πυριτίου αρχίζουν να απορροφούν ελαφρά, όπως και το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, για αυτό απαιτούνται κατάλληλες κυψελίδες και λήψη φασμάτων υπό κενό. Τα φασματοφωτόμετρα αυτά είναι πολύ πιο ακριβά και σε περιπτώσεις που ρυθμίζεται η θερμοκρασία των κυψελίδων η τιμή αυξάνεται σημαντικά.

Η παρουσίαση των φασμάτων UV-VIS των οργανικών και ανόργανων ενώσεων γίνεται αυτόματα σε κατάλληλα βαθμολογημένο χαρτί (ανάλογα με το όργανο ή σε οθόνη Η/Υ με γραφική παράσταση της ϵ ή $\log \epsilon$ στον άξονα των x προς το μήκος κύματος στον άξονα των y (όπου ϵ ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης), είτε της $\log I_0/I$, γνωστής ως οπτικής πυκνότητας (optical density) ως προς το μήκος κύματος.



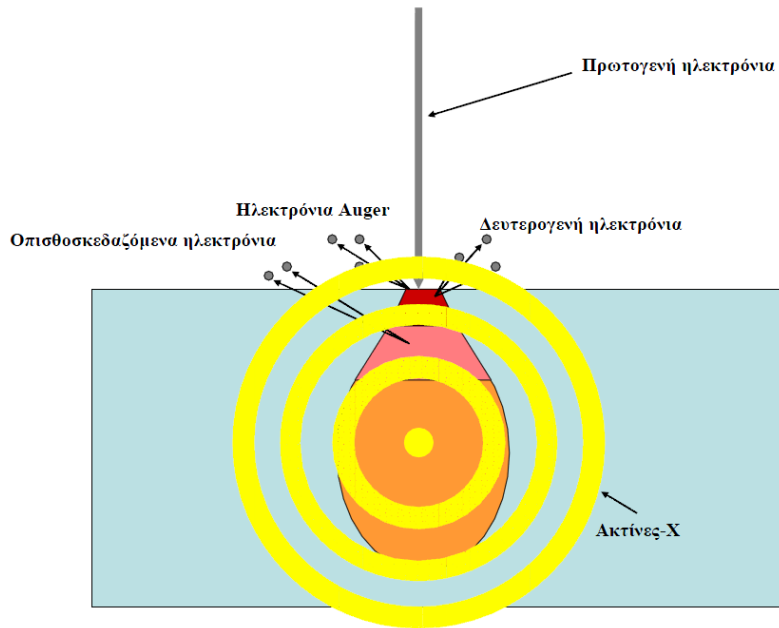
Εικόνα 1.18 Φάσμα UV του βενζοϊκού οξέος σε κυκλοεξάνιο

1.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

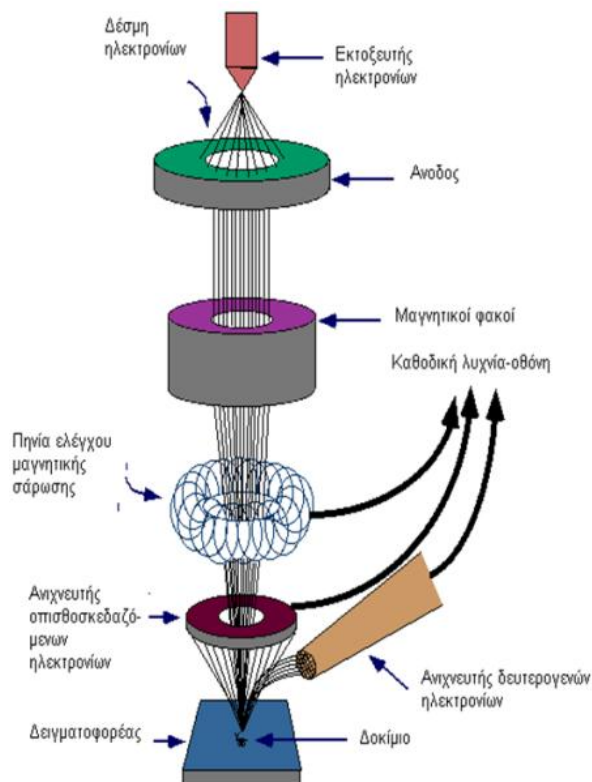
Σε πολλούς τομείς της επιστήμης είναι απαραίτητη η γνώση της φυσικής κατάστασης των επιφανειών των στερεών. Αρχικά για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείτο η οπτική μικροσκοπία. Η διακριτική ικανότητά της όμως περιορίζεται εξ' αιτίας της περίθλασης σε διαστάσεις παραπλήσιες με αυτές του μήκους κύματος του φωτός. Για αυτό το λόγο, σε περιπτώσεις που χρειάζεται μεγάλη διακριτική ικανότητα και η οπτική μικροσκοπία δεν μπορεί να ανταπεξέλθει, έχει αντικατασταθεί με άλλες τεχνικές. Μία από αυτές τις τεχνικές είναι και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM).

Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, η στήλη παραγωγής και εστίασης της δέσμης ηλεκτρονίων λειτουργεί σε μια τάση από 0 – 30 kV και υπό κενό ($<10^{-3}$ Pa). Η πηγή δημιουργεί δέσμη ηλεκτρονίων (πρωτογενή ηλεκτρόνια), η οποία διερχόμενη μέσω μιας σειρά μαγνητικών φακών, επιταχύνεται, συγκεντρώνεται και εστιάζεται πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Το υπό εξέταση δείγμα σαρώνεται από την προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων και τα εκπεμπόμενα από την επιφάνεια του δοκιμίου ηλεκτρόνια συλλέγονται και ενισχύονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν ένα οπτικό σήμα. Το είδος της εκπεμπόμενης από την επιφάνεια του δοκιμίου ακτινοβολίας, εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των πρωτογενών ηλεκτρονίων και των ατόμων του υλικού και μπορεί να είναι:

- **Ηλεκτρόνια Auger.** Προέρχονται από αλληλεπίδραση των πρωτογενών ηλεκτρονίων με τις υποστοιβάδες των επιφανειακών ατόμων. Η μέτρηση τους δίδει πληροφορίες για τη χημική σύσταση της επιφάνειας του υλικού.
- **Δευτερογενή ηλεκτρόνια.** Προέρχονται από ανελαστικές συγκρούσεις των πρωτογενών ηλεκτρονίων με τα άτομα της επιφάνειας. Οι πληροφορίες που συλλέγονται από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια αφορούν κυρίως την τοπογραφία της επιφάνειας.
- **Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια.** Προέρχονται από ελαστικές συγκρούσεις των πρωτογενών ηλεκτρονίων με άτομα των επιφανειακών στρωμάτων (μέχρι και 100 nm). Η ένταση του παραγόμενου σήματος εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό των στοιχείων και τον κρυσταλλογραφικό προσανατολισμό. Οι πληροφορίες που συλλέγονται αφορούν τη χημική σύσταση, την κρυσταλλογραφία και την τοπογραφία της παρατηρούμενης επιφάνειας.
- **Ακτίνες-X.** Παράγονται από το επιφανειακό στρώμα του δοκιμίου μέχρι βάθους έως 1 μm και εξαρτώνται από το είδος των ατόμων της επιφάνειας. Η ανάλυση τους οδηγεί σε χημική ανάλυση της επιφάνειας.



Σχήμα 1.4 Περιοχή αλληλεπίδραση των πρωτογενών ηλεκτρονίων με το υπό μελέτη δείγμα. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι τα κυρίως κατάλληλα για την μελέτη της τοπογραφίας των δειγμάτων



Σχήμα 1.5 Σχηματικό διάγραμμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)

Στο σχήμα 1.5 παρουσιάζεται το διάγραμμα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης και τα επιμέρους κομμάτια από τα οποία αποτελείται. Το μαγνητικό σύστημα εστίασης με το συγκεντρωτικό και τον αντικειμενικό φακό που διαθέτει, χρησιμεύει για τη σμίκρυνση του ειδώλου σε τελικό μέγεθος κουκκίδας από 5-200 nm πάνω στο δείγμα. Κάθε

φακός έχει κυλινδρικό σχήμα ύψους 10-15 cm. Ο συγκεντρωτικός φακός, ο οποίος μπορεί να αποτελείται από έναν ή περισσότερους φακούς, ρυθμίζει τη διάδοση της ηλεκτρονικής δέσμης που φτάνει στον αντικειμενικό φακό. Στον αντικειμενικό φακό ρυθμίζεται το εύρος της ηλεκτρονικής δέσμης που προσπίπτει στο δείγμα.

Τα δύο ζεύγη ηλεκτρομαγνητικών πηνίων που βρίσκονται στον αντικειμενικό φακό, χρησιμεύουν για τη σάρωση. Το ένα ζεύγος εκτρέπει την ακτίνα κατά μήκος του δείγματος και το άλλο κάθετα σε αυτό. Για να επιτευχθεί η σάρωση πρέπει να εφαρμοστεί ηλεκτρικό σήμα στο ένα από τα δύο ζεύγη των πηνίων. Με αυτόν τον τρόπο η ηλεκτρονική δέσμη χτυπάει το δείγμα στο ένα άκρο του κεντρικού άξονα του συστήματος των φακών. Στη συνέχεια κινείται σε ευθεία γραμμή κατά μήκος του δείγματος, με χρονική μεταβολή του σήματος στο παραπάνω ζεύγος πηνίων, και μετά επιστρέφει στην αρχική της θέση. Μετά από τη συμπλήρωση αυτής της γραμμής σάρωσης, το άλλο ζεύγος πηνίων εκτρέπει ελαφρά τη δέσμη και έτσι επαναλαμβάνεται η κίνηση της δέσμης με το πρώτο ζεύγος πηνίων. Με αυτόν τον τρόπο πετυχαίνεται η ακτινοβολήση όλης της επιφάνειας του δείγματος με τη δέσμη ηλεκτρονίων.

Τα ίδια σήματα που περιγράφηκαν παραπάνω, χρησιμοποιούνται και για να οδηγήσουν τις οριζόντιες και κάθετες σαρώσεις ενός σωλήνα καθοδικών ακτινών. Η απεικόνιση του δείγματος παράγεται χρησιμοποιώντας την έξοδο ενός ανιχνευτή για ρύθμιση της έντασης φωτισμού της κουκκίδας στο σωλήνα καθοδικών ακτινών. Επομένως η σάρωση παράγει ένα χάρτη του δείγματος στον οποίο υπάρχει ένα-προς-ένα συσχέτιση μεταξύ του σήματος που παράγεται σε μια συγκεκριμένη θέση της επιφάνειας του δείγματος και του αντίστοιχου σημείου της οθόνης του σωλήνα καθοδικών ακτινών.

Οι θάλαμοι δείγματος είναι έτσι σχεδιασμένοι ώστε να επιτρέπουν την ταχεία αλλαγή των δειγμάτων. Επειδή τα ηλεκτρόνια δε μπορούν να ταξιδέψουν στον αέρα, το όλο σύστημα, πηγή ηλεκτρονίων, φακοί, παρασκευάσμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφησης πρέπει να βρίσκονται σε υψηλό κενό της τάξης των 10^{-4} Torr τουλάχιστον. Η υποδοχή του δείγματος ονομάζεται έδρανο και στα περισσότερα όργανα μπορεί να συγκρατήσει δείγματα αρκετών εκατοστών.

Ένα δείγμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης θα πρέπει να έχει ορισμένες ιδιότητες που είναι: α) να αντέχει στο υψηλό κενό, β) να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων και γ) να είναι αγωγίμο. Το ολοκληρωμένο σύστημα αναλυτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης περιλαμβάνει: α) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με δυνατότητα μεγέθυνσης από 10 μέχρι 300.000 φορές, που επιτρέπει εργασίες μορφολογικής παρατήρησης σε ποικιλία υλικών, τόσο αγωγίμων όσο και μη αγωγίμων (γεωλογικών, μεταλλουργικών, κεραμικών, πολυμερών, χάρτου, βιολογικών, πορωδών δειγμάτων κλπ.) και β) σύστημα για στοιχειακή μικροανάλυση με φασματομέτρο ακτίνων X διασπειρόμενης ενέργειας (Energy Dispersive X-ray, EDX), το οποίο μπορεί να πραγματοποιήσει ποιοτική και ποσοτική μικροανάλυση και να δημιουργήσει στοιχειακή χαρτογράφηση (element mapping) σε λειασμένες και μη επιφάνειες [1.17].

Βιβλιογραφία 1^ο Κεφαλαίου

- 1.1 Shazza Rehman, Zanyar Movasaghi, Art T. Tucker, Simon P. Joel, Jawwad A. Darr, Alexander V. Ruban and Ihtesham U. Rehman, Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue *Journal of Raman Spectroscopy* (2007)
- 1.2 B. Brożek-Płuska, I. Placek, K. Kurczewski, Z. Morawiec, M. Tazbir, H. Abramczyk, Breast cancer diagnostics by Raman spectroscopy Elsevier (2008)
- 1.3 Abigail S. Haka, Karen E. Shafer-Peltier, Maryann Fitzmaurice, Joseph Crowe, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld, Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy PNAS (2005)
- 1.4 Christoph Krafft, Petra R. osch, and J.. urgen Popp, Raman in Medicine, Chapter 28
- 1.5 Janina Kneipp, Tom Bakker Schut, Mike Kliffen, Marian Menke-Pluijmers, Gerwin Puppels, Characterization of breast duct epithelia: a Raman spectroscopic study Elsevier (2003)
- 1.6 Α. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία, Σύγχρονα Θέματα (2008)
- 1.7 Ewen Smith, Geoffrey Dent, Modern Raman spectroscopy—a practical approach, John Wiley & Sons (2005)
- 1.8 A. Smekal, *Naturwissenschaften*, 43 (1923) 873
- 1.9 CV Raman, KS Krishnan, A new type of secondary radiation, *Nature* 121 (1928) 501
- 1.10 J. L. Koenig, Raman Scattering of Synthetic Polymers-A Review, *Applied Spectroscopy Reviews* 4(2) 1971 233-305
- 1.11 Rajinder Singh, C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect, *Phys. perspect.* 4 (2002) 399–420
- 1.12 John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto and Chris W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*, Elsevier (2003)
- 1.13 Bernhard Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*, VCH (1995)
- 1.14 Slobodan Sasic, *Pharmaceutical Applications Of Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons (2007)
- 1.15 Peter Larkin, *Infrared And Raman Spectroscopy: Principles And Spectral Interpretation*, Elsevier (2011)
- 1.16 Ν. Χατζηρησιτίδης, Κ. Βύρας, Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών (2000)
- 1.17 Skoog, Holler, Nieman Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, (Μεταφρασμένη Πέμπτη έκδοση 2002), κεφάλαια 16,17 σελ. 446-500, κεφάλαιο 21, σελ.633-638, κεφάλαιο 12 σελ. 324-354
- 1.18 D. N. Sathyanarayana, *Vibrational Spectroscopy: Theory And Applications*, New Age International (2004)
- 1.19 Fleischmann, M., Hedra, P.J. and McQuillan, A.J., Raman-Spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* 26 (1974) 163-166
- 1.20 Campion , A., Kambhampati, P., *Chem Soc Rev* 27(4) (1998) 241
- 1.21 Le Ru, E., Etchegoin, P., “Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects” 1st Edition, Elsevier (2009)
- 1.22 Jeanmaire D.L., Van Duyne R.P., Surface Raman spectroelectrochemistry.1.Heterocyclic, aromatic and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 84 (1977) 1-20
- 1.23 Albrecht G.M. and Creighton J.A., *Journal of American Chemical Society* 99 (1977) 5215

- 1.24 Bhavya Sharma, Renee R. Frontiera, Anne-Isabelle Henry, Emilie Ringe, Richard P. Van Duyne, "SERS: Materials, applications, and the future" *Materials Today* 15 (2012) 16-25
- 1.25 P. M. Platzman and P. A. Wolf. *Waves and interactions in solid state plasmas* (Solid State Physics, Suppl. No 13). Academic Press, New York, London, 1973.
- 1.26 J. D. Jackson. *Classical electrodynamics*. 3rd edition, Wiley, New York, 1998
- 1.27 Boltas seva, A., and Atwater, H. A., *Science* 331(6015) (2011) 290
- 1.28 Kosuda, K. M., et al., *Nanostructures and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. In *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Andrews, D., et al., (eds.) Academic Press, Oxford 3 (2011) 263
- 1.29 Van Du yne, R. P., et al., *J Chem Phys* 99 (1993) 2101
- 1.30 Matthew Rycenga, Pedro H. C. Camargo, Weiyang Li, Christine H. Moran and Younan Xia, *Understanding the SERS Effects of Single Silver Nanoparticles and Their Dimers*, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (4) (2010) 696–703
- 1.31 Αναστασόπουλος Ιωάννης, "Χρησιμοποίηση της μεθόδου SERS στην ελεγχόμενη αποδέσμευση μικρού μοριακού βάρους χημικών ενώσεων από πολυμερικές μήτρες" Πανεπιστήμιο Πατρών 2011
- 1.32 Smith, E., Dent, G., *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, John Wiley and Sons, 2005
- 1.33 Kartin Kneipp, *Surface-enhanced Raman Scattering*, *Physics Today* (2007) 40-46
- 1.34 Όξενκιουν - Πετροπούλου Μ., *Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης: φασματομετρικές μέθοδοι, Συμμετρία* 2006

Κεφάλαιο 2^ο

2.1 Εισαγωγή

Ο τομέας της Υπολογιστικής Χημείας αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο που χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια, καθώς δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης υλικών που είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν ή πολύ ακριβά για να χρησιμοποιηθούν. Επίσης, είναι ένας εύκολος τρόπος για τους επιστήμονες να πραγματοποιούν προβλέψεις πριν την εκτέλεση των πειραμάτων έτσι ώστε να μπορούν να προετοιμαστούν καλύτερα για τις επακόλουθες παρατηρήσεις. Ακόμα, το πλεονέκτημα αυτών των τεχνικών σε σχέση με τις πειραματικές μεθόδους είναι ότι μπορούν να δώσουν πληροφορίες και για δομές που υφίστανται καθώς και για δομές που δεν έχουν ακόμα παρασκευασθεί ή δεν μπορούν να υπάρξουν σε συνήθεις συνθήκες. Πρακτικά, σε ένα μόνο πείραμα δεν μπορούν να υπολογιστούν πολλοί παράμετροι ταυτόχρονα (π.χ. διπολική ροπή, θερμότητα σχηματισμού, κ.ά.), ενώ υπολογιστικά είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί.

Η Κβαντική και η Κλασσική Μηχανική, καθώς η Στατιστική Φυσική και η Θερμοδυναμική, αποτελούν τη βάση για το μεγαλύτερο μέρος της Υπολογιστικής Χημείας και των προγραμμάτων των ηλεκτρονικών υπολογιστών, συνδυάζοντας τη μοντελοποίηση των ατόμων και των μορίων με τα Μαθηματικά. Χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό Υπολογιστικής Χημείας, μπορούν να πραγματοποιηθούν:

- υπολογισμοί ηλεκτρονιακής δομής (electronic structures),
- βελτιστοποιήσεις γεωμετρίας (geometry optimizations),
- υπολογισμοί συχνοτήτων (frequency calculations),
- ορισμός των μεταβατικών δομών (transition structure) και της ακολουθίας των αντιδράσεων (reaction paths),
- υπολογισμοί πρωτεϊνών, π.χ. πρόσδεση (docking),
- υπολογισμοί ηλεκτρονίων και κατανομής φορτίου (charge distribution),
- υπολογισμοί της δυναμικής επιφανειακής ενέργειας (potential energy surface-PES),
- υπολογισμοί των σταθερών ταχύτητας για τις χημικές αντιδράσεις (κινητική),
- θερμοδυναμικοί υπολογισμοί, όπως θερμότητα αντίδρασης (heat of reaction), ενέργεια ενεργοποίησης (energy of activation) και
- υπολογισμοί διάφορων φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των μορίων.

Οι σημαντικότερες αριθμητικές μέθοδοι είναι οι *ab-initio*, οι ημι-εμπειρικές (semi-empirical) και οι κβαντομηχανικές (molecular mechanics). Οι ορισμοί των όρων αυτών είναι χρήσιμοι για την κατανόηση της χρήσης των υπολογιστικών τεχνικών στη Χημεία:

- *Ab-initio*, σημαίνει στα λατινικά «από το μηδέν», και αποτελεί μια ομάδα μεθόδων στην οποία οι μοριακές δομές μπορούν να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας μόνο την εξίσωση Schrödinger, τις τιμές των θεμελιωδών σταθερών και τους ατομικούς αριθμούς των ατόμων που εξετάζονται.

- Οι ημι-εμπειρικές τεχνικές χρησιμοποιούν προσεγγίσεις που προέρχονται από εμπειρικά (πειραματικά) δεδομένα, τα οποία στη συνέχεια εισάγονται σε μαθηματικά μοντέλα.
- Οι κβαντομηχανικές μέθοδοι χρησιμοποιούν την κλασική φυσική, εμπειρικές και ημι-εμπειρικές τεχνικές για να εξηγήσουν και να ερμηνεύσουν τη συμπεριφορά των ατόμων και των μορίων [2.1].

Πίνακας 2.1. Βασικά χαρακτηριστικά των τριών κύριων μεθόδων

Μέθοδος	Χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Χρήση
Μοριακή Μηχανική	<ul style="list-style-type: none"> • Χρησιμοποιεί την κλασική φυσική • Βασίζεται στο δυναμικό πεδίο (force-field) • Υπολογιστικά, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις • Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλα μόρια όσο τα ένζυμα 	<ul style="list-style-type: none"> • Βασίζεται σε δυναμικά τα οποία με κάποιον τόπο έχουν ορισθεί • Μερικές φορές είναι ανακριβής διότι τα δυναμικά αυτά χρησιμοποιούνται πέρα από το αποδεδειγμένο εύρος εγκυρότητας 	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν υπολογίζει ηλεκτρονιακές δομές • Απαιτεί πειραματικά δεδομένα ή δεδομένα από <i>ab initio</i> υπολογισμούς 	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλα μόρια • Συστήματα και διαδικασίες χωρίς σπάσιμο ή σχηματισμό δεσμών
Ημι-Εμπειρικές	<ul style="list-style-type: none"> • Χρησιμοποιούν την κβαντική φυσική • Χρησιμοποιούν εμπειρικά δεδομένα που προέρχονται από εμπειρικές παραμέτρους • Χρησιμοποιούν πολλές προσεγγίσεις 	<ul style="list-style-type: none"> • Υπολογιστικά, λιγότερο απαιτητικές σε σχέση με τις <i>ab-initio</i> • Υπολογίζουν μεταβατικές και διηγεμένες καταστάσεις 	<ul style="list-style-type: none"> • Απαιτεί πειραματικά δεδομένα (ή δεδομένα από τις <i>ab-initio</i>) για τον υπολογισμό παραμέτρων • Λιγότερο απαιτητική απ' ό,τι οι <i>ab-initio</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Συστήματα μεσαίου μεγέθους • Συστήματα με ηλεκτρονιακές μεταβάσεις
<i>Ab-initio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Χρησιμοποιούν την κβαντική φυσική • Μαθηματικά ορισμένες, καθόλου εμπειρικές παράμετροι • Χρησιμοποιούν προσεγγίσεις εκτενώς 	<ul style="list-style-type: none"> • Χρήσιμες σε ένα ευρύ φάσμα συστημάτων • Δεν εξαρτώνται από πειραματικά δεδομένα • Υπολογίζουν μεταβατικές και διηγεμένες καταστάσεις 	<ul style="list-style-type: none"> • Υπολογιστικά απαιτητικές 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρά συστήματα • Συστήματα με ηλεκτρονιακές μεταβάσεις • Μόρια χωρίς πειραματικά δεδομένα • Συστήματα που απαιτούν αυστηρή ακρίβεια

2.2 Η εξίσωση Schrödinger

Ο Αυστριακός φυσικός E. Schrödinger προσπαθώντας να περιγράψει τη συμπεριφορά των ηλεκτρονίων στα άτομα με τη χρήση μαθηματικών εξισώσεων, διατύπωσε την γνωστή εξίσωση Schrödinger. Η εξίσωση αυτή είναι μια γραμμική διαφορική εξίσωση δεύτερης τάξης και από τη λύση της προκύπτει μια κυματοσυνάρτηση, $\Psi(r,t)$, η οποία εξαρτάται από το χώρο και το χρόνο και περιγράφει με επιτυχία την κατάσταση του συστήματος στο οποίο εφαρμόζεται. Δεδομένου ότι τα προβλήματα που εξετάζονται στη Χημεία δεν εξαρτώνται από το χρόνο αλλά μόνο από το χώρο, η εξίσωση Schrödinger καταλήγει να έχει την επόμενη μορφή:

$$H\Psi(r) = E\Psi(r) \quad (2.1)$$

όπου, Ψ : η κυματοσυνάρτηση

E : η ολική ενέργεια του σωματιδίου

H : ο τελεστής Hamilton, ο οποίος ισούται με $H = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2m} \nabla^2 + V$

η Λαπλασιανή ορίζεται ως:

$$\nabla_q^2 = \nabla_q \cdot \nabla_q = \left(\frac{\partial^2}{\partial x_q^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_q^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_q^2} \right)$$

και V είναι το πεδίο δυναμικού στο οποίο κινείται το σωματίδιο

Ο τελεστής Hamilton είναι πολύ σημαντικός στον τομέα της Κβαντομηχανικής και αντιπροσωπεύει την συνολική ενέργεια του συστήματος, δηλαδή το άθροισμα της κινητικής και δυναμικής ενέργειας. Η γενική μορφή του τελεστή Hamilton ή αλλιώς η Χαμιλτωνιανή του μοριακού συστήματος που αποτελείται από N πυρήνες και n ηλεκτρόνια εκφράζεται ως εξής:

$$H_{tot} = -\sum_{\alpha=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_\alpha} \nabla_\alpha^2 - \sum_{i=1}^n \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 + \sum_{\alpha=1}^N \sum_{\beta>\alpha}^N K \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{|r_{\alpha\beta}|} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n K \frac{e^2}{|r_{ij}|} - \sum_{i=1}^n \sum_{\alpha=1}^N K \frac{Z_\alpha e^2}{|r_{i\alpha}|} \quad (2.2)$$

όπου: m_e η μάζα του ηλεκτρονίου, M_α η μάζα του πυρήνα α , e η απόλυτη τιμή του φορτίου του ηλεκτρονίου, Z_α ο ατομικός αριθμός του πυρήνα α , \hbar η σταθερά του Plank και K η σταθερά του Coulomb, $K=1/4\pi\epsilon_0$.

Ο πρώτος και ο δεύτερος όρος αντιπροσωπεύουν την κινητική ενέργεια N πυρήνων και n ηλεκτρονίων αντίστοιχα. Ο τρίτος και ο τέταρτος όρος εκφράζουν τις απώσεις μεταξύ N πυρήνων και μεταξύ n ηλεκτρονίων αντίστοιχα, ενώ ο τελευταίος όρος συμβολίζει τις έλξεις μεταξύ N πυρήνων και n ηλεκτρονίων. Η Χαμιλτωνιανή δύναται να γραφεί ως εξής:

$$H_{tot} = T_e + V(r, R) + T_N \quad (2.3)$$

με: $T_e = -\sum_{i=1}^n \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2$

κινητική ενέργεια
ηλεκτρονίων

$$\begin{aligned}
T_N &= - \sum_{\alpha=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_\alpha} \nabla_\alpha^2 && \text{κινητική ενέργεια} \\
&&& \text{πυρήνων} \\
V(r, R) &= \sum_{\alpha=1}^N \sum_{\beta>\alpha}^N K \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{|r_{\alpha\beta}|} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n K \frac{e^2}{|r_{ij}|} - \sum_{i=1}^n \sum_{\alpha=1}^N K \frac{Z_\alpha e^2}{|r_{i\alpha}|} && \text{δυναμική ενέργεια} \\
&&& \text{συστήματος}
\end{aligned}$$

όπου r και R συμβολίζουν το σύνολο των ηλεκτρονιακών και πυρηνικών συντεταγμένων αντίστοιχα. Η τελική μορφή της εξίσωσης Schrödinger για το μόριο θα είναι τελικά η ακόλουθη:

$$H_{tot} \Psi_l(r, R) = (T_e + T_N) \Psi_l(r, R) = E_l \Psi_l(r, R) \quad (2.4)$$

όπου το l συμβολίζει έναν κβαντικό αριθμό ο οποίος αντιστοιχεί στη συνολική ενέργεια του συστήματος [2.2-2.5].

2.3 Η προσέγγιση Born-Oppenheimer

Η προσέγγιση Born-Oppenheimer αποσυνδέει την κίνηση των πυρήνων από εκείνη των ηλεκτρονίων, βασισμένη στο γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια είναι πολύ ελαφρύτερα των πυρήνων δεδομένου ότι $m_p \approx 1836 m_e$. Αυτό σημαίνει ότι ηλεκτρόνια κινούνται ταχύτερα σε σχέση με τους πυρήνες, έτσι η κινητική τους ενέργεια είναι μηδενική και η δυναμική ενέργεια που οφείλεται στην άπωση πυρήνα-πυρήνα είναι σταθερή. Επομένως, από την γενική μορφή της Χαμιλτωνιανής, προκύπτει η λεγόμενη ηλεκτρονιακή Χαμιλτωνιανή (electronic Hamiltonian):

$$H_{elec} = - \sum_{i=1}^n \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n K \frac{e^2}{|r_{ij}|} - \sum_{i=1}^n \sum_{\alpha=1}^N K \frac{Z_\alpha e^2}{|r_{i\alpha}|} = T_e + V_{ee} + V_{Ne} \quad (2.5)$$

Η λύση της εξίσωσης Schrödinger με H_{elec} είναι η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση Ψ_{elec} και η ηλεκτρονιακή ενέργεια $E_{elec} \Psi_{elec}$ εξαρτάται μόνο από τις συντεταγμένες των ηλεκτρονίων, ενώ οι συντεταγμένες των πυρήνων εισάγονται μόνο παραμετρικά και δεν εμφανίζονται καθόλου στην έκφραση του Ψ_{elec} . Έτσι, η ολική ενέργεια E_{tot} αποτελεί το άθροισμα της E_{elec} και του σταθερού όρου της πυρηνικής άπωσης, δηλαδή:

$$E_{nuc} = \sum_{\alpha=1}^N \sum_{\beta>\alpha}^N K \frac{Z_\alpha Z_\beta e^2}{|r_{\alpha\beta}|} \quad (2.6)$$

Η εξίσωση Schrödinger έχει τη μορφή:

$$H_{elec} \Psi_{elec} = E_{elec} \Psi_{elec} \quad (2.7)$$

και

$$E_{tot} = E_{elec} + E_{nuc} \quad (2.8)$$

Η προσέγγιση Born-Oppenheimer απλουστεύει σημαντικά τους μοριακούς κβαντικούς υπολογισμούς. Η απλουστευμένη, όμως, αυτή μορφή δεν είναι τέτοια ώστε να μπορεί να λυθεί με ακρίβεια η εξίσωση Schrödinger στα μοριακά συστήματα [2.2,2.4].

2.4 Η θεωρία Hartee–Fock

Η θεωρία Hartee-Fock (HF) είναι θεμελιώδους σημασίας για ένα μεγάλο μέρος της θεωρίας της ηλεκτρονιακής δομής. Αποτελεί τη βάση της θεωρίας των μοριακών τροχιακών (molecular orbital (MO) theory), η οποία υποθέτει ότι η κίνηση κάθε ηλεκτρονίου μπορεί να περιγραφεί από μία μονο-σωματιδιακή συνάρτηση, που ονομάζεται τροχιακό (orbital) και δεν εξαρτάται ρητά από τις στιγμιαίες κινήσεις των άλλων ηλεκτρονίων. Η εισαγωγή της έννοιας του τροχιακού στη Χημεία αποτελεί την απόδειξη της προβλεπτικής ικανότητας της θεωρίας Hartee-Fock. Ουσιαστικά, η έννοια του τροχιακού αποτελεί μαθηματικές σχέσεις, οι οποίες δεν δίνουν την πραγματική εικόνα της κίνησης των ηλεκτρονίων, αλλά την προσεγγίζουν με ακρίβεια. Μόνο στην περίπτωση του υδρογόνου (ή άλλων μονο-ηλεκτρονιακών συστημάτων, όπως He^+) τα τροχιακά καθορίζονται ακριβώς από ιδιοσυναρτήσεις που χρησιμοποιούν την πλήρη ηλεκτρονιακή μορφή της Χαμιλτωνιανής. Όσον αφορά, την εξέταση μορίων κοντά στη γεωμετρία ισορροπίας τους (equilibrium geometry), η θεωρία HF δίνει καλές πληροφορίες για πιο εμπειριστωμένους θεωρητικούς υπολογισμούς, διότι προσομοιάζει καλύτερα την ηλεκτρονιακή εξίσωση Schrödinger [2.6].

Η θεωρία Hartree (1928) βασίστηκε στην ιδέα ότι κάθε ηλεκτρόνιο ενός πολυηλεκτρονιακού συστήματος που αποτελείται από N πυρήνες και n ηλεκτρόνια, κινείται μέσα σε ένα πεδίο δυναμικού V σφαιρικής συμμετρίας. Το πεδίο αυτό είναι άθροισμα του πεδίου δυναμικού που οφείλεται στους N θετικά φορτισμένους πυρήνες και του μέσου πεδίου δυναμικού που προέρχεται από τα υπόλοιπα $n-1$ ηλεκτρόνια του συστήματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα επιμέρους πεδία δυναμικού που δημιουργούνται έχουν και αυτά σφαιρική συμμετρία. Το δυναμικό είναι αποτέλεσμα των συνεισφορών που προσφέρουν σε αυτό τα υπόλοιπα $n-1$ ηλεκτρόνια του συστήματος, με το ποσοστό συνεισφοράς του καθενός από αυτά να καθορίζεται από την μονοηλεκτρονιακή του συνάρτηση [2.7].

