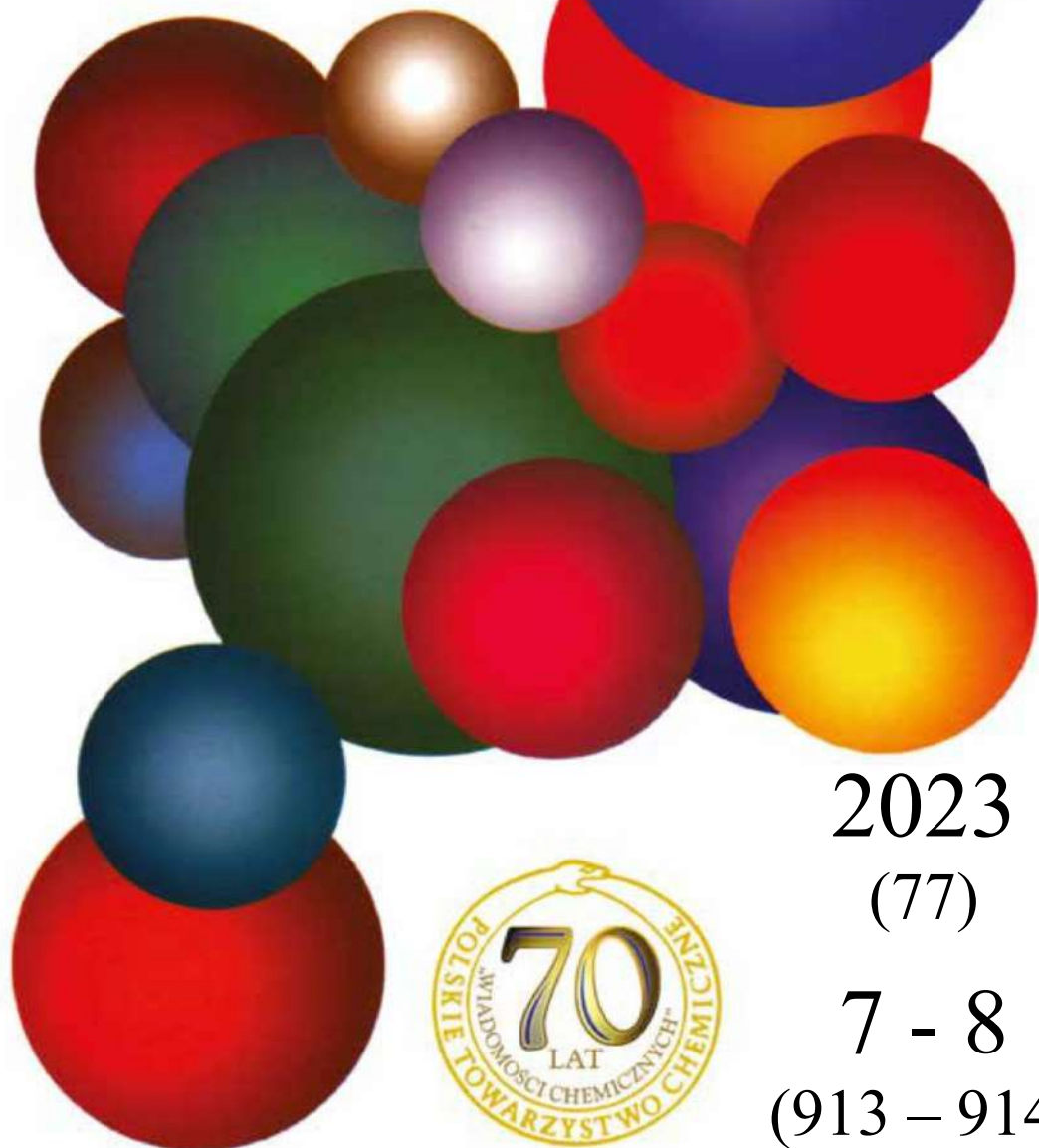


WIADOMOŚCI *chemiczne*



2023

(77)

7 - 8

(913 – 914)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

RADA REDAKCYJNA

IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI, BOGUSŁAW BUSZEWSKI
(PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GÓRECKI, MIETEK JARONIEC,
ANATÓL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JERZY LESZCZYŃSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

MARCIN DRAĞ, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

REDAKTOR NACZELNY

PIOTR J. CHMIELEWSKI

P. O. SEKRETARZA REDAKCJI

DAGMARA JACEWICZ

e-mail: czasopisma@ptchem.pl

BIURO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO (FINANSE)

e-mail: biuro@ptchem.pl

MARTA PAWLAK (KOLPORTAŻ)

e-mail: kolportaz@ptchem.pl

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

e-mail: czasopisma@ptchem.pl

ADRES STRONY INTERNETOWEJ

<https://ptchem.pl/pl/chem-news>

©Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

Warszawa 2019

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Obsługa artykułów:

Joanna Drzeżdżon

Skład i przygotowanie do druku:

Mateusz Drzeżdżon

Druk:

Sowa Sp. z o.o.

ul. Raszyńska 13, 05-500 Piaseczno

Tel.: +48(22) 431 81 40

Fax. +48(22) 431 81 50

e-mail: sowadruk@sowadruk.pl

Zeszyt dedykowany
Profesorowi Jerzemu Piotrowi Hawrankowi

80. ROCZNICA URODZIN PROFESORA JERZEGO PIOTRA HAWRANKA



Profesor Jerzy P. Hawranek nierozłącznie związany z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Człowiek wielkiej wiedzy, który łącząc pasję naukową z talentem organizacyjnym, zdolnościami dydaktycznymi, jednocześnie jest Osobą niezwyklej skromności. Dla wielu z nas - Jego uczniów, przyjaciół, znajomych jest naukowcem o ustalonej renomie na forum krajowym i międzynarodowym. Prace naukowe, monografie, które stworzył są wypełnione twórczym zapałem i wyężoną pracą. Nie sposób jest napisać na kilku stronach, tekstu sławiącego uczonego, Jego zasługi, osiągnięcia i dokonania.

Jubileusz 80-lecia kojarzy się z upływem czasu, który dla wybrańców bywa łaskawy. Tak jest w przypadku Jubilata, który obchodził we wrześniu 2022 roku swój jubileusz, dla którego czas wyraźnie zwolnił. Jako dowód niech posłuży pamięć Jego uczniów, znajomych i przyjaciół. Chociaż jubileusz, którego jesteśmy świadkami, kojarzy się z czasem, to jednocześnie zdajemy sobie sprawę, że nie tylko rocznica urodzin Jubilata zdecydowała o tym, że pisany jest tekst na tę okoliczność, ale niewątpliwie o jubileuszu zdecydował autorytet oraz liczne zasługi profesora Hawranka.

Profesor Jerzy P. Hawranek urodził się 1 września 1942 roku w Mikołowicach (dawna Czechosłowacja). W 1945 wraz z rodziną przeniósł się do miejscowości Tłustomosty w województwie opolskim. Po ukończeniu szkoły podstawowej w 1955 roku, dalszą naukę kontynuował w Liceum Ogólnokształcącym w Raciborzu, które ukończył w 1959 roku. W tym samym roku rozpoczął studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Uwieńczeniem studiów była praca magisterska pt. „Elektroda chinhydronowa w stopionych solach organicznych”, napisana pod kierunkiem prof. Adolfa Kiszy, obroniona w 1964 roku. Przedmiotem pracy były poszukiwania wygodnej w stosowaniu elektrody odwracalnej, względem jonów wodorowych, w stopionych solach organicznych. W latach 1968/69 ukończył Studium Podyplomowe Metod Numerycznych prowadzone przez Instytut Matematyki UW. Jubilat całą swoją karierę naukową związał z Uniwersytetem Wrocławskim, na którym przepracował ponad 50 lat. Pracę naukową i dydaktyczną rozpoczął w roku 1964 w Zakładzie Chemii Fizycznej, na stanowisku asystenta. W 1969 był już starszym asystentem, a w 1970 roku – adiunktem. W tym czasie Zakładem Chemii Fizycznej kierował wybitny naukowiec prof. dr hab. Lucjan Sobczyk. Badania naukowe w Zakładzie prowadzone były w czterech dziedzinach: wiązanie wodorowe – teoria i fizyczne właściwości, fizykochemia stopionych soli, spektroskopia molekularna, technika mikrofalowa i fizyka dielektryków. Zakład tworzyła grupa młodych i aktywnych pracowników, wśród których znajdował się Jubilat. Do ważnych osiągnięć naukowych zespołu w tym czasie, zaliczano odkrycie zjawiska przeskoków protonu w wiązaniach wodorowych, wyhodowanie nowej klasy ferroelektryków, opracowanie przez Jerzego P. Hawranka szeregu programów komputerowych umożliwiających pełną ilościową analizę widm. Już wtedy Jubilat był obiecującym młodym pracownikiem naukowym, wykazującym duże zdolności eksperymentalne i teoretyczne. Dowodem na to, była opublikowana pod redakcją Lucjana Sobczyka, wydana w 1969 roku monografia „Wiązanie wodorowe”, w której znalazł się artykuł przeglądowy autorstwa Jerzego P. Hawranka, Lucjana Sobczyka „Wiązanie wodorowe w kwasach nukleinowych a mutacje genetyczne.” W 1970 roku prof. Jerzy P. Hawranek obronił pracę doktorską zatytułowaną „*Polarność i natężenie pasm absorpcyjnych w podczerwieni wiązań wodorowych*”. Rozprawa doktorska uzyskała bardzo wysoką ocenę, co zaowocowało przyznaniem w 1971 roku Indywidualnej Nagrody Ministra III stopnia. Ważną rolę w rozwoju kariery naukowej Jubilata odegrały staże w wiodących ośrodkach naukowych. W latach 1971-1972 odbył staż naukowy w Solid State Spectroscopy Laboratory Dep. of Physics, Northeastern University, Boston, USA, następnie od 1972-1974 przebywał w Division of Chemistry, National Research Council of Canada, Ottawa, Kanada. Wyniki otrzymane w czasie

tych pobytów stały się podstawą rozprawy habilitacyjnej, zatytułowanej: „*Wyznaczenie zespolonego współczynnika załamania w funkcji częstości oraz natężeń absolutnych pasm absorpcyjnych w podczerwieni*” (1976 rok). Rozprawa habilitacyjna została również wyróżniona Nagrodą Ministra. Wkrótce, awansował na stanowisko docenta, tytuł profesora nauk chemicznych otrzymał w 1991 roku. Od 1999 r. jest profesorem zwyczajnym (obecnie na emeryturze) na Wydziale Chemii UW.

Profesor Jerzy P. Hawranek w czasie swojej długoletniej pracy najpierw w Instytucie Chemii, potem na Wydziale Chemii UW, i na Uniwersytecie Wrocławskim pełnił wiele ważnych i znaczących funkcji. O Jego pozycji naukowej może świadczyć wybór na Dziekana Wydziału Chemii UW w latach 1999-2005. Pełnił również funkcję zastępcy Dyrektora Instytutu Chemii ds. naukowych w kadencjach 1979-1981, 1982-1984, 1984-1987, kierownika Studium Doktoranckiego przy Instytucie Chemii 1983-1986, członka Senackiej Komisji ds. Rozwoju Kadry naukowej i zatrudnienia 1984-1987, przewodniczącego Kolegium Wydawniczego IChUWr 1984-1996, członka Rektorskiej Komisji ds. Komputeryzacji Uczelni 1987-1996, od 1995 pełnomocnika Dziekana Wydziału Chemii ds. Studium Doktoranckiego i Komputeryzacji, vice-przewodniczącego Rady Naukowej Międzywydziałowego Laboratorium Sieci Komputerowych i Oprogramowania w kadencji 1996-1999, członka Senackiej Komisji ds. Nauki w latach 1990-1993 oraz wiele innych. Profesor Hawranek brał czynny udział przy organizacji nauki. Był członkiem Komitetu Spektroskopii PAN, sekretarzem Naukowym Komitetu Spektroskopii PAN w latach (1978-81), sekretarzem Naukowym III International Symposium on Specific Interactions between Molecules or Ions, w Karpaczu, członkiem Komitetu Organizacyjnego XIII European Congress on Molecular Spectroscopy we Wrocławiu, członkiem Komitetu Organizacyjnego I Ogólnopolskiej Konferencji „Mini – Mikrokomputery w Chemii we Wrocławiu w roku 1986 i 1988, vice-przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego VIII International Workshop „Horizons in H-Bond Research” w Polanicy Zdroju.

Działalność naukowa prof. Jerzego P. Hawranka obejmowała fizykochemię układów skondensowanych, skoncentrowanych głównie na analizie kształtu pasm oscylacyjnych molekularnych cieczy i roztworów ze słabym wiązaniem wodorowym. W pierwszym etapie działalności naukowej prowadził badania pod kierunkiem prof. A. Kiszy, w zakresie elektrochemii stopionych soli, później pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka, nad własnościami dielektrycznymi i spektroskopowymi słabych wiązań wodorowych. Zainicjował i rozwinął badania w zakresie spektroskopii i fizykochemii cieczy molekularnych w trzech nurtach tematycznych:

- relaksacja oscylacyjna i reorientacyjna w czystych cieczach
- relaksacja oscylacyjna w układach z wiązaniem wodorowym
- dyspersja w podczerwieni czystych cieczy i układów z wiązaniem wodorowym.

Główne osiągnięcia naukowe uzyskane w wyniku tych badań to: wyznaczenie po raz pierwszy wysokoczęstościowych własności dielektrycznych, w szczególności polaryzowalności wibracyjnej, szeregu czystych cieczy i układów z wiązaniem wodorowym, wykrycie nowych cech spektralnych, towarzyszących powstawaniu wiązania wodorowego, wykazanie, że prędkość modulacji maleje ze wzrostem siły tego wiązania. Do osiągnięć należało również zbadanie procesów relaksacyjnych, w serii po-

nad 30 kompleksów z międzycząsteczkowym wiązaniem wodorowym. Jubilat rozwiązał także szereg zagadnień związanych z komputeryzacją metod spektroskopowych. Opracował oryginalną metodę wyznaczania widm zespolonego współczynnika załamania dla układów izotropowych, system kompleksowej analizy kształtu pasm i wyznaczania parametrów relaksacyjnych, nową metodę wyznaczania parametrów modulacji. Zaproponował również dwie nowe metody wyznaczania polaryzowalności wibracyjnej cząsteczek i układów z wiązaniem wodorowym w fazie ciekłej. Zajmował się zagadnieniami numerycznymi spektroskopii cienkowarstwowej m. in. wyznaczaniem parametrów geometrycznych cienkich warstw na drodze optymalizacji ich widma interferencyjnego. Profesor Henryk Ratajczak w swojej opinii napisał wtedy : „*Doc. dr hab. Jerzy P. Hawranek posiada poważny dorobek naukowy, jest twórcą dobrze pracującego zespołu naukowego w zakresie spektroskopii oscylacyjnej cieczy, posiada wyróżniające się osiągnięcia w pracy dydaktycznej, wychowawczej, organizacyjnej. Zespół kierowany przez prof. Jerzego P. Hawranka uzyskał wiele znaczących wyników, dzięki temu należał on do czołowych zespołów badawczych w skali światowej, w zakresie pomiaru i analizy kształtu pasm widm oscylacyjnych cieczy i roztworów*”. Prowadzone przez Profesora Jerzego P. Hawranka dalsze badania dotyczyły ważnych i trudnych zagadnień dynamicznych oddziaływań wewnątrz- międzycząsteczkowych, których elementami były czasy korelacji rotacyjnej oraz relaksacja oscylacyjna. Te ostatnie zagadnienia były wizytówką naukową Profesora, a także obszarem szeroko zakrojonych badań prowadzonych tak w kraju jak i za granicą. Osiągnięcia Jubilata czyniły Go liderem w Polsce i znaczącą postacią w światowym życiu naukowym. Powiązał On badania relaksacyjne z problematyką wiązań wodorowych, które były domeną ośrodka wrocławskiego. Opublikował przeszło 100 prac naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej poświęconych chemii i spektroskopii. Wygłosił kilkadziesiąt referatów i doniesień naukowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach i zjazdach, w tym kilka na zaproszenie organizatorów. Był opiekunem 35 prac magisterskich i promotorem 14 doktoratów, z których czworo posiada już tytuły naukowe profesora (Bogusława Czarnik-Mausewicz[†], Małgorzata Broda, Mirosław Czarnecki, Roman Szostak). Pełnił rolę recenzenta w wielu przewodach habilitacyjnych i wnioskach o tytuł naukowy profesora. Był organizatorem i współorganizatorem konferencji naukowych, w których uczestniczyli wybitni spektroskopisci, tak chemicy jak i fizycy z całego świata. Działalność ta, jak i liczne powołania do Komitetów Redakcyjnych czasopism polskich i zagranicznych, była wyznacznikiem Jego naukowej pozycji w kraju i na świecie. Do przytoczonej opinii zamieszczonej powyżej można dołączyć jeszcze jedną opinię o działalności naukowej prof. Jerzego P. Hawranka napisaną przez prof. Jerzego Konarskiego, wybitnego specjalistę chemii i spektroskopii teoretycznej „*prof. Jerzy H. Hawranek jest szeroko znany w środowisku spektroskopistów w Polsce i za granicą. Dorobek naukowy Jerzego P. Hawranka to duża ilość różnych, ważnych, tak teoretycznie jak i praktycznie podejmowanych zagadnień, głęboka znajomość dyskutowanych problemów*”.

Profesor Jerzy P. Hawranek przez wiele lat (1992- 2013 r.) był kierownikiem Zespołu spektroskopii cieczy molekularnych. Wraz ze swoim zespołem rozwijał bada-

nia dyspersji w podczerwieni czystych cieczy i układów z wiązaniem wodorowym w fazie ciekłej, metodami spektroskopii cienkowarstwowej. Prowadził badania biomolekuł i oddziaływań w układach z wiązaniem wodorowym w fazie ciekłej metodami spektroskopii NIR, MIR FIR i ramanowskiej. Kolejnym tematem badawczym było zastosowanie metod chemometrycznych w spektroskopii oraz ilościowa analiza leków przy użyciu spektroskopii ramanowskiej i technik refleksyjnych w zakresie IR i NIR. Pracownicy Zakładu wraz z Profesorem zajmowali się również numerycznymi zagadnieniami spektroskopii takimi jak, dwuwymiarowa analiza korelacyjna, czy numeryczny opis kształtu pasm. W 1999 roku została opublikowana monografia pod redakcją Jerzego P. Hawranka i Lucjan Sobczyka zatytułowana „*Zjawiska relaksacji molekularnej*”, poświęcona zagadnieniom relaksacji w spektroskopii rezonansowej, w szczególności jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) i kwadrupolowego rezonansu jądrowego (NQR), także wybranym zagadnieniom relaksacji wzbudzeń optycznych w różnych obszarach spektralnych.

Profesor Jerzy P. Hawranek był i nadal pozostaje powszechnie znanym i uznawanym autorytetem naukowym, zaangażowanym organizatorem działalności naukowej, a także znakomitym wykładowcą i wychowawcą wielu pokoleń chemików. Wiele wysiłku włożył w pracę na rzecz organizacji dydaktyki. Zorganizował oraz zmodernizował trzy Mikrokomputerowe Pracownie Dydaktyczne. Opracował program nauczania i utworzył od podstaw pracownię Spektralnych Metod Analizy dla kierunku Chemia Środowiska. We wczesnych etapach pracy prowadził ćwiczenia rachunkowe i laboratoryjne z chemii fizycznej. Od 1974 – 1983 nieprzerwanie wykładał na kierunku Chemia. Prowadził również wykłady ze spektroskopii i fotochemii dla Chemii Zaocznej, z zastosowań ETO w chemii, z metod numerycznych w chemii fizycznej, od 1986 z metod numerycznych w spektroskopii molekularnej, z informatyki chemicznej, z metod numerycznych dla Chemii Środowiska. Prowadził sześciu studentów w/g indywidualnego toku studiów.

Profesor J. P. Hawranek przeszedł przez wszystkie szczeble działalności dydaktycznej. Najważniejszym osiągnięciem dydaktycznym było zainicjowanie i rozwijanie kształcenia w zakresie zastosowań elektronicznych technik obliczeniowych zarówno na poziomie podstawowym jak i zaawansowanym. Kierował zespołem dydaktycznym powołanym do nauczania przedmiotu kursowego „Zastosowanie ETO w chemii”. W 1987 roku zespół dydaktyczny został przekształcony w Zakład Dydaktyczny ETO, którym kierował przez wiele lat. W swej pracy dydaktycznej zwracał szczególną uwagę na nauczanie informatyki oraz modułów związanych z informatyką takich jak Sieci Komputerowe, Bazy Danych, Matlab, Interfejsy, Sterowanie Komputerowe, Architektura Komputerów oraz Systemy Operacyjne. Był znakomitym wykładowcą, bardzo cenionym przez studentów. Swoim entuzjazmem potrafił zarażać młodych słuchaczy. Dowodem na to *było czterokrotne zdobycie pierwszego miejsca, w plebiscytach studenckich na Najlepszego Wykładowcę*. Wraz z prof. Henrykiem Ratajczakiem aktywnie uczestniczył w przygotowaniu projektu międzynarodowych studiów magisterskich, które realizowane były na Wydziale Chemii UW w ramach programu Erasmus-Mundus.

Profesor Jerzy P. Hawranek był członkiem Advisory Editorial Board *Spectrochimica Acta A* (od 1997 r.), członkiem European Academy of Science Arts and Humanities (od 2001 r.), członkiem Komisji IUPAC 15 – Molecular Structure and Spectroscopy (1998-2001). W 1985 został członkiem Komitetu Redakcyjnego czasopisma *Wiadomości Chemiczne*. Redaktorem naczelnym był wtedy prof. Ignacy Z. Siemion, który od razu wprowadził zmiany w składzie Komitetu Redakcyjnego, prof. Bogdan Burczyk został redaktorem tematyki technologicznej, prof. Jerzy P. Hawranek - redaktorem tematyki spektroskopowej. Nowa redakcja nie chciała tracić niczego z pozytywnego dorobku poprzedniej redakcji. Redaktorzy współpracujący z nią, w szczególności nasz Jubilat chcieli aby publikowane materiały w większym stopniu odnosiły się do aktualnych trendów chemii światowej, by informowały o najwybitniejszych odkryciach chemicznych, by uwzględniały dorobek polskich badań chemicznych. Nasz Jubilat wraz z prof. Ignacym Z. Siemionem planował wprowadzenie na łamy czasopisma przeglądowych artykułów zespołów badawczych, chciał, aby czasopismo zawierało również doniesienia o ciekawych wynikach uzyskiwanych w laboratoriach. Marzeniem Profesora było, aby czasopismo *Wiadomości Chemiczne* było nie tylko czytane przez znaczące ośrodki akademickie, ale także przez chemików pracujących w miejscowościach odległych od ośrodków uniwersyteckich, także przez studentów. W tamtym czasie nową inicjatywą redaktorów, w tym prof. Hawranka było utworzenie serii pod nazwą „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz zeszytów tematycznych związanych z jubileuszami wybitnych placówek naukowych i z relacjami z ważnych międzynarodowych konferencji naukowych. Redaktorami zeszytów tematycznych byli: prof. Ignacy Z. Siemion, prof. Lucjan Sobczyk, prof. Bogdan Burczyk. Nasz Jubilat redagował „Spektroskopię NMR”. Dbał o wysoki poziom czasopisma. Przykładał ogromną wagę, aby *Wiadomości Chemiczne* integrowały polskie środowisko chemiczne, aby docierały do pracowników nauki w szkołach wyższych, instytucjach badawczych, do doktorantów, studentów, aby było cytowane w Chemical Abstracts. Jako osoba współpracująca od 35 lat z redakcją *Wiadomości Chemicznych*, mogę dodać, że Zebrania Komitetu Redakcyjnego odbywały się w niezwykle miłej atmosferze, z doskonale przygotowanymi tematami do omówienia. Z okazji pewnych jubileuszy były nawet kwiaty, filiżanka kawy i ciasto domowej roboty. Serdeczna atmosfera zawsze sprzyjała twórczej pracy.

Wszechstronna działalność prof. Hawranka była zauważana i honorowana wieloma wyróżnieniami. Społeczność Wydziału Chemii bardzo wysoko ceniła Profesora Hawranka, Jego zaangażowanie i oddanie sprawom Wydziału, Jego precyzyjny i przemyślany sposób działania, konsekwentne poszukiwanie najlepszych kompromisowych rozwiązań. Profesor zawsze popierał i wspomagał inicjatywy na rzecz modernizacji aparaturowych na Wydziale, kluczowych dla utrzymania wysokiego poziomu nauczania, przyczynił się także do wzrostu liczby doktorantów, co bardzo istotnie wpłynęło na wzbogacenie osiągnięć naukowych i utrzymana przez Wydział wysokiej pozycji w rankingach krajowych i międzynarodowych. Za zasługi na polu nauki jak i dydaktyki uzyskał wiele odznaczeń i wyróżnień. Został odznaczony Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski, Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Złotym Krzyżem Zasługi. Otrzymał wiele nagród Ministra i nagród Polskiej Akademii Nauk.

I CZAS NA KILKA SŁÓW OD SIEBIE...

W gronie najbliższych współpracowników, również osób pracujących w Bibliotece Wydziału Chemii UW, prof. Jerzy P. Hawranek, który był przez wiele lat opiekunem naukowym, zaskarbił sobie nie tylko szacunek i poważanie, ale także ogromną sympatię. Mimo wielu obowiązków był otwarty na różnorodne oczekiwania swoich współpracowników i podwładnych. Wspierał ich działania i samodzielne inicjatywy naukowe, dydaktyczne i często nakłaniał do podnoszenia kwalifikacji. W ramach podnoszenia kwalifikacji, były Dziekan Wydziału Chemii prof. Jerzy P. Hawranek przyszedł z pomocą i przyczynił się do powstania dużej serii : „*Z Problemów Bibliotek Naukowych Wrocławia*”, T. 1, *Chemia*, do której wstęp napisał prof. Ignacy Z. Siemion. Również należy dodać, że Profesor jako znawca tematów i różnych dziedzin chemii, wiele swojego cennego czasu poświęcił pracom przy tworzeniu haseł przedmiotowych do nowego katalogu rzeczowego w bibliotece Wydziału. Kolejnym przejawem troski o los swoich współpracowników była pomoc dzieciom naszych pracowników, jak i pracowników z innych wydziałów oraz INTiBS PAN we Wrocławiu. Profesor Jerzy P. Hawranek wyraził zgodę na przedmaturalne, dodatkowe lekcje z matematyki prowadzone na naszym wydziale, wspierał również wiele ważnych dla nas, innych inicjatyw. Wielu naukowców dużo zawdzięcza Profesorowi. Dzięki Jego wsparciu i współpracy uzyskali doktoraty, zdobyli znaczący dorobek naukowy, nagrody ministra, otrzymali etaty na naszej Alma Mater. Naukowcy, są ogromnie wdzięczni za bezinteresowną pomoc, ogromne wsparcie i setki mądrych rozmów, nie tylko o badaniach naukowych, ale też o życiu, przyszłości, książkach i milionie innych spraw. Za wszystkie te działania oraz okazaną pomoc

Serdecznie Dziękujemy.

Szanowny Panie Profesorze, Drogi Jubilacie !

Największą satysfakcją każdego człowieka jest świadomość, że to, co zostało za nim, co było częścią jego twórczego życia, pozostaje w bardzo dobrym stanie, a ludzie, z którymi Profesor współpracował, pamiętają Go i darzą wielkim szacunkiem. Mielśmy wszyscy zaszczyt współpracować z Człowiekiem dużego formatu.

Życzę Panu Profesorowi dużo zdrowia, radości, szczęścia. Niech ogromne osiągnięcia naukowe i organizacyjne będą dla Profesora źródłem satysfakcji z dobrze przeżytych 80 lat.

*Z wyrazami szacunku i poważania
Kazimiera Lukjan
(Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego)*

MODELOWANIE WŁAŚCIWOŚCI WIĄZAŃ WODOROWYCH NA PRZYKŁADZIE KOMPLEKSÓW UKŁAD AMIDOWY - WODA

MODELING THE PROPERTIES OF HYDROGEN
BONDS. AN EXAMPLE OF AMIDE-WATER COMPLEX

**Kacper Rzepiela¹, Aneta Buczek¹, Teobald Kupka¹,
Tapas Kar², Małgorzata A. Broda¹ ***

¹*Uniwersytet Opolski, Wydział Chemii, ul. Oleska 48, 45-052 Opole,*

²*Utah State University, Logan, United States*

**email: broda@uni.opole.pl*

Praca dedykowana

Panu Profesorowi Jerzemu Piotrowi Hawrankowi

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Kompleksy N-metyloacetamidu z cząsteczką wody

2. Kompleksy uracylu – woda

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Kacper Rzepiela jest absolwentem studiów magisterskich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W 2021 obronił pracę magisterską pt. „Modelowanie oddziaływań uracylu i fluorouracylu z cząsteczkami wody”. Obecnie jest doktorantem Szkoły Doktorskiej UO. Zajmuje się badaniem właściwości leków i ich niekowalencyjnych oddziaływań z wybranymi nośnikami molekularnym i nanostrukturalnymi.



Dr Aneta Buczek studiowała chemię w latach 2003 – 2008 na Uniwersytecie Opolskim, (Wydział Chemii, kierunek Chemia Podstawowa i Stosowana). W 2008 uzyskała tytuł magistra chemii (promotor: dr hab. Małgorzata Broda, prof. UO). W latach 2008 – 2014 - doktorantka Środowiskowego Studium Doktoranckiego Uniwersytetu Opolskiego i Politechniki Wrocławskiej. W 2014 uzyskała tytuł doktora nauk chemicznych. Obecnie zatrudniona na stanowisku adiunkta w Instytucie Chemii UO w Katedrze Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego. Działalność naukowa: badania właściwości konformacyjnych pochodnych α,β -dehydrofenyloalaniny, badanie siły wiązań tworzonych przez modelowe dehydropeptydy, wyznaczenie częstości anharmonicznych małych molekuł.



Prof. dr hab. Teobald Kupka Tytuł magistra chemii uzyskał w roku 1978 w Instytucie Chemii Wydziału Matematyki-Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Od 1980 roku pracował w zespole profesora Jana O. Dziegielewskiego w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Radiacyjnej zajmując się głównie zastosowaniem spektroskopii NMR w badaniach związków organicznych i kompleksów metali przejściowych. Na podstawie wyników tych badań uzyskał w roku 1992 tytuł doktora nauk chemicznych. Pracował w zespołach dr Mika Pintara i Harta Peemoeller'a w Ontario, Kanada, w Argonne National Laboratory, Chicago (zespoły dr Bob Botto, Branko Ruscic i Larry Curtiss) oraz w Academia Sinica (Tajpei, Tajwan). W roku 2011 uzyskał stopień doktora habilitowanego na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Wrocławskiego a w roku 2020 tytuł profesora nauk ścisłych i przyrodniczych (Instytut Chemii, UO Opole). Zainteresowania naukowe koncentrują się obecnie na badaniach eksperymentalnych z zastosowaniem technik NMR, IR i Ramana oraz modelowaniu molekularnym układów biologicznie ważnych i nanomateriałów.



<https://orcid.org/0000-0002-6252-3822>



Dr Tapas Kar uzyskał tytuł mgr inż w roku 1983 i stopień doktora w 1988 w Burdwan University, Indian Institute of Technology (Indie) pod kierunkiem prof. AB Sannigrahi. Od 1990 r. pracował w renomowanych ośrodkach naukowych w Europie Zachodniej, Brazylii i USA. Ponadto, w latach 1991-1993 przebywał na prestiżowym stypendium naukowym w Niemczech (Alexander von Humboldt Fellowship). Ostatnio pracował w zespole prof. Steve Scheiner w Utah State University w Logan (USA). Współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi, w tym z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Opolskiego.



<http://orcid.org/0000-0001-8493-4254>



Prof. dr hab. Małgorzata A. Broda

Studia magisterskie w latach 1977-1982 w Instytucie Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Od 1982 asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Wrocławskiego w zespole prof. J. P. Hawranka. Praca doktorska pt: „Relaksacja oscylacyjna w halogenofenolach” przygotowana pod kierunkiem prof. J. P. Hawranka. Habilitacja w 2009 r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tytuł rozprawy habilitacyjnej: „Stereoelektronowe właściwości pochodnych α,β -dehydroaminokwasów”. Od 1993 roku adiunkt w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Opolskiego. Od 2011 – kierownik Zakładu Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego. W roku 2020 – tytuł profesora nauk chemicznych. Zainteresowania naukowe: Spektroskopia oscylacyjna układów z wiązaniem wodorowym; badanie relaksacji oscylacyjnej na podstawie analizy kształtu pasm; właściwości modelowych peptydów i α,β -dehydropeptydów; modelowanie molekularne właściwości strukturalnych i spektroskopowych związków o znaczeniu biologicznym.



<http://orcid.org/0000-0002-4092-3593>

ABSTRACT

The energy and structure of intermolecular hydrogen bonds between water molecule and *N*-methylamide (NMA) or uracil (U) are discussed on the basis of DFT calculations. Theoretical methods are applied to calculate properties of *cis*- and *trans*-NMA complexes with one water molecule. Subsequently, H-bonds in six uracil – water complexes are analyzed. The influence of dispersion interactions and the polar environment on the hydrogen bond energy was analyzed. Results obtained by B3LYP functional with and without Grimme D3 dispersion correction indicate that dispersion interaction plays a significant role in an association process. In addition, the polar solvent reduces the hydrogen bond energy and this reduction is directly proportional to the hydrogen bond energy.

Keywords: hydrogen bond, binding energy, Grimme D3 dispersion correction, uracil, amide bond

Słowa kluczowe: wiązanie wodorowe, energia oddziaływania, poprawka dyspersyjna Grimme'a, uracyl, wiązanie amidowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

B3LYP - hybrydowy funkcjonal gęstości (ang. Becke three parameter, Lee, Young i Parr)

DFT - teoria funkcjonału gęstości (ang. density functional theory)

NMA - *N*-metyloacetamid (ang. *N*-methylacetamide)

D3 - empiryczna poprawka Grimme'a na energię dyspersyjną

PCM - model rozpuszczalnika ciągłego (ang. polarized continuum model)

WCSS - Wrocławskie Centrum Sieciowo-Superkomputerowe

a.u. - jednostki atomowe (ang. atomic unit)

WPROWADZENIE

Wiązanie wodorowe odgrywa bardzo istotną rolę pośród oddziaływań stabilizujących układy molekularne i jest obiektem badań prowadzonych w wielu obszarach chemii, na przykład z zakresu nanotechnologii [1,2], projektowania leków [3,4] czy poszukiwania nowych materiałów [5-7]. Wiązanie wodorowe jest wyjątkowym, niekowalencyjnym oddziaływaniem występującym w wielu cząsteczkach organicznych. Najbardziej znanym i przytaczanym przykładem jest cząsteczka DNA będąca głównym nośnikiem informacji genetycznej. Rdzeń helisy DNA utrzymywany jest poprzez komplementarne pary zasad azotowych połączonych ze sobą za pomocą dwóch lub trzech wiązań wodorowych. Tworzenie podobnych oddziaływań w peptydach i białkach prowadzi do powstania fragmentów o regularnej strukturze, które określa się jako elementy struktury drugorzędowej. Są one o tyle ważne, że stają się rusztowaniem, wokół którego powstaje ostateczna struktura trójwymiarowa białka – struktura trzeciorzędowa, decydująca o jego funkcji. Ponadto wiązania wodorowe są niezbędne do tworzenia oddziaływań pomiędzy receptorami a ligandami, co ma ogromne znaczenie w działaniu leków.

Badanie właściwości wiązania wodorowego ma ponad 100 – letnią historię. Pierwsze wzmianki o tego typu oddziaływaniach pojawiły się w 1902 r. [8]. Natomiast Pauling w 1939 roku zauważył, że „w pewnych warunkach atom wodoru przyciągany jest przez dwa atomy zamiast jednego, co może świadczyć o rodzaju pewnej więzi pomiędzy nimi” [9]. Złożona natura tego oddziaływania spowodowała, że na przestrzeni wielu lat definicja wiązania wodorowego ewoluowała i nawet obecnie jest tematem wielu dyskusji [10-13]. Niemniej jednak najnowsza z nich wypracowana została przez IUPAC [14]. Wg niej wiązanie takie tworzy się zawsze pomiędzy atomem wodoru związanym kowalencyjnie z atomem lub jonem o większej od niego elektroujemności (X) a wolną parą elektronową drugiego atomu (Y) występującego w tej samej lub innej cząsteczce. Wiązanie to zaznacza się linią przerywaną $X-H\cdots Y-Z$. Pomiędzy atomami H i Y występuje głównie oddziaływanie elektrostatyczne. Ponadto dochodzi do przeniesienia ładunku z akceptora na atom wodoru i związane z nim atomy oraz do polaryzacji chmury elektronowej zarówno akceptora jak i donora wiązania wodorowego [15]. Energia wiązań wodorowych mieści się w granicach od ok. 1 do 40 kcal/mol [16]. Pod tym kątem można je sklasyfikować jako wiązania silne, umiarkowane i słabe.

Prace eksperymentalne dotyczące właściwości i różnorodnych skutków występowania wiązania wodorowego są wspomagane metodami modelowania molekularnego. Aby stwierdzić obecność wiązania wodorowego w układzie należy określić kryteria, na podstawie których można to stwierdzić w strukturach krystalicznych czy otrzymanych za pomocą modelowania molekularnego [17-22]. W większości prac dotyczących tego zagadnienia przyjmuje się że odległość pomiędzy atomami $H\cdots A$ powinna być krótsza niż suma promieni van der Waalsa akceptora i wodoru. Geometrię wiązań wodorowych określa się podając odległość pomiędzy atomami $H\cdots Y$ i $X\cdots Y$ oraz wartość kąta walencyjnego utworzonego przez atomy $X-H\cdots Y$. Wiązanie wodorowe tworzy się, gdy

odległość pomiędzy atomami $H\cdots Y$ jest mniejsza od 3,0 Å (w przypadku słabych oddziaływań granicę można przesunąć do 3,2 Å a kąt zawarty pomiędzy atomami $X-H\cdots Y$ powinien być większy od 90° [16, 18].

Celem prezentowanej pracy jest przybliżenie czytelnikowi problemów związanych z wiarygodnym przewidywaniem energii wiązania wodorowego i właściwości strukturalnych kompleksów z jedną cząsteczką wody wybranych związków o znaczeniu biologicznym - *N*-metyloacetamidu i uracylu. Obliczenia przeprowadzono przy zastosowaniu teorii funkcjonału gęstości (DFT) [23, 24]. Wpływ rozpuszczalnika modelowano przy pomocy teorii rozpuszczalnika ciągłego (PCM) [25, 26].

1. KOMPLEKSY *N*-METYLOACETAMIDU Z CZĄSTECZKĄ WODY

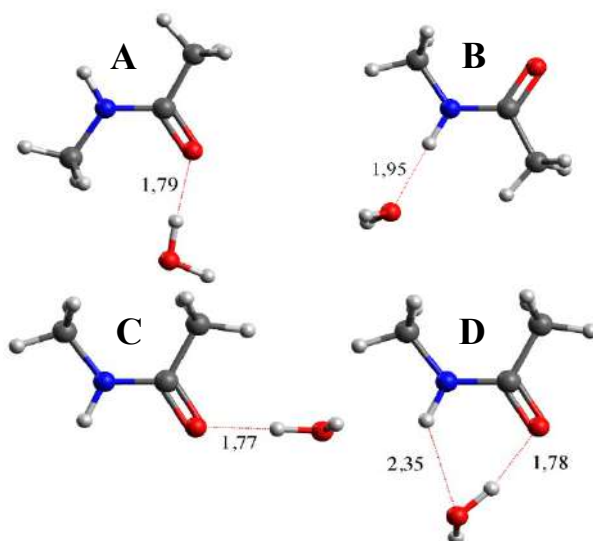
Wszystkie obliczenia, których wyniki będą prezentowane w tej pracy wykonano przy pomocy programu Gaussian 16 [27]. Użyty został funkcjonał hybrydowy B3LYP [28] i baza funkcyjna Dunninga aug-cc-pVTZ [29]. Funkcjonał B3LYP jest jednym z najczęściej stosowanych do modelowania właściwości związków organicznych ale ma poważny mankament - nie uwzględnia oddziaływań dyspersyjnych. Z tego powodu, aby sprawdzić jaki jest wpływ tych oddziaływań na energię i strukturę geometryczną wiązań wodorowych tworzonych przez układy amidowe, zastosowaliśmy empiryczną poprawkę Grimme'a uwzględniającą dyspersję [30]. Wpływ rozpuszczalnika wzięty został pod uwagę przez zastosowanie modelu ciągłego dielektryka (PCM) [25]. Każda zoptymalizowana struktura została zweryfikowana jako minimum energetyczne poprzez obliczenie częstości drgań harmonicznym i sprawdzenie, że wszystkie one są rzeczywiste. Energia międzycząsteczkowego oddziaływania (E_{int}) w badanych kompleksach została obliczona jako różnica pomiędzy energią kompleksu i sumą energii monomerów. W fazie gazowej została ona dodatkowo skorygowana metodą CP (ang. counterpoise correction) ze względu na błąd superpozycji bazy (BSSE) [31].

Pierwszym analizowanym układem był kompleks NMA – woda. *N*-Metyloacetamid może występować w dwóch konfiguracjach – *cis* i *trans*. Obliczono kompleksy dla obu tych izomerów, bo chociaż *cis*-NMA jest, zgodnie z wynikami obliczeń DFT [32], o około 3 kcal/mol mniej trwałe niż *trans*-NMA to w polarnym otoczeniu różnica energii między nimi zmniejsza się do ~1,5 kcal/mol. Ponadto, w kolejnym etapie analizowane będą wiązania wodorowe tworzone przez uracyl, którego fragmenty strukturalne są podobne do *cis*-NMA.

Układ amidowy ma dwa ugrupowania zdolne do tworzenia wiązań wodorowych o średniej energii – grupę karbonylową C=O i grupę N-H. Zoptymalizowano dwa kompleksy *trans*-NMA stabilizowane wiązaniami wodorowymi C=O \cdots H-O_w i N-H \cdots O_w, odpowiednio *trans*-NMA-H₂O (A) i *trans*-NMA-H₂O (B). Istnieje jeszcze jeden kompleks stabilizowany wiązaniem C=O \cdots H-O_w, który różni się od struktury

(A) ułożeniem cząsteczki wody [33] co jedynie w nieznacznym stopniu wpływa na energię i parametry geometryczne oddziaływania. Dla izomeru *cis*-NMA również otrzymano dwa kompleksy, z których jeden jest stabilizowany przez wiązanie wodorowe $C=O \cdots H-O_w$ (*cis*-NMA-H₂O (C)), a w drugim cząsteczka wody tworzy oddziaływanie zarówno z grupą C=O jak i N-H (*cis*-NMA-H₂O (D)). Pomimo wielokrotnych prób optymalizacji struktury kompleksu *cis*-NMA z wodą, w której występowałyby wyłącznie wiązanie N-H \cdots O_w nie udało się uzyskać takiego minimum. Takiej struktury nie otrzymano również metodą Hartree-Focka [34].

Struktury wszystkich obliczonych kompleksów NMA – woda z zastosowaniem poprawki Grimme'a i w otoczeniu wody jako ciągłego dielektryka przedstawione są na **rysunku 1**. Wybrane parametry energetyczne i strukturalne dla tych kompleksów oraz uzyskane również bez poprawki na oddziaływania dyspersyjne lub/i w fazie gazowej są zebrane w **Tabeli 1**. Już na wstępie warto zaznaczyć, że dla stosowanej w naszych obliczeniach bazy funkcyjnej aug-cc-pVTZ błąd wynikający z superpozycji bazy jest mały i wynosi od 1% do 2% energii oddziaływania i nie ma praktycznego znaczenia dla interpretacji otrzymanych wyników.



Rysunek 1. Struktury kompleksów *trans*- i *cis*-NMA z cząsteczką wody otrzymane metodą B3LYP/aug-cc-pVTZ z zastosowaniem poprawki Grimme'a D3 i metody PCM. Wiązania wodorowe zaznaczone są czerwonymi liniami przerywanymi

Figure 1. Structures of *trans*- and *cis*-NMA complexes with water molecule obtained by B3LYP/aug-cc-pVTZ method using Grimme D3 correction and PCM method. Hydrogen bonds are indicated by red dashed lines

Analizując wyniki obliczeń zebrane w **Tabeli 1**, można stwierdzić, że uwzględnienie w obliczeniach poprawki na oddziaływania dyspersyjne dla struktur

w fazie gazowej zwiększa energie oddziaływania o około 1,6 kcal/mol w przypadku wiązań $C=O \cdots HO_w$, i o około 1,3 kcal/mol dla oddziaływania $N-H \cdots O_w$, co oznacza wzrost energii wiązania wodorowego o około 20%. Towarzyszy temu niewielkie (od 0,007 do 0,049 Å) skrócenie odległości $H \cdots O$. Jeżeli próbujemy modelować wpływ polarnego rozpuszczalnika metodą PCM, to energia oddziaływania w badanych kompleksach jest mniejsza niż w fazie gazowej o około 30%, a dodanie poprawki na oddziaływania dyspersyjne ma podobny wpływ na energię oddziaływania jak w przypadku kompleksów w próżni. Różnica pomiędzy energią wiązania wodorowego obliczona bez poprawki Grimme'a i z tą poprawką wynosi, dla układów modelowanych w otoczeniu polarnego ośrodka, około 1,5 kcal/mol. W przypadku kompleksów stabilizowanych przez pojedyncze wiązanie wodorowe, czyli (A), (B) i (C), uwzględnienie w obliczeniach wpływu polarnego rozpuszczalnika powoduje (pomimo znacznie mniejszej energii wiązania wodorowego) skrócenie odległości $O \cdots H$ o około 0,08 Å, zarówno w przypadku wiązań $C=O \cdots HO_w$ jak i $N-H \cdots O_w$. Natomiast w przypadku kompleksu (D) polarne otoczenie powoduje zmniejszenie odległości $C=O \cdots HO_w$ i jednocześnie znaczne wydłużenie wiązania $N-H \cdots O_w$ (o około 0,3 Å).

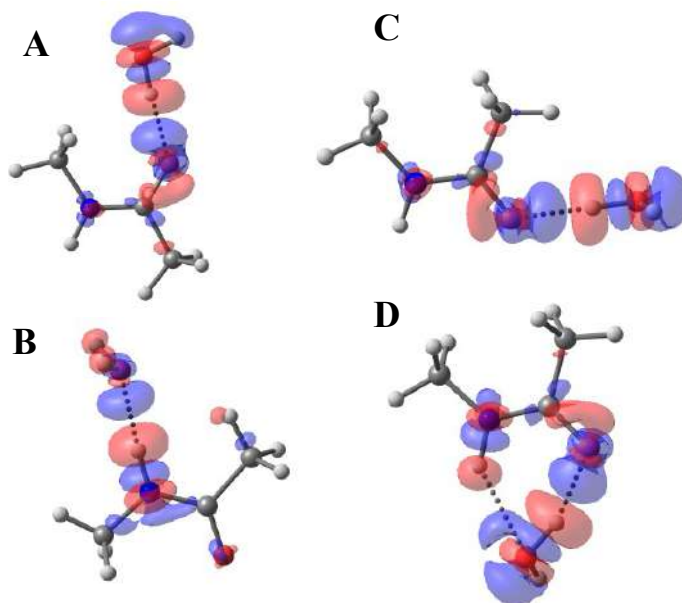
Tabela 1. Energie oddziaływania E_{int} [kcal/mol] i długości wiązań wodorowych [Å] w kompleksach *trans*- i *cis*-NMA z cząsteczką wody otrzymane metodą B3LYP/aug-cc-pVTZ. $E_{int}(kor)$ oznacza energie oddziaływania skorygowane ze względu na błąd superpozycji bazy

Table 1. E_{int} interaction energies [kcal/mol] and hydrogen bond lengths [Å] in *trans*- and *cis*-NMA complexes with a water molecule obtained by the B3LYP/aug-cc-pVTZ method. $E_{int}(kor)$ denotes interaction energies corrected for base superposition error

Kompleks	Faza gazowa		Woda	
	B3LYP	B3LYP-D3	B3LYP	B3LYP-D3
<i>trans</i> -NMA-H ₂ O (A)				
E_{int}	-6,92	-8,83	-4,52	-6,18
$E_{int}(kor)$	-6,82	-8,73	-	-
$C=O \cdots HO_w$	1,871	1,850	1,807	1,791
<i>trans</i> -NMA-H ₂ O (B)				
E_{int}	-4,10	-5,38	-2,61	-4,07
$E_{int}(kor)$	-4,01	-5,28	-	-
$N-H \cdots O_w$	2,089	2,040	1,992	1,954
<i>cis</i> -NMA-H ₂ O (C)				
E_{int}	-7,18	-8,78	-4,97	-6,36
$E_{int}(kor)$	-7,09	-8,69	-	-
$C=O \cdots HO_w$	1,848	1,840	1,799	1,768
<i>cis</i> -NMA-H ₂ O (D)				
E_{int}	-9,48	-11,19	-4,94	-6,66
$E_{int}(kor)$	-9,37	-11,08	-	-
$C=O \cdots HO_w$	1,837	1,839	1,776	1,779
$N-H \cdots O_w$	2,088	2,080	2,439	2,351

W przypadku kompleksu (C) uwzględnienie w obliczeniach wpływu rozpuszczalnika nie tylko skraca wiązanie $C=O \cdots HO_w$, ale również powoduje zmianę wzajemnego ułożenia cząsteczek w kompleksie. W kompleksie zoptymalizowanym w fazie gazowej, cząsteczka wody leży w płaszczyźnie wiązania amidowego, natomiast w polarnym otoczeniu płaszczyzna cząsteczki wody jest w przybliżeniu prostopadła do płaszczyzny układu amidowego.

W literaturze jest wiele prac, gdzie analizowane są energie wiązań wodorowych pomiędzy NMA a dwoma cząsteczkami wody [32, 35-38]. W przypadku kiedy *trans*-NMA tworzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody poprzez grupę karbonylową i grupę N-H, obserwowany jest efekt kooperatywny, czyli energia wiązań wodorowych w takim przypadku jest większa niż suma energii dwóch pojedynczych oddziaływań, a różnica wynosi około 0,7 – 0,9 kcal/mol w zależności od metody obliczeń, w szczególności 0,7 dla B3LYP/PCM. Natomiast jeśli obie cząsteczki wody oddziałują z grupą karbonylową amidu występuje efekt antykooperatywny, czyli energia oddziaływania w takim układzie jest o około 0,6 kcal/mol mniejsza niż suma dwóch wiązań wodorowych $C=O \cdots HO_w$ [35]. W przypadku *cis*-NMA autorzy [35] stwierdzają, że ich obliczenia nie wskazują na występowanie kooperatywnego efektu. Jednak ze względu na efekt sprzężenia π -elektronowego w układzie amidowym można się spodziewać, że utworzenie wiązania wodorowego z cząsteczką wody zmieni rozkład gęstości elektronowej, a tym samym protono-donorowe lub -akceptorowe właściwości amidu. Aby to lepiej zobrazować, na **rysunku 2** przedstawiona została zmiana gęstości elektronowej po utworzeniu wiązania wodorowego w kompleksach *trans*- i *cis*- NMA z cząsteczką wody. Niebieskie i czerwone obszary wskazują odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie gęstości elektronowej w kompleksie w porównaniu do gęstości w izolowanych cząsteczkach. Uzyskane rezultaty wskazują, że zgodnie z oczekiwaniami, największe zmiany gęstości elektronowej występują w obszarze utworzonego wiązania wodorowego $H \cdots O$, przy czym w okolicy protonu mostkowego następuje zmniejszenie gęstości elektronowej, a w pobliżu atomu tlenu (jego wolnych par elektronowych) gęstość elektronowa rośnie po utworzeniu kompleksu. Jest to typowy obraz dla wiązania wodorowego [39, 40]. Oprócz tego, w układzie amidowym, obserwowane są niewielkie zmiany gęstości elektronowej na sąsiedniej grupie zdolnej do tworzenia wiązania wodorowego. To pozwala zrozumieć, dlaczego energia oddziaływania w kompleksie D (-6,66 kcal/mol obliczona metodą PCM//B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ) nie jest równa sumie takich energii w kompleksach C i B (odpowiednio -6,36 i -4,07 kcal/mol) oraz dlaczego wiązanie wodorowe $N-H \cdots O_w$ w kompleksie D pod wpływem polarnego otoczenia znacznie się wydłuża, podczas gdy w pozostałych kompleksach rozpuszczalnik powoduje zmniejszenie odległości $H \cdots O$.

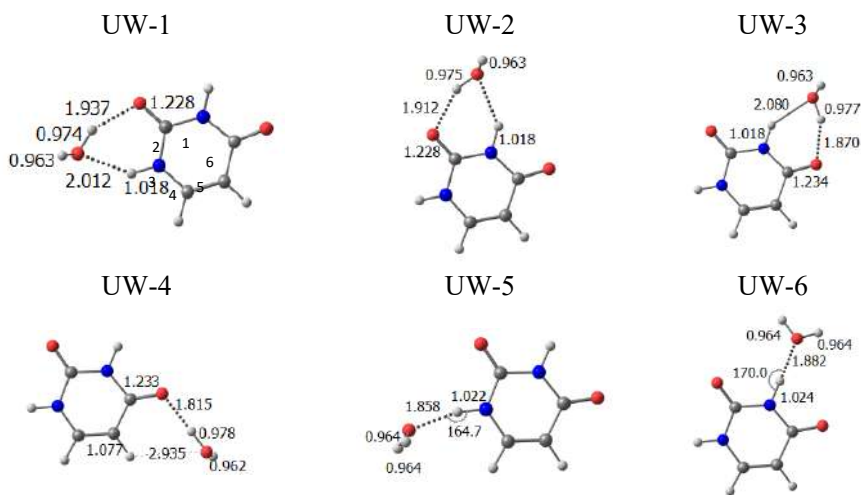


Rysunek 2. Zmiana gęstości elektronowej (kontur dla wartości 0.001 e/a.u.^3) dla kompleksów *trans* i *cis* NMA z jedną cząsteczką wody otrzymane metodą PCM//B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ
 Figure 2. Change in electron density (contour for 0.001 e/a.u.^3 value) for *trans* and *cis* NMA complexes with one water molecule obtained by PCM//B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ method

2. KOMPLEKSY URACYL-WODA

Kolejnym modelowym układem, którego oddziaływanie z cząsteczką wody jest analizowane w tej pracy to uracyl, tj. jedna z pirymidynowych zasad azotowych. Istnieje sześć tautomerów uracylu, z których forma zawierająca dwie grupy karbonylowe i dwa fragmenty N-H jest najbardziej stabilna, co wykazały zarówno badania eksperymentalne jak i teoretyczne [41-44]. Tylko taki tautomer uwzględniono w obliczeniach.

Struktury geometryczne sześciu kompleksów uracylu z cząsteczką wody (**Rysunek 3**) zostały obliczone w fazie gazowej i w wodzie, bez uwzględnienia poprawki Grimme'a oraz z tą poprawką. Ich energie względne i energie wiązań wodorowych zostały zebrane w **tabeli 2**. Cztery pierwsze z tych kompleksów, mające dwa wiązania wodorowe pomiędzy składnikami kompleksu, zostały już wcześniej opisane w literaturze [45, 46]. Natomiast dwa pozostałe, stabilizowane przez jedno wiązanie wodorowe pomiędzy uracylem i cząsteczką wody, są prezentowane po raz pierwszy.



Rysunek 3. Struktury kompleksów uracylu z cząsteczką wody otrzymane metodą PCM/B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ. Wiązania wodorowe zaznaczono liniami przerywanymi. W kompleksie UW-1 podano numerację atomów w cząsteczce uracylu

Figure 3. Structures of uracil complexes with water molecule obtained by PCM/B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ method. Hydrogen bonds are marked with dashed lines. In the UW-1 complex, the numbering of atoms in the uracil molecule is given

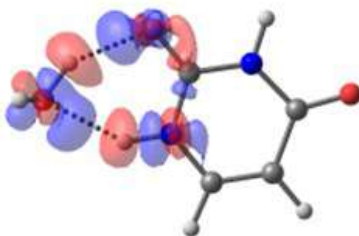
W fazie gazowej najniższym energetycznym jest kompleks UW-1 stabilizowany przez dwa wiązania wodorowe: $C=O \cdots HO_w$ i $N-H \cdots O_w$, których długości, bez poprawki Grimme'a, wynoszą odpowiednio 1,925 Å i 1,950 Å, a energia oddziaływania w tym układzie jest równa -9,9 kcal/mol. Uwzględnienie oddziaływań dyspersyjnych, zwiększa energię oddziaływania do -11,7 kcal/mol i nieco skraca oba wiązania. Choć energia oddziaływania w tym kompleksie jest bardzo podobna jak w układzie *cis*-NMA (D) to wiązania wodorowe mają inną geometrię. Mianowicie wiązanie $C=O \cdots HO_w$ jest w kompleksie UW-1 o 0,09 Å dłuższe a wiązanie $N-H \cdots O_w$ o 0,17 Å krótsze niż w kompleksie (D). Otoczenie polarnego rozpuszczalnika modelowane metodą PCM powoduje, podobnie jak dla kompleksów NMA, znaczne zmniejszenie energii oddziaływania oraz modyfikuje geometrię wiązań wodorowych, ale ta modyfikacja jest inna niż w przypadku kompleksu (D) dla NMA. Oba wiązania stają się dłuższe, ale wydłużenie wiązania $N-H \cdots O_w$ nie jest tak duże jak w przypadku kompleksu NMA(D). Oznacza to, że *cis*-NMA wcale nie jest tak dobrym modelem wiązań wodorowych uracylu z cząsteczką wody. Różnice najprawdopodobniej wynikają z cyklicznej budowy uracylu, chociaż obliczone zmiany rozkładu gęstości elektronowej pod wpływem utworzenia wiązania z jedną

cząsteczką wody (na przykładzie kompleksu UW-1) wcale nie wskazują na to, że zmiany są zdelokalizowane poza fragment wiązań wodorowych stabilizujących kompleks (Rysunek 4).

Tabela 2. Energie względne (E_{rel}) i energie oddziaływania E_{int} [kcal/mol] w kompleksach uracyl - woda otrzymane metodą B3LYP/aug-cc-pVTZ. $E_{int}(kor)$ oznacza energie oddziaływania skorygowane ze względu na błąd superpozycji bazy. Wpływ wody jako rozpuszczalnika modelowano metodą PCM

Table 2. Relative energies (E_{rel}) and interaction energies E_{int} [kcal/mol] in uracil-water complexes obtained by the B3LYP/aug-cc-pVTZ method. $E_{int}(kor)$ denotes interaction energies corrected for base superposition error. The effect of water as a solvent was modeled by the PCM method

Kompleks	Faza gazowa		Woda	
	B3LYP	B3LYP-D3	B3LYP	B3LYP-D3
UW-1				
E_{rel}	0,00	0,00	0,04	0,04
E_{int}	-9,94	-11,72	-4,43	-6,25
$E_{int}(kor)$	-9,82	-11,60	-	-
C=O...HO _w	1,925	1,932	1,928	1,937
N-H...O _w	1,950	1,941	2,029	2,012
UW-2				
E_{rel}	2,07	2,04	0,37	0,36
E_{int}	-7,41	-9,23	-4,11	-5,92
$E_{int}(kor)$	-7,29	-10,21	-	-
C=O...HO _w	1,949	1,956	1,905	1,912
N-H...O _w	2,023	2,009	2,108	2,087
UW-3				
E_{rel}	1,38	1,36	0,00	0,00
E_{int}	-8,09	-9,90	-4,48	-6,29
$E_{int}(kor)$	-7,98	-9,81	-	-
C=O...HO _w	1,909	1,914	1,864	1,970
N-H...O _w	1,994	1,983	2,098	2,080
UW-4				
E_{rel}	3,10	3,16	0,40	0,84
E_{int}	-6,37	-8,10	-4,08	-5,45
$E_{int}(kor)$	-6,29	-8,01	-	-
C=O...HO _w	1,904	1,894	1,828	1,815
C-H...O _w	2,475	2,410	3,347	2,935
UW-5				
E_{rel}	3,12	3,66	0,60	1,07
E_{int}	-6,36	-7,60	-3,88	-5,21
$E_{int}(kor)$	-6,25	-7,51	-	-
N-H...O _w	1,948	1,921	1,879	1,858
UW-6				
E_{rel}	5,17	5,62	1,28	1,72
E_{int}	-4,30	-5,64	-3,20	-4,56
$E_{int}(kor)$	-4,20	-5,53	-	-
N-H...O _w	1,949	1,929	1,910	1,882

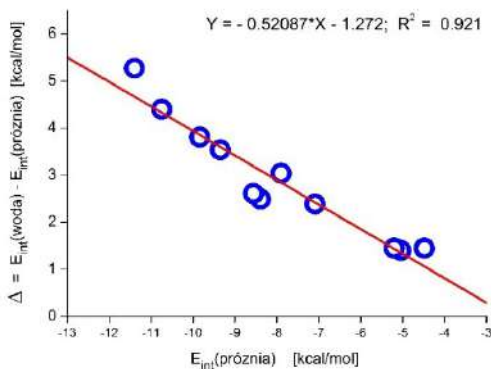


Rysunek 4. Zmiana gęstości elektronowej (kontur dla wartości 0.001 e/a.u.³) w kompleksie UW-1 w porównaniu w otrzymana metodą PCM//B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ

Figure 4. The change in electron density (contour for the value of 0.001 e/a.u.³) in the UW-1 complex in comparison with that obtained by the PCM//B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ method

Warto zauważyć, że dwie grupy protonodonorowe uracylu, N1-H i N3-H mają różne otoczenie chemiczne, co wpływa na energie i struktury geometryczne tworzonych przez nie wiązań wodorowych. Z tego powodu kompleks UW-2 w fazie gazowej jest o około 2 kcal/mol mniej stabilny niż kompleks UW-1 co wynika ze słabszych protonodonorowych właściwości grupy N3-H. Zgodnie z tym, energia oddziaływania kompleksu UW-5 (stabilizowanego wiązaniem N1H...Ow) jest w fazie gazowej o około 2 kcal/mol większa niż w przypadku UW-6 (stabilizowanego wiązaniem N3H...Ow).

Dla wszystkich sześciu kompleksów uracyl-woda polarny rozpuszczalnik powoduje znaczne zmniejszenie energii wiązania wodorowego, podobnie jak to zaobserwowaliśmy dla kompleksów NMA z jedną cząsteczką wody. Co ciekawe zmniejszenie energii oddziaływania jest tym większe im większa jest energia wiązania wodorowego. Ta liniowa zależność przedstawiona jest na rysunku 5.



Rysunek 5. Zależność (otrzymana metodą B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ) różnicy energii oddziaływań w wodzie i fazie gazowej ($\Delta = E_{int}(woda) - E_{int}(faza\ gazowa)$) od energii oddziaływań w fazie gazowej z cząsteczką wody NMA lub uracylu

Figure 5. Dependence (obtained by the method B3LYP-D3/aug-cc-pVTZ) of the difference in energy of interactions in water and gas phase ($\Delta = E_{int}(water) - E_{int}(gas\ phase)$) on the energy of interactions in the gas phase with the water molecule NMA or uracil

UWAGI KOŃCOWE

Zrozumienie i poprawne modelowanie metodami teoretycznymi oddziaływania uracylu z wodą jest bardzo ważne w kontekście badania struktury i funkcji DNA/RNA. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki obliczeń funkcjonałem B3LYP czterech kompleksów *N*-metyloacetamidu i sześciu kompleksów uracylu z jedną cząsteczką wody. Modelowanie prowadzone było z zastosowaniem poprawki Grimme'a aby uwzględnić oddziaływania dyspersyjne. Zastosowano średniej wielkości bazę funkcyjną aug-cc-pVTZ a wpływ wody jako polarnego otoczenia uwzględniono stosując metodę ciągłego dielektryka (PCM). Analizując otrzymane wyniki można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Zoptymalizowanie struktur geometrycznych dwóch, nie opisanych wcześniej w literaturze, kompleksów uracylu – woda (UW-5 i UW-6) stabilizowanych przez tylko jedno wiązanie wodorowe pozwoliło lepiej scharakteryzować i porównać protono-donorowe właściwości grup N1-H i N3-H uracylu.
2. Energia hydratacji uracylu w polarnym środowisku (metoda PCM) jest o 1,5 do 5 kcal/mol mniejsza niż w fazie gazowej. Najsilniejszy efekt obserwowany jest dla najsilniejszych wiązań wodorowych.
3. Przeprowadzając modelowanie funkcjonałem B3LYP wiązań wodorowych amidów w cząsteczką wody koniecznie należy wziąć pod uwagę oddziaływania dyspersyjne. Udział tych oddziaływań w całkowitej energii wiązania może sięgać nawet 30%.

PODZIĘKOWANIA

Wszystkie obliczenia wykonano przy pomocy sprzętu i oprogramowania WCSS. Autorzy dziękują również za wsparcie finansowe w ramach Uniwersytetu Opolskiego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Liu, C. Hu, A. Comotti, M.D. Ward, *Science*, 2011, **333**, 436.
- [2] M.L. Bushey, T.-Q. Nguyen, W. Zhang, D. Horoszewski, C. Nuckolls, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 5446.
- [3] R.E. Babine, S.L. Bender, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1359.
- [4] P. Schmidtke, F. Javier Luque, J.B. Murray, X. Barril, *JACS*, 2011, **133**, 18903.
- [5] W.H. Binder, R. Zirbs, *S. Adv. Polym. Sci.*, 2007, **207**, 1.
- [6] S. Debrus, H. Ratajczak, J. Venturini, N. Pinçon, J. Baran, J. Barycki, T. Głowiak, A. Pietraszko, *Synth. Met.*, 2002, **127**, 99.
- [7] C. Shao, H. Chang, M. Wang, F. Xu, J. Yang, *ACS Appl. Mater.*, 2017, **9**, 28305.
- [8] A. Werner, *Liebigs Ann. Chem.*, 1902, **322**, 261.

- [9] L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, Cornell University Press, Ithaca, 1960.
- [10] P. Schuster, G. Zundel, C. Sanfordy, *The Hydrogen Bond: Recent Developments in Theory and Experiments*, Vols. I-III. North Holland, Amsterdam, 1976.
- [11] S.J. Grabowski, Ed. *Hydrogen Bonding-New Insights*. Springer, Dordrecht, 2006.
- [12] P. Gilli, G. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*. Oxford University Press, Oxford, 2009.
- [13] B. Kojić-Prodić, K. Molčanov, *Acta Chim. Slov.*, 2008, **55**, 692.
- [14] E. Arunan, G.R. Desiraju, R.A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D.C. Clary, R.H. Crabtree, J.J. Dannenberg, P. Hobza, H.G. Kjaergaard, A.C. Legon, B. Mennucci, D.J. Nesbitt, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 1637.
- [15] G.R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 565.
- [16] G.A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [17] S. Scheiner, *Hydrogen Bonding: A Theoretical Perspective*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [18] T. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 48.
- [19] I. Rozas, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 2782.
- [20] I.Y. Torshin, I.T. Weber, R.W. Harrison, *Protein Eng.*, 2002, **15**, 359.
- [21] I.K. McDonald, J.M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1994, **238**, 777.
- [22] G.R. Desiraju, T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [23] R.G. Parr, W. Yang, *Density-functional theory of atoms and molecules*. Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [24] J. A. Pople, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, *Chem. Phys. Lett.*, 1992, **199**, 557.
- [25] S. Miertuš, E. Scrocco, J. Tomasi, *Chem. Phys.*, 1981, **55**, 117.
- [26] M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, J. Tomasi, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **255**, 327.
- [27] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, *Gaussian 16 Rev. C.01*. Wallingford, CT, 2016.
- [28] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- [29] R. A. Kendall, T. H. Dunning Jr., R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.*, 1992, **96**, 6796.
- [30] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich and H. Krieg, *J. Chem. Phys.*, 2010, **132**, 154104.
- [31] S. F. Boys and F. Bernardi, *Mol. Phys.*, 1970, **19**, 553.
- [32] A. Panuszko, E. Gojłto, J. Zielkiewicz, M. Śmiechowski, J. Krakowiak, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2483.
- [33] R. Zhang, H. Li, Y. Lei, S. Han, *J. Mol. Struct.*, 2004, **693**, 17.
- [34] D.A. Dixon, K.D. Dobbs, J.J. Valentini, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 13435.
- [35] W.-G. Han, S. Suhai, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 3942.
- [36] M.H. Farag, M.F. Ruiz-López, A. Bastida, G. Monard, F. Ingrosso, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 9056.
- [37] N.S. Kang, Y.K. Kang, *Chem. Phys. Lett.*, 2017, **687**, 23.
- [38] X. Xiao, Y. Tan, L. Zhu, Y. Guo, Z. Wen, M. Li, X. Pu, A. Tian, *J. Mol. Model.*, 2012, **18**, 1389.
- [39] T. Kar, S. Scheiner, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 9161.
- [40] T. Kar, S. Scheiner, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 1473.
- [41] K. Rzepiela, A. Buczek, T. Kupka, M.A. Broda, *Molecules*, 2020, **25**, 3931.
- [42] K. Rzepiela, A. Buczek, T. Kupka, M.A. Broda, *Struct. Chem.*, 2021, **32**, 275.
- [43] D.D. Colasurdo, M.N. Pila, D.A. Iglesias, S.L. Laurella, D.L. Ruiz, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 2018, **24**, 214.
- [44] Y. Tsuchiya, T. Tamura, M. Fujii, M. Ito, *J. Phys. Chem.*, 1988, **92**, 1760.
- [45] T. Fornaro, M. Biczysko, J. Bloino, V. Barone, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8479.

[46] T. Fornaro, D. Burini, M. Biczysko, V. Barone, *J. Phys. Chem. A*, 2015, **119**, 4224.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 kwietnia 2023 r.

**ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII
OSCYLACYJNEJ W ZAKRESIE NIR DO ŚLEDZENIA
MODYFIKACJI KONFORMACYJNYCH
ZACHODZĄCYCH W HYDROFOBOWYM
OBSZARZE MODELOWYCH DWUWARSTW
LIPIDOWYCH**

APPLICATION OF NIR RANGE VIBRATIONAL
SPECTROSCOPY TO FOLLOW THE
CONFORMATIONAL MODIFICATIONS OCCURRING
IN THE HYDROPHOBIC REGION OF MODEL LIPID
BILAYERS

Marta Kuć, Katarzyna Cieślik-Boczula*, Maria Rospenk

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: katarzyna.cieslik-boczula@uwr.edu.pl

Praca dedykowana
Panu Profesorowi Jerzemu Piotrowi Hawrankowi

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Błony biologiczne

1.1. Budowa i funkcje błon biologicznych

1.2. Właściwości błon biologicznych

2. Liposomy jako modele błon biologicznych

3. Przejścia fazowe modelowych dwuwarstw lipidowych

4. Metody badawcze układów bilamelarnych

4.1. Wspomagana analizą chemometryczną (PCA) spektroskopia FTIR
w zakresie NIR jako alternatywna metoda w badaniu przejść
fazowych modelowych układów błonowych w zakresie MIR

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr Marta Kuć – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (2013). Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2022 roku w Uniwersytecie Wrocławskim na podstawie przedstawionej pracy doktorskiej zatytułowanej: „Wpływ wybranych cząsteczek o właściwościach anestetycznych na struktury modelowych błon lipidowych.”. Praca wykonana została pod opieką naukową prof. Marii Rospenk i dr hab. Katarzyny Cieślik-Boczuli.



<https://orcid.org/0000-0001-7872-8649>

Dr hab. Katarzyna Cieślik-Boczula – w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizyko-chemicznych badań cieni erytrocytów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tytuł doktora habilitowanego uzyskała w roku 2020 za pracę pod tytułem „Wpływ związków o aktywności anty- i pro-neurodegeneracyjnej na strukturę poli-L-lizyny i modelowych błon lipidowych.” Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo - zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.



<https://orcid.org/0000-0002-0240-9366>

Prof. dr hab. Maria Rospenk – absolwentka chemii, Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiązania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy Profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnątrz- i między- cząsteczkowego wiązania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.



<https://orcid.org/0000-0003-3023-0619>

ABSTRACT

Biomembranes, which are the structural and functional basis of the cells of all living organisms, have been an extremely interesting research object for biology and chemistry scientists for years. The multitude of elements constituting the components of natural lipid membranes, however, is associated with interpretation difficulties regarding the nature of the processes taking place in them. A useful research object that is a model of bilamellar biosystems with a significantly simplified composition and at the same time retaining properties that can be a reference point in relation to natural membranes are lipid membranes in the form of one or several component liposomes. It is precisely such systems built of molecules of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) or dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG), and analogous systems with the addition of cholesterol (Chol), that were the subject of research in this work.

Near-infrared (NIR) vibrational spectroscopy provides a suitable method for the study of the hydrated samples. In most cases it can be alternatively adopted instead of commonly used mid-infrared (MIR) vibrational spectroscopy. This technique was applied for the first time to identify the spectral changes associated with the conformational changes in the hydrophobic region of model lipid bilayers. *Trans/gauche* isomerization of CH₂ groups of lipid hydrocarbon chains is accompanied by characteristic changes in spectral parameters of both $\nu_{as,s}$ CH₂ bands and their first overtones ($2\nu_{as,s}$ CH₂). The heating of all types of analyzed liposomes results in main phase transition (T_m) accompanied by *trans* to *gauche* isomerization of CH₂ groups of lipid hydrocarbon chains. The NIR-spectroscopy was able to describe in proper way (similar to MIR results) the character of T_m in studied bilayers.

Keywords: lipid bilayers, liposome, main phase transition, Mid-infrared vibrational spectroscopy (MIR), Near-infrared vibrational spectroscopy (NIR), Principal Component Analysis (PCA)

Słowa kluczowe: dwuwarstwa lipidowa, liposom, główne przejście fazowe, spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni (MIR), spektroskopia oscylacyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR), Analiza Składników Głównych (PCA)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AFM** – mikroskopia sił atomowych (z ang. Atomic Force Microscopy)
- ATR-IR** – spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni (z ang. Attenuated Total Reflection – Infrared Spectroscopy)
- BPF** – dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek (z ang. bilayered phospholipid flake)
- Chol** – cholesterol
- DPPC** – dipalmitoilofosfatydylocholina
- DPPG** – dipalmitoilofosfatydyloglicerol
- DSC** – różnicowa kalorymetria skaningowa (z ang. Differential Scanning Calorimetry)
- EPR** – spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (z ang. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy)
- FIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie dalekiej podczerwieni (z ang. Far Infrared Spectroscopy)
- FT-ATR-MIR** – spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy)
- FTIR-ATR** – spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (z ang. Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflection Spectroscopy)
- GUV** – (z ang. giant unilamellar vesicles) olbrzymie, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$
- H_I** – dwuwymiarowa cylindryczna faza heksagonalna
- H_{II}** – dwuwymiarowa odwrócona faza heksagonalna
- IR** – spektroskopia w zakresie podczerwieni (z ang. Infrared Spectroscopy)
- L_α** – faza lamelarna ciekła (z ang. lamellar liquid-crystalline phase)
- L_β** – faza żelowa uporządkowana (z ang. lamellar gel phase)
- L_c** – faza lamelarna krystaliczna (z ang. lamellar crystalline phase)
- LUV** – (z ang. large unilamellar vesicles) duże, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-400 nm
- MIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni (z ang. Mid Infrared Spectroscopy)
- NIR** – spektroskopia oscylacyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (z ang. Near Infrared Spectroscopy)
- MLV** – (z ang. multilamellar vesicles) wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 500 \text{ nm}$,
- MVV** – (z ang. multivesicular vesicles) wielopęcherzykowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$
- NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
- OLV** – (z ang. oligolamellar vesicles) kilkuwarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-500 nm
- P_β** – faza żelowa pomarszczona (z ang. lamellar rippled gel phase)
- PCA** – analiza głównych składowych (z ang. Principal Component Analysis)
- S_u** – krytyczny współczynnik upakowania
- SUV** – (z ang. small unilamellar vesicles) małe, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 20-100 nm
- SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. Scanning Electron Microscopy)
- T_m** – temperatura głównego przejścia fazowego
- T_p** – temperatura przedprzejścia
- T_s** – temperatura subprzejścia

WPROWADZENIE

Selektywna przepuszczalność umożliwiająca transport substancji z udziałem różnego rodzaju białek oraz zapewnienie odrębności i integralności obszarów, w których zachodzą wzajemnie wykluczające się reakcje chemiczne, stanowią niezwykle istotne funkcje wszystkich błon biologicznych [1-4]. Badanie na poziomie molekularnym za pomocą technik pomiarowych i analiza uzyskanych rezultatów niezwykle skomplikowanych strukturalnie układów, jakimi są naturalnie występujące błony, nastęrcza naukowcom wielu problemów. Jako rozwiązanie wspomnianego problemu badawczego w badaniach biochemicznych powszechnie stosuje się modelowe układy dwuwarstwowe zwane liposomami [1,5,6].

Dwuwarstwy lipidowe zagregowane w liposomy, będące modelem naturalnie występujących błon, są powszechnie badanymi i analizowanymi układami na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci [7-12]. Spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni – FT-ATR-MIR (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy) jest jedną z technik eksperymentalnych stosowanych powszechnie do badania zarówno modelowych jak i występujących naturalnie systemów biologicznych [13-22]. Dane strukturalne, informacje o stopniu i sposobie interakcji międzycząsteczkowych a także modyfikacjach strukturalnych będących wynikiem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, pH, czy stopnia uwodnienia, możliwe są do uzyskania z analizy widm mierzonych metodą FT-ATR-MIR [19,20]. Jednym z ograniczeń przy badaniu układów biologicznych za pomocą wspomnianej metody jest konieczność przeprowadzania pomiarów w obecności wody. Problematyczna jest w konsekwencji właściwa interpretacja otrzymanych wyników, ponieważ w zakresach istotnych z punktu widzenia analizy pojawiają się intensywne sygnały pochodzące od drgań grup OH cząsteczek wody.

1. BŁONY BIOLOGICZNE

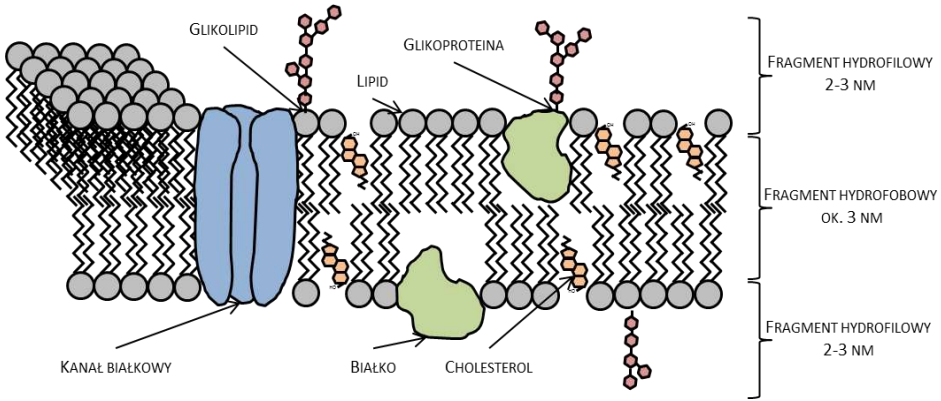
Błony biologiczne zapewniają autonomię i ograniczają powierzchnię zarówno całej komórki jak i zanurzonych w cytosolu komponentów, takich jak jądro komórkowe, lizosomy, mitochondria, aparaty Golgiego, chloroplasty, rybosomy etc. gwarantując funkcjonalizację poszczególnych organelli o odmiennych składach chemicznych (różna wartość pH, swoisty skład jonów). Z drugiej strony stanowią półprzepuszczalną barierę umożliwiając łączność i wymianę substancji między macierzą zewnątrzkomórkową a wnętrzem komórki. [1-4].

1.1. BUDOWA I FUNKCJE BŁON BIOLOGICZNYCH

Mimo różnorodności strukturalnej naturalnych membran, wyróżnić można kilka komponentów charakterystycznych dla wszystkich błon biologicznych [1,2]. Podstawę ich składu stanowią lipidy zagregowane w formie dwuwarstw z całkowicie (integralnie) lub częściowo (powierzchniowo lub peryferycznie) zanurzonymi w niej białkami. W skład błon biologicznych wchodzi również glikoproteiny i glikolipidy, czyli sacharydy kowalencyjnie przyłączone odpowiednio do białek lub lipidów [3,5].

Grubość naturalnych dwuwarstw wynosi zazwyczaj od 6 do 10 nm [1], z czego ok. 3 nm przypadają na wewnętrzną hydrofobową część lipidów, zaś zewnętrzną hydrofilo-

wym fragmentom lipidów a także powierzchniowym oraz peryferycznym białkom błonowym przypisuje się grubość w granicach 2-3 nm dla każdej z warstw [3]. Schemat przedstawiający strukturę błony biologicznej z zaznaczonymi jej elementami i wyszczególnionymi fragmentami pokazany został na **Rysunku 1**.



Rysunek 1. Schemat budowy błony biologicznej z zaznaczonymi grubościami poszczególnych fragmentów dwuwarstwy

Figure 1. Scheme of the structure of biological membrane with marked thickness of particular parts of the bilayer

Z budową błon biologicznych związane są ściśle ich funkcje. Do podstawowych zaliczyć można:

- ✓ ograniczanie obszaru komórki oraz organeli wewnątrzkomórkowych od środowiska zewnętrznego,
- ✓ odbieranie i przekazywanie bodźców zewnętrznych a także w obrębie komórki,
- ✓ pośredniczenie w wymianie i przetwarzaniu informacji oraz transporcie jonów i cząsteczek,
- ✓ tworzenie przedziałów międzykomórkowych zapewniających integralność różnych obszarów, egzo- i endocytoza [1-4].

Amfifilowość jest niezwykle istotną cechą strukturalną cząsteczek lipidów błonowych [1,3,23], która determinuje szereg ich właściwości fizykochemicznych, takich jak słaba rozpuszczalność w wodzie a dobra w rozpuszczalnikach niepolarnych (chloroform, metanol, eter) [24,25]. Strukturę amfifilowej molekuly lipidu stanowi część hydrofilowa (tzw. polarna „głowa”) oraz fragment hydrofobowy (tzw. apolarny „ogon”) zawierający łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych.

Bazując na budowie chemicznej, lipidy błonowe podzielić można na cztery główne klasy:

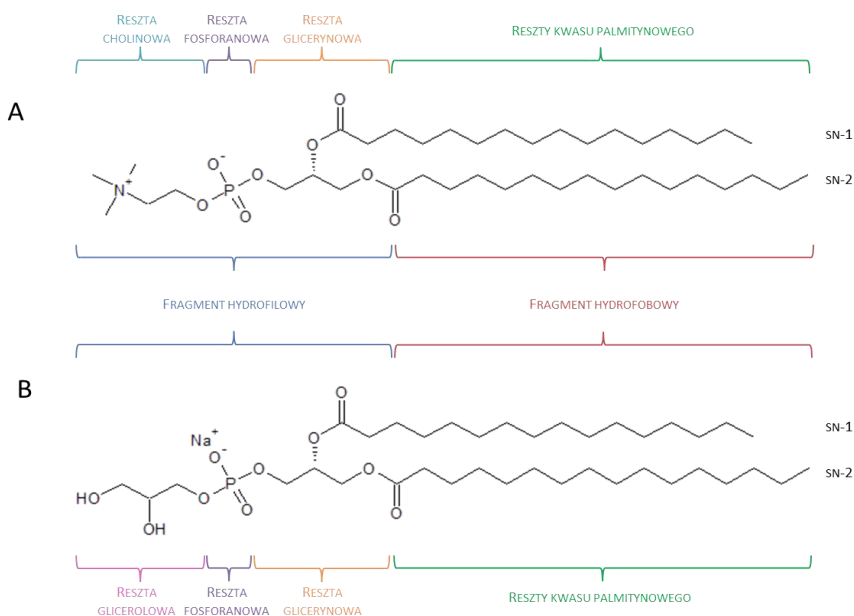
- ✓ diacylofosfoglicerydy (fosfolipidy)
- ✓ diacyloglikoglicerydy (glikolipidy)
- ✓ sfingolipidy
- ✓ sterole i ich pochodne [3,26,27].

W niniejszej pracy wykorzystano lipidy z grup fosfolipidów i steroli.

Fosfolipidy - strukturę cząsteczki fosfolipidu tworzy glicerol połączony trzema wiązaniami estrowymi, z których dwa (sn-1 i sn-2 znajdujące się odpowiednio przy pierwszym i drugim atomie węgla glicerolu) tworzone są z łańcuchami acylowymi kwa-

sów tłuszczowych, zaś trzecie (sn-3 umiejscowione przy trzecim atomie węgla glicerolu) z ufosforylowaną pochodną alkoholową [1,3,26-28].

Podstawę niniejszej pracy stanowiły badania modelowych błon lipidowych zbudowanych z cząsteczek dipalmitoilofosfatydylochliny (DPPC) lub dipalmitoilofosfatydyloglicerolu (DPPG). Oba z wybranych do analizy fosfolipidów tworzą w środowisku wodnym struktury dwuwarstwowe i są powszechnie stosowane jako modele błon biologicznych, stanowiąc dobre odniesienie do właściwości naturalnych membran [29]. Molekuły pierwszego z wymienionych fosfolipidów przyjmują w roztworach wodnych postać zwitterjonów [30-32], zaś drugiego – naładowanych ujemnie indywidualów, których ładunek zlokalizowany jest w obszarze grupy fosforanowej [32,33]. Fragmenty hydrofobowe obu analizowanych fosfolipidów tworzą dwie reszty kwasu palmitynowego połączone wiązaniami estrowymi z glicerolowym rdzeniem. Część hydrofilową cząsteczek DPPC stanowią grupy cholinowa oraz fosforanowa przyłączone do rdzenia glicerolu wiązaniem estrowym, zaś grupy glicerolowa i fosforanowa połączone z rdzeniem glicerolowym za pomocą wiązania estrowego charakterystyczne są dla molekuł DPPG. Schemat budowy badanych fosfolipidów z zaznaczonymi charakterystycznymi grupami przedstawiony został na **Rysunku 2**.

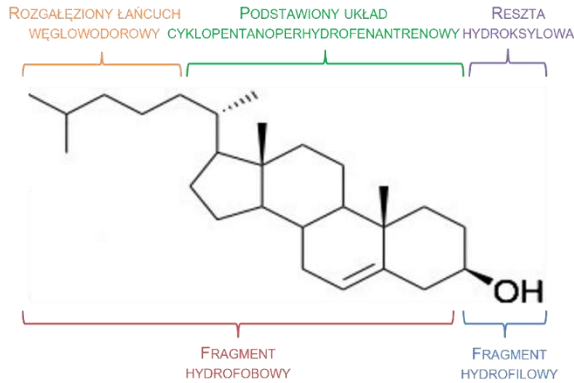


Rysunek 2. Schemat budowy cząsteczek badanych fosfolipidów: A - DPPC (dipalmitoilofosfatydylochliny); B - DPPG (dipalmitoilofosfatydyloglicerolu)

Figure 2. Scheme of the structure of the molecules of the studied phospholipids : A – DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine); B - DPPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol)

Sterole – odmienność budowy cząsteczek steroli w porównaniu do innych klas lipidów błonowych ma swoje odzwierciedlenie w niższym stopniu polarności steroli względem pozostałych. W cząsteczce sterolu fragment hydrofilowy występuje w postaci pojedynczej grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie C-3 pierwszego pierścienia będącego częścią układu cyklopentanoperhydrofenantrenowego. Ugrupowanie to, pod-

stawione często dodatkowo przy atomie C-17 prostym lub rozgałęzionym łańcuchem alifatycznym, stanowi część hydrofobową molekuł steroli [34-37]. Najpowszechniej występującym w komórkach eukariotycznych zwierzęcych steroidem jest cholesterol (Chol), którego domieszki stosowano w niniejszej pracy. Schemat budowy cząsteczki cholesterolu przedstawia **Rysunek 3**.



Rysunek 3. Schemat budowy cząsteczki cholesterolu
Figure 3. Scheme of the structure of cholesterol

Molekuły Chol dzięki lokowaniu pierścieni steroidowych równolegle do łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowym obszarze błon lipidowych oraz oddziaływaniom grup – OH z resztami estrowymi cząsteczek lipidów błonowych przyjmują odpowiednią orientację w dwuwarstwie fosfolipidowej [31,34-36,38-43]. Amfifilowy charakter molekuł Chol umożliwia im selektywne wbudowywanie się w strukturę dwuwarstw, a co za tym idzie modyfikację fizykochemicznych właściwości membran, takich jak płynność czy przepuszczalność [30,31,36-50]. Wpływ cholesterolu na regulację płynności modelowych błon biologicznych został poddany analizie w niniejszej pracy.

1.2. WŁAŚCIWOŚCI BŁON BIOLOGICZNYCH

Niespełna 100 lat temu Gorter i Grendel [51] przeprowadzając badania czerwonych krwinek udowodnili dwuwarstwową organizację lipidów w naturalnych błonach. Układ taki wynika przede wszystkim z amfifilowej struktury lipidów błonowych. Na bilamelarną formę błon wpływ mają również takie cechy jak kształt czy różnorodność grup funkcyjnych budujących cząsteczki lipidów [52].

Na rozwinięcie i uściślenie teorii opisującej strukturotwórcze procesy zachodzące w błonach biologicznych przyszło poczekać od odkrycia Gortera i Grendela kolejne 50 lat, kiedy to Singer i Nicolson [53] zaproponowali, uznawany do dziś za najbliższy stanowi faktycznemu, *mobilis in mobili*, czyli model płynnej mozaiki. Jako pierwszy uwzględnił on możliwość występowania szeregu słabych, niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy białkowymi i lipidowymi komponentami tworzącymi naturalne membrany, takich jak: oddziaływania wodorowe, elektrostatyczne, dipolowe czy Van der Waalsa, zapewniających integralność składników błon. Ich istnienie generuje ponadto możliwość pełnienia przez białka określonych funkcji [1]. Zachodzące pomiędzy polarnymi fragmentami lipidów oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe oraz przyciągające siły Van der Waalsa występujące między łańcuchami węglowodorowymi

hydrofobowych części lipidów są interakcjami pozwalającymi na zachowanie dwuwarstwowej struktury błon [1,5,52,54].

Model płynnej mozaiki przedstawia błony jako płynne struktury zorientowanych przestrzennie molekuł lipidów, uformowanych w dwuwarstwy, z asymetrycznie rozmieszczonymi wewnątrz integralnymi i powierzchniowymi białkami błonowymi [1,5]. Model ten zakłada również występowanie w naturalnych membranach szeregu specyficznych właściwości, takich jak dynamika, płynność, selektywność czy asymetria, które determinowane są przez skład lipidowy błon [52].

Dynamika błon biologicznych związana jest ze znacznym stopniem mobilności budujących membranę komponentów. Zanurzone w dwuwarstwie lipidowej, jak w swoistym „rozpuszczalniku”, białka błonowe posiadają zdolność do wykonywania ruchów bocznych oraz do rotacji. Spowodowane jest to zrywaniem i tworzeniem się nowych słabych wiązań i oddziaływań z cząsteczkami lipidów stanowiących strukturę membran [1,26]. Z uwagi na wielkość białek i hydrofobowy charakter wewnętrznej części błon niemożliwe jest z kolei przemieszczanie się białek z jednej strony dwuwarstwy na drugą [1].

W obrębie każdej z monowarstw tworzących naturalne membrany zauważalny jest również duży stopień swobody ruchów molekuł lipidów – wyróżniamy dwa rodzaje ich ruchu:

- ✓ boczne przemieszczanie w obrębie monowarstwy, czyli tak zwana dyfuzja lateralna – odbywa się w kierunku równoległym do płaszczyzny dwuwarstwy,
- ✓ rotacja pojedynczej molekuly lipidu – obrót cząsteczek lipidów wokół własnej osi [3,52].

Teoretycznie możliwe są również tzw. ruchy flip-flop, czyli przemieszczanie się cząsteczek lipidów z jednej monowarstwy do drugiej, jednak translokacja taka z uwagi na bardzo długi czas jej zachodzenia, związany z koniecznością niekorzystnego energetycznie oddziaływania polarnej części lipidu z apolarną częścią dwuwarstwy, nie jest procesem, który zaobserwować można w czasie rzeczywistym [1,3,5,52].

Tworzenie różnorodnych pod względem składu lipidowego struktur a także mobilność amfifilowych molekuł determinują następną z właściwości naturalnych membran, jaką jest płynność [1]. Cecha ta wynika bezpośrednio ze składu lipidowego, którego modyfikacje, np.: ilości czy rodzaju tworzących dwuwarstwę lipidów, generują zmiany stopnia płynności błon. Im krótszy łańcuch węglowodorowy, tym mniejsza powierzchnia oddziaływań Van der Waalsa, czego konsekwencją jest spadek stopnia uporządkowania i wzrost płynności dwuwarstwy [1-3,55]. Również brak wiązań nienasyconych w obrębie ogonów acylowych skutkuje występowaniem stabilnej, gęsto upakowanej struktury dwuwarstwy, wynikającej z dużej ilości oddziaływań Van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi w konformacji *trans*. Z kolei występowanie nienasyconych wiązań w hydrofobowym fragmencie dwuwarstwy powoduje przejście łańcuchów w konformację *gauche*, czego efektem jest spadek ścisłego upakowania dwuwarstwy oraz wzrost stopnia jej płynności [1]. Obecność Chol w naturalnych błonach jest kluczowa w procesie regulacji stopnia ich płynności. Prostopadłe względem płaszczyzny dwuwarstwy wbudowywanie się molekuł Chol w membranę w znacznym stopniu rozluźnia jej upakowaną strukturę, ale również częściowo hamuje ruchy lipidów, wywołując ambiwalentny efekt na płynność błon [3,31,34-50]. Płynność dwuwarstw może być również regulowana poprzez modyfikacje struktury hydrofilowych fragmentów lipidów błonowych. Siła wiązań wodorowych pojawiających się w obrębie główek fosfolipidowych zależy od rodzaju pochodnej alko-

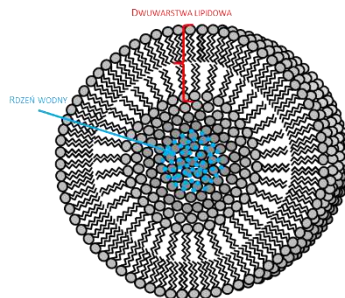
holowej estryfikującej resztę fosforanową – wzrost płynności dwuwarstwy powodowany jest przez zwiększenie ilości fosfatydylocholin w strukturze dwuwarstwy, zaś dodatek do błon fosfatydyloetanolamin w znacznym stopniu je stabilizuje [31].

Selektywność membran biologicznych jest ściśle związana z przepuszczalnością przez obszar dwuwarstw określonego rodzaju substancji i zależna od ich wielkości oraz stopnia polarności. Niewielki rozmiar oraz brak ładunku takich cząsteczek, jak O_2 , CO_2 , N_2 czy proste węglowodory, pozwala na swobodne przenikanie ich przez dwuwarstwę. Stosunkowo łatwo pokonywać błonę lipidową mogą również małe cząsteczki polarne, takie jak woda czy mocznik. Apolarny rejon dwuwarstw jest jednak fragmentem ograniczającym możliwość dyfuzji większych cząsteczek polarnych, np.: glukozy czy aminokwasów a także uniemożliwiającym przenikanie do i z wnętrza komórki jonów, takich jak: H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$. Przemieszczanie tych indywidualiów poprzez membrany możliwe jest wyłącznie poprzez odpowiednie pompy i kanały jonowe, których podstawą strukturalną są białka [3,55,56].

Asymetryczność błony związana jest z nieprzypadkowym rozmieszczeniem lipidów i białek w dwuwarstwie [1,3,24]. Silniejsze wiązanie białek przez zewnętrzną powierzchnię błon biologicznych skutkuje występowaniem większej ich ilości po stronie macierzy zewnątrzkomórkowej [1]. Również cholesterol, fosfolipidy, takie jak fosfatydylocholiny i sfingomielin występują w większej ilości, a wykazujące całkowitą asymetrię glikolipidy znajdują się jedynie po zewnętrznej stronie błony. Z kolei wewnętrzna monowarstwa naturalnych membran bogata jest w fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny [1-3,55].

2. LIPOSOMY JAKO MODELE BŁON BIOLOGICZNYCH

Opisane wcześniej właściwości amfifilowe cząsteczek lipidów determinują amfipatyczność powstającego układu lamelnego, którego zewnętrzne fragmenty hydrofilowe wchodzi w liczne interakcje z otaczającymi je cząsteczkami wody poprzez oddziaływania elektrostatyczne i tworzenie wiązań wodorowych. Hydrofobowe wnętrze dwuwarstwy lipidowej jest izolowane od polarnego środowiska [1,5,6]. W celu zniwelowania niekorzystnych energetycznie oddziaływań łańcuchów węglowodorowych znajdujących się na krawędziach membran z molekułami wody, poprzez zakrzywienie dwuwarstwy formują się struktury kuliste, zwane liposomami. Liposomy są to zamknięte, sferyczne pęcherzyki posiadające wewnętrzny rdzeń wodny otoczony przez jedną lub kilka dwuwarstw lipidowych rozmieszczonych wokół niego koncentrycznie i oddzielonych od siebie przestrzeniami wodnymi [6,57-64]. Schemat budowy liposomu jednowarstwowego z elementami jego struktury przedstawiono na **Rysunku 4**.



Rysunek 4. Schemat budowy jednowarstwowego pęcherzyka liposomowego
Figure 4. Scheme of the structure of a unilamellar liposomal vesicle

Predyspozycja dwuwarstw do organizowania się w struktury kuliste została po raz pierwszy zauważona przez Banghama [65] w latach 60. ubiegłego wieku. Prekursorowi technologii liposomowej udało się otrzymać pęcherzyki wielowarstwowe [68,77], zaś kilka lat później, dzięki długotrwałemu procesowi sonifikacji lipidów w środowisku wodnym, Papahadjopoloulos [66,67] uzyskał dyspersję liposomów jednowarstwowych. Strukturalny i funkcjonalny paralelizm liposomów do błon biologicznych warunkuje ich aplikacyjność jako modeli naturalnych membran – biokompatybilnych i biodegradowalnych nośników leków, białek błonowych, sond, antygenów i innych makromolekuł [58-61,68,69].

Rozpatrując morfologię tworzących się w roztworach wodnych pęcherzyków liposomowych wyróżnić można ich kilka podstawowych rodzajów:

- ✓ SUV – (z ang. small unilamellar vesicles) małe, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 20-100 nm,
- ✓ LUV – (z ang. large unilamellar vesicles) duże, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-400 nm,
- ✓ GUV – (z ang. giant unilamellar vesicles) olbrzymie, jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$,
- ✓ OLV – (z ang. oligolamellar vesicles) kilkuwarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy 100-500 nm,
- ✓ MLV – (z ang. multilamellar vesicles) wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 500 \text{ nm}$,
- ✓ MVV – (z ang. multivesicular vesicles) wielopęcherzykowe pęcherzyki lipidowe o średnicy $> 1 \mu\text{m}$ [2,5,6,58,70].

Próby opisanego mechanizmu formowania się struktur liposomowych zostały podjęte wielokrotnie. Już w latach 80. XX wieku Lasic [71] postulował, iż bez względu na zastosowaną technikę preparacji liposomów, produktem pośrednim będzie BPF czyli dwuwarstwowy fosfolipidowy płatek (z ang. bilayered phospholipid flake). Ze względu na wysoce niekorzystne energetycznie napięcie na krawędziach dwuwarstwy, BPF w wyniku działania energii krawędzi i energii zaginania płaskiej dwuwarstwy zostaje uformowany w liposom. Nie jest on jednak układem termodynamicznie stabilnym ze względu na swoją krzywiznę. Do powstania liposomów konieczne jest więc dostarczenie energii z zewnątrz, na sposób np.: temperatury, wytrząsania, sonifikacji czy ekstruzji [6,71].

Do powszechnie stosowanych metod preparacji liposomów należą:

- ✓ uwadnianie cienkiego filmu lipidowego,
- ✓ działanie falami ultradźwiękowymi – sonifikacja,
- ✓ kalibracja przy pomocy membran o zdefiniowanej średnicy porów – ekstruzja,
- ✓ odparowanie techniką odwróconych faz,
- ✓ stosowanie prasy Frencha,
- ✓ wstrzykiwanie roztworu eterowego lub etanolowego,
- ✓ dializa detergentowa [6,72-78].

W zależności od potrzeb, możliwe jest uzyskanie różnego rodzaju liposomów dobierając odpowiednią technikę lub łącząc kilka metod ich preparacji [71,72]. W niniejszej pracy połączono uwadnianie cienkiego filmu lipidowego, sonifikację oraz ekstruzję. Możliwymi do kontrolowania na etapie preparacji cechami liposomów są ich skład, struktura oraz wielkość [58-61]. Stosowanie pęcherzyków lipidowych utworzonych z lipidów syntetycznych jako modeli naturalnych membran pozwala na ich wykorzystanie między innymi w medycynie, biologii czy kosmetyce, umożliwiając:

- ✓ kształtowanie i odtwarzanie procesów zachodzących w naturalnych membranach,
- ✓ badanie właściwości białek błonowych oraz ich interakcji z otaczającym je środowiskiem lipidowym,
- ✓ kontrolowane modyfikacje składu dwuwarstw generujące zmiany właściwości modelowych błon,
- ✓ transport do wnętrza komórek trudno rozpuszczalnych i łatwo utleniających się w wodzie ingrediencji,
- ✓ przenoszenie substancji polarnych (wnętrze liposomów) oraz apolarnych (obszar dwuwarstw),
- ✓ implementowanie substancji bioaktywnych (przeciwciał, genów, antygenów, leków) do miejsc docelowych – tzw. terapię celowaną,
- ✓ intensyfikację odpowiedzi immunologicznej [6,55].

3. PRZEJŚCIA FAZOWE MODELOWYCH DWUWARSTW LIPIDOWYCH

Zmiany właściwości fizykochemicznych błon biologicznych generowane są przez czynniki zewnętrzne, tj.: modyfikacje temperatury, pH, ciśnienia, dodatek Chol czy stopień uwodnienia. Reorganizacje strukturalne membran zachodzące skokowo określane są mianem przejść fazowych dwuwarstw lipidowych [2,79].

Amfifilowe właściwości cząsteczek lipidów są podstawą występowania w tworzonych przez nie układach mezomorfizmu liotropowego, czyli procesu powstawania w obecności rozpuszczalnika (w strukturach biologicznych najczęściej wody) ciekłych kryształów o zróżnicowanej morfologii [3,5]. Amfipatyczność molekuł lipidów przejawia się w skłonności do tworzenia w roztworach wodnych różnorodnych liotropowych agregatów, w których polarne fragmenty cząsteczek lipidów wyeksponowane są „na zewnątrz” i zdolne do tworzenia oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych z otaczającymi je cząsteczkami wody, zaś części hydrofobowe ukryte są „w środku” układu, co pozwala im na ograniczenie niekorzystnych energetycznie oddziaływań z grupami hydrofilowymi korpuskuł wody. Różnice strukturalne wchodzących w skład błony cząsteczek lipidów mają swoje odzwierciedlenie w zachodzących w dwuwarstwach zmianach fizykochemicznych.

Polimorfizm termotropowy, czyli determinowana zmianą temperatury zdolność agregatów lipidowych do modyfikacji strukturalnych ma swoje podłoże w reorganizacji upakowania, a co za tym idzie, stopnia swobody ruchów molekuł lipidów [2,80]. Naturalnie występujące błony, zbudowane w przeważającej ilości z fosfolipidów mają tendencję do tworzenia struktur dwuwarstwowych [5], a między innymi od długości i stopnia nasycenia łańcuchów alifatycznych, jak również od wielkości i rodzaju fragmentów hydrofilowych cząsteczek lipidów zależą temperatury, w których następuje skokowa zmiana parametrów fizykochemicznych dwuwarstwy związana ze zmianą jej morfologii i nazywana temperaturą przejścia fazowego [3,5,80,81].

Czynnikiem generującym zachodzenie przejścia fazowego w obrębie dwuwarstwy lipidowej są modyfikacje strukturalne pojedynczych molekuł wchodzących w skład błon. Wspomniane modyfikacje dotyczyć mogą temperaturowo-zależnych zmian konformacyjnych (przejścia z formy *trans* do *gauche*) znajdujących się w hydrofobowym obszarze dwuwarstw łańcuchów acylowych lub mogą być wywołane zmianą stopnia uwodnienia hydrofilowych fragmentów membran [2,79-81].

Do opisu faz występujących w dwuwarstwach lipidowych, których istnienie zależne jest od temperatury, powszechnie używana jest nomenklatura Luzzati’ego [83]. Skokowe

zmiany parametrów fizykochemicznych zbudowanych z cząsteczek DPPC dwuwarstw generowane wzrostem temperatury badanego układu widoczne są na wykresach otrzymanych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (z ang. Differential Scanning Calorimetry - DSC) jako trzy odrębne procesy utożsamiane z trzema przemianami fazowymi pierwszego rzędu, do których zajścia potrzebne jest dostarczenie energii z zewnątrz: subprzejściem, przedprzejściem i głównym przejściem fazowym [2,80,84,85].

Występowanie dwuwarstw lipidowych w czterech odmiennych morfologicznie fazach:

- ✓ L_c – lamelarnej krystalicznej (z ang. lamellar crystalline phase),
- ✓ L_β – lamelarnej żelowej uporządkowanej (z ang. lamellar gel phase),
- ✓ P_β – lamelarnej żelowej pomarszczonej (z ang. lamellar rippled gel phase),
- ✓ L_α – lamelarnej ciekłej (z ang. lamellar liquid-crystalline phase),

ściśle skorelowane jest z temperaturą układu [86].

W najniższych temperaturach dwuwarstwa lipidowa przyjmuje fazę lamelarną krystaliczną, zwaną również subżelową. Równolegle uporządkowane, ściśle upakowane, sztywne, ułożone pod niewielkim kątem względem normalnej dwuwarstwy łańcuchy węglowodorowe, w których strukturze wiązania węgiel-węgiel występują w konformacji *all-trans*, stabilizowane są licznymi oddziaływaniami Van der Waalsa [2,5,46,84,87,88]. Ścisłe upakowanie hydrofilowych części membrany hamuje wnikanie molekuł wody w głąb dwuwarstwy [84]. Ograniczona częstotliwość rotacji wzdłuż wiązań C-C a także znikoma ruchliwość łańcuchów alifatycznych wynikające ze sztywnej, trójskośnej symetrii upakowania wzrastają wraz z dostarczeniem do układu energii termicznej [84,87].

Wartość temperatury, w której następuje pierwsze przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej z fazy lamelarnej krystalicznej do fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej, czyli tak zwane subprzejście (z ang. subtransition), zależna jest od rodzaju lipidu budującego membranę [3,5,80]. Nazywana jest ona temperaturą subprzejścia – T_s [5,84,88]. Proces ten cechuje się wzrostem poziomu hydratacji polarnego obszaru dwuwarstwy na skutek wnikania molekuł wody otaczających dwuwarstwę (z ang. bulk water) do wewnętrznych jej obszarów, gdzie znajdują się „związane” cząsteczki wody (z ang. bound water) [89,90]. Jest to możliwe w efekcie modyfikacji symetrii bocznego upakowania molekuł lipidów oraz zmniejszenia stopnia uporządkowania lipidów w błonie [84,87,89-94]. Domieszkowanie membran pewnymi dodatkami skutkować może zahamowaniem subprzejścia. Do czynników takich należą Chol, którego ingrediencja na poziomie 20 mol% powoduje zanik tego przejścia fazowego [46,95].

Skutkiem subprzejścia są modyfikacje strukturalne prowadzące do pojawienia się fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej, którą cechuje niewielki wzrost kąta nachylenia łańcuchów węglowodorowych do powierzchni dwuwarstwy oraz zwiększenie jej grubości przy zachowaniu relatywnie wysokiego stopnia upakowania molekuł lipidów w dwuwarstwie [5,87]. Wzmocniony zostaje ruch rotacyjny łańcuchów acylowych, zaś wiązania C-C pozostają względem siebie w konformacji *trans* [5]. Dalszy wzrost temperatury prowadzi do zmian w symetrii upakowania cząsteczek lipidów z trójskośnego na ortorombowe [84,91,92].

Temperaturą przedprzejścia (T_p) określana jest temperatura, w której zachodzi przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej z fazy lamelarnej żelowej uporządkowanej do fazy lamelarnej żelowej pomarszczonej, noszące nazwę przedprzejścia fazowego (z ang. pretransition). Jest ono spowodowane zwiększeniem intensywności rotacji wzdłuż długiej osi łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów [79,84,87,88,96]. Poziom

hydratacji polarnej części błony oraz parametry strukturalne dwuwarstwy ulegają zmianie [97,98]. Występowanie również tego przejścia fazowego zależne jest od dodatku do membran cząsteczek Chol. Już 20 mol% tego sterolu hamuje zachodzenie przedprzejścia [95].

Wynikiem przedprzejścia fazowego są dalsze zmiany w organizacji przestrzennej bilamelarnie zagregowanych cząsteczek lipidów prowadzące do pojawienia się fazy lamelarniej żelowej pomarszczonej [79,84]. Następuje dalszy wzrost nachylenia łańcuchów acylowych względem normalnej dwuwarstwy oraz zwiększenie jej grubości skutkujące modyfikacją płaskiej dotąd powierzchni w pofałdowaną [5,90,97,98]. Wzrasta poziom hydratacji oraz swobody ruchów rotacyjnych hydrofobowych łańcuchów, których większość pozostaje w konformacji *trans*. W hydrofobowym rejonie dwuwarstwy powstają domeny bogate w molekuły zawierające w strukturze konformery *gauche* [97,98]. Wzrost nieuporządkowania dwuwarstwy skutkuje także modyfikacją symetrii upakowania molekuł lipidów z ortorombowego na heksagonalne [87,88,90,97,98].

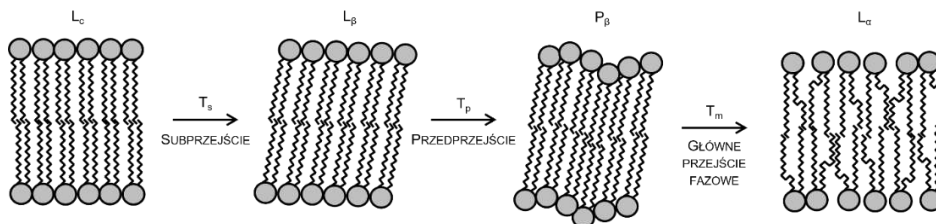
Ponowny wzrost temperatury aż do wartości zwanej temperaturą głównego przejścia fazowego (T_m) prowadzi do przemiany dwuwarstwowych agregatów lipidowych z fazy lamelarniej żelowej pomarszczonej do fazy lamelarniej ciekłej, w nomenklaturze określane jako główne przejście fazowe (z ang. main phase transition) [46,79,80,84]. Zachodzące podczas tej przemiany tak zwane topnienie łańcuchów węglowodorowych lipidów związane jest ze zmianą konformacji wiązań C-C z *trans* na *gauche* na skutek energii termicznej dostarczonej do układu [2,3,5,82]. Łańcuchy alifatyczne bogate w konformery *gauche* charakteryzują się wzrostem częstości rotacji wzdłuż wiązania węgiel-węgiel. Skutkuje to znacznym rozluźnieniem ciasno upakowanej dotąd struktury błony, dzięki spowodowanemu powstawaniem zagięć łańcuchów ograniczeniu powierzchni interakcji hydrofobowych, np.: oddziaływań Van der Waalsa [2,3,5,84,99]. Chol w stężeniu 20 mol% znacznie ogranicza kooperatywność (równoczesne modyfikacje całego układu) głównego przejścia fazowego a dodatek 40-50 mol% tego sterolu do membrany skutkuje zupełnym zanikiem tej przemiany [95]. Wartość temperatury głównego przejścia fazowego zależy od wielu czynników, do których należą rodzaj i stężenie lipidu, ładunek oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych grup polarnych a także długość i stopień nasycenia łańcuchów węglowodorowych [2,5].

Efektom głównego przejścia fazowego jest pojawienie się fazy lamelarniej ciekłej, którą wyróżniają:

- ✓ znaczny w porównaniu do niskotemperaturowych faz poziom nieuporządkowania, powodujący rozluźnienie upakowania membrany, wzrost stopnia jej uwodnienia oraz poziomu przepuszczalności,
- ✓ zwiększenie stopnia swobody ruchów rotacyjnych cząsteczek lipidów,
- ✓ wysoki współczynnik dyfuzji lateralnej przejawiający się we wzroście płynności błony,
- ✓ zaburzenie symetrii heksagonalnego upakowania lateralnego [2,5,84,88].

Liczba zagięć łańcuchów alifatycznych powodowanych występowaniem w strukturze lipidów konformerów *gauche* wynosi około 4-5 na jeden łańcuch węglowodorowy i skutkuje zmniejszeniem ich długości oraz wzrostem zajmowanej powierzchni [5,84,99]. Molekuły Chol wykazują ambiwalentny wpływ na płynność błon w zależności od fazy, w której dwuwarstwa występuje. W temperaturach poniżej głównego przejścia fazowego sterol ten upłynnia znajdującą się w fazie żelowej błonę przez zmniejszenie liczby oddziaływań Van der Waalsa między hydrofobowymi częściami molekuł lipidów. W temperaturach powyżej głównego przejścia fazowego

Chol usztywnia i uporządkowuje ciekłokrystaliczną strukturę membrany poprzez ograniczenie mobilności łańcuchów alifatycznych [2,5,46,95]. Schemat determinowanych wzrostem temperatury przejść fazowych dwuwarstwy lipidowej z zaznaczonymi rodzajami poszczególnych faz oraz łączącymi je etapami przemian fazowych przedstawiony został na **Rysunku 5**.



Rysunek 5. Schemat determinowanych wzrostem temperatury przejść fazowych dwuwarstwy lipidowej
Figure 5. Scheme of temperature-dependent phase transitions of a lipid bilayer

4. METODY BADAWCZE UKŁADÓW BILAMELARNYCH

Do konwencjonalnych technik eksperymentalnych stosowanych w badaniu systemów bilamelarnych należą m.in.: spektroskopia w zakresie podczerwieni (z ang. Infrared Spectroscopy – IR) [45,47,49,82,87-89,93,100], różnicowa kalorymetria skaningowa (z ang. Differential Scanning Calorimetry – DSC) [80,96,100-102], spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR) [38,40,45,100], spektroskopia fluorescencyjna [96,100], spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (z ang. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy – EPR) [96,100,102-104], spektroskopia Ramana [101], skaningowa mikroskopia elektronowa (z ang. Scanning Electron Microscopy – SEM) [66,105], mikroskopia sił atomowych (z ang. Atomic Force Microscopy – AFM) [106], spektroskopia rozpraszania promieni X (z ang. X-ray Scattering Spectroscopy – X-ray) [42,91,94,107]. Oprócz technik eksperymentalnych do śledzenia fluktuacji biomembran coraz szerzej stosowane są również badania dynamiki molekularnej [35,36,50,98,99].

Każda z wymienionych metod badawczych umożliwia śledzenie odmiennych zjawisk zachodzących w obszarze dwuwarstw lipidowych będących wynikiem modyfikacji parametrów fizykochemicznych (temperatura, pH, stopień uwodnienia) mierzonych układów, czy domieszkowania błon różnymi dodatkami. Każda posiada również szereg cech predysponujących ale również i utrudniających jej zastosowanie w analizie układów błonowych. Wybrane możliwości i ograniczenia metod badawczych służących do pomiarów modelowych błon lipidowych zebrane zostały w **Tabeli 1** [45,98-107].

W niniejszej pracy skupiono się na sprawdzeniu, czy stosowaną powszechnie w badaniu modelowych układów błonowych spektroskopię oscylacyjną w zakresie średniej podczerwieni (MIR) można zastąpić nie wykorzystywaną do analizy tego rodzaju systemów spektroskopią w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Systemy zbudowane z molekuł dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) lub dipalmitoilofosfatydyloglicerolu (DPPG), oraz analogiczne układy z dodatkiem cholesterolu (Chol), stanowiły obiekt badań w niniejszej pracy. Do realizacji celu wykorzystano metody spektroskopowe wspomagane analizą chemometryczną:

- ✓ technikę spektroskopii oscylacyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR),
- ✓ technikę spektroskopii oscylacyjnej w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR).

Tabela 1. Możliwości i ograniczenia metod eksperymentalnych stosowanych do badania modelowych błon lipidowych[45,98-107]

Table 1. Possibilities and limitations of experimental methods used to study model lipid membranes[45,98-107]

METODA BADAWCZA	MOŻLIWOŚCI	OGRANICZENIA
DSC	WYZNACZANIE WARTOŚCI TEMPERATUR PRZEJŚĆ FAZOWYCH ORAZ OKREŚLANIE STOPNIA ICH KOOPERATYWNOŚCI	BADANIE UKŁADÓW ZAWIERAJĄCYCH LOTNE SKŁADNIKI
SPEKTROSKOPIA NMR	MONITOROWANIE MOLEKULARNEGO UPORZĄDKOWANIA ORAZ TYPÓW AGREGACJI DZIĘKI TECHNIKOM ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR	BADANIE PROSTYCH, JEDNO LUB DWUSKŁADNIKOWYCH UKŁADÓW
SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA	ŚLEDZENIE PROCESU GŁÓWNEGO PRZEJŚCIA FAZOWEGO	KONIECZNOŚĆ STOSOWANIA SOND FLUORESCENCYJNYCH
SPEKTROSKOPIA EPR	WYZNACZANIE PARAMETRÓW OPISUJĄCYCH SZEREG WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH UKŁADÓW DZIĘKI MONITOROWANIU RÓŻNYCH OBSZARÓW BŁONY	KONIECZNOŚĆ STOSOWANIA SOND SPINOWYCH
SPEKTROSKOPIA IR	RÓWNOCZESNE MONITOROWANIE WSZYSTKICH OBSZARÓW DWUWARSTWY W FUNKCJI ZMIENNEGO PARAMETRU (TEMPERATURY, pH, STOPNIA UWODNIENIA)	KONIECZNOŚĆ ELIMINOWANIA Z WIDM PASM POCHODZĄCYCH Z ABSORPCJI CZĄSTECZEK WODY
SPEKTROSKOPIA RAMANA	PRZEPROWADZANIE POMIARÓW UKŁADÓW W ŚRODOWISKU WODNYM	STOSUNKOWO NISKA CZUŁOŚĆ APARATURY POMIAROWEJ
SPEKTROSKOPIA ROZPRASZANIA X-RAY	WYZNACZANIE PARAMETRÓW OKREŚLAJĄCYCH STOPIEŃ UPAKOWANIA I UPORZĄDKOWANIA ŁAŃCUCHÓW WĘGLOWODOROWYCH	BADANIE UKŁADÓW W FORMIE NATYWNEJ – KONIECZNOŚĆ WYSTĘPOWANIA PRÓBKII W FORMIE KRYSZTAŁICZNEJ
AFM	PRACA Z NANOSKOPOWĄ ROZDZIELCZOŚCIĄ	PRÓBKA WYMAGA IMMOBILIZOWANIA POWIERZCHNI

Spektroskopia oscylacyjna w zakresach MIR i NIR zastosowana została w celu określenia zmian w stanie konformacyjnym grup CH_2 łańcuchów lipidowych stanowiących hydrofobowy obszar modelowych błon. U podstaw tej techniki leży absorbancja promieniowania przez oscylujące molekuly. Wzajemne ruchy atomów w cząsteczkach generują modyfikacje struktury geometrycznej molekuł, tj. zmiany wielkości kątów, czy długości wiązań między atomami. Selekttywne pochłanianie promieniowania z zakresu $12500\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ przez cząsteczki skutkuje wzbudzeniem drgań wiązań między atomami tworzącymi molekuly. Częstotliwość promieniowania w zakresie IR jest bowiem zbliżona do częstotliwości drgań wiązań chemicznych w cząsteczkach związków organicznych. Warunkiem koniecznym do pojawienia się pasm pochodzących od drgań wiązań w molekule jest zmiana momentu dipolowego podczas oscylacji. Obecność określonych grup funkcyjnych będących elementami składowymi molekuł, predestynuje występowanie w nich drgań, które są podstawą do pojawiania się na widmach IR tzw. pasm charakterystycznych, położenie, kształt i intensywności których pozwala na wnioskowanie o składzie i organizacji cząsteczek.

Spektrum długości fali, które podczerwień obejmuje podzielić można na trzy obszary:

- ✓ bliska podczerwień (NIR, z ang. Near Infrared Spectroscopy) – $12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$,
- ✓ średnia podczerwień (MIR, z ang. Mid Infrared Spectroscopy) – $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$,
- ✓ daleka podczerwień (FIR, z ang. Far Infrared Spectroscopy) – $400\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ [13-15].

Efektom zaabsorbowania przez molekuly promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni jest widmo, na którym zaobserwować można szereg pasm pochodzących od drgań grup atomów tworzących cząsteczkę, od których masy oraz siły wiązania zależy umiejscowienie sygnału na widmie. W zależności od wartości energii koniecznej do dostarczenia w celu przejścia drgającego układu ze stanu podstawowego na wzbudzony wyróżnić można trzy typy pasm absorpcji:

- ✓ pasma podstawowe, u podstawy istnienia których leży transformacja układu oscylacyjnego z poziomu podstawowego na pierwszy poziom wzbudzony. Pasma te zaobserwować można głównie w zakresie średniej podczerwieni;
- ✓ pasma nadtonów, które widoczne są podczas przechodzenia układu drgającego z poziomu podstawowego na drugi i kolejne wyższe wzbudzone poziomy energetyczne. Obecność tych pasm stwierdza się przeważnie w zakresie bliskiej podczerwieni;
- ✓ pasma kombinacyjne są z kolei wynikiem sumy lub różnicy drgań dwóch różnych oscylatorów. Także one obecne są najczęściej w zakresie bliskiej podczerwieni [13-16].

Zmiany w parametrach spektralnych pasm pochodzących od drgań grup CH budujących cząsteczki lipidów, zachodzące pod wpływem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, umożliwią śledzenie zmian strukturalnych zachodzących w hydrofobowej części modelowych błonach lipidowych. Do tego typu pasm zaliczamy między innymi sygnały pochodzące od drgań rozciągających symetrycznych (ν_s) i asymetrycznych (ν_{as}) grup metylenowych (CH_2) i terminalnych metylowych (CH_3) budujących łańcuchy acylowe cząsteczek lipidów. Pasma te znajdują się w obszarze wysokich częstości zakresu średniej podczerwieni, a intensywność pierwszych z nich jest najwyższa ze wszystkich pochodzących od drgań cząsteczek fosfolipidów sygnałów. Ich maksima znajdują się odpowiednio przy ok. 2920 cm^{-1} dla $\nu_{as}\text{ CH}_2$, 2850 cm^{-1} dla $\nu_s\text{ CH}_2$, 2955 cm^{-1} dla $\nu_{as}\text{ CH}_3$ oraz 2870 cm^{-1} dla $\nu_s\text{ CH}_3$ [17,18,93,109]. W przypadku sygnałów pochodzących od pierwszych nadtonów drgań rozciągających symetrycznych ($2\nu_s$) i asymetrycznych ($2\nu_{as}$) grup metylenowych (CH_2) budujących łańcuchy węglowodorowe molekuł fosfolipidów, których występowanie zaobserwować można w zakresie bliskiej podczerwieni, maksima pasm znajdują się przy około 5780 cm^{-1} dla $2\nu_{as}\text{ CH}_2$ oraz 5660 cm^{-1} dla $2\nu_s\text{ CH}_2$ [110-112]. Kształt i położenie tych pasm w znacznym stopniu skorelowane jest z termo- i liotropowym typem fazy zagregowanych fosfolipidów. Na fragmentach widm IR w zakresie $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ układów bilamelarnych rejestrowanych w funkcji wzrastającej temperatury zaobserwować można szereg modyfikacji parametrów spektralnych, takich jak: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowych oraz przesunięcie maksimów pasm $\nu_{as,s}\text{ CH}_2$ w kierunku wyższych wartości liczb falowych [17,18,109]. Analogiczne zmiany położenia i kształtu pasm pochodzących od drgań cząsteczek bogatych w długie fragmenty alifatyczne zaobserwować można w przypadku sygnałów pochodzących od $2\nu_s$ i $2\nu_{as}$ występujących w zakresie $6000\text{-}5500\text{ cm}^{-1}$ na widmach IR [110-112]. Zarejestrowane dla stanowiących obiekt badań układów lipidowych zmiany parametrów spektralnych w wersji graficznej przedstawione zostaną w dalszej części pracy.

Spektroskopia oscylacyjna osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia z transformacją Fouriera w zakresie średniej podczerwieni – FT-ATR-MIR (z ang. Fourier Transform Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy) jest jedną z technik eksperymentalnych stosowanych powszechnie do badania zarówno modelowych jak i występujących naturalnie systemów biologicznych [13-22]. Dane strukturalne, informacje o stopniu i sposobie interakcji międzycząsteczkowych a także

modyfikacjach strukturalnych będących wynikiem działania czynnika zewnętrznego, np. temperatury, pH, czy stopnia uwodnienia, możliwe są do uzyskania z analizy widm mierzonych metodą FT-ATR-MIR [19,20]. Do największych ograniczeń tej metody podczas badania układów biologicznych należy konieczność rejestrowania widm w środowisku wodnym. Nastręcza to wielu problemów przy interpretacji mierzonych systemów z uwagi na pojawiające się w istotnych, z punktu widzenia analizy, zakresach pasm o dużej intensywności pochodzących od drgań grup –OH cząsteczek wody. Częściowe zniwelowanie tej trudności możliwe jest dzięki zastosowaniu transformacji Fouriera (FT), która ułatwia gromadzenie dużej ilości interferogramów oraz wpływa na wzrost stosunku sygnał/szum, umożliwiając rejestrowanie widm o dobrej rozdzielczości [19]. Użyteczne może okazać się również zastosowanie tzw. ciężkiej wody – D₂O, której wykorzystanie pozwala na wyeliminowanie pasm pochodzących od drgań grup –OH cząsteczek H₂O.

Spektroskopia oscylacyjna w zakresie NIR jest techniką, której zastosowanie przy badaniu i analizie modyfikacji strukturalnych modelowych błon lipidowych nie było powszechne. W literaturze przed 2014 rokiem (rozpoczęcie niniejszych badań) nie udało się natrafić na żadną pracę, w której użyto by techniki spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR do badania tego typu systemów. Niemniej opierając się na jej analogicznym względem metody MIR fizycznym podłożu, bazującym na występowaniu w analizowanych układach drgań grup funkcyjnych w cząsteczkach lipidów oraz ich pierwszych nadtonów, przypuszczać można, iż podobnie jak spektroskopia oscylacyjna w zakresie średniej podczerwieni również technika NIR może okazać się użytecznym narzędziem dostarczającym szeregu informacji dotyczących struktury i właściwości fizykochemicznych modeli błon biologicznych.

Intensywny rozwój aparatury pomiarowej związany przede wszystkim ze wzrostem stopnia ich zautomatyzowania, mający miejsce na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, wiąże się z koniecznością analizy obszernych zbiorów danych doświadczalnych. Mnogość wyników w znacznym stopniu ogranicza możliwość ich eksploracji za pomocą klasycznych metod analitycznych. Narzędziem pomocnym przy interpretacji wielowymiarowych danych jest chemometria, u której podstaw leżą statystyczne i matematyczne metody analizy danych, prowadzące do otrzymania szeregu informacji dotyczących modyfikacji zachodzących w badanych układach [113-116].

Do głównych celów chemometrii zaliczyć można:

- ✓ gromadzenie, kompresję, eksplorację oraz wizualizację danych pomiarowych,
- ✓ modelowanie, kalibrację i kontrolę statystyczną procesów,
- ✓ klasyfikację, grupowanie i korekcję sygnałów,
- ✓ identyfikację i interpretację wzorców i trendów [113-115,117,118].

Wyniki pomiarów przeprowadzanego eksperymentu stanowią najczęściej szeroki zbiór będący rezultatem zbadania szeregu obiektów. Eksplikacja z wielowymiarowych danych charakterystyki analizowanych próbek oraz ich cech poprzez redukcję wymiaru jest nadrzędną intencją stosowania metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych [113,119-121].

Jedną z powszechnie stosowanych metod projekcji danych jest metoda analizy składników głównych (z ang. Principal Component Analysis – PCA). Analiza PCA jest użytecznym narzędziem chemometrycznym umożliwiającym kompresję wielowymiarowych danych, będących wynikiem np. pomiarów spektroskopowych, poprzez zastąpienie wyjściowych danych jednym lub kilkoma tzw. czynnikami (lub składnikami) głównymi (z ang. principal components, PC) czyli liniowymi kombinacjami zmiennych wyjściowych, pozostającymi względem siebie w relacji ortogonalnej i opisu-

jącymi zasadniczą część wariancji danych. Iteracyjny sposób wyznaczania czynników głównych pozwala na zachowanie przez nie wysokiego stopnia zawartych w oryginalnych danych informacji przy jednoczesnym zachowaniu maksymalnego poziomu wariancji poddawanego analizie układu. Pierwszy czynnik główny (PC1) wyznaczany jest zgodnie z kierunkiem obejmującym największy rozrzut obiektów, a co za tym idzie opisującym maksimum całkowitej zmienności zachodzącej w badanym układzie. Każdy kolejny czynnik główny przedstawia inną, nieopisaną przez poprzedni część zmienności [117,119-121]. Poddanie danych eksperymentalnych szeregowi procedur przygotowawczych takich jak: odsumianie, korekcja linii bazowej, normalizacja czy centrowanie (usuwanie powielanych oraz nieistotnych informacji ze zbioru widm) ma na celu wyeliminowanie niespecyficznego i niebędącej podstawą badanego procesu, zmienności [117,119,122,123]. Wyjściowe dane wygenerowane w postaci macierzy są poprzez algorytm PCA poddawane procesowi dekompozycji do iloczynu dwóch macierzy T i P, czyli macierzy wartości czynnikowych (z ang. scores) zawierającej współrzędne obiektów i macierzy ładunków czynnikowych (z ang. loadings) charakteryzującej parametry, zorientowanych w taki sposób, aby zoptymalizować w maksymalnym stopniu opis wariancji danych [122]. Dzięki zastosowaniu metody PCA możliwa jest więc również graficzna wizualizacja zależności wiążących obiekty i parametry, co ułatwia w znacznym stopniu interpretację analizowanych danych [117,119-125]. Wartości czynnikowe dla każdego obiektu opisywane są jako odległość ich prostopadłego rzutu na oś PC1. Im większa wartość scores, tym większa zmienność wnoszona przez dany obiekt do układu. Zbliżone wartości scores dla kilku próbek sugerują z kolei ich analogiczny wkład w wariancję analizowanego systemu [119,125]. Ładunki czynnikowe kolejnych zmiennych równe są *cosinusowi* kąta między osią danego obiektu a osią PC1. Przyjmują one zatem wartości od 1 do -1. Wartości te są ściśle zależne od wariancji kolejnej zmiennej – im większy wpływ zmienności na kierunek osi PC1, tym bliższa jedności wartość ładunku czynnikowego (ponieważ *cos* kąta wynosi 0). I odwrotnie – im bardziej równoległe względem siebie biegną osie zmiennej i PC1, tym bliższa zeru wartość *cos* kąta między osiami i tym mniejszy wkład w opis zależnej od PC1 części wariancji ma określona dana – wartość liczby falowej [119,125].

Oparte na założeniach statystyki i modelach matematycznych metody chemometryczne okazują się być wsparciem i uzupełnieniem technik badawczych, którymi na przestrzeni ostatnich lat próbuje się na wielu płaszczyznach analizować coraz bardziej skomplikowane i różnorodne pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym systemy [126-129]. Graficzne przedstawienie otrzymanych w wyniku przeprowadzenia analizy PCA udziałów wartości i ładunków czynnikowych w ogólnej zmienności badanego układu pozwala na uzyskanie szeregu istotnych informacji dotyczących złożonych układów, takich jak modyfikowane licznymi parametrami modelowe błony lipidowe [128,130-133].

W niniejszej pracy metoda PCA zastosowana została w celu śledzenia i interpretacji monitorowanych przy użyciu spektroskopii IR modyfikacji strukturalnych w hydrofobowym obszarze dwuwarstw lipidowych, będących skutkiem zmian temperatury modelowych błon. Do realizacji postawionych celów pracy, konieczna była preparacja próbek wodnych dyspersji liposomowych, których pomiary prowadzono w funkcji wzrastającej temperatury technikami spektroskopii MIR i NIR [134-136].

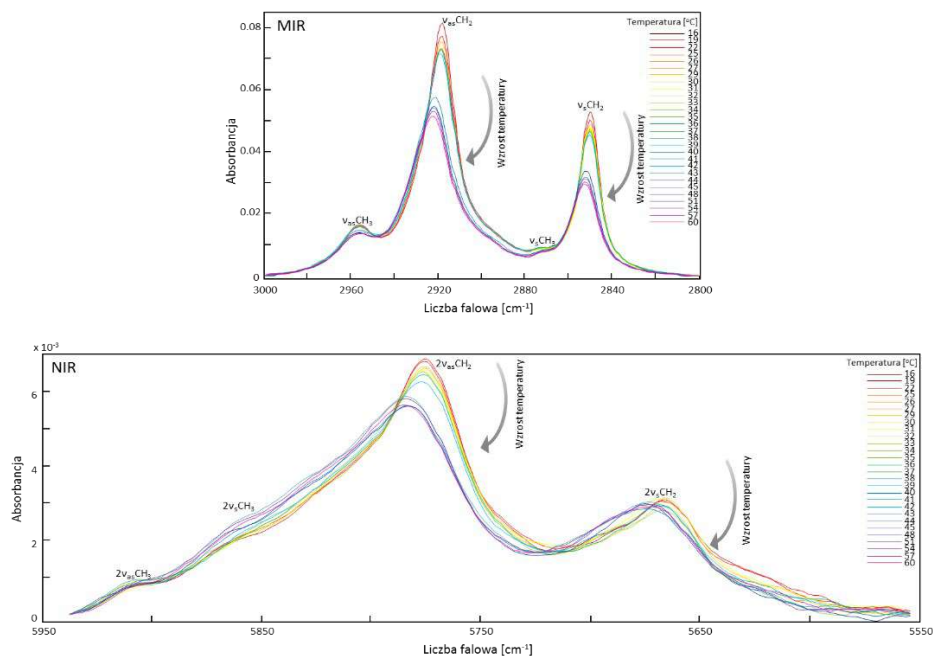
4.1. Wspomagana analizą chemometryczną (PCA) spektroskopia FTIR w zakresie NIR jako alternatywna metoda w badaniu przejść fazowych modelowych układów błonowych w zakresie MIR

Większość charakterystycznych pasm występujących w cząsteczkach związków organicznych, pochodzących od drgań podstawowych, związanych z przejściem cząsteczki z poziomu podstawowego na pierwszy poziom wzbudzony, zaobserwować można w zakresie MIR. Z kolei przeważającą część pierwszych i kolejnych nadtonów sygnałów pochodzących od tych drgań, będących efektem przechodzenia cząsteczki ze stanu podstawowego na drugi i wyższe poziomy wzbudzone, oraz tzw. pasma kombinacyjne wynikające z nakładania się kilku rodzajów drgań, znaleźć można w zakresie NIR [13]. Nadtony powinny podlegać analogicznym modyfikacjom spektralnym, jak odpowiadające im pasma pochodzące od drgań podstawowych, ponieważ u ich podłoża leżą te same rodzaje oscylacji, monitorujące to samo zjawisko zachodzące w badanym układzie [13,16]. Badania w pełni uwodnionych błon lipidowych pozwalają na lepsze przybliżenie procesów zachodzących w układach modelowych dwuwarstw do tych mających miejsce w naturalnie występujących błonach, które znajdują się we w pełni uwodnionym stanie. Poważny problem eksperymentalny, jaki w zakresie MIR stanowi silne nakładanie się pasm pochodzących od grup funkcyjnych lipidów budujących błony z szerokim pasmem o wysokiej intensywności będącym wynikiem drgań grup –OH cząsteczek wody zostaje częściowo zniwelowany w zakresie NIR, gdzie wspomniane pasma są lepiej rozseparowane. Możliwość przeanalizowania alternatywnego zakresu spektralnego w celu zbadania tego samego procesu zachodzącego w badanych układach pozwoliła na optymalne pod względem technicznym i ekonomicznym dobranie parametrów technicznych przeprowadzanych pomiarów [134-136].

Badania MIR i NIR modelowych błon DPPC – w pierwszej kolejności przeprowadzono pomiary powszechnie stosowaną do badania systemów lipidowych techniką FTIR-ATR w zakresie MIR wodnych dyspersji liposomowych DPPC w funkcji wzrastającej temperatury. Analizie poddano zakres $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, w którym znajdują się pasma pochodzące od drgań $\nu_{\text{as,s}}\text{CH}_2$ charakteryzujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidów. W serii zmierzonych w funkcji wzrastającej temperatury widm, zgodnie z oczekiwaniami, zauważono szereg zmian spektralnych: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz przesunięcie maksimum pasm $\nu_{\text{as,s}}\text{CH}_2$ w kierunku wyższych wartości liczb falowych. Modyfikacje te są wynikiem zmian konformacyjnych wzdłuż wiązań C-C w łańcuchach alifatycznych z konformacji *trans* do *gauche* i związanego z tym przejścia fazowego dwuwarstwy z uporządkowanej fazy żelowej do rozluźnionej fazy ciekłokrystalicznej. Fakt ten jest potwierdzony licznymi eksperymentami opisanymi w literaturze [18,130-133,137-140].

W kolejnym kroku po raz pierwszy miało miejsce poddanie dyspersji liposomowych DPPC pomiarom spektroskopowym w zakresie NIR w celu analizy sygnałów pochodzących od drgań $2\nu_{\text{as,s}}$ grup CH_2 lipidowych łańcuchów alifatycznych i sprawdzenie stopnia korelacji pomiędzy wynikami otrzymanymi dla zakresów MIR i NIR [13,110,134]. Zauważono, iż także w przypadku analizy zakresu NIR na zmierzonych w funkcji temperatury widmach widoczne są analogiczne modyfikacje spektralne badanych sygnałów, czyli obniżenie intensywności, poszerzenie i wysoko-częstościowe przesunięcie maksimum pasm pochodzących od drgań $2\nu_{\text{s}}$ (z 5775 cm^{-1} w fazie żelowej, do 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_{\text{as}}$ (z 5662 cm^{-1} w fazie żelowej, do 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów węglowodoro-

wych cząsteczek lipidów [110,134]. Temperaturowe ewolucje widm FT-IR zmierzonych w zakresie MIR i NIR obejmujących odpowiednio pasma $\nu_{as,s}CH_2$ i $\nu_{as,s}CH_3$ oraz $2\nu_{as,s}CH_2$ i $2\nu_{as,s}CH_3$ dla wodnych dyspersji liposomowych DPPC przedstawione zostały na Rysunku 6.



