

Ramanova spektroskopija kao metoda mjerenja stupnja konverzije kompozitnih materijala

Andelina Šekelja¹

Ana Crnadak²

dr. sc. Matej Par³

izv. prof. dr. sc. Danijela Marović³

[1] studentica 6. godine, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

[2] diplomirala u Akademskoj godini 2019./2020.

[3] Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Članak „Ramanova spektroskopija kao metoda mjerenja stupnja konverzije kompozitnih materijala“ u prošlom broju je zabunom objavljen bez slika. Molimo autore da prihvate ispriku Uredništva Sonde, uz ponavljanje cjelovitog članka.

STUPANJ KONVERZIJE

Polimerizacija kompozitnih materijala temeljno je i klinički značajno svojstvo koje određuje mnogobrojna fizička svojstva materijala poput čvrstoće, tvrdoće, elastičnosti, biokompatibilnosti, apsorpcije vode i promjene boje (1-5). Stupanj konverzije (SK) je postotak dvostrukih ugljikovih veza konvertiranih u jednostruke kao rezultat polimerizacijskog procesa. Nakon završene polimerizacije bilo bi idealno da je sav monomer prešao u polimer, ali dio dvostrukih veza monomera ostaje neizreagiran. Za to je odgovoran proces gelacije materijala koji nastupa kad više nema viskoznog tečenja materijala. Zbog porasta viskoznosti reaktivnog medija stupanj konverzije nikada ne doseže 100%, odnosno monomerne i neke polimerne molekule imaju neizreagirane dvostruke ugljikove veze na krajevima lanaca. Stupanj konverzije kompozitnih materijala obično iznosi 55 % - 75 % (6).

METODE ODREĐIVANJA STUPANJA KONVERZIJE

Postoje izravne i neizravne metode određivanja stupnja konverzije. Izravne metode

temelje se na vibracijskoj spektroskopiji te izravno određuju količinu neizreagiranih C=C veza (7). U izravne metode pripadaju Ramanova spektroskopija te spektroskopija s Fourierovom transformacijom infracrvenog spektra (FTIR). Neizravne metode određivanja stupnja konverzije uključuju mjerenje mikrotvrdoće, diferencijalnu pretražnu kalorimetriju, diferencijalnu toplinsku analizu i tekućinskukromatografiju visokih performansi. U ovome članku naglasak će biti na izravnim metodama određivanja stupnja konverzije, a posebnu pažnju usmjerit ćemo na Ramanovu spektroskopiju.

Spektroskopija općenito

Spektroskopija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem emisijskih i apsorpcijskih elektromagnetskih spektara atoma i molekula. Njome se mjeri veličina zračenja u ovisnosti o energiji, valnoj duljini ili frekvenciji (8). Koristi se u mnogim granama prirodnih znanosti jer daje informacije o građi i sastavu tvari, njenoj temperaturi i tlaku te može dati informacije o dinamici promatranog sustava. Najšira upotreba spektroskopije jest u analitičke svrhe.

Vibracijske spektroskopije: infracrvena spektroskopija i Ramanova spektroskopija

Vibracijska spektroskopija grana je spektroskopije koja proučava spektre nastale vibracijama molekula. Obuhvaća infracrvenu spektroskopiju i Ramanovu spektroskopiju.

Svaka molekula karakterizirana je specifičnim skupom energetske stanja koja su određena rasporedom atoma u molekuli. Skup energetske prijelaza između tih stanja predstavlja uzorak jedinstven za određen kemijski spoj. Pregled uzoraka vibracijskom spektroskopijom daje spektar u kojem su prijelazi između vibracijskih stanja prikazani pomoću spektralnih vrpce. Pozicija vrpce unutar spektra određena je energijom prijelaza između vibracijskih stanja i izražava se kao valni broj (cm^{-1}). Dodjeljivanjem specifične vibracijske vrpce određenoj funkcijskoj skupini ili vezi unutar molekule, vibracijska spektroskopija može pružiti kvalitativne i kvantitativne informacije (9). Preračunavanje spektroskopskih podataka u apsolutne vrijednosti koncentracije zahtijeva korištenje kalibracijskih krivulja, koje povezuju koncentraciju određene vrste uzorka s intenzitetom njegove odgovarajuće vibracijske vrpce. Alternativno, omjer koncentracija može se izračunati bez korištenja kalibracijskih krivulja. Umjesto toga, spektar se normalizira korištenjem unutarnjeg standarda, to jest vibracijske vrpce čiji intenzitet ostaje konstantan. Kod mjerenja kompozitnih materijala u stomatologiji to znači korištenje vrpce koja ne prolazi promjene tijekom polimerizacije. Zbog toga izračunavanje stupnja konverzije ne zahtijeva kalibracijske krivulje jer se evaluira samo relativni iznos dvostrukih veza potrošenih prilikom polimerizacije. Obzirom da su C=C veze sadržane u različitim