Με αυτό τον τρόπο, οι πολυηλεκτρονιακές εξισώσεις Schrödinger μπορούν εύκολα να επιλυθούν, αφού πρώτα μετασχηματιστούν σε μονοηλεκτρονιακές. Συνεπώς, στο σύστημα που περιγράφεται από n ηλεκτρόνια, θα προκύψουν μονοηλεκτρονιακές εξισώσεις Schrödinger, οι οποίες θα δώσουν n μονοηλεκτρονιακές κυματοσυναρτήσεις.

Σύμφωνα με την μεθοδολογία του Hartree, ο τελεστής Hamilton μπορεί να γραφεί ως άθροισμα των μονοηλεκτρονιακών τελεστών H_i :

$$H = H_i = \sum_{i=1}^n H_i \quad (2.9)$$

όπου H_i περιγράφει την κινητική και τη δυναμική ενέργεια του ηλεκτρονίου i .

Με βάση τη μέθοδο του διαχωρισμού των μεταβλητών, κάθε τελεστής Hamilton μπορεί να γραφεί ως άθροισμα τελεστών, επομένως η κυματοσυνάρτηση μπορεί να

εκφραστεί ως γινόμενο των επιμέρους κυματοσυναρτήσεων. Η κυματοσυνάρτηση Ψ μπορεί να πάρει την παρακάτω μορφή:

$$\Psi(1,2,3,\dots,n) = \Psi_1 \cdot \Psi_2 \cdot \dots \cdot \Psi_n \quad (2.10)$$

Η κάθε μονοηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ψ_i αποτελεί λύση της μονοηλεκτρονιακής εξίσωσης:

$$H_i \psi_i = E_i \psi_i \quad (2.11)$$

Το ηλεκτροστατικό πεδίο που δρα πάνω σε ένα ηλεκτρόνιο i , εξαιτίας ενός άλλου ηλεκτρονίου j δίνεται από τη σχέση:

$$V(r_i) = \left\langle j \left| \frac{1}{r_{ij}} \right| j \right\rangle \quad (2.12)$$

Η ολική δυναμική ενέργεια για ένα ηλεκτρόνιο i , το οποίο κινείται σε ένα πεδίο δυναμικού, το οποίο δημιουργείται από τα υπόλοιπα $n-1$ ηλεκτρόνια, θα δίνεται από τη σχέση:

$$V(r_i) = \sum_{i>j} \left\langle j \left| \frac{1}{r_{ij}} \right| j \right\rangle \equiv J_j(i) \quad (2.13)$$

όπου $J_j(i)$ ονομάζεται τελεστής Coulomb. Ο μονοηλεκτρονιακός τελεστής Hamilton παίρνει λοιπόν τη μορφή $H_i + J_j(i)$, οπότε και η μονοηλεκτρονιακή εξίσωση Schrödinger παίρνει την παρακάτω μορφή:

$$[H_i + J_j(i)] = E_i \Psi_i \quad (2.14)$$

Οι μονοηλεκτρονιακές αυτές οι εξισώσεις που προκύπτουν ονομάζονται εξισώσεις Hartree. Ωστόσο, από τη θεωρία Hartree για την εύρεση της κυματοσυναρτήσης Ψ , πρέπει να έχουν υπολογιστεί οι υπόλοιπες συναρτήσεις Ψ_i . Το ίδιο ισχύει βέβαια και για τα υπόλοιπα $n-1$ ηλεκτρόνια του πολυηλεκτρονιακού συστήματος. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε από τον Hartree με την εισαγωγή της μεθόδου των διαδοχικών επαναλήψεων. Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε Μέθοδος Αυτοσυνεπούς Πεδίου ή Μέθοδος SCF (Self-ConsistentFieldMethod). Στις αυτοσυνεπείς διαδικασίες επιλέγεται δοκιμαστικό σύνολο spin-τροχιακών τα οποία χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό του τελεστή Fock, εν συνεχεία επιλύονται οι εξισώσεις Hartree-Fock απ' όπου προκύπτει νέο σύνολο spin-τροχιακών, από τα οποία σχηματίζεται ένας νέος τελεστής Fock, κ.ο.κ. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται μέχρι να ικανοποιηθούν τα κριτήρια σύγκλισης [2.8,2.9].

Η μέθοδος Hartree βελτιώθηκε στη συνέχεια (1930) από τον Fock, ο οποίος εισήγαγε την έννοια της αντισυμμετρίας των ηλεκτρονιακών κυματοσυναρτήσεων, την οποία είχε αγνοήσει ο Hartree, γράφοντας την κυματοσυνάρτηση Ψ με τη βοήθεια της ορίζουσας Slater.

Κάθε ηλεκτρόνιο χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό $\frac{1}{2}$ και μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο υπάρχουν δύο πιθανές καταστάσεις, που αντιστοιχούν σε ευθυγράμμιση

κατά την κατεύθυνση ή αντίθετα του πεδίου. Έτσι, λοιπόν, δύο συναρτήσεις τροχιακών που ονομάζονται α και β , και τηρούν τους όρους της ορθοκανονικότητας.

$$\begin{aligned}\langle \alpha | \alpha \rangle &= \langle \beta | \beta \rangle = 1 \\ \langle \alpha | \beta \rangle &= \langle \beta | \alpha \rangle = 0\end{aligned}$$

Η ολοκληρωμένη έκφραση της ηλεκτρονιακής κυματοσυνάρτησης πρέπει να είναι αντισυμμετρική, όσον αφορά την ανταλλαγή συντεταγμένων οποιονδήποτε δύο ηλεκτρονίων. Η αρχή του Pauli, η οποία αναφέρει ότι δύο ηλεκτρόνια δεν μπορούν να χαρακτηρίζονται από τον ίδιο κβαντικό αριθμό, αποτελεί άμεση συνέπεια της ύπαρξης της αντισυμμετρίας. Η αντισυμμετρικότητα της κυματοσυνάρτησης εισάγεται με τη βοήθεια της ορίζουσας Slater (Slater determinant). Οι στήλες της ορίζουσας Slater είναι μονο-ηλεκτρονιακές κυματοσυναρτήσεις, τροχιακά, ενώ οι συντεταγμένες των ηλεκτρονίων ορίζονται κατά μήκος των γραμμών της. Οι μονοηλεκτρονιακές συναρτήσεις αποτελούν τα μοριακά τροχιακά ϕ_i , τα οποία δίνονται ως γινόμενο ενός χωρικού τροχιακού και μιας συνάρτησης spin (α ή β) και τα οποία ακολουθούν τους όρους της ορθοκανονικότητας. Στη γενική περίπτωση, που το μελετούμενο σύστημα αποτελείται από ηλεκτρόνια και πτροχιακά, η ορίζουσα Slater δίνεται από τη σχέση:

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \cdots & \phi_N(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \cdots & \phi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \cdots & \phi_N(N) \end{vmatrix} \quad (2.15)$$

όπου $1/\sqrt{N!}$ ονομάζεται σταθερά κανονικοποίησης. Η ανταλλαγή θέσης δύο ηλεκτρονίων αντιστοιχεί σε ανταλλαγή της θέσης δύο σειρών της ορίζουσας, γεγονός που προκαλεί την αλλαγή του πρόσημου της [2.5, 2.10].

Με την παρέμβαση αυτή του Fock στην θεωρία του Hartree, οι εξισώσεις του Hartree μετονομάζονται σε εξισώσεις Hartree-Fock και έχουν την ακόλουθη μορφή:

$$h^{HF} \phi_i = E_i \phi_i \quad (2.16)$$

όπου $h^{HF}(1) = H_i(1) + \sum_{j=1}^n ((J_j(1) + K_j(1)))$ ονομάζεται συντελεστής Hartree-Fock, το $J_j(1)$

τελεστής Coulomb και $K_j(1)$ τελεστής ανταλλαγής.

Ο τελεστής $J_j(1)$ είναι ένας τελεστής ολοκλήρωμα, το αποτέλεσμα του οποίου είναι ένα στατιστικό μέσο τυπικό δυναμικό στο συγκεκριμένο σημείο.

Ο τελεστής $K_j(1)$ είναι και αυτός ένας τελεστής ολοκλήρωμα, το αποτέλεσμα του οποίου είναι δυναμικό. Όμως, η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το δυναμικό που προκύπτει εξαρτάται από την τιμή του $\phi_j(1)$ σε όλα τα σημεία του χώρου και όχι απλά από την τιμή σε ένα μόνο σημείο, όπως συμβαίνει με τον τελεστή Coulomb. Γι' αυτό το λόγο, ο τελεστής ανταλλαγής λέγεται μη τοπικός τελεστής, ενώ ο τελεστής Coulomb ονομάζεται και τοπικός συντελεστής [2.8].

Σύμφωνα με τη θεωρία Hartree-Fock, η συμπεριφορά κάθε ηλεκτρονίου μπορεί να περιγραφεί με το τροχιακό που το χαρακτηρίζει. Οι επιδράσεις των υπόλοιπων ηλεκτρονίων στο συγκεκριμένο τροχιακό εισάγονται μέσω των όρων του Χαμιλτώνειου του συστήματος. Έτσι, ο τελεστής HF εκτός από τις ιδιοσυναρτήσεις που αντιστοιχούν σε n κατεχόμενα τροχιακά, υπάρχουν και άπειρες σε αριθμό ιδιοσυναρτήσεις που αντιστοιχούν σε μη κατεχόμενα τροχιακά, που ονομάζονται κενά ή φανταστικά και μαζί με τα κατεχόμενα τροχιακά αποτελούν ένα πλήρες σύνολο ορθοκανονικών συναρτήσεων.

2.5 Θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας

Η βασική στρατηγική που ακολουθείται στην θεωρία του συναρτησιακού της πυκνότητας (Density Functional Theory–DFT) για την επίλυση του πολυηλεκτρονιακού προβλήματος είναι ο διαχωρισμός της συνολικής ενέργειας ενός ηλεκτρονιακού συστήματος σε έναν αριθμό διαφορετικών συνεισφορών:

$$E[\rho] = T_R + V_{ext} + E_H + E_X + E_C \quad (2.17)$$

όπου T_R είναι η κινητική ενέργεια, E_H είναι η κλασσική αλληλεπίδραση ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου ή όρος Hartree-Fock, V_{ext} είναι η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με το εξωτερικό πεδίο, E_X είναι η ενέργεια ανταλλαγής και E_C είναι ο όρος συσχέτισης (κατά μέσο όρο). Ο δεύτερος και ο τρίτος όρος είναι γνωστοί ως συναρτησιακά της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (explicit functional of the electronic density). Ο πρώτος και ο τέταρτος όρος είναι γνωστοί ως συναρτησιακά των μη-αλληλεπιδρώντων τροχιακών (non-interacting orbitals), τα οποία είναι άγνωστα συναρτησιακά της πυκνότητας. Ο τελευταίος όρος είναι η ενέργεια συσχέτισης και είναι ο μεγάλος άγνωστος. Ουσιαστική σημασία έχει το άθροισμα των δύο τελευταίων όρων $E_X + E_C$ [2.11,2.12].

Η προσέγγιση Hartree-Fock είναι μια ειδική περίπτωση της θεωρίας DFT όπου ο όρος E_X υπολογίζεται από τον αντίστοιχο όρος της μεθοδολογίας HF που περιέχει τον τελεστή ανταλλαγής K_{ij} και $E_C = 0$. Τα συναρτησιακά που χρησιμοποιούνται στην θεωρία DFT είναι ένας συναρτησιακός παράγοντας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας $\rho[r]$:

$$\rho[r] = n \int |\Psi|^2 dr_1 dr_2 \dots dr_n d\omega_1 \dots d\omega_n \quad (2.18)$$

όπου Ψ είναι η πολυηλεκτρονιακή συνάρτηση $\Psi(1,2,\dots,n)$.

Υπάρχουν συναρτησιακές που αποτελούν συνδυασμό της συναρτησιακής της ανταλλαγής με τη συναρτησιακή της συσχέτισης. Μια τέτοια συναρτησιακή είναι η BLYP του Becke. Επειδή όμως ακόμη και η θεωρία HF περιλαμβάνει έναν όρο ανταλλαγής, γι' αυτό προτάθηκε η δημιουργία συναρτησιακών (υβριδικές συναρτησιακές), οι οποίες περιλαμβάνουν τους όρους ανταλλαγής της HF και της DFT, αλλά και τους όρους συσχέτισης της DFT. Μία πολύ γνωστή υβριδική τριπαραμετρική συνάρτηση είναι η B3LYP, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα και δίνεται από τον εξής τύπο [2.13,2.14]:

$$E_{B3LYP}^{XC} = E_{LD}^X + C_0(E_{HF}^X - E_{LD}^X) + C_X \Delta E_X^{Becke} + E_{VWN}^C + C_C(E_{LYP}^C - E_{VWN}^C) \quad (2.19)$$

Σε αυτόν τον τύπο ο Becke χρησιμοποιεί μια σειρά από διαφορετικές συναρτήσεις, καθώς και τρεις παραμέτρους. Οι τιμές των παραμέτρων προσδιορίστηκαν από τον ίδιο και βρέθηκαν ίσες με $C_0=0.20$, $C_X=0.72$ και $C_C=0.81$ και VWN είναι τοπική συναρτησιακή των Vosko, Wilk και Nusair. Το γεγονός ότι οι ίδιες τιμές των παραμέτρων χρησιμοποιούνται από διαφορετικές συναρτησιακές, αποδεικνύει την ορθότητα της επιλογής του Becke να χρησιμοποιεί μίγμα των όρων ανταλλαγής της θεωρίας HF και της DFT. Η τριπαραμετρική αυτή συνδυάζει τη συναρτησιακή τη συναρτησιακή ανταλλαγής του Becke (B88), με τη συναρτησιακή της συσχέτισης των Lee, Yang και Parr (LYP). Ουσιαστικά η πρώτη περιγραφή της B3LYP είναι αυτή που δημοσιεύτηκε από την Gaussian Inc. το 1994.

Η μέθοδος DFT βρίσκει μεγάλη εφαρμογή διότι δίνει ακριβείς υπολογισμούς βελτιστοποίησης της γεωμετρίας και υπάρχει και η δυνατότητα υπολογισμού των συχνοτήτων δόνησης. Επίσης, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον υπολογισμό της ενέργειας, καθώς δίνει καλύτερα αποτελέσματα από αυτά που προκύπτουν με τη χρήση της μεθόδου HF. Η επιτυχία της μεθόδου συνίσταται τόσο στην προσεγγιστική εισαγωγή της έννοιας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε ένα μονοηλεκτρονιακό μοντέλο όσο και στην ταχύτητά της.

2.5.1 Συναρτήσεις Βάσης

Το 1951 οι Hall και Roothaan εισήγαγαν μια νέα θεωρία την LCAO-SCF (Local Combination of Atomic-Orbital Self-Consistent-Field) σύμφωνα με την οποία κάθε τροχιακό μπορεί να εκφραστεί ως γραμμικός συνδυασμός κάποιων τροχιακών συναρτήσεων βάσης. Το σύνολο βάσης είναι ένα σύνολο μαθηματικών συναρτήσεων που αποτελούν τη βάση ενός συναρτησιακού χώρου. Κάθε μοριακό τροχιακό στη θεωρία HF μπορεί να εκφραστεί ως γραμμικός συνδυασμός των συναρτήσεων βάσης, των οποίων οι συντελεστές καθορίζονται από την αυτοσυνεπή (SCF) λύση των εξισώσεων HF. Η πλήρης κυματοσυνάρτηση HF εκφράζεται με τη μορφή ορίζουσας Slater που σχηματίζεται από μεμονωμένα κατειλημμένα μοριακά τροχιακά [24]. Το τελευταίο μπορεί να εκφραστεί με τον παρακάτω γενικό τύπο, που δόθηκε από τους Hall-Roothan [2.15,2.16]:

$$\psi_i = \sum_{\mu} c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (2.20)$$

όπου $c_{\mu i}$ είναι οι συντελεστές στους γραμμικούς συνδυασμούς και ϕ_{μ} οι συναρτήσεις βάσης. Οι συναρτήσεις βάσης ορίζονται πρωταρχικές, ενώ ο γραμμικός συνδυασμός αυτών ορίζεται ως συμπυκνωμένη συνάρτηση βάσης. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν δύο τύποι πρωταρχικών συναρτήσεων βάσης (ή ατομικά τροχιακά, AO) που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στους υπολογισμούς της ηλεκτρονιακής δομής, τα τροχιακά τύπου Slater και τα τροχιακά τύπου Gauss [2.17,2.18].

2.5.2 Τροχιακά τύπου Slater και τύπου Gauss

Τα τροχιακά αυτού του τύπου χαρακτηρίζονται από την πολύ καλή περιγραφή της κυματοσυνάρτησης στο χώρο τόσο σε μεγάλες αποστάσεις από τον πυρήνα του ατόμου όσο και κοντά σε αυτόν, και είναι εκθετικές εξισώσεις της μορφής:

$$\chi_{nlm}(r, \theta, \phi) = N_n r^{n-1} \exp[-\zeta r] Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (2.21)$$

όπου, $Y_{lm}(\theta, \phi)$ είναι σφαιρικές αρμονικές, N_n είναι σταθερά κανονικοποίησης και ζ ο εκθέτης του τροχιακού που καθορίζει την έκταση του τροχιακού στον χώρο. Επίσης, τα τροχιακά τύπου Slater προκύπτουν από ένα δυναμικό της μορφής:

$$V(r) = \frac{\zeta n}{r} + \frac{n(n-1) - l(l+1)}{2r^2} \quad (2.22)$$

Αν και είναι πολύ απλές οι εκθετικές τους μορφές και αποτελούν τις καλύτερες συναρτήσεις βάσης, εντούτοις δεν χρησιμοποιούνται στους κβαντοχημικούς υπολογισμούς ηλεκτρονιακής δομής, εκτός από υπολογισμούς στα μεμονωμένα άτομα, σε διατομικά ή γραμμικά μόρια, καθώς ο υπολογισμός των ολοκληρωμάτων των πολυκεντρικών συναρτήσεων είναι πολύ δύσκολος, αν όχι αδύνατος. Έτσι, για να επιταχυνθεί αλλά και να επιτευχθεί ο υπολογισμός σε συστήματα με πολλά άτομα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν συναρτήσεις τύπου Gauss [2.18,2.19]. Οι καινούργιες αυτές συναρτήσεις προτάθηκαν από τον Boys, οι οποίες είναι και αυτές απλές εκθετικές συναρτήσεις και έχουν τη μορφή:

$$\chi_{nlm}(r, \theta, \phi, \zeta) = N_{n\zeta} r^{n-1} \exp[-\zeta r^2] Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (2.23)$$

Όπως είναι φανερό, οι παραπάνω συναρτήσεις διαφέρουν από τις GTO στον εκθετικό παράγοντα $e^{-\zeta r^2}$, διαφορά που έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτει ένα διαφορετικό δυναμικό μέσα στο οποίο κινείται το ηλεκτρόνιο, το οποίο δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$V(r) = 2\zeta^2 r^2 + \frac{n(n-1) - l(l+1)}{2r^2} \quad (2.24)$$

Οι παραπάνω συναρτήσεις GTO, είναι και οι πιο διαδεδομένες, στους υπολογισμούς ηλεκτρονιακής δομής σε πολυατομικά συστήματα εμφανίζουν, όμως, ένα μεγάλο μειονέκτημα, αυτό της μη σωστής περιγραφής της συμπεριφοράς της κυματοσυνάρτησης (ΑΟ) τόσο κοντά στον πυρήνα όσο και μακριά από αυτόν. Το πρόβλημα, όμως, αυτό μπορεί να λυθεί με τη χρησιμοποίηση περισσότερων GTO από ό,τι STO για την περιγραφή μιας συνάρτησης. Τέλος, τα GTO χρησιμοποιούνται συνήθως στους υπολογισμούς, όχι με τη σφαιρική πολική τους μορφή, αλλά με την καρτεσιανή τους, δηλαδή στη μορφή:

$$\chi_{nlm}(x, y, z, \zeta) = N_n x^l y^m z^n \exp[-\zeta r^2] \quad (2.25)$$

Τα l, m, n είναι θετικοί ακέραιοι αριθμοί, με βάση τις τιμές των οποίων χαρακτηρίζονται τα GTO. Ουσιαστικά, το άθροισμα των αριθμών αυτών αντιστοιχεί στο δεύτερο κβαντικό αριθμό l , ο οποίος όπως είναι γνωστό χαρακτηρίζει τον τύπο του τροχιακού.

Έτσι, όταν:

- i. $l+m+n=0$ ή $l=m=n=0$ το GTO τροχιακό είναι τύπου s , με μορφή $\exp[-\zeta r^2]$
- ii. $l+m+n=1$, τότε αν $l=1, m=0, n=0$ το GTO τροχιακό είναι τύπου p_x , με μορφή $x \exp[-\zeta r^2]$. Αν $l=0, m=1, n=0$ το GTO τροχιακό είναι τύπου p_y , με μορφή $y \exp[-\zeta r^2]$ και αν $l=0, m=0, n=1$ το GTO τροχιακό είναι τύπου p_z , με μορφή $z \exp[-\zeta r^2]$.
- iii. $l+m+n=2$, τότε το GTO τροχιακό είναι τύπου d με μορφή $x^2 \exp[-\zeta r^2]$, $y^2 \exp[-\zeta r^2]$, $z^2 \exp[-\zeta r^2]$ ή $xyz \exp[-\zeta r^2]$.

Μερικά από τα σύνολα βάσης που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι:

- Σύνολα ελάχιστης βάσης (Minimal basis sets)
- Σύνολα βάσης διπλού ζήτα (Double zeta basis sets)
- Εκτεταμένα σύνολα βάσης (Extended basis sets)
- Σύνολα βάσης ανάπτυξης STO με STO
- Σύνολα «Διαχωρισμένης» Στιβάδας Σθένους (Slit-valence basis sets)

2.5.3 Σύνολα «Διαχωρισμένης» Στιβάδας Σθένους

Στο πρόγραμμα Gaussian, οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται απαιτούν να καθορίζεται μια βασική συνάρτηση. Όπως αναφέρθηκε, η χρησιμοποίηση συναρτήσεων βάσης STO καθιστά τους κβαντικούς υπολογισμούς δύσκολους αν όχι αδύνατους. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο κάθε συνάρτηση βάσης STO αντικαθίσταται με έναν γραμμικό συνδυασμό GTO και έτσι δημιουργούνται τα σύνολα ανάπτυξης STO με GTO, τα οποία συμβολίζονται ως STO-NG. Έτσι, προκύπτουν σύνολα βάσης, όπως STO-2G, STO-3G, STO-4G.

Όσον αφορά τα σύνολα βάσης, δίνεται μεγαλύτερη ευκαμψία σε ένα STO-NG διακρίνοντας τα τροχιακά της στοιβάδας σθένους σε εσωτερικά και εξωτερικά. Στην περίπτωση αυτή, τα σύνολα βάσης ονομάζονται «διαχωρισμένης» στοιβάδας σθένους (slit-valence basis sets) ή σύνολα βάσης SV. Τα σύνολα αυτά έχουν γενικό τύπο STO $l-mnG$, όπου l δίνει τον αριθμό των GTO που προσομοιάζουν τα τροχιακά της εσωτερικής στιβάδας, ενώ με m και n συμβολίζονται τα «εσωτερικά» και «εξωτερικά» τροχιακά της εξωτερικής στιβάδας σθένους, αντίστοιχα.

Για παράδειγμα, το σύνολο βάσης STO 4-31G για το άτομο του άνθρακα περιέχει 4 τροχιακά τύπου Gauss, που περιγράφουν το $1s$ AO (εσωτερική στιβάδα), 3 τροχιακά GTO που περιγράφουν ένα σύνολο εσωτερικών $2s$ και $2p$ AO (στιβάδα σθένους) και 1 GTO που περιγράφει ένα σύνολο εξωτερικών $2s$ και $2p$ AO (στιβάδα σθένους). Το σύνολο βάσης STO 6-31G περιέχει 6 GTO τροχιακά για την περιγραφή των τροχιακών της εσωτερικής στοιβάδας, 3 τροχιακά GTO που περιγράφουν ένα σύνολο «εσωτερικών» τροχιακών της στοιβάδας σθένους και ένα τροχιακό GTO που περιγράφει το σύνολο των «εξωτερικών» τροχιακών της στοιβάδας σθένους. Η βάση αυτή χρησιμοποιεί τις ίδιες συναρτήσεις βάσης

για την περιγραφή του ατόμου του άνθρακα, αλλά χρησιμοποιούνται περισσότερα τροχιακά GTO, αυξάνοντας την ακρίβεια.

Οι περισσότερες βασικές συναρτήσεις χρησιμοποιούν έναν (31) διαχωρισμό κατά τον οποίο το s και p τμήμα των συναρτήσεων ισορροπίας μοιράζονται τους εκθετικούς παράγοντες των αρχικών Gaussian συναρτήσεων (primitive). Ο περιορισμός της χρησιμοποίησης τεσσάρων συναρτήσεων Gaussian οδηγεί σε ανεπαρκή περιγραφή της ισορροπίας ορισμένων ατόμων, ιδιαιτέρως του οξυγόνου και του φθορίου, καθώς οι 4-31G, 5-31G και 6-31G δεν εκτείνονται πολύ μακριά. Μια εναλλακτική λύση θα μπορούσε να ήταν η χρήση πέντε Gaussian συναρτήσεων, δηλαδή ένας διαχωρισμός της μορφής (32) ή (41). Όμως, ένας τέτοιος διαχωρισμός, κατά κανόνα, δεν είναι τόσο αποτελεσματικός όσο ο (31). Έτσι, η καλύτερη εναλλακτική έγκειται στη χρήση περισσότερων Gaussian συναρτήσεων με τριπλό διαχωρισμό (triple split) της μορφής (311). Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η ευελιξία και βελτιώνεται η περιγραφή του εξωτερικού τμήματος του ατόμου. Έτσι, η βασική συνάρτηση 6-311G αποτελεί μια τριπλού διαχωρισμού συνάρτηση βάσης (triple split-valence basis set), η οποία διαχωρίζει τη στοιβάδα σθένους σε τρία τμήματα, που αντιπροσωπεύονται από τρία, ένα και ένα τροχιακά GTO, αντίστοιχα [2.21,2.22].

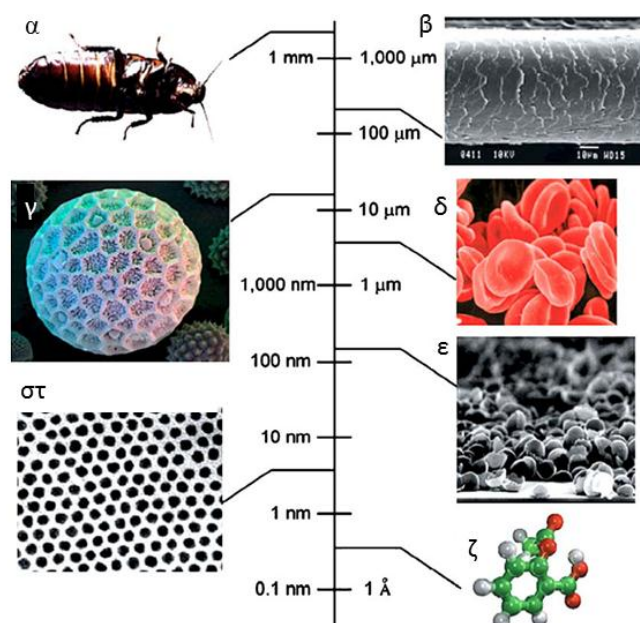
Βιβλιογραφία 2^ο Κεφαλαίου

- 2.1 <http://www.tau.ac.il/~ephraim/intro2comp.pdf>
Introduction to Computational Chemistry Laboratory, Tel Aviv University
- 2.2 Σημειώσεις Ειδικών Κεφαλαίων Φυσικοχημείας, Κ. Βύρας – Α. Παπακονδύλης, Αθήνα (2006)
- 2.3 Semi-empirical methods of quantum chemistry, J. Sadlej, Horwood (1985)
- 2.4 A Chemist's Guide to Density Functional Theory. Second Edition, Wolfram Koch, Max C. Holthausen Wiley (2001)
- 2.5 Δεπάστας Ιωάννης, Μελέτη της δομής των ηλεκτρονικών, μαγνητικών και οπτικών ιδιοτήτων των αρωματικών cyclo-Cu₃Au₃ ομότοπων (2007)
- 2.6 C. David Sherrill, An Introduction to Hartree-Fock Molecular Orbital Theory, June 2000
- 2.7 D. R. Hartree, The Calculations of Atomic Structures, Wiley (1957)
- 2.8 Κωνσταντίνος Τσίπης, Εισαγωγή στην κβαντική χημεία, Τόμος I (1984)
- 2.9 Κωνσταντίνος Τσίπης, Εισαγωγή στην κβαντική χημεία, Τόμος II (1984)
- 2.10 Introduction To Computational Chemistry. Second Edition, Frank Jensen, Wiley, 2007
- 2.11 David S. Sholl, Janice A. Steckel, Density Functional Theory- A Practical Introduction, John Wiley And Sons (2009)
- 2.12 Eberhard Engel, Reiner M. Dreizler, Density Functional Theory, Springer (2011)
- 2.13 Becke A. D., J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648
- 2.14 Lee C., Yang W., Parr R. G., Phys. Rev. B37 (1988) 785
- 2.15 G. G. Hall, Proc. Roy. Soc. A205 (1951) 541
- 2.16 C. C. J. Roothaan, Rev. Mol. Phys 23 (1951) 69
- 2.17 J. C. Slater, Phys. Rev. 36 (1930) 57
- 2.18 S.F. Boys, Proc. Roy. Soc. A200 (1950) 542
- 2.19 J.B. Foresman, Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, Gaussian, Inc.
- 2.20 Χρήστος Κεφαλίδης, Κβαντοχημική Μελέτη των Καταλυτικών Κύκλων της Υδροσυλβίωσης, Υδροκυανίωσης και Υδροαμίνωσης Αλκενίων και Αλκινίων με Καταλύτες Διπυρηνικά Σύμπλοκα του Λευκόχρυσου, Θεσσαλονίκη (2008)
- 2.21 R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. A basis set for correlated wave functions, J. Chem. Phys. 72(1) (1980) 650-654
- 2.22 F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry John Wiley & Sons (1999)

Κεφάλαιο 3^ο

3.1 Εισαγωγή

Το πρόθεμα νανο- προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και συγκεκριμένα από την λέξη νάνος. Πατέρας της επιστήμης της Νανοτεχνολογίας θεωρείται ο φυσικός Richard Feynman, ο οποίος αναφέρθηκε στο εννοιολογικό υπόβαθρο σχετικά με τη νανοτεχνολογία σε ομιλία του το 1959 με τίτλο “There’s plenty of room at the bottom”, στα πλαίσια της ετήσιας συνάντησης φυσικών στο Ινστιτούτο Τεχνολογιών της Καλιφόρνιας. Ουσιαστικά, υπογράμμισε τη δυνατότητα χειρισμού των υλικών σε επίπεδο ατόμων και μορίων και έφερε ως παράδειγμα ότι η εγκυκλοπαίδεια Britannica μπορεί να γραφτεί στην κεφαλή μιας καρφίτσας. Στις μέρες μας, η Νανοτεχνολογία αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο, διεπιστημονικό πεδίο που βρίσκει εφαρμογές στη μηχανική και στην παρασκευή υλικών σε μοριακό επίπεδο [3.1,3.2]. Όπως έχει τονίσει ο Gourley (2005), ο κλάδος της Νανοτεχνολογίας μπορεί να χωριστεί σε διάφορες κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν τη νανοβιοτεχνολογία (nanobiotechnology), τα βιολογικά μικρο-ηλεκτρομηχανικά συστήματα (micro-electromechanical systems), τη μικρορευστοδυναμική (microfluidics), τους βιοανιχνευτές (biosensors), τις μικροσυστοιχίες (microarrays) και τη μικρομηχανική ιστών (tissue microengineering) [3.3].