Rysunek 6. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresach MIR i NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPC

Figure 6. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the MIR and NIR ranges, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPC systems

Przypisania pasm zaprezentowanych powyżej dokonano w oparciu o dane literaturowe [110-112] dotyczące układów lipidowych oraz innych cząsteczek związków organicznych, zawierających w swojej budowie różne fragmenty alifatyczne. Podobnie jak w spotykanych w literaturze przykładach, również w badanych błonach DPPC, zarówno w zakresie MIR jak i NIR, intensywność sygnału pochodzącego od drgań rozciągających asymetrycznych CH_2 jest większa, niż dla pasma drgań rozciągających symetrycznych CH_2 [110-112]. Pasma o niewielkiej intensywności przy 5859 i 5832 cm^{-1} przypisano odpowiednio pierwszym nadtonom drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych terminalnych grup CH_3 wchodzących w skład łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów. Zgodne z danymi literaturowymi [110,141], nieco zmodyfikowane względem zakresu MIR, wzajemne położenie pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}CH_2$ oraz $2\nu_{as,s}CH_3$ zostało również zaobserwowane w przypadku analizowanych systemów lipidowych, a ilość grup metylenowych (15) i metylowych (1) w szesnastowęglowych łańcuchach alifatycznych cząsteczek badanych lipidów ma swoje odzwierciedlenie w intensywności sygnałów.

Proces głównego przejścia fazowego, czyli wynikająca ze zmiany konformacji wiązań (*trans-gauche*) między atomami węgla w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów modyfikacja strukturalna dwuwarstwy ze ściśle upakowanej, uporządkowanej

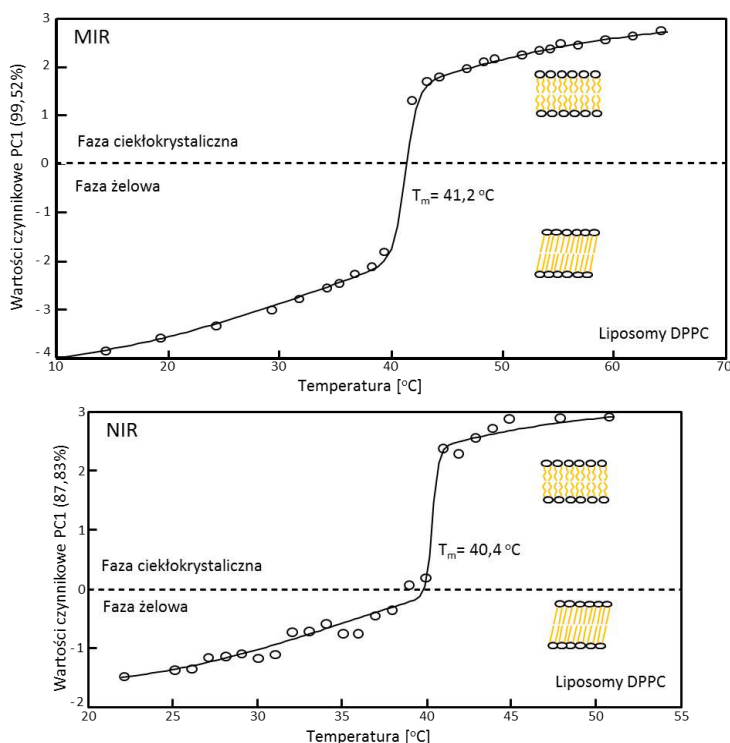
(faza żelowa) do bardziej płynnej i rozluźnionej (faza ciekłokrystaliczna) znajduje swoje odzwierciedlenie w zmianie opisanych powyżej parametrów spektralnych widm modulowanych temperaturą układów liposomowych. Obie przedstawione metody pomiarowe opierające się na analizie odmiennych zakresów spektralnych dają spójne wyniki: ewolucja położenia i kształtu pasm $2\nu_{as,s}CH_2$ była analogiczna z kierunkiem zmian położenia i kształtu pasm $\nu_{as,s}CH_2$.

Użycie narzędzi chemometrycznych w kolejnym kroku analizy umożliwiło uzyskanie z wyższą dokładnością większej ilości informacji o modyfikacjach strukturalnych związanych z obserwowanymi na widmach zmianami spektralnymi. W przypadku analizowanych układów informacji takich dostarczyła, pozwalająca na redukcję wielowymiarowości danych, analiza czynników głównych (PCA).

Analiza PCA widm modelowych błon DPPC zmierzonych w zakresie MIR i NIR

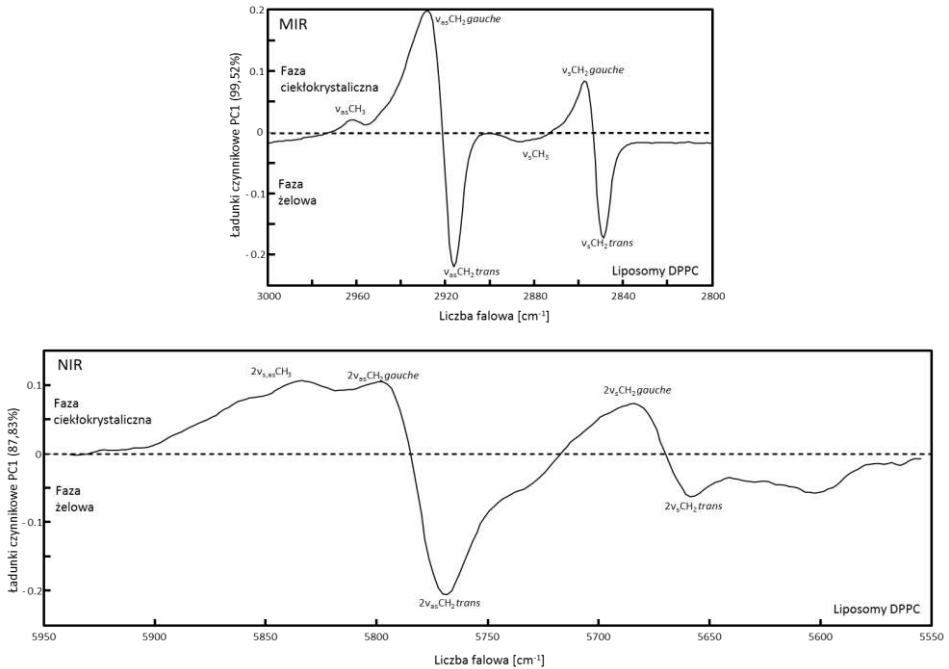
– modele PCA zostały sporządzone oddzielnie dla każdego z poddanych analizie zakresów. W obu przypadkach przeważającą część (MIR: 99,52%, NIR: 87,83%) obserwowanych na widmach absorpcyjnych zmienności zachodzących w układzie przypisano jednemu, głównemu procesowi związanemu ze zmianą temperatury. Za pozostały udział w całkowitej zmienności absorbancji odpowiadają nie tylko obserwowane na widmach szumy, ale również inne losowe zmiany absorbancji związane z nieoptymalną korekcją linii bazowej oraz odjęciem widma wody od widma badanej dyspersji liposomowej. Na widmach mierzonych techniką FT-IR wszystkich opisanych w tej pracy rodzajów układów błonowych pojawiały się incydentalne modyfikacje absorbancji o analogicznym podłożu. Obliczenia modelu PCA przeprowadzone zostały na macierzy stworzonej z mierzonych w funkcji temperatury widm liposomów DPPC. W rejonie średniej podczerwieni analizie PCA poddano zakres $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, zaś w rejonie bliskiej podczerwieni zakres $5940-5555\text{ cm}^{-1}$.

Konstruowanie modelu PCA, na którego podstawie wyznaczone zostały udziały poszczególnych czynników w całkowitej zmienności absorbancji w układzie, składało się z kilku kroków, mających na celu wyekspozowanie maksymalnej ilości informacji z danych wyjściowych. I tak dzięki odpowiedniej projekcji danych otrzymano dla zakresów MIR i NIR wykresy wartości czynnikowych, na których graficznie zilustrowane zostały korelacje pomiędzy mierzonymi w kolejnych temperaturach widmami. Wykresy te przedstawione zostały na **Rysunku 7**.



Rysunek 7. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPC mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresach MIR i NIR
 Figure 7. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPC liposomes measured by vibrational spectroscopy in the MIR and NIR ranges

Zaprezentowane na **Rysunku 7** wykresy przedstawiają krzywe sigmoidalne wygenerowane przez dopasowanie funkcji do otrzymanych w analizie PCA punktów układających się specyficznie na płaszczyźnie wartości czynnikowe – temperatura. Zbliżonym wartościom czynnikowym dla czynnika pierwszego przypisuje się znaczne podobieństwo opisywanych przez nie widm. Z kolei duża zmiana wartości czynnikowych, odczytywana jest jako tożsama z widmami znacznie się od siebie różniącymi [130]. Równocześnie z wykresami wartości czynnikowych w funkcji temperatury, wygenerowane zostały wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej, które pokazują odpowiadającą udziałowi czynnika pierwszego, zmianę absorbancji przy poszczególnych wartościach liczb falowych w analizowanym zakresie spektralnym w całkowitej zmienności spektralnej układu. Duża wartość ładunku czynnikowego oznacza, iż zmiany absorbancji przy danej wartości liczby falowej mają znaczny wkład w zachodzący w układzie proces [125]. Ładunki czynnikowe wskazujące, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych w zakresach MIR i NIR zaobserwować można największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej, zaprezentowane zostały na **Rysunku 8**.



Rysunek 8. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPC mierzonych w zakresach MIR i NIR
 Figure 8. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPC liposomes measured in the MIR and NIR ranges

Sigmoidalny kształt obu, tzn. wygenerowanych dla zakresów MIR i NIR, wykresów wartości czynnikowych w funkcji temperatury jest charakterystyczny dla układów lipidowych, w których zachodzi zjawisko głównego przejścia fazowego [130]. Ujemne wartości czynnikowe opisują dwuwarstwę w fazie żelowej, zaś dodatnie przypisywane są błonie w stanie ciekłokrystalicznym, co można było stwierdzić porównując zależności wartości czynnikowych z odpowiadającymi im zmianami na wykresach ładunków czynnikowych. Z miejsca przebiegu krzywej sigmoidalnej, określającego, między którymi mierzonymi w funkcji temperatury widmami występują największe różnice spektralne, wyznaczone zostały wartości temperatur głównych przejść fazowych, które wynoszą odpowiednio: dla regionu MIR: $T_m = 41,2$ °C, dla NIR: $T_m = 40,4$ °C. Wartości te są do siebie zbliżone i zgodne z danymi literaturowymi [130,142,143].

Wygenerowane wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej dla obu studiowanych rejonów spektralnych pozwoliły na charakterystykę stanu konformacyjnego badanej błony w obu fazach oraz określenie kierunku zmian konformacyjnych zachodzących podczas głównego przejścia fazowego. W niskotemperaturowej fazie żelowej ładunki czynnikowe posiadały charakterystyczne dla bogatej w konformery *trans* fazy żelowej ujemne wartości, których maksima zlokalizowane były w pozycjach odpowiednio dla rejonu MIR 2850 i 2917 cm^{-1} , a dla rejonu NIR 5662 i 5775 cm^{-1} . Z kolei nieuporządkowaną, wysokotemperaturową fazę ciekłokrystaliczną cechuje występowanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych właściwych występowaniu sygnałów w rejonie MIR 2853 i 2923 cm^{-1} i NIR 5672 i 5785 cm^{-1} , będących następstwem drgań rozciągających

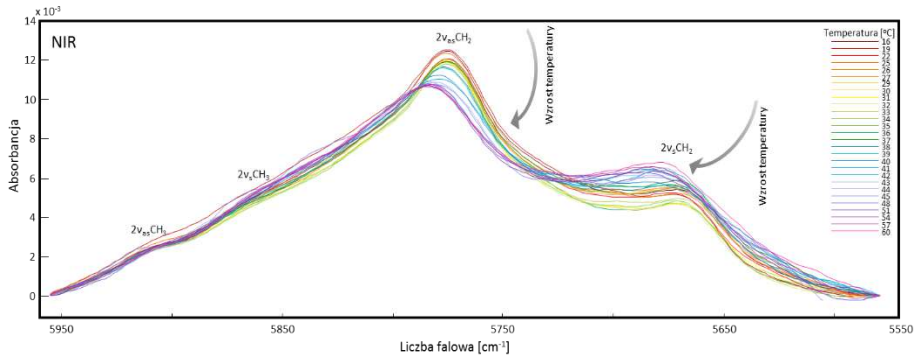
symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych, w których zaobserwować można pojawienie się między atomami węgla wiązań w konformacji *gauche*. Również pojawienie się mało intensywnych maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych odpowiadających pasmom podstawowym i pierwszym nadtonom drgań $\nu_{as,s}$ terminalnych grup CH_3 w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów sugeruje znaczne rozluźnienie struktury bilamelarnej w fazie ciekłokrystalicznej, dzięki którym możliwe są intensywne ruchy konformacyjne w obrębie końcowych fragmentów łańcuchów alifatycznych molekuł budujących dwuwarstwę [82,130]. Wszystkie powyższe rozważania prowadzą do konkluzji, iż wygenerowany w analizie PCA pierwszy czynnik (PC1) zarówno w przypadku regionu MIR jak i NIR opisuje ten sam proces – główne przejście fazowe błon DPPC.

Otrzymane wyniki wskazują, iż technika NIR może być z powodzeniem stosowana do śledzenia procesu głównego przejścia fazowego i innych temperaturowo-zależnych zmian w wodnych dyspersjach liposomowych, jako metoda alternatywna do stosowanej powszechnie w badaniach tego typu systemów spektroskopii oscylacyjnej w zakresie MIR.

Badania NIR modelowych błon DPPG – oprócz najpowszechniej występujących w większości żywych komórek lipidów zwitterjonowych, jak np. fosfatydylocholin, istotne znaczenie dla struktury i funkcji mają również, zawierające się w mniejszym procencie całkowitej ilości lipidów błonowych, lipidy ujemnie naładowane, do których zaliczyć można między innymi fosfatydyloglicerole [144-146]. Budowa i funkcje biologiczne wielu enzymów, białkowych kanałów jonowych (np. potasowych) czy receptorów (np. acetylocholinowych) są często utrzymywane i modulowane przez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi lipidami błonowymi [147-150].

Modelowe dwuwarstwy DPPG studiowano z pomocą spektroskopii NIR a analizie poddano pasma pochodzące od drgań $2\nu_{as,s}$ grup CH_2 budujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidów [13,110,135]. Na zmierzonych metodą NIR w funkcji temperatury widmach błon DPPG zaobserwowano szereg modyfikacji spektralnych badanych sygnałów, takich jak: spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej i batochromowe przesunięcie maksimów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów alifatycznych molekuł lipidów [110,135]. Temperaturowo-zależne modyfikacje fragmentów widm NIR zawierających pierwsze nadtony pochodzące od drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych w łańcuchach alifatycznych cząsteczek lipidów niedomieszkowanych dyspersji liposomowych DPPG pokazano na **Rysunku 9**.

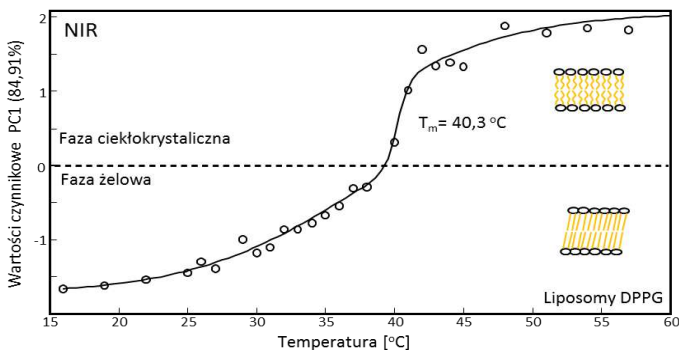
Układ pasm będących efektem drgań grup metylowych i metylenowych cząsteczek DPPG jest taki sam, jak w przypadku molekuł DPPC. Powodem tego może być między innymi fakt, iż hydrofobowy fragment obu poddanych analizie lipidów jest identyczny. Uzyskanie szczegółowych danych dotyczących zachodzących w analizowanym układzie modyfikacji strukturalnych generujących zmiany spektralne na zmierzonych w funkcji temperatury widmach NIR, możliwe było dzięki zastosowaniu analizy PCA. Jej przeprowadzenie pozwoliło na śledzenie procesu głównego przejścia fazowego błon DPPG, będącego konsekwencją modyfikacji konformacyjnych *trans/gauche* w obrębie wiązań C-C łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów, warunkujące przejście fazowe dwuwarstwy DPPG z fazy żelowej charakteryzującej się znacznym uporządkowaniem i ścisłym upakowaniem do fazy ciekłokrystalicznej, którą cechuje bardziej płynna i rozluźniona struktura.



Rysunek 9. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPG

Figure 9. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPG systems

Analiza PCA widm modelowych błon DPPG zmierzonych w zakresie NIR – model PCA wyliczony został dla analizowanego zakresu spektralnego, w którym dokonano pomiarów niedomieszkowanych bilamelarnych układów DPPG w funkcji wzrastającej temperatury. Przeważająca część (84,91%) pojawiających się na widmach zmian absorbancji w układzie odpowiada głównemu procesowi strukturalnemu generowanemu zmianą temperatury. Resztę wkładu w całkowitą zmienność absorbancji miały zauważalne na widmach szumy a także pozostałe, losowe zmiany absorbancji wynikające z nieprecyzyjnego odjęcia widm wody od widm dyspersji liposomowych lub nieidealnej korekcją linii bazowej. Analogicznie jak dla czystych liposomów DPPC, także dla ujemnie naładowanych liposomów DPPG obliczenie modelu PCA wykonano na macierzy uzyskanej z połączenia mierzonych w funkcji temperatury widm, w zakresie $5940\text{--}5555\text{ cm}^{-1}$. Korelacje pomiędzy mierzonymi w kolejnych temperaturach widmami przedstawione zostały jako zależność wartości czynnikowych od temperatury na **Rysunku 10**.

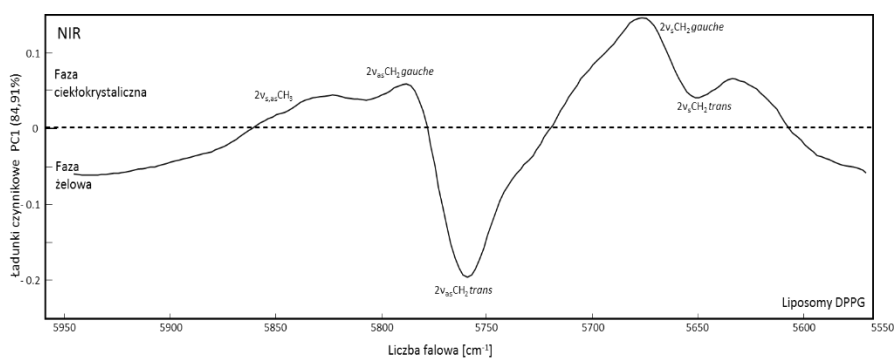


Rysunek 10. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPG mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 10. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPG liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Skonstruowanie modelu PCA umożliwiło monitorowanie przebiegu procesu zachodzącego w poddawanych analizie błonach DPPG. Przedstawiony powyżej wykres

wartości czynnikowych w funkcji temperatury pozwala wnioskować o podobieństwie (zbliżone wartości czynnikowe) bądź odmienności (odległe wartości czynnikowe) między charakteryzowanymi przez nie widmami. Znaczna zmiana wartości czynnikowych, świadczy o znacznym wkładzie poszczególnych widm w zmienność absorbancji opisanej za pomocą czynnika pierwszego. Obok wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury, w toku analizy PCA wygenerowano również wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej, który dla czynnika pierwszego (PC1), ilustruje udział zmian absorbancji w analizowanym zakresie spektralnym wynikających z modyfikacji strukturalnych wywołanych zajściem procesu głównego przejścia fazowego. Na **Rysunku 11** pokazane zostały ładunki czynnikowe w funkcji liczb falowych. Na wykresie tym zaobserwować można, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych dostrzegalne są największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej.



Rysunek 11. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPG mierzonych w zakresie NIR

Figure 11. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPG liposomes measured in the NIR range

Analiza PCA umożliwiła otrzymanie dla niskotemperaturowej fazy żelowej maksimum ładunków czynnikowych o ujemnej wartości zlokalizowanym w pozycji charakterystycznej (5775 cm^{-1}) dla pasma pochodzącego od pierwszego nadtonu drgań rozciągających asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów alifatycznych znajdujących się w konformacji *trans*. Nieuporządkowaną, wysokotemperaturową fazę ciekłokrystaliczną cechuje zaś występowanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych właściwych występowaniu sygnałów odpowiednio przy 5672 i 5785 cm^{-1} , będących następstwem pierwszego nadtonu dla drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych, w których zaobserwować można pojawienie się między atomami węgla wiązań w konformacji *gauche*. Również powstawanie dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych odpowiadających sygnałom pierwszych nadtonów drgań $2\nu_{s,as}$ terminalnych grup CH_3 łańcuchów węglowodorowych molekuł lipidów dowodzi, że w układzie następuje rozluźnienie struktury bilamelarnej w fazie ciekłokrystalicznej, dzięki któremu możliwe są ruchy konformacyjne w obrębie końcowych odcinków łańcuchów alifatycznych cząsteczek budujących dwuwarstwę [82,130]. O zachodzeniu zjawiska głównego przejścia fazowego w badanym układzie lipidowym świadczy również charakterystyczny, sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury [130]. Uporządkowaną dwuwarstwę w fazie żelo-

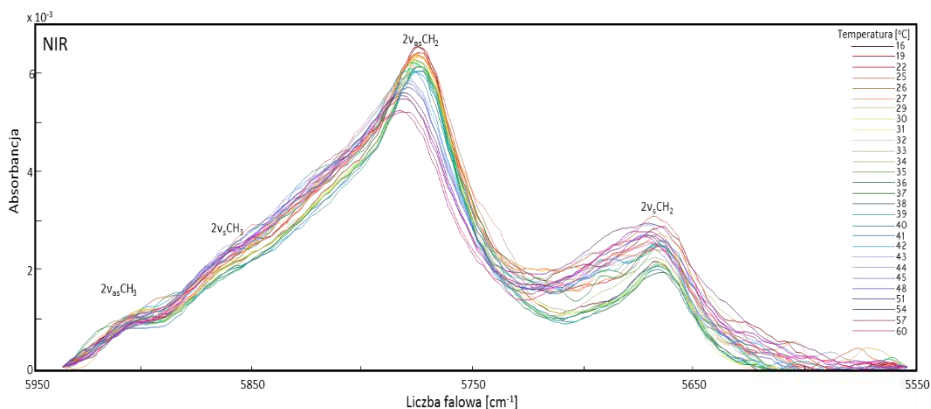
wej obrazują ujemne wartości czynnikowe, z kolei rozluźnionej błonie w fazie ciekłokrystalicznej odpowiadają dodatnie wartości czynnikowe. Temperatura głównego przejścia fazowego analizowanego systemu bilamelarnego wyznaczona została w miejscu przecięcia krzywej sigmoidalnej, które tożsame jest z największymi zmianami parametrów spektralnych między kolejnymi widmami mierzonymi w funkcji temperatury. Tak wyznaczona wartość $T_m = 40,3$ °C, co jest zgodne z danymi literaturowymi [33,45,96,142,143,151-153]. Przeprowadzone badania modelowych błon ujemnie naładowanych molekuł DPPG i ich interpretacja pozwalają postulować, że otrzymany w analizie PCA pierwszy czynnik opisuje ten sam proces, który zachodzi również w zwitterjonowych dwuwarstwach zbudowanych z cząsteczek DPPC, czyli główne przejście fazowe.

Badania NIR modelowych błon DPPC/Chol – cholesterol, jak już wspomniano, jest jednym ze steroli wchodzących w skład błon biologicznych. Jego cząsteczki mają zdolność do wbudowywania się w określone miejsce dwuwarstw lipidowych [34-44]. Istotną jego funkcją jest zdolność do modyfikowania właściwości fizykochemicznych dwuwarstw lipidowych. Wpływ stężenia cholesterolu na rozluźnienie błony w fazie żelowej, jej usztywnienie w fazie ciekłokrystalicznej i wynikający z tego faktu spadek kooperatywności a finalnie zupełny zanik przejścia fazowego modelowych dwuwarstw, jest powszechnie znany [37,38,45-51,154-156]. Stężenie Chol zostało odpowiednio dobrane tak, aby przejście fazowe było nadal obserwowalne, podczas gdy jego kooperatywność została znacznie obniżona [34,38,45-51].

Badania rozpoczęto od pomiarów modelowych błon lipidowych DPPC domieszkowanych Chol w stężeniu 10 mol%. Pomiarów dyspersji liposomowych DPPC/Chol w funkcji temperatury dokonano wykorzystując spektroskopię NIR. Charakterystykę modyfikacji strukturalnych zachodzących w analizowanym układzie oparto o zmiany spektralne pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}$ grup CH_2 budujących łańcuchy acylowe molekuł lipidów [13,110,136]. Zmiany te przejawiały się jako spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej i przesunięcie w kierunku wyższych wartości liczb falowych maksimów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów [110,136]. **Rysunek 12** przedstawia spowodowane wzrostem temperatury zmiany spektralne na fragmentach widm NIR obejmujących pierwsze nadtony drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek DPPC w układach DPPC/Chol.

Również na powyższym rysunku widoczny jest charakterystyczny dla fosfolipidów układ pasm będący konsekwencją drgań grup CH_2 i CH_3 łańcuchów alifatycznych w cząsteczkach lipidów. Na temperaturowo-zależną ewolucję sygnałów składa się spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz ich wysoko-częstościowe przesunięcie. Podłoża takich modyfikacji parametrów spektralnych dopatrywać się należy w wynikającym ze wzrostu temperatury przyroście populacji konformerów *gauche* wiązań między grupami CH_2 znajdującymi się w obrębie łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów. Stąd wniosek, iż zwiększenie temperatury w błonach DPPC/Chol skutkuje zachodzeniem głównego przejścia fazowego (uporządkowana faza żelowa \rightarrow rozluźniona faza ciekłokrystaliczna) związanego z izomeryzacją *trans/gauche* wiązań C-C w acylowych łańcuchach lipidowych. Przeprowadzona na zmierzonych techniką NIR w funkcji wzrastającej temperatury widmach dyspersji liposomowych DPPC/Chol analiza PCA potwierdziła te przypuszczenia oraz dostarczyła kompleksowych informacji dotyczących zmian spektra-

lnych, u których podłoża leżą modyfikacje strukturalne mające miejsce w studiowanym układzie.

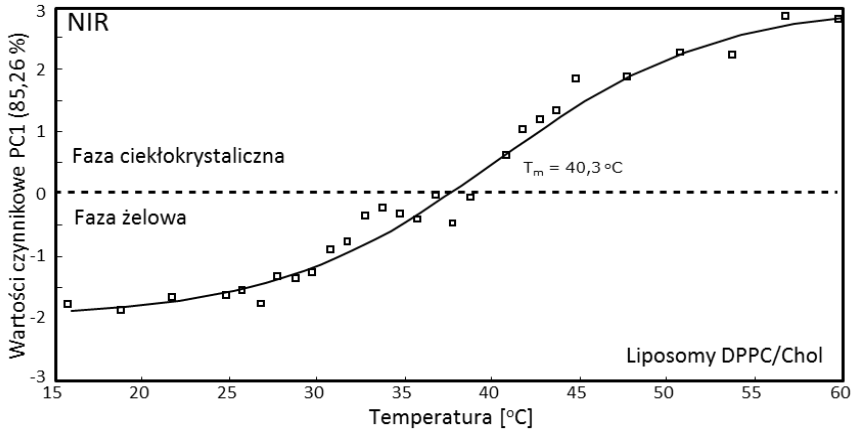


Rysunek 12. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPC/Chol

Figure 12. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPC/Chol systems

Analiza PCA widm modelowych błon DPPC/Chol zmierzonych w zakresie NIR – mierzone w zakresie NIR w funkcji temperatury widma bilamelarnych układów DPPC/Chol poddane zostały analizie PCA, która umożliwiła wygenerowanie modelu opisującego fluktuacje charakteryzowanego systemu. Zachodzący w układzie temperaturowo-zależny proces, którego przebieg monitorowano, generował dominujący procent (85,28 %) widocznych na widmach absorpcyjnych zmienności. U podłoża reszty całkowitej zmienności absorbancji leżą takie zjawiska, jak przypadkowe zmiany absorbancji wynikające z niedokładnej korekcji linii bazowej, czy nieidealnego odjęcia widma wody od widma liposomów, a także widoczne na widmach szumy. Zarejestrowane w funkcji wzrastającej temperatury widma dyspersji liposomowej DPPC/Chol stanowiły składowe macierzy, która posłużyła do obliczenia modelu PCA. Analizie PCA poddano zakres 5940-5555 cm^{-1} .

Analogicznie jak w przypadku modeli PCA sporządzanych dla wcześniej analizowanych układów, również w przypadku modelowych błon DPPC/Chol wyznaczenie udziałów poszczególnych czynników w całkowitej zmienności absorbancji w systemie doprowadziło do otrzymania maksymalnej ilości informacji z danych wyjściowych. Optymalna projekcja danych umożliwiła uzyskanie wykresu wartości czynnikowych, obrazującego wzajemne powiązania między widmami NIR zarejestrowanymi w funkcji wzrastającej temperatury. **Rysunek 13** ilustruje opisane wyżej korelacje.

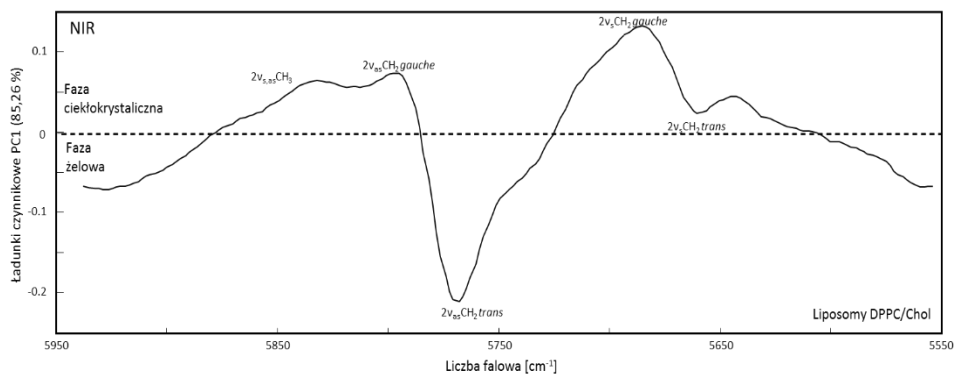


Rysunek 13. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPC/Chol mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 13. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPC/Chol liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Charakterystyczna relacja między uzyskanymi z analizy PCA punktami odpowiadającymi wartościom czynnikowym otrzymanym dla widm mierzonych w kolejnych temperaturach, pozwoliła na dopasowanie do ich przebiegu krzywej, która ma kształt sigmoidalny. Ze zbliżonymi wartościami czynnikowymi dla czynnika pierwszego utożsamiany jest paralelizm widm przez nie charakteryzowanych. Znaczna zmiana wartości czynnikowych cechuje z kolei widma zdecydowanie się od siebie różniące.

Oprócz wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury, z analizy PCA uzyskano także wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej. Wykres ten przedstawia modyfikacje absorbancji przy kolejnych wartościach liczb falowych w poddanym analizie zakresie spektralnym, która odpowiada udziałowi czynnika pierwszego w całkowitej zmienności spektralnej układu. Znaczna wartość ładunku czynnikowego sugeruje duży udział zmian absorbancji przy danej wartości liczby falowej w proces mający miejsce w badanym systemie. Na **Rysunku 14** przedstawiono wykres ładunków czynnikowych, na którym zilustrowane zostało, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach absorpcyjnych NIR zauważalne są największe zmiany odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej.



Rysunek 14. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPC/Chol mierzonych w zakresie NIR

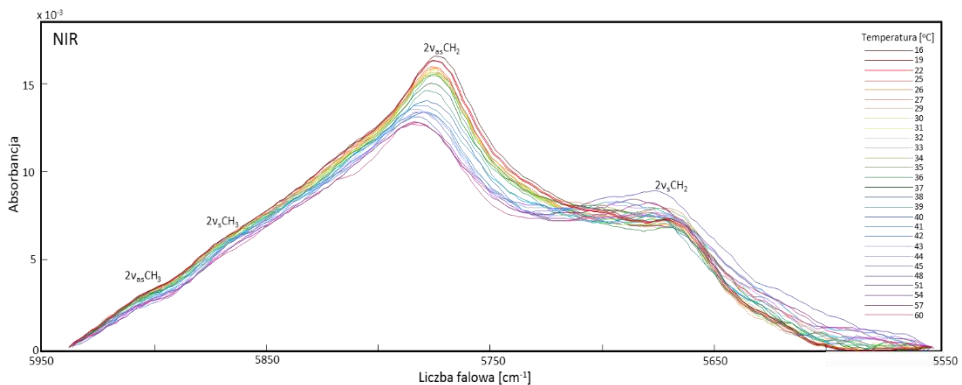
Figure 14. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPC/Chol liposomes measured in the NIR range

Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych w funkcji temperatury jest typowym dla tego rodzaju systemów efektem mającym miejsce w studiowanym układzie lipidowym DPPC/Chol procesu głównego przejścia fazowego. Ujemne wartości czynnikowe charakteryzują modelową błonę w niskotemperaturowej fazie żelowej. Dodatnie utożsamiane są z kolei z wysokotemperaturowym stanem ciekłokrystalicznym dwuwarstwy. Stwierdzenie to opiera się na porównaniu zależności wartości czynnikowych z adekwatnymi zmianami na wykresach ładunków czynnikowych. Kształt przebiegu krzywej wartości czynnikowych w funkcji temperatury dla lipidowych systemów DPPC/Chol jest jednak znacznie bardziej „płaski” i nie tak „skokowy”, jak miało to miejsce w przypadku analogicznego wykresu niedomieszkiwanego cholesterolu czystych błon DPPC. Podłoża takiego efektu doszukiwać się należy we wspomnianym już w niniejszej pracy spadku kooperatywności głównego przejścia fazowego determinowanego przez obecność w strukturze błon lipidowych molekuł Chol [34,37,38,45-51]. Do wyznaczenia wartości temperatury głównego przejścia fazowego posłużyło zlokalizowanie miejsca przegięcia krzywej sigmoidalnej, determinujące równocześnie, między którymi mierzonymi w funkcji temperatury widmami pojawiają się największe różnice spektralne. Dla układu DPPC/Chol wartość ta wynosiła $T_m = 40,3$ °C i korelowała z danymi literaturowymi [142,143].

Wykresy ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej dla poddanego analizie zakresu spektralnego umożliwiły przeprowadzenie analizy stanu konformacyjnego modelowej dwuwarstwy DPPC/Chol w każdej z faz oraz ustalenie kierunku modyfikacji stanu konformacyjnego obserwowanych w trakcie trwania procesu głównego przejścia fazowego. Niskotemperaturową fazę żelową cechowało występowanie ładunków czynnikowych z maksimami zlokalizowanymi w pozycjach 5662 i 5775 cm^{-1} , mających wartości ujemne utożsamiane ze znaczną liczebnością konformerów *trans*. Zaś dla wysokotemperaturowej fazy ciekłokrystalicznej charakterystyczna jest obecność dodatnich maksimów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych 5672 i 5785 cm^{-1} . Są one efektem drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych łańcuchów węglowodorowych bogatych w wiązania w konformacji *gauche* między atomami węgla.

Kolejnym dowodem na rozluźnienie struktury dwuwarstwowej w fazie ciekłokrystalicznej i wynikające z tego wzmożone ruchy konformacyjne w obszarze końcowych fragmentów łańcuchów alifatycznych cząsteczek tworzących błonę, jest pojawienie się maksimum ładunków czynnikowych o niewielkiej intensywności przy wartościach liczb falowych odpowiadającym drganiom $2\nu_{as,s}$ terminalnych grup CH_3 [82,279]. Podsumowując – w inkorporowanych cząsteczkami Chol modelowych błonach DPPC, podobnie, jak w przypadku czystych dyspersji liposomowych DPPC zachodzi temperaturowo-zależny proces głównego przejścia fazowego, który zdefiniowany został dzięki otrzymanemu w analizie PCA pierwszemu czynnikowi (PC1).

Badania NIR modelowych błon DPPG/Chol – do uzyskania pełnego obrazu dotyczącego poziomu oddziaływania molekuł Chol na poddane analizie układy błonowe, przeprowadzono analogiczne, jak dla obojętnych błon DPPC/Chol badania posiadających ujemny ładunek w hydrofilowym obszarze dwuwarstwy systemów DPPG/Chol. W poddanej analizie układzie DPPG/Chol udział molowy cholesterolu wynosił 10 mol%. Pomiary przy pomocy spektroskopii NIR przeprowadzone zostały w funkcji temperatury na dyspersjach liposomowych DPPG/Chol. Analizowano zachodzące w obrębie hydrofobowych fragmentów dwuwarstw lipidowych modyfikacje strukturalne, których odzwierciedlenie spektralne znaleźć można w interpretacji zmian parametrów pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as,s}$ CH_2 [13,110]. Ewolucje spektralne wspomnianych sygnałów opierały się na spadku ich intensywności, wzroście szerokości połówkowej oraz wysoko-częstotściowym przesunięciu maksimum pasm pochodzących od drgań $2\nu_{as}$ (5775 cm^{-1} w fazie żelowej, 5785 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) i $2\nu_s$ (5662 cm^{-1} w fazie żelowej, 5672 cm^{-1} w fazie ciekłokrystalicznej) grup CH_2 łańcuchów acylowych cząsteczek lipidów tworzących modelowe błony lipidowe [110]. Zależne od temperatury modyfikacje rejonów widm NIR zawierających pierwsze nadtony drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych w łańcuchach alifatycznych molekuł DPPG układów liposomowych DPPG/Chol, ilustrujących reorganizację hydrofobowego obszaru analizowanych dwuwarstw, przedstawione zostały na **Rysunku 15**.



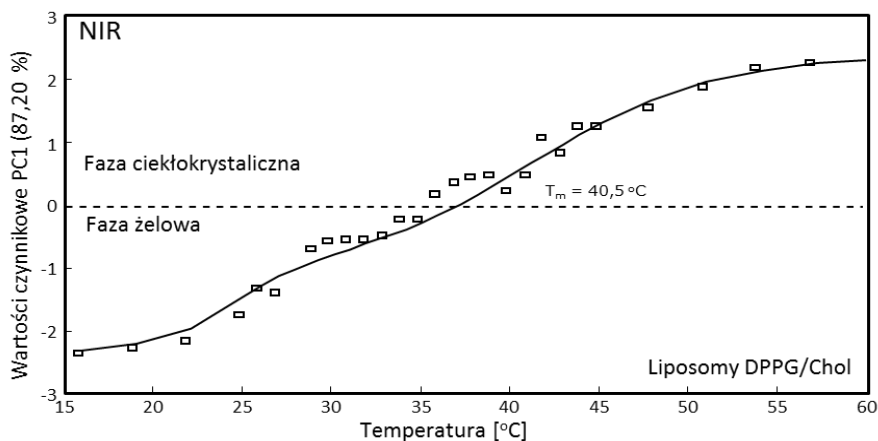
Rysunek 15. Temperaturowo-zależne zmiany spektralne na widmach w zakresie NIR, pozwalające na monitorowanie procesu przejścia fazowego w systemach lipidowych DPPG/Chol

Figure 15. Temperature-dependent spectral changes in spectra in the NIR range, allowing the monitoring of the phase transition in lipid DPPG/Chol systems

Określona konfiguracja sygnałów będąca następstwem drgań grup metylenowych i metyloowych w łańcuchach węglowodorowych molekuł lipidów zilustrowana została na

powyższym rysunku. Modyfikacje spektralne wynikające z podwyższenia temperatury układu podczas pomiarów są skorelowane ze wzrostem udziału konformerów *gauche* w wiązaniach C-C w obrębie hydrofobowego obszaru dwuwarstw DPPG/Chol. Analiza PCA wspomnianego zakresu pozwoliła na otrzymanie wyczerpujących informacji odnośnie molekularnego podłoża zachodzących w układzie zmian. Powiązano je z głównym przejściem fazowym modelowych dwuwarstw DPPG/Chol z uporządkowanej fazy żelowej do rozluźnionej fazy ciekłokrystalicznej będącego rezultatem izomeryzacji *trans/gauche* grup CH₂ łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów analizowanych błon.

Analiza PCA widm modelowych błon DPPG/Chol zmierzonych w zakresie NIR – przeprowadzona została na zakresie spektralnym monitorującym temperaturowo-zależne modyfikacje w układzie DPPG/Chol. Dominująca składowa (87,20 %) widocznych na widmach NIR zmienności w analizowanym systemie determinowana jest zachodzeniem pod wpływem wzrostu temperatury głównego procesu strukturalnego. Na całkowitą zmienność absorbancji odpowiadają poza tym dostrzegalne na widmach losowe modyfikacje absorbancji, których podłożem są nieidealne odjęcie widm wody od widm dyspersji liposomowych oraz nieprecyzyjna korekcja linii bazowej jak również dostrzegalne na widmach szumy. Macierz otrzymana dzięki połączeniu zarejestrowanych w funkcji temperatury fragmentów widm NIR w zakresie 5940-5555 cm⁻¹ posłużyła do obliczenia modelu PCA. Korelacje pomiędzy widmami w kolejnych temperaturach zaprezentowano na **Rysunku 16** jako zależność wartości czynnikowych w funkcji temperatury.

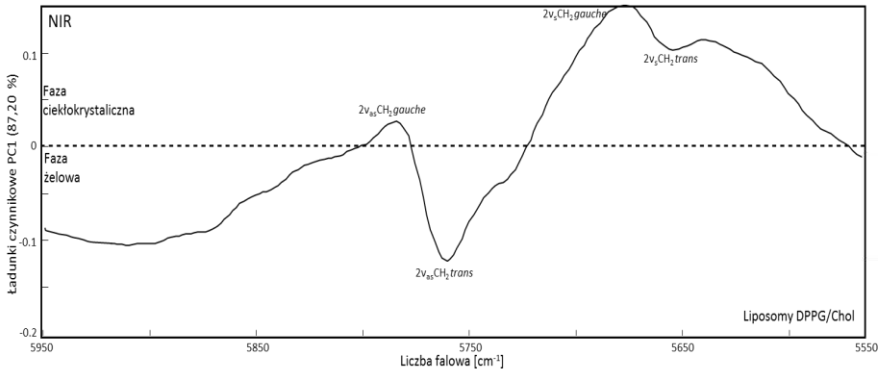


Rysunek 16. Sigmoidalny kształt wykresu wartości czynnikowych PC1 w funkcji temperatury liposomów DPPG/Chol mierzonych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR

Figure 16. Sigmoidal shape of the plot of scores on PC1 as a function of the temperature of DPPG/Chol liposomes measured by vibrational spectroscopy in the NIR range

Monitorowanie przebiegu procesu mającego miejsce w studiowanych modelowych błonach DPPG/Chol możliwe było dzięki stworzeniu modelu PCA. Zaprezentowany na **Rysunku 16** wykres wartości czynnikowych w funkcji temperatury charakteryzuje poziom podobieństwa ilustrowanych przez nie widm. Przebieg punktów definiujących wartości czynnikowe w kolejnych temperaturach ma charakterystyczny dla układów lipidowych sigmoidalny kształt. Z analizy PCA otrzymano również wykres wartości ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej. Obrazuje on zmiany absorbancji przy

określonych wartościach liczb falowych w badanym zakresie spektralnym determinowane zmianami strukturalnymi związanymi z przebiegiem procesu głównego przejścia fazowego. **Rysunek 17** przedstawia wykres ładunków czynnikowych w funkcji liczb falowych, na którym zauważyć można, przy jakich wartościach liczb falowych na widmach NIR pojawiają się największe zmiany odpowiednio dla fazy żelowej oraz ciekłokrystalicznej.



Rysunek 17. Wykres ładunków czynnikowych PC1 w funkcji liczby falowej liposomów DPPG/Chol mierzonych w zakresie NIR

Figure 17. Plot of the loadings on PC1 in the function of wavenumber of DPPG/Chol liposomes measured in the NIR range

Przeprowadzenie analizy PCA pozwoliło na określenie rodzaju zachodzącego w badanym układzie DPPG/Chol procesu. Przebieg wykresu wartości czynnikowych wyznaczanych w funkcji wzrastającej temperatury ma typowy dla układów modelowych dwuwarstw fosfolipidowych, sigmoidalny kształt, wynikający z zachodzącego w nim procesu głównego przejścia fazowego. Ujemne wartości czynnikowe cechują niskotemperaturową fazę żelową modelowej błony DPPG/Chol, zaś dodatnie odzwierciedlają wysokotemperaturowy stan ciekłokrystaliczny bilamelarnego systemu. Podstawą do wysnucia takiego wniosku są relacje między wykresem wartości czynnikowych i wykresem ładunków czynnikowych.

Analogicznie jak dla układów DPPC/Chol, również w przypadku domieszkowanych cholesterolom ujemnie naładowanych błon DPPG zauważalny jest „spłaszczony” kształt krzywej wartości czynnikowych w funkcji temperatury w stosunku do czystych dwuwarstw DPPG. Widoczny spadek kooperatywności przejścia fazowego zachodzącego w modelowych błonach DPPG/Chol wynika z występowania cząsteczek cholesterolu w strukturze analizowanych systemów [34,37,38,45-51]. Wyznaczenie wartości temperatury głównego przejścia fazowego Układu DPPG/Chol możliwe było dzięki zlokalizowaniu miejsca przegięcia krzywej sigmoidalnej definiującej, między którymi widmami rejestrowanymi w funkcji temperatury widoczne są największe zmiany parametrów spektralnych. Otrzymana wartość $T_m = 40,5$ °C, jest zgodna ze znanymi danymi literaturowymi [142,143].

Klasyfikacja stanu konformacyjnego modelowej błony DPPG/Chol odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej a także określenie tendencji jego zmian wynikających z faktu zachodzenia procesu głównego przejścia fazowego możliwe było dzięki analizie wykresów ładunków czynnikowych w funkcji liczby falowej charakteryzowanego zakresu spektralnego. Niskotemperaturowa faza żelowa określona

została przez ujemne wartości ładunków czynnikowych z maksimum w pozycji 5775 cm^{-1} , za które odpowiada znaczna ilość konformerów *trans*. Z kolei wysokotemperaturowej fazie ciekłokrystalicznej odpowiada obecność dodatnich maksimumów ładunków czynnikowych przy wartościach liczb falowych 5672 i 5785 cm^{-1} . Maksima te są konsekwencją drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów alifatycznych bogatych w konformery *gauche* między atomami węgla [82,136]. Ilustrowany przez otrzymany z analizy PCA pierwszy czynnik główny, potwierdza, iż proces głównego przejścia fazowego zachodzi pod wpływem wzrostu temperatury w układzie DPPG/Chol, analogicznie, jak w niedomieszkowanych molekułami cholesterolu ujemnie naładowanych dwuwarstw DPPG.

UWAGI KOŃCOWE

W prezentowanych badaniach zastosowano po raz pierwszy analizę pierwszych nadtonów drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów budujących struktury dwuwarstwowe do określenia przejść fazowych mających miejsce w strukturach liposomowych. Podłoża strukturalnego wspomnianych przejść fazowych upatrywać należy w modyfikacjach konformacyjnych *trans/gauche* wiązań między atomami węgla w łańcuchach węglowodorowych stanowiących hydrofobową część poddawanych analizie modelowych błon lipidowych. Ewolucja parametrów spektralnych zarówno dla drgań ν_s i ν_{as} grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów jak i ich pierwszych nadtonów przebiegała w sposób analogiczny. Wykazano zatem, że metoda spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR może z powodzeniem stanowić alternatywę stosowanej powszechnie techniki FT-IR w zakresie MIR, gdy np. istnieją techniczne przeszkody uniemożliwiające zastosowanie tej drugiej.

Analiza widm zmierzonych dla układów błonowych techniką spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR w funkcji wzrastającej temperatury umożliwiła zaobserwowanie ewolucji szeregu parametrów spektralnych tj. spadek intensywności, wzrost szerokości połówkowej oraz przesunięcie w kierunku wyższych wartości liczb falowych maksimumów pasm pochodzących od drgań $2\nu_s$ i $2\nu_{as}$ grup CH_2 łańcuchów węglowodorowych cząsteczek lipidów. Dzięki zastosowaniu analizy PCA możliwe było wyodrębnienie obszarów na widmach absorpcyjnych, w których pod wpływem temperatury zaobserwowano największe zmiany parametrów spektralnych odpowiednio w fazie żelowej i ciekłokrystalicznej badanej błony. Analiza PCA pozwoliła również na uzyskanie informacji na temat ewolucji procesu głównego przejścia fazowego, który ma miejsce w hydrofobowym obszarze dwuwarstw lipidowych, a także na określenie wartości temperatur głównego przejścia fazowego dla wszystkich mierzonych układów błonowych.

Porównanie fosfolipidów charakteryzujących się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi miało na celu na uzyskanie wielostronnego i przez to bardziej obiektywnego obrazu zjawisk obserwowanych w modelowych błonach lipidowych oraz odniesienie ich do tych mających miejsce w różnych obszarach naturalnych dwuwarstw. Realizacja postawionego w niniejszym eksperymencie zadania była możliwa dzięki wykorzystaniu techniki spektroskopii oscylacyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR) i bliskiej podczerwieni (NIR), w funkcji wzrastającej temperatury, wspomaganą, w celu wyodrębnienia specyficznej wariacji wywołanej badanym efektem, analizą chemometryczną PCA. Spektroskopia FT-IR w zakresie NIR zastosowana została po raz pierwszy do monitorowania modyfikacji zachodzących w hydrofobowym rejonie mode-

lowych dwuwarstw lipidowych. Wykazano, iż z powodzeniem może ona stanowić alternatywę do używanej powszechnie w badaniu tego rodzaju układów techniki FT-IR w zakresie MIR.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Budowa i dynamika błony, w *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [2] A. Kozubek, A. F. Sikorski, J. Szopa, Molekularna organizacja komórki, t. II: Lipidy, liposomy i błony biologiczne, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 1996.
- [3] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła, Błony biologiczne, Śląsk – Wydawnictwo Naukowe, Katowice – Warszawa, 2003.
- [4] L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.
- [5] M. Bryszewska, W. Leyko, *Biofizyka dla biologów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997.
- [6] A. Kozubek, *Wstęp do technologii liposomowej*, Wrocław 2004.
- [7] J. R. Trudell, D. G. Payan, J. H. Chin, E. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **373**, 436.
- [8] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, G. Poste, G. Shepherd, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **394**, 504.
- [9] J. M. Vanderkooi, R. Landesberg, H. Selick II, G. G. McDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **464**, 1.
- [10] H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **779**, 381.
- [11] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J. M. Ruyschaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1422**, 105.
- [12] P. Garidel, A. Blume, W. Hübner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1466**, 245.
- [13] J. M. Chlammers, P. R. Griffith, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, t. 1-5, John Wiley & Sons, London, 2002.
- [14] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1996.
- [15] A. S. Kassis, *Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy (ATR-IR) as an In Situ Technique for Dissolution Studies*, Seton Hall University, 2011.
- [16] L. Piel, *Idee chemii kwantowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006.
- [17] K. Cieślík-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, A. Koll, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15495.
- [18] K. Cieślík-Boczula, B. Czarnik-Matuszewicz, M. Perevozkina, A. Filarowski, N. Boens, W. M. de Borggraeve, A. Koll, *J. Mol. Struct.*, 2008, **878**, 162.
- [19] R. A. Dluhy, S. M. Stephens, S. Widayati, A. D. Willims, *Spectrochim. Acta A*, 1995, **51**, 1413.
- [20] H. Fabian, C. P. Schultz, *Fourier transform infrared spectroscopy of peptide and protein analysis*, w: R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [21] L. K. Tamm, S. A. Tatulian, *Q Rev. Biophys.*, 1997, **30**, 365.
- [22] J.L.R. Arrondo, F. M. Goñi, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **96**, 53.
- [23] H. R. Matthews, R. A. Freedland, R. I. Miesfeld, *Biochemia i biologia molekularne w zarysie*, Wydawnictwo Prószyński i S-ka, Warszawa, 2000.
- [24] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, *Biology*, Thomson Books/Cole, Belmont USA, 2008.
- [25] M. Pasenkiewicz-Gierula, *KOSMOS*, 2009, **58**, 49.
- [26] G. Karp, *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, John Wiley, 2010.
- [27] B. Alberts, *Podstawy biologii komórek 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005.
- [28] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill Jr., R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Sepner, G. Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2005, **107**, 337.
- [29] J. Ulander, A. D. J. Haymet, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3475.
- [30] R. Harrison, G. G. Lunt, *Błony biologiczne struktura i funkcje*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1980.

- [31] A. Blume, Lipids, w D. Waltz, J. Teissie, G. Milazzo (Eds.) *Biochemistry of Membranes*, Birkhäuser, Verlag Basel/Switzerland, 2004.
- [32] A.S. Janoff, K.W. Miller, w D. Chapman (Ed.), *Biological Membranes*, t. 4 (strony: 417-467), Academic Press, New York, 1982.
- [33] M. F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen, T. Heimburg, *PNAS*, 1999, **96**, 14312.
- [34] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte, *Prog. Lipid. Res.*, 2002, **41**, 393.
- [35] M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Róg, K. Kitamura, A. Kusymi, *Biophys. J.*, 2000, **78**, 1376.
- [36] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2009, **1788**, 97.
- [37] T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2004, **8**, 459.
- [38] O. Soubias, F. Jolibois, A. Milon, V. Réat, *Compets. Rendus. Chimie*, 2006, **9**, 393.
- [39] A.M. Smondyrev, M.L. Berkowitz, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2075.
- [40] D. Marquardt, N. Kučerka, S.R. Wassall, T.A. Harroun, J. Katsaras, *Chem. Phys. Lipids*, 2016, **199**, 17.
- [41] National Center for Biotechnology Information, USA.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>, 2017 (dostęp: 8.11.2017).
- [42] N. Borochof, E.J. Wachtel, D. Bach, *Chem. Phys. Lipids*, 1995, **76**, 85.
- [43] P.W.M. van Dijk, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **555**, 89.
- [44] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochem.*, 1993, **32**, 516.
- [45] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 345.
- [46] K.M.G. Taylor, R.M. Morris, *Thermochim. Acta*, 1995, **248**, 289.
- [47] M.G.K. Benesch, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids*, 2015, **191**, 123.
- [48] M.G.K. Benesch, R.N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids*, 2016, **195**, 21.
- [49] M.G.K. Benesch, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 168.
- [50] F. de Meyer, B. Smit, *PNAS*, 2009, **106**, 3654.
- [51] E. Gorter, F. Grendel, *J. Experiment. Med.*, 1925, **41**, 439.
- [52] B. D. Hames, N. M. Hooper, J. D. Houghton, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
- [53] J. S. Singel, G. L. Nicolson, *Science*, 1972, **175**, 720.
- [54] J. Koolman, K. H. Roehm, *Color atlas of biochemistry*, Thieme, New York, 2005.
- [55] P. A. Mayes, *Lipidy o znaczeniu fizjologicznym*, D. K. Granner, Błony: struktura, organizacja i funkcja, w *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998.
- [56] C. A. Ville, *Błony plazmatyczne*, w *Biologia*, Wydanie VIII według VII wydania amerykańskiego, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1987.
- [57] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2002.
- [58] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 2012, **1**, 147.
- [59] Y. P. Patil, S. Jadhav, *Chem. Phys. Lip.*, 2014, **177**, 8.
- [60] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, *ISRN Pharm*, 2012, **2012**.
- [61] V. V. Mody, M. I. Nounou, M. Bikram, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 795.
- [62] J. S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari, *Int. J. Pharm. Stud. Res.*, 2012, **3**, 14.
- [63] K. P. S. Kumar, D. Bhowmik, L. Deb, *Pharma Innovation*, 2012, **3**, 29.
- [64] H. Anwekar, S. Patel, A. K. Singhai, *Int. J. Pharm. Life Sciences*, 2011, **2**, 945.
- [65] A. D. Bangham, *Adv. Lipid Res.*, 1963, **1**, 63.
- [66] D. Papahadjopoulos, N. Miller, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1967, **135**, 624.
- [67] D. Papahadjopoulos, J. C. Watkins, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1967, **135**, 639.
- [68] G. Sessa, G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, 1968, **9**, 310.
- [69] A. Sharma, U.S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, 1997, **154**, 123.
- [70] A. Gómez-Hens, J. M. Fernández-Romero, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 9.
- [71] D. D. Lasic, *Biochem. J.*, 1988, **256**, 1.
- [72] D. D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, 1993.
- [73] A. Wagner, K. Vorauehr-Uhl, *J. Drug. Deliv.*, 2011, **2011**, 1.

- [74] N. Düzgüneş, G. Gregoriadis, Introduction: the origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham (strony: 1-3), D. Nejat (Ed.), *Methods in enzymology*, Academic Press, San Diego, 2005.
- [75] C. H. Huang, *Biochem.*, 1969, **8**, 344.
- [76] R. H. Müller, G. E. Hildebrand, R. Jachowicz, A. A. Kubicz, J. Klawe, M. Bröker, *Technologia nowoczesnych postaci leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2003.
- [77] Y. Barenholtz, S. Amselem, D. Lichtenberg, *FEBS Lett.*, 1979, **99**, 210.
- [78] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1979, **557**, 9.
- [79] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1376**, 91.
- [80] K. Brandenburg, P. Garidel, J. Howe, J. Andrä, L. Hawkins, M. H. J. Koch, U. Sydel, *Thermochim. Acta*, 2006, **445**, 133.
- [81] D. Chapman, *Q Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [82] K. Cieślik, A. Koll, J. Grdadolnik, *Vibr. Spectr.*, 2006, **41**, 14.
- [83] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 711.
- [84] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers*, w P. L. Yeagle, *The Structure of Biological Membranes*, CRC Press, 2004.
- [85] A. Henrich, K. Michalak, *Ćwiczenia laboratoryjne z biofizyki*. Skrypt dla studentów medycyny, Wyd. Akademii Medycznej we Wrocławiu, Wrocław, 2002.
- [86] J. M. Seddon, R. H. Templer, *Polymorphism of lipid – water systems* w R. Lipowsky, E. Sackman (Eds.), *Handbook of Biological Physics*, t. 1 (strony: 97-151), Elsevier Science B. V., 1995.
- [87] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **96**, 9.
- [88] T. Le Bihan, M. Pezolet, *Chem. Phys. Lip.*, 1998, **94**, 13.
- [89] E. Okamura, J. Umemura, T. Takenaka, *Vibr. Spectr.*, 1991, **2**, 95.
- [90] D. M. Small, R. A. Zoeller, *Lipids, Structure and Biochemistry*, w *Encyclopedia of Human Biology*, t. 4 (strony: 725-748), Academic Press, Inc., 1991.
- [91] D. Marsh, *Chem. Phys. Lip.*, 165 (2012) 59-76.
- [92] S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R. M. Suter, C. R. Worthington, W. J. Sun, J. F. Nagle, *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1097.
- [93] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**, 2347.
- [94] N. Kučerka, M. P. Nieh, J. Katsaras, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1808**, 2761.
- [95] A. I. Boyanov, R. D. Koynova, B. G. Tenchov, *Chem. Phys. Lip.*, 1986, **39**, 155.
- [96] K. A. Riske, R. P. Barroso, C. C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V. B. Henriques, M. T. Lamy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 954.
- [97] M. Kranenburg, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 6553.
- [98] J. M. Rodgers, J. Sørensen, F. J. M. de Meyer, B. Schiott, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 1551.
- [99] M. Eeman, M. Deleu, *Biotechnol. Argon Soc. Environ.*, 2010, **14**, 719.
- [100] D. Chapman, *Q Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [101] S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **79**, 3862.
- [102] M. Budai, Zs. Szabó, M. Szógyi, P. Gróf, *Int. J. Pharma*, 2003, **250**, 239.
- [103] N. Usova, L. Persson, P.-O. Westlund, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 2785.
- [104] M. Raguz, L. Mainali, J. Widomska, W. K. Subczyński, *Chem. Phys. Lip.*, 2011, **164**, 819.
- [105] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, *Int J Pharm*, 2011, **417**, 138.
- [106] B. Ruozzi, D. Belletti, A. Tombesi, G. Tosi, L. Bondioli, F. Forni, M.A. Vandelli, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 557.
- [107] N. Škalko, J. Bouwstra, F. Spies, M. Stuart, P. M. Frederik, G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1370**, 151.
- [108] K.A. Okotrub, S.Y. Amstislavsky, N.V. Surovtsev, *Arhiv. Biochem. Biophys.*, 2017, **635**, 37.
- [109] X. Bin, I. Zawisza, J. D. Goddard, J. Lipkowski, *Langmuir*, 2005, **21**, 330.
- [110] J. Workman Jr., L. Weyer, *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*, 2nd Edn., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2012.
- [111] M. Buback, A. A. Harfoush, *Z. Naturforsch. A*, 1983, **38**, 528.
- [112] L. Ricard-Lespade, G. Longhi, S. Abbate, *Chem. Phys.*, 1990, **142**, 245.
- [113] J. Mazerski, *Chemometria z lotu ptaka*, w: D. Zuba, A. Parczewski (Eds.), *Chemometria w nauce i praktyce*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2009.

- [114] N. Kumar, A. Bansal, G. S. Sarma, R. K. Rawal, *Talanta*, 2014, **123**, 186.
- [115] I. Singh, P. Juneja, B. Kaur, P. Kumar, *ISRN Anal. Chem.*, 2013, **2013**, 1.
- [116] R. G. Brereton, *Analyst.*, 1987, **112**, 1635.
- [117] B. Krakowska, D. Custers, E. Deconinck, M. Daszykowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **127**, 112.
- [118] E. Szymańska, J. Gerretzen, J. Engel, B. Geurts, L. Blanchet, L. M. C. Buydens, *Trends Anal. Chem.*, 2015, **69**, 34.
- [119] M. Daszykowski, B. Walczak, *Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych*, w: D. Zuba, A. Parczewski (Eds.), *Chemometria w analityce*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2008.
- [120] T. Laskowski, J. Mazerski, *Chemometria w praktyce. Ćwiczenia laboratoryjne*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2011.
- [121] J. Kupis, *Chemometria*, w: J. Kupis, M. Skowron-Jaskólska, D. Szczukocki, B. Krawczyk, *Metrologia i Chemometria w Analityce Środowiska*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 2016.
- [122] J. Mazerski, *Podstawy chemometrii*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2000.
- [123] A. Astel, J. Mazerski, J. Namieśnik, *Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach analitycznych środowiska*, w: J. Namieśnik, W. Czrzanowski, P. Szpinek (Eds.), *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiska*, Centrum Dokładności Analityki i Monitoringu Środowiska, Gdańsk, 2003.
- [124] J.E. Jackson, *A User's Guide to Principal Components*, Wiley & Sons, New York, 1991.
- [125] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz, *Chemometrics: a Practical Guide*, Wiley, 1998.
- [126] O. Y. Rodionova, L. P. Houmøller, A. L. Pomerantsev, P. Geladi, J. Burger, V. L. Dorofeyev, A. P. Arzamastsev, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **549**, 151.
- [127] A. Rohman, Y. B. Che Man, *Vibr. Spectr.*, 2011, **55**, 141.
- [128] A. Porfire, I. Tomuta, L. Tefas, S. E. Leucuta, M. Achim, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **63**, 87.
- [129] H. L. Huang, P. Antonelli, *J. Appl. Meteorol.*, 2001, **40**, 365.
- [130] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, P. Świątek, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, W. Malinka, *Chem. Phys.*, 2015, **458**, 9.
- [131] J. Petrus, B. Czarnik-Matusewicz, R. Petrus, K. Cieślík-Boczula, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, *Chem. Phys. Lip.*, 2015, **186**, 51.
- [132] O. Wesołowska, J. Gąsiorowska, J. Petrus, B. Czarnik-Matusewicz, K. Michalak, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2014, **1838**, 173.
- [133] K. Cieślík-Boczula, *Chem. Phys. Lip.*, 2018, **214**, 24.
- [134] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *Vibr. Spectr.*, 2016, **85**, 55.
- [135] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectr.*, 2017, **186**, 37.
- [136] M. Kuć, K. Cieślík-Boczula, M. Rospenk, *J. Mol. Struct.*, 2018, **1162**, 17.
- [137] A. Murawska, K. Cieślík-Boczula, B. Czarnik-Matusewicz, *J. Mol. Struct.*, 2012, **974**, 183.
- [138] K. Cieślík-Boczula, P. Świątek, A. Jaszczyszyn, P. Zawilska, K. Gąsiorowski, W. Malinka, G. Köhler, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 3605.
- [139] K. Cieślík-Boczula, J. Maniewska, G. Gryniewicz, W. Szeja, A. Koll, A. B. Hendrich, *Vib. Spectrosc.*, 2012, **62**, 64.
- [140] K. Cieślík-Boczula, S. Küpcü, D. Rünzler, A. Koll, G. Köhler, *J. Mol. Struct.*, 2009, **919** 373.
- [141] C. Tosi, A. Pinto, *Spectrochim. Acta A Mol. Spectrosc.*, 1972, **28**, 585.
- [142] A. B. Hendrich, O. Wesołowska, K. Michalak, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1510**, 414.
- [143] Avanti Polar Lipids Inc., *Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids*, <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/> (dost.16.11.17).
- [144] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, **66**, 199.
- [145] J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, *Phospholipids*, Elsevier Biomedical Press, Nowy Jork, 1982.
- [146] R. B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, Nowy Jork, 1989.
- [147] I. Vorobyov, T. W. Allen, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1808**, 1673.
- [148] C. J. DaCosta, S. A. Medaglia, N. Lavigne, S. Wang, C. L. Craswell, J. E. Baenziger, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33841.
- [149] A. M. Powl, J. M. East, A. G. Lee, *Biochemistry*, 2005, **44**, 5873.

- [150] F. I. Valiyaveetil, Y. F. Zhou, R. Mackinnon, *Biochemistry*, 2002, **41**, 10771.
- [151] Y. P. Zhang, R. N. Lewis, R. N. McElhaney, *Biophys. J.*, 1997, **72**, 779.
- [152] J. Pan, F. A. Heberle, S. Tristram-Nahle, M. Szymański, M. Koepfinger, J. Katsaras, N. Kučerka, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1818**, 2135.
- [153] R. M. Epand, B. Gabel, R. F. Epand, A. Sen, S. W. Hui, A. Muga, W. K. Surewicz, *Biophys. J.*, 1992, **63**, 327.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 marca 2023 r.

ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII OSCYLACYJNEJ W DETEKCJI BARWNIKÓW AZOWYCH W OPAKOWANIACH DO ŻYWNOŚCI

APPLICATION OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN THE DETECTION OF AZO DYES IN FOOD CONTACT PACKAGING MATERIALS

**Edyta Kucharska^{1,*}, Jacek Michalski¹, Wojciech
Sąsiadek¹, Lucyna Dymińska¹, Paulina Hołubniak¹,
Jerzy Hanuza²**

¹ *Katedra Chemii Bioorganicznej, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet
Ekonomiczny we Wrocławiu, ul. Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław*

² *Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polska Akademia Nauk,
ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław*

**e-mail: edyta.kucharska@ue.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Struktura związków azowych
2. Charakterystyki oscylacyjne wiązań azowych w pochodnych pirydyny i fenylo-pirydyny
3. Identyfikacja materiału i barwnika kolorowych folii opakowaniowej do makaronu

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Edyta Kucharska Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Chemii Bioorganicznej, Specjalność - technologia żywności i żywienia.

Uzyskała tytuł magistra inżyniera technologii chemicznej (1995, Politechnika Wrocławska), tytuł doktora chemii (2005, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław).

Zajmuje się syntezą azo- i hydrazo-pochodnych pirydyny oraz badaniami spektroskopowymi (IR, Raman, UV-Vis), a także wykonuje obliczenia kwantowo-chemiczne DFT.



<https://orcid.org/0000-0003-0530-6079>



Dr Jacek Michalski Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Chemii Bioorganicznej, Specjalność - technologia żywności i żywienia.

Uzyskał tytuł magistra (1996, Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego o specjalności chemia organiczna) oraz tytuł doktora nauk chemicznych (2005, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław).

Zajmuje się syntezą nowych pochodnych pirydyny oraz ich badaniem metodami spektroskopowymi (IR, Raman, UV-Vis), w powiązaniu z modelowaniem molekularnym.



<https://orcid.org/0000-0001-5393-2109>



Dr Wojciech Sąsiadek Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Chemii Bioorganicznej, Specjalność - technologia żywności i żywienia.

Uzyskał tytuł magistra (2001, specjalność chemia środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego) oraz doktora nauk chemicznych (2007, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław).

Zajmuje się badaniami spektroskopowymi (IR, Raman, UV-Vis) m.in. różnych materiałów biologicznych oraz siarkowych pochodnych pirydyny, a także wykonuje obliczenia kwantowo-chemiczne DFT.



<https://orcid.org/0000-0001-6927-6759>



Dr hab. Lucyna Dymińska Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Chemii Bioorganicznej, Specjalność - technologia żywności i żywienia.

Uzyskała tytuł magistra biotechnologii (1996, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego), doktora chemii (2008, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław) oraz doktora habilitowanego nauk rolniczych (2019, Instytut Agrofizyki, Lublin).

Zajmuje się badaniem składu chemicznego produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego metodami spektroskopowymi. W swoich badaniach wykorzystuje obliczenia chemii kwantowej oraz matematyczne dopasowywanie widm teoretycznych i eksperymentalnych, co ułatwia przypisanie najbardziej charakterystycznych pasm cząsteczkom aktywnym biologicznie.



<https://orcid.org/0000-0001-8044-6835>

Inż. Paulina Hołubniak uzyskała tytuł inżyniera na kierunku Zarządzanie i Inżynieria Produkcji o specjalności - inżynieria produktów chemicznych (2023, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu). Zdobywała doświadczenie zawodowe w firmach Incora w roku 2021 oraz Parker Hannifin w 2022 na stanowiskach biurowo-księgowych. Obecnie pełni funkcję młodszego specjalisty ds. księgowości i finansów w przedsiębiorstwie będącym producentem stali.



