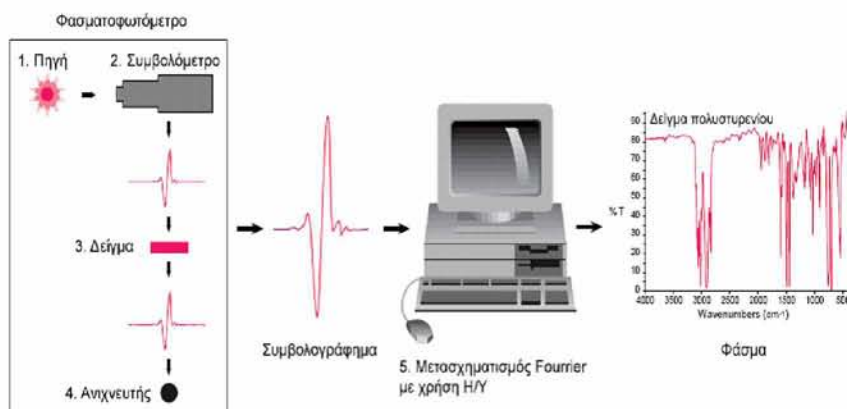




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

**"Ταυτοποίηση νέων αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με
φασματοσκοπικές τεχνικές"**

ΛΑΡΙΣΑ, 2013

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας:

"Ταυτοποίηση νέων αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με φασματοσκοπικές τεχνικές".

Τριμελής Επιτροπή:

Δ. Κομιώτης, Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη Σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Π. Μαρκουλάτος, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Αιμ. Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας), Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτρη.

Εκτιμώ το ενδιαφέρον τους γιατί χωρίς την βοήθεια τους και τη συνεργασία τους η έρευνα αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτή την εργασία, για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της και κυρίως για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό αντικείμενο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Κυρίτση Χρήστο για το αμείωτο ενδιαφέρον και την βοήθεια του κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη διόρθωση της παρούσας εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα κ. Μαντά Στυλιανή για τις γνώσεις που μου παρείχε αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης του πειράματος. Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την φιλική τους διάθεση και τις πολύτιμες συμβουλές τους και σε όλους που δεν ανέφερα και που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση τις ερευνάς μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ενδιαφέρουσες μελέτες έχουν αποδείξει ότι στην σύγχρονη χημεία οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι το βασικό εργαλείο για την αναγνώριση της μοριακής δομής. Γι' αυτό το λόγο οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών, την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και τον έλεγχο της καθαρότητας των ενώσεων.

Κατά το 1980 πραγματοποιούνται οι πρώτες μετρήσεις κλινικής φασματοσκοπίας φωσφόρου από τους Gordon και Griffith. Από τότε όμως μέχρι και σήμερα έχει επέλθει πολύ σημαντική πρόοδος κυρίως χάρη στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του μαγνητικού συντονισμού και των ηλεκτρονικών υπολογιστών (τόσο από πλευράς υλικού, όσο και από πλευράς λογισμικού) προσφέροντας πανίσχυρα εργαλεία στα χέρια των ερευνητών τα οποία προσφέρουν μικρούς χρόνους εξέτασης, καλύτερη διακριτική ικανότητα, μεγαλύτερη ευκολία στον χειριστή και απεριόριστες δυνατότητες χαρτογράφησης όλου του ανθρώπινου σώματος και στις 3 διαστάσεις αλλά και την μελέτη φαινομένων με χρονική εξέλιξη.

Τέλος, οι πλέον βασικές μέθοδοι για τα οργανικά μόρια είναι η 1) φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR) 2) η φασματομετρία μαζών, 3) η φασματοσκοπία υπερύθρου και 4) η φασματοσκοπία UV/Vis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
Ευχαριστίες	iii
Πρόλογος	iv
Περιεχόμενα	v
1. Εισαγωγή	1
1.1. Ιστορική αναδρομή	1
1.2. Κύριες φασματοσκοπικοί μέθοδοι.....	2
2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	3
2.1.Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR	3
2.2.Φασματοσκοπία NMR	3
2.3.Η φύση των απορροφήσεων NMR	4
2.4.Φασματομετρία μαζών	6
2.5.Υπέρυθρη φασματοσκοπία (INFRARED SPECTROSCOPY, IR) ...	10
2.6.Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας	11
2.7.Δονητική φασματοσκοπία	12
3. Φασματοσκοπία υπερίθρου με μετασχηματισμό Fourier	
(Fourier Transform–InfraRed spectroscopy, FT-IR)	14
3.1.Η αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου FTIR	15
3.2.Δυνατότητες και Πλεονεκτήματα Φασματοφωτόμετρου FT-IR	17
3.3.Φασματομετρία UV-VIS	19
4. Υδατάνθρακες	21
5. Νουκλεοζίτες	23
5.1.Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	24
5.2 Νουκλεοζίτες ως αντιυικοί παράγοντες	24
5.3.Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα	25

6. Ειδικό μέρος.....	29
6.1.Στόχος-σκοπός μελέτης.....	29
6.2.Υλικά μεθοδοι	30
7. Νουκλεοζίτες που ταυτοποιήθηκαν.....	31
7.1.Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθινυλο-β-D αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης .	31
7.2.Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθινύλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνη ...	33
7.3. Ταυτοποίηση της 9-(3'-C-αιθινυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης....	35
7.4. Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθινυλο-β-D αλλοπυρανόζυλο) 5- φλορουρακίλης	37
7.5 Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθινυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης	38
8. Αποτελέσματα - Συζήτηση	41
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: Φασματόμετρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	5
ΣΧΗΜΑ 2: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης ...	23
ΣΧΗΜΑ 3: Χημικές δομές της ECyd και EUrd	25
ΣΧΗΜΑ 4: 3'επιμερή των ECyd και EUrd	26
ΣΧΗΜΑ 5: Δομές των αιθινυλο πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών.....	27
ΣΧΗΜΑ 6: Χημική δομή της 5-αιθινυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη	27
ΣΧΗΜΑ 7: Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR	28
ΣΧΗΜΑ 8: Δομή των νουκλεοζιτών που ταυτοποιήθηκαν.....	29

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 Φασματόμετρο Μάζας.....	7
ΕΙΚΟΝΑ 2 Διαχωρισμός ιόντων σε τετραπολικό φίλτρο μάζας.....	8
ΕΙΚΟΝΑ 3 Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS.....	9
ΕΙΚΟΝΑ 4 Αναπαράσταση των δονητικών διαδικασιών IR και Raman.....	10
ΕΙΚΟΝΑ 5. Διαδικασία μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη.....	11

EIKONA 6 Ταλάντωση διατομικού μορίου	13
EIKONA 7 Προσπίπτουσα ακτινοβολία σε δείγμα πάχους b	14
EIKONA 8 Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson.....	15
EIKONA 9 Διάταξη FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating).....	17
EIKONA 10 Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.....	18
EIKONA 11 Φ.Φ UV-VIS.....	20
EIKONA 12 Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης.....	31
EIKONA 13 Φάσμα υπερύθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης.....	32
EIKONA 14 Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνης	33
EIKONA 15 Φάσμα υπερύθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D- αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνης.....	34
EIKONA 16 Ταυτοποίηση της 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης	35
EIKONA 17 Φάσμα μαζών της 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης.....	36
EIKONA 18 Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) 5-φθοροουρακίλης	37
EIKONA 19 Φάσμα υπερύθρου της 1 -(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) 5-φθοροουρακίλης	38
EIKONA 20 Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης.....	38
EIKONA 21 Φάσμα υπερύθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης.....	39

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Ιστορική αναδρομή

Πρώτα πρέπει να γίνει ιδιαίτερη αναφορά στον μαθηματικό Jean Baptiste Joseph Fourier ο οποίος ανακάλυψε τους ομώνυμους μετασχηματισμούς και στον Nicola Tesla για τις εφευρέσεις του σχετικά με τον ηλεκτρομαγνητισμό οι οποίες έδωσαν μεγάλη ώθηση στην περαιτέρω εξέλιξη της τεχνολογίας. Το 1924 ο Pauli μετά από σειρά μελετών πρότεινε την θεωρητική ύπαρξη μιας εγγενούς πυρηνικής περιστροφής. Το 1925 οι Uhlenbeck και Goudsmit εισήγαγαν στην φυσική την έννοια του περιστρεφόμενου ηλεκτρονίου. Δύο χρόνια αργότερα, ο Pauli και ο Charles Galton Darwin ανέπτυξαν ένα θεωρητικό πλαίσιο για την έννοια της περιστροφής ηλεκτρονίων με βάση τους νόμους της κβαντικής μηχανικής που αναπτύχθηκαν από τον Edwin Schrodinger και τον Werner Heisenberg. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με τις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων ξεκινούν στις αρχές της δεκαετίας του '30 με τους Gorter και Rabi.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός ανακαλύφθηκε στο πανεπιστήμιο Kazan από τον σοβιετικό Yevgeni K. Zavoisky. Ο Zavoisky είχε ανιχνεύσει το φαινόμενο το 1941 και παρουσίασε τα πορίσματά του σε αγγλόφωνο ρωσικό επιστημονικό περιοδικό αλλά δεν είχε αντίκτυπο στην επιστημονική κοινότητα της εποχής. Η επίσημη ιστορία καταγράφει ότι το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR-nuclear magnetic resonance) ανακαλύφθηκε ανεξάρτητα από τους Felix Bloch (Stanford) και Edward Purcell (Harvard) το 1946 και το 1952 βραβεύονται με βραβείο Nobel φυσικής.

Το 1955/1956, ο Erik Odeblad και ο Gunnar Lindstrom από τη Στοκχόλμη δημοσίευσαν τις πρώτες μελέτες σχετικά με την ανάλυση ζωντανών κυττάρων και αξιολόγησης ζωικών ιστών. Προς το τέλος της δεκαετίας του '60 γίνονται έρευνες για την λήψη σημάτων και προσδιορισμού των χρόνων χαλάρωσης σε ανθρώπους και σε ζώα με κυριότερη την μελέτη του J. Johns, ο οποίος προσδιόρισε σήμα NMR από ζωντανά ζώα (1967). Το 1972 ο Raymond Damadian ανακαλύπτει ότι οι παθολογικοί ιστοί έχουν μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης σε σχέση με τους αντίστοιχους υγιείς. Ακόμα το 1973 ο Lauterbur παρουσιάζει την εικόνα δυο σωλήνων με νερό στο περιοδικό Nature και το 1974 παρουσιάζει την απεικόνιση της θωρακικής κοιλότητας ενός ποντικού. Στις 3 Ιουλίου 1977, και μετά από μέτρηση 6 ωρών και ανακατασκευή

22 ωρών δημιουργήθηκε η πρώτη εικόνα προερχόμενη από τον πρώτο υποτυπώδη μαγνητικό τομογράφο που κατασκευάστηκε από τον Sir Peter Mansfield.

Τέλος, το 1980 πραγματοποιούνται οι πρώτες μετρήσεις κλινικής φασματοσκοπίας φωσφόρου από τους Gordon και Griffith. Από τότε όμως μέχρι και σήμερα έχει επέλθει πολύ σημαντική πρόοδος κυρίως χάρη στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του μαγνητικού συντονισμού και των ηλεκτρονικών υπολογιστών (τόσο από πλευράς υλικού, όσο και από πλευράς λογισμικού) προσφέροντας πανίσχυρα εργαλεία στα χέρια των ερευνητών τα οποία προσφέρουν μικρούς χρόνους εξέτασης, καλύτερη διακριτική ικανότητα, μεγαλύτερη ευκολία στον χειριστή και απεριόριστες δυνατότητες χαρτογράφησης όλου του ανθρώπινου σώματος και στις 3 διαστάσεις αλλά και την μελέτη φαινομένων με χρονική εξέλιξη. Μερικά σημαντικά παραδείγματα της προόδου αυτής είναι τα βραβεία Nobel που απονεμήθηκαν στους 'Richard P. Ernst το 1991 και στον Kurt Wiithrich το 2002' (Περιοδικό: Επιστήμης και τεχνολογίας Αναστάσιος Καρατόπης).

1.2. Κύριες φασματοσκοπικοί μέθοδοι:

Στην σύγχρονη χημεία οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι το βασικό εργαλείο για την αναγνώριση της μοριακής δομής. Γι' αυτό το λόγο οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών, την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και τον έλεγχο της καθαρότητας των ενώσεων. Οι πλέον βασικές μέθοδοι για τα οργανικά μόρια είναι η 1) φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR) 2) η φασματομετρία μαζών, 3) η φασματοσκοπία υπερύθρου και 4) η φασματοσκοπία UV/Vis (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξανδρού Α.Γ., 1986).

2.Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

2.1.Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR

Η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) εκμεταλλεύεται τη μαγνητική ιδιότητα της ιδιοστροφορμής I (*spin*) συγκεκριμένων πυρήνων. Κάθε ένα από τα πυρηνικά σωματίδια έχει την ιδιότητα αυτή, ενώ το συνολικό spin ενός πυρήνα εξαρτάται από τις συζεύξεις τους. Οι πυρήνες με $I \neq 0$ είναι μαγνητικά ενεργοί. Η μελέτη πολυπεπτιδίων, βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στις μαγνητικές πυρηνικές ιδιότητες των ισοτόπων ^1H , ^{15}N , ^{13}C , ^2H . Με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου έντασης B_0 , η πυρηνική μαγνητική ροπή ευθυγραμμίζεται με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και αποκτά φορά παράλληλη ή αντιπαράλληλη με αυτό. Η διαφορά ενέργειας των δύο σταθμών είναι μικρή και εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού πεδίου B_0 και τη φυσική σταθερά που καλείται γυρομαγνητικός λόγος γ του πυρήνα $\Delta E = \gamma \hbar B_0 / 2\pi$. (R.Kellner et al, 1997). Μικρότερης ενέργειας, και άρα πιο πιθανή, είναι η κατάσταση στην οποία η πυρηνική μαγνητική ροπή είναι παράλληλη προς το άνυσμα της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Ο λόγος του αριθμού των μορίων με αντιπαράλληλη προς το εξωτερικό πεδίο μαγνητική ροπή (N-) προς αυτόν με παράλληλη (N+) προβλέπεται από τη στατιστική Boltzman $N-/N+ = e^{-\Delta H/K\tau}$ (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξανδρού Α.Γ., 1986).

2.2. Φασματοσκοπία NMR

Η φασματοσκοπία NMR, αποτελεί φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες ατόμων με αυτοστροφορμή (*spin*) υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, όταν ακτινοβολούνται διεγείρονται και κατά την αποδιέγερση τους δίνουν σήμα. Στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων (102 MHz), (η απορροφούμενη ενέργεια οδηγεί σε μεταβολή του πυρηνικού spin).

Το spin αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα όπως η μάζα, το ηλεκτρικό φορτίο. Είναι πολλαπλάσια του $\frac{1}{2}$ και μπορεί να είναι είτε $-$ ή $+$. Όπως η περιστροφή του ηλεκτρονίου δημιουργεί το spin του, έτσι και οι πυρήνες διαφόρων στοιχείων έχουν πυρηνικό spin 1, λόγω αυτοπεριστροφής. Το πυρηνικό spin, λόγω του φορτίου του

πυρήνα δημιουργεί μαγνητικό δίπολο, του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από τη μαγνητική ροπή μ (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986).

Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006). Αν ένας πυρήνας με spin $\neq 0$ βρεθεί σε μαγνητικό πεδίο εντάσεως H_0 , το διάνυσμα της στροφικής ορμής του πυρήνα παίρνει $(2I+1)$ προσανατολισμούς ως προς την διεύθυνση του πεδίου και σε κάθε προσανατολισμό αντιστοιχεί μια ορισμένη τιμή ενέργειας E (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986). Ο πυρήνας του 1H (πρωτόνιο) έχει $I=1/2$ και μπορεί να προσανατολιστεί παράλληλα ($I=+1/2$) και αντιπαράλληλα ($I=-1/2$). Ο παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί την βασική κατάσταση της χαμηλής ενέργειας, ενώ ο προσανατολισμός αποτελεί την βασική κατάσταση της χαμηλής ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος τη διεγερμένη κατάσταση αυξημένης ενέργειας.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (βασική κατάσταση) αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (διεγερμένη κατάσταση) (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξού και ο όρος πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (McMURRY, J. 2005). Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για τον συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα (McMURRY, J. 2005).

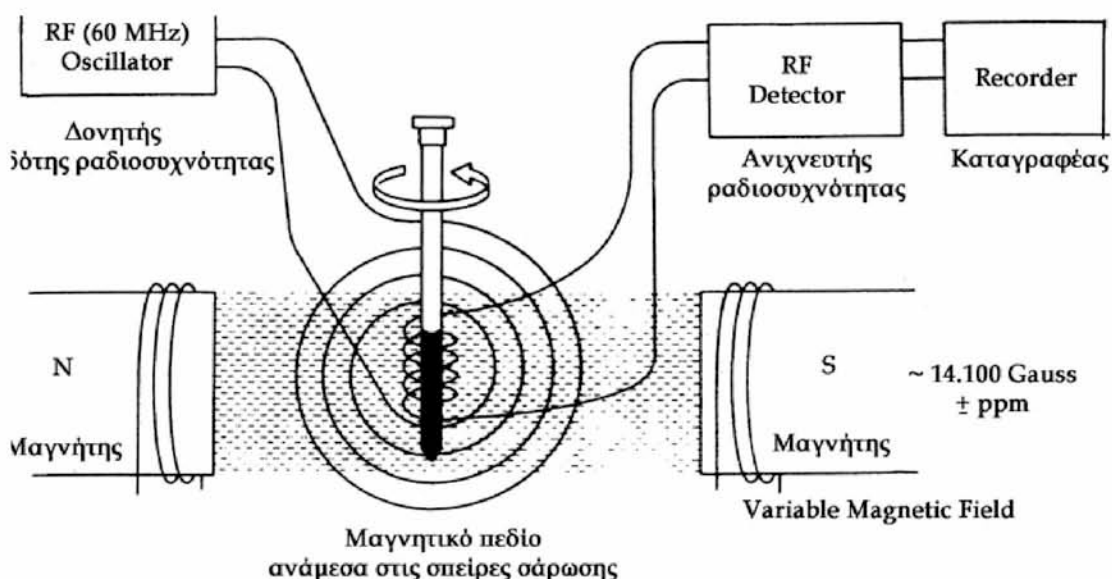
2.3. Η φύση των απορροφήσεων NMR.

Η μεγάλη χρησιμότητα της φασματοσκοπίας NMR στη διερεύνηση της δομής των οργανικών ενώσεων έγκειται στο ότι όλοι οι ομοειδείς πυρήνες σε ένα μόριο δεν συντονίζονται ακριβώς στην ίδια συχνότητα, αλλά υπάρχει μεταξύ τους μια μικρή διαφορά οφειλόμενη στο διαφορετικό χημικό περιβάλλον του καθενός.

Κάθε πυρήνας δεν δέχεται μόνο την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 αλλά δέχεται και την επίδραση του αντίθετου εξ επαγωγής μαγνητικού πεδίου που προκαλείται από τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν :

Ηπραγματικό = Ηεφαρμοζόμενο – Ητοπικό (e^-)

Οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Όμως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από κάθε πυρήνα εξαρτάται από το είδος των ατόμων και των δεσμών στο γειτονικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα κάθε πυρήνας να έχει μια ελαφρά διαφορετική συχνότητα συντονισμού (Μαννομουστακός Τ., 2004). Εάν το όργανο του NMR είναι αρκετά ευαίσθητο, οι μικροδιαφορές του πραγματικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου που γίνονται αισθητές σε κάθε πυρήνα είναι δυνατό να ανιχνευθούν, όποτε λαμβάνουμε διαφορετικό σήμα NMR για κάθε διακριτό πυρήνα άνθρακα ή υδρογόνου κάποιου μορίου. Έτσι το φάσμα NMR μιας οργανικής ένωσης <<χαρτογραφεί>> αποτελεσματικά το δίκτυο σύνδεσης C-H (McMURRY, J. 2005). Ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίσταται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Κάθε κορυφή στο NMR αντιστοιχεί σ' ένα χημικά διακριτό πυρήνα του μορίου. Η αρχή λειτουργίας ενός τυπικού φασματομέτρου NMR απεικονίζεται στο σχήμα 1.



ΣΧΗΜΑ 1. Φασματομέτρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη μεταφέρεται με ένα μικρό σιφόνιο σε ένα γυάλινο σωλήνα NMR με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα που βρίσκεται μεταξύ

των πόλων του μαγνήτη. Η ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων (RF) εκπέμπεται από ένα πηνίο που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα και μετά την απορρόφηση ενέργειας καταγράφει το ίδιο το σήμα (single –coil spectrometer) ή άλλο πηνίο (cross-coil spectrometer). Για να επιτευχθεί συντονισμός, η ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων (RF) μεταβάλλεται σιγά-σιγά κατά τη σάρωση. Το σήμα της απορρόφησης RF συλλαμβάνεται από τον ανιχνευτή, ενισχύεται και καταγράφεται. Το φασματογραφικό χαρτί NMR είναι ειδικά βαθμολογημένο και η καταγραφή του φάσματος γίνεται αφού προηγουμένως ρυθμιστεί το << μηδέν>> με μια ουσία αναφοράς, συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006).

2.4.Φασματομετρία μαζών

Είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που οδηγούν στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια κατάσταση (με ή χωρίς διάσπαση των μορίων). Καθένα από τα ιόντα που σχηματίζονται χαρακτηρίζεται από το λόγο της μάζας προς το φορτίο του (m/z) και από τη σχετική αφθονία του.

Η φασματομετρία μαζών (εικόνα 1) βασίζεται σε χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην αέρια φάση κατά τις οποίες σχηματίζονται ιοντικά και ουδέτερα θραύσματα εξαιτίας της διάσπασης των μορίων ενός συστατικού λόγω ιονισμού του. Τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) και καταγράφονται με τη μορφή ενός φάσματος μαζών. Αν οι εντάσεις του φορτίου κάθε ιόντος εκφραστούν ως ποσοστό της έντασης του ιόντος το οποίο αποτελεί τη βασική κορυφή, οι τιμές m/z συναρτήσει της εκατοστιαίας σχετικής έντασης (% RI) αποτελούν το γραμμικό φάσμα μαζών. Η φασματομετρία μαζών είναι τεχνική που μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη δομή μιας χημικής ένωσης και υπό προϋποθέσεις να επιτρέψει τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Στην περίπτωση μιγμάτων χημικών ενώσεων, παρέχει ελάχιστες χρήσιμες πληροφορίες ακόμη και όταν χρησιμοποιηθούν φασματομέτρα μαζών μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών με την αεριοχρωματογραφία επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων ακόμη και όταν αυτά περιέχονται σε εξαιρετικώς χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε:

1. φασματόμετρα συνεχούς λειτουργίας ή φασματόμετρα εκπομπής ιόντων, όπως τα φασματόμετρα μαζών μαγνητικού τομέα και τα φασματόμετρα μαζών τετραπολικού φίλτρου, και
2. φασματόμετρα αποθήκευσης ιόντων, όπως τα φασματόμετρα παγίδευσης ιόντων (ή IT-MS) και τα φασματόμετρα κυκλοτρονικού συντονισμού (ή ICR-MS).

Κάθε φασματόμετρο μαζών αποτελείται από διάφορες επιμέρους διατάξεις στις οποίες λαμβάνουν χώρα η ατμοποίηση του δείγματος, ο ιονισμός του δείγματος, ο διαχωρισμός των ιόντων τα οποία σχηματίζονται κατά τον ιονισμό του δείγματος, η προώθηση των επιμέρους ιόντων στον ανιχνευτή, και η αποτύπωση του συνόλου των ιόντων (φάσμα μαζών).

Ο ιονισμός στα φασματόμετρα μαζών επιτυγχάνεται με α) πρόσπτωση ηλεκτρονίων, ανιόντων ή κατιόντων και β) έκθεση στην επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου.

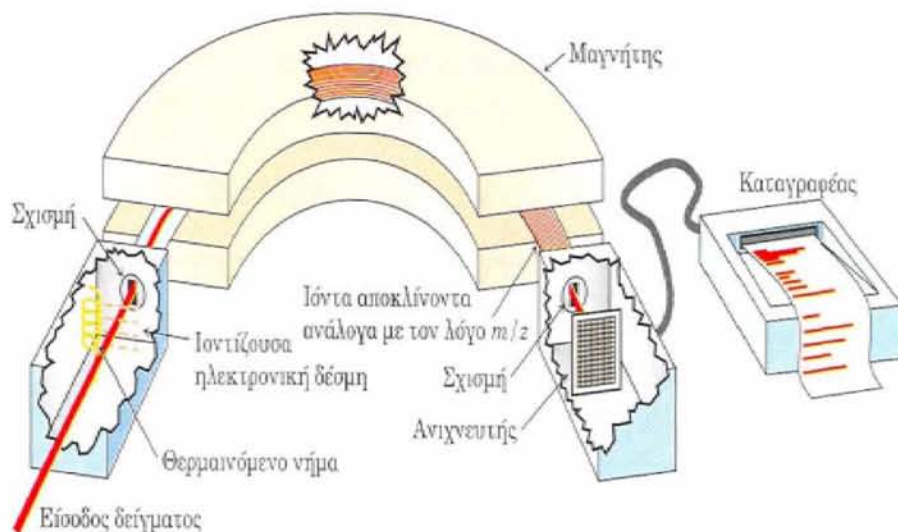
Ο διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται:

σε μαγνητικό ή ηλεκτρομαγνητικό αναλυτή μάζας,

σε αναλυτή μάζας στον οποίο μετράται ο «χρόνος πτήσης»,

σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικού φίλτρου, ή

σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικής παγίδας ιόντων.

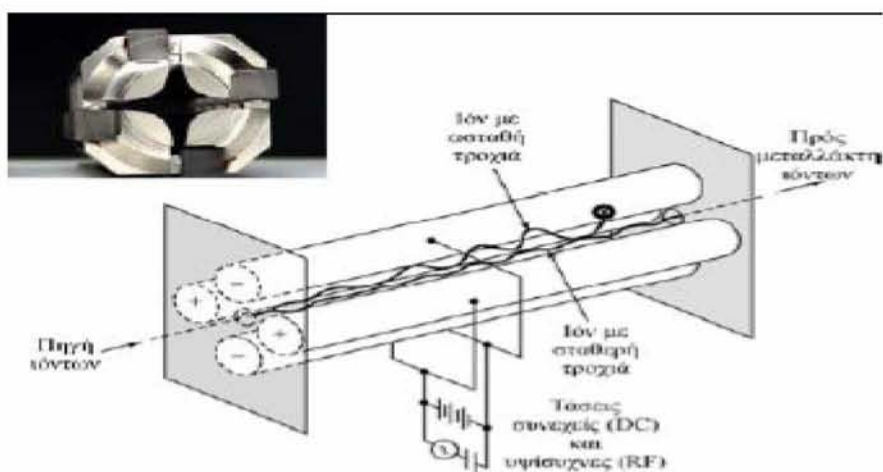


ΕΙΚΟΝΑ 1 Φασματόμετρο Μάζας

Διαχωρισμός σε τετραπολικό φίλτρο μάζας:

Τα τετραπολικά φίλτρα μάζας αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες ράβδους τοποθετημένες με τρόπο που οι άξονές ενός να διέρχονται από ενός κορυφές

ενός τετραγώνου. Στο ένα ζεύγος από ενός διαγωνίως ευρισκόμενες ράβδους, εφαρμόζεται τάση +Vdc Volts, ενώ στο άλλο ανάλογο ζεύγος τάση -Vdc Volts.



ΕΙΚΟΝΑ 2 Διαχωρισμός ιόντων σε τετραπολικό φίλτρο μάζας

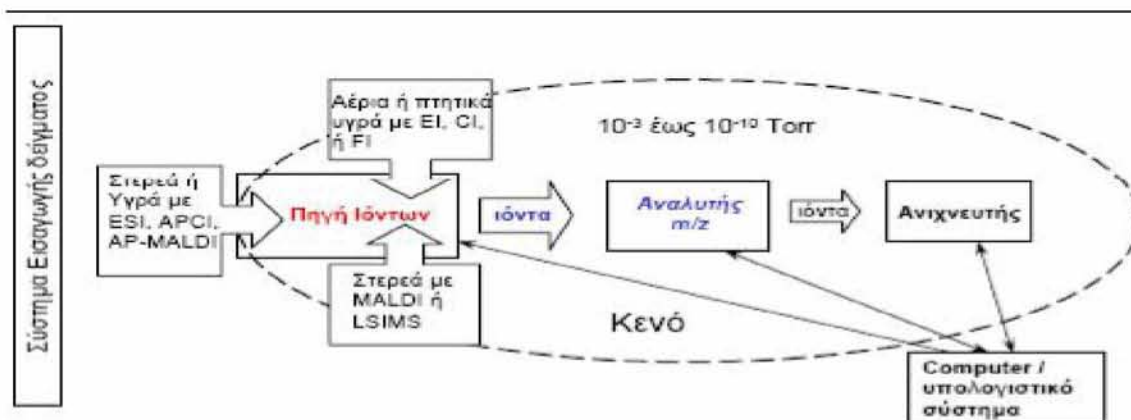
Τα ιόντα επιταχύνονται στο κέντρο του τετραπολικού φίλτρου (κατά μήκος του άξονα z που διέρχεται από το σημείο τομής των διαγωνίων του νοητού τετραγώνου το οποίο σχηματίζουν οι άξονες των ράβδων). Στα δύο ζεύγη των ράβδων εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση, καθορισμένης συχνότητας ραδιοκυμάτων με διαφορά φάσης 180° , οπότε τα ιόντα που πάλλονται με ένα ολοένα αυξανόμενο πλάτος προσκρούουν σε μια ράβδο, ενώ μόνο τα ιόντα με ορισμένο λόγο m/z (καθορίζεται από τη διαφορά δυναμικού V και από τη συχνότητα των ραδιοκυμάτων) διέρχονται μέσα από το τετραπολικό φίλτρο και ανιχνεύονται. Με σάρωση ενός συχνότητας των ραδιοκυμάτων ή του δυναμικού είναι δυνατή η καταγραφή του φάσματος μαζών. Ο λόγος ενός μάζας ενός το φορτίο ενός ιόντος υπολογίζεται από τη σχέση $m/z = 0,136 \cdot V / r_0^2 \cdot f^2$, όπου r_0 η συχνότητα των ράβδων (σε cm), και f η συχνότητα των ραδιοκυμάτων σε (MHz).