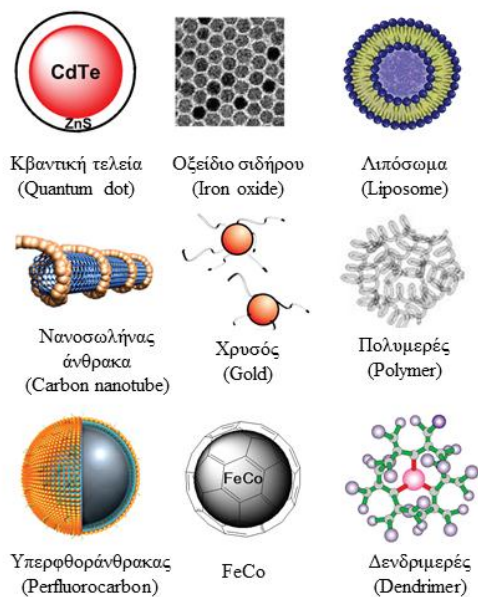
Εικόνα 3.1 Σχετικά μεγέθη μικρών αντικειμένων (α) κατσαρίδα, (β) ανθρώπινη τρίχα, (γ) κόκκοι γύρης, (δ) ερυθρά αιμοσφαίρια, (ε) νανοσωματίδια κοβαλτίου, (στ) νανοσωματίδια παλλαδίου και (ζ) μόριο ασπιρίνης

Ο τομέας της Νανοϊατρικής και συγκεκριμένα η ανάπτυξη αποτελεσματικών κλινικών μεθόδων που βασίζονται στη Νανοτεχνολογία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες της (Freitas, 1999). Η Νανοϊατρική εξαρτάται από διάφορες αλληλένδετες τεχνολογίες, που εντάσσονται στο πλαίσιο νέων αλλά και σταδιακά αναπτυσσόμενων πεδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται (α) η κατασκευή νανοδομών που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση, στους βιοαισθητήρες και στη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery), (β) η περαιτέρω εμβάθυνση της γνώσης της γονιδιωματικής (genomics), της πρωτεϊνωματικής

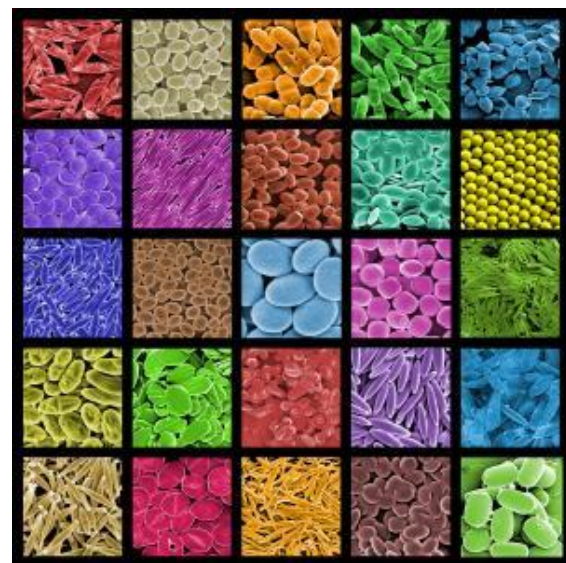
(proteomics) και της νανο-μηχανικής και (γ) η δημιουργία κατάλληλων μοριακών δομών που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να εξουδετερώνουν παθογόνους ξενιστές, να αντικαθιστούν ή να αποκαθιστούν κύτταρα ή κυτταρικά συστατικά *in vivo* [3.3].

3.2 Πολυμερικοί νανοφορείς φαρμάκων

Η κατασκευή νανοδομών, και συγκεκριμένα νανοσωματιδίων (nanoparticles) διαφόρων σχημάτων, μεγεθών και συνθέσεων έχει προκαλέσει θεμελιώδεις αλλαγές στη χρήση της Νανοτεχνολογίας στα βιολογικά συστήματα. Έτσι λοιπόν, η χρήση της Νανοτεχνολογίας στον τομέα της Ιατρικής, και συγκεκριμένα στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπου καρκίνου εμπεριέχει πολλές εφαρμογές. Αναλυτικότερα, υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες νανοσωματιδίων, αυτά που περιέχουν οργανικά και αυτά που περιέχουν ανόργανα μόρια. Τα λιποσώματα, τα δενδριμερή και οι νανοσωλήνες άνθρακα, όπως και άλλα πολυμερή αποτελούν βασικά παραδείγματα των οργανικών σωματιδίων. Ως ανόργανα σωματίδια χρησιμοποιούνται το φωσφορικό ασβέστιο, ο χρυσός, ο άργυρος, το οξείδιο του πυριτίου, το οξείδιο του σιδήρου και τα υδροξείδια διπλών επιπέδων (layered double hydroxide, LDH) [3.4,3.5].



Εικόνα 3.2 Τα είδη των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά φαρμάκων [3.6]



Εικόνα 3.3 Πολυμερικά μικρο- και νανοσωματίδια σε διάφορα σχήματα και μεγέθη [3.7]

Τα τελευταία έτη, ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον έχει δοθεί στην κατασκευή πολυμερικών νανοφορέων φαρμάκων. Στην ιδανική περίπτωση, οι φορείς αυτοί θα πρέπει να στοχεύουν (target) στην παθολογική περιοχή για να παρέχουν τη μέγιστη δυνατή θεραπευτική δράση. Επίσης, η χρήση τους έχει ως σκοπό να ελαχιστοποιήσει την αποδόμηση του φαρμάκου (drug degradation) και την απενεργοποίησή (inactivation) του κατά την χορήγηση, να αποτρέψει τυχόν παρενέργειες, όπως επίσης να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητά του και την ποσότητα που μεταφέρεται στην περιοχή-στόχος. Γενικά, οι φορείς αυτοί θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από βιοαποδομησιμότητα, χαμηλό κόστος παραγωγής, μικρό

μέγεθος, μεγάλη χωρητικότητα αποθήκευσης του φαρμάκου και να συγκεντρώνεται σε συγκεκριμένες περιοχές του ανθρώπινου σώματος μην επεμβαίνοντας στην καλή κυκλοφορία του αίματος [3.8,3.9,3.10].

Τα λιποσωμικά συστήματα είναι τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν για να μεταφέρουν φάρμακα (drug carrier or delivery) ή βιολογικά ενεργές ενώσεις εντός των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από καρκίνο. Συγκεκριμένα, η εμπορική ονομασία του σκευάσματος είναι Doxil και αποτελείται από λιποσώματα που στη επιφάνειά τους φέρουν ομάδες πολυ(αιθυλογλυκόλης) (polyethylene glycol-PEG) και στα οποία έχει εγκλειστεί ένα φάρμακο, η δοξορουβικίνη, η δομή και οι ιδιότητες της οποίας θα αναλυθούν παρακάτω. Τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, ώστε το περιεχόμενό τους να διαχέεται στο προβληματικό κύτταρο [3.4,3.5]. Το σύστημα αυτό μεταφοράς φαρμάκου (drug delivery system) χαρακτηρίζεται από μειωμένη τοξικότητα (toxicity) και υψηλή και επιλεκτική θεραπευτική δράση κατά του καρκίνου, συγκρινόμενο με τη χορήγηση της ελεύθερης δοξορουβικίνης [3.11].

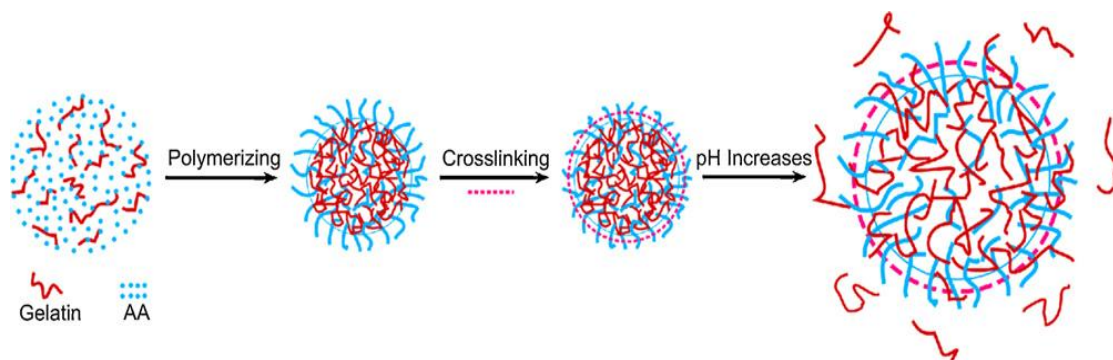


Εικόνα 3.4 Σχηματική απεικόνιση του «πεγκυλιωμένου» λιποσώματος

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην ανάπτυξη μεθόδων κατασκευής κενών (κούφιων) (hollow) πολυμερικών σφαιρών, που το μέγεθός τους κυμαίνεται από την κλίμακα του νανομέτρου μέχρι κάποια μικρόμετρα, λόγω του μεγάλου εύρους εφαρμογής τους, όπως ο εγκλωβισμός (encapsulation) φαρμάκων και ενζύμων με σκοπό την ελεγχόμενη αποδέυσμεσή (release) τους, οι χρωστικές ουσίες (pigments) και οι καταλύτες (catalysts). Οι σφαίρες αυτές παρουσιάζουν απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα (external stimuli response), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στις μακροσκοπικές ιδιότητες, τις διαστάσεις, τη δομή και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια. Τα εξωτερικά αυτά ερεθίσματα περιλαμβάνουν μεταβολές στο pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ του διαλύματος (ion-strength) και του μαγνητικού πεδίου (magnetism). Οι πολυμερικές αυτές κάψουλες έχουν ερευνηθεί με μεγάλη προσοχή από τους επιστήμονες λόγω της δυνητικής αλλά και πρακτικής χρήσης τους σε πολλές βιολογικές εφαρμογές [3.10,3.12].

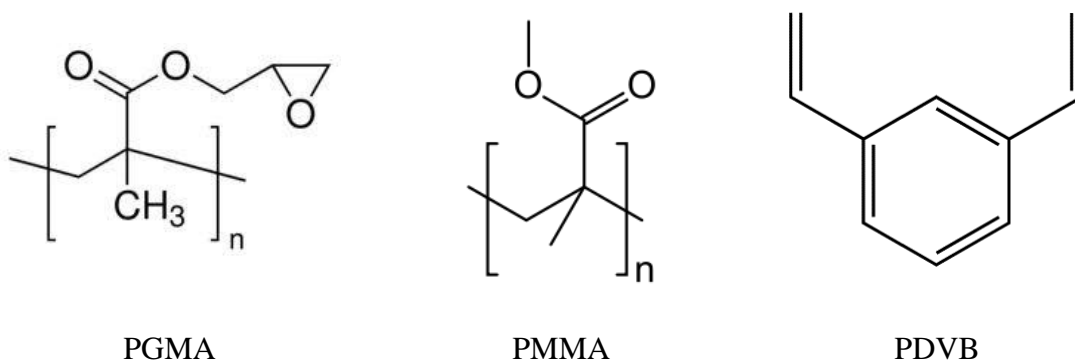
Τα πιο σημαντικά πολυμερικά συστήματα, από βιολογικής απόψεως, είναι εκείνα τα οποία παρουσιάζουν ευαισθησία σε αλλαγές του περιβάλλοντος pH και σε αυτά θα επικεντρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία. Τα pH-ευαίσθητα πολυμερή είναι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες που φέρουν στη δομή τους όξινες ή βασικές ομάδες (καρβοξυλικές, φωσφορικές ή αμιδικές λειτουργικές ομάδες) που είτε είναι δέκτες ή δότες πρωτονίων, ως απόκριση στην αλλαγή του pH του περιβάλλοντός τους. Τα όξινα πολυμερή δεν αποκρίνονται σε χαμηλές τιμές του pH, καθώς οι όξινες ομάδες πρωτονιώνονται και δεν

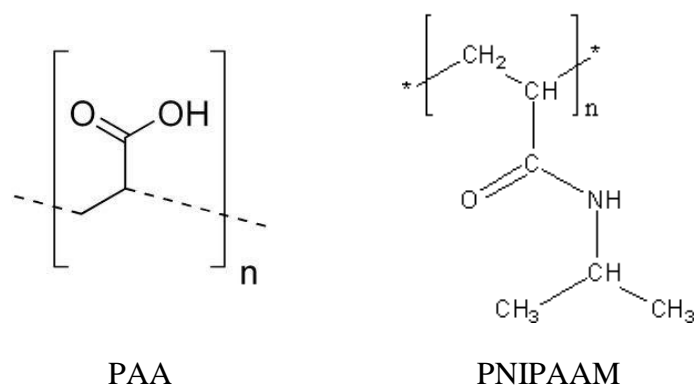
υφίσταται αλλαγή του βαθμού ιονισμού τους. Όταν όμως το pH αυξάνεται, ένα αρνητικά φορτισμένο πολυμερές διογκώνεται. Η αντίθετη συμπεριφορά συναντάται στα βασικά πολυμερή, καθώς ο ιονισμός των βασικών ομάδων αυξάνεται με τη μείωση του pH. Οι αλλαγές στο pH προκαλούν μετατόπιση στη χημική ισορροπία και αλλαγές στον βαθμό ιονισμού (ionization degree) του πολυμερικής αλυσίδας. Στην περίπτωση της μείωσης του pH, η οσμωτική πίεση λόγω της μείωσης του βαθμού ιονισμού, έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση (swelling) του σωματιδίου. Η απόκριση αυτή μπορεί να παρατηρηθεί από την αλλαγή της θολότητας (turbidity) του διαλύματος. Επομένως, η συμπεριφορά της απόκρισης μπορεί να περιγραφεί ως αλληλουχία των εξής βημάτων: (α) αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τα πρωτόνια και ιονισμός του πολυμερούς – λήψη του σήματος, (β) διόγκωση του πολυμερικού συστήματος – αλλαγή των ιδιοτήτων του υλικού και (γ) μετάβαση από θολό σε διαυγές διάλυμα – απόκριση [3.10,3.13].



Εικόνα 3.5 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος ζελατίνη (gelatin)/ακρυλικού οξέος (AA), η απόκρισή του κατά την μείωση του pH και η παρατηρούμενη διόγκωση [3.10]

Τυπικά παραδείγματα pH-ευαίσθητων πολυμερών που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, αλλά και χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία είναι: ο πολυ(γλυσιδολικός μεθυλεστέρας) – PGMA, poly(glycidyl methacrylate), πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) – PMMA, poly(methyl methacrylate), το πολυ(διβινυλικό βενζόλιο) – PDVB, poly(divinyl benzene), το πολυ(ακρυλικό οξύ) – PAA, poly(acrylic acid) και το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) – PNIPAAm, poly(N-isopropylacrilamide).





Εικόνα 3.6 Η δομή των πολυμερών

Τα πολυμερή αυτά που χρησιμοποιούνται συντήθενται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργήσουν μια δομή πυρήνα-κελύφους (core-shell structure). Η παρασκευή τέτοιων νανοδομών αποτελεί μια αποδοτική προσέγγιση για τη σύνθεση «έξυπνων» πολυμερικών συστημάτων που αποκρίνονται σε διαφόρων ειδών ερεθίσματα. Πολλές core-shell δομές έχουν συντεθεί σε δύο βήματα, στα οποία η σύνθεση νανοσωματιδίων από μέταλλα, οξείδια και πολυμερή διαφορετικών σχημάτων και μεγεθών, καθορίζεται από τη λειτουργικότητα για την οποία προορίζονται. Ένας πυρήνας από πολυμερές, μέταλλο ή οξείδιο του μετάλλου μπορεί να παρασκευασθεί με κάποιου είδους πολυμερισμό (π.χ. ριζικός πολυμερισμός, πολυμερισμός γαλακτώματος) και στη συνέχεια ένα πολυμερικό κέλυφος σχηματίζεται γύρω από τον πυρήνα. Αυτή είναι η μέθοδος για την παρασκευή κενών δομών που αποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους [3.10].

Τα pH-ευαίσθητα πολυμερή χρησιμοποιούνται σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Οι πιο σημαντικές αφορούν τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και γονιδίων (drug and gene delivery systems) και τους ανιχνευτές γλυκόζης (glucose sensors).

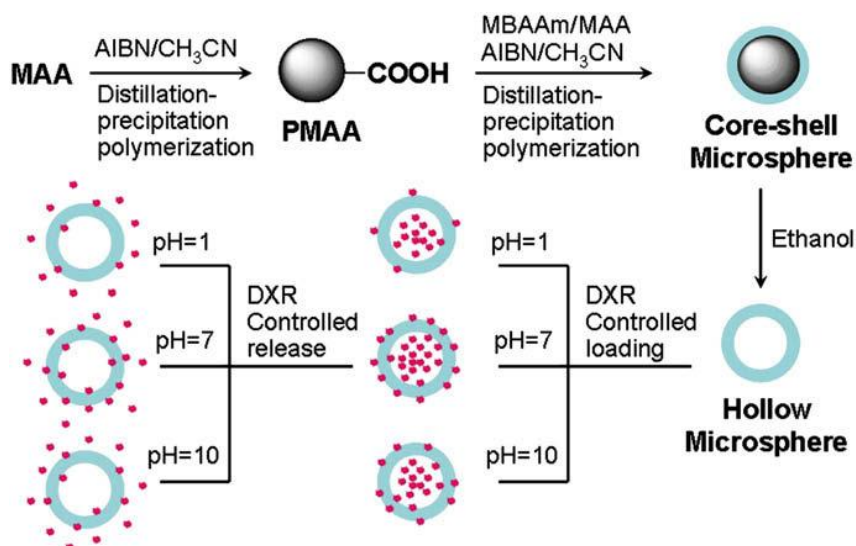
Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, το pH κύμνεται μεταξύ του 2 (στομάχι) και του 10 (παχύ έντερο). Το γεγονός αυτό καθιστά τα pH-ευαίσθητα πολυμερή ιδανικά για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου στο γαστρεντερικό σύστημα. Έτσι, χρησιμοποιούνται πολυμερή που ανθίστανται στην αποσύνθεση σε όξινο περιβάλλον και απελευθερώνουν το φάρμακο σε αλκαλικό μέσο. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα αυτού του είδους πολυμερών, τα οποία κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο, π.χ. το Eudragit L και το Eudragit S από την εταιρία Röhm Pharma GmbH (βασίζεται στο μεθακρυλικό οξύ και στο μεθακρυλικό μεθυλεστέρα), το CMEC από την εταιρία Freund Sangyio Co. (βασίζεται στη σελουλόζη). Ένας μεγάλος αριθμός πολυσακχαριτών, όπως η αμυλόζη, η πηκτίνη, η χιτοσίνη, η ινσουλίνη, η θεική χονδοϊτίνη και η δεξτράνη έχουν διερευνηθεί για τη στοχευμένη αποδέσμευση φαρμάκου στην περιοχή του παχέος εντέρου [3.14,3.15].

Ο Bellomo και οι συνεργάτες του [3.16] έχουν παρασκευάσει ένα σύστημα μεταφοράς που αποτελείται από αμφιφιλικά τμήματα πολυπεπτιδίων. Η υδροφιλική στοιβάδα αποτελείται από λυσίνη και ορισμένες υδατοδιαλυτές ομάδες αιθυλενογλυκόλης, ενώ η υδροφοβική από πεπτιδία λευκίνης. Το συνθετικό αυτό πολυμερές αποτελεί μια δομή που

είναι πολύ ευαίσθητη σε αλλαγές του περιβάλλοντος, αποκρίνεται αποκλειστικά σε αλλαγές του pH και χρησιμοποιείται ως σύστημα μεταφοράς φαρμάκων.

Ο Yang et al. [3.12] έχει συνθέσει pH-ευαίσθητες κενές πολυμερικές σφαίρες μέθοδο πολυμερισμού μέσω καταβύθισης μετά από απόσταξη. Οι πολυμερικές αυτές σφαίρες φορτώθηκαν με φάρμακο, τη δοξορουβικίνη, είχαν συγκεκριμένο μέγεθος, δομή core-shell και αποελούνταν από τα πολυμερή: poly(N,N'-methylene bisacrylamide-co-methacrylic acid) - (P(MBAAm-co-MAA)). Χρησιμοποιήθηκαν για ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου σε διάφορες τιμές του pH, όπως δείχνει η παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 3.7 Παρασκευή των κούφιων νανοφορέων και η συμπεριφορά τους στη φόρτωση και αποδέσμευσή του φαρμάκου σε διαφορετικά pH [3.17]

Συστήματα μεταφοράς γονιδίων

Οι πολυηλεκτρολύτες έχουν μεγάλες δυνατότητες ως βιοϋλικά, καθώς μπορούν να μεταφέρουν αντίθετα φορτισμένα μόρια. Μία από τις πλέον υποσχόμενες εφαρμογές των πολυμερών αυτών είναι ως μη ιογενείς φορείς γονιδίων (non-viral gene carries). Το μόριο του DNA είναι πολύ δύσκολο να εισαχθεί στα κύτταρα, διότι είναι αρνητικά φορτισμένο και έχει μεγάλο μέγεθος σε φυσιολογικές συνθήκες. Τα λιποσώματα και τα πολυκατιόντα είναι οι δύο κύριες κατηγορίες χημικών (μη ιογενών) μεθόδων μεταφοράς γονιδίων, ώστε το DNA να ενσωματωθεί σε νανοσωματίδια, τα οποία με τη σειρά τους δύναται να μεταφερθούν σε συγκεκριμένα τμήματα των κυττάρων. Οι Godbey και Mikos έλαβαν υπ' όψιν τους την πρόοδο που συντελείται σε αυτό το τομέα [3.18] και περιέγραψαν τη χρήση της πολυ(αιθυλαμίνης) – poly(ethylenimine), PEI, και της πολυ(L-λυσίνης) – poly(L-lysine), PLL, ως από τα πιο καίρια πολυμερή για αυτή την εφαρμογή. Το PEI είναι ένα πολυκατιοντικό συνθετικό πολυμερές το οποίο έχει την ικανότητα να συμπυκνώνει το DNA σε υδατικό διάλυμα, σχηματίζοντας σύμπλοκα που εύκολα ενδοκυτταρώνονται από πολλούς τύπους κυττάρων. Η χιτοσίνη είναι ένας βιοσυμβατός και απορροφήσιμος κατιοντικός αμινοπολυσακχαρίτης που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως σύστημα μεταφοράς του DNA [3.19-3.23].

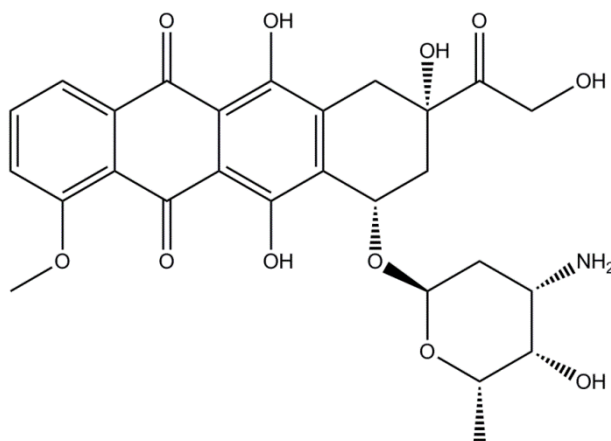
Ο Kataoka [3.24] υπογράμμισε την ανάπτυξη πολυμερικών μικκυλίων ως μεταφορείς φαρμάκων και γονιδίων που βασίζονται στη δοξορουβικίνη που είναι ενωμένη με ένα συμπολυμερές το poly(ethylene glycol)-poly(aspartame hydrazine doxorubicin) [(PEG-p(Asp-Hid-dox)]. Το πολυμερές αυτό διατήρησε τα φάρμακα και τα γονίδια σε φυσιολογικό pH και τα απελευθέρωσε όταν το pH μειώθηκε κάτω από το 6.

Ανιχνευτές γλυκόζης

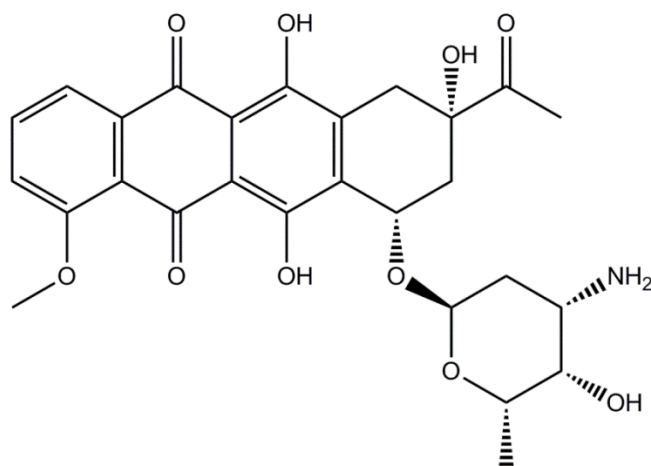
Μία από τις πιο σημαντικές των pH-ευαίσθητων πολυμερών είναι η κατασκευή συστημάτων μεταφοράς ινσουλίνης για τη θεραπεία των διαβητικών ασθενών. Η μεταφορά της ινσουλίνης είναι διαφορετική σε σχέση με άλλα φάρμακα, καθώς θα πρέπει να μεταφερθεί σε συγκεκριμένη ποσότητα και σε ακριβή χρόνο. Πολλές συσκευές έχουν αναπτυχθεί για αυτό το σκοπό και έχουν έναν ενσωματωμένο αισθητήρα γλυκόζης στο σύστημα. Σε ένα περιβάλλον που είναι πλούσιο σε γλυκόζη, όπως η κυκλοφορία του αίματος μετά από ένα γεύμα, η οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ καταλύεται από την οξειδάση της γλυκόζης (glucose oxidase, GluOx) και μπορεί να μειώσει το pH περίπου στο 5.8. Αυτό το ένζυμο είναι όσως το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο στην ανίχνευση της γλυκόζης και το καθιστά δυνατό στην εφαρμογή του σε διάφορους τύπου pH-ευαίσθητων υδροπηκτών για βελτιωμένη χορήγηση της ινσουλίνης [3.25].

3.3 Δοξορουβικίνη και δαουνορουβικίνη

Οι ανθρακυκλίνες (anthracyclines) αποτελούν από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί για την αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου (Weiss, 1992). Οι ανθρακυκλίνες ορίζονται σαν ενώσεις με αντιβιοτική δράση, που περιέχουν ένα τετραϋδروναφθαλινικό δακτύλιο. Οι πρώτες ανθρακυκλίνες απομονώθηκαν στις αρχές του 1960 από τη χρωστική ουσία που παρήγαγε ο μικροοργανισμός *Streptomyces peuceitius*. Δύο από τα πιο σημαντικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα και θα μελετηθούν στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι η δοξορουβικίνη (doxorubicin, DOX) και η δαουνορουβικίνη (daunorubicin, DNR), η δομή των οποίων φαίνεται στις παρακάτω εικόνες [3.26].



Εικόνα 3.8 Η δομή της δοξορουβικίνης



Εικόνα 3.9 Η δομή της δαουνορουβικίνης

Είναι τετρακυκλικά μόρια, που αποτελούνται από τρεις επίπεδους και αρωματικούς υδροξυ-ανθρακοκινονικούς δακτυλίους, που λειτουργούν ως χρωμοφόρο (chromophore) και έναν μη γραμμικό και μη αρωματικό δακτύλιο που ενώνεται με μια αμινο-γλυκοζυτική πλευρική ομάδα. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο ενώσεων έγκειται στο ότι η πλευρική ομάδα της DOX, και συγκεκριμένα ο C-14, τερματίζει με μια αλκοολική ομάδα (-CH₂OH), ενώ της DNR με ένα μεθύλιο (-CH₃). Η διαφορά αυτή δεν είναι ασήμαντη, καθώς έχει διάφορες συνέπειες στη φασματοσκοπική μελέτη τους.

Η κλινική χρήση και των δύο φαρμάκων γρήγορα έδειξε ότι χαρακτηρίζεται από ορισμένες παρενέργειες και προβλήματα, όπως η ανάπτυξη της αντίστασης (resistance) στα καρκινικά κύτταρα ή η τοξικότητα (toxicity) σε υγιείς ιστούς, που κυρίως εμφανίζονται ως χρόνια μυοκαρδιοπάθεια (chronic cardiomyopathy) και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (congestive heart failure, CHF). Για τη βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης των φαρμάκων, αλλά και συγχρόνως για τη μείωση των συνεπειών της τοξικότητάς τους έχουν αναπτυχθεί καινοτόμες τεχνικές, όπως ο εγκλεισμός τους σε πολυμερικές δομές (polymeric shells) και σε νανοδοχεία (nanocapsules) [3.27].

Παρ' όλη την εκτενή κλινική χρήση, οι μηχανισμοί δράσης των ανθρακυκλινών στα καρκινικά κύτταρα παραμένουν ακόμα αβέβαιοι. Ορισμένοι μηχανισμοί που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία [3.26] και μπορούν να εξηγήσουν τη συμπεριφορά τους περιγράφονται ως εξής:

- α. παρεμβολή (intercalation) στο DNA, οδηγώντας σε αναστολή της σύνθεσης των μακρομορίων
- β. παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οδηγώντας σε καταστροφή του DNA ή σε υπεροξείδωση των λιπιδίων
- γ. άμεση σύνδεση στις κυτταρικές μεμβράνες (membrane effects)
- δ. αναστολή της τοποϊσομεράσης II (topoisomerase II)

Βιβλιογραφία 3^ο Κεφαλαίου

- 3.1 Κ.Α. Χαριτίδης, NANOΔΟΜΕΣ & NANOΥΛΙΚΑ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΠ, 2011
- 3.2 Κ.Α. Χαριτίδης, Τ.Κ. Βιδάλης, Νανοεπιστήμες και Νανοτεχνολογίες: Το αίτημα της ρύθμισης, Εκδόσεις Σάκκουλα 2010, Σειρά: Δίκαιο & Κοινωνία στον 21ο αιώνα, ISBN: 978-960-445-617-8
- 3.3 Dwaine F. Emerich, Christopher G. Thanos, The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis, *Biomolecular Engineering* 23 (2006) 171–184
- 3.4 O'Regan, Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer: A review 7 (2006)
- 3.5 Zhi Ping Xu, Qing Hua Zeng, Gao Qing Lu, Ai Bing Yu, Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 1027 – 1040
- 3.6 Weibo Cai, Ting Gao, Hao Hong, Jiangtao Sun, Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology* 1 (2008) 17-32
- 3.7 How To Make Polymeric Micro And Nanoparticles, *ScienceDaily* (2007)
- 3.8 Srinivas Ganta, Harikrishna Devalapally, Aliasgar Shahiwala, Mansoor Amiji, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release* 126 (2008) 187–204
- 3.9 Vladimir P. Torchilin, Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging, *The AAPS Journal* 9 (2) (2007) E128-147
- 3.10 Mikhail Motornov, Yuri Roiter, Ihor Tokarev, Sergiy Minko, Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 174-211
- 3.11 Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y., Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes, *Cancer Res.* 54(4) (1994) 987-92
- 3.12 Xiaoying Yang, Liting Chen, Bo Huang, Feng Bai, Xinlin Yang, Synthesis of pH-sensitive hollow polymer microspheres and their application as drug carriers, *Polymer* 50 (2009) 3556–3563
- 3.13 Stephanie J. Grainger, Mohamed E. H. El-Sayed, Stimuli-Sensitive Particles For Drug Delivery,
- 3.14 Chourasia MK, Jain SK., Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharmaceut Sci* 6 (2003) 33-66
- 3.15 Chourasia MK, Jain SK. Polysaccharides for colon targeted drug delivery . *Drug Delivery* 11 (2004) 129-148
- 3.16 Jones RAL. Biomimetic polymers: Tough and smart. *Nat Mater* 3 (2004) 209-210
- 3.17 M.R.Aguilar*, C. Elvira, A. Gallardo, B. Vázquez, and J.S. Román, Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials, *Topics in Tissue Engineering* 3 (2007)
- 3.18 Godbey WT, Mikos AG. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release* 2001;72:115-125
- 3.19 Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:145-150
- 3.20 Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 24 (2003) 1255-1264

- 3.21 Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 15 (1998) 1332-1339
- 3.22 Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514 (2001) 51-64
- 3.23 Leong KW, Mao HQ, Truong L, Roy K, Walsh SM, August JT. DNA polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Control Release* 53 (1998) 183-193
- 3.24 Kataoka K. Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery 4-5 (2004)
- 3.25 Podual K, Doyle III, Peppas NA. Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase. *Polymer* 41 (2000) 3975-3983
- 3.26 Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol Rev.* 56(2) (2004) 185-229
- 3.27 Gobind Das, Annalisa Nicastrì, Maria Laura Coluccio, Francesco Gentile, Patrizio Candeloro, Gheorghe Cojoc, Carlo Liberale, Francesco De Angelis, Enzo Di Fabrizio, FT-IR, Raman, RRS Measurements and DFT Calculation for Doxorubicin, *Microscopy Research And Technique* 73 (2010) 991-995

Κεφάλαιο 4^ο

4.1 Πειραματική Διαδικασία

4.1.1 Παρασκευή πολυμερικών νανοφορέων φαρμάκων

Σφαίρες πολυ(γλυσιδικικού μεθυλεστέρα) (poly(glycidyl methacrylate)-PGMA) και κενές σφαίρες πολυ(γλυσιδικικού μεθυλεστέρα@μεθακρυλικού μεθυλεστέρα-co-διβινυλοβενζολίου-co-ακρυλικού οξέος) (poly(glycidyl methacrylate@methyl methacrylate-co-divinyl benzene-co-acrylic acid)-P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA) συνετέθησαν με την τεχνική πολυμερισμού γαλακτώματος (emulsion polymerization), χαρακτηρίστηκαν δομικά με φασματοσκοπία IR και Raman και μορφολογικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Από την παραπάνω μελέτη, προέκυψαν σφαίρες μεγέθους 310 ± 10 nm, οι οποίες παρουσιάζουν pH ευαισθησία. Οι σφαίρες στη συνέχεια, φορτώθηκαν με το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη (Doxorubicin, DOX) και μελετήθηκε η ικανότητα απελευθέρωσής του σε διαφορετικό περιβάλλον pH. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς επικάλυψης και του εγκλεισμού (encapsulation) του φαρμάκου έγινε μελέτη των δειγμάτων με φασματοσκοπία Raman. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, ο δομικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών νανοσφαιρών, του φαρμάκου αλλά και των νανοδοχείων που εμπεριέχουν το φάρμακο πραγματοποιείται με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας Raman, τα φάσματα των οποίων φαίνονται παρακάτω. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με laser που εκπέμπει στα 785 nm σε όλο το φασματικό εύρος $0-3000 \text{ cm}^{-1}$ [4.1].