Prof. Jerzy Hanuza Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Chemii Bioorganicznej, dyscyplina: chemia fizyczna i teoretyczna; spektroskopia ciała stałego, fizykochemia związków organicznych, bioorganicznych i kompleksowych; nanotechnologia; fizykochemia i technologia żywności.

Uzyskał tytuł magistra chemii (1964, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Wrocławski), dr nauk chemicznych (1972, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław, chemia fizyczna i teoretyczna), dr hab. (1987, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN, Wrocław, chemia fizyczna i teoretyczna) oraz tytuł profesora (1993).



<https://orcid.org/0000-0002-9493-4140>

ABSTRACT

This work is a continuation of our research on spectroscopic and structural properties and applications of a number of azo-dipyridine and phenyl-azopyridine derivatives. In the previous works, the results of DFT quantum calculations were used to discuss infrared and Raman spectra. The presented study generalizes these results using the literature data on the structure of aromatic azo compounds. Analysis of the spectra and detailed assignment of the observed bands to the specific oscillating modes enables their application to identification of azo dyes widely used in the food industry. The bioactivity of azo dyes means that the safety of their use requires the search for new methods of their detection in food. The paper shows that vibrational spectroscopy is an effective diagnostic method for identifying not only the material from which the plastic foil is made, but also the dye used for its dyeing. In this work, the method was applied to colour plastic foils used as pasta packaging. It has been shown that this foil is made of polypropylene, and azo dyes, such as orange yellow (orange dye), tartrazine (yellow dye), allura red (red dye), brilliant blue (blue dye) and a mixture of yellow and blue dyes (green dye) were used for its dyeing.

Keywords: azo-dipyridines and phenyl-azopyridines, crystal structures, IR and Raman spectra, vibrations of azo bridge, azo dyes in food packing

Słowa kluczowe: azo-dipirydyny i fenylo-azopirydyny, struktura krystaliczna, widma IR i Ramana, drgania normalne wiązań azowych, barwniki azowe w opakowaniach żywności

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

IR	– infrared (podczerwień)
b	– broad (szeroki)
m	– medium (średni)
s	– strong (silny)
sh	– shoulder (na zboczu)
v	– very (bardzo)
w	– weak (słaby)
v	– stretching (rozciągające)
δ	– bending (zginające)
ρ	– rocking (wahadłowe)
τ	– twisting (skręcające)
ω	– wagging (wachlarzowe)

WPROWADZENIE

Stosowanie barwników spożywczych od lat budzi wiele kontrowersji z powodu ich wpływu na jakość produktów żywnościowych oraz ich oddziaływania na zdrowie człowieka. Zainteresowanie tymi problemami zainicjowała publikacja przedstawiająca wyniki badań prowadzonych w 2007 r. w Wielkiej Brytanii. Wskazywały one, iż spożycie niektórych syntetycznych barwników może przyczyniać się do nadmiernej aktywności dzieci – barwniki te nazwano „szóstką z Southampton” [1]. Doniesienia te zapoczątkowały narastające niepokoje wśród konsumentów oraz stały się bodźcem do podjęcia szczegółowych badań oceny szkodliwości stosowania tych dodatków do żywności. Wyniki tych badań doprowadziły do szeregu zmian na rynku produktów spożywczych, ich producenci zaczęli modyfikować receptury wyrobów wprowadzając naturalne barwniki zamiast syntetycznych [2,3]. Wyraźnej zmianie uległy przekazy zawarte na etykietach informujących o składzie produktu, stały się bardziej komunikatywne, stosując w miejsce oznaczeń kodowych „E” prostsze nazwy składników. Reakcją producentów barwników na tę sytuację było wprowadzenie naturalnej „żywności barwiącej” zamiast barwników syntetycznych [4,5]. Zaniechanie stosowania barwników syntetycznych nie zostało jednakże w pełni zaakceptowane przez wszystkich producentów żywności [6].

Barwniki spożywcze stanowią jedną z 26 grup substancji dodatkowych do żywności. Definiuje się je jako substancje nadające lub przywracające żywności barwę, oraz jako preparaty uzyskane ze środków spożywczych i jadalnych surowców naturalnych poprzez procesy fizyczne i chemiczne [7]. Ich użycie jest uzasadnione, gdy jego celem jest przywrócenie pierwotnego wyglądu żywności, której barwa uległa zmianie wskutek przetwarzania, przechowywania, pakowania i dystrybucji, lub gdy powoduje poprawę wizualnych atrybutów żywności, lub gdy nadaje barwę żywności, która byłaby bezbarwna [7]. Naganny jest fakt, iż niektórzy producenci żywności posługują się barwnikami w celu zamaskowania niekorzystnych przebarwień, wad lub upodobnienia produktu sztucznego do naturalnego, zafałszowania składu lub poprawy efektu wizualnego [8]. Niedozwolone jest także użycie barwników dla ukrycia objawów zepsucia lub złej jakości produktu, gdyż jest to świadome wprowadzanie konsumenta w błąd. Barwienie żywności nie może szkodzić odbiorcy i musi odbywać się zgodnie z zasadą Dobrej Praktyki Produkcyjnej, czyli w najmniejszej dawce i równocześnie koniecznej dla osiągnięcia zamierzonego efektu technologicznego [9].

Barwniki klasyfikuje się według różnych kryteriów. Dzieli się je na nieorganiczne i organiczne, te drugie na pochodzenia naturalnego i syntetycznego, sztuczne i identyczne z naturalnymi. Barwniki syntetyczne stanowią najliczniejszą grupę dozwolonych barwników do żywności [10]. Syntetyczne barwniki organiczne mają zróżnicowaną strukturę chemiczną nie występującą w produktach naturalnych. W ich skład wchodzi barwniki azowe, triakrylometanowe, ksantenowe, indygooidowe i chinolonowe [11,12].

Mają one wszelkie zalety, których brak barwnikom pochodzenia naturalnego – prezentują szeroką gamę barw wysokiej czystości i intensywności koloru, łatwo się je dozuje, są tanie i wydajne, większość z nich jest łatwo rozpuszczalna w wodzie a nierozpuszczalna w alkoholu i są stabilne fizycznie i chemicznie [11-13].

Barwniki azowe (azoareny) są najliczniejszą klasą barwników spośród obecnie stosowanych. Mają zastosowanie zarówno w przemyśle tekstylnym, farmaceutycznym spożywczym oraz analizie chemicznej. Charakteryzują się obecnością jednej, lub więcej grup azowych, które są chromoforem łączącym dwa układy węglowodorowe tworząc mostek między nimi: $A - N = N - E$, gdzie A jest grupą elektro-akceptorową, a E – elektro-donorową. Zależnie od liczby grup azowych w cząsteczce, rozróżnia się barwniki mono- i poli-azowe. Znaczenie handlowe mają barwniki mono- i di-azowe [12,14,15].

Stosowanie barwników azowych umożliwia uzyskanie całej palety barw. Jest ona zależna od rodzaju, liczby i położenia grup funkcyjnych w pierścieniach aromatycznych. Chromofory aminowe i hydroksylowe odgrywają szczególną rolę, gdyż ułatwiają one procesy sprzęgania oraz pogłębiają barwę. Natomiast reszta sulfonowa zwiększa rozpuszczalność barwnika w wodzie i powinowactwo do określonego podłoża [16]. Na kolor wpływa również struktura barwnika, czy mostki azowe występujące jako sprzężone $Ar-N=N-Ar'-N=N-Ar''$ lub izolowane $Ar-N=N-Ar'-X-Ar'-N=N-Ar$, gdzie X oznacza grupę izolującą, np. metylową, etylenową, iminową, acyloaminową, karbamidową lub atomy tlenu i siarki [14,15]. Układ sprzężony powoduje, iż barwa związku jest głębsza niż dla struktury mono-azowej lub mieszaniny barwników [14,15,17]. Natomiast barwniki z izolowanymi mostkami azowymi wykazują w przybliżeniu barwę odpowiadającą mieszaninie barwników powstających poprzez rozerwanie wiązania wewnątrz grupy izolującej.

Bioaktywność związków azowych jest nadal przedmiotem badań naukowych na temat ich wpływu na organizm człowieka. Wynika to przede wszystkim ze specyficznej drogi ich metabolizmu w układzie pokarmowym. Ponieważ najmniej trwałym składnikiem barwnika jest wiązanie azowe, *in vivo* ulega ono enzymatycznej redukcji pod wpływem enzymu azoreduktazy, który występuje u ssaków w różnych organach wewnętrznych: wątrobie, nerkach, płucach, sercu, mózgu, śledzionie i mięśniach. Największą aktywność wykazuje enzym wątroby i nerek, a także w organizmach różnych szczepów bakterii zasiedlających przewód pokarmowy i zdrową ludzką skórę, np. *Staphylococcus aureus* [18,19]. Redukcja zachodzi również pod wpływem drożdży piekarskich i piwowarskich [1,12]. W wyniku redukcji wiązania azowego powstają aminy, aminy aromatyczne lub kwasy aminosulfonowe. Te ostatnie nie stwarzają zagrożenia, gdyż jako rozpuszczalne w wodzie, są wydalane z organizmu. Największym zagrożeniem są aminy aromatyczne wykazujące działanie rakotwórcze [20]. Mutagenna aktywność barwników zawierających benzydynę, 2-naftyloaminę i 4-aminobifenyl spowodowała wycofanie ich z użycia [18,19]. Metabolizowanie czerwieni 2G (E128) do aniliny również skutkowało zaniechaniem jego stosowania w przemyśle spożywczym w 2007 roku [21]. Zagrożenia ze strony barwników azowych wynikają także z ich oddzia-

ływań z ludzkimi erytrocytami, co może prowadzić do niedokrwistości [1,12]. Niektóre barwniki, np. tartrazyna, mogą powodować reakcje alergiczne [1]. Szczególne zagrożenie barwniki azowe stwarzają osobom wrażliwym na salicylany, gdyż mogą być przyczyną ich szkodliwych nietolerancji [11]. Ponadto niektóre barwniki mogą uwalniać histaminę będącą przekaźnikiem reakcji zapalnej – związek ten gromadzi się w ziarnistościach komórek tłuszczowych, co powoduje skurcz mięśni oskrzelowych, rozszerzenie naczyń krwionośnych lub zwiększenie wydzielania śluzu w drogach oddechowych oraz astmę [22].

Opisana wyżej bioaktywność barwników azowych powoduje, iż bezpieczeństwo ich stosowania wymaga dalszych poszukiwań nowych metod ich detekcji w żywności. Taką możliwość stwarza spektroskopia oscylacyjna, która jest w stanie w sposób jednoznaczny wykryć konkretny barwnik w produkcie spożywczym. Niniejsza praca wykorzystuje tę metodę pomiarową wspartą obliczeniami kwantowymi w celu wykrywania ich obecności w sposób jakościowy i ilościowy.

1. STRUKTURA ZWIĄZKÓW AZOWYCH

Struktura geometryczna i elektryczna związku azowego decyduje o jego właściwościach fizykochemicznych. Dwa atomy azotu o hybrydyzacji sp^2 , z których każdy posiada wolną parę elektronową są połączone wiązaniem podwójnym. Układ ten tworzy dwuwartościową grupę azową. Związki zawierające tę grupę funkcyjną mogą występować w dwu formach, izomerów *trans* (*E*) i *cis* (*Z*). Odwracalny proces izomeryzacji wykorzystuje się do budowy elementów pamięci optycznej, przełączników molekularnych lub konstrukcji sensorów.

Badania strukturalne związków azowych od wielu lat były przedmiotem zainteresowań naukowców. Było to wynikiem stosowania tych połączeń jako barwników tekstyliów, żywności, opakowań oraz środków farmaceutycznych. Najliczniejszą grupę spośród nich stanowią azobenzeny. Ich szkielet jest zbudowany z dwu pierścieni fenyłowych połączonych wiązaniem podwójnym $N = N$, tzw. grupą azową. Azobenzen występuje w postaci pomarańczowych kryształów lub ciemnobrązowego bezpostaciowego ciała stałego. Nie rozpuszcza się w wodzie, natomiast dobrze rozpuszcza się w podstawowych rozpuszczalnikach organicznych (etanol, metanol, benzen). Dzięki obecności wiązania $N = N$ posiada zdolność do fotoizomeryzacji geometrycznej występując w dwóch odmianach *cis* i *trans*. Spektroskopowo, cząsteczki te charakteryzują się niskoenergetycznym pasmem $n - \pi^*$ w obszarze widzialnym i wysokoenergetycznym pasmem $\pi - \pi^*$ w obszarze UV. Izomer *trans* jest bardziej stabilny termodynamicznie niż izomer *cis*, gdyż jest cząsteczką płaską. Struktura pochodnych azobenzenu została opisana w wielu pracach naukowych – wyniki ich badań rentgenowskich przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry geometryczne pochodnych azobenzenu

Table 1. Structural parameters of azobenzene derivatives

Pochodna azobenzenu Struktura	d(C ₁ -N) Å	d(N=N) Å	d(C ₂ -N) Å	∠(C ₁ NN) °	∠(NNC ₂) °	Lit.
<i>trans</i> -azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /a) Z=4 (No. 14)	1,40-1,43	1,23	1,40-1,43	120-123	120-123	[23]
<i>trans</i> -azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /a) Z=2 (No. 14)	1,434	1,247	1,434	111,1-113,6	111,1-113,6	[24]
<i>trans</i> -azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /c) Z=2 (No. 14)	1,428(2)	1,247(2)	1,428(2)	114,1(1)	114,1(2)	[25]
<i>trans</i> -azobenzene/ <i>trans</i> -stilbene (C ₁₄ H ₁₂) _x (C ₁₂ H ₁₀ N ₂) _{1-x} C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /c) Z=2 (No. 14)	1,429	1,250	1,429	113,8	113,8	[26]
(<i>E</i>) azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /c) Z=4 (No. 14)	1,431	1,249	1,431	114,1	114,1	[27]
(<i>E</i>)-2,2'- dimethylazobenzene C _{2h} ³ (C2/c) Z=4 (No. 13)	1,473	1,240	1,473	113,8	113,8	[27]
(<i>E</i>)-3,3'- dimethylazobenzene D _{2h} ¹⁵ (Pbca) Z=4 (No. 61)	1,436	1,246	1,436	113,8	113,8	[27]
(<i>E</i>)-4,4'- dimethylazobenzene C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /a) Z=2 (No. 14)	1,426	1,252	1,434	113,8	113,8	[27]
<i>cis</i> -azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ D _{2h} ¹⁴ (Pbcn) Z=4 (No. 60)	1,46	1,23	1,46	121	121	[28]
<i>cis</i> -azobenzene C ₁₂ H ₁₀ N ₂ D _{2h} ¹⁴ (Pbcn) Z=4 (No. 60)	1,449	1,253	1,449	121,9	121,9	[29]

Długość wiązania N=N w *trans*- i *cis*-azobenzenach i ich pochodnych mieści się w granicach 1,23 – 1,253 Å. Kąt bryłowy formy *trans* jest bliski 15 – 16°, natomiast forma *cis* charakteryzuje się bardziej skrzyśniętą geometrią wynoszącą około 8° (172°).

Odrębną grupę tworzą pochodne (fenyloazo)pirydyny. Opracowanie struktury tej grupy związków w znacznym stopniu jest osiągnięciem autorów niniejszej pracy [30,31]. Parametry geometryczne wiązań azowych w tych połączeniach zestawiono w tabeli 2.

Obliczenia optymalizacji zostały wykonane z zastosowaniem pakietu programu Gaussian 03W metodą DFT (teoria funkcjonału gęstości, ang. density functional theory), używając funkcjonału B3LYP, na poziomie 6-311++G(d,p). Jako bazę optymalizacji przyjęto dane rentgenograficzne, a w przypadku ich braku standardowe odległości i kąty wykorzystywane przy budowaniu struktur cząsteczkowych dostępne w programie GaussView 4.1.

Pochodne azodipirydyny są najmniej zbadaną grupą azopochodnych. Ich parametry strukturalne przedstawia tabela 3.

Tabela 2. Parametry strukturalne wiązania azowego w pochodnych (fenyloazo)pirydyny

Table 2. Structural parameters of azo bond in derivatives of phenylazo-pyridine

Pochodna (fenyloazo)pirydyny Struktura	d(C ₁ -N) Å	d(N=N) Å	d(C ₂ -N) Å	∠(C ₁ NN) °	∠(NNC ₂) °	Lit.
2-fenyloazo-5-nitro-6-methyl- pyridine C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂ C ₁ ¹ (P-1) Z=2 (No. 2)	1,430	1,240	1,421	114,5	116,1	[30]
6-methyl-3,5-dinitro-2-[(E)- phenyldiazenyl]pyridine C ₁₂ H ₉ N ₅ O ₄ C ₃ ³ (Cc) Z=4 (No. 9)	1,426	1,237	1,430	113,2	114,5	[31]
2-fenyloazopyridine (C ₁₁ H ₁₀ N ₃ O _{0.25})(BF ₄) C _{2h} ⁶ (C2/c) Z=8 (No.15)	1,412	1,248	1,411	114,8	113,5	[32]
2-(fenyloazo)pyridine(ClO ₄ ⁻¹) C ₁₁ H ₁₀ N ₃ (ClO ₄) C _{2h} ⁶ (C2/c) Z=8 (No.15)	1,421	1,258	1,417	---	---	[33]
3-(phenyldiazenyl)pyridine C ₁₀ H ₉ N ₃ C _{2v} ² (Pca2 ₁) Z=4 (No. 26)	1,43	1,26	1,43	113,1	113,6	[34]

Tabela 3. Parametry strukturalne wiązania azowego w pochodnych dipirydyn
 Table 3. Structural parameters of azo bond in derivatives of dipirydines

Pochodna bipirydyn Struktura	d(C ₁ -N) Å	d(N=N) Å	d(C ₂ -N) Å	∠(C ₁ NN) °	∠(NNC ₂) °	Lit.
4,4'-dimethyl-3,3'-dinitro- 2,2'-azobipirydine C ₁₂ H ₁₀ N ₆ O ₄ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /c) Z=4 (No. 14)	1,434	1,233	1,435	113,55	114,27	[35,36]
<i>trans</i> -2,2'-azopyridine C ₁₀ H ₈ N ₄ C _{2h} ⁵ (P2 ₁ /c) Z=4 (No. 14)	1,431	1,246	1,431	114,0	114,0	[37]
<i>trans</i> -4,4'-azopyridine C ₁₀ H ₈ N ₄ C _{2h} ² (P2 ₁ /n) Z=2 (No. 11)	---	---	---	---	---	[38]
<i>cis</i> -2,2'-azopyridine C ₁₀ H ₈ N ₄ C _{2h} ⁶ (C2/c) Z=12 (No. 15)	1,4434 (A) 1,4417 (B)	1,2479 (A) 1,2524 (B)	1,4421 (A) 1,4417 (B)	---	---	[39]

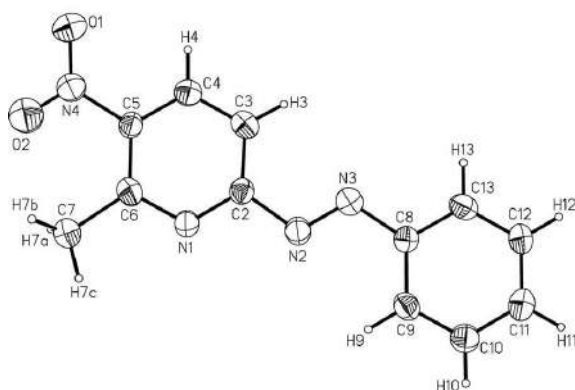
Wyniki badań strukturalnych dibenzenowych, fenylo-pirydynowych i dipirydynowych azo związków świadczą, iż średnie długości wiązań C₁-N i C₂-N wynoszą dla nich odpowiednio: 1,4405 i 1,4505, 1,421 i 1,4205 oraz 1,4375 i 1,4365 Å. Różnice te dla dibenzenów i dipirydyn są niewielkie, ale różnią się od nich długością wiązań fenylazo-pirydyn. Bardziej wyraźnie są różnice między kątami C₁-N-N oraz N-N-C₂, które wynoszą: 113,95 i 114,8° dla dibenzenów, 113,775 i 114,135° dla fenylazo-pirydyn oraz 117,05 i 117,05° dla pochodnych dipirydynowych. Dla wszystkich tych związków wartości kątów bryłowych C₁NNC₂ świadczą, iż ugrupowania te nie leżą na jednej płaszczyźnie, a zatem symetrii wiązań azowych nie można opisywać grupą punktową C_{2h} dla konfiguracji *trans* oraz grupą C_{2v} dla *cis*-azo związków. Potwierdzają to wyniki pomiarów widm IR i Ramana tych połączeń, które świadczą, iż nawet niewielkie zaburzenia tych struktur powodują, iż do analizy widm oscylacyjnych należy stosować symetrię C₁. Jest to tym bardziej uzasadnione, gdy podstawniki obu pierścieni są różne.

2. CHARAKTERYSTYKI OSCYLACYJNE WIĄZAŃ AZOWYCH W POCHODNYCH PIRYDINY I FENYLO-PIRYDINY

Spektroskopia oscylacyjna może być efektywną metodą jakościowej i ilościowej identyfikacji barwników azowych stosowanych w technologii żywności i produkcji opakowań spożywczych. Widma z zakresu podczerwieni są szczególnie przydatne do tych celów ze względu na częste wykorzystywanie ich w analizie chemicznej. Spektro-

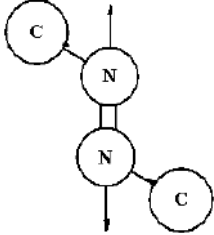
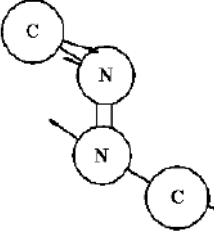
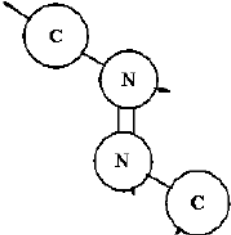
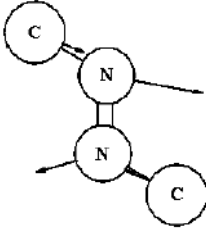
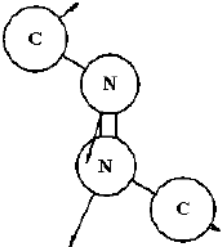
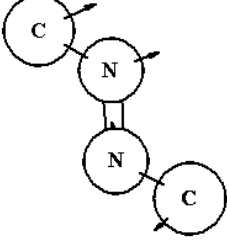
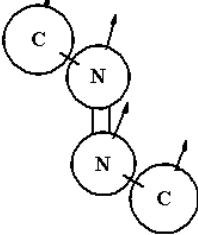
metry na podczerwień są znacznie tańsze niż do pomiarów widm Ramana. Przez długi czas zastosowanie tych metod było ograniczone, gdyż brak polarności grupy azowej powodował, iż identyfikacja tych związków była utrudniona z uwagi na małą intensywność pasm w widmach w podczerwieni. W dodatku, zakresy pasm drgań azowych pokrywały się z drganiami pierścieni aromatycznych. Pasma tych drgań dla połączeń o konformacji *cis* mają większą intensywność niż związków *trans*. Pasma w widmach Ramana również wykazywały większą intensywność. Stosując metodę porównawczą lokalizowano drgania wiązań azowych o konfiguracji *trans* w zakresie 1380-1465 cm^{-1} , a dla form *cis* 1500-1520 cm^{-1} [40]. Położenie pasm drgań rozciągających $\nu(\text{C-N})$ i zginających $\delta(\text{C-N=N})$ proponowano w widmach Ramana około 590 cm^{-1} . Opracowanie szczegółowych charakterystyk oscylacyjnych wiązań azowych w związkach aromatycznych stało się możliwe w wyniku obliczeń kwantowych przeprowadzonych dla szeregu modelowych połączeń: 2-fenylazo-5-nitro-6-metylo-pirydyny [30], 6-metylo-3,5-dinitro-2-[(E)fenylazo]pirydyny [31], 2,2'-azo-bipirydyny i 4,4'-dimetylo-3,3'-dinitro-2,2'-azobipirydyny [35] oraz 3,3'-dinitro-2,2'-azobipirydyny i 4,4' (lub 5,5' lub 6,6')-dimetylo-pochodnych [36].

Właściwości oscylacyjne czteroatomowego mostka azowego $\text{C}_1\text{-N=N-C}_2$ opisywane są przez sześć charakterystycznych drgań normalnych. Są to drgania rozciągające $\nu(\text{C}_1\text{-N})$, $\nu(\text{N=N})$, $\nu(\text{C}_2\text{-N})$, zginające $\delta(\text{C}_1\text{-N=N})$ i $\delta(\text{C}_2\text{-N=N})$ oraz torsyjne $\tau(\text{C}_1\text{NNC}_2)$. Nowe nazewnictwo drgań normalnych tego układu zostało zaproponowane w pracach wykorzystujących kwantowe obliczenia DFT [30,31]. Rysunek 1 przedstawia modelową strukturę 2-fenylazo-5-nitro-6-metylo-pirydyny, dla której opracowano charakterystyki drgań normalnych wiązania azowego, drgania te przedstawiono w tabeli 4.

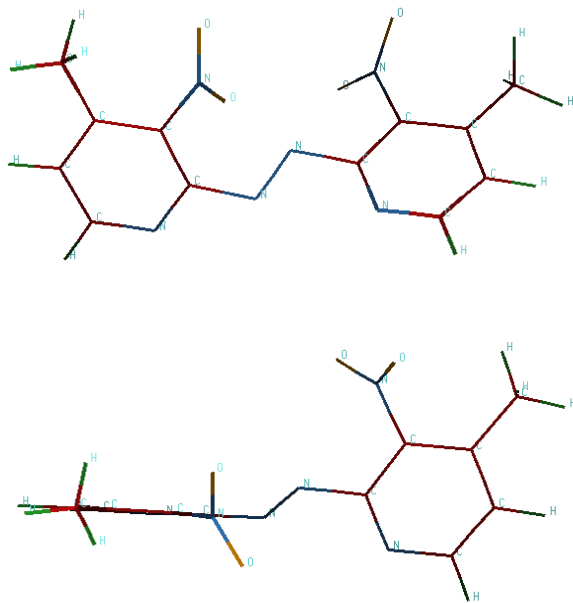


Rysunek 1. Struktura cząsteczki: 2-fenylazo-5-nitro-6-metylo-pirydyny [30]
Figure 1. The structure of 2-phenylazo-5-nitro-6-methyl-pyridine [30]

Tabela 4. Drgania normalne wiązania azowego w pochodnej fenyloazo-pirydyny
 Table 4. Normal vibrations of azo bond in phenylazo-pyridine derivative

	
$\nu(\text{N}=\text{N})$ 1469-1487 cm^{-1}	$\nu_{\text{as}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 1305 cm^{-1}
	
$\nu_{\text{s}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 1266 cm^{-1}	$\delta_{\text{as}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 932-951 cm^{-1}
	
$\delta_{\text{s}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 496-498 cm^{-1}	$\gamma(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 174-189 cm^{-1}
	
$\tau(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 66, 132-137 cm^{-1}	

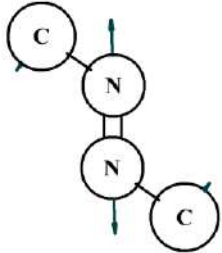
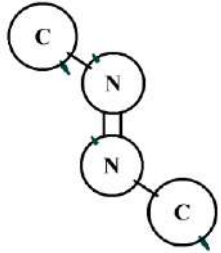
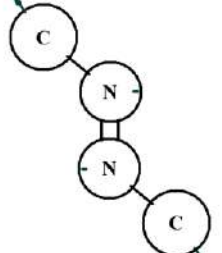
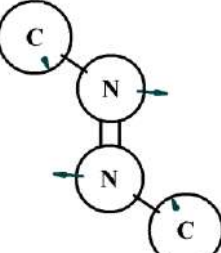
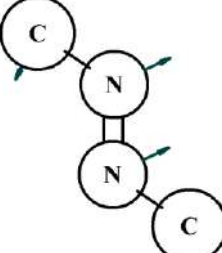
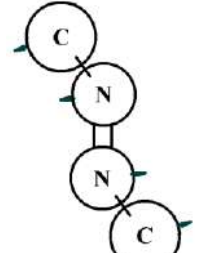
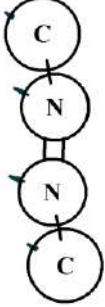
Obliczenia kwantowe wykonano również dla 4,4'-dimetylo-3,3'-dinitro-2,2'-azobipirydyny [35] będącej modelowym układem pochodnej azobipirydyny – jego strukturę ilustruje rysunek 2. Charakterystykę drgań oscylacyjnych tego związku przedstawia tabela 5.



Rysunek 2. Struktura 4,4'-dimetylo-3,3'-dinitro-2,2'-azobipirydyny
Figure 2. The structure of 4,4'-dimethyl-3,3'-dinitro-2,2'-azobipiridine

Wyniki pomiarów widm w podczerwieni i Ramana analizowanych przy pomocy obliczeń kwantowych wykazały, iż charakterystyczne dla wiązań azowych oscylacje obserwuje się dla pochodnych fenilo-azopirydyny w następujących zakresach liczb falowych: $\nu(\text{NN})$ 1469-1490 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 1300-1310 cm^{-1} , $\nu_{\text{s}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 1260-1270 cm^{-1} , $\delta_{\text{as}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 930-960 cm^{-1} , $\delta_{\text{s}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 490-500 cm^{-1} oraz $\tau(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 60-140 cm^{-1} . Dla pochodnych azobipirydyny liczby falowe tych oscylacji przesuwają się w kierunku mniejszych wartości, zwłaszcza gdy obydwa pierścienie pirydynowe tych związków zawierają masywne podstawniki. Wówczas drgania wiązań azowych występują w zakresach: $\nu(\text{NN})$ 1420-1455 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 1210-1220 cm^{-1} , $\nu_{\text{s}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 1180-1190 cm^{-1} , $\delta_{\text{as}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 920-930 cm^{-1} , $\delta_{\text{s}}(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 630-640 cm^{-1} oraz $\tau(\text{C}_1\text{NNC}_2)$ 85-100 cm^{-1} . Dane te można wykorzystać do identyfikacji materiałów stosowanych do produkcji opakowań spożywczych.

Tabela 5. Drgania normalne wiązania azowego w pochodnej azobipirydyny
 Table 5. Normal vibrations of azobond in azobipyridine derivative

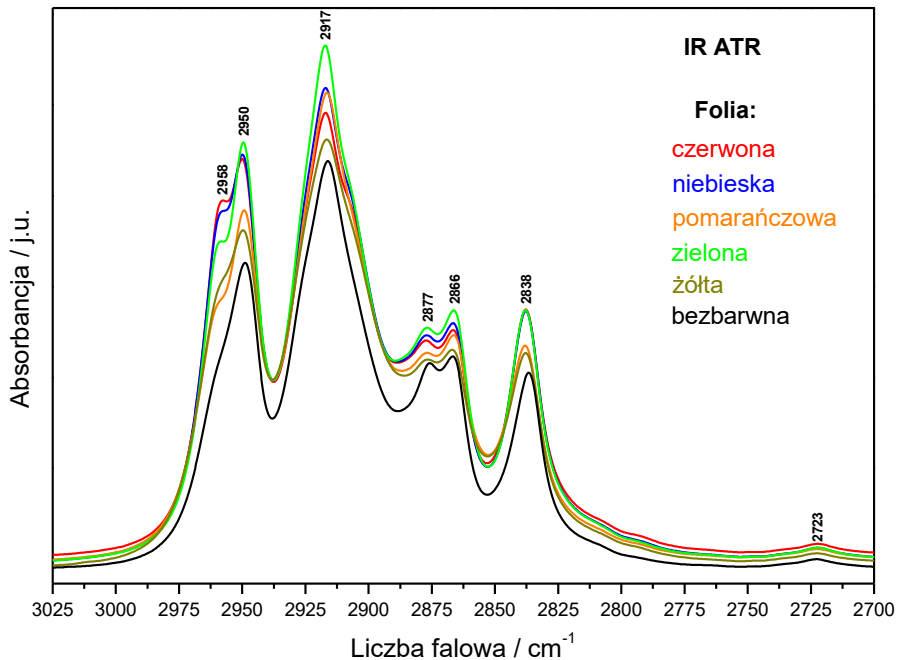
	
$\nu(\text{N}=\text{N})$ 1420-1452 cm^{-1}	$\nu_{\text{as}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 1212 cm^{-1}
	
$\nu_{\text{s}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 1186-1190 cm^{-1}	$\delta_{\text{as}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 926 cm^{-1}
	
$\delta_{\text{s}}(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 638 cm^{-1}	$\gamma(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 119 cm^{-1}
	
$\tau(\text{C}\text{N}\text{N}\text{C})$ 85-93 cm^{-1}	

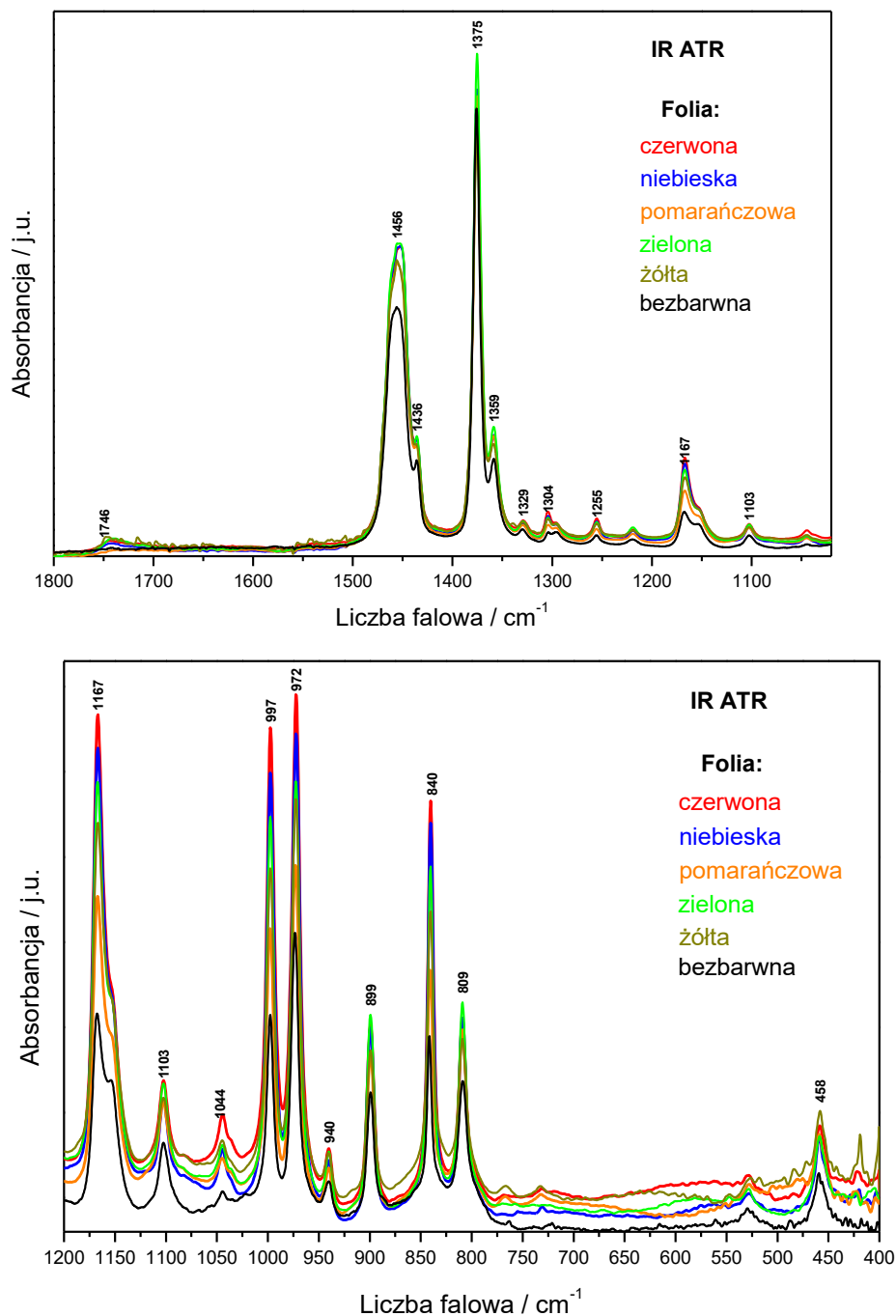
3. IDENTYFIKACJA MATERIAŁU I BARWNIKA KOLOROWYCH FOLII OPAKOWANIOWYCH DO MAKARONU

W analizie widm barwników azowych wykorzystuje się charakterystyki oscylacyjne wyprowadzone z obliczeń kwantowych. Podejście to zilustrowano na podstawie pomiarów widm IR i Ramana folii stosowanych jako opakowania makaronu. Badano folie koloru pomarańczowego, żółtego, czerwonego, niebieskiego, zielonego oraz bezbarwną (bez dodatku barwników).

Widma FT IR w zakresie $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ rejestrowano w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrometru Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR o rozdzielczości 2 cm^{-1} . Widma przedstawione na rysunku 3 zostały wykonane przy pomocy diamentowej przystawki ATR dla 132 skanów. Natomiast widma przedstawione na rysunkach 5, 7, 9, 11 i 13 zostały wykonane w technice transmisyjnej dla 132 skanów.

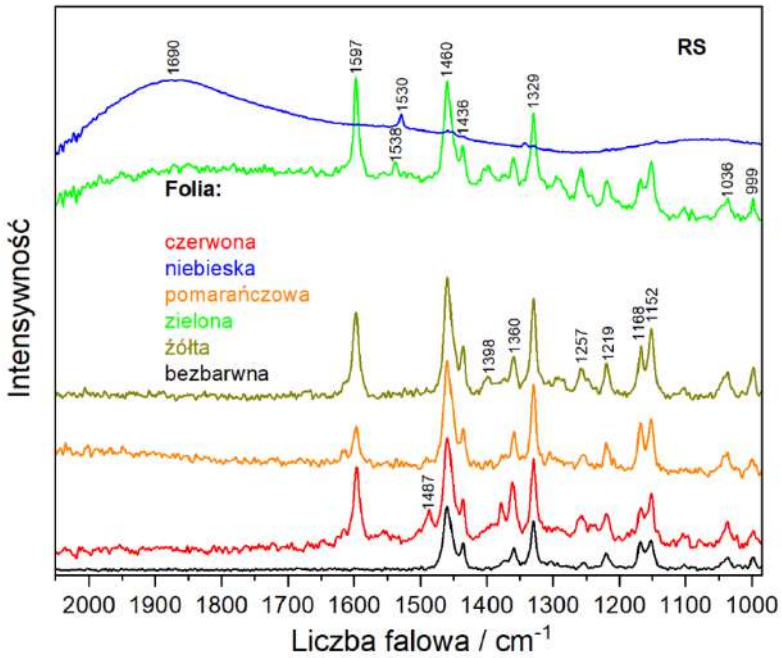
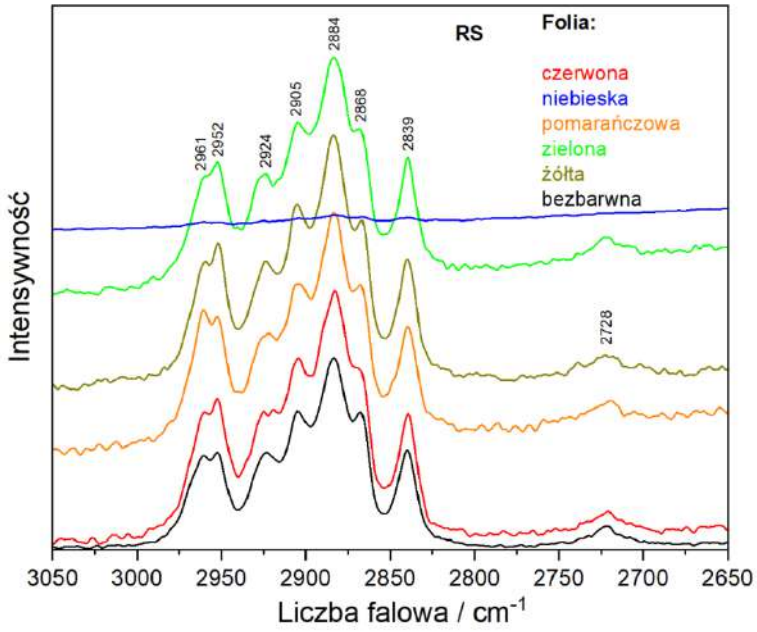
Widma FT Ramana były mierzone z użyciem spektrometru Bruker 110/S stosując wzbudzenie linią 1064 nm lasera YAG:Nd $^{3+}$ o mocy 200 mW z rozdzielczością spektralną 2 cm^{-1} dla 256 skanów. Stosowane wzbudzenie okazało się odpowiednie dla folii żółtej, pomarańczowej, czerwonej i zielonej – zmierzone widma są intensywne i dobrej jakości. Widmo Ramana folii niebieskiej zdecydowanie różni się od pozostałych widm z powodu silnego nagrzewania się folii o ciemnym, błękitnym zabarwieniu.

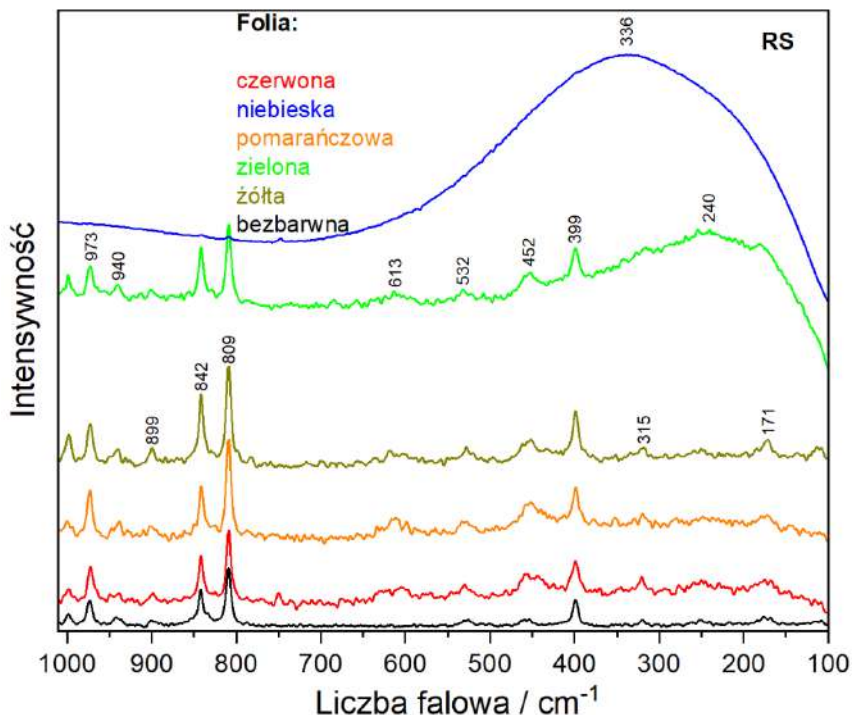




Rysunek 3. Widma ATR IR kolorowych folii opakowania makaronu

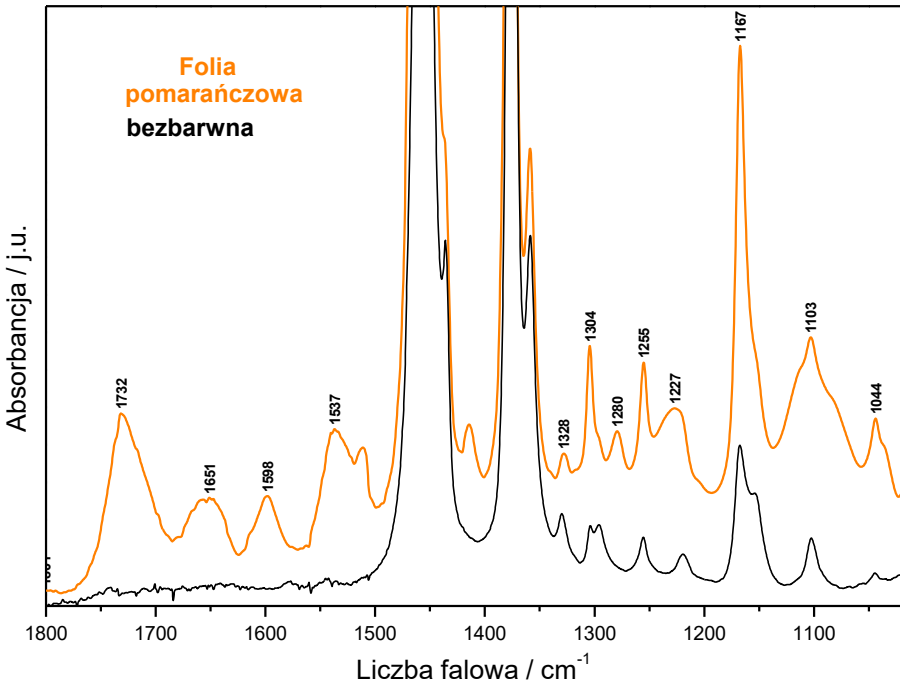
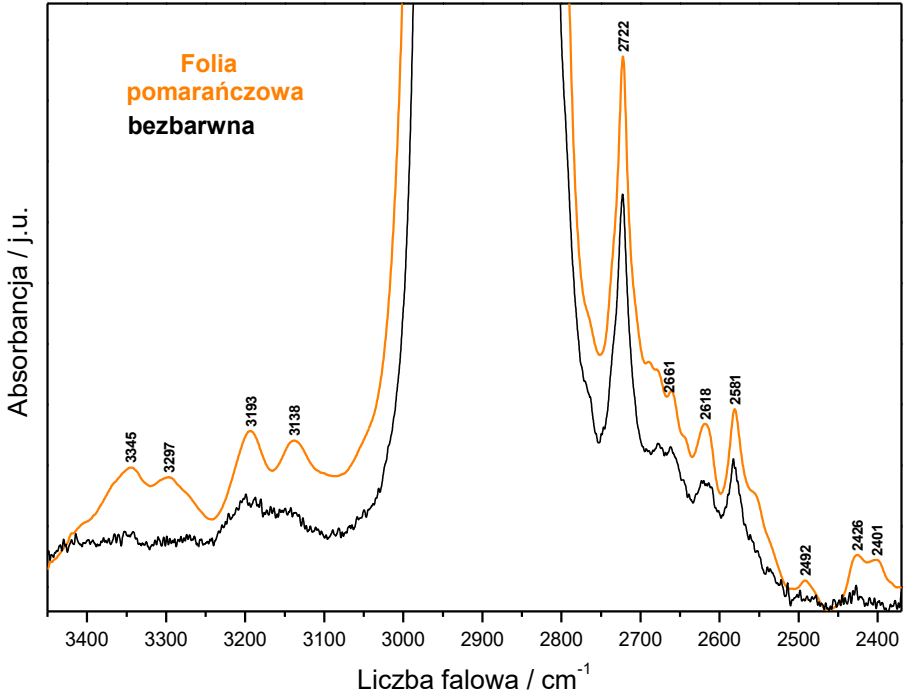
Figure 3. ATR IR spectra of colour plastic foils used as macaroni packaging

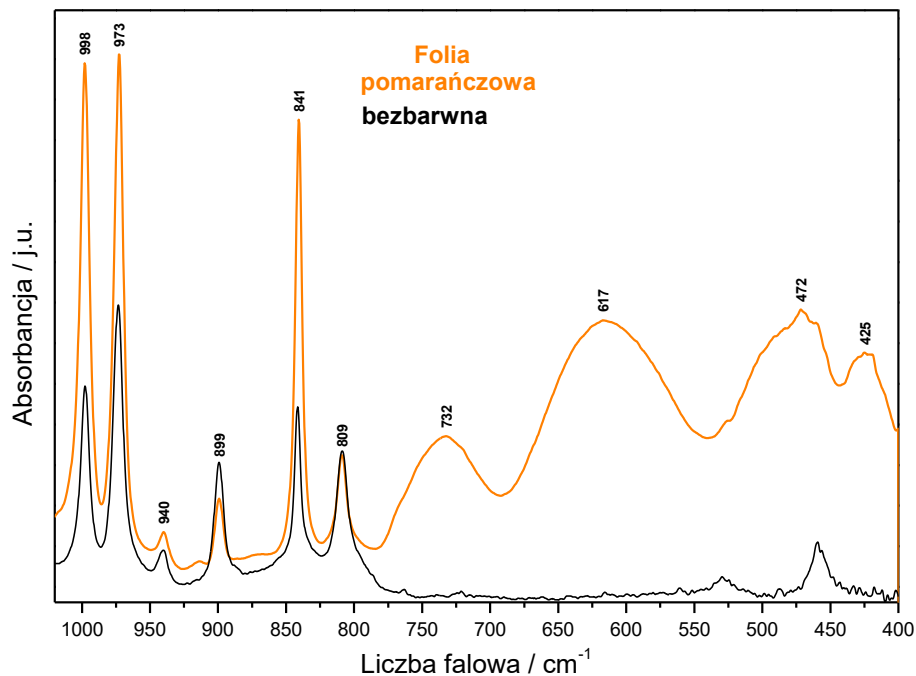




Rysunek 4. Widma Ramana kolorowych folii opakowania makaronu
 Figure 4. Raman spectra of colour plastic foils used as macaroni packaging

W zmierzonych widmach oscylacyjnych obserwuje się charakterystyczne pasma odpowiadające następującym drganiom: asymetryczne rozciągające: $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ 2958 vs, 2950 vs; asymetryczne rozciągające $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ 2917 vs; symetryczne rozciągające $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ 2877 s, 2866 s; symetryczne rozciągające $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 2838 s, 2723 w; asymetryczne deformacyjne $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ 1465 vs, sh; asymetryczne deformacyjne $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ 1456 s, 1436 sh; symetryczne deformacyjne $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ 1375 s, 1359 m; symetryczne deformacyjne $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 1329 w, 1304 w; skręcające $\rho(\text{CH}_3)$ 1255 w, 1219 vw; rozciągające $\nu(\text{C-C})$ $\nu_{\text{as}}(\text{CCCC})$ 1167 m, 1103 w; rozciągające $\nu(\text{C-C})$: $\nu_{\text{s}}(\text{CCCC})$ 1047 vw, 997 w, 972 m; skręcające $\rho(\text{CH}_3) + \nu(\text{C-C})$ 940 vw, 899 w, 840 m, 809 w; skręcające $\rho(\text{CH}_2) + \nu(\text{C-C})$ 732 m,b, 617 m,b oraz skręcające $\tau(\text{CH}_3) + \tau(\text{CH}_2)$ 425 m, 319 w. Zmierzone widma folii opakowaniowej makaronu w sposób jednoznaczny wskazują, iż wszystkie kolorowe folie wykonane są z polipropylenu [40]. Ponieważ widma propylenu dominują swoją intensywnością uniemożliwia to identyfikację barwników użytych do barwienia folii, sprawia to, iż konieczne jest wykonanie widm IR z większą rozdzielczością i intensywnością. Zostały one przedstawione na rysunkach 5, 7, 9, 11 i 13.



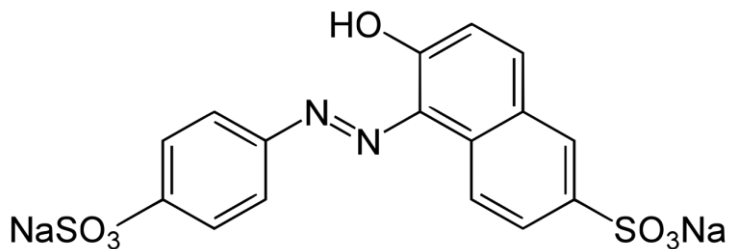


Rysunek 5. Widma IR folii pomarańczowej
 Figure 5. IR spectra of orange yellow foil

Widma folii pomarańczowej składają się z dwu sekwencji pasm. Jedną tworzą silne pasma pochodzące od folii polipropylenowej oraz seria słabszych pasm zakresu $2200\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ – odpowiadają one przejściom kombinacyjnym drgań folii z zakresu $500\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Druga sekwencja pasm pochodzi od drgań oscylacyjnych barwnika pomarańczowego. Tworzą ją pasma charakterystyczne dla drgań grup funkcyjnych molekuly barwnika. Należy je przyporządkować następującym modom normalnym: rozciągające i zginające grupy hydroksylowej: $\nu(\text{OH}) - 3345\text{ w}, 3297\text{ w}$; $\delta(\text{OH}) - 1415\text{ w}$, $\gamma(\text{OH}) - 732\text{ m,b}$; drgania grupy azowej: $\nu(\text{N=N}) - 1460\text{ w}$ (Raman), $\nu_{\text{as}}(\text{CNNC}) - 1227\text{ w}$, $\nu_{\text{s}}(\text{CNNC}) - 1090\text{ w}$, $\delta_{\text{as}}(\text{CNNC}) 940\text{ w}$, $\delta_{\text{s}}(\text{CNNC}) - 617\text{ m,b}$; drgania grupy SO_3 : $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3) - 1328$; $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_3) - 1090$; $\delta_{\text{as}}(\text{SO}_3) - 472\text{ m,b}$ oraz drgania pierścieni aromatycznych (benzenowy, naftalenowy): $\nu(\text{CH}) - 3193\text{ w}, 3138\text{ w}$; $\nu(\phi) - 1651, 1598$; $\delta(\phi) - 610\text{ sh}$; $\gamma(\phi) - 425\text{ m}$.

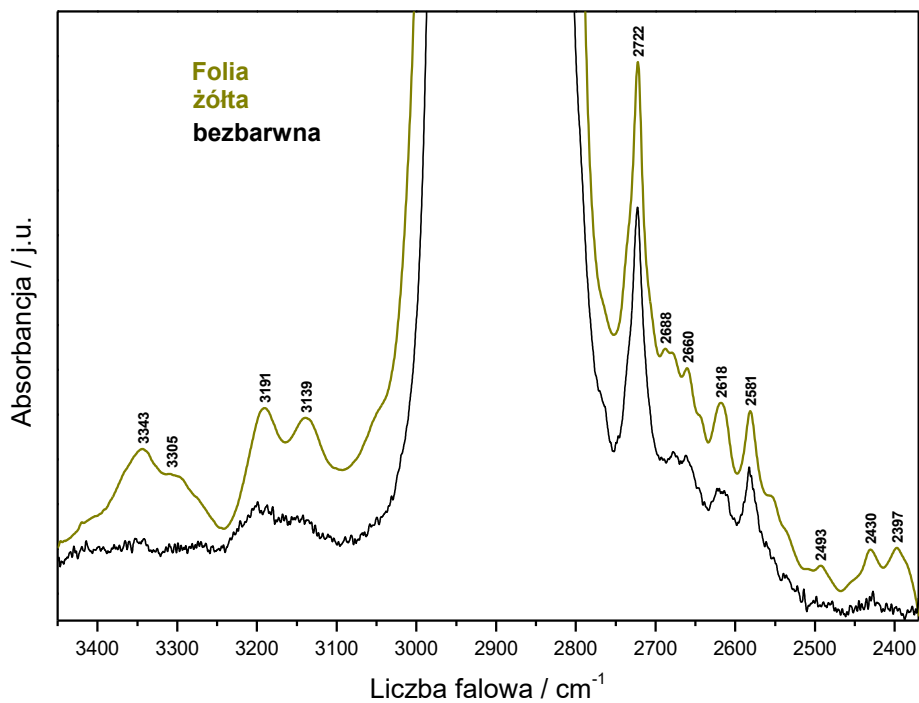
Wymienione pasma pochodzące od drgań grupy hydroksylowej, azowej i sulfonowej, a także pierścieni aromatycznych pozwalają w sposób jednoznaczny zidentyfikować barwnik jako żółcień pomarańczową. Jego wzór strukturalny przedstawia rysunek 6. Jest barwnikiem mono-azowym o barwie żółtej z odcieniem pomarańczowym,

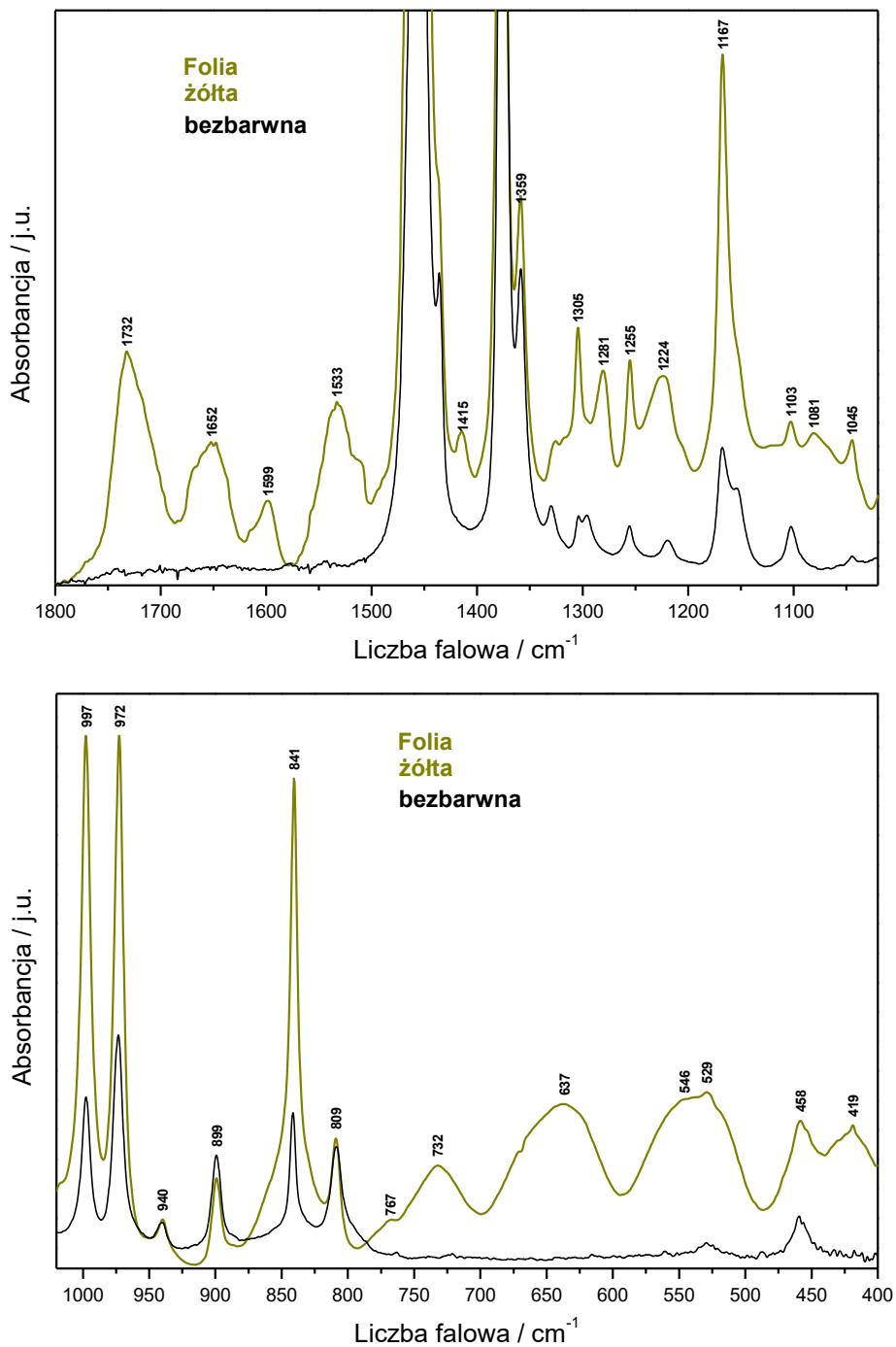
dobrze rozpuszczalnym w wodzie. Posiada wysoką odporność na światło, temperaturę i kwasy, a znacznie mniejszą na zasady i SO_2 . W obecności jonów wapnia barwnik może się wytrącać.



Rysunek 6. Żółcień pomarańczowa FCF $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$

Figure 6. Sunset yellow FCF, $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$

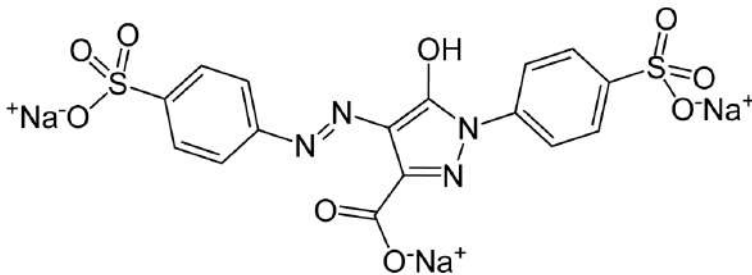




Rysunek 7. Widma IR folii żółtej
Figure 7. IR spectra of yellow foil

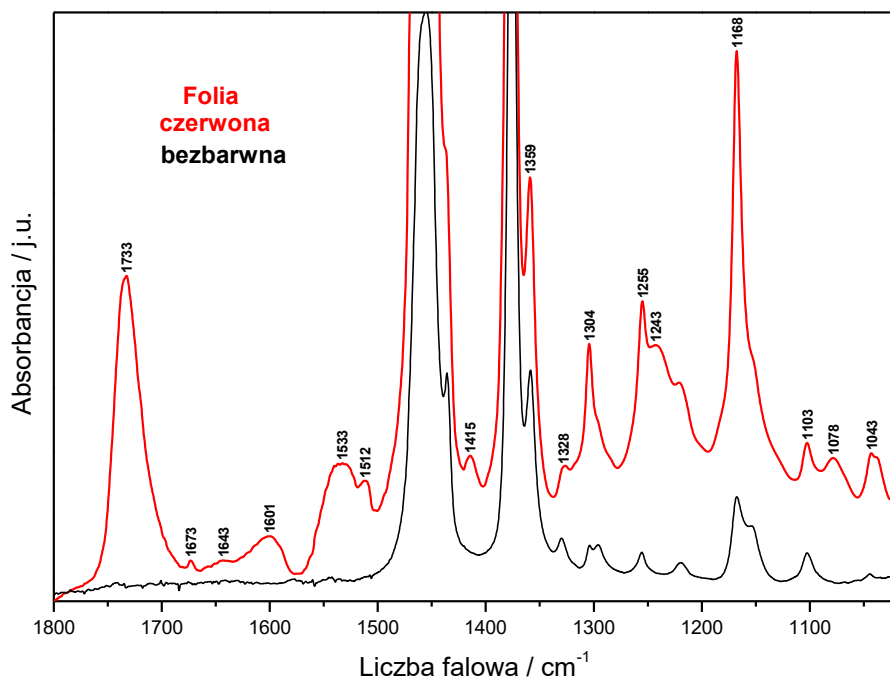
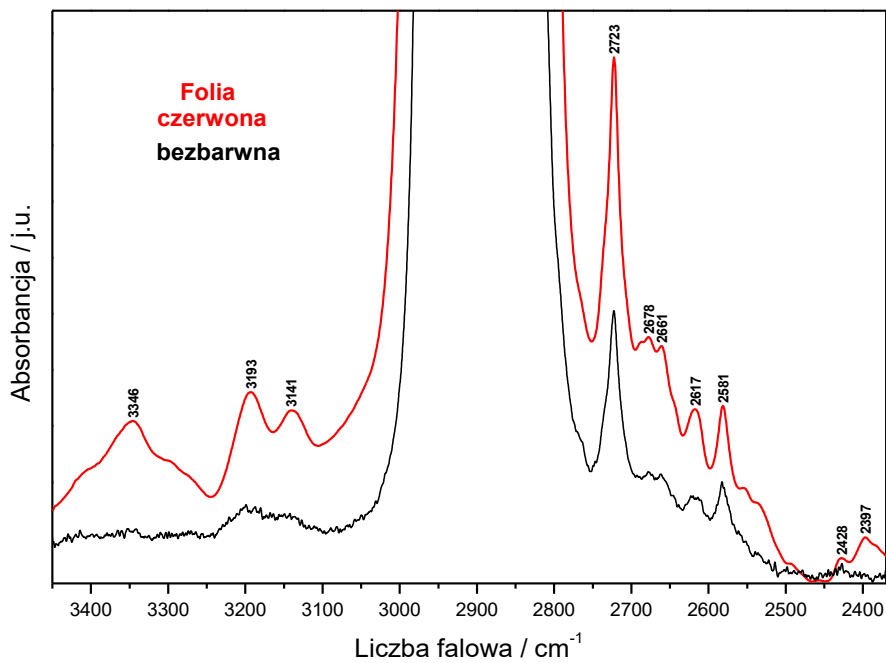
Widma folii żółtej, podobnie jak folii pomarańczowej, składają się z dwu sekwencji pasm. Jedną tworzą silne pasma pochodzące od folii polipropylenowej oraz seria słabszych pasm kombinacyjnych zakresu 2200-2700 cm^{-1} . Druga sekwencja pasm pochodzi od drgań oscylacyjnych barwnika żółtego. Podobieństwo widm folii żółtej i pomarańczowej sugeruje, iż w molekułe barwnika występują podobne składniki, gdyż tworzą ją pasma charakterystyczne dla takich samych grup funkcyjnych. Należy je przyporządkować następującym modom normalnym: rozciągające i zginające grupy hydroksylowej: $\nu(\text{OH})$ – 3345 w, 3305 w; $\delta(\text{OH})$ – 1415 w, $\gamma(\text{OH})$ – 732 m,b; drgania grupy azowej: $\nu(\text{N}=\text{N})$ – 1460 m (Raman), $\nu_{\text{as}}(\text{CNNC})$ – 1224, $\nu_{\text{s}}(\text{CNNC})$ – 1103, 1081, $\delta_{\text{as}}(\text{CNNC})$ 943 w, $\delta_{\text{s}}(\text{CNNC})$ – 637 m,b; drgania grupy SO_3 : $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3)$ – 1325; $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_3)$ – 1081; $\delta_{\text{as}}(\text{SO}_3)$ – 419 m,b; drgania pierścieni aromatycznych (benzenowy): $\nu(\text{CH})$ – 3191 w, 3139 w; $\nu(\phi)$ – 1652, 1599; $\delta(\phi)$ – 500 sh; $\gamma(\phi)$ – 450 m; drgania grupy karboksylowej COO : $\nu(\text{C}=\text{O})$ – 1732; $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ – 1305, $\delta(\text{COO})$ – 767; $\omega(\text{COO})$ – 546; $\rho(\text{COO})$ – 458; drgania pierścienia pirazolowego: $\nu(\text{NH})$ – 3305; $\nu(\varphi)$ – 1550 sh; $\delta(\text{CH})$ – 1060 sh; $\delta(\varphi)$ – 825 sh. Wymienione pasma pochodzące od drgań grupy hydroksylowej, azowej, karboksylowej i sulfonowej, a także pierścieni aromatycznych i pirazolowego świadczą, iż barwnikiem żółtej folii jest tartrazyna. Wzór strukturalny tego barwnika przedstawia rysunek 8.

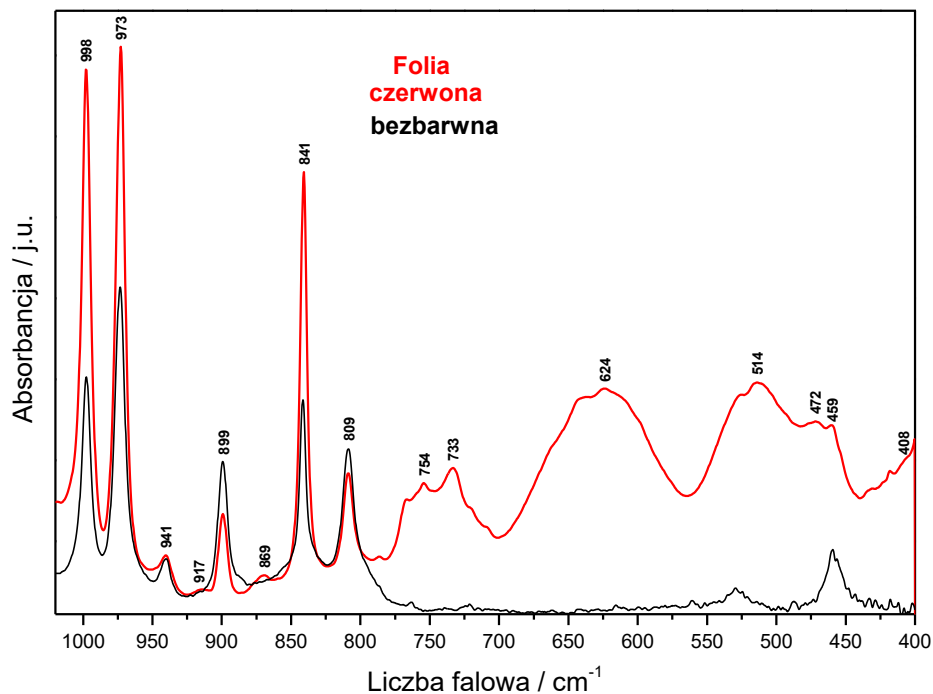
Tartrazyna (żółcień spożywcza 5, E102) – organiczny związek chemiczny, cytrynowożółty barwnik azowy produkowany głównie do celów spożywczych. Należy do syntetycznych barwników kwasowych z grupy barwników pirazolowych (pirazolonowych).