Τα φασματομέτρα μαζών με τετραπολικό φίλτρο είναι φθηνότερα και πολύ μικρότερα σε διαστάσεις σε σχέση με τα φασματομέτρα μαζών μαγνητικού τομέα, αλλά είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Ωστόσο με τα φασματομέτρα αυτά λαμβάνονται γραμμικά φάσματα μαζών (R.Kellner et al, 1997).

Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS:

Η γραμμή μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη, διατηρεί τα διαχωρισθέντα συστατικά στην αέρια φάση κατά τη μεταφορά τους από τη χρωματογραφική στήλη

του αεριοχρωματογράφου στο φασματόμετρο μάζας. Στο θάλαμο ιονισμού του τελευταίου ιονίζεται κάθε συστατικό χωριστά, κυρίως με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας. Τα θετικώς φορτισμένα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, όπου και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z), (McMurry, 2002). Ο ανιχνευτής ταξινομεί τα ιοντικά θραύσματα σύμφωνα με το λόγο m/z και τα καταγράφει ως κορυφές. Το σήμα του ανιχνευτή ενισχύεται και μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη πληροφορία με τη μορφή του φάσματος μάζας. Το υψηλό κενό στο θάλαμο ιονισμού του φασματομέτρου μάζας εγγυάται ότι η πιθανότητα σύγκρουσης των ιόντων με μη ιονισθέντα μόρια είναι εξαιρετικά μικρή.



ΕΙΚΟΝΑ 3 Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS.

Καταγραφή όλων των ιόντων (Full Scan):

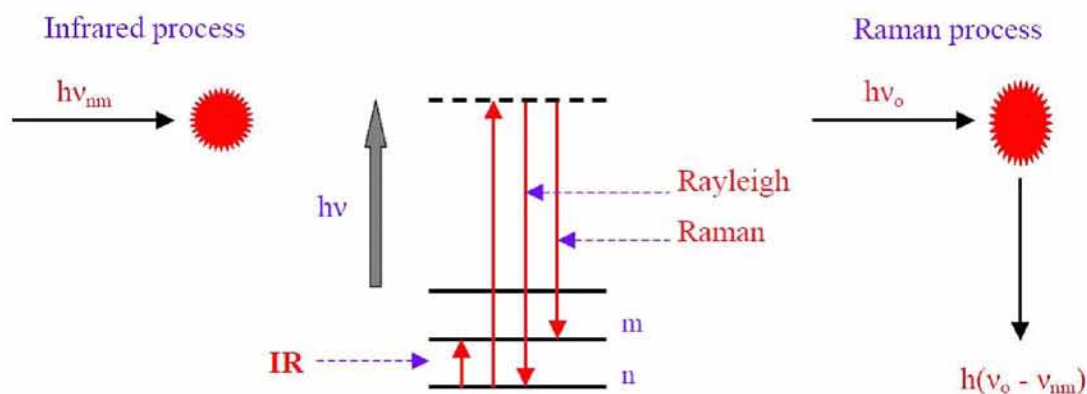
Η τεχνική επιτρέπει τη λήψη του φάσματος μαζών όλων των συστατικών που διαχωρίζονται αεριοχρωματογραφικώς με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ταυτοποίησή τους με τη βοήθεια ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών. Η παράμετρος που παίζει καθοριστικό ρόλο στη λήψη του φάσματος μαζών όταν χρησιμοποιούνται φασματόμετρα μαζών συνεχούς λειτουργίας, είναι ο διαθέσιμος χρόνος για την καταγραφή της μάζας του κάθε ιόντος. Ο χρόνος αυτός καθορίζει και την τυπική ευαισθησία του φασματόμετρου μαζών. Η ανίχνευση και η καταγραφή όλων των ιόντων που σχηματίζονται κατά τον ιονισμό κάθε επιμέρους συστατικού του εξεταζόμενου δείγματος γίνεται ταυτοχρόνως στα φασματόμετρα μαζών αποθήκευσης ιόντων. Σε μια πρώτη φάση αποθηκεύονται όλα τα ιόντα στον αναλυτή μάζας και στη συνέχεια, αφού ταξινομηθούν σύμφωνα με τη μάζα τους, οδηγούνται με πολύ μεγάλη ταχύτητα στον πολλαπλασιαστή όπου ανιχνεύονται και καταγράφονται. Στα φασματόμετρα αυτά μπορούν να καταγραφούν μέχρι 11.000

μονάδες μάζας ανά δευτερόλεπτο (στα φασματομέτρα μαζών συνεχούς λειτουργίας είναι δυνατό να καταγραφούν μόνο 1.000 μονάδες μάζας ανά δευτερόλεπτο).

2.5. Υπέρυθρη φασματοσκοπία (INFRARED SPECTROSCOPY, IR)

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες x, κλπ.) με την ύλη. Τα άτομα, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει. Ένα άτομο/μόριο διεγείρεται μόνο από φωτόνια ενέργειας ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ του διεγερμένης και του ουδέτερης κατάστασης. Με ακτινοβολία (φως) υπέρυθρων συχνοτήτων ($10 - 12800 \text{ cm}^{-1}$), λόγω της χαμηλής ενέργειας του φωτονίου, μπορούν να διεγερθούν μόρια από ένα δονητικό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Η ενέργεια μιας τέτοιας ακτινοβολίας ($1 - 800 \text{ meV}$) είναι αρκετή, ώστε να προκαλέσει δονήσεις στα μόρια που την απορροφούν. Ωστόσο, οι περιστροφικές ενέργειες των μορίων είναι ακόμα μικρότερες από τις δονητικές, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ακτινοβολία να είναι ικανή να προκαλέσει παράλληλα και περιστροφικές μεταπτώσεις. Στην περίπτωση αυτή, η φασματοσκοπία ονομάζεται δονητική (vibrational spectroscopy).

Οι δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών ενός συστήματος και την μελέτη χημικών αντιδράσεων. Τέτοιες τεχνικές είναι η φασματοσκοπία FTIR και η φασματοσκοπία Raman οι οποίες είναι μη καταστροφικές ως προς το δείγμα και σχετίζονται κυρίως με μελέτες μεταβάσεων μεταξύ δονητικών και περιστροφικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης, ιόντων και μορίων.

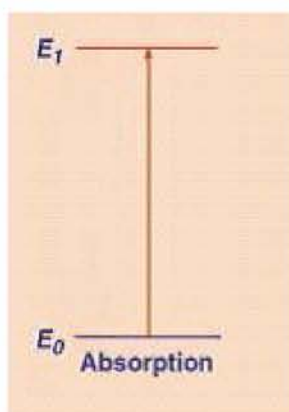


EIKONA 4 Αναπαράσταση των δονητικών διαδικασιών IR και Raman

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) προκύπτει από απορρόφηση της ακτινοβολίας και μετάβαση σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο. Ενώ η Raman φασματοσκοπία διαφέρει από την υπέρυθη IR στο ότι η πληροφορία αποκτάται από σκέδαση φωτός. Κατά τη διαδικασία της Raman έχουμε διέγερση φωτονίων σε μία διεγερμένη κατάσταση και μη ελαστική σκέδαση των φωτονίων κατά την αποδιέγερση (Εικόνα 4). Ένα ποσοστό των φωτονίων παραμένουν ενεργειακά αμετάβλητα κ επιστρέφουν στην κατώτερη ενεργειακά στάθμη (τότε έχουμε την λεγόμενη σκέδαση Rayleigh), ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό σκεδάζονται με μεταβολή της ενέργειας τους (σχεδίαση Raman).

2.6. Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας.

Όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο γίνεται μεταφορά ενέργειας από το πεδίο στο μόριο όταν ικανοποιείται η συνθήκη του Bohr, $\Delta E = h\nu$, όπου ΔE η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων του μορίου, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της ακτινοβολίας. Στην εικόνα 5 δίδονται σχηματικά οι ενεργειακές στάθμες ενός διατομικού μορίου. Κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη υποδιαιρείται σε στάθμες ταλαντώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον κβαντικό αριθμό ταλαντώσεως ν , ενώ κάθε στάθμη ταλαντώσεως υποδιαιρείται σε στάθμες περιστροφής των οποίων η ενέργεια χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό J .



ΕΙΚΟΝΑ 5. Διαδικασία μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη.

Οι ενεργειακές στάθμες λόγω περιστροφής ευρίσκονται η μία πλησίον της άλλης και επομένως μεταπτώσεις μεταξύ γειτονικών σταθμών λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές συχνότητες (ή μεγάλα μήκη κύματος). Τέτοιες μεταπτώσεις δίδουν τα φάσματα περιστροφής (rotational spectra) τα οποία μετρώνται στην περιοχή των

μικροκυμάτων και άπω υπερύθρου, δηλαδή 1cm^{-1} (10000 μm) έως περίπου 102 cm^{-1} (100 μm). Υπενθυμίζεται ότι η συχνότητα, ν , μετατρέπεται σε κυματάρηθμους, u , ή σε μήκος κύματος, λ , μέσω της σχέσης: $\lambda = c / \nu = 1 / u$, όπου c η ταχύτητα του φωτός.

Η απόσταση μεταξύ δονητικών ενεργειακών σταθμών είναι μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα οι σχετικές ενεργειακές μεταπτώσεις να λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερες συχνότητες (μικρότερα μήκη κύματος) απ' ότι οι μεταπτώσεις λόγω περιστροφής. Τα δονητικά φάσματα (vibrational spectra) μετρώνται συνήθως στην περιοχή 102 cm^{-1} (102 μm) έως 104 cm^{-1} (1 μm) (περιοχή υπερύθρου). Τέλος, η μεγάλη ενεργειακή απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονιακών ενεργειακών σταθμών έχει ως αποτέλεσμα τα αντίστοιχα ηλεκτρονιακά φάσματα (electronic spectra) να μετρώνται στην περιοχή 104 cm^{-1} (1 μm) έως 105 cm^{-1} (0.1 μm) (περιοχή ορατού και υπεριώδους) (R.Kellner et al,1997).

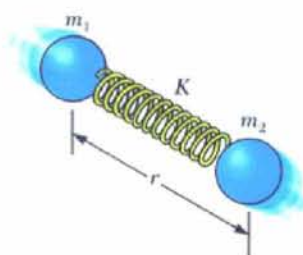
2.7. Δονητική Φασματοσκοπία

Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μια μετάβασης του μορίου μεταξύ δύο δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο καθίσταται δυνατή όταν υπάρχει αλλαγή στη διπολική ροπή που χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο τρόπο δόνησης. Δηλαδή το μόριο πρέπει να περιέχει ένα δίπολο το οποίο να δονείται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η μόνιμη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση: $\mu = e * r$ όπου μ η διπολική ροπή, e το φορτίο και r η απόσταση που χωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά φορτία. Η θεωρία είναι ότι, αν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισοροπίας της. Το ταλαντούμενο δίπολο απορροφά ενέργεια από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του διπόλου. Το ποσό της ακτινοβολίας IR που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της

διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης:
 $\Pi R \sim (\partial P / \partial q)^2$ Αυτό σημαίνει ότι μία δόνηση είναι ενεργή στο IR όταν μεταβάλλει τη διπολική ροπή.

Δονήσεις Τάσης:

Η θεωρία των μοριακών διεγέρσεων περιγράφεται απλά με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Το σύστημα θεωρείται ότι αποτελείται από δυο σφαίρες μάζας m , συνδεδεμένες μέσω ενός αβαρούς ελατηρίου, του οποίου η τάση δίνεται από μια σταθερά k .

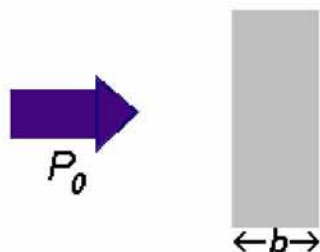


ΕΙΚΟΝΑ 6 Ταλάντωση διατομικού μορίου

Η ενέργεια του συστήματος, σύμφωνα με την θεωρία του κλασικού αρμονικού ταλαντωτή δίνεται από την σχέση $E = kx$, όπου x είναι η μετατόπιση του ελατηρίου. Επειδή το x μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή, κάθε τιμή ενέργειας κατά την κλασική άποψη είναι επιτρεπτή, συμπεράσμα, όμως, που κβαντομηχανικά δεν ευσταθεί. Έτσι, σύμφωνα με την κβαντομηχανική, η ενέργεια του συστήματος δίνεται από την σχέση: $E = (n + 1/2)h\nu$, όπου ν είναι η συχνότητα δόνησης και n είναι ο κβαντικός αριθμός που παίρνει τιμές $(0, 1, 2, \dots)$. Συνεπώς, η ενέργεια του κβαντομηχανικού ταλαντωτή μπορεί να είναι μόνο ακέραιο πολλαπλάσιο του $1/2 h\nu$. Η ενέργεια με $n=0$, $E_0 = 1/2 h\nu$, ονομάζεται ενέργεια μηδενικού σημείου και υπάρχει ακόμα και στη θερμοκρασία του απόλυτου μηδέν, γιατί είναι ανεξάρτητη από τις θερμικές κινήσεις των μορίων (R.Kellner et al, 1997).

3. Φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform–InfraRed spectroscopy, FT-IR)

Στη φασματοσκοπία υπερέυθρου μελετάμε την απορρόφηση υπερέυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση.



ΕΙΚΟΝΑ 7 Προσπίπτουσα ακτινοβολία σε δείγμα πάχους b .