monomerima, temeljna pretpostavka jest da su njihova infracrvena apsorpcija i intenzitet Ramanovog raspršenja ovisni o molekularnoj strukturi monomera.

RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA

Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed njegove interakcije s vibracijskim prijelazima molekule (10). Ramanova spektroskopija temelji se na mjerenju molekularnih vibracija uz pomoć neelastičnog Ramanovog raspršenja. Za razliku od elastičnog (Rayleighovog) raspršenja, neelastično raspršenje karakteriziraju različite energije pobudnog i raspršenog fotona (11). Molekule u uzorku pobuđene su u virtualno stanje nakon obasjavanja uzorka laserskim svjetlom te se nakon pobude vraćaju u vibracijski nivo osnovnog energetskog stanja, pritom emitirajući foton energije različite od pobudnog fotona (11). Ukoliko se molekule nakon pobude u virtualno stanje vraćaju u viši vibracijski nivo osnovnog energetskog stanja, emitirani foton manje je frekvencije od pobudnog te se pojava naziva Stokesovo raspršenje. Pri anti-Stokesovom raspršenju frekvencija emitiranog fotona veća je od frekvencije pobudnog fotona, budući se molekule pobuđene u virtualno stanje iz početnog, višeg vibracijskog nivoa, vraćaju u niži vibra-

cijski nivo osnovnog elektronskog stanja. U oba slučaja, energijska razlika predstavlja Ramanov pomak i odgovara karakterističnom vibracijskom energetskom prijelazu molekule. U Ramanovom spektrometru efekt raspršenja induciran je obasjavanjem uzorka monokromatskom laserskom zrakom. Raspršena svjetlost na uzorku prikupljena je lećom, a elastično raspršeni fotoni (Rayleigh) su filtrirani. Ti fotoni imaju istu energiju kao i pobudni fotoni koje emitira laser i ne nose podatke o vibracijskom spektru molekula. Samo mali dio fotona koji su bili neelastično raspršeni (oko 1 od 10 milijuna) vodi do detektora za prikaz Ramanovog spektra. Standardni se uređaj sastoji od izvora zračenja (laser određene valne duljine), nosača uzorka ili ćelije za uzorak, monokromatora / selektora valnih duljina (optička rešetka ili Michaelisonovinterferometar), detektora te sustava za obradu signala (12).

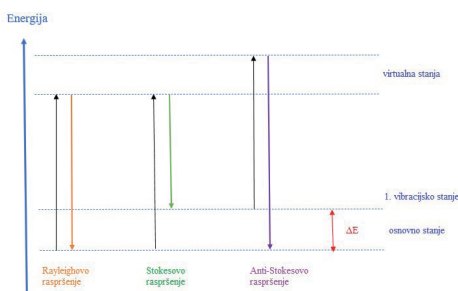
Postupak snimanja uzorka

Jedna od prednosti Ramanove spektroskopije naspram infracrvene spektroskopije je jednostavnija priprema uzorka. Polimerizirani ili nepolimerizirani uzorak učvrsti se na nosač i poravnava s laserskom zrakom. Na računalo povezanom s Ramanovim spektrometrom odrede se potrebni parametri te pokrene snimanje. Snimljeni spektri

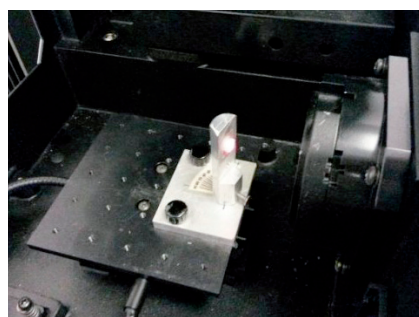
spremaju se na računalo za kasniju analizu.