Rysunek 8. Żółty barwnik – tartrazyna

Figure 8. Yellow dye – tartrazine

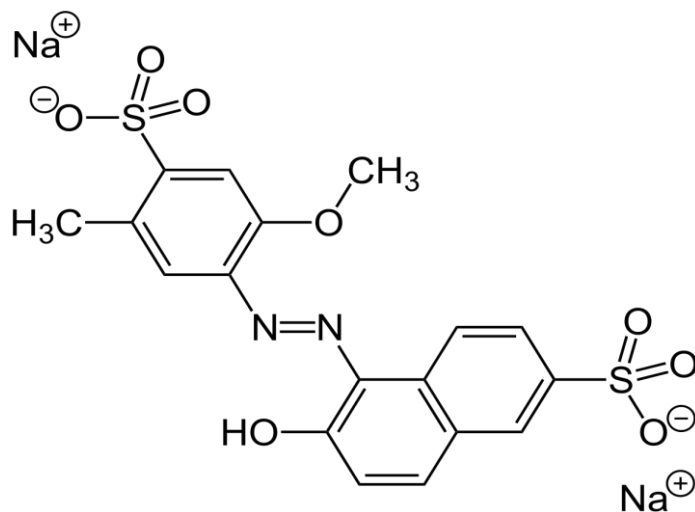




Rysunek 9. Widma IR folii czerwonej

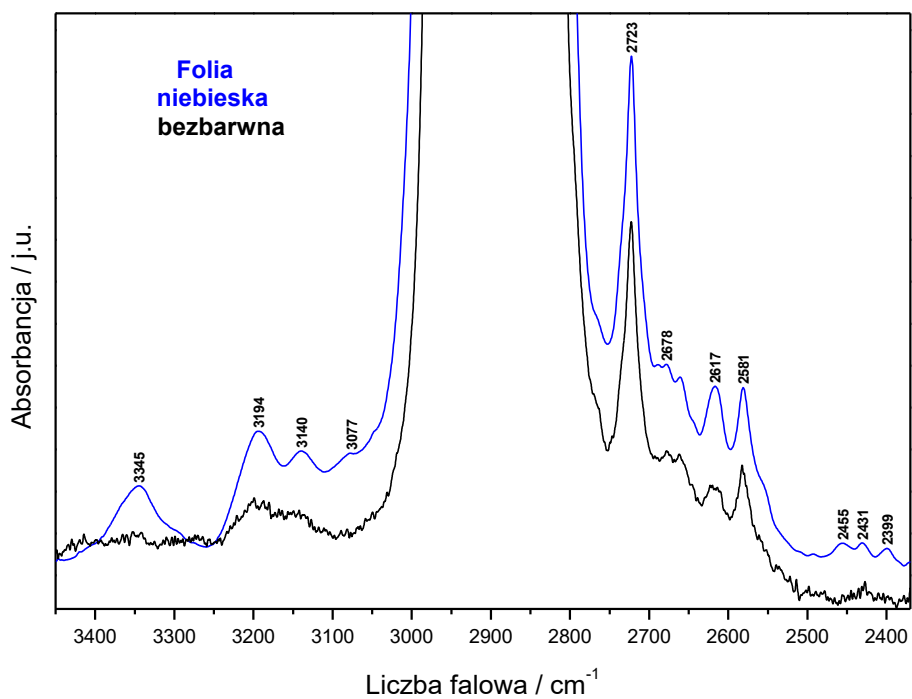
Figure 9. IR spectra of red foil

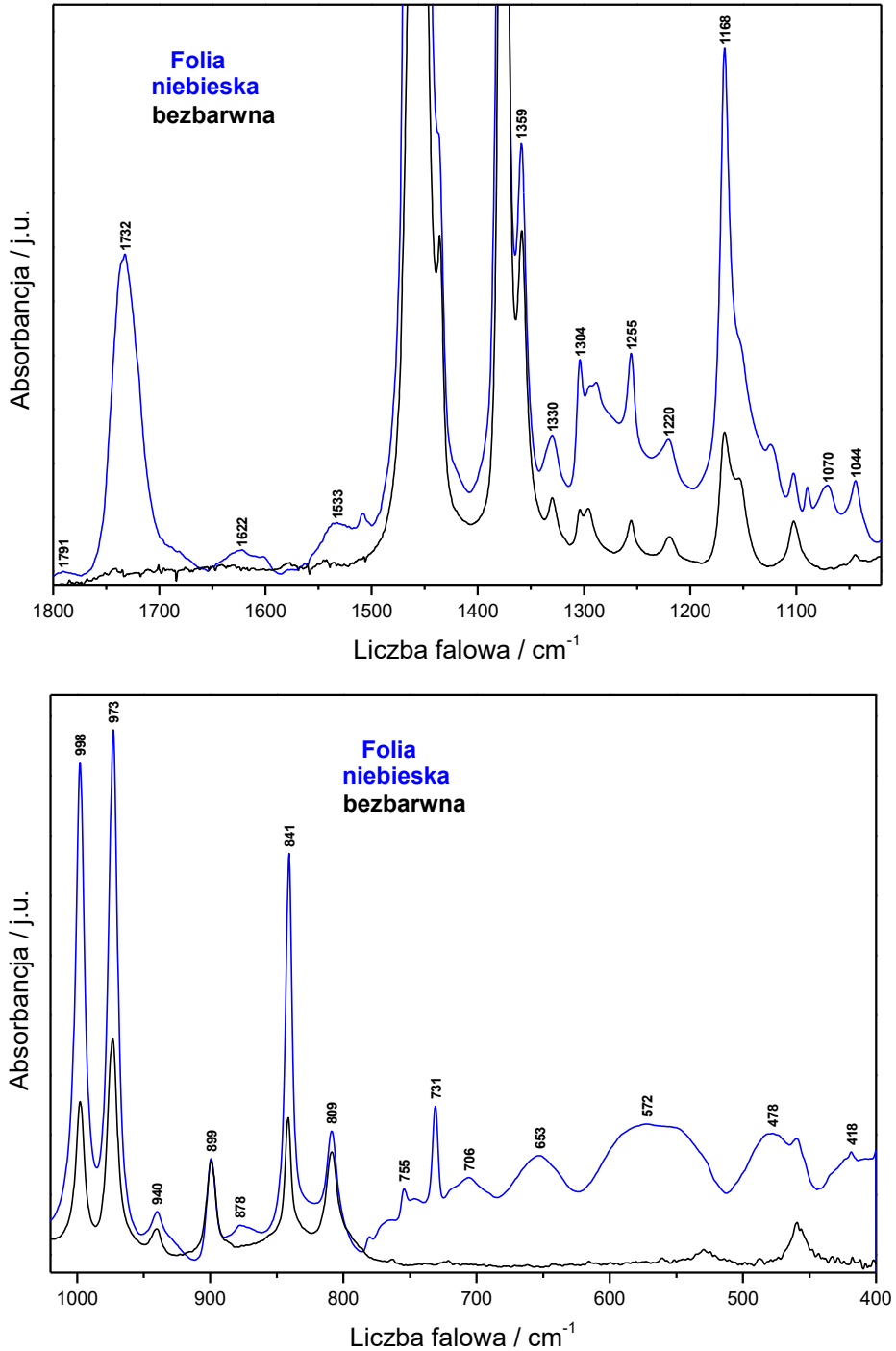
Widmo folii czerwonej jest w pewnych zakresach liczb falowych podobne do widm poprzednich folii (rysunek 9). Zawiera pasma pochodzące od wiązania azowego, grup sulfonowych oraz aromatycznych pierścieni benzenowego i naftalenowego. Równocześnie nie występują w pasma grup: karboksylowej, karbonylowej i pirazolu. Widmo folii czerwonej jest wynikiem obecności w niej barwnika azowego czerwieni allura. Wzór tego związku przedstawia rysunek 10.



Rysunek 10. Wzór strukturalny czerwieni allura

Figure 10. Structural scheme of allura red

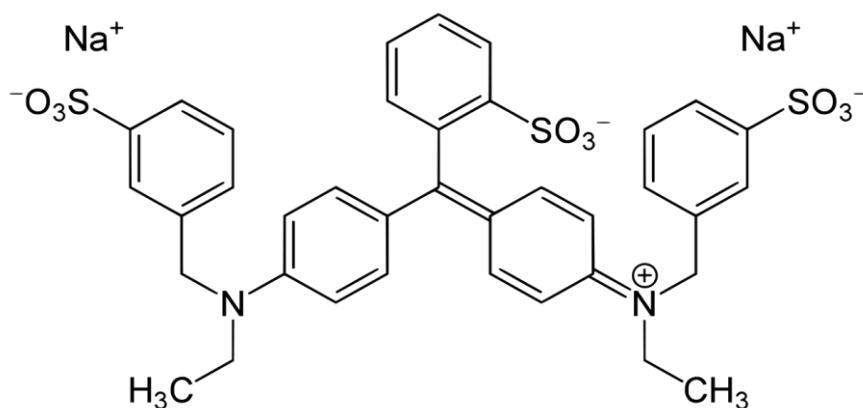




Rysunek 11. Widma IR folii niebieskiej

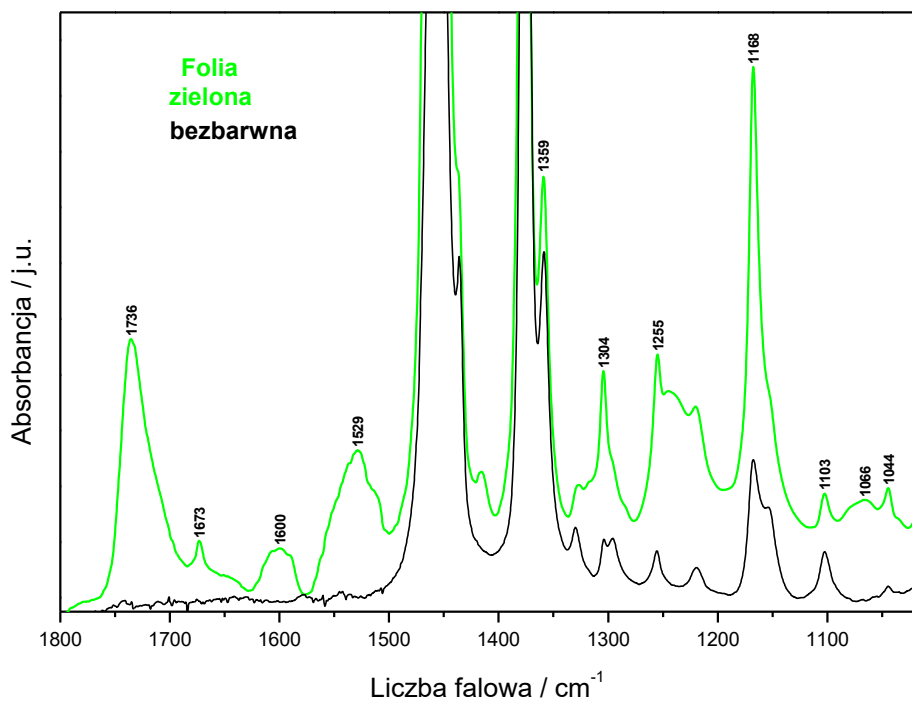
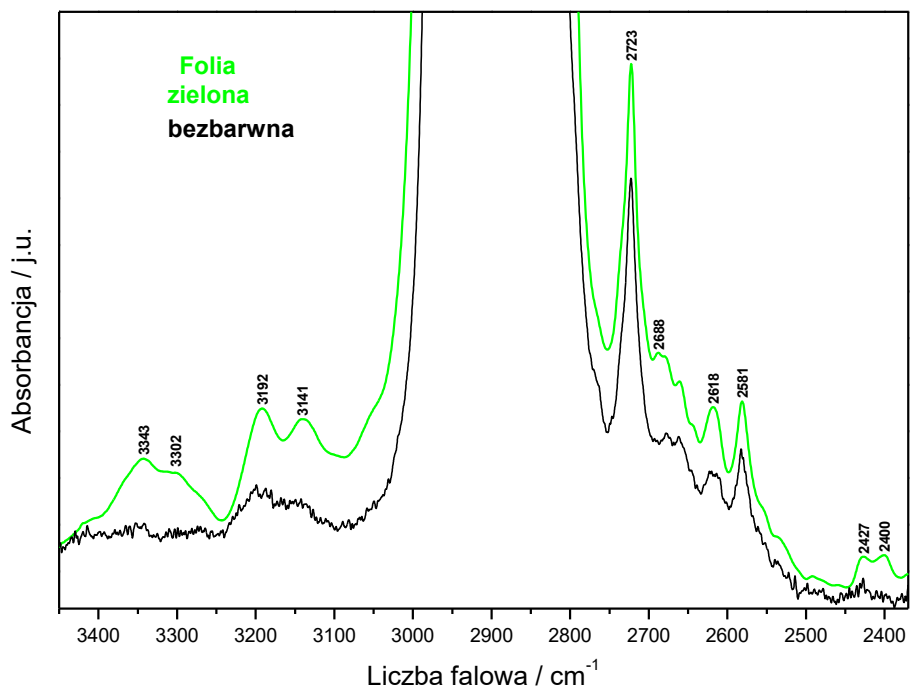
Figure 11. IR spectra of blue foil

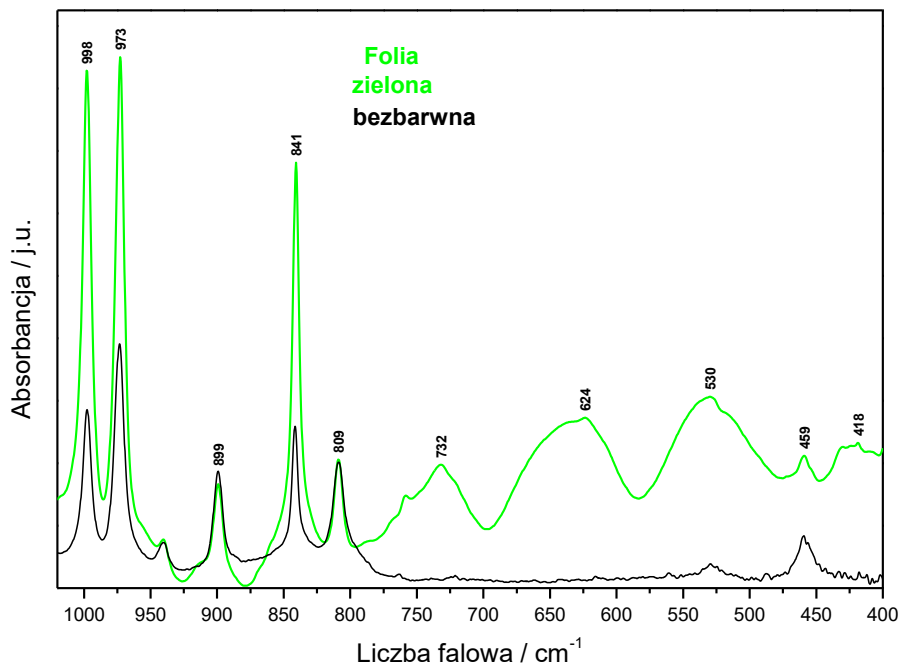
Widmo folii niebieskiej różni się od widm folii analizowanych poprzednio. Zawiera pasma pochodzące od grup sulfonowych i metylowych oraz bogate widma składowych aromatycznych pierścieni benzenowych. Równocześnie nie występują w nim pasma grup: azowej, karboksylowej, karbonylowej i pirazolu. Ponadto obserwuje się w nim pasma pochodzące od drgań wiązań imidynowych $C=N-CC$ w zakresach charakterystycznych dla tego mostka. Występują one przy 1622 i 1605 cm^{-1} oraz 1224 i 1070 cm^{-1} . Na tej podstawie można wnosić, iż niebieskim barwnikiem zastosowanym w folii jest błękit brylantowy. Jego wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 12.



Rysunek 12. Wzór strukturalny barwnika niebieskiego – błękit brylantowy
Figure 12. Structural scheme of blue dye – brilliant blue

Widmo folii zielonej różni się od analizowanych poprzednio. Obok wymienionych wyżej sekwencji pasm obserwuje się w nim wiele dodatkowych składowych w formie przebiegów występujących na zboczach silniejszych pasm. Taki charakter widma tej folii świadczy, iż barwa ta jest wynikiem mieszania dwu lub trzech innych barwników. Barwę tę można otrzymać poprzez zmieszanie indygotyny z tatrtrazyną lub żółcenią chinolinową, a także z błękitu patentowego i tartrazyny lub żółcieni chinolinowej. Kolor zielony zwykle otrzymuje się wskutek połączenia żółtego i niebieskiego barwnika. Najprawdopodobniej do tej folii został zastosowany błękit patentowy, który jest wyjątkowo trwały i stabilny w tworzywach używanych w przemyśle spożywczym oraz innych technologiach.





Rysunek 13. Widma IR folii zielonej
Figure 13. IR spectra of green foil

UWAGI KOŃCOWE

Spektroskopia oscylacyjna w podczerwieni jest efektywną metodą diagnostyczną identyfikacji materiału, z którego wykonana jest folia z tworzywa sztucznego, a także barwnika zastosowanego do jej barwienia. W niniejszej pracy metodę tę zastosowano do barwnych folii stosowanych jako opakowanie makaronu. Wykazano, iż folia ta jest wykonana z polipropylenu, a do jej barwienia zastosowano żółcień pomarańczową (barwnik pomarańczowy), tartrazynę (barwnik żółty), czerwień allura (barwnik czerwony), błękit brylantowy (barwnik niebieski) oraz mieszaninę barwników żółtego i niebieskiego (barwnik zielony). Podkreślić należy, iż barwniki: pomarańczowy, żółty, czerwony i zielony wykorzystują organiczne związki azowe.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Sicińska, A. Brzozowska, *Przem. Chem.*, 2010, **89(9)**, 1148.
- [2] GNT, *Przem. Spoż.*, 2011, **65(7-8)**, 41.
- [3] W. Bogusz-Kalis, *Mistrz Branży*, 2012, **4**, 58.
- [4] J. Meszka, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2013, **3**, 6.
- [5] A. Turlej, *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, 2013, **8**, 28.
- [6] *Forum czystej etykiety*, *Mistrz Branży*, 2012, **5**, 66.

- [7] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Europy nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (Dz. Urz. UE z 31.12.2008. L. 354/16).
- [8] A. Florowska, E. Dłużewska, K. Marciniak-Lukasiak, *Przem. Spoż.*, 2013, **67(5)**, 8.
- [9] E. Dłużewska, A. Gasik, *Przem. Spoż.*, 2009, **5**, 10.
- [10] J. Czapski, Rozdział w wydawnictwie pod redakcją J. Gawęcki, N. Baryłko-Pikielna, *Zmysły a jakość żywności i żywienia*, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań, 2007.
- [11] A. Gasik, M. Mitek, *Przem. Spoż.*, 2007, **8**, 48.
- [12] J. Janiak, *Przem. Spoż.*, 2006, **5**, 22.
- [13] T. Talik, Z. Talik, *Podstawy Chemii Żywności*, cz. 2. wyd. III. Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu, Wrocław, 1993.
- [14] E. Kociołek-Balawejder (red.), *Technologia Chemiczna Organiczna – Wybrane Zagadnienia*, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Wrocław, 2013.
- [15] H. Kwiecień, *Chemia i Preparatyka Barwników Organicznych*, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego, Szczecin, 2014.
- [16] A. Kołodziejczyk, K. Dzierzbicka, *Podstawy Chemii Organicznej*, tom II, Gdańsk, 2014.
- [17] B. I. Stiepanow, *Podstawy Chemii i Technologii Barwników Organicznych*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1980.
- [18] E. Węglarz-Tomczak, L. Górecki, *Chemicz.*, 2012, **66(12)**, 1298.
- [19] W. Czajkowski, *Informator chemika kolorysty*, 2007, **10**, 12.
- [20] A. Nowak, Z. Libudzisz, *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 2008, **6(61)**, 25.
- [21] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 884/2007 a dnia 26 lipca 2007 r. w sprawie środków nadzwyczajnych zawieszających stosowanie E128 czerwień 2G jako barwnika żywności.
- [22] A. Jędrzyk-Golińska, *Alergie i nietolerancje pokarmowe*. Artykuł opublikowany w J. Gawęcki, Z. Krejpcio, *Bezpieczeństwo Żywności i Żywienia*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2014 r.
- [23] J. J. De Lange, J. M. Robertson, I. Woodward, W. H. Bragg, *Proc. R. Soc. Lond.*, 1939, **A171**, 398.
- [24] C. J. Brown, *Acta Cryst.* 1966, **21**, 146.
- [25] J. A. Bouwstra, A. Schouten, J. Kroon, *Acta Cryst.* 1983, **C39**, 1121.
- [26] J. A. Bouwstra, A. Schouten, J. Kroon, R. B. Helmholtz, *Acta Cryst.*, 1985, **C41**, 420.
- [27] J. Harada, K. Ogawa, S. Tomoda, *Acta Cryst.*, 1997, **B53**, 662.
- [28] G. C. Hampson, J. M. Robertson, *J. Chem. Soc.*, 1941, 409.
- [29] A. Mostad, C. Rømming, *Acta Chem. Scand.*, 1971, **25**, 3561.
- [30] J. Michalski, E. Kucharska, M. Wandas, J. Hanuza, A. Waškowska, M. Mączka, Z. Talik, S. Olejniczak, M. J. Potrzebowski, *J. Mol. Struct.*, 2005, **744-747**, 377.
- [31] J. Michalski, I. Bryndal, J. Lorenc, K. Hermanowicz, J. Janczak, J. Hanuza, *Spectrochim. Acta A*, 2018, **191**, 521.
- [32] K. Panneerselvam, K. Hansongnorn, N. Rattanawit, F.-L. Liao, T.-H. Lu, *Anal. Sci.*, 2000, **16**, 1107.
- [33] A. Saha, C. Das, S. Goswami, S.-M. Peng, *Indian J. Chem.*, 2001, **40A**, 198.
- [34] K. M. Hutchins, S. P. Yelgaonkar, B. L. Harris-Conway, E. W. Reinheimer, L. R. MacGillivray, R. H. Groeneman, *Supramol. Chem.*, 2018, **30**, 533.
- [35] E. Kucharska, J. Hanuza, A. Waškowska, Z. Talik, *Chem. Phys.*, 2004, **306**, 71.
- [36] E. Kucharska, J. Hanuza, J. Lorenc, *Spectrochim. Acta A*, 2014, **127**, 370.
- [37] H. Bock, R. Dienelt, H. Schödel, T. T. H. Van., *Struct. Chem.*, 1998, **9**, 279.
- [38] L. Gao, Y. Hao, X. Zhang, X. Huang, T. Wang, H. Hao, *CrystEngComm*, 2020, **20**, 3279.
- [39] I. J. L. Mendez, J. S. Pleizier, H.-B. Wang, J. A. Wisner, *J. Chem. Cryst.*, 2019, **49**, 113.
- [40] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, John Wiley and Sons, LTD, England, 2004.

SPEKTROSKOPIA NIR - MODELOWANIE KWANTOWO-MECHANICZNE WIDM JAKO NARZĘDZIE W BADANIACH PODSTAWOWYCH I WSPARCIE ZASTOSOWAŃ ANALITYCZNYCH

NIR SPECTROSCOPY - SPECTRA SIMULATION AS A POTENT TOOL IN BASIC RESEARCH AND ANALYTICAL APPLICATIONS

Krzysztof B. Beć^{1*}, Justyna Grabska^{1*}

¹*University of Innsbruck, Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry,
Innrain 80-82, 6020 Innsbruck, Austria*

**e-mail: krzysztof.bec@uibk.ac.at, justyna.grabska@uibk.ac.at*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Podstawy fizyczne spektroskopii NIR

1.1. Kwantowo-mechaniczny opis przejść oscylacyjnych

1.2. Podstawowe zrozumienie i praktyczna interpretacja widm NIR

2. Zastosowania

2.1. Chemia fizyczna

2.2. Wsparcie analizy jakościowej i ilościowej za pomocą spektroskopii NIR

2.2.1. Interpretacja różnic instrumentalnych

2.2.2. Chemiczna interpretacja modeli kalibracyjnych

2.2.3. Zakres daktyloskopowy widm NIR złożonych struktur
molekularnych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr Krzysztof Beć pracuje w zespole badawczym prof. Christiana W. Hucka na Uniwersytecie w Innsbrucku od 2019 roku. Uzyskał stopień doktora w dziedzinie chemii fizycznej i teoretycznej w 2014 roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W latach 2015-2018 pracował w zespole prof. Yukihiko Ozakiego na Uniwersytecie Kwansei-Gakuin w Japonii, zajmując się spektroskopią oscylacyjną oraz nową techniką spektroskopii elektronowej w zakresie dalekiego nadfioletu (ATR-FUV-DUV). Jest autorem ponad 80 artykułów, 1 książki i 14 rozdziałów, głównie poświęconych spektroskopii NIR. Jego doświadczenie naukowe pozwala mu na unikalne spojrzenie na praktyczne zastosowania spektroskopii teoretycznej w chemii analitycznej. Dr. Beć otrzymał wiele stypendiów, w tym prestiżowe stypendium/staż JSPS (Japonia), stypendium rządu Irlandii oraz kierownictwo projektu badawczego w ramach programu Lise Meitner agencji finansującej badania naukowe Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, FWF w Austrii.



<https://orcid.org/0000-0003-0822-5098>

Dr Justyna Grabska uzyskała stopień doktora (2015) w dziedzinie chemii fizycznej i teoretycznej na Uniwersytecie Wrocławskim. Jej praca doktorska koncentrowała się na opracowywaniu nowych metod analizy widm oscylacyjnych w celu badania wysokoczęstotliwościowych właściwości dielektrycznych. Po dołączeniu do zespołu prof. Christiana W. Hucka na Uniwersytecie w Innsbrucku w Austrii, poszerzyła swoje pole badawcze o spektroskopię analityczną. Następnie pracowała w grupie prof. Yukihiko Ozakiego (Kwansei Gakuin University, Japonia), gdzie skupiała się na wykorzystaniu nowych metod chemii teoretycznej w spektroskopii NIR i ich zastosowaniu do badania właściwości biomolekuł. Dr. Grabska w 2019 powróciła do laboratorium prof. Christiana W. Hucka w Innsbrucku, gdzie obecnie kontynuuje swoją pracę nad rozwojem analitycznej spektroskopii NIR. Jej głównym wkładem w postęp naukowy jest opracowanie nowych metod analizy spektroskopii NIR opartych na metodach chemii komputerowej. W 2023 roku zdobyła prestiżowy grant Elise Richter, finansowany przez agencję badawczą Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, FWF w Austrii.



<https://orcid.org/0000-0002-9280-2902>

ABSTRACT

Near-infrared (NIR) spectroscopy is a powerful technique that has been extensively used for the qualitative and quantitative analysis of a broad range of chemical compounds in various fields, such as pharmaceuticals, food, and environmental monitoring. However, the interpretation of NIR spectra is often challenging due to the complex line shape and overlapping signals that make it difficult to assign the bands to specific molecular vibrations. In recent years, significant advancements in theoretical methods have enabled the calculation of NIR spectra for a variety of molecules, paving the way for the integration of computational chemistry and NIR spectroscopy. This emerging field offers a wealth of opportunities to improve our understanding of the spectral features and to provide detailed molecular fingerprints that are essential for fundamental research and practical applications. Accurate simulation of NIR bands unlocks new potential in exploring the solvent effect or intermolecular interactions, in which cases interpreted overtones and combination bands provide unique information, complementary to that extracted from the fundamental bands observed in mid-infrared (MIR) region. In the area of applications, by reproducing the spectra of molecules with complex structures, theoretical calculations can provide new physical insights into the nature of the vibrational modes that contribute to the spectral signals. This knowledge can be used to improve the accuracy and reliability of chemometric models that are commonly used in quantitative analysis.

Keywords: spectra simulation, near-infrared (NIR), spectra interpretation, overtones, combination bands, band assignments

Słowa kluczowe: modelowanie kwantowo-mechaniczne widm, spektroskopia absorpcyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR), interpretacja widm, nadtony, pasma drgań kombinacyjnych, przypisania pasm

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 2DCOS - dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna (two-dimensional correlation spectroscopy)
- ATR - całkowite wewnętrzne odbicie (Attenuated Total Reflection)
- DFT – teoria funkcjonału gęstości (density functional theory)
- FT - transformata Fouriera (Fourier transform)
- GVPT2 - uogólniona metoda zaburzeń drugiego rzędu (Generalized Vibrational Second-Order Perturbation Theory)
- MIR - zakres średniej podczerwieni (mid-infrared)
- NIR - zakres bliskiej podczerwieni (near-infrared)
- PLSR – regresja metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (Partial Least Squares Regression)
- SW-NIR – krótkofalowa część zakresu bliskiej podczerwieni (short-wavelength NIR)
- VSCF - metoda pola samouzgodnionego (Vibrational Self-Consistent Field)
- VPT2 - oscylacyjna metoda zaburzeń drugiego rzędu (Vibrational Second-Order Perturbation Theory)
- VCI - oscylacyjna metoda oddziaływania konfiguracji (Vibrational Configuration Interaction)

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich czterech dziesięcioleci spektroskopia absorpcyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) (800–2500 nm; 12,500–4000 cm^{-1}) stała się jedną z najbardziej powszechnych i przydatnych metod chemii analitycznej, dostarczając nieinwazyjnego narzędzia do szybkiej jednoczesnej charakterystyki jakościowej i ilościowej szerokiej gamy próbek [1-3]. Obecnie pozostaje to szybko rozwijająca się technika analityczna, zdobywająca uznanie w coraz szerszych kręgach laboratoriów badawczych i w różnych zastosowaniach praktycznych. Głównie znana jako narzędzie analityczne użyteczne do analizy ilościowej i jakościowej, spektroskopia NIR jest szczególnie ważna w sektorze rolniczym [4,5] i żywnościowym [6-10], przemyśle farmaceutycznym [11,12], w analizach produktów naturalnych [13,14], analizach środowiskowych [15,16] i szeroko pojętej charakterystyce materiałów [17-19]. Potencjał tej techniki jest również widoczny w badaniach biologicznych [20-22], medycznych [23-25] i obrazowaniu [26], a także w chemii fizycznej, jak np. w badaniach własności drgań molekularnych i oddziaływań międzycząsteczkowych. Unikalny jest wkład tej dziedziny w badania podstawowe i w obrębie chemii fizycznej, na przykład w zakresie natury drgań molekularnych i interakcji międzycząsteczkowych [27-30].

Zalety spektroskopii NIR zarówno w badaniach podstawowych, jak i w zastosowaniach, ściśle wynikają z kilku jej fundamentalnych własności. Główną różnicą między widmami NIR i MIR (spektroskopia absorpcyjna w zakresie średniej podczerwieni) lub Ramana jest różnica między obserwowanymi typami pasm oscylacyjnych. Widma NIR składają się tylko z pasm nadtonów i drgań kombinacyjnych. Interpretacja tych pasm, z wyjątkiem nadtonów stosunkowo prostych cząsteczek, poprzez analizę odpowiadającym im pasm drgań fundamentalnych (obserwowanych w widmach MIR lub Ramana) napotyka spore trudności. Niektóre pasma w widmach NIR, np. rozciągające X-H, są bardziej intensywne, inaczej również wpływa na te intensywności obecność oddziaływań międzycząsteczkowych lub inne własności otoczenia chemicznego molekuly. Te zjawiska dostarczają cennych informacji na temat wiązania wodorowego lub efektu rozpuszczalnika [27,30]. Poza tym, w przypadku prostszych cząstek, rozseparowanie pasm nadtonów jest niejednokrotnie większe niż między odpowiednimi pasmami drgań fundamentalnych w widmach MIR i/lub Ramana, ułatwiając analizę położenia pasm w zakresie NIR. Z drugiej strony, w aplikacjach praktycznych duże znaczenie mają niższe wartości współczynnika ekstynkcji odpowiadające pasmom nadtonów i drgań kombinacyjnych. W efekcie, analiza wielu rodzajów próbek spektroskopią NIR może zostać wykonana poprzez bezpośredni pomiar widma refleksyjności (R) powierzchni próbki w jej natywnej postaci. W przypadku spektroskopii MIR, wymagane jest przygotowanie próbki; odbywa się to na przykład poprzez osadzenie próbki w nieabsorbującej macierzy (na przykład, metoda pastylki KBr) lub użycie techniki całkowitego wewnętrznego odbicia w spektroskopii w średniej podczerwieni (ATR-IR). W obu przypadkach, istotnie zwiększa to złożoność procesu analizy, co ma

decydujące znaczenie w zastosowaniach praktycznych, szczególnie w przemyśle. Należy także wspomnieć o innych czynnikach instrumentalnych, takich jak dostępność relatywnie niedrogich fotodetektorów zamiast termodetektorów potrzebnych w przypadku spektroskopii MIR, źródeł emitujących światło białe, bardziej praktycznych materiałów optycznych, jak również sond światłowodowych, które w zakresie bliskiej podczerwieni są zdecydowanie bardziej praktyczne niż te, które mogą być stosowane w zakresie średniej podczerwieni. Te cechy bywają decydujące dla wyboru stosowanej spektroskopii w aplikacjach analitycznych [3].

Zaawansowane technologie sensorów, miniaturyzacja oraz zastosowanie sensorów w dronach oraz szybki rozwój zaawansowanych analiz danych, sprawiają, że spektroskopia NIR jest stale ulepszana [1,31-34]. Mimo to, wewnętrzna złożoność widm NIR i trudność w interpretacji jej wyników pozostają ograniczającymi czynnikami w szeregu potencjalnych zastosowań [35-39]. Szerokie pasma charakterystyczne dla widm NIR, wynikające z wysokiego stopnia nakładania, często powodują trudności w bezpośredniej interpretacji, ponieważ wiele grup chemicznych nie posiada przejrzystego zakresu daktyloskopowego widma, co jest tak cenione w spektroskopii MIR oraz Ramana [36].

W swojej historii rozwoju, spektroskopia oscylacyjna skorzystała w dużym stopniu z teorii i chemii obliczeniowej, co zostało opisane w niedawnym artykule [31]. W spektroskopii MIR lub Ramana, dobre zrozumienie pojawiających się w widmach pasm drgań podstawowych można osiągnąć dzięki łatwo dostępnym obliczeniom mechaniki kwantowej, które są powszechnie wykorzystywane [40]. Przybliżenie harmoniczne pozwala przewidzieć pasma drgań fundamentalnych z często wystarczającą dokładnością [31]. Natomiast spektroskopia NIR napotykała tutaj kluczowe ograniczenia, ponieważ nadtony i pasma drgań kombinacyjnych nie są dostępne w obliczeniach harmonicznych [41-42], co czyni koniecznym zastosowanie zdecydowanie bardziej złożonych metod anharmonicznych [43-45].

Ostatnie kilka lat przyniosły znaczne postępy w zastosowaniu metod chemii teoretycznej do spektroskopii NIR [31,36,37,43]. Szczegółowe interpretacje widm prostych cząsteczek, takich jak alkohole [46,47], fenole [48], nitryle [49] w istotny sposób poprawia rozumienie subtelných cech widm NIR. Możliwe stały się również badania bardziej złożonych cząsteczek o dużym znaczeniu praktycznym, takich jak witaminy [50], terpeny [51], alkaloidy [52], kwasy nukleinowe [53], proste kwasy karboksylowe [54,55], kwasy tłuszczowe z długim łańcuchem [56] i polimery [57].

Modelowanie kwantowo-mechaniczne widm NIR pozwala na więcej niż jedynie interpretację pasm [58]. Przykładami są tutaj badania efektów towarzyszących oddziaływaniom międzycząsteczkowym, w tym wiązaniu wodorowemu, jak również ogólnych efektów otoczenia molekularnego, które odgrywają ważną rolę w spektroskopii analitycznej, jako "efekty matrycowe". Analiza zjawisk zachodzących w układzie cząsteczka-rozpuszczalnik pozwala lepiej zrozumieć widma NIR roztworów wodnych. Efekty tych oddziaływań mają również znaczenie w zastosowaniach, umożliwiając ilo-

ściową analizę znacznie rozcieńczonych roztworów metodami spektroskopii NIR [59]. Ostatecznie, szczegółowa wiedza na temat wkładów poszczególnych drgań molekularnych do widm NIR umożliwia interpretację różnic w charakterystykach oferowanych przez zminiaturyzowane spektrometry. Często takie spektrometry działają w określonych, wąskich zakresach i nie posiadają możliwości pomiaru całego widma NIR [60-63]. Dzięki temu można zrozumieć, w jaki sposób dostępność informacji chemicznej wpływa na wydajność spektrometrów opartych na różnorodnych rozwiązaniach technicznych [63].

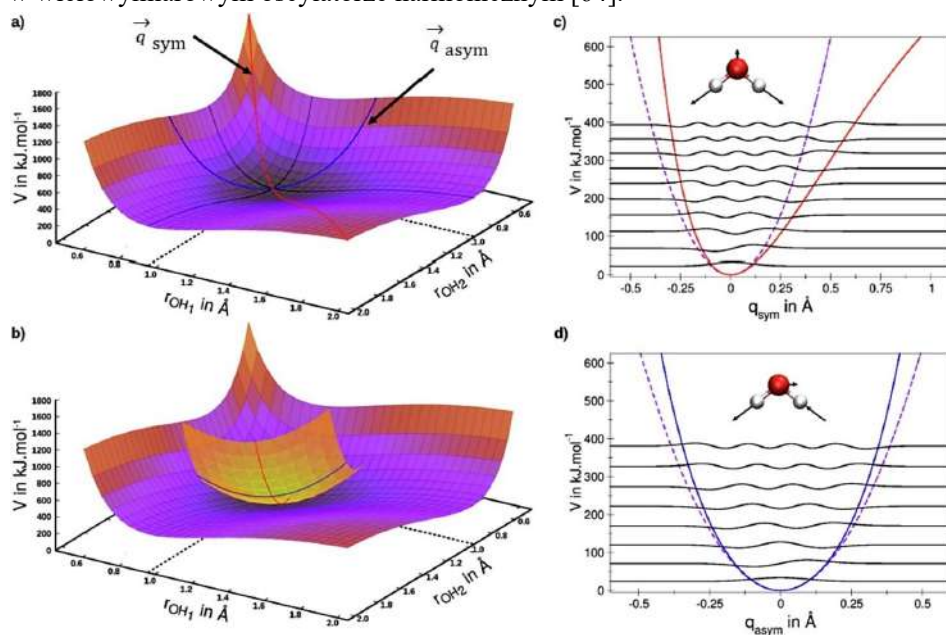
1. PODSTAWY FIZYCZNE SPEKTROSKOPII NIR

1.1. KWANTOWO-MECHANICZNY OPIS PRZEJŚĆ OSCYLACYJNYCH

Spektroskopia NIR opiera się tylko na nadtonach i pasmach drgań kombinacyjnych [64], ponieważ pasma drgań fundamentalnych nie są obserwowane powyżej 4000 cm^{-1} . Znaczące różnice zachodzą między spektroskopią MIR i NIR, z punktu widzenia chemii teoretycznej i fizyki chemicznej. Podstawowe przejścia, tj. z poziomu wibracyjnego podstawowego do pierwszego poziomu wzbudzonego (ν_01), można łatwo opisać z wykorzystaniem modelu oscylatora harmonicznego (i.e., przybliżenia harmonicznego). Pierwszym elementem tego uproszczenia opisu zjawiska drgania molekularnego jest reprezentacja potencjału oscylacyjnego za pomocą szeregu Taylora, ograniczonego do drugiego członu. Oznacza to, że potencjał jest reprezentowany funkcją kwadratową w dziedzinie współrzędnej normalnej. W wyniku tego uproszczenia, model oscylatora harmonicznego może posiadać jedynie równoodległe poziomy energetyczne; istnieje więc jedno możliwe przejście $\Delta v = \pm 1$. Drugą składową przybliżenia harmonicznego jest oddanie funkcji momentu dipolowego poprzez szereg Taylora ograniczony do pierwszego (liniowego) członu wyrażenia. W rezultacie, liniowa reprezentacja funkcji momentu dipolowego powoduje, że prawdopodobieństwa (czyli intensywności) przejść między poziomami energetycznymi innymi niż sąsiadujące są równe zero. Zatem tylko przejścia między sąsiadującymi poziomami wibracyjnymi są dozwolone w modelu oscylatora harmonicznego.

Przybliżenie harmoniczne drgań molekularnych jest często opisywana w podręcznikach na przykładzie molekuł dwuatomowych o jednowymiarowym potencjale oscylacyjnym. Jednak taki prosty przykład nie daje pełnego zrozumienia najważniejszych pasm obserwowanych w widmach NIR, czyli pasm drgań kombinacyjnych, które w decydujący sposób wynikają ze sprzężeń między drganiami normalnymi. Aby móc opisać pasma drgań kombinacyjnych, należy więc rozważyć układ będący przynajmniej oscylatorem dwuwymiarowym. Przykładem może być problem, w którym uwagę poświęcimy dwóm z trzech drgań w cząsteczce

wody - drganiom rozciągającym, odpowiednio, symetrycznemu i antysymetrycznemu. Taki układ, zdefiniowany w układzie rozpiętym przez dwie współrzędne normalne jak przedstawia Rysunek 1, jest wystraszający, by rozpatrzyć wielowymiarowy potencjał oscylacyjny. Sprzężenie pomiędzy tymi dwoma drganiami jest natomiast wyrażone przez powierzchnię potencjału pomiędzy punktami leżącymi na odpowiednich współrzędnych normalnych; punkty te opisują potencjał sprzężenia. Przybliżenie harmoniczne w wielowymiarowej przestrzeni, takiej jak w omawianym przykładzie, nadal prowadzi do reprezentacji rzeczywistej powierzchni potencjału jako funkcji kwadratowej względem każdej ze współrzędnych. W omawianym przypadku, potencjał harmoniczny jest więc reprezentowany przez paraboloidę (Rysunek 1). W rezultacie, każdy punkt na powierzchni potencjału harmonicznego może być uzyskany jako liniowa kombinacja odpowiednich punktów z każdego z dwóch potencjałów harmonicznym poszczególnych drgań; innymi słowy, rozprężonych oscylatorów harmonicznym. W konsekwencji zaniedbany zostaje potencjał sprzężenia w takim układzie, co skutkuje brakiem możliwości pojawienia się drgań kombinacyjnych w wielowymiarowym oscylatorze harmonicznym [64].



Rysunek 1. Harmoniczny i anharmoniczny potencjał 2D drgań rozciągających cząsteczki wody: v_1 (symetryczny, q_{sym}) i v_3 (antysymetryczny, q_{asym}); (a) prawdziwy charakter modów normalnych na powierzchni energii potencjalnej (linia czerwona: q_{sym} ; linia niebieska: q_{asym}); (b) charakter przybliżenia harmonicznego zastosowanego do tych modów; (c) harmoniczna i anharmoniczna krzywa potencjału podobna do Morse'a q_{sym} ; zwiększa się odstęp między kolejnymi poziomami energetycznymi; (d) harmoniczna i kwartalna krzywa potencjału anharmonicznego q_{asym} ; w przeciwieństwie do q_{sym} odstęp między poziomami wykazują wzrost przy wyższym wzbudzeniu. Reprodukowano za zgodą (Springer Nature) z pozycji [64]

Figure 1. Harmonic and anharmonic 2D potential of the stretching vibrations of water: v_1 (symmetric, q_{sym}) and v_3 (antisymmetric, q_{asym}); (a) the true nature of normal modes on the potential energy surface (red line: q_{sym} ; blue line: q_{asym}); (b) the nature of the harmonic approximation applied to these modes; (c) harmonic and anharmonic Morse-like potential curve of q_{sym} ; the spacing between subsequent energy levels is increasing; (d) harmonic and quartic anharmonic potential curve of q_{asym} ; in contrast to q_{sym} , the spacing between the levels demonstrate an increase upon higher excitation. Reproduced with permission (Springer Nature) from Ref. [64]

Te uproszczenia, które cechują przybliżenie harmoniczne, znacząco zmniejszają złożoność obliczeniową opisu drgań molekularnych. Niemniej jednak, aby uzyskać możliwość opisu nadtonów i drgań kombinacyjnych, konieczne jest stosowanie bardziej zaawansowanego, anharmonicznego opisu, w którym postać potencjału oscylacyjnego i funkcji momentu dipolowego są wierniej odzwierciedlone. Niestety, uzyskanie dokładnego rozwiązania równania Schrödingera takiego oscylatora jest bardzo kosztowne z punktu widzenia złożoności obliczeniowej. Obecne ograniczenia stosowania takich metod pozwalają jedynie opisać proste układy, na przykład molekuly o 4 oscylacyjnych stopniach swobody, czyli linowe molekuly trójatomowe [65].

Alternatywne podejście do tego zagadnienia bazuje na rozszerzeniu modelu oscylatora harmonicznego. Wkłady do anharmoniczności uwzględnia się poprzez włączenie wyższych członów do rozwinięcia szeregu Taylora. Opisują one odchylenie od przybliżenia harmonicznego, przy czym wraz z postępem tego rozwinięcia kolejne człony opisują coraz mniejsze odstępstwo od modelu harmonicznego. Liczba członów rozwinięcia szeregu Taylora własności oscylatora molekularnego zależy zatem od dokładności, którą chcemy osiągnąć w opisie efektów anharmonicznych. W przypadku energii potencjalnej, najistotniejsze wkłady anharmoniczne zawarte są w członie sześciennym oraz czwartego rzędu. Jednak wyższe składniki anharmoniczne również mogą być uwzględniane dla bardziej dokładnych opisów, zwłaszcza w przypadku układów silnie anharmonicznych; poprzez układy takie należy rozumieć przypadki poza kręgiem bezpośrednich zainteresowań spektroskopii analitycznej (np. niektóre krystaliczne materiały ferroelektryczne w obecności przejść fazowych lub silnego sprzężenia elektronowo-fononowego). Należy również pamiętać, że uwzględnienie składników wyższego rzędu poza czwartym wiąże się z wykładniczo rosnącym większym kosztem obliczeniowym.

Natomiast w rozwinięciu szeregu Taylora dla momentu dipolowego, najczęściej stosowanym podejściem jest uwzględnienie członu kwadratowego, tj. składnika drugiego. Ostateczna liczba członów "anharmonicznych", które należy rozważyć w tym opisie, zależy od stopnia anharmoniczności w badanym systemie, a także od dostępnych zasobów obliczeniowych. W praktyce, często stosuje się kompromis pomiędzy dokładnością a obliczeniowymi kosztami, uwzględniając najważniejsze

składniki anharmoniczne, które mają największy wpływ na opis drgań molekularnych.

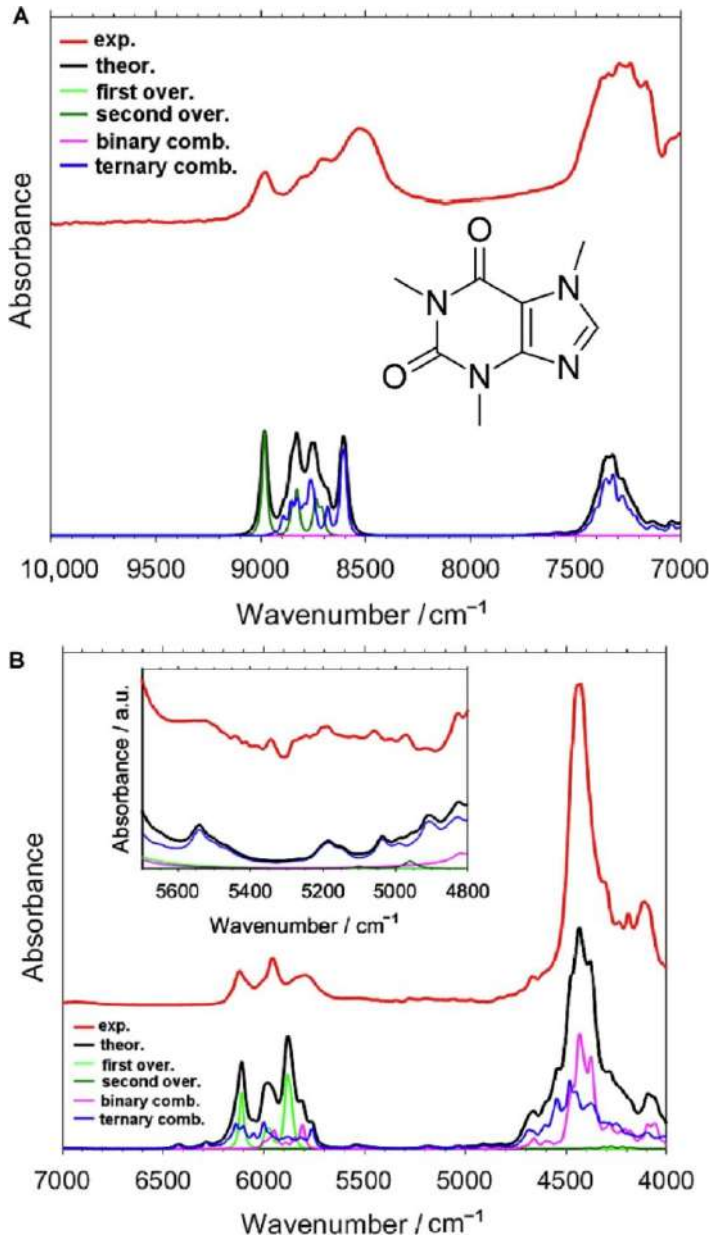
Z tego względu wprowadzono różne metody anharmoniczne chemii kwantowej, które mają zapewnić wystarczającą dokładność i użyteczność w spektroskopii, przynajmniej dla małych i średnich cząsteczek. Dostępne koncepcje teoretyczne obejmują np. oscylacyjna metoda pola samouzgodnionego (Vibrational Self-Consistent Field, VSCF), oscylacyjna metoda zaburzeń drugiego rzędu (Vibrational Second-Order Perturbation Theory, VPT2) oraz oscylacyjna metoda oddziaływania konfiguracji (Vibrational Configuration Interaction, VCI) [66-68]. Niemniej jednak nawet te bardziej wydajne metody pozostawały przez długi czas zbyt kosztowne do regularnego zastosowania w spektroskopii NIR. Ze względu na zbyt wysoki koszt obliczeniowy, VCI można generalnie uznać za narzędzie nieodpowiednie do badania jakiegokolwiek systemu składającego się z więcej niż kilkunastu atomów. Metoda VSCF jest bardziej dostępna i lepiej dopasowana do tych potrzeb, ale nie zyskała popularności poza spektroskopią MIR i Ramana [66]. Poza tym, uproszczony opis sprzężeń międzymodowych w schemacie VSCF może zmniejszyć ogólną dokładność otrzymanego widma teoretycznego, biorąc pod uwagę szczególnie znaczenie drgań kombinacyjnych w widmach w bliskiej podczerwieni. Proponowane sposoby ulepszenia opisu sprzężeń w VSCF (na przykład metoda PT2-VSCF, w której teoria rachunku zaburzeń drugiego rzędu [PT2] zastosowana jest do obliczenia poprawek na sprzężenia między drganiami) powodują znaczny wzrost kosztu obliczeniowego. W porównaniu z tą rodziną metod, VPT2 wyróżnia się jako szczególnie przystępna ze względu na znacznie niższą złożoność obliczeniową [69]. Niemniej jednak, w swojej oryginalnej postaci, metoda VPT2 często prowadzi do znacznego błędu w opisie drgań o podobnej energii, co ma kluczowe znaczenie w opisie sprzężeń. Prowadzi to do obarczenia części wyników znacznym błędem, przy czym trudno dla danego układu jest przewidzieć które z opisywanych drgań są dotknięte tym problemem. Chociaż istniało kilka skutecznych sposobów na ominiecie tego problemu używając VPT2, modyfikacje te nie miały uniwersalnego charakteru i wymagały szczególnego przygotowania opisu konkretnego układu. To skutecznie czyniło te rozwiązania mało przydatnymi dla celów spektroskopii, dla której dostępność metody mogącej być łatwo zastosowanej do opisu szeregu różnych cząsteczek jest kluczowa. W ciągu ostatniej dekady poczyniono starania, aby udoskonalić schemat VPT2 poprzez wprowadzenie uniwersalnej modyfikacji, umożliwiając jego wygodne wykorzystanie w spektroskopii stosowanej. Istotne postępy w tym kierunku zostały osiągnięte przez grupę profesora Barone [70], skutkując wprowadzeniem ulepszonych schematów VPT2, takich jak DVPT2, DCPT2 i GVPT2, czyli odpowiednio warianty „deperturbed”, „degeneracy-corrected” i uogólniony tej metody [44]. W szczególności, GVPT2 - uogólniona

metoda - zapewnia niezawodność w przewidywaniu widm anharmonicznych zarazem oferując bardzo dużą szybkość obliczeń w porównaniu z konkurencyjnymi rozwiązaniami takimi jak PT2-VSCF. Nowe warianty metody VPT2 umożliwiają zintensyfikowane badania w zakresie spektroskopii NIR, w tym teoretyczne przewidywanie widm skomplikowanych cząsteczek. W konsekwencji, w ostatnich latach zauważono znaczący wzrost zainteresowania modelowaniem kwantowo-mechanicznym widm NIR przy użyciu metod DVPT2/GVPT2 [31,37,42,44].

1.2. PODSTAWOWE ZROZUMIENIE I PRAKTYCZNA INTERPRETACJA WIDM NIR

Najbardziej oczywistą korzyścią z dostępności modelowania kwantowo-mechanicznego widm jest możliwość znacznie dokładniejszej interpretacji pasm NIR. Ważne jest, że w przeciwieństwie do spektroskopii MIR lub technik ramanowskich, konwencjonalne metody spektroskopii używane do identyfikacji pasm (np. systematyczne badania serii związków, podstawienie izotopowe, itp.) nie zawsze dostarczają wystarczających informacji do zrozumienia skomplikowanych widm NIR, w których wiele pasm się nakłada i tworzy skomplikowane obwiednie spektralne. W takim przypadku modelowanie kwantowo-mechanicznego oferuje szczególnie przydatne narzędzie w analizie i interpretacji widm NIR.

Modelowane kwantowo-mechaniczne widma NIR ujawniają, że główne źródła intensywności absorpcji pochodzą z pasm drgań kombinacyjnych, jak pokazano na przykładzie kofeiny (Rysunek 2) [52]. Istotność poszczególnych pasm w widmie NIR można ilościowo oszacować, obliczając procentowe udziały w intensywności widma teoretycznego. Analiza zakresu spektralnego $10,000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ kofeiny wykazuje, że drgania kombinacyjne podwójne stanowią 37% intensywności, a uwzględniając drgania kombinacyjne potrójne, całkowity udział pasm drgań kombinacyjnych wynosi 86%. Natomiast pasma pierwszych nadtonów (2ω) stanowią tylko 12%, zaś pasma drugich nadtonów (3ω) jedynie 1% intensywności integralnej w całym analizowanym zakresie NIR kofeiny. W zakresie $10,000\text{-}7000\text{ cm}^{-1}$, czyli w krótkofalowej części zakresu NIR (tj. short-wavelength NIR, SW-NIR), pasma drugich nadtonów stanowią już 26,8%, a drgania kombinacyjne potrójne aż 73,2% intensywności integralnej, jak wynika z Tabeli 1 [52].



Rysunek 2. Eksperymentalne i teoretyczne widmo NIR kofeiny w regionie A: 10 000–7000 cm^{-1} ; B: 7000–4000 cm^{-1} . Dodatkowo przedstawiono udział w kształtowaniu obwiedni pasm pierwszych i drugich nadtonów oraz pasm drgań kombinacyjnych podwójnych i potrójnych. Reprodukacja (licencja CC-BY 4.0) z pozycji [52]

Figure 2. Experimental and simulated NIR spectrum of caffeine in region A: 10,000–7000 cm^{-1} ; B: 7000–4000 cm^{-1} . Additionally, presented are the contributions to absorption lineshape from the first and second overtones, as well as binary and ternary combinations. Reproduced (CC-BY 4.0 license) from Ref. [52]

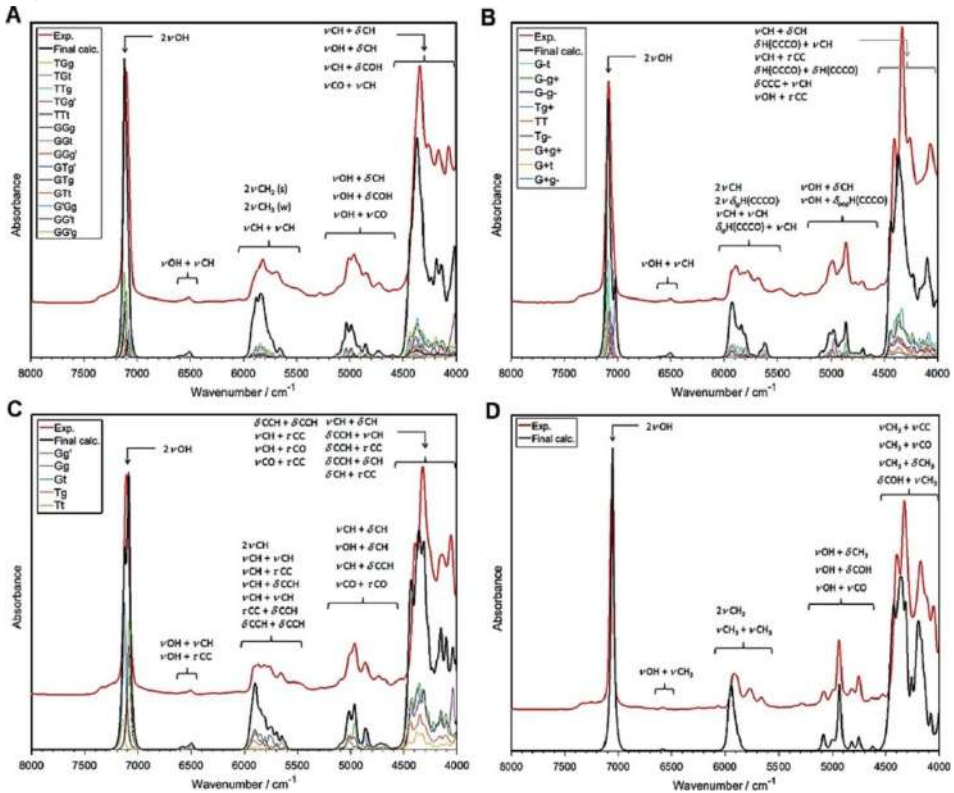
Tabela 1. Udziały drgań w widmie NIR (w % integralnej intensywności całkowitej) kofeiny w wybranych zakresach spektralnych na podstawie obliczonego widma. Reprodukacja (licencja CC-BY 4.0) z pozycji [52]

Table 1. Vibrational contributions to NIR spectrum (in % of the integral intensity) of caffeine in selected wavenumber regions based on the calculated spectrum. Reproduced (CC-BY 4.0 license) from Ref. [52]

Zakres spektralny [cm ⁻¹]	Pierwszy nadton	Drugi nadton	Drgania kombinacyjne podwójne	Drgania kombinacyjne potrójne
10,000–4000	11.57	1.28	36.91	50.24
10,000–7000	0.02	26.78	0.00	73.20
7000–4000	11.85	0.64	37.83	49.67
5000–4000	0.01	0.88	48.10	51.01
6500–5500	40.52	0.00	14.77	44.70
7700–7000	0.05	0.00	0.01	99.95
9200–8400	0.00	42.27	0.00	57.73

Ponadto, ciekawe wnioski można wysunąć porównując wyniki analizy dla kofeiny z podobnymi badaniami wcześniej przeprowadzonymi dla metanolu [71], etanolu [72] i kwasu rozmarynowego [73]. Drugie nadtony wydają się być zbyt mało intensywne, aby być istotne w widmach NIR w każdym z omawianych przypadków, z wyjątkiem krótkofalowego fragmentu widma (czyli dla liczb falowych większych niż ok. 7200 cm⁻¹ w omawianych przypadkach). W konsekwencji, pełne odwzorowanie widm w tym zakresie może być osiągnięte w zadowalającym stopniu poprzez uwzględnienie w obliczeniach jedynie pierwszych nadtonów i drgań kombinacji podwójnych [37]. W odniesieniu do drgań kombinacji potrójnych, jedynie przypadek kofeiny wydaje się być wyjątkowy, ponieważ te pasma są znacznie ważniejsze dla jej niskoczęstotliwościowego zakresu NIR („długofalowego”, ok. 4800–4000 cm⁻¹) niż wynikałoby to z wcześniejszych analiz dla innych cząsteczek. Szczególną uwagę warto zwrócić na badanie dotyczące alkoholi butylowych [47]. Teoretyczny kształt obwiedni widma uzyskany dla czterech izomerów alkoholu butylowego dzięki obliczeniom pierwszych nadtonów i drganiach kombinacji podwójnych bardzo przypomina eksperymentalne widma, prawidłowo oddając nawet drobne szczegóły (Rysunek 3). Można założyć, że w wielu przypadkach wyższe wzbudzenia objawiają się jedynie poprzez, co prawda liczne, ale bardzo mało intensywne pasma, które w zakresie 7000–4000 cm⁻¹ nie wylaniają się ponad poziom linii podstawowej. Ponadto, interesującym wynikiem badania alkoholi butylowych jest wyraźne wskazanie, że dokładne odtworzenie kształtu obwiedni NIR wymaga

uwzględnienia wpływu form konformacyjnych istniejących w badanym systemie (Rysunek 3).

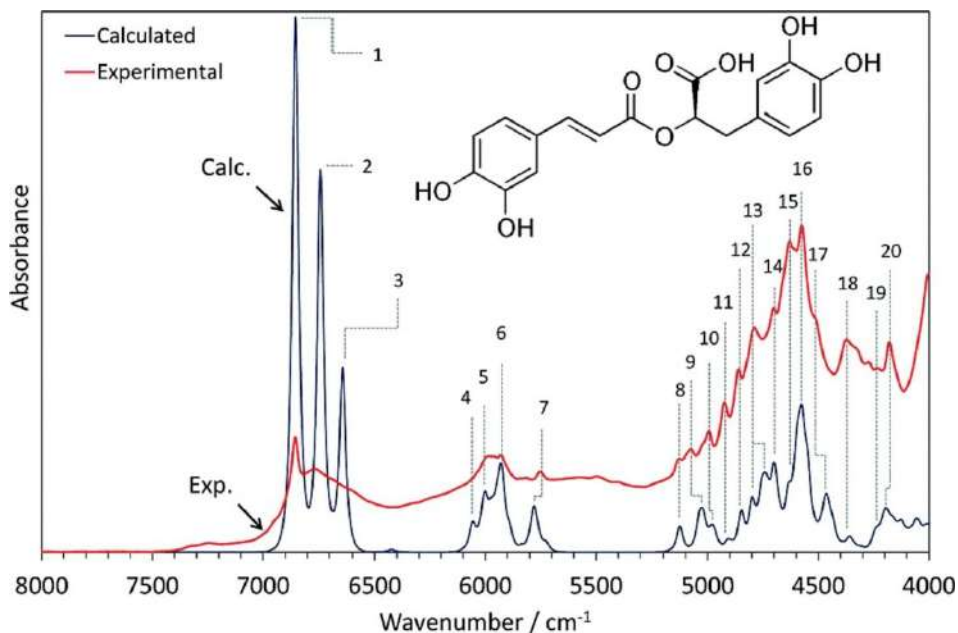


Rysunek 3. Eksperymentalne i teoretyczne widma NIR A: 1-butanolu, B: 2-butanolu, C: izobutanolu, D: tert-butanolu. Reprodukacja (licencja CC-BY 4.0) z pozycji [48]

Figure 3. Experimental and calculated NIR spectra of A: 1-butanol, B: 2-butanol, C: isobutanol, D: tert-butanol. Reproduced (CC-BY 4.0 license) from Ref. [48]

Lepsze zrozumienie pasm nadtonów i drgań kombinacyjnych w złożonej, wieloskładnikowej próbce ma duże znaczenie dla wsparcia zastosowań analitycznych spektroskopii w bliskiej podczerwieni. Na przykład, pełne przypisanie pasm obliczonego widma NIR kwasu rozmarynowego, ważnego przeciwutleniacza występującego w wielu roślinach (Rysunek 4), umożliwiło lepsze zaprojektowanie metody analitycznej [73]. W cytowanej pracy informacje chemiczne dotyczące charakterystycznych liczb falowych poszukiwanego składnika roślinnego zostały połączone z heterokorelowaną dwuwymiarową spektroskopią korelacyjną (2DCOS), aby określić względną czułość różnych spektrometrów wobec konkretnych pasm występujące w odpowiednich widmach NIR [73]. Dzięki widmu teoretycznemu

i przypisaniem pasm NIR znacznie dokładniejszym niż te dostępne z ogólnych źródeł, możliwe stało się pełne zrozumienie cech modeli chemometrycznych używanych w analizie z użyciem różnych spektrometrów.



Rysunek 4. Eksperymentalne i teoretyczne widmo NIR kwasu rozmarynowego otrzymane z obliczeń metoda anharmonicznej analizy wibracyjnej GVPT2 na poziomie metody struktury elektronowej DFT-B3LYP/N07D. Teoretyczne kształty pasm uzyskano stosując funkcję iloczynowa Cauchy'ego-Gausa. Reprodukacja za zgodą Royal Society of Chemistry (2017) z pozycji [73]

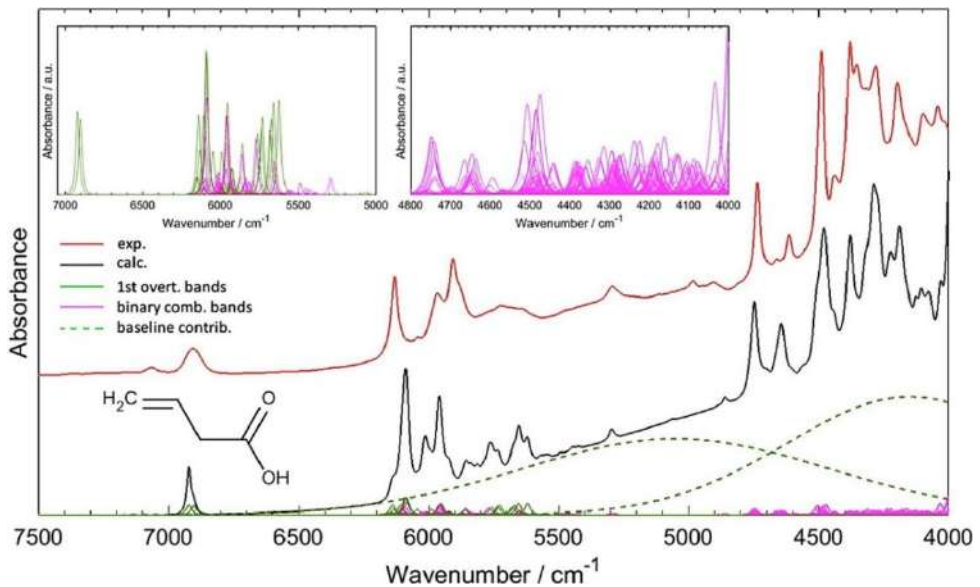
Figure 4. The experimental and theoretical NIR spectrum of rosmarinic acid obtained through fully anharmonic (GVPT2) DFT-B3LYP/N07D calculation. The theoretical bands shapes were obtained with the application of Cauchy-Gauss product function. Reproduced with permission from Royal Society of Chemistry (2017) from Ref. [73]

2. ZASTOSOWANIA

2.1. CHEMIA FIZYCZNA

Modelowanie kwantowo-mechaniczne widm NIR przynosi zauważalne korzyści w badaniach fizyko-chemicznych, takich jak badania struktury i dynamiki cząsteczek jak również oddziaływań międzycząsteczkowych. Poza umożliwieniem bardziej szczegółowego poznania korelacji widmo-struktura chemiczna w zakresie NIR dla wielu podstawowych związków, modelowania widm pozwoliły na wyjaśnienie również innych istotnych problemów [46,48,50,54,57,74]. Warto zwrócić szczególną uwagę na efekty podstawienia izotopowego, w których dokładnie odtworzono pasma charakterystyczne dla izotopowych form metanolu i etanolu [71,72,75]. Te obliczone widma NIR zapewniają wysoką dokładność, z wiernie odtworzonymi również subtel-

nymi szczegółami kształtu obwiedni widma. Dla przykładu, rzetelność modelowanych kwantowo-mechanicznie widm została potwierdzona poprzez porównanie z eksperymentalnymi widmami sześciu izotopowych form etanolu. To pozwala z kolei na wiarygodne rozszerzenie analizy widm dla dwóch innych form, których próbek nie można wyizolować, a tym samym nie jest możliwe poznanie ich widm NIR na drodze pomiarów.



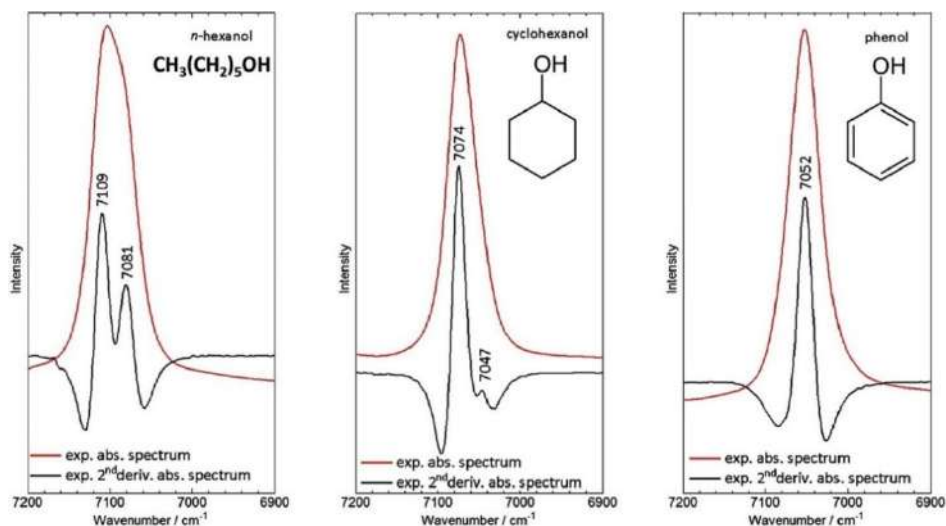
Rysunek 5. Udziały w obliczonym widmie NIR na przykładzie kwasu winylooctowego. Wszystkie intensywności pasm są przedstawione w skali; uwagę zwraca znaczny poziom nakładania się pasm. Reprodukacja za zgodą z pozycji [55]. Prawa autorskie (2017) American Chemical Society

Figure 5. Contributions to the calculated NIR spectrum on the example of vinylacetic acid. All band intensities are kept to scale. Note a significant level of band overlapping; magnified major regions with better view of details of calculated bands are presented as well. Reprinted with permission from Ref. [55]. Copyright (2017) American Chemical Society

Z drugiej strony, badane widma NIR metanolu deuterowanego zawierały pasma zanieczyszczeń nieznanego pochodzenia [71]. Modelowane kwantowo-mechanicznie widma umożliwiły identyfikację tych zanieczyszczeń jako specyficznych, nierównomiernie deuterowanych form metanolu, które pojawiły się albo ze względu na niedoskonałą syntezę, albo na spontaniczną wymianę izotopową, która zachodziła w próbce. Identyfikacja takich zanieczyszczeń nie byłaby możliwa przy użyciu podejść doświadczalnych, ponieważ synteza lub wyizolowanie takich izotopologów nie jest możliwa. To doskonały przykład potencjału modelowania kwantowo-mechanicznego widm w identyfikacji nieznanych substancji obecnych w próbce.