Η διαπερατότητα T ορίζεται: $T=I/I_0$

Η διέλευση μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του 0 και του 1 και συχνά εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (οπότε οι τιμές που μπορεί να πάρει βρίσκονται μεταξύ του 0 και του 100%). Η απορρόφηση και η διέλευση σχετίζονται επομένως ως εξής:

$$P=P_0 \text{Exp}[-a b]$$

Όπου: P : Ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση δείγματος

P_0 : Ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

a : σταθερά απορρόφησης

b : πάχος δείγματος

Ενώ η σχέση Απορρόφησης $A(\%)$ –Σκέδασης $S(\%)$ – Διαπερατότητας $T(\%)$ – Ανάκλασης $R(\%)$ είναι:

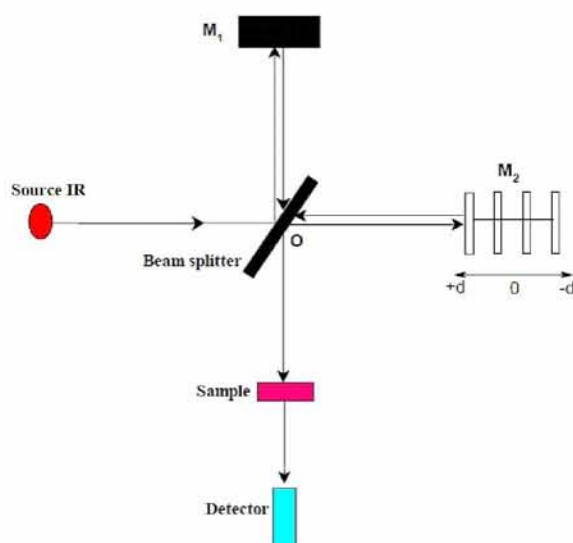
$$A(\%) + S(\%) + T(\%) + R(\%) = 100 (\%) \quad (3.12)$$

Η πλέον χρήσιμη σχέση στην φασματοφωτομετρία απορρόφησης προκύπτει από τον συνδυασμό του νόμου του Lambert (κάθε στρώμα, ίσης επιφάνειας, ενός απορροφητικού μέσου απορροφά ίσο ποσοστό της ακτινοβολίας που το διασχίζει) και του νόμου του Beer (η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ανάλογη προς την

συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας). Το φάσμα απορρόφησης και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων.

3.1. Η αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου FTIR

Τα δονητικά φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR. Αυτό έχει ως βάση λειτουργίας το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα. Μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier) δίνει το φάσμα απορρόφησης IR. Το συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών, αρχικά σχεδίασε ο Michelson το 1891. Πολλά άλλα συμβολόμετρα δύο δεσμών έχουν σχεδιαστεί μετά απ' αυτό, τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμα για μερικές ιδιαίτερες εφαρμογές. Ωστόσο, η αρχή λειτουργίας των συμβολόμετρων δύο δεσμών είναι παρόμοια.



ΕΙΚΟΝΑ 8 Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson.

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή.

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson (Εικόνα 8). Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr και το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45° , ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά (R.Kellner et al ,1997).

Η ακτινοβολία που παράγεται από την IR πηγή προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης, ο οποίος διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη αποστέλλοντας το ένα τμήμα στο κάτοπτρο M_1 και το άλλο μισό στο M_2 . Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση $(L+d)$, ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta=2d$. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν επιστρέψουν στο διαχωριστή, συμβάλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με την διαδικασία αυτή, δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής μέσω των οποίων γίνεται η κατάλληλη επιλογή των μηκών κύματος.

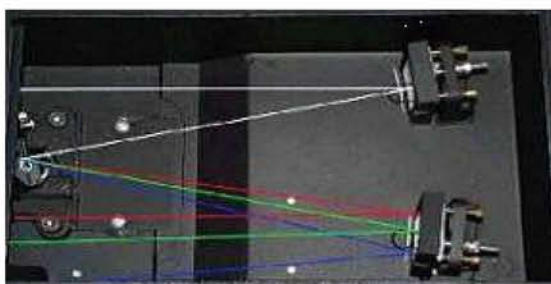
Στην περίπτωση μονοχρωματικής δέσμης φωτός μήκους κύματος λ (αν και στην περίπτωση της φασματοφωτομετρίας FT-IR δεν χρησιμοποιείται μονοχρωματική ακτινοβολία) που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα B , υπόκειται σε ενισχυτική ή καταστροφική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις της πλάκας B από τα κάτοπτρα M_1 και M_2 . Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται ενισχυτική συμβολή με αποτέλεσμα να τετραπλασιάζεται η ένταση. Εάν, όμως οι αποστάσεις της B από τα M_1 και M_2 δεν είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στα κάτοπτρα και επανέρχονται στην B , όπου και αλληλοεξουδετερώνονται.

Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR η πηγή εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα. Κατά την έξοδο από το συμβολόμετρο έχουμε επαλληλία των διαφόρων φασματικών συνιστωσών των επιμέρους δεσμών. Το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους εντάσεων ακτινοβολίας που αντιστοιχούν σε κάθε φασματική περιοχή. Έτσι για μηδενική διαφορά οπτικού δρόμου όλες οι φασματικές

συνιστώσες είναι σε φάση και η συνολική ένταση ακτινοβολίας είναι μέγιστη. Καθώς αυξάνεται η διαφορά οπτικού δρόμου ΔL η επαλληλία για κάθε φασματική συνιστώσα οδηγεί σε μέγιστο ή ελάχιστο ανάλογα με τον λόγο $\Delta L/\lambda$. Έτσι η συνολική ένταση μειώνεται ή αυξάνεται με όλο και μικρότερο πλάτος διαμόρφωσης. Μετά από μια μέγιστη διαφορά οπτικού δρόμου δεν υπάρχει πια κανένας συσχετισμός φάσης μεταξύ των διαφόρων φασματικών συνιστωσών και η συνολική ένταση είναι πια σταθερή και ανεξάρτητη από την διαφορά οπτικού δρόμου.

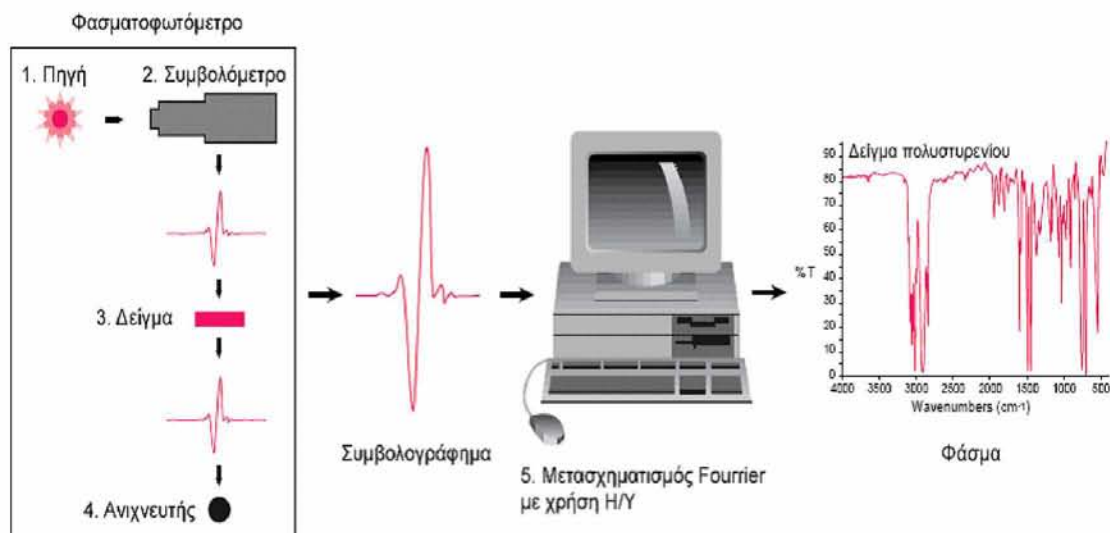
3.2. Δυνατότητες και Πλεονεκτήματα Φασματοφωτόμετρου FT-IR

Η τεχνική αυτή του FT-IR έχει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες τεχνικές φασματοσκοπίας. Χρησιμοποιεί το συμβολόμετρο Michelson για επιλογή μήκους κύματος και το μετασχηματισμό Fourier για τη δημιουργία του φάσματος. Κατά συνέπεια παίρνουμε φάσματα υψηλής ποιότητας.



ΕΙΚΟΝΑ 9 Διάταξη FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating).

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα. Καταρχήν, η χρήση υπολογιστή στη φασματοσκοπία FT-IR προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων, υπολογισμού του μέσου όρου τους, επεξεργασίας και αποθήκευσης των δεδομένων. Τούτο συνεπώς οδηγεί στην καταγραφή φασμάτων υψηλής ποιότητας. Είναι δυνατή επίσης η αφαίρεση φασμάτων και επομένως η ακριβής ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών που οφείλονται τόσο σε μεταβαλλόμενη σύσταση, όσο και στη φυσική κατάσταση του δείγματος.



ΕΙΚΟΝΑ 10 Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρον.

Η ύπαρξη «βιβλιοθήκης» φασμάτων υπερόθρου παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης του φάσματος ενός μείγματος συστατικών στα επί μέρους συστατικά του και επομένως τη δυνατότητα ποιοτικής/ποσοτικής ανάλυσης του μείγματος. Η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει τη φασματοσκοπία FT-IR μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση που η ατμόσφαιρα του φωτομέτρου δεν έχει πλήρως εκκενωθεί ή αντικατασταθεί με άζωτο. Τότε, το φάσμα υπερόθρου παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H₂O και το CO₂ του χώρου του φωτομέτρου. Το σοβαρότερο όμως μειονέκτημα της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η απαιτούμενη ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολομέτρου Michelson.

Βεβαία σε σύγκριση με τα συμβατικά IR φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα, τα FTIR φασματοφωτόμετρα υπερέχουν σημαντικά, καθώς ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι πολύ μεγαλύτερος. Η υπεροχή των FTIR φασματοφωτόμετρων οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους, που έχουν ως αποτέλεσμα: 1) όλες οι συχνότητες που εκπέμπονται από την πηγή να φθάνουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή 2) ένα μεγάλο εμβαδόν της δέσμης να περνά μέσα από το δείγμα και 3) η θέση του κινούμενου καθρέπτη να προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια.

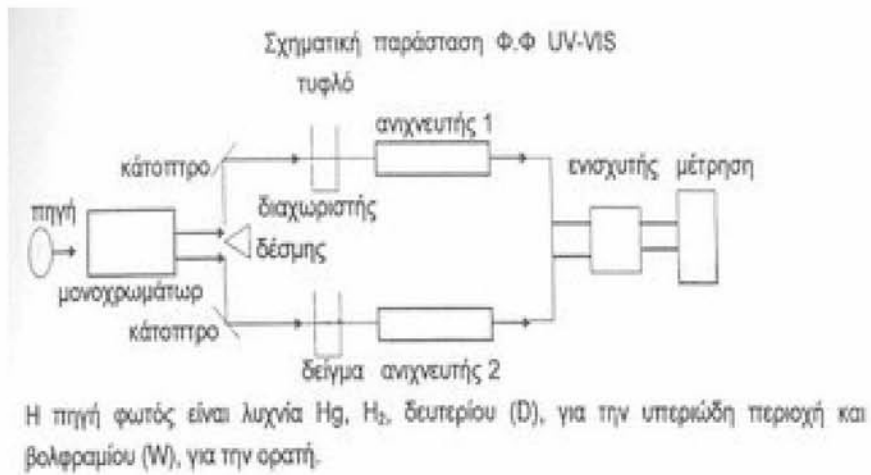
3.3.Φασματομετρία UV-VIS

Η απορρόφηση υπεριώδους (UV : 190 - 400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (visual 400-800 nm), προκαλεί μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, χωρίς όμως να αλλάζουν τον κύριο κβαντικό αριθμό.

Ο μονοχρωμάτορας (πρίσμα, ή παραθλαστικό φράγμα), αναλύει τα λευκό φως στις διάφορες μονοχρωματικές περιοχές του και επιλέγει τα επιθυμητό μήκος κύματος, με μεγάλη ακρίβεια. Ο διαχωριστής δέσμης, χωρίζει την εξερχόμενη δέσμη σε δύο ίσα μέρη. Οι κυψελίδες που περιέχουν το τυφλό και το δείγμα μέτρησης, κατασκευάζονται από χαλαζία για την περιοχή UV, ή και από ύαλο για την περιοχή VIS. Οι ανιχνευτές 1 και 2 συνδυαζόμενοι βρίσκουν το σήμα που οφείλεται στην ουσία που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Ο ενισχυτής, ενισχύει το εξερχόμενο σήμα. Η μέτρηση, ή και καταγραφή του σήματος γίνεται από ευπαθές φωτοκύτταρο και εκφράζεται σαν απορρόφηση, ή διαπερατότητα. Σήμερα τα χρησιμοποιούμενα όργανα είναι συνήθως αυτογραφικά διπλής δέσμης, (ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται αυτόματα) και δίνουν τις μεταβολές της απορρόφησης, ή της διαπερατότητας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος.

Στην φασματοσκοπική μέθοδο το μήκος κύματος παρατηρείται :

- α) Το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, καλείται μ.κ μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ. Σ' αυτό το μ.κ πραγματοποιούνται υποχρεωτικά όλες οι μετρήσεις.
- β) Σε λευκό διάλυμα, ή τυφλό δείγμα (blank), είναι το διάλυμα που έχει υποστεί όλες ακριβώς τις επεξεργασίες όπως και το άγνωστο, αλλά δεν περιέχει την ουσία που εξετάζουμε. Η κυψελίδα που περιέχει το λευκό διάλυμα ονομάζεται και κυψελίδα αναφοράς. Είναι κατασκευασμένη από χαλαζία, ή γυαλί ανάλογα με την περιοχή μέτρησης.
- γ) Και σε καμπύλη αναφοράς, ή βαθμονόμησης (calibration curve), ονομάζεται η καμπύλη που προκύπτει από τη γραφική απεικόνιση των αριθμητικών τιμών μιας φυσικοχημικής ιδιότητας του δείγματος (A ή T%), σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ουσίας. σε πρότυπα διαλύματα. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζουμε αμέσως τη συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος. Σωστές μετρήσεις λαμβάνονται όταν η μικρότερη τιμή της % T είναι 10% και η μέγιστη οριακή τιμή απορρόφησης μονάδας (A=1).



ΕΙΚΟΝΑ 11 Φ.Φ UV-VIS

4.Υδατάνθρακες

Οι Υδατάνθρακες ή αλλιώς σάκχαρα, είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες που αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$ και μοριακά βάρη που κυμαίνονται από μικρότερα του 100 μέχρι εκατοντάδες χιλιάδες. Σε αυτούς ανήκουν απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη αλλά μπορεί να φτάσουν μέχρι σύνθετα μόρια που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη.

Είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους σε τέσσερις κύριες κατηγορίες :

- Μονοσακχαρίτες -όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη- οι οποίοι αποτελούν τις μονομερείς μονάδες για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες. Οι πιο γνωστοί δισακχαρίτες είναι το καλαμοσάκχαρο (σακχαρόζη), η λακτόζη και η μαλτόζη.
- Ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Πολυσακχαρίτες, όπως είναι η κυτταρίνη, το άμυλο, και το γλυκογόνο, που αποτελούνται από εκατοντάδες ή και χιλιάδες μόρια μονοσακχαριτών.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού αυτοί οι όροι στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται απλά για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

Ο γενικός τύπος $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ανταποκρίνεται πλήρως στο μοριακό τύπο των μονοσακχαριτών οι οποίοι έχουν ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα και οξυγόνου, ενώ περιέχουν διπλάσιο αριθμό ατόμων υδρογόνου στο μόριό τους. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεϋδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες, αντίστοιχα (Χ. Κυρίτης, 2010).

