

Redakcja naukowa
Roman Petrus
Jan Kalembkiewicz

Trendy badań w naukach technicznych i przyrodniczych

NAUKI TECHNICZNE I ŚCISŁE

dziedziny nauk technicznych,
matematycznych,
chemicznych i fizycznych



Wydano za zgodą Rektora

Redaktor naczelny

Wydawnictw Politechniki Rzeszowskiej
prof. dr hab. inż. Leonard ZIEMIANSKI

Recenzenci

prof. dr hab. inż. Dorota ANTOS
dr hab. inż. Barbara DĘBSKA, prof. PRz
prof. dr hab. inż. Henryk GALINA
prof. dr hab. inż. Krzysztof KACZMARSKI
dr hab. inż. Renata LUBCZAK, prof. PRz
dr hab. inż. Mariusz OLEKSY, prof. PRz
dr hab. Marek PYDA, prof. PRz
dr hab. inż. Wojciech ZAPAŁA, prof. PRz

W procesie wydawniczym pominięto etap opracowania redakcyjnego.
Monografię wydrukowano z matryc dostarczonych przez redaktorów naukowych.

Projekt okładki

Sylwia WIĘCEK

Przygotowanie matryc

Anna KOCUR

*właściwości spektralne, właściwości mechaniczne, starzenie fizyczne,
modelowanie matematyczne, modelowanie kwantowo-mechaniczne, adsorpcja,
ekstrakcja, współosadzanie, polikondensacja, poli(n-izopropyloakryloamid),
związki powierzchniowo czynne, kwas mefenamowy, kwas nitrylotrioctowy,
hydrochinon, 2-(etoksykarbonylometylo)-1-fenylo-6h-imidazo[1,5-c]-
-chinolino-3,5-dion, drewno, ogórki, roślinne metabolity wtórne*

ISBN 978-83-7934-089-7

e-ISBN 978-83-7934-091-0

Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej
al. Powstańców Warszawy 12, 35-959 Rzeszów

SPIS TREŚCI

Anna Czerniecka-Kubicka, Iwona Zarzyka, Marek Pyda STARZENIE FIZYCZNE POLI(N-IZOPROPYLOAKRYLOAMIDU).....	5
Małgorzata Kosińska, Lidia Zapala, Jan Kalembkiewicz, Tadeusz Pietryga, Urszula Maciolek, Anna Kuźniar CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNYCH KWASU MEFENAMOWEGO Z WYKORZYSTANIEM KWANTOWO – MECHANICZNYCH METOD OBLICZENIOWYCH.....	17
Marek Leško METODA ODWROTNA W ESTYMACJI PARAMETRÓW MODELU IZOTERMY ADSORPCJI.....	33
Dagmara Migut, Józef Gorzelany, Natalia Matlok, Ewa Szczepańska OCENA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH WYBRANYCH ODMIAN OGÓRKÓW ŚWIEŻYCH I W TRAKCIE PROCESU KISZENIA.....	47
Michał Milek, Jaroslav Legáth ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH DO EKSTRAKCJI ROŚLINNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH.....	59
Rafał Rawski, Dorota Saletnik, Przemysław Sanecki, Piotr Skitał ZALEŻNOŚCI REGRESYJNE W CHEMII ANALITYCZNEJ. WYZNACZANIE I BADANIE ISTOTNOŚCI ZALEŻNOŚCI REGRESYJNYCH.....	69
Anna Ryczek, Jaromir B. Lechowicz POLIKONDENSACJA KWASU NITRYLOTRIOCTOWEGO Z HYDROCHINONEM.....	85
Dorota Saletnik, Piotr Skitał, Przemysław Sanecki, Rafał Rawski MODELOWANIE MATEMATYCZNE PROCESU WSPÓŁOSADZANIA/ROZTWARZANIA TRZECH METALI.....	101
Agnieszka Szyszkowska, Karol Hęclik, Iwona Zarzyka MODELOWANIE KWANTOWO-MECHANICZNE CZĄSTECZKI 2-(ETOKSYKARBONYLOMETYLO)-1-FENYLO-6H-IMIDAZO[1,5-c]-CHINAZOLINO-3,5-DIONU.....	117
Tobiasz Wysoczański, Deta Łuczycka, Katarzyna Pentoś IMPEDANCJA JAKO PARAMETR RÓŻNICUJĄCY GATUNKI DREWNA.....	129

STARZENIE FIZYCZNE POLI(N-IZOPROPYLOAKRYLOAMIDU)

Anna Czerniecka-Kubicka^{1a}, Iwona Zarzyka¹, Marek Pyda¹

¹Zakład Chemii Organicznej, Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza

^aanna_czerniecka@poczta.fm

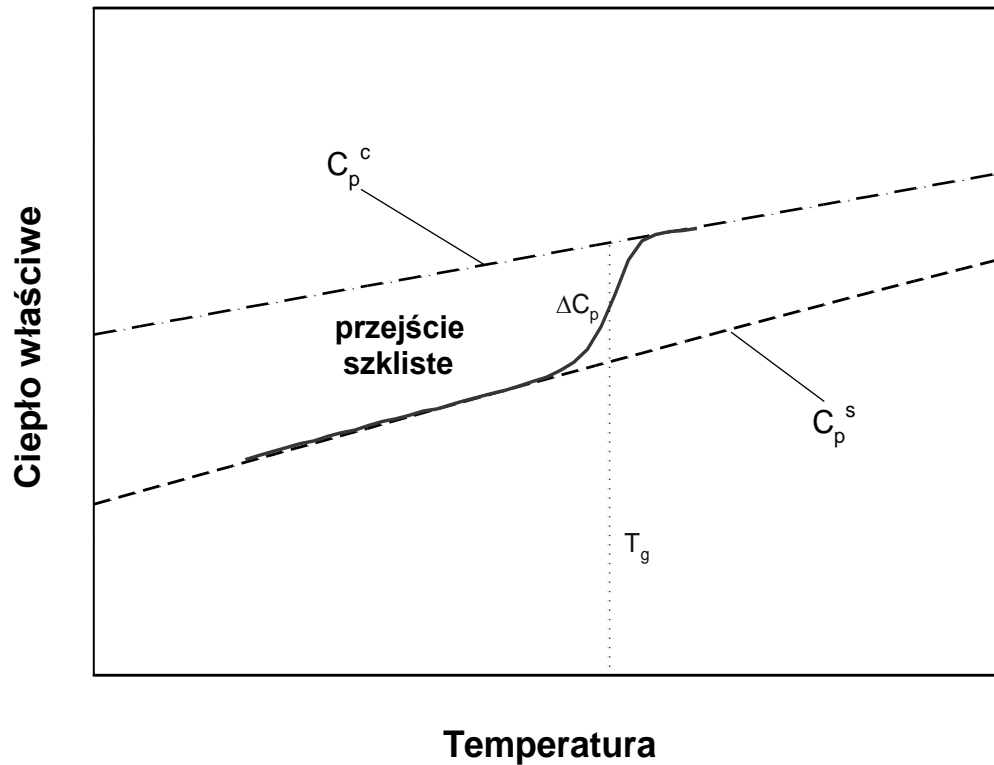
1. WSTĘP

Materiały bezpostaciowe (amorficzne) znajdują się w stanie termodynamicznie nierównowagowym [1-3] i dążą do stanu równowagi, co uwidacznia się jako starzenie fizyczne polimeru. Właściwości fizyczne materiałów amorficznych i semikrystalicznych będących w stanie termodynamicznie nierównowagowym, zmieniają się z czasem i temperaturą [4]. W wypadku materiałów amorficznych, wielkości takie jak objętość, entalpia i entropia przyjmują wartości znacznie większe niż w materiałach będących w stanie równowagowym [3]. Właściwości termodynamiczne zmieniają się podczas procesu starzenia w rozważanej temperaturze w kierunku wartości równowagowych, a ich zmiany są związane z porządkowaniem cząsteczek. Niektóre właściwości tych materiałów ulegają powolnym procesom relaksacyjnym w czasie, dążąc do stanu równowagi, bez wpływu czynników zewnętrznych [4].

Termin „starzenia fizycznego” jest ściśle związany z przejściem szklistym i stosowany jest w odniesieniu do polimerów, substancji farmaceutycznych oraz wielu innych materiałów, których właściwości ulegają zmianom, w trakcie przechowywania, w określonej temperaturze. Starzenie fizyczne jest zjawiskiem całkowicie odwracalnym, w którym wszystkie zachodzące zmiany w badanym materiale mogą zostać cofnięte. Proces starzenia dotyczy zarówno materiałów syntetycznych, jak i naturalnych [1-2]. Jest on obserwowany w sytuacji, gdy bezpostaciowy materiał zostaje ochłodzony poniżej temperatura zeszklenia, a następnie wygrzany w tej temperaturze przez określony czas.

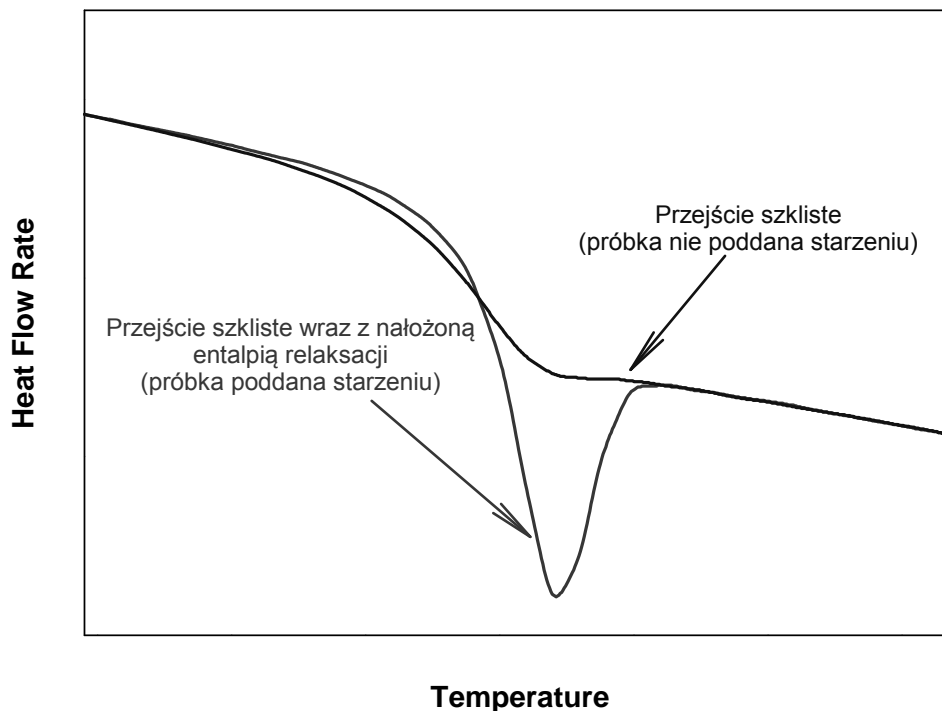
Przejście szkliste (rysunek 1) jest przemianą fazową bezpostaciowej substancji w stanie amorficznym stałym w stan amorficzny ciekły lub odwrotnie.

W obszarze przejścia szklistego następuje duża zmiana właściwości fizykochemicznych materiałów, tj. gęstości, lepkości czy ciepła właściwego [5]. Parametrami charakteryzującymi przejście szkliste są: temperatura przejścia szklistego (T_g) i zmiana ciepła właściwego (ΔC_p) w T_g wyznaczona pomiędzy przedłużoną linią oscylacyjnego ciepła właściwego (C_p^s) [6], a linią ciepła właściwego stanu ciekłego (C_p^c) (rysunek 1).



Rys. 1. Sposób analizy przejścia szklistego materiału amorficznego

Na rysunku 2 przedstawiono porównanie zmian strumienia ciepła w obszarze przejścia szklistego materiału poddanego i niepoddanego procesowi starzenia fizycznego. Charakterystyczną cechą tego zjawiska jest nakładanie endotermicznego piku entalpii relaksacji na zmianę strumienia ciepła w obszarze przejścia szklistego.



Rys. 2. Porównanie strumienia ciepła w funkcji temperatury materiału starzonego i nie poddanego procesowi starzenia

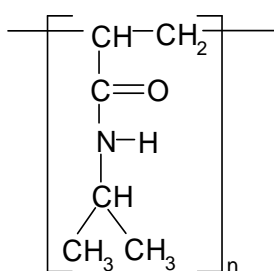
Parametrem charakteryzującym zjawisko starzenia fizycznego jest entalpia relaksacji (ΔH_f) [7-9]. Jest to parametr wyznaczony na podstawie pomiarów standardowej lub temperaturowo modulowanej różnicowej kalorymetrii skaningowej, który pozwala opisać stopień zaawansowania procesu starzenia fizycznego badanego materiału. Zmiana entalpii starzenia jest szacowana na podstawie pola powierzchni endotermicznego piku nakładającego się na zmiany ciepła właściwego lub strumienia ciepła. Jest to wynik samoistnego dążenia amorficznego lub semikrystalicznego materiału do stanu równowagi – stanu o większej stabilności termodynamicznej, w temperaturze poniżej temperatury przejścia szklistego. W ujęciu molekularnym, podczas starzenia fizycznego, ruchy cząsteczkowe poszczególnych fragmentów grup cząsteczek w badanym materiale zanikają. Natomiast obecna faza amorficzna dąży do uporządkowania swojej struktury osiągając stan o większej stabilności.

W niniejszej pracy przedstawiono analizę termiczną poli(N-izopropylakryloamid) poddanego starzeniu fizycznemu. Na podstawie pomiarów DSC, wyznaczono temperaturę, w której endotermiczny pik entalpii relaksacji jest największy, tzn. proces starzenia postępuje w największym stopniu. Następnie znaleziono czas po jakim proces starzenia, w danej temperaturze, już nie postępuje – układ osiągnął stan równowagi.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 MATERIAŁY

Poli(N-izopropylakryloamid) (PNIPA, rysunek 3) został wytworzony metodą wolnorodnikowej polimeryzacji w wodzie, co zostało opisane w pracach [10-11]. Otrzymany związek scharakteryzowano na podstawie analizy elementarnej oraz chromatografii żelowej (GPC) wykorzystując N,N-dimetyloformamid jako rozpuszczalnik. Wagowo średnia masa molowa jest równa $M_w = 731800$ g/mol, natomiast współczynnik dyspersji $M_w/M_n = 2,132$. Na podstawie analizy elementarnej oszacowano czystość (99.7 ± 0.1) %. Analiza została przeprowadzona z użyciem analizatora elementarnego EA 1108 firmy Carlo-Erba.



Rys. 3. Jednostka konstytucyjna PNIPA

2.2 METODY BADAWCZE

Badania kalorymetryczne PNIPA przeprowadzono przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego firmy TA Instruments DSC Q1000. Zastosowanym systemem chłodzącym była chłodziarka zewnętrzna. Wszystkie analizy przeprowadzono w atmosferze azotu, którego przepływ był stały i wynosił 50 ml/min. Pomiary zostały przeprowadzone w zakresie temperatury 180 - 460 K. Badania DSC przeprowadzono przy stałej szybkości ogrzewania próbki ($q = 10$

K/min), ze stałą wartością szybkości chłodzenia - 40 K/min. W wyniku pomiaru metodą DSC otrzymano termogramy, które przedstawiają zależność strumienia ciepła lub ciepła właściwego w funkcji czasu lub temperatury.

Każdy przeprowadzony pomiar ciepła właściwego przy użyciu DSC został skalibrowany z wykorzystaniem ciepła właściwego szafiru (Al_2O_3). Kalibracja temperatury i strumienia ciepła w aparatach DSC została przeprowadzona w odniesieniu do parametrów topnienia indu, tj. początkowej temperatury topnienia, tzw. „onset”: $T_m(\text{onset}) = 429,75 \text{ K}$ i entalpii topnienia $\Delta H_f = 28,45 \text{ J/g}$ (3,281 kJ/mol).

Skalibrowane wyniki ciepła właściwego otrzymano na podstawie trzech pomiarów: pierwszy z pustym tygłem odniesienia i pustym tygłem próbki, był wykonany w celu korekcji „asymetrii komory” aparatu DSC, drugi pomiar z pustym tygłem odniesienia i tygłem napełnionym szafirem przeprowadzono w celu kalibracji ciepła właściwego, natomiast trzeci pomiar był wykonany z pustym tygłem odniesienia i tygłem napełnionym badanym materiałem. Na tej podstawie została wyznaczona stała kalibracji zgodnie z równaniem [12]:

$$m \cdot C_p = K \frac{\Delta T}{q} + C_s \frac{d\Delta T}{dT_s} \quad (1)$$

K - stała kalibracji, ΔT - różnica temperatury pomiędzy próbką badaną i próbką odniesienia, C_s - ciepło właściwe próbki wraz z naczynkiem pomiarowym, T_s - temperatura próbki, q - szybkość ogrzewania, m - masa sporządzonych próbek, która wahała się w granicach 3 - 5 mg.

Temperaturowo modulowana różnicowa kalorymetria skaningowa (TMDSC) została zastosowana w celu oddzielenia procesów odwracalnych i nieodwracalnych [12-18].

Temperaturowo modulowana różnicowa kalorymetria skaningowa (TMDSC) opiera się na pomiarze efektów cieplnych wynikających z liniowej zmiany temperatury, na którą nałożony jest sygnał sinusoidalnej lub innej periodycznej zmiany temperatury. Odpowiedzią układu na program temperaturowy TMDSC jest zmiana temperatury będąca różnicą temperatury, pomiędzy badaną próbką $T_s(t)$ i próbką odniesienia $T_r(t)$, w czasie [$\Delta T = T_r(t) - T_s(t)$]. Mierzona zmiana ΔT jest proporcjonalna do strumienia ciepła nazywanego modulowanym strumieniem ciepła [12, 19].

2.3 METODYKA POMIARÓW

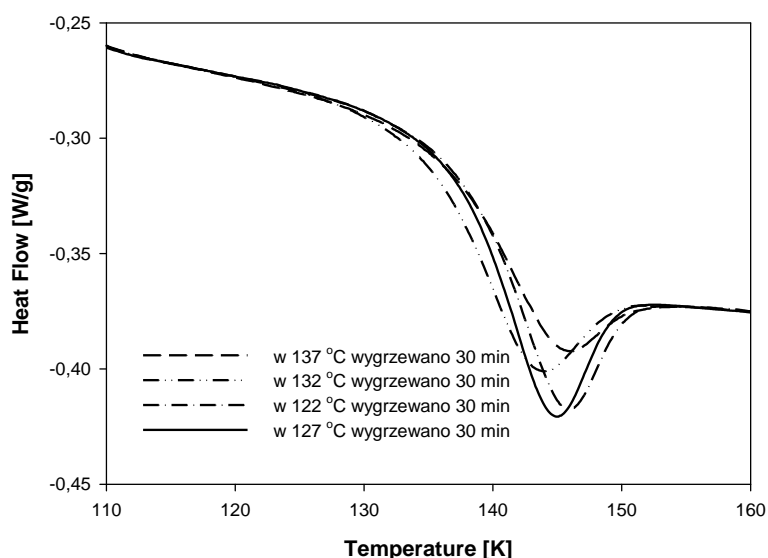
PNIPA poddano starzeniu izotermicznemu wykorzystując kalorymetry skaningowe firmy TA Instruments DSC Q1000 i TA 2920. Próbki ogrzewano do temperatury 200°C z szybkością 10°C/min, a następnie chłodzono z szybkością 40°C/min do temperatury 122, 127, 132 i 135°C. W danej temperaturze próbka była wygrzewana, wewnątrz kalorymetru w atmosferze azotu, w czasie 30 minut. Następnie próbkę ogrzewano do temperatury 200°C/min z szybkością 10°C/min. Po ustaleniu temperatury starzenia, próbkę po ogrzewaniu do temperatury 200°C z szybkością 10°C/min, chłodzono z szybkością 40°C/min do temperatury 127°C. W tej temperaturze próbkę wygrzewano w różnym czasie, w zakresie od 5 minut do 3 miesięcy. W kolejnym etapie programu temperaturowego, w zależności od metody, ogrzewanie do temperatury 200°C/min prowadzono z szybkością 10°C/min - w metodzie DSC oraz 3°C/min - w metodzie TMDSC ($p = 60 \text{ s}$, $A = 1,5^\circ\text{C/min}$).

3. WYNIKI

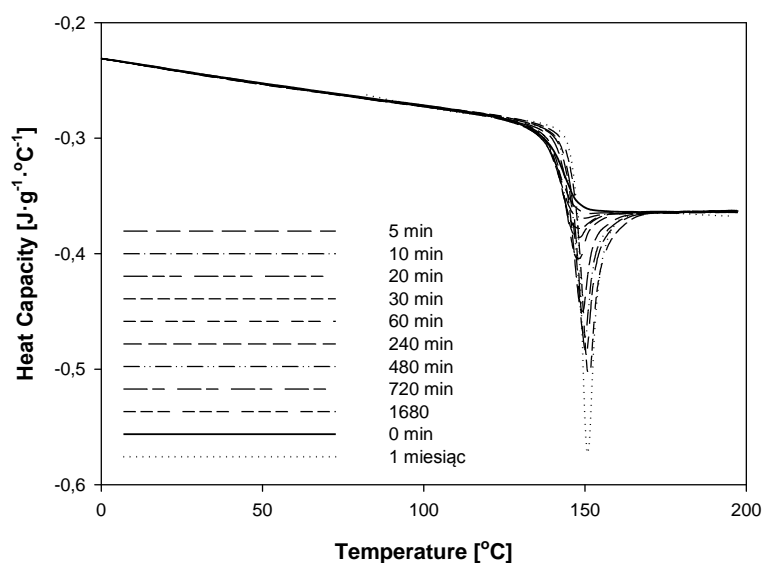
3.1 STANDARDOWA RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA, DSC

Przeprowadzono izotermiczne starzenie PNIPA, badając wpływ tego zjawiska na właściwości termiczne amorficznego PNIPA, co zostało przedstawione na rysunku 4 i 5. Widoczne jest nakładanie się zmian ciepła właściwego i entalpii relaksacji podczas przejścia szklistego. Można zauważyć, że temperatura przejścia szklistego zależy od temperatury (rys. 4) i czasu (rys. 5) starzenia.

Początkowo zbadano w jakiej temperaturze (poniżej temperatury zeszklenia) proces starzenia postępuje najszybciej. W tym celu próbkę PNIPA wygrzewano przez 30 min w temperaturze 137, 132, 127 i 122°C. Stwierdzono, że pik entalpii relaksacji jest największy po wygrzewaniu PNIPA w temperaturze 127°C (rys. 4).



Rys. 4. Wygrzewanie próbek w zakresie temperatury 122-137°C przez 30 min

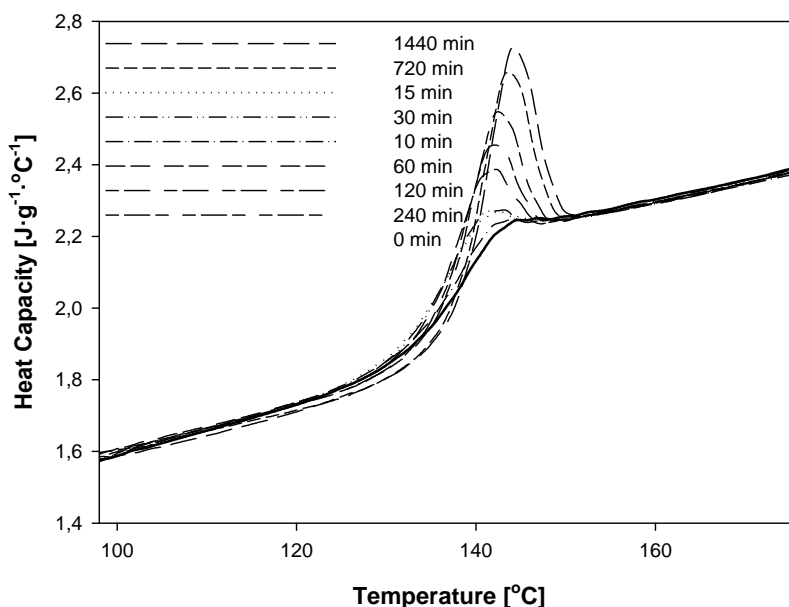


Rys. 5. Zmiana strumienia ciepła w funkcji temperatury próbek PNIPA wygrzewanych w temperaturze 127°C w różnym czasie, w zakresie 5 min – 3 miesiące, wyznaczona metodą DSC podczas ogrzewania z szybkością 10°C/min

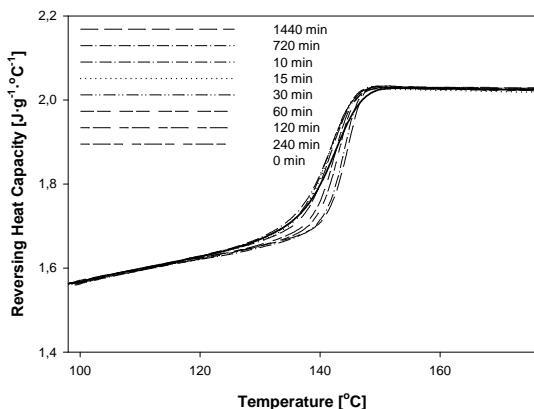
Następnie PNIPA poddano starzeniu w temperaturze 127°C w czasie od 5 minut do 1 miesiąca, co przedstawiono na rysunku 5. Stwierdzono, że stosowanie dłuższego czasu starzenia powoduje zwiększenie entalpii relaksacji w przejściu szklistym.

3.2 TEMPERATUROWO MODULOWANA RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA, TMDSC

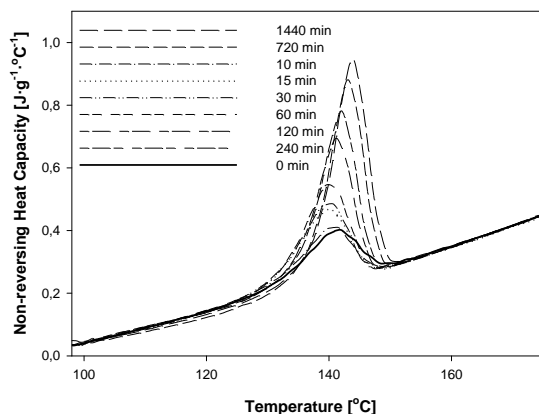
W celu oddzielenia zmian ciepła właściwego od entalpii relaksacji (procesu odwracalnego od nieodwracalnego), w obszarze przejścia szklistego w pozornym ciepłe właściwym wynikającego z procesu starzenia, zastosowano metodę TMDSC. Temperaturowe zmiany całkowitego ciepła właściwego w przejściu szklistym starzonych próbek PNIPA przedstawiono na rys. 6. Na rys. 6a i 6b pokazano odpowiednio odwracalne i nieodwracalne ciepło właściwe otrzymane w wyniku dekonwolucji fourierowskiej.



Rys. 6. Starzenie izotermiczne, przedstawione w funkcji ciepła właściwego od temperatury, otrzymane metodą TMDSC



Rys. 6a. Odwracalne ciepło właściwe w funkcji temperatury uzyskane w wyniku dekonwolucji strumienia głównego



Rys. 6b. Nieodwracalne ciepło właściwe w funkcji temperatury uzyskane w wyniku dekonwolucji strumienia głównego

Tabela 1. Zależność temperatury zeszklenia od czasu starzenia amorficznego PNIPA wygrzewanego w temperaturze 127°C. Charakterystyki otrzymano na podstawie odwracalnego ciepła właściwego (rys. 6b)

Temperatura zeszklenia [°C]	Czas starzenia fizycznego [min]
140,35	0
141,39	10
141,40	15
141,41	30
141,90	60
142,40	120
142,79	240
143,77	720
144,60	1440

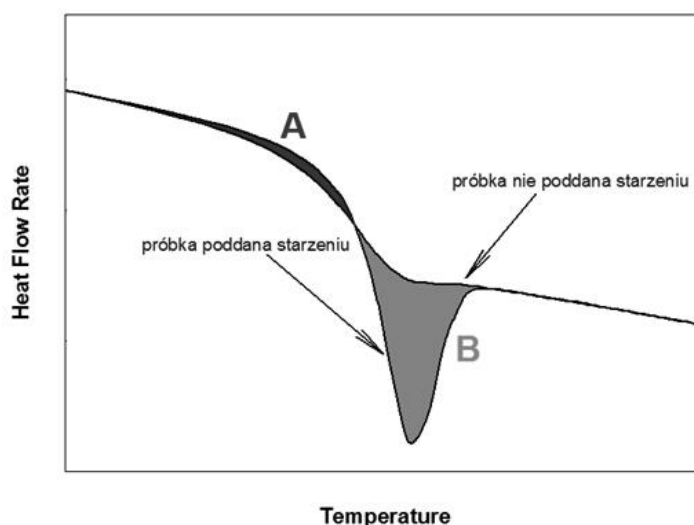
Na podstawie analizy zmian odwracalnego ciepła właściwego zaobserwowano wzrost temperatury przejścia szklistego wraz z wydłużeniem się czasu starzenia (tabela 1, rys. 6a). Z kolei analiza nieodwracalnego ciepła właściwego (rys. 6b) przedstawia wzrost endotermicznego piku entalpii relaksacji w obszarze przejścia szklistego starzonych próbek PNIPA. Wzrost udziału entalpii relaksacji świadczy o wewnętrznym uporządkowaniu struktury oraz dążeniu badanego materiału do osiągnięcia wyższej stabilności termodynamicznej w danej temperaturze.

3.3 ANALIZA STARZENIA

Entalpia relaksacji wyznaczona metodą DSC jest obliczana jako różnica efektu energetycznego powstałego w wyniku starzenia oraz efektu pochodzącego od niestarzonego materiału amorficznego zgodnie z równaniem:

$$\Delta H_{\text{relx}} = B - A \quad (2)$$

w którym A, B są to pola powierzchni ograniczone krzywymi otrzymanymi dla starzonej oraz niestarzonej próbki PNIPA uzyskanych za pomocą metody DSC (rys. 7).



Rys. 7. Szacowanie entalpii relaksacji na podstawie pomiarów metodą DSC

Tabela 2 przedstawia wzrost oszacowanej wartości entalpii relaksacji dla czasów starzenia fizycznego w zakresie 5 min do 5 miesięcy w temperaturze 127°C. Na podstawie tabeli wykreślono krzywą zależności entalpii relaksacji w funkcji logarytmicznej czasu starzenia, co przedstawiono na rysunku 8.

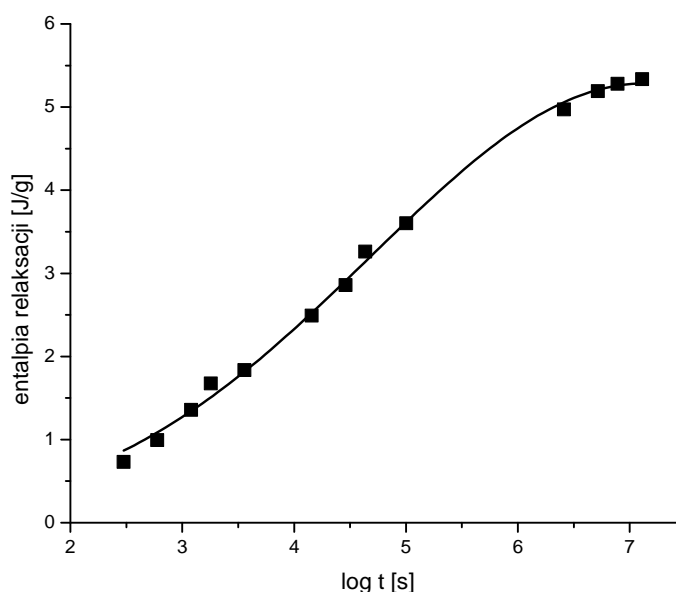
Tabela 2. Zmiany entalpii relaksacji w czasie procesu starzenia poli(N-izopropylakryloamidu)

Czas starzenia, t_a	$\log t$ [s]	Entalpia relaksacji [J/g]
5 min	2,47712	0,732
10 min	2,77815	0,992
20 min	3,07918	1,355
30 min	3,25527	1,675
60 min	3,5563	1,835
240 min	4,15836	2,491
480 min	4,45939	2,859
720 min	4,63548	3,262
1 dzień	5,00346	3,601
1 miesiąc	6,41363	4,970
2 miesiące	6,71466	5,190
3 miesiące	6,89076	5,280
5 miesięcy	7,11261	5,330

Wyniki przedstawione na rysunku 8 wskazują na duże zmiany entalpii relaksacji w zakresie od 5 min do 3 miesięcy. Po przekroczeniu czasu trzech miesięcy, entalpia praktycznie się nie zmienia osiągając stan równowagi termodynamicznej. Zakładając, że gdy czas starzenia dąży do nieskończoności, to entalpia relaksacji może osiągnąć wartość maksymalną. Próbkę może uzyskać wówczas stan równowagi termodynamicznej. Wartość tzw. równowagowej entalpii relaksacji (ΔH_∞) można wyznaczyć z materiału niestarzonego na podstawie równania:

$$\Delta H_\infty = \Delta C_p (T_g - T_a) \quad (3)$$

w którym: ΔC_p jest skokiem ciepła właściwego w procesie zeszklenia wyznaczonym dla materiału nie poddanemu starzeniu; T_g , T_a to odpowiednio temperatura zeszklenia i starzenia.



Rys. 8. Zmiany entalpii relaksacji w zależności od czasu starzenia PNIPA

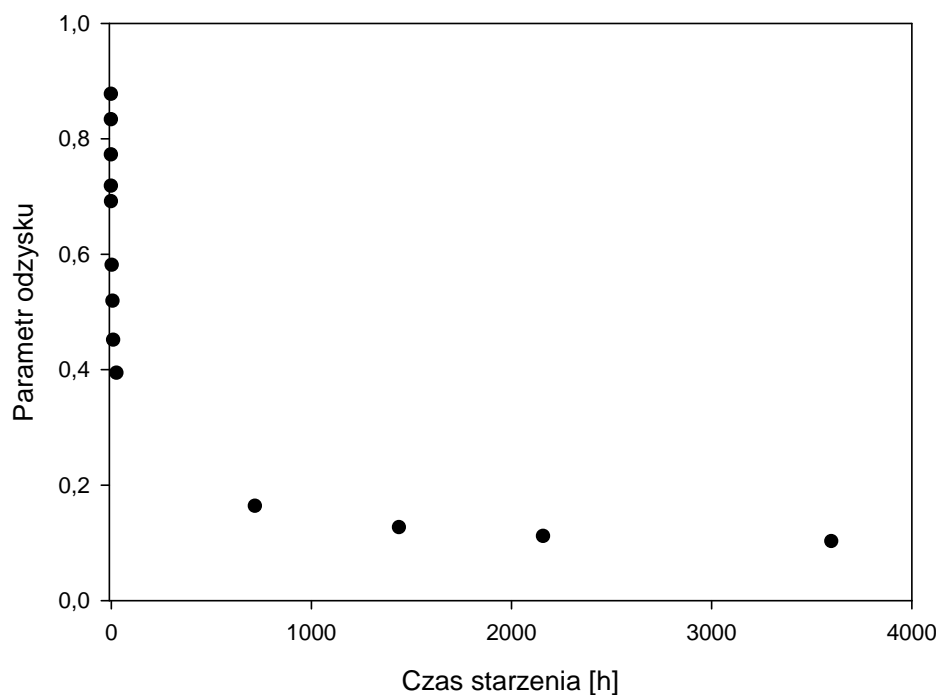
Dokładna wartość T_g została wyznaczona w pracy [20] i była równa $140,35^\circ\text{C}$. Na tej podstawie wyznaczono wartość ΔH_∞ , stosując jednocześnie temperaturę 127°C jako temperaturę w której starzono próbkę. W przypadku badanej próbki wyznaczona entalpia równowagowa wynosi $\Delta H_\infty = 5,94 \text{ J/g}$.

Jednym z parametrów opisujących proces starzenia jest również, tzw. parametr odzysku φ , który opisuje kinetykę procesu starzenia. Wskazuje on na stopień zaawansowania procesów relaksacji materiału zgodnie z równaniem 4.

$$\varphi^{(t_a)} = \frac{\Delta H_\infty - \Delta H_{(t_a)}}{\Delta H_\infty} \quad (4)$$

gdzie: ΔH_∞ to równowagowa entalpia relaksacji, a $\Delta H_{(t_a)}$ to entalpii relaksacji w danej temperaturze starzenia po czasie t .

W wypadku niestarzonej próbki parametr ten przyjmuje wartość 1, z kolei dla materiału w pełni zrelaksowanego, gdy entalpia osiągnie wartość równowagową, wynosi 0. Parametr odzysku dla poli(N-izopropylakryloamidu) wynosi 0,01, co oznacza, że próbka po czasie 5 miesięcy znajduje się w stanie bliskim równowagi termodynamicznej. Rysunek 9 przedstawia graficzne zmiany parametru odzysku φ w funkcji czasu starzenia, t_a .



Rys. 9. Parametr odzysku φ w funkcji czasu starzenia PNIPA

4. WNIOSKI

Zbadano fizyczne starzenie poli(N-izopropylakryloamidu) w warunkach izotermicznych za pomocą standardowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz temperaturowo modulowanej różnicowej kalorymetrii skaningowej (TMDSC). Przedstawiono sposób postępowania prowadzący do oszacowania entalpii relaksacji, będącej miarą procesu starzenia, w zależności od czasu starzenia próbki.

Na podstawie zmian entalpii relaksacji stwierdzono, że po czasie pięciu miesięcy eksponowania próbki na działanie temperatury 127°C, materiał się już prawie nie starzeje, czyli znajduje się blisko stanu całkowitego uporządkowania i dąży w kierunku stanu równowagi. Potwierdza to również oszacowany parametr odzysku poli(N-izopropylakryloamidu), który wynosi 0,01, co wskazuje, że próbka znajduje się blisko stanu równowagi termodynamicznej.

Literatura

1. J. N. Hay, The physical ageing of amorphous and crystalline polymers, *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 67, 1995, p. 1855–1858.
2. Y. Liu, B. Bhandari, W. Zhou, Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, 2006, p. 5701–5717.
3. L. C. E. Struik, *Physical Aging in Amorphous Polymers and Other Materials*, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1978.
4. A. Celli, M. Scandola, Thermal properties and physical aging of Poly-L-lactic acid, *Polymer*, Vol. 33, 1992, p. 2699–2703.
5. W. Przygodzki, *Metody fizyczne badań polimerów*, PWN, Warszawa, 1990.
6. M. Pyda, M. Bartkowiak, B. Wunderlich, Computation of heat capacities of solids using a general Tarasov equation, *Journal of Thermal Analysis*, No. 52, 1998, p. 631–656.
7. C. T. Moynihan, S. N. Crichton, S. M. Opalka, Linear and nonlinear structural relaxation, *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 131, 1991, p. 420–434.
8. D. J. Plazek, K. L. Ngai, *Physical Properties of Polymer Handbook*, Ed. J. E. Mark, American Institute of Physics, Woodbury, New York, 1996.
9. C. T. Moynihan, J. Easteal, M. A. DeBolt, J. Tucker, Dependence of fictive temperature of glass on cooling rate, *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 59, 1976, p. 12–16.
10. I. Zarzyka, M. Pyda, M. L. Di Lorenzo, Influence of crosslinker and ionic comonomer concentration on glass transition and demixing/mixing transition of copolymers poly(N-isopropylacrylamide) and poly(sodium acrylate) hydrogels, *Colloid Polymer Science*, Vol. 292, 2014, p. 485–492.
11. B. Strachotova, A. Strachota, M. Uchman, M. Slouf, J. Brus, J. Plestil, L. Matejka, Super porous organic-inorganic poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogel with a very fast temperature response, *Polymer*, Vol. 48, 2007, p. 1471–1482.
12. B. Wunderlich, *Thermal Analysis of Polymeric Materials*, SPRING, Verlag, Berlin, 2005.
13. B. Wunderlich, *Thermal Analysis. Text for an audio course*, Rensselaer Polytechnic Institute TROY, New York, 1981.
14. B. Wunderlich, The contributions of MDSC to the understanding of the thermodynamics of polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 85, No. 1, 2006, p. 179–187.
15. B. Wunderlich, A. Boller, I. Okazaki, K. Ishikiriyama, W. Chen, M. Pyda, J. Pak, I. Moon, R. Androsch, Temperature-modulated differential scanning calorimetry of reversible and irreversible first-order transitions, *Thermochemica Acta*, Vol. 330, No. 1-2, 1999, p. 21–38.
16. L. C. Thomas, A. Boller, I. Okazaki, B. Wunderlich, Modulated differential scanning calorimetry in the glass transition region, IV. Pseudo-isothermal analysis of the polystyrene glass transition, *Thermochemica Acta*, Vol. 291, No. 1-2, 1997, p. 85–94.

17. A. Boller, C. Schick, B. Wunderlich, Modulated differential scanning calorimetry in the glass transition region, *Thermochimica Acta*, Vol. 266, 1995, p. 97–111.
18. B. Wunderlich, Temperature-Modulated Calorimetry of Polymers with Single and Multiple Frequencies to Determine Heat Capacities as well as Reversible and Irreversible Transition Parameters. *Material Characterization by Dynamic and Modulated Thermal Analytical Techniques*, ASTM STP 1402, A. T. Riga and L. H. Judovits, Eds., American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, 2001.
19. A. Sykuła, E. Łodyga-Chruścińska, M. Zakrzewski, Polimorfizm – jego wpływ na substancje farmaceutyczne. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia spożywcza i biotechnologia*. Vol. 984, No. 70, 2006, p. 93–106.
20. A. Czerniecka-Kubicka, J. Schliesser, B. F. Woodfield, I. Zarzyka, M. Pyda, Vibrational heat capacity of poly(N-isopropylacrylamide), *Polymer*, Vol. 63, 2015, p. 108–115.

CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNYCH KWASU MEFENAMOWEGO Z WYKORZYSTANIEM KWANTOWO – MECHANICZNYCH METOD OBLICZENIOWYCH

**Małgorzata Kosińska^{1a}, Lidia Zapala¹, Jan Kalembkiewicz¹,
Tadeusz Pietryga², Urszula Maciolek¹, Anna Kuźniar¹**

¹Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Politechnika Rzeszowska

²Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Rzeszowska

^amkosinska@prz.edu.pl

1. WSTĘP

Występowanie substancji w stanie stałym w różnych odmianach polimorficznych jest powszechnie znanym zjawiskiem. Odmiany polimorficzne tego samego związku chemicznego mogą charakteryzować się znacząco różnymi właściwościami fizykochemicznymi i mechanicznymi, m. in. różną rozpuszczalnością, szybkością rozpuszczania, stabilnością chemiczną, a w przypadku substancji biologicznie czynnych, różną biodostępnością. Jedną z przyczyn występowania zjawiska polimorfizmu jest różnorodność konformacyjna cząsteczki związku chemicznego, która znajduje odzwierciedlenie w badaniach spektroskopowych substancji stałych. Występowanie teoretycznie nieskończonej liczby możliwych odmian polimorficznych substancji (wynikającej z nieskończonej liczby konformacji, które może przyjmować dana cząsteczka) ogranicza fakt, że nie każde ułożenie przestrzenne atomów w cząsteczce jest tak samo prawdopodobne i preferowane. W stanie stałym związek przyjmuje konformację najtrwalszą, co wynika z warunku minimum energii, do którego dążą układy [1, 2].

Kwas mefenamowy (MFA) jest znanym lekiem z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Wykazuje silne właściwości przeciwbólowe oraz słabsze przeciwzapalne, przeciwgorączkowe i przeciwrheumatyczne. Ma najslabsze działanie przeciwagregacyjne spośród wszystkich NLPZ. Do produktów leczniczych, w których kwas mefenamowy stanowi substancję czynną należą: Mefacit, Apo-mafen, Postan, Parkemed, Antalv. Preparaty te są stosowane przy łagodzeniu ostrych i przewlekłych bólów występujących podczas chorób zwyrodnieniowych stawów, bólów menstruacyjnych, mięśniowych, pooperacyjnych [3-5]. Kwas mefenamowy wykazuje także efekt terapeutyczny w przypadku chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimer'a) i w środkach przeciwnowotworowych [6-8]. Ponadto, charakteryzuje się aktywnością przeciwbakteryjną [9]. Ważną właściwością kwasu mefenamowego jest występowanie w odmianach polimorficznych, które różnią się m. in. stabilnością, barwą, rozpuszczalnością. Fakt istnienia odmian polimorficznych kwasu mefenamowego wynika z możliwości przyjmowania przez cząsteczkę tego związku w stanie stałym różnych

konformacji. Odmiana polimorficzna I występuje w formie białej i jest bardziej stabilna. Natomiast metastabilna odmiana polimorficzna II występuje w formie zielonej i może być otrzymywana na drodze: rekrytalizacji odmiany I z odpowiednich rozpuszczalników, przejścia fazowego podczas ogrzewania w zakresie temperatur 160–190°C lub kompresji ciała stałego. Istnieją także doniesienia o wyodrębnieniu III odmiany polimorficznej kwasu mefenamowego na drodze kokrytalizacji formy II z adeniną z układu DMF/metanol 1:1. Rozróżnienie odmian polimorficznych kwasu mefenamowego jest możliwe z wykorzystaniem badań spektroskopowych, ponieważ w zależności od formy polimorficznej w widmach IR, Ramana czy NMR obserwowane są przesunięcia pasm lub odpowiednio pików [1, 2, 10-13].

Oprócz zastosowania w produktach leczniczych, kwas mefenamowy jest wykorzystywany, m. in. w syntezie stałych związków kompleksowych z jonami metali [6, 14-26]. Do podstawowych metod stosowanych w celu weryfikacji zdolności kompleksotwórczych liganda i potwierdzenia jego budowy należą metody spektralne UV-VIS i spektroskopia w podczerwieni [27]. Poprawna interpretacja widm elektronowych i IR wyjściowego liganda w tym zakresie jest zatem niezbędna, a poprawność interpretacji weryfikują metody obliczeniowe.

W ramach pracy zarejestrowano doświadczalne widma UV-VIS oraz IR kwasu mefenamowego. Metody obliczeniowe wykorzystano w celu ustalenia geometrii cząsteczki MFA o najniższej energii, na podstawie której modelowano następnie widmo IR kwasu mefenamowego oraz widma elektronowe. Uzyskane wyniki obliczeń wykorzystano w szczególowej interpretacji doświadczalnych widm IR oraz UV-VIS aminokwasu.

2. METODY BADAWCZE

2.1 METODY DOŚWIADCZALNE

Zarejestrowano doświadczalne widmo w podczerwieni kwasu mefenamowego w zakresie częstości 4000–400 cm^{-1} . Pomiar przeprowadzono na próbce w postaci pastylki z KBr, przy zastosowaniu spektrofotometru ALPHA FT-IR Bruker. Widma UV/VIS roztworów kwasu mefenamowego w metanolu i DMSO zarejestrowano w zakresie długości fali 200–500 nm z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS-NIR Jasco V-670.

2.2 METODY OBLICZENIOWE

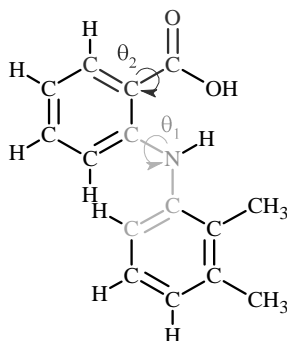
Analizę konformacyjną z optymalizacją struktury cząsteczki kwasu mefenamowego przeprowadzono w programie Cache Work System Pro 6.1.12., metodą półempiryczną AM1 (*Austin Model 1*). Optymalizację geometryczną różnych struktur wyjściowych kwasu mefenamowego wykonano w programie Gaussian 03W, stosując metodę funkcjonałów gęstości DFT (*Density Functional Theory*), z funkcjonałem hybrydowym B3LYP (*Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr*) i bazą funkcyjną 6-311G (d,p).

Modelowano także absorpcyjne widma elektronowe cząsteczki kwasu mefenamowego z uwzględnieniem wpływu rozpuszczalnika (odpowiednio metanolu lub DMSO). Obliczenia energii stanów wzbudzonych wykonano metodą DFT, z funkcjonałem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G (d,p), rozważając liczbę przejść pomiędzy stanami elektronowymi (N) równą 30. Widmo IR kwasu mefenamowego modelowano w programie Gaussian metodą DFT z funkcjonałem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G+ (d,p).

3. WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

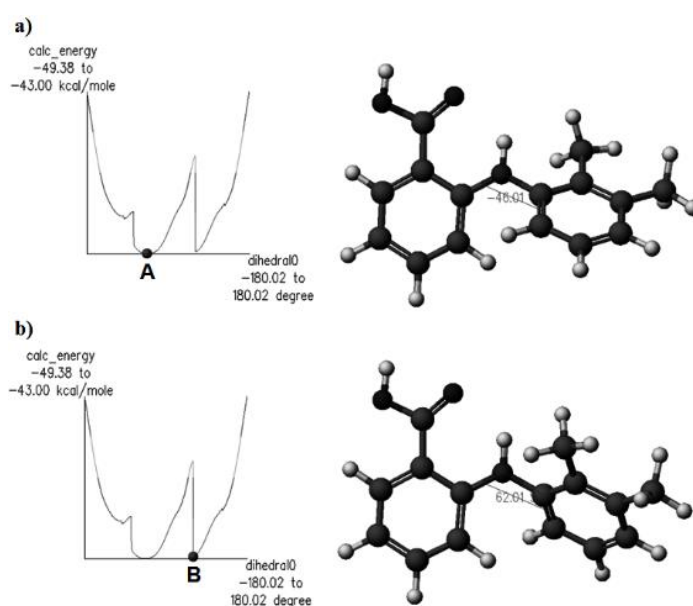
3.1 ANALIZA KONFORMACYJNA

Cząsteczka kwasu mefenamowego może przyjmować konformacje, które wynikają ze zmiennego położenia względem siebie w przestrzeni dwóch pierścieni aromatycznych i atomów grupy karboksylowej względem pierścienia aromatycznego. Strukturę cząsteczki kwasu mefenamowego ze wskazanymi, zmieniającymi się w konformacjach tego związku kątami torsyjnymi przedstawiono na rys. 1.

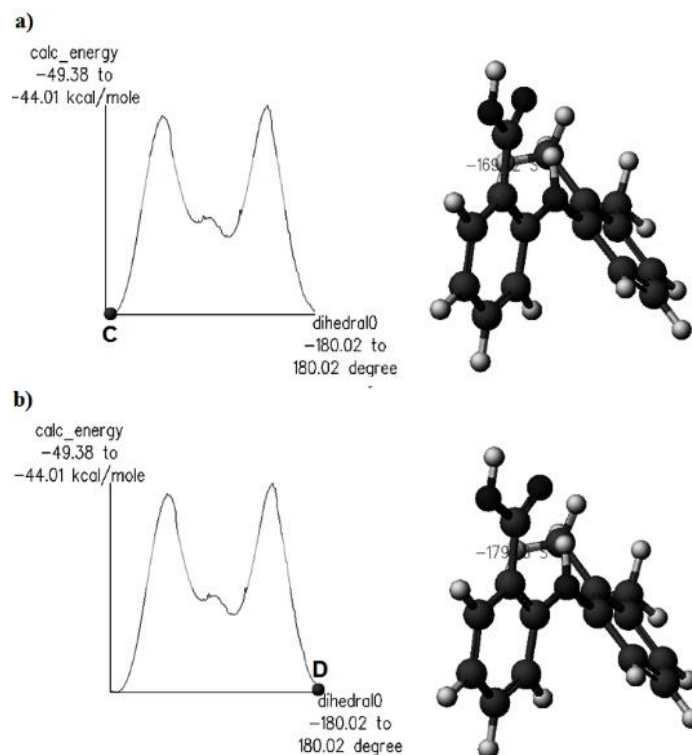


Rys. 1. Struktura cząsteczki MFA ze zdefiniowanymi kątami torsyjnymi

W celu ustalenia jak zmienia się energia cząsteczki kwasu mefenamowego w zależności od wartości odpowiednich kątów torsyjnych θ_1 i θ_2 przeprowadzono analizę konformacyjną z optymalizacją struktury w programie Cache Work System Pro 6.1.12., metodą półempiryczną AM1. Polegała ona na tym, że strukturę kwasu poddawano zmianom kąta θ_1 , a następnie θ_2 o 1° w przedziale od -180° do $+180^\circ$, przy czym po każdej zmianie wartości kąta otrzymana struktura była dodatkowo optymalizowana. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawione zostały na rys. 2 i 3 w postaci wykresów zależności energii cząsteczki w funkcji wartości kąta torsyjnego θ_1 i θ_2 . Przedstawiono także struktury kwasu znajdujące się w minimum energetycznym.