Badania omówione tutaj udowadniają istnienie zakresu daktyloskopowego widma NIR, przypominającego ten znany w spektroskopii MIR oraz Ramana. Te osiągnięcia pomagają rozwiązać jedną z kilku niedoskonałości spektroskopii NIR jakim jest ograniczona zdolność tej techniki do identyfikacji struktur chemicznych [76-78].

Widma NIR charakteryzują się skomplikowaną naturą, co wynika z daleko posuniętego efektu nakładania się pasm. Nawet w przypadku prostszych cząsteczek, takich jak kwas winylooctowy, może ujawnić się jako zaskakujący fakt, jak bardzo poszczególne pasma nadtonów i drgań kombinacyjnych nakładają się na siebie (Rysunek 5) [55]. To doskonały przykład pokazujący, jak ważne jest stosowanie metod chemii obliczeniowej, aby uzyskać przydatne informacje o pochodzeniu widm NIR. Wydaje się również zrozumiałe, że praktykowany w spektroskopii MIR lub Ramana sposób przedstawiania przypisań pasm na rysunkach lub w związanych tabelach, nie wystarczą, by moc w pełni oddać złożony charakter widm NIR.



Rysunek 6. Widma NIR wraz z druga pochodna (pomnożone przez -1) badanych alkoholi (0,2 M; CCl_4) w zakresie spektralnym pierwszego nadtonu pasma rozciągającego OH. Reprodukacja z zgodą Elsevier z pozycji [48]

Figure 6. NIR and second derivative spectra (multiplied by -1) of studied alcohols (0.2 M; CCl_4) in the region of the first overtone of the OH stretching band. Reprinted with permission from Elsevier from Ref. [48]

Alkohole są szeroko wykorzystywane w spektroskopii NIR w badaniach struktur chemicznych i oddziaływań międzycząsteczkowych. Pasma wyższych nadtonów νOH stanowią bogate źródło informacji na temat tych zjawisk, ze względu na wysoką anharmoniczność tych drgań, wrażliwość na środowisko chemiczne i zdolność tworzenia wiązań wodorowych. W dodatku, położenie tych pasm w zakresach spe-

ktralnych wolnych od innych istotnych pasm NIR istotnie polepsza możliwości badania również bardziej subtelnych efektów przejawiających się w zmianach parametrów tych pasm [46]. Jak przedstawia Rysunek 6 na przykładzie n-heksanolu, cykloheksanolu i fenolu, położenie pasma νOH przejawia wysoką czułość względem natury chemicznej związku zawierającego grupę hydroksylową [48]. Z kolei kształt tego pasma zależy także od równowagi form konformacyjnych [46-48].

2.2. WSPARCIE ANALIZY JAKOŚCIOWEJ I ILOŚCIOWEJ ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII NIR

Zastosowanie metod obliczeniowych widm NIR w aplikacjach analitycznych można podzielić w uproszczeniu na trzy główne kierunki: (i) interpretację różnic instrumentalnych, (ii) zrozumienie modeli kalibracyjnych, oraz (iii) zrozumienie różnic między zastosowalnością różnych technik spektroskopowych (np. NIR vs MIR) w analizie danego składnika. Ta wiedza pozwala na lepsze zaprojektowanie analizy i dostosowanie jej do wybranego instrumentu, np. wybór konkretnego sensora NIR lub MIR jako przyrządu najlepiej spełniającego wymagania danej analizy.

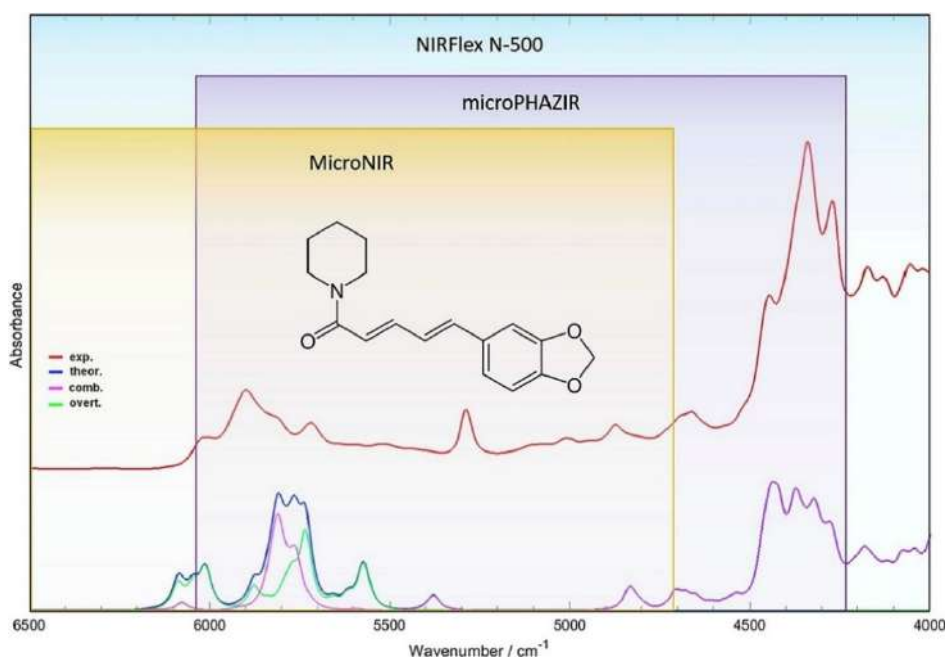
2.2.1. Interpretacja różnic instrumentalnych

W ostatniej dekadzie ciąglej postęp w technologii spowodował dynamiczny rozwój przenośnych, zminiaturyzowanych spektrometrów NIR. Przyrządy te istotnie zwiększyły potencjał tej techniki spektroskopowej, umożliwiając bezpośrednią analizę poza laboratorium, oferując nowe spektrum zastosowań tej techniki w nauce i przemyśle [60,61]. W praktyce, miniaturyzacja została zrealizowana poprzez opracowanie wielu odrębnych rozwiązań inżynierskich przez producentów, w efekcie czego poszczególne instrumenty różnią się kluczowymi elementami konstrukcyjnymi, np. monochromatorem czy detektorem [60,61]. W konsekwencji, wydajność i przydatność tych urządzeń do specyficznych zastosowań różnią się, a ich praktyczne parametry są decydujące dla jakości dostarczanej analizy.

Różnice te wywodzą się z ograniczonego zakresu liczb falowych, które te instrumenty mogą mierzyć, jak również niejednakowej rozdzielczości spektralnej. W wyniku czego, przyrządy te nie są w jednakowy sposób zarejestrować wszystkie charakterystyczne pasma analizowanych składników próbki. Przykładem może być analiza zawartości piperony w czarnym pieprzu [63,79]. Badanie te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem metody PLSR oraz pomiarów wykonanych przenośnymi urządzeniami VIAVI MicroNIR i ThermoFischer microPHAZIR, oraz spektrometrze stacjonarnym FT-NIR Büchi NIRFlex N-500. W odróżnieniu od spektro-

metru laboratoryjnego, kompaktowe urządzenia mierzą tylko fragmenty zakresu NIR, nie ujmując wszystkich znaczących pasm analizowanego składnika (Rysunek 7).

Ta selektywna zdolność do zarejestrowania pasm charakterystycznych analizowanego składnika, która jest uzależniona od zakresu spektralnego specyficznego dla danego urządzenia, wpływa znacząco na ostateczny wynik analizy. W omawianym przykładzie, microPHAZIR może mierzyć tylko pierwsze nadtony i drgania kombinacyjne C–H piperyny, które dostarczają najwięcej informacji do modelu kalibracyjnego. Ważne jest, aby brać pod uwagę ten aspekt podczas projektowania optymalnej aplikacji, bowiem przewidzieć można przydatność danego spektrometru do wykonania danej analizy.

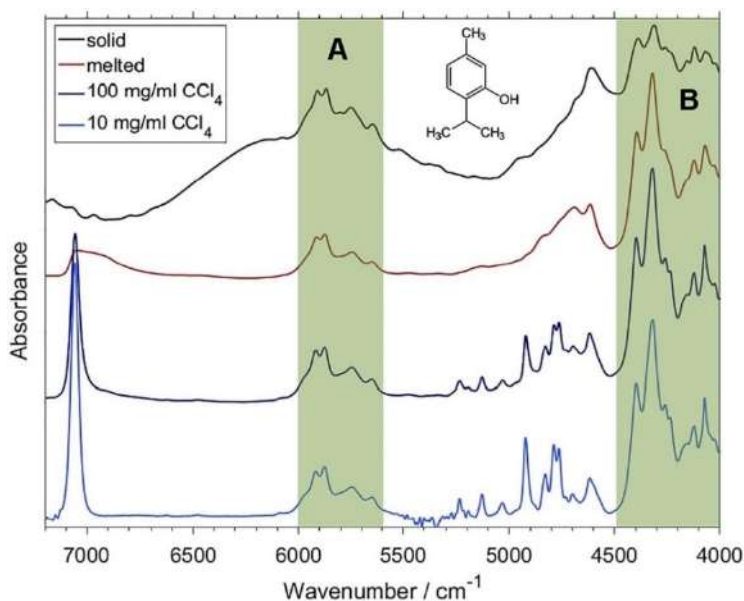


Rysunek 7. Teoretyczne widmo NIR piperyny w porównaniu z widmem eksperymentalnym piperyny (roztwór w CCl_4). Przedstawiono również zsumowane wkłady z pierwszych nadtonów i pasm kombinacji. Zaznaczone kolorem są zakresy, które mogą być zarejestrowane przez dwa różne przenośne spektrometry. Reprodukacja (licencja CC-BY 4.0) z pozycji [79]

Figure 7. Quantum mechanically simulated NIR spectrum of piperine compared with the experimental spectrum of a piperine standard (solution in CCl_4). The summed contributions from the first overtones and combination bands are presented as well. Highlighted in color are the ranges that were recorded by the different spectrometers after spectra pre-treatment. Reproduced (CC-BY 4.0 license) from Ref. [79]

2.2.2. Chemiczna interpretacja modeli kalibracyjnych

Obliczone widma NIR pozwalają na interpretację, w jaki sposób pasma absorpcyjne (intensywności spektralne przy danych liczbach falowych) manifestowane są w modelach kalibracyjnych jako informacja ilościowo skorelowana ze stężeniem analizowanego składnika w próbce. Jako przykład posłużyć mogą badania tymolu, który jest związkiem reprezentatywnym dla szeregu substancji czynnych, często analizowanych w produktach naturalnych, jako że odgrywają one kluczową rolę w terapeutycznych właściwościach wielu roślin leczniczych [51]. Jak wspomniano wcześniej, pasma grup OH należą do najbardziej intensywnych i wyraźnych pasm obserwowanych w widmach NIR. Modelowanie kwantowo-mechaniczne widma tymolu potwierdza te ogólną prawidłowość, pokazując, że nie tylko nadtony, ale także drgania kombinacyjne νOH należą do najważniejszych cech widma NIR tego związku. Badania tymolu wykazały istotne różnice między zakresami liczb falowych, w których pasma NIR zależą w sposób istotny od postaci próbki (polikrystaliczna, stopiony kryształ oraz roztwór w CCl_4 o dwóch różnych stężeniach, 10 oraz 100 mg/mL). Pasma, których parametry pozostają względnie niezmiennione, grupują się w dwóch zakresach liczb falowych, odpowiednio 6000–5600 i 4490–4000 cm^{-1} (Rysunek 8). Modelowanie kwantowo-mechaniczne widma NIR tymolu umożliwiło przypisanie tych dwóch zakresów jako zdominowanych pasmami drgań kombinacyjnych i nadtonami, odpowiednio drgań rozciągających C-H i CH_3 (zakres A), oraz drgań rozciąganych oraz deformacyjnych CH_3 , z udziałem również drgań deformacyjnych pierścienia (zakres B). Wyniki te pomogły w interpretacji modelu PLSR skalibrowanego do oceny zawartości tymolu w suchym ekstrakcie stosowanym w produkcji leku naturalnego na bazie *Thymi herba*. Kluczowe liczby falowe, które wykazują największą korelację ze stężeniem analizowanej substancji, znajdują się wyłącznie w tych dwóch zakresach spektralnych (A i B). Co ciekawe, pasma pochodzące od grupy OH nie wnoszą istotnego wkładu do modelu PLSR. Pokazuje to, że najbardziej intensywne i charakterystyczne pasma NIR niekoniecznie oferują najlepszą informację analityczną o analizowanej próbce.



Rysunek 8. Zestaw eksperymentalnych widm NIR tymolu; próbka w stanie stałym (polikrystaliczna) i ciekłym (stopiona, 333 K) oraz roztwór w CCl_4 (100 i 10 mg mL^{-1} CCl_4). Zaznaczone są zakresy liczby falowej jakościowo niezależne od fazy próbki i stężenia; A: 6000–5600 cm^{-1} ; B: 4490–4000 cm^{-1} . Reprodukacja (licencja CC-BY 4.0) z pozycji [51]

Figure 8. A set of the experimental NIR spectra of thymol; solid state and melted (neat liquid, 333 K) as well as diluted in CCl_4 (100 and 10 mg mL^{-1} CCl_4). Highlighted are the wavenumber regions qualitatively independent of sample phase and concentration; A: 6000–5600 cm^{-1} ; B: 4490–4000 cm^{-1} . Reproduced (CC-BY 4.0 license) from Ref. [51]

2.2.3. Zakres daktyloskopowy widm NIR złożonych struktur molekularnych

Biomolekuły są systemami o uniwersalnym znaczeniu, ale ich interpretacja w spektroskopii NIR jest szczególnie trudna. W przeciwieństwie do dobrze znanych pasm charakterystycznych MIR i Ramana, trudniej jest zdefiniować zakresy spektralne, w których można wykryć charakterystyczne pasma ważnych związków o znaczeniu biochemicznym. Jednym z przykładów obecnie dyskutowanych w literaturze przedmiotu są pasma charakterystyczne peptydów. Pasma amidowe (np. A, B, I, II oraz III) należą do jednych z najważniejszych cech widmowych w badaniach próbek biologicznych oraz w zastosowaniach medycznych z udziałem technik MIR oraz ramanowych i stanowią doskonały przykład ilustrujący możliwości spektroskopii oscylacyjnej w zakresie identyfikacji struktur chemicznych jak również ich funkcji. Niestety, użyteczność spektroskopii NIR w podobnych rolach pozostaje utrudniona. Charakteryzacja pasm amidowych w zakresie NIR jest wciąż przedmiotem badań i stanowi przedmiot debaty w literaturze naukowej, a dostępne podejścia eksperymentalne tylko częściowo rozwiązują ten problem [76,80].

Na przestrzeni ostatnich lat, badania w zakresie NIR dla biomolekuł skupiło się na ustanowieniu wiarygodnych korelacji między widmem a strukturą chemiczną różnych biomolekuł; kwasów tłuszczowych o krótkim, średnim i długim łańcuchu [55,56,74] czy zasad nukleinowych (adeniny, guaniny, tyminy i cytozyny) [53]. Na przykład, wyodrębniono zakresy spektralne widm NIR, które zawierają pasma specyficzne dla kwasów tłuszczowych, w szczególności niosące informacje o obecności wiązań wielokrotnych w łańcuchu węglowym.

Poza biologicznymi cząsteczkami, polimery również są przedmiotem zainteresowania w spektroskopii NIR ze względu na ich szerokie zastosowanie w przemyśle. Chociaż skomplikowane cząsteczki chemiczne mogą stanowić wyzwanie dla obliczeń teoretycznych, zastosowanie uproszczonych modeli, które uwzględniają główne motywy strukturalne większych układów, jest odpowiednie dla polimerów ze względu na ich okresową strukturę. Układy posiadające sześciocząłkowy pierścień aromatyczny w swojej strukturze cząsteczkowej ukazują wyraźne kombinacje pasm ν_{CH} i δ_{ring} tworzące bardzo charakterystyczny kształt obwiedni widmowej pomiędzy 4700 a 4500 cm^{-1} [57]. Struktura ta wydaje się być podobna we wszystkich czterech polimerach, mimo znacznych różnic w strukturze, do której jest przyłączony pierścień aromatyczny, co potwierdza istnienie uniwersalnego i specyficznego zakresu daktyloskopowego pierścienia aromatycznego w widmie NIR. Jego położenie w części widma NIR, gdzie zazwyczaj nie występują inne silne pasma, umożliwia łatwą bezpośrednią interpretację w kierunku obecności struktury pierścienia aromatycznego w analizowanej próbce, bez potrzeby stosowania złożonej analizy w oparciu o trenowanie modelu chemometrycznego.

UWAGI KOŃCOWE

Anharmoniczne obliczenia mechaniki kwantowej zyskują coraz większą przydatność w rozwiązywaniu problemów zarówno w podstawowej spektroskopii NIR, jak i jej zastosowaniach analitycznych. Niniejszy przegląd podkreśla wzrost wartości teoretycznej spektroskopii NIR w porównaniu z innymi rodzajami spektroskopii oscylacyjnej. Znacznie bardziej złożone widma niż te typowe dla spektroskopii MIR czy Ramana, z wsparciem konwencjonalnych metod analizy spektralnej, zwiększają specyficzność chemiczną spektroskopii NIR. Postępy w teoretycznych metodach otwierają drogę do modelowania widm NIR znacznie większych cząsteczek i ujawniają ukryty potencjał spektroskopii NIR.

Badania te przynoszą znaczną poprawę naszego zrozumienia widma NIR. Obecnie prowadzone prace badawcze obejmują zarówno chemię fizyczną, jak i rozwój zastosowań spektroskopii NIR. Szczegółowe przypisania pasm NIR dostarczają nowych informacji fizycznych, takich jak oddziaływania międzycząsteczkowe obserwowane

w widmach NIR. Badania stosowane obejmują szeroki zakres tematów, w których możliwe jest ujawnienie zakresu daktyloskopowego widma NIR w skomplikowanych systemach, takich jak biomolekuły, kwasy tłuszczowe, zasady nukleinowe oraz polimery. Ponadto korelacje ustalone między strukturą molekularną a widmami NIR poprawiają specyficzność chemiczną spektroskopii NIR.

W ilościowych i jakościowych ramach analitycznych spektroskopii NIR modelowanie kwantowo-mechaniczne widm umożliwia interpretację wkładu chemicznego w różnice między poziomami wydajności obserwowanymi między zminiaturyzowanymi spektrometrami. Można lepiej zrozumieć jakość przewidywania danej struktury chemicznej, często nierównej między różnymi zminiaturyzowanymi spektrometrami. Prowadzi to do lepszej analizy poprzez wybór najlepiej dopasowanego sensora do zamierzonego zastosowania. Ponadto dopuszcza się wzajemne przenikanie się modeli kalibracyjnych ze szczegółowymi informacjami na temat pochodzenia pasm NIR. Możliwości te stanowią niezbędny pomost do poprawy potencjału zastosowań spektroskopii NIR poprzez integrację zinterpretowanych informacji chemicznych w ustalonych ramach analitycznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca ta jest dedykowana prof. dr hab. Jerzemu Hawrankowi z okazji osiemdziesiątych urodzin.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Ozaki, C.W. Huck, K.B. Beć, Near-IR spectroscopy and its applications in V.P. Gupta (Ed.), *Molecular and laser spectroscopy. Advances and applications*, San Diego, Calif.: Elsevier, 2018, p. 11–38.
- [2] C.W. Huck, K.B. Beć, J. Grabska, Near infrared spectroscopy in natural product research in R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*, John Wiley & Sons, 2020, p. 1-29.
- [3] H.W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heise, *Near-infrared spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
- [4] V. Baeten, P. Dardenne, Application of NIR in agriculture in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Ed.), *Near-infrared spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 331-345.
- [5] R. Pandiselvam, N.U. Sruthi, A. Kumar, A. Kothakota, R. Thirumdas, S.V. Ramesh, D. Cozzolino, *Food Rev. Int.* 2021.
- [6] Y. Ozaki, W.F. McClure, A.A. Christy, *Near infrared spectroscopy in food science and technology*, Wiley Interscience, New York, 2006.
- [7] M. Manley, P.J. Williams, Applications: food science in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), *Near-infrared spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 347-359.
- [8] D. Cozzolino, *Molecules* 2021, **26**, 6981.
- [9] A. Aït-Kaddour, A. Hassoun, C. Bord, E. Schmidt-Filgueras, A. Biancolillo, F. Di Donato, H. Tumay Temiz, D. Cozzolino, *Food Bioprocess Technol.* 2021, **14**, 781-803.
- [10] D. Cozzolino, *Food Anal. Methods* 2022, **15**, 1390-1396.

- [11] B. Igne, E.W. Ciurczak, Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), *Near-infrared spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 391-412
- [12] E.W. Ciurczak, J.K. Drennen, III, *Pharmaceutical and medical applications of near-infrared spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [13] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, **193**, 113686.
- [14] L. Yin, J. Zhou, D. Chen, T. Han, B. Zheng, A. Younis, Q. Shao, *Spectrochim. Acta A* 2019, **221**, 117208.
- [15] M.F. Dupont, A. Elbourne, D. Cozzolino, J. Chapman, V.K. Truong, R.J. Crawford, K. Latham, *Anal. Methods* 2020, **12**, 4597-4620.
- [16] J. Grabska, K.B. Beć, C.W. Huck, Current and future applications of IR and NIR spectroscopy in ecology, environmental studies, wildlife and plant investigations in Cozzolino, D. (Ed.), *Comprehensive analytical chemistry. Infrared Spectroscopy for Environmental Monitoring*, Vol. 98, 2022, p. 45-76.
- [17] H. Yan, H.W. Siesler, *Appl. Spectrosc.* 2018, **72**, 1362-1370.
- [18] H. Yan, H.W. Siesler, *J. Near Infrared Spectrosc.* 2018, **26**, 311-321.
- [19] T. Scherzer, Applications of NIR techniques in polymer coatings and synthetic textiles, in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen, (Eds.), *Near-infrared spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 475-516.
- [20] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, *Molecules* 2020, **25**, 2948.
- [21] M. Ishigaki, Y. Ozaki, Near-infrared spectroscopy and imaging in protein research *Vibrational Spectroscopy in Protein Research. From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies*, Academic Press, 2020, p. 143-176.
- [22] Y. Ozaki, C.W. Huck, M. Ishigaki, D. Ishikawa, A. Ikehata, H. Shinzawa, *Encyclopedia of Biophysics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018, p. 1-19.
- [23] V.R. Kondepati, H.M. Heise, J. Backhaus, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **390**, 125-139.
- [24] H.M. Heise, Medical applications of NIR spectroscopy in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), *Near-infrared Spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 437-473.
- [25] A. Sakudo, *Clinica Chimica Acta* 2016, **455**, 181-188.
- [26] K.B. Beć, J. Grabska, G.K. Bonn, M. Popp, C.W. Huck, *Front. Plant Sci.* 2020, **11**, 1226.
- [27] M.A. Czarniecki, Y. Morisawa, Y. Futami, Y. Ozaki, *Chem. Rev.* 2015, **115**, 9707-9744.
- [28] M.A. Czarniecki, Y. Morisawa, Y. Katsumoto, T. Takaya, S. Singh, H. Sato, Y. Ozaki, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021, **23**, 19188-19194.
- [29] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, Y. Ozaki, Quantum mechanical simulation of near-infrared spectra. Applications in physical and analytical chemistry in Y. Ozaki, M.J. Wójcik, J. Popp (Eds.), *Molecular spectroscopy: A quantum chemistry approach*, Vol. 2, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2019, p. 353-388.
- [30] M.A. Czarniecki, K.B. Beć, J. Grabska, T.S. Hofer, Y. Ozaki Overview of application of NIR spectroscopy to physical chemistry in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), *Near-infrared Spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 297-330.
- [31] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, *Spectrochim. Acta A* 2021, **254**, 119625.
- [32] K.B. Beć, J. Grabska, N. Plewka, C.W. Huck, *Molecules* 2021, **26**, 6390.
- [33] S. Mayr, K.B. Beć, J. Grabska, V. Wiedemair, V. Pürgy, M.A. Popp, G.K. Bonn, C.W. Huck, *Spectrochim. Acta A* 2021, **249**, 119342.
- [34] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, Near-infrared (NIR) sensors in environmental analysis in Narayan, R. (Ed.), *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*, Vol. 4, Elsevier, 2023, p. 484-503.
- [35] L.G. Weyer, S.C. Lo, Spectra-structure correlations in the near-infrared in J.M. Chalmers, P.R. Griffiths, (Eds.), *Handbook of vibrational spectroscopy*, Wiley, Chichester, 2002, Vol. 3, p. 1817-1837.
- [36] K.B. Beć, J. Grabska, Y. Ozaki, Advances in anharmonic methods and their applications to vibrational spectroscopies in M.J. Wójcik, H. Nakatsuji, B. Kirtman, Y. Ozaki (Eds.), *Frontiers of quantum chemistry*, Springer Singapore, Singapore, 2018, p. 483-512.
- [37] K.B. Beć, C.W. Huck, *Front. Chem.* 2019, **7**, 48.
- [38] L. Ma, Y. Peng, Y. Pei, J. Zeng, H. Shen, J. Cao, Y. Qiao, Z. Wu, *Sci. Rep.* 2019, **9**, 9503.
- [39] J. Workman, Jr., L. Weyer, (Eds.), *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy*, CRC press, Boca Raton, 2007.

- [40] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, Physical principles of infrared spectroscopy in Cozzolino, D. (Ed.), *Comprehensive analytical chemistry. Infrared Spectroscopy for Environmental Monitoring*, Vol. 98, 2022, p. 1-43.
- [41] J. Bloino, M. Biczysko, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 2015.
- [42] V. Barone, S. Alessandrini, M. Biczysko, J.R. Cheeseman, D.C. Clary, A.B. McCoy, R.J. DiRisio, F. Neese, M. Melosso, C. Puzzarini, *Nat. Rev. Methods Primers* 2021, **1**, 38.
- [43] Y. Ozaki, K.B. Beć, Y. Morisawa, S. Yamamoto, I. Tanabe, C.W. Huck, T.S. Hofer, *Chem. Soc. Rev.* 2021, **50**, 10917-10954.
- [44] J. Bloino, A. Baiardi, M. Biczysko, *Int. J. Quantum Chem.* 2016, **116**, 1543-1574.
- [45] S. Singh, R. Szostak, M.A. Czarnecki, *J. Mol. Liq.* 2021, **336**, 116277.
- [46] K.B. Beć, Y. Futami, M.J. Wójcik, Y. Ozaki, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, **18**, 13666-13682.
- [47] J. Grabska, K.B. Beć, Y. Ozaki, C.W. Huck, *J. Phys. Chem. A* 2017, **121**, 1950-1961.
- [48] K.B. Beć, J. Grabska, M.A. Czarnecki, *Spectrochim. Acta A* 2018, **197**, 176-184.
- [49] K.B. Beć, D. Karczmít, M. Kwaśniewicz, Y. Ozaki, M.A. Czarnecki, *J. Phys. Chem. A* 2019, **123**, 4431-4442.
- [50] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, S. Mazurek, M.A. Czarnecki, *Molecules* 2021, **26**, 6779.
- [51] K.B. Beć, J. Grabska, C.G. Kirchler, C.W. Huck, *J. Mol. Liq.* 2018, **268**, 895-902.
- [52] J. Grabska, K.B. Beć, Y. Ozaki, C.W. Huck, *Molecules* 2021, **26**, 5212.
- [53] K.B. Beć, J. Grabska, Y. Ozaki, M.A. Czarnecki, C.W. Huck, *Sci. Rep.* 2019, **9**, 17398.
- [54] K.B. Beć, Y. Futami, M.J. Wójcik, T. Nakajima, Y. Ozaki, *J. Phys. Chem. A* 2016, **120**, 6170-6183.
- [55] J. Grabska, M. Ishigaki, K.B. Beć, M.J. Wójcik, Y. Ozaki, *J. Phys. Chem. A* 2017, **121**, 3437-3451.
- [56] J. Grabska, K.B. Beć, M. Ishigaki, C.W. Huck, Y. Ozaki, *J. Phys. Chem. B* 2018, **122**, 6931-6944.
- [57] K.B. Beć, J. Grabska, J. Badzoka, C.W. Huck, *Spectrochim. Acta A* 2021, **262**, 120085.
- [58] J. Grabska, *NIR News* 2021, **32**, 7-14.
- [59] G. Bázár, Z. Kovacs, M. Tanaka, A. Furukawa, A. Nagai, M. Osawa, Y. Itakura, H. Sugiyama, R. Tsenkova, *Anal. Chim. Acta* 2015, **896**, 52-62.
- [60] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, *Chem. Eur. J.* 2021, **27**, 1514-1532.
- [61] K.B. Beć, J. Grabska, H.W. Siesler, C.W. Huck, *NIR News* 2020, **31**, 28-35.
- [62] R.A. Crocombe, *App. Spectr.* 2018, **72**, 1701-1751.
- [63] J. Grabska, K.B. Beć, S. Mayr, C.W. Huck, *App. Spectr.* 2021, **75**, 1022-1032.
- [64] K.B. Beć, J. Grabska, T.S. Hofer, *Introduction to quantum vibrational spectroscopy* in Y. Ozaki, C.W. Huck, S. Tsuchikawa, S.B. Engelsen (Eds.), *Near-infrared spectroscopy*, Springer, Singapore, 2021, p. 83-110.
- [65] U. Kuenzer, T.S. Hofer, *Chem. Phys.* 2019, **520**, 88-99.
- [66] T.K. Roy, R.B. Gerber, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, **15**, 9468-9492.
- [67] Q. Yu, J.M. Bowman, *J. Phys. Chem. A* 2020, **124**, 1167-1175.
- [68] W.B. Carpenter, Q.i. Yu, J.H. Hack, B. Dereka, J.M. Bowman, A. Tokmakoff, *J. Chem. Phys.* 2020, **153**, 124506.
- [69] B. Temelso, G.C. Shields, *J. Chem. Theory Comput.* 2011, **7**, 2804-2817.
- [70] V. Barone, *J. Chem. Phys.* 2005, **122**, 014108.
- [71] J. Grabska, M.A. Czarnecki, K.B. Beć, Y. Ozaki, *J. Phys. Chem. A* 2017, **121**, 7925-7936.
- [72] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, M.A. Czarnecki, *Molecules* 2019, **24**, 2189.
- [73] C.G. Kirchler, C.K. Pezzeri, K.B. Beć, S. Mayr, M. Ishigaki, Y. Ozaki, C.W. Huck, *Analyst* 2017, **142**, 455-464.
- [74] J. Grabska, K.B. Beć, M. Ishigaki, M.J. Wójcik, Y. Ozaki, *Spectrochim. Acta A* 2017, **185**, 35-44.
- [75] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, M.A. Czarnecki, *J. Mol. Liq.* 2020, **310**, 113271.
- [76] K.B. Beć, J. Grabska, C.W. Huck, *Anal. Chim. Acta* 2020, **1133**, 150-177.
- [77] K. Czamara, K. Majzner, M.Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, *J. Raman Spectrosc.* 2015, **46**, 4-20.
- [78] E. Wiercigroch, E. Szafranec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, *Spectrochim. Acta A* 2017, **185**, 317-335.
- [79] S. Mayr, K.B. Beć, J. Grabska, E. Schneckenreiter, C.W. Huck, *Talanta* 2021, **223**, 121809.
- [80] M. Ishigaki, A. Ito, R. Hara, S.-I. Miyazaki, K. Murayama, K. Yoshikiyo, T. Yamamoto, Y. Ozaki *Anal. Chem.* 2021, **93**, 2758-2766.

ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII OSCYLACYJNEJ W ANALIZIE FITOZWIĄZKÓW I SUBSTANCJI ODŻYWCZYCH W PRODUKTACH NATURALNYCH I SPOŻYWCZYCH

APPLYING VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN AN ANALYSIS OF PHYTOCHEMICALS AND NUTRIENTS IN NATURAL AND FOOD PRODUCTS

Sylwester Mazurek*, Roman Szostak*

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

**e-mail: sylwester.mazurek@uwr.edu.pl, roman.szostak@uwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Analiza fitoźwiązków

2. Spektroskopia oscylacyjna

2.1. Techniki pomiarowe w zakresie podczerwieni

2.2. Spektroskopia Ramana

3. Techniki chemometryczne – eksploracyjna analiza danych

4. Przykłady zastosowań technik spektroskopowych

4.1. Klasyfikacja materiału roślinnego

4.2. Analiza ilościowa substancji aktywnych i składników odżywczych

4.2.1. Schemat analizy

4.2.2. Przykłady oznaczeń ilościowych

4.2.3. Analizy produktów spożywczych

4.3. Techniki obrazowania

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Sylwester Mazurek, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w roku 1999. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2004, w tym samym roku podjął pracę na Wydziale Chemii UWr w zespole badawczym prof. dr hab. J.P. Hawranka. W latach 2005-2007 odbył staż naukowy w National Institute of Chemistry w Ljubljanie, Słowenia, w grupie prof. Jure Zupana, a w latach 2010-2013 kierował laboratorium mikrospektroskopii IR w Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, Szwajcaria. W roku 2018 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na zastosowaniu technik spektroskopii oscylacyjnej w diagnostyce medycznej, badaniach substancji aktywnych w materiale roślinnym, analizie produktów spożywczych i leczniczych.



<https://orcid.org/0000-0002-8096-5229>

Prof. dr hab. Roman Szostak, absolwent Uniwersytetu Wrocławskiego. Pracę doktorską przygotował pod opieką prof. dr hab. J.P. Hawranka. W roku 2013 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych, a w roku 2021 tytuł profesora. Jego aktywność naukowa obejmuje badania oddziaływań międzycząsteczkowych i struktury cząsteczek z wykorzystaniem spektroskopii oscylacyjnej i technik obliczeniowych, poszukiwanie zależności między strukturą a reaktywnością amidów i karbenów, analizę ilościową substancji aktywnych w lekach i ziołach oraz składników odżywczych w żywności na bazie widm Ramana i IR, a także diagnostykę chorób z użyciem spektroskopii oscylacyjnej.



<https://orcid.org/0000-0002-5436-7284>

ABSTRACT

The prevalence of lifestyle diseases and trends related to healthy eating contribute to the constant search for chemical compounds with specific biological activity. Studies are conducted on plants and substances of natural origin that have been used in medicine for millennia. Techniques of vibrational spectroscopy are an underrated group of methods enabling direct analysis of plant raw material and food in their native forms. The presented examples of Arabidopsis tissues, various species and hybrids of poplar and Cistus herb classification, as well as quantitative analyses of active compounds in plant material and pharmaceutical products and determination of physicochemical parameters of common food (i.e. milk, yoghurts, pasta and flour), demonstrate the possibility of using vibrational spectroscopy for comprehensive analysis of samples of natural origin. Typical measurement techniques and chemometric methods are briefly described in this paper. The scheme of quantitative analysis based on vibrational spectra is shown and the impact of selected experimental parameters on the accuracy of the obtained results is discussed. The imaging techniques used to analyse the changes in plant tissue structures caused by genetic mutations were also presented.

Keywords: vibrational spectroscopy, chemometrics, qualitative analysis, quantitative analysis, classification

Słowa kluczowe: spektroskopia oscylacyjna, chemometria, analiza jakościowa, analiza ilościowa, klasyfikacja

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ANN	– sztuczne sieci neuronowe
AOAC	– Association of Official Analytical Chemists
API	– aktywny składnik farmaceutyczny
ATR	– spektroskopia całkowitego osłabionego odbicia
CA	– analiza skupień
CLS	– metoda klasycznych najmniejszych kwadratów
CV	– walidacja krzyżowa
DA	– analiza dyskryminacyjna
DRIFTS	– technika odbicia rozproszonego w podczerwieni
FT	– transformata Fouriera
ILS	– metoda odwrotnych najmniejszych kwadratów
ISO	– International Organization for Standardization
IR	– spektroskopia w podczerwieni
LC/MS	– chromatografia cieczowa/spektrometria mas
LOO	– walidacja z pominięciem jednej próbki
LNO	– walidacja z pominięciem n próbek
MIR	– średnia podczerwień
MSC	– multiplikatywna korekta rozproszenia
NIR	– bliska podczerwień
PAT	– technologia analizy procesu
PC	– główna składowa
PCA	– analiza głównych składowych
PCR	– regresja głównych składowych
PLS	– regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów
R	– współczynnik korelacji liniowej
R_{CV}	– współczynnik korelacji liniowej walidacji krzyżowej
RMSE	– średni błąd kwadratowy
RSEP	– względny standardowy błąd przewidywania
$RSEP_{KAL}$	– RSEP oznaczeń próbek kalibracyjnych
$RSEP_{WAL}$	– RSEP oznaczeń próbek walidacyjnych
SAL	– całkowita zawartość salicylanów
S/N	– stosunek sygnału do szumu
SNV	– normalizacja przy użyciu odchylenia standardowego
SOM	– mapy samoorganizujące się
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa
TFL	– całkowita zawartość flawonoidów
TPC	– całkowita zawartość polifenoli
WT	– roślina typu dzikiego

WPROWADZENIE

Powszechność chorób cywilizacyjnych oraz trendy związane ze zdrowym odżywianiem przyczyniają się do ciągłego poszukiwania związków chemicznych o określonej aktywności biologicznej. Kontynuowane są studia nad roślinami i substancjami pochodzenia naturalnego, często stosowanymi w leczeniu od tysięcy lat. Niedocenianą grupą metod umożliwiającą bezpośrednią analizę surowców roślinnych i żywności w natywnej postaci są techniki spektroskopii oscylacyjnej. Przedstawione przykłady klasyfikacji tkanek rzodkiewnika, różnych gatunków i hybryd topoli oraz ziela czystka, jak również analizy ilościowe substancji aktywnych w materiale roślinnym, diosminy w tabletkach oraz oznaczenia parametrów fizykochemicznych popularnych produktów spożywczych, mleka, jogurtów, makaronów i mąk, demonstrują możliwości zastosowania spektroskopii oscylacyjnej do kompleksowego badania próbek pochodzenia naturalnego. Opisano krótko typowe techniki pomiarowe i stosowane metody chemometryczne. Podano schemat postępowania w toku analizy ilościowej prowadzonej na bazie widm oscylacyjnych i omówiono wpływ wybranych parametrów pomiarowych na dokładność otrzymywanych wyników. Przedstawiono również zastosowanie technik obrazowania chemicznego w analizie zmian struktur tkankowych roślin wywołanych mutacjami genetycznymi.

1. ANALIZA FITOZWIĄZKÓW

Rośliny stanowią podstawowe źródło pokarmu człowieka. Są ważnym surowcem dla wielu gałęzi gospodarki, dostarczają substancji stosowanych w leczeniu i profilaktyce chorób. Fitozwiązki (ang. *phytochemicals*), roślinne związki aktywne, to szeroka grupa substancji chemicznych, stanowiących wtórne produkty przemiany materii. Są wykorzystywane przez rośliny do walki przeciwko grzybom, bakteriom, infekcjom wirusowym, chronią je przed insektami oraz zwierzętami roślinożernymi [1, 2]. Substancje te są również wykorzystywane przez rośliny do wabięcia owadów, a także jako substancje sygnałowe do kontaktu z symbiontami. Najważniejszymi grupami fitozwiązków są polifenole, flawonoidy, antocyjany, alkaloidy, terpeny, fitoestrogeny, karotenoidy, limonoidy, fitosterole oraz błonnik. Wiele z nich wykazuje działanie przeciwutleniające, zmniejszając ryzyko chorób cywilizacyjnych powiązanych z uszkodzeniami oksydacyjnymi [3]. Ze względu na korzystny wpływ na zdrowie i funkcjonowanie organizmu ludzkiego, od lat prowadzone są intensywne badania nad fitozwiązkami, ulepszane są procedury ich pozyskiwania i izolacji z materiału roślinnego, poszukuje się nowych źródeł tych związków [4].

Większość standardowych analiz związków biologicznie czynnych w materiale roślinnym oraz substancji odżywczych w produktach spożywczych pochodzenia naturalnego opiera się na analizie ekstraktów z wykorzystaniem metod spektrofotome-

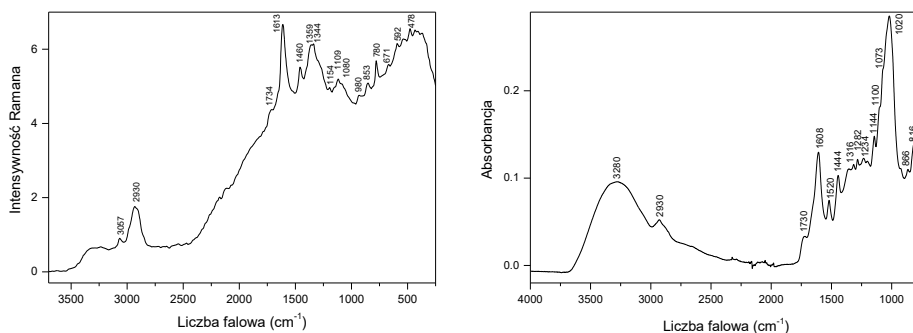
trycznych i chromatograficznych w połączeniu z różnorodnymi technikami detekcji [5, 6]. Metody te stanowią również podstawę oficjalnych protokołów analiz, m.in. farmakopei krajowych i międzynarodowych, standardów ISO, czy zaleceń organizacji skupiających chemików analityków (np. AOAC). Ze względu na złożony skład chemiczny próbek naturalnych oznaczenie ilościowe określonej substancji chemicznej, bądź wybranych grup związków, wymaga wielu operacji, co jest czasochłonne i kosztowne. Analizę poprzedza izolacja oznaczanego składnika z badanego materiału. Na tym etapie mogą pojawić się kłopoty związane z rozpuszczalnością próbki oraz wymyciem innych związków rozpuszczalnych w użytych rozpuszczalnikach, co może oznaczać konieczność rozdzielania otrzymanej mieszaniny. Proces ekstrakcji bądź trawienia enzymatycznego zrywa wiązania łączące substancję aktywną z matrycą komórkową, może także wpłynąć na strukturę ekstrahowanego związku. To powoduje, że właściwości jak i aktywność biologiczna związku wyizolowanego i obecnego w wyjściowym materiale badawczym mogą się różnić. Istotną kwestią jest rodzaj wiązań łączących fitozwiązków ze strukturami komórkowymi, determinujący potencjalny sposób uwolnienia badanej substancji z matrycy. O ile niektóre fitozwiązki, np. terpeny czy olejki eteryczne, są gromadzone w stanie wolnym wprost w tkankach wydzielniczych roślin to w przypadku flawonoidów większość z nich występuje w postaci glikozydów, głównie O-glikozydów [2]. Stosowane procedury izolacji zmieniają się w zależności od rodzaju badanej matrycy, np. gatunku roślin, rodzaju tkanki, obecności w niej innych substancji chemicznych. Część fitozwiązków obecnych w matrycy może być trudna do wyekstrahowania przy zastosowaniu typowych rozpuszczalników. W badaniach fitozwiązków kontrola wydajności ekstrakcji, wydaje się być często niedostateczna. Identyfikacja wyizolowanej substancji i określenie jej stężenia w ekstrakcie wymaga użycia wzorca, lub odpowiednich baz danych, co w przypadku modyfikacji strukturalnych, będących efektem np. trawienia enzymatycznego, może nie dawać satysfakcjonujących wyników analiz.

Wyodrębnienie kolejnych składników z tej samej próbki wiąże się zwykle z koniecznością powtórzenia procesu, z zastosowaniem innych rozpuszczalników. Wymusza również zmiany procedury identyfikacji i oznaczania ilościowego substancji. Stąd, przeprowadzenie kompleksowej analizy badanego materiału lub też wyznaczenie szeregu parametrów fizykochemicznych związanych ze składem chemicznym próbki, oznacza konieczność użycia różnych zestawów odczynników i urządzeń pomiarowych. Takie analizy wymagają dużych ilości materiału, są drogie i czasochłonne. Nie bez znaczenia jest kwestia użycia znacznych objętości rozpuszczalników oraz konieczność ich utylizacji. Niedocenianą alternatywą dla analiz z użyciem metod ekstrakcyjnych są techniki spektroskopowe, a zwłaszcza spektroskopia oscylacyjna.

2. SPEKTROSKOPIA OSCYLACYJNA

Spektroskopia oscylacyjna jest jednym z podstawowych narzędzi analitycznych wykorzystywanych do badania struktury związków chemicznych [7-9]. Widma w zakresie podczerwieni (IR) i Ramana dostarczają informacji o obecności grup funkcyjnych i fragmentów cząsteczek, pozwalając na identyfikację substancji i analizę jakościową badanego układu [10]. Dodatkowo, wprost proporcjonalna zależność pomiędzy ilością promieniowania zaabsorbowanego (spektroskopia IR) i rozproszonego (Raman) przez próbkę, której miarami są absorbcja i intensywność promieniowania rozproszonego, a stężeniem drgających oscylatorów znajduje zastosowanie w analizie ilościowej, pozwalając oznaczyć skład złożonych układów wieloskładnikowych.

Techniki spektroskopii oscylacyjnej umożliwiają rejestrację widm dla różnych rodzajów próbek, tj. gazów, ciał stałych, cieczy, zawiesin, emulsji i filmów. Przy pomocy dedykowanych akcesoriów i układów optycznych możliwe są nieinwazyjne pomiary widm w skali w makro i mikro, co pozwala dobrać dla badanego materiału odpowiednią technikę pomiarową. Widma oscylacyjne rejestruje się szybko, czas pomiaru nie przekracza zwykle kilku minut. W sprzyjających warunkach widma otrzymywane są w czasie rzeczywistym, dzięki czemu techniki te znajdują zastosowanie w monitoringu procesów wytwórczych i analitycznych. Widma oscylacyjne umożliwiają badania zarówno surowców, jak i gotowych produktów, dzięki swoim zaletom spektroskopia oscylacyjna znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym, kosmetycznym i spożywczym [11, 12].



Rysunek 1. Widma Ramana (strona lewa) i ATR (strona prawa) suszonych kłączy pięciornika kurzego ziela
Figure 1. Raman (left) and ATR spectra (right) of dried tormentil rhizomes

Próbki pochodzenia naturalnego charakteryzują się bogatym składem chemicznym, co przekłada się na złożoność ich widm oscylacyjnych. Widmom ramanowskim tego typu układów często towarzyszy wysokie tło fluorescencyjne, które w skrajnych przypadkach może uniemożliwić analizę. Na Rys. 1 przedstawiono widma Ramana i ATR wysuszonych kłączy pięciornika kurzego ziela, tradycyjnie stosowanego w objawowym leczeniu łagodnych biegunek oraz stanów zapalnych błony śluzowej jamy ustnej. Obecność celulozy, jako materiału budulcowego tkanek roślinnych, oraz hemicelulozy

i pektyn, stanowiących strukturalne substancje podporowe, przekłada się na występowanie pasm drgań fragmentów polisacharydów w widmach. W szczególności widma w zakresie podczerwieni charakteryzują się silną absorpcją w zakresie 900-1200 cm^{-1} , z charakterystycznymi pasmami przy około 1020, 1073 i 1100 cm^{-1} , związanymi z drganiami $\nu(\text{C}-\text{O})$ i $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ szkieletów polisacharydowych. Obecność dużej liczby bogatych w grupy hydroksylowe jednostek cukrowych znajduje odbicie w widmach IR w postaci szerokiego pasma w zakresie 3000-3500 cm^{-1} , z maksimum przy około 3280 cm^{-1} . Woda i pozostałe związki obecne w badanym materiale roślinnym, zawierające w swojej strukturze grupy OH, m.in. lipidy i białka, również dają wkład widmowy w tym zakresie. W widmie ramanowskim intensywność drgań rozciągających O-H grup hydroksylowych jest stosunkowo niewielka. Widoczne w widmie Ramana pasmo przy około 3060 cm^{-1} , to pasmo drgań $\nu(\text{CH})$ fragmentów aromatycznych związków polifenolowych. Pasma przy 2930 cm^{-1} występujące w obu widmach pięciornika (Rys. 1) pochodzą od drgań $\nu(\text{CH})$ grup alifatycznych polifenoli i węglowodanów. O obecności estrów kwasów tłuszczowych oraz pektyn świadczy pasmo $\nu(\text{C}=\text{O})$ z maksimum przy około 1730 cm^{-1} . W zakresie 1500-1700 cm^{-1} w widmach dominują udziały związków polifenolowych oraz białek. Intensywne pasmo z maksimum przy 1613 cm^{-1} w widmie Ramana i maksimum przy 1608 cm^{-1} w widmie IR pochodzi od drgań pierścienia aromatycznego $\nu(\text{C}=\text{C})$ związków polifenolowych, a zauważalne poszerzenie pasma, przy około 1650 cm^{-1} , wynika z wkładu drgań amidowych białek. Obecność związków polifenolowych może być potwierdzona występowaniem w widmie Ramana pięciornika pasma z maksimum przy 1359 cm^{-1} , przypisywanego drganiom zginającym fenolowych grup OH, oraz w obszarze deformacyjnych drgań szkieletowych C-C-O i C-C-C, z charakterystycznym pasmem przy 780 cm^{-1} . W zakresie 1300-1460 cm^{-1} , w obu widmach, można zauważyć liczne udziały wynikające z nakładania się pasm drgań CH_2 , CH_3 lipidów i białek oraz związków aromatycznych. Spośród substancji obecnych w kłączach, ważnym składnikiem zapasowym jest skrobia. W widmach oscylacyjnych jej najbardziej charakterystyczne pasmo, pochodzące od drgań deformacyjnych pierścieni cukrowych, jest widoczne przy 478 cm^{-1} .

W zależności od rodzaju tkanki i typu badanego materiału roślinnego, można oczekiwać dodatkowych pasm wynikających z obecności specyficznych grup związków chemicznych, np. chlorofili i karotenoidów w liściach, czy antocyjanów w owocach.

2.1. TECHNIKI POMIAROWE W ZAKRESIE PODCZERWIENI

Spektroskopia w podczerwieni IR jest jedną z najważniejszych metod eksperymentalnych wykorzystywanych do identyfikacji i określania składu próbek w różnych stanach skupienia. Zmieniając geometrię układu pomiarowego, np. poprzez użycie przystawek umieszczanych na drodze wiązki promieniowania można uzyskać

szereg trybów pomiarowych. Coraz powszechniej stosowane są techniki osłabionego całkowitego odbicia wewnętrznego i odbicia rozproszonego, które wypierają popularne niegdyś pomiary transmisyjne.

2.1.1. Technika transmisyjna

W spektroskopii transmisyjnej wiązka promieniowania przechodzi przez próbkę. Detektor rejestruje intensywności wiązki padającej na próbkę (I_0) i intensywność wiązki promieniowania opuszczającej próbkę (I). Widma zapisuje się w skali transmitancji

$$T = I / I_0, \quad (1)$$

lub absorbancji:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}. \quad (2)$$

Absorbancja zależy liniowo od stężenia substancji absorbujących:

$$A = \varepsilon l c, \quad (3)$$

ε to molowy współczynnik absorpcji, l - grubość warstwy próbki, c - stężenie substancji absorbującej. Równanie (3) umożliwia bezpośrednie zastosowanie widm IR do oznaczeń ilościowych. W zakresie średniej podczerwieni wiele próbek absorbuje promieniowanie zbyt silnie. Prawidłowy pomiar jest możliwy po rozcieńczeniu próbki materiałem nieabsorbującym, np. KBr, lub po zmniejszeniu grubości warstwy absorbującej.

2.1.2. Technika ATR

Coraz częściej stosowaną metodą pomiaru widm IR jest technika osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance*). W metodzie tej rejestruje się widmo substancji umieszczonej na materiale o dużej wartości współczynnika załamania światła. Efekt całkowitego wewnętrznego odbicia uzyskuje się, gdy promieniowanie podczerwone skierowane na powierzchnię graniczną pada od strony ośrodka o dużym współczynniku załamania światła n_1 na próbkę o współczynniku załamania n_2 ($n_1 > n_2$), pod kątem większym od kąta granicznego θ_{gr} dla całkowitego odbicia:

$$\theta_{gr} = \arcsin n_2/n_1. \quad (4)$$

Technika ATR daje widma próbek mających bezpośredni kontakt z kryształem ATR. Głębokość penetracji próbki d_p przez falę elektromagnetyczną o długości fali λ padającej pod kątem θ przybliża zależność:

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}. \quad (5)$$

Metoda ATR pozwala bez konieczności wcześniejszego przygotowania próbek rejestrować widma substancji stałych, filmów, tkanek, cieczy, roztworów i emulsji. Podobnie jak w technice transmisyjnej widma ATR zapisuje się w skali absorbancji.

2.1.2. Technika DRIFTS

Spektroskopia odbicia rozproszonego w podczerwieni DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) jest techniką stosowaną głównie do badania substancji stałych w zakresie średniej i bliskiej podczerwieni. Widmo DRIFTS otrzymuje się rejestrując promieniowanie rozproszone dyfuzyjnie przez próbkę o grubości wyraźnie większej od długości fali promieniowania. Wartością mierzoną jest refleksja R :

$$R = \frac{I}{I_0}, \quad (6)$$

I oznacza intensywność promieniowania rozproszonego przez próbkę, a I_0 to intensywność promieniowania padającego. Proporcjonalne do stężenia są wartości funkcji Kubelki-Munka [13]:

$$F = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{K}{S} = \frac{2.303\epsilon c}{S}, \quad (7)$$

K to współczynnik absorpcji, S to współczynnik rozproszenia, a ϵ to molowy współczynnik absorpcji próbki, c - stężenie substancji.

Przygotowanie próbki do pomiarów w bliskiej podczerwieni sprowadza się do jej rozdrobnienia. W średniej podczerwieni próbki pochłaniają promieniowanie zbyt silnie. W tym zakresie pomiary ilościowe prowadzi się zwykle dla kilkuprocentowych mieszanin badanej substancji w KBr [14].

2.2. SPEKTROSKOPIA RAMANA

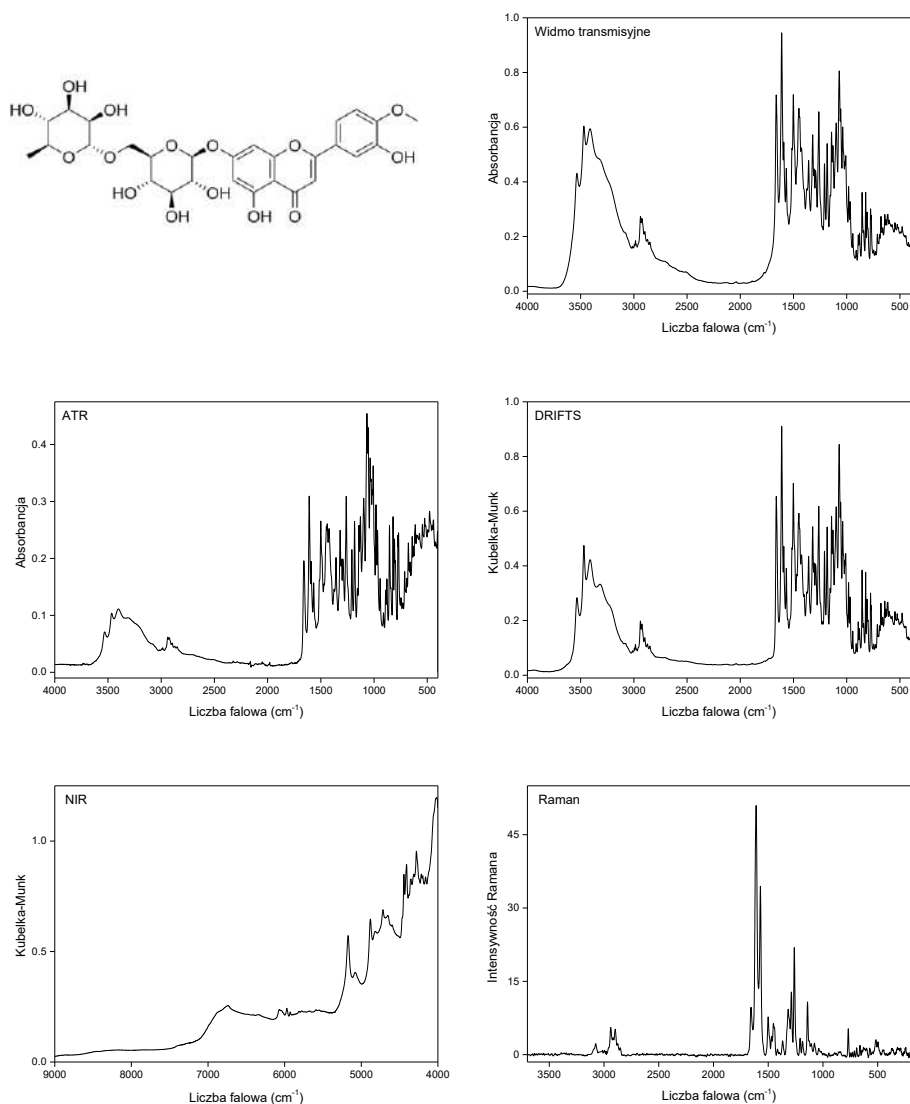
W spektroskopii Ramana rejestrowana jest intensywność promieniowania rozproszonego nieelastycznie przez próbkę. Prawdopodobieństwo tego procesu jest niewielkie, rzędu 10^{-6} , dlatego jako źródła promieniowania wzbudzającego stosowane są lasery emitujące promieniowanie monochromatyczne o dużej mocy [15, 16]. Podobnie jak widmo IR, widmo Ramana składa się z pasm odpowiadających drganiom cząsteczek. W analizie ilościowej z zastosowaniem techniki ramanowskiej wykorzystuje się wprost proporcjonalną zależność pomiędzy intensywnością promieniowania rozproszonego (I_R) a stężeniem substancji (c):

$$I_R = k I_0 c. \quad (8)$$

Współczynnik k reprezentuje zarówno cechy próbki jak i warunki aparaturowe, I_0 to intensywność wiązki wzbudzającej.

Typowym materiałem badawczym w przypadku analiz chromatograficznych i spektroskopowych próbek pochodzenia naturalnego są ekstrakty. Tymczasem techniki spektroskopii oscylacyjnej dają możliwość rejestracji widm próbek w ich natywnej

postaci (Rys. 2), bez konieczności izolacji badanych składników. Dodatkowo, w połączeniu z technikami obrazowania chemicznego, spektroskopia oscylacyjna stanowi doskonałe źródło informacji o rozmieszczeniu analizowanych związków chemicznych w badanych próbkach, co pozwala na analizę wpływu wybranych czynników na funkcjonowanie i fizjologię roślin, a w przypadku składników odżywczych



Rysunek 2. Wzór strukturalny diosminy i jej widma: transmisyjne IR, ATR, DRIFTS, NIR i FT Ramana
 Figure 2. Structural formula of diosmin and its spectra: IR, ATR, DRIFTS, NIR and FT Raman

lub fitozwiązków umożliwia znalezienie tych części roślin i tkanek, w których stężenie substancji jest najwyższe, co ułatwia selekcję surowca dla przemysłu [17-19].

Przenośne spektrometry pozwalają na pomiary w terenie, co znajduje zastosowanie w ocenie dojrzewania owoców, monitoringu zapotrzebowania na wodę i związki mineralne czy analizie pozostałości po środkach ochrony roślin [20-23].

2. TECHNIKI CHEMOMETRYCZNE – EKSPLORACYJNA ANALIZA DANYCH

Bogaty skład chemiczny próbek pochodzenia naturalnego znajduje odzwierciedlenie w złożoności rejestrowanych widm oscylacyjnych. W widmach IR i Ramana pasma drgań substancji o podobnej strukturze i zbliżonych energiach oscylacji nakładają się co utrudnia interpretację uzyskanych wyników i powoduje potrzebę wsparcia analiz przy użyciu technik chemometrycznych. Odseparowanie zmienności widmowej charakterystycznej dla badanej substancji od udziałów pochodzących od pozostałych składników układu może znaleźć zastosowanie zarówno w klasyfikacji badanego materiału, jego analizie jakościowej jak i umożliwić analizę ilościową wybranych związków [24].

Opracowanie modeli chemometrycznych poprzedzone jest utworzeniem macierzy danych X o wymiarach $m \times n$, zawierającej dla każdego z m analizowanych obiektów n wartości cech (deskryptorów), w przypadku widm oscylacyjnych wartości np. absorbancji lub intensywności rozproszenia ramanowskiego przy każdej liczbie falowej. W celu zminimalizowania wpływu części błędów pomiarowych dane poddaje się wstępnym modyfikacjom, które mogą obejmować korektę linii bazowej, skalowanie lub różniczkowanie widm. Popularne są procedury MSC i SNV korygujące zarówno zniekształcenia addytywne jak i multiplikatywne występujące w widmach [25].

Eksploacyjna analiza danych umożliwia wykrycie podobieństw i różnic między próbkami, pozwala na identyfikację skupień i systematycznych trendów. Pokazuje, które zmienne wnoszą istotny wkład do opisu badanego układu oraz umożliwia wykrycie próbek nietypowych (tzw. *outliers*) obecnych w analizowanym zestawie. Metody eksploracyjne opierają się na wykorzystaniu technik projekcji, co pozwala na redukcję wymiaru danych, który dla technik spektroskopowych jest szczególnie duży. Metody projekcyjne tworzą nową niskowymiarową przestrzeń reprezentacji danych, której osiami są najbardziej istotne zmienne [26].

Klasyfikację próbek na bazie widm można przeprowadzić wykorzystując analizę głównych składowych (*principal component analysis*, PCA), analizę skupień (*cluster analysis*, CA) i samoorganizujące się mapy (*self-organizing maps*, SOM), które umożliwiają identyfikację zmienności spektralnej pochodzącej od różnych grup związków chemicznych [27]. Połączenie danych spektralnych z informacją o przynależności analizowanych obiektów do określonych grup lub klas pozwala na opracowanie modeli dyskryminacyjnych (*discriminant analysis*, DA). Natomiast uwzględ-

dnienie wyników analiz referencyjnych umożliwia budowę modeli ilościowych dla wybranych składników lub parametrów. Najczęściej wykorzystywane są w tym celu regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów (*partial least squares regression*, PLS) i sztuczne sieci neuronowe (*artificial neural networks*, ANN), rzadziej stosuje się regresję głównych składowych (*principal component regression*, PCR) [28].

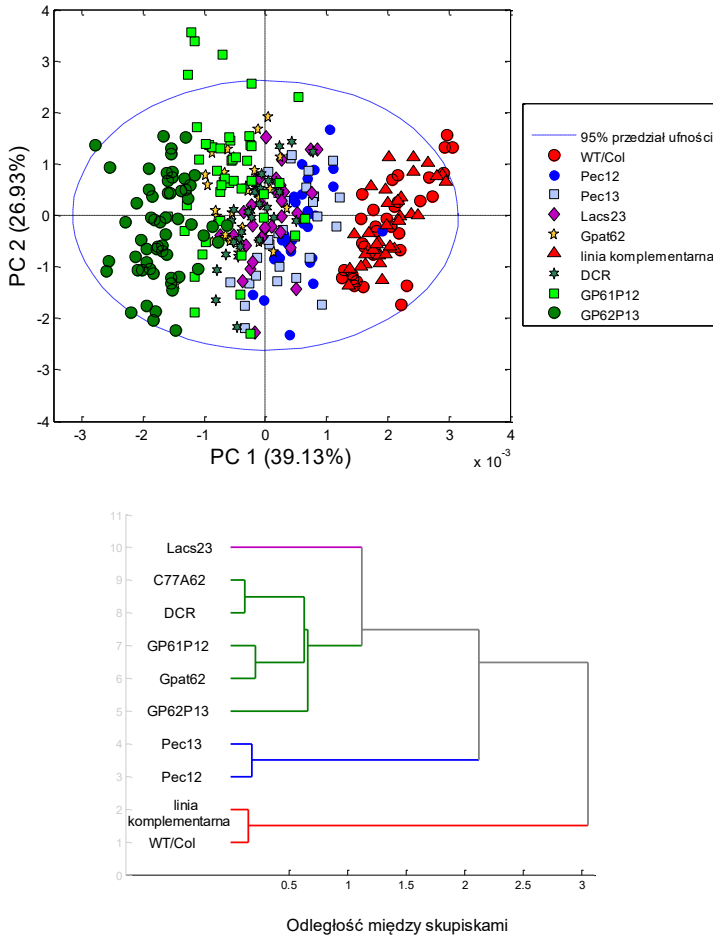
4. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ TECHNIK SPEKTROSKOPOWYCH

4.1. KLASYFIKACJA MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*, L.), ze względu na krótki cykl życiowy i najmniejszy wśród roślin naczyniowych genom, jest w genetyce i biologii molekularnej gatunkiem modelowym. Wykorzystując technikę mikroskopii FTIR w badaniach tkankowych stwierdzono, że różne związki chemiczne obecne w płatkach rzodkiewnika są rozmieszczone w obrębie tkanki w charakterystyczny sposób. Obserwacja ta pozwoliła na wykorzystanie obrazowania IR do śledzenia zmian składu kutykuli spowodowanych nadekspresją lub modyfikacją genów zaangażowanych w proces biosyntezy kutyny [29]. Analiza profilu polimerowego tkanek z zastosowaniem technik LC/MS wymaga gramowych ilości materiału, co w przypadku płatków jest niezwykle trudne do realizacji. Dodatkowo, mutacje genów odpowiedzialnych za biosyntezę polimerów kutyny, mogą wpływać na procesy związane z formowaniem kwiatostanu. W przypadku silnych fenotypów, mutanty charakteryzują się bardzo ubogim kwiatostanem, któremu towarzyszy karłowatość, wadliwy rozwój pędów i fuzja narządów (*organ fusion*), co uniemożliwia przeprowadzenie klasycznych analiz chemicznych. Widma IR płatków pozwoliły odróżnić rośliny typu dzikiego (*wild type*, WT) od roślin należących do różnych rodzin mutacji kutyn (*lacs2*, *pec1* i *pec2*, *gpat6* i *cyp77*). Najbardziej charakterystyczne zmiany w widmach płatków zaobserwowano w postaci zmiany położenia pasm drgań rozciągających $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$ i $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})$. Wynikają one głównie ze zmieniającej się zawartości ω -dihydroksykwasów tłuszczowych, w szczególności kwasu 10,16-dihydroksyheksadekainowego.

W przypadku mutacji o silnym fenotypie zaobserwowano również bardzo istotne zmniejszenie intensywności wspomnianych pasm w widmach IR w porównaniu do widm dla WT, co wskazywało na zmiany gęstości i grubości warstwy kutyny. Różnice w morfologii kutykuli pomiędzy badanymi genotypami zostały potwierdzone obrazowaniem przy użyciu mikroskopii elektronowej (TEM). Informacje uzyskane z widm transmisyjnych płatków w zakresie MIR były zgodne z danymi LC/MS dla polimerów kutyny wyekstrahowanych z kwiatów. Potwierdzają one propagację zmian chemicznych w składzie kutykuli w różnych tkankach rzodkiewnika w obrębie badanych mutacji [29, 30]. Na podstawie zarejestrowanych widm płatków WT i mutantów opracowano model PCA. Wykresy obiektów w przestrzeni PC1/PC2 pokazały wyraźne grupowanie próbek należących do różnych mutacji, a analiza skupień na bazie zakresów

charakterystycznych dla estrów alifatycznych kwasów tłuszczowych, tj. obejmujących drgania $\nu(\text{C-H})$ i $\nu(\text{C=O})$, umożliwiła klasyfikację mutacji ze względu na podobieństwo zmian w warstwach kutyny (Rys. 3). Przeprowadzone badania potwierdziły, że mikrospektroskopia IR umożliwia prowadzenie unikalnych analiz chemicznych dla tkanek roślinnych bądź ich fragmentów, dla których użycie innych technik badawczych jest utrudnione.



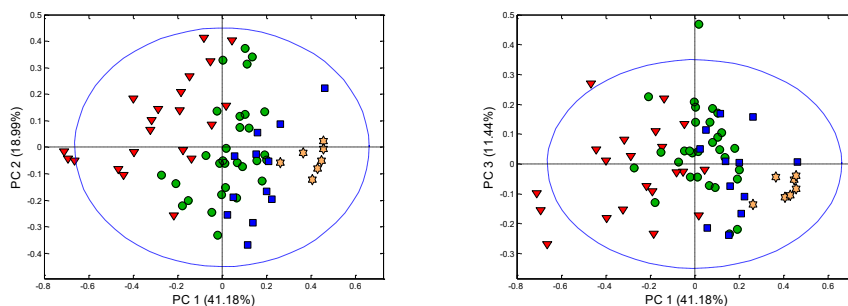
Rysunek 3. Wykres obiektów PCA dla widm IR płatków mutantów rzodkiewnika oraz dendrogram dla spektrotypów

Figure 3. PC scores plots for IR spectra of *Arabidopsis* mutants' petals and dendrogram for spectrotypes

Szczególnie ważną z punktu widzenia potencjalnych zastosowań jest klasyfikacja materiału roślinnego ze względu na zawartość substancji aktywnych. W przypadku preparatów leczniczych otrzymywanych na bazie surowców roślinnych wymagana jest standaryzacja materiału pochodzącego z różnych upraw bądź siedlisk,

różniącego się zawartością substancji aktywnych. Podobnych procedur wymaga produkcja kosmetyków czy produktów spożywczych. Oznacza to konieczność rozwijania szybkich metod analitycznych, pozwalających oznaczać ilościowo wybrane grupy związków chemicznych bez konieczności ich ekstrakcji z matrycy roślinnej.