Κάποιες από τις σπουδαιότερες λειτουργίες των υδατανθράκων είναι οι παρακάτω:

1. Αποτελούν κύρια πηγή ενέργειας για τον οργανισμό.
2. Έχουν άμεση σχέση με το μεταβολισμό των λιπών. Σε περίσσεια, η γλυκόζη μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια, ενώ σε ανεπάρκεια τα λίπη διασπώνται σε λιπαρά οξέα, για να καλύψουν ενεργειακές ανάγκες και γλυκερόλη, η οποία μετατρέπεται σε

γλυκόζη.

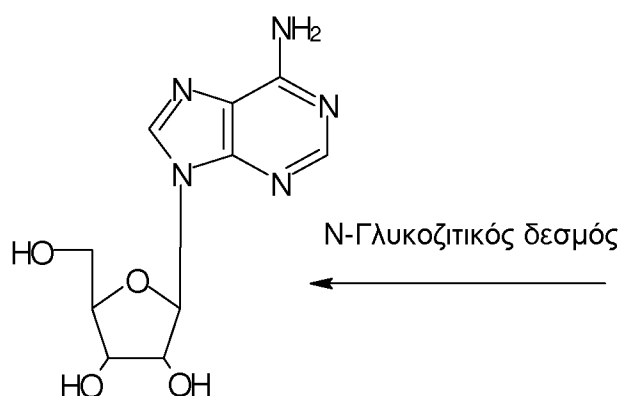
3. Η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το κεντρικό νευρικό σύστημα.

4. Οι υδατάνθρακες, επίσης, προστατεύουν τις πρωτεΐνες. Σε ανεπάρκεια υδατανθρακών, ο οργανισμός μετατρέπει ορισμένα αμινοξέα (πρωτεΐνες) σε γλυκόζη (Internet atcare).

5. ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

Τα νουκλεοσίδια (ή νουκλεοζίτες) είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και μιας ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Παράδειγματα ριβονουκλεοζιτών αποτελούν η αδενοσίνη, η γουανοσίνη, η κυτιδίνη, η θυμιδίνη, η ουριδίνη και η ινোসίνη. Φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών από ειδικές κινάσες του κυττάρου τους μετατρέπει σε νουκλεοτίδια τα οποία είναι οι μοριακοί δομικοί λίθοι του DNA και του RNA. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στη φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA.

Από άποψη χημικής δομής οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από μια βάση, που είναι είτε μια πουρίνη είτε μια πυριμιδίνη, ενωμένη με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. et al, 2001). Στη φύση όπου απαντώνται N-γλυκοζιτικοί δεσμοί πάντα η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου, οπότε χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζίτες β στερεοδιάταξης (σχήμα 2).



ΣΧΗΜΑ 2: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές, αντιυικές, αντιοξειδωτικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες (Tsirkone G. et al, 2010; Balatsos N. A. et al, 2009; Tiwari N. et al, 2009). Το ενδιαφέρον για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών έχει ενταθεί με σκοπό την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων και επέκτασης της του φάσματος των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους.

5.1. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιοι αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-(2'-deoxy-2'-methylene-β-D-erythro-pentofurano) cytosine (DMDC) και 1-β-D-arabinofuranoxycytosine (araC) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών όπως διαφόρους τύπους λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Matsuda A. et al, 2004; Cory A. H. et al, 1994; Yamagami K. et al, 1991; Lin T. S. et al, 1991; Baker C. H. et al, 1991). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. et al, 2010; Bhat U. G. et al, 2010).

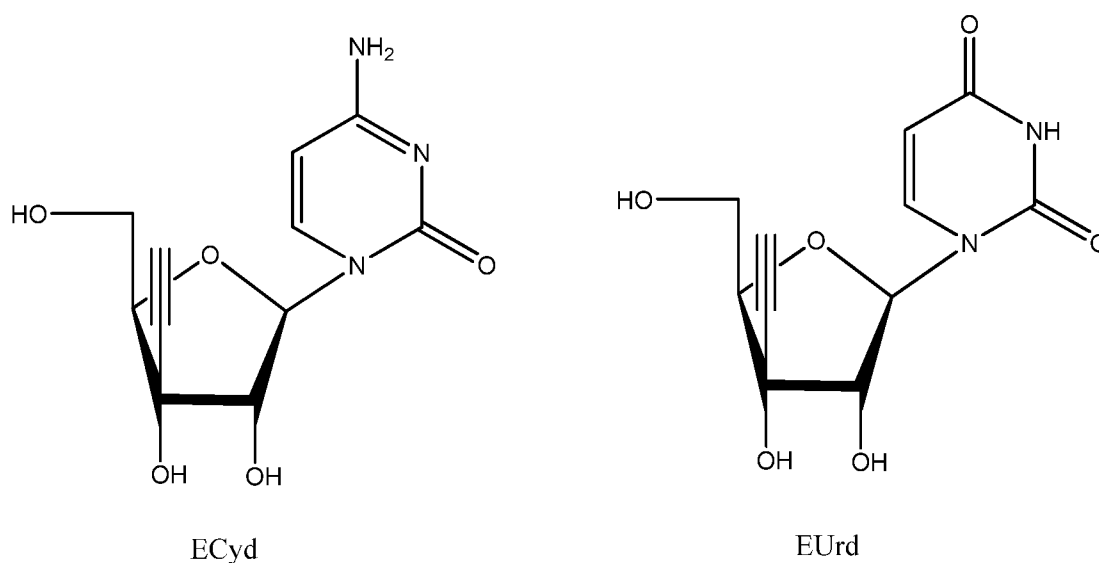
5.2 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Agelis G. et al, 2008; Komiotis D. et al, 2008; Agelis G. et al, 2007; Zhou W. et al, 2004; Perigaund C. et al, 1992; Komiotis D. et al, 1991). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα ddC, AZT, ddl, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη

τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. et al, 2001).

5.3.Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα

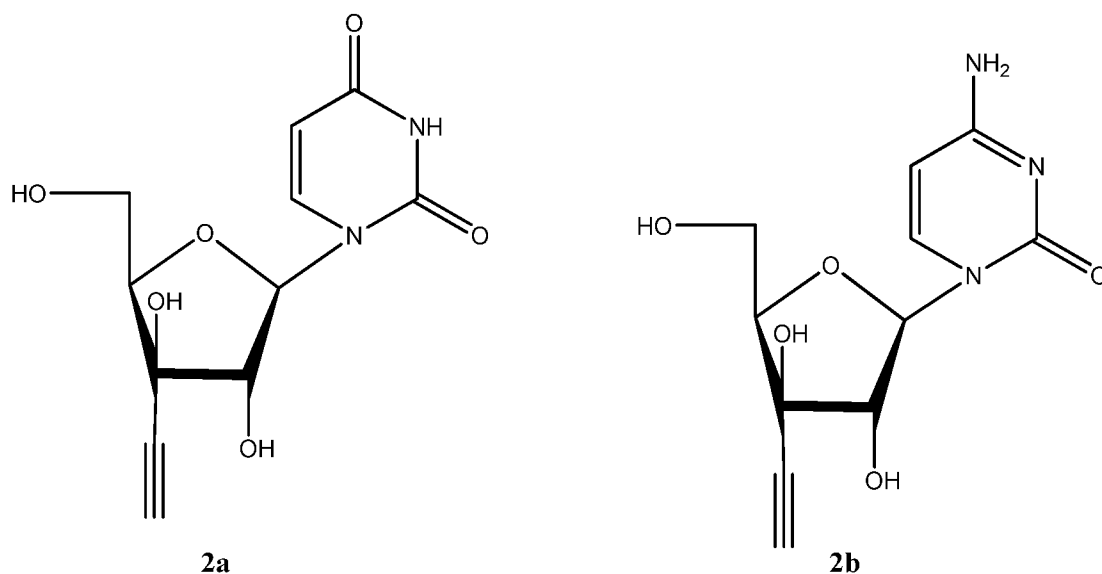
Σε μια μελέτη το 1996 του Hideshi Hattori διαπιστώθηκε ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (σχήμα 3) που φέρουν αιθύνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ECyd και EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ό,τι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda et al. 1996). Μάλιστα η EUrd παρουσίασε επίσης σημαντική αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε ανθρώπινους όγκους, που εισήχθησαν σε ποντίκια σαν ξενομοσχεύματα.



Σχήμα 3. Χημικές δομές της ECyd και EUrd

Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hideshi et al. 1998). Συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-ξυλο-πεντοφουρανοζυλο) κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3' επιμερή των ECyd και EUrd (Σχήμα 4). Η βιολογική δράση αυτών των ξυλο-παραγώγων ήταν σημαντικά μικρότερη, παρόλο που είχαν τόσο την αιθύνυλο ομάδα όσο και το υδροξύλιο στην

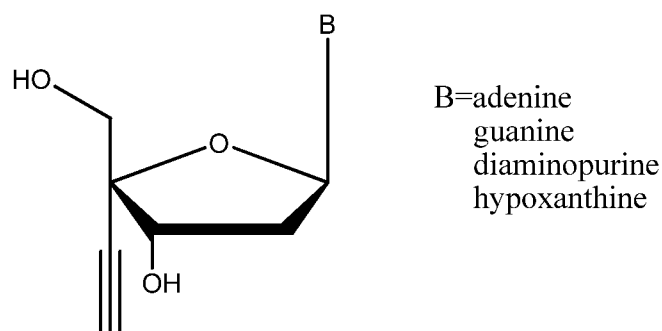
3'-θέση του σακχάρου. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι η παρουσία μιας 2',3'- cis διόλης στην ECyd και EUrd με μια ριβο-διαμόρφωση ήταν απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητά τους.



Σχήμα 4. 3'έπιμερή των ECyd και EUrd

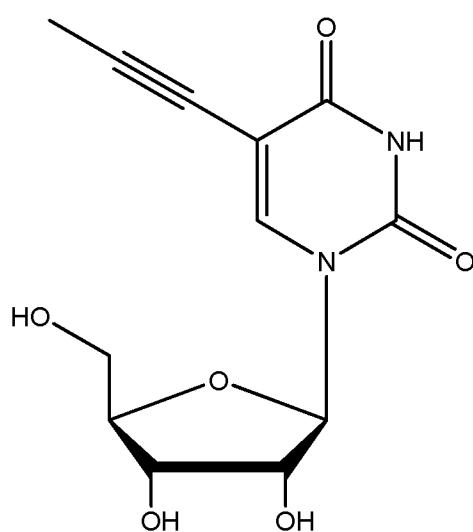
Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Makoto et al. 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην ECMP καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (*in vivo*), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Οι πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθυνυλο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντι- HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Satoru et al. 2003). Η δομή των νουκλεοζιτών απεικονίζεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5. Δομές των αιθυνυλο πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

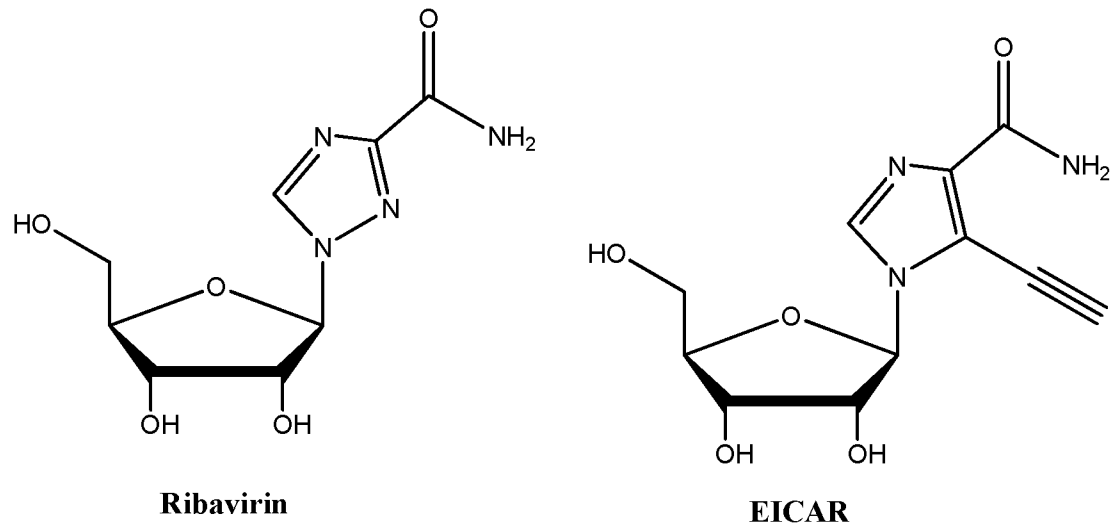
Η παρουσία της αιθυνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (σχήμα 6), παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, ξεπερνώντας την αντίστοιχη της 5-φθορο ουρακίλης (Srinivasarao et al. 2007).



Σχήμα 6. Χημική δομή της 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη

Τέλος, το 5-αιθυνυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1H-ιμιδαζολο-4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθυνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντιαυτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιαυτική του λειτουργία από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ribavirin (Minakawa et al. 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με το withinterferon-α (De Clercq et al. 2002). Επιπλέον της αντιαυτικής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και εμποδίζει

την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων in vitro (Minakawa et al. 1991). Στο παρακάτω σχήμα 7 απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR (Κυρίτσης Χ.,2010).



Σχήμα 7. Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR

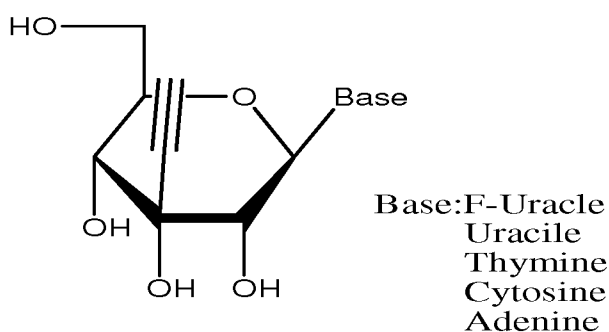
6. Ειδικό μέρος

6.1. Στόχος– Σκοπός μελέτης

Η μελέτη αυτής της πτυχιακής έρευνας έχει ως “στόχο-σκοπό” την ταυτοποίηση νέων εν δυνάμει αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων με σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές.

Όπως ήδη αναφέρθηκε μια βασική τεχνική της ταυτοποίησης οργανικών ενώσεων είναι η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού “NMR”, η οποία στηρίζεται στο φαινόμενο της αυτοστροφορμής (spin) των πυρήνων κάτω από την επίδραση ισχυρού σε στατικού μαγνητικού πεδίου και μας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την εξεταζόμενη δομή. Επιπλέον, η φασματομετρία μαζών και η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελούν δυο επίσης πολύ σημαντικές τεχνικές για την ταυτοποίηση του μοριακού βάρους και την εύρεση χαρακτηριστικών ομάδων στην εξεταζόμενη ένωση αντίστοιχα.

Με τη βοήθεια των τριών πιο πάνω τεχνικών και λαμβάνοντας υπόψη το έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι φούρανο αιθύνυλο νουκλεοζίτες λόγω της σημαντικής αντικαρκινικής τους δράσης, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η ταυτοποίηση μίας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρνουν την αιθύνυλο ομάδα στο τμήμα του σακχάρου. Η στόχευση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής είναι στραμμένη εμφαντικά ως προς την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων νουκλεοζιτών με τις αναφερθείσες φασματοσκοπικές μεθόδους. Η δομή των μορίων που ταυτοποιήθηκαν φαίνεται στη εικόνα (σχήμα 8) που ακολουθεί και περιλαμβάνει τους πυρανονουκλεοζίτες με ετεροκυκλική βάση την φθοροουρακίλη, ουρακίλη, θυμίνη, κυτοσίνη, αδενίνη.