Prednosti Ramanove spektroskopije

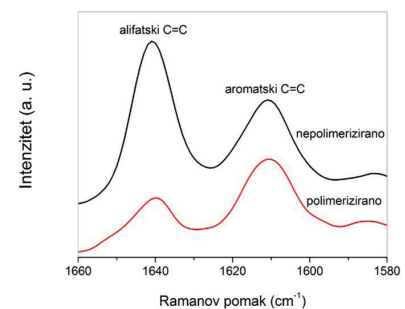
Prednost Ramanove spektroskopije jest neinvazivnost koja omogućava višestruka mjerenja na istim uzorcima (13). To ju čini vrlo pogodnom metodom za određivanje stupnja konverzije na različitim dubinama istog uzorka. Prednosti ove metode su i neovisnost o temperaturi i tlaku, jednostavna mikroskopija, jednostavna primjena bez potrebe za dodatnom prethodnom pripremom uzorka. Prednost je i mogućnost mjerenja uzoraka *in situ* raznih oblika i geometrije bez oštećivanja samog uzorka. Prednost Ramanove spektroskopije jest i neosjetljivost na vlagu što znači da nema potrebe za posebnim uvjetima kontrole vlažnosti zraka te dopušta mjerenja vlažnih uzoraka. Moderni laserski izvori također omogućuju ispitivanje mikro-uzoraka, pa se Ramanova spektroskopija može koristiti i za analizu površine, tankih slojeva, prahova, svih vrsta otopina i plinova. Ramanov spektrometar može se povezati s mikroskopom kako bi se omogućilo fokusiranje laserske zrake na vrlo malom području uzorka (mikro-Raman) za procjenu lokalnog stupnja konverzije (14). Zbir takvih lokalnih mikro-mjerenja može pridonijeti stvaranju mapiranih presjeka stupnja konverzije i istraživanju stupnja kon-



Slika 1. Shematski prikaz elastičnog (Rayleighovog) raspršenja i neelastičnog (Ramanovog) raspršenja. Neelastično raspršeni fotoni imaju nižu (Stokesovo raspršenje) ili višu energiju (Anti-Stokesovo raspršenje) nego pobudni fotoni. Energijska razlika (ΔE) predstavlja Ramanov pomak. (Modificirano iz: Milićić V, ed. *Dental composite materials for direct restorations*, uz dopuštenje dr.sc. Mateja Para)



Slika 2. Uzorak kompozita učvršćen na univerzalni nosač u odjeljku za Ramanovu spektrometriju. Crvena boja potječe od laserske zrake koja se koristi za određivanje mjesta na uzorku na kojem će se provesti mjerenje.



Slika 3. Primjer Ramanovih spektara nepolimeriziranog i polimeriziranog materijala. (Slika preuzeta s dopuštanjem autora dr. sc. Matej Par)

verzije kao funkcije položaja unutar samoga uzorka, npr. za proučavanje poprečnog presjeka hibridnog sloja.

Nedostaci Ramanove spektroskopije

Ramanova spektroskopija pokazuje i nekoliko nedostataka. Zbog slabog intenziteta Ramanovog raspršenja, potrebno je dulje vrijeme izlaganja kako bi se prikupio spektar zadovoljavajuće kvalitete. To predstavlja problem jer onemogućava praćenje stupnja konverzije u stvarnome vremenu te dovodi do netočnih mjerenja ako se kalkulacije izvode prije nego je prikupljena dostatna količina spektralnih informacija (12). Stoga, Raman je bolje upotrebljavati u statičnim sustavima koji su osvijetljeni barem 24 h prije samoga mjerenja. Problem predstavlja i povišenje temperature na površini samoga uzorka obasjanog laserskom zrakom budući da time može doći do povećanja mobilnosti zaostanog monomera i slobodnih radikala produžujući polimerizaciju. Problem zagrijavanja

uzoraka istaknut je kod mjerenja bioloških uzoraka (15).


Primjena Ramanove spektrometrije u stomatologiji

U suvremenoj stomatologiji primjena metode Ramanove spektrometrije zastupljena je u velikom broju za određivanje stupnja konverzije monomera u polimer. Energetski spektar emitiranih fotona određen je vibracijskim energetskim stanjem koje je specifično za određenu funkcijsku grupu i kemijsku vezu. Područje na 1640 cm^{-1} dodijeljeno je vibracijama C=C veze te se relativna promjena u intenzitetu prije i nakon polimerizacije koristi u računanju stupnja konverzije. Dobivene vrijednosti stupnja konverzije naknadno se računaju uvrštavanjem vrijednosti integriranih intenziteta u formulu:

$$SK = 1 - R_{\text{polimerizirano}} / R_{\text{nepolimerizirano}} (\%)$$

Gdje je R = (alifatski C=C integrirani intenzitet) / (aromatski C=C integrirani intenzitet)