Przykładem zastosowania technik spektroskopowych do klasyfikacji materiału roślinnego była analiza próbek kory i liści różnych gatunków i hybryd topoli, stanowiących źródło salicylanów i flawonoidów [31]. Kora i liście wierzbowatych (*Salicaceae*) od tysięcy są wykorzystywane do leczenia infekcji i stanów zapalnych.



Rysunek 4. Wykres obiektów PCA dla widm ATR próbek liści topoli: zawartość salicylanów do 3% - kolor czerwony, do 6% - zielony, do 9% - niebieski, powyżej 9% - pomarańczowy

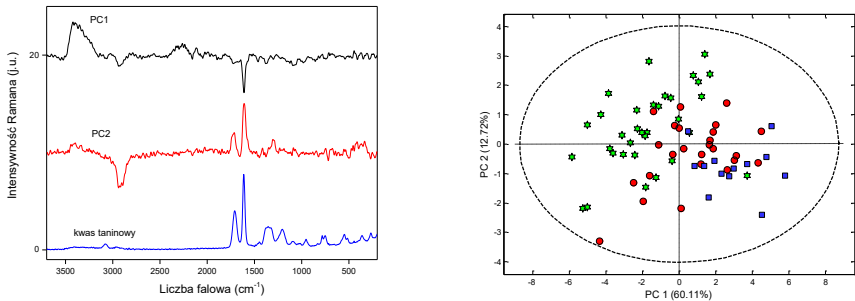
Figure 4. PC scores plots for ATR spectra of poplar leaves: salicylate content up to 3% - red, up to 6% - green, up to 9% - blue, above 9% - orange

Zawartość substancji aktywnych w surowcu ściśle wiąże się z przynależnością gatunkową, jak również zajmowanym przez roślinę siedliskiem oraz sposobem przetwarzania i przechowywania materiału. Wykorzystując wykresy obiektów PCA, modelu zbudowanego na bazie widm ATR wysuszonych i zmielonych liści, na płaszczyźnie PC1/PC2 uzyskano wyraźny rozdział próbek o zróżnicowanej zawartości salicylanów (Rys. 4). Dzięki zastosowaniu technik spektroskopowych można wykonać wstępne analizy przetwarzanego surowca i dostosować parametry procesu technologicznego w trakcie wytwarzania leku. Jak wspomniano, połączenie metod spektroskopowych i chemometrycznej analizy danych umożliwia przeprowadzanie badań przesiewowych (skriningu) materiału roślinnego pod kątem zawartości pożądanych związków aktywnych, a tym samym optymalizację źródeł surowca.

Możliwość identyfikacji próbek na podstawie widm oscylacyjnych pokazano dla suchego ziele czystka szarego (*Cistus × incanus*, L.), rośliny leczniczej pochodzenia śródziemnomorskiego [32]. Dzięki właściwościom przeciwzapalnym i przeciwutleniającym od czasów starożytnych ziele czystka jest stosowane w medycynie, a charakterystyczny bukiet zapachowy wykorzystuje się w perfumerii i kosmetyce. Aktywność biologiczna ziele czystka jest związana z obecnością flawonoidów i garbników, m.in. pochodnych flawonoli (myrycetyny, kwercetyny i kemferolu) oraz ich

glikozydów (mirycytriny, kwercytriny, hiperozydu, tylozydu), proantocyjanidyny oraz hydrolizowanych garbników. Za prozdrowotne walory surowca odpowiadają również kwasy fenolowe, w tym kwas galusowy, *p*-kumarowy, chlorogenowy oraz kwas elagowy.

Wykorzystując widma IR, NIR i Ramana wysuszonych i zmielonych liści czystka szarego pochodzących z Turcji i Albanii, zbudowano modele PCA. Wykazano, że na bazie widm ramanowskich, w których pasma drgań rozciągających C=C związków aromatycznych charakteryzują się dużą intensywnością, łatwo można wyodrębnić zmienność widmową związaną z obecnością polifenolowych substancji aktywnych.



Rysunek 5. PCA dla widm Ramana ziela czystka szarego: strona lewa – przebiegi dwóch pierwszych głównych składowych i widmo kwasu taniinowego, strona prawa – wykres obiektów PC1/PC2; zawartość TF < 30 mg ME/s.m. – kolor zielony, w zakresie 30-40 ME/s.m. – kolor czerwony, TF > 40 ME/s.m. – kolor niebieski

Figure 5. PCA for Raman spectra of cistus herb: left side - loadings of the first two PCs and spectrum of tannic acid, right side - plot of PC1/PC2 scores; TF content < 30 mg ME/d.w. – green, in the range of 30-40 ME/d.w. – red color, TF > 40 ME/d.w. – blue color

Kombinacja pierwszej i drugiej głównej składowej umożliwiła separację badanego materiału roślinnego według zawartości flawonoidów, co przedstawiono na Rys 5. Analiza danych widmowych z wykorzystaniem narzędzi chemometrycznych pozwala także określić pochodzenie próbek roślinnych, co jest istotne w przypadku kontroli autentyczności produktów i wykryć obecność domieszek. W badanym zestawie próbek kraj pochodzenia zadeklarowano tylko dla części materiału roślinnego. Niemniej, na bazie położenia obiektów na płaszczyźnie PC1/PC2, można było z dużym prawdopodobieństwem określić pochodzenie próbek, dla których brakowało deklaracji, zarówno na podstawie danych IR jak i ramanowskich. O przypisaniu próbek do konkretnej lokalizacji decydowała nie tyle zawartość substancji aktywnych, co pełny skład chemiczny materiału roślinnego, uwzględniający zmienność zawartości składników budulcowych (celulozy, hemiceluloz, pektyn) oraz substancji odżywczych.

4.2. ANALIZA ILOŚCIOWA SUBSTANCJI ATYWNYCH I SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH

Jak wspomniano we wstępie, podstawowym zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej jest analiza strukturalna związków chemicznych. Proporcjonalność rejestrowanych sygnałów w widmach oscylacyjnych do stężenia substancji obecnych w badanym układzie umożliwia wykorzystanie widm IR i Ramana do analiz ilościowych. W przypadku próbek pochodzenia naturalnego dane spektroskopowe wykorzystuje się najczęściej do oznaczania stężeń grup związków chemicznych [31, 32]. Niemniej, w korzystnych warunkach i przy zastosowaniu odpowiednich narzędzi matematycznych, możliwe jest również wyznaczenie zawartości pojedynczych substancji, nawet wówczas, gdy ich stężenia nie przekraczają ułamków procentów wagowych [33].

Współczesne urządzenia pomiarowe generują ogromne zbiory danych, stąd analiza ilościowa bazująca na danych spektroskopowych wymaga użycia technik modelowania wielowymiarowego. Przy pomocy algorytmów chemometrycznych można oznaczyć ilościowo wiele składników obecnych w próbkach pochodzenia naturalnego i wyznaczyć parametry, których wartości są skorelowane ze składem próbek. Czynnikiem wpływającym na jakość oznaczeń ilościowych na bazie danych spektroskopowych są jednorodność próbki, parametry zarejestrowanego widma, zawartość badanego składnika oraz dokładność analiz referencyjnych.

4.2.1. Schemat analizy

Analiza ilościowa z wykorzystaniem danych spektroskopowych polega na budowie modelu kalibracyjnego definiującego zależność pomiędzy informacjami zawartymi w widmach a stężeniami analizowanych składników, zgodnie z ogólną zależnością $Y = f(X)$, gdzie Y reprezentuje macierz modelowanych parametrów, a X to macierz danych widmowych [34]. Do konstrukcji modelu można wykorzystać szereg metod, poczynając od zależności liniowych pomiędzy stężeniem a absorbancją lub intensywnością promieniowania rozproszonego, przy wybranych liczbach falowych, co pozwala otrzymać krzywe kalibracyjne. Ten sposób postępowania, w którym stężenie każdego z oznaczanych składników wyznacza się na podstawie danych widmowych przy wybranej liczbie falowej, jest określany mianem analizy przy użyciu jednej zmiennej. Pozwala on na przeprowadzenie oznaczeń prostych układów, dla których pasma analizowanych substancji są dobrze wyodrębnione. W przypadku analizy próbek naturalnych, tylko w nielicznych przypadkach możliwe jest oznaczenie wybranych związków przy użyciu tej metody.

Układy zawierające wiele różnych substancji, często o podobnej budowie, analizowane są przy wykorzystaniu metody klasycznych najmniejszych kwadratów (*classical least squares*, CLS), odwrotnych najmniejszych kwadratów (*inverse least squares*, ILS), sieci ANN i technik wykorzystujących transformacje danych doświadczalnych, z których najważniejszą jest metoda częściowych najmniejszych kwa-

dratów PLS. We wszystkich tych technikach modele kalibracyjne budowane są w oparciu o znaczne fragmenty widm, składające się z setek a nawet tysięcy punktów. Dla każdego oznaczanego składnika tworzy się krzywą przewidywania, pokazującą zależność stężenia wyznaczonego z modelu od stężenia znanego.

Do przeprowadzenia kalibracji wykorzystuje się zwykle od około 2/3 do około 4/5 dostępnych próbek, pozostałe tworzą zestaw walidacyjny. Dla obu zestawów wyznaczone są parametry pozwalające ocenić jakość opracowanego modelu poczynając od współczynników korelacji (R) i determinacji (R^2), które charakteryzują siłę związku pomiędzy zmiennymi niezależnymi i zależnymi. Rysowane są wykresy reszt modelu i błędów względnych oznaczeń, co pozwala zauważyć próbki odstające. Próbki te łatwiej zidentyfikować metodą walidacji krzyżowej. Polega ona na sukcesywnym wyłączeniu kolejnych próbek z zestawu kalibracyjnego, budowie modeli bez ich udziału, a następnie kwantyfikacji pominiętych próbek na bazie tych modeli. W kolejnym kroku próbki wracają do zestawu kalibracyjnego. Miarą uzyskiwaną w tym postępowaniu jest współczynnik korelacji walidacji krzyżowej (R_{CV}), czyli współczynnik korelacji dla wektora o elementach tak wyznaczonych i wektora znanych wartości. Im jego wartość jest bliższa jedności, tym opracowany model jest bardziej odporny (tzw. krzepkość modelu, *robustness*). Zwyczajowo, dla zestawów kalibracyjnych o liczebności nieprzekraczającej 30 wykonuje się walidację metodą odrzuc jedną próbkę LOO (*leave-one-out*). Dla liczniejszych zestawów kalibracyjnych stosuje się technikę LNO (*leave-n-out*, gdzie $n = 2, 3$, etc.).

Często podawanymi syntetycznymi miarami jakości dopasowania są średni błąd kwadratowy (*root-mean-square error*, RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^A - C_i)^2}{n}}, \quad (8)$$

gdzie C_i^A oznacza znane stężenie substancji, C_i to wartość wyznaczona na podstawie modelu, a n jest liczebnością serii lub wyrażany w procentach względny standardowy błąd przewidywania (*relative standard error of prediction*, RSEP):

$$RSEP(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^A - C_i)^2}{\sum_{i=1}^n C_i^A{}^2}} \times 100. \quad (9)$$

Błędy te obliczane są zarówno dla zestawu walidacyjnych ($RSEP_{WAL}$) jak i kalibracyjnego ($RSEP_{KAL}$). Powinny one być porównywalne i dostatecznie małe.

Różnice w jakości modeli kalibracyjnych i wartości błędów oznaczeń obrazują wyniki uzyskane na bazie widm ATR modelowego zestawu $n=39$ próbek zawierających ponad 80% diosminy oraz sól sodową karboksymetylocelulozy, alkohol poliwinylowy i stearynian magnezu. Parametry modeli pozwalających oznaczyć diosminę zostały przedstawione w Tabeli 1. Krzywą kalibracyjną wyznaczoną przy wykorzystaniu absorbancji pasma drgań $\nu(C=O)$ o maksimum przy 1661 cm^{-1} oraz krzywe przewidywania otrzymane metodami CLS i PLS a także błędy oznaczeń pokazuje Rys. 6.

Techniki chemometryczne dostarczają wielu użytecznych narzędzi diagnostycznych, które umożliwiają detekcję punktów odbiegających, sprawdzenie kompatybilności serii kalibracyjnych i próbek oznaczanych oraz kontrolę liczby czynników, uwzględnianych przy budowie modelu by uniknąć „przeuczenia modelu”

Tabela 1. Parametry modeli kalibracyjnych dla diosminy

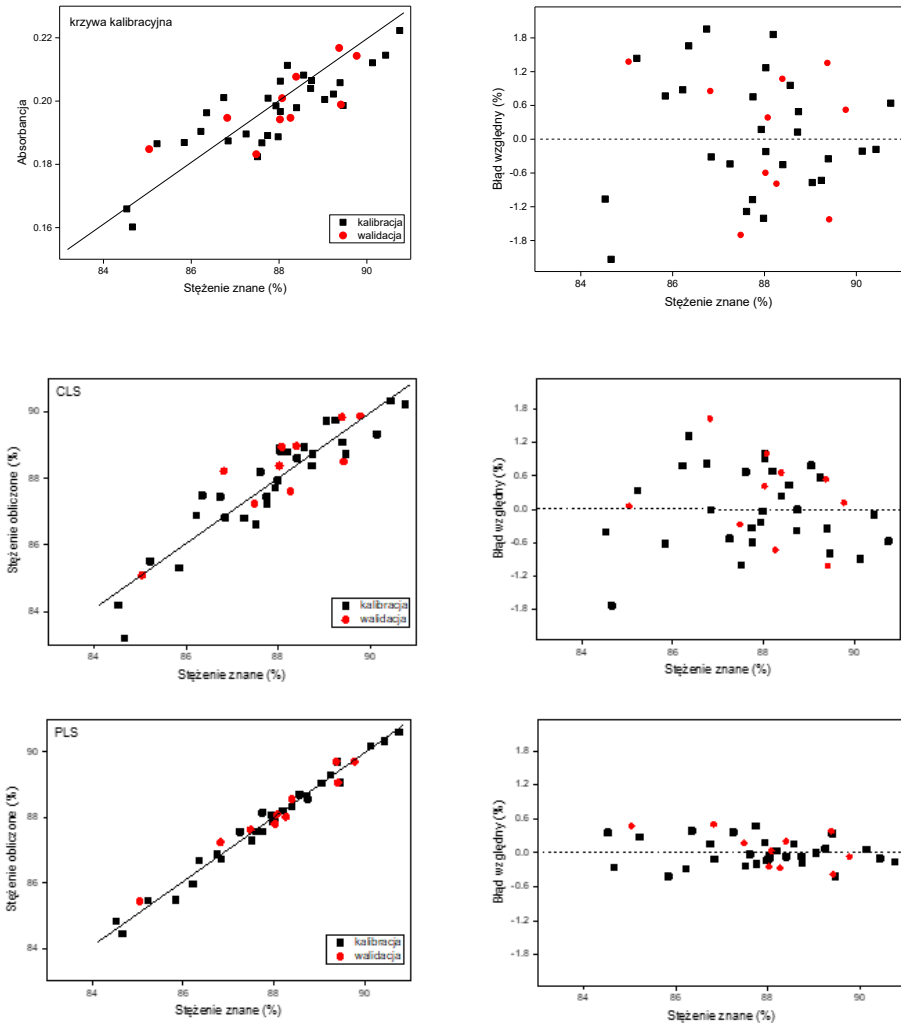
Table 1. Parameters of calibration models for diosmin determination

Parametr	Metoda		
	Krzywa kalibracyjna	CLS	PLS
R_{KAL}	0.846	0.931	0.991
R_{WAL}	0.768	0.878	0.983
R_{CV}	0.815	0.905	0.949
$RSEP_{KAL}(\%)$	1.09	0.70	0.24
$RSEP_{WAL}(\%)$	1.09	0.78	0.31
$RMSE_{KAL}(g)$	9.6	6.1	2.1
$RMSE_{WAL}(g)$	9.6	6.9	2.7
n_{KAL}	29	29	29
n_{WAL}	10	10	10

(*overfitting*). Zaletą chemometrii jest możliwość wykorzystania wielu sposobów normalizacji i korekcji danych oraz metod selekcji zmiennych, mogących istotnie wpłynąć jakość modeli opracowywanych na bazie danych spektroskopowych. Finalnie, przy użyciu modelu o zweryfikowanej jakości, przeprowadza się oznaczenia modelowanego składnika lub parametru wykorzystując widmo analizowanej próbki.

Analiza ilościowa składników układów złożonych na bazie danych spektroskopowych wymaga odpowiedniego planu badań. Bogate widma z wieloma nachodzącymi na siebie pasmami i zniekształcenia aparaturowe wymuszają budowę modeli kalibracyjnych w oparciu większą liczbę próbek w porównaniu na przykład do analiz ilościowych przeprowadzanych metodami chromatograficznymi. Jest to szczególnie ważne w przypadku modelowania składników, których w badanym układzie jest niewiele. W przypadku analiz ilościowych układów wieloskładnikowych relatywnie prostych, o znanym składzie, np. produktów leczniczych, szczególny nacisk kładzie się na zachowanie ortogonalności zawartości składników mieszanin kalibracyjnych. Dzięki temu możliwe staje się użycie metody najmniejszych kwadratów w wersji CLS lub ILS. Ten sposób postępowania znajduje zastosowanie przy odtwarzaniu składu preparatów leczniczych w warunkach laboratoryjnych i opracowaniu procedur oznaczania stężeń substancji czynnej API (*active pharmaceutical ingredient*). Metoda PLS pozwala przeprowadzić analizę zawartości API zarówno w pojedynczych produktach handlowych [35-38], jak również w preparatach o zbliżonym składzie masy tabletkowej, zawierających tę samą substancję czynną [39-42]. Ze względu na zazwyczaj wysokie, od kilku do kilkudziesięciu procent, stężenie API lekach, różne techniki spektroskopii oscylacyjnej mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie w badaniach ilościowych. Niemniej, największy potencjał analityczny wydaje się mieć technika ramanowska, po-

mimo zwykle niższego stosunku sygnału do szumu S/N w porównaniu z widmami NIR i IR. Znane są przykłady oznaczeń na bazie widm ramanowskich substancji aktywnych w preparatach handlowych, w których zawartość API stanowiła mniej niż 0,05% masy układu [43, 44].



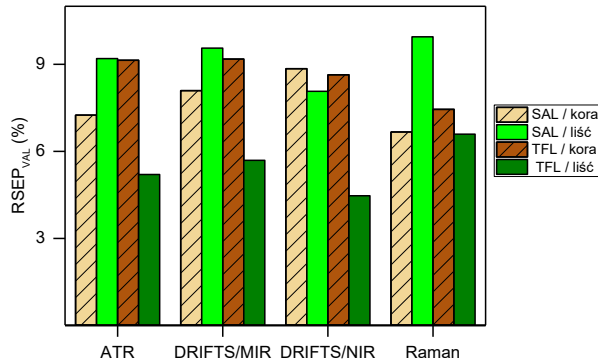
Rysunek 6. Modelowanie zawartości diosminy na bazie widm ATR: strona lewa - krzywa kalibracyjna, krzywe regresji dla modeli CLS i PLS, strona prawa - błędy względne
 Figure 6. Determination of diosmin content based on ATR spectra: left panel - calibration curve, and prediction curves for CLS and PLS models; right panel - relative errors

Nieco inaczej wygląda schemat analizy ilościowej substancji w produktach naturalnych i roślinnych. Charakter tych układów sprawia, że w warunkach laboratoryjnych nie można odtworzyć ich składu. Dodatkowo, wiele interesujących składników, np. substancji aktywnych, jest mieszaniną związków o zbliżonej budowie. Analiza ilościowa sprowadza się więc do oznaczenia nie pojedynczej formy substancji, lecz całej grupy związków o podobnej strukturze. Dlatego, w przypadku analiz materiału pochodzenia naturalnego metody oficjalne pozwalają oznaczyć stężenie grupy związków, a wynik podawany jest w przeliczeniu na związek bazowy [45]. Analizy ilościowe produktów naturalnych w oparciu o widma oscylacyjne polegają na konstrukcji modeli kalibracyjnych, z wykorzystaniem macierzy zmiennych zależnych Y zawierającej wyniki analiz referencyjnych, przeprowadzanych dla badanych substancji wg dedykowanych procedur analitycznych. Niedogodnością może być fakt, że oficjalne metody analizy często bazują na wynikach oznaczeń substancji wyekstrahowanych z matrycy naturalnej przy pomocy określonych rozpuszczalników. Jak już wspomnieliśmy, nie zawsze kontrolowany jest poziom wycięcia badanej grupy związków, dodatkowo niektóre ze stosowanych metod charakteryzuje niedostateczna precyzja. Oznacza to, że błędy oznaczeń referencyjnych znajdują wprost odzwierciedlenie w wynikach otrzymywanych w oparciu o modele chemometryczne psując ich jakość.

Dokładna znajomość składu badanego układu ma również tę zaletę, że może posłużyć do monitorowania procesów produkcji oraz analiz wyrobów gotowych [46, 47]. Dzięki temu, techniki spektroskopii oscylacyjnej znalazły zastosowanie jako narzędzia kontroli i analizy procesów wytwórczych (*process analytical technology*, PAT) w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym [48].

4.2.2. Przykłady oznaczeń ilościowych

We wspomnianych wcześniej analizach spektroskopowych 185 próbek kory i liści topoli [31], przeprowadzono modelowanie zawartości salicylanów i flawonoidów. Na bazie widm ATR, DRIFTS, NIR i Ramana oraz analiz referencyjnych zbudowano modele PLS. Otrzymano je optymalizując zakresy widmowe dla każdej z technik i rodzaju badanego materiału roślinnego. W przypadku salicylanów, których stężenia zmieniały się w granicach 0,6-8,1% dla kory i 0,5-10,0% dla liści, modele kalibracyjne charakteryzowały się wartościami współczynników korelacji w zakresie 0,984-0,991, a parametry R_{CV} dla walidacji krzyżowej mieściły się w przedziale 0,891-0,982. Błędy RSEP oznaczeń salicylanów w próbkach kalibracyjnych i walidacyjnych zawierały się w granicach 6,0-9,9%, przy czym dla kory błędy te były o ok. 2% niższe niż błędy oznaczeń salicylanów w liściach. Drugą grupą substancji aktywnych oznaczanych w analizowanym materiale roślinnym były flawonoidy, których stężenia mieściły się w zakresie 0,1-0,5% oraz 0,4-1,8%, odpowiednio dla kory i liści. Mimo niższej, w porównaniu do salicylanów, zawartości TFL w badanych próbkach, możliwe było opracowanie wiarygodnych modeli kalibracyjnych. Oznaczenia ilościowe flawonoidów w korze obarczone były błędami RSEP 7,0-9,2%. Dla liści błędy te mieściły się w przedziale 3,4-6,5% (Rys. 7).



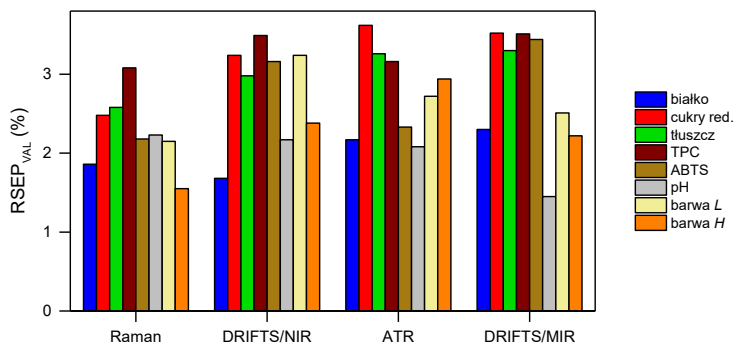
Rysunek 7. Wartości błędów $RSEP_{VAL}$ oznaczeń całkowitej zawartości salicylanów (SAL) i flawonoidów (TFL) w korze i liściach topoli na bazie danych spektroskopowych

Figure 7. $RSEP_{VAL}$ error values of total salicylates (SAL) and flavonoids (TFL) determinations in poplar bark and leaves based on spectroscopic data

Każda z użytych technik spektroskopii oscylacyjnej pozwoliła oznaczyć zawartość salicylanów i flawonoidów w sproszkowanych próbkach kory i liści bez konieczności ekstrakcji substancji aktywnych z materiału roślinnego.

Analiza całkowitej zawartości polifenoli (TPC), TFL oraz aktywności przeciwutleniającej FRAP dla ziela czystka szarego dała jeszcze lepsze wyniki [32]. W suszonym materiale stężenie TPC zmieniało się w zakresie 36,4-69,8 mg GAE/g, TFL od 16,8 do 53,5 mg ME/g, a aktywność FRAP oznaczono w przedziale 16,9-48,5 mM GAE/g. Na podstawie widm zmielonych próbek i wyników analiz referencyjnych opracowano modele kalibracyjne techniką PLS. Najlepszą zdolnością prognostyczną charakteryzowały się te otrzymane na bazie widm Ramana. Błędy RSEP oznaczeń trzech analizowanych parametrów dla próbek walidacyjnych wyniosły 2,7%, 2,9% i 5,4%, podczas gdy dla modeli zbudowanych na bazie widm MIR i NIR błędy te były prawie dwa razy większe. Na uwagę zasługuje fakt uzyskania wyższych wartości parametru R_{CV} dla modeli dedykowanych oznaczeniom TFL (0,915-0,966) w porównaniu do wartości parametru przy modelowaniu całkowitej zawartości polifenoli (0,826-0,842).

Możliwość równoczesnej analizy składników odżywczych i wybranych parametrów fizykochemicznych próbek pyłku pszczelego w oparciu o widma oscylacyjne pokazano w pracy Węglińskiej i innych [49]. Optymalizując zakresy widm IR, NIR i Ramana zbudowano modele kalibracyjne umożliwiające oznaczenie zawartości białka, cukrów redukujących, tłuszczu i polifenoli, a także aktywności przeciwutleniającej, pH oraz parametrów barwy. W przypadku analiz składników odżywczych błędy oznaczeń próbek walidacyjnych mieściły się w granicach 1,7-2,3% dla białka, 2,5-3,6% dla cukrów i 2,6-3,6% dla tłuszczu, przy czym najniższe błędy RSEP zanotowano dla modeli opracowanych na bazie widm ramanowskich.



Rysunek 8. Wartości błędów $RSEP_{WAL}$ oznaczeń ilościowych parametrów fizykochemicznych pyłków pszczoelich na bazie danych spektroskopowych

Figure 8. $RSEP_{WAL}$ error values for quantitative determination of physicochemical parameters of bee pollen based on spectroscopic data

Pomimo stosunkowo niewielkiej zawartości związków polifenolowych, uzyskano niskie błędy oznaczeń, w granicach 3,1-3,5%. Wartość aktywności przeciwutleniającej ABTS pyłków silnie korelowała z zawartością TPC, a wyznaczone błędy $RSEP_{WAL}$ były niższe niż dla oznaczeń polifenoli i mieściły się w zakresie 2,2-3,4%. W pracy tej przedstawiono również możliwość modelowania przy użyciu danych widmowych wartości pH ($RSEP_{WAL}=1,5-2,2\%$) oraz parametrów barwy *L* i *H* ($RSEP_{WAL}=1,6-3,2\%$) badanych próbek, co potwierdza wysoki potencjał spektroskopii oscylacyjnej w analizie złożonych układów naturalnych. Warto wspomnieć, że dla jednej próbki, czas potrzebny do oznaczenia 8 analizowanych parametrów, w oparciu o każde z jej widm oscylacyjnych, był blisko sto razy krótszy od czasu potrzebnego do wykonania analiz referencyjnych. Zestawienie błędów oznaczeń ilościowych na bazie różnych technik pokazano na Rys. 8.

Przedstawiony w pracy tok postępowania bazujący na chemometrycznej analizie danych spektroskopowych daje możliwość wyznaczenia szeregu parametrów próbki na podstawie pojedynczego widma. Co ważne, tego typu procedura nie wymaga rozpuszczenia próbki i ekstrakcji oznaczanych składników co, jak wspomnieliśmy, wielokrotnie skraca czas analizy i eliminuje konieczność użycia odczynników chemicznych.

4.2.3. Analiza produktów spożywczych

Opisana powyżej procedura może znaleźć zastosowanie w analizie produktów spożywczych. Wykorzystanie danych widmowych w znaczący sposób przyspiesza oznaczanie zawartości składników odżywczych i wybranych cech fizykochemicznych, w szczególności, gdy wyznaczenie pojedynczego parametru przy użyciu standardowo stosowanych protokołów jest procesem żmudnym lub kosztownym. Powszechnie stoso-

wane metody oznaczania wilgotności w mąkach, zalecane przez American Association of Cereal Chemists (AACC), polegają na suszeniu próbki w temp. 105 °C, do uzyskania stałej masy, co zajmuje około 3 godzin. Wyznaczenie zawartości popiołu wiąże się z analizą spaleniwą w temp. 550°C. Na bazie widm Ramana próbek mąki, uzyskanych z przemiału 15 różnych odmian pszenicy, oraz wyników analiz referencyjnych opracowano modele PLS umożliwiające oznaczenie wilgotności, a także zawartości popiołu, azotu, węgla, siarki i tlenu [50]. W przypadku dwóch pierwszych parametrów błąd RSEP dla próbek walidacyjnych był na poziomie 2,1 i 1,7%, podczas gdy modelowanie składu pierwiastkowego dało błędy równe 0,1 i 0,3% dla C i O oraz 1,1 i 3,3% dla N i S. Wszystkie powyższe oznaczenia przeprowadzono na bazie pojedynczego widma próbki, którego czas rejestracji nie przekraczał 5 min.

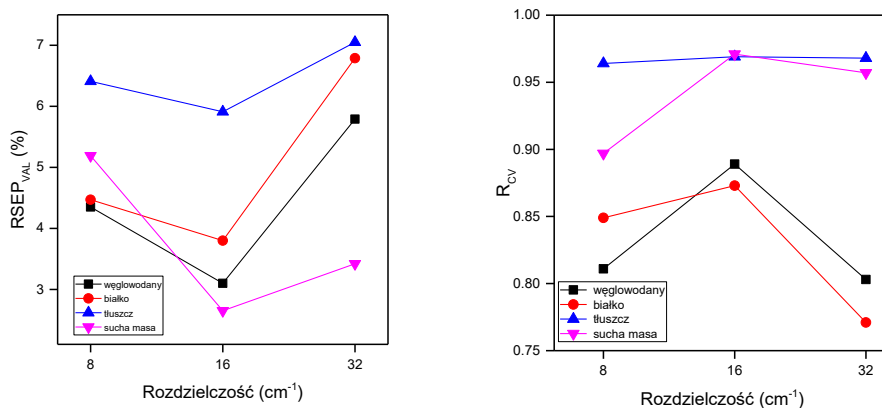
W innych badaniach spektroskopię oscylacyjną zastosowano do analiz wilgotności makaronów, jednego z podstawowych parametrów determinujących jakość gotowych produktów [51]. Widma ATR, NIR i Ramana zhomogenizowanych próbek posłużyły do konstrukcji modeli kalibracyjnych. Na ich podstawie wyznaczono wilgotność z błędem w granicach 2.1-5.7%. Najniższe wartości uzyskano dla modelu opracowanego z wykorzystaniem widm ATR.

Techniki spektroskopowe są szczególnie użyteczne, gdy oznaczenie interesującego parametru przy użyciu standardowych technik analitycznych jest procesem długotrwałym i kłopotliwym. Przykładem takich analiz są oznaczenia zawartości glutenu w mąkach, realizowane przy pomocy uciążliwej techniki wymywania lub testów immunologicznych ELISA. Jako alternatywę, pokazano zastosowanie spektroskopii IR, NIR i Ramana [52]. Na bazie widm oscylacyjnych opracowano modele PLS, pozwalające oznaczyć gluten z dokładnością 3-5%.

Techniki spektroskopowe zastosowano również do analizy mleka i jogurtów. Oznaczenia zawartości tłuszczu, białka i laktozy w jogurtach naturalnych przeprowadzono na bazie widm ramanowskich z dokładnością 2-4% oraz widm ATR z błędem 1-5% [53]. Podobne oznaczenia dla mleka były obciążone błędami w zakresie 2-6% i 2-3% [54]. Omówione badania sugerują silny wpływ jednorodności badanego materiału i wielkości obszaru próbkowania na jakość analiz.

Czynnikami wpływającymi na atrakcyjność technik spektroskopowych w zastosowaniach analitycznych są łatwość i prostota pomiaru. Jakość modeli kalibracyjnych i uzyskanych na ich podstawie oznaczeń ilościowych zależy od stosunku sygnału do szumu (S/N) dla rejestrowanych widm. O ile widma ATR i NIR charakteryzują się na ogół wysokimi wartościami parametru S/N, to widma DRIFTS w zakresie MIR i widma Ramana są najczęściej gorszej jakości. Poprawę stosunku sygnału do szumu można uzyskać poprzez wydłużenie czasu rejestracji widm, co nie jest pożądane w razie konieczności analizy wielu próbek. Pogorszenie rozdzielczości mierzonych widm pozwala, przy tym samym czasie zapisu, uzyskać polepszenie parametru S/N, w tym przypadku trzeba się jednak liczyć ze stratą informacji możliwych do uzyskania z tak zarejestrowanych widm [55, 56].

Wpływ rozdzielczości widm na jakość oznaczeń ilościowych składników odżywczych sprawdzono badając próbki mleka krowiego [54]. Dla serii zhomogenizowanych mieszanin próbek mleka zbudowano modele kalibracyjne na bazie widm FT Ramana otrzymanych z rozdzielczością 8, 16 i 32 cm^{-1} , akumulując tę samą liczbę interferogramów.



Rysunek 9. Wykresy parametrów $RSEP_{VAL}$ i R_{CV} modelowania PLS zawartości składników odżywczych w mleku krowim na bazie widm Ramana

Figure 9. Plotted $RSEP_{VAL}$ and R_{CV} parameters for PLS modelling of nutrients' content in cow's milk based on Raman spectra

Modele PLS zbudowane na bazie widm zarejestrowanych z rozdzielczością 16 cm^{-1} charakteryzowały się najniższymi wartościami błędów RSEP i najwyższymi wartościami współczynnika R_{CV} .

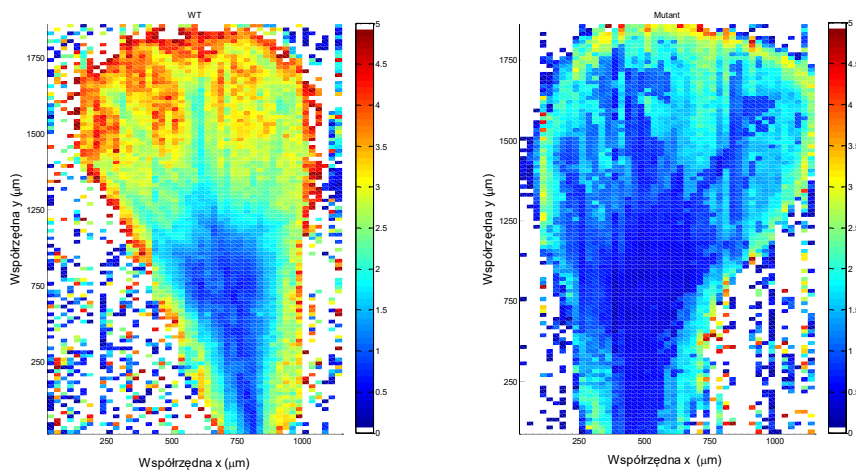
Błędy $RSEP_{VAL}$ dla oznaczeń węglowodanów, białka, tłuszczu i suchej masy wyniosły odpowiednio 3,1, 3,8, 5,9 i 2,6%. Polepszenie rozdzielczości do 8 cm^{-1} powinno wiązać się z pojawieniem się dodatkowych informacji. Niemniej tak otrzymane widma charakteryzowały się niższym stosunkiem S/N w porównaniu z widmami zarejestrowanymi z rozdzielczością 16 cm^{-1} . Zwiększony poziom szumu spowodował pogorszenie zdolności prognostycznej opracowanych na ich podstawie modeli kalibracyjnych. Widma zapisane z rozdzielczością 32 cm^{-1} były mniej zaszumione lecz zbyt rzadkie próbkowanie wiązało się z częściową utratą informacji. W konsekwencji, opracowane modele kalibracyjne charakteryzowały się podwyższonymi wartościami błędów RSEP, które dla zestawów walidacyjnych wyniosły 5,8, 6,8, 7,0 i 3,4%. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 9.

Widma charakteryzujące się wysokim stosunkiem sygnału do szumu pozwalają uzyskać oznaczenia ilościowe obarczone małymi błędami także dla próbek naturalnych. Rozdzielczość z jaką rejestrowane są widma wydaje się mieć mniejsze znaczenie [57, 58]. Jest to szczególnie istotne w przypadku użycia spektrometrów przenośnych, o gorszych parametrach optycznych i elektronicznych.

4.3. TECHNIKI OBRAZOWANIA

Ważnym obszarem zastosowań spektroskopii oscylacyjnej w analizie fitozwiązków w roślinach jest obrazowanie chemiczne. Możliwość szybkiej rejestracji widm IR i Ramana w połączeniu z mikroskopią optyczną znajduje szerokie zastosowanie w analizie tkanek roślinnych, umożliwiając porównanie informacji strukturalnych ze składem chemicznym badanego fragmentu próbki. W technikach obrazowania dane pomiarowe są umieszczane w wielowymiarowej macierzy, tzw. *hyper-cube*. Zawiera ona widma skanowanej powierzchni zarejestrowane w punktach o współrzędnych (x,y) . Wyświetlając intensywność sygnału w widmie przy wybranej liczbie falowej dla każdego punktu powierzchni uzyskuje się mapę. Liczba możliwych do uzyskania map odpowiada długości wektora liczb falowych i często jest liczona w tysiącach. W praktyce, wiele map jest do siebie bardzo podobnych i nie wszystkie mają wartość analityczną. Konfokalna mikroskopia ramanowska pozwala dodatkowo uzyskać mapy dla współrzędnej z , pokazując przekrój poprzeczny badanej próbki [59].

We wspomnianej w paragrafie 4.1 pracy dotyczącej analizy tkanek mutantów kutyny rzodkiewnika [29] opisano rejestrację zestawów widm IR pozwalających na obrazowanie płatków wybranych przedstawicieli roślin genetycznie zmutowanych oraz typu WT. W celu zwiększenia zdolności rozdzielczej, analizy wykonano na bazie drugich pochodnych widm transmisyjnych obliczonych metodą Savitzkiego-Golaya przy użyciu przedziałów 15-punktowych i wielomianu stopnia 3-go. Niezwykłym odkryciem było stwierdzenie nierównocennego rozmieszczenia substancji chemicznych w obrębie badanych tkanek. Dla każdej z podstawowych grup związków wchodzących w ich skład, tj. estrów alifatycznych kwasów tłuszczowych, białek, celulozy, hemiceluloz i pektyn otrzymano charakterystyczne mapy absorpcji, przy czym mapy dla poszczególnych drgań przypisanych danej grupie związków miały taki sam wzór. Podobieństwa pomiędzy tymi mapami a mapami otrzymanymi dla innych drgań umożliwiły dokładniejsze przypisanie pasm w widmach IR, w szczególności tych, których przypisania literaturowe były niejednoznaczne. Wykorzystując podobieństwo map otrzymanych dla drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$, $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})$ i $\delta(\text{C}-\text{H})$ potwierdzono, że dla mutantów kutyny, dla których grubość warstwy polimerowej w płatkach była znacząco zredukowana w stosunku do roślin WT, obserwuje się zachowanie charakterystycznego, niejednorodnego rozmieszczenia biopolimeru w obrębie tkanki.



Rysunek 10. Obrazowanie chemiczne: względne mapy absorpcji białko/lipidy dla płatków rzodkiewnika rośliny kontrolnej (WT) i mutacji lacs2-3. Skala kolorystyczna reprezentuje stosunek wartości drugich pochodnych widm IR dla pasm 1733 cm^{-1} i 1658 cm^{-1}

Figure 10. Chemical imaging: relative protein/lipid maps for Arabidopsis petals of wild-type plant and the lacs2-3 mutation. Colorbar represents ratio of the second derivative values of IR spectra for bands 1733 cm^{-1} and 1658 cm^{-1}

Jedną z zalet technik obrazowania jest możliwość uzyskania tzw. map względnych otrzymywanych w wyniku operacji matematycznych wykonywanych dla map tej samej próbki uzyskanych dla różnych drgań. Pozwalają one przedstawić zależności pomiędzy różnymi grupami związków chemicznych i śledzić zmiany dla wielu substancji jednocześnie, znacząco ułatwiając interpretację danych. Porównanie map względnych uzyskanych dla mutantów kutyny i typu WT uzmysławia skalę zmian chemicznych w tkance, które są następstwem mutacji, wygaszenia lub nadekspresji wybranych genów regulujących biosyntezę kutyny. Przykład map względnych, pokazujących stosunek zawartości białka do lipidów dla tkanki rośliny kontrolnej i mutantu lacs23 przedstawiono na Rys. 10.

Techniki obrazowania ramanowskiego i podczerwonego, łącząc obrazy mikroskopowe z informacjami spektroskopowymi, tworzą unikalne narzędzia wspomagające badania materiału roślinnego oraz produktów pochodzenia naturalnego. Obrazowanie znajduje coraz powszechniejsze zastosowanie w analizach tkanek roślinnych, umożliwiając analizy strukturalne tkanek, biopolimerów oraz substancji biologicznie czynnych [60-64].

UWAGI KOŃCOWE

Spektroskopia oscylacyjna w połączeniu z metodami chemometrycznymi pozwala wykonać szczegółowe analizy materiału roślinnego, produktów naturalnych i spożywczych. Ważną zaletą metod wykorzystujących widma IR i Ramana jest możliwość przeprowadzania oznaczeń dla próbek w ich natywnej postaci bez konieczności ekstrakcji oznaczanych substancji. Dostępne techniki pomiarowe pozwalają na pomiar widm różnorodnych próbek, umożliwiając też badania *in vivo*. Nowe możliwości stwarza spektroskopowe obrazowanie chemiczne, które pozwala na analizy strukturalne tkanek. Dostarczając informacji o rozmieszczeniu przestrzennym badanych związków umożliwia śledzenie procesów biosyntezy ważnych z punktu widzenia fizjologii roślin, jak również zmian chorobowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727.
- [2] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysegou, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 586.
- [3] C.J. Dillard, J.B. German, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1744.
- [4] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, *Food Chem.*, 2011, **126**, 1821.
- [5] R. Tsao, Z.Y. Deng, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 2004, **812**, 85.
- [6] M. Butnariu, C.Z. Coradini, *Chem. Cent. J.*, 2012, **6**. doi:10.1186/1752-153x-6-35
- [7] Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki (red. K Małek), PWN, Warszawa, 2016.
- [8] *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and Applications* (ed. B. Schrader), Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [9] *Modern techniques in applied molecular spectroscopy* (ed. F.M. Mirabella), J. Wiley & Sons, New York, 1998.
- [10] *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds. J. Chalmers, P. Griffiths), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2002.
- [11] S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B.K. Cho, *Trends Food Sci. Technol.*, 2015, **46**, 85.
- [12] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 53.
- [13] P.J. Brimmer, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 1988, **42**, 242.
- [14] T. Czaja, S. Mazurek, R. Szostak, *Talanta*, 2016, **161**, 655.
- [15] H. Wikstrom, I.R. Lewis, L.S. Taylor, *Appl. Spectrosc.*, 2005, **59**, 934.
- [16] D. Yang, Y. Ying, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, **46**, 539.
- [17] M. Baranska, H. Schulz, E. Joubert, M. Manley, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7716.
- [18] H. Schulz, M. Barańska, *Vib. Spectrosc.*, 2007, **43**, 13.
- [19] K.B. Bec, J. Grabska, G.K. Bonn, M. Popp, C.W. Huck, *Front. Plant Sci.*, 2020, **11**, doi:10.3389/fpls.2020.01226
- [20] R. Deidda, P.Y. Sacre, M. Clavaud, L. Coic, H. Avohou, P. Hubert, E. Ziemons, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **114**, 251.
- [21] D.P. Aykas, A. Menevseoglu, *Food Control*, 2021, **121**, doi:10.1016/j.foodcont.2020.107670
- [22] C.K. Pezzei, S.A. Schonbichler, C.G. Kirchler, J. Schmelzer, S. Hussain, V.A. Huck-Pezzei, M. Popp, J. Krolitzek, G.K. Bonn, C.W. Huck, *Talanta*, 2017, **169**, 70.
- [23] H. Yaman, D.P. Aykas, R. Jimenez-Flores, L.E. Rodriguez-Saona, *J. Dairy Sci.*, 2022, **105**, 40.
- [24] S. Bureau, D. Cozzolino, C.J. Clark, *Postharvest Biol. Technol.*, 2019, **148**, 1.

- [25] A. Rinnan, F. van den Berg, S.B. Engelsen, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 1201.
- [26] M.L. Vigni, C. Durante, M. Cocchi, *Exploratory Data Analysis, w Chemometrics in Food Chemistry* (ed. F. Marini), Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [27] M. Otto, *Chemometrics*, Wiley-Vch, New York, 1999.
- [28] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- [29] S. Mazurek, A. Mucciolo, B.M. Humbel, C. Nawrath, *Plant J.*, 2013, **74**, 880.
- [30] S. Mazurek, I. Garroum, J. Daraspe, D. De Bellis, V. Olsson, A. Mucciolo, M.A. Butenko, B.M. Humbel, C. Nawrath, *Plant Physiol.*, 2017, **173**, 1146.
- [31] S. Mazurek, M. Włodarczyk, S. Pielorz, P. Okinczyc, P.M. Kus, G. Długosz, D. Vidal-Yanez, R. Szostak, *Molecules*, 2022, **27**, doi:10.3390/molecules27123954.
- [32] S. Pielorz, I. Fecka, K. Bernacka, S. Mazurek, *Molecules*, 2022, **28**, doi:10.3390/molecules28010161.
- [33] S. Mazurek, I. Fecka, M. Węglińska, R. Szostak, *Talanta*, 2018, **189**, 308.
- [34] R. Kramer, *Chemometric techniques for quantitative analysis*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- [35] R. Szostak, S. Mazurek, *Analyst*, 2002, **127**, 144-148.
- [36] R. Szostak, S. Mazurek, *Drug Test. Anal.*, 2013, **5**, 126.
- [37] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2016, **83**, 1.
- [38] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2017, **93**, 57.
- [39] S. Mazurek, R. Szostak, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 814.
- [40] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2011, **57**, 157.
- [41] S. Mazurek, R. Szostak, *Food Chem.*, 2011, **125**, 1051.
- [42] S. Pielorz, M. Weglinska, S. Mazurek, R. Szostak, *Molecules*, 2022, **27**, doi:10.3390/molecules27238276
- [43] S. Mazurek, K. Pichlak, R. Szostak, *Processes*, 2021, **9**, doi:10.3390/pr9010008.
- [44] B.Y. Li, A. Calvet, Y. Casamayou-Boucau, C. Morris, A.G. Ryder, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 3419.
- [45] Willow Bark (*Salicis cortex*) Monograph, *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2020.
- [46] T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote, J.P. Remon, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 869.
- [47] K.A. Esmonde-White, M. Cuellar, C. Uerpmann, B. Lenain, I.R. Lewis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 637.
- [48] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervae, *Int. J. Pharm.*, 2011, **417**, 32.
- [49] M. Węglińska, R. Szostak, A. Kita, A. Nemś, S. Mazurek, *Talanta*, 2020, **212**, 8.
- [50] T. Czaja, A. Sobota, R. Szostak, *Foods*, 2020, **9**, doi:10.3390/foods9030280
- [51] T. Czaja, E. Kuzawinska, A. Sobota, R. Szostak, *Talanta*, 2018, **178**, 294.
- [52] T. Czaja, S. Mazurek, R. Szostak, *Food Chem.*, 2016, **211**, 560.
- [53] T. Czaja, M. Baranowska, S. Mazurek, R. Szostak, *Spectrochim. Acta A*, 2018, **196**, 413.
- [54] S. Mazurek, R. Szostak, T. Czaja, A. Zachwieja, *Talanta*, 2015, **138**, 285.
- [55] B.K. Hart, P.R. Griffiths, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 1337.
- [56] B.K. Hart, R.J. Berry, P.R. Griffiths, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 1346.
- [57] B.T. Bowie, D.B. Chase, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 164A.
- [58] B.T. Bowie, D.B. Chase, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 200A.
- [59] N. Gierlinger, M. Schwanninger, *Plant Physiol*, 2006, **140**, 1246.
- [60] R. Baranski, M. Baranska, H. Schulz, *Planta*, 2005, **222**, 448.
- [61] H. Schulz, M. Barańska, R. Barański, *Biopolymers*, 2005, **77**, 212-221.

- [62] M. Szymanska-Chargot, M. Chylinska, P.M. Pieczywek, P. Rosch, M. Schmitt, J. Popp, A. Zdunek, *Planta*, 2016, **243**, 935.
- [63] A. Saletnik, B. Saletnik, C. Puchalski, *Molecules*, 2021, **26**, doi:10.3390/molecules26061537
- [64] P. Bock, M. Felhofer, K. Mayer, N. Gierlinger, *Front. Plant Sci.*, 2021, **12**, doi:10.3389/fpls.2021.793330.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 kwietnia 2023 r.

DWUWYMIAROWA ANALIZA KORELACYJNA

TWO-DIMENSIONAL CORRELATION ANALYSIS

Mirosław Antoni Czarnecki

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław, Polska
e-mail: miroslaw.czarnecki@uwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Otrzymywanie dwuwymiarowych widm korelacyjnych
2. Właściwości dwuwymiarowych widm korelacyjnych
3. Problemy z interpretacją dwuwymiarowych widm korelacyjnych
4. Przygotowanie danych do analizy
5. Otrzymywanie informacji o dynamice zmian spektralnych z dwuwymiarowych widm korelacyjnych
6. Metoda ruchomego okna
7. Widma mocy

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Mirosław Czarnecki całą swoją karierę naukową związał z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora i kieruje "Zespołem chemometrii i spektroskopii stosowanej". Promotorem pracy magisterskiej (1981) pt. „*Kształt pasm w podczerwieni układów ze słabymi oddziaływaniami*”, oraz pracy doktorskiej (1989) pt. „*Dyspersja w podczerwieni cząsteczek o symetrii C_{3v} w fazie ciekłej*” był prof. dr hab. J. P. Hawranek. W latach 1992-1993 przebywał na stażu podoktorskim w Kwansai Gakuin University (Japonia) w zespole prof. Yukihiro Ozaki a w 1995 odbył staż na University of Essen (Niemcy) w zespole prof. Heinza Sieslera. Staże te zaowocowały całkowitą zmianą tematyki badawczej. Zainteresowania naukowe prof. Czarneckiego skupiły się na teoretycznych i praktycznych aspektach zastosowania dwuwymiarowej analizy korelacyjnej do badania różnorodnych układów chemicznych. W tym czasie opublikował szereg fundamentalnych prac dotyczących tej metody. Prace te do dziś są wielokrotnie cytowane i stanowiły zasadniczą część rozprawy habilitacyjnej (2001) zatytułowanej „*Dwuwymiarowa analiza korelacyjna dynamicznych widm oscylacyjnych*”. W 2010 roku otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych. Oprócz dwuwymiarowej analizy korelacyjnej, tematyka badawcza prof. Czarneckiego obejmuje również układy z wiązaniem wodorowym a w szczególności stan i oddziaływanie wody w różnych środowiskach, mikroheterogeniczność mieszanin binarnych, układy ciekłokrystaliczne, układy o znaczeniu biologicznym, komputerowo-wspomagana spektroskopia, chemometria oraz spektroskopia w bliskiej podczerwieni. Od 1997 roku jest członkiem Society for Applied Spectroscopy (USA).



<https://orcid.org/0000-0003-4166-1334>

ABSTRACT

This review provides fundamental information on theoretical and practical aspects of two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS). At first, is shown a brief development of this method since its introduction by Isao Noda in 1986. In the next part is explained the general idea of 2DCOS, and details of determination of the synchronous and asynchronous spectra from the experimental data. Next section includes comprehensive description of the properties and the rules for interpretation of the 2D correlation spectra. The most common problems with interpretation of 2DCOS spectra, and the ways of improving results of correlation analysis by a proper data pre-treatment are widely discussed. In addition, some of the most important modifications of this method like moving-window analysis and PCMW2D are described. Finally, the usefulness of the power spectra is presented. It has been shown that 2D correlation analysis is a versatile and powerful tool for data analysis and provides information not readily accessible from the original data set.

Keywords: two-dimensional correlation analysis, interpretation of 2DCOS spectra, data pretreatment, moving-window analysis, power spectra, spectral analysis, vibrational spectroscopy.

Słowa kluczowe: dwuwymiarowa analiza korelacyjna, interpretacja widm 2DCOS, przygotowanie danych do analizy, metoda ruchomego okna, widma mocy, analiza danych spektralnych, spektroskopia oscylacyjna.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

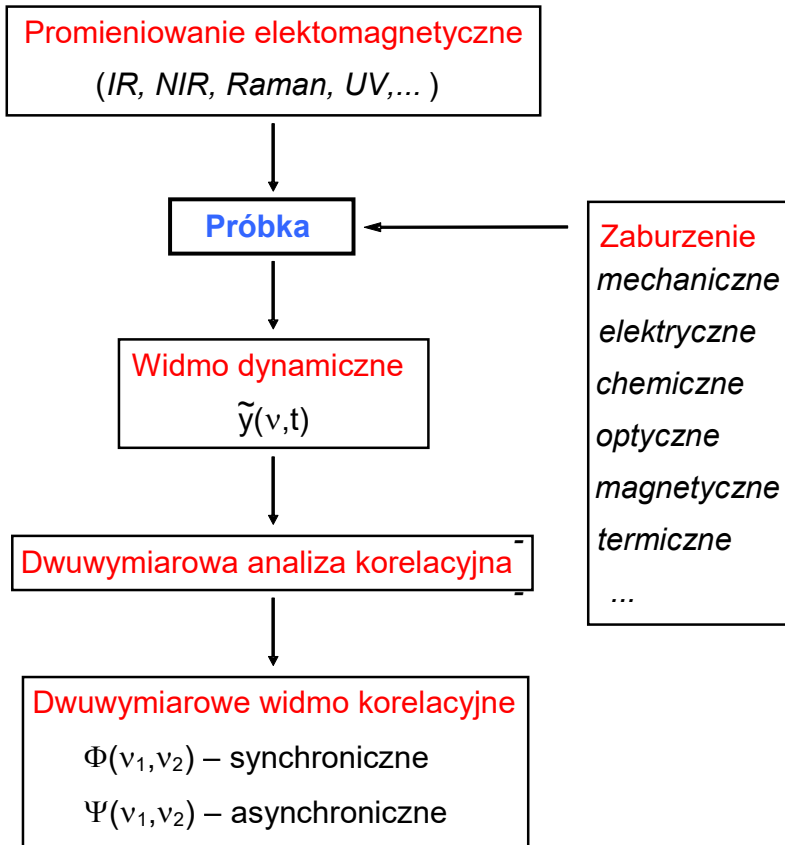
2D	dwuwymiarowa (two-dimensional)
2DCOS	dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna (two-dimensional correlation spectroscopy)
IR	podczerwień (infrared)
MIR	średnia podczerwień (mid-infrared)
NIR	bliska podczerwień (near-infrared)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ultraviolet radiation)
ATR	całkowite osłabione odbicie (attenuated total reflection)
FT	transformata Fouriera (Fourier transform)
PCA	analiza głównych składowych (principal component analysis)
PCMW2D	dwuwymiarowa metoda ruchomego okna zależna od zaburzenia (perturbation-correlation moving-window two-dimensional)

WPROWADZENIE

W 1986 roku Isao Noda zaprezentował po raz pierwszy ideę dwuwymiarowej analizy korelacyjnej [1]. Początkowo metoda ta mogła być używana jedynie do pomiarów, w których stosowano periodyczne zaburzenia o niewielkiej amplitudzie. W związku z czym obszar jej zastosowań był mocno ograniczony - głównie do reologicznych badań polimerów oraz do badania molekularnego mechanizmu reorientacji ciekłych kryształów w polu elektrycznym [2-4]. W 1993 roku Noda opublikował uogólniony algorytm, który umożliwił stosowanie dwuwymiarowej analizy korelacyjnej do dowolnego typu zaburzeń [5]. Co więcej, nowy algorytm pozwalał również na korelacje danych pochodzących z różnego rodzaju eksperymentów (hetero-korelacje). Tym sposobem, dwuwymiarowa analiza korelacyjna stała się uniwersalnym narzędziem do analizy danych, nie tylko spektralnych. Od tego czasu obserwuje się szybki rozwój tej metody oraz lawinowy wzrost liczby prac, w których autorzy prezentują potencjał tej metody oraz jej zastosowania do nowych obszarów badawczych. Pojawiły się również modyfikacje oryginalnego algorytmu zaproponowanego przez Nodę w 1993 roku. Jedną z pierwszych modyfikacji była ilościowa dwuwymiarowa analiza korelacyjna opracowana przez Egkasisa i Ishidę [6]. Oryginalne widma zostały znormalizowane względem amplitudy zmian intensywności przy poszczególnych liczbach falowych. Jednak taki sposób normalizacji powoduje znaczną redukcję stosunku sygnału do szumu, wskutek czego użyteczność zaproponowanej metody jest mocno ograniczona. Inne modyfikacje dwuwymiarowej analizy korelacyjnej również wykazywały szereg ograniczeń i nie zyskały szerszej popularności. Wyjątkiem była metoda ruchomego okna (moving window) zaproponowana przez Thomasa and Richardsona w 2000 roku [7], a następnie rozwinięta przez Moritę i współpracowników [8]. Metoda ta została dokładniej omówiona w dalszej części pracy.

Do popularyzacji dwuwymiarowej analizy korelacyjnej przyczyniły się organizowane cyklicznie (zazwyczaj co 2 lata) sympozja poświęcone teoretycznym i praktycznym aspektom tej metody. Pierwsze sympozjum zorganizował prof. Ozaki w 1999 roku w miejscowości Sanda (Japonia). Natomiast piąte sympozjum (2009 rok) zostało zorganizowane przez prof. Czarnik-Matuszewicz (†) i prof. Czarneckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jak do tej pory, najważniejszym i najbardziej kompletnym kompendium wiedzy o dwuwymiarowej analizie korelacyjnej jest monografia Nody i Ozakiego pt. "Two Dimensional Correlation Spectroscopy Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy", która ukazała się w 2004 roku nakładem wydawnictwa John Wiley & Sons [9]. Co dwa lata ukazuje się przeglądowa praca Nody (ostatnio w *J. Mol. Struct.* 1217 (2020) 128405), w której opisuje on najważniejsze dokonania w tej dziedzinie w minionym okresie czasu. Oprogramowanie do dwuwymiarowej analizy korelacyjnej jest powszechnie dostępne, gdyż zostało zaimplementowane w większości programów służących do analizy danych spektralnych oraz obliczeń chemometrycznych. Poza tym, dostępne są darmowe wersje oprogramowania na stronach internetowych wielu zespołów badawczych (np. <https://www.dropbox.com/s/5fgvt5k4e7u7wiw/shige.zip>). Dwuwymiarowe widma korelacyjne można również obliczyć samodzielnie. Najlepszym i najczęściej używanym środowiskiem do tych obliczeń jest Matlab. Odpowiednie informacje i instrukcje można znaleźć w pracy przeglądowej [10].

1. OTRZYMYWANIE DWUWYMIAROWYCH WIDM KORELACYJNYCH



Rysunek 1. Idea dwuwymiarowej analizy korelacyjnej
Figure 1. Idea of two-dimensional correlation analysis

Idea dwuwymiarowej analizy korelacyjnej, którą zilustrowano na Rysunku 1, jest stosunkowo prosta. Badaną próbkę poddajemy zaburzeniu a następnie zmiany wywołane danym zaburzeniem rejestrujemy za pomocą odpowiedniej metody, najczęściej spektroskopii oscylacyjnej (MIR, NIR, Raman). Informacja jaką otrzymujemy w wyniku analizy korelacyjnej zależy zarówno od rodzaju użytego zaburzenia (reprezentowanego przez zmienną t) jak i od rodzaju sondy (reprezentowanej przez zmienną ν), która rejestruje zmiany spektralne wywołane działaniem tego zaburzenia. Wynikiem pomiarów eksperymentalnych jest seria widm, z której tworzymy macierz $A(v, t)$ uporządkowaną względem zaburzenia. Po odjęciu widma odniesienia $A^{\text{ref}}(v)$ (reference spectrum) od każdego z widm otrzymujemy tzw. widmo dynamiczne $A^{\text{d}}(v, t)$ (dynamic spectrum), które zawiera informację o zmianach spektralnych przy poszczególnych wartościach ν względem widma odniesienia:

$$A^d(v, t) = \begin{cases} A(v, t) - A^{ref.}(v) & \text{dla } t_{\min} \leq t \leq t_{\max} \\ 0 & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (1)$$

gdzie t_{\min} i t_{\max} są minimalnymi i maksymalnymi wartościami zaburzenia (t). Wybór widma odniesienia ma duży wpływ na wygląd widm korelacyjnych i został przedyskutowany w kilku wcześniejszych pracach [11-13]. Jako widmo odniesienia najczęściej stosuje się widmo uśrednione względem zaburzenia. Można również zastosować pierwsze lub ostatnie widmo w serii a nawet całkowicie arbitralne widmo odniesienia. Jednak użycie odpowiedniego widma odniesienia pozwala wyeliminować pasma, które nie zmieniają swojej intensywności na wskutek działania zaburzenia. Tym sposobem widma korelacyjne stają się znacznie prostsze niż widma oryginalne, gdyż zawierają jedynie te pasma, które zmieniają swoją intensywność.

Oryginalny algorytm, opublikowany przez Nodę w 1993 roku, wymagał zastosowania transformaty Fouriera (FT) do obliczenia dwuwymiarowych widm korelacyjnych [5]. W 2000 roku Noda opublikował modyfikację tego algorytmu, która umożliwiła obliczenie widm korelacyjnych bez konieczności użycia transformaty Fouriera. Została ona zastąpiona transformacją z wykorzystaniem macierzy Hilberta-Nody [14]. Obecnie ten sposób obliczania dwuwymiarowych widm korelacyjnych dominuje ze względu na swoją prostotę i łatwość implementacji [10]. Stosując zmodyfikowany algorytm, przekształcamy widmo dynamiczne na parę dwuwymiarowych widm korelacyjnych: widmo synchroniczne $\Phi(v_i, v_j)$ (synchronous spectrum) i widmo asynchroniczne $\Psi(v_i, v_j)$ (asynchronous spectrum):

$$\Phi(v_i, v_j) = \frac{1}{N-1} A_d(v_i, t) \cdot A_d(v_j, t)^T \quad (2)$$

$$\Psi(v_i, v_j) = \frac{1}{N-1} A_d(v_i, t) \cdot M \cdot A_d(v_j, t)^T \quad (3)$$

gdzie N jest liczbą widm w macierzy danych, górny indeks T oznacza operację transponowania a M jest macierzą Hilberta-Nody następującej postaci:

$$M_{k,l} = \begin{cases} 0 & \text{dla } k=l \\ 1/(\pi \cdot (k-l)) & \text{w przeciwnym przypadku} \end{cases} \quad (4)$$

gdzie $k, l=1, 2, \dots, N$. W postaci rozwiniętej macierz ta wygląda następująco:

$$M = \frac{1}{\pi} \begin{bmatrix} 0 & 1 & \frac{1}{2} & \frac{1}{3} & \dots \\ -1 & 0 & 1 & \frac{1}{2} & \dots \\ -\frac{1}{2} & -1 & 0 & 1 & \dots \\ -\frac{1}{3} & -\frac{1}{2} & -1 & 0 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{bmatrix} \quad (5)$$

Jak łatwo zauważyć, macierz Hilberta-Nody jest antysymetryczna względem głównej przekątnej, na której wszystkie wartości są równe zero. Taką samą symetrię będą również posiadały widma asynchroniczne. Jeżeli korelujemy dwie identyczne serie danych ze sobą (A_d z A_d), wówczas mówimy o homo-korelacji lub w skrócie o korelacji. Jeżeli natomiast wykonujemy korelację dwóch macierzy A_d i B_d , które zawierają wyniki pochodzące z różnych eksperymentów, wówczas mamy do czynienia z hetero-korelacją. Odpowiednie wzory na hetero-korelacyjne widma synchroniczne i asynchroniczne mają następującą postać:

$$\Phi(v_i, \mu_j) = \frac{1}{N-1} A_d(v_i, t) \cdot B_d(\mu_j, t)^T \quad (6)$$

$$\Psi(v_i, \mu_j) = \frac{1}{N-1} A_d(v_i, t) \cdot M \cdot B_d(\mu_j, t)^T \quad (7)$$

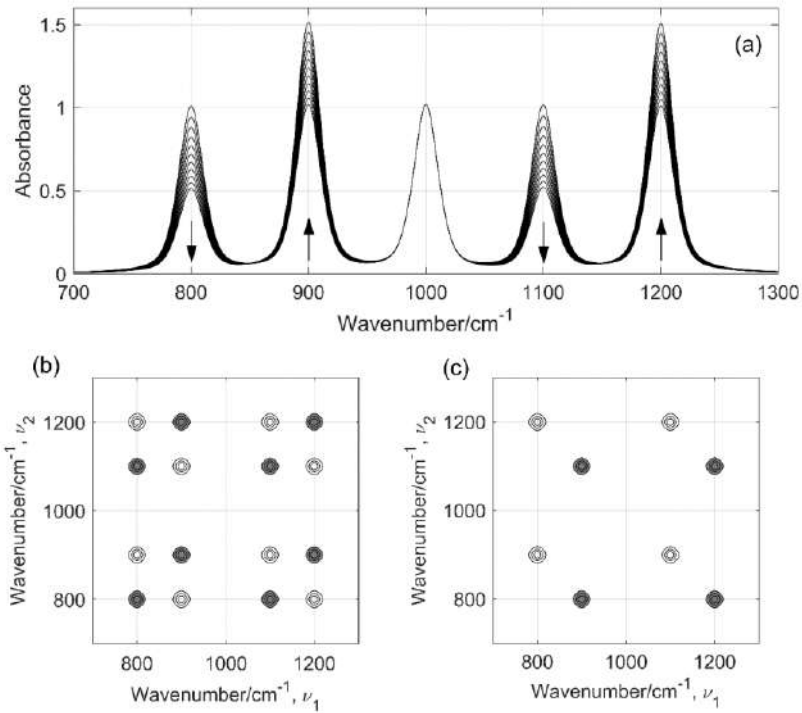
gdzie μ jest zmienną związaną z macierzą B . Oczywiście, widma hetero-korelacyjne nie wykazują symetrii względem głównej przekątnej. Aby można było wykonać analizę hetero-korelacyjną, obie serie pomiarowe (A_d i B_d) muszą być zmierzone dla tych samych wartości zaburzenia (t), gdyż w przeciwnym wypadku otrzymane wyniki nie mają sensu fizycznego. Hetero-korelacja jest bardzo przydatnym narzędziem do określania pochodzenia nieznanymi pasm. Wykorzystując selektywne korelacje pomiędzy widmami, gdzie dokładnie znane są przypisania pasm a widmami zawierającymi pasma nieznanego pochodzenia, można dokonać wiarygodnego przypisania pasm o nieznanym pochodzeniu. Znakomitą ilustracją tego faktu jest hetero-korelacja pomiędzy widmami MIR i NIR, NIR i Ramana lub MIR i Ramana [15, 16]. Jednak na tym nie kończą się możliwości analizy hetero-korelacyjnej, umożliwia ona również korelację danych otrzymanych za pomocą całkowicie odmiennych technik eksperymentalnych jak np. pomiędzy SAXS (small angle X-ray scattering) i IR [17]. Taka korelacja pozwala uzyskać jakościowo nowe wyniki, których otrzymanie nie jest możliwe w inny sposób.

Zazwyczaj pomiary widm eksperymentalnych wykonywane są dla równoodległych wartości zaburzenia (ze stałym krokiem). Jeżeli nie jest spełniony ten warunek, wówczas do obliczenia dwuwymiarowych widm korelacyjnych stosujemy zmodyfikowany algorytm [18].

2. WŁAŚCIWOŚCI DWUWYMIAROWYCH WIDM KORELACYJNYCH

Na Rysunku 2a pokazano serię symulowanych (syntetycznych) widm, z których każde zawiera 5 pasm. Kształty wszystkich pasm były przybliżone za pomocą sumy funkcji Gaussa i Lorentza o takim samym udziale (0.5), natomiast zmiany intensywności opisywała funkcja eksponencjalna. Pasma przy 850 i 1050 cm^{-1} zmniejszają swoją intensywność z tą samą szybkością, natomiast pasma przy 950, 1150 cm^{-1} zwiększają swoją intensywność w tym samym tempie. Pasma przy 1000 cm^{-1} posiada stałą intensywność w całym zakresie zaburzeń. Rysunki 2b i 2c zawierają widma synchroniczne i asynchroniczne obliczone z widm pokazanych na Rysunku 2a. W pracy przyjęto następującą konwencję: dodatnie piki synchroniczne i asynchroniczne mają kontury cieniowane, natomiast kontury pików ujemnych nie są cieniowane. Widmem odniesienia było widmo średnie, o ile nie stwierdzono inaczej.