Σχήμα 8. Δομή των νουκλεοζιτών που ταυτοποιήθηκαν

6.2. Υλικά και μέθοδοι

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance), με χρήση φασμάτων υπερύθρου (IR Spectrophotometry) καθώς και με χρήση φασμάτων μαζών (Mass Spectrometry).

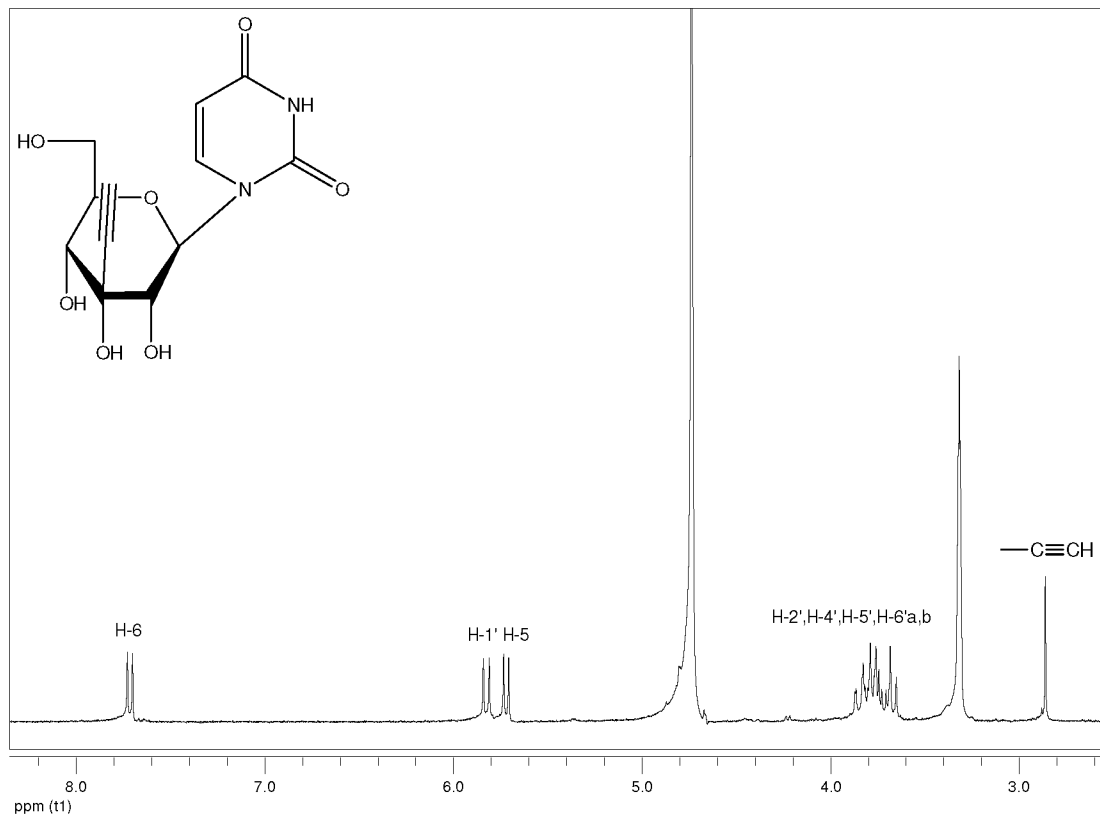
Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φυτόμετρο Bruker 400 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) και δευτεριωμένο διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Τα φάσματα IR πάρθηκαν με χρήση του σπεκτοφωτόμετρου Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR.

Τα φάσματα μαζών πάρθηκαν με τη χρήση ενός φασματογράφου μάζας ThermoQuest Finnigan AQA με τη μέθοδο του ιονισμού με ηλεκτροσπασμό.

7.Νουκλεοζίτες που ταυτοποιήθηκαν

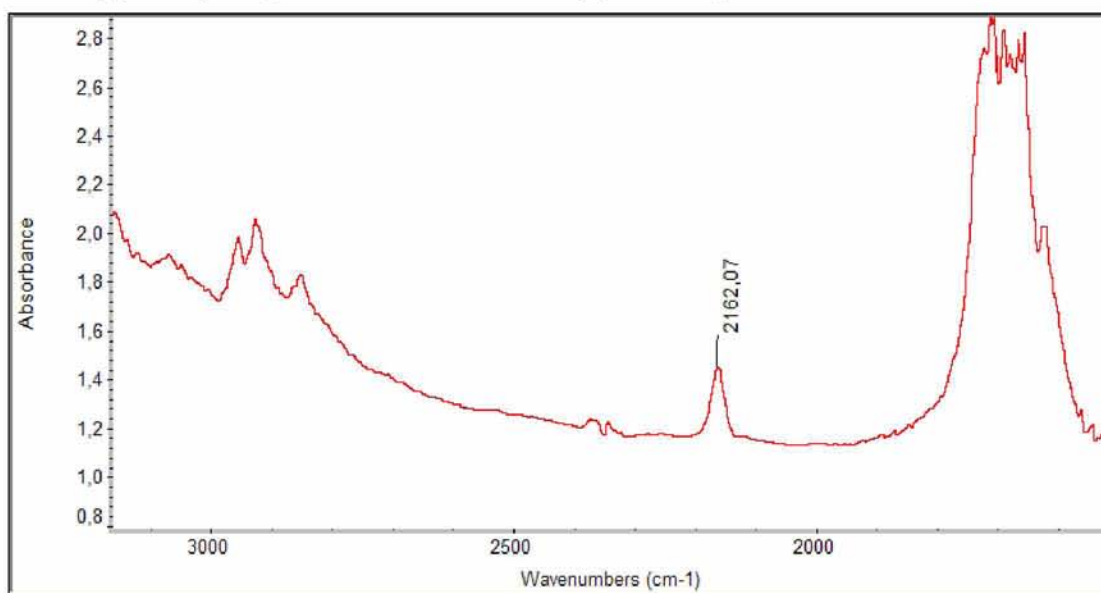
7.1.Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 12:Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης

Στο φάσμα ¹H NMR της ένωσης 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) ουρακίλης το σήμα πρωτονίου H-6 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 7.71 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το H-1' ως μια διπλή κορυφή, το αιθερικό πρωτόνιο του σακχάρου, ακολουθούμενο από το πρωτόνιο H-5 της βάσης σαν επίσης μία διπλή κορυφή στην περιοχή 5,82 έως 5,72. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,86 έως 3,65 δ. Τέλος, χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση στα 2,85 δ σαν μια απλή κορυφή του

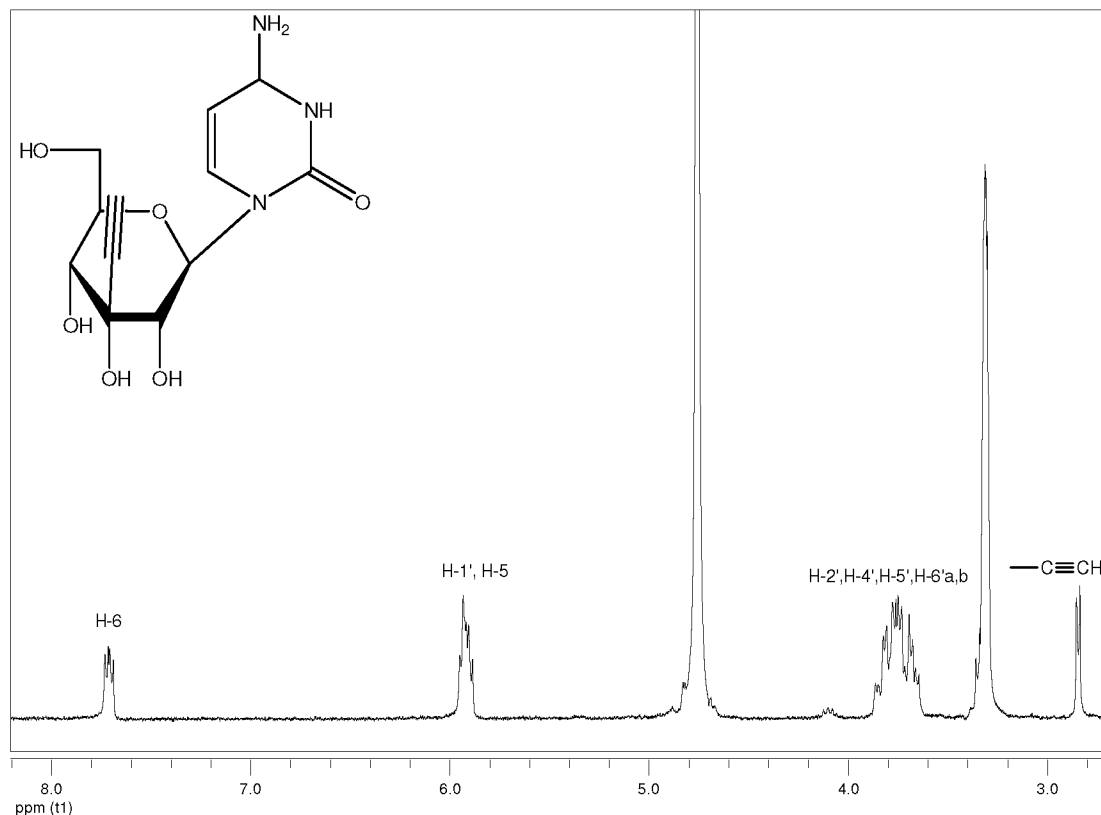
πρωτονίου της αιθύνυλο ομάδας. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της αμινομάδας της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που συμβαίνει μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).



ΕΙΚΟΝΑ 13: Φάσμα υπερόθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο)ουρακίλης

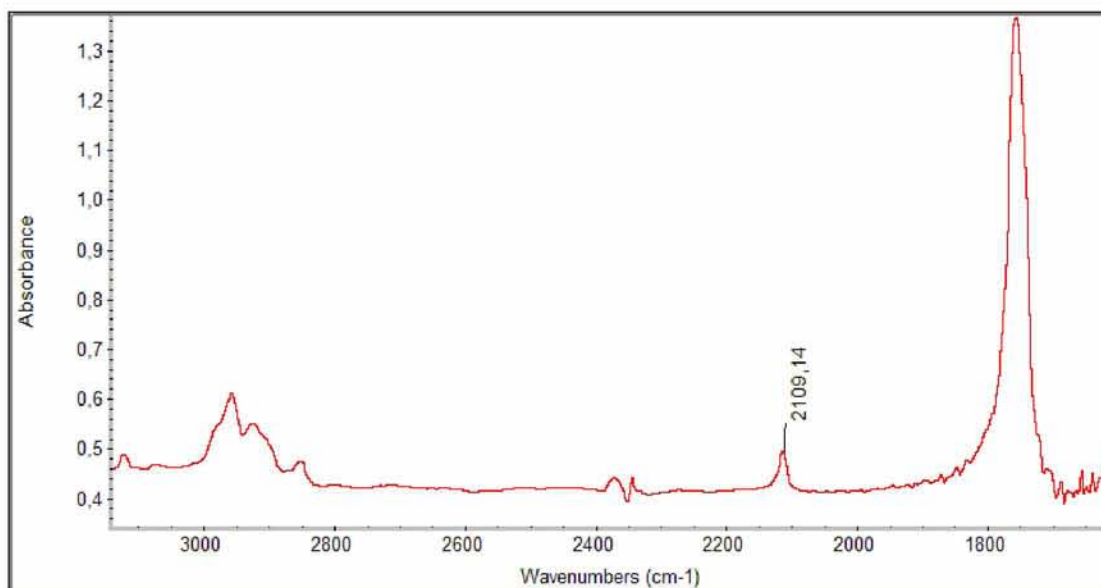
Από το παραπάνω φάσμα IR φαίνεται η χαρακτηριστική απορρόφηση τάσης του δεσμού $C\equiv C$ στα 2162 cm^{-1} η οποία και είναι η σχετική χαρακτηριστική απορρόφηση εσωτερικών αλκυνίων ,υψηλής διαγνωστικής αξίας όσον αφορά την εξακρίβωση της δομής της υπό διερεύνηση ένωσης

7.2. Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνης



ΕΙΚΟΝΑ 14: Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνης

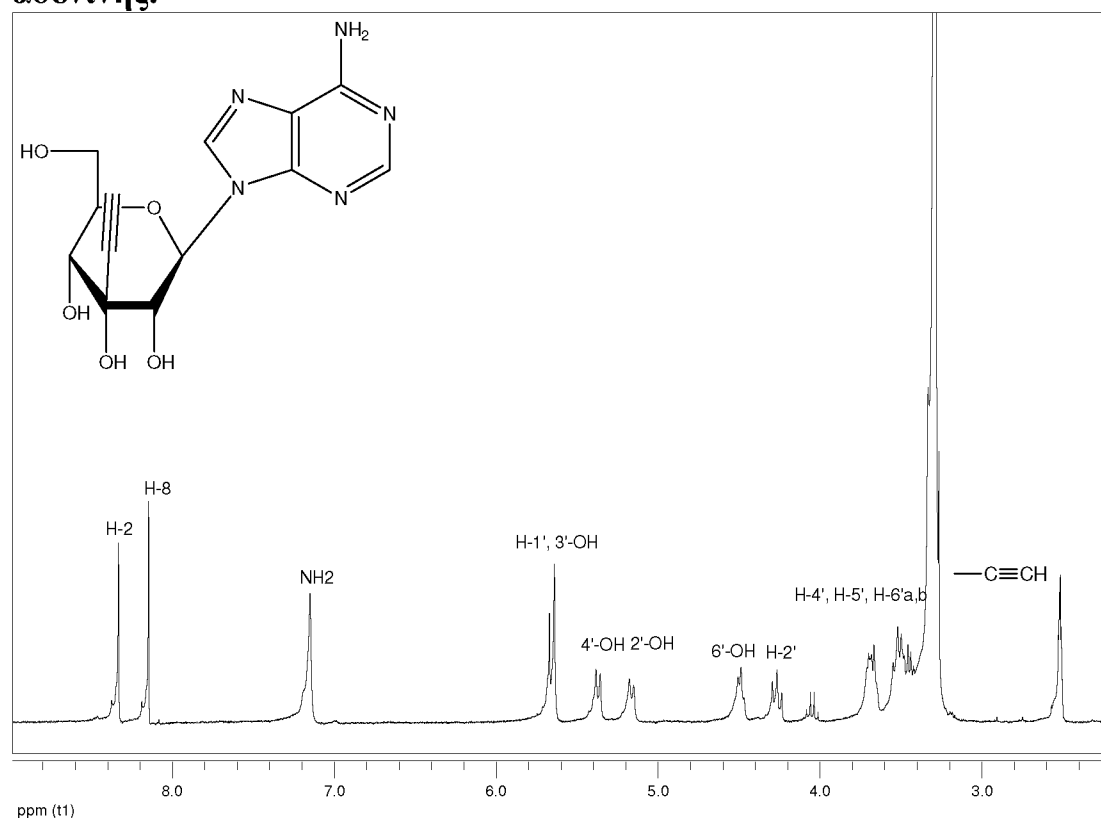
Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) κυτοσίνης το σήμα πρωτονίου H-6 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 7.72 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το H-1', το αιθερικό πρωτόνιο του σακχάρου, και το πρωτόνιο H-5 της βάσης σαν επίσης μία πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 5,95 έως 5,88. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,86 έως 3,64. Τέλος, χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση στα 2,83 δ σαν μια απλή κορυφή του πρωτονίου της αιθύνυλο ομάδας. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της αμινομάδας της βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που συμβαίνει μεταξύ αυτού και του διαλύτη (μεθανόλη).