Rys. 2. Wykresy energii cząsteczki MFA w zależności od wartości kąta θ_1 i struktury odpowiadające minimum energetycznym - wyniki analizy metodą AM1 (punkty A i B – minima energii)



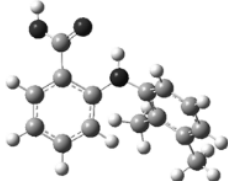
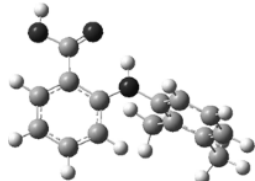
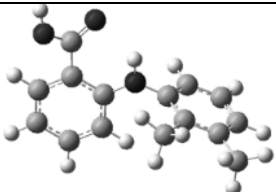
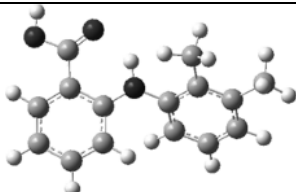
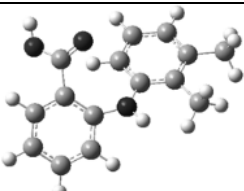
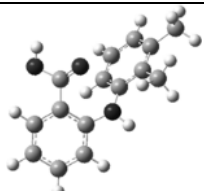
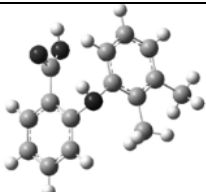
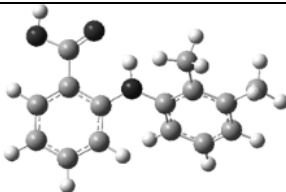
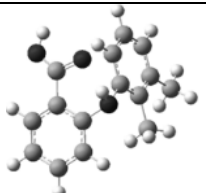
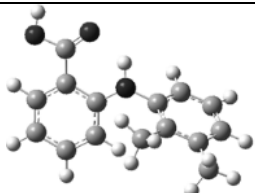
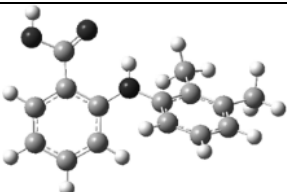
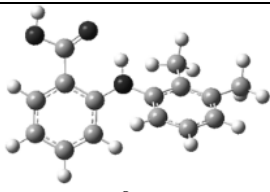
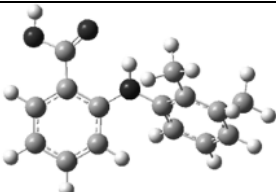
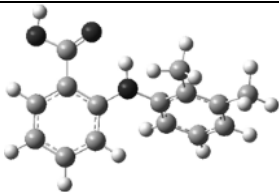
Rys. 3. Wykresy energii cząsteczki MFA w zależności od wartości kąta θ_2 i struktury odpowiadające minimum energetycznym - wyniki analizy metodą AM1 (punkty **C** i **D** – minima energii)

Wyniki przeprowadzonych badań konformacyjnych potwierdziły, że zarówno wzajemne położenie względem siebie pierścieni, jak również orientacja w przestrzeni atomów grupy karboksylowej w zauważalny sposób wpływają na energię cząsteczki kwasu mefenamowego. Z wykresów energii cząsteczki MFA w zależności od wartości kąta θ_1 i θ_2 (rys. 2 i 3) wynika, że uprzywilejowane energetycznie są konformacje, w których pierścienie aromatyczne nie znajdują się w jednej płaszczyźnie. Natomiast w przypadku grupy karboksylowej można stwierdzić, że korzystnym energetycznie jest jej ułożenie koplanarne z pierścieniem.

3.2 OPTIMALIZACJA GEOMETRYCZNA

W celu otrzymania konformacji kwasu mefenamowego o najniższej energii przeprowadzono optymalizację geometryczną struktur kwasu różniących się wyjściowymi wartościami kątów torsyjnych θ_1 i θ_2 . Siedem różnych wyjściowych struktur cząsteczki MFA poddano optymalizacji geometrycznej w programie Gaussian 03W, stosując metodę funkcjonałów gęstości DFT, z funkcjonałem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G (d,p). Wyniki przeprowadzonych obliczeń zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki obliczeń optymalizacyjnych przeprowadzonych metodą DFT, z funkcjonałem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G (d,p)

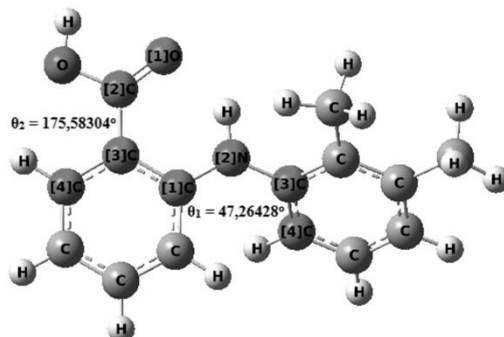
Nr	Wyjściowa struktura MFA poddawana optymalizacji	Struktury zoptymalizowane	Energia cząsteczki
1*			-786,07037232
	$\theta_1 = -103,58385^\circ, \theta_2 = 46,31448^\circ$	$\theta_1 = -86,54597^\circ, \theta_2 = -79,83750^\circ$	
2*			-786,07155409
	$\theta_1 = 90,44208^\circ, \theta_2 = -143,05357^\circ$	$\theta_1 = 47,26428^\circ, \theta_2 = 175,58304^\circ$	
3*			-786,05587610
	$\theta_1 = 5,51601^\circ, \theta_2 = 145,85419^\circ$	$\theta_1 = -27,34063^\circ, \theta_2 = 151,80231^\circ$	
4**			-786,07155410
	$\theta_1 = 99,23787^\circ, \theta_2 = 104,32381^\circ$	$\theta_1 = 47,27954^\circ, \theta_2 = 175,58623^\circ$	
5**			-786,07055806
	$\theta_1 = 99,23787^\circ, \theta_2 = -180,00000^\circ$	$\theta_1 = 107,50212^\circ, \theta_2 = -76,77360^\circ$	
6***			-786,07155303
	$\theta_1 = -46,02463^\circ, \theta_2 = -69,99162^\circ$	$\theta_1 = -45,95046^\circ, \theta_2 = -75,46273^\circ$	
7***			-786,07155296
	$\theta_1 = 62,02320^\circ, \theta_2 = 166,58432^\circ$	$\theta_1 = 45,90109^\circ, \theta_2 = 175,45565^\circ$	

*struktury wyjściowe MFA zaczerpnięte z Banku Danych Białkowych (PDB)

**struktury wyjściowe MFA zdefiniowane w programie GaussView 3.09

***struktury wyjściowe MFA zaczerpnięte z wyników analizy konformacyjnej (rys. 2)

Na podstawie przedstawionych wyników ustalono, że konformacją kwasu mefenamowego o najniższej energii (według obliczeń komputerowych przeprowadzonych metodą DFT, z funkcjonałem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G (d,p)) jest ta, w której wartości kątów torsyjnych θ_1 i θ_2 wynoszą odpowiednio w przybliżeniu ok. 47° i 175° (struktury 2 i 4, tabela 1). Strukturę cząsteczki o najniższej energii przedstawiono na rys. 4.

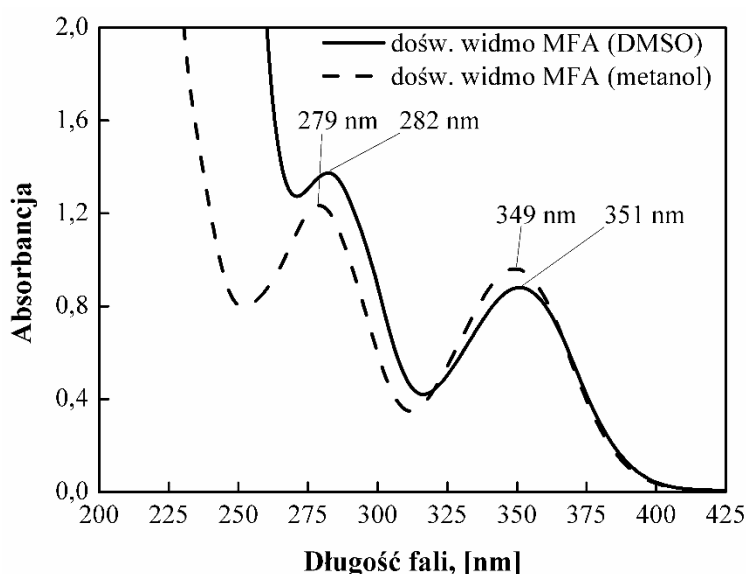


Rys. 4. Geometria cząsteczki kwasu mefenamowego o najniższej energii (wizualizacja: program GaussView 3.09)

Wyniki analizy konformacyjnej i optymalizacji geometrycznej potwierdziły, że korzystnym energetycznie jest koplarnie położenie atomów grupy $-\text{COOH}$ względem pierścienia aromatycznego. To przestrzenne ułożenie sprzyja tworzeniu wewnętrznego wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej a atomem wodoru drugorzędowej grupy aminowej. Silna tendencja do tworzenia tego wiązania wynika z faktu powstawania sześciocząłowego pierścienia chelatowego. Jego obecność wyjaśnia charakterystyczne cechy widma IR MFA, tj. przesunięcie położenia pasm od drgań typowych dla grupy aminowej i karbonylowej.

3.3 BADANIA SPEKTRALNE - WIDMA UV/VIS

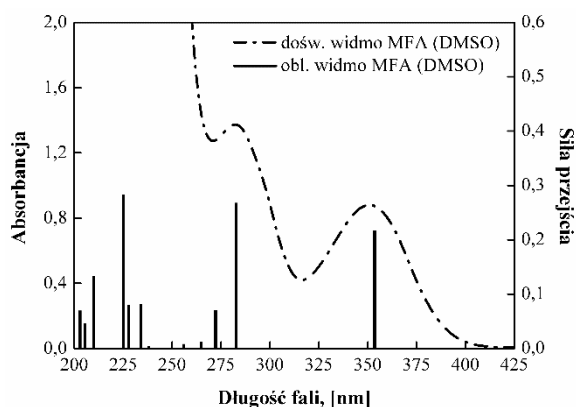
Na rys. 5 przedstawiono i porównano widma UV-VIS roztworów kwasu mefenamowego w metanolu i DMSO.



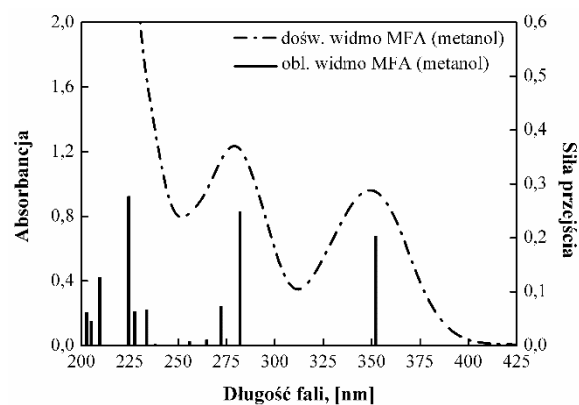
Rys. 5. Widma UV-VIS roztworów kwasu mefenamowego w DMSO i metanolu

W widmie kwasu mefenamowego obecne są trzy pasma absorpcji: pasmo I w zakresie 312-375 nm, pasmo II w zakresie 262–300 nm i pasmo III poniżej 260 nm. Można zauważyć, że w zakresie długości fal poniżej 312 nm występują różnice w przebiegu linii spektralnych widm roztworów w różnych rozpuszczalnikach. Powyżej 312 nm przebieg linii spektralnych jest bardzo zbliżony. W widmie roztworu w DMSO, powyżej 275 nm, obserwuje się nieznaczne przesunięcie batochromowe pasma absorpcji w porównaniu do widma roztworu metanolowego kwasu mefenamowego. Można to wyjaśnić wpływem polarności rozpuszczalnika na położenie maksimum absorpcji [28].

W celu zilustrowania przejść pomiędzy stanami elektronowymi cząsteczki kwasu mefenamowego modelowano absorpcyjne widmo elektronowe. Dla cząsteczki MFA o najniższej energii (rys. 4) przeprowadzono obliczenia energii stanów wzbudzonych metodą DFT, z funkcjonalem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G (d,p), rozważając liczbę przejść pomiędzy stanami elektronowymi (N) równą 30. Widma elektronowe modelowano, uwzględniając wpływ rozpuszczalnika (odpowiednio metanolu lub DMSO). Porównanie doświadczalnych i obliczonych widm kwasu mefenamowego przedstawiono na rys. 6-7.



Rys. 6. Doświadczalne i obliczone widmo UV-VIS MFA (rozpuszczalnik: DMSO)



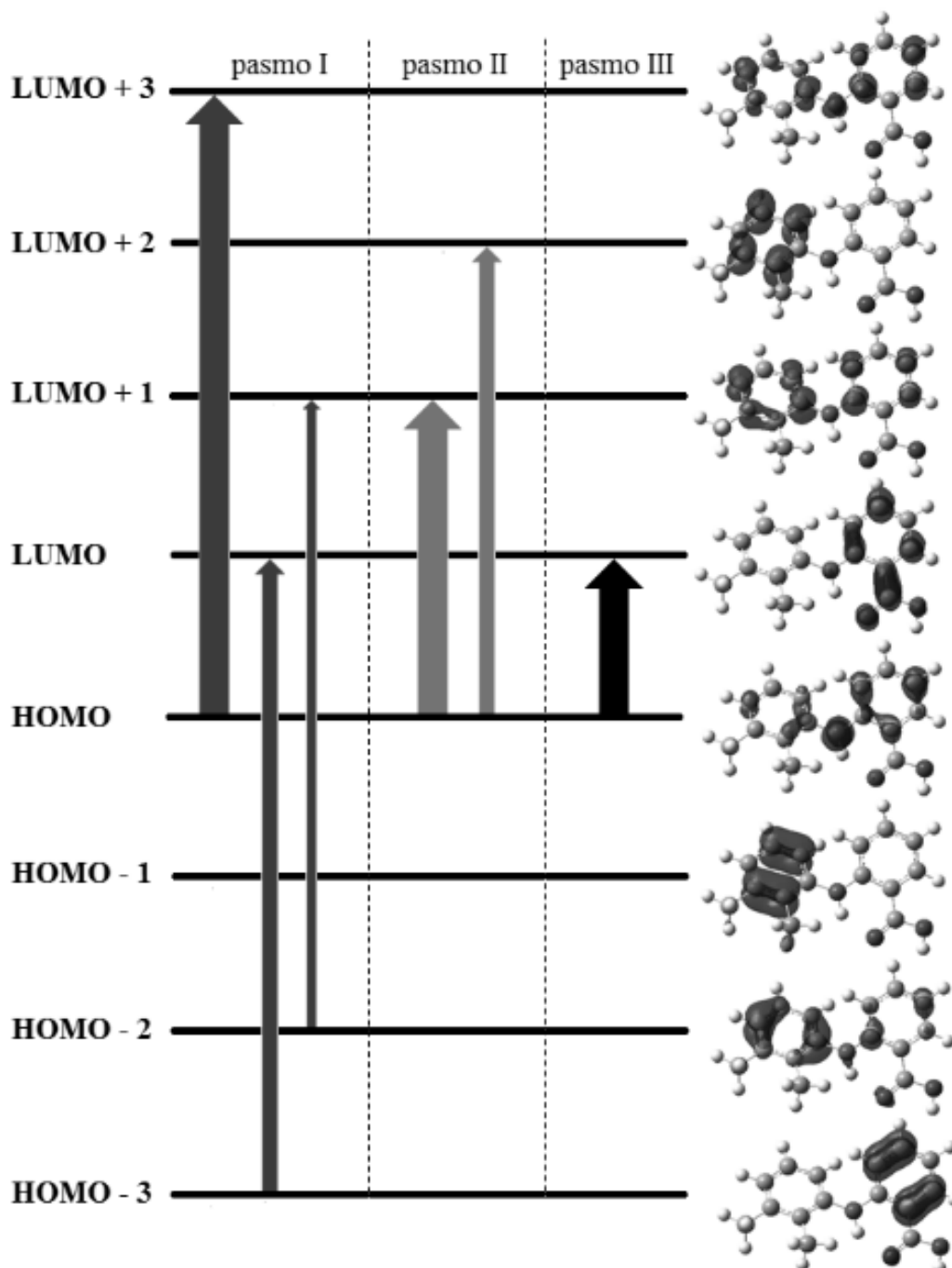
Rys. 7. Doświadczalne i obliczone widmo UV-VIS MFA (rozpuszczalnik: metanol)

W tabeli 2 wskazano przejścia pomiędzy stanami elektronowymi odpowiadające położeniu maksimum pasm absorpcyjnych w widmach doświadczalnych, wynikające z obliczeń przeprowadzonych programem Gaussian.

Tabela 2. Przejścia pomiędzy stanami elektronowymi w cząsteczce kwasu mefenmowego, aktywne w widmie elektronowym

Pasma	Rozpuszczalnik	Położenie maksimum pasma, [nm]		Przejścia między orbitalami
		widmo doświadczalne	widmo obliczone	
I	metanol	349	352	HOMO → LUMO
	DMSO	351	354	
II	metanol	279	282	HOMO → LUMO + 1
	DMSO	282	283	HOMO → LUMO + 2
III	metanol	200-250	224	HOMO → LUMO + 3
	DMSO		225	HOMO - 3 → LUMO HOMO - 2 → LUMO + 1

Ilustrację rozkładu gęstości elektronicznej wybranych poziomów energii orbitalnych i przejść pomiędzy nimi przedstawiono na rys. 8.

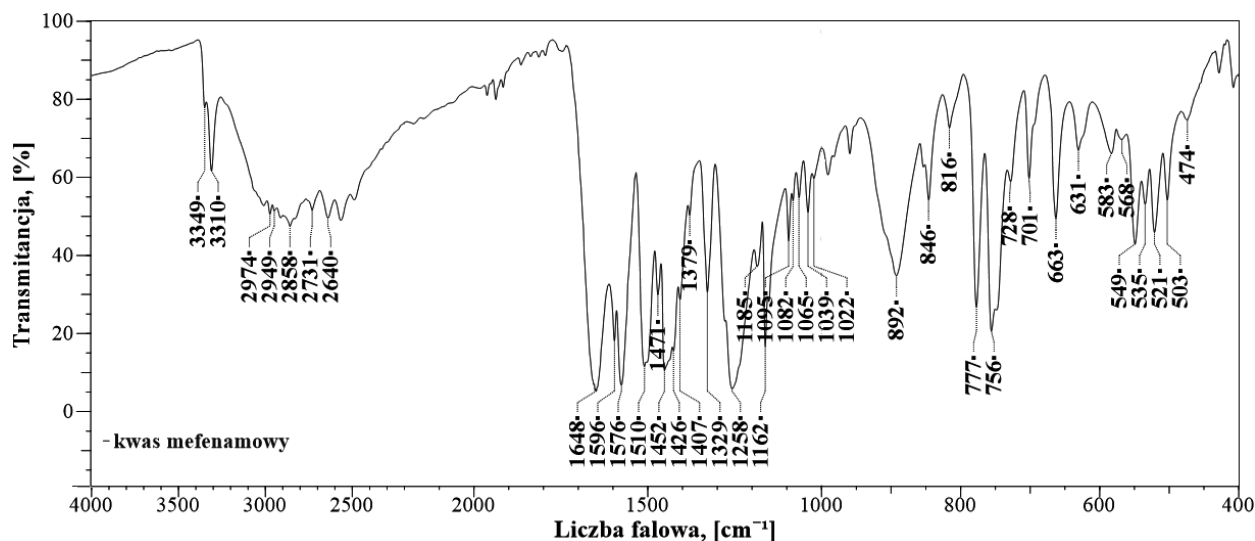


Rys. 8. Wybrane poziomy energii orbitalnych i przejścia pomiędzy nimi (na podstawie obliczeń programem Gaussian; szerokość linii odpowiada wkładowi poszczególnych przejść w intensywność maksimum absorpcji)

Ze względu na podobieństwo strukturalne do kwasu N-fenylantranilowego można wykazać, że pasmo I jest związane z przejściem $\pi \rightarrow \pi^*$ wewnątrz heterocyklicznego ugrupowania, tworzonego w wyniku wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego. Natomiast pasmo II przypisane może być przejściu $\pi \rightarrow \pi^*$ układu benzenoidowego cząsteczki kwasu mefenamowego. Położenie maksimum pasma I przy większej długości fali w porównaniu do pasma II, wskazuje na większą delokalizację elektronów π w pierścieniu tworzonego w wyniku obecności wiązania wodorowego [29].

3.4 BADANIA SPEKTRALNE - WIDMA W PODCZERWIENI

Doświadczalne widmo IR kwasu mefenamowego zostało przedstawione na rys. 9.



Rys. 9. Widmo IR kwasu mefenamowego (pastylka z KBr)

W widmie IR kwasu mefenamowego można wyodrębnić pasma drgań charakterystyczne dla pierścieni aromatycznych, podstawników metylowych w pierścieniu, grupy karboksylowej i drugorzędowej grupy aminowej.

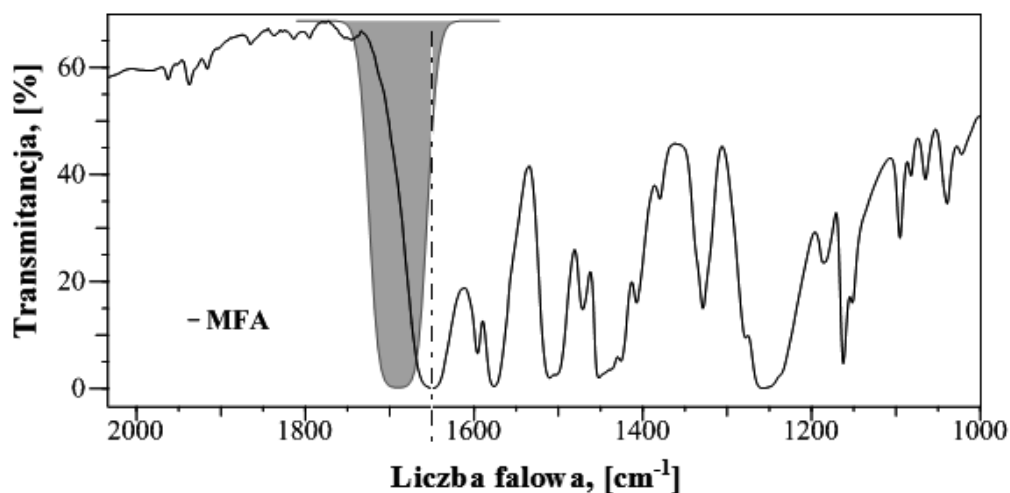
Szczegółową interpretację widma IR kwasu mefenamowego przeprowadzono na podstawie danych literaturowych ([1-2, 10, 19, 30-33]) oraz symulacji drgań w obliczonym widmie IR cząsteczki kwasu mefenamowego o najniższej energii w programie Gaussian metodą DFT z funkcjonalem hybrydowym B3LYP i bazą funkcyjną 6-311G+ (d,p).

Drgania związane z grupą karboksylową

W widmie IR kwasu mefenamowego obecne jest szerokie pasmo w zakresie 3300–2500 cm^{-1} , które związane jest z drganiami rozciągającymi O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) w grupie $-\text{COOH}$. Postać tego pasma jest charakterystyczna dla aromatycznych kwasów karboksylowych ze względu na sprzężenie występujące pomiędzy grupą karboksylową a pierścieniem. Pasma poniżej 2731 cm^{-1} są pasmami nadtonów i drgań kombinacyjnych O-H.

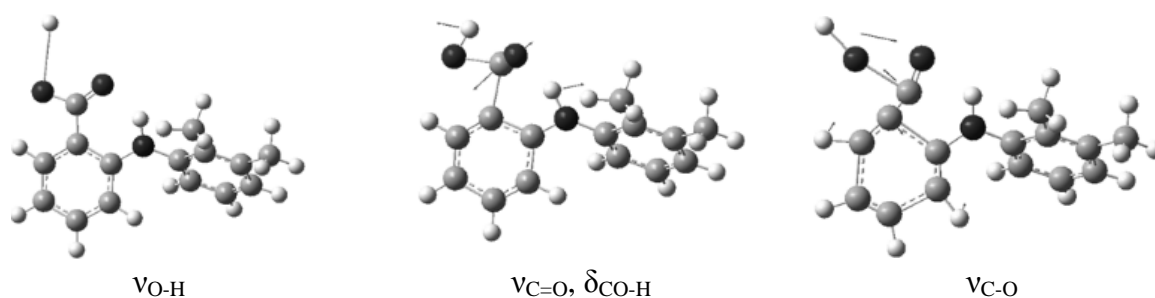
Położenie pasma od drgań rozciągających $\text{C}=\text{O}$ ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) przy niższej częstotliwości (1648 cm^{-1}) w porównaniu do typowych związków karbonylowych (rys. 10) wskazuje na zaangażowanie tej grupy w wewnętrzne wiązanie wodorowe. Potwierdza to wnioski wynikające z przeprowadzonej analizy konformacyjnej.

Do charakterystycznych dla grupy karboksylowej pasm należą także sprzężone dwa pasma: drgań deformacyjnych CO-H ($\delta_{\text{CO-H}}$) i drgań rozciągających C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) oraz pasmo drgań zginających poza płaszczyznę O-H ($\pi_{\text{O-H}}$), którym w widmie kwasu mefenamowego przypisać można pasma przy odpowiednio 1426 i 1329 cm^{-1} oraz 892 cm^{-1} .



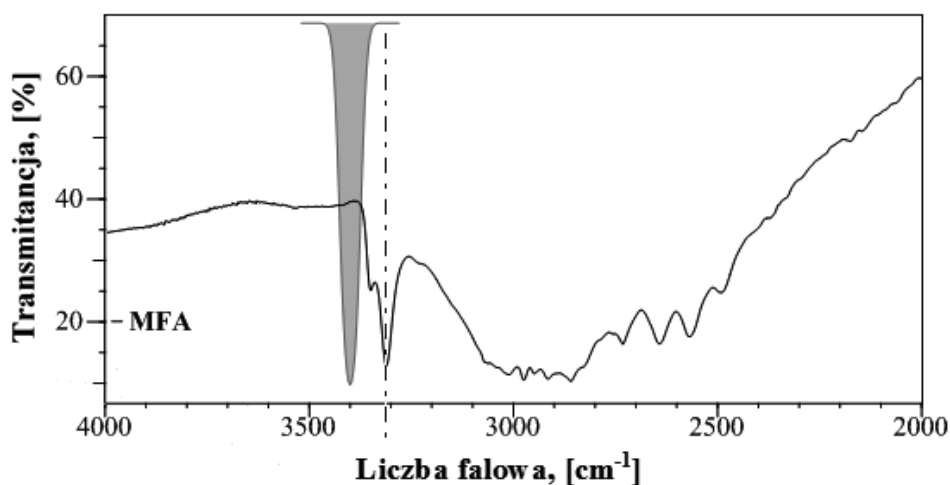
Rys. 10. Położenie pasma drgań rozciągających C=O w doświadczalnym widmie IR kwasu mefenamowego (linia przerywana) w stosunku do typowego zakresu występowania pasma od tych drgań w aromatycznych kwasach karboksylowych (pole szare) – na podstawie analizy z wykorzystaniem programu AnalyzeIt IR KnowItAll® Informatics System

Schematyczną ilustrację drgań charakterystycznych dla grupy –COOH w cząsteczce kwasu mefenamowego przedstawiono na rys. 11.



Rys. 11. Ilustracja drgań typowych dla grupy karboksylowej w cząsteczce kwasu mefenamowego (na podstawie zamodelowanego widma IR)

Drgania związane z drugorzędową grupą aminową

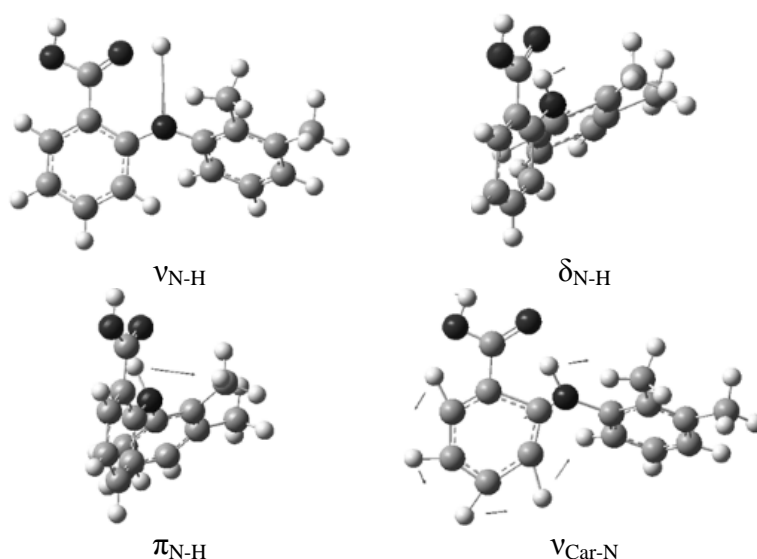


Rys. 12. Położenie pasma drgań rozciągających N-H w doświadczalnym widmie IR kwasu mefenamowego (linia przerywana) w stosunku do typowego zakresu występowania pasma od tych drgań w aminach aromatycznych (pole szare) - na podstawie analizy z wykorzystaniem programu AnalyzeIt IR KnowItAll® Informatics System

Od drgań rozciągających grupy aminowej N-H ($\nu_{\text{N-H}}$) pochodzą pasma przy 3349 i 3310 cm^{-1} . Dwa pasma wskazują, że badana próbka kwasu mefenamowego to mieszanina odmian polimorficznych z dominującym udziałem odmiany polimorficznej I, dla której charakterystyczne jest pasmo przy ok. 3312 cm^{-1} . Dla formy II natomiast przy ok. 3347 cm^{-1} [1-2, 10, 13]. Przesunięcie pasma od drgań $\nu_{\text{N-H}}$ w kierunku mniejszych częstości w porównaniu do typowych amin (rys. 12), podobnie jak w przypadku grupy C=O, wskazuje na zaangażowanie tego ugrupowania w silne, wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe.

Typowe dla grupy aminowej są także pasma od drgań deformacyjnych N-H: zginające w płaszczyźnie ($\delta_{\text{N-H}}$) i poza płaszczyznę (wachlarzowe, $\pi_{\text{N-H}}$). W widmie kwasu mefenamowego drganiom tym można przypisać pasma odpowiednio przy 1510, 631 i 583 cm^{-1} . Pasma, o dużej intensywności przy 1258 cm^{-1} związane jest natomiast z drganiami rozciągającymi $\text{C}_{\text{ar}}\text{-N}$ ($\nu_{\text{Car-N}}$), typowymi dla amin aromatycznych, na które nakładają się także drgania deformacyjne O-H w płaszczyźnie, w grupie -COOH.

Schematyczną ilustrację drgań w cząsteczce kwasu mefenamowego, związanych z grupą aminową przedstawiono na rys. 13.

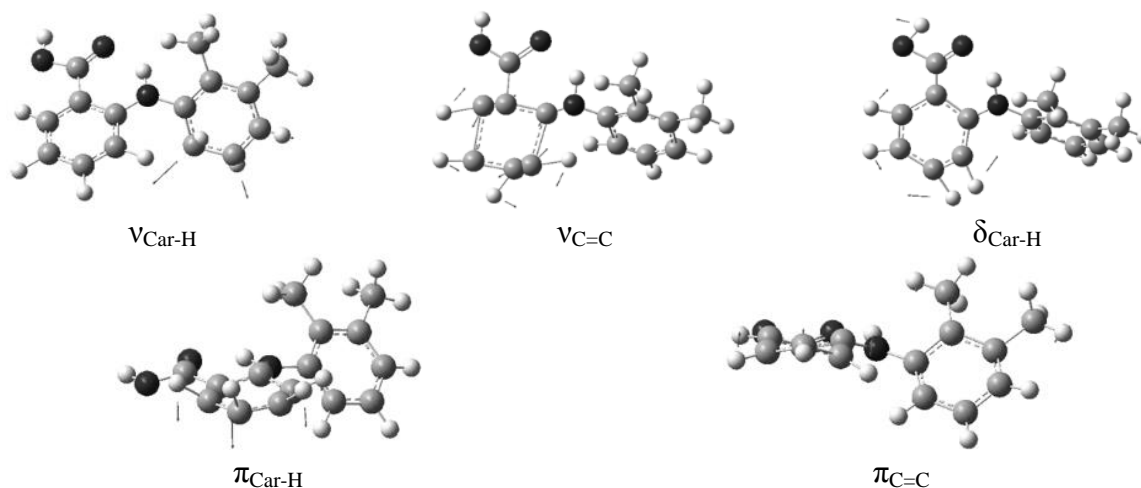


Rys. 13. Ilustracja drgań typowych dla grupy aminowej w cząsteczce kwasu mefeanmowego (na podstawie zamodelowanego widma IR)

Drgania związane z pierścieniem aromatycznym

Aromatycznym, rozciągającym drganiom $\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$ ($\nu_{\text{Car-H}}$) można przypisać pasmo położone przy 3009 cm^{-1} . Szereg pasm o małej intensywności w zakresie 2000–1730 cm^{-1} stanowią natomiast typowe dla układów aromatycznych pasma nadtonów i drgań kombinacyjnych C-H. Zbiór pasm o małej intensywności przy częstościach 1095, 1082, 1065, 1039 i 1022 cm^{-1} związany jest z drganiami zginającymi $\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$ ($\delta_{\text{Car-H}}$) w płaszczyźnie pierścienia. Od drgań zginającymi $\text{C}_{\text{ar}}\text{-H}$ ($\pi_{\text{Car-H}}$) poza płaszczyznę pierścienia pochodzą pasma o średniej intensywności przy 777 i 756 cm^{-1} . Pasma położone przy 1596, 1576, 1471 i 1452 cm^{-1} można przypisać aromatycznym drganiom rozciągającym C=C ($\nu_{\text{C=C}}$) wewnątrz pierścieni aromatycznych. Natomiast pasma przy częstościach 728, 701 i 663 cm^{-1} mogą być wynikiem drgań deformacyjnych pierścieni, wyginających C=C poza płaszczyznę ($\pi_{\text{C=C}}$).

Schematyczną ilustrację wybranych drgań w cząsteczce kwasu mefenamowego, typowych dla pierścienia aromatycznego przedstawiono na rys. 14.

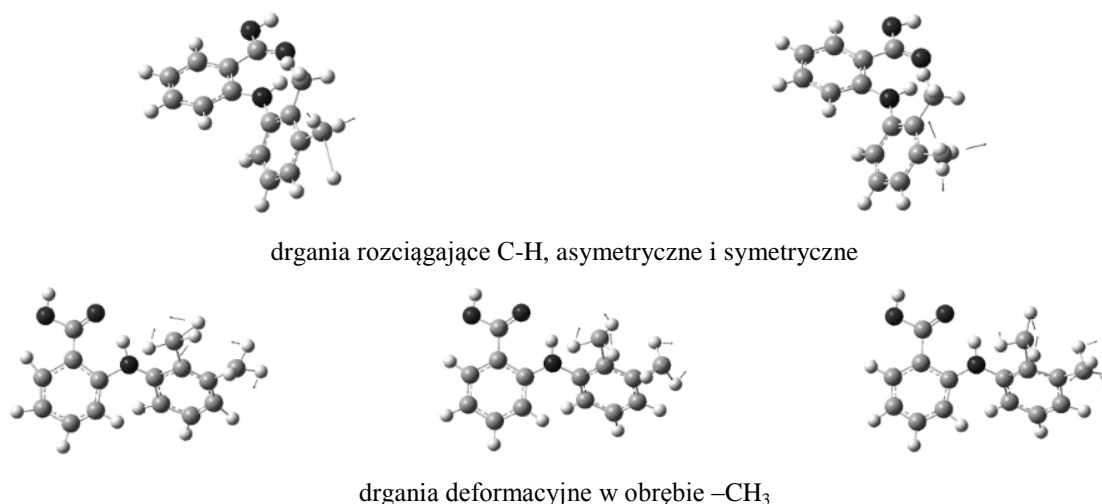


Rys. 14. Ilustracja przykładowych drgań, typowych dla pierścieni aromatycznych w cząsteczce kwasu mefenamowego (na podstawie zamodelowanego widma IR)

Drgania związane z podstawnikami metylowymi

W widmie IR kwasu mefenamowego można wskazać także pasma, które związane są z drganiami charakterystycznymi dla grupy metylowej. Drgania rozciągające C-H (ν_{C-H}) w obrębie grupy metylowej sprawiają, że szerokie pasmo w zakresie 3300–2500 cm^{-1} jest poszarpane ze względu na nałożenie tych oscylacji z drganiami O-H w obrębie grupy karboksylowej. Pasma przy 2974, 2949 i 2912 cm^{-1} przypisane mogą być asymetrycznym drganiom rozciągającym, natomiast pasmo przy 2859 cm^{-1} symetrycznym drganiom rozciągającym C-H w obrębie grup metylowych. Wskazanie na widmie doświadczalnym kwasu mefenamowego pasm związanych wyłącznie z drganiami deformacyjnymi C-H w obrębie grup metylowych nie jest możliwe, gdyż występują one w rejonach drgań charakterystycznych dla pierścienia aromatycznego. Deformacyjnym drganiom C-H może odpowiadać pasmo przy 1379 cm^{-1} . Również pasmo przy 1452 cm^{-1} może być związane z drganiami C-H w obrębie grup metylowych, przy czym nakłada się ono z drganiami rozciągającymi $\nu_{C=C}$ pierścienia aromatycznego.

Schematyczną ilustrację wybranych drgań w cząsteczce MFA, typowych dla grupy metylowej przedstawiono na rys. 15.



Rys. 15. Ilustracja przykładowych drgań, typowych dla grup metylowych, w cząsteczce kwasu mefenamowego (na podstawie zamodelowanego widma IR)

4. PODSUMOWANIE

Wykorzystano elementy modelowania komputerowego do badań konformacji cząsteczki kwasu mefenamowego, optymalizacji geometrycznej i analizy cech spektroskopowych tego związku.

Na podstawie badań konformacyjnych przeprowadzonych metodą półempiryczną AM1 oraz optymalizacji geometrycznej cząsteczki kwasu mefenamowego metodą DFT zauważono, że najkorzystniejszym pod względem minimalnej energii jest koplanarne położenie grupy –COOH w stosunku do pierścienia aromatycznego, potwierdzające możliwość tworzenia wewnętrznego wiązania wodorowego. Obecność tego wiązania tłumaczy przesunięcie położenia pasm od drgań typowych dla grup aminowej i karboksylowej na doświadczalnym widmie IR kwasu mefenamowego. Absorpcyjne widma elektronowe kwasu mefenamowego modelowano dla cząsteczki o najniższej energii, uwzględniając wpływ rozpuszczalnika (odpowiednio metanolu lub DMSO). Zgodność obserwowana pomiędzy widmami doświadczalnymi i obliczonymi pozwoliła na udokumentowanie i zilustrowanie rozkładu gęstości elektronowej wybranych poziomów energii orbitalnych i przejść pomiędzy nimi odpowiadających głównym pasmom absorpcyjnym doświadczalnego widma UV-VIS kwasu mefenamowego.

Literatura

1. V. R. Cunha, C. M. Izumi, P. A. Petersen, A. Magalhaes, M. L. Temperini, H. M. Tetrilli, V. R. Constantino, Mefenamic acid anti-inflammatory drug: probing its polymorphs by vibrational (IR and Raman) and solid-state NMR spectroscopies, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 118, No. 16, 2014, p. 4333–4344.
2. S. Jabeen, T. J. Dines, S. A. Leharne, B. Z. Chowdhry, Raman and IR spectroscopic studies of fenamates – Conformational differences in polymorphs of flufenamic acid, mefenamic acid and tolfenamic acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 96, 2012, p. 972–985.
3. G. Rajtar–Cynke, *Farmakologia. Podręcznik dla studentów i absolwentów*, Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2007.
4. W. Janiec, *Kompendium farmakologii*, Wydawnictwa Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
5. I. Korzeniewska–Rybicka, I. Kurowska–Jastrzębska, W. Masełbas, *Leksykon leków cz. 1*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004.
6. D. K. Demertzi, D. H. Litinal, M. Staninska, A. Primikiri, C. Kotoglov, M. A. Demertzis, Anti-oxidant, in vitro, in vivo Anti- Inflammatory Activity and Antiproliferative Activity of Mefenamic Acid and its Metal Complexes with Manganese(II), Cobalt(II), Nickel(II), Copper(II) and Zinc(II), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 24, No. 3, 2009, p. 742–752.
7. A. D. S. Hernández, H. R. G. Salazar, D. A. M. Galindo, A. R. Hernandez, R. M. Martinez, J. G. Esquivel, L. L. V. Velazquez, L. M. B. Rodriguez, F. E. Gómez, A. R. Martinez, et al., Antitumor Effect of Meclofenamic Acid on Human Androgen-independent Prostate Cancer: a Preclinical Evaluation, *International Urology and Nephrology*, Vol. 44, No. 2, 2012, p. 471–477.

8. D. H. Woo, I. S. Han, G. Jung, Mefenamic Acid-induced Apoptosis in Human Liver Cancer Cell-lines through Caspase-3 Pathway, *Life Science*, Vol. 75, No. 20, 2004, p. 2439–2449.
9. A. Hussein, S. Al.-Janabi, Elevation of antidermatophytic action of mefenamic acid by cobalt ions, *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 42, No. 6, 2010, p. 351–353.
10. R. K. Gilpin, W. Zhou, Infrared studies of the thermal conversion of mefenamic acid between polymorphic states, *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 37, No.1, 2005, p. 53–59.
11. R. Panchagnula, P. Sundaramurthy, O. Pillai, S. Agrawal, Y. A. Raj, Solid-State Characterization of Mefenamic Acid, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 93, No. 4, 2004, p. 1019–1029.
12. S. SeethaLekshmi, T. N. G. Row, Conformational Polymorphism in a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Mefenamic Acid, *Crystal Growth Design*, Vol. 12, No. 8, 2012, p. 4283-4289.
13. R. K. Gilpin, W. Zhou, Infrared studies of the polymorphic states of the fenamates, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 37, No. 3, 2005, p. 509–515.
14. A. Tarushi, Z. Karafrou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, A. N. Papadopoulos, D. P. Kessissoglou, Antioxidant capacity and DNA-interaction studies of zinc complexes with a non-steroidal anti-inflammatory drug, mefenamic acid, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 128, 2013, p. 85–96.
15. F. X. Campos, M. R. S. Soares, A. J. Terezo, A. B. Siqueira, Synthesis, characterization, and antioxidant evaluation of solid-state mefenamates of some bivalent metals, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 115, No. 1, 2014, p. 167–176.
16. J. Feng, X. Du, H. Liu, X. Sui, C. Zhang, Y. Tang, J. Zhang, Manganese-mefenamic acid complexes exhibit high lipoxygenase inhibitory activity, *Dalton Transactions*, Vol. 43, 2014, p. 10930–10939.
17. X. Totta, A. A. Papadopoulou, A. G. Hatzidimitriou, A. Papadopoulos, G. Psomas, Synthesis, structure and biological activity of nickel(II) complexes with mefenamato and nitrogen-donor ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 145, 2015, p. 79–93.
18. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A. N. Papadopoulos, C. A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, Non-steroidal antiinflammatory drug-copper(II) complexes: Structure and biological perspectives, *Dalton Transactions*, Vol. 40, 2011, p. 8555–8568.
19. H. Bojarowicz, Z. Kokot, A. Surdykowski, Complexes of Fe(III) ions with mefenamic acid, *Complexes of Fe(III) ions with mefenamic acid*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 15, No. 3, 1996, p. 339–342.
20. F. Dimiza, A. N. Papadopoulos, V. Tangoulis, V. Psycharis, C. P. Raptopoulou, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, Biological evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs-cobalt(II) complexes, *Dalton Transactions*, Vol. 39, No. 19, 2010, p. 4517–4528.
21. V. Dokorou, Z. Ciunik, U. Russo, D. Kovala-Demertzi, Synthesis, crystal structures and spectroscopic studies of diorganotin derivatives with mefenamic acid. Crystal and molecular structures of 1,2:3,4-di- μ -2-[(2,3-dimethylphenyl)amino]-benzoato-O,O-1,3-bis-2-[-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoato-O-1,2,4:2,3,4-di- μ -3-oxo-tetrakis[di-methyltin(IV)] and 1,2:3,4-di- μ -2-[-[-[(2,3-dimethylphenyl)amino]-benzoato-O,O-1,3-bis-2-[-[-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoato-O-1,2,4:2,3,4-di-3-oxo-tetrakis[di-n-butyltin(IV)]], *Journal of Organometallic Chemistry*, Vol. 630, 2001, p. 205–214.

22. P. C. Andrews, R. L. Ferrero, P. C. Junk, I. Kumar, Q. Luu, K. Nguyen, J. W. Taylor, Bismuth(III) complexes derived from non-steroidal anti-inflammatory drugs and their activity against *Helicobacter pylori*, *Dalton Transactions*, Vol. 39, 2010, p. 2861–2868.
23. W. Brzyska, W. Ożga, Preparation and properties of rare earth element complex with mefenamic acid, *Polish Journal of Chemistry*, Vol. 67, 1993, p. 619–625.
24. W. Brzyska, W. Ożga, Thermal decomposition of yttrium and lanthanide complexes with mephenamic acid, *Thermochimica Acta*, Vol. 195, 1992, p. 149–155.
25. F. X. Campos, A. L. C. S. Nascimento, T. A. D. Colman, D. A. Ga'lico, O. Treu-Filho, F. J. Caires, A. B. Siqueira, M. Ionashiro, Synthesis, characterization and thermal behavior of solid state of some mefenamate of trivalent lanthanides (La, Ce, Pr and Nd), *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2015, doi:10.1007/s10973-015-4956-7.
26. A. Topaçli, S. Ide, Molecular structures of metal complexes with mefenamic acid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 21, No. 5, 1999, p. 975–982.
27. W. Brzyska, *Wstęp do chemii koordynacyjnej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 1996.
28. T. Nowicka–Jankowska, E. Wieteska, K. Gorczyńska, A. Michalik, *Spektrofotometria UV/VIS w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1988.
29. N. Rajendiran, T. Balasubramanian, Dual fluorescence of N-phenylanthranilic acid: Effect of solvents, pH and beta–cyclodextrin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 68, No. 3, 2007, p. 867–876.
30. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, PWN, Warszawa, 2007.
31. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, 1986.
32. A. I. Vogel, *Preparatyka organiczna*, WNT, Warszawa, 1984.
33. B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2004.

METODA ODWROTNA W ESTYMACJI PARAMETRÓW MODELU IZOTERMY ADSORPCJI

Marek Leśko^{1a}

¹ Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza

^a marlesko@onet.eu

1. WSTĘP

W modelu dynamiki chromatografii kluczową rolę pełni opis równowagi adsorpcyjnej. Jeżeli proces powierzchniowy adsorpcja – desorpcja, przebiega znacznie szybciej niż inne etapy transportu masy, wtedy stosowany jest model izoterm adsorpcji. W przeciwnym przypadku (proces powierzchniowy adsorpcja – desorpcja przebiega wolno) należy zaproponować adekwatną kinetykę adsorpcji. Istnieje wiele metod pomiaru równowagi adsorpcji i wyznaczania matematycznego opisu procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja.

Niniejsza praca poświęcona jest wykorzystaniu metody odwrotnej w estymacji parametrów modeli izoterm adsorpcji na przykładzie modelowych układów chromatograficznych. Metoda odwrotna jest numeryczną metodą identyfikacji parametrów równań izoterm adsorpcji a tym samym całego modelu opisującego równowagę procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja. Po raz pierwszy w chromatografii została zastosowana na początku lat 90 – tych XX wieku przez Dose i współpracowników [1]. Od tego momentu metoda odwrotna była wielokrotnie używana do wyznaczenia izoterm jednoskładnikowych, dwuskładnikowych a nawet trójskładnikowych [2-9]. Nazywana jest również metodą dopasowania do piku i ta nazwa wyraża jej ideę. Jest ona, bowiem klasycznym przykładem rozwiązywania problemu odwrotnego. Polega na estymowaniu wartości parametrów modelu izoterm adsorpcji na podstawie przeładowanych profili pików chromatograficznych. Oznacza to takie dobranie wartości parametrów równania izoterm adsorpcji, aby uzyskać jak najlepszą zgodność między symulowanymi profilami (otrzymanymi z rozwiązania modelu) a odpowiadającymi profilami stężeniowymi uzyskanymi w trakcie wykonywanych doświadczeń laboratoryjnych. Metoda dopasowania do piku wymaga jednak, wcześniej założenia odpowiedniego mechanizmu procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja a tym samym postaci matematycznej modelu izoterm adsorpcji. Model ten na etapie estymacji parametrów jest tylko hipotezą, która jest potwierdzana lub odrzucana na podstawie uzyskanej zgodności między obliczonymi profilami stężeniowymi a odpowiadającymi pikami eksperymentalnymi. W przypadku uzyskania niezadawalającej zgodności należy zaproponować nowy model izoterm adsorpcji i powtórzyć estymację. Taką czynność powtarza się aż otrzyma się model, który w sposób poprawny przewiduje rozkład stężeń na wylocie z kolumny chromatograficznej. W ten sposób uzyskuje się model izoterm adsorpcji z wartościami parametrów.

Wielu autorów [10-13], którzy zajmowali się metodą odwrotną podkreśla jej zalety i wskazuje, jako alternatywny sposób uzyskiwania opisu równowagi adsorpcyjnej w układzie chromatograficznym w stosunku do tzw. eksperymentalnych metod takich jak metoda analizy frontalnej, metoda elucji punktów charakterystycznych czy metoda perturbacji. Przewaga metody odwrotnej nad wymienionymi sposobami wyznaczania izoterm adsorpcji polega na ograniczeniu ilości doświadczeń laboratoryjnych do minimum koniecznego do estymacji parametrów modelu izoterm adsorpcji oraz później do przeprowadzenia walidacji modelu. Cała zasadnicza i kluczowa część oparta jest na obliczeniach komputerowych. Metoda dopasowania do piku posiada również wady. Jak stwierdzono powyżej wymaga wcześniej założenia odpowiedniego modelu izoterm adsorpcji. Ze względu na dużą różnorodność izoterm może to nastroczać pewnych problemów i wydłużyć czas wyznaczenia właściwej izoterm adsorpcji. Głównym mankamentem metody dopasowania do piku jest wyznaczenie wartości parametrów modelu izoterm adsorpcji, z których rozpoczyna się estymacja. Aby estymacja mogła zakończyć się sukcesem pik obliczony na podstawie zadanych wartości parametrów musi mieć podobny kształt jak pik eksperymentalny i przede wszystkim musi być zagnieżdżony w piku eksperymentalnym. Dobór tych parametrów dokonywany jest metodą prób i błędów. Im większa jest liczba parametrów tym trudniej znaleźć taki zestaw, aby spełnić wymienione wyżej warunki. Ponadto niedoskonałości metody odwrotnej związane są bezpośrednio z zastosowanym algorytmem optymalizacyjnym.

W niniejszej pracy metoda odwrotna została zastosowana w estymacji parametrów jednoskładnikowej izoterm adsorpcji na podstawie pików chromatograficznych otrzymanych w trybie elucji gradientowej celem między innymi jej testowania na przykładzie różnych układów chromatograficznych. W tym miejscu należy stanowczo podkreślić to, że według dostępnej wiedzy metoda odwrotna do tej pory nie była stosowana do wyznaczania modelu izoterm adsorpcji w przypadku elucji prowadzonej w trybie gradientowym. W ostatnim czasie dokonano adaptacji metody odwrotnej dla tego typu chromatografii [14, 15]. Przeprowadzono tam szczegółowe rozważania dotyczące różnych aspektów użycia metody odwrotnej w estymacji parametrów modeli izoterm adsorpcji na podstawie przeładowanych profili pików chromatograficznych otrzymanych bezpośrednio w elucji prowadzonej w trybie gradientowym. Okazało się, że w tej technice chromatograficznej metoda odwrotna również pozwala na uzyskanie poprawnego opisu równowagi adsorpcyjnej.

Rozważano chromatografię HPLC (ang. high performance liquid chromatography) oraz UHPLC (ultra – high pressure chromatography). Jako substancje chromatografowane wybrano cztery związki (cykloheptanon – C7, 2-naftalenosulfonian sodu – SNS, chlorek benzylotrietyloamoniowy – BTEAC, omeprazol – OM), które należy traktować jako substancje modelowe. W obu technikach chromatograficznych dla tych samych substancji chromatografowanych stosowano ten sam program gradientu. Otrzymano w ten sposób osiem zestawów danych eksperymentalnych, przy czym każdy z czterech zestawów różnił się od pozostałych czterech kolumną chromatograficzną przy użyciu, której został uzyskany. Ze względu na podobieństwo odpowiadających układów chromatograficznych (z trzech elementów składających się na układ chromatograficzny inny był jedynie adsorbent) celem było również określenie podobieństw oraz różnic między chromatografią HPLC a UHPLC w kontekście samego opisu równowagi termodynamicznej, jak i również wyznaczania modelu izoterm adsorpcji za pomocą metody odwrotnej. Sprawdzone czy możliwe jest zastosowanie tego samego modelu izoterm adsorpcji w odpowiadających układach chromatograficznych.

2. MODEL MATEMATYCZNY

Symulacja pracy kolumny chromatograficznej wymaga zastosowania odpowiedniego modelu dynamiki kolumny chromatograficznej. Użycie metody odwrotnej w wyznaczaniu izoterm adsorpcji bądź optymalizacja matematyczna procesu chromatograficznego preferuje zastosowanie jak najprostszego modelu matematycznego. W tej pracy założono jak się później okazało poprawnie brak wszelkich oporów transportu masy oraz nieskończenie szybkie ustalenie się równowagi procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja. Na podstawie powyższych założeń najprostszym stosowanym w praktyce modelem preparatywnej kolumny chromatograficznej jest model równowagowo – dyspersyjny ED (ang. equilibrium-dispersive model). Równanie bilansu masy wymienionego modelu może zostać zapisane w następujący sposób [16]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_t) \partial q^*}{\varepsilon_t \partial t} + \frac{u \partial(c)}{\varepsilon_t \partial z} = D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (1)$$

gdzie: ε_t – porowatość całkowita, u – prędkość fazy ruchomej odniesiona do jednostkowej powierzchni przekroju poprzecznego kolumny chromatograficznej, D_a – pozorny współczynnik dyspersji wzdłużnej c i q – stężenia substancji chromatografowanej odpowiednio w fazie ruchomej i stacjonarnej.

Pozorny współczynnik dyspersji wzdłużnej obliczany był z równania:

$$D_a = \frac{uL}{\varepsilon_t N} \quad (2)$$

gdzie L to długość kolumny chromatograficznej natomiast N to liczba pólki teoretycznych. Liczba pólki teoretycznych obliczana była metodą momentów [17] w oparciu o piki chromatograficzne chromatografii analitycznej uzyskane w warunkach izokratycznych dla rozważanych stężeń modyfikatora.

Rozwiązanie równania (1) wymaga sformułowania odpowiednich warunków początkowych oraz brzegowych. Jako warunki początkowe zastosowano typowe warunki używane dla kolumn chromatograficznych. Mianowicie dla $t = 0$ otrzymuje się:

$$c(r, z) = q(r, z) = 0 \quad (3)$$

Natomiast, jako warunki brzegowe zastosowano warunki typu Danckwertsza [18], które można sformułować w następujący sposób:

$$\text{dla } z = 0 \quad uc_F(t, z = 0) - uc(t, z = 0) = -D_a \left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_{z=0} \quad (4)$$

$$\text{dla } z = L \quad D_a \left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_{z=L} = 0 \quad (5)$$

Profil stężeniowy wprowadzanej próbki był przybliżany następującymi funkcjami:

$$c_F(t, z = 0) = A_2 + (A_1 - A_2) / \left(1 + \left(\frac{t}{x_0} \right)^p \right) \quad (6)$$

$$c_F(t, z = 0) = y_0 + \frac{A}{w} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \exp\left(\left(-2 \frac{t-x_c}{w}\right)^2\right) \quad (7)$$

gdzie: A , A_1 , A_2 , x_0 , p , y_0 , x_c , w to parametry równań estymowane na podstawie zarejestrowanych profili iniekcji (rys.1).

Kształt profilu gradientu zgodnie, z którym zmieniał się udział objętościowy acetonitrylu w fazie ruchomej na wlocie do kolumny chromatograficznej można zapisać w następujący sposób:

$$\varphi(t, L = 0) = \begin{cases} \varphi_0, & 0 \leq t < t_p + t_g \\ \varphi_0 + \beta(t - t_p), & t_p \leq t < t_p + t_g \\ \varphi_0 + \Delta\varphi, & t \geq t_p + t_g \end{cases} \quad (8)$$

gdzie: φ_0 to udział modyfikatora w eluencie [v/v] w chwili początkowej gradientu natomiast $\Delta\varphi$ to zmiana jego udziału od wartości początkowej gradientu do jego wartości końcowej. Parametr β to nachylenie liniowego gradientu. Parametry t_g oraz t_p to odpowiednio czas trwania zmiany ilości modyfikatora w eluencie i czas liczony po wprowadzeniu próbki w autosamplerze do momentu, w którym gradient modyfikatora osiąga wlot kolumny chromatograficznej. Założono, że modyfikator nie ulega adsorpcji.

Model ED musi być uzupełniony równaniem izoterm adsorpcji. Z uzyskanych profili pików chromatograficznych wynika, że cykloheptanon, chlorek benzylotrietyloamoniowy, 2-naftalenosulfonian sodu charakteryzowane są przez izotermę typu I klasyfikacji według Brunaur'a [19]. Natomiast równowaga adsorpcyjna omeprazolu ustala się zgodnie z izotermą typu III. Zatem zdecydowano się zastosować izotermę bi – Langmuira (izoterma typu I) oraz izotermę BET (izoterma typu III). Użyte modele zostały zmodyfikowane do postaci uwzględniającej tryb elucji gradientowej. Postać matematyczna wymienionych w kolejności modeli przedstawia się następująco:

$$q^* = \frac{a_{0,I} \exp(-S_{a,I} \varphi) c}{1 + b_{0,I} \exp(-S_{b,I} \varphi) c} + \frac{a_{0,II} \exp(-S_{a,II} \varphi) c}{1 + b_{0,II} \exp(-S_{b,II} \varphi) c} \quad (9)$$

$$q^* = \frac{a_0 \exp(-S_a \varphi) c}{(1 - b_{L,0} \exp(-S_{b,L} \varphi) c)(1 - b_{L,0} \exp(-S_{b,L} \varphi) c + b_0 \exp(-S_b \varphi) c)} \quad (10)$$

3. DANE EKSPERYMENTALNE

Doświadczenia chromatograficzne wykonano w zakresie chromatografii HPLC oraz UHPLC. W przypadku HPLC wykorzystano chromatograf Agilent 1200 system (Palo Alto, CA, USA) wyposażony między innymi w autosampler z pętlą dozującą o pojemności 900 μ L, detektor diodowy (DAD), termostat. Natomiast dane eksperymentalne w zakresie UHPLC uzyskano przy wykorzystaniu chromatografu Waters Acquity UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) wyposażony w podobne urządzenia jak chromatograf HPLC.

Zastosowano następujące kolumny chromatograficzne:

- kolumna XBridge o wymiarach 100 x 4.6 mm wypełniona porowatą krzemionką o średniej wartości średnicy ziaren 3.5 μ m z fazą związaną C18 (HPLC)

- kolumna Acquity o wymiarach 50 x 2.1 mm wypełniona porowatą krzemionką o średniej wartości średnicy ziaren 1.7 μm z fazą związaną C18 (UHPLC)

Jako analit wykorzystano poniższe związki chemiczne:

- cykloheptanon ($\geq 99\%$) – C7
- 2-naftalenosulfonian sodu ($\geq 95\%$) – SNS
- chlorek benzylotrietyloamoniowy ($\geq 99\%$) – BTEAC
- omeprazol ($\geq 99\%$) – OM

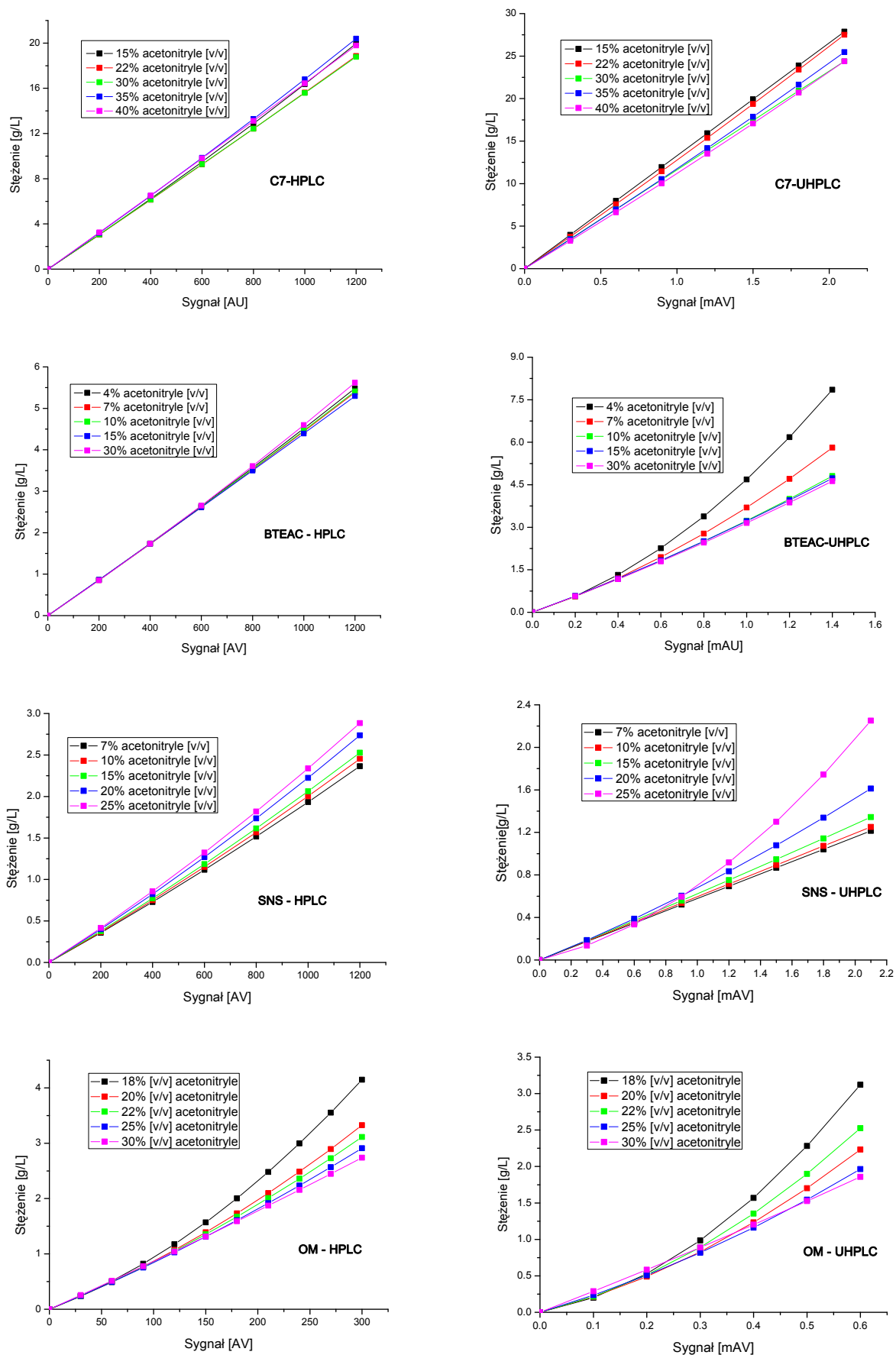
Fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i buforu fosforanowego o pH 8. W zależności od udziału acetonitrylu w fazie ruchomej, pH eluentu wahało się pomiędzy 8.07 i 8.79. Przy tych warunkach C7 jest cząsteczką neutralną elektrycznie, BTEAC ma ładunek dodatni natomiast SNS oraz OM ujemny.

Szczegółowe informacje dotyczące zakresu zmian parametrów operacyjnych w cyklach doświadczalnych znajdują się w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry przeprowadzonych doświadczeń laboratoryjnych dotyczących badań chromatograficznych w zakresie HPLC i UHPLC

Substancja		BTEAC		C7		SNS		OM	
System		HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC
warunki preparatywne	C_{inlet} [g/L]	5	5	25	25	5	5	1	1
	V_{inj} [μL]	250, 500	25, 50	250, 500	25, 50	100, 200	6, 10, 12.5	300, 400, 500	30, 40, 50
warunki analityczne	C_{inlet} [g/L]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.1	0.1
	V_{inj} [μL]	5	2	10	2	5	2	5	5
φ [%]		4	4	15	15	7	7	18	18
$\Delta\varphi$ [%]		26	26	25	25	18	18	12	12
β [%/min]		1, 2, 3	1, 2, 3	1, 3, 5	1, 3, 5	1, 3, 5	1, 3, 5	1, 2, 3	1, 2, 3

Najważniejszym elementem danych eksperymentalnych są przeładowane profile pików chromatograficznych uzyskane w trybie elucji gradientowej, które posłużyły do estymacji parametrów modeli izoterm adsorpcji. Przed dokonaniem estymacji dane eksperymentalne zostały odpowiednio przygotowane. Sygnał został przeliczony na stężenie przy wykorzystaniu krzywej kalibracyjnej. W tym miejscu należy podkreślić to, że w przypadku chromatografii gradientowej przeliczenie sygnału na stężenie i tym samym uzyskanie profili stężeniowych jest zdecydowanie trudniejsze niż w chromatografii izokratycznej. Związane jest to z wpływem składu fazy ruchomej na odpowiedź detektora. Wymagało to wykonania pięciu krzywych kalibracyjnych dla każdego układu chromatograficznego celem sprawdzenia wielkości wpływu składu fazy ruchomej na natężenie sygnału oraz jego stopień nieliniowości (rys. 1). Do przeliczenia sygnału na stężenie wybierano krzywą wyznaczoną dla udziału modyfikatora w eluencie równym 30, 15, 20, 25 % [v/v] odpowiednio dla C7, BTEAC, SNS, OM.



Rys. 1. Krzywe kalibracyjne dla wybranych związków chemicznych uzyskane dla różnych udziałów modyfikatora w fazie ruchomej

4. ROZWIĄZANIE MODELU ORAZ ESTYMACJA PARAMETRÓW MODELU IZOTERMY ADSORPCJI

Zastosowany model matematyczny dynamiki chromatografii nie ma rozwiązania analitycznego. Do jego rozwiązania zastosowano metodę kolokacji ortogonalnej na elementach skończonych [20, 21]. Wymieniona metoda uważana jest za bardzo dokładną. Jej implementację można spotkać w wielu obszarach inżynierii chemicznej. Szczegółowo została opisana przez Villadsena i Michelsena [22]. Ponadto posługiwano się również mniej dokładną, ale za to relatywnie szybką metodą rozwiązywania modelu równowagowo – dyspersyjnego opartą na różnicach skończonych zaproponowaną przez Rouchona [23].

Jak już stwierdzono powyżej metoda odwrotna polega na dopasowywaniu profili stężeniowych do odpowiadających profili eksperymentalnych tak, aby uzyskać jak najlepszą zgodność. Ilościowo oznacza to minimalizację sumy kwadratów różnic między stężeniami obliczonymi za pomocą modelu a odpowiadającymi stężeniami eksperymentalnymi. Zatem musi być zastosowana odpowiednia metoda optymalizacyjna, która minimalizuje funkcje celu. W tej pracy używano deterministycznej metody opartej na algorytmie Levenberga – Marquardta [24, 25]. Algorytm ten został użyty we wszystkich obliczeniach i estymacjach.

Modele izoterm bi – Langmuira oraz BET zmodyfikowane do postaci uwzględniającej tryb elucji gradientowej posiadają odpowiednio 8 i 6 nieznanymi parametrów. Jest to dość duża liczba parametrów do ich jednoczesnej estymacji przy użyciu metody odwrotnej. Dlatego zastosowano już sprawdzony sposób [15] polegający na stopniowym wyznaczaniu parametrów modelu opisującego stan równowagi procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja:

1. W pierwszym kroku rozważano warunki chromatografii analitycznej tj. obliczono parametry liniowych izoterm adsorpcji, które otrzymano z równań (9) i (10) poprzez założenie, że parametry „b” równają się zero. Wyznaczenie parametrów dokonano dopasowując obliczane czasy retencji na podstawie modelu do odpowiadających czasów uzyskanych podczas pomiarów eksperymentalnych dla trzech rozważanych gradientów zmiany modyfikatora w eluencie.
2. Estymowano pozostałe parametry („b”) równania bi – Langmuira oraz BET na podstawie dwóch przeładowanych profili stężeniowych otrzymanych dla skrajnych nachyleń gradientów. Parametry z kroku pierwszego były utrzymywane na stałym poziomie. W trakcie estymacji model rozwiązywano metodą różnic skończonych zaproponowaną przez Rouchona [7].
3. W trzecim kroku estymowano wszystkie parametry rozpatrywanych modeli na podstawie tych samych profili, co w kroku drugim, przy czym do rozwiązywania modelu równowagowo – dyspersyjnego używano metody kolokacji ortogonalnej na elementach skończonych.

Celem dwóch pierwszych kroków było znalezienie odpowiednich wartości parametrów izoterm adsorpcji, z których rozpoczynano właściwą estymację, która miała miejsce w kroku trzecim.

Metoda Levenberga – Marquardta z racji tego, że należy do metod deterministycznych jest czuła na występowanie minimów lokalnych. Aby uniknąć uzyskania rozwiązania, które

odpowiada minimum lokalnemu i dodatkowo jest nie do przyjęcia ze względu na niewystarczającą zgodność między profilami symulowanymi a eksperymentalnymi zawsze wykonywano kilka estymacji zaczynając od innych wartości parametrów modelu izoterm adsorpcji.

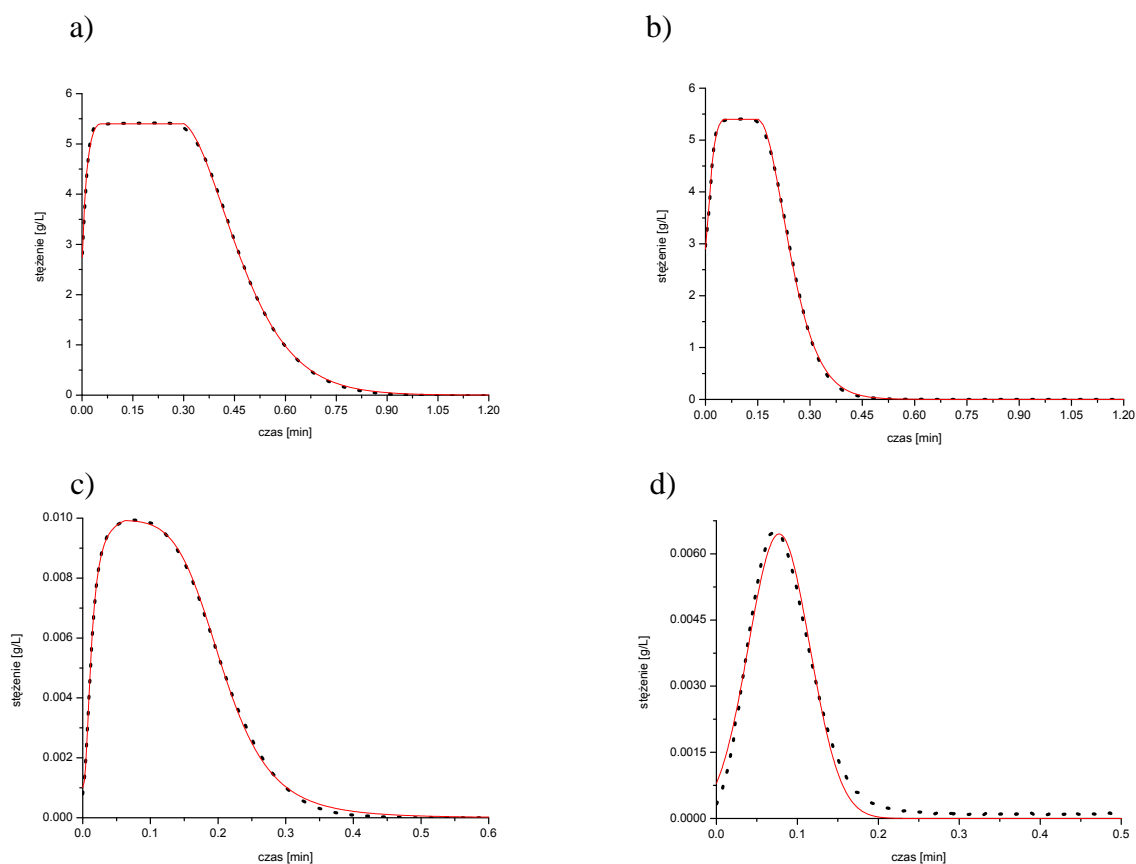
5. REZULTAT ORAZ DYSKUSJA WYNIKÓW

Przeprowadzono estymacje parametrów modeli izoterm adsorpcji na podstawie danych eksperymentalnych modelowych układów chromatograficznych. W tym celu profil stężeniowy wprowadzanej próbki na wlocie do kolumny chromatograficznej przybliżono funkcjami podanymi równaniami 6 i 7. Jak można zauważyć na rys. 1 uzyskano bardzo dobrą zgodność z odpowiadającymi profilami eksperymentalnymi.

Estymacje wykonano w oparciu o sprawdzony już sposób składający się z trzech etapów (rozdział 4). Powodem rozbicia wyznaczania równania izoterm na trzy etapy jest uproszczenie problemu. Jak stwierdzono we wprowadzeniu sama metoda odwrotna posiada pewne ograniczenia i niedoskonałości. Jednym z większych problemów jest wyznaczenie wartości parametrów modelu izoterm adsorpcji, z których rozpoczynana jest ich estymacja. Wartości tych parametrów nie mogą być przypadkowe. To znaczy muszą być tak dobrane, aby profil bądź profile pików symulowanych przy użyciu modelu dynamiki kolumny chromatograficznej były dobrze zagnieżdżone w odpowiadających profilach eksperymentalnych. Taka operacja wykonywana jest metodą prób i błędów. Jest rzeczą oczywistą, że im więcej izoterm ma parametrów tym trudniej znaleźć odpowiedni zestaw ich wartości. Dlatego zastosowano taki sposób postępowania, którego celem jest uproszczenie znalezienia wartości parametrów wstępnych poprzez ograniczenie ich liczby. Właściwa estymacja miała miejsce w kroku trzecim powyższej procedury, gdzie estymowano wszystkie parametry przedmiotowych izoterm przy użyciu dokładnej metody rozwiązywania modelu, jaką jest metoda kolokacji ortogonalnej. Warto jest podkreślić to, że już po drugim etapie uzyskiwano dobrą zgodność między wykonywanymi symulacjami a odpowiadającymi danymi eksperymentalnymi. Estymacja mająca miejsce w ostatnim kroku powodowała nieznaczne polepszenie zgodności między symulowanymi profilami stężeniowymi a odpowiadającymi profilami eksperymentalnymi.

Na podstawie chromatogramów stwierdzono, że piki chromatograficzne w warunkach chromatografii preparatywnej cykloheptanonu, chlorku benzylotrietyloamoniumowego oraz 2-naftalenosulfonianu sodu, zarówno w przypadku chromatografii HPLC jak i UHPLC mają charakterystyczny trójkątny kształt z najpierw pojawiającym się szkiem a następnie falą prostą i ogonem pików. W analizowanych przypadkach zdecydowano się, zatem zastosować izotermę bi – Langmuira (9). Taki wybór podyktowany był kształtem pików chromatograficznych oraz wcześniejszymi pracami, gdzie w podobnych układach chromatograficznych z sukcesem zastosowano właśnie ten model izoterm adsorpcji [14]. W trakcie estymacji parametrów zaproponowanego modelu izoterm adsorpcji oraz podczas porównywania otrzymanych profili pików chromatograficznych z rozwiązania modelu dynamiki chromatografii z odpowiadającymi profilami eksperymentalnymi potwierdzono mechanizm adsorpcji oraz zaproponowane równanie opisujące równowagę procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja. Potwierdza to rys. 3, na którym porównano obliczone profile pików chromatograficznych z danymi eksperymentalnymi. Jak można zauważyć uzyskano lepszą niż zadawalającą zgodność. Pokazane porównanie odnosi

się do tych profili pików chromatograficznych, które nie były brane do wyznaczenia izoterm adsorpcji, co jeszcze bardziej uwiarygodnia użyteczność otrzymanego modelu.

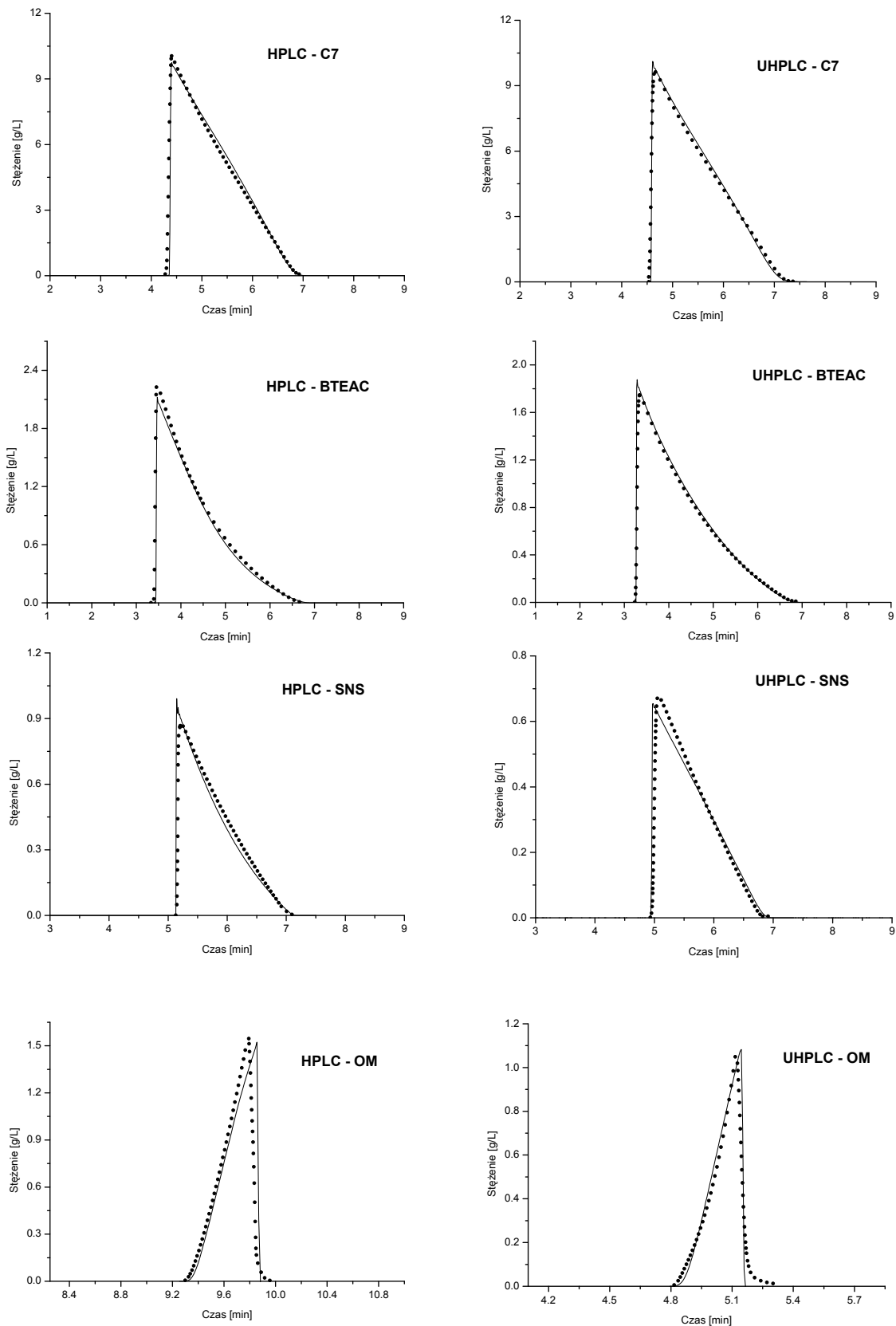


Rys. 2. Porównanie profili iniekcji przybliżonych funkcjami (linia ciągłą) z odpowiadającymi profilami eksperymentalnymi (symbole), objętość nastrzyku: a) 500 μL , b) 250 μL , c) 200 μL , d) 6 μL

Otrzymane piki chromatograficzne omeprazolu w przypadku chromatografii HPLC i UHPLC posiadają kształt z najpierw pojawiającym się ogonem i falą prostą a następnie szkiem piku. Jest to przypadek, gdzie równowagę procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja może opisywać izoterma wypukła. Zdecydowano się zastosować izotermę BET (10) zmodyfikowaną do postaci uwzględniającej elucję gradientową. Również i dla tych układów chromatograficznych uzyskano dobrą zgodność między obliczonymi profilami omeprazolu a odpowiadającymi danymi eksperymentalnymi (rys. 3).

Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność rozumowania, stawiania hipotez, co do mechanizmu adsorpcji oraz sposobu estymacji parametrów modeli izoterm adsorpcji.

Chromatografowane związki należy traktować, jako substancje modelowe, przy czym BTEAC oraz SNS są związkami o budowie jonowej. Takie substancje wykazują większą nieliniowość i złożoność w opisie równowagi adsorpcyjnej a tym samym większą trudność w wyznaczeniu izoterm adsorpcji. Dlatego zdecydowano się na uwzględnienie takich związków chemicznych oraz sprawdzenie metody odwrotnej w wyznaczeniu ich modeli izoterm adsorpcji. Jednak w analizowanych w tej pracy przykładach szczególnie zwiększonej trudności nie zauważono jak i również stopień przewidywania profili chromatograficznych na wylocie z kolumny chromatograficznych nie odbiega od pozostałych przypadków.



Rys. 3. Porównanie symulowanych profili pików chromatograficznych (linia ciągła) z odpowiadającymi eksperymentalnymi profilami stężeniowymi (symbole). Nachylenie gradientu zmian modyfikatora: 2, 3, 3 i 2%/min odpowiednio dla cykloheptanonu (C7), chlorku benzylotrietyloamoniowego (BTEAC), 2-naftalenosulfonianu sodu (SNS), omeprazolu (OM)

Tabela 2. Wartości parametrów modelu izotermi bi – Langmuira (C7, BTEAC, SNS) oraz BET (OM) wyznaczone za pomocą metody odwrotnej w chromatografii HPLC oraz UHPLC

Związek	Parametr	Wartość		Odchylenie standardowe		Test t – Student 95 % poziom ufności	
		HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC
C7	a_I	49.64	46.86	0.1978	0.1502	0.3876	0.2944
	Sa_I	13.01	17.78	0.02168	0.0256	0.04249	0.05018
	b_I	9.041	65.76	0.03353	0.2086	0.06572	0.4089
	Sb_I	22.02	53.10	0.04865	0.1093	0.09535	0.2144
	a_{II}	13.77	25.22	0.03656	0.05158	0.07165	0.1010
	Sa_{II}	4.651	6.966	0.01049	0.008285	0.02056	0.01624
	b_{II}	0.05293	1.664	0.0002000	0.004667	0.0003920	0.009147
	Sb_{II}	1.378	14.99	0.005591	0.01158	0.01095	0.02270
BTEAC	a_I	47.59	48.80	0.3744	0.1608	0.7339	0.3152
	Sa_I	26.80	33.08	0.1534	0.06528	0.3007	0.1279
	b_I	5.371	4.234	0.03995	0.01313	0.07829	0.02573
	Sb_I	2.755	3.959	0.02575	0.02956	0.05047	0.05794
	a_{II}	7.075	3.458	0.03703	0.006914	0.07258	0.01355
	Sa_{II}	8.147	1.416	0.05321	0.01108	0.1043	0.02172
	b_{II}	0.8866	0.5603	0.006477	0.002747	0.01269	0.005385
	Sb_{II}	30.95	23.13	0.1658	0.1306	0.3251	0.2559
SNS	a_I	275.0	149.7	0.6834	0.9803	1.340	1.921
	Sa_I	26.53	30.73	0.02772	0.08645	0.05433	0.1694
	b_I	25.85	8.599	0.04447	0.04980	0.08716	0.09760
	Sb_I	9.157	7.469	0.02665	0.05058	0.05223	0.09913
	a_{II}	28.99	21.05	0.04794	0.1264	0.09396	0.2477
	Sa_{II}	12.89	11.01	0.01083	0.02970	0.02124	0.05820
	b_{II}	0.5507	4.992	0.001381	0.03298	0.002708	0.06464
	Sb_{II}	2.513	10.86	0.007742	0.05858	0.01517	0.1148
OM	a_0	1036	1218	1.014	1.136	1.988	2.227
	Sa	18.83	20.15	0.002579	0.003046	0.005055	0.005970
	$b_{L,0}$	0.1339	0.08751	0.006215	0.0005599	0.01218	0.001097
	Sb_L	1.606	0.1593	0.1122	0.002857	0.2200	0.005599
	b_0	0.9889	1.429	0.02216	0.02189	0.04343	0.04291
	Sb	9.660	12.59	0.1657	0.1140	0.3247	0.22350

Wartym odnotowania jest fakt, że modele izoterm adsorpcji nie ulegają zmianie, gdy przechodzi się z chromatografii HPLC na chromatografię UHPLC przy stałych pozostałych elementach układu chromatograficznego tj. eluentu oraz substancji chromatografowanej. Zmianie ulegają jedynie wartości parametrów (Tabela 2). Zastosowana w równaniach izotermi adsorpcji eksponentjalna zależność łącząca stężenie modyfikatora w eluencie z równowagowym stężeniem adsorbentu daje dobre rezultaty w przewidywaniu przez model dynamiki chromatografii profili pików chromatograficznych na wylocie z kolumny chromatograficznej. Ponadto użyte z sukcesem te same modele izoterm adsorpcji, co do postaci matematycznej w HPLC i UHPLC mogą wskazywać na podobieństwo faz stacjonarnych zastosowanych w kolumnach chromatograficznych obu rozważanych technik chromatograficznych. Można domniemywać, że istnieje podobny rozkład energii adsorpcji w obu rozważanych kolumnach chromatograficznych,

albowiem zarówno w HPLC jak i UHPLC dobry rezultat dało przybliżenie powierzchni heterogenicznej modelem zakładającym istnienie dwóch rodzajów miejsc adsorpcyjnych.

Z punktu widzenia technicznego nie zauważono, jakichkolwiek różnic w przypadku użycia metody odwrotnej w chromatografii HPLC i UHPLC.

6. WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było testowanie metody odwrotnej w wyznaczaniu modelu izoterm adsorpcji w przypadku elucji gradientowej na przykładzie różnych układów chromatograficznych. Ponadto sprawdzono podobieństwo między chromatografią HPLC a UHPLC w kontekście wyznaczania izoterm adsorpcji oraz opisu równowagi termodynamicznej procesu powierzchniowego adsorpcja – desorpcja dla faz stacjonarnych stosowanych w wymienionych technikach chromatograficznych.

Główne wnioski z wykonanych obliczeń i rozważań, które można zwięźle sformalizować w kilku punktach to:

1. Model izoterm adsorpcji nie zmienia się, gdy zmianie ulega zastosowana technika chromatograficzna. Zmianie ulegają jedynie wartości parametrów równania izoterm adsorpcji (Tabela 2).
2. Rozkład energetyczny miejsc adsorpcyjnych jest podobny w fazach stacjonarnych stosowanych w kolumnach chromatograficznych HPLC oraz UHPLC.
3. Z powodzeniem zastosowano w izotermie adsorpcji eksponenty zależność łączącą stężenie modyfikatora z równowagowym stężeniem adsorbentu.

Dodatkowym a zarazem ważnym elementem niniejszej pracy jest fakt wyznaczenia po raz pierwszy izoterm BET za pomocą metody odwrotnej w oparciu o przeładowane profile pików chromatograficznych otrzymanych w trybie elucji gradientowej.

Literatura

1. E. V. Dose, S. Jacobson, G. Guiochon, Determination of Isotherms from Chromatographic Peak Shapes, *Analytical Chemistry*, Vol. 63, 1991, p. 833–839.
2. F. James, M. Sepulveda, Parameter identification for a model of chromatographic column, *Inverse Problems*, Vol. 10, 1994, p. 1299–1314.
3. F. James, M. Sepulveda, F. Charton, I. Quinones, G. Guiochon, Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles, *Chemical Engineering Science*, Vol. 54, 1999, p. 1677–1696.
4. G. Guiochon, F. James, M. Sepulveda, Numerical results for the flux identification in a system of conservation laws, *International Series of Numerical Mathematics*, Vol. 129, 1999, p. 423–432.
5. M. Juza, Development of an high-performance liquid chromatographic simulated moving bed separation from an industrial perspective, *Journal of Chromatography A*, Vol. 865, 1999, p. 35–49.
6. C. B. Ching, W. Arlt, M. Lisso, G. Wozny, Kinetic and Equilibrium Study of the Enantioseparation of Fenoprofen in a Batch Setup, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 39, 2000, p. 4365–4369.

7. D. Antos, W. Piatkowski, K. Kaczmarski, Determination of mobile phase effect on single-component adsorption isotherm by use of numerical estimation, *Journal of Chromatography A*, Vol. 874, 2000, p. 1–12.
8. D. Antos, A. Seidel-Morgenstern, Application of gradients in the simulated moving bed process, *Chemical Engineering Science*, Vol. 56, 2001, p. 6667–6682.
9. L. Zhang, J. Selker, A. Qu, A. Velayudhan, Numerical estimation of multicomponent adsorption isotherms in preparative chromatography: implications of experimental error, *Journal of Chromatography A*, Vol. 934, 2001, p. 13–29.
10. P. Forssen, R. Arnell, T. Fornstedt, An improved algorithm for solving inverse problems in liquid chromatography, *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 30, 2006, p. 1381–1391.
11. R. Arnell, P. Forssen, T. Fornstedt, Accurate and rapid estimation of adsorption isotherms in liquid chromatography using the inverse method on plateaus, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1099, 2005, p. 167–174.
12. A. Felinger, D. Zhou, G. Guiochon, Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1005, 2003, p. 35–49.
13. A. Cavazzini, A. Felinger, G. Guiochon, Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1012, 2003, p. 139–149.
14. D. Åsberg, M. Leško, M. Enmark, J. Samuelsson, K. Kaczmarski, T. Fornstedt, Fast estimation of adsorption isotherm parameters in gradient elution preparative liquid chromatography. I: The single component case, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1299, 2013, p. 64–70.
15. D. Åsberg, M. Leško, M. Enmark, J. Samuelsson, K. Kaczmarski, T. Fornstedt, Fast estimation of adsorption isotherm parameters in gradient elution preparative liquid chromatography. II: The competitive case, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1314, 2013, p. 70–76.
16. G. Guiochon, D. G. Shirazi, A. Felinger, A. M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Second Edition, Academic Press, Boston, MA, 2006.
17. M. Suzuki, *Adsorption Engineering*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
18. P. V. Danckwerts, Continuous flow systems: Distribution of residence times, *Chemical Engineering Science*, Vol. 2, 1953, p. 1–13.
19. S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, E. J. Teller, On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases, *Journal of American Chemical Society*, Vol. 62, 1940, p. 1723–1732.
20. Z. Ma, G. Guiochon, Application of orthogonal collocation on finite elements in the simulation of non-linear chromatography, *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 15, 1991, p. 415–426.
21. A. J. Berninger, R. D. Whitley, X. Zhang, N. H. L. Wang, A versatile model for simulation of reaction and nonequilibrium dynamics in multicomponent fixed-bed adsorption processes, *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 15, 1991, p. 749–768.
22. V. J. Villadsen, M. L. Michelsen, *Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximation*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1978.
23. P. Rouchon, M. Schonauer, P. Valentin, G. Guiochon, Numerical Simulation of Band Propagation in Nonlinear Chromatography, *Separation Science and Technology*, Vol. 22, 1987, p. 1793–1833.

-
24. A. Felinger, G. Guiochon, Optimizing preparative separations at high recovery yield, *Journal of Chromatography A*, Vol. 752, 1996, p. 31–40.

OCENA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH WYBRANYCH ODMIAN OGÓRKÓW ŚWIEŻYCH I W TRAKCIE PROCESU KISZENIA

Dagmara Migut^{1a}, Józef Gorzelany¹, Natalia Matlok¹, Ewa Szczepańska¹

¹Katedra Inżynierii Produkcji Rolno - Spożywczej, Wydział Biologiczno - Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów

^admigut@op.pl

1. WSTĘP

Ogórki kiszzone to produkt utrwalony biologicznie, z dodatkiem przypraw smakowo - aromatycznych i zalany roztworem soli kuchennej. Ogórki gruntowe jako materiał biologiczny charakteryzują się anizotropowością, która wynika zarówno z ich uwarunkowań genetycznych jak i środowiskowych, dlatego ważne jest monitorowanie cech mechanicznych surowca, które mają wpływ na jego jakość i przeznaczenie. Warunkuje to powstawanie produktu finalnego o odpowiednich parametrach mechanicznych i wysokiej jakości.

Celem badań było określenie wpływu odmiany i składu chemicznego zalewy na właściwości mechaniczne ogórków na poszczególnych etapach procesu kiszenia oraz ocena odporności skórki i miąższu świeżych i kiszonych owoców badanych odmian ogórków na uszkodzenia mechaniczne powstałe w procesie przebiccia stemplem o średnicy 5 mm.

2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BADANEGO SUROWCA

Ogórki jako materiał biologiczny charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami mechanicznymi, które zależne są od warunków pogodowych, miejsca uprawy oraz innych parametrów związanych ze zróżnicowanymi warunkami atmosferycznymi.

Ogórki przeznaczone do kiszenia powinny być świeże, nie wykazywać oznak zepsucia, oraz odznaczać się odpowiednią dojrzałością. Ponadto powinny charakteryzować się wyrównanym wybarwieniem, cylindrycznym, walcowatym kształtem oraz niezbyt grubą i elastyczną skórką, o gładkiej lub brodawkowatej powierzchni.

Surowiec charakteryzujący się pożądanymi cechami poddawany jest fermentacji mlekowej, która towarzyszy człowiekowi od tysięcy lat. Jest ona wykorzystywana w wielu dziedzinach przemysłu spożywczego. Warzywa kiszzone oraz produkty wytwarzane przy udziale bakterii fermentacji mlekowej są popularnym elementem diety, nie tylko dzięki charakterystycznym walorom smakowo-zapachowym lecz również dzięki właściwościom prozdrowotnym kiszzonek. Zawarte w nich bakterie fermentacji mlekowej LAB; (lactic acid bacteria) występują powszechnie w wielu produktach żywnościowych [1-4].

Bakterie fermentacji mlekowej stanowią naturalną mikroflorę układu pokarmowego człowieka oraz mają zdolność do tworzenia witamin z grupy B, które są istotnym elementem procesów metabolicznych [5].

Kiszenie jest biologiczną metodą utrwalania żywności. Oparta jest na procesie fermentacji mlekowej. Czynnikiem utrwalającym produkt są wytworzone na drodze fermentacji bakterie kwasu mlekowego. W tradycyjnych technologiach produkcji proces ten zachodzi spontanicznie, lecz stosowanie dodatku kultur starterowych pozwala na przeprowadzenie procesu kontrolowanego, ukierunkowanego co umożliwi uzyskanie produktu finalnego wysokiej jakości [6]. Przeprowadzenie spontanicznej fermentacji mlekowej wymaga użycia surowca o wysokiej higienie mikrobiologicznej.

Dodatek soli kuchennej stanowi pożywkę dla mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej gwarantując im szybszy wzrost, a jednocześnie ogranicza rozwój mikroflory niepożądaną [7]. Sam wzrost mikroflory kwasu mlekowego ogranicza rozwój niepożądanych drobnoustrojów i umożliwia szybszą i skuteczniejszą fermentację mlekową.

Fermentacja mlekowa jest procesem beztlenowym przeprowadzanym przez bakterie kwasu mlekowego, którego substratem są cukry zawarte w surowcu. W czasie trwania reakcji powstaje głównie kwas mlekowy, ale również niewielkie ilości kwasu octowego, aldehydu octowego, butanodiolu, diacetylu oraz dwutlenku węgla. Fermentacja mlekowa prowadzi do rozkładu węglowodanów zawartych w surowcu, do kwasu mlekowego obecnego w ilości 1,0 - 1,8 % w produkcie gotowym. W wyniku rozwoju i przemian zachodzących podczas procesów metabolicznych bakterii homofermentatywnych powstaje jedynie kwas mlekowy, natomiast bakterie heterofermentatywne oprócz tworzenia kwasu mlekowego, mają zdolność do wytwarzania produktów ubocznych takich jak kwas octowy, alkohol etylowy, gliceryna i inne związki [8, 9].

Badania właściwości mechanicznych pozwalają optymalizować procesy zbioru, transportu, magazynowania i przetwarzania surowca. Ogórki gruntowe charakteryzują się anizotropowością, dlatego prowadzenie badań w tym kierunku wymaga kompleksowego podejścia oraz cykliczności. Badania właściwości mechanicznych pozwalają na określenie jakości surowca, jego jędrności oraz twardości co decyduje o jego przeznaczeniu przetwórczym. Ponadto właściwości tekstury są podstawową cechą ocenianą przez szerokie grono konsumentów zarówno owoców świeżych jak i przetworzonych [10, 11]. Owoce ogórka charakteryzują się niejednorodnymi wartościami parametrów przebiccia w obrębie owocu, dlatego nie jest łatwo scharakteryzować jego właściwości poprzez podstawowy test na przebiccie [12, 13].

3. CEL PRACY

Celem przeprowadzonych badań była ocena odporności na uszkodzenia skórki i miększu świeżych oraz kiszonych owoców ogórka gruntowego powstałe w wyniku przebiccia stemplem o średnicy 5 mm oraz określenie składu chemicznego zalewy na właściwości mechaniczne badanego surowca.

4. METODYKA BADAŃ

Materiał badawczy stanowiły owoce trzech odmian ogórków gruntowych: Izyd F₁, Potomac 1 F₁ oraz Potomac 2 F₁, pobrane z poletek doświadczalnych znajdujących się w miejscowości Budziwój (woj. Podkarpackie) oraz ze Stacji Sandomierskiej Hodowli z siedzibą w Sandomierzu. Pozyskane odmiany zostały podzielone na frakcje wielkościowe w zależności od długości owocu. Do I frakcji wielkościowej zaliczały się owoce o długości 3,5 - 5,5cm, natomiast do II frakcji owoce o długości 6,0 - 8,0cm. Ogórki zostały przetransportowane do Laboratorium Analiz Mechanicznych, Katedry Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej Uniwersytetu Rzeszowskiego, gdzie zostały poddane operacjom mycia oraz pakowania. Materiał badawczy umieszczono w chłodni o temperaturze 4°C.

Wykonano analizy wybranych właściwości mechanicznych świeżych owoców ogórków, następnie materiał badawczy poddano procesowi kiszenia w szklanych słojach z zamknięciem typu twist-off. Kiszenie przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch zalew o różnym składzie chemicznym (tab.1). Do momentu rozpoczęcia fermentacji burzliwej słoje przetrzymywano w temperaturze pokojowej, po czym zostały przeniesione do pomieszczenia z temperaturą 5°C.

Kolejne pomiary właściwości mechanicznych zostały wykonane w 10, 30, 60 oraz 90 dniu procesu kiszenia.

Badania właściwości mechanicznych wykonywane były przy pomocy maszyny wytrzymałościowej Zwick/Roell Z010 z wykorzystaniem stempla o średnicy $\varphi = 5$ mm. Maszyna zbudowana jest z głowicy pomiarowej, na której znajduje się przetwornik z elementem tensometrycznym, podstawy i ruchomej belki czytnika cyfrowego. Rejestracja wyników dokonana była automatycznie na drukarce współpracującej z maszyną. Podczas pomiaru głowica przysyła sygnał odpowiadający sile ściskającej przez wtyczkę do przedwzmacniacza, następnie do czytnika cyfrowego oraz drukarki.

Badania właściwości mechanicznych przeprowadzono przy ustalonych parametrach:

- $F_v = 2$ N (siła wstępna)
- $V_1 = 40$ mm/min (prędkość dochodzenia i powrotu belki z czujnikiem)
- $V_2 = 20$ mm/min (prędkość belki z czujnikiem w czasie pomiaru)

Zarejestrowano następujące parametry:

- F_{max} = maksymalna siła przebicia skórki i miąższu owocu [N]
- L_{max} = maksymalne odkształcenie do momentu przebicia [mm]
- X = wartość średnia maksymalnej siły i odkształcenia z jednej serii pomiarów
- σ = odchylenie standardowe
- V = współczynnik wariancji

Proces przebicia skórki i miąższu analizowanych odmian ogórków został przeprowadzony na całych owocach ogórka, w trzech miejscach pomiaru tj. u nasady ogonka liściowego, środkowej i końcowej części owocu w 12 powtórzeniach dla każdej z badanych części w pięciu terminach pomiaru - dla owoców świeżych oraz poddanych kiszeniu. Pomiar odbywał się osobno dla każdej z frakcji wielkościowej. Po każdej serii pomiarów rejestrowane były wyniki z obliczeniami średnich wartości: maksymalnej siły przebicia, odkształcenia do momentu przebicia, pracy oraz umownego modułu sprężystości.

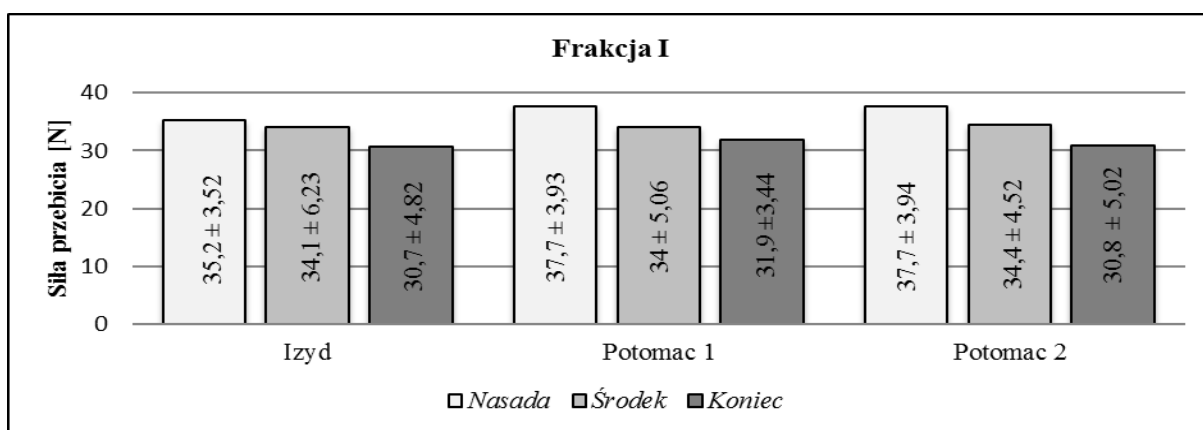
Tabela 1. Skład chemiczny zalew wykorzystanych w procesie kiszenia ogórków

ZALEWA A		ZALEWA B	
Nazwa składnika	Dodatek na 100 kg ogórków (%)	Nazwa składnika	Dodatek na 100 kg ogórków (%)
Wodny roztwór NaCl	4-10	Wodny roztwór NaCl	4-10
Koper świeży	2,5	Koper świeży	2,5
Korzeń chrzanu	0,2	Korzeń chrzanu	0,2
Czosnek	0,15	Czosnek	0,15
		Gorczyca	0,04
		Ziele angielskie	0,06

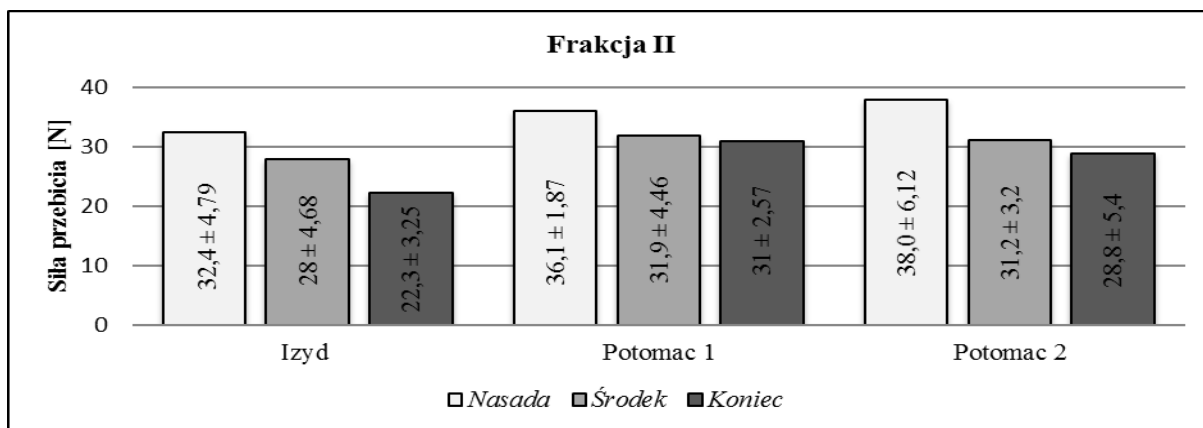
5. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki pracy badawczej oraz szczegółowe udział pomiarów badanych właściwości owoców ogórka przedstawiono w formie tabel i rycin oraz z udziałem metod obliczeniowych w programie *Statistica*.

Zgodnie z metodyką przeprowadzonych pomiarów siły przebicia skórki i miąższu świeżych i kiszonych ogórków stemplem o średnicy 5 mm, na podstawie uzyskanych wyników na rysunkach 1 - 2 przedstawiono średnią siłę przebicia skórki i miąższu świeżych owoców ogórka analizowanych odmian dla dwóch frakcji wielkościowych w różnych miejscach pomiaru.



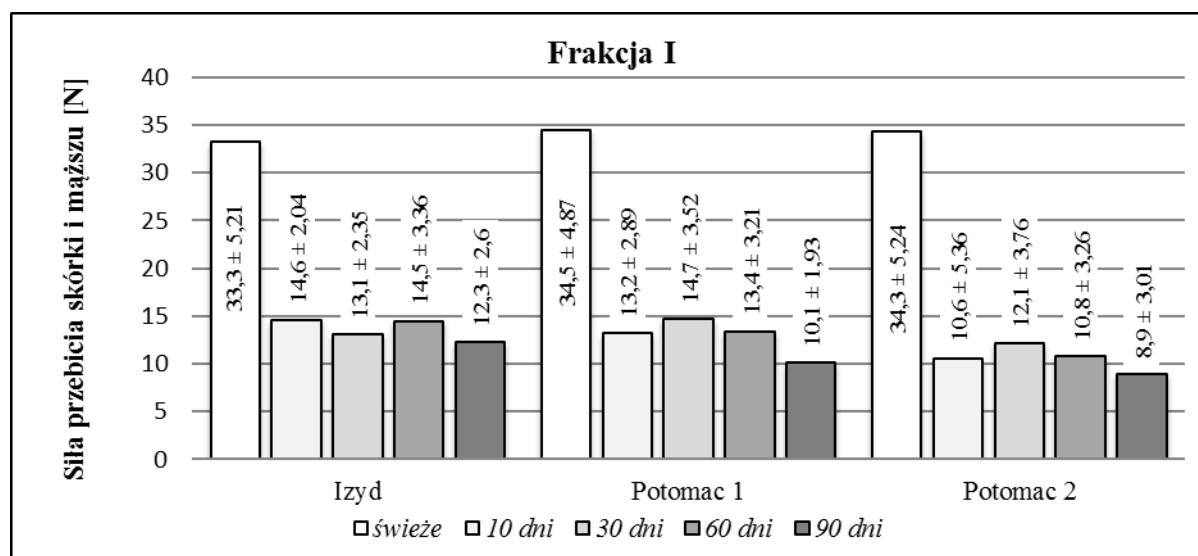
Rys. 1. Średnia siła przebicia stemplem o średnicy 5 mm świeżych owoców ogórków gruntowych w trzech miejscach owocu I frakcji wielkościowej



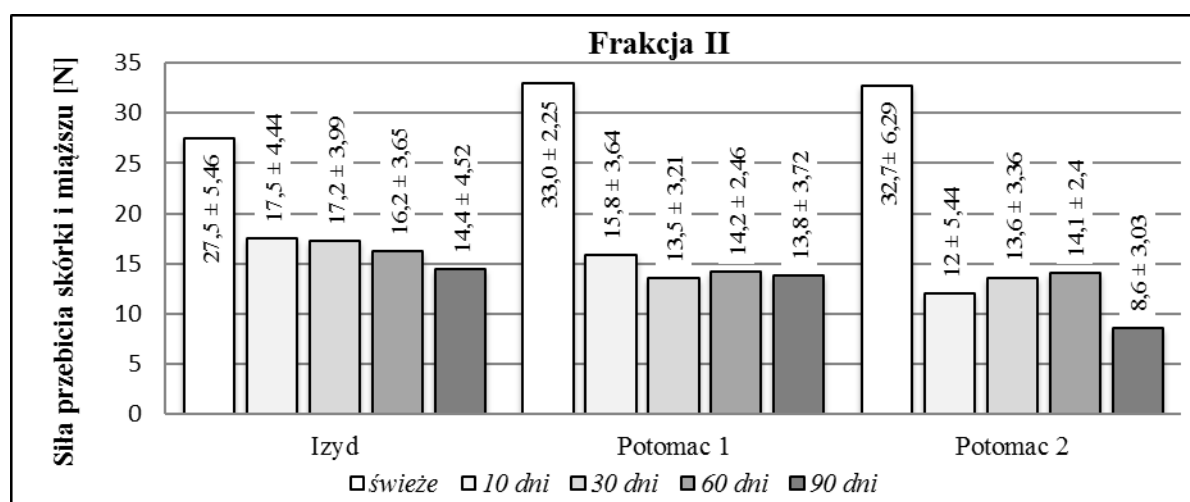
Rys. 2. Średnia siła przebicia stemplem o średnicy 5 mm świeżych owoców ogórków gruntowych w trzech miejscach owocu II frakcji wielkościowej

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, iż końcowa część owocu ogórka charakteryzuje się najniższą odpornością na uszkodzenia powstałe w wyniku przebicia skórki i mięszu we wszystkich analizowanych odmianach. Równocześnie zaobserwowano, że nasada ogonka liściowego jest częścią najbardziej odporną na uszkodzenia. Zależność ta dotyczy wszystkich analizowanych odmian niezależnie od frakcji wielkościowej. Wartość siły przebicia I frakcji wielkościowej mieściła się w zakresie 30,7 - 37,7 N. Owoce ogórka gruntowego I frakcji wielkościowej charakteryzują się wyższą odpornością na przebicie w stosunku do frakcji II. Wartości parametru kształtowały się odpowiednio: odmiana Potomac 2 - spadek wartości siły przebicia o 2,1 N, Potomac 1 - 3,3 N i Izyd -5,7 N.

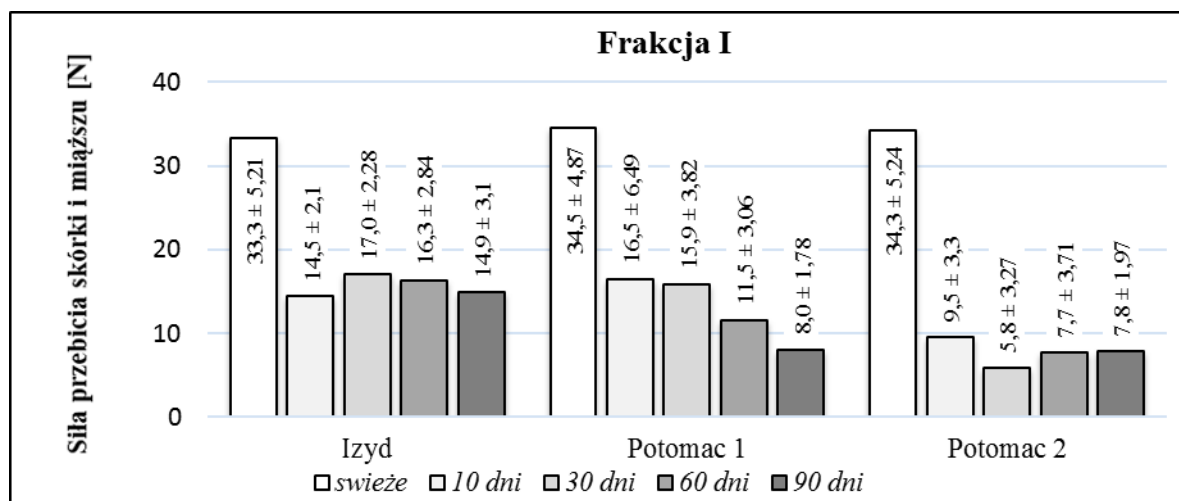
Podczas trwania procesu kiszenia wykonano kolejne pomiary siły przebicia skórki i mięszu analizowanych odmian poddanych kiszeniu dwóch zalewach o różnym składzie chemicznym. Wyniki pomiarów przedstawiają rysunki 3 - 6.



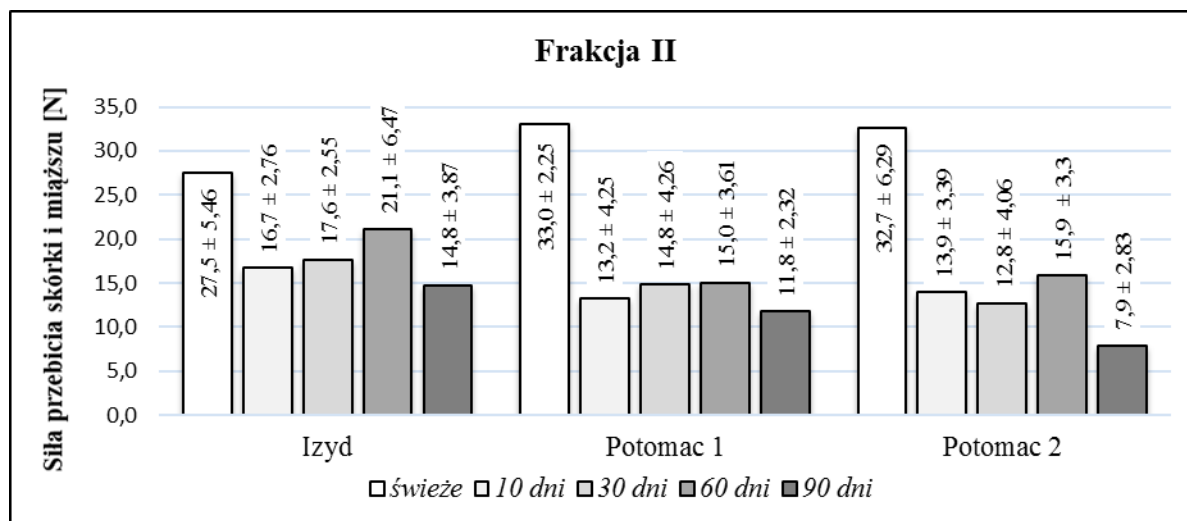
Rys. 3. Średnie wartości siły przebicia skórki i mięszu stemplem o średnicy 5 mm świeżych i kiszonych owoców ogórków w kolejnych terminach pomiarów. Zalewa A, frakcja I



Rys. 4. Średnie wartości siły przebicia skórki i mięszu stemplem o średnicy 5 mm świeżych i kiszonych owoców ogórków w kolejnych terminach pomiarów. Zalewa A, frakcja II



Rys. 5. Średnie wartości siły przebicia skórki i mięszu stemplem o średnicy 5 mm świeżych i kiszonych owoców ogórków w kolejnych terminach pomiarów. Zalewa B, frakcja I

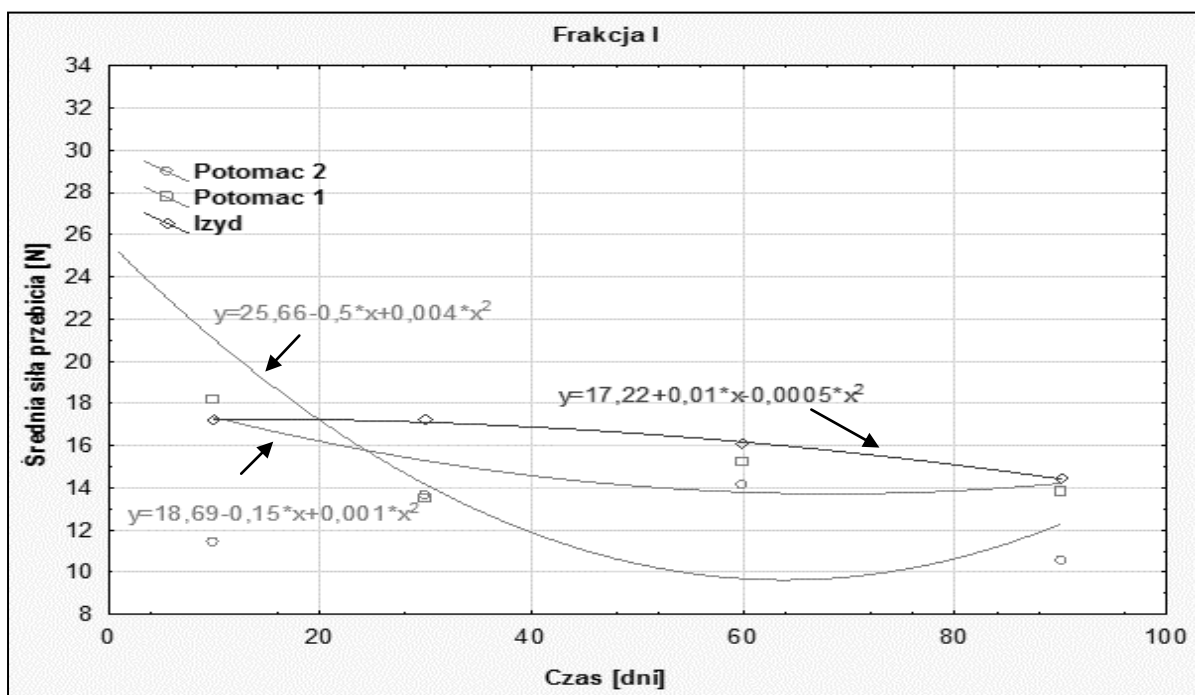


Rys. 6. Średnie wartości siły przebicia skórki i mięszu stemplem o średnicy 5 mm świeżych i kiszonych owoców ogórków w kolejnych terminach pomiarów. Zalewa B, frakcja II

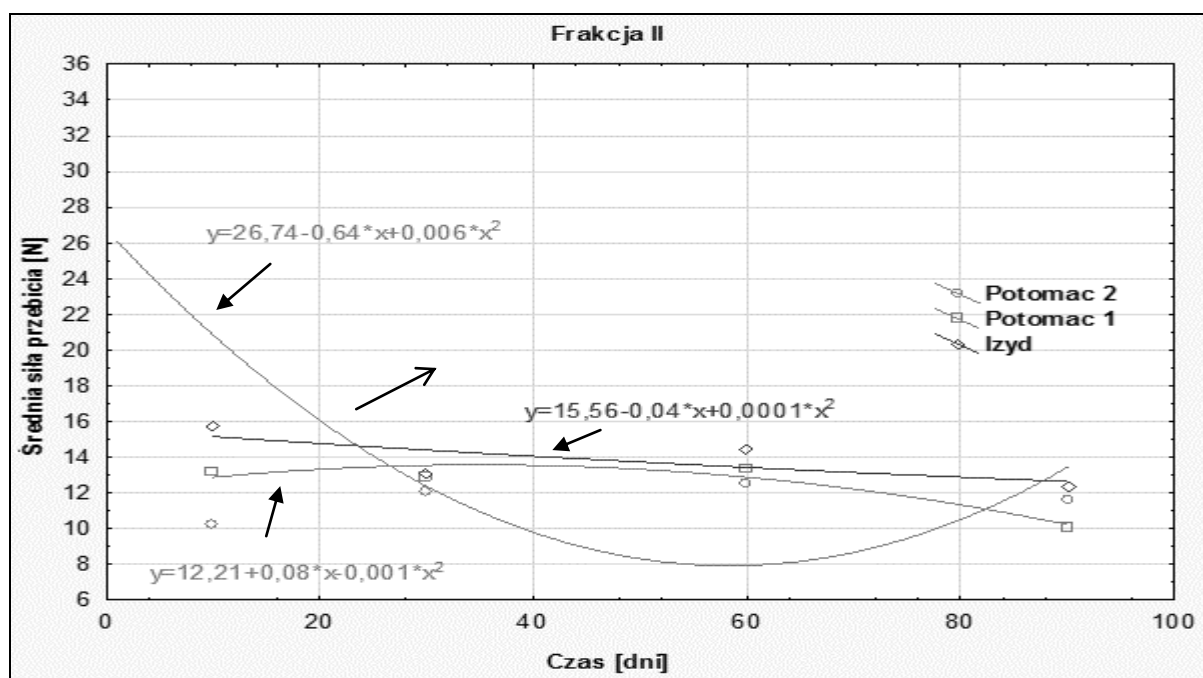
Podczas procesu kiszenia odnotowano znaczący, ponad dwukrotny spadek, wartości siły przebicia skórki i mięszu. Ogórki I frakcji wielkościowej poddane kiszeniu w zalewie A charakteryzowały się nieznacznie niższymi wartościami niż ogórki II frakcji wielkościowej kiszonych w tej samej zalewie. Odmiany Izyd i Potomac 1 charakteryzowały się podobnymi wartościami siły przebicia. Największą siłą przebicia dla I frakcji wielkościowej, odnotowano dla odmiany Izyd w 10 i 60 dniu zakiszania odpowiednio: 14,6 N i 14,5 N. U odmiany Potomac 1 największą siłą przebicia zarejestrowano w 30 dniu zakiszania (14,7 N). Analizując wartości parametru uzyskane dla owoców II frakcji wielkościowej stwierdzono, iż największą odpornością na przebicie charakteryzowały się ogórki odmiany Izyd zarówno w 10 jak i 90 dniu zakiszania. Najmniejsze wartości siły przebicia skórki i mięszu owoców ogórka odnotowano u odmiany Potomac 2.

Ogórki poddane kiszeniu w zalewie B, również charakteryzowały się ponad dwukrotnym spadkiem siły przebicia skórki i mięszu w porównaniu do ogórków świeżych. Najmniejszą wytrzymałość na przebicia skórki odnotowano dla odmiany Potomac 2, zarówno dla I jak i II frakcji wielkościowej.

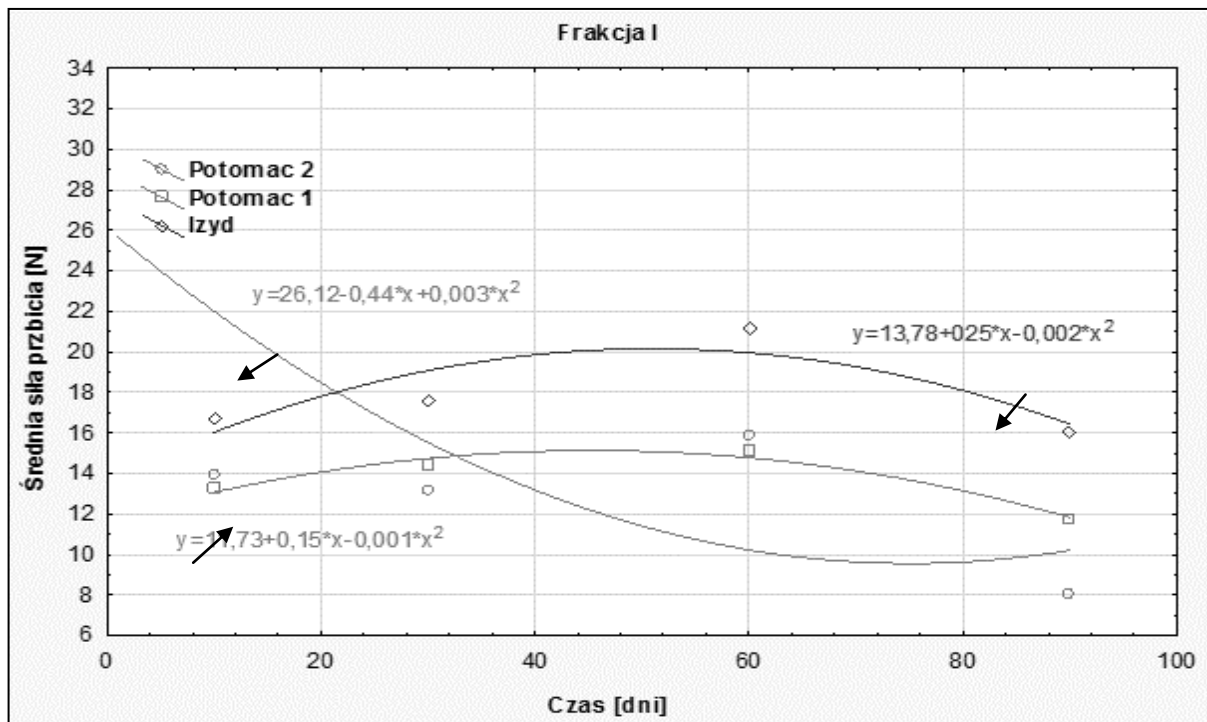
Średnie wartości siły przebicia świeżych owoców ogórków stemplem o średnicy 5 mm niezależnie od frakcji i odmiany były w zakresie od 27,5 N dla frakcji II odmiana Izyd do 34,5 N frakcja I odmiana Potomac 1. Natomiast po okresie kiszenia wartości te były w zakresie od 7,9 N frakcja II odmiana Potomac 2 do 14,9 N frakcja I odmiana Izyd. Rysunki 7 - 10 przedstawiają linie trendu zależności pomiędzy średnią siłą przebicia, a czasem zakiszania w podziale na dwie frakcje wielkościowe oraz dla dwóch zalew.



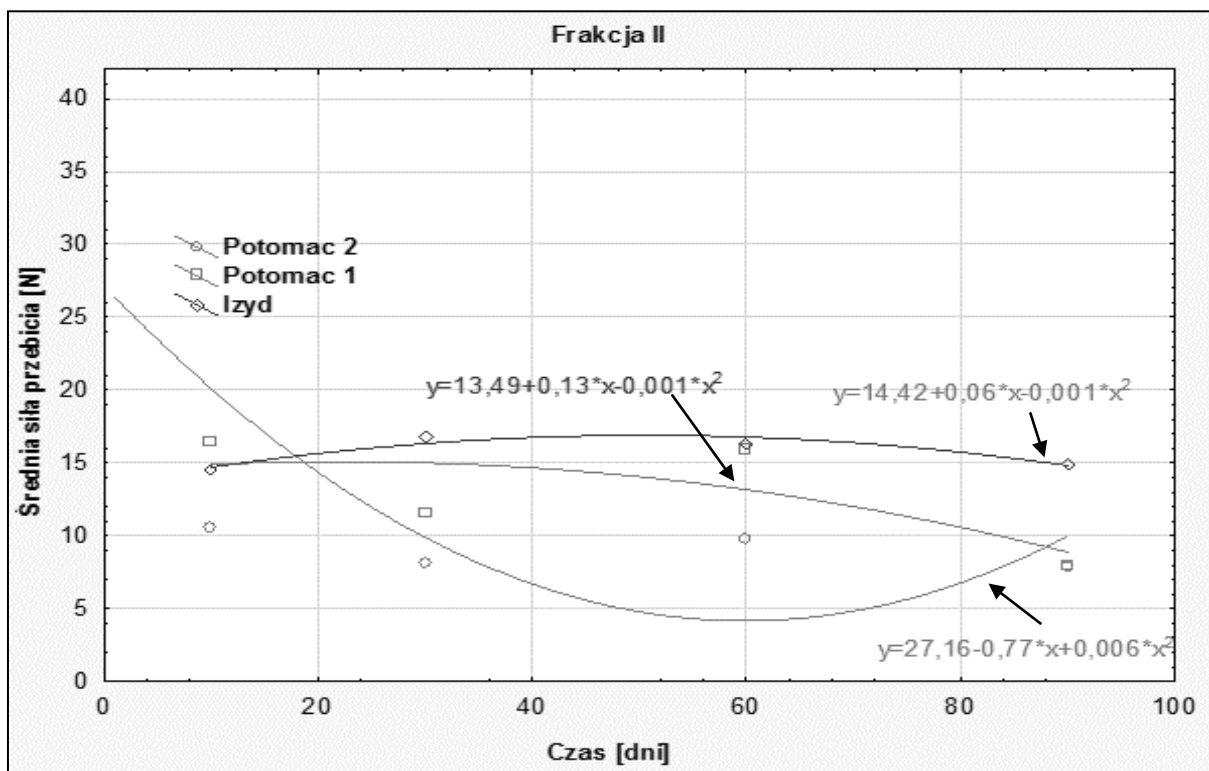
Rys. 7. Linie trendu średnich wartości siły przebicia skórki i miąższu ogórków stemplem o średnicy 5 mm w czasie zakiszania. Zalewa A, Frakcja I



Rys. 8. Linie trendu średnich wartości siły przebicia skórki i miąższu ogórków stemplem o średnicy 5 mm w czasie zakiszania. Zalewa A, Frakcja II



Rys. 9. Linie trendu średnich wartości siły przebicia skórki i miąższu ogórków stemplem o średnicy 5 mm w czasie zakiszania. Zalewa B, Frakcja I



Rys. 10. Linie trendu średnich wartości siły przebicia skórki i miąższu ogórków stemplem o średnicy 5 mm w czasie zakiszania. Zalewa B, Frakcja II

Analizując przebieg linii trendu można stwierdzić, iż siła przebicia skórki i miąższu podczas procesu zakiszania zmienia się z czasem. Zależność siły przebicia skórki i miąższu owoców ogórka od czasu zakiszania wybranych odmian ogórków gruntowych opisuje funkcja kwadratowa $y=ax^2+bx+c$. Otrzymane współczynniki determinacji dla analizowanych odmian

ogórków charakteryzowały się zróżnicowanymi wartościami od $R^2=0,49$ do $R^2=0,99$. Najwyższy współczynnik determinacji zarejestrowano dla odmiany Izyd II frakcji w zalewie A, a także dla Potomac 1 frakcji I w zalewie B. Najniższymi wartościami tego współczynnika charakteryzowały się odmiana Potomac 2 frakcja II zalewa A.

W celu wykazania istotnych różnic i zależności wykonano analizę wariancji ANOVA, która pozwala porównać ze sobą wpływ wybranych czynników na badaną cechę poprzez analizę różnic pomiędzy średnimi. Wykonano również test post-hoc Najmniejszych Istotnych Różnic (NIR) z poziomem ufności $\alpha = 0,05$. Wyniki analiz przedstawiają tabele 2 - 3.

Tabela 2. Średnie wartości siły przebiccia skórki i miąższu analizowanych odmian owoców ogórków świeżych oraz w procesie kiszenia

Czas zakiszania [dni]	Siła przebiccia F_{\max} [N]
Świeże	31,0d \pm 6,17
30	14,8b \pm 4,69
60	15,8c \pm 4,45
90	12,3a \pm 4,23
Ogół grup	16,20 \pm 7,14

Stwierdzono występowanie różnic istotnych statystycznie pomiędzy każdą z analizowanych grup-terminów pomiaru. Proces zakiszania istotnie wpływa na zmianę wartości parametru. Tabela 4 przedstawia średnie wartości siły przebiccia skórki i miąższu owoców ogórków świeżych oraz w 90 dniu kiszenia w zależności od odmiany.

Tabela 3. Średnie wartości siły przebiccia skórki i miąższu analizowanych odmian owoców ogórków świeżych oraz w procesie kiszenia w zależności od odmiany

Odmiana i frakcja wielkościowa		Siła przebiccia F_{\max} [N]	
		Ogórki świeże	Ogórki w 90 dniu procesu kiszenia
Frakcja I	Izyd	27,5ab \pm 5,46	15,2c \pm 4,26
	Potomac 1	32,4b \pm 3,86	12,8b \pm 3,24
	Potomac 2	32,7b \pm 6,3	9,3a \pm 3,17
Średnia		29,06 \pm 6,28	13,00 \pm 4,35
Frakcja II	Izyd	33,3a \pm 5,21	13,6b \pm 3,16
	Potomac 1	35,2b \pm 4,78	9,0a \pm 2,11
	Potomac 2	34,3ab \pm 5,25	9,7a \pm 3,16
Średnia		32,98 \pm 5,41	11,60 \pm 4,0
Ogół grup		31,02 \pm 6,17	12,30 \pm 4,23

Stwierdzono, że w świeżych owocach ogórka gruntowego nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy wartościami odmian Potomac 1 oraz Potomac 2. Różnice wystąpiły pomiędzy odmianą Izyd, a pozostałymi analizowanymi odmianami dla siły przebiccia potrzebnej do przebiccia skórki i miąższu w dwóch frakcjach wielkościowych.

W 90 dniu procesu kiszenia w I frakcji wielkościowej zaobserwowano istotnie statystyczne różnice pomiędzy średnimi wartościami parametru siły przebicia wśród wszystkich analizowanych odmianach. Owoce odmian Potomac 1 oraz Potomac 2 nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy średnimi. Różnice statystycznie istotne wystąpiły pomiędzy odmianą Izyd, a pozostałymi analizowanymi odmianami dla dwóch parametrów.

Tabela 4. Średnie wartości pracy oraz umownego współczynnika sprężystości dla dwóch frakcji wielkościowych świeżych oraz kiszonych owoców ogórków w analizowanych terminach pomiaru

Frakcje	Czas zakiszania	Praca W [mJ]	Umowny współczynnik sprężystości E_u [MPa]
Średnia wartość dla frakcji I	Świeże	106,8 ± 29,94	3,9 ± 0,8
Średnia wartość dla frakcji II	Świeże	83,4 ± 27,12	4,5 ± 1,2
Średnia wartość frakcja I i II		95,1 ± 30,01	4,2 ± 1,0
Średnia wartość dla frakcji I	10 dni	44,3 ± 17,6	1,0 ± 0,35
Średnia wartość dla frakcji II	10 dni	46,9 ± 16,29	1,0 ± 0,29
Średnia wartość frakcja I i II		45,6 ± 15,36	1,0 ± 0,13
Średnia wartość dla frakcji I	30 dni	37,9 ± 14,34	0,9 ± 0,26
Średnia wartość dla frakcji II	30 dni	46,2 ± 14,2	0,9 ± 0,26
Średnia wartość frakcja I i II		42,1 ± 12,96	0,9 ± 0,26
Średnia wartość dla frakcji I	60 dni	47,3 ± 17,25	1,1 ± 0,55
Średnia wartość dla frakcji II	60 dni	52,8 ± 15,07	1,0 ± 0,39
Średnia wartość frakcja I i II		50,1 ± 13,33	1,1 ± 0,6
Średnia wartość dla frakcji I	90 dni	37,4 ± 14,73	0,8 ± 0,41
Średnia wartość dla frakcji II	90 dni	38,7 ± 14,81	0,8 ± 0,32
Średnia wartość frakcja I i II		38,1 ± 13,96	0,8 ± 0,41
Średnia Frakcja I	10-90 dni	41,7 ± 22,94	0,95 ± 0,46
Średnia Frakcja II	10-90 dni	46,2 ± 23,96	0,9 ± 0,51
Średnia wartość frakcja I i II	10-90 dni	43,9 ± 23,58	0,9 ± 0,24

Tabela 4 przedstawia średnie wartości pracy oraz średnie wartości umownego współczynnika sprężystości dla ogórków świeżych oraz poddanych kiszeniu w dwóch zalewach o różnym składzie chemicznym oraz w podziale na frakcje wielkościowe.

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że średnie wartości umownego współczynnika sprężystości mieściły się w granicach od 4,2 MPa dla świeżych owoców ogórka do 0,9 MPa dla ogórków kiszonych. Poszczególne średnie wartości umownego współczynnika sprężystości w różnych terminach pomiaru wynosiły kolejno: 1,0 MPa w 10 dniu, 0,9 MPa w 30 dniu, 1,1 MPa w 60 dniu oraz 0,8 MPa w 90 dniu kiszenia. Natomiast średnie wartości pracy dla frakcji I i II wahały się od: 95,1 mJ dla świeżych owoców ogórków analizowanych odmian do 43,9 mJ dla kiszonych owoców ogórków.

6. WNIOSKI

1. Jakość produktu finalnego uzyskanego w procesie kiszenia ogórków gruntowych uzależniona jest zarówno od odmiany jak i składu chemicznego zalewy. Stwierdzono wpływ składu chemicznego zalewy na wartość analizowanego parametru oraz istotnie statystyczne różnice pomiędzy poszczególnymi odmianami badanych ogórków gruntowych.
2. Świeże owoce analizowanych odmian ogórków gruntowych charakteryzowały się zróżnicowanymi wartościami siły przebicia skórki i miąższu. Niezależnie od miejsca przebicia wartości te mieściły się w przedziale od 27,5N dla owoców odmiany Izyd II frakcji wielkościowej, do 34,5 N u odmiany Potomac 1 I frakcji wielkościowej.
3. Ogórki świeże I frakcji wielkościowej charakteryzowały się wyższymi wartościami pracy w porównaniu do owoców ogórków II frakcji wielkościowej. Średnie wartości analizowanego parametru wynosiły odpowiednio 106,8 mJ oraz 83,4 mJ. Średnie wartości umownego współczynnika sprężystości wynosiły 3,9 MPa dla owoców I frakcji oraz 4,5 MPa dla ogórków II frakcji.
4. W czasie trwania procesu kiszenia zaobserwowano znaczący spadek wartości siły przebicia skórki i miąższu analizowanych odmian ogórków gruntowych. W 90 dniu procesu kiszenia średnia siła przebicia skórki i miąższu owoców ogórków mieściła się w przedziale 7,8 - 14,9 N. Podczas procesu kiszenia nastąpił znaczny spadek średniej wartości pracy: o ok. 59,7 mJ tj. ok 59%, a także spadek umownego współczynnika sprężystości - o 3,4 MPa, tj. ok 80%.
5. Owoce kiszonych ogórków gruntowych z I frakcji wielkościowej charakteryzowały się wyższymi wartościami siły przebicia skórki i miąższu, dlatego można stwierdzić, iż mniejsze owoce są bardziej predysponowane do celów przetwórczych aniżeli owoce duże.
6. Stwierdzono zróżnicowaną odporność na uszkodzenia mechaniczne skórki i miąższu owoców ogórków w zależności od miejsca przebicia stemplem. We wszystkich analizowanych odmianach końcowa część owocu charakteryzowała się najniższymi wartościami parametru, nasada ogonka liściowego – najwyższymi.

Literatura

1. A. Chlebowska-Śmigiel, M. Gniewosz, Próba zastosowania pullulanu jako stymulatora wzrostu wybranych bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, Vol. 3, No. 88, 2013, p. 111–124.
2. K. Goderska, T. Rychlik, E. Andrzejewska, A. Szkaradkiewicz, A. Czarnecki, Antagonistyczny wpływ *Lactobacillus acidophilus* dsm 20079 i dsm 20242 na bakterie patogenne izolowane od ludzi, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, Vol. 3, No. 82, 2012, p. 114–131.
3. Y. Rivera-Espinoza, Y. Gallardo-Navarro, Non-dairy probiotic products, *Food Microbiology*, Vol. 27, No. 1, 2010, p. 1–11.
4. A. Sip, M. Krasowska, M. Więckowicz, W. Grajek, Metody skryningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, Vol. 1, No. 62, 2009, p. 5–26.
5. A. Arnoldi, Functional Foods. Cardiovascular Disease and Diabetes, *Food Science and Technology*, No. 4, 2004, p. 450–451.
6. D. Zaręba, M. Ziarno, Alternatywne probiotyczne napoje warzywne i owocowe, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, Vol. 2, No. 44, 2011, p. 160–168.
7. S. Garcha, S. Natt, In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291, *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 49, No. 5, 2012, p. 643–648.
8. W. Franco, I. Perez-Diaz, S. Johanningsmeier, R. McFeeters, Characteristic of spoilage-associated econdary cucumber fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 78, No. 4, 2012, p. 1273–1284.
9. M. Brasca, S. Morandi, R. Lodi, A. Tamburini, Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 103, 2007, p. 1516–1524.
10. Y. Sakata, H. Horie, Y. Yoshioka, Fruit textures of beit alpha, greenhouse, Japanese, pickling and slicer-type cucumbers, *The Japanese Society for Horticultural Science*, Vol. 80, No. 4, 2011, p. 420–425.
11. N. Sakurai, S. Iwatani, S. Terasaki, R. Yamamoto, Texture evaluation of cucumber by a new acoustic vibration method, *The Japanese Society for Horticultural Science*, Vol. 74, No. 1, 2005, p. 31–35.
12. K. Kohyama, A. Nagata, Y. Tamaki, N. Sakurai, Comparison of human-bite and instrument puncture tests of cucumber texture, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 52, No. 2, 2009, p. 243–246.
13. J. Xiaoyi, W. Yuan, W. Xingzhu, L. Yonghua, X. Weiwei, R. Hui, H. Guoqing, Effects of lactic acid bacteria inoculated fermentation of pickled cucumbers, *Advance Journal of Science and Technology*, Vol. 5, No. 12, 2013, p. 1610–1617.

ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH DO EKSTRAKЦИИ ROŚLINNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH

Michał Milek^{1a}, Jaroslav Legáth¹

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Rzeszowska

^amkkmilek@gmail.com

1. WSTĘP

Związki biologicznie czynne pochodzenia roślinnego znajdują szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym czy spożywczym. Tradycyjne metody pozyskiwania tego typu związków obejmują różnego rodzaju techniki ekstrakcyjne, które przy odpowiednim doborze warunków pozwalają na efektywne wykorzystanie naturalnych surowców. Obok klasycznych rozpuszczalników stosowanych od dawna do ekstrakcji metabolitów roślinnych coraz większą popularność zdobywają inne substancje, które mogą zastąpić tradycyjne rozpuszczalniki, bądź jako dodatki pozwalają zwiększyć wydajność ekstrakcji i uzyskać inne korzystne efekty. Do takich substancji, coraz szerzej znajdujących zastosowanie w analityce i preparatyce związków pochodzenia naturalnego należą związki powierzchniowo czynne, zwane surfaktantami.

2. EKSTRAKCYJA WSPOMAGANA SURFAKTANTAMI

Surfaktanty posiadają cząsteczki o asymetrycznej budowie: mają hydrofobowy fragment węglowodorowy oraz hydrofilową „głowę”. Grupa polarna może mieć charakter jonowy lub niejonowy. Taka konstrukcja skutkuje charakterystycznym zachowaniem tego typu związków w roztworach. Powyżej pewnego charakterystycznego stężenia (krytyczne stężenie micelarne – CMC) w roztworach wodnych surfaktanty tworzą tzw. micelle – struktury o hydrofobowym wnętrzu i grupach polarnych skierowanych na zewnątrz. W środowisku rozpuszczalników niepolarnych układ miceli jest odwrotny: ich wnętrze ma charakter polarny [1].

Stosunkowo nowym zastosowaniem surfaktantów jest wykorzystywanie ich roztworów do ekstrakcji, w procesie zwanym ekstrakcją wspomaganą micelarnie. Micelle tworzące się w roztworze surfaktanta solubilizują cząsteczki analitu i ułatwiają jego odzysk z drugiej fazy ciekłej lub stałej matrycy. W przypadku ekstrakcji metabolitów roślinnych zazwyczaj stosowane są techniki wspomagające, jak promieniowanie mikrofalowe czy ultradźwięki, które ułatwiają uwolnienie pożądaných związków ze stałego materiału roślinnego. Zastąpienie klasycznych rozpuszczalników organicznych roztworami surfaktantów niesie ze sobą liczne zalety. Za stosowaniem surfaktantów przemawia ich nietoksyczność i niepalność, niskie stężenia konieczne do osiągnięcia krytycznego stężenia micelnego i co za tym idzie niskie zużycie odczynników

oraz możliwość wykorzystania uzyskanych ekstraktów w żywności, lekach czy kosmetykach. Wymienione zalety stosowania ekstrakcji wspomaganą micelarnie pozwalają spełnić tzw. zasady zielonej chemii, na co zwraca się obecnie szczególną uwagę [2].

Można wyróżnić dwa warianty omawianego procesu: ekstrakcja może być realizowana w układach ciekłych bądź w układach ciało stałe-ciecz. W pierwszym przypadku dochodzi do zatężania analitów po osiągnięciu tzw. punktu zmętnienia, w wyniku uzyskania dwóch niemieszających się wzajemnie faz: bogatej w surfaktant solubilizujący pożądane anality (koacerwat) oraz ubogiej w surfaktant fazy wodnej. Punkt zmętnienia jest charakterystyczną dla danego surfaktantu wartością temperatury, przy której wspomniany rozdział na dwie fazy zachodzi. Do rozdziału na dwie fazy przyczyniają się czynniki takie jak pH lub dodatek elektrolitu [2]. W drugim przypadku następuje jedynie wyodrębnienie docelowych substancji ze stałej matrycy, przy udziale czynników wspomagających (mikrofale, ultradźwięki). Dodatek związku powierzchniowo czynnego ma za zadanie poprawę rozpuszczalności analitów i zwiększenie wydajności ekstrakcji. W ten sposób realizowana jest ekstrakcja metabolitów roślinnych ze stałych surowców. W drugim etapie związki te mogą być zatężane w punkcie zmętnienia.

Metody wykorzystujące związki powierzchniowo czynne są najczęściej stosowane do ekstrakcji jonów metali oraz innych substancji stanowiących zanieczyszczenia środowiskowe. Coraz częściej jednak wykorzystuje się je także w stosunku do próbek pochodzenia biologicznego, barwników czy związków o aktywności farmakologicznej. W dalszej części artykułu uwaga została skupiona na przykładach zastosowań ekstrakcji wspomaganą micelarnie do pozyskiwania roślinnych metabolitów wtórnych.

3. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ

Fang i współpracownicy już w 2000 r. donosili o możliwości stosowania związków powierzchniowo czynnych w procesie ekstrakcji składników aktywnych z roślin leczniczych. Na przykładzie żeń-szenia wykazali, że 10% roztwór wodny Tritonu X-100 może być z powodzeniem stosowany do odzysku związków z grupy saponin trójterpenowych, co więcej, w porównaniu z czystą wodą oraz metanolem roztwór tego niejonowego surfaktanta zapewnił wyższą wydajność i korzystniejszą kinetykę ekstrakcji [3]. Inną rośliną wykorzystywaną w tradycyjnej medycynie chińskiej, *Codonopsis pilosula*, posłużyła jako materiał badawczy do ekstrakcji markerowych glikozydów w celu porównania metody ekstrakcji ciśnieniowej gorącą wodą z dodatkiem surfaktanta oraz metod klasycznych (w aparacie Soxhleta). Wykazano, że przy zastosowaniu odpowiednich warunków dodatek związków powierzchniowo czynnych może być korzystny w tego typu metodach ekstrakcyjnych i pozwala wyeliminować użycie rozpuszczalników organicznych [4].

Inny zespół chińskich naukowców zastosował niejonowy Genapol X-080 jako alternatywny rozpuszczalnik w procesie ekstrakcji diterpenów z szalwii (*Salvia miltiorrhiza*). Maksymalny odzysk analitów po zatężeniu w punkcie zmętnienia osiągnięto przy 10% stężeniu roztworu Genapolu i przy stosunku rozpuszczalnika do surowca 20:1 [5]. Ten sam surfaktant zastosowano także z powodzeniem do wspomaganą ultradźwiękowo ekstrakcji izoflawonu daidzeiny z korzeniu rośliny z rodzaju *Pueraria* [6]. Inne związki z klasy polifenoli, mianowicie kumaryny: eskulinę i eskuletynę izolowano z kory jesionu, również z wykorzystaniem Genapolu X-080 [7]. Podobne wyniki, dotyczące ekstrakcji kumaryn z owoców rośliny *Cnidium monnieri*

opublikował zespół chińskich naukowców w 2008 roku. Obecność specyficznych dla tej rośliny związków potwierdzono analizą chromatograficzną [8].

Często stosowanym związkiem powierzchniowo czynnym jest także Triton X-100 lub Triton X-114. Pierwszy z wymienionych surfaktantów posłużył we wspomaganej mikrofalowo ekstrakcji kwasu glicyryzynowego oraz likwirytiny z korzenia lukrecji. 5% roztwór Tritonu X-100 wykazał się wyższą wydajnością odzysku tych związków w porównaniu do etanolu, metanolu oraz wody [9]. Korzeń lukrecji był również surowcem do ekstrakcji glicyryzyny oraz efedryny z wykorzystaniem roztworów Tritonu X-100 i jonowego SDS. Metodą zastosowaną w tym przypadku była ekstrakcja ciśnieniowa gorącą wodą z dodatkiem wymienionych surfaktantów. Wydajność izolacji dwóch wyżej wymienionych metabolitów była co najmniej porównywalna bądź wyższa dla procesu z dodatkiem surfaktantów w porównaniu z przypadkiem zastosowania rozpuszczalników organicznych [10]. Wśród przykładów zastosowań surfaktantów typu Triton wymienić warto także ekstrakcję antrachinonów z liści *Morinda citrifolia* [11], czy diterpenów z szławii [12] (Triton X-100). Roztwór Tritonu X-114 okazał się skutecznym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji bergeniny (glikozyd kwasu galusowego) z *Ardisia japonica* [13].

Wodne roztwory kilku różnych związków powierzchniowo czynnych zastosował zespół badawczy z Pakistanu do ekstrakcji kwasu chlorogenowego z liści morwy. Proces był realizowany jako wspomagany promieniowaniem mikrofalowym. Wyniki wskazują, że w tym przypadku najskuteczniejszy okazał się surfaktant anionowy (SDS), nieco niższą wydajność odzysku kwasu chlorogenowego uzyskano przy zastosowaniu surfaktantu kationowego (CTAB) oraz niejonowego (Brij-35). Zbadany został również wpływ odczynu rozpuszczalnika na wydajność procesu – optymalną wartość pH ustalono na 1,0 [14]. Kwas chlorogenowy, a także flawonoidy: kwercetyna i rutyna były izolowane z wiciokrzewu (*Lonicera japonica*) przy pomocy wodnych roztworów Tritonu X-100 i X-114. Analiza HPLC ekstraktów potwierdziła obecność pożądaných polifenoli [15].

Flawonoidy są cennymi metabolitami o szerokim spektrum działania biologicznego, dlatego często są docelowymi związkami, które próbuje się izolować korzystając z omawianej techniki. Kwercetyna i kemferol były ekstrahowane z liści *Diospyros kaki* z użyciem roztworu glikolu polietylenowego i ze wspomaganiami mikrofalami. Dla porównania wykonano również ekstrakty metanolowe i etanolowe w takich samych warunkach. Analiza chromatograficzna wykazała, że ekstrakty uzyskane z wykorzystaniem roztworów PEG zawierały większe ilości flawonoidów [16]. Glikol polietylenowy był także stosowany jako alternatywne rozpuszczalniki do ekstrakcji newadensyny, eskuliny oraz eskuletyny z rośliny *Lysionotus pauciflorus* oraz z kory jesionu. Wykazano, że zastosowanie PEG zamiast klasycznych rozpuszczalników organicznych skutkuje uzyskaniem wyższej wydajności a także redukcji czasu i zużycia odczynników [17].

W literaturze dostępne są również doniesienia o zastosowaniu ekstrakcji wspomaganej micelarnie do izolacji alkaloidów. Autorzy Sun i Liu opisują przypadek wykorzystania tej metody do pozyskiwania berberyny, palmityny oraz jatorryzyny z kłaczy *Coptis*, rośliny tradycyjnie stosowanej w chińskiej medycynie ludowej. Zastosowanie zakwaszonego 5% roztworu Genapolu X-080 i promieniowania mikrofalowego pozwoliło na osiągnięcie wysokiego odzysku alkaloidów z surowca w jednostopniowym procesie ekstrakcji [18]. Inny alkaloid – kamftotecyna, specyficzny dla *Camphotoca acuminata* był izolowany z tej rośliny z zastosowaniem Tritonu X-114. Warunki ekstrakcji zoptymalizowano, stężenie surfaktanta

ustalono na 7%, pH środowiska na 7 a czas ekspozycji w polu ultradźwiękowym na 40 minut [19].

Często celem badań jest uzyskanie złożonego ekstraktu o pewnych właściwościach, niekoniecznie zaś izolacja poszczególnych składników fitochemicznych. Tak było w przypadku zastosowania związków powierzchniowo czynnych do ekstrakcji przeciwutleniaczy z kwiatu bzu czarnego. Oznaczone parametry takie jak całkowita zawartość związków fenolowych oraz flawonoidów wskazują, że ekstrakcja wspomagana micelarnie była w tym przypadku bardziej skuteczna od typowej ekstrakcji z zastosowaniem wody jako rozpuszczalnika i może być dobrą metodą stosowaną w celu uzyskania ekstraktów roślinnych bogatych w antyoksydanty [20]. Polifenole w ogólności były także izolowane przez grupę autorów z Iranu z jabłek. Zastosowano roztwory takich związków jak CTAB, SDS, Triton X-100, PEG 2000 i Brij-35. Zbadano wpływ wielu parametrów na całkowitą zawartość polifenoli w uzyskanych ekstraktach [21].

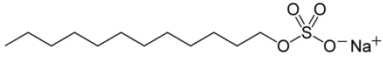
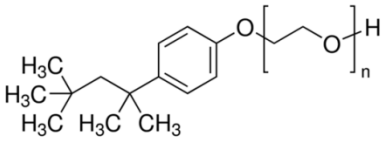
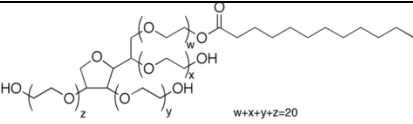
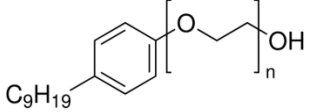
Interesujący przykład tzw. mieszanej ekstrakcji w punkcie zmętnienia (ang. *mixed cloud point extraction*) opisuje w publikacji z 2015 roku zespół Zhou i współpracowników z Xinjiang w Chinach. Liście toiny weneckiej (*Apocynum venetum*) ekstrahowano najpierw 80% etanolem pod chłodnicą zwrotną a następnie liofilizowany ekstrakt poddano w kolejnym kroku ekstrakcji micelarniej. Zastosowano dwa rodzaje surfaktantów: kationowy CTAB oraz niejonowy Genapol X-080. W celu osiągnięcia rozdziału faz zastosowano dodatek chlorku sodu oraz inkubację w temperaturze 55°C. pH ustalono do wartości 8,0. Faza bogata w surfaktant była analizowana pod kątem zawartości flawonoidów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. W porównaniu z typowym procesem ekstrakcji w punkcie zmętnienia (z zastosowaniem jedynie niejonowego Genapolu X-080) dodatek surfaktanta jonowego spowodował poprawę kształtu pików poszczególnych flawonoidów na chromatogramach oraz blisko trzykrotny wzrost współczynnika wzbogacenia analitów. Wynik oznaczenia wskazuje na wysoką efektywność tego typu metody i ukazuje perspektywy jej wykorzystania do ekstrakcji metabolitów roślinnych na większą skalę oraz do zateżnienia analitów o różnym stopniu polarności [22].

Zdecydowanie mniej jest doniesień literaturowych o wykorzystaniu układów z micelami odwróconymi do ekstrakcji związków biologicznie czynnych z materiału roślinnego. W przypadku micel odwróconych hydrofilowy charakter ich wnętrza powinien być szczególną właściwością sprzyjającą solubilizacji polarnych analitów, w tym wielu klas metabolitów roślinnych. Zhou i współpracownicy zastosowali mieszaninę CTAB, n-heptanu i alkoholu n-oktylowego do ekstrakcji owoców dziurawca (*Hypericum perforatum*). W tego typu mieszaninie CTAB tworzy micelle odwrócone, co jest czynnikiem sprzyjającym ekstrakcji związków fenolowych. W uzyskanych ekstraktach oznaczano hyperozyd (3-galaktozyd kwercetyny). Wyniki eksperymentu potwierdziły, że zastosowanie ekstrakcji wspomaganą micelarnie w układzie micel odwróconych może być skuteczną i efektywną metodą izolacji związków o charakterze polarnym [23]. Przy pomocy układu TRPO (tlenek trialkilofosfiny) w cykloheksanie ekstrahowano matrynę, alkaloid występujący w korzeniach rośliny *Sophora flavescens*, tradycyjnie stosowanej w chińskiej medycynie ludowej. Tlenek trialkilofosfiny w cykloheksanie tworzy micelle odwrócone. Wyniki eksperymentu wskazują, że matryna i jej pochodna oksymatryna mogą być z zadowalającą wydajnością ekstrahowane przy zastosowaniu ekstrakcji w układzie micel odwróconych. Autorzy sugerują, że mechanizmem zaangażowanym w odzysk alkaloidów są w tym przypadku oddziaływania koordynacyjne pomiędzy analitem a micelami odwróconymi TRPO [24].

4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

W celu sprawdzenia użyteczności metody ekstrakcji wspomaganą micelarnie do pozyskiwania związków fenolowych z materiału roślinnego wykonano serię ekstraktów z liści i kwiatów mniszka lekarskiego (*Taraxacum officinale* Web.) z zastosowaniem roztworów kilku związków powierzchniowo czynnych jako rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Liście i kwiaty mniszka lekarskiego po zebraniu wysuszono i sproszkowano. Po 0,5 g surowca umieszczono w zakręcanych probówkach wirówkowych o pojemności 50 ml i zalano 20 ml odpowiedniego roztworu surfaktanta. Jako rozpuszczalniki zastosowano wodne roztwory SDS (BioRad), Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich), Tweenu 20 (Roth) oraz Nonidetu P-40 (Fluka) o stężeniach 0,1%, 0,5%, 1%, 2% w przypadku liści oraz 2% w przypadku kwiatów mniszka. Surfaktanty wykorzystane w eksperymencie wraz z ich ogólną charakterystyką zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie związków powierzchniowo czynnych użytych do ekstrakcji

Surfaktant	Wzór chemiczny	Charakter	Krytyczne stężenie micelizacji (CMC) [mM] ¹	Temperatura punktu zmętnienia ²
SDS		kationowy	7-10	>100°C
Triton X-100		niejonowy	0,2 – 0,9	65°C
Tween 20		niejonowy	0,15	76°C
Nonidet P-40		niejonowy	0,059	45-50°C

^{1,2}Dane na podstawie [25]

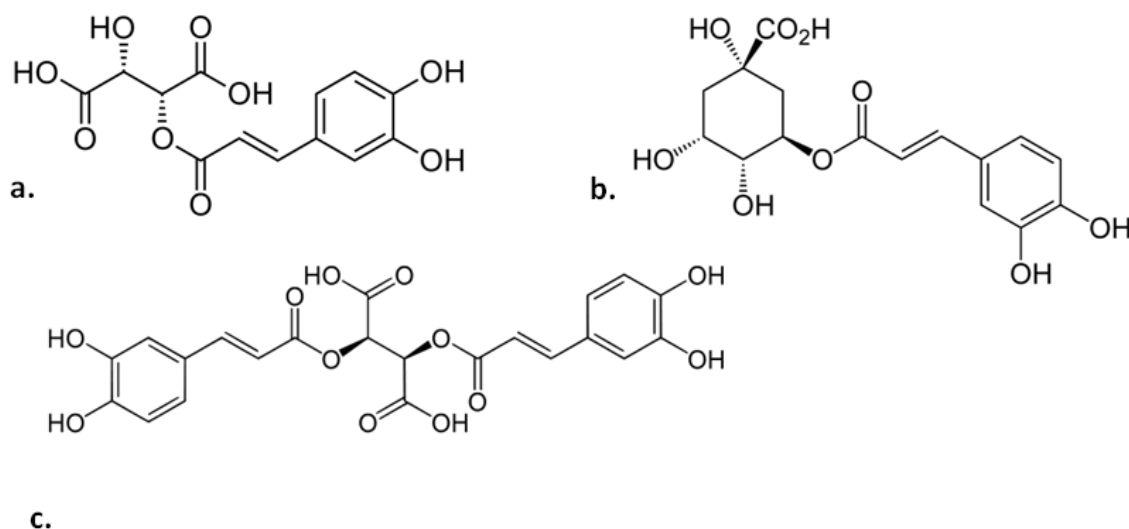
Ekstrakcję prowadzono jako wspomaganą ultradźwiękami w łaźni ultradźwiękowej (Bandelin Sonorex RK31) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po ekstrakcji ekstrakty odwirowano przez 10 minut przy 7800 obr/min. Następnie supernatant przesączono przez bibułę filtracyjną i przesącz zebrano do dalszych badań. Analizę jakościową pod kątem obecności polifenoli prowadzono metodą ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UPLC-MS). Anality rozdzielano na kolumnie Kinetex 1,7 μm XB-C18 100 Å (dł. 50 mm, śr. wewn. 2,1 mm). Zastosowano gradient fazy ruchomej (acetonitryl oraz woda z dodatkiem 0,05% kwasu mrówkowego): ACN od 10 do 100% w czasie 20 minut. Jako metodę jonizacji próbki zastosowano electrospray (ESI), jonizacja w trybie ujemnym. Przeprowadzono pełny skan w trybie Q1 (spektrometr AB Sciex QTRAP 4500 z potrójnym kwadrupolem). Metabolity identyfikowano na podstawie widm fragmentacyjnych, poprzez porównanie z wzorcami bądź z danymi z bazy MassBank. Informacje o zidentyfikowanych z dużym prawdopodobieństwem związkach wraz z danymi o czasach retencji i jonach fragmentacyjnych zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Metabolity zidentyfikowane w ekstraktach mniszka lekarskiego

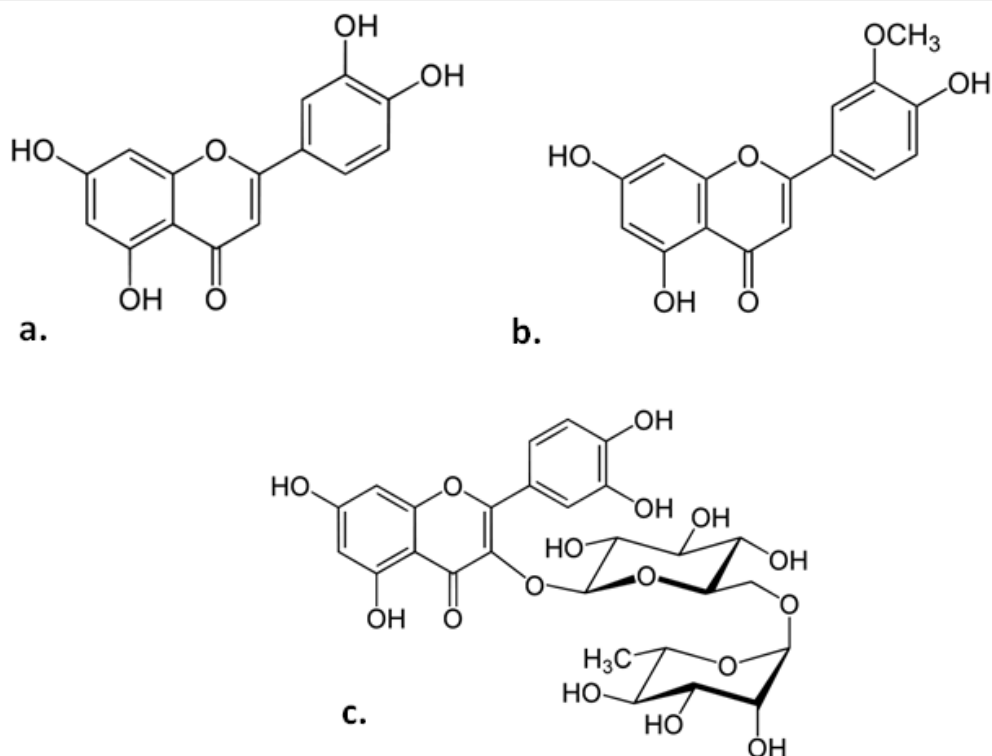
Lp.	Czas retencji [min]	Jon molekularny [m/z]	Główne jony fragmentacyjne [m/z]	Masa rzeczywista [Da]	Związek
1.	1,25 – 1,33	311,0	135; 149; 179	312,2290	Kwas kaftarowy
2.	1,74 – 1,87	352,9	179; 191	354,3087	Kwas 1-kawochinowy lub 5-kawochinowy
3.	2,11 – 2,13	353,2	179; 191	354,3087	Kwas 3-kawochinowy
4.	4,08 – 4,10	609,7	301	610,5175	Rutyna
5.	4,18 – 4,27	472,9	135; 149; 179; 293; 312;	474,3711	Kwas cykoriowy
6.	4,78 – 4,82	515,2	179; 191; 353	516,4509	Kwas dikawochinowy
7.	5,98 – 6,07	285,3	132; 150; 175; 199; 216	286,2363	Luteolina
8.	6,90 – 6,92	299,1	175; 242; 285;	300,2629	Chryzoeriol

Dominującymi związkami w ekstraktach z liści mniszka lekarskiego były kwas cykoriowy oraz kaftarowy, na co wskazuje występowanie wyraźnych, intensywnych pików przypisywanych tym metabolitom na wszystkich chromatogramach. Wzory strukturalne najważniejszych kwasów fenolowych przedstawiono na rysunku 1.

Ponadto, zarówno na chromatogramach ekstraktów z liści, jak i kwiatów, obecny jest intensywny pik przy czasie retencji ok. 6 minut, przypisywany luteolinie. Szczególnie dużą zawartość tego flawonoidu obserwowano z ekstraktach z kwiatów mniszka. Obok luteoliny w ekstraktach obecny jest chryzoeriol, będący jej 3'-metylowaną pochodną. Spośród innych flawonoidów poprzez porównanie czasu retencji oraz widma fragmentacyjnego z wzorcem potwierdzono obecność rutyny (3-O-rutynozyd kwercetyny). Wzory strukturalne zidentyfikowanych flawonoidów zaprezentowano na rysunku 2.



Rys. 1. Kwasy fenolowe zidentyfikowane w ekstraktach mniszka lekarskiego: a. – kwas kaftarowy, b. – kwas 5-kawochinowy (chlorogenowy), c. – kwas cykoriowy

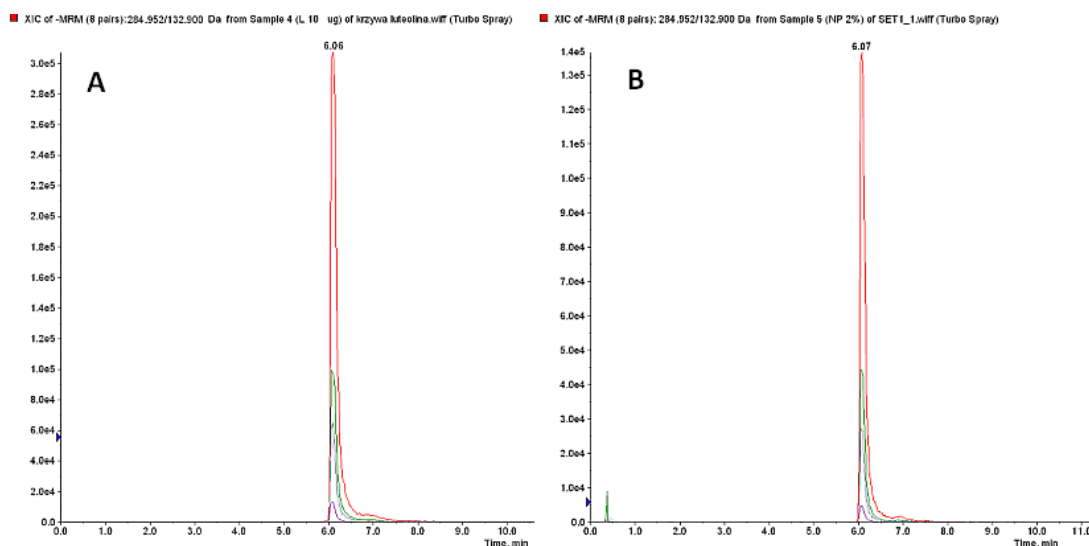


Rys. 2. Flawonoidy zidentyfikowane w ekstraktach mniszka lekarskiego: a. – luteolina, b. – chrysoeriol, c. – rutyna

Izomery kwasów kawochinowych rozróżniono na podstawie charakterystycznego wzoru fragmentacji: izomer podstawiony w pozycji 3 charakteryzuje się na widmie fragmentacyjnym obecnością stosunkowo intensywnego pików przy m/z 179, który to pik jest słaby w przypadku izomerów 1-CQA oraz 5-CQA [26]. Dla dokładnego określenia, który z dwóch możliwych izomerów jest eluowany przy czasie retencji ok. 1,8 min. należałoby przeprowadzić porównanie ze standardem analitycznym. Podobnie w przypadku kwasu dikawochinowego trudno jest stwierdzić, z którym izomerem mamy do czynienia, nie dysponując odpowiednimi wzorcami. Ponadto, obok związków wymienionych w tabeli 1. stwierdzono obecność licznych innych związków, trudniejszych do identyfikacji na podstawie samych widm fragmentacyjnych. Prawdopodobnie w ekstraktach obecne są pewne pochodne kwasu kawowego, na co wskazuje obecność jonu o m/z 179. Na podstawie obecności jonów fragmentacyjnych charakterystycznych dla luteoliny (m/z 175, 199, 216 i 285) można wnioskować, że wyekstrahowano także pewne glikozydy tego flavonoidu o masach 448 i 610 Da (diglikozydy). W ekstraktach kwiatów przy czasie retencji ok. 6,7 min. wmywany jest pewien glikozyd, na podstawie obecności jonu fragmentacyjnego o m/z 327 można wnioskować, iż jest to orientyna (8-glukozyd luteoliny). Przy znacznie wyższych wartościach czasu retencji obserwowane są piki pochodzące od zastosowanych do ekstrakcji surfaktantów. Ich widma charakteryzują się występowaniem licznych pików oddalonych od siebie o charakterystyczną wartość masy, odpowiadającą jednostkom strukturalnym tworzącym hydrofobowy „ogon” węglowodorowy surfaktanta.

Ponadto obecność dwóch związków – luteoliny oraz rutyny potwierdzono przy pomocy analiz MRM (ang. *multiple reaction monitoring*). W takim trybie analizy w pierwszym kwadrupolu spektrometru masowego wybierane są jony macierzyste o zdefiniowanej wartości m/z . W komorze kolizyjnej dochodzi do fragmentacji, a drugi kwadrupol przepuszcza do detekcji jedynie jony fragmentacyjne o zadanej m/z . Biorąc pod uwagę kilka par MRM, odpowiadających charakterystycznym dla danego związku przejściom fragmentacyjnym, można

z dużą pewnością zidentyfikować związek chemiczny obecny w badanej próbce. Metoda MRM może być także stosowana w analizie ilościowej. W przypadku luteoliny wykorzystano 5 par MRM: $m/z = 284,95 \rightarrow 132,90$; $284,95 \rightarrow 150,90$; $284,95 \rightarrow 174,90$; $284,95 \rightarrow 198,90$ oraz $284,95 \rightarrow 216,90$. Dla rutyny były to 3 pary odpowiadające przejściom: $609,14 \rightarrow 254,60$; $609,14 \rightarrow 271,00$ oraz $609,14 \rightarrow 300,00$. Rysunek 3 przedstawia porównanie chromatogramów MRM dla standardu luteoliny (A) oraz przykładowego ekstraktu wykonanego z użyciem 2% roztworu Nonidetu P-40 (B).



Rys. 3. Chromatogramy MRM dla standardu luteoliny (A) oraz ekstraktu (NP-40 2%, B)

5. PODSUMOWANIE

Przedstawione liczne przykłady zastosowań surfaktantów w procesie ekstrakcji roślinnych metabolitów wtórnych o aktywności biologicznej dowodzą, że omawiana technika pozyskiwania związków biologicznie czynnych zdobywa coraz większą popularność. Wynika to z szeregu jej zalet w stosunku do technik klasycznych, wykorzystujących rozpuszczalniki organiczne. Na całym świecie prowadzonych jest wiele badań dotyczących wykorzystania związków powierzchniowo czynnych w ekstrakcji wspomaganą micelarnie i ekstrakcji w punkcie zmętnienia. Obszar dotyczący analitów pochodzenia roślinnego jest niewielkim wycinkiem szerokiego zakresu zastosowań tej metody, jest jednak ważny ze względu na rosnące zapotrzebowanie na tego typu substancje, wykorzystywane w farmacji czy kosmetyce.

Opisane badania własne, w których wodne roztwory surfaktantów zastosowano do uzyskania bogatych w polifenole ekstraktów z pospolitej rośliny leczniczej – mniszka lekarskiego, potwierdzają użyteczność tej metody. Analizy UPLC/MS wykazały obecność kilku ważnych polifenoli z grupy flawonoidów oraz kwasów fenolowych. Te wstępne badania mogą stanowić podstawę do dalszych prac nad wykorzystaniem systemów ekstrakcji opartych na roztworach związków powierzchniowo czynnych do pozyskiwania, zateżnienia i izolacji cennych składników fitochemicznych, mających szerokie spektrum działania biologicznego.

Literatura

1. R. Zieliński, Surfaktanty. Budowa, właściwości, zastosowania, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań, 2009.
2. A. Melnyk, L. Wolska, J. Namieśnik, Wykorzystanie związków powierzchniowo czynnych na etapie przygotowania próbek do analizy jako zielona alternatywa dla konwencjonalnych technik ekstrakcyjnych, *Analityka*, Vol. 4, 2014, p. 16–23.
3. Q. Fang, H. W. Yeung, H. W. Leung, C. W. Huie, Micelle-mediated extraction and preconcentration of ginsenosides from Chinese herbal medicine, *Journal of Chromatography A*, Vol. 904, 2000, p. 47–55.
4. E. S. Ong, S. M. Len, Evaluation of surfactant-assisted pressurized hot water extraction for marker compounds in *Radix Codonopsis pilosula* using liquid chromatography and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Separation Science*, Vol. 26, 2003, p. 1533–1540.
5. Z. Shi, J. He, W. Chang, Micelle-mediated extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge* with analysis by high-performance liquid chromatography, *Talanta*, Vol. 64, 2004, p. 401–407.
6. J. He, Z. Zhao, Z. Shi, M. Zhao, Y. Li, W. Chang, Analysis of Isoflavone Daidzein in *Puerariae radix* with Micelle-Mediated Extraction and Preconcentration, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, p. 518–523.
7. Z. Shi, X. Zhu, H. Zhang, Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in *Cortex fraxini* by HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 44, 2007, p. 867–873.
8. J. Zhou, X. L. Sun, S. W. Wang, Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1200, 2008, p. 93–99.
9. Ch. Sun, Y. Xie, Q. Tian, H. Liu, Analysis of Glycyrrhizic Acid and Liquiritin in Licorice root with Microwave-assisted Micellar Extraction and Pre-concentration, *Phytochemical Analysis*, Vol. 19, 2008, p. 160–163.
10. A. T. W. Eng, M. Y. Heng, E. S. Ong, Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 583, 2007, p. 289–295.
11. K. Kiathevest, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution, *Separation and Purification Technology*, Vol. 66, 2009, p. 111–117.
12. W. Bi, M. Tian, K. H. Row, Extraction and concentration of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza Bunge* by task-specific non-ionic surfactant assistance, *Food Chemistry*, Vol. 126, 2011, p. 1985–1990.
13. W. Xing, L. Chen, Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration of bergenin from *Ardisia japonica*, *Separation and Purification Technology*, Vol. 110, 2013, p. 57–62.
14. A. A. Memon, N. Memon, M. I. Bhangar, Micelle-mediated extraction of chlorogenic acid from *Morus laevigata* W. leaves, *Separation and Purification Technology*, Vol. 76, 2010, p. 179–183.

15. L. Jiang, G. Zhou, Y. Li, Micelle-Mediated Extraction for the Analysis of Chlorogenic Acid, Rutin, and Quercetin in Honeysuckle by HPLC–UV, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 34, 2011, p. 1473–1487.
16. L. Liu, R. L. Liu, J. Zhang, Z. Q. Zhang, Study on the PEG-based microwave-assisted extraction of flavonoid compounds from persimmon leaves, *Journal of Separation Science*, Vol. 35, 2012, p. 3412–3420.
17. T. Zhou, X. Xiao, G. Li, Z. Cai, Study of polyethylene glycol as a green solvent in the microwave-assisted extraction of flavone and coumarin compounds from medicinal plants, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1218, 2011, p. 3608–3615.
18. Ch. Sun, H. Liu, Application of non-ionic surfactant in the microwave-assisted extraction of alkaloids from *Rhizoma Coptidis*, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 612, 2008, p. 16–164.
19. W. Xing, L. Chen, F. Zhang, Separation of camptothecin from *Camptotheca acuminata* samples using cloud point extraction, *Analytical Methods*, Vol. 6, 2014, p. 3644–3650.
20. K. Śliwa, A. Tomasziewicz-Potępa, E. Sikora, J. Ogonowski, Micelle-mediated extraction of elderberry blossom by whey protein and naturally derived surfactants, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 60, 2013, p. 803–806.
21. R. Hosseinzadeh, K. Khorsandi, S. Hemmaty, Study of the Effect of Surfactants on Extraction and Determination of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Fruits Extracts, *Plos One*, Vol. 8, 2013, e57353.
22. J. Zhou, J. B. Sun, X. Y. Xu, Z. H. Cheng, P. Zeng, F. Q. Wang, Q. Zhang, Application of mixed cloud point extraction for the analysis of six flavonoids in *Apocynum venetum* leaf samples by high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 107, 2015, p. 273–279.
23. X. Zhou, L. Dong, D. Li, A comprehensive study of extraction of hyperoside from *Hypericum perforatum* L. using CTAB reverse micelles, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 83, 2008, p. 1413–1421.
24. L. Dong, W. Li, X. Zhou, Q. Kang, W. Shen, Liquid-liquid extraction of matrine using TRPO/cyclohexane reverse micelles, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 26, 2009, p. 415–425.
25. M. Johnson, A comprehensive review of laboratory detergents, and their applications in biomedical experiments, including Labome survey results, *Labome Materials and Methods*, Vol. 3, 2013, p. 163.
26. M. N. Clifford, S. Knight, N. Kuhnert, Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSⁿ, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, p. 3821–3832.

ZALEŻNOŚCI REGRESYJNE W CHEMII ANALITYCZNEJ. WYZNACZANIE I BADANIE ISTOTNOŚCI ZALEŻNOŚCI REGRESYJNYCH

Rafał Rawski^{1a}, Dorota Saletnik¹, Przemysław Sanecki¹, Piotr Skitał¹

¹Katedra Chemii Nieorganicznej i Procesowej, Politechnika Rzeszowska

^alightcode@derpymail.org

1. WSTĘP

W praktyce analitycznej często występuje sytuacja, gdy stężenie oznaczanej substancji jest proporcjonalne do wielkości sygnału przyrządu pomiarowego, którym może być przykładowo absorbancja, natężenie prądu lub wysokość/pole piku. Aby uzyskać wiarygodne wyniki, należy najpierw sporządzić krzywą wzorcową, będącą zależnością wielkości sygnału przyrządu pomiarowego od stężenia mierzonej substancji. Krzywa wzorcowa nie jest zależnością funkcyjną w sensie matematycznym lecz zależnością regresyjną. W zależności regresyjnej danej wartości x może odpowiadać kilka wartości y . Innymi słowy w praktyce dysponuje się zbiorem danych w postaci macierzy zawierającej kolumnę wartości x i kolumny wartości y (jedną lub więcej). Trzeba odpowiedzieć na pytanie czy istnieje związek (korelacja) pomiędzy zmiennymi y i x . Ilościowe wyznaczenie takiego związku nosi nazwę analizy regresji.

Redakcje czasopism analitycznych nie akceptują już samej prostej analizy statystycznej podczas wyznaczania krzywej wzorcowej (równanie prostej $ax + b$, Δa , Δb i r^2). Współczynnik r^2 jako kryterium jakości korelacji nie wystarcza, a nawet może prowadzić do błędnych wniosków bowiem jego wartość bliską 1 otrzymuje się także dla zależności wyraźnie zakrzywionych [1, 2]. Z tego powodu w publikacjach należy przedstawiać pełną ocenę statystyczną, obejmującą testy *F-Snedecora*, *F-IUPAC*, *F-Mandel'a* oraz *Lack of Fit* na ew. obecność krzywoliniowości. Testy, trzeci i czwarty z wymienionych, zostały w niniejszej pracy potraktowane pierwszoplanowo, zwłaszcza że są bardzo nielicznie reprezentowane w literaturze polskojęzycznej [3, 4] i mało znane ogółowi badaczy. Dotychczasowa literatura przedmiotu dotycząca testu *F-Mandel'a* oraz testu *Lack of Fit* odwołuje się do kilku procedur, bez podawania klarownych przykładów, rozwiązanych krok po kroku, wraz z wyraźną końcową konkluzją. Zamiast tego, odnośne prace oryginalne często zawierają odniesienia do oprogramowania statystycznego, niedostępnego lub niejasnego dla czytelnika [5, 6].

Celem niniejszej pracy jest danie czytelnikowi klarownego narzędzia do statystycznej oceny modeli regresyjnych używanych do kalibracji, w którym wystarczą standardowe programy typu Origin, Excel lub Libre Office. Dlatego, oprócz niezbędnego minimum teorii, przedstawiono szereg konkretnych przykładów z możliwością wprowadzenia własnych danych.

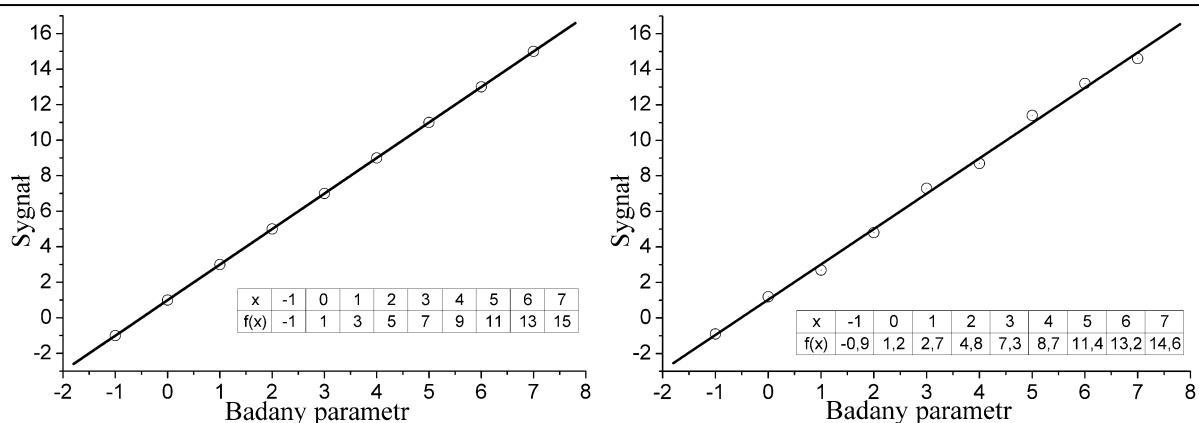
2. KRZYWE KALIBRACYJNE JAKO PRZYKŁAD ZALEŻNOŚCI REGRESYJNYCH

2.1 ZALEŻNOŚCI FUNKCYJNE A ZALEŻNOŚCI REGRESYJNE

LISTA UŻYTYCH SYMBOLI			
Symbol	Znaczenie	Symbol	Znaczenie
$a; b; c$	Współczynniki równań regresji	s_0	Odchylenie standardowe
$t_a; t_b; t_c$	Istotności współczynników regresji	s_a	Odchylenie standardowe wsp. a
α	Poziom istotności	s_b	Odchylenie standardowe wsp. b
df	Ilość stopni swobody	n	Liczba zmiennych niezależnych x
$t(\alpha, df)$	Współczynnik $t_{Studenta}$	$\hat{}$	Symbol wartości estymowanej
E_L, E_Q	Efekt liniowy i kwadratowy	$\bar{}$	Symbol wartości średniej
F_{IUPAC}	Wartość testu F-IUPAC	$\#$	Symbol wartości krytycznej
F_M	Wartość testu F-Mandel'a	$s_{\hat{y}}^2$	Wariancja resztowa
F_L, F_Q	Istotność efektu liniowego i kwadratowego	F_{LoF}	Wartość testu Lack of Fit
SSE_{red}	Suma kwadratów błędów modelu zredukowanego	SSE_{full}	Suma kwadratów błędów modelu pełnego
$SSLF$	Suma kwadratów błędów niedopasowania	$MSLF$	Średnia suma kwadratów błędów niedopasowania
MSE_{full}	Średnia suma kwadratów błędów modelu pełnego	m_i	Ilość powtórzeń pomiaru y_i dla danego x
r^2	Współczynnik determinacji modelu liniowego	R^2	Współczynnik determinacji modelu kwadratowego

Celem analizy regresji jest stworzenie modelu opisu zbioru doświadczalnych wartości zmiennych zależnych y i niezależnych x oraz przewidywanie wartości zmiennej x na jego podstawie. Wiąże się to z pewnymi błędami oszacowania. Dla danego zbioru danych może istnieć znaczna liczba modeli regresyjnych, jednak chcąc uzyskać wiarygodne wyniki, należy używać modelu dającego jak najmniejsze jego odchylenie od danych doświadczalnych. Można to zrobić intuicyjnie prowadząc prostą lub krzywą pomiędzy punktami lub w sposób ściśle matematyczny.

Dla dobrego zrozumienia idei opracowania matematycznego wyników eksperymentów, modelowania, estymacji, kalibracji, krzywych wzorcowych itp. pojęć należy wyraźnie rozróżnić pojęcia zależności funkcyjnej i zależności regresyjnej [7, 8]. Z zależnością funkcyjną $y = f(x)$ mamy do czynienia wtedy, gdy każdemu elementowi zbioru wartości zmiennej x przyporządkowana jest dokładnie jedna wartość y . W przypadku zależności regresyjnej punkty nie leżą dokładnie na prostej a jednej wartości zmiennej niezależnej x może odpowiadać kilka wartości y . Porównanie przykładowej zależności funkcyjnej i regresyjnej przedstawia Rys. 1.



Rys. 1. A: Zależność funkcyjna: $y = 2x + 1$; $\Delta a = 0$; $\Delta b = 0$; $r^2 = 1$
 B: Zależność regresyjna: $y = 1,988x + 1,035$; $\Delta a = 0,004$; $\Delta b = 0,0628$; $r^2 = 0,9970$

Dla współczynnika kierunkowego a i współczynnika przesunięcia b równania prostej $y = ax + b$ można wyznaczyć ich przedziały ufności Δa i Δb w oparciu o generowane przez program Origin wartości parametrów. Jest to wygodny i użyteczny program lecz oznaczenia równania prostej są tam odwrotne niż przyjęte w matematyce, mianowicie $y = Bx + A$ (Tabela 1). Jego stosowanie wymaga poza tym wyjaśnienia istoty parametru "Error" dla A i B , są to po prostu odchylenia standardowe s_a i s_b . Program Origin podaje także odchylenie standardowe s_0 oznaczone jako SD . Dla naszego przykładu $s_a = 0,04117$; $s_b = 0,16295$.

Tabela 1. Identyfikacja oznaczeń regresji liniowej w programie Origin, na podstawie [8]

Origin $Y = A + BX$	STATYSTYKA $y = ax + b$	Równanie definiujące
B	Współczynnik kierunkowy a	(9)
A	Wyraz wolny b	(9)
SD	s_0	(1)
Error B	s_a	(2)
Error A	s_b	(2)

2.2 BADANIE ISTOTNOŚCI WSPÓŁCZYNNIKÓW RÓWNANIA REGRESJI

Po wyznaczeniu równania regresji należy określić istotność otrzymanych wartości współczynników wielomianu otrzymanego równania regresyjnego.

Test na istotność współczynnika równania $y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + \dots + b_nx^n$ zakłada hipotezę zerową H_0 : „Współczynnik b_i nie różni się istotnie od zera”. Hipotezę tą można zweryfikować poprzez obliczenie równania: $t_{b_i} = |b_i|/s_{b_i}$, a następnie porównanie otrzymanej wartości ze współczynnikiem $t(\alpha; n - k - 1)$, gdzie k oznacza stopień wielomianu. Jeśli zachodzi zależność $t_{b_i} \geq t$, to należy odrzucić hipotezę zerową na rzecz hipotezy alternatywnej: „Współczynnik b_i różni się znacząco od zera”. Wynik taki wskazuje na istotność danego współczynnika i niemożność jego pominięcia w zapisie równania [9, 10].

W przypadku naszego przykładu $t_a = 48,29$; $t_b = 6,352$; $t(0,95; 7) = 2,365$. Tym samym w przypadku obu współczynników równania należy odrzucić hipotezę zerową uznając je tym samym za istotne i niemożliwe do pominięcia.

2.3 PRZEDZIAŁ UFNOŚCI I WSPÓŁCZYNNIK DETERMINACJI

Po wyznaczeniu równania regresji należy wyznaczyć przedziały ufności współczynników równania. Można tego dokonać posługując się ich odchyleniem standardowym oraz współczynnikiem $t_{Studenta}$ [7]. Stosując poniższe równania (1) i (2) można obliczyć wartości odchyłeń dla każdego ze współczynników równania.

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2 - b \sum_{i=1}^n y_i - a \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n - 2} \quad (1)$$

$$s_a^2 = \frac{n s_0^2}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}; \quad s_b^2 = \frac{s_a^2}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2 \quad (2)$$

Następnie należy odszukać w tablicy współczynnik $t_{Studenta}$ dla przyjętego poziomu istotności α oraz liczby stopni swobody $df = n - 2$, gdzie n – liczba wartości x . Mając te dane można łatwo obliczyć przedziały ufności współczynników a i b (3).

$$\Delta a = t(\alpha, df) \cdot s_a^2; \quad \Delta b = t(\alpha, df) \cdot s_b^2 \quad (3)$$

$$\hat{y} = (a \pm \Delta a)x + b \pm \Delta b \quad (4)$$

Ogólną postać liniowego modelu regresyjnego wyraża wzór (4), gdzie Δa i Δb oznaczają przedziały ufności (błąd dopasowania). Jeśli $\Delta a = 0$ i $\Delta b = 0$, to rozpatrywana zależność $y = ax + b$ jest zależnością funkcyjną. Potwierdza to podany wyżej wniosek, że zależność funkcyjna jest szczególnym przypadkiem zależności regresyjnej (symbol $\hat{}$) gdy błąd dopasowania równy jest zeru. Wartość y wynikająca dla danego x z równania regresji (tu prostej), jest zawsze wartością estymowaną \hat{y} . Różnica $y_i - \hat{y}_i$, a ściślej jej kwadrat, ma istotne znaczenie dla metody najmniejszych kwadratów.

Do oceny jakości (siły) związku regresyjnego służy współczynnik korelacji r oraz współczynnik determinacji r^2 (5).

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (5)$$

Współczynnik r^2 przyjmuje wartości z przedziału $(0; 1)$, im jego wartość jest bliższa 1, tym zastosowany model lepiej opisuje dany zbiór punktów doświadczalnych. Nie stanowi to jednak decydującego kryterium.

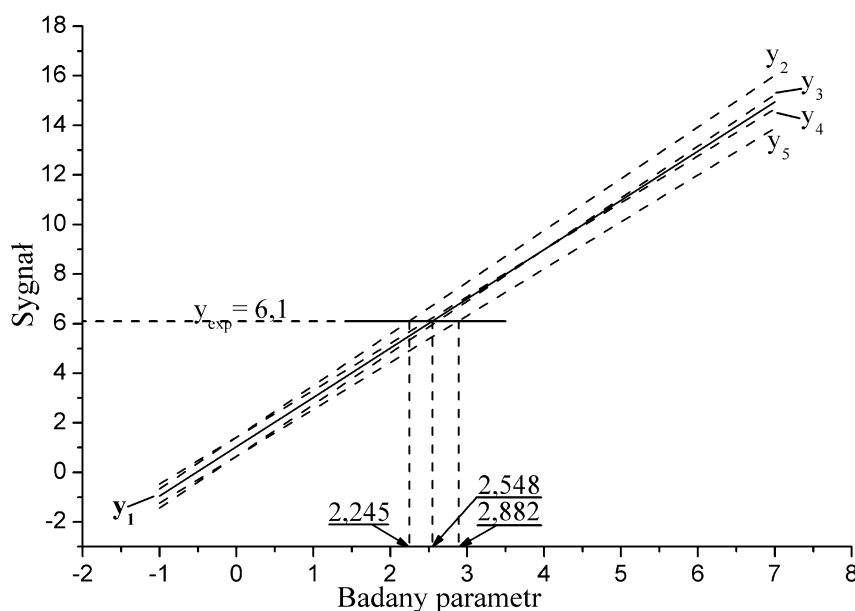
Same wartości odchylenia standardowego¹ s_a i s_b , które uzyskujemy przy pomocy programu Origin to za mało. Wiele osób myli s_a i s_b z przedziałami ufności, uważając te pierwsze za miarę niepewności a i b . Aby otrzymać rzeczywisty przedział ufności, trzeba s_a^2 i s_b^2 pomnożyć przez wartość współczynnika $t_{Studenta}$ (tu: 2,365) dla danego poziomu istotności α (tu: 0,95) i $n - 2$ stopni swobody (n - liczba wartości x). Tak uzyskuje się pełne równanie prostej regresji z Rys. 1

¹ Odchylenie standardowe (sd) jest różnie definiowane (sd populacji, sd pojedynczego pomiaru, sd średniej [7]). Dlatego, aby uniknąć nieporozumień, należy przy posługiwaniu się tym pojęciem podać odpowiednie równanie definiujące.

czyli $y = ax + b$; $a = 1,988 \pm 0,004$; $b = 1,035 \pm 0,06280$; $r^2 = 0,9970$. Przedział ufności, jako miara niepewności wyznaczonego równania, zależy istotnie od liczby punktów pomiaru poprzez parametr $t_{Studenta}$. Optimum liczby punktów pomiarowych wynosi 8 do 9, gdyż wtedy przedział ufności staje się istotnie węższy. Nie jest to wielki problem ponieważ dla danego x , którego to wartość uważa się za pewną, możemy mieć kilka wartości y . Po przekroczeniu $n = 9$, współczynnik $t_{Studenta}$ maleje już nieznacznie ze wzrostem liczby punktów pomiarowych, dlatego brak jest motywacji do dalszego zwiększania liczby punktów pomiarowych.

Na bazie równania regresji y_1 z Rys. 1B, zmieniając a i b o wartość Δa i Δb wg reguły: $(a\uparrow)(b\uparrow)$, $(a\uparrow)(b\downarrow)$, $(a\downarrow)(b\uparrow)$, $(a\downarrow)(b\downarrow)$ wyznaczono cztery dodatkowe równania regresji (4), które następnie przedstawiono na wykresie (Rys. 2).

$$\begin{aligned} y_1 &= 1,988x + 1,035; & y_2 &= 2,085x + 1,420; \\ y_3 &= 2,085x + 0,6495; & y_4 &= 1,891x + 1,420; \\ y_5 &= 1,891x + 0,6495 \end{aligned} \quad (6)$$



Rys. 2. Równanie regresji wraz z dodatkowymi równaniami wynikającymi z przedziałów ufności. O dokładności decydują dwa równania skrajne y_2 i y_5 . Dane liczbowe z Rys. 1B

Zależność wzorcowa i wyznaczony dla niej przedział ufności (Rys. 2) pozwala na wyznaczenie nieznannej wartości x (np. stężenia) przy dysponowaniu zmierzoną wartością y . Widoczne na wykresie graniczne równania y_2 i y_5 , wyznaczające najszerszy zakres błędów, pozwoliły na wyznaczenie przedziału ufności dla całej krzywej modelowej. Należy pamiętać, że niepewność wartości y skutkuje niepewnością x . Tym samym odczytana na podstawie modelu wartość x również posiada swój przedział ufności Δx , który powinien zostać uwzględniony.

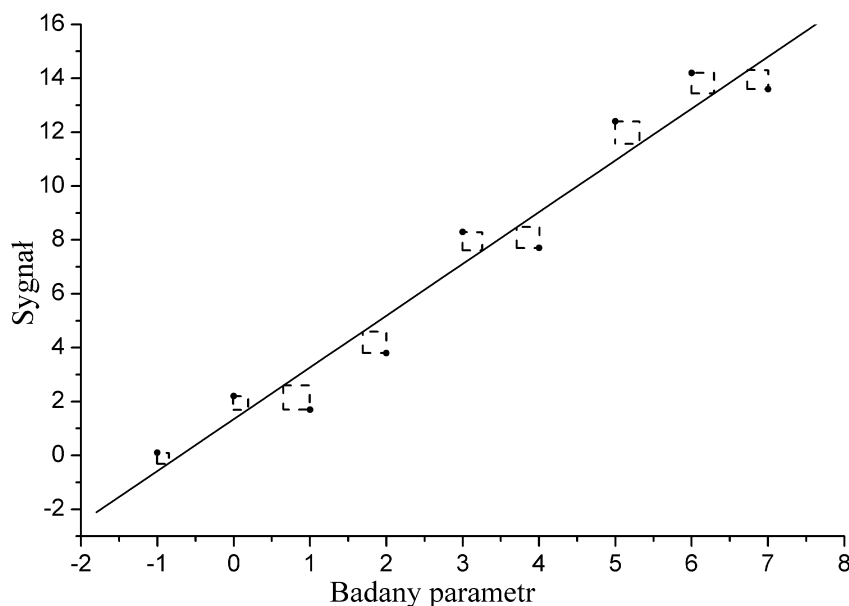
2.4 PODSUMOWANIE WYZNACZANIA ZALEŻNOŚCI REGRESYJNEJ

1. Wyznaczono podstawowe równanie regresji z użyciem programu Origin.
2. Potwierdzono istotność wszystkich wyznaczonych współczynników równania.
3. Wyznaczono przedział ufności dla a i b , korzystając z wartości s_a^2 , s_b^2 i wsp. $t_{Studenta}$.

4. Wyznaczono cztery graniczne równania regresji. Wykorzystano równanie podstawowe i dwa zewnętrzne, dające najszerszy przedział ufności.
5. Odczytano, dla zmierzonej wartości y_{exp} , trzy wartości $x = 2,548; 2,245; 2,882$ co ostatecznie daje $x = 2,548 \pm 0,303$ lub przedział $x \in (2,245; 2,882)$.

3. METODA NAJMNIEJSZYCH KWADRATÓW

Powyzsza analiza bazowała na programie Origin bez podania, że wyznacza on krzywe regresji (Rys. 1 i 2) metodą najmniejszych kwadratów. Jest to metoda optymalizacji zależności modelowej, gdy kryterium optymalizacji stanowi minimalizacja sumy odchyleń model-eksperyment dla wszystkich punktów czyli np. sumy pól kwadratów [8] zaznaczonych na Rys. 3.



Rys. 3. Istota optymalizacji zależności modelowej do punktów doświadczalnych metodą najmniejszych kwadratów

Jeśli przez zbiór par punktów pomiarowych x_i, y_i poprowadzi się funkcję $\hat{y} = f(x)$ stanowiącą model opisu, to każdemu punktowi pomiarowemu x , będą odpowiadać dwie wartości: zmierzona y i oszacowana (estymowana) \hat{y} . Model czyli równanie regresji może być liniowy lub krzywoliniowy, wyrażony odpowiednim wyrażeniem funkcyjnym.

Dla liniowego modelu regresji $\hat{y} = ax + b$ kryterium optymalizacji jest minimum sumy $S(a, b)$:

$$S(a, b) = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - b - ax_i)^2 = \text{minimum} \quad (7)$$

gdzie \hat{y}_i oznacza wartość estymowaną na podstawie równania regresji, a n liczbę punktów pomiarowych (w przypadku wielokrotnych pomiarów dla danego punktu x_i należy przyjąć wartości średnie \bar{y}_i).

Równanie (7) jest funkcją dwóch zmiennych a i b . Określenie wartości minimalnej funkcji wielu zmiennych jest możliwe poprzez znalezienie punktu, w którym jej pochodne cząstkowe

względem wszystkich zmiennych są równe zero. Stąd wynika układ równań (8), który może zostać uporządkowany do formy (9).

$$\begin{cases} \frac{\partial S(a, b)}{\partial a} = 2 \sum_{i=1}^n (y_i - b - ax_i)(-x_i) = 0 \\ \frac{\partial S(a, b)}{\partial b} = 2 \sum_{i=1}^n (y_i - b - ax_i)(-1) = 0 \end{cases} \quad (8)$$

$$\begin{cases} b \sum_{i=1}^n x_i + a \sum_{i=1}^n x_i^2 = \sum_{i=1}^n x_i y_i \\ bn + a \sum_{i=1}^n x_i = \sum_{i=1}^n y_i \end{cases} \quad (9)$$

Z układu (9) wynikają wzory na współczynniki a i b równania prostej:

$$a = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (10)$$

Stosowana metoda jest czuła na ewentualnie obecne w zbiorze danych istotnie odbiegające wartości y . Każda z takich wartości będzie odchyłać wyznaczoną funkcję w swoją stronę przez co dopasowanie do pozostałych punktów będzie słabsze. Dlatego przed zastosowaniem tej metody należy pozbyć się wszelkich błędów grubych ze zbioru danych, posługując się odpowiednim kryterium matematycznym [7].

3.1 METODA NAJMNIEJSZYCH KWADRATÓW – PRZYKŁAD

Metodami kolorymetrycznymi, przy użyciu spektrofotometru UV-VIS, zbadano próbki zawierające znane stężenia albuminy oraz próbki o znanym stężeniu glicyny w celu sporządzenia krzywych wzorcowych. Dane pomiarowe zostały zamieszczone w Tabeli 2.

Ze wzorów (10) lub szybciej z programu Origin dla danych albuminy (Tabela 2) uzyskuje się: $a = 0,02205$; $b = 0,04778$; $t_a = 16,21$; $t_b = 2,962$; $t(0,95; 9) = 2,262$. Stąd, wszystkie współczynniki równania są istotne. Zatem ma ono postać: $y = 0,02205x + 0,04778$; $s_0^2 = 8,174 \cdot 10^{-4}$; $s_a^2 = 1,850 \cdot 10^{-6}$; $s_b^2 = 2,602 \cdot 10^{-4}$.

Przedziały ufności wynoszą odpowiednio: $\Delta a = 4,184 \cdot 10^{-6}$; $\Delta b = 5,886 \cdot 10^{-4}$. Tak więc ostatecznie równanie regresji liniowej ma postać:

$$y = (2,205 \cdot 10^{-2} \pm 4,184 \cdot 10^{-6})x + (4,778 \cdot 10^{-2} \pm 5,886 \cdot 10^{-4}) \quad (11)$$

Współczynnik r^2 równania (11) wynosi 0,9667 co jest dobrym lecz nie najlepszym wynikiem, na co wskazuje druga cyfra po przecinku. Sugeruje to na konieczność sprawdzenia innych modeli.

Tabela 2. Wyniki pomiaru stężeń albuminy i glicyny metodą UV-VIS

Standard albuminy [μg/ml]	Wysokość piksu [$\times 10^{-3}$]	Średnia wysokość piksu	Standard glicyny [μg/ml]	Wysokość piksu [$\times 10^{-3}$]	Średnia wysokość piksu
0	0; 0; 0	0	0	0; 0; 0	0
2	89; 82; 70	0,08033	0,00250	175; 221; 222	0,2060
4	137; 142; 128	0,1357	0,00500	368; 435; 458	0,4203
6	215; 201; 205	0,2070	0,00750	627; 643; 635	0,6350
8	245; 242; 243	0,2433	0,01000	861; 799; 858	0,8393
10	302; 317; 290	0,3030	0,01125	952; 915; 961	0,9427
12	335; 325; 327	0,3290	0,01250	1087; 1009; 1015	1,037
14	366; 375; 370	0,3703	0,01375	1189; 1097; 1180	1,155
16	413; 405; 400	0,4060	0,01500	1301; 1174; 1248	1,241
18	434; 441; 420	0,4317			
20	442; 450; 441	0,4443			

Z danych dla glicyny (Tabela 2), wynika $a = 83,26$; $b = 0,002650$; $t_a = 178,4$; $t_b = 0,5724$; $t(0,95; 7) = 2,365$. Równanie ma postać: $y = 83,26x + 2,650 \cdot 10^{-3}$; $s_0^2 = 4,733 \cdot 10^{-5}$; $s_a^2 = 0,2179$; $s_b^2 = 2,144 \cdot 10^{-5}$. Przedziały ufności współczynników wynoszą odpowiednio $\Delta a = 0,5153$; $\Delta b = 5,070 \cdot 10^{-5}$, co ostatecznie daje równanie (12). Test istotności współczynników wskazał na możliwość uproszczenia współczynnika b ($t_b < t(0,95; 7)$), co prowadzi do uzyskania formy (12').

$$y = (83,26 \pm 0,5153)x + 2,650 \cdot 10^{-3} \pm 5,070 \cdot 10^{-5} \quad (12)$$

$$y = (83,26 \pm 0,5153)x \quad (12')$$

Współczynnik r^2 równania (12) wynosi 0,9998. Tym samym r^2 jest bliski 1, co sugeruje uzyskanie niemal idealnego równania regresyjnego. Jednak, w świetle aktualnych wymagań czasopism analitycznych, nawet taka wartość r^2 nie stanowi wystarczającego dowodu na poprawność przyjętego modelu. Wymagane jest podanie wyników dodatkowych testów statystycznych, przedstawionych w kolejnych rozdziałach.

W podanym przykładzie wartości s_0^2 , s_a^2 i s_b^2 zostały obliczone przy pomocy programu Origin, wartości Δa i Δb , obliczeniowo proste, za pomocą kalkulatora.

4. TEST LACK OF FIT [11, 12]

Jak zostało to wspomniane we wstępie, współczynnik determinacji nie może jednoznacznie wskazać czy przyjęty model jest odpowiedni. Aby to rozstrzygnąć należy przeprowadzić analizę statystyczną przyjętego modelu. Jednym z testów statystycznych używanych do tego celu jest test Lack of Fit, czyli test służący do wykrycia niedopasowania danych do przyjętego modelu regresyjnego.

Przedmiotem testu jest model regresyjny

$y_{ij} = ax_i + b + \varepsilon_{ij}$; $\{(x_i, y_{ij}): i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, m_i\}$ dla przypadku, gdy każdej wartości x_i odpowiadają $m_i \leq 3$ wartości y (Tabela 2), gdzie n oznacza liczbę pomiarów, a m oznacza ilość powtórzeń pomiaru dla danego x .

Aby model liniowy był dopasowany do danych, utrzymana musi zostać hipoteza zerowa $H_0: y_{ij} = ax_j + b$. Aby ją sprawdzić należy obliczyć sumę kwadratów błędów modelu pełnego (13) i błędów modelu zredukowanego (14), a następnie odjąć je od siebie (15).

$$SSE_{full} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} y_{ij}^2 - \sum_{i=1}^n n_i \bar{y}_i^2 \quad (13)$$

$$SSE_{red} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} (y_{ij} - b - ax_i)^2 \quad (14)$$

$$SSLF = SSE_{red} - SSE_{full} \quad (15)$$

Uzyskane w ten sposób wyniki (13), (15) należy podzielić przez odpowiadające im liczby stopni swobody (16), (17). Uzyskany rezultat to (18) i (19). Końcowym wynikiem obliczeń testu jest wartość F_{LoF} (20).

$$df_{SSE,full} = m - n; \quad (16)$$

$$df_{SSLF} = n - 2 \quad (17)$$

$$MSE_{full} = \frac{SSE_{full}}{df_{SSE,full}}; \quad (18)$$

$$MSLF = \frac{SSLF}{df_{SSLF}} \quad (19)$$

$$F_{LoF} = \frac{MSLF}{MSE_{full}} \quad (20)$$

Aby przyjąć lub odrzucić hipotezę zerową, postawioną na początku testu, należy porównać obliczoną wartość F_{LoF} (20) z wartością tablicową $F_{LoF}^{\#}(\alpha; df_{SSLF}; df_{SSE,full})$. Jeśli przy założonym stopniu istotności α zachodzi nierówność $F_{LoF} > F_{LoF}^{\#}$, hipotezę liniowości $H_0: y_{ij} = ax_j + b$ należy odrzucić.

4.1 TEST LACK OF FIT – PRZYKŁAD

Test Lack of Fit wymaga przynajmniej 3 pomiarów wartości y dla każdego x . Same średnie wartości y nie wystarczają. Dlatego w przykładzie zostały wykorzystane wartości nieuśrednione (Tabela 2). Dane te podstawiliśmy kolejno do wzorów (13), (14), (15); podobnie (16), (17), (18), (19) oraz (20) otrzymując wyniki:

Albumina	$SSE_{full} = 1,22 \cdot 10^{-3}$; $SSE_{red} = 0,02329$; $SSLF = 0,02207$; $df_{SSE,full} = 22$; $df_{SSLF} = 9$; $MSE_{full} = 5,545 \cdot 10^{-5}$; $MSLF = 2,452 \cdot 10^{-3}$; $F_{LoF} = 44,21$; $F_{LoF}^{\#}(0,95; 9; 22) = 2,420$
Glicyna	$SSE_{full} = 0,02663$; $SSE_{red} = 0,02764$; $SSLF = 1,009 \cdot 10^{-3}$; $df_{SSLF} = 7$; $df_{SSE,full} = 18$; $MSE_{full} = 1,479 \cdot 10^{-3}$; $MSLF = 1,441 \cdot 10^{-4}$; $F_{LoF} = 0,09742$; $F_{LoF}^{\#}(0,95; 7; 18) = 2,577$

Dla albuminy prawdziwa jest nierówność $F_{LoF} > F_{LoF}^{\#}$. Tym samym należy odrzucić hipotezę zerową o dobrym dopasowaniu modelu liniowego i przyjąć hipotezę alternatywną. Model liniowy dla danych albuminy wykazuje niedopasowanie.

Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku danych dla glicyny. $F_{LoF} < F_{LoF}^{\#}$, tym samym nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej o dopasowaniu modelu liniowego.

5. TEST F-SNEDECOR'A [9, 10]

Test ten zakłada oddzielne wyznaczenie oraz porównanie istotności efektu liniowego i kwadratowego. Efektem liniowym E_L nazywamy tą część ogólnej zmienności zmiennej zależnej, która jest objaśniana przez przyjęty model liniowy $\hat{y} = ax + b$ i wynika z równania (21), gdzie \bar{y} oznacza wartość średnią całej populacji wartości y . Jeśli natomiast zastąpimy model liniowy modelem kwadratowym $\hat{y} = ax^2 + bx + c$, to ta część zmienności zmiennej zależnej objaśniana przez tę parabolę wynika z niemal identycznego iloczynu (22), rozszerzonego o dodatkowy człon.

$$E_L = r^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (21)$$

$$R^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (22)$$

Jeśli natomiast zastąpimy model liniowy modelem kwadratowym $\hat{y} = ax^2 + bx + c$, to ta część zmienności zmiennej zależnej objaśniana przez tę parabolę wynika z niemal identycznego iloczynu (22), rozszerzonego o dodatkowy człon.

Efektem kwadratowym w ogólnej zmienności zmiennej zależnej jest ta jej część, która może zostać dodatkowo objaśniona przez zastąpienie modelu liniowego kwadratowym. Należy więc od iloczynu (22) odjąć równanie (21) otrzymując wyrażenie (23).

$$E_Q = R^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 - r^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = (R^2 - r^2) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (23)$$

Test definiuje istotność efektu jako stosunek tego efektu do wariancji resztowej. Wartość ta określa tę część zmienności zmiennej zależnej, która pozostanie po odjęciu zmienności tłumaczonej przez zmienną zależną. Można ją obliczyć poprzez podzielenie sumy kwadratów odchyłeń przez liczbę stopni swobody, $df = n - (k + 1)$, gdzie n i k oznaczają odpowiednio liczbę zmiennych niezależnych oraz stopień wielomianu (24). Dla ułatwienia obliczeń, wzór (24) można uprościć wstawiając wartość średnią \bar{y} uzyskując osobne wzory dla modelu liniowego i kwadratowego.

$$s_{\hat{y}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - k - 1} \quad (24)$$

$$s_{\hat{y},L}^2 = \frac{(1 - r^2) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - k - 1}; \quad s_{\hat{y},Q}^2 = \frac{(1 - R^2) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - k - 1} \quad (25)$$

Mając zdefiniowane pojęcia efektów (21), (23) oraz wariancji resztowej (25) można uzyskać końcowy wynik testu w postaci istotności efektów.

$$F_L = \frac{r^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{s_{\hat{y},L}^2}; \quad (26)$$

$$F_Q = \frac{(R^2 - r^2) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{s_{\hat{y},Q}^2} \quad (27)$$

Pozostaje teraz porównanie otrzymanych istotności (26), (27) z wartościami tablicowymi $F^\#(\alpha; 1; n - k - 1)$ dla danego poziomu istotności α . Jeśli istotność danego efektu ma wartość mniejszą od wartości tablicowej, należy uznać brak istotności danego efektu. W przypadku wartości większych od tablicowych, im wartość F jest większa od $F^\#$ tym istotniejszy jest dany efekt, najlepiej o jeden lub kilka rzędów wielkości.

Test ten dopuszcza możliwość pozytywnego wyniku dla wszystkich badanych modeli krzywej wzorcowej. W przeciwieństwie do pozostałych testów, dających odpowiedź zero-jedynkową, wyniki klasycznego testu F pozwalają na ilościową ocenę wkładu każdego z modeli w opis danych. Dlatego, mimo swojej niejednoznaczności, jest on przydatny, w ocenie modeli regresyjnych.

5.1 TEST F-SNEDECOR'A – PRZYKŁAD

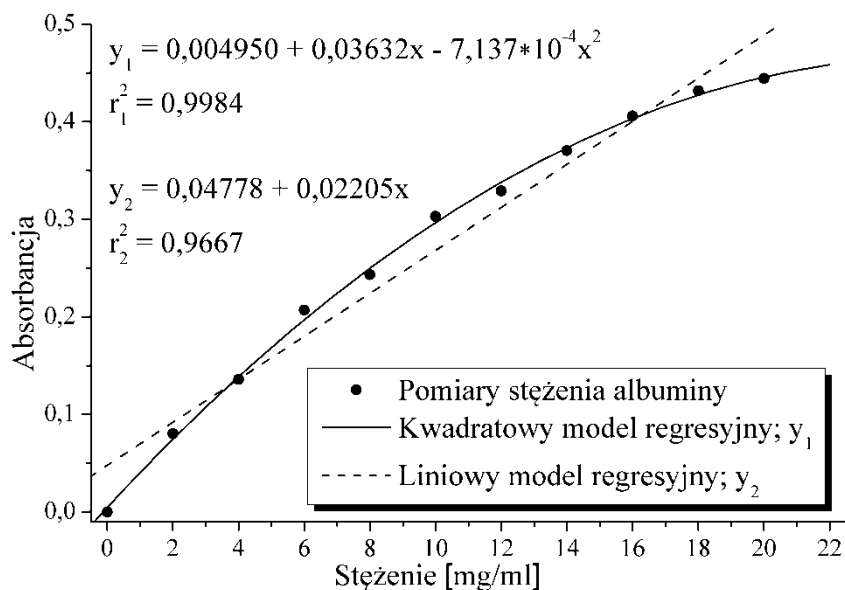
Klasyczny test F-Snedecor'a nie wymaga wielokrotnych pomiarów dla jednej zmiennej niezależnej. Co więcej, w przypadku danych wielokrotnych należy dane te uśrednić. Dla uśrednionych danych z Tabeli 2, korzystając z programu Origin, wyznaczono równania modeli liniowej i kwadratowej zależności regresyjnej dla danych albuminy oraz ich współczynniki determinacji.

Najpierw obliczono efekty liniowy i kwadratowy oraz wariancję resztową dla obu modeli. Następnie obliczono istotności obu efektów.

$$E_L = 0,2139; E_Q = 6,994 \cdot 10^{-3}; s_{\hat{y},L}^2 = 8,173 \cdot 10^{-4}; s_{\hat{y},Q}^2 = 4,520 \cdot 10^{-5}$$

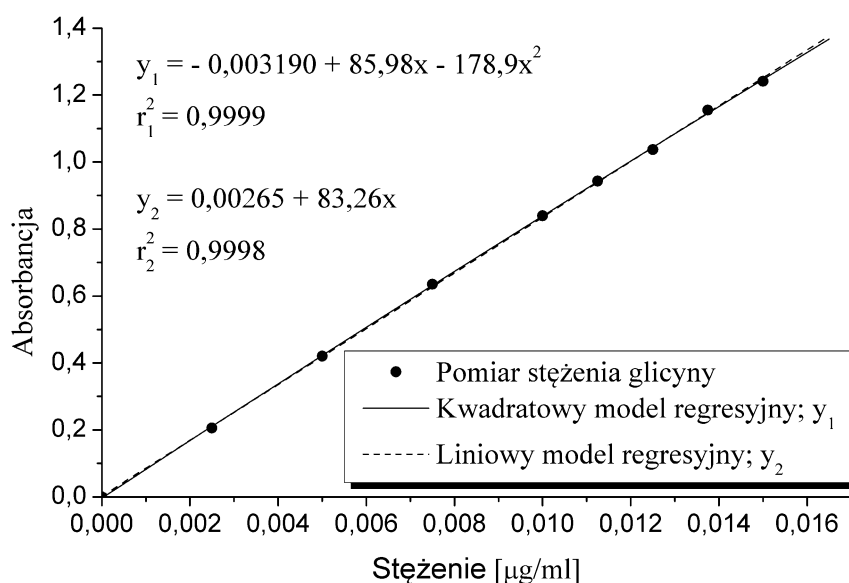
$$F_L = 2,617 \cdot 10^2; F_Q = 1,547 \cdot 10^2; F_L^\# = 5,117; F_Q^\# = 5,318$$

Zachodzi nierówność $F_L > F_L^\#$. Wartość istotności efektu liniowego przekracza wartość tablicową o 2 rzędy wartości. Wskazuje to na dużą istotność tego efektu i mogłoby być podstawą do zaakceptowania modelu liniowego. Jednak wartość istotności efektu kwadratowego F_Q jest również wyższa od wartości tablicowej $F_Q^\#$ o dwa rzędy wielkości. Stąd wniosek, że efekt kwadratowy ma równie istotny wkład i nie można go pominąć. Przedstawiona sytuacja jest przypadkiem, gdzie otrzymuje się wyniki pozytywne dla obu efektów.



Rys. 4. Wyznaczone modele regresyjne dla danych albuminy w programie Origin. Badanie istotności współczynników podanych równań wykazało możliwość pominięcia wyrazu wolnego równania y_1 . $t_c = 0,9649 < t(0,95; 8) = 2,306$. Badanie istotności współczynników równania y_2 wykazało brak możliwości pominięcia każdego z wyrazów tego równania.

Następnie wykonano identyczne czynności dla danych glicyny (Tablica 2). Program Origin przedstawił następujące zależności regresyjne:



Rys. 5. Wyznaczone modele regresyjne dla danych glicyny w programie Origin. Badanie istotności współczynników podanych równań y_1 i y_2 wykazało możliwość pominięcia wyrazu wolnego w każdym z nich. $t_b = 0,5724 < t(0,95; 7) = 2,365$; $t_c = 0,6146 < t(0,95; 6) = 2,447$

Obliczenia dla danych glicyny przeprowadzone zostały tak samo jak dla danych albuminy. Poniżej zostały przedstawione wyniki obliczeń.

$$E_L = 1,505; E_Q = 1,137 \cdot 10^{-4}; s_{\hat{y},L}^2 = 4,8 \cdot 10^{-5}; s_{\hat{y},Q}^2 = 3,71 \cdot 10^{-5}$$

$$F_L = 3,13 \cdot 10^4; F_Q = 3,07; F_L^\# = 5,591; F_Q^\# = 5,987$$

Istotność efektu liniowego F_L przekracza wartość tablicową $F_L^\#$ o 4 rzędy wielkości co wskazuje bardzo silnie na korzyść modelu liniowego. Dodatkowo istotność efektu kwadratowego F_Q jest mniejsza od wartości tablicowej $F_Q^\#$. Co więcej, jest bliska zeru. Taki wynik stanowi podstawę odrzucenia istotności efektu kwadratowego i przyjęcia liniowego modelu krzywej regresyjnej.

6. MODYFIKACJA TESTU F-SNEDECOR'A WG IUPAC ORAZ WG MANDEL'A

Chcąc zmodyfikować powyższy test tak, aby wykluczyć możliwość zaistnienia niejednoznacznego wyniku, Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) przyjęła zmodyfikowaną wersję testu F-Snedecor'a opartą jedynie o wariancje resztowe modelu liniowego i kwadratowego [13]. Test ten sprawdza czy wariancja objaśniana przez model kwadratowy jest większa niż ta objaśniana przez model liniowy. Test obejmuje postawienie hipotezy zerowej H_0 : „Wariancja objaśniana przez model kwadratowy nie różni się od tej objaśnianej przez model liniowy”. Tym samym zakłada ona że model kwadratowy nie jest znaczący. Równanie testu ma postać:

$$F_{IUPAC} = \frac{s_{\hat{y},L}^2 - s_{\hat{y},Q}^2}{s_{\hat{y},Q}^2} \quad (28)$$

Zmodyfikowany test zakłada porównanie otrzymanej wartości (28) z wartością tablicową $F_{IUPAC}^\#(\alpha; 1; n - 3)$. Jeśli jest ona większa od wartości tablicowej, to należy odrzucić hipotezę zerową na rzecz hipotezy alternatywnej: „Wariancja objaśniana przez parabolę jest większa od wariancji modelu liniowego”. Wynik taki sugerowałby konieczność użycia modelu kwadratowego.

Test ten jest testem prostym i łatwym do zrozumienia. Nie uwzględnia jednak wpływu stopni swobody, co może stawiać pod znakiem zapytania jego przydatność w większości analiz, gdzie ilość punktów kalibracyjnych jest stosunkowo niewielka. Z tego powodu w 1964 roku chemik i statystyk J. Mandel zaproponował udoskonaloną wersję testu.

W przeciwieństwie do IUPAC, Mandel zdefiniował test nie jako różnicę wariancji resztowych obu modeli, a jako różnicę sum kwadratów dopasowania liniowego i kwadratowego, podzielonych przez odpowiednią liczbę stopni swobody [14].

$$F_M = \frac{SS_L - SS_Q}{(n - 2) - (n - 3)} \cdot \frac{1}{s_{\hat{y},Q}^2} = \frac{SS_L - SS_Q}{s_{\hat{y},Q}^2}; \quad SS = df \cdot s_{\hat{y}}^2 \quad (29)$$

Wzór (29) po przekształceniu można doprowadzić do postaci zbliżonej do równania testu F_{IUPAC} :

$$F_M = \frac{df_L \cdot s_{\hat{y},L}^2 - df_Q \cdot s_{\hat{y},Q}^2}{s_{\hat{y},Q}^2} \quad (30)$$

Jak widać zasadniczą różnicą pomiędzy podejściem IUPAC, a podejściem Mandel'a jest uwzględnienie w teście stopni swobody każdego z badanych modeli. Przekłada się to na

dokładniejszy wynik testu, zwłaszcza przy mniejszej ilości danych, gdzie różnice pomiędzy testami są najbardziej widoczne.

Test Mandel'a, tak jak modyfikacja IUPAC, porównuje wynik testu do tej samej wartości tablicowej $F_{IUPAC}^{\#} = F_M^{\#}(\alpha; 1; n - 3)$ oraz posiada taki sam warunek przyjęcia bądź odrzucenia hipotezy zerowej. Jednak z powodu zastosowania w równaniu stopni swobody zdarza się, że wynik testu Mandel'a różni się na tyle od wyniku testu IUPAC aby po przyrównaniu do tej samej wartości tablicowej dawać przeciwny wniosek niż test F_{IUPAC} . W takiej sytuacji warto przyjąć wynik testu Mandel'a jako testu dokładniejszego.

6.1 MODYFIKACJA WG IUPAC ORAZ MANDEL'A – PRZYKŁAD

Aby pokazać działanie testu F_{IUPAC} wykonaliśmy analizę danych z pomiarów stężenia albuminy i glicyny metodą UV-VIS (Tabela 2). Wyniki poszczególnych etapów obliczeń przedstawiono poniżej.

Albumina	$s_{\hat{y},L}^2 = 8,17 \cdot 10^{-4}; s_{\hat{y},Q}^2 = 4,54 \cdot 10^{-5}; F_{IUPAC} = 17,075; F_{IUPAC}^{\#} = 5,318$
Glicyna	$s_{\hat{y},L}^2 = 4,80 \cdot 10^{-5}; s_{\hat{y},Q}^2 = 3,71 \cdot 10^{-5}; F_{IUPAC} = 0,2951; F_{IUPAC}^{\#} = 5,987$

Dla danych albuminy można zauważyć, że wartość F_{IUPAC} jest wyższa niż odpowiadająca jej wartość krytyczna. Wskazuje to na konieczność użycia modelu kwadratowego. Z kolei wartość uzyskana z testu dla danych glicyny nie przekracza odpowiadającej jej wartości krytycznej. Sugerowałoby to użycie liniowego modelu regresyjnego. Wiedząc, że z powodu nieuwzględnienia stopni swobody przez test, może on dawać błędne konkluzje dla niektórych zestawów danych [15], dla potwierdzenia wyników wykonano test Mandel'a.

Albumina	$s_{\hat{y},L}^2 = 8,17 \cdot 10^{-4}; s_{\hat{y},Q}^2 = 4,54 \cdot 10^{-5}; df_L = 9; df_Q = 8;$ $F_M = 154,673; F_M^{\#} = 5,318$
Glicyna	$s_{\hat{y},L}^2 = 4,80 \cdot 10^{-5}; s_{\hat{y},Q}^2 = 3,71 \cdot 10^{-5}; df_L = 7; df_Q = 6;$ $F_M = 3,066; F_M^{\#} = 5,987$

Test Mandel'a potwierdził wyniki poprzedniego testu dla obu zestawów danych. Co więcej, w przypadku danych albuminy, wynik testu o wiele bardziej przekracza wartość krytyczną niż w przypadku testu F-IUPAC. Jest to ostateczne potwierdzenie konieczności użycia kwadratowego modelu regresyjnego dla danych albuminy. Z kolei dla danych glicyny uzyskano zbliżony wynik jak w poprzednim teście, potwierdzając tym samym konieczność użycia liniowego modelu regresyjnego.

7. PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych testów statystycznych zostały zebrane w tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki przeprowadzonych testów statystycznych

Test	Albumina	Glicyna
Lack of Fit	Model liniowy niedopasowany	Model liniowy dopasowany
F-Snedecor'a	Oba efekty istotne w równym stopniu	Efekt liniowy istotny Efekt kwadratowy nieistotny
F-IUPAC	Model kwadratowy	Model liniowy
F-Mandel'a	Model kwadratowy	Model liniowy

Mając zestawione ze sobą wyniki testów statystycznych, można łatwo zauważyć, że dane glicyny wykazują całkowitą liniowość. Widoczne jest to na Rys. 5, gdzie wyznaczone krzywe modelowe zachodzą na siebie do tego stopnia, że są niemożliwe do odróżnienia. W przypadku danych glicyny można z czystym sercem korzystać z liniowego modelu krzywej regresyjnej do obliczania stężenia badanej substancji o ile dane pomiarowe znajdują się w zakresie danych kalibracyjnych. Użycie modelu kwadratowego nie wniosłoby żadnej poprawy, a nawet mogłoby narobić problemów w przypadku ekstrapolacji poza zakres danych kalibracyjnych.

Dane albuminy nie dają już tak jednomyślnego wyniku testów. Test F-Snedecor'a wykazał równy udział obu efektów w opisie danych. Jednakże pozostałe testy statystyczne jednoznacznie wskazały konieczność zastosowania modelu kwadratowego. Jest to wystarczający wynik aby przyjąć ten model regresyjny.

Choć w przypadku danych albuminy testy F-IUPAC i F-Mandel'a dały identyczną konkluzję, warto zwrócić jednak uwagę na różnicę liczbową w otrzymanych wynikach. Dla tego samego zestawu danych wartość testu F-Mandel'a okazała się znacznie wyższa. Pokazuje to jak duży udział w ostatecznym wyniku ma uwzględnienie stopni swobody. Dlatego też w sytuacjach kiedy, z powodu małej ilości danych pomiarowych, testy dają sprzeczne wyniki, należy przyjąć konkluzję płynącą z testu F-Mandel'a. Wynik taki sugeruje również konieczność powtórzenia pomiarów dla większej ilości punktów.

W konkluzji można stwierdzić, że wszystkie zaprezentowane testy statystyczne są przydatnym, a nawet koniecznym krokiem w procesie wyznaczania krzywych wzorcowych. Dodatkowo prowadzą do powstawania lepszych i dokładniejszych procedur badawczych niejako wymuszając na naukowcach poświęcanie większej uwagi planowaniu swych eksperymentów. Ocena przydatności modeli regresyjnych do opisu danych kalibracyjnych powinna być oparta przynajmniej na kilku testach statystycznych zamiast na jednym wyniku współczynnika determinacji, co pozwala lepiej zobrazować sytuację i uniknąć poważnych błędów.

Wszystkie omawiane testy statystyczne mogą być w łatwy sposób przeprowadzone przy użyciu zwykłego arkusza kalkulacyjnego, a nawet za pomocą kalkulatora. Dlatego też wszystkie z zaprezentowanych testów statystycznych są łatwo dostępne dla każdego i powinny być stosowane w każdym przypadku kiedy zachodzi konieczność wyznaczenia krzywej wzorcowej.

Omawiane testy statystyczne zostały opracowane w postaci jednego pliku arkusza kalkulacyjnego gotowego do użycia i są dostępne dla zainteresowanych pod adresem lightcode@derpymail.org.

Literatura

1. J. Van Looc, M. Elskens, C. Croux, H. Beernaert, Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient, *Accreditation and Quality Assurance*, Vol. 7, 2002, p. 281–285.
2. Analytical Methods Committee, Is my calibration linear?, *Analyst*, Vol. 119, 1994, p. 2363-2366.
3. J. Namieśnik, P. Konieczka, Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, WNT, Warszawa, 2007.
4. P. Konieczka, J. Namieśnik i in., Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, 2004.
5. L. Brüggemann, W. Quapp, R. Wennrich, Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements, *Accreditation and Quality Assurance*, Vol. 11, 2006, p. 625–631.
6. J. Faraway, *Practical Regression and Anova using R*, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, 2002, p. 26–54.
7. J. R. Taylor, *Wstęp do analizy błęd pomiarowego*, PWN, Warszawa, 1999.
8. K. Doerffel, *Statystyka dla chemików analityków*, WNT, Warszawa, 1989.
9. J. Czermiński, A. Iwasiewicz, Z. Paszek, A. Sikorski, *Metody Statystyczne w Doświadczalnictwie Chemicznym*, Wyd. 2 zm., Edycja 2, PWN, Warszawa, 1974.
10. J. Czermiński, A. Iwasiewicz, Z. Paszek, A. Sikorski, *Metody statystyczne dla chemików*, PWN, Warszawa, 1992.
11. J. Wei, D. Paul, StatWiki 2015, UC Davis GeoWiki by University of California http://statwiki.ucdavis.edu/Regression_Analysis/Simple_linear_regression/Test_for_Lack_of_Fit
12. L. C. Rodriguez, A. M. G. Campana, J. M. B. Sendra, Statistical estimation of linear calibration range, *Analytical Letters*, Vol. 29, No. 7, 1996, p. 1231–1239.
13. K. Danzer, L. A. Currie, Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998), *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 70, No. 4, 1998, p. 993–1014.
14. J. M. Andrade, M. P. Gomez-Carracedo, Notes on the use of Mandel's test to check for nonlinearity in laboratory calibrations, *Analytical Methods*, Vol. 5, 2013, p. 1145–1149.
15. M. Zaręba, P. T. Sanecki, R. I. Rawski, Simultaneous determination of thimerosal and aluminum in vaccines and pharmaceuticals with the use of HPLC method, *Acta Chromatographica*, doi: 10.1556/1326.2016.28.3.2

POLIKONDENSACJA KWASU NITRYLOTRIOCTOWEGO Z HYDROCHINONEM

Anna Ryczek^{1a}, Jaromir B. Lechowicz^{1b}

¹Katedra Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego, Politechnika Rzeszowska

^aaryczek@prz.edu.pl; ^bjlechow@prz.edu.pl

1. WSTĘP

Na początku ubiegłego wieku Carothers [1] wykazał, że polimery usieciowane otrzymuje się podczas polimeryzacji monomerów wielofunkcyjnych. Badania modelowe układów polimeryzujących rozpoczął Flory [2, 3] i w początkowych latach rozwoju nauki o polimerach kontynuował Stockmayer [4, 5]. Wykorzystane przez nich, początkowo tylko, techniki statystyczne pozwoliły prognozować zmiany podstawowych parametrów molekularnych typowych układów polimeryzacyjnych prowadząc do sformułowania tzw. ogólnej teorii polimeryzacji zwanej też teorią Flory'ego-Stockmayera. Fundamentalne postępy w rozwoju teorii polimeryzacji dokonali później m.in. Gordon [6], Dušek [7], Kuchanov [8], Galina [9]. Wraz z rozwojem technik komputerowych rozpoczęto opracowywać techniki symulacji komputerowych procesów polimeryzacji. Największy wpływ na rozwój teorii perkolacji, która to metoda symulacyjna była na początku najczęściej wykorzystywana, wywarły prace Stauffera [10]. Modele bezkratowe polimeryzacji spopularyzowały prace Duška [11] i Eichingera [12]. Cechą wspólną wczesnych modeli było to, że w większości pozwalały one wyznaczać parametry związane z topografią makrocząsteczek układu nie pozwalając na uwzględnianie dynamiki reagujących układów.

Nowe spojrzenie na sposób modelowania procesów polimeryzacji z wykorzystaniem komputerów rozpoczął Pakuła [13], który opracował techniki pozwalające badać wpływ dyfuzji składników układu na przebieg polimeryzacji zarówno w układach gęstych jak i w rozpuszczalniku.

W niniejszej pracy wykorzystywane były techniki symulowania procesu polimeryzacji na bazie modeli bezkratowych opracowane wcześniej przez jednego ze współautorów [14]. Uzyskane w wyniku symulacji komputerowych [15] wyniki polimeryzacji typu $A_3 + B_2$ procesów wieloetapowych okazały się na tyle ciekawe, aby podjąć próbę zweryfikowania ich w rzeczywistym eksperymencie. Badania te wykazały, że możliwa jest zmiana mechanizmu procesu polimeryzacji tylko poprzez zmianę sposobu dozowania monomerów do układu reakcyjnego. Zaobserwowana zmiana mechanizmu procesu charakteryzuje się przejściem z układu nieżelującego do układu podlegającemu żelowaniu. Z punktu widzenia budowy cząsteczek jest to zmiana z układów (hiper)rozgałęzionych do sieci polimerowych.

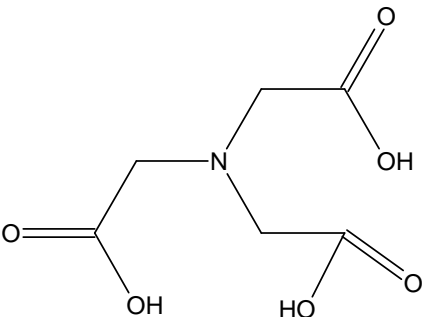
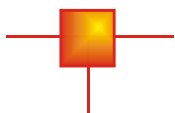
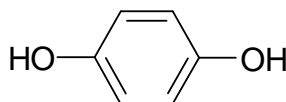

Aby sprawdzić, czy uzyskane w wyniku badań symulacyjnych wyniki układów wieloetapowych sprawdzają się w przypadku układów rzeczywistych należało znaleźć taki układ

rzeczywisty, możliwie najprostszy, który odpowiadałby układowi wcześniej badanemu z wykorzystaniem technik symulacyjnych.

2. TEORIA

W badaniach modelowych nie zajmowano się początkowo konkretnym rzeczywistym układem reakcyjnym, tj. nie precyzowano konkretnych surowców. Układ reakcyjny traktowany był jako graf molekularny a jego składnikami były monomery. Krawędziami grafu były powstające wiązania pomiędzy wierzchołkami (merami) tworząc subgrafy (cząsteczki). W odniesieniu do aktualnie badanego rzeczywistego układu reakcyjnego cząsteczki monomerów można symbolicznie przedstawić w tabeli 1.

Tabela 1. Schematyczne i symboliczne przedstawienie reagujących składników układu

Nazwa	Zapis schematyczny	Zapis symboliczny
Kwas nitrylotriooctowy		
Hydrochinon		

Podczas analizy przebiegu reakcji wykorzystano typowe założenia charakterystyczne dla modeli tego typu:

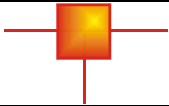


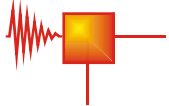


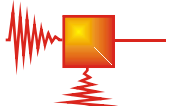


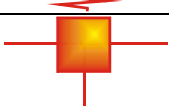
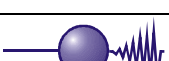
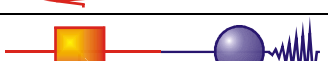
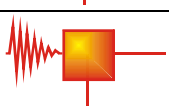
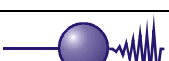

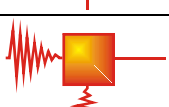
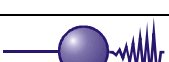

- reaktywność grup funkcyjnych nie zależy od wielkości cząsteczek (postulat Flory'ego),
- reaktywność grup funkcyjnych zależy od stanu przereagowania meru (efekt podstawienia tzw. pierwszej powłoki).

Reakcje elementarne, które zachodzą w procesie opisują przemiany grup funkcyjnych przynależnych do merów o różnych stopniach przereagowania. Takich typów reakcji dla badanego układu reakcyjnego można wyróżnić 6. Przedstawiono je w tabeli 2. Wykorzystano założenie Flory'ego, że reaktywność grup funkcyjnych nie zależy od wielkości cząsteczki. Niereaktywny fragment cząsteczki (w zasadzie o dowolnej wielkości) przedstawiono w tabeli graficznie jako zygzak.

Każda z reakcji charakteryzuje się określoną stałą kinetyczną, tzw. elementarną stałą kinetyczną. Wartości tych stałych nie są tożsame z typowymi stałymi kinetycznymi uzyskiwanymi podczas analizy układów rzeczywistych. W laboratorium mierzy się bowiem zmiany stężeń określonych cząsteczek a nie ich fragmentów. Nie jest to oczywiście niemożliwe. Zmiany udziałów konkretnych fragmentów cząsteczek układu można próbować mierzyć technikami magnetycznego rezonansu jądrowego. Można też dopasowywać uzyskane dane doświadczalne do wyników symulacji uzyskanych dla różnych wartości stałych kinetycznych.

Dokładność stosowanych metod jest jednak niezadowalająca. Same wartości elementarnych stałych kinetycznych w/w reakcji wykorzystywanych w symulacjach komputerowych nie są zwykle znane dla konkretnych procesów rzeczywistych. Nie są one wyznaczane ani tablicowane gdyż nie znajdują zastosowań poza badaniami modelowymi. Porównanie badań symulacyjnych z eksperymentalnymi wymaga najczęściej przygotowania tychże eksperymentów tak aby pozwoliły mierzyć parametry generowane w symulacjach.

Tabela 2. Wykaz reakcji elementarnych

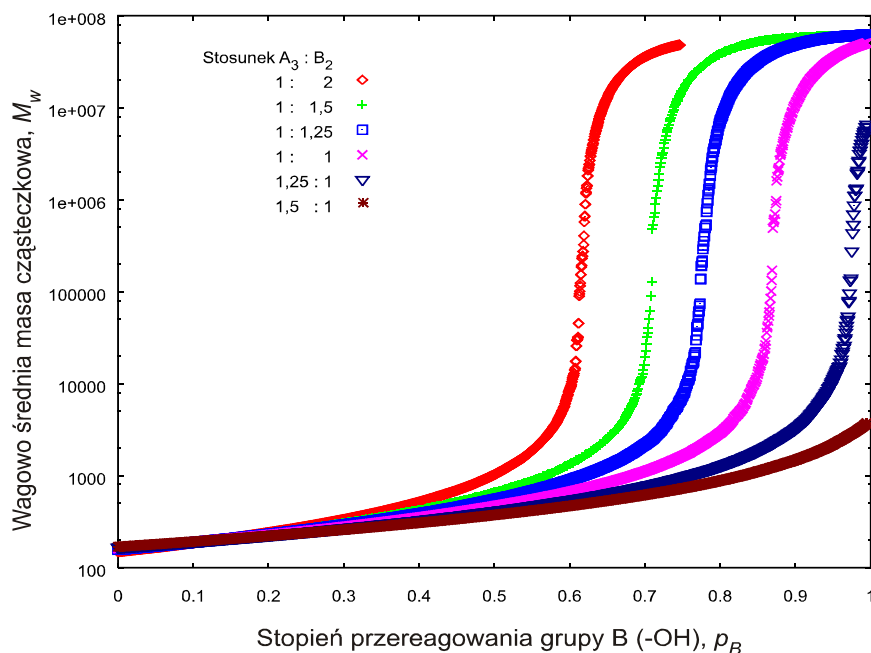
Mer z reagującą grupą A	Mer z reagującą grupą B	Produkt
		
		
		
		
		
		

Mimo starań porównanie danych symulacyjnych i układów rzeczywistych prowadzi zwykle do znacznych rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami. Z tego powodu w poszukiwaniu układów rzeczywistych do konfrontacji wyników symulacyjnych dąży się do wyboru możliwie najprostszych substratów, szczególnie takich, w których nie obserwuje się efektu podstawienia, efekt ten jest niewielki, bądź ograniczony do pojedynczej grupy funkcyjnej. W niniejszej pracy starano się zbadać przydatność układu reakcyjnego złożonego z kwasu nitrylotrioctowego (NTA) i hydrochinonu (HCh). W wybranym układzie reakcyjnym podejrzewa się, że grupy karboksylowe w NTA nie powinny mieć różnej reaktywności w zależności od miejsca przyłączenia w cząsteczce. Inaczej jest przy grupach hydroksylowych hydrochinonu. Tu efekt podstawienia może być widoczny. Ze względu na symetryczność hydrochinonu obie grupy hydroksylowe są jednakowo reaktywne. Przereagowanie jednej z grup powodować będzie prawdopodobnie zmniejszenie reaktywności pozostałej grupy funkcyjnej.

3. WYNIKI BADAŃ SYMULACYJNYCH

W badaniach symulacyjnych generowano układ reakcyjny złożony sumarycznie z 2000000 cząsteczek monomerów zmieniając stosunek pomiędzy monomerami A_3 i B_2 . Na obecnym, wstępnym etapie badań, nie uwzględniano efektu podstawienia grup funkcyjnych. Na rysunku 1 przedstawiono zmiany wagowo-średnich ciężarów cząsteczkowych, M_w , wraz z postępem

procesu, p , uzyskanych podczas symulacji układów o różnym składzie. Jako stopień przereagowania układu wybrano udział przereagowanych grup funkcyjnych typu B (grup funkcyjnych $-\text{OH}$), p_B . Do analiz wybrano układy reakcyjne o składzie bliskim stechiometrycznego. Polimeryzacja takich układów prowadzi do powstawania sieci polimerowych, tj. żelowania ale tuż przed osiągnięciem stanu usieciowania cząsteczki polimeru charakteryzują się dużym stopniem rozgałęzienia (polimer hiperrozgałęziony). Na wykresie zależności M_w od p_B widać żelowanie charakteryzowane punktem przegięcia krzywej.

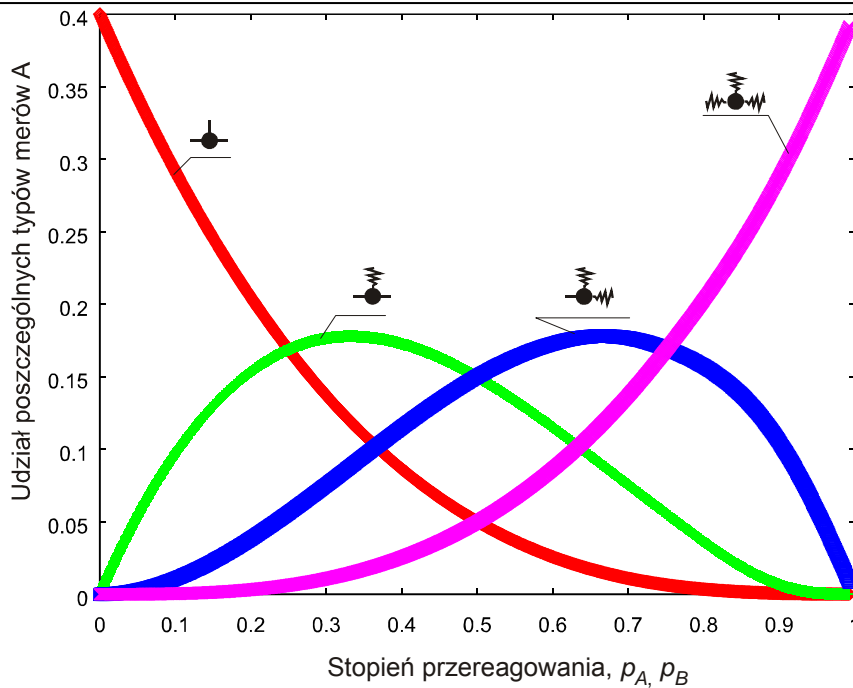


Rys. 1. Zmiany udziałów poszczególnych typów merów A (mer odpowiednio z 0, 1, 2, 3 – przereagowanymi grupami A). Układ reakcyjny $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$

W układach reakcyjnych, w których grupy funkcyjne B są w nadmiarze (np. o stosunku molowym $A_3:B_2 = 1:2$) powstające (makro)cząsteczki zakończone są tymi grupami funkcyjnymi. Pozostaje też sporo nieprereagowanego monomeru B_2 . Nie osiąga się tu całkowitego stopnia przereagowania grup funkcyjnych B z powodu wyczerpania zdolnych do reakcji grup A. Żelowanie następuje dla mniejszych wartości stopnia przereagowania niż dla układu o stechiometrycznym składzie ($A_3 : B_2 = 1 : 1,5$).

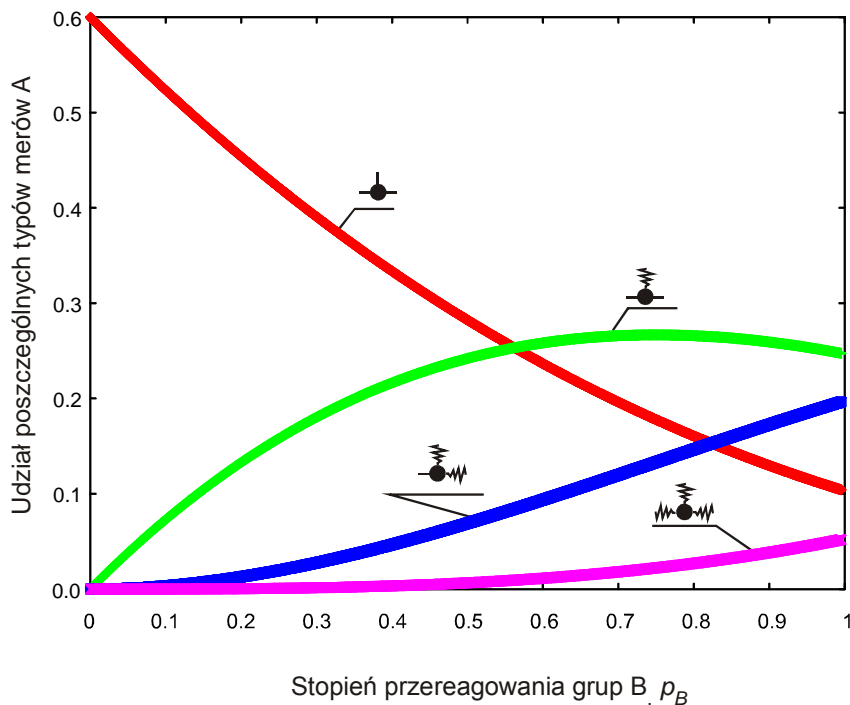
Inaczej jest przy rozpatrywaniu układów posiadających nadmiar grup funkcyjnych typu A. Niedomiar grup funkcyjnych typu B powoduje relatywne opóźnienie żelowania układu. Wartości stopnia przereagowania, p_B , przy którym następuje żelowanie układu ulegają zwiększeniu a przy stosunku molowym reagentów $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$ układ nie żeluje a wartość końcowa średniego ciężaru cząsteczkowego polimeru zmniejsza się.

Na rys. 2 przedstawiono zmiany udziałów poszczególnych typów merów pochodzących od monomeru A_3 wraz z przebiegiem procesu uzyskane podczas polimeryzacji układu o składzie stechiometrycznym. Można zaobserwować, że nawet po punkcie żelowania charakteryzowanym wartością stopnia przereagowania układu, $p_A = p_B = 0,71$ nie obserwuje się żadnych gwałtownych zmian udziałów merów konkretnych typów. Oznacza to, że zaraz po utworzeniu sieci polimerowej liczba wiązań sieciujących układ jest jeszcze stosunkowo niewielka.



Rys. 2. Zmiany udziałów poszczególnych typów merów A (mer odpowiednio z 0, 1, 2, 3 – przereagowanymi grupami A). Układ reakcyjny $A_3 : B_2 = 1 : 1,5$

Analiza wartości większości parametrów molekularnych po punkcie żelowania jest praktycznie nieosiągalna w przypadku układów rzeczywistych. Dla symulacji komputerowych nie jest to problemem. Aby porównać dane uzyskane z eksperymentu z doświadczeniem należy więc albo analizować układy przed punktem żelowania bądź wybrać układy nieżelujące. W zależności od składu układu mogą to być układy liniowe, rozgałęzione bądź hiperrozgałęzione.

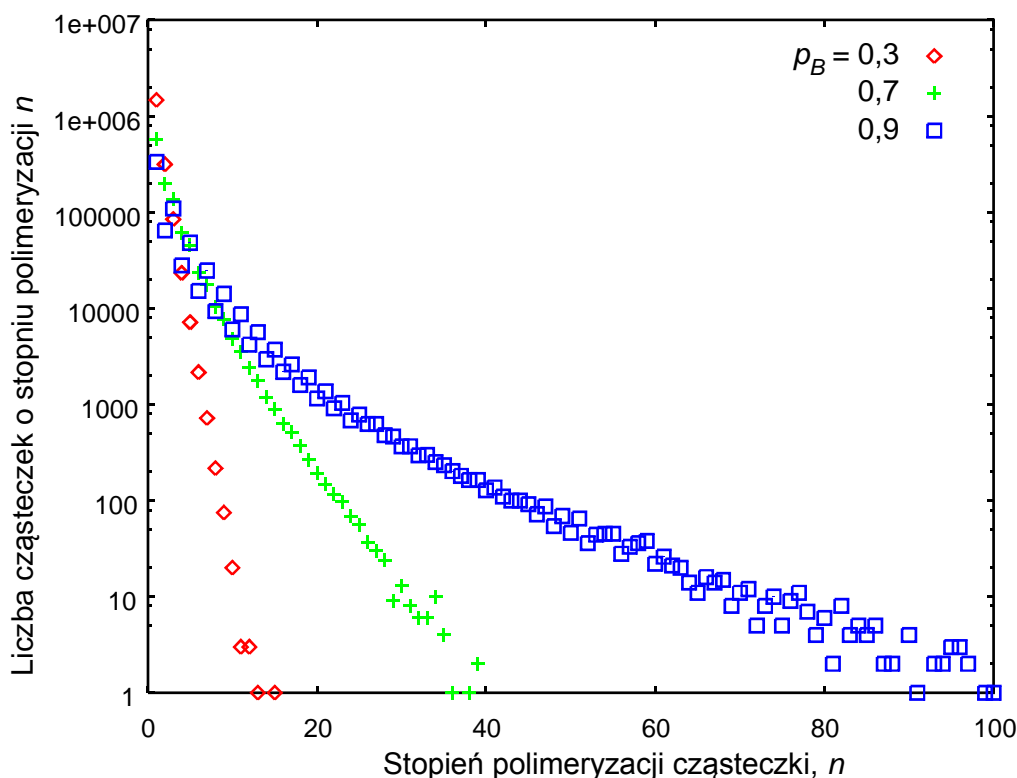


Rys. 3. Zmiany udziałów poszczególnych typów merów A (mer odpowiednio z 0, 1, 2, 3 – przereagowanymi grupami A). Układ reakcyjny $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$

Na rys. 3 przedstawiono analogiczne zależności jak na rys. 2, ale dla układu o niestechiometrycznym stosunku $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$.

Układ zawierający znaczący niedomiar grup funkcyjnych typu B nie żeluje. Udział merów całkowicie przereagowanych typu A w takim układzie do samego końca procesu pozostaje niewielki. Widać też wyraźnie pozostający w układzie nieprzereagowany monomer A_3 .

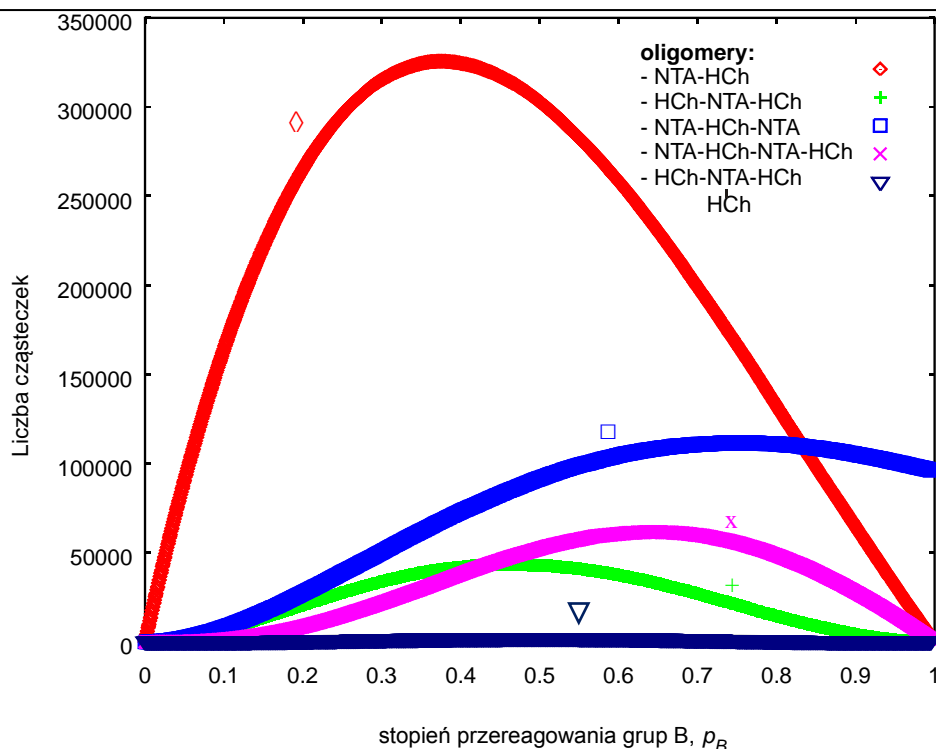
Na rys. 4 przedstawiono zmiany liczb cząsteczek o kolejnych stopniach polimeryzacji uzyskanych po przeprowadzeniu procesu polimeryzacji do stopnia przereagowania $p_B = 0,3, 0,7, 0,9$. Uzyskane zależności świadczą o dużej liczbie pozostających w układzie reakcyjnym cząsteczek o najmniejszych ciężarach cząsteczkowych nawet dla znacznego stopnia przereagowania układu reakcyjnego.



Rys. 4. Zmiany liczb cząsteczek o różnych stopniach polimeryzacji wyznaczone dla różnych stopni przereagowania grup funkcyjnych A układu reakcyjnego. Stosunek substratów $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$

W trakcie wyodrębniania polimeru z mieszaniny reakcyjnej najmniejsze cząsteczki mogą ulec usunięciu z układu reakcyjnego, chociażby wymyciu wodą wykorzystywaną do wytrącania polimeru. Stąd przy porównaniu wielu parametrów molekularnych uzyskanego polimeru (np. ciężarów cząsteczkowych, liczb: kwasowych i hydroksylowych) będą obserwowane znaczące odchylenia.

Na rys. 5 przedstawiono zmiany liczb cząsteczek o niewielkich stopniach polimeryzacji dla układu niestechiometrycznego $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$. Jak widać do stosunkowo dużej wartości stopnia przereagowania układu obserwuje się znaczące ilości oligomerów o małym stopniu polimeryzacji. Udział oligomerów kończących się grupami B pozostaje znaczący po zakończeniu polimeryzacji (np. trimer: NTA-HCh-NTA). Potwierdza to zachowanie się układu reakcyjnego obserwowane na rys. 1 – uzyskanie niewielkich średnich ciężarów cząsteczkowych produktu.



Rys. 5. Zmiany liczby początkowych oligomerów w układzie reakcyjnym. Skład układu: $A_3 : B_2 = 1,5 : 1$

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1 ODCZYNNIKI

Kwas nitrylotrioctowy (NTA, 95%, AppliChem), hydrochinon (HCh, 98%, Fluka), N,N'-diizopropylkarbodiimid (DIC, >99%, Merck), N,N-dimetyloformamid (DMF, cz.d.a., CHEMPUR) i metanol (cz.d.a., CHEMPUR) użyto bez wcześniejszego oczyszczenia. 4-toluenosulfonian 4-(N,N-dimetyloamino)pirydyniowy (DPTS) otrzymano zgodnie z opisem przedstawionym w publikacji [16].

4.2 NISKOTEMPERATUROWA POLIKONDENSACJA KWASU NITRYLOTRIOCTOWEGO I HYDROCHINONU

Hiperrozgałęzione aromatyczno-alifatyczne poliestry otrzymano metodą niskotemperaturowej polikondensacji. W tym celu zmontowano zestaw składający się z kolby trój szyjnej o poj. 100 cm³, chłodnicy powietrznej zakończonej rurką wypełnioną środkiem suszącym (bezwodny siarczan magnezu), termometru, układu doprowadzającego argon i mieszadła magnetycznego. Do kolby wprowadzono 1 g kwasu nitrylotrioctowego (monomer A₃) oraz 10 cm³ N,N-dimetyloformamidu i przy ciągłym mieszaniu, w atmosferze powietrza, ogrzewano ją do temp. 105°C w celu rozpuszczenia NTA. Po ochłodzeniu mieszaniny wdroplono, za pomocą wkraplacza o pojemności 50 cm³, wcześniej rozpuszczony w 10 cm³ DMF 4-toluenosulfonian 4-(N,N-dimetyloamino)pirydyniowy DPTS (0,462 g) oraz hydrochinon (monomer B₂). Użyte do reakcji ilości hydrochinonu zamieszczono w tabeli 3. Po wprowadzeniu w/w substratów podłączono argon i odpowietrzono układ reakcyjny, po czym rozpoczęto wkraplanie 3,16 cm³ N,N'-diizopropylkarbodiimidu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez określony czas, bez

dostępu powietrza, ciągle mieszając. Podczas procesu, wytrącał się produkt uboczny – N,N'-diizopropylomocznik (DPU) w postaci białego, krystalicznego osadu, który odsączono na lejku Büchnera. Otrzymany przesącz wkroplono, filtrując go jednocześnie przez filtr chromatograficzny o średnicy 0,45 μm , do zlewki z zimną wodą (ok. 70 cm^3), energicznie mieszając w celu wyodrębnienia polimeru. Zlewkę z produktem pozostawiono na dobę w lodówce. Po upływie tego czasu polimer odsączono na lejku Büchnera, przemyto kilkakrotnie małymi porcjami lodowatej wody (łącznie ok. 300 cm^3) i umieszczono w suszarce, w temp. 50°C, do całkowitego osuszenia.

Zastosowano następujące proporcje reagentów:

- hydrochinon – nHCh:nNTA = 1:1; 2:3; 1:1,25; 3:2; 2:1; 3:1; 2,5:1; 2,75:1,
- DPTS – 0,1 mola na 1 mol grup -COOH,
- DIC – 1,3 mola na 1 mol grup -COOH,
- DMF – 20 ml/1 g NTA.

Tabela 3. Ilości hydrochinonu użyte w poszczególnych syntezach

nA ₃ : nB ₂	1:1	3:2	1,25:1	2:3	1:2	1:3	1:2,5	1:2,75
m HCh [g]	0,576	0,384	0,461	0,864	1,152	1,728	1,440	1,584

4.3 CHARAKTERYSTYKA OTRZYMANYCH HIPERROZGAŁĘZIONYCH POLIESTRÓW

Stopień przereagowania grup karboksylowych oraz liczbę kwasową oznaczono poprzez miareczkowanie próbki mieszaniny reakcyjnej za pomocą 0,1 M r-ru KOH w etanolu wobec błękitu bromotymolowego jako wskaźnika.

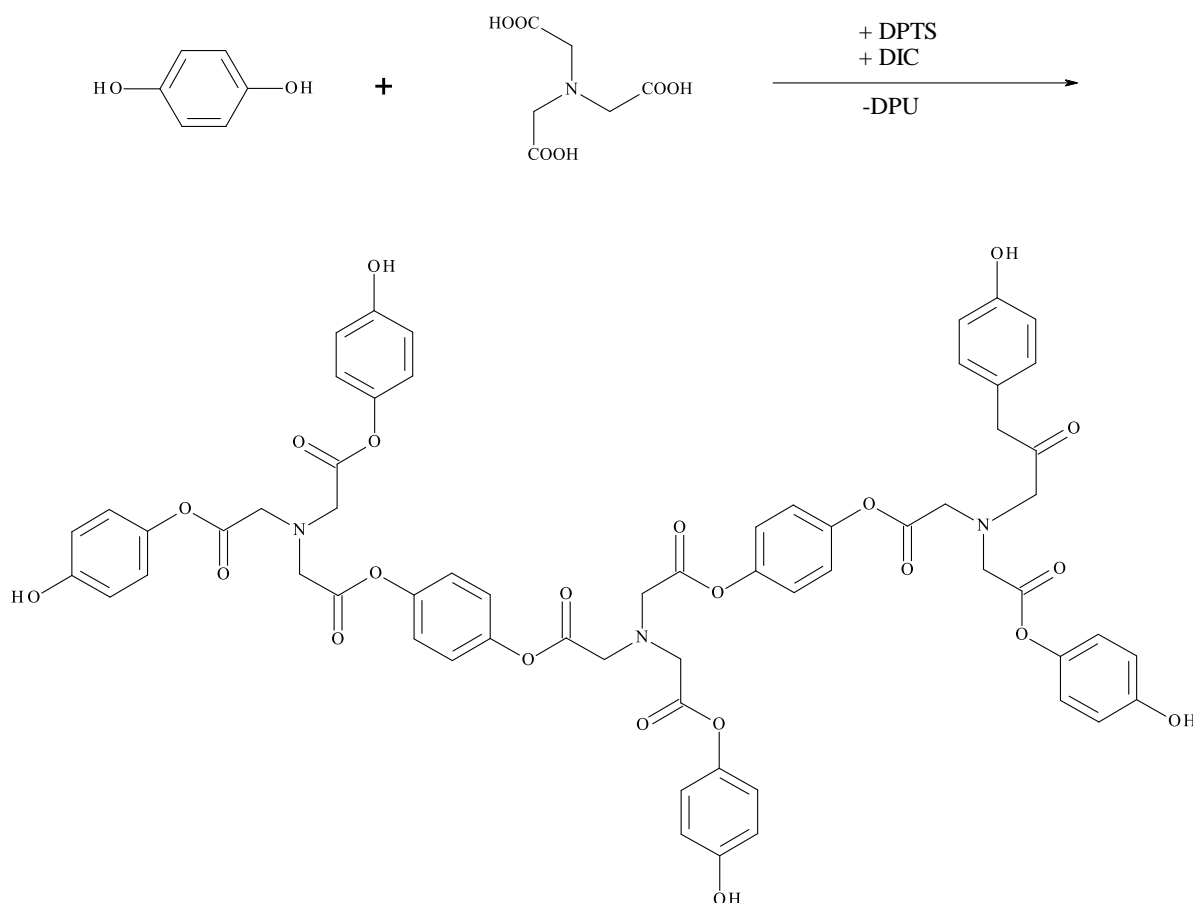
Widma ¹H-NMR monomerów jak i uzyskanych produktów wykonano przy użyciu aparatu ¹H-NMR BrukerAvance II. Jako rozpuszczalnik zastosowano DMSO-d₆, a jako wzorzec zewnętrzny tetrametylosilan.

Widma absorpcyjne w podczerwieni HCh, NTA i produktów wykonano przy użyciu spektrometru FT-IR Nicolet 8700. Próbkę do badań przygotowano poprzez roztarcie 2 mg badanego materiału z 200 mg KBr, a następnie ich sprasowaniu w tabletkę.

Analizę składu i struktury hiperrozgałęzionych poliestrów wykonano stosując metodę laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą matrycą (MALDI) połączoną z pomiarem czasu przelotu (TOF) przy użyciu spektrometru firmy Bruker model AutoflexSpeed. Pomiary przeprowadzono rejestrując jony dodatnie w trybie z reflektorem wytworzone za pomocą impulsów lasera SmartBeam II o długości fali 352 nm, mocy około 70-100 μJ i częstotliwości 1000 Hz. Zastosowano defleksję jonów poniżej $m/z=70$. Stosując metodę przesuwu płytki typu *random walk* otrzymano widma będące wynikiem zsumowania po 10 tys. strzałów lasera. Dane przetworzono i analizowano za pomocą programu FlexAnalysis 3.3. Matrycę przygotowano poprzez rozpuszczenie 10 mg kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego w 1 cm^3 0,2% r-ru kwasu trifluoroctowego w acetonitrylu. Tak przygotowany roztwór w ilości 0,3 μl naniesiono na stalową płytkę, wysuszone, a następnie na suchą matrycę nałożono taką samą ilość roztworu analizowanej próbki w rozpuszczalniku jakim był DMF. Czynności te powtórzono trzykrotnie. Przygotowane próbki analizowano w zakresie 80-2000 Da. Przed wykonaniem pomiarów przeprowadzono kalibrację zewnętrzną z wykorzystaniem wzorca peptydowego *Brukerpeptide standard* oraz adduktów złota Au₁-Au₉ wykonując 7-8 punktów m/z .

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W pracy opisano syntezę hiperrozgałęzionych aromatyczno–alifatycznych poliestrów metodą niskotemperaturowej polikondensacji kwasu nitrylotrioctowego (monomer A₃) i hydrochinonu (monomer B₂). Reakcje prowadzono w rozpuszczalniku jakim był N,N–dimetyloformamid, w obecności N,N–diizopropylkarbodiimidu (DIC) i p–toluenosulfonianu 4–(N,N–dimetyloamino)pirydyniowego (DPTS). DIC pełnił w reakcji funkcję zarówno aktywatora grup karboksylowych, jak i substancji wiążącej wodę. DPTS był natomiast katalizatorem reakcji. W trakcie syntezy wytrącał się, w postaci białego, krystalicznego osadu, małowcząsteczkowy produkt uboczny N,N–diizopropylmocznik (DPU). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez określony czas (tabela 4). Podczas reakcji niektóre reagenty podlegały żelowaniu, stąd w kolejnej syntezie układów o takich samych składach reakcje kończono pół godziny przed wcześniej wyznaczonym czasem żelowania, aby wyodrębnić polimer nieusieciowany. Przykład zachodzącej w układzie reakcji przedstawiono poniżej (schemat 1).



Schemat 1. Reakcja polikondensacji kwasu nitrylotrioctowego i hydrochinonu

Wyniki analiz chemicznych uzyskanych polimerów zamieszczono w poniższej tabeli (tabela 4) i porównano do uzyskanych wyników z symulacji komputerowych.

Tabela 4. Wyniki analiz chemicznych otrzymanych polimerów i symulacji komputerowych

n A ₃ : n B ₂	eksperyment				symulacje	
	Czas reakcji [godz.]	LK [mg KOH/g]	Wydajność [%]	p-COOH [%]	p-COOH _B żel. [%]	p-OH _B żel. [%]
1,5:1	72	192,9	75,5	58,1	-*	-*
1,25:1	96**	141,3	60,4	65,7	52	97
1:1	21,5	128,9	81,3	63,6	58	87
1:1,5	12,5	125,1	80,7	62,6	71	71
1:2	10	79,0	70,8	54,8	83	62
1:2,5	96**	34,1	93,8	77,0	93	56
1:2,75	96**	34,8	82,5	72,7	97	53
1:3	72	32,0	75,5	72,9	-*	-*

-* według badań symulacyjnych układ o tym składzie nie podlega żelowaniu

** według badań symulacyjnych układ żeluje przy zadanym stopniu przereagowania grup funkcyjnych -COOH, ale w czasie przeprowadzenia eksperymentu tego nie zaobserwowano

Analizując wyniki zawarte w tabeli 4 można zauważyć, że wraz ze wzrostem zawartości molowej hydrochinonu maleje liczba kwasowa uzyskanych produktów co jest zgodne z oczekiwaniem.

Większość uzyskanych wyników eksperymentalnych dotyczących żelowania układu wydaje się być zgodnych z wynikami symulacji komputerowych. Chociaż 3 procesy nie doprowadziły do usieciowania polimeru w maksymalnym (96 h) czasie trwania polikondensacji (A₃:B₂ = 1,25:1, 1:2,5, 1:2,75) to tylko pierwszy z nich okazał się niespodzianką. Przy osiągniętym stopniu przereagowania grup funkcyjnych -COOH ponad 65% uzyskanych w polimeryzacji układu A₃:B₂ = 1,25:1 układ powinien być usieciowany jak wynika to z badań symulacyjnych (stopień przereagowania -COOH = 52%). W przypadku pozostałych reakcji prowadzonych przez 96 godzin nie osiągnięto końcowego stopnia przereagowania grup funkcyjnych pozwalających na usieciowanie układu reakcyjnego i układ rzeczywiście nie sieciował.

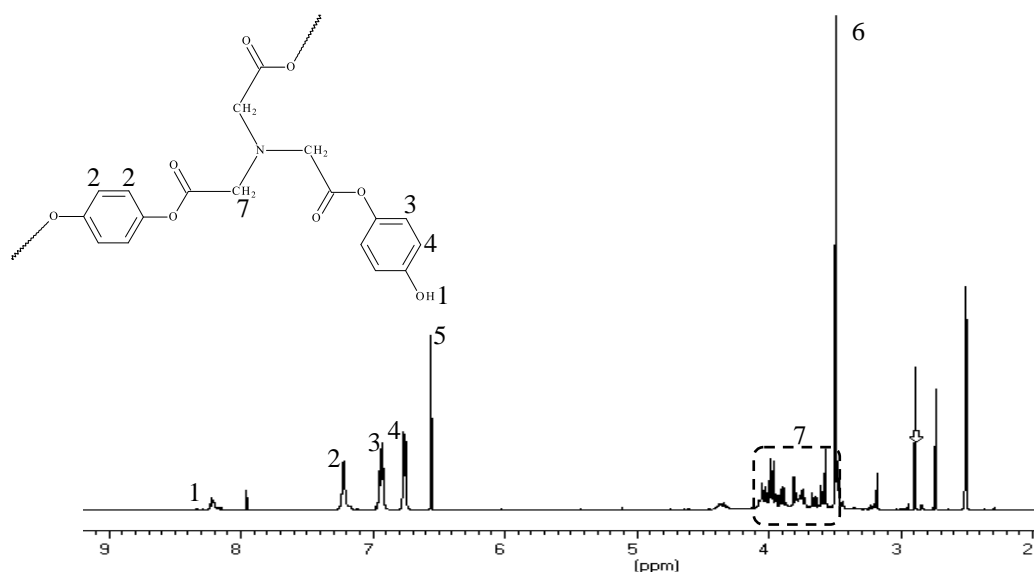
Dla układu reakcyjnego A₃:B₂ = 1:1 obserwowano żelowanie już w ciągu pierwszej doby prowadzenia eksperymentu. Powtarzając proces polimeryzacji w krótszym czasie (21,5 h) układ nie zdążył usieciować. Zaskakujący był stosunkowo wysoki stopień przereagowania grup karboksylowych w takim jeszcze nie usieciowanym układzie, większy niż w przypadku produktu usieciowanego wygenerowanego w wyniku symulacji komputerowych.

Za przyczynę takiego stanu rzeczy można winić metodykę oznaczania karboksylowych grup końcowych. Analiza grup końcowych metodami miareczkowymi wymaga dokładniejszego przebadania procesu dla wyznaczenia jego punktu równoważnikowego jak również znalezienia odpowiedniego rozpuszczalnika.

Na wspomniane odchylenia wyników eksperymentów od symulacji może wpływać też efekt podstawienia grup funkcyjnych. Ten ostatni nie był brany pod uwagę do generowania stanu układu reakcyjnego podczas symulacji komputerowych. Wspomniano wcześniej, że w badanym układzie można się spodziewać pewnego efektu podstawienia związanego z nierównocześnieścią grup hydroksylowych w hydrochinonie przed i po reakcji z 1 grupą karboksylową.

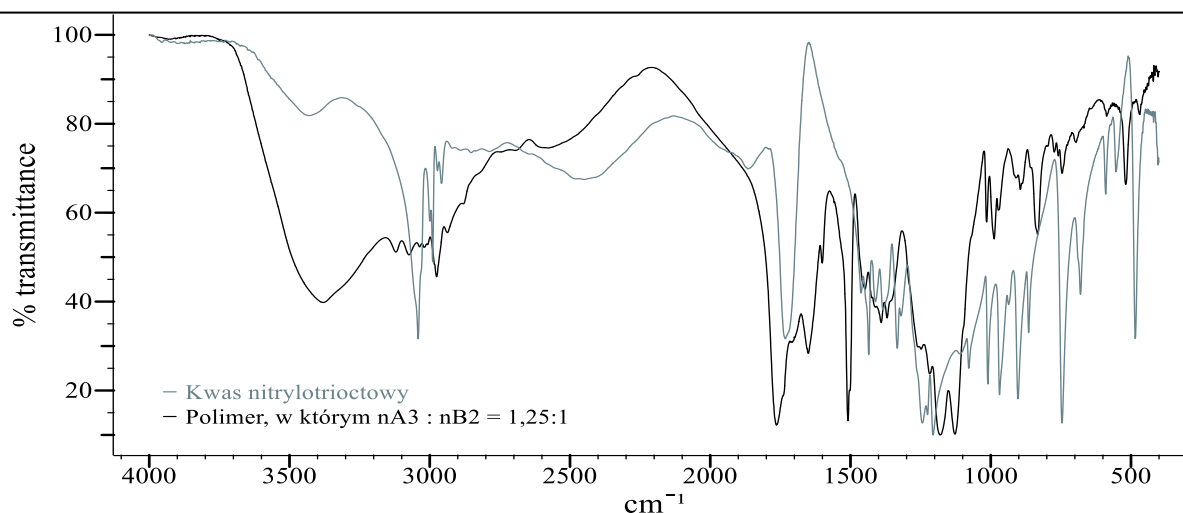
Przyczynę odchylenia wyników eksperymentalnych od symulacyjnych można próbować odnaleźć szczegółowo analizując przebieg reakcji metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni (IR) pozwalających badać zmiany udziałów grup funkcyjnych w układzie reakcyjnym i produktach końcowych.

Metodą protonowego rezonansu magnetycznego potwierdzono struktury otrzymanych polimerów. Przykładowe widmo jednego z produktów reakcji, uzyskanego podczas polikondensacji monomerów w stosunku molowym $A_3:B_2 = 1,25:1$, przedstawiono na rys. 6. Na widmie $^1\text{H-NMR}$ otrzymanych produktów obserwuje się sygnały rezonansowe pochodzące od wolnych grup hydroksylowych przy wartościach przesunięcia chemicznego 8,07-8,36 ppm (1) oraz sygnały pochodzące od protonów pierścienia aromatycznego hydrochinonu odpowiednio: z dwoma przereagowanymi grupami $-\text{OH}$ (7,21 ppm), (2); jedną przereagowaną grupą $-\text{OH}$ (6,95 i 6,76 ppm), (3 i 4) oraz od nieprzereagowanego monomeru (6,55 ppm), (5). Ponadto, obserwuje się sygnały rezonansowe pochodzące od protonów grupy $-\text{CH}_2-$ w nieprzereagowanym kwasie nitrylotrioctowym przy 3,48 ppm (6) oraz rozmyte, z powodu różnego otoczenia, sygnały pochodzące od tej samej grupy ale w polimerze, w zakresie 3,55-4,15 ppm (7). Dla produktów uzyskanych przy zastosowaniu nadmiaru hydrochinonu w stosunku do NTA nie obserwuje się sygnału rezonansowego, pochodzącego od protonów grupy $-\text{CH}_2-$ przy 3,48 ppm, w nieprzereagowanym kwasie nitrylotrioctowym.



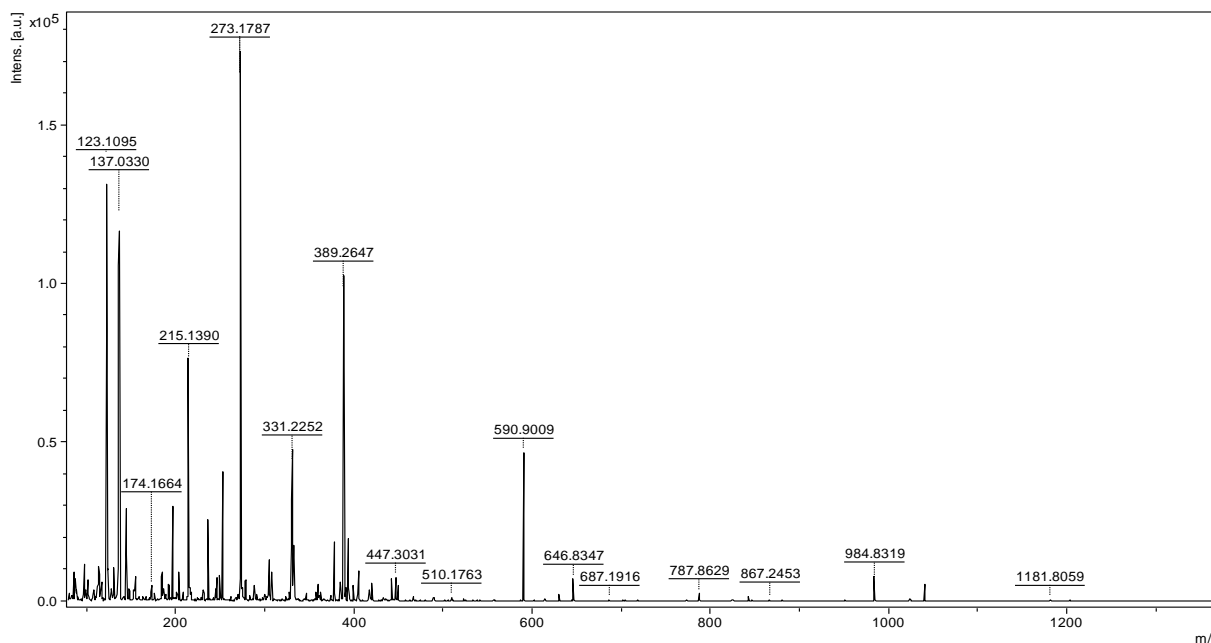
Rys. 6. Widmo $^1\text{H-NMR}$ produktu reakcji kwasu nitrylotrioctowego z hydrochinonem w stosunku molowym $A_3:B_2 = 1,25:1$

Za pomocą spektroskopii w podczerwieni potwierdzono obecność pasm charakterystycznych dla poliestrów. Na rys. 7 porównano widmo kwasu nitrylotrioctowego z przykładowym hiperrozgałęzionym polimerem otrzymanym wskutek polimeryzacji wspomnianego powyżej układu ($A_3:B_2 = 1,25:1$). Zauważono, że szerokie pasmo w zakresie $3300-2900\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań rozciągających grupy O-H w kwasie oraz tworzących się w nim wiązań wodorowych zanika. W polimerze pojawia się natomiast szerokie pasmo drgań rozciągających grupy $-\text{OH}$ przyłączonej do pierścienia aromatycznego w zakresie $3700-3150\text{ cm}^{-1}$. O obecności ugrupowania estrowego świadczy również pasmo pochodzące od drgań rozciągających C=O z maksimum pików równym 1763 cm^{-1} oraz pasmo drgań rozciągających C-O przy 1180 cm^{-1} .



Rys. 7. Porównanie widm IR kwasu nitrylotrioctowego i polimeru, w którym stosunek $nA_3:nB_2 = 1,25:1$

Analiza MALDI-TOF [17] posłużyła do określenia struktury otrzymanych polimerów. Jako rozpuszczalnik zastosowano DMF, natomiast matrycę stanowił kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB). W wyniku analizy uzyskano widma spektrometryczne przedstawiające sygnały pochodzące od mas cząsteczek zawierających przyłączone jony potasu, sodu, protonu oraz złota. Intensywność tych sygnałów zależna jest od rodzaju i proporcji jonów powstałych podczas pomiaru. Na rys. 8 przedstawiono widmo masowe produktu polikondensacji prowadzonej w układzie stechiometrycznym $A_3:B_2 = 1:1,5$ (2:3). Na widmie dla m/z w zakresie 80-2000 Da zaobserwowano sygnały pochodzące do samego polimeru, polimeru zawierającego cykle oraz cząsteczek mających przyłączony fragment katalizatora (pochodzący od 4-(N,N-dimetyloamino)pirydyny – DMAP) oraz N,N'-diizopropylomocznik (DPU). Zidentyfikowane struktury przedstawiono w tabeli 5.



Rys. 8. Widmo MALDI-ToF dla polimeru, w którym stosunek $nA_3:nB_2 = 2:3$

Tabela 5. Analiza masowa MALDI-ToF dla polimeru, w którym stosunek $nA_3:nB_2 = 2:3$

Nr	Pozycja sygnału m/z	Struktura molekularna jonów	Obliczona masa molowa jonów [g/mol]
1.	134,15	$B_2 + Na^+$	133,11
2.	149,01	$B_2 + K^+$	149,21
3.	174,17	$A_3\text{cykl} + H^+$	174,14
4.	192,99	$A_3 + H^+$	192,14
5.	215,14	$A_3 + Na^+$	214,14
6.	231,11	$A_3 + K^+$	230,24
7.	284,31	$A_3B_2 + H^+$	284,25
8.	287,53	$A_3B_2\text{cykl} + Na^+$	288,25
9.	289,15	$A_3B_2\text{cykl} + Na^+$	288,25
10.	303,50	$A_3B_2\text{cykl} + K^+$	304,35
11.	305,12	$A_3B_2\text{cykl} + K^+$	304,35
12.	306,26	$A_3B_2 + Na^+$	306,25
13.	308,26	$B_2 + Au^{3+}$	307,08
14.	320,25	$A_3 + DMAP + Na^+$	319,24
15.	389,26	$A_3 + Au^{3+}$	388,11
16.	389,26	$A_3B_2 + DMAP + H^+$	389,45
17.	443,16	$(A_3)_2B_2(\text{cykl})_2 + Na^+$	443,39
18.	466,88	$A_3 + 2DPU + Na^+$	466,64
19.	468,16	$A_3(B_2)_3 + H^+$	468,47
20.	490,11	$A_3(B_2)_3 + Na^+$	490,47
21.	524,20	$A_3(B_2)_2 + DPU + Na^+$	524,86
22.	687,19	$(A_3)_2B_2\text{cykl} + 2DMAP + K^+$	687,89
23.	687,19	$(A_3)_3(B_2)_2(\text{cykl})_2 + H^+$	686,64
24.	825,22	$(A_3)_2(B_2)_5 + H^+$	825,83
25.	847,16	$(A_3)_2(B_2)_5 + Na^+$	847,83
26.	881,26	$(A_3)_2(B_2)_4 + DPU + Na^+$	882,22
27.	1204,26	$(A_3)_3(B_2)_7 + Na^+$	1205,19

Analiza wyników uzyskanych podczas badań spektroskopii masowej potwierdza dużą ilość małowcząsteczkowych produktów reakcji w próbce mimo znaczącego stopnia przereagowania układu nieco powyżej 62% (tabela 4). Można to było zaobserwować wcześniej w wynikach symulacji. Dla uzyskanego stopnia przereagowania grup karboksylowych na rys. 1 wartość wagowo-średniego ciężaru cząsteczkowego układu osiąga wartość rzędu 1000 (dla układu stechiometrycznego $p_A = p_B$), a na rys. 2 można stwierdzić znaczącą jeszcze ilość cząsteczek monomerów dla tego stopnia przereagowania układu.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W pracy przeprowadzono symulacje komputerowe układu reakcyjnego podczas polikondensacji monomerów trój- (A_3) z dwufunkcyjnym (B_2) oraz zaproponowano rzeczywisty układ reakcyjny zgodny z badanym symulacyjnie modelem polimeryzacji. Układ złożony z kwasu nitrylotrioctowego i hydrochinonu poddano niskotemperaturowej polikondensacji. W analizie przebiegu procesu rzeczywistego starano się znaleźć sposób wyznaczenia podstawowych parametrów molekularnych uzyskiwanych w symulacjach komputerowych co

pozwoilioby p3wniej dokonać por3wnań mi3dzy obiema podejściami do procesu polikondensacji $A_3 + B_2$.

Takie po³¹czenie badañ symulacja – eksperyment pozwala z jednej strony testować jakoŝć zaproponowanego modelu polimeryzacji a w przypadku uzyskania zgodnoŝci prognozować w przysz³oŝci przebieg procesu rzeczywistego. Uzyskane wyniki symulacyjne mog³yby zatem pozwalać przewidywać zmiany podstawowych parametr3w molekularnych uk³adu podczas polimeryzacji jeszcze przed wykonaniem cz3sto kosztownego doŝwiadczenia uk³adu rzeczywistego.

Jako, ŝe niniejsza praca ma charakter wst3pny na obecnym etapie uzyskano jakoŝciowe potwierdzenie zgodnoŝci badañ symulacyjnych z badaniami uk³adu rzeczywistego. Daje to podstawy do wykonania znacznie obszerniejszych badañ, kt3re pomog³y w przysz³oŝci w spos3b iloŝciowy potwierdzić b³dŝ odrzucić zgodnoŝć modelu z uk³adem rzeczywistym.

Literatura

1. W. H. Carothers, Polymers and polyfunctionality, Transactions of the Faraday Society, Vol. 32, 1935, p. 39–49.
2. P. J. Flory, Molecular Size Distribution in Linear Condensation Polymers, Journal of the American Chemical Society, Vol. 58, 1936, p. 1877–1185.
3. P. J. Flory, Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers I. Gelation, Journal of the American Chemical Society, Vol. 63, 1941, p. 3083–3090.
4. W. H. Stockmayer, Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched-Chain Polymers, The Journal of Chemical Physics, Vol. 11, No. 2, 1943, p. 45–55.
5. W. H. Stockmayer, Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched Polymers II. General Cross Linking, The Journal of Chemical Physics, Vol. 12, No. 4, 1944, p. 125–131.
6. M. Gordon, Good's Theory of Cascade Processes Applied to the Statistics of Polymer Distributions, Proceedings of the Royal Society of London A, Vol. 268, No. 1333, 1962, p. 240–256.
7. K. Duŝek, Correspondence between the theory of branching processes and the kinetic theory for random crosslinking in the post-gel stage, Polymer Bulletin, Vol. 1, No. 8, 1979, p. 523–528.
8. S. I. Kuchanov, Y. S. Povolotskaya, Calculation of the gel-point under non-equilibrium polycondensation with allowance for the first shell substitution effect, Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A, Vol. 24, No. 10, 1982, p. 2190–2196.
9. H. Galina, J. B. Lechowicz, Mean-Field Kinetic Modeling of Polymerization: The Smoluchowski Coagulation Equation, Advances in Polymer Science, Vol. 137, 1998, p. 135–172.
10. D. Stauffer, A. Coniglio, M. Adam, Gelation and critical phenomena, Advances in Polymer Science, Vol. 44, 1982, p. 103–158.
11. J. Mikeŝ, K. Duŝek, Simulation of polymer network formation by the Monte Carlo method, Macromolecules, Vol. 15, No. 1, 1982, p. 93–99.

12. K. J. Lee, B. E. Eichinger, Computer simulation of end-linked networks: telechelic polyoxyethylene crosslinked with plurifunctional isocyanates, *Macromolecules*, Vol. 22, No. 3, 1989, p. 1441–1448.
13. T. Pakuła, Studies of Complex Polymer Systems by Computer Simulation, *Recent Developments in Polymer Science*, Vol. 1, 1996, p. 101–118.
14. H. Galina, J. Lechowicz, Modelling of hyper-branched and network polymerisation, *Macromolecular Symposia*, Vol. 174, No. 1, 2001, p. 307–317.
15. J. B. Lechowicz, Gelation in the non-stoichiometric step growth polymerization of two- and three-functional monomers, *Polimery*, Vol. 55, No. 7-8, 2010, p. 594–596.
16. J. S. Moore, S. I. Stupp, Room temperature polyesterification, *Macromolecules*, Vol. 23, No. 1, 1990, p. 65–70.
17. J. Sekuła, J. Nizioł, W. Rode, T. Ruman, Gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET) as universal solution for laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and imaging of low molecular weight compounds, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 875, 2015, p. 61–72.

MODELOWANIE MATEMATYCZNE PROCESU WSPÓŁOSADZANIA/ROZTWARZANIA TRZECH METALI

Dorota Saletnik^{1a}, Piotr Skitał¹, Przemysław Sanecki¹, Rafał Rawski²

¹Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Politechnika Rzeszowska

²Uniwersytet Rzeszowski

^ad.saletnik@stud.prz.edu.pl

1. WSTĘP

Kwestię jednoczesnego badania i modelowania procesu osadzania/roztwarzania metali na elektrodach stałych podjęła po raz pierwszy Brainina w roku 1974 [1, 2]. Problem ten został również omówiony przez Chevalier'a i współautorów [3], Mouhandes'a [4-6] oraz Grygar'a [7, 8]. Dalsze modele matematyczne procesu osadzania/roztwarzania metali, badanego za pomocą analizy strippingowej, opisane zostały przez Comptona i współautorów [9, 10].

Modele matematyczne procesu elektrodowego opublikowane do tej pory generalnie opisują następczą wieloelektronową elektronację lub deelektronację pojedynczej substancji (procesy wieloetapowe). W praktyce spotykamy często także układy wieloskładnikowe. Model odpowiedni do opisu elektroosadzania w układach wieloskładnikowych nie został jednak do tej pory opisany w literaturze. Głównym problemem w realizacji modelu dla układu wieloskładnikowego jest znacznie większa liczba równań różniczkowych wymagana do opisanie i rozwiązania w porównaniu z procesem wieloetapowym (liczba indywidualów chemicznych biorących udział w procesie determinuje liczbę równań różniczkowych, które są wymagane do modelowania). Próba teoretycznego porównania wieloetapowej redukcji następczej do redukcji w układzie wieloskładnikowym za pomocą voltamperometrii cyklicznej została zrealizowana wcześniej [11].

Przykładem redukcji układu wieloskładnikowego może być proces współosadzania dwóch metali z jednego roztworu. Współosadzanie metali jest ważnym zagadnieniem w elektrochemii i ma wiele zastosowań w tak istotnych obszarach techniki jak inżynieria materiałowa i elektronika [12-20], elektrokataliza [21-27], elektropowlekanie [28-33], a także w chemii analitycznej toksycznych metali z wykorzystaniem współosadzania bizmutu [34-45].

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badania i modelowania elektroredukcji jonów Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} oraz współosadzania Bi, Pb i Cd w środowisku $0,5\text{M KNO}_3$ ($\text{pH}=1$). Do opisu tego procesu zastosowano model dwupłatowy. Model ten został z powodzeniem zastosowany w elektroosadzaniu metali w szerokim zakresie stężeń oraz szybkości zmian potencjału [46, 47] i jest on w stanie opisać nadpotencjałowe osadzanie metalu na powierzchni z innego lub tego samego metalu. Jako przykład metalu odpowiedniego do współosadzania wybrany został bizmut ze względu na jego szerokie zastosowanie w analizie strippingowej, w której ten inertny metal

zastępuje toksyczną rtęć. Złożony proces współosadzania nie podlega regule addytywności, innymi słowy nie jest prostą sumą procesów realizowanych oddzielnie. Model ten zastosowany do opisu współosadzania metali Bi, Pb i Cd jest w stanie uwzględnić wzajemne oddziaływanie wszystkich badanych kationów w czasie procesu.

Rozwiązanie równań różniczkowych cząstkowych opisujących proces współosadzania metali oraz estymacja parametrów zostały przeprowadzone za pomocą programu *ESTYM_PDE* opracowanego przez K. Kaczmarskiego. Rozwiązywanie problemów elektrochemicznych za pomocą tego programu zostało opisane we wcześniejszych pracach [48-58]. Teoretyczne aspekty modelowania matematycznego procesów elektrodowych zostały omówione w [59-65].

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 SPOSÓB PROWADZENIA BADAŃ

Do pomiarów metodą woltamperometrii cyklicznej (CV) zastosowano skomputeryzowany analizator elektrochemiczny *REFERENCE 600* firmy *GAMRY*. Pomiar CV zostały przeprowadzone w układzie trójelektrodowym, w temperaturze $298,15 \pm 0,1\text{K}$. Elektrode pracującą stanowiła elektroda z węgla szklanego GCE2 ($\Phi = 2\text{ mm}$). Elektrode odniesienia była nasycona elektroda kalomelowa (Nas. EK), a elektrodą pomocniczą elektroda platynowa. W pomiarach CV zastosowano naczynko zaopatrzone w płaszcz umożliwiający termostatowanie oraz doprowadzenia gazu (jedno sięgające powyżej dna, drugie nad powierzchnią roztworu). Elektroda odniesienia była połączona z badanym roztworem poprzez naczynko przejściowe wypełnione roztworem o identycznym składzie jak roztwór badany. Badany roztwór składał się z elektrolitu podstawowego ($0,5\text{M KNO}_3$) wraz z depolaryzatorami (Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+}). W pierwszej kolejności przygotowano roztwory pojedynczych jonów Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} . Odpowiednie stężenia uzyskano rozpuszczając obliczone ilości $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ w roztworze $0,5\text{M KNO}_3$, o $\text{pH}=1$ ustalonym niewielką ilością kwasu azotowego(V) i wodorotlenku potasu. Roztwory te wykorzystano następnie do otrzymania roztworów trójskładnikowych zawierających jony Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} o stężeniach 5; 1 i $0,2\text{mM}$. Roztwór odtleniano przez około 10 - 15 minut. Bezpośrednio po całkowitym odtlenieniu następowała właściwa rejestracja krzywych CV, której dokonano dla 7 różnych szybkości polaryzacji: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 oraz $2,0\text{ V/s}$.

2.2 OPIS PROGRAMU ESTYM_PDE

Program *Estym_PDE* [66] przeznaczony jest do rozwiązywania i estymacji parametrów równań różniczkowych cząstkowych, opisujących jednowymiarowy transport masy i/lub ciepła z nałożoną konwekcją. Transportowi masy może towarzyszyć reakcja chemiczna i/lub elektrochemiczna. Program napisany został w Delphi 5.0 firmy Borland i może pracować pod systemami operacyjnymi Windows 95/98/NT/2000/XP/Vista/Windows7.

Wzory określające równania różniczkowe i algebraiczne mogą być dowolną kombinacją wbudowanych w program wyrażeń arytmetycznych. Program *Estym_PDE* umożliwia estymację parametrów wybranych *równań różniczkowych cząstkowych*. Aby estymacja była możliwa, należy wprowadzić dane doświadczalne związane z danym zagadnieniem. Maksymalnie można wprowadzić 11 kolumn i 16000 wierszy danych. Program podczas estymacji, bez względu na

wprowadzoną liczbę wierszy, uwzględnia dane podane w pierwszych 1000 wierszach. Zostało przyjęte, że zbiory z danymi doświadczalnymi mają rozszerzenie *.prn.

Program *Estym_PDE* rozwiązuje układ równań różniczkowych metodą kolokacji ortogonalnej na elementach skończonych. Oznacza to, że obszar, w którym poszukiwane jest rozwiązanie $(X_p X_k)$, dzielony jest na taką liczbę przedziałów, jaką wskaże użytkownik. W każdym przedziale rozwiązanie przybliżane jest wielomianem Lagrange'a w N_j punktach węzłowych. Po wprowadzeniu liczby przedziałów, program automatycznie przyjmuje względną długość przedziałów równą $1/(\text{liczba przedziałów})$. Długości te mogą być dowolnie zmienione. Należy tylko pamiętać by całkowita długość względna przedziałów była równa jeden.

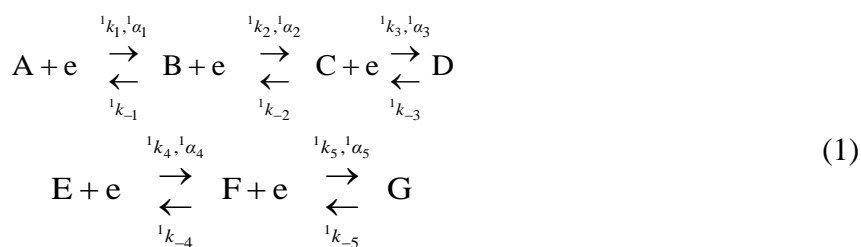
W przypadku reakcji elektrochemicznej można otrzymać wykres stężenia w funkcji czasu lub wybierając opcję *Wykres $I=f(E)$* wygodniejszy w elektrochemii wykres prądu od potencjału. Ponadto użytkownik musi zdefiniować schemat reakcji elektrochemicznej naciskając przycisk *schemat reakcji elektrochemicznej*. We wszystkich wprowadzanych równaniach można wykorzystać wbudowane w program wyrażenia arytmetyczne.

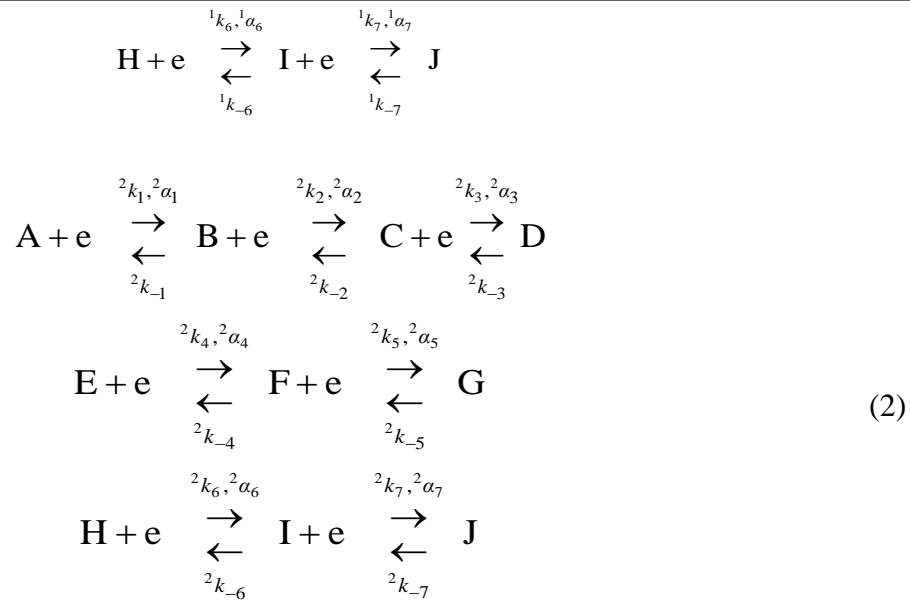
Aby znaleźć wartości poszukiwanych parametrów dla układu równań różniczkowych należy uruchomić polecenie *Zadania/Estymacja parametrów modelu*. Program będzie tak dobierał wartości estymowanych parametrów, by zminimalizować sumę kwadratów różnic między obliczonymi wartościami zmiennych funkcji, a wartościami doświadczalnymi podanymi w tabeli danych doświadczalnych.

2.3 MODEL DWUPLATOWY

Model matematyczny [48, 58], zastosowany w niniejszej pracy do opisu procesu wydzielania/roztwarzania metali, nazwany został modelem dwupłatowym. Zakładamy, że konkurują ze sobą dwa procesy zachodzące z różnymi nadpotencjałami. Nadpotencjał wydzielania metalu na czystej elektrodzie jest z reguły większy od nadpotencjału wydzielania metalu na tym samym metalu. Innymi słowy proces redukcji zachodzi na dwóch płatach. Model dwupłatowy łączy elektrowydzielanie na niezajętej powierzchni elektrody oraz na powierzchni zajętej przez warstwę bizmutu. Odpowiada to następczo-równoległej redukcji na dwóch różnych elektrodach, przy czym powierzchnia pierwszej z nich maleje, drugiej rośnie, a suma tych powierzchni jest stała i równa powierzchni elektrody. Model dwupłatowy wymaga dwóch zestawów parametrów kinetycznych przy modelowaniu. Są one wyszczególnione poniżej, jako element dwupłatowego pliku urr. zastosowanego w programie *ESTYM_PDE*.

Rozważane są trzy reakcje elektrodowe (trójelektronowa redukcja jonów Bi^{3+} oraz dwuelektronowa redukcja jonów Pb^{2+} i Cd^{2+}), jako reakcje następczo-równoległe na dwóch płatach tzn. dwu różnych, lecz współzależnych obszarach powierzchni elektrody. Ta sama reakcja elektrodowa biegnie na poszczególnych płatach z różnym nadpotencjałem.





gdzie:

$A \equiv \text{Bi}^{3+}$, $B \equiv \text{Bi}^{2+}$, $C \equiv \text{Bi}^{1+}$, $D \equiv \text{Bi}$, $E \equiv \text{Pb}^{2+}$, $F \equiv \text{Pb}^+$, $G \equiv \text{Pb}$ oraz $H \equiv \text{Cd}^{2+}$, $I \equiv \text{Cd}^+$, $J \equiv \text{Cd}$; $^1k_1, ^1k_{-1}, ^1k_2, ^1k_{-2}, ^1k_3, ^1k_{-3}, ^2k_1, ^2k_{-1}, ^2k_2, ^2k_{-2}, ^2k_3, ^2k_{-3}; ^1k_4, ^1k_{-4}, ^1k_5, ^1k_{-5}, ^2k_4, ^2k_{-4}, ^2k_5, ^2k_{-5}$ oraz $^1k_6, ^1k_{-6}, ^1k_7, ^1k_{-7}, ^2k_6, ^2k_{-6}, ^2k_7, ^2k_{-7}$ oznaczają stałe szybkości odpowiednich procesów elektrodowych [cm/s], indeksy górne oznaczają numer płatu (1 lub 2).

Rozważana jest dyfuzja indywiduum A, B, C, E, F, H, I ale także indywiduum D, G, J, które chociaż nierozpuszczalne, choćby na bardzo krótko muszą pojawić się w roztworze przy elektrodzie. Bilans masy dla każdego i-tego składnika roztworu ma postać:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad (3)$$

gdzie:

x – odległość od elektrody [cm], t – czas [s], D_i – współczynnik dyfuzji substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$) [cm^2/s], c_i – stężenie substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$) [mol/cm^3].

Procesy wymiany elektronu opisuje równanie Butlera-Volmera:

$$i_1 = i_0 \left[\exp\left(\frac{\alpha z F \eta}{RT} - \frac{(1-\alpha) z F \eta}{RT}\right) \right] \quad (4)$$

gdzie:

α – współczynnik przejścia procesu katodowego, z – liczba elektronów wymienianych w procesie elektrodowym, R – stała gazowa [$\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$], T – temperatura [K], i_1 – natężenie prądu cząstkowego dla etapu elementarnego [A], i_0 – natężenie prądu wymiany [A], F c stała Faradaya [C/mol], η – nadpotencjał [V].

Dodatkowo, adsorpcja wydzielonych na powierzchni elektrody metali jest opisana przez odpowiednie równanie izotermy, w analizowanym przypadku równaniem izotermy BET.

$$q = \frac{q_s K_1 c}{(1 - K_d c)(1 + K_1 c - K_d c)} \quad (5)$$

gdzie:

q – aktualne stężenie powierzchniowe składnika, q_s – maksymalne stężenie powierzchniowe, K_1 , K_d – stałe równowagi adsorpcji, c – aktualne stężenie w roztworze przy powierzchni elektrody.

Natężenie prądu liczone jako sumę Σi_i prądów procesów elementarnych:

$$i_i = FAD_i \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (6)$$

gdzie:

i_i – natężenie prądu cząstkowego dla etapu elementarnego (i oznacza numer etapu przeniesienia ładunku) [A], F – stała Faradaya [C/mol], A – powierzchnia elektrody [cm²], D_i – współczynnik dyfuzji substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$) [cm²/s], x – odległość od elektrody [cm], c_i – stężenie substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$) [mol/cm³].

Przedstawiony układ równań różniczkowych wraz z odpowiednimi warunkami granicznymi pozwala, na wyznaczenie rozkładu stężeń indywiduów Bi³⁺, Bi²⁺, Bi⁺, Bi, Pb²⁺, Pb⁺, Pb, Cd²⁺, Cd⁺, Cd w funkcji odległości od elektrody i czasu. Tym samym można określić sumaryczne natężenie prądu i natężenie prądu poszczególnych etapów. W niniejszej pracy rozwiązanie wymienionego układu równań zostało zrealizowane przy pomocy programu *ESTYM_PDE* w wersji przystosowanej do obliczeń kinetyki elektrochemicznej. Zastosowany model był dostosowany do redukcji eksperymentalnej prowadzonej na płaskiej elektrodzie.

Tabela 1. Symbole, oznaczenia, akronimy

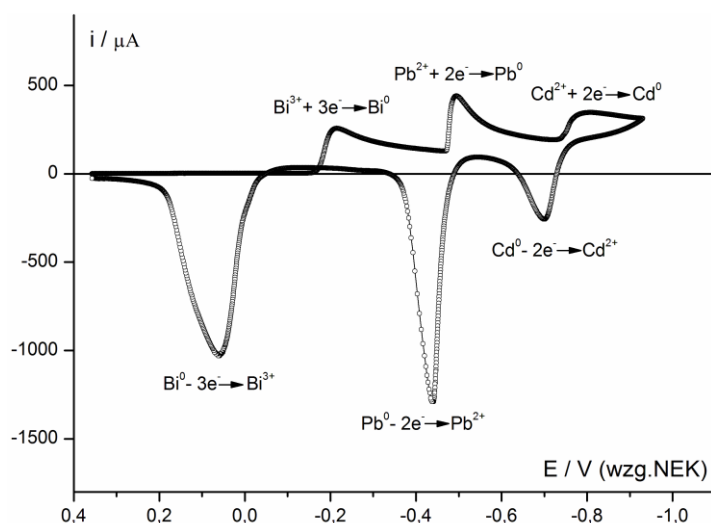
Symbol	Sens fizyczny	Wymiar
A	powierzchnia elektrody	cm ²
c	stężenie substancji	mol/cm ³
c_i	stężenie substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$)	mol/cm ³
D_i	współczynnik dyfuzji substancji i ($i = A, B, C, D, E, F, G, H, I, J$)	cm ² /s
E	potencjał	V, mV
F	stała Faradaya	C/mol
I, i	natężenie prądu	A, μA
i_i	natężenie prądu cząstkowego dla etapu elementarnego, i oznacza numer etapu przeniesienia ładunku	A, μA
i₀	natężenie prądu wymiany	A, μA
j_k	stała szybkości reakcji przeniesienia dla etapu elementarnego i ($i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$) na j -tym płacie ($j=1, 2$)	cm/s
K_d	stała równowagi adsorpcji	cm ² /mol
K₁	stała równowagi adsorpcji	cm ² /mol
q	aktualne stężenie powierzchniowe składnika	mol/cm ²
q_s	maksymalne stężenie powierzchniowe składnika	mol/cm ²
q_{s,1}	maksymalne stężenie powierzchniowe składnika odpowiadające utworzeniu jednej teoretycznej warstwy molekularnej	mol/cm ²
R	stała gazowa	J/(mol·K)

t	czas	s
T	temperatura w skali bezwzględnej	K
ν	szybkość nakładania potencjału w voltamperometrii	V/s
x	współrzędna; odległość od elektrody	cm
z	liczba elektronów wymienianych w procesie elektrodowym	–
α	współczynnik przejścia procesu katodowego	–
j_{α_i}	elementarny współczynnik przejścia procesu (etapu) katodowego, indeks "i" oznacza numer etapu przeniesienia ładunku ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$), indeks "j" oznacza numer płatu ($j=1, 2$)	–
∂	symbol pochodnej cząstkowej	–
η	nadpotencjał	V
CV	cykliczna voltamperometria	–
GCE2	elektroda z węgla szklanego ($\Phi = 2$ mm)	–
NEK	nasycona elektroda kalomelowa	–

3. WYNIKI I DISKUSJA WYNIKÓW

3.1 ZESTAWIENIE WYNIKÓW EKSPERYMENTALNYCH

Wyniki eksperymentalne zostały przedstawione w formie znormalizowanych krzywych CV i zestawione w funkcji serii szybkości polaryzacji dla wybranego stężenia. Przykładowe wyniki zostały pokazane na Rys. 1.



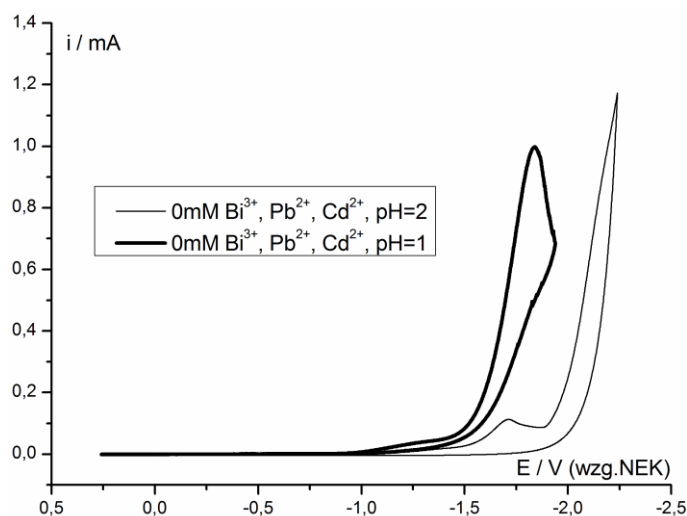
Rys. 1. Krzywe CV elektroredukcji jonów Bi^{3+} (5mM), Pb^{2+} (5mM) i Cd^{2+} (5mM) w 0,5M KNO_3 przy $\text{pH}=1$ na elektrodzie GCE2 dla szybkości polaryzacji 1 V/s oraz ich identyfikacja

3.2 WPŁYW REDUKCJI JONÓW WODOROWYCH NA BADANIE PROCESU WYDZIELANIA KADMU

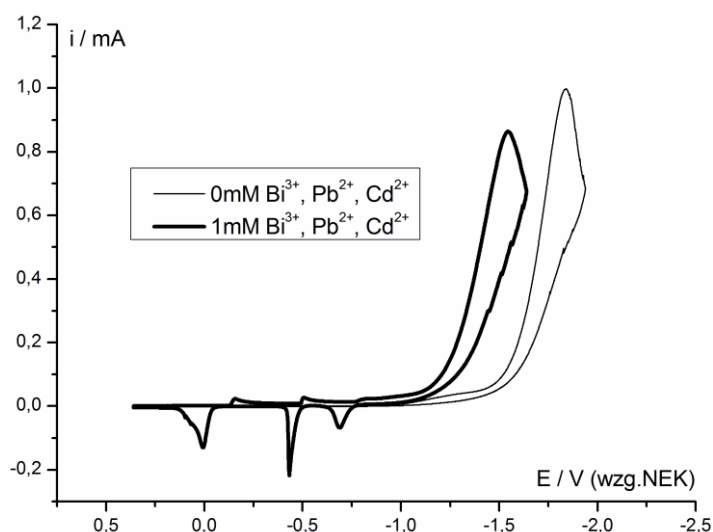
Z powyżej prezentowanych danych eksperymentalnych wynika, że w części krzywej CV, która odpowiada elektroredukcji jonów kadmu w badanym roztworze duży udział w wartości natężenia prądu zajmuje proces redukcji jonów wodorowych. W celu jednoznacznej identyfikacji wspomnianego procesu dodatkowo zarejestrowano krzywe CV dla wodnego roztworu 0,5M KNO_3 o $\text{pH}=1$ i $\text{pH}=2$ i przedstawiono na Rys. 2. Częściowe nakładanie się procesu wydzielania

kadmu oraz elektrodukcji jonów wodorowych powoduje, że badanie redukcji jonów kadmu w tym roztworze obarczone jest istotnym błędem. Na wielkość tego błędu wpływają dwa czynniki:

- dziesięciokrotnie większe stężenie jonów wodorowych (0,1M) od stężenia jonów kadmu (0,001M);
- przesunięcie pików wydzielania wodoru w stronę potencjałów bardziej dodatnich (o około 0,3V), a tym samym większe nakładanie się z pikami elektrodukcji jonów kadmu. Przesunięcie to spowodowane jest tym, że pokrycie powierzchni elektrody metalem zmienia jej właściwości i wyraźnie przyspiesza proces wydzielania wodoru w porównaniu z niepokrytą elektrodą GCE. Rys. 3 zawierający dwie krzywe CV redukcji jonów wodorowych w obecności i nieobecności jonów metali potwierdza proces katalizy.



Rys. 2. Krzywe CV elektrodukcji jonów H^+ w funkcji pH (pH=1 - czerwone punkty, pH=2 - czarne punkty) w wodnym roztworze $0,5M KNO_3$ (elektrolit podstawowy) na elektrodzie GCE2 dla szybkości polaryzacji $0,05V/s$

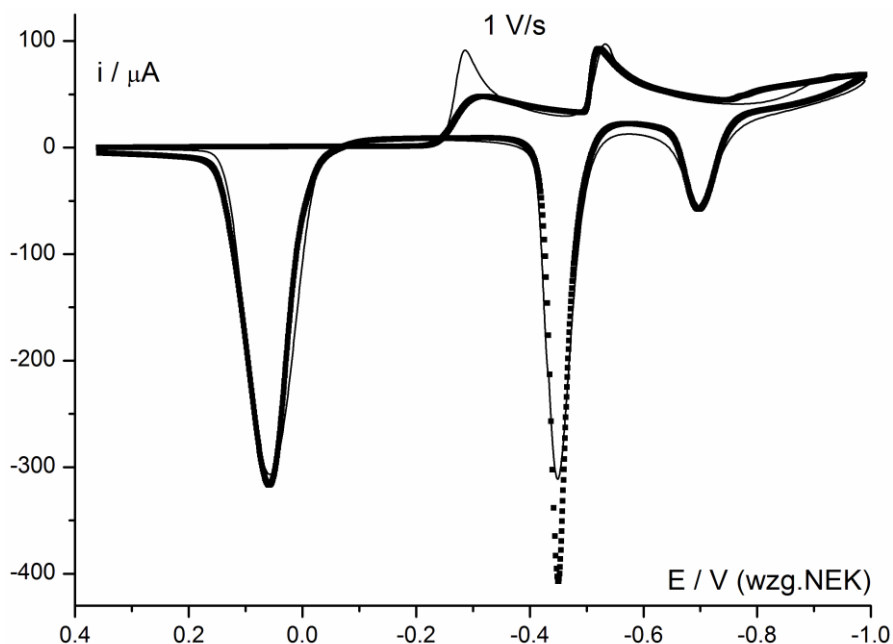


Rys. 3. Krzywe CV elektrodukcji jonów H^+ w obecności i nieobecności jonów Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} w $0,5M KNO_3$ przy pH=1 na elektrodzie GCE2 dla szybkości polaryzacji $0,05V/s$

3.3 MODELOWANIE DANYCH EKSPERYMENTALNYCH

Na bazie uzyskanych danych przeprowadzono modelowanie matematyczne procesu współosadzania/roztwarzania w układzie $\text{Bi}^{3+}/\text{Bi}^{2+}/\text{Bi}^+/\text{Bi}^0$, $\text{Pb}^{2+}/\text{Pb}^+/\text{Pb}^0$ i $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^+/\text{Cd}^0$ za pomocą modelu dwupłatowego z zastosowaniem programu *ESTYM_PDE*. Przedstawione poniżej wykresy (Rys. 4) stanowią porównanie doświadczalnych przebiegów CV (czarne punkty) z krzywymi teoretycznymi (czarne linie) otrzymanymi za pomocą modelu dwupłatowego osadzania/roztwarzania metali z udziałem adsorpcji.

W celu dopasowania pików utleniania i redukcji na krzywych teoretycznych do pików na krzywych doświadczalnych oraz odwzorowania pętli, charakterystycznej dla procesu osadzania/roztwarzania metali na elektrodzie stałej, konieczna była zmiana parametru stopnia pokrycia powierzchni elektrody depolaryzatozem q_s i parametru q_{s1} odpowiadającego za przejście między płatem pierwszym (czysta powierzchnia elektrody GCE2), a płatem drugim (powierzchnia elektrody GCE2 pokryta metalem). Wyznaczone wartości wybranych parametrów kinetycznych oraz parametrów równania izotermii BET wraz z przedziałami ufności zostały zamieszczone w podpisie Rys. 4.

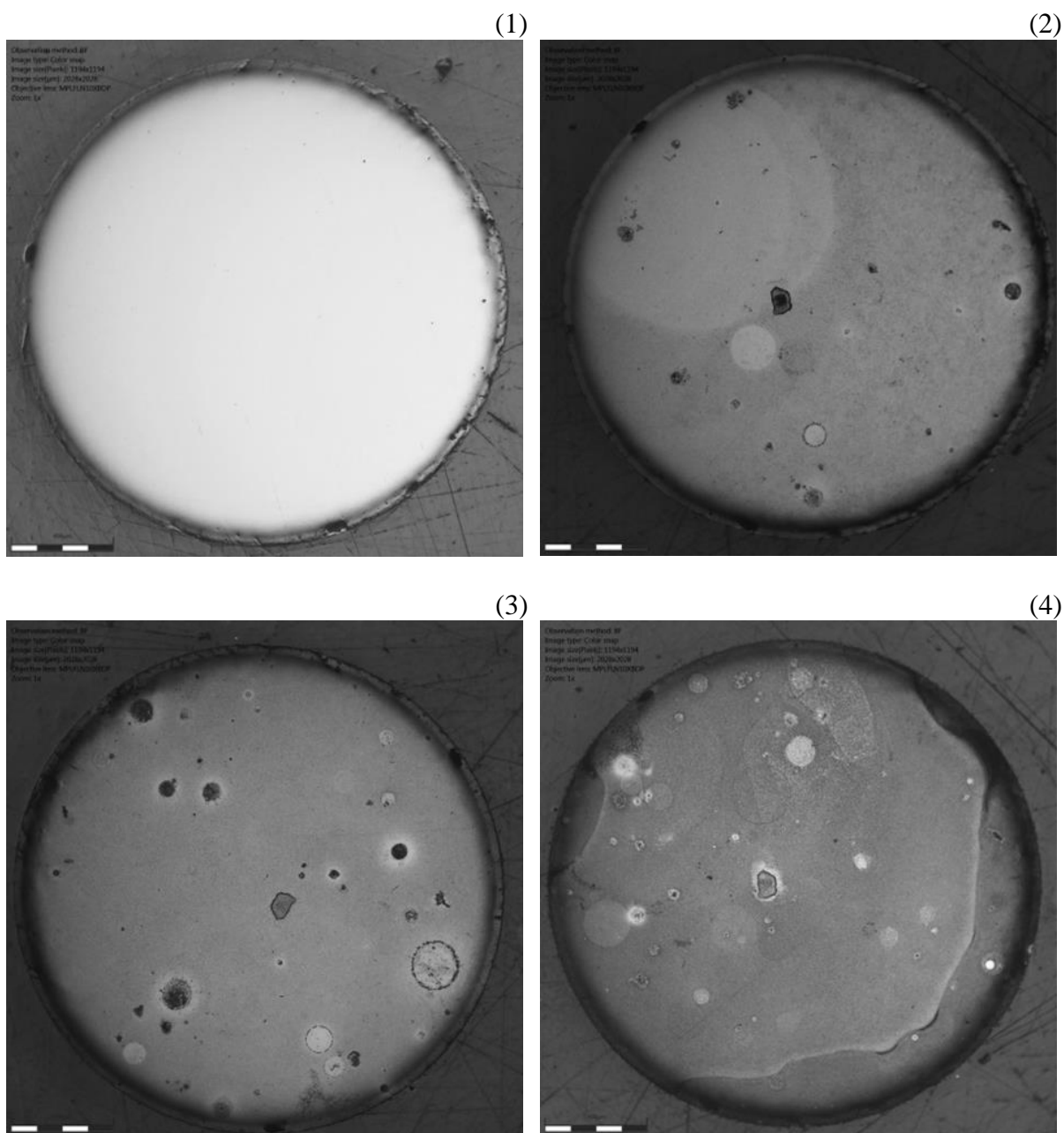


Rys. 4. Krzywe CV elektroredukcji jonów Bi^{3+} (1mM), Pb^{2+} (1mM) i Cd^{2+} (1mM) w 0,5M KNO_3 przy pH=1 na elektrodzie GCE2 (czarne punkty). Teoretyczne krzywe CV (czarne linie) obliczone na podstawie modelu. Wyznaczone parametry: ${}^1k_1=(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ cms}^{-1}$, ${}^2k_1=0,07 \pm 0,001 \text{ cms}^{-1}$, ${}^1k_2=1,0 \pm 0,01 \text{ cms}^{-1}$, ${}^2k_2=1,0 \pm 0,005 \text{ cms}^{-1}$, ${}^1k_3=1,0 \pm 0,01 \text{ cms}^{-1}$, ${}^2k_3=1,0 \pm 0,003 \text{ cms}^{-1}$, ${}^1\alpha_{123}=0,50 \pm 0,006$, ${}^2\alpha_{123}=0,50 \pm 0,007$, $E_{0123}=-0,066 \pm 0,0004 \text{ V}$, $q_{\text{Bi},s1}=(9,0 \pm 0,8) \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$, $q_{\text{Bi},s}=(6,0 \pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-2}$; $q_{\text{Pb},s}=(1,4 \pm 0,07) \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-2}$, $K_{\text{Bi},1}=(1,0 \pm 0,05) \times 10^5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $K_{\text{Bi},d}=(1,0 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $D_{\text{Bi}^{3+}}=(5,5 \pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

3.4 OBRAZ POWIERZCHNI ELEKTRODY PRACUJĄCEJ

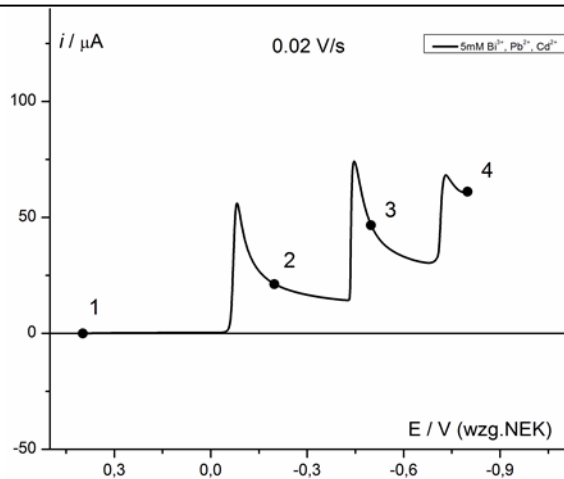
Wykonano zdjęcia mikroskopowe (Rys. 5 i 7) powierzchni elektrody pracującej GCE2 dla największego stężenia badanych jonów (5mM) oraz najmniejszej szybkości polaryzacji (0.02V/s), a zatem dla przypadku o największej koncentracji osadzonej fazy metalicznej (Bi, Pb i Cd). Oznacza to, że w pozostałych przypadkach ilość osadzonego metalu była jeszcze

mniejsza. Zdjęcia wykonano w różnych punktach potencjałowych, które odpowiadają prądowi dyfuzyjnemu elektrowspółosadzania badanych jonów.

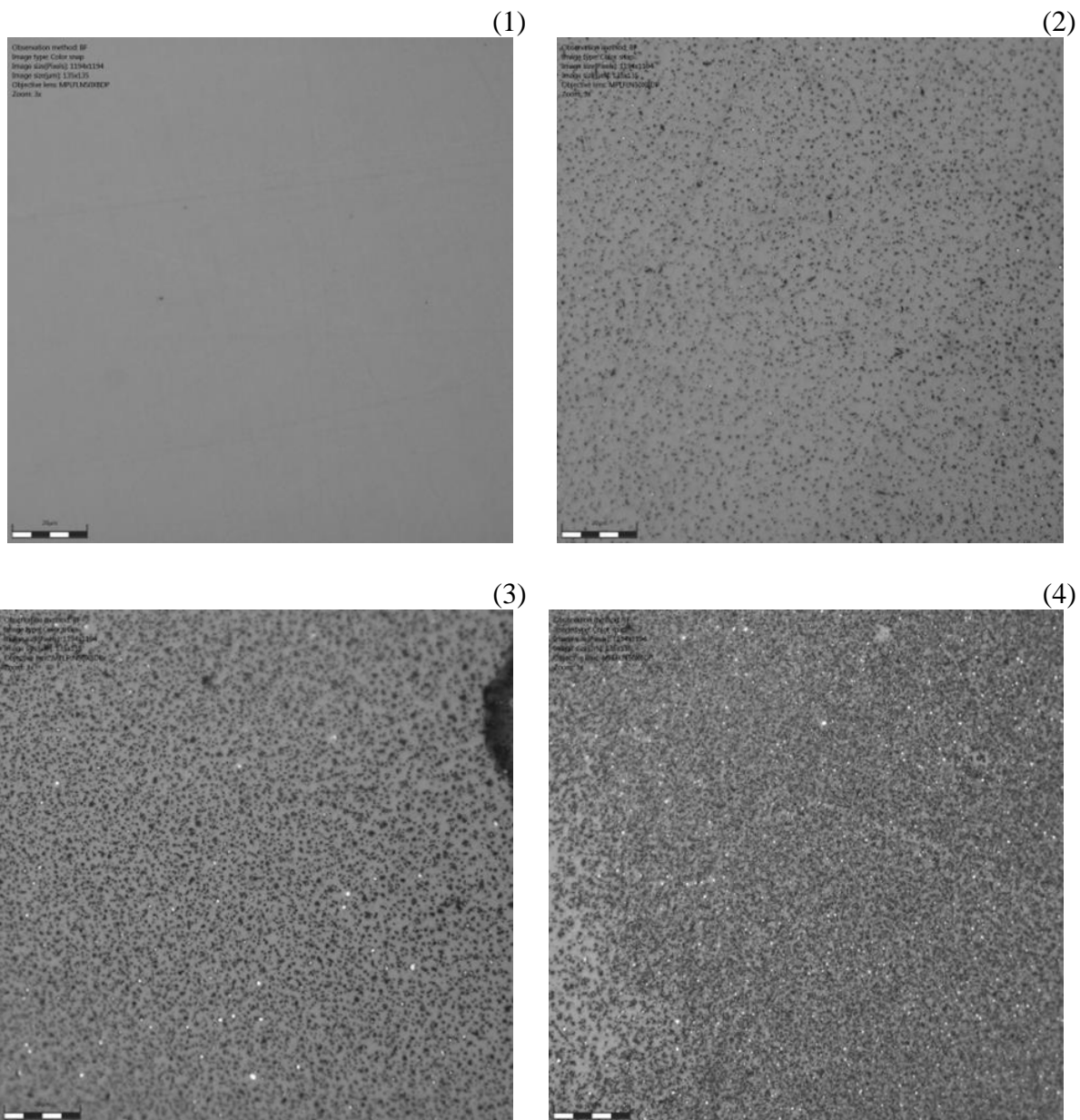


Rys. 5. Zdjęcia mikroskopowe powierzchni elektrody pracującej GCE na różnych etapach osadzania Bi, Pb i Cd w 0,5M KNO_3 przy $\text{pH}=1$, dla stężenia 5mM i szybkości polaryzacji 0,02V/s. Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu optyczno-cyfrowego Olympus DSX-500i (technika: BF, okular: 14x, obiektyw: 10x, zoom: 1x, HDR: nie, powiększenie: 140x)

Poszczególne zdjęcia na Rys. 5 i 7 odpowiadają punktom zaznaczonym na krzywej woltamperometrycznej przedstawionej na Rys. 6. Zdjęcia zostały wykonane za pomocą mikroskopu optyczno-cyfrowego Olympus DSX-500i.



Rys. 6. Krzywa woltamperometryczna, przy rejestracji której wykonano zdjęcia powierzchni elektrody GCE2 w różnych jej punktach potencjałowych, odpowiadających prądowi dyfuzyjnemu elektroredukcji jonów Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} w $0,5\text{M KNO}_3$ przy $\text{pH}=1$, dla stężenia 5mM i szybkości polaryzacji $0,02\text{V/s}$. Zaznaczone punkty charakterystyczne: (1) czysta powierzchnia elektrody, (2) elektroda pokryta Bi, (3) elektroda pokryta Bi i Pb, (4) elektroda pokryta Bi, Pb i Cd, odpowiadają poszczególnym zdjęciom na Rys. 6 i 7



Rys. 7. Zdjęcia mikroskopowe powierzchni elektrody pracującej GCE na różnych etapach osadzania Bi, Pb i Cd w $0,5\text{M KNO}_3$ przy $\text{pH}=1$, dla stężenia 5mM i szybkości polaryzacji $0,02\text{V/s}$. Zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu optyczno-cyfrowego Olympus DSX-500i (technika: BF, okular: $14\times$, obiektyw: $50\times$, zoom: $3\times$, HDR: nie, powiększenie: $2100\times$)

4. WNIOSKI

Korzystając z modelu dwupłatowego uwzględniającego reakcję biegnącą na dwóch różnych powierzchniach elektrody uzyskano dobry stopień odwzorowania doświadczalnych przebiegów CV przez krzywe teoretyczne otrzymane z zastosowaniem tego modelu. Wyniki estymacji parametrów kinetycznych wraz z ich odchyleniem standardowym przedstawione zostały w opisie rysunku.

Zastosowany model pozwala na odtworzenie trzech katodowych pików dyfuzyjnych, trzech anodowych pików adsorpcyjnych, a także pętli charakterystycznej dla procesu osadzania/roztwarzania metali na elektrodzie stałej. Pętla ta występuje wyłącznie dla bizmutu, który osadza się jako pierwszy i zmuszony jest do nukleacji na czystej powierzchni elektrody GCE2. Zmiany właściwości powierzchni elektrody, spowodowane osadzaniem się bizmutu, zostały zawarte w modelu. Zaprezentowane wyniki wskazują, że technika woltamperometrii cyklicznej wraz zaawansowanym modelem dwupłatowym uwzględniającym adsorpcję poprzez równanie izotermy BET, są wystarczające aby w pełni opisać proces współosadzania/roztwarzania w układzie $\text{Bi}^{3+}/\text{Bi}^{2+}/\text{Bi}^+/\text{Bi}^0$, $\text{Pb}^{2+}/\text{Pb}^+/\text{Pb}^0$ i $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^+/\text{Cd}^0$, w szerokim zakresie stężeń i wartości szybkości polaryzacji. Można się zatem spodziewać, że podobne podejście będzie przydatne przy modelowaniu osadzania innych ważnych metali i stopów.

W wyniku modelowania wyznaczono stałe szybkości reakcji dla badanych jonów Bi^{3+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} . Wraz ze wzrostem wartości $^2k/{}^1k$ obserwujemy zwykle większą pętlę na krzywej CV. Charakterystyczne przecięcie się części krzywej CV (pętla) występuje tylko dla jonów Bi^{3+} , które redukują się jako pierwsze i są zmuszone do nukleacji na czystej elektrodzie GCE (duża wartość $^2k/{}^1k$). W przypadku jonów Pb^{2+} i Cd^{2+} nie obserwujemy charakterystycznej pętli, co uzasadnia małe wartości $^2k/{}^1k$.

W obszarze elektroredukcji jonów kadmu spory udział w wartości natężenia prądu zajmuje proces redukcji jonów wodorowych. Częściowe nakładanie się tych procesów powoduje, że badanie redukcji jonów kadmu w tym roztworze obarczone jest znacznym błędem.

Literatura

1. K. Z. Brainina, R. P. Lesunova, Use of a paste electrode for electrochemical phase analysis. 1. Theoretical aspects. Formation of soluble products, Zhurnal Analiticheskoi Khimii, Vol. 29, 1974, p. 1302–1308.
2. K. Z. Brainina, M. B. Vydrevich, Stripping analysis of solids, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, Vol. 121, 1981, p. 1–28.
3. F. G. Chevallier, A. Goodwin, C. E. Banks, L. Jiang, T. G. J. Jones, R. G. Compton, A new method for the study of processes at the liquid-liquid interface using an array of microdroplets on a Au electrode, Journal of Solid State Electrochemistry, Vol. 10, 2006, p. 857–864.
4. M. T. Mouhandess, F. Chassagneux, O. Vittori, A. Accary, R. M. Reeves, Some theoretical aspects of electrodisolution of iron oxide ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) in carbon paste electrodes with acidic binder, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, Vol. 181, No. 1-2, 1984, p. 93–105.

5. M. T. Mouhandess, F. Chassagneux, O. Vittori, Electrochemical behaviour of α -Fe₂O₃ using carbon paste electrodes: Influence of particle size, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 131, 1982, p. 367–371.
6. M. T. Mouhandess, F. Chassagneux, B. Durand, Z. Z. Sharara, O. Vittori, Some advantages of carbon paste electrodes in the morphological study of finely divided iron oxides, *Journal of Materials Science*, Vol. 20, No. 9, 1985, p. 3289–3299.
7. T. Grygar, Phenomenological kinetics of irreversible electrochemical dissolution of metal-oxide microparticles, *Journal of Solid State Electrochemistry*, Vol. 2, 1998, p. 127–136.
8. T. Grygar, F. Marken, U. Schröder, F. Scholz, Electrochemical analysis of solids. A review, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, Vol. 67, No. 2, 2002, p. 163–207.
9. S. E. Ward-Jones, F. G. Chevallier, Ch. A. Paddon, R. G. Compton, General theory of cathodic and anodic stripping voltammetry at solid electrodes: mathematical modeling and numerical simulations, *Analytical Chemistry*, Vol. 79, No. 11, 2007, p. 4110–4119.
10. S. E. Ward-Jones, S. H. Zheng, C. A. Jeffrey, S. Seretis, S. Morin, R. G. Compton, Stripping voltammetry of bismuth at Au(111): Mathematical modelling and numerical simulation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 616, No. 1-2, 2008, p. 38–44.
11. P. Sanecki, P. Skitał, A comparison of the multistep consecutive reduction mode with the multicomponent system reduction mode in cyclic voltammetry, *Computers & Chemistry*, Vol. 26, No. 4, 2002, p. 333–340.
12. F. Wang, S. Doi, K. Hosoiri, H. Yoshida, T. Kuzushima, M. Sasadaira, T. Watanabe, Nanostructured Fe-Pd thin films for thermoelastic shape memory alloys-electrochemical preparation and characterization, *Electrochimica Acta*, Vol. 51, No. 20, 2006, p. 4250–4254.
13. J. Hassoun, S. Panero, B. Scrosati, Electrodeposited Ni-Sn intermetallic electrodes for advanced lithium ion batteries, *Journal of Power Sources*, Vol. 160, No. 2, 2006, p. 1336–1341.
14. K. Žužek Rožman, A. Krause, K. Leistner, S. Fähler, L. Schultz, H. Schlörb, Electrodeposition and hard magnetic properties of Co-Pt films in comparison to Fe-Pt films, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 314, No. 2, 2007, p. 116–121.
15. L. Cagnon, Y. Dahmane, J. Voiron, S. Pairis, M. Bacia, L. Ortega, N. Benbrahim, A. Kadri, Electrodeposited CoPt and FePt alloys nanowires, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol. 310, No. 2, 2007, p. 2428–2430.
16. G. Staikov (Ed.), *Electrocrystallization in Nanotechnology*, WILEY-VCH, 2007.
17. S. C. Hernández, B. Y. Yoo, E. Stefanescu, S. Khizroev, N. V. Myung, Electrodeposition of iron-palladium thin films, *Electrochimica Acta*, Vol. 53, No. 18, 2008, p. 5621–5627.
18. D. Zhang, Ch. Yang, J. Dai, J. Wen, L. Wang, Ch. Chen, Fabrication of Sn-Ni alloy film anode for Li-ion batteries by electrochemical deposition, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, Vol. 19, No. 6, 2009, p. 1489–1493.
19. T. Osaka, M. Datta, Y. Shacham-Diamand (Editors), *Electrochemical Nanotechnologies*, Springer Science+Business Media, 2010.
20. D. Liang, G. Zangari, Fe-Pt magnetic multilayers by electrochemical deposition, *Electrochimica Acta*, Vol. 56, No. 28, 2011, p. 10567–10574.
21. Z. D. Wei, S. H. Chan, Electrochemical deposition of PtRu on an uncatalyzed carbon electrode for methanol electrooxidation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 569, No. 1, 2004, p. 23–33.

22. F. J. Rodríguez-Nieto, T. Y. Morante-Catacora, C. R. Cabrera, Sequential and simultaneous electrodeposition of Pt-Ru electrocatalysts on a HOPG substrate and the electro-oxidation of methanol in aqueous sulfuric acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 571, No. 1, 2004, p. 15–26.
23. Z. He, J. Chen, D. Liu, H. Zhou, Y. Kuang, Electrodeposition of Pt-Ru nanoparticles on carbon nanotubes and their electrocatalytic properties for methanol electrooxidation, *Diamond and Related Materials*, Vol. 13, No. 10, 2004, p. 1764–1770.
24. C. Milhano, D. Pletcher, The electrodeposition and electrocatalytic properties of copper-palladium alloys, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 614, No. 1-2, 2008, p. 24–30.
25. T. Y. Morante-Catacora, Y. Ishikawa, C. R. Cabrera, Sequential electrodeposition of Mo at Pt and PtRu methanol oxidation catalyst particles on HOPG surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 621, No. 1, 2008, p. 103–112.
26. W. Ye, H. Kou, Q. Liu, J. Yan, F. Zhou, Ch. Wang, Electrochemical deposition of Au-Pt alloy particles with cauliflower-like microstructures for electrocatalytic methanol oxidation, *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 37, No. 5, 2012, p. 4088–4097.
27. J. Wang, Z. Dong, J. Huang, J. Li, X. Jin, J. Niu, J. Sun, J. Jin, J. Ma, Filling carbon nanotubes with Ni-Fe alloys via methylbenzene-oriented constant current electrodeposition for hydrazine electrocatalysis, *Applied Surface Science*, Vol. 270, 2013, p. 128–132.
28. J. B. Bajat, V. B. Mišković-Stanković, M. D. Maksimović, D. M. Dražić, S. Zec, Electrochemical deposition and characterization of Zn-Co alloys and corrosion protection by electrodeposited epoxy coating on Zn-Co alloy, *Electrochimica Acta*, Vol. 47, No. 25, 2002, p. 4101–4112.
29. L. S. Sanches, S. H. Domingues, C. E. B. Marino, L. H. Mascaro, Characterisation of electrochemically deposited Ni-Mo alloy coatings, *Electrochemistry Communications*, Vol. 6, No. 6, 2004, p. 543–548.
30. L. S. Tsybulska, T. V. Gaevskaya, O. G. Purovskaya, T. V. Byk, Electrochemical deposition of zinc-nickel alloy coatings in a polyligand alkaline bath, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 203, No. 3-4, 2008, p. 234–239.
31. Ch. Han, Q. Liu, D. G. Ivey, Electrochemical composite deposition of Sn-Ag-Cu alloys, *Materials Science and Engineering: B*, Vol. 164, No. 3, 2009, p. 172–179.
32. M. Allemand, M. H. Martin, D. Reyter, L. Roué, D. Guay, C. Andrei, G. A. Botton, Synthesis of Cu-Pd alloy thin films by co-electrodeposition, *Electrochimica Acta*, Vol. 56, No. 21, 2011, p. 7397–7403.
33. H. M. Maltnava, O. N. Vrublevska, T. N. Vorobyova, Electrochemical Deposition of Gold-Tin Alloy from Propyleneglycol Electrolyte, *Metal Finishing*, Vol. 111, No. 6, 2013, p. 28–34.
34. K. Schwabe, Die pH-Indikation an Wismutelektroden, *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, Vol. 53, No. 3, 1949, p. 125–132.
35. J. Wang, J. Lu, S. B. Hocevar, P. A. M. Farias, Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry, *Analytical Chemistry*, Vol. 72, No. 14, 2000, p. 3218–3222.
36. J. Wang, J. Lu, Bismuth film electrodes for adsorptive stripping voltammetry of trace Nickel, *Electrochemistry Communications*, Vol. 2, No. 6, 2000, p. 390–393.
37. J. Wang, J. Lua, U. A. Kirgoz, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 434, No. 1, 2001, p. 29–34.

38. R. Pauliukaitė, C. M. A. Brett, Characterization and Application of Bismuth-Film Modified Carbon Film Electrodes, *Electroanalysis*, Vol. 17, No. 15-16, 2005, p. 1354–1359.
39. A. Economou, Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 24, No. 4, 2005, p. 334–340.
40. Y. Wu, N. B. Li, H. Q. Luo, Simultaneous measurement of Pb, Cd and Zn using differential pulse anodic stripping voltammetry at a bismuth/poly(p-aminobenzene sulfonic acid) film electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 133, No. 2, 2008, p. 677–681.
41. C. F. Zinola (Ed.), *Electrocatalysis: Computational, Experimental and Industrial Aspects*, Taylor & Francis Inc, CRC Press, 2010.
42. V. Guzsvány, Z. Papp, J. Zbiljić, O. Vajdle, M. Rodić, Bismuth Modified Carbon-Based Electrodes for the Determination of Selected Neonicotinoid Insecticides, *Molecules*, Vol. 16, No. 6, 2011, p. 4451–4466.
43. J. Saturno, D. Valera, H. Carrero, L. Fernández, Electroanalytical detection of Pb, Cd and traces of Cr at micro/nano-structured bismuth film electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 159, No. 1, 2011, p. 92–96.
44. S. Anandhakumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, In situ bismuth film modified carbon fiber microelectrode for nanomolar detection of cadmium and lead, *Indian Journal of Chemistry*, Vol. 51, 2012, p. 699–703.
45. A. Królicka, A. Bobrowski, J. Zarębski, I. Tesarowicz, Bismuth Film Electrodes for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Sunset Yellow FCF in Soft Drinks, *Electroanalysis*, Vol. 26, No. 4, 2014, p. 756–765.
46. P. T. Sanecki, P. M. Skitał, K. Kaczmarski, The mathematical models of the stripping voltammetry metal deposition/dissolution process, *Electrochimica Acta*, Vol. 55, No. 5, 2010, p. 1598–1604.
47. P. M. Skitał, P. T. Sanecki, K. Gibała, The description of the copper deposition/dissolution process in ammonia buffer with the application of mathematical two-plate model, *Electrochimica Acta*, Vol. 138, 2014, p. 383–391.
48. P. T. Sanecki, P. M. Skitał, K. Kaczmarski, The mathematical models of the stripping voltammetry metal deposition/dissolution process, *Electrochimica Acta*, Vol. 55, No. 5, 2010, p. 1598–1604.
49. P. M. Skitał, P. T. Sanecki, The experimental verification of mathematical two-plate model describing the metal deposition/dissolution process, *Russian Journal of Electrochemistry*, Vol. 48, No. 8, 2012, p. 797–803.
50. P. M. Skitał, P. T. Sanecki, K. Gibała, The description of the copper deposition/dissolution process in ammonia buffer with the application of mathematical two-plate model, *Electrochimica Acta*, Vol. 138, 2014, p. 383–391.
51. P. Sanecki, P. Skitał, The cyclic voltammetry simulation of a competition between stepwise and concerted dissociative electron transfer. The modeling of alpha apparent variability. The relationship between apparent and elementary kinetic parameters, *Computers & Chemistry*, Vol. 26, No. 4, 2002, p. 297–311.
52. P. Sanecki, C. Amatore, P. Skitał, The problem of the accuracy of electrochemical kinetic parameters determination for the ECE reaction mechanism, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 546, 2003, p. 109–121.

53. P. Sanecki, P. Skitał, K. Kaczmarski, Numerical modeling of ECE-ECE and parallel EE-EE mechanisms in cyclic voltammetry. Reduction of 1,4-benzenedisulfonyl difluoride and 1,4-naphthalenedisulfonyl difluoride, *Electroanalysis*, Vol. 18, 2006, p. 981–991.
54. P. Sanecki, P. Skitał, The application of EC, ECE and ECE-ECE models with potential dependent transfer coefficient to selected electrode processes, *Journal of The Electrochemical Society*, Vol. 154, No. 8, 2007, p. F152–F158.
55. P. Sanecki, P. Skitał, The mathematical models of kinetics of the E, EC, ECE, ECEC, ECE–ECE and ECEC–ECEC processes with potential-dependent transfer coefficient as a rationale of isoalpha points, *Electrochimica Acta*, Vol. 53, No. 26, 2008, p. 7711–7719.
56. P. Skitał, P. Sanecki, The ECE process in cyclic voltammetry. The relationships between elementary and apparent kinetic parameters obtained by convolution method, *Polish Journal of Chemistry*, Vol. 83, No. 6, 2009, p. 1127–1138.
57. P. M. Skitał, P. T. Sanecki, K. Kaczmarski, The mathematical model of the stripping voltammetry hydrogen evolution/dissolution process on Pd layer, *Electrochimica Acta*, Vol. 55, No. 20, 2010, p. 5604–5609.
58. P. M. Skitał, The Mathematical Modelling of the Palladium Deposition/Dissolution Process by Cyclic Voltammetry Method, *International Journal of Electrochemical Science*, Vol. 9, No. 5, 2014, p. 2589–2602.
59. S. W. Feldberg, Digital simulation: A general method for solving electrochemical diffusion-kinetic problems, in: A. J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 3, Marcel Dekker, New York, 1969, p. 199.
60. D. K. J. Gosser, *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*, VCH Publishers Inc., New York, 1993.
61. B. Speiser, Numerical simulation of electroanalytical experiments: recent advance in methodology, in: A. J. Bard, I. Rubinstein (Eds.), *Electroanalytical Chemistry, A Series of Advances*, Vol. 19, Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
62. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods, fundamentals and applications*, Wiley, New York, 2001.
63. L. K. Bieniasz, D. Britz, Recent developments in digital simulation of electroanalytical experiments, *Polish Journal of Chemistry*, Vol. 78, No. 9, 2004, p. 1195–1219.
64. D. Britz, *Digital simulation in electrochemistry*, Springer, Berlin, 2005.
65. P. Sanecki, P. Skitał, Mathematical modeling of electrode processes - potential dependent transfer coefficient in electrochemical kinetics, in: U. K. Sur, (Ed.), *Recent Trend in Electrochemical Science and Technology*, Ch. 3, InTech, Croatia 2012, p. 53. <http://www.intechopen.com/articles/show/title/mathematical-modeling-of-electrode-processes-potential-dependent-transfer-coefficient-in-electrochem>.
66. *Help* do programu *Estym_PDE*.

MODELOWANIE KWANTOWO-MECHANICZNE CZĄSTECZKI 2-(ETOKSYKARBONYLOMETYLO)-1- FENYLO-6H-IMIDAZO[1,5-c]-CHINAZOLINO-3,5- DIONU

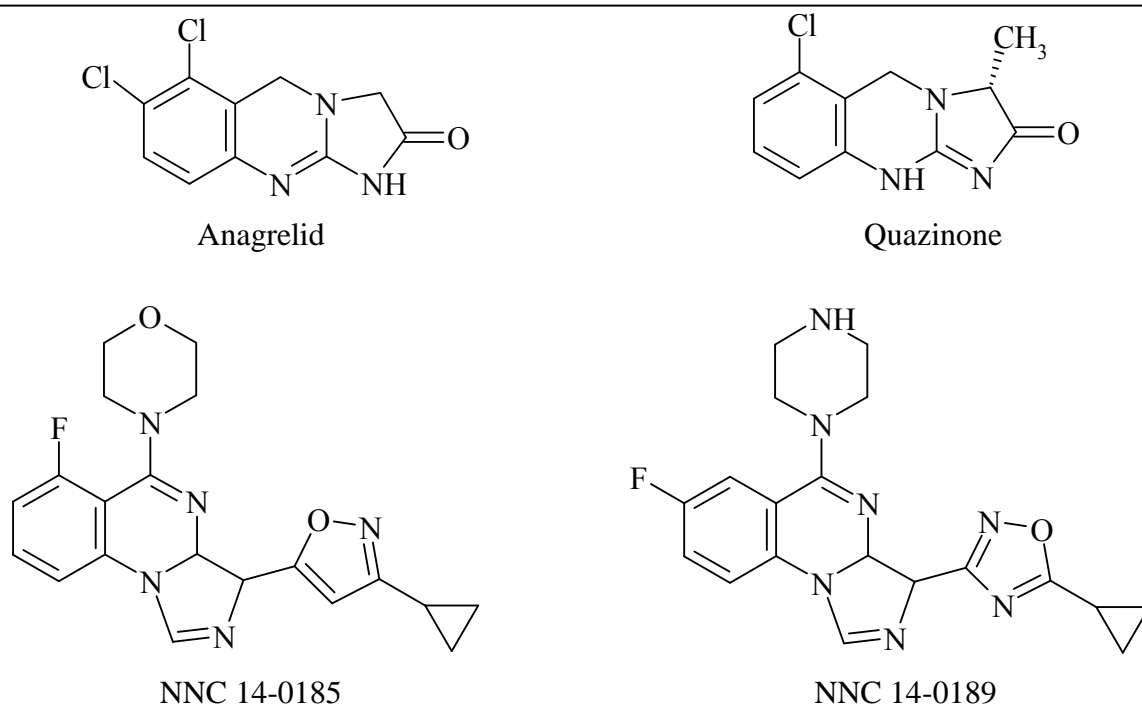
Agnieszka Szyszkowska^{1a}, Karol Hęclik¹, Iwona Zarzyka¹

¹Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska

^aszyszkowska.a@wp.pl

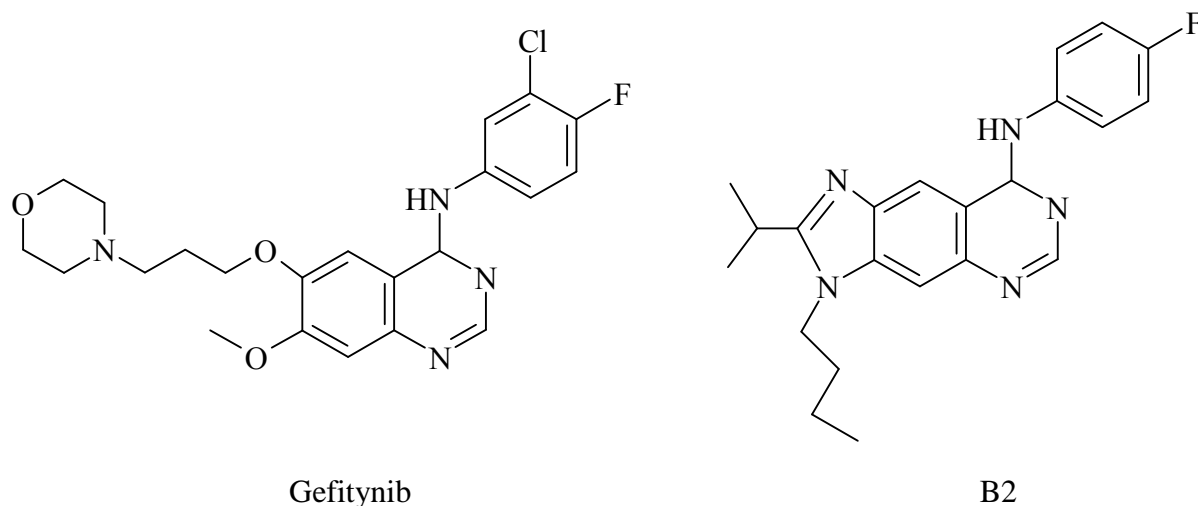
1. WSTĘP

Związki zawierające ugrupowanie imidazochinolinowe i imidazochinazolinowe wykazują interesujące właściwości. W literaturze zostało opisane ponad 100 pochodnych imidazo[4,5-c]chinolinonów, z których połowa wykazuje aktywność biologiczną. Ostatnio widoczne jest duże zainteresowanie dwupodstawionymi pochodnymi chinolino-2,4-dionu, ze względu na właściwości biologiczne. Przykładem jest 3,3-diazydochinolino-2,4-dion, który pełni rolę inhibitora agregacji płytek krwi. Z kolei 3-hydroksy-3-alkilochinolino-2,4-dion występuje w organizmach bakterii i ma właściwości antybiotyczne [1]. Również imidazochinazoliny znalazły szerokie zastosowanie w medycynie i farmacji w związku z ich aktywnością przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwwirusową czy przeciwdrgawkową. Obecnie, są dostępne na rynku leki zawierające związki z powyższym ugrupowaniem. Jednym z nich jest anagrelid - 6,7-dichloro-1H,5H-imidazo[2,1-b]chinazolin-2(3H)-on (rys. 1), wykorzystywany w leczeniu zakrzepicy, nadpłytkowości samoistnej oraz przewlekłej białaczki szpikowej. Inny przykład to quazinon - (3R)-6-chloro-3-metylo-5H,10H-imidazo[2,1-b]chinazolin-2(3H)-on (rys. 1), który jest powszechnym składnikiem leków nasercowych. Podobnie, właściwości biologicznie czynne wykazują imidazo[1,5-a]chinazoliny, tj. NNC 14-0185 i NNC 14-0189 (rys. 1), które mają działanie przeciwdrgawkowe, co wykazano w badaniach szczurów i myszy. Dlatego związki te będą mogły być wykorzystane do produkcji leków przeciwpadaczkowych [2].



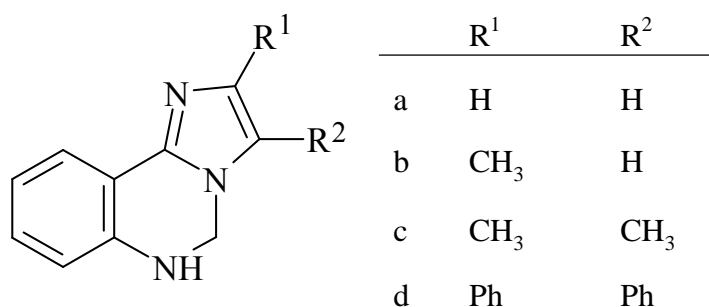
Rys. 1. Przykładowe pochodne imidazochinazolininy wykazujące działanie biologiczne

W ostatnich latach, związki zawierające w swojej budowie ugrupowanie chinazolinowe są wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej. Właściwości cytostatyczne w stosunku do linii komórek A549 NSCLC dla dwóch związków: 2-izopropyl-3-butylo-8-[(4-fluorofenyl)-amino]-3H-imidazo[4,5-g]chinazolininy oznaczanej symbolem B2 oraz N-(3-chloro-4-fluorofenyl)-7-metoksy-6-[(3-morfolin-4-yl)propoksy]chinazolino-4-aminy, o nazwie zwyczajowej gefitynib (rys. 2) zostały porównane przez Chen'a i współpracowników [3].



Rys. 2. Pochodne chinazolininy wykazujące działanie antynowotworowe

Ponadto, związki z ugrupowaniem imidazochinazolinowym mogą być stosowane jako substancje neutralizujące wolne rodniki, a w związku z tym jako substancje zapobiegające peroksydacji lipidów i uszkodzeniom komórek. Dobrymi inhibitorami peroksydacji lipidowej okazały się być pochodne imidazo[1,2-c]chinazolininy przedstawione na rysunku 3 [4].



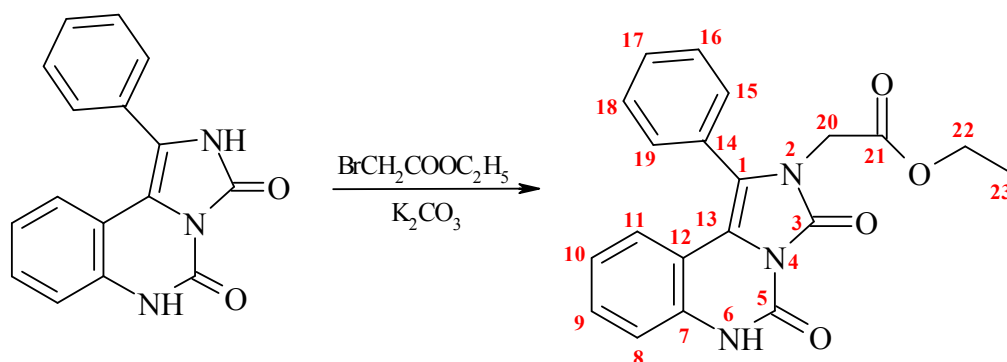
Rys. 3. Pochodne imidazochinolinonu będące inhibitorami peroksydacji lipidowej

Pochodne chinazolino-3,5-dionu, otrzymane podczas reakcji 3-aminochinazolinodionu z mocznikiem w wyniku przegrupowania wewnątrzcząsteczkowego [5, 6] mogą także wykazywać aktywność biologiczną. Niestety są one słabo rozpuszczalne i z tego powodu ich stosowanie jest utrudnione. W związku z tym, istnieje konieczność znalezienia lepiej rozpuszczalnych pochodnych tych związków. Jednym ze sposobów jest otrzymanie ich pochodnych estrowych.

W niniejszej pracy, zostało to zilustrowane na przykładzie reakcji 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-c]-chinazolino-3,5-dionu z bromooctanem etylu. Z wykorzystaniem obliczeń kwantowo-mechanicznych, w pracy wyjaśniono również dlaczego najpierw otrzymuje się monoestry podstawione przy atomie azotu nr 2.

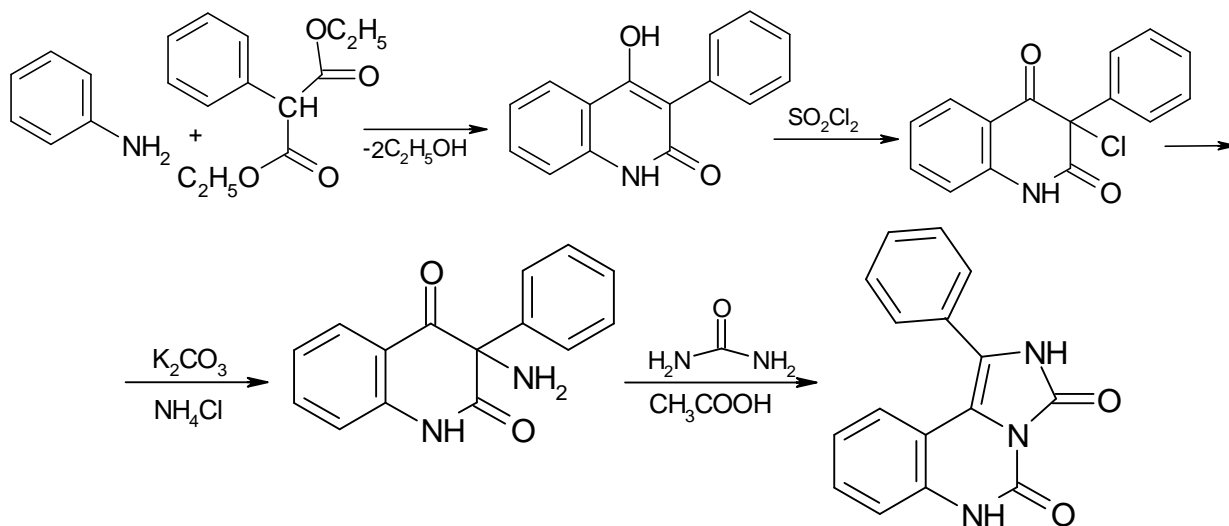
2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 SYNTEZA 2-(ETOKSYKARBONYLOMETYLO)-1-FENYLO-6H-IMIDAZO[1,5-C]CHINAZOLINO-3,5-DIONU



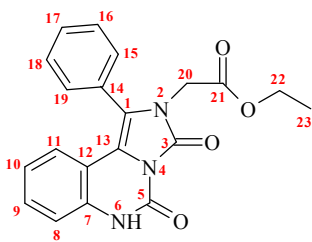
Rys. 4. Schemat syntezy 2-(etoksykarbonylometylo)-1-fenyl-6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu

W jednoszyjnej kolbie okrągłodennej o pojemności 100 cm³, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i chłodnicę zwrotną, umieszczano 40 cm³ DMF, 3,04 g (0,022 mola) węglanu potasu i 2,77 g (0,010 mola) 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu otrzymanego wg procedury opisanej w pracy [7], zgodnie ze schematem:



Rys. 5. Schemat syntezy 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu

Po 10 minutach dodawano $1,33 \text{ cm}^3$ (2,0 g, 0,012 mola) bromooctanu etylu. Mieszaninę reakcyjną zabezpieczano rurką suszącą z wodorotlenkiem potasu i mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny, a następnie przez godzinę w temperaturze $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Po ochłodzeniu, mieszaninę poreakcyjną przelano do rozdzielacza i dodawano 100 cm^3 chloroformu i 100 cm^3 wody. Po rozdzieleniu, warstwę wodną ekstrahowano 4-krotnie 100 cm^3 chloroformu. Ekstrakt chloroformowy przemyto 2-krotnie 200 cm^3 wody, suszono siarczanem(VI) sodu, a chloroform odparowano. Resztki DMF odparowano przy udziale toluenu, a suchą pozostałość krystalizowano z benzenu (ok. 400 cm^3), sączono na gorąco i roztwór zatężano do objętości 200 cm^3 . Po wysuszeniu uzyskano ok. 3 g produktu z wydajnością ok. 70 % mas. o temperaturze topnienia $182\text{-}184 \text{ }^\circ\text{C}$, którego czystość sprawdzano za pomocą TLC w układzie eluentów chloroform/etanol = 9 : 1, $R_f = 0,70$.



Wydajność 70%. Jasnożółte kryształy, temp. top. 174°C (benzen), IR: 3570-3320, 3066 2982, 2941, 2907, 1762, 1683, 1639, 1613, 1587, 1481, 1443, 1388, 1372, 1289, 1266, 1246, 1201, 1142, 1106, 1028, 929, 798, 752, 700, 601, 533 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$), $\delta = 1,10$ (3H, t, CH_3 , $J_{22,23} = 6,26 \text{ Hz}$), 4,05 (2 H, q, CH_2 , $J_{22,23} = 6,26 \text{ Hz}$), 4,22 (2 H, s, CH_2), 6,72 (1 H, d, $J_{10,11} = 8,05 \text{ Hz}$), 6,78 (1 H, t, $J_{10,9} = 7,56 \text{ Hz}$), 7,02 (1 H, d, $J_{9,8} = 8,05 \text{ Hz}$), 7,14 (1 H, t, $J_{11,10} = 7,56 \text{ Hz}$), 7,46 (2 H, m), 7,62 (3 H, m), 10,80 (1 H, s).

2.2 STOSOWANE METODY BADAWCZE

Widma $^1\text{H-NMR}$ otrzymanego związku wykonano przy użyciu spektrometru NMR o częstotliwości roboczej 500 MHz firmy Bruker. Jako rozpuszczalnik stosowano $\text{d}_6\text{-DMSO}$, a jako wzorzec wewnętrzny heksametylodisiloksan (HMDS).

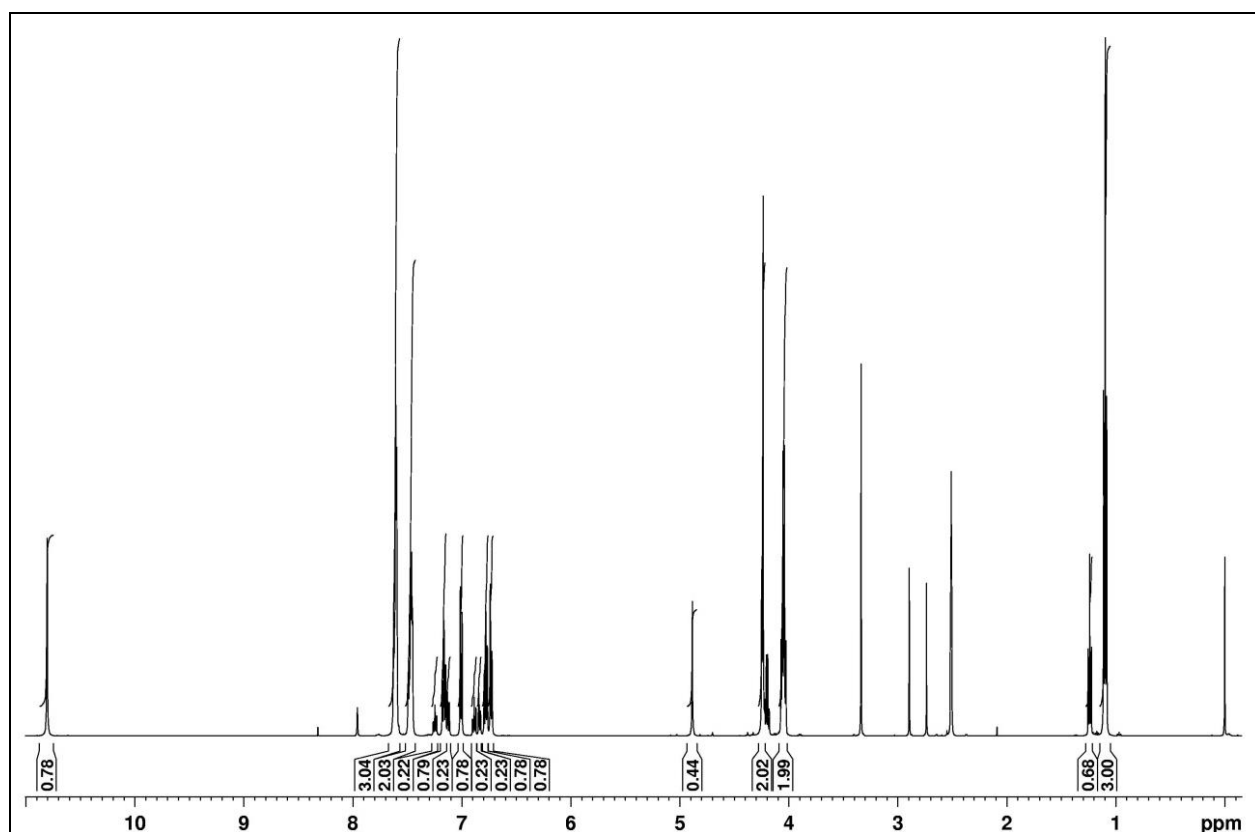
Widma IR produktów wykonano w postaci pastylki KBr przy użyciu aparatu ALPHA FT-IR firmy BRUKER.

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonano stosując metodę funkcjonału gęstości (DFT) przy wykorzystaniu programu Gaussian 09 [8] udostępnionego w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego w ramach grantu G49-12. Do obliczeń został użyty potencjał korelacyjno-wymienny B3LYP [9, 10] oraz baza funkcyjna 6-31G(d,p) [11]. Zestawienie potencjału hybrydowego B3LYP z tą bazą jest często stosowane jako najbardziej odpowiednie narzędzie do optymalizacji struktur związków organicznych [12].

3. DYSKUSJA WYNIKÓW

W reakcji równomolowych ilości 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-*c*]chinazolino-3,5-dionu i bromooctanu etylu uzyskano jako główny produkt 2-(etoksykarbonylometylo)-1-fenyl-6H-imidazo[1,5-*c*]chinazolino-3,5-dion (rys. 4), którego strukturę potwierdzono metodami instrumentalnymi.

W widmie $^1\text{H-NMR}$ monoestru (rys. 6) obserwuje się sygnał protonu przy atomie azotu nr 6 przy 10,80 ppm.



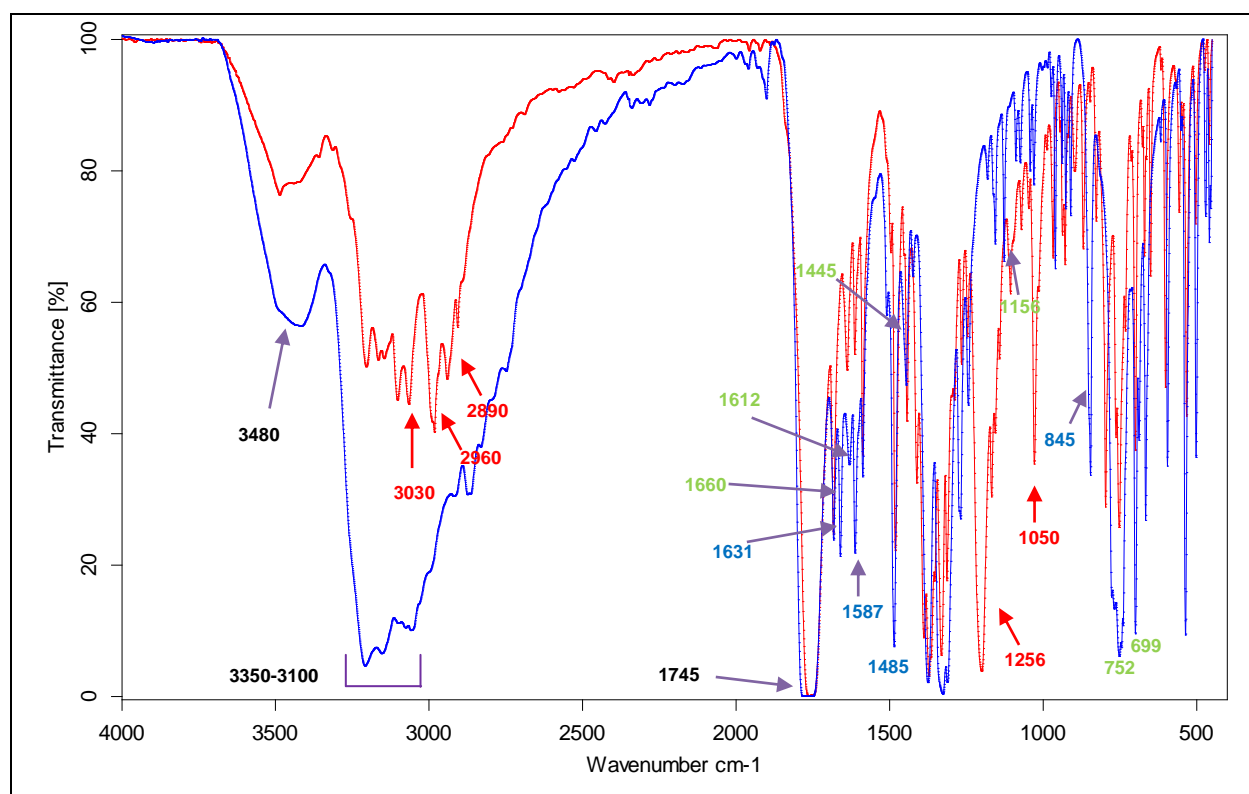
Rys. 6. Widmo $^1\text{H-NMR}$ 2-(etoksykarbonylometylo)-1-fenyl-6H-imidazo[1,5-*c*]chinazolino-3,5-dionu

Ponadto obecny jest tryplet przy 1,10 ppm od protonów grupy metylowej i kwartet od grupy metylenowej przy 4,05 ppm w ugrupowaniu estrowym, przy atomie azotu nr 2. Protony grupy metylenowej przy grupie karbonylowej pojawiają się w formie singletu przy 4,22 ppm. Sygnały protonów przy pierścieniu chinazolinowym przy atomach węgla nr 8, 9, 10 i 11 ulegają wyraźnemu rozsunięciu w porównaniu do widma $^1\text{H-NMR}$ 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-

c]chinazolino-3,5-dionu i pojawiają się odpowiednio przy 7,02, 6,78, 7,14 i 6,72 ppm. Podobnie protony pierścienia fenyłowego dają dwa odrębne sygnały przy 7,46 i 7,62 ppm odpowiednio protony przy C15 i C19 oraz C16, C17 i C18.

Strukturę monoestru potwierdza również jego widmo IR (rys. 7). W widmie IR 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu obserwuje się szerokie pasma przy 3480 cm^{-1} i w zakresie $3100 - 3350\text{ cm}^{-1}$ od drgań walencyjnych wiązań N-H grup amidowych z atomem N2 i N6. Pasma pochodzące od drgań walencyjnych grup karbonylowych występuje przy 174 cm^{-1} . Pasma szkieletowe pierścienia aromatycznego grupy fenyłowej są obserwowane przy $1660, 1612, 1509, 1445\text{ cm}^{-1}$. Natomiast pasma płaskich drgań deformacyjne wiązań C-H występują przy 1156 cm^{-1} , a pasma drgań deformacyjnych niepłaskich przy 752 i 699 cm^{-1} . Natomiast pasma walencyjne, szkieletowe pierścienia chinazolinowego są obserwowane przy $1631, 1587, 1485\text{ cm}^{-1}$, a pasmo deformacyjne przy 845 cm^{-1} .

W widmie IR uzyskanego monoestru (rys. 7) obserwuje się wyraźne zmiany w zakresie $2000 - 3500\text{ cm}^{-1}$; odsłonięte zostaje pasmo przy 3030 cm^{-1} od drgań walencyjnych wiązań C-H pierścienia aromatycznego. Ponadto pojawiają się pasma przy 2890 i 2960 cm^{-1} pochodzące od drgań walencyjnych symetrycznych i asymetrycznych wiązań C-H grup metylenowych i metylowych. Pojawia się również pasmo przy 1256 i 1050 cm^{-1} charakterystyczne dla drgań asymetrycznych i symetrycznych wiązań C-O estrów.