Dwuwymiarowe widma synchroniczne zawierają informacje o podobieństwie zmian spektralnych przy różnych liczbach falowych. Są one symetryczne względem głównej przekątnej i zawierają piki zarówno na przekątnej (auto-peaks) jak i poza przekątną (cross-peaks). Piki na przekątnej są zawsze dodatnie, podczas gdy piki poza przekątną mogą być dodatnie lub ujemne (Rysunek 2b). Pojawienie się pików poza przekątną oznacza, że zmiany spektralne dla danej pary liczb falowych (ν_1, ν_2) w pewnym (lub całym) zakresie zaburzeń zachodzą jednocześnie. A zatem, można wnioskować, że zmiany przy ν_1 i ν_2 pochodzą od tego samego fragmentu cząsteczki lub też od różnych fragmentów, które ze sobą oddziałują. Należy jednak nadmienić, że takie jednoczesne zmiany spektralne mogą mieć charakter przypadkowy, co można zweryfikować dopiero na widmie asynchronicznym. Jeżeli pik synchroniczny przy (ν_1, ν_2) ma znak dodatni to zmiany spektralne przy ν_1 i ν_2 zachodzą w tym samym kierunku (jednocześnie rosną lub jednocześnie maleją). Ujemny pik synchroniczny przy (ν_1, ν_2) oznacza, że zmiany spektralne przy ν_1 i ν_2 zachodzą w przeciwnych kierunkach. Na widmie synchronicznym, przedstawionym na Rysunku 2b, piki przy współrzędnych (800, 1100) i (900, 1200) cm^{-1} są dodatnie. Natomiast wszystkie pozostałe piki poza przekątną są ujemne, co zgadza się z kierunkami zmian przedstawionymi na Rysunku 2a. Co ciekawe, przy liczbie falowej 1000 cm^{-1} nie występują żadne piki korelacyjne gdyż pasmo to ma stałą intensywność w całym zakresie zaburzeń. Intensywność pozadiagonalnych pików synchronicznych zależy od dwóch czynników: (a) amplitudy zmian spektralnych przy ν_1 i ν_2 oraz (b) stopnia korelacji tych zmian. Stwarza to możliwość obserwacji niewielkich zmian spektralnych, które widoczne są na widmie synchronicznym dzięki korelacji z pikiem o dużej amplitudzie zmian. Przekątna widma synchronicznego nazywana jest widmem mocy (power spectrum) i zawiera piki autokorelacyjne. Intensywność tych pików zależy wyłącznie od amplitudy zmian spektralnych przy danej liczbie falowej. Widmo mocy może być cennym źródłem informacji o mechanizmach zmian indukowanych przez dane zaburzenie [19], co przedyskutowano w dalszej części pracy.



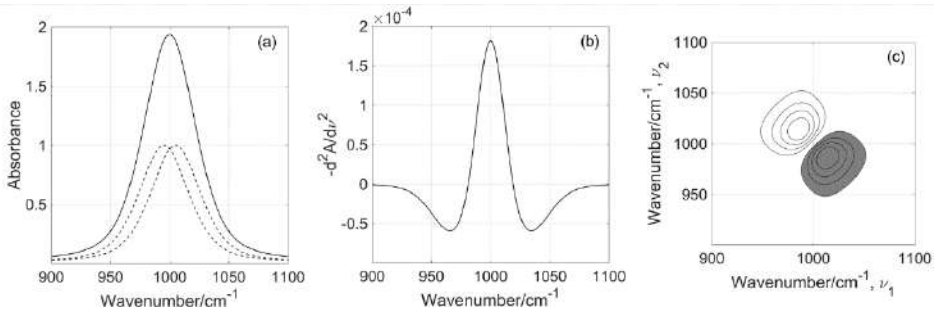
Rysunek 2. Seria symulowanych widm (a) oraz odpowiadające im dwuwymiarowe widmo synchroniczne (b) i asynchroniczne (c)
 Figure 2. Series of simulated spectra (a) and corresponding synchronous (b) and asynchronous (c) spectra

Dwuwymiarowe widma asynchroniczne ujawniają różnice w charakterze zmian spektralnych przy różnych liczbach falowych. Piki asynchroniczne są generowane wówczas, jeżeli zmiany przy (ν_1, ν_2) zachodzą z różnymi prędkościami, są przesunięte w fazie lub opisują je inne funkcje. Widma te są antysymetryczne względem głównej przekątnej i zawierają jedynie piki pozadiagonalne, które mogą być dodatnie lub ujemne. Główna przekątna widma asynchronicznego nie zawiera żadnych pików. Dodatni pik asynchroniczny przy (ν_1, ν_2) wskazuje, że zmiany spektralne przy ν_1 zachodzą szybciej lub wcześniej niż zmiany przy ν_2 . Pik ujemny oznacza sytuację odwrotną. Powyższe reguły obowiązują jeżeli na widmie synchronicznym pik przy (ν_1, ν_2) ma znak dodatni. Jeżeli natomiast na widmie synchronicznym przy (ν_1, ν_2) jest pik ujemny, wówczas reguły dotyczące interpretacji widma asynchronicznego zostają odwrócone. Aby ułatwić interpretację widm asynchronicznych, intensywności na widmach asynchronicznych można pomnożyć (tablicowo) przez znak odpowiadających im intensywności na widmach synchronicznych [20].

$$\Psi'(\nu_i, \nu_j) = \text{sign}(\Phi(\nu_i, \nu_j)) \cdot \Psi(\nu_i, \nu_j) \quad (8)$$

Tym sposobem, interpretując znak pików na zmodyfikowanych widmach asynchronicznych nie musimy uwzględniać znaku odpowiednich pików synchronicznych. Zatem, dodatni pik asynchroniczny przy (ν_1 , ν_2) oznacza, że zmiany spektralne przy ν_1 są szybsze lub wcześniejsze niż zmiany przy ν_2 a pik ujemny oznacza sytuację odwrotną. Piki asynchroniczne są generowane jeżeli dla pewnego zakresu zaburzeń, zmiany przy ν_1 i ν_2 zachodzą w sposób niezależny, czyli z różnymi prędkościami, są przesunięte w fazie lub opisują je różne funkcje. Pojawienie się pików na widmie asynchronicznym sugeruje, że zmiany spektralne przy ν_1 i ν_2 pochodzą od różnych składników badanego układu lub od różnych fragmentów tego samego składnika, które w odmienny sposób reagują na dane zaburzenie. Piki asynchroniczne pojawiają się tylko wówczas, jeżeli zastosowane zaburzenie wywołuje selektywne zmiany spektralne przy różnych liczbach falowych. Jeżeli natomiast zmiany spektralne są nieselektywne, czyli przy wszystkich liczbach falowych mają identyczny charakter i zakres, wówczas na widmach asynchronicznych nie pojawiają się żadne piki. Należy dodać, że zmiany liniowe również nie generują pików asynchronicznych, nawet jeżeli zachodzą z różnymi prędkościami. Zatem dwuwymiarowa analiza korelacyjna jest doskonałym narzędziem do badania nawet niewielkich odchyień zmian spektralnych od liniowości. Z drugiej strony, korelacja zmian liniowych i nieliniowych prowadzi do powstania pików asynchronicznych [21]. Na Rysunku 2c piki asynchroniczne pojawiają się jedynie pomiędzy pasmami przy współrzędnych 800 i 1100 cm^{-1} a pasmami przy 900 i 1200 cm^{-1} . Zatem można wnioskować, że zmiany przy tych współrzędnych mają inny charakter i/lub zachodzą z różnymi prędkościami. Podobnie jak na widmie synchronicznym, również na widmie asynchronicznym nie występują żadne piki przy liczbie falowej 1000 cm^{-1} .

Istnieje szereg doniesień literaturowych, że nawet niewielkie różnice w charakterze zmian spektralnych przy ν_1 i ν_2 mogą generować niezależne piki na widmie asynchronicznym [5, 9-11, 22, 23]. Jest to najważniejsza cecha widm korelacyjnych i prowadzi ona do podwyższenia spektralnej rozdzielczości (resolution enhancement). Bez względu na to jak bardzo nakładają się pasma pochodzące od różnych oscylatorów molekularnych, jeżeli tylko odpowiednie zmiany spektralne posiadają odmienny charakter, wówczas zostaną one rozdzielone na widmie asynchronicznym jako osobne indywidua. Zatem efekt podwyższenia rozdzielczości spektralnej na widmach asynchronicznych ma przyczynę fizyczną a nie stanowi jedynie numerycznej manipulacji na danych, jak ma to miejsce np. w widmach drugiej pochodnej. Efekt podwyższenia spektralnej rozdzielczości zilustrowano na Rysunku 3. Pasma przy 995 i 1005 cm^{-1} tak bardzo nakładają się na siebie, że tworzą jedną obwiednię spektralną (Rysunek 3a), której nie udało się rozdzielić na widmie drugiej pochodnej (Rysunek 3b). Ponieważ tempo zmian spektralnych dla obu tych pasm było nieco różne, zostały one rozdzielone na widmie asynchronicznym (Rysunek 3c).



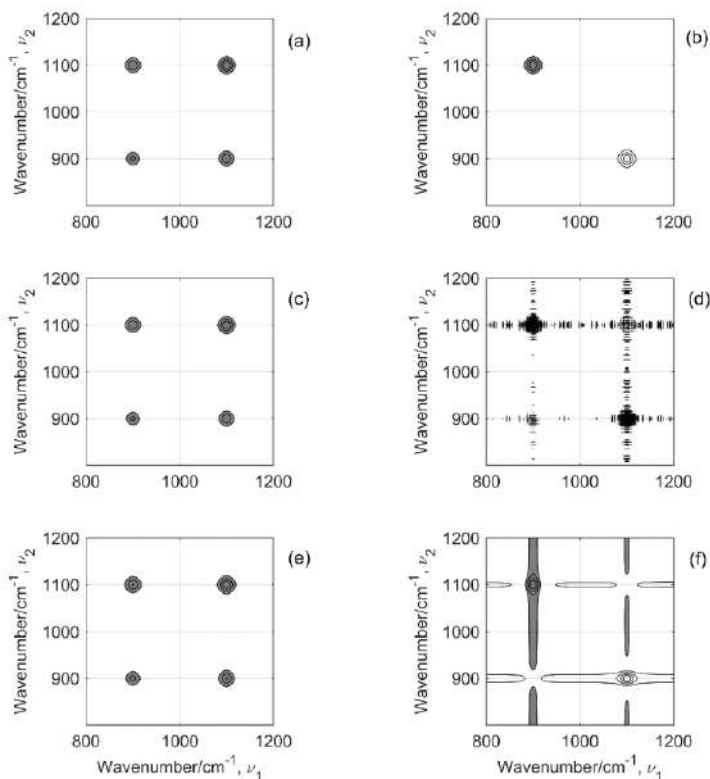
Rysunek 3. Obwiednia spektralna (linia ciągła) składająca się z dwóch pasm przy 995 i 1005 cm^{-1} (linia przerywana) (a), druga pochodna (pomnożona przez -1) widma z Rysunku 3a (b) oraz odpowiednie widmo asynchroniczne (c)

Figure 3. Spectral envelope (solid line) with two component bands at 995 and 1005 cm^{-1} (dashed line) (a), second derivative (multiplied by -1) of the spectrum shown in Figure 3a (b) and the corresponding asynchronous spectrum (c)

3. PROBLEMY Z INTERPRETACJĄ DWUWYMIAROWYCH WIDM KORELACYJNYCH

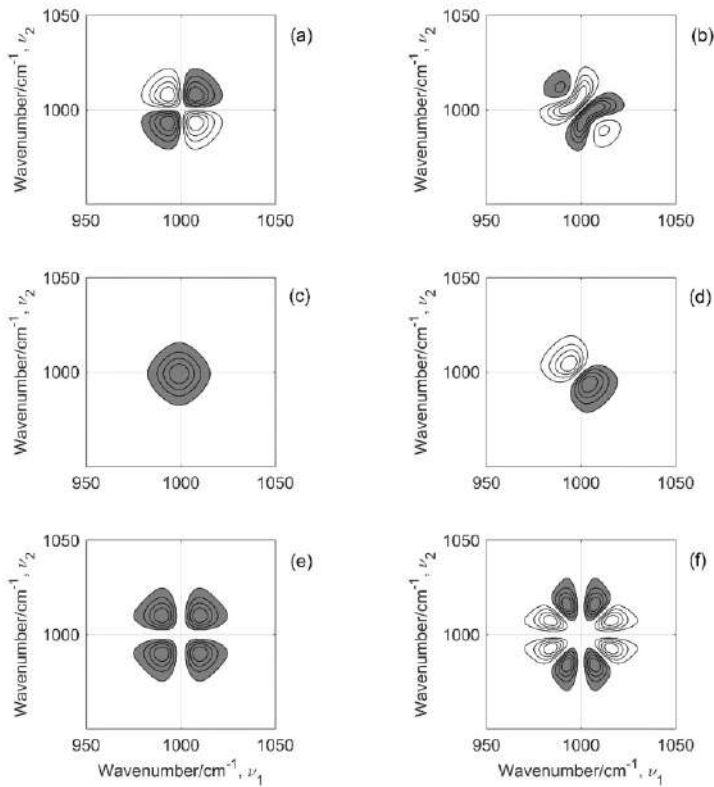
Pomimo, że dwuwymiarowe widma korelacyjne można stosunkowo łatwo obliczyć, jednak ich interpretacja może stanowić spore wyzwanie. Jak pokazały komputerowe symulacje, czasami różne przyczyny fizyczne mogą generować podobne (lub identyczne) wzory pików na widmach korelacyjnych [10, 11, 22-24]. Ponadto, interpretację widm korelacyjnych znacznie utrudniają takie zaburzenia i niepożądane efekty jak szum, fluktuacje linii podstawowej, zmiana położenia czy szerokości połówkowej pasma. Na Rysunku 4 zilustrowano wpływ szumu i fluktuacji linii podstawowej na widma synchroniczne i asynchroniczne. Jak łatwo zauważyć, wpływ szumu przejawia się bardzo nieregularnymi kształtami konturów (Rysunek 4d), natomiast fluktuacje linii podstawowej powodują powstawanie wydłużonych obwiedni wokół pików (Rysunek 4f). Szczególnie wrażliwe na wszelkiego rodzaju zaburzenia są widma asynchroniczne. Z jednej strony tak duża zależność wyglądu widma od niewielkich nawet fluktuacji w danych wejściowych może stanowić spore utrudnienie. Jednak z drugiej strony ta cecha widm asynchronicznych umożliwia obserwację nawet niewielkich różnic w charakterze zmian spektralnych przy różnych liczbach faliowych, co pozwala zaobserwować znacznie nakładające się pasma jako osobne indywidua. Z kolei zmiana położenia (Rysunki 5a-5d) lub szerokości pasma (Rysunki 5e, 5f) prowadzi do powstania szeregu pików, zwłaszcza na widmach asynchronicznych. Rysunki 5a i 5b przedstawiają widma synchroniczne i asynchroniczne otrzymane z widm, które zawierają pojedyncze pasmo zmieniające swoje położenie od 1000 cm^{-1} do 1001 cm^{-1} bez zmiany intensywności. Na widmie synchronicznym i asynchronicznym obserwujemy charakterystyczne wzory zwane koniczyną (clover-leaf pattern) i motylem (butterfly pattern) [10, 11, 22-24]. Jeżeli zmianie położenia towarzyszy zmiana intensywności, wówczas widma synchroniczne i asynchroniczne mogą ulec uproszczeniu. Końcowy efekt zależy od wielkości zmian wszystkich parametrów pasma. Jak pokazuje Rysunek 5c, na widmie synchronicznym efekt zmiany położenia został całkowicie wyeliminowany wskutek znacznej zmiany intensywności, natomiast widmo asynchroniczne (Rysunek 5d)

wciąż zawiera dwa piki, podczas gdy widmo oryginalne zawierało tylko jedno pasmo. Co więcej, wzór pików na tym widmie jest bardzo podobny do tego jaki generują dwa pasma zmieniające swoją intensywność z różnymi prędkościami (Rysunek 3c). Zatem jak już wcześniej wspomniano, dwie różne przyczyny fizyczne mogą generować podobny układ pików na widmie korelacyjnym [10, 11, 22-24].



Rysunek 4. Widmo synchroniczne (a) i asynchroniczne (b) otrzymane z serii niezaburzonych widm zawierających pasma przy 900 i 1100 cm^{-1} , które zmieniają intensywność z różnymi prędkościami. Widmo synchroniczne (c) i asynchroniczne (d) otrzymane z danych z dodanym przypadkowym szumem. Widmo synchroniczne (e) i asynchroniczne (f) otrzymane z danymi z dodatkowymi fluktuacjami linii podstawowej

Figure 4. Synchronous (a) and asynchronous (b) spectra constructed from unperturbed spectra with peaks at 900 and 1100 cm^{-1} changing intensity at different rate. Synchronous (c) and asynchronous (d) spectrum obtained from noisy data. Synchronous (e) and asynchronous (f) spectrum obtained from data with baseline fluctuations



Rysunek 5. Widma synchroniczne (a) i asynchroniczne (b) otrzymane z widm zawierających pasmo zmieniające swoje położenie od 1000 cm^{-1} do 1001 cm^{-1} bez zmiany intensywności. Widma synchroniczne (c) i asynchroniczne (d) otrzymane z widm zawierających pasmo zmieniające swoje położenie od 1000 cm^{-1} do 1001 cm^{-1} oraz intensywność z 1 na 0.5. Widma synchroniczne (e) i asynchroniczne (f) otrzymane z widm zawierających pasmo przy 1000 cm^{-1} zmieniające swoją szerokość połówkową z 20 na 15 cm^{-1} .

Figure 5. Synchronous (a) and asynchronous (b) spectra constructed from spectra with a band changing its position from 1000 to 1001 cm^{-1} without intensity changes. Synchronous (c) and asynchronous (d) spectra constructed from spectra with a band changing its position from 1000 to 1001 cm^{-1} and intensity from 1 to 0.5. Synchronous (e) and asynchronous (f) spectra constructed from spectra with a band at 1000 cm^{-1} reducing its half-width from 20 to 15 cm^{-1} .

Aby rozstrzygnąć jakie jest prawdziwe źródło pochodzenia obserwowanych pików korelacyjnych, pomocne mogą okazać się komputerowe symulacje lub też dokładna analiza widm eksperymentalnych. Należy również wspomnieć, że położenia pików asynchronicznych mogą znacznie odbiegać od prawdziwych położenia pasm [22, 23]. Różnica położenia jest tym większa, im bliżej siebie znajdują się pasma na widmie oryginalnym i im mają większe szerokości połówkowe. Położenia pików synchronicznych są znacznie mniej zaburzone niż położenia pików asynchronicznych. Warto jednak pamiętać, że nie zawsze największe zmiany spektralne mają miejsce

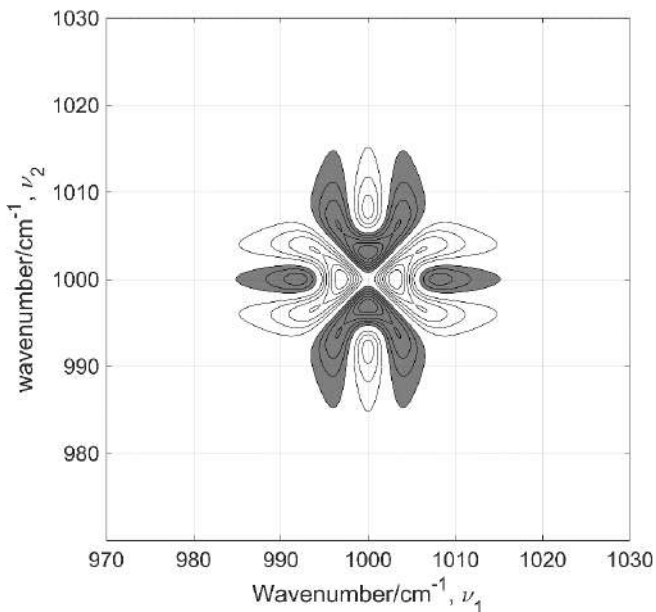
w maksimum pasma oryginalnego, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z obwiednią spektralną składającą się z kilku nakładających się pasm.

Inny poważny problem związany z interpretacją dwuwymiarowych widm korelacyjnych stanowi poprawne określenie kolejności (sekwencji) zmian spektralnych [10, 25-27]. Bezkrytyczne stosowanie reguł interpretacji widm korelacyjnych w wielu przypadkach może prowadzić do błędnych wniosków. Reguły te zostały pierwotnie wyprowadzone dla periodycznych zmian zaburzenia i określały relację pomiędzy częstością zaburzenia i częstością zmian spektralnych przy poszczególnych liczbach falowych [1-3]. Jednak w przypadku stosowania ogólnego algorytmu [5], sprawa nie jest już tak prosta, gdyż częstość zaburzeń nieperiodycznych pozostaje nieokreślona. Zatem możemy porównywać jedynie ewolucję względnych zmian intensywności różnych sygnałów w funkcji zaburzenia. Otrzymana informacja nie budzi wątpliwości, jeżeli wszystkie zmiany spektralne opisuje taka sama funkcja a asynchroniczność wynika jedynie z przesunięcia w fazie zmian przy różnych liczbach falowych. W takim przypadku analiza korelacyjna dostarcza wiarygodną sekwencję zmian spektralnych. Jednak dla większości danych eksperymentalnych obserwujemy zmiany spektralne przy wszystkich liczbach falowych, począwszy od samego początku pomiarów. Aby otrzymać informacje o przesunięciu w fazie konieczne byłoby wykonanie pomiarów czasowo-rozdzielczych w skali czasowej nieosiągalnej na zwykłych spektrometrach. Ewentualne przesunięcie w fazie zmian spektralnych jest zazwyczaj na tyle małe, że z pomiarów otrzymujemy jedynie informację o względnej prędkości zmian przy różnych liczbach falowych. Zatem widma korelacyjne dostarczają informację typu "szybciej-wolniej" a nie "wcześniej-później". Należy jednak podkreślić, że wyznaczona sekwencja szybkości zmian jest wiarygodna tylko wówczas, gdy zmiany te opisuje identyczna funkcja. Jeżeli natomiast zmiany spektralne przy różnych liczbach falowych opisują różne funkcje, wówczas wyznaczona sekwencja zmian traci sens fizyczny.

4. PRZYGOTOWANIE DANYCH DO DWUWYMIAROWEJ ANALIZY KORELACYJNEJ

Rzadko się zdarza aby dwuwymiarową analizę korelacyjną można było wykonać na oryginalnych, niepoprawionych widmach. Każde dane spektralne zawierają mniejszy lub większy poziom szumu oraz fluktuacje linii podstawowej. Ponadto, niektóre zaburzenia, takie jak temperatura, mogą generować zmianę położenia i/lub szerokości pasm. Część z tych niepożądanych efektów można wyeliminować lub ograniczyć w trakcie pomiarów lub też za pomocą odpowiednich metod numerycznych. Np. redukcję szumu można osiągnąć poprzez zwiększenie liczby akumulacji widm. Jednak metoda ta powoduje wydłużenie czasu pomiaru i nie zawsze można ją zastosować (np. w czasie pomiarów widm indywiduów krótko-żyjących). Istnieje szereg metod numerycznych, które pozwalają na tzw. 'wygładzenie widm' czyli redukcję szumu. Najczęściej stosowaną techniką wygładzania widm jest metoda Savitzkiego-Golaya, która polega na aproksymacji kolejnych fragmentów widma za pomocą wielomianu niskiego stopnia [28]. Czasami stosowane są bardziej zaawansowane metody eliminacji szumu jak np. wygładzanie fourierowskie czy chemometryczne (za pomocą PCA). Sposób eliminacji fluktuacji linii podstawowej zależy od amplitudy i charakteru tych zaburzeń. W wielu

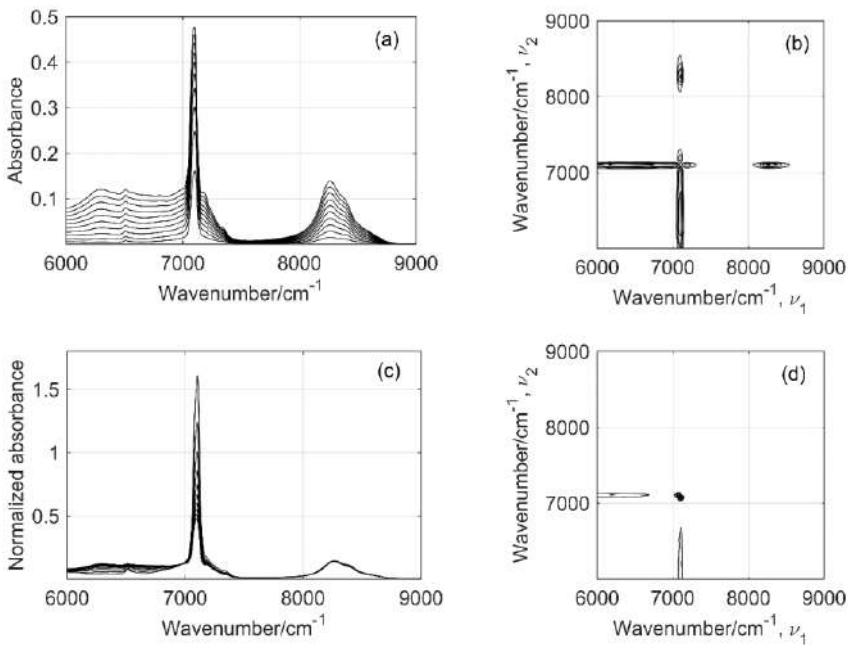
przypadkach nawet prosty offset znacznie poprawia jakość widm synchronicznych i asynchronicznych. Offset polega na sprowadzeniu absorbancji wszystkich widm do wartości zero w punkcie odniesienia, który wybieramy w rejonie wolnym od pasm. Kiedy zaburzenia linii podstawowej mają złożony charakter, wówczas można zastosować bardziej zaawansowane metody korekcji jak np. MSC (multiplicative scatter/signal correction) [29]. Jeżeli zawiodą wszelkie znane metody korekcji linii podstawowej, wówczas do dwuwymiarowej analizy korelacyjnej można zastosować widma drugich pochodnych [11]. Druga pochodna skutecznie eliminuje fluktuacje linii podstawowej, jednak na widmach korelacyjnych mogą pojawić się dodatkowe piki (side lobes), które są artefaktami związanymi z charakterem widm drugiej pochodnej. Inne niepożądane efekty, jak zmiana położenia lub szerokości pasma mogą być specyficznym skutkiem działania danego zaburzenia na badany układ i nie można ich wyeliminować z widm korelacyjnych. Oba te efekty często występują jednocześnie dając złożony wzór pików korelacyjnych, co znakomicie ilustruje Rysunek 6. Źródłem wszystkich zmian spektralnych widocznych na tym rysunku są dwa pasma, które zmieniają swoje położenia od 995 do 999 cm^{-1} i od 1005 do 1001 cm^{-1} oraz szerokości połówkowe z 10 na 5 cm^{-1} . Bezpośrednia interpretacja takich widm jest trudna i może prowadzić do błędnych wniosków. Bardzo pomocnym narzędziem do poprawnej interpretacji złożonych widm korelacyjnych są komputerowe symulacje. Porównanie syntetycznych widm korelacyjnych z widmami otrzymanymi z danych eksperymentalnych pozwala na ustalenie rzeczywistej przyczyny obserwowanych zmian spektralnych [10, 11, 22-24].



Rysunek 6. Dwuwymiarowe widmo asynchroniczne otrzymane z widma symulowanego, w którym dwa pasma zmieniają swoje położenie i szerokość połówkową (szczegóły w tekście)

Figure 6. Two-dimensional correlation asynchronous spectrum obtained from the simulated spectrum consisting of two bands changing position and half-width (details in the text)

Kolejny problem utrudniający interpretację dwuwymiarowych widm korelacyjnych wynika z faktu, że stosowane zaburzenie, oprócz badanego efektu, jednocześnie może wywoływać szereg efektów niepożądanych (side effects). Np. zmiana temperatury wpływa nie tylko na wszelkiego rodzaju równowagi kwasowo-zasadowe, asocjacyjne, konformacyjne, itp. ale powoduje również zmianę gęstości a co za tym idzie, generuje nieselektywne zmiany intensywności [21]. Wzrost temperatury o 50 °C dla typowej cieczy powoduje zmianę gęstości o ok. 3-5%, co jest wyraźnie zauważalne na widmach asynchronicznych w postaci dodatkowych pików. Jeszcze większe efekty występują, kiedy zaburzeniem jest zmiana stężenia badanej substancji. W takim przypadku nieselektywne zmiany spektralne wywołane zmianą stężenia mogą być porównywalne lub znacznie większe niż odpowiednie zmiany selektywne, które stanowią przedmiot badań. Dwuwymiarowe widma korelacyjne, a zwłaszcza widma asynchroniczne, otrzymane z takich danych mają bardzo ograniczoną przydatność gdyż zawierają informację o wszystkich efektach jednocześnie [11, 21]. Aby wyeliminować niepożądane efekty z widm korelacyjnych należy znormalizować widma eksperymentalne. Najlepszą metodą normalizacji jest wykorzystanie znanej relacji pomiędzy zaburzeniem a niepożądanym efektem (np. zmiana gęstości w funkcji temperatury) [21]. Jeżeli taka zależność nie jest znana, wówczas do normalizacji można wykorzystać tzw. wzorec wewnętrzny, czyli intensywność pasma, którego zmiany spektralne mają jedynie charakter nieselektywny. Jak pokazano na Rysunku 7, w zakresie NIR znakomitym wzorcem do normalizacji może być drugi nadton drgania rozciągającego C-H zlokalizowany w zakresie 8200-8400 cm^{-1} [21]. Intensywność integralna tego pasma wykazuje bardzo wysoki stopień korelacji ($R=0.9999$) ze zmianą gęstości. Jak można zauważyć, normalizacja spowodowała znaczne uproszczenie widm korelacyjnych, gdyż zostały wyeliminowane nieselektywne zmiany gęstości (np. pasma powyżej 8000 cm^{-1}). Dzięki temu badane efekty stały się lepiej widoczne i ujawniły swój rzeczywisty charakter.



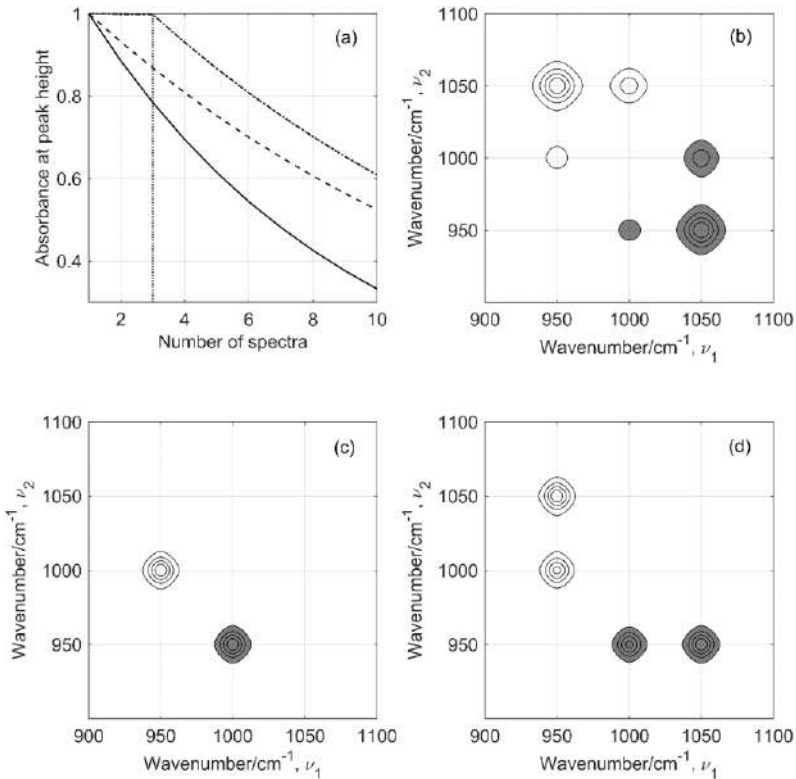
Rysunek 7. Widma NIR 1-oktanolu w zakresie stężeń [0.1:0.1:1]. M przed normalizacją (a) i po normalizacji (c) oraz odpowiednie widma asynchroniczne (b/d)

Figure 7. NIR spectra of 1-octanol in the concentration range of [0.1:0.1:1]. M before normalization (a), after normalization (c) and the corresponding asynchronous spectra (b/d)

5. OTRZYMYWANIE INFORMACJI O DYNAMICE ZMIAN SPEKTRALNYCH Z DWUWYMIAROWYCH WIDM KORELACYJNYCH

Jeżeli do analizy korelacyjnej użyjemy całą serię widm, wówczas otrzymane wyniki będą zawierały sumaryczną informację o wszystkich procesach zachodzących w badanym układzie, bez względu na dynamiczny zakres ich występowania. Kiedy badany proces ma złożoną dynamikę, wówczas interpretacja takich widm może dostarczyć niejednoznaczne wyniki. Aby rozwiązać ten problem, należy wykonać analizę korelacyjną na mniejszych porcjach danych, dzieląc cały zakres zaburzeń na mniejsze zakresy (okna). Tym sposobem otrzymamy informację jedynie o zmianach zachodzących w danym przedziale zaburzeń. Następnie, porównując informacje otrzymane z różnych zakresów zaburzenia możemy prześledzić dynamikę zmian przy poszczególnych liczbach falowych. Powyższą ideę zilustrowano na Rysunku 8 w oparciu o widma syntetyczne, z których każde zawierało trzy pasma. Pasma przy 950 cm⁻¹ zmienia swoją intensywność z inną prędkością niż dwa pozostałe pasma, natomiast pasma przy 1050 i 1150 cm⁻¹ mają identyczną prędkość zmian ale zmiany te są przesunięte w fazie (Rysunek 8a). Jak łatwo można zauważyć, wzór pików na widmie asynchronicznym zależy od tego, jaki zakres zmian (ile widm) zostanie użyty do obliczeń. Zgodnie z oczekiwaniami, największa liczba pików znajduje się na widmie asynchronicznym obliczonym z całej serii widm (Rysunek 8b). Natomiast Rysunki 8c

i 8d, które wygenerowano dla ograniczonych zakresów zaburzenia (1-3 i 3-10) zawierają już informację bardziej selektywną. Oczywiście, metoda ta będzie efektywna wówczas, jeżeli dysponujemy odpowiednio dużą liczbą widm a badane zmiany spektralne nie są monotoniczne w całym zakresie zaburzeń. Analiza Rysunku 8 pokazuje jeszcze jeden istotny problem. Niezależnie od faktu, czy dwa pasma zmieniają swoje intensywności z różnymi prędkościami, czy też zmiany te zachodzą z tymi samymi prędkościami ale są przesunięte w fazie, na widmie asynchronicznym jest generowany pik. Analizując całą serię danych nie można rozróżnić tych dwóch odmiennych sytuacji, tzn. czy pasma zmieniają swoje intensywności z różnymi prędkościami czy też zmiany są jedynie przesunięte w fazie. W takim przypadku podział całej serii widm na mniejsze podzakresy pozwala na jednoznaczne ustalenie źródła pochodzenia pików asynchronicznych. Widmo asynchroniczne otrzymane z całej serii danych (Rysunek 8b) zawiera pik przy współrzędnych 1000 i 1050 cm^{-1} . Z kolei na widmie otrzymanym z zakresu 3-10 (Rysunek 8d) pik ten nie występuje, co sugeruje identyczne tempo zmian spektralnych w danym przedziale. Jeżeli do analizy użyjemy tylko widma z początkowego zakresu (1-3), wówczas przy liczbie falowej 1050 cm^{-1} nie występują żadne piki, co świadczy o braku zmian spektralnych w tym zakresie (Rysunek 8c). Zatem na podstawie powyższej analizy możemy jednoznacznie stwierdzić, że zmiany spektralne przy 1000 i 1050 cm^{-1} zachodzą z tą samą prędkością ale są przesunięte w fazie (zmiany przy 1050 cm^{-1} zaczynają się z opóźnieniem), natomiast zmiany spektralne przy 950 cm^{-1} przebiegają z inną prędkością (zachodzą szybciej) niż zmiany dla pozostałych pasm.



Rysunek 8. Zmiany intensywności w maksimum dla trzech pasm: 950 cm^{-1} (linia ciągła), 1000 cm^{-1} (linia przerywana) i 1050 cm^{-1} (linia kreska-kropka) (a) oraz widma asynchroniczne obliczone z widm 1-10 (b), 1-3 (c) oraz 3-10 (d)

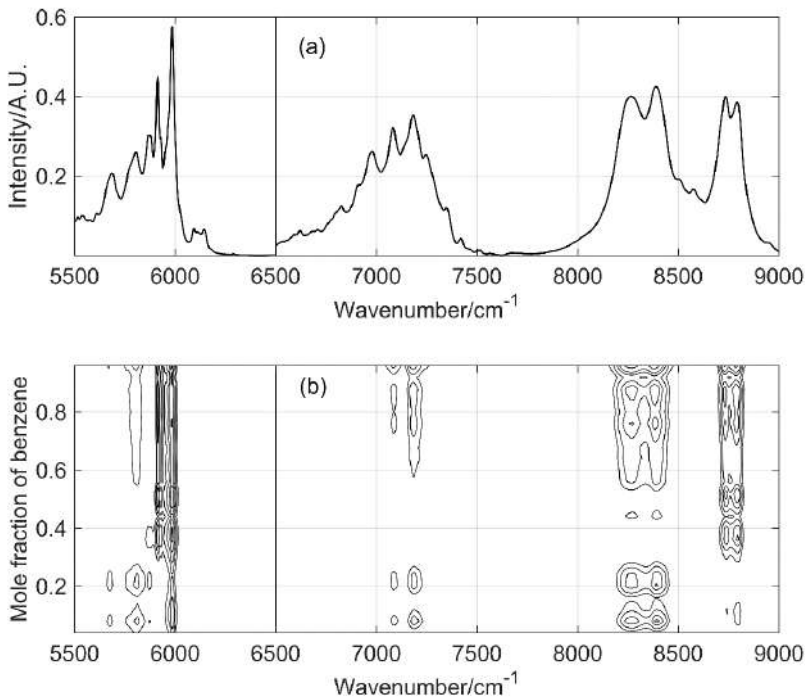
Figure 8. Peak height variations for three bands: 950 cm^{-1} (solid line), 1000 cm^{-1} (dashed line) and 1050 cm^{-1} (dash-dot line) (a) and the asynchronous spectra constructed from spectra 1-10 (b), 1-3 (c) and 3-10 (d)

6. METODA RUCHOMEGO OKNA (MOVING WINDOW ANALYSIS)

Metoda ruchomego okna jest innym, bardzo użytecznym narzędziem do badania dynamiki zmian spektralnych. Po raz pierwszy została zastosowana przez Thomasa i Richardsona do analizy przejść fazowych w ciekłym kryształach 4'-n-octylo-4-cyjanobifenylu (8CB) [7]. Metoda ta polega na sukcesywnym obliczaniu widm mocy na mniejszych podzbiórach danych, które nazywamy oknami. Długość okna jest stała i powinna być liczbą nieparzystą, ponieważ obliczone widmo mocy przypisujemy środkowej wartości zaburzenia w danym przedziale. Obliczenia rozpoczynamy od okna zawierającego pierwsze widmo w serii danych. Następnie przesuwamy okno o jedno widmo w kierunku końca serii danych i obliczamy kolejne widmo mocy. Obliczenia kontynuujemy do momentu, kiedy bieżące okno będzie zawierało ostatnie widmo w serii.

Wynikiem tej analizy jest macierz widm mocy uporządkowanych względem zaburzenia. Wykres konturowy tej macierzy pozwala na bezpośrednie porównanie na jednym dwuwymiarowym widmie dynamiki zmian przy różnych liczbach falowych. Im mniejszy jest rozmiar okna (mniejsza liczba widm), tym większa rozdzielczość otrzymanego widma, dlatego też najczęściej stosujemy okno zawierające 3 widma. Na Rysunku 9 pokazano wyniki otrzymane metodą ruchomego okna dla binarnej mieszaniny n-heksanu z benzenem w całym zakresie ułamków molowych [30]. W tym przypadku zaburzeniem był skład mieszaniny. Jak można zauważyć, zmiany spektralne dla obu składników mieszaniny mają odmienny charakter i występują w innych zakresach ułamków molowych, dzięki czemu łatwo można ustalić źródło pochodzenia poszczególnych pasm i ich ewolucję w funkcji zaburzenia. Szczegółowa analiza tych wyników znajduje się we wcześniejszej pracy [30].

W 2006 roku Morita zaproponował rozszerzoną modyfikację tej metody (PCMW2D -perturbation-correlation moving-window two-dimensional), która polegała na bezpośredniej korelacji zmian spektralnych ze zmianami wartości zaburzenia [8]. Tym sposobem można otrzymać odpowiednik zarówno widma synchronicznego jak i asynchronicznego, co umożliwia badanie mechanizmu skomplikowanych zmian spektralnych w funkcji zaburzenia. Jednak obliczanie i interpretacja tych widm nie jest tak prosta i bezpośrednia jak w przypadku klasycznej metody ruchomego okna.



Rysunek 9. Widmo NIR mieszaniny n-heksan/benzen uśrednione po składzie (a) i wyniki otrzymane metodą ruchomego okna (b). Intensywności w zakresie 6500–9000 cm^{-1} zostały powiększone (100x) aby pojawiły się w tej skali. Wszystkie piki są dodatnie

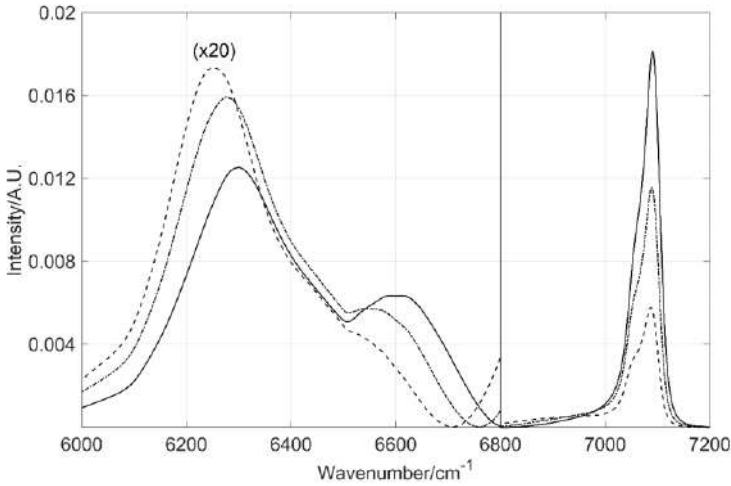
Figure 9. A composition-average NIR spectrum of n-hexane/benzene mixture (a) and results of moving window analysis (b). Intensities in the 6500–9000 cm^{-1} range were enlarged (100x) to appear in this scale. All peaks are positive

7. WIDMA MOCY (POWER SPECTRA)

Główna przekątna widma synchronicznego, tzw. widmo mocy, reprezentuje zakres zmian spektralnych przy poszczególnych liczbach falowych, względem widma odniesienia. Innymi słowy, widma mocy pokazują czułość poszczególnych fragmentów cząsteczki lub różnych składników mieszaniny na dane zaburzenie. Pomimo, że mogą one stanowić cenne źródło informacji o badanym układzie, w praktyce nie są wykorzystywane zbyt często [19]. Częściowo może to być spowodowane brakiem odpowiedniego oprogramowania, które umożliwiłoby niestandardową analizę korelacyjną a częściowo nieznanymi potencjalnymi możliwościami jakie posiadają widma mocy. Widma te można wykorzystać na wiele sposobów. Jeden ze sposobów polega na podziale całego zakresu zaburzenia na mniejsze przedziały, co pozwala na otrzymanie informacji o wpływie różnych wartości zaburzenia na zakres zmian spektralnych w danym przedziale zaburzeń. Powyższe informacje można powiązać ze zmianami populacji poszczególnych indywidualów obecnych w badanym układzie, zmianami strukturalnymi lub też ze zmianami w oddziaływaniach między- lub wewnątrzcząsteczkowych. Ten sposób wykorzystania widm mocy został zilustrowany na Rysunku

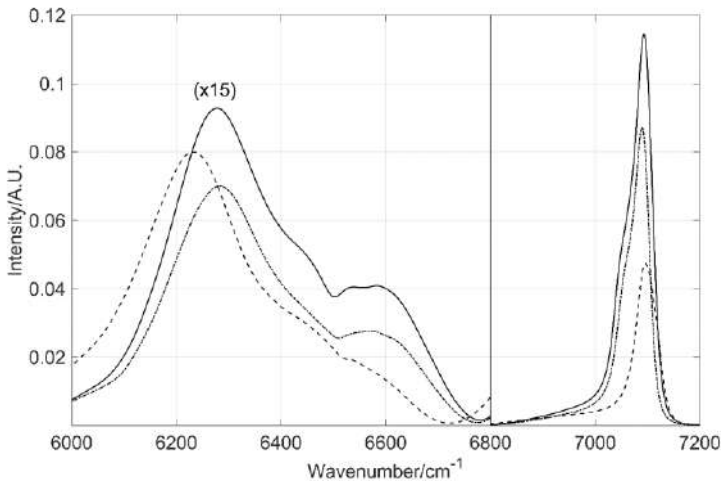
10 [19]. Widma mocy ciekłego 2-oktanolu zostały obliczone dla trzech przedziałów temperatury: 20-40, 40-60 i 60-80 °C. Wraz ze wzrostem temperatury obserwujemy wzrost intensywności pasma wysoko częstotściowego, które odpowiada drganiom rozciągającym pierwszego nadtonu wolnej grupy OH. Jednocześnie, maleje intensywność nisko częstotściowych pasm, które są przypisane do grupy OH zaangażowanej w wiązanie wodorowe. Widać również, że położenie pasma wolnej grupy OH nie zmienia się, natomiast pasmo związanej grupy OH przesuwają się w kierunku wyższych liczb falowych wraz ze wzrostem temperatury. Więcej informacji na ten temat można znaleźć w pracach [19, 31]. Ten sposób analizy różni się od metody ruchomego okna, również opartej na widmach mocy, gdzie końcowym rezultatem analizy jest dwuwymiarowy wykres ukazujący zmiany spektralne przy poszczególnych liczbach falowych w funkcji zaburzenia. Natomiast omawiana metoda umożliwi bezpośrednie porównanie na jednym wykresie zmian spektralnych dla kilku dokładnie określonych przedziałów zaburzenia.

Inny sposób wykorzystania widm mocy polega na analizie serii widm różnych próbek dla tych samych wartości zaburzenia. Otrzymane w ten sposób widma mocy pozwalają na porównanie czułości różnych próbek oraz ich poszczególnych fragmentów na identyczne zaburzenie. Rysunek 11 przedstawia widma mocy dla trzech alkoholi oktylowych (1-oktanol, 2-oktanol i 3-oktanol) zmierzonych w tym samym zakresie temperatur (20-80 °C). Analiza intensywności oraz położenia pików na widmach mocy dostarcza wielu cennych informacji o procesach asocjacji mających miejsce w tych alkoholach. Wzrost temperatury powoduje największe zmiany intensywności dla pasma wolnej grupy OH w drugorzędowym 3-oktanolu a najmniejsze w pierwszorzędowym 1-oktanolu. Widać również systematyczne zmiany położenia zasocjowanej (ok. 6250 cm^{-1}) i wolnej (ok. 7100 cm^{-1}) grupy OH przy przejściu od 1-oktanolu do 3-oktanolu. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że termiczny rozpad asocjacji alkoholi oktylowych jest procesem złożonym i jego przebieg zależy od molekularnej struktury alkoholi. Szczegółowa analiza tych wyników znajduje się we wcześniejszych pracach [19, 31].



Rysunek 10. Widma mocy otrzymane z widm NIR 2-oktanolu zarejestrowanych w przedziale temperatur 20-40 °C (linia przerywana), 40-60 °C (linia kreska-kropka) i 60-80 °C (linia ciągła). Widma w zakresie 6000-6800 cm^{-1} zostały powiększone 20-krotnie aby były dobrze widoczne w tej skali

Figure 10. Power spectra determined from temperature-dependent NIR spectra of 2-octanol in 20-40 °C (dashed line), 40-60 °C (dash-dot line), and 60-80 °C (solid line) range. The spectra from 6000 to 6800 cm^{-1} were enlarged 20 times to properly appear in this scale



Rysunek 11. Widma mocy otrzymane z widm NIR 1-oktanolu (linia przerywana), 2-oktanolu (linia kreska-kropka) oraz 3-oktanolu (linia ciągła) zarejestrowanych w przedziale temperatur 20-80 °C. Widma w zakresie 6000-6800 cm^{-1} zostały powiększone 15-krotnie aby były dobrze widoczne w tej skali

Figure 11. Power spectra determined from NIR spectra of 1-octanol (dashed line), 2-octanol (dash-dot line), and 3-octanol (solid line) recorded from 20 to 80 °C. The spectra from 6000 to 6800 cm^{-1} were enlarged 15 times to properly appear in this scale

UWAGI KOŃCOWE

W ciągu niespełna trzydziestu lat dwuwymiarowa analiza korelacyjna stała się jednym z rutynowych narzędzi do analizy i interpretacji danych spektroskopowych. Jednak metoda ta jest na tyle uniwersalna, że można ją stosować do dowolnego typu danych, nie tylko widm oscylacyjnych. Pierwszy algorytm otrzymywania dwuwymiarowych widm korelacyjnych wymagał stosowania periodycznych zaburzeń o niewielkiej amplitudzie i użycia transformaty Fouriera do obliczeń. Obecnie, uogólniony algorytm w połączeniu z wykorzystaniem macierzy Hilberta-Nody pozwala na bardzo łatwe obliczanie widm synchronicznych (iloczyn dwóch macierzy) i asynchronicznych (iloczyn trzech macierzy). Jednocześnie, algorytm ten umożliwia zastosowanie tak ważnych nieperiodycznych zaburzeń jak temperatura, ciśnienie, pH czy skład próbki. O ile otrzymywanie dwuwymiarowych widm korelacyjnych jest stosunkowo proste, to interpretacja tych widm może stanowić poważne wyzwanie. W szczególności bardzo ostrożnie należy podchodzić do wyznaczonej sekwencji zmian oraz nadmiernej liczby pików, zwłaszcza na widmie asynchronicznym. W razie wątpliwości, najlepszym sposobem weryfikacji wyników eksperymentalnych pozostają komputerowe symulacje. Aby otrzymać jak najlepsze i najbardziej wiarygodne wyniki, należy odpowiednio zaplanować eksperyment oraz przygotować dane eksperymentalne do analizy. Często niezbędna może okazać się normalizacja widm, która całkowicie lub częściowo eliminuje wpływ niepożądanych efektów na widmo korelacyjne.

Pomimo tych trudności, w literaturze można znaleźć wiele interesujących zastosowań dwuwymiarowej analizy korelacyjnej do badania różnorodnych układów, poczynając od prostych cząsteczek a kończąc na złożonych układach biologicznych. Niewątpliwym atutem tej metody jest podwyższenie spektralnej rozdzielczości i możliwość obserwowania selektywnych korelacji pomiędzy różnymi pikami. Dodatkową zaletą dwuwymiarowej analizy korelacyjnej jest możliwość korelowania danych z całkowicie odmiennych typów eksperymentów, tzw. hetero-korelacja. Analiza hetero-korelacyjna może dostarczyć nowych jakościowo informacji, niedostępnych z homo-korelacji każdej z serii danych z osobna. Dużo interesujących informacji mogą dostarczyć również widma mocy a zwłaszcza oparta o widma mocy, metoda ruchomego okna. Aby zwiększyć zasób i wiarygodność informacji pozyskiwanej z dwuwymiarowych widm korelacyjnych, opracowywane są nowe warianty tej metody. Między innymi, pojawiają się próby połączenia dwuwymiarowej analizy korelacyjnej z metodami chemometrycznymi [32]. Jednak nawet zastosowanie uogólnionego algorytmu zaproponowanego przez Nodę w 1993 roku, może dostarczyć wiele cennych informacji o strukturze, oddziaływaniach, przemianach fazowych czy procesach równowagowych w badanym układzie. Co ważne, niejednokrotnie otrzymanie tych informacji nie wymaga użycia specjalistycznej aparatury, dużego nakładu pracy i środków, natomiast potencjalne korzyści wynikające z zastosowania dwuwymiarowej analizy korelacyjnej z pewnością będą znacznie większe niż wysiłek włożony w opanowanie tej metody.

PODZIĘKOWANIE

Praca ta jest dedykowana prof. dr hab. Jerzemu Hawrankowi z okazji osiemdziesiątych urodzin.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] I. Noda, *Bull. Am. Phys. Soc.*, 1986, **31**, 520.
- [2] I. Noda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8116.
- [3] I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**, 550.
- [4] V. G. Gregoriou, J. L. Chao, H. Toriumi, R. A. Palmer, *Chem. Phys. Lett.*, 1991, **179**, 491.
- [5] I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47**, 1329.
- [6] S. Ekgasit, H. Ishida, *Appl. Spectrosc.*, 1995, **49**, 1243.
- [7] M. Thomas, H. H. Richardson, *Vib. Spectrosc.*, 2000, **24**, 137.
- [8] S. Morita, H. Shinzawa, I. Noda, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.*, 2006, **60**, 398.
- [9] I. Noda, Y. Ozaki, *Two Dimensional Correlation Spectroscopy Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2004.
- [10] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, **46**, 67.
- [11] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 1583.
- [12] P. J. Tandler, P. B. Harrington, H. Richardson, *Anal. Chim. Acta.*, 1998, **368**, 45.
- [13] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc.*, 2003, **57**, 989.
- [14] I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 994.
- [15] I. Noda, Y. Liu, Y. Ozaki, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 8674.
- [16] M. A. Czarnecki, P. Wu, H. Siesler, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **282**, 326.
- [17] I. Noda, *Chemtract: Macromol. Chem.*, 1990, **1**, 89.
- [18] I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 2003, **57**, 1049.
- [19] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc.*, 2020, **74**, 894.
- [20] M. A. Czarnecki, H. Maeda, Y. Ozaki, M. Suzuki, M. Iwahashi, *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 994.
- [21] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc.*, 1999, **53**, 1392.
- [22] A. Gericke, S. J. Gadaleta, J. W. Brauner, R. Mendelsohn, *Biospectroscopy*, 1996, **2**, 341.
- [23] M. A. Czarnecki, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 986.
- [24] M. A. Czarnecki, *Vib. Spectrosc.*, 2012, **58**, 193.
- [25] I. Noda, *J. Mol. Struct.*, 2010, **974**, 3.
- [26] L. M. V. Sikirzhyski, Z. Hong, I. K. Lednev, S. A. Asher, *Appl. Spectrosc.*, 2013, **67**, 283.
- [27] I. Noda, *J. Mol. Struct.*, 2016, **1124**, 197.
- [28] A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.*, 1964, **36**, 1627.
- [29] *PLS-Toolbox, Chemometrics Tutorial (Eigenvector Research, Inc.)*.
- [30] P. Tomza, W. Wrzeszcz, M. A. Czarnecki, *J. Mol. Liq.*, 2019, **276**, 947.
- [31] M. A. Czarnecki, *Vib. Spectrosc.*, 2004, **36**, 237.
- [32] J. Hniopek, M. Schmitt, J. Popp, T. Bocklitz, *Appl. Spectrosc.*, 2020, **74**, 460.

Praca wpłynęła do Redakcji 9 stycznia 2023 r.

INFORMACJE

MECENASI WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH



Hydrolab to polska firma z ponad 20-letnim doświadczeniem na rynku. Jesteśmy dobrze zorganizowanym, nowoczesnie zarządzanym przedsiębiorstwem.

Produkujemy laboratoryjne demineralizatory, zaprojektowane zgodnie z wytycznymi polskich i europejskich norm, wykorzystując najnowsze technologie oczyszczania wody.

Jesteśmy w stanie zaplanować całą gospodarkę wodną w laboratorium, z pełną dokumentacją kwalifikacyjną.

Hydrolab aktualnie posiada w swojej ofercie ponad sto modeli urządzeń do oczyszczania wody.



Firma CEMIS-TECH Sp. z o.o. powstała w celu promowania ekologicznych rozwiązań firmy SOAPY-EUROPE na rynku polskim i rynkach środkowej Europy. Jednakże energiczne poczynania naszego profesjonalnego zespołu, zaowocowały rozszerzeniem działalności na segment laboratoryjny.

W chwili obecnej CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest wyłącznym i autoryzowanym przedstawicielem w Polsce tak uznanych firm jak: CEM Corporation, Teledyne ISCO Inc., Syrris Ltd, JACOMEX SAS, ThalesNano Inc, SOAPY Europe SRL, Mantech Inc., ZUELAB.

Ambicją naszej firmy jest dostarczenie Państwu nie tylko zamówionego sprzętu. Nasi specjaliści pomogą w wyborze urządzeń i dostosują ofertę do Państwa specyficznych wymagań aplikacyjnych. Proponujemy też grupowe bądź indywidualne szkolenia w naszym laboratorium aplikacyjnym w Kamp-Lintfort lub w Poznaniu. Ułatwi to Państwu szybkie opracowanie własnych metodyk analitycznych lub przygotowania próbek do analizy.

CEMIS-TECH Sp. z o.o. organizuje we współpracy z Uniwersytetem Jana Kochanowskiego w Kielcach coroczne Sympozjum na Łysej Górze. Możecie tam Państwo zapoznać się z najnowszymi osiągnięciami polskiej i światowej analityki chemicznej, a także indywidualnie skonsultować swoje problemy z najwybitniejszymi postaciami polskiej chemii.

Zmarł prof. zw. dr hab. czł. rzecz. PAN Lucjan Sobczyk

Z głębokim żalem zawiadamiamy, że dnia 14 czerwca 2023 zmarł prof. zw. dr hab. czł. rzecz. PAN Lucjan Sobczyk.

Twórca wrocławskiej szkoły badań wiązania wodorowego i współtwórcą wrocławskiej szkoły chemii fizycznej. Autor i współautor ponad 300 publikacji naukowych i 20 książek, m.in. podręcznika Chemia fizyczna (praca zbiorowa, komitet red. Adam Bielański, Kazimierz Gumiński, Bogdan Kamiński, Krzysztof Pigoń, Lucjan Sobczyk, PWN, 1980).

Wieloletni pracownik Uniwersytetu Wrocławskiego. Kierownik Zakładu Chemii Fizycznej, Dziekan Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1972–1975), Prorektor ds. nauki i współpracy z zagranicą (1975–1981).

Doktor Honoris Causa Uniwersytetu Wrocławskiego i Leningradzkiego.

Członek rzeczywisty PAN oraz przewodniczący Rady Naukowej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN.

Zasłużony działacz a od 2001 roku Członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Przewodniczący Oddziału Wrocławskiego PTChem (1971) oraz Prezes PTChem w latach 1980-1985.

Wielokrotnie nagradzany medalami m.in. Medalami PTChem imienia Jędrzeja Śniadeckiego (1986) oraz Jana Zawidzkiego (1979). Odznaczony Złotym Krzyżem Zasługi, Krzyżem Kawalerskim, Oficerskim i Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski, Medalem Komisji Edukacji Narodowej.

Profesor Lucjan Sobczyk był wybitnym uczonym, człowiekiem prawego charakteru i wielkiego umysłu

Żegnamy Pana Profesora z głębokim smutkiem.

W imieniu Zarządu oraz wszystkich Członków Oddziału Wrocławskiego.

Tomasz OLSZEWSKI
Przewodniczący Oddziału Wrocławskiego

SZKOŁA LETNIA STEM-CPD - ZAPROSZENIE DO AVEIRO 15-19.10.2023

ECTN Working Group Eurolecturer Academy



3rd STEM-CPD Summer School

15-19 October 2023

University of Aveiro, Portugal



The STEM-CPD Summer School is dedicated to continuous professional development (CPD) in teaching and learning in higher education STEM disciplines (Science, Technology, Engineering, and Mathematics). This event is intended for lecturers who are committed to student-centered teaching and aims to develop their university teaching competences with an international dimension. The program enables participants to implement professional development activities for lecturers at their respective universities, thereby enhancing the quality of education. Upon successful completion of the STEM-CPD Summer School, participants will be awarded the CPD Ambassador certificate and gain the opportunity to join the international CPD Ambassadors community.

Do wygrania złoty chromatograf FLASH



Firma Teledyne ISCO świętuje złote gody chromatografii FLASH. Z tej okazji każdy może wylosować ZŁOTY CHROMATOFRAF FLASH. Wystarczy się zarejestrować i wypełnić formularz. Losowanie odbędzie się w grudniu 2023 roku. Co miesiąc pomiędzy uczestników zostaną rozlosowane dodatkowe nagrody. Bliższych informacji udziela dystrybutor Firmy Teledyne ISCO firma CEMIS-TECH.

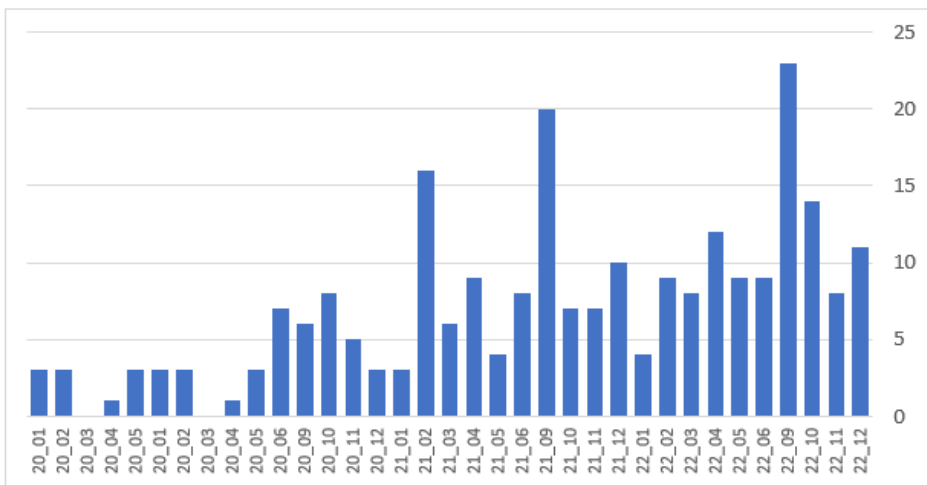
Link do rejestracji

https://info.teledynepharma.com/golden?utm_campaign=Golden%20CombiFlash&utm_content=241980419&utm_medium=social&utm_source=facebook&hss_channel=fbp-302780329759812

O efektach pracy RDN opowiada profesor Marcin Hoffmann: Jakie ośrodki akademickie były najbardziej aktywne w przypadku chemicznych profesur i habilitacji?

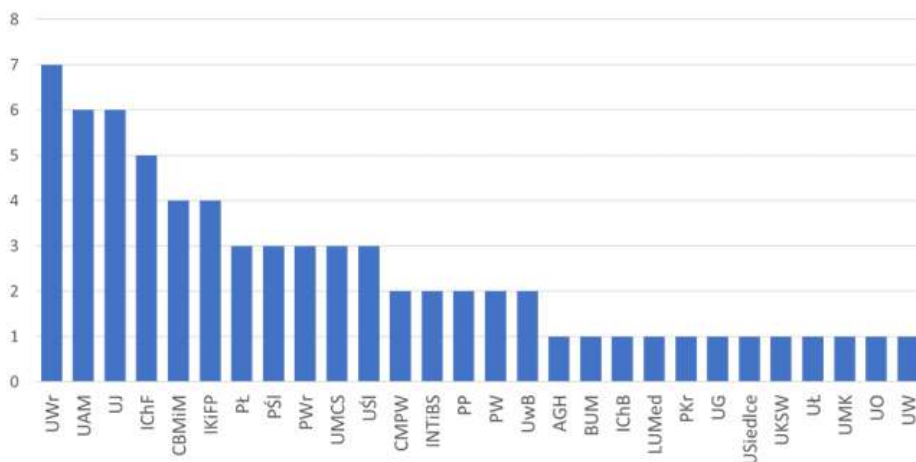
Jak już sygnalizowałem wcześniej kilka lat funkcjonowania Rady Doskonałości Naukowej (RDN) pozwala na odpowiedź na pytanie, które ośrodki były szczególnie aktywne w habilitacjach i profesurach w przypadku nauk chemicznych.

Przypomnijmy, że jeśli idzie o liczbę spraw dotyczących nauk chemicznych, które przedstawialiśmy (to jest Pani Profesor Grażyna Stochel, Pan Profesor Bogusław Buszewski i ja Marcin Hoffmann) przedstawicielom innych dyscyplin to w okresie pełnych trzech lat (od stycznia 2020 roku do grudnia 2022 roku) było ich łącznie 246; najwięcej we wrześniu 2022 roku – 23 (Rys. 1)

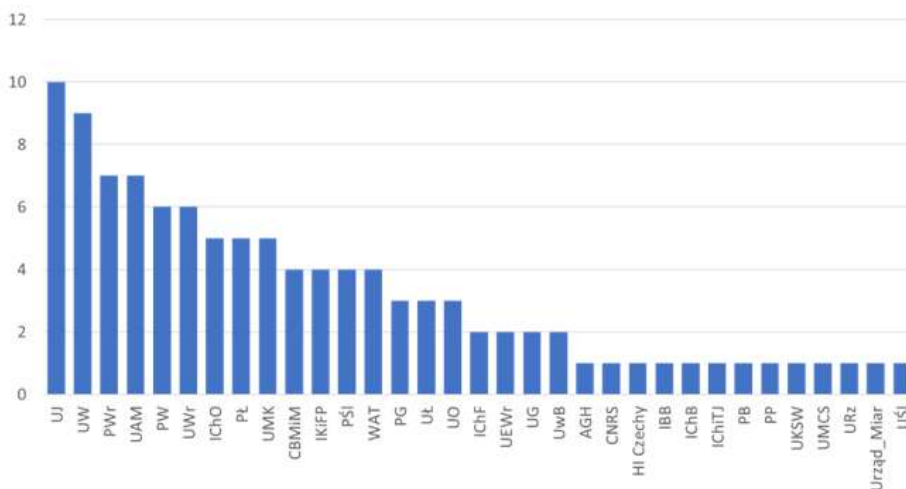


Rys. 1. Liczba spraw bezpośrednio dotyczących chemików w poszczególnych miesiącach

W przypadku 69 spraw dotyczących wyznaczenie kandydatów na recenzentów w postępowaniach o nadanie tytułu profesora w dyscyplinie nauki chemiczne najwięcej wniosków: to jest siedem, wpłynęło z Uniwersytetu Wrocławskiego. (Rys. 2) Natomiast po sześć wniosków pochodziło z Uniwersytetu Jagiellońskiego i Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, a pięć z Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.



Rys. 2 Liczba spraw o wyznaczenie kandydatów na recenzentów w postępowaniach o nadanie tytułu profesora (nauki chemiczne) w latach 2020-2022 podziale na poszczególne jednostki.



Rys. 3 Liczba spraw o wyznaczenie przewodniczących komisji i kandydatów na recenzentów w postępowaniach o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego (nauki chemiczne) w latach 2020-2022 podziale na poszczególne jednostki.

W przypadku 106 habilitacji, najwięcej wniosków bo dziesięć, dotyczyło Uniwersytetu Jagiellońskiego. Uniwersytet Warszawski związany był z dziewięcioma wnioskami habilitacyjnymi. Podkreślić należy, że członkowie Rady Doskonałości Naukowej w zasadzie nie recenzowali ani profesur, ani habilitacji. Natomiast przedstawialiśmy (Grażyna Stochel, Bogusław Buszewski i Marcin Hoffmann) naszym kolegą z innych

dyscyplin przygotowywane przez nas podsumowania z otrzymanych przez RDN recenzji, by przed głosowaniami mogli sobie wyrobić opinie o poszczególnych sprawach.

prof. dr hab. Marcin Hoffmann
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

W kolejnym odcinku odpowiedź na pytanie, związane z publicznym kolokwium habilitacyjnym jakie będzie wymagane również w naukach chemicznych w przypadku wniosków złożonych począwszy od 1 października 2023 roku.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne wartościowe materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkowa ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informacje na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.

- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNiSW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. stron nadliczbowych tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej- kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”.

Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za strony drukowane w kolorze (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).

- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.

- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane.

Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).

- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).

- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.

- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).

- Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:

- tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony,

- WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),

- pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),

- pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),

- spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

- Kolejne strony pracy powinny zawierać:

- notki o autorach pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji),

- obszernie streszczenie pracy w języku angielskim (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz słowa kluczowe – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,

- wykaz stosowanych skrótów – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać

i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI

– selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor),

– dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.

- Tabele, rysunki, fotografie

Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczytki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

- Piśmiennictwo cytowane

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku artykułów z czasopism tradycyjnych, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, 61, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, 51, 3.

W przypadku książek najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-

20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać jeden plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szrotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkowało czarno-białym wydrukiem wersji papierowej. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: czasopisma@ptchem.pl, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Kazimiera LUKJAN: 80. rocznica urodzin Profesora Jerzego Piotra Hawranka.....	621
Kacper RZEPIELA, Aneta BUCZEK, Teobald KUPKA, Tapas KAR, Małgorzata A. BRODA: Modelowanie właściwości wiązań wodorowych na przykładzie kompleksów układ amidowy - woda.....	629
Marta KUĆ, Katarzyna CIEŚLIK-BOCZULA, Maria ROSPENK: Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej w zakresie NIR do śledzenia modyfikacji konformacyjnych zachodzących w hydrofobowym obszarze modelowych dwuwarstw lipidowych.....	647
Edyta KUCHARSKA, Jacek MICHALSKI, Wojciech SAŚIADEK, Lucyna DYMIŃSKA, Paulina HOŁUBNIAK, Jerzy HANUZA: Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej w detekcji barwników azowych w opakowaniach do żywności.....	687
Krzysztof B. BEĆ, Justyna GRABSKA: Spektroskopia NIR – modelowanie kwantowo-mechaniczne widm jako narzędzie w badaniach podstawowych i wsparcie zastosowań analitycznych.....	719
Sylwester MAZUREK, Roman SZOSTAK: Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej w analizie fitozwiązków i substancji odżywczych w produktach naturalnych i spożywczych	745
Mirosław Antoni CZARNECKI: Dwuwymiarowa analiza korelacyjna.....	775
Informacje	801