ΕΙΚΟΝΑ 15: Φάσμα υπερίθρου της 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-D- αλλοπυρανοζυλο) κυτοσίνης

Από το προηγούμενο φάσμα IR φαίνεται η χαρακτηριστική απορρόφηση τάσης του δεσμού $C\equiv C$ στα 2109 cm^{-1} η οποία και είναι η σχετική χαρακτηριστική απορρόφηση εσωτερικών αλκυνίων ,υψηλής διαγνωστικής αξίας όσον αφορά την εξακρίβωση της δομής της υπό ταυτοποίηση ένωσης

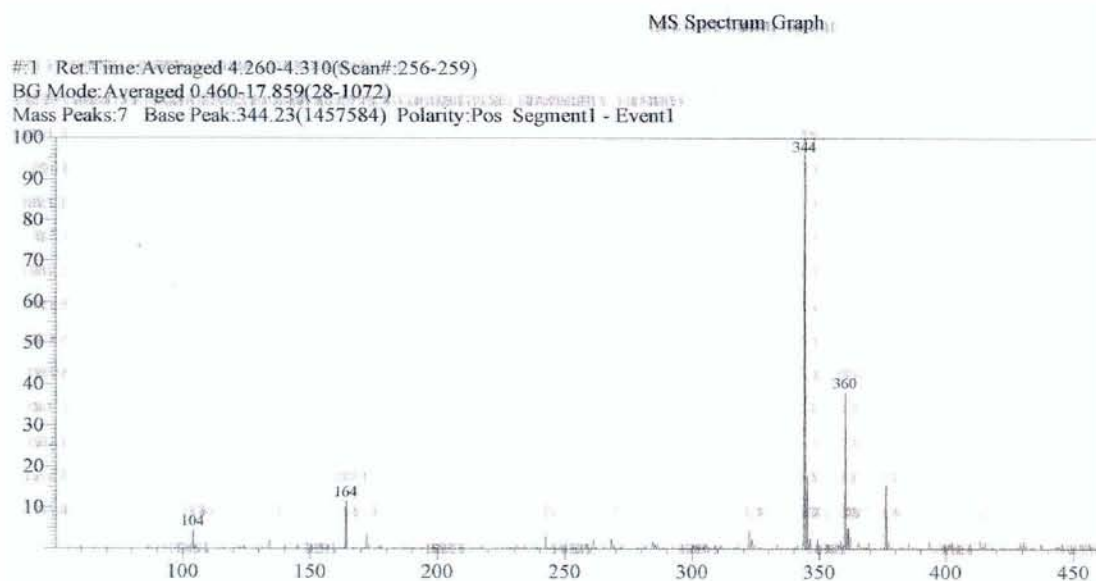
7.3. Ταυτοποίηση της 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης.



ΕΙΚΟΝΑ 16: Ταυτοποίηση της 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης

Στο φάσμα ¹H NMR της ένωσης 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδενίνης τα σήματα πρωτονίου H-2 και H-8 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζονται πρώτα σαν απλές κορυφές στα 8,33 και 8,15 ppm, αντίστοιχα. Ακολουθεί η άμινο ομάδα σαν μια απλή ευρεία κορυφή στα 7,15 ppm. Στη συνέχεια εμφανίζονται το H-1' και το 3'-OH ως μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 8,33 έως 8,15. Τα σήματα πρωτονίων των 4'-OH, 2'-OH και 6'-OH παρουσιάζονται σαν δύο διπλές (5,36 και 5,16 ppm) και μία τριπλή (4,48 ppm) αντίστοιχα. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 4,26 έως 3,43 δ. Τέλος, στα 3,26 δ είναι η απορρόφηση σαν μια απλή κορυφή του πρωτονίου της αιθύνυλο ομάδας, αν και δεν είναι αρκετά ευδιάκριτη λόγω του διαλύτη διμέθυλο σουλφοξειδίου.

Ταυτοποίηση με GC-MS

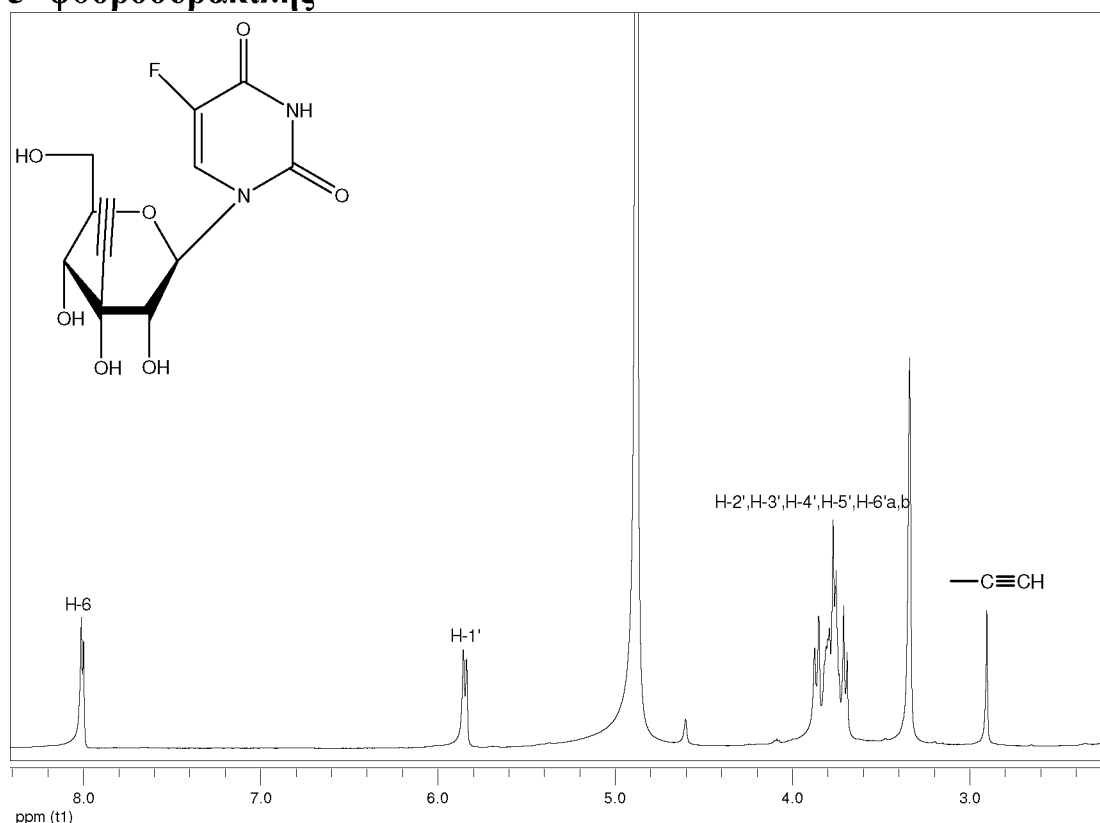


ΕΙΚΟΝΑ 17: Φάσμα μαζών της 9-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) αδερίνης

Τα θραύσματα που είναι χαρακτηριστικά της ένωσης φαίνονται σε:

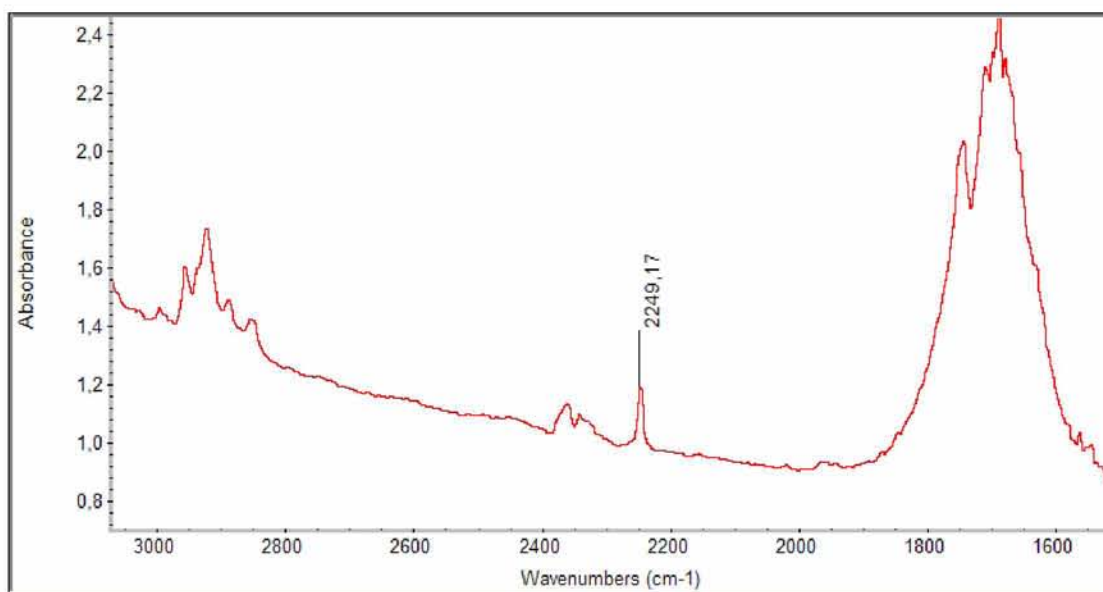
$$(M+Na)^{+1}(m/z) = 344 \text{ και } (M+K)^{+1}(m/z) = 360.$$

7.4. Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-Dαλλοπυρανόζυλο) 5-φθοροουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 18:Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) 5-φθοροουρακίλης

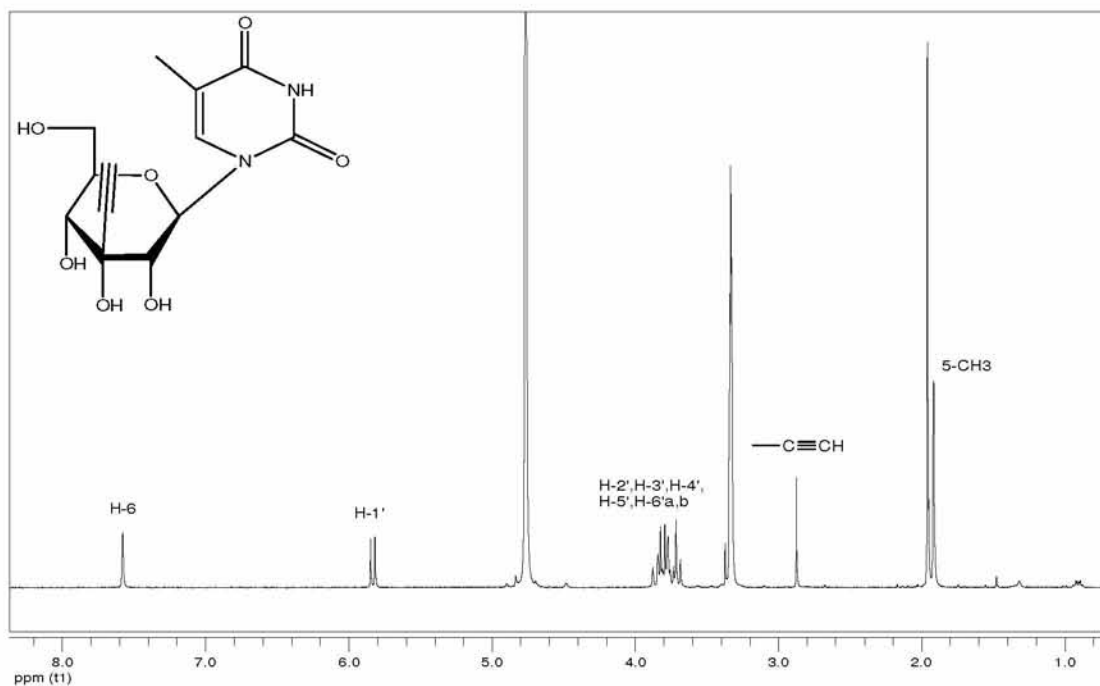
Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) φθοροουρακίλης το σήμα πρωτονίου H-6 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 8,00 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο και ως εκ τούτου εμφανίζεται σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το H-1' ως μια διπλή κορυφή, το αιθερικό πρωτόνιο του σακχάρου, στην περιοχή των 5,84 ppm. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,87-3,68 δ. Τέλος, χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση στα 2,89 δ σαν μια απλή κορυφή του πρωτονίου της αιθύνυλο ομάδας. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που συμβαίνει μεταξύ αυτού και του διαλύτη (μεθανόλη).