Osim za određivanje stupnja konverzije, Ramanova spektrometrija može se koristiti i za (16, 17):

- dijagnostiku ranog karijesa
- dijagnosticiranje razvojnih poremećaja cakline i dentina
- identifikaciju oralne mikrobiološke flore
- abnormalnosti vezane uz oralna meka tkiva
- dijagnostička pomoć za procjenu postave zubnog implantata (kakvoća kosti)
- dijagnostika oralnih malignih promjena
- dijagnostika promjena žlijezda slinovnica kod osoba oboljelih od Sjögrenovog sindroma (18)
- izradu regresijskih modela za forenzičko određivanje dobi (19). 

LITERATURA

1. Calheiros FC, Daronch M, Rueggeberg FA, Braga RR. Degree of conversion and mechanical properties of a BisGMA:TEGDMA composite as a function of the applied radiant exposure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84(2):503–9.
2. Krifka S, Seidenader C, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composite in human pulp cells. *Clin Oral Investig.* 2012;16(1):215–24.
3. Tarle Z, Meniga A, Ristic M, Sutalo J, Pichler G, Davidson CL. The effect of the photopolymerization method on the quality of composite resin samples. *J Oral Rehabil.* 1998;25(6):436–42.
4. Knezević A, Tarle Z, Meniga A, Sutalo J, Pichler G, Ristić M. Degree of conversion and temperature rise during polymerization of composite resin samples with blue LEDs. *J Oral Rehabil.* 2001;28(6):586–91.
5. Tarle Z, Meniga A, Knezević A, Sutalo J, Ristić M, Pichler G. Composite conversion and temperature rise using a conventional, plasma arc, and an experimental blue LED curing unit. *J Oral Rehabil.* 2002;29(7):662–7.
6. Al-Ahdal K, Ilie N, Silikas N, Watts DC. Polymerization kinetics and impact of post polymerization on the degree of

conversion of bulk-fill resin composite at clinically relevant depth. *Dent Mater.* 2015;31(10):1207–13.

7. Shin WS, Li XF, Schwartz B, Wunder SL, Baran GR. Determination of the degree of cure of dental resins using Raman and FT-Raman spectroscopy. *Dent Mater.* 1993;9(5):317–24.
8. Mađerić S. FT-IR analiza polimernih materijala : završni rad [Završni rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2016.
9. Chalmers JM, Griffiths PR, editors. *Handbook of vibrational spectroscopy.* Chichester: Wiley; 2001.
10. Ratkaj, Marina. Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari [thesis]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2013.
11. Tarle Z, Par M. Polymerization: Degree of conversion. In: Miletić Vesna, editor. *Dental composite materials for direct restorations. Pt II, Polymerization.* eBook. Cham: Springer; 2018. p. 63–89.
12. Ramanova spektroskopija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020.
13. Tsuda H, Arends J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):539–47.
14. Rolland SL, Walls AW, McCabe JF, German MJ. Use of micro-Raman spectroscopy to

investigate hybrid layer quality in demineralized root dentine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Oct;95(1):62–8.

15. Marigheto NA, Kemsley EK, Potter J, Belton PS, Wilson RH. Effect of sample heating in FT-Raman spectra of biological materials. *Spectrochim Acta - Part A Mol Spectrosc.* 1996;52(12):1571–9.
16. Ramakrishnaiah R, Rehman GU, Basavara-jappa S, Al Khuraif AA, Durgesh BH, Khan AS, et al. Applications of Raman spectroscopy in dentistry: Analysis of tooth structure. *Appl Spectrosc Rev.* 2015;50(4):332–50.
17. Choo-Smith LP, Hewko M, Sowa MG. Emerging Dental Applications of Raman Spectroscopy. In: Matousek P, Morris Meds. *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields.* Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010.
18. Xue L, Sun P, Ou D, Chen P, Chen M, Yan B. Diagnosis of pathological minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome by using Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):723–8.
19. Osmani A, Par M, Škrabić M, Vodanović M, Gamulin O. Principal Component Regression for Forensic Age Determination Using the Raman Spectra of Teeth [published online ahead of print, 2020 Aug 27]. *Appl Spectrosc.* 2020.