Σφαίρες πολυ(μεθακρυλικού οξέος) poly(methacrylic acid)-PMAA παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο πολυμερισμού μέσω καταβύθισης μετά από απόσταξη (distillation precipitation polymerization) [4.2]. Ο πυρήνας των σφαιρών απομακρύνθηκε μετά από παραμονή τους σε απόλυτη αιθανόλη για 24 ώρες. Οι κενές σφαίρες που προέκυψαν, χαρακτηρίστηκαν δομικά με φασματοσκοπία Raman και IR και μορφολογικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Η μέθοδος εγκλεισμού της δαουνορουβικίνης (Daunorubicin, DNR) στους πολυμερικούς νανοφορείς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την βιβλιογραφία [4.3]. Συγκεκριμένα, η DNR προστέθηκε σε εναιώρημα (suspension) των PMAA νανοφορέων που παρασκευάστηκαν σε ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4 (τελική συγκέντρωση νανοφορέων 1 mg/mL). Στη συνέχεια, το σύστημα που προέκυψε αφέθηκε σε ήπια ανάδευση (gentle agitation) για τρεις μέρες στους $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Η DNR που δεν φορτώθηκε αφαιρέθηκε μετά από φυγοκέντρωση και η συγκέντρωσή της μετρήθηκε με τη μέθοδο φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) στα 482 nm. Τέλος, για την αξιολόγηση των δυνατικών εφαρμογών αυτών των δομών, μετρήθηκαν δύο σημαντικές παράμετροι, η ικανότητα φόρτωσης του φαρμάκου (drug loading capacity-DLC) σύμφωνα με τη σχέση: $\text{DLC} (\%) = (\text{βάρος του φαρμάκου που έχει φορτωθεί} / \text{αρχικό βάρος του φαρμάκου}) \times 100$, και η απόδοση του εγκλεισμού (encapsulation efficiency-EE) σύμφωνα με τη σχέση: $\text{EE} (\%) = (\text{βάρος του$

φαρμάκου που έχει φορτωθεί / βάρος των κούφιων νανοσφαιρών). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, DLC = 40.7% και EE = 90.7%.

Σφαίρες πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου-co-μεθακρυλικού οξέος) poly(N-isopropylacrilamide-co-methacrylic acid – P(NIPAAm-co-MAA) συνετέθησαν με τη μέθοδο πολυμερισμού μέσω καταβύθισης μετά από απόσταξη, σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία. Η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι λόγω της φωτοευαισθησίας του PNIPAAm, η ήπια ανάδευση πραγματοποιείται στους 10 °C. Όσον αφορά τις παραμέτρους DLC και EE, αυτές υπολογίστηκαν 41% και 91.2% αντίστοιχα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με laser που εκπέμπει στα 785 nm σε όλο το φασματικό εύρος 0-3000 cm^{-1} .

4.1.2 Παρασκευή ενεργών υποστρωμάτων για επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS)

4.1.2.1 Παρασκευή κολλοειδούς αργύρου

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml προστέθηκαν, υπό μαγνητική ανάδευση, 99 ml αποσταγμένο νερό, 2.2 mg νιτρικού αργύρου (AgNO_3) και 8.2 mg κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Το διάλυμα ψύχθηκε για 15 λεπτά σε λουτρό πάγου, καθώς ταυτόχρονα έγινε απαέρωση με αέριο άζωτο (N_2). Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 1 ml υδατικού διαλύματος τετραϋδροβορικού νατρίου (NaBH_4) και το διάλυμα αφέθηκε για 1 ώρα υπό συνεχόμενη μαγνητική ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της αντίδρασης (το αρχικά διαυγές διάλυμα άλλαξε σε κίτρινο χρώμα) ή το αρχικά διαυγές διάλυμα μετατράπηκε σε κίτρινο, το οποίο είναι ένδειξη της ολοκλήρωσης της αντίδρασης [4.4].



Εικόνα 4.1 Παρασκευή κολλοειδούς αργύρου

4.1.2.2 Παρασκευή λεπτού υμενίου αργύρου

Η παρασκευή του υποστρώματος SERS έγινε με την μέθοδο της Χημικής Εναπόθεσης Ατμού (Chemical Vapor Deposition-CVD) πάνω σε βοριοπυριτικό γυαλί (borosilicate glass) διαστάσεων 22×22 mm. Πριν την εναπόθεση του αργύρου, το γυαλί αφέθηκε για 24 ώρες σε διάλυμα θειϊκού οξέος (H_2SO_4) και υπεροξειδίου του

υδρογόνου (H_2O_2) σε αναλογία 3:1. Κατόπιν, έγινε έκπλυση με υπερκάρθρο νερό και ξήρανση με αέριο άζωτο. Ο καθαρισμός του υποστρώματος είναι απαραίτητος για την δημιουργία τραχύτητας αλλά και για την «ενεργοποίηση» της επιφάνειας, ώστε να γίνει σωστή εναπόθεση του αργύρου. Το πάχος του υμενίου που δημιουργήθηκε είναι περίπου 50 nm.

Για τη διαπίστωση της επιτυχούς παρασκευής ενεργών υποστρωμάτων SERS, παρασκευάστηκε διάλυμα 4-αμινοθειοφαινόλης (4-aminothiophenol, 4-ATP) σε απόλυτη αιθανόλη συγκέντρωσης 4.5 mM, που αποτελεί ένωση αναφοράς για τις μετρήσεις SERS [4.5].



Εικόνα 4.2 Η δομή του μορίου της 4-ATP

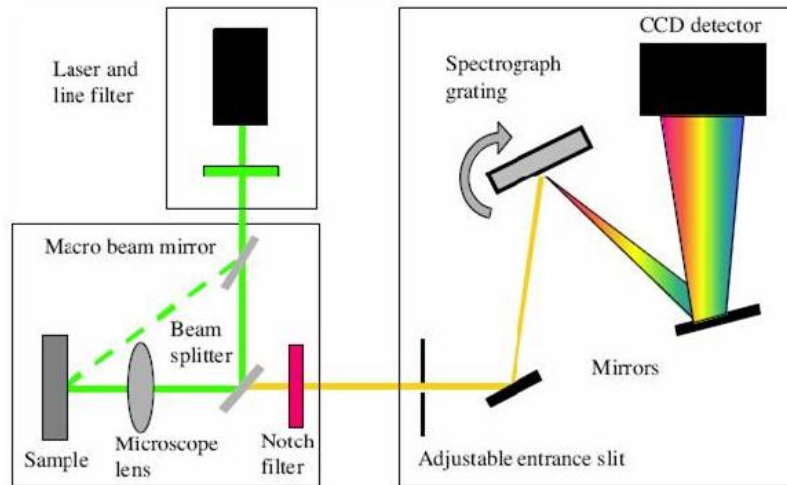
Αναλυτικότερα, τοποθετήθηκε μια σταγόνα από το κολλοειδές διάλυμα αργύρου που παρασκευάστηκε, σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφέθηκε για ξήρανση. Μια σταγόνα του διαλύματος 4-ATP τοποθετήθηκε πάνω από τη σταγόνα του διαλύματος των νανοσωματιδίων αργύρου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ξήρανσή της. Οι μετρήσεις Raman έγιναν με χρήση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εκπέμπει στα 785 nm και στο φασματικό εύρος $900-1800\text{ cm}^{-1}$.

Εναλλακτικά, μετά την παρασκευή του λεπτού υμενίου αργύρου, αυτό αφέθηκε στο διάλυμα 4-ATP για 24 ώρες και στη συνέχεια εκπλύθηκε με απόλυτη αιθανόλη ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του 4-ATP που δεν προσροφήθηκε στην επιφάνεια. Οι μετρήσεις Raman πραγματοποιήθηκαν με χρήση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εκπέμπει στα 785 και 514 nm, στο φασματικό εύρος $900-1700\text{ cm}^{-1}$.

4.2 Οργανολογία

4.2.1 Οργανολογία της φασματοσκοπίας Raman

Η πειραματική διάταξη η οποία χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία Raman παρουσιάζεται στην εικόνα 4.3.

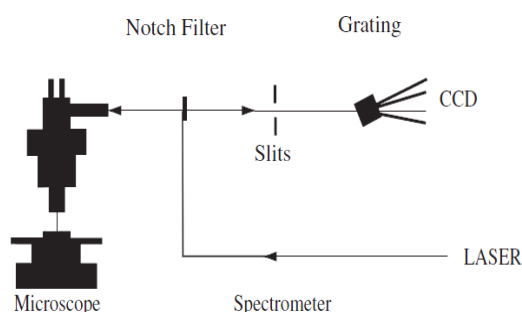


Εικόνα 4.3 Τυπική διάταξη φασματοσκοπίας Raman [4.6]

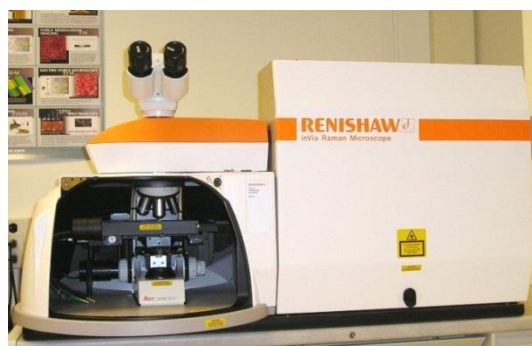
Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται μια πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας Raman είναι η πηγή διέγερσης (laser), ο μονοχρωμάτορας και το ανιχνευτικό σύστημα.

Ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιούνται laser αερίων ιόντων συνεχούς εκπομπής (continuous wave-CW), όπως Ar^+ (514.5 nm) αλλά και φωτοδιόδοι (diode laser), όπως αυτή που εκπέμπει στα 785 nm. Το μονοχρωματικό φως που παράγεται από το laser με τη βοήθεια ενός φίλτρου (line filter) περιορίζεται σε ένα πολύ στενό φασματικό εύρος. Στη συνέχεια, η δέσμη οδηγείται σε ένα σύστημα οπτικών (microscope lens), όπου διαχωρίζεται (beam splitter), με την βοήθεια ενός δεύτερου φίλτρου (notch filter). Ουσιαστικά, αποκόπτεται η κύρια συχνότητα που αντιστοιχεί στην σκέδαση Rayleigh, ώστε να γίνουν εμφανείς οι γραμμές Stokes και anti-Stokes της σκέδασης Raman που είναι πιο ασθενείς. Τα σκεδαζόμενα φωτόνια διέρχονται από μια οπή ρυθμιζόμενης διαμέτρου (adjustable entrance slit), ώστε να περιοριστούν χωρικά. Όσο μεγαλύτερη διάμετρο έχει η οπή, τόσο μεγαλύτερη είναι και η περιοχή που ανιχνεύεται, ταυτόχρονα όμως μειώνεται η διακριτική ικανότητα (resolution). Η γεωμετρία διέγερσης-συλλογής αλλά και η πόλωση της διεγείρουσας δέσμης, είναι σημαντικοί παράμετροι για τη διέγερση του υλικού. Η διέγερση-συλλογή σε γωνία 180° είναι η πιο συνηθισμένη γεωμετρία που απαντάται, ενώ αρκετά συχνά απαντάται επίσης και αυτή των 90° . Τέλος, τα φωτόνια κατευθύνονται προς το φράγμα περίθλασης (spectrograph grating), διαχωρίζονται στα επιμέρους μήκη κύματος που τα αποτελούν και προσπίπτουν στον ανιχνευτή διάταξης συζευγμένου φορτίου (Charge Coupled device-CCD), στον οποίο μετράται η έντασή τους, πληροφορία τελικά που θα δώσει το φάσμα Raman [4.7,4.8]. Ο ανιχνευτής CCD αποτελείται από χιλιάδες μικροσκοπικές φωτοδιόδους πυριτίου διατεταγμένες σε δισδιάστατο πλέγμα. Κάθε φωτοδίοδος συσσωρεύει φορτίο ανάλογο με τον αριθμό φωτονίων που έχουν προσπέσει πάνω της κατά το χρόνο έκθεσης. Τα φορτία από όλες τις φωτοδιόδους σαρώνονται και διαβάζονται σε όλο το μήκος και πλάτος της κάμερας CCD. Συνήθως χρησιμοποιείται ο μέσος όρος του σήματος εξόδου από τις φωτοδιόδους κάθε στήλης για να αποδώσει την ένταση του σήματος Raman ανά μήκος κύματος.

Η εισαγωγή του μικροσκοπίου ως βελτίωση της βασικής διάταξης της φασματοσκοπίας Raman αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην περαιτέρω ανάπτυξη της τεχνικής αυτής. Στη φασματοσκοπία micro-Raman τόσο για τη διέγερση όσο και για τη συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας χρησιμοποιείται ο αντικειμενικός φακός μικροσκοπίου και γεωμετρία διέγερσης-συλλογής είναι κατά συνέπεια αυτή των 180° . Το μικροσκόπιο επιτρέπει την οπτική εξέταση του δείγματος υπό μεγέθυνση και στη συνέχεια την επιλεκτική ανάλυση πολύ μικρών περιοχών του, της τάξης του $1\mu\text{m}$. Έτσι, υπάρχει η δυνατότητα της λήψης φάσματος από διάφορες περιοχές του δείγματος, αλλά σε ένα σημείο κάθε φορά. Η συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μέσω του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την κλασική διάταξη φασματοσκοπίας Raman και σε συνδυασμό με τη χρήση της κάμερας CCD επιτρέπεται η λήψη αξιόπιστων φασμάτων Raman σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.



Εικόνα 4.4 Τυπική διάταξη φασματοσκοπίας micro-Raman [4.9]



Εικόνα 4.5 inVia Raman Microscope της εταιρείας Renishaw που χρησιμοποιείται κατά την πειραματική διαδικασία

4.2.2 Οργανολογία της φασματοσκοπίας UV-Vis

Τα ηλεκτρονικά φάσματα απορρόφησης UV-Vis ελήφθησαν με το φασματοφωτόμετρο της εταιρείας Jasco (model V-650). Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν από τα 700 έως τα 340 nm με ρυθμό σάρωσης 400 nm/min και άνοιγμα σχισμής φασματομέτρου 0,5 nm. Οι πλαστικές κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οπτικής διαδρομής 1 cm.



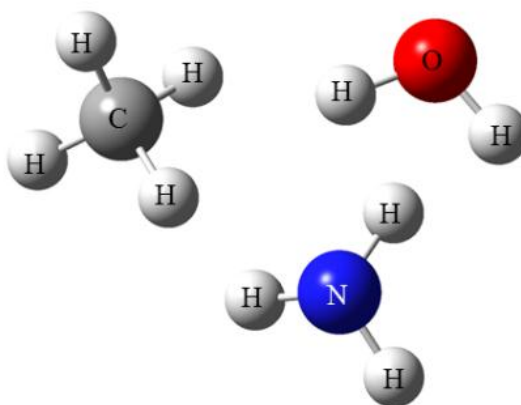
Εικόνα 4.6 Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται κατά την πειραματική διαδικασία

4.3 Θεωρητικός υπολογισμός των φασμάτων Raman της δοξορουβικίνης και της δαουνορουβικίνης

Ο θεωρητικός υπολογισμός των φασμάτων Raman των δύο φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Gaussian 09W V7 της εταιρίας Gaussian Inc [4.10]. Τα φάσματα Raman εξήχθησαν με τη βοήθεια του λογισμικού Gauss View 5.

Το πρόγραμμα Spartan '08 V1.2.0 χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της δομής των δύο μορίων. Οι δομές αυτές βελτιστοποιήθηκαν βρίσκοντας την ελάχιστη ενεργειακή κατάσταση (optimization) και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των δονητικών φασμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Gaussian 09W V7. Η βελτιστοποιημένη δομή και οι δονητικές συχνότητες (vibrational frequencies) της δοξορουβικίνης και της δαουνορουβικίνης υπολογίστηκαν κάνοντας χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις, οι υπολογισμοί της βέλτιστης γεωμετρίας και των δονητικών συχνοτήτων των μορίων πραγματοποιήθηκαν χωρίς περιορισμούς. Σημειώνεται, επίσης, ότι τα μόρια που προσομοιώνονται βρίσκονται στη στερεή φάση και δεν υπόκεινται σε αλληλεπίδραση με άλλα μόρια.

Τα φάσματα Raman που προέκυψαν είχαν εύρος 6 cm^{-1} και χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής (scaling factor) 0.96 για τη διόρθωση του θεωρητικού φάσματος Raman που προέκυψε.



Εικόνα 4.7 Σχηματική απεικόνιση των ατόμων στο πρόγραμμα Gaussian 09W V7

Βιβλιογραφία 4^ο Κεφαλαίου

- 4.1 C. Tapeinos, E. Efthimiadou, N. Boukos, M. Koklioti, C. Charitidis, G. Kordas, Langmuir, 2012
- 4.2 Xiaoying Yang, Liting Chen, Bo Huang, Feng Bai, Xinlin Yang b, Synthesis of pH-sensitive hollow polymer microspheres and their application as drug carriers, Polymer (2009) 50 3556–3563
- 4.3 Panayiotis Bilalis, Alexandros Chatzipavlidis, Leto-Aikaterini Tziveleka, Nikos Boukos, George Kordas, Nanodesigned magnetic polymer containers for dual stimuli actuated drug controlled release and magnetic hyperthermia mediation, J. Mater. Chem. (2012) 22 13451-13454
- 4.4 Mirkin, C.A., Cao Y.-W., Jin, R. U.S. Patent 0038255, 2004
- 4.5 Kazumasa Uetsuki, Prabhat Verma, Taka-aki Yano, Yuika Saito, Taro Ichimura, and Satoshi Kawata, Experimental Identification of Chemical Effects in Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol, J. Phys. Chem. C (2010) 114 7515–7520
- 4.6 Kit Umbach, Raman: theory and instrumentation, Dept. of MS&E
- 4.7 John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto and Chris W. Brown, Introductory Raman Spectroscopy, Elsevier (2003)
- 4.8 Richard L. McCreery, Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, John Wiley & Sons (2000)
- 4.9 Ewen Smith, Geoffrey Dent, Modern Raman spectroscopy—a practical approach, John Wiley & Sons (2005)
- 4.10 Gaussian 09, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009

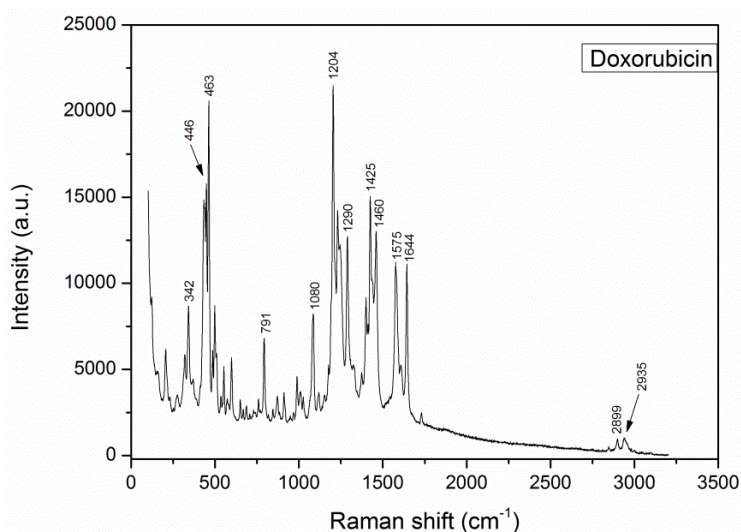
Κεφάλαιο 5^ο

5.1 Χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων

5.1.1.1 Δομικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη με φασματοσκοπία Raman

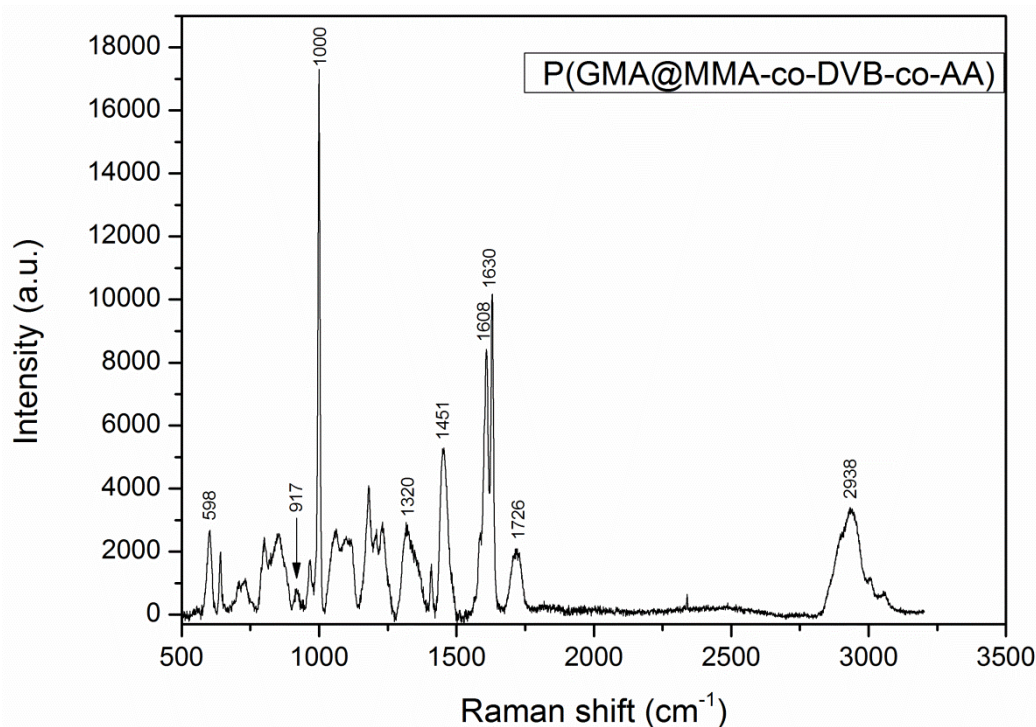
Στην ενότητα αυτή μελετάται ποιοτικά ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη (Doxorubicin-DOX) με χρήση της φασματοσκοπίας Raman. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φαρμάκου στο δείγμα των πολυμερικών σφαιρών στο οποίο έχει εγκλωβιστεί το φάρμακο συγκριτικά με το ελεύθερο φάρμακο επιβεβαιώνει την ύπαρξη του φαρμάκου στην πολυμερική μήτρα.

Συγκεκριμένα, οι χαρακτηριστικές κορυφές της δοξορουβικίνης που εμφανίζεται στην περιοχή των 342, 446, 463, 1204, 1425, 1460, 1575 και 1644 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν σε δονήσεις χαρακτηριστικών δεσμών, οι οποίες θα περιγραφούν αναλυτικά ακολούθως. Πιο αναλυτικά, η κορυφή στα 342 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση C–O–H, ενώ οι δονήσεις στην περιοχή των 446 και 463 cm^{-1} προέρχονται από την δόνηση τάσης, αφενός του καρβονυλίου, C=O, αφετέρου του αιθερικού δεσμού του σακχάρου C–O–C και C–OH. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1084 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C–N της ντονοζαμίνης. Οι κορυφές από 1200–1300 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις των δεσμών C–O, C–OH και C–H. Επίσης, βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι η κορυφή στα 1290 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου του μορίου της δοξορουβικίνης με μόρια νερού (O–H...O). Η κορυφή στα 1425 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση των δεσμών του φαινολικού δακτυλίου της DOX και στα 1460 cm^{-1} στη δόνηση της άμινο-ομάδας (-NH₂) του σακχάρου αυτού, ντονοζαμίνη. Οι δύο τελευταίες χαρακτηριστικές κορυφές, δηλαδή στα 1575 και 1644 cm^{-1} οφείλονται στη δόνηση τάσης των δεσμών του αρωματικού δακτυλίου. Τέλος, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2899 και 2935 cm^{-1} οφείλονται στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης του –CH₃ και –CH₂ [5.1-5.4].



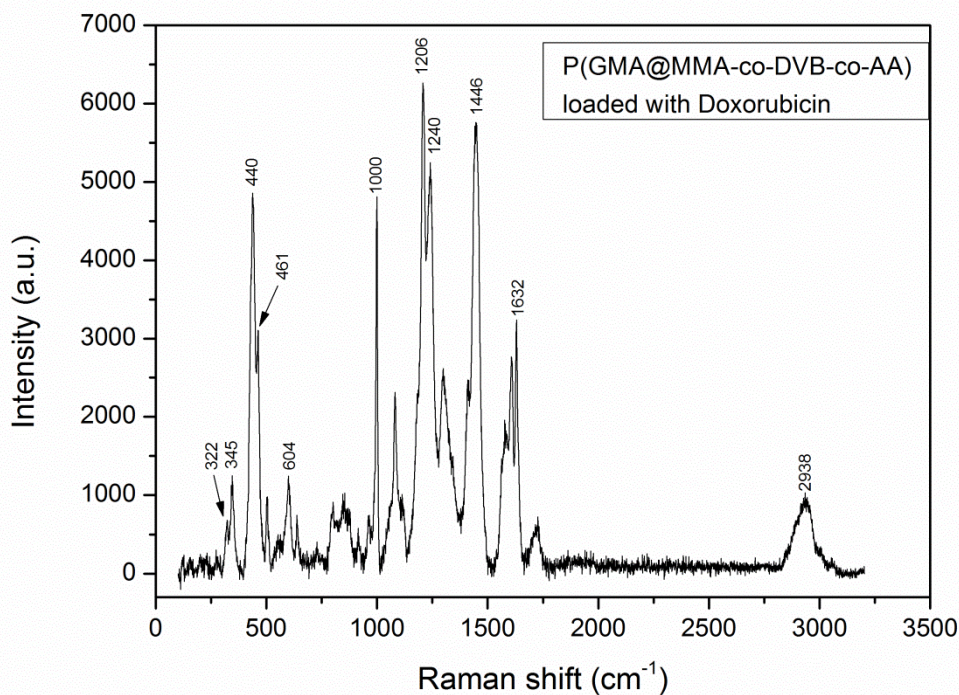
Σχήμα 5.1 Φάσμα Raman της δοξορουβικίνης

Σχετικά με τις πολυμερικές νανοσφαίρες που έχουν δομή πυρήνα-φλοιού (core-shell structure), παρατηρούνται οι κύριες κορυφές στα 1000, 1100-1300, 1455 και 1600 cm^{-1} . Αναλυτικότερα, η κορυφή στα 598 cm^{-1} οφείλεται η δόνηση τάσης του δεσμού C–C–O του PMMA. Επίσης, η κορυφή στα 917 cm^{-1} προέρχεται από τη δόνηση παραμόρφωσης του εποξειδικού δακτυλίου (epoxy ring deformation) του PGMA και η έντασή της είναι αρκετά μικρή λόγω του γεγονότος ότι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έντασή της σχετίζεται με τη συγκέντρωση των εποξειδικών ομάδων στο πολυμερές. Η οξεία κορυφή που εμφανίζεται στα 1000 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του C–O–C που προέρχεται από το PMMA. Ακόμα, η κορυφή στα 1320 cm^{-1} προέρχεται από τη δόνηση τάσης του δεσμού C–O του PMMA, ενώ στα 1451 cm^{-1} φαίνεται η δόνηση κάμψης του δεσμού C–H. Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 1608 και 1630 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης των αρωματικών δεσμών C–H του βενζολικού δακτυλίου (benzene ring) του DVB. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1726 cm^{-1} δικαιολογεί τη δόνηση τάσης του καρβονυλίου –C=O του PMMA και του PAA [5.5,5.6].



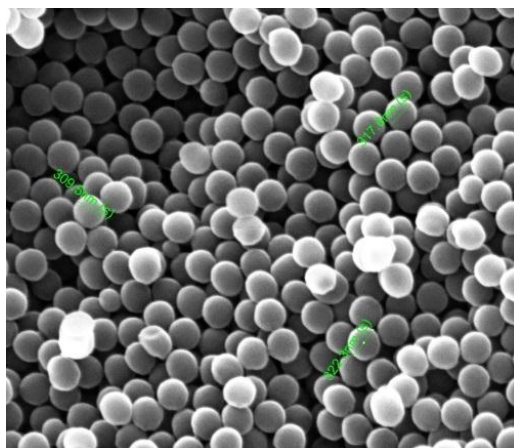
Σχήμα 5.2 Φάσμα Raman των νανοσφαιρών P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA)

Το φάσμα Raman που προέκυψε από τα νανοδοχεία που έχει πραγματοποιηθεί ο εγκλωβισμός του φαρμάκου, παρατηρείται ότι οι κορυφές στα 320, 344, 459, 463 cm^{-1} αποδίδονται στο εγκλεισμένο φάρμακο, καθώς εμφανίζονται στο φάσμα της δοξορουβικίνης αλλά με μικρότερη σχετική ένταση. Επίσης, οι κορυφές που βρίσκονται μετά τα 1000 cm^{-1} είναι φανερό ότι προέρχονται από το πολυμερές, καθώς εμφανίζονται στους ίδιους κυματάριθμους, αλλά είναι χαμηλότερης έντασης.



Σχήμα 5.3 Φάσμα Raman των νανοσφαιρών P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA) φορτωμένων με DOX

5.1.1.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)



Εικόνα 5.1 Εικονογράφημα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των κενών P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA) νανοσωματιδίων

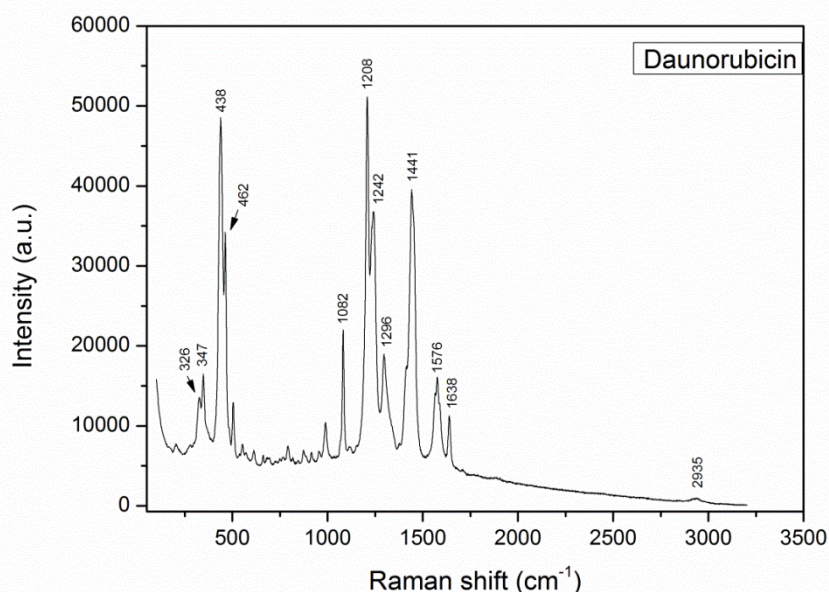
Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των κενών P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA) μικροσφαιρών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: SEM). Στην εικόνα 5.1, παρατηρείται η μορφολογία των συντιθέμενων μικροσφαιρών οι οποίες παρουσιάζουν καλή πολυδιασπορά και ομοιομορφία στην επιφάνειά τους. Το μέγεθός τους κυμαίνεται στα 310 ± 10 nm.

5.1.2.1 Δομικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη με φασματοσκοπία Raman

Στην ενότητα αυτή μελετάται ποιοτικά ο εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη (Daunorubicin-DNR) με χρήση της φασματοσκοπίας Raman. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φαρμάκου στο δείγμα των πολυμερικών σφαιρών στο οποίο έχει εγκλωβιστεί το φάρμακο συγκριτικά με το ελεύθερο φάρμακο επιβεβαιώνει την ύπαρξη του φαρμάκου στην πολυμερική μήτρα.

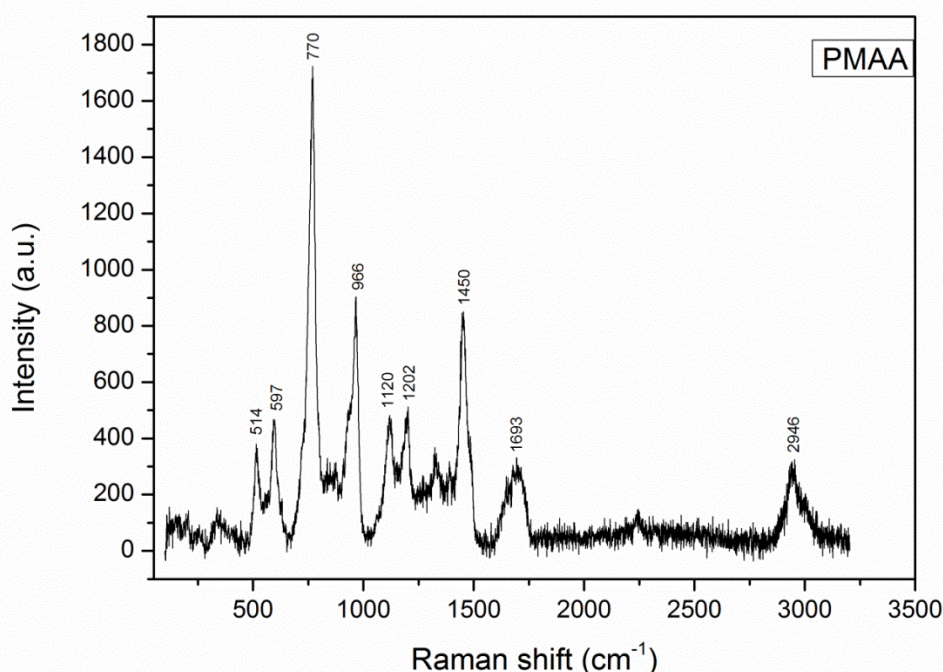
Όσον αφορά το δονητικό φάσμα που προέκυψε από την δαουνορουβικίνη, παρατηρούνται οι κύριες κορυφές, δηλαδή στα 347, 438, 462, 1082, 1208, 1242, 1441, 1576 και 1638 cm^{-1} . Επειδή το μόριο της δαουνορουβικίνης έχει πολλές ομοιότητες με αυτό της δοξορουβικίνης αναμένεται ότι τα φάσματά τους δεν θα παρουσιάζουν αρκετές διαφορές. Έτσι, η κορυφή που εμφανίζεται στα 347 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση C–O–H, ενώ οι κορυφές στα 438 και 462 cm^{-1} προέρχονται από το καρβονύλιο C=O, τον αιθέρα του σακχάρου C–O–C και τη δόνηση C–OH. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1082 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C–N της ντονοσαμίνης του φαρμάκου. Οι δονήσεις των δεσμών C–O, C–OH και C–H επαληθεύονται από τις κορυφές που είναι εμφανείς στα 1208 και 1242 cm^{-1} . Επίσης, βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι η κορυφή που παρατηρείται στα 1290 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί σε δεσμούς υδρογόνου O–H...O της δαουνορουβικίνης. Η κορυφή στα 1441 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση του φαινολικού δακτυλίου (vRing(Phe)) ή στη δόνηση κάμψης του δεσμού N–H της ντονοζαμίνης του φαρμάκου. Οι δύο τελευταίες χαρακτηριστικές κορυφές, δηλαδή στα 1576 και 1638 cm^{-1} οφείλονται στη δόνηση τάσης του δακτυλίου. Τέλος, η κορυφή που παρατηρείται στα 2935 cm^{-1} οφείλεται στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση των –CH₃ και –CH₂.

Ακόμα, θα πρέπει να τονιστεί ότι επειδή το μόριο της δαουνορουβικίνης αποτελείται από φαινολικούς δακτυλίους, παρουσιάζει έντονο φθορισμό. Αυτό μπορεί να δικαιολογήσει το γεγονός ότι οι κορυφές που τις χαρακτηρίζουν κυμαίνονται σε μεγάλες εντάσεις σε σχέση με τα πολυμερή.



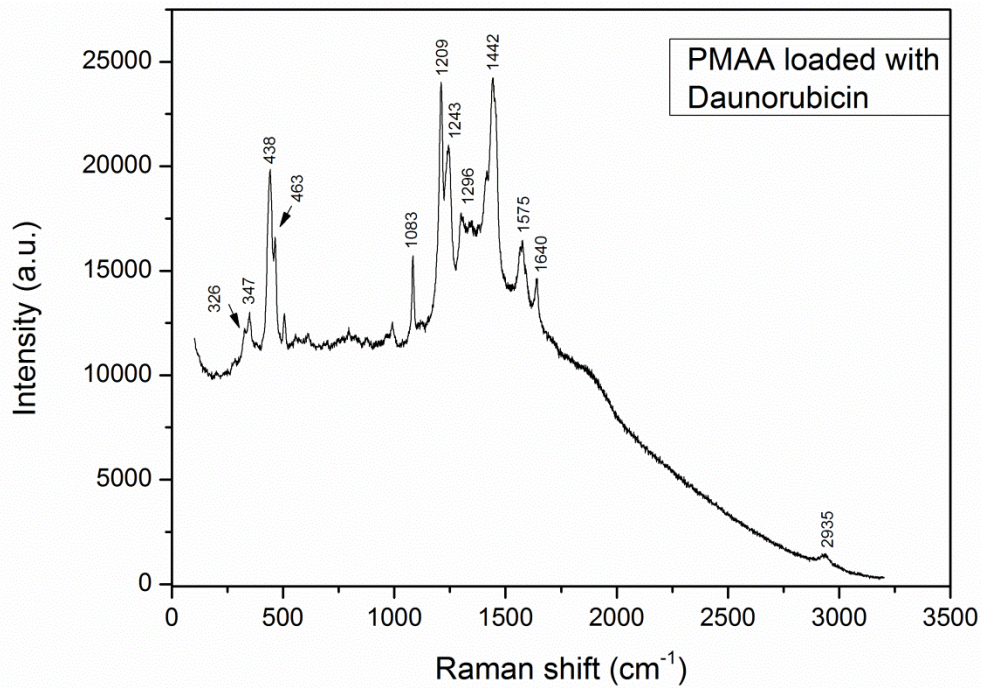
Σχήμα 5.4 Φάσμα Raman της δαουνορουβικίνης

Όσον αφορά τις πολυμερικές σφαίρες από PMAA (poly-methacrylic acid), εμφανίζουν τις εξής κύριες κορυφές στα 514, 597, 770, 966, 1120, 1202, 1450, 1693 και 2946 cm^{-1} . Αναλυτικότερα, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 514 και 597 cm^{-1} οφείλονται στην δόνηση κάμψης του σκελετού του πολυμερούς, δηλαδή του δεσμού C–C–C. Η έντονη κορυφή στα 770 cm^{-1} προέρχεται από την συμμετρική δόνηση τάσης του C–C του C–COOH. Επίσης, η κορυφή που εμφανίζεται στα 966 cm^{-1} δικαιολογείται από τη δόνηση του δεσμού C–CH₃. Ακόμα, η φασματική περιοχή από 1100 έως 1200 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις του δεσμού C=O ή του O–H του καρβονυλίου. Η κορυφή που είναι εμφανής στα 1450 cm^{-1} προκύπτει από τη δόνηση κάμψης του –CH₂ και η δόνηση στα 1693 cm^{-1} χαρακτηρίζει τη δόνηση τάσης που προέρχεται από το καρβονύλιο [5.7]. Τέλος, η κορυφή στα 2946 cm^{-1} προέρχεται από τη δόνηση τάσης του –CH₂ [5.8,5.9].



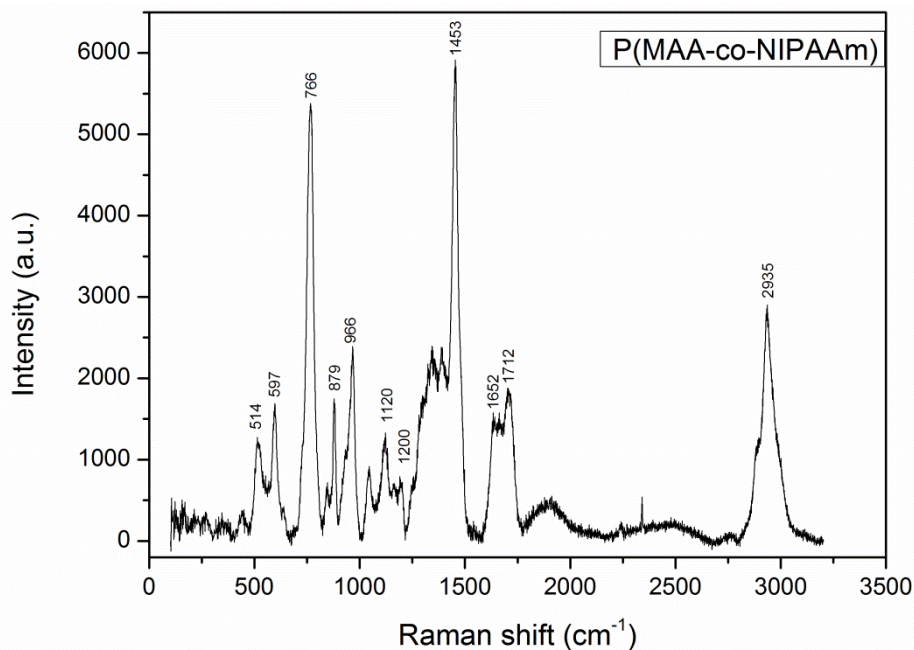
Σχήμα 5.5 Φάσμα Raman των νανοσωματιδίων PMAA

Το φάσμα Raman που προκύπτει από τα πολυμερικά νανοδοχεία που είναι φορτωμένα με τη δαουνορουβικίνη μοιάζει να ταυτίζεται με αυτό της δαουνορουβικίνης, παρουσιάζοντας καθόλου ή μικρές μετατοπίσεις στους κυματάρθμους. Η ομοιότητα αυτή οφείλεται, αρχικά, στο γεγονός ότι τόσο το πολυμερές όσο και το φάρμακο εμφανίζουν ενεργές δονήσεις στο φασματικό εύρος 300-1600 cm^{-1} με αποτέλεσμα να υπερκαλύπτονται. Ο σημαντικότερος όμως λόγος που δικαιολογεί τη μορφή αυτή του φάσματος είναι ότι η δαουνορουβικίνη είναι ένα μόριο με έντονο φθορισμό (fluorescence), που σημαίνει ότι η ένταση των κορυφών που τη χαρακτηρίζουν είναι πολύ υψηλότερη από αυτή του PMAA, πράγμα που συνεπάγεται ότι οι κορυφές του πολυμερούς δεν δύναται να εμφανιστούν.



Σχήμα 5.6 Φάσμα Raman των νανοσφαιρών PMAA φορτωμένων με DNR

Επίσης, εξετάστηκαν και δείγματα πολυμερικών νανοδοχείων P(NIPAAm-co-MAA), στα οποία έχει φορτωθεί το φάρμακο δαουνορουβικίνη. Το φάσμα που προέκυψε από τις κενές πολυμερικές σφαίρες φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

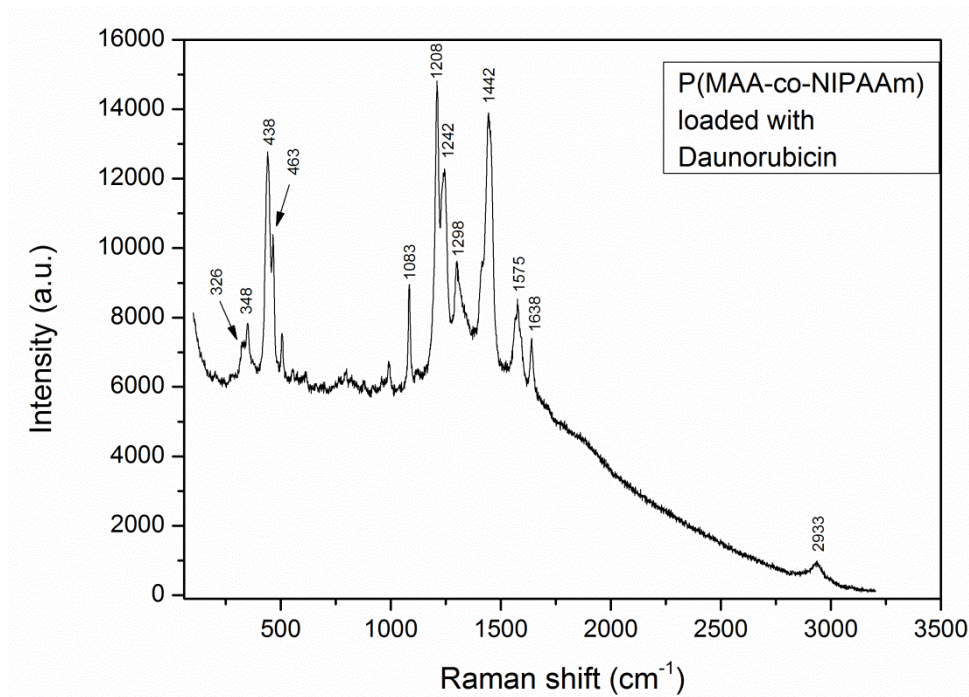


Σχήμα 5.7 Φάσμα Raman από τις πολυμερικές σφαίρες P(NIPAAm-co-MAA)

Παρατηρείται ότι το φάσμα Raman δεν διαφέρει πολύ από αυτό που προέκυψε από τους υπολογισμούς των σφαιρών από PMAA. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο αυτά πολυμερή έχουν παρόμοια δομή και όπως είναι φανερό, αρκετές κορυφές είναι είτε καθόλου είτε λίγο μετατοπισμένες. Η μόνη κορυφή που διαφοροποιεί τα δύο φάσματα είναι αυτή που παρουσιάζεται στα 879 cm^{-1} , οφείλεται

σε δόνηση έκτασης του δεσμού C–N και είναι η μόνη η οποία αποδεικνύει την ύπαρξη του PNIPAAm, διότι μόνο αυτό περιέχει άζωτο στη δομή του [5.4].

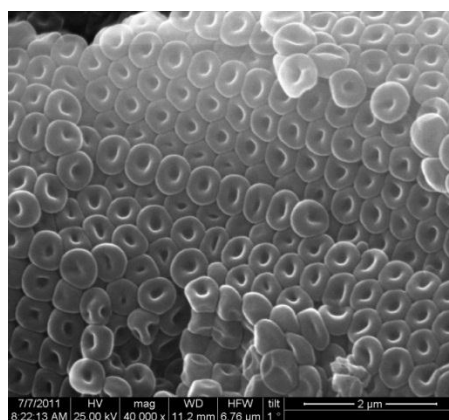
Το φάσμα που προέκυψε από τα νανοδοχεία που φορτώθηκαν με δαουνορουβικίνη φαίνεται παρακάτω:



Σχήμα 5.8 Φάσμα Raman των νανοσωματιδίων PMAA-PNIPAAm φορτωμένων με DNR

Όπως παρατηρείται, και σε αυτή τη περίπτωση, το φάσμα Raman που προκύπτει από μοιάζει να ταυτίζεται με αυτό της δαουνορουβικίνης και με αυτό που προέρχεται από τα φορτωμένα νανοδοχεία PMAA, παρουσιάζοντας καθόλου ή μικρές μετατοπίσεις στους κυματάριθμους. Οι λόγοι που συμβαίνει αυτό έχουν εξηγηθεί παραπάνω.

5.1.2.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)



Εικόνα 5.2 Εικονογράφημα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των κενών PMAA νανοσωματιδίων

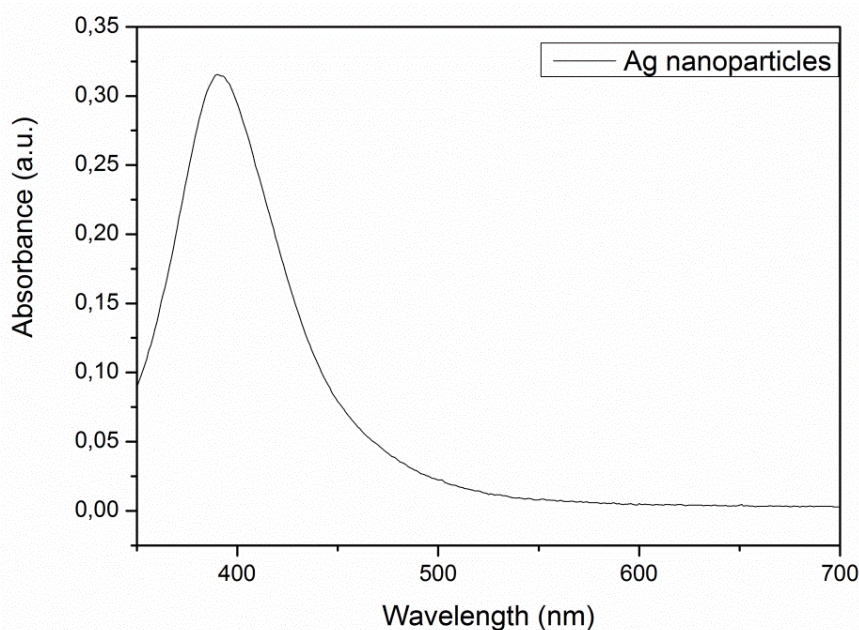
Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των κενών PMAA νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με SEM. Στην εικόνα 5.2, η παρατηρούμενη κοιλότητα παραπέμπει σε κενά πολυμερικά νανοδοχεία, δηλαδή πιστοποιεί την απομάκρυνση του πυρήνα. Η κοιλότητα δημιουργείται λόγω της απομάκρυνσης του διαλύτη υπό κενό. Ακόμα, δεν υπάρχουν δευτερογενή νανοσωματίδια – άμορφες πολυμερικές δομές. Επίσης, η πολυδιασπορά των νανοδοχείων είναι πολύ καλή, καθώς φαίνεται ότι έχουν το ίδιο μέγεθος $\sim 530 \pm 10\text{nm}$. Το μέγεθος των δοχείων υπολογίστηκε πριν την απομάκρυνση του πυρήνα, όταν αυτά ήταν σφαιρικά.

Οπτικά, τα πολυμερικά συστήματα που έχουν φορτωθεί με φάρμακο, δεν θα παρουσιάζουν κάποια ουσιαστική διαφορά, διότι το φάρμακο που εγκλωβίζεται είναι της τάξης των 1-2nm και η διακριτική ικανότητα του SEM αρχίζει μετά τα 10nm.

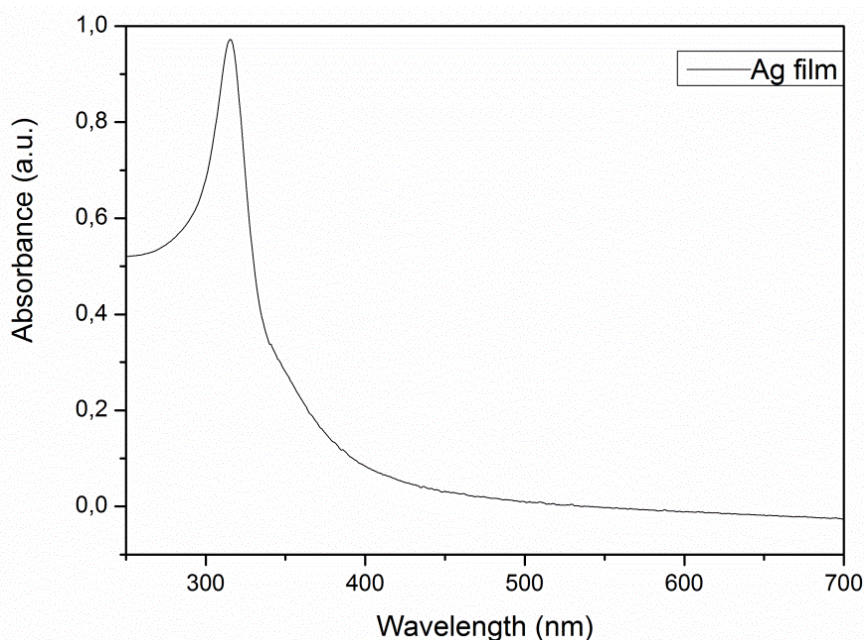
5.2 Χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων για επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS)

5.2.1 Χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων SERS με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis

Στην ενότητα αυτή πραγματοποιείται μελέτη της κατασκευής ενεργών υποστρωμάτων με σκοπό την επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS). Μια επιπρόσθετη βασική παράμετρος για τη συλλογή των φασμάτων SERS αποτελεί το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινολογίας και επιλέγεται βάσει της ικανότητάς του να διεγείρει τα επιφανειακά πλάσμονια του υποστρώματος SERS, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ενίσχυση. Για το λόγο αυτό, πριν από τις μετρήσεις SERS, συλλέχθηκαν τα φάσματα απορρόφησης UV-vis του κolloειδούς διαλύματος αργύρου και του λεπτού υμενίου πάνω στο βοριοπυριτικό γυαλί.



Σχήμα 5.9 Φάσμα απορρόφησης UV-vis του κolloειδούς διαλύματος νανοσωματιδίων Ag



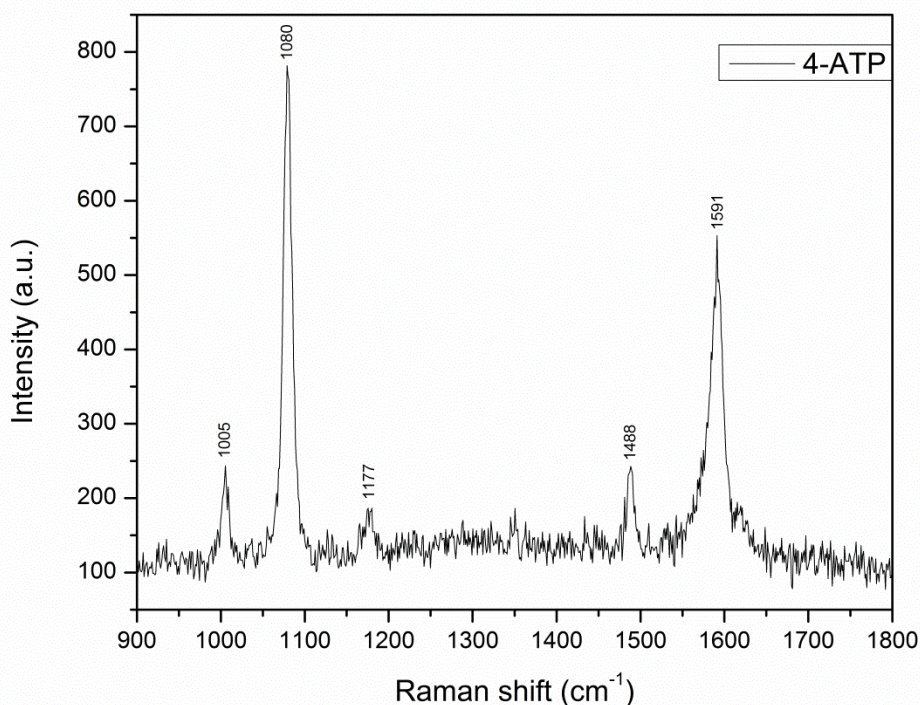
Σχήμα 5.10 Φάσμα απορρόφησης UV-vis του λεπτού υμενίου Ag πάνω στο βοριοπυριτικό γυαλί

Όπως παρατηρείται από τα φάσματα απορρόφησης UV-vis, το μέγιστο του φάσματος στην περίπτωση του κολλοειδούς διαλύματος Ag βρίσκεται περίπου στα 392 nm, ενώ του λεπτού υμενίου Ag περίπου στα 315 nm. Η διαφορά που παρατηρείται στα μέγιστα των φασμάτων απορρόφησης είναι σημαντική και μπορεί να αποδοθεί στο μέγεθος των νανοσωματιδίων αργύρου. Γενικότερα, όταν τα νανοσωματίδια είναι μικρού μεγέθους, το μέγιστο της απορρόφησης στο φάσμα UV-Vis μετατοπίζεται προς την υπεριώδη περιοχή [5.10,5.11].

5.2.2 Δομικός χαρακτηρισμός των ενεργών υποστρωμάτων SERS με φασματοσκοπία Raman

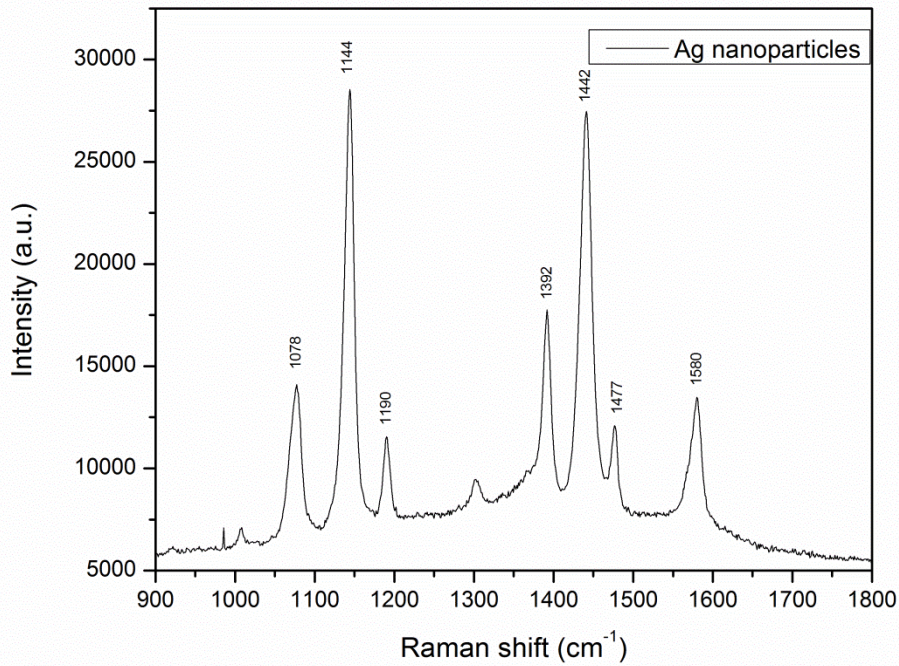
Στο τμήμα αυτό του κεφαλαίου, εξετάζεται η επιφανειακή ενίσχυση της σκέδασης Raman της 4-αμινοθειοφαινόλης (4-aminothiophenol, 4-ATP), που έχει προσροφηθεί σε κολλοειδές διάλυμα αργύρου και σε λεπτό υμένιο αργύρου με χρήση της φασματοσκοπίας Raman. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του 4-ATP και στις δύο κατηγορίες υποστρωμάτων επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του φαινομένου SERS.

Στο σχήμα 5.11 παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα Raman του διαλύματος 4-ATP στο φασματικό εύρος $900-1800\text{ cm}^{-1}$ και με χρήση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εκπέμπει στα 785 nm. Συγκεκριμένα, οι παρατηρούμενες κορυφές στα 1080 και 1591 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις τάσης των δεσμών C-S και C-C, αντίστοιχα. Επίσης, οι δύο χαμηλότερης έντασης κορυφές στα 1177 και 1488 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H και σε ένα συνδυασμό δόνησης τάσης του C-C και δόνησης κάμψης του C-H, αντίστοιχα.



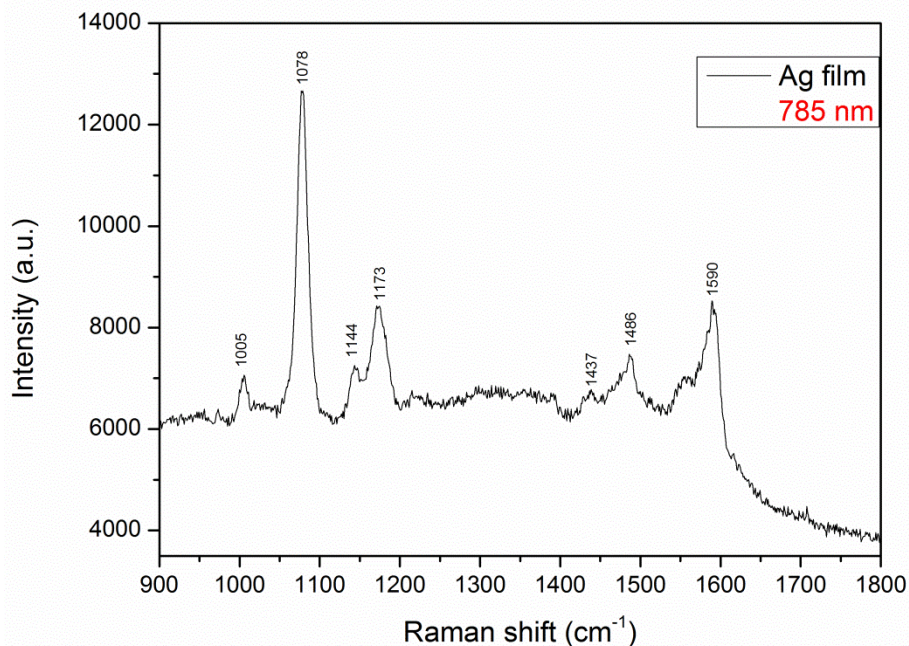
Σχήμα 5.11 Φάσμα Raman του 4-ATP

Στο σχήμα 5.12 παρουσιάζεται το φάσμα Raman που αντιστοιχεί σε διάλυμα 4-ATP προσροφημένου στο κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου. Οι δύο κορυφές στα 1078 και 1580 cm^{-1} εμφανίζονται και στο φάσμα Raman του καθαρού 4-ATP. Υπάρχει, ωστόσο, μία μικρή μετατόπιση των κυματάρθμων που χαρακτηρίζουν αυτές τις κορυφές, αλλά δικαιολογείται διότι βρίσκεται εντός των ορίων των πειραματικών σφαλμάτων. Επίσης, οι κορυφές στα 1177 και 1488 cm^{-1} έχουν μετατοπιστεί στα 1190 και 1477 cm^{-1} στο φάσμα του σχήματος 5.11, αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο φάσμα υπάρχουν και άλλες κορυφές, λόγω της (ύπαρξης της ενίσχυσης) του φαινομένου SERS. Οι νέες κορυφές μπορούν να χαρακτηρίσουν διάφορες δονητικές μορφές του 4-ATP. Αναλυτικότερα, η ενισχυμένη κορυφή στα 1144 cm^{-1} είναι ενδεικτική της εμφάνισης του φαινομένου και προέρχεται από τη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H. Επίσης, οι παρατηρούμενες κορυφές στα 1392 και στα 1442 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στο συνδυασμό της δόνησης τάσης του C-C και της δόνησης κάμψης του C-H [5.12].



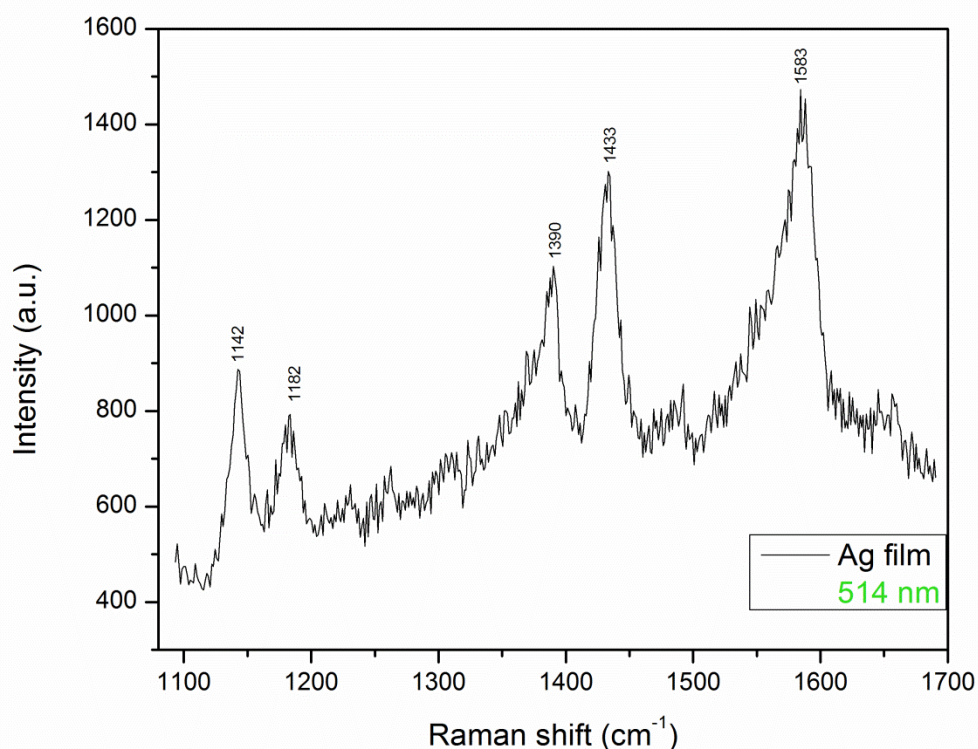
Σχήμα 5.12 Φάσμα Raman του 4-ATP που έχει προσροφηθεί στο κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου

Ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του 4-ATP που έχει προσροφηθεί στο λεπτό υμένιο αργύρου με υπόστρωμα το βοριοπυριτικό γυαλί φαίνεται παρακάτω. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο φασματικό εύρος $900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ και με χρήση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εκπέμπει στα 785 nm . Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι οι κορυφές στα 1005 , 1078 , 1144 , 1173 , 1437 , 1486 και 1590 cm^{-1} , με μικρές μετατοπίσεις στους κυματάριθμους, μπορούν να αποδοθούν στην ύπαρξη του 4-ATP στο λεπτό υμένιο αργύρου και είναι χαρακτηριστικές λόγω της εμφάνισης του φαινομένου SERS.



Σχήμα 5.13 Φάσμα Raman του 4-ATP που έχει προσροφηθεί στο λεπτό υμένιο αργύρου, με διεγείρουσα ακτινοβολία που εκπέμπει στα **785 nm**

Όπως προέκυψε από το προηγούμενο δονητικό φάσμα, το 4-ATP στην φασματική περιοχή $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ δεν παρουσιάζει τη χαρακτηριστική κορυφή στα 1390 cm^{-1} και η κορυφή στα 1437 cm^{-1} είναι χαμηλής εντάσεως. Γι' αυτό το λόγο, το 4-ATP που έχει προσροφηθεί στο λεπτό υμένιο αργύρου με υπόστρωμα το βοριοπυριτικό γυαλί μετρήθηκε και με τη χρήση μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εκπέμπει στα 514 nm στο φασματικό εύρος $1100\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.14. Στο φάσμα αυτό παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές του 4-ATP, καθώς και αυτές που δεν εμφανίζονταν κατά τη μέτρηση με το laser στα 785 nm . Υπάρχει μια μικρή μετατόπιση των συχνοτήτων, η οποία δικαιολογείται αφενός λόγω της αλλαγής του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και αφετέρου λόγω των πειραματικών σφαλμάτων. Επίσης, όπως είχε αναφερθεί, το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας θα πρέπει να επιλέγεται ώστε να διεγείρει τα επιφανειακά πλασμόνια του υποστρώματος SERS. Το επιλεχθέν, λοιπόν, μήκος κύματος προκύπτει από το φάσμα απορρόφησης UV-vis του λεπτού υμενίου και σχετίζεται με την επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Επειδή το λεπτό υμένιο Ag απορροφά στα 315 nm , προκύπτει ότι το laser που εκπέμπει στα 514 nm θα διεγείρει ευκολότερα τα επιφανειακά πλασμόνια του αργύρου, με αποτέλεσμα το ληφθέν φάσμα να περιέχει περισσότερες φασματικές πληροφορίες σχετικά με το φαινόμενο SERS [5.13,5.14,5.15].



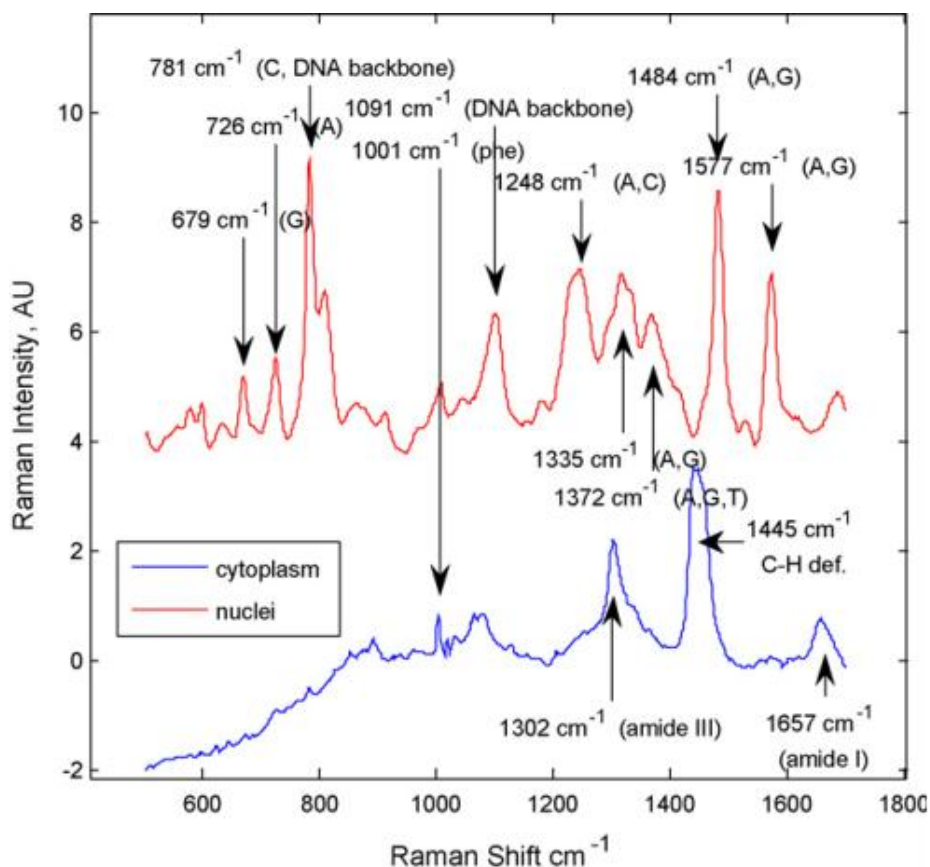
Σχήμα 5.14 Φάσμα Raman του 4-ATP που έχει προσροφηθεί στο λεπτό υμένιο αργύρου, με διεγείρουσα ακτινοβολία που εκπέμπει στα **514 nm**

5.2.3 Ενεργά υποστρώματα SERS και η συμβολή τους στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων

Η κατασκευή ενεργών υποστρωμάτων SERS έχει εκτεταμένες εφαρμογές τόσο σε θεμελιώδεις όσο και σε εφαρμοσμένες ερευνητικές δραστηριότητες. Συνέβαλλε όχι μόνο στην ανάπτυξη μελετών ενισχυμένης οπτικής σκέδασης από επιφάνειες αλλά δημιούργησε και ένα νέο πεδίο επιφανειακής φασματοσκοπίας. Ανάμεσα σε αυτές τις εφαρμογές, η φασματοσκοπία Raman έχει χρησιμοποιηθεί ως μη επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για τον γρήγορο χαρακτηρισμό καρκινικών κυττάρων, σε ιστούς και σε σωματικά υγρά (π.χ. στο αίμα) [5.16,5.17,5.18]

Σε μια πιο θεμελιώδη προσέγγιση οι Chenxu Yu et al. [5.19], μελέτησαν καρκινικά κύτταρα μαστού χρησιμοποιώντας τη συνεστιακή φασματοσκοπία Raman (confocal Raman microspectroscopy) ως τεχνική για τον χαρακτηρισμό τους. Η χρήση της συγκεκριμένης μικροσκοπίας δίνει την δυνατότητα απόκτησης φάσματος ακόμα και σε υποκυτταρικό επίπεδο, για παράδειγμα μπορεί να καταγραφεί το φάσμα του πυρήνα ενός μοναδικού κυττάρου. Αναλύοντας τα συστατικά του φάσματος του πυρήνα φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων μπορούμε να καταγράψουμε φασματοσκοπικά τις βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την μετάβαση από το φυσιολογικό στο καρκινικό κύτταρο. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να καταγραφούν οι *in vivo* αλλαγές στη χημική σύσταση των κυττάρων που επάγονται από την εφαρμογή διαφορετικών φαρμακευτικών ή άλλων αγωγών και την εν γένει απόκριση των ασθενών σε διαφορετικές θεραπείες. Στην συγκεκριμένη εργασία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν πάνω σε γυαλιά μικροσκοπίου, στα οποία είχε τοποθετηθεί ένα λεπτό υμένιο χρυσού. Με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου Raman πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τόσο στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm), που θεωρείται το σύνολο του κυττάρου εκτός από τον πυρήνα), όσο και στον πυρήνα (nuclei) καρκινικών κυττάρων μαστού (Σχήμα 5.15). Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται όλες οι κορυφές που προκύπτουν, καθώς και ο χαρακτηρισμός αυτών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία κατεβλήθησαν προσπάθειες προσδιορισμού του φάσματος Raman καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF7) στα οποία έχει χορηγηθεί το αντικαρκινικό φάρμακο ντονορουμπικίνη εγκλεισμένο σε προαναφερθέντες νανοπεριέκτες που επιπροσθέτως περιείχαν και νανοσωματίδια αργύρου. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε τριβλία Petri στα οποία είχε τοποθετηθεί βοριοπυριτικό γυαλί διαστάσεων 22x22 mm. Στην συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα ντονορουμπικίνης - νανοπεριεκτών και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν δεν απέδωσαν αξιόλογο αποτέλεσμα. Ωστόσο, είναι εφικτό να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες και να υπάρξουν αξιόλογα αποτελέσματα στο μέλλον.



Σχήμα 5.15 Φάσμα Raman από το κυτόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού [5.19]

Πίνακας 5.1

Κορυφές (cm ⁻¹)	Χαρακτηρισμός	Προέλευση
679	Γουανίνη	Νουκλεϊκά οξέα
726	Αδενίνη	Νουκλεϊκά οξέα
781	Κυτοσίνη	Νουκλεϊκά οξέα
776	Ουρακίλη	RNA
829,852	Τυροσίνη	Πρωείνες
1003	Φαινυλαλανίνη	Πρωείνες
1090	O-P-O-	Νουκλεϊκά οξέα
10,611,129	C-N, C-C	Πρωείνες
1210	Τυροσίνη, Φαινυλαλανίνη	Πρωείνες
1205-1219	Αρωματικά αμινοξέα	Πρωείνες
1248	Αμίδιο III	Πρωείνες
1278-1293,1308, 1338	-CH ₂	Νουκλεϊκά οξέα, Πρωείνες, Λιπίδια
1335	Αδενίνη, Γουανίνη	Νουκλεϊκά οξέα
1372	Αδενίνη, Γουανίνη, Θυμίνη	DNA
1445	C-H	Νουκλεϊκά οξέα, Πρωείνες, Λιπίδια
1575	Αδενίνη, Γουανίνη	Νουκλεϊκά οξέα
1594-1617	Αρωματικά αμινοξέα	Πρωείνες
1665	Αμίδιο I	Πρωείνες

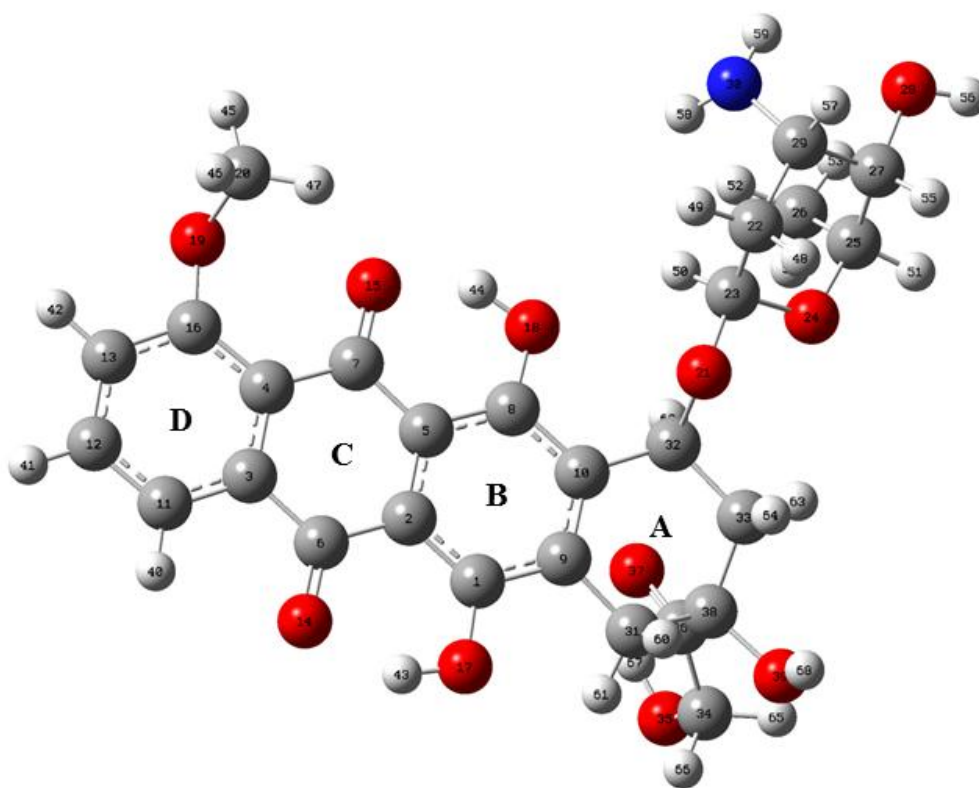
Βιβλιογραφία 5^{ου} Κεφαλαίου

- 5.1 J. L. Koenig, Raman Scattering of Synthetic Polymers-A Review, *Applied Spectroscopy Reviews* (1971) 4(2) 233-305
- 5.2 G. Das, A. Nicastri, M. L. Coluccio, F. Gentile, P. Candeloro, G. Cojoc, C. Liberale, F. Angelis, E. Fabrizio, FT-IR, Raman, RRS Measurements and DFT Calculation for Doxorubicin, *Microscopy Research and Technique* (2010) 73 991-995
- 5.3 Chul Jae Lee, Jae Soo Kang, Mak Soon Kim, Kwang Pill Lee, and Mu Sang Lee, *Bull. Korean Chem. Soc* (2004) 25(8) 1211-1216
- 5.4 George Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, John Wiley & Sons (2004)
- 5.5 Elaine Mertz and Jack L. Koenig, Application of FT-IR and NMR to Epoxy Resins, *Advances in Polymer Science* (1986) 75 73-112
- 5.6 Hana Vaškova, Vojtěch Křesalek, Quasi real-time monitoring of epoxy resin crosslinking via Raman microscopy, *International Journal of Mathematical Models and Methods in Applied Sciences* (2011) 5(7) 1197-1204
- 5.7 Jack L. Koenig, A. C. Angood, J. Semen, J. B. Lando, Laser-excited Raman studies of the conformational transition of syndiotactic polymethacrylic acid in water, *J. Am. Chem. Soc.* (1969) 91(26) 7250–7254
- 5.8 Jian Dong, Yukihiro Ozaki and Kenichi Nakashima, Infrared, Raman, and Near-Infrared Spectroscopic Evidence for the Coexistence of Various Hydrogen-Bond Forms in Poly(acrylic acid), *Macromolecules* (1997) 30 1111-1117
- 5.9 H.W. Choi, H.J. Woo, W. Hong, J.K. Kim, S.K. Lee, C.H. Eum, Structural modification of poly(methyl methacrylate) by proton irradiation, *Applied Surface Science* (2001) 169-170 433-437
- 5.10 Thai-Hoa Trana, Thanh-Dinh Nguyen, Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: Aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2011) 88 1–22
- 5.11 Rucha Desai, Venu Mankad, Sanjeev K. Gupta, Prafulla K. Jha, Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment, *Nanoscience and Nanotechnology Letters* (2012) 4 30-34
- 5.12 Kazumasa Uetsuki, Prabhat Verma, Taka-aki Yano, Yuika Saito, Taro Ichimura, and Satoshi Kawata, Experimental Identification of Chemical Effects in Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol, *J. Phys. Chem. C* (2010) 114 7515–7520
- 5.13 Osawa M., Matsuda N., Yoshii K., Uchida, I. *J. Phys. Chem.* (1994) 98 12702
- 5.14 Kim K., Lee H. S., *J. Phys. Chem. B* (2005) 109 18929
- 5.15 Wang Y., Chem H., Dong S., Wang E. J., *Chem. Phys.* (2006) 124 074709
- 5.16 Le Ru, E., Etchegoin, P., “Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects” 1st Edition, Elsevier (2009)
- 5.17 Slobodan Sasic, *Pharmaceutical Applications Of Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons (2007)
- 5.18 Andrew J. Berger, Tae-Woong Koo, Irving Itzkan, Gary Horowitz, Michael S. Feld, Multicomponent Blood Analysis by Near-Infrared Raman Spectroscopy, *Applied Optics* (1999) 38(13) 2916-2926
- 5.19 Chenxu Yu, Erin Gestl, Kristin Eckert, David Allara, Joseph Irudayaraj, *Cancer Detection and Prevention* (2006) 30 515–522

Κεφάλαιο 6^ο

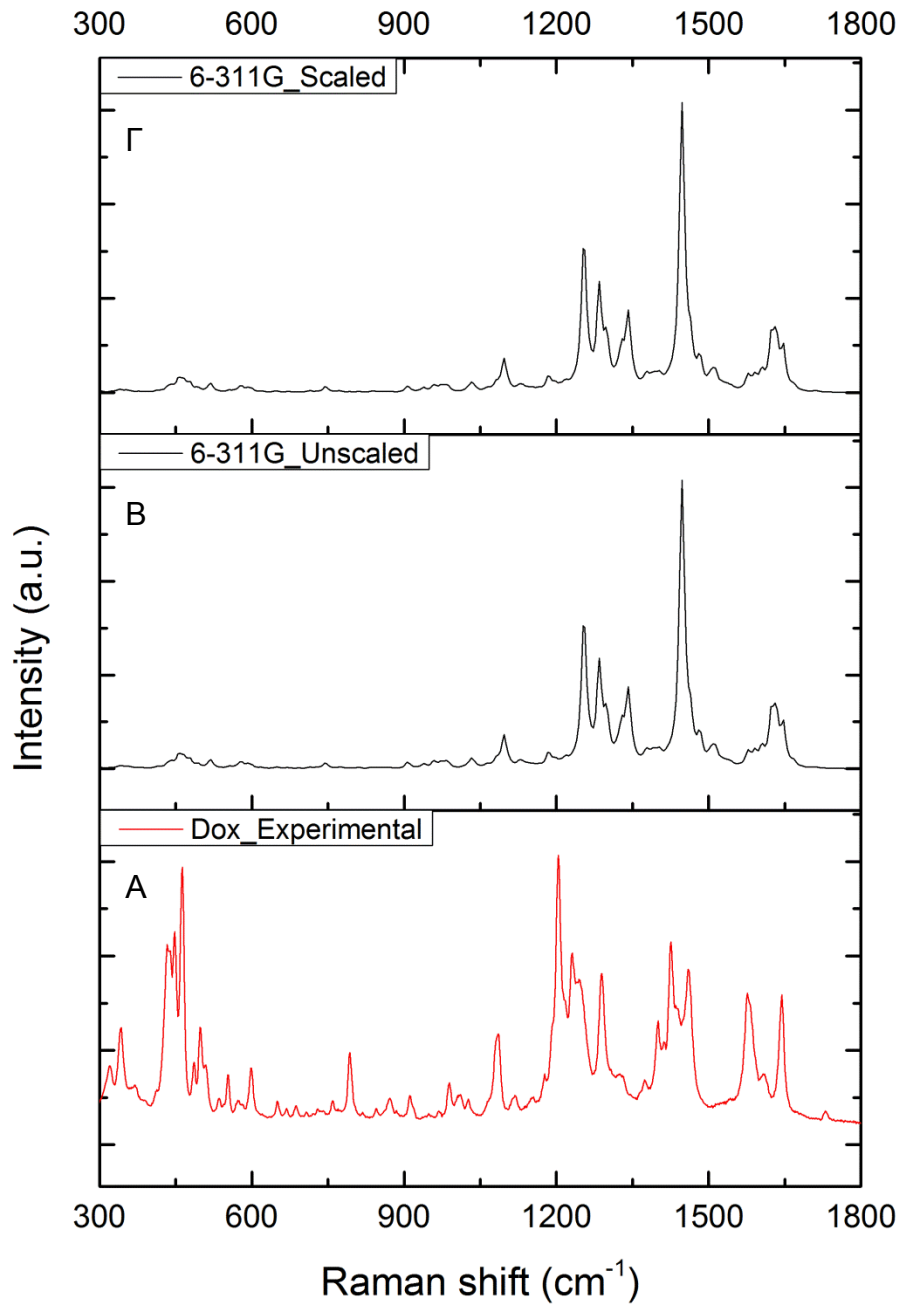
6.1 Θεωρητικός υπολογισμός φασμάτων Raman της δοξορουβικίνης

Η στερεοχημική δομή της δοξορουβικίνης, όπως προέκυψε από την εύρεση της ελάχιστης ενεργειακής κατάστασης με τη βοήθεια του προγράμματος Spartan '08 V1.2.0 και κατά την εισαγωγή του μορίου στο πρόγραμμα Gaussian 09W πριν τον υπολογισμό των φασμάτων φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Η αρίθμηση των ατόμων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρόγραμμα Gaussian 09W [6.1]. Επίσης, οι τέσσερις εξαμελείς δακτύλιοι (Rings) που περιέχονται στο μόριο της θα αναφέρονται ως A, B, C και D, καθώς και ο δακτύλιος της ντονοζαμίνης ως Daun από την ορολογία Daunosamine.



Εικόνα 6.1 Η βελτιστοποιημένη δομή της δοξορουβικίνης

Όπως αναφέρθηκε, ο υπολογισμός των θεωρητικών φασμάτων Raman της δοξορουβικίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G. Τα φάσματα που προκύπτουν, προέρχονται πριν (Unscaled) και μετά (Scaled) την εισαγωγή των συντελεστών κλίμακας και παρουσιάζονται παρακάτω. Επίσης, το φασματικό εύρος περιορίζεται στα 300-1800 cm^{-1} , καθώς η δοξορουβικίνη εμφανίζει ενεργές κορυφές σε αυτό το εύρος, δηλαδή στην περιοχή του «δακτυλικού αποτυπώματος» (fingerprint) [6.2].



Σχήμα 6.1 Α) Πειραματικό, Β) Χωρίς συντελεστή και Γ) Με συντελεστή διόρθωσης φάσμα Raman της δοξορουβικίνης

Οι κύριες κορυφές, όπως προέκυψαν μετά την προσομοίωση και την εισαγωγή του συντελεστή διόρθωσης (Σχήμα 1.Γ) εμφανίζονται περίπου στα 458, 1097, 1254, 1284, 1341, 1447, 1627 και 1646 cm^{-1} . Συγκεκριμένα, οι κορυφές που εμφανίζονται γύρω στα 450-480 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C=O, C-OH και C-O-C. Οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 1000-1300 cm^{-1} προέρχονται από διάφορα είδη δονήσεως κάμψης (συστρεφόμενη, παλλόμενη) του δεσμού C-H. Η κορυφή όμως στα 1097 cm^{-1} οφείλεται και στη συστρεφόμενη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H₂. Στα 1341 cm^{-1} είναι εμφανείς οι δονήσεις έκτασης και κάμψης των δεσμών CO-H, C-H καθώς και των εξαμελών δακτυλίων της

δοξορουβικίνης. Επίσης, η κορυφή στα 1447 cm^{-1} μπορεί να οφείλονται σε δονήσεις έκτασης των ατόμων άνθρακα των εξαμελών δακτυλίων αλλά και στην παλλόμενη δόνηση κάμψης ατόμων άνθρακα και υδρογόνων. Οι κορυφές γύρω στα $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ χαρακτηρίζουν τις δονήσεις έκτασης των εξαμελών δακτυλίων της δοξορουβικίνης, καθώς και τη δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{C}=\text{O}$.

Στον πίνακα που ακολουθεί, πραγματοποιείται η πλήρης καταγραφή των κορυφών με τη μεγαλύτερη ένταση, καθώς επίσης και ο χαρακτηρισμός των δονήσεων από τις οποίες προέρχονται. Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθες:

ν , δ αντιπροσωπεύουν τη δόνηση έκτασης (stretching) και κάμψης (bending) αντίστοιχα

s και a αντιπροσωπεύουν τη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση

ω , r , t , s αντιπροσωπεύουν την παλλόμενη (wagging), λικνιζόμενη (rocking), συστρεφόμενη (twisting) και ψαλιδοειδή (scissoring) δόνηση κάμψης αντίστοιχα

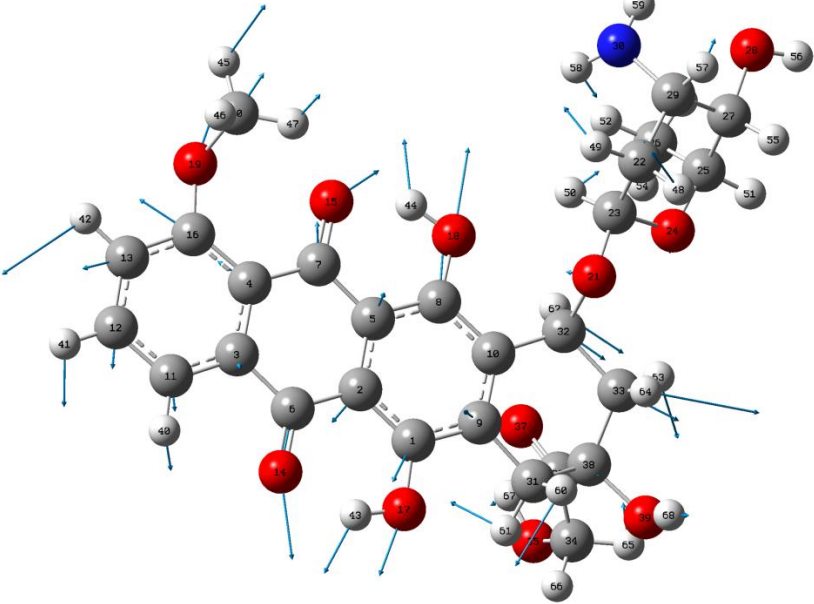
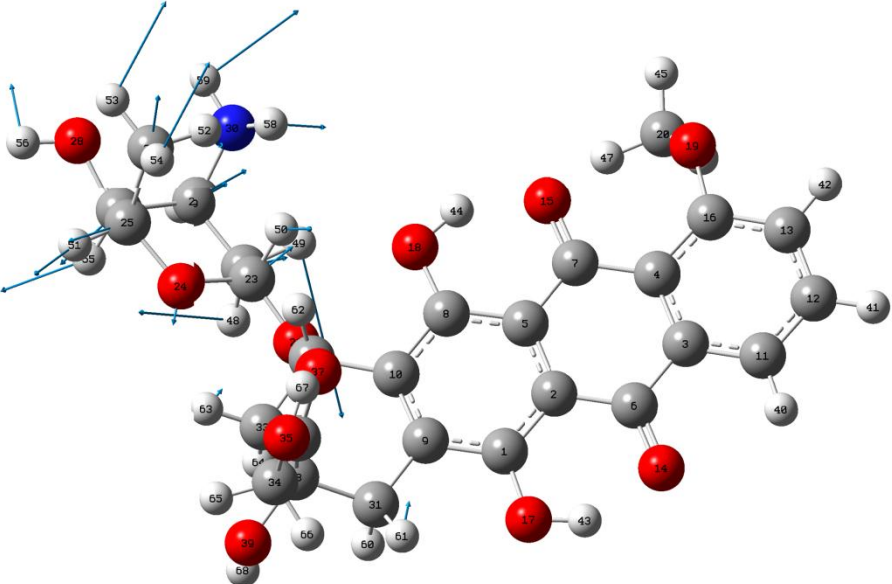
Ring αντιπροσωπεύει τον εξαμελή δακτύλιο της δοξορουβικίνης

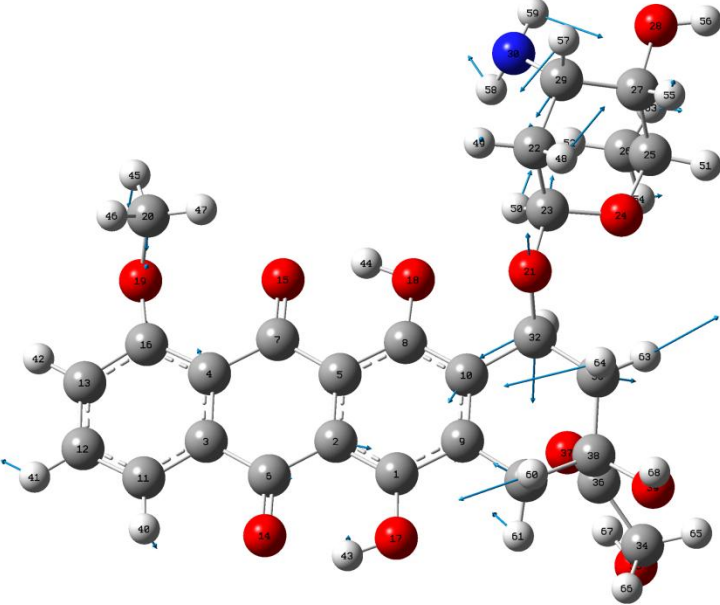
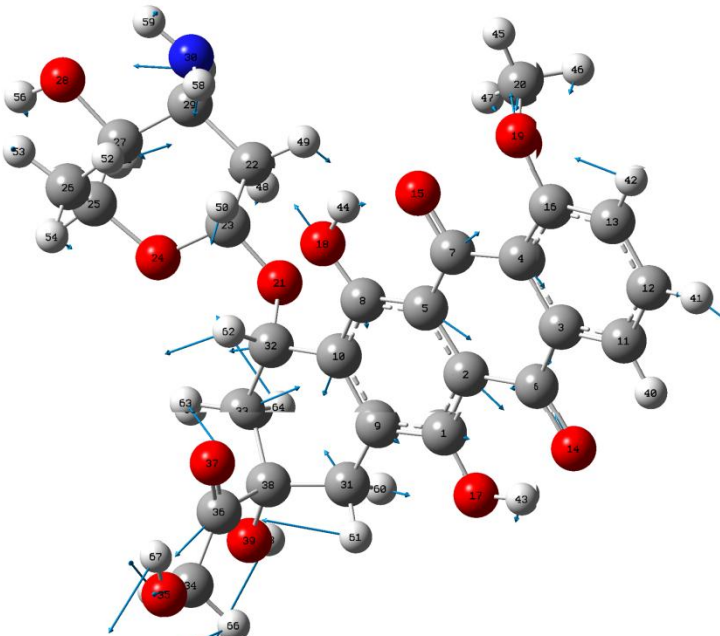
Ring breathing αντιπροσωπεύει την δόνηση έκτασης του δακτυλίου και

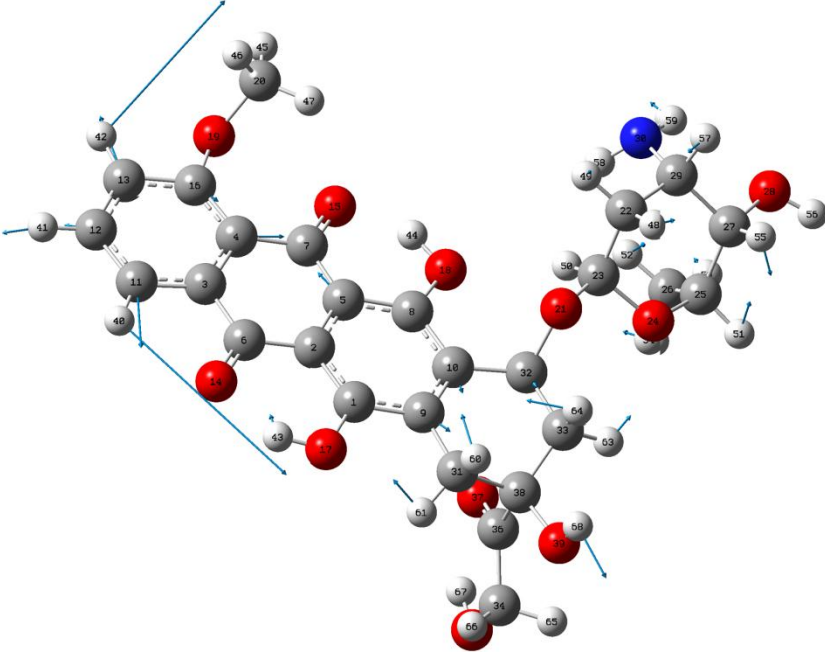
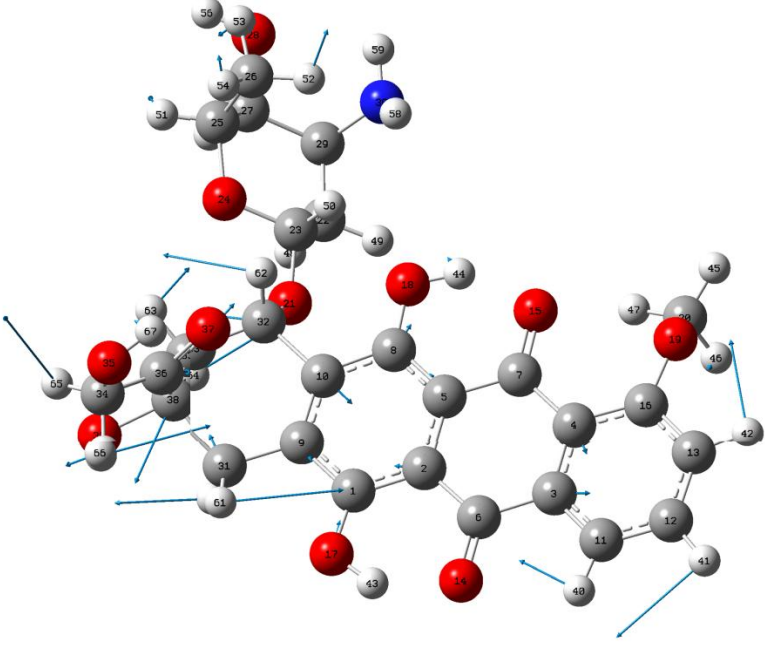
Daun αντιπροσωπεύει τον δακτύλιο της ντονοζαμίνης

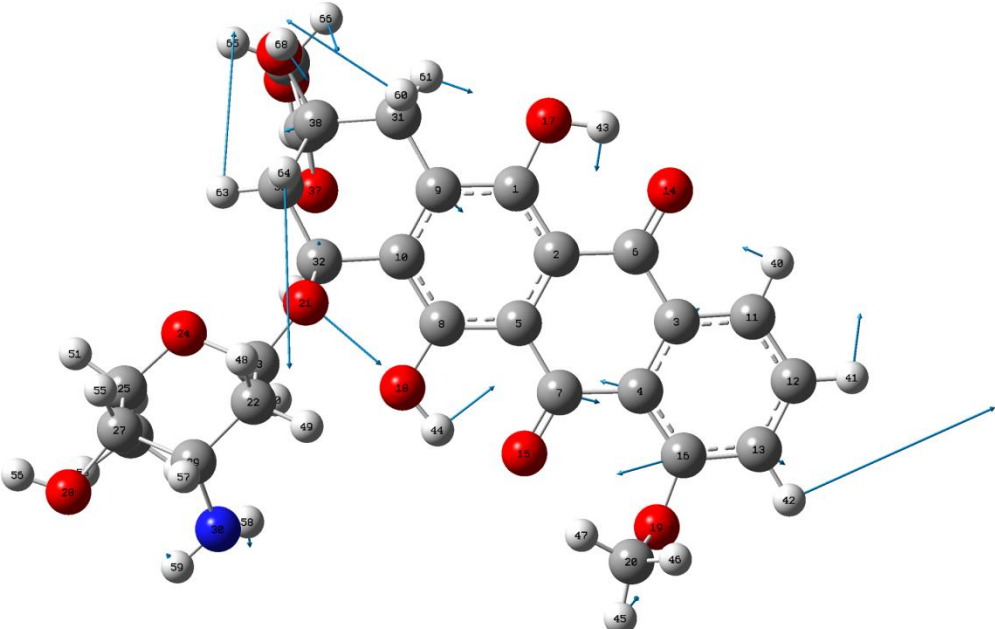
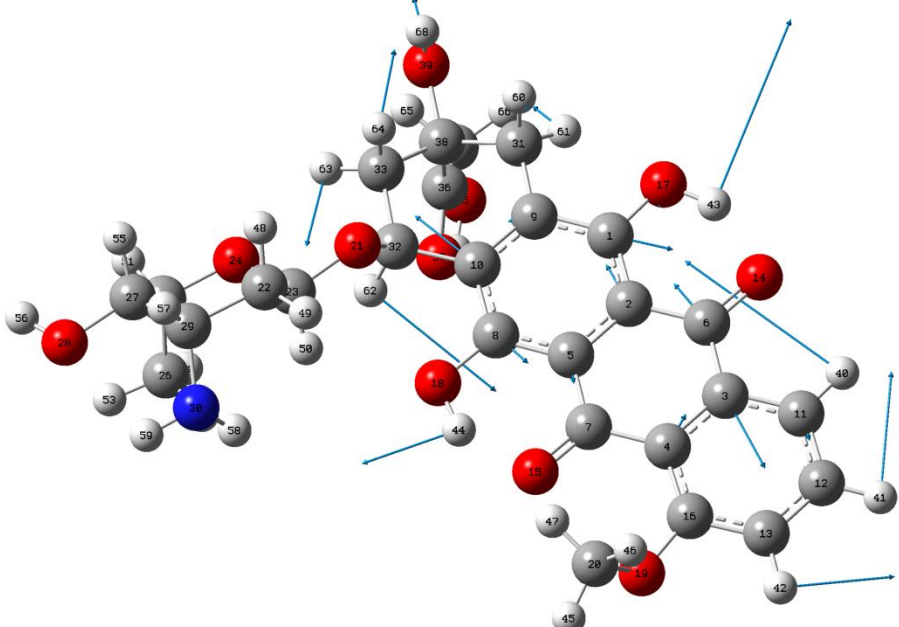
Πίνακας 6.1 Καταγραφή των κορυφών και ο χαρακτηρισμός τους

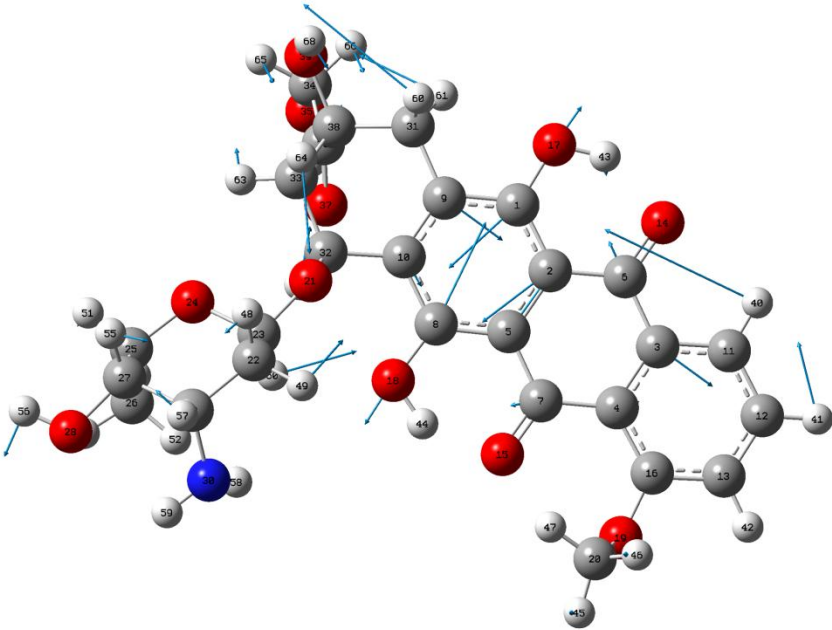
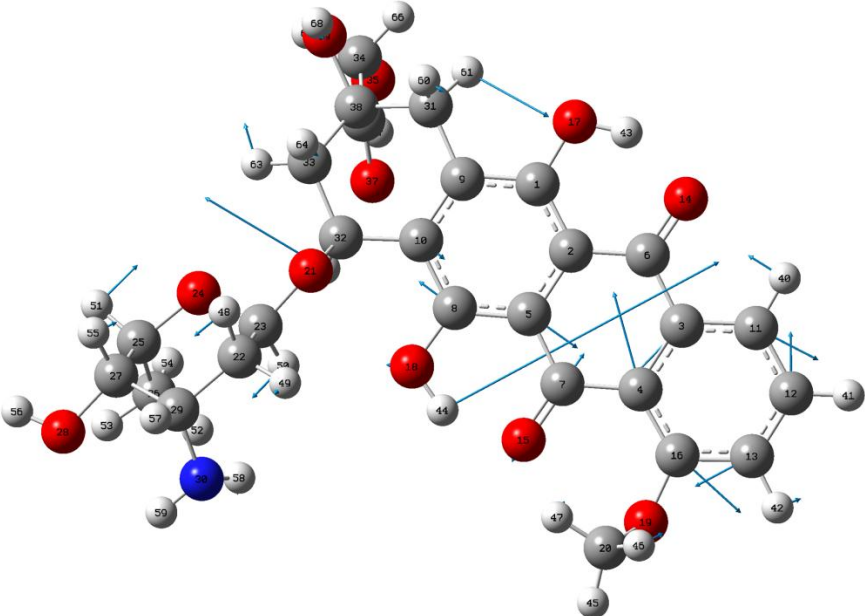
Κορυφές Raman (cm^{-1})	Χαρακτηρισμός	Εικόνες
458.05	$\delta\text{C}^{6/7/36}=\text{O}$, $\delta\text{C}^{1/8/27/38}-\text{OH}$, $\delta\text{C}-\text{O}^{19/21/24}-\text{C}$, $\delta\text{CO}^{17/18/28/35/39}-\text{H}$, $\delta\text{C}-\text{H}_x$, $\text{tN}-\text{H}_2$, $\omega\text{C}-\text{N}$, δRing (A,B,C,D), $\nu\text{Ring}(\text{Daun})$, $\delta\text{C}^{36}-\text{C}^{38}-\text{C}^{31}$	
478.66	δRing (A,B,C,D), $\delta\text{C}^{6/7/36}=\text{O}$, $\delta\text{C}^{1/8/27/38}-\text{OH}$, $\delta\text{CO}^{17/18/28/35/39}-\text{H}$, $\delta\text{C}-\text{H}_x$, $\delta\text{C}-\text{O}^{19/21/24}-\text{C}$, $\text{tN}-\text{H}_2$, $\omega\text{C}-\text{N}$	

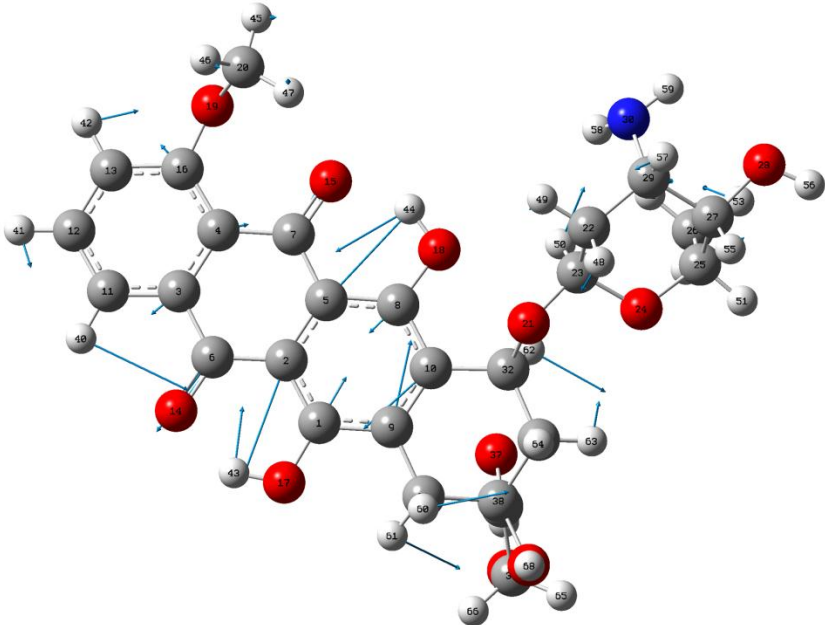
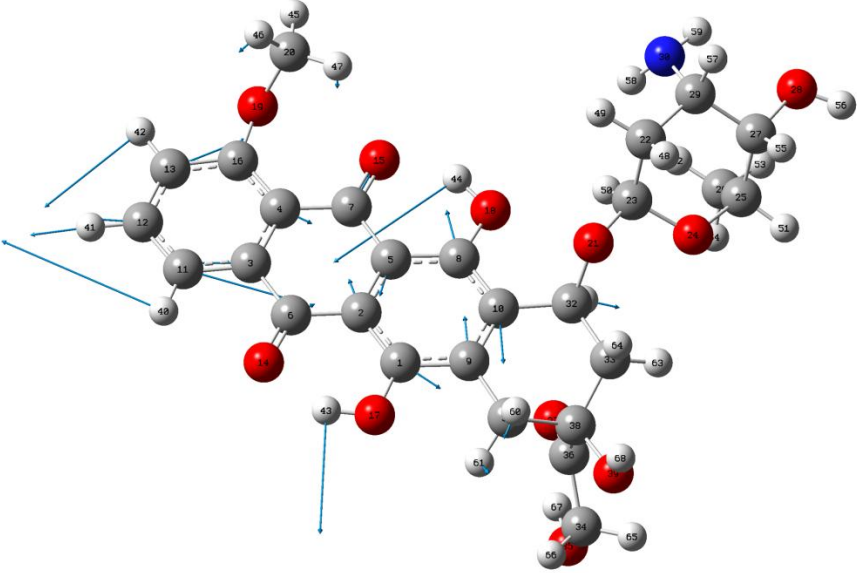
519,62	$\nu\text{Ring (A,B,C,D)}$, $\nu\text{C}^{1/8}\text{-OH}$, $\delta\text{CO-}$ $^{17/18}\text{H}$, $\delta\text{C}^{6/7/36}=\text{O}$, $\omega\text{C}^{21/19}\text{-C}$, $\delta\text{C}^{11/12/13/32/22}\text{-H}$, $\omega\text{C}^{33,22}\text{-H}_2$, $\text{rC}^{22}\text{-H}_2$	
744.96	$\nu\text{Ring(Daun)}$, $\delta\text{C}^{25/27/29/22/26}\text{-H}$, $\omega\text{N-H}_2$, $\delta\text{CO}^{28}\text{-H}$, $\omega\text{C-O}^{24}\text{-C}$	

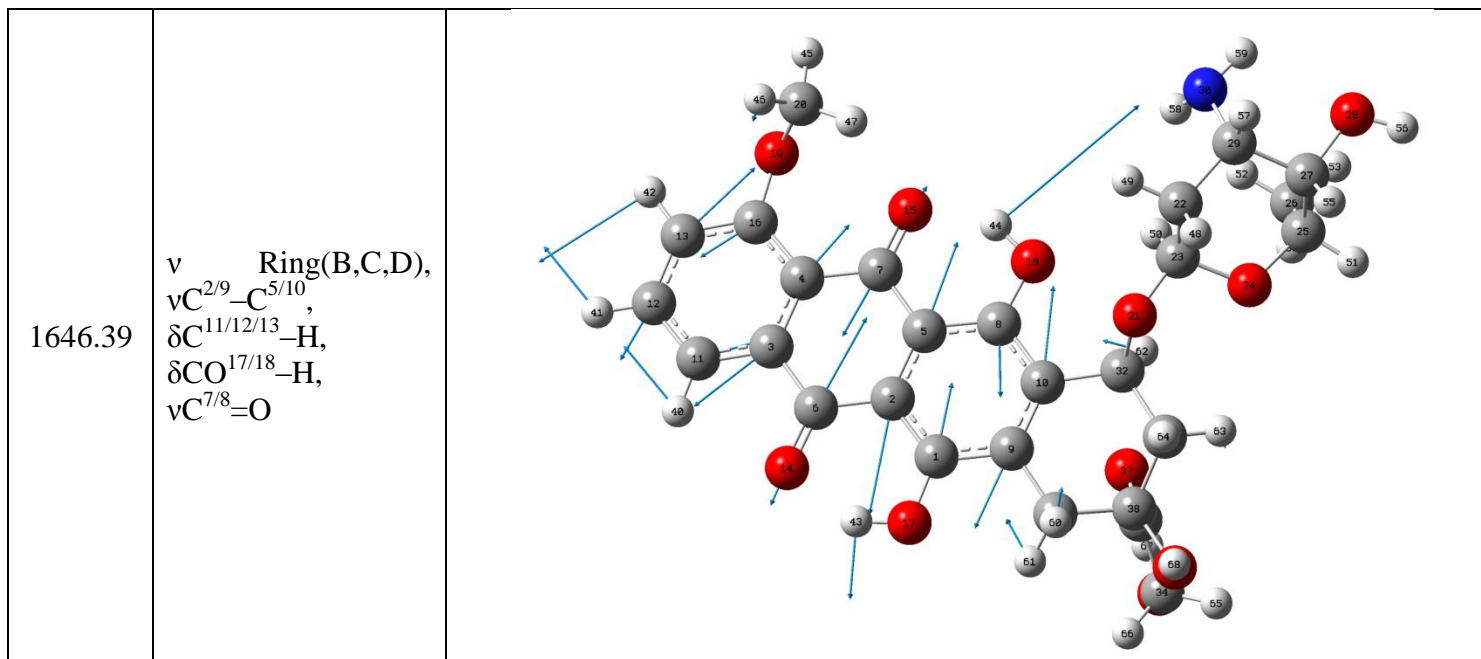
904.15	$rC^{33}-H_2$, $\omega C^{31}-H_2$, $tN-H_2$, $\nu C^{21/19}-O$, $\delta C^{26/25/29/22/23/32/20}$ H, ν Ring (A,B,C,D, Daun)	
1030.69	$tC^{33}-H_2$, $\omega C^{34}-H_2$, $\nu CO^{35}-H$, $\delta C^{12/13/27/29}-H$, $\nu C^{34/38/20}-O$, $\nu C^{32}-C^{33}$, Ring breathing (B), ν Ring (A,C,D)	

1097.72	ν_s C ¹¹ -C ¹² -C ¹³ , $\delta C^{11/12/13/26/29/27/25/33}$ - H, Ring breathing (B), ν Ring (A,C,D), ωC^{31} -H ₂ , νC^{12} -H, δC -N, tN-H ₂	
1185.46	$\delta C^{11/12/13/34/25/26}$ -H, $t C^{31}$ -H ₂ , ωC^{33} -H ₂ , ν_a C ^{32/34} -C ^{33/36} - C _{38/38}	

1254.82	$tC^{33/31/34}-H_2$, $\delta C^{11/12/13}-H$, $\delta CO^{17/18}-H$, vRing (A,B,C,D)	
1284.1	$\delta CO^{17/18/39}-H$, $\delta C^{11,12,13,32}-H$, ν_a Ring(A,B,C,D), $tC^{33,31}-H_2$	

1297.19	v_a Ring(A,B,C,D), $\delta C^{11/12/23}-H$, $\nu C-O^{17/18}$, $\omega C^{31/34}-H_2$, $tC^{22/33}-H_2$	
1341.04	$\delta CO^{18}-H$, v_a Ring(B,C,D), $\delta C^{32/31/25}-H$, $\omega C^{31}-H_2$, $\nu C^7=O$	

1447.6	νC^2-C^5 , ν Ring(B,C,D), $\nu C^{6/7}=O$, $\omega C^{31}-H_2$, $\omega C^{33}-H_3$, $\delta CO^{16/17}-$ H , $\nu C^{1/8}-OH$, $\omega C^{10}-$ $C^{32}-H^{62}$, $\delta C^{11/12/13/32/33}-H$	
1627.73	ν Ring(B,C,D), $\delta C^{11/13}-H$, $\nu C^{12}-H$, $\delta CO^{16/17}-H$, $\delta C^{6/7}=O$, $\omega C^{20}-$ $H_2^{46/47}$	



6.1.1 Σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων

Στο Σχήμα 6.1 παρατίθεται το φάσμα Raman που προέκυψε σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία και το φάσμα μετά από τον θεωρητικό υπολογισμό από την προσομοίωση του μορίου της δοξορουβικίνης.

Τα αποτελέσματα στο φασματικό εύρος 300-1000 cm^{-1} (Σχήμα 6.1.Γ) δείχνουν να μην ταιριάζουν όσον αφορά τις εμφανιζόμενες κορυφές, καθώς άλλες δεν παρουσιάζονται καθόλου, ενώ άλλες εμφανίζονται με πολύ μικρή ένταση, συγκρίνοντας με τους πειραματικούς υπολογισμούς. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της DFT μεθόδου είναι εμφανείς οι κορυφές γύρω στα 400-520, 750 και 1000 cm^{-1} , ενώ σύμφωνα με τις πειραματικές μετρήσεις η δοξορουβικίνη παρουσιάζει περισσότερες κορυφές και με μεγάλη ένταση. Οι δονήσεις που προκύπτουν από το πρόγραμμα Gaussian συμφωνούν με τη βιβλιογραφία και αφορούν τον ίδιο χαρακτηρισμό. Η διαφοροποίηση αυτή που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το laser που εκπέμπει 785 nm, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, είναι ευαίσθητο σε μετρήσεις στο συγκεκριμένο φασματικό εύρος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κορυφές με μεγάλη ένταση. Επίσης, αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι προσομοιώθηκε μόνο ένα μόριο φαρμάκου, ενώ κατά τη διάρκεια της πειραματικής μέτρησης κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό. Αυτό συνεπάγεται ότι υφίστανται ορισμένες διαφορές μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών υπολογισμών που έχουν σχέση με τη μορφή του φάσματος Raman. Τα μόρια της δοξορουβικίνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα ορισμένες φασματικές πληροφορίες να μην εμφανίζονται ή να εμφανίζονται με μειωμένη ένταση κατά την προσομοίωση.

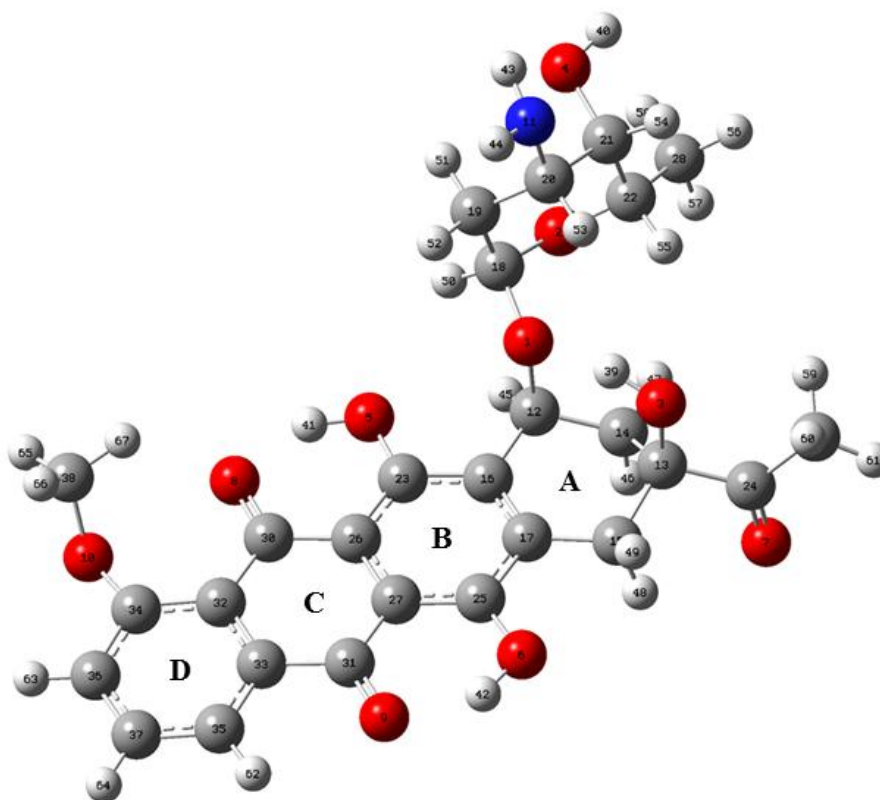
Σχετικά με τα αποτελέσματα που αφορούν στο φασματικό εύρος 1000-1800 cm^{-1} , συμφωνούν σε μεγάλο ποσοστό με αυτά των πειραματικών μετρήσεων. Αναλυτικότερα, οι κορυφές που εμφανίζονται 1200-1300 cm^{-1} παρουσιάζουν την ίδια μορφή και στις δύο περιπτώσεις, αν και είναι λίγο μετατοπισμένες, και χαρακτηρίζουν τις δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H. Στο πειραματικό φάσμα στην περιοχή 1350-1500 cm^{-1} εμφανίζονται τρεις κορυφές, ενώ στο θεωρητικό υπάρχει μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 1447 cm^{-1} . Και στις δύο περιπτώσεις, οι κορυφές αυτές χαρακτηρίζουν τις δονήσεις από τους εξαμελείς δακτυλίους της δοξορουβικίνης και ίσως με τη χρήση της μεθόδου DFT η κορυφή αυτή να αποτελεί παρεμβολή (intercalation) των τριών πειραματικών. Τέλος, οι δύο παρατηρούμενες κορυφές στα 1600 cm^{-1} (Σχήμα 6.1.Γ) υπάρχουν και στο θεωρητικό φάσμα που προέκυψε, αλλά με άλλη μορφολογία. Ο χαρακτηρισμός τους, βέβαια, είναι σύμφωνος με τη βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, τα θεωρητικά αποτελέσματα που προέκυψαν με χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G βρίσκουν μεγάλη ομοιότητα στο φασματικό εύρος 1000-1800 cm^{-1} , ενώ στα 300-1000 cm^{-1} υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις, λόγω των αιτιών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

6.2 Θεωρητικός υπολογισμός φασμάτων Raman της δαουνορουβικίνης

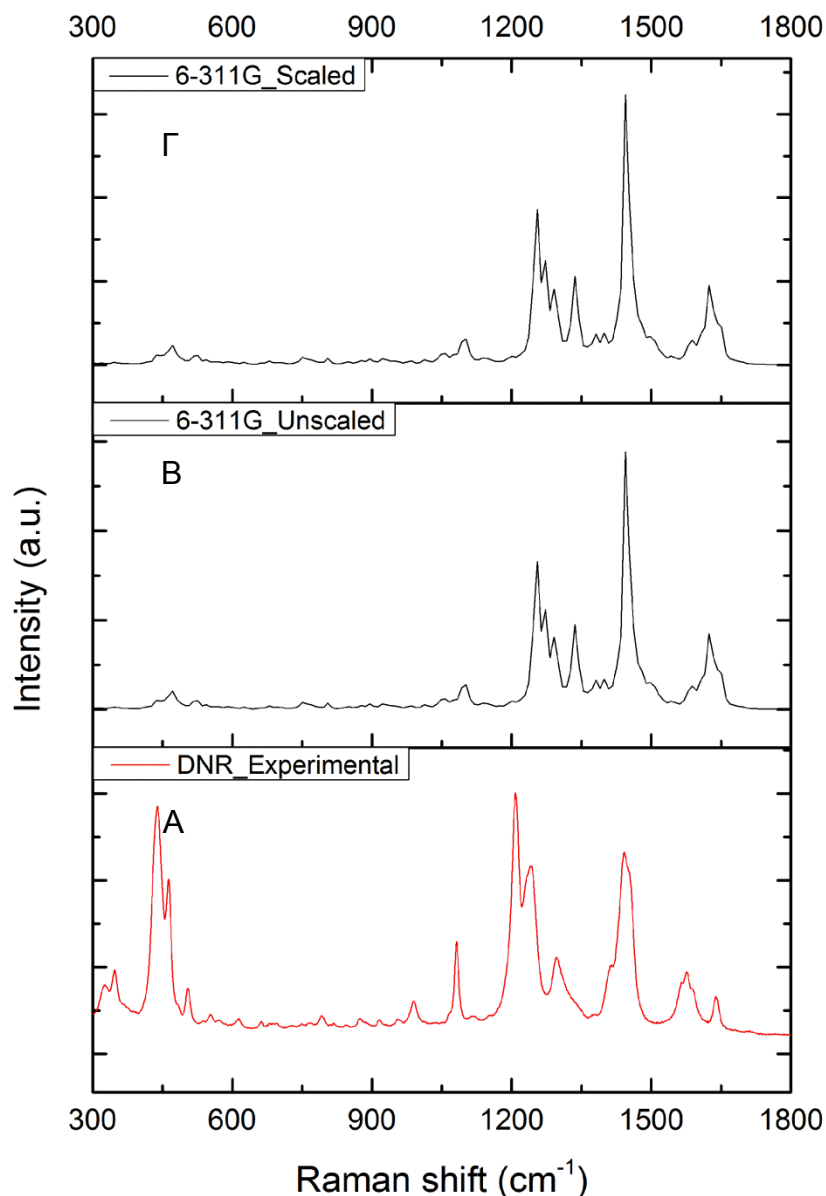
Η στερεοχημική δομή της δαουνορουβικίνης, όπως προέκυψε από την εύρεση της ελάχιστης ενεργειακής κατάστασης με τη βοήθεια του προγράμματος Spartan '08 V1.2.0 και κατά την εισαγωγή του μορίου στο πρόγραμμα Gaussian 09W πριν τον υπολογισμό των φασμάτων φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Η αρίθμηση των ατόμων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρόγραμμα Gaussian 09W [6.1]. Επίσης, οι τέσσερις εξαμελείς δακτύλιοι (Rings) που περιέχονται στο μόριο της θα αναφέρονται ως A, B, C και D, καθώς και ο δακτύλιος της ντονοζαμίνης ως Daun από την ορολογία Daunosamine.

Η διαφορά στη δομή των δύο φαρμάκων οφείλεται στο γεγονός ότι ο άνθρακας που συνδέεται με διπλό δεσμό με οξυγόνο, στην περίπτωση της δοξορουβικίνης (C36) συνδέεται με μια ομάδα $-\text{CH}_2\text{OH}$, ενώ στην περίπτωση της δαουνορουβικίνης (C24) συνδέεται με μια ομάδα $-\text{CH}_3$.



Εικόνα 6.2 Η βελτιστοποιημένη δομή της δαουνορουβικίνης

Όπως αναφέρθηκε, ο υπολογισμός των θεωρητικών φασμάτων Raman της δαουνορουβικίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G. Τα φάσματα που προκύπτουν, προέρχονται πριν (Unscaled) και μετά (Scaled) την εισαγωγή των συντελεστών κλίμακας και παρουσιάζονται παρακάτω. Επίσης, το φασματικό εύρος περιορίζεται στα $300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, καθώς η δαουνορουβικίνη εμφανίζει ενεργές κορυφές σε αυτό το εύρος, δηλαδή στην περιοχή του «δακτυλικού αποτυπώματος» (fingerprint).



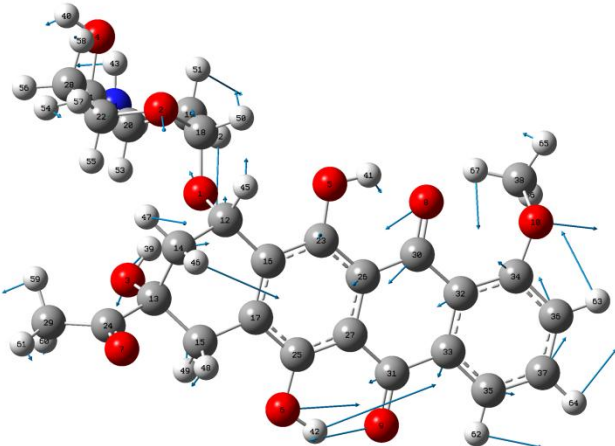
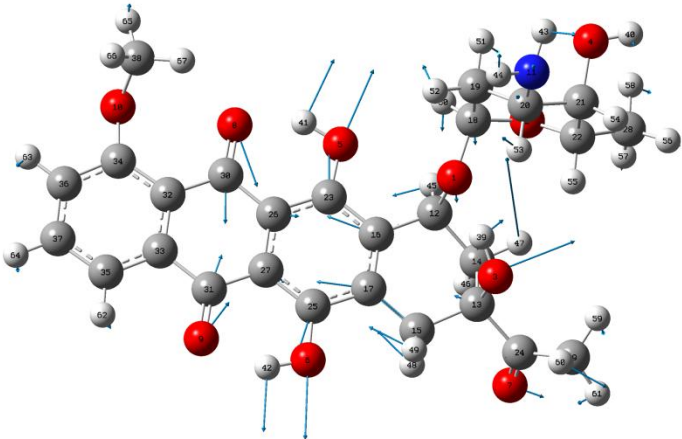
Σχήμα 6.2 Α) Πειραματικό, Β) Χωρίς συντελεστή και Γ) Με συντελεστή διόρθωσης φάσμα Raman της δαουνορουβικίνης

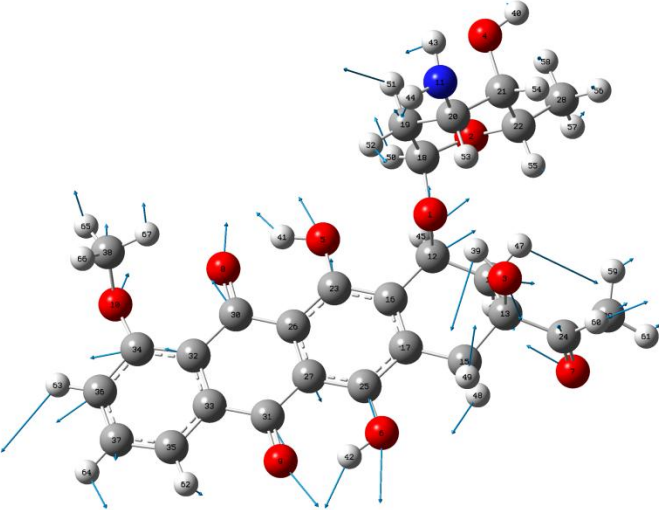
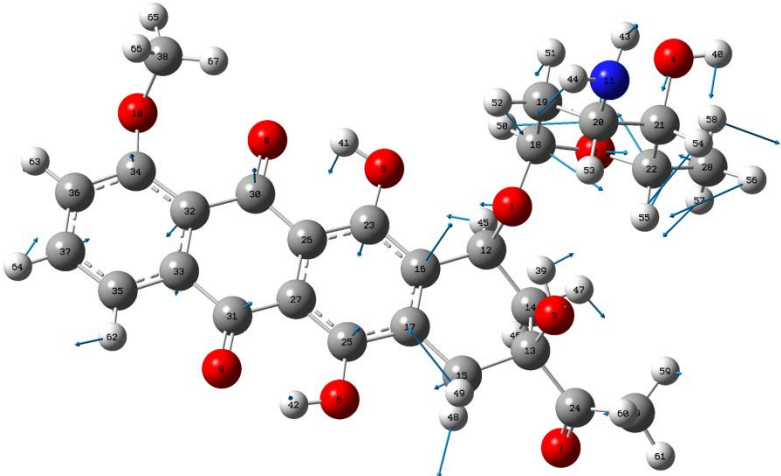
Οι κύριες κορυφές, όπως προέκυψαν μετά την προσομοίωση και την εισαγωγή του συντελεστή διόρθωσης (Σχήμα 6.2.Γ) εμφανίζονται περίπου στα 436, 1098, 1254, 1272, 1335, 1442, 1623 και 1650 cm^{-1} . Συγκεκριμένα, οι κορυφές που εμφανίζονται γύρω στα 430-480 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C=O, C-OH και C-O-C. Οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 1000-1300 cm^{-1} προέρχονται από διάφορα είδη δονήσεως κάμψης (συστρεφόμενη, παλλόμενη) του δεσμού C-H. Η κορυφή όμως στα 1098 cm^{-1} οφείλεται και στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-N. Στα 1335 cm^{-1} είναι εμφανείς οι δονήσεις έκτασης και κάμψης των δεσμών CO-H, C-H καθώς και των εξαμελών δακτυλίων της δαουνορουβικίνης. Επίσης, η κορυφή στα 1442 cm^{-1} μπορεί να οφείλονται σε δονήσεις έκτασης των ατόμων άνθρακα των εξαμελών δακτυλίων αλλά και στη ψαλιδοειδή δόνηση κάμψης

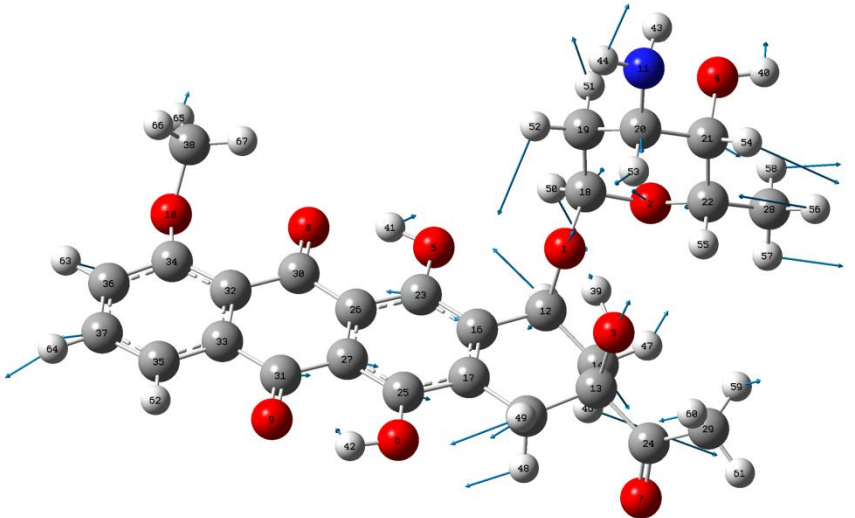
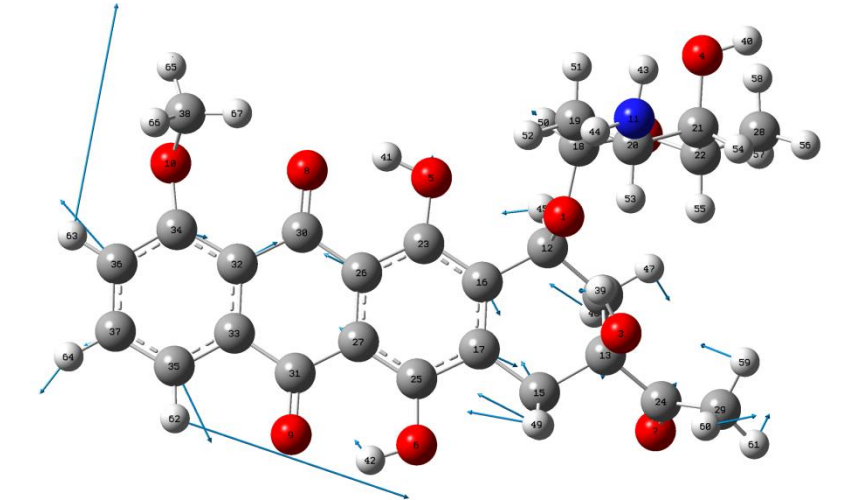
ατόμων άνθρακα και υδρογόνων. Οι κορυφές γύρω στα $1600-1650\text{ cm}^{-1}$ χαρακτηρίζουν τις δονήσεις έκτασης των εξαμελών δακτυλίων της δοξορουβικίνης, τη δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{C}=\text{O}$, καθώς και σε ψαλιδοειδή δόνηση κάμψης του άνθρακα 15 με τα υδρογόνα.

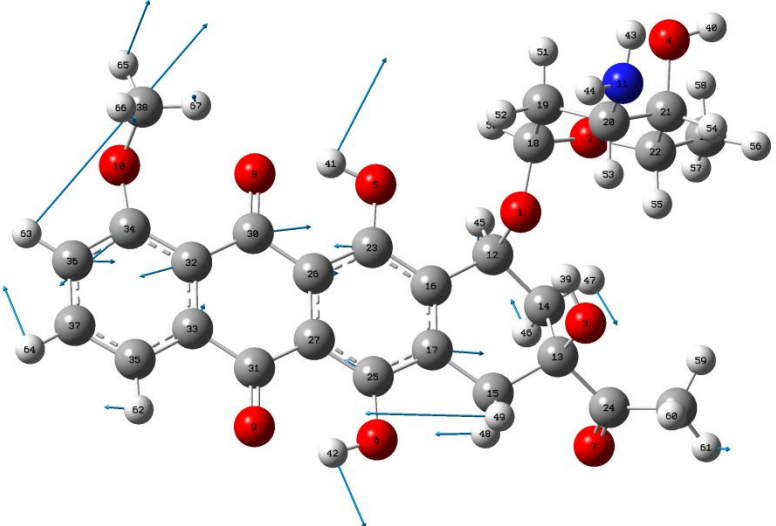
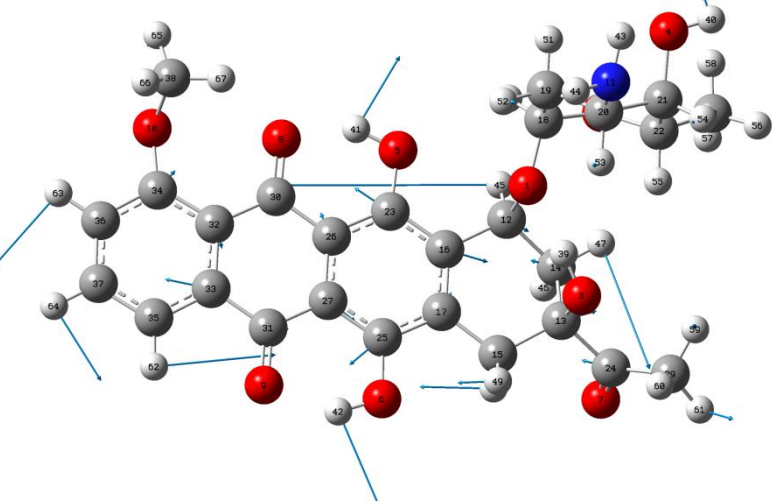
Στον πίνακα που ακολουθεί, πραγματοποιείται η πλήρης καταγραφή των κορυφών με τη μεγαλύτερη ένταση, καθώς επίσης και ο χαρακτηρισμός των δονήσεων από τις οποίες προέρχονται. Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του θεωρητικού φάσματος της δοξορουβικίνης.

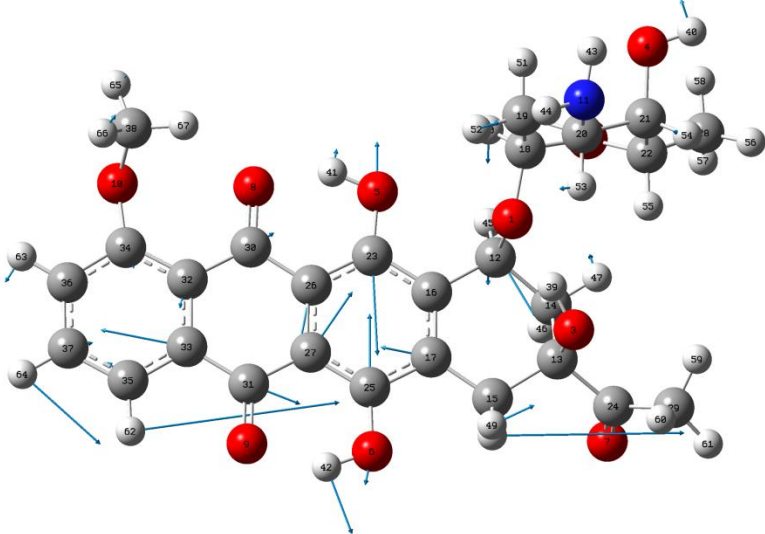
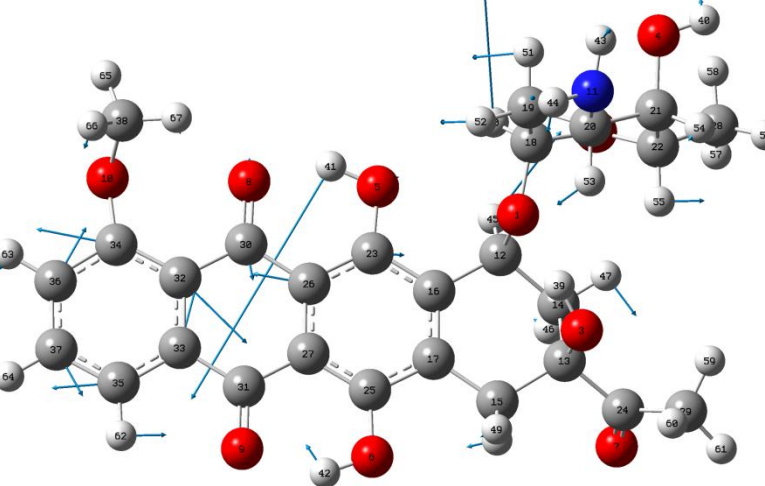
Πίνακας 6.2 Καταγραφή των κορυφών και ο χαρακτηρισμός τους

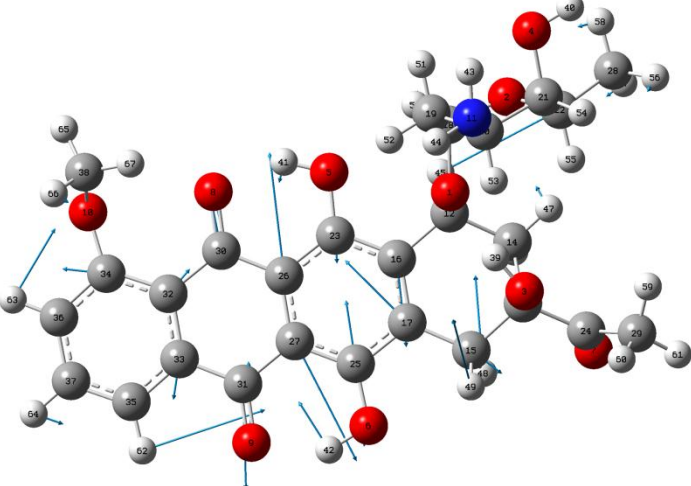
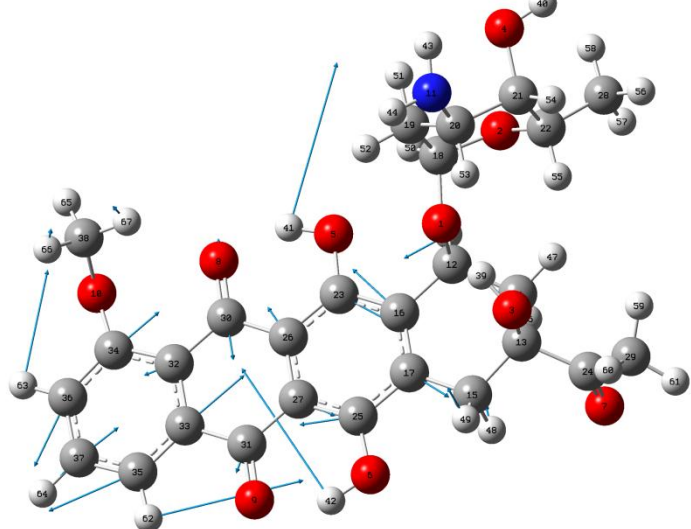
Κορυφές Raman (cm^{-1})	Χαρακτηρισμός	Εικόνες
436.52	$\delta\text{C}^{30/31}=\text{O}$, $\delta\text{C}^{25/39}-\text{OH}$, $\delta\text{CO}^{6/5/3/4}-\text{H}$, $\delta\text{C}-\text{O}^{10/2/1}-\text{C}$, $\delta\text{C}^{35/36/37/38/14/29/18/12}-\text{H}$, $\text{rC}^{14/19/15}-\text{H}_2$, $\text{tN}-\text{H}_2$, $\delta\text{C}-\text{N}$, $\delta\text{Ring}(\text{A,B,C,D, Daun})$	
471.46	$\delta\text{C}^{30/31}=\text{O}$, $\delta\text{C}^{23/25}-\text{OH}$, $\delta\text{CO}^{5/6/3}-\text{H}$, $\text{rC}^{14}-\text{H}_2$, $\omega\text{C}^{15}-\text{H}_2$, Ring breathing (B,C), $\nu\text{Ring}(\text{A, Daun})$, $\delta\text{C}^{19/12/19/28}-\text{H}$, $\omega\text{N}-\text{H}_2$, $\delta\text{C}-\text{N}$	

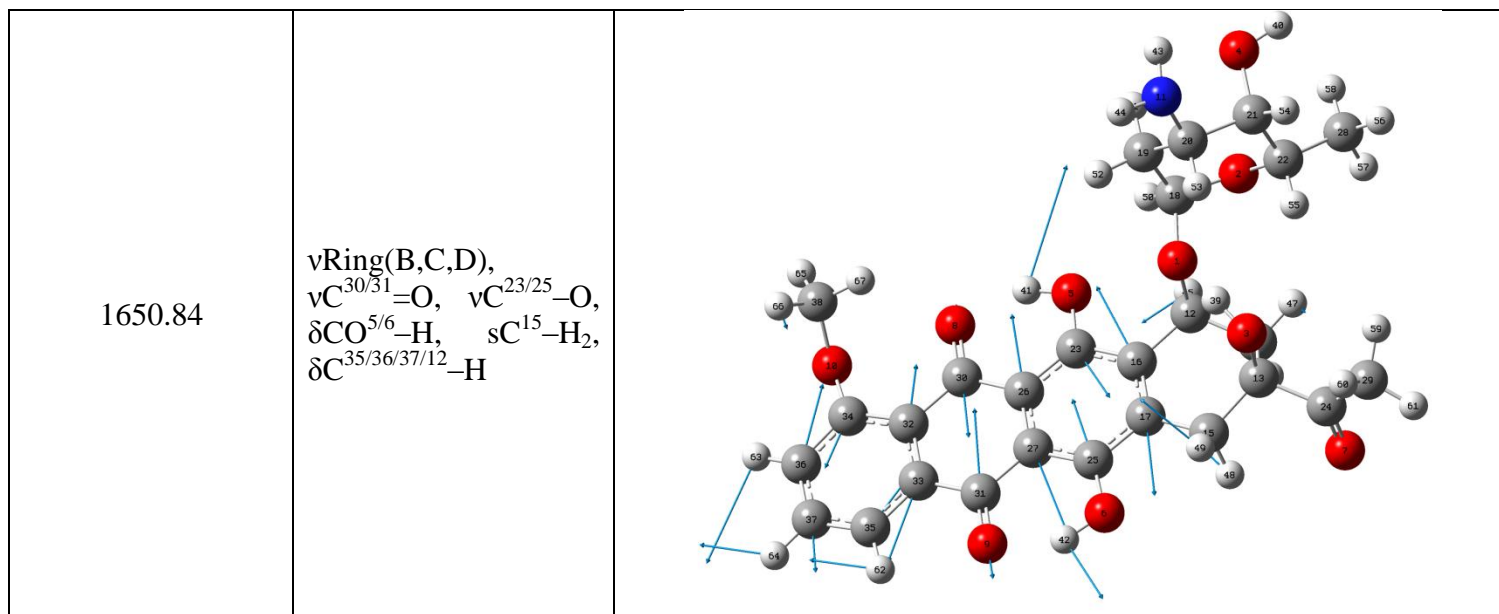
521.37	$\delta C^{30/31/24}=\text{O}$, $\delta C^{23/25/13}-\text{OH}$, $\delta \text{CO}^{5/6/3}-\text{H}$, Ring breathing (B,C), $\nu\text{Ring}(\text{A}, \text{Daun})$, $\delta \text{C}-\text{O}^{10/2/1}-\text{C}$, $\delta C^{35/36/37/38/19/14/12/29/12}-$ H , $rC^{15}-\text{H}_2$, $\omega\text{N}-\text{H}_2$	
752.24	$\nu\text{Ring}(\text{Daun})$, $\delta C^{21/28/18/19/20/15/12/35/37}-$ H , $t\text{N}-\text{H}_2$, $\delta \text{C}-\text{O}^{1/2}-\text{C}$, $\delta C^{21/13}-\text{OH}$, $\delta \text{CO}^{4/5}-\text{H}$, $\nu\text{Ring}(\text{A}, \text{B}, \text{C}, \text{D})$	

806.3	$\nu\text{Ring(Daun)}$, $\delta\text{C}^{21/14/18/36/37/28/12/22}\text{-H}$, $\delta\text{C}^{3/21}\text{-OH}$, $\delta\text{CO}^{5/6/4/3}\text{-H}$, $\nu\text{Ring(A,B,C,D)}$	
1098.84	$\delta\text{C}^{35/36/37/12/29}\text{-H}$, $\omega\text{C}^{15}\text{-H}_2$, $\nu\text{sC}^{35}\text{-C}^{37}$, C^{36} , $\text{tC}^{14}\text{-H}_2$, Ring(B) , $\nu\text{Ring(A,C,D)}$, $\delta\text{C-N}$	

<p>1254.66</p>	<p>$\delta C^{36/37/38/35/12}-H,$ $\omega C^{15}-H_2, \quad tC^{14}-H_2,$ $\delta CO^{5/6}-H, \nu C^{30}-C^{32}$</p>	
<p>1272.5</p>	<p>$\delta C^{12/14/35/36/37}-H,$ $\omega C^{15}-H_2, \quad \delta CO^{5/6}-H,$ $\nu C^{23/13}-C^{16/24},$ $\nu Ring(A,B,C,D)$</p>	

<p>1290.82</p>	<p>$\delta C^{35/37/15/14/12}-H$, $\nu C^{23/25}-O$, $\nu C^{31/36}-C^{33/27}$, $\nu Ring(A,B,C,D)$</p>	
<p>1335.91</p>	<p>$\delta CO^{5/6}-H$, $\nu_a C^{33}-C^{32}-C^{34}$, $\nu Ring(B,C,D)$, $\nu C^{30}=O$, $\omega C^{19}-H_2$, $\delta C^{12/18/35/22}-$ H, $tN-H_2$</p>	

<p>1442.45</p>	<p>$\nu\text{Ring(B,C,D)}$, $\nu\text{C}^{26/16}\text{-C}^{27/17}$, $\nu\text{C}^{30/31}=\text{O}$, $\nu\text{C}^{23/25}\text{-O}$, $\delta\text{CO}^{5/6}\text{-H}$, $s\text{C}^{15}\text{-H}_2$, $\delta\text{C}^{12/35/36/37}\text{-H}$</p>	
<p>1623.94</p>	<p>$\nu\text{Ring(B,C,D)}$, $\delta\text{CO}^{5/6}\text{-H}$, $\nu\text{C}^{30/31}=\text{O}$, $\nu\text{C}^{23/25}\text{-O}$, $\delta\text{C}^{35/36/12}\text{-H}$, $s\text{C}^{15}\text{-H}_2$</p>	



6.2.1 Σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων

Στο Σχήμα 6.2 παρουσιάζεται το φάσμα Raman που προέκυψε σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία και το φάσμα μετά από τον θεωρητικό υπολογισμό από την προσομοίωση του μορίου της δαουνορουβικίνης.

Το θεωρητικό φάσμα της δαουνορουβικίνης εμφανίζει πολλές ομοιότητες και σχεδόν την ίδια μορφολογία με αυτό της δοξορουβικίνης. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς, όπως έχει αναφερθεί, τα δύο φάρμακα μοιάζουν αρκετά στη δομή τους.

Έτσι, τα αποτελέσματα στο φασματικό εύρος $300-1000\text{ cm}^{-1}$ (Σχήμα 6.2.Γ) και σε αυτή τη περίπτωση, δείχνουν να μην ταιριάζουν όσον αφορά τις εμφανιζόμενες κορυφές, διότι άλλες δεν παρουσιάζονται καθόλου, ενώ άλλες εμφανίζονται με πολύ μικρή ένταση, συγκρίνοντας με τις πειραματικές μετρήσεις. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της DFT μεθόδου είναι εμφανείς οι κορυφές γύρω στα $400-520$, 750 , 800 και 1000 cm^{-1} , ενώ σύμφωνα με τις πειραματικές μετρήσεις η δαουνορουβικίνη παρουσιάζει περισσότερες κορυφές και με μεγάλη ένταση. Οι δονήσεις που προκύπτουν από την προσομοίωση με το πρόγραμμα Gaussian συμφωνούν με τη βιβλιογραφία και αφορούν στον ίδιο χαρακτηρισμό. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται και σε αυτή τη περίπτωση, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το laser που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, είναι ευαίσθητο σε μετρήσεις στο συγκεκριμένο φασματικό εύρος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κορυφές με μεγάλη ένταση. Επίσης, αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι προσομοιώθηκε μόνο ένα μόριο δαουνορουβικίνης, ενώ κατά τη διάρκεια της πειραματικής μέτρησης κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό. Αυτό συνεπάγεται ότι υφίστανται ορισμένες διαφορές μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών υπολογισμών που έχουν σχέση με τη μορφή του φάσματος Raman. Τα μόρια της δαουνορουβικίνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα ορισμένες φασματικές πληροφορίες να χάνονται κατά τους θεωρητικούς υπολογισμούς.

Σχετικά με τα αποτελέσματα που αφορούν στο φασματικό εύρος $1000-1800\text{ cm}^{-1}$, συμφωνούν σε μεγάλο ποσοστό με αυτά των πειραματικών μετρήσεων. Αναλυτικότερα, οι κορυφές που εμφανίζονται $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζουν την ίδια μορφή και στις δύο περιπτώσεις, αν και είναι λίγο μετατοπισμένες, και χαρακτηρίζουν τις δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H. Στο πειραματικό φάσμα στην περιοχή $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται μία κορυφή και στο θεωρητικό φάσμα πάλι υπάρχει μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 1447 cm^{-1} . Και στις δύο περιπτώσεις, οι κορυφές αυτές χαρακτηρίζουν τις δονήσεις από τους εξαμελείς δακτυλίους της δαουνορουβικίνης. Τέλος, οι δύο παρατηρούμενες κορυφές στα 1600 cm^{-1} (Σχήμα 6.1.Γ) υπάρχουν και στο θεωρητικό φάσμα που προέκυψε, αλλά με άλλη μορφολογία (με μορφή μίας κορυφής). Ο χαρακτηρισμός τους, βέβαια, είναι σύμφωνος με τη βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, τα θεωρητικά αποτελέσματα που προέκυψαν με χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G βρίσκουν μεγάλη ομοιότητα

στο φασματικό εύρος $1000-1800\text{ cm}^{-1}$, ενώ στα $300-1000\text{ cm}^{-1}$ υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις, λόγω των αιτιών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Βιβλιογραφία 6^{ου} Κεφαλαίου

- 6.1 Gaussian 09, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
- 6.2 G. Das, A. Nicastrì, M. L. Coluccio, F. Gentile, P. Candeloro, G. Cojoc, C. Liberale, F. Angelis, E. Fabrizio, FT-IR, Raman, RRS Measurements and DFT Calculation for Doxorubicin, *Microscopy Research and Technique* (2010) 73 991-995

Κεφάλαιο 7^ο

7.1 Συμπεράσματα

Στην διπλωματική εργασία μελετήθηκαν **φαρμακευτικές ενώσεις με χρήση της μεθόδου της φασματοσκοπίας Raman**. Τα φάρμακα αυτά, η δοξορουβικίνη και η δαουνορουβικίνη, παρουσιάζουν έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

Στο πρώτο σκέλος του πειραματικού μέρους της εργασίας, οι δύο αυτές ενώσεις εγκλωβίστηκαν σε pH-ευαίσθητες πολυμερικές νανοσφαίρες και εξετάστηκαν δομικά. Συγκεκριμένα, η δοξορουβικίνη φορτώθηκε σε σφαίρες πολυ(γλυσιδλικού μεθυλεστέρα@μεθακρυλικού μεθυλεστέρα-co-διβινυλοβενζολίου-co-ακρυλικού οξέος) – P(GMA@MMA-co-DVB-co-AA). Έτσι, εξετάστηκαν τα φάσματα Raman που προέκυψαν από τη δοξορουβικίνη, τις κενές και τις φορτωμένες πολυμερικές σφαίρες. Τα φάσματα αυτά χαρακτηρίστηκαν πλήρως ως προς τις κύριες κορυφές που εμφανίζονταν και επισημάνθηκαν οι μεταξύ διαφορές τους. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι **οι εμφανιζόμενες κορυφές, από το φάσμα των φορτωμένων με φάρμακο σφαιρών, στο φασματικό εύρος 100-500 cm⁻¹, προέρχονται από τη δοξορουβικίνη, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι το φάρμακο έχει εγκλωβιστεί στις πολυμερικές σφαίρες**. Επίσης, η κορυφή στα 1290 cm⁻¹, η οποία εμφανίζεται και στο φάσμα της δοξορουβικίνης και σε αυτό με τα φορτωμένα νανοδοχεία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μπορεί να οφείλεται σε δεσμούς υδρογόνου που στη πρώτη περίπτωση μπορεί να είναι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μορίων της δοξορουβικίνης και στη δεύτερη περίπτωση μεταξύ μορίου δοξορουβικίνης και πολυμερούς. Επίσης, η δαουνορουβικίνη φορτώθηκε σε σφαίρες πολυ(μεθακρυλικού οξέος) poly(methacrylic acid – PMAA) και σε σφαίρες πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου-co-μεθακρυλικού οξέος) poly(N-isopropylacrilamide-co-methacrylic acid – P(NIPAAm-co-MAA)). Έτσι, διερευνήθηκαν τα δονητικά φάσματα που προέκυψαν από μετρήσεις σε δείγματα της δαουνορουβικίνης, των κενών και των φορτωμένων πολυμερικών νανοδοχείων. Τα φάσματα αυτά χαρακτηρίστηκαν πλήρως ως προς τις κύριες κορυφές τους και εξετάστηκαν οι μεταξύ τους διαφορές. Συγκρητικά, το φάσμα Raman που προέκυψε από τα πολυμερικά νανοδοχεία (και στις δύο περιπτώσεις) που είναι φορτωμένα με τη δαουνορουβικίνη μοιάζει να ταυτίζεται με αυτό της δαουνορουβικίνης, παρουσιάζοντας καθόλου ή μικρές μετατοπίσεις στους κυματάρθρους. Ο λόγος που δικαιολογεί το παρατηρούμενο αυτό αποτέλεσμα, έγκειται στο γεγονός ότι **η δαουνορουβικίνη λόγω των δακτυλίων που περιέχει, είναι ένα μόριο με έντονο φθορισμό (fluorescence)**, πράγμα που σημαίνει ότι η ένταση των κορυφών που τη χαρακτηρίζουν είναι πολύ υψηλότερη από αυτή του πολυμερούς (που δεν εμφανίζει σχεδόν καθόλου φθορισμό), που συνεπάγεται ότι οι κορυφές του πολυμερούς δεν δύναται να εμφανιστούν. Το γεγονός, βέβαια, της μη εμφάνισης των κορυφών του πολυμερούς δεν συνεπάγεται ότι τα νανοδοχεία δεν υφίστανται, αλλά ότι πρέπει να βρεθούν τρόποι και διαδικασίες μείωσης του φθορισμού, ώστε να προκύψουν πιο συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Όσον αφορά την παρασκευή των δύο κατηγοριών ενεργών υποστρωμάτων για ενίσχυση της σκέδασης Raman (SERS), δηλαδή το κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου και το λεπτό υμένιο αργύρου σε υπόστρωμα βοριοπυριτικού γυαλιού, συμπεραίνεται

ότι με τη βοήθεια του διαλύματος της 4-αμινοθειοφαινόλης (4-ATP) διαπιστώθηκε η ύπαρξη του φαινομένου SERS. **Η προσρόφηση του 4-ATP στο κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση όλων των χαρακτηριστικών κορυφών του 4-ATP που οφείλονται στο φαινόμενο SERS.** Στην περίπτωση του λεπτού υμενίου, το φάσμα Raman που προκύπτει από τη διέγερση με την ακτινοβολία που εκπέμπει στα 514 nm εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές του 4-ATP στο φασματικό εύρος 1100-1700 cm^{-1} , γεγονός που δεν συμβαίνει με το laser στα 785 nm. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι **τα επιφανειακά πλασμόνια του αργύρου διεγείρονται πιο αποτελεσματικά όταν το μήκος κύματος της προσπίπουσας ακτινοβολίας βρίσκεται πιο κοντά στο μέγιστο απορρόφησης του λεπτού υμενίου.** Ωστόσο, κορυφές όπως στα 1144 και 1590 cm^{-1} είναι κοινές και στα δύο ληφθέντα φάσματα. Τα υποστρώματ αυτά δύναται να συμβάλουν στην **ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων** που αφορούν ασθένειες, όπως ο καρκίνος.

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας, με τη βοήθεια προγραμμάτων της Υπολογιστικής Χημείας, πραγματοποιήθηκε ο θεωρητικός υπολογισμός των φασμάτων Raman της δοξουρουβικίνης και της δαουνορουβικίνης με χρήση της μεθόδου DFT και συγκεκριμένα του υβριδικού συναρτησιακού των Becke και Lee, Yang και Parr, B3LYP και του συνόλου βάσης 6-311G. Στα πλαίσια αυτών των προσομοιώσεων προέκυψαν τα φάσματα Raman σε όλο το φασματικό εύρος και χαρακτηρίστηκαν πλήρως όλες οι κύριες εμφανιζόμενες κορυφές, καθώς επίσης καταγράφηκαν οι δονήσεις και τα είδη αυτών που προέρχονται από την εκάστοτε κορυφή. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η **οπτικοποίηση** του είδους των δονήσεων, δηλαδή με αυτό τον τρόπο δεν αποδικνύεται μόνο η ύπαρξη μιας δόνησης ενός δεσμού μεταξύ των ατόμων ενός μορίου, αλλά υπάρχει και δυνατότητα εξακρίβωσης του είδους της δόνησης. Οι δονήσεις χωρίζονται σε δονήσεις τάσης ή εκτατικές δονήσεις (ν) και δονήσεις κάμψης (δ). Η δόνηση έκτασης χαρακτηρίζεται από μια συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Η δόνηση κάμψης χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δυο δεσμών και μπορεί να είναι τεσσάρων ειδών: ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) και συστρεφόμενη (twisting). Στη συνέχεια, αφού παρατέθηκαν τα δύο θεωρητικά φάσματα Raman (με και χωρίς την προσθήκη του συντελεστή διόρθωσης) και τα φάσματα των φαρμάκων, όπως προέκυψαν κατά την πειραματική διαδικασία, ακολούθησε η μεταξύ τους σύγκριση. Αναλυτικότερα, **τα αποτελέσματα και για τις δύο ενώσεις, στο φασματικό εύρος 300-1000 cm^{-1} δείχνουν να μην ταιριάζουν όσον αφορά τις εμφανιζόμενες κορυφές,** καθώς άλλες δεν παρουσιάζονται καθόλου, ενώ άλλες εμφανίζονται με πολύ μικρή ένταση, συγκρίνοντας με τους πειραματικούς υπολογισμούς. Η απουσία των κορυφών μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι **η χρησιμοποιούμενη ακτινοβολία που εκπέμπει 785 nm** και χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάκριση της πειραματικής διαδικασίας, **είναι ευαίσθητη σε μετρήσεις στο συγκεκριμένο φασματικό εύρος,** με αποτέλεσμα να προκύπτουν κορυφές με μεγάλη ένταση. Επίσης, αξίζει σε αυτό το σημείο να υπογραμμιστεί ότι προσομοιώθηκε μόνο ένα μόριο φαρμάκου, ενώ κατά τη διάρκεια της πειραματικής μέτρησης κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό. Αυτό συνεπάγεται ότι υφίστανται ορισμένες διαφορές μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών υπολογισμών που έχουν σχέση με τη μορφή του φάσματος Raman. Τα μόρια του φαρμάκου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα ορισμένες φασματικές πληροφορίες να μην εμφανίζονται ή να εμφανίζονται με

μειωμένη ένταση κατά την προσομοίωση. Όσον αφορά, τα αποτελέσματα στο φασματικό εύρος 1000-1800 cm^{-1} , παρουσιάζουν σε μεγάλο ποσοστό ομοιότητα με αυτά των πειραματικών μετρήσεων και ο χαρακτηρισμός τους συμφωνεί με τη βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν, είναι φανερό πως η φασματοσκοπία Raman αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των πολυμερικών συστημάτων, και συγκεκριμένα των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Η κατασκευή ενεργών υποστρωμάτων SERS έχει εκτεταμένες εφαρμογές και μπορεί να συμβάλει αισθητά στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών τεχνικών για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η Υπολογιστική Χημεία σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία Raman έχει τη δυνατότητα να δώσει σημαντικές και αξιόπιστες πληροφορίες για τον δομικό χαρακτηρισμό μορίων που παρουσιάζουν έντονο φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

7.2 Προτάσεις για περαιτέρω μελέτη

Τα τελευταία χρόνια, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην εύρεση τρόπων για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Είναι σαφές, λοιπόν, ότι στο μέλλον θα πρέπει να υπάρξει τροποποίηση και ταυτόχρονη βελτίωση των συστημάτων που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί ένα χρήσιμο ερευνητικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό φαρμακευτικών ενώσεων με αντικαρκινική δράση. Με την τεράστια ευαισθησία και ευελιξία που παρέχει η Νανοτεχνολογία σε συνδυασμό με αυτή τη φασματοσκοπική τεχνική, αφενός έχει τη δυνατότητα να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα στη μελέτη πολύπλοκων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, και αφετέρου μπορεί να επηρεάσει αισθητά ακόμα και στη διάγνωση διαφόρων τύπου καρκίνου, μέσω της επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman, και να υποσχεθεί στους ασθενείς καλύτερη μεταχείριση στο εγγύς μέλλον. Έχουν πραγματοποιηθεί μεγάλα βήματα σε αυτόν τον τομέα και πολλές εύρενες έχουν εκπονηθεί που να αποδεικνύουν την επιτυχή συνέχιση των δοκιμών, ώστε η φασματοσκοπία Raman να αποτελέσει κλινική πραγματικότητα.

Ο κλάδος της Υπολογιστικής Χημείας μπορεί να συμβάλει καθοριστικά, μέσω των προσομοιώσεων και των θεωρητικών υπολογισμών των φασμάτων Raman. Η μελέτη ενός μορίου δοξορουβικίνης και δαουνορουβικίνης έδειξε αξιόλογα αποτελέσματα, αλλά η διερεύνηση περισσότερων του ενός μορίων, δύναται να συντελέσει σε πιο ολοκληρωμένο δομικό χαρακτηρισμό, καθώς λαμβάνεται υπ' όψιν ο παράγοντας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων του φαρμάκου. Επιπλέον, θα ήταν δυνατή η προσομοίωση ακόμα πιο πολύπλοκων δομών, όπως η εύρεση της βελτιστοποιημένης δομής και εν συνεχεία του φάσματος Raman, πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως αυτών που εξετάστηκαν στη πειραματική διαδικασία.

Το μέλλον φαίνεται πιο φωτεινό από ποτέ, αλλά πολλά εμπόδια υπάρχουν ακόμα για να ξεπεραστούν.