ΕΙΚΟΝΑ 19: Φάσμα υπερίθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) 5-φθοροουρακίλης

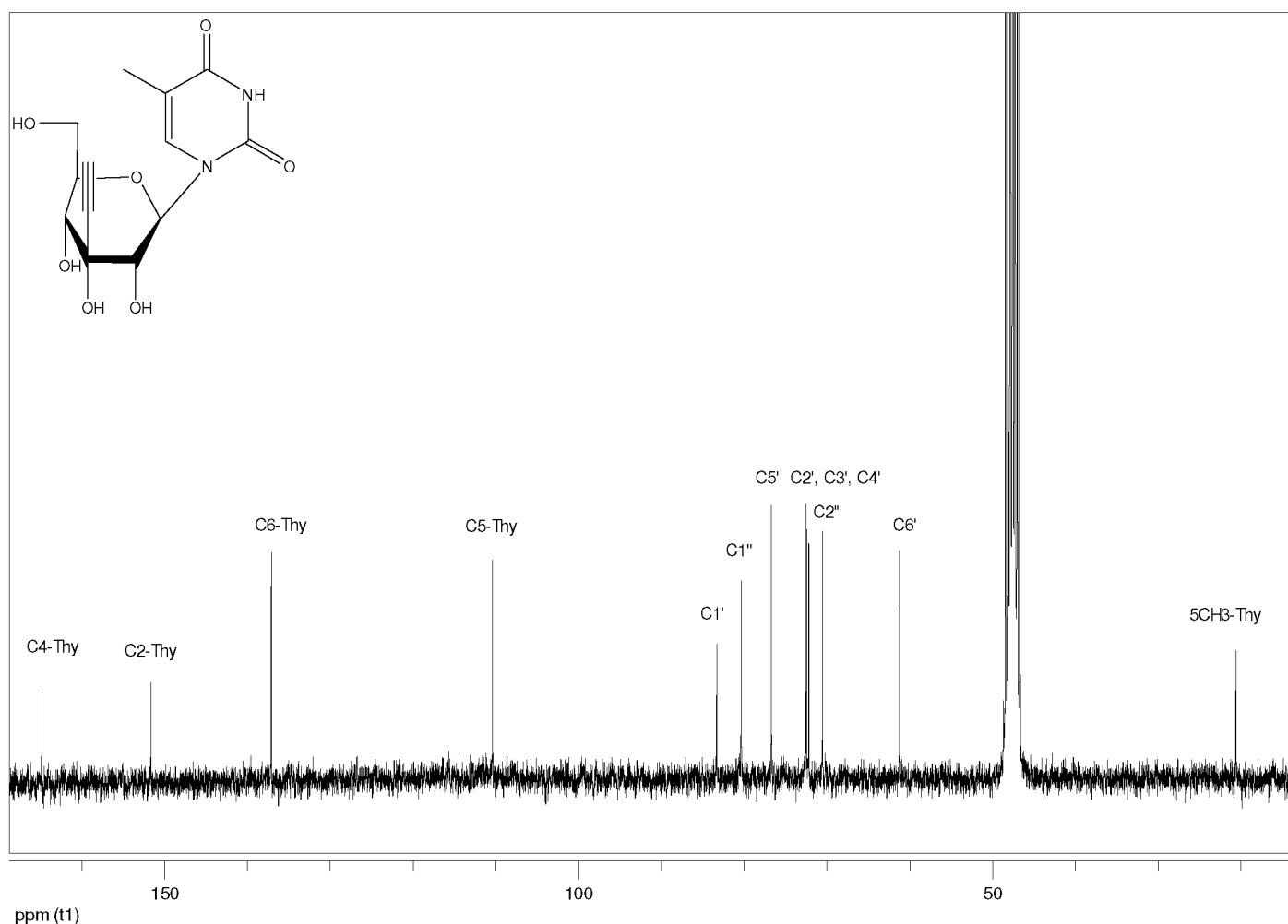
Από το παραπάνω φάσμα IR φαίνεται επίσης η χαρακτηριστική απορρόφηση τάσης του δεσμού $C\equiv C$ στα 2249 cm^{-1} της υπό διερεύνηση ένωσης.

7.5. Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης



ΕΙΚΟΝΑ 20: Ταυτοποίηση της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης το σήμα πρωτονίου H-6 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 7,56 ppm. Ακολουθεί το H-1' ως μια διπλή κορυφή, το αιθερικό πρωτόνιο του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή στην περιοχή 5,81 ppm. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,86-3,66 δ. Χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση σαν μια απλή κορυφή του πρωτονίου της αιθύνυλο ομάδας στα 2,85 δ και τέλος της 5-μέθυλο ομάδας σαν μια απλή κορυφή στα 1,94 δ. Σημειώνεται ότι και σε αυτή την περίπτωση το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που συμβαίνει μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).



ΕΙΚΟΝΑ 21: Φάσμα υπερέθρου της 1-(3'-C-αιθύνυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης

Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 1-(3'-C-αιθύλυλο-β-D-αλλοπυρανόζυλο) θυμίνης εμφανίζονται αρχικά οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις χαμηλού πεδίου των καρβονυλικών ανθράκων της βάσης. Συγκεκριμένα στην περιοχή χαμηλού πεδίου του φάσματος εμφανίζονται οι κορυφές C-4 και C-2 των καρβονυλικών ανθράκων της θυμίνης σε χημική μετατόπιση 165 και 152δ αντίστοιχα. Ακολουθεί οι απορροφήσεις των δύο sp^2 υβριδισμένων βινυλικών ανθράκων C-6 και C-5 στα 137 και 110 δ αντίστοιχα. Κάτω από τα 90δ ακολουθούν οι απορροφήσεις όλων των sp^3 υβριδισμένων αλειφατικών ανθράκων του μορίου καθώς και των sp ανθράκων της αιθύλυλο ομάδας. Χαρακτηριστική είναι τέλος στην περιοχή πολύ υψηλού πεδίου 20 δ, η απορρόφηση του μεθυλικού άνθρακα στην 5 θέση της βάσης.

8. Αποτελέσματα- Συζήτηση

Οι σύγχρονες τεχνικές φασματοσκοπίας συμβάλλουν αποτελεσματικά στην ταυτοποίηση τόσο της δομής, όσο και της καθαρότητας ενός πλήθος ενώσεων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος . Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση μιας νέας τάξης αιθύνυλο πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή βιολογική δράση. Τα νέα νουκλεοζιτικά παράγωγα συντέθηκαν μετά από μια σειρά σύντομων αντιδράσεων και η απομόνωση τους περιλάμβανε τεχνικές καθαρισμού όπως η χρωματογραφία στήλης.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αποτίμηση των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οδήγησε στην αποκάλυψη της δομής των επιθυμητών μας προϊόντων με σαφήνεια και βεβαιότητα, επιβεβαιώνοντας την αδιαμφισβήτητη σημασία της συγκεκριμένης τεχνικής στην ταυτοποίηση οργανικών μορίων. Επιπλέον η φασματοσκοπία μαζών, κατέδειξε τη σημαντικότητα της στην εύρεση του μοριακού βάρους μιας οργανικής ένωσης. Τέλος, η φασματοσκοπία υπερύθρου επιβεβαίωσε την χαρακτηριστική αιθύνυλο ομάδα στα μόρια που ελέγχθηκε. Με βάση τα αναφερόμενα, τα νέα μόρια διαθέτουν την αναμενόμενη χαρακτηριστική δομή και καθαρότητα, ώστε να μπορεί να ελεγχτεί στη συνέχεια η πιθανή βιολογική τους δράση.

9 .ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Agelis G.; Tzioumaki N.; Tselios T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 1366.
- ❖ Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. Biochem. Pharmacol. **1974**, 23, 2095
- ❖ Alfassi ZB. General Aspects of the Chemistry of Radicals. Viley-VCH, Weinheim, 1999.
- ❖ American Diabetes Association: Diabetic Nephropathy (Position Statement).Diabetes Care 23(Suppl.1):S69-S72,2000
- ❖ Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. Biochemistry 2009, 48, 6044–6051.
- ❖ Βαλανίδης Αθ.Π., Οργανική χημεία 56-110, 2006
- ❖ Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξανδρού Α.Γ., 1986, 13-60.
- ❖ Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T., and Polonsky, K. S., 1996. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu. Rev. Physiol.* 58:171-186.
- ❖ Bender C, Berliner LJ, eds. EPR: Instrumental Methods. Klumer Academic/Plenum, Dordrecht, 2004.
- ❖ Berg, J. M., Tymockzko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351
- ❖ Berg, J. M., Tymockzko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006 p.649, 651

- ❖ Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
- ❖ Bradley D. *Modern Drug Discovery* 11, 28-30, 32, 34, 2001.
- ❖ Chang CT, Chen YC, Fang JT, Huang CC. Metformin-associated lactic acidosis: case reports and literature review. *J Nephrol* 15(4): 398-402, 2002.
- ❖ Conway DL. Obstetric management in Gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30,suppl 2, s175-179.
- ❖ Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47,365.
- ❖ Christos kiritsis, et al. *Medical chemistry* 2012, 8, 320-329
- ❖ D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 1998, p. 519-571.
- ❖ Daniel De Noon: Actos Effective in Late-Stage Type 2, *Diabetes WebMD Health News*, 2005.
- ❖ Dewit S, 2009. *Παθολογική Χειρουργική Νοσηλευτική. Έννοιες και Πρακτική*. 2ος τόμος. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα.
- ❖ *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, Volume 31, Supplement 1, 2008.
- ❖ Christos Kiritsis¹, Stella Manta¹, Ioannis Papatiriou², Evdokia Coutouli-Argyropoulou³, Sakellarios Trakossas³, Jan Balzarini⁴ and Dimitri Komiotis¹, (*Medicinal Chemistry*, 2012, 8, 320-329)

- ❖ Goldberg RB, Einhorn D, Lucas CP.: A randomised placebo- controlled trial of repaglinide in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:1897-1903, 1998.
- ❖ Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
- ❖ Halliwell, B., (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*
- ❖ Heiner Laube, Department of Internal Medicine, Universität Giessen And Giessen: *Acarbose An Update of Its Therapeutic Use in Diabetes Treatment*, 2002.
- ❖ Hermann LS, Wiernsperger N. Impaired glucose tolerance and metformin: Clinical and mechanistic aspects. *Br J Diabetes and Related Disorders* 2002, 2:177–183.
- ❖ Ian N. Scobie, MD, *Diabetes Retinopathy, Chronic complications of diabetes mellitus. An Atlas Of Diabetes Mellitus*, second edition, 2002.
- ❖ Ignatavicius & Workman, 2008. Παθολογική □ Χειρουργική Νοσηλευτική. Κριτική σκέψη για συνεργατική φροντίδα. 2ος τόμος. Ιατρικές Εκδόσεις Βήτα Αθήνα.
- ❖ Komiotis D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids* 1991, 10, 431.
- ❖ Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: p. 2389-2397.

- ❖ Langer O, Berkus M, Brustman L, Anyaegbunam A, Mazze R. Rationale for insulin management in gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1991;40 (Suppl2):186-190.
- ❖ Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. J. *Med. Chem.* 1991, *34*, 2607.
- ❖ Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. J. *Med. Chem.* 1991, *34*, 2607.
- ❖ Marshall W., *Clinical biochemistry*, 2000, p.217-220.
- ❖ Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, *95*, 105.
- ❖ Mavromoustakos T., Zervou M., Zoumpoulakis P.,Kyrikou I. Et al, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004.
- ❖ McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p.1245-1247
- ❖ Mc Murry J. *Οργανική Χημεία, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο*, 2002, σελ.54.
- ❖ Misbin RI, Green L, Stadel BV, Gueriguian JL, Gubbi A, Fleming GA: Lacticacidosis in patients with diabetes treated with metformin. *N Engl J Med* 338: 265– 266, 1998.
- ❖ Misbin RI: The phantom of lactic acidosis due to metformin in patients with diabetes. *Diabetes Care* 27: 1791–1793, 2004.
- ❖ Mona M. Chitre, PharmD, CGP, and Susan Burke: Treatment Algorithms and the Pharmacological Management of Type 2Diabetes, *Diabetes Spectrum* 4: 249-255, 2006.

- ❖ Moon H. R., Kim H. O., Lee S. K., Choi W. J., Chun M. W., Jeong L. S.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 1499-1507.
- ❖ Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: p. 2389-2397
- ❖ Oikonomakos, N.G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2002 3: p.561-586.
- ❖ Oikonomakos, N. G.; Somsak, L., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2008, 9 (4), p.379-395.
- ❖ Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983
- ❖ Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, *Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*, **1997** : 4, 26.
- ❖ Parsons AF. *An Introduction to Free Radical Chemistry*. Blackwell Science, Oxford, 2000.
- ❖ Pelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:730-736.
- ❖ Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903.
- ❖ R.Kellner,J.-M.Mermet,M.Otto,H.M.Widmer.,*Analytical Chemistry*,1997.
- ❖ Saltiel, AR. You are what you secrete. *Nature Medicine* 2001;7(8): 887-888.

- ❖ Somsák, L.; Nagya, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. *Current pharmaceutical design* 2003, 9, 1177–1189.
- ❖ Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983.
- ❖ Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *International Journal of Molecular Sciences* 2007.
- ❖ Stryer Lubert, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, p.347-354.
- ❖ Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. 2007. *Protein Sci* 16(8): p. 1773-82
- ❖ Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Secrist, J. A. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 2009, 28, 657–677.
- ❖ Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010, 18, 3413–3425.
- ❖ Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis D. *Archiv der Pharmazie* 2009, 342, 353.
- ❖ Walker M, Turnbull DM. Mitochondrial related diabetes: a clinical perspective. *Diabetic Med* 1997;14:1007-1009.
- ❖ William H. Brown, *Organic Chemistry*, 1995, *Mass Spectrometry*, p.453-459.

- ❖ William H. Brown, Organic Chemistry, 1995, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, p.475-478, 498-501.
- ❖ William H. Brown, Organic Chemistry, 1995, Infrared and Ultraviolet – Visible Spectroscopy, p.521-530.
- ❖ William H. Brown, Organic Chemistry, 1995, Nucleosides and Nucleotides, p.1088.
- ❖ Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. Cancer Res. 1991, 51, 2319.
- ❖ Yong S. K. Moon, Pharm. D.; Moti L. Kashyap, M. D., Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetic Dyslipidemia, Pharmacotherapy Publications 24 (12):1692-1713, 2004.107.
- ❖ Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. Med. Chem. 2004, 47, 3399.
- ❖ Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., and Johnson, L.N., The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. 1997. Structure 5(11): p. 1413-25.
- ❖ Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report 2007, Part II, pp. 371-372
- ❖ Γαρούφας Αθαν., μεταπτυχιακή διατριβή ταυτοποίηση υπογλυκαιμικών παραγόντων με φασματοσκοπικές τεχνικές (2012)

- ❖ Δημήτριος Θ. Καραμήτσος, Διαβητολογία, Εκδόσεις Σιώκης, 2000.
- ❖ Θ. Μαυρομούστακος, Μ. Ζερβού, Ε. Μαντζουράνη, Σχεδιασμός Φαρμακευτικών Ενώσεων με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ 17,1, 8-15, 2004.
- ❖ Ι. Ιωαννίδης, Αντιδιαβητικά φάρμακα: Διπλός στόχος, ygeia.tanea.gr
- ❖ Κυρίτσης Χρ., μεταπτυχιακή εργασία, σύνθεση νέων αιθύνυλο και κυανό νουκλεοζιτών ως πιθανοί αντικό και αντικαρκινικοί παράγοντες (2010)
- ❖ Ν. Κατσίλαμπρος, Ι. Ιωαννίδης: Νεότερα Αντιδιαβητικά Φάρμακα. Ά Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΠΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ» , Αρχ. Ελλ. Ιατρ., 16(6), 1999, Νοέμβριος-Δεκέμβριος, 552-556.
- ❖ Παπαδογιάννης Ι. & Σαμανίδου Β. Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2001, σελ. 331.
- ❖ Ράπτης Σ, Φαρμακευτική αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη, Εσωτερική Παθολογία, Αθήνα, 1998.
- ❖ Σαχίνη Καρδάση Α & Πάνου Μ, 2004. Παθολογική & χειρουργική νοσηλευτική. Νοσηλευτικές διαδικασίες. 3ος Τόμος Εκδόσεις ΒΗΤΑ, Β' έκδοση, Αθήνα.
- ❖ Τούντας Χ: Σακχαρώδης Διαβήτης Θεωρία και Πράξη. Αθήνα 2005,σελ 140.
- ❖ www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Actos/201400e11.pdf
- ❖ http://fmesite.aegean.gr/sites/default/files/ProtinomeniDomiDiplomatikis_0.doc

- ❖ www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Avandia/H-268-e11.pdf
- ❖ <http://health.allrefer.com>, reviewed by R.S. Douglas, Department of Ophthalmology, UCLA Medical Center, Review provided by VeriMed Healthcare Network (12/22/2002).
- ❖ www.medscape.com
- ❖ www.medicenet.com
- ❖ www.novonordisk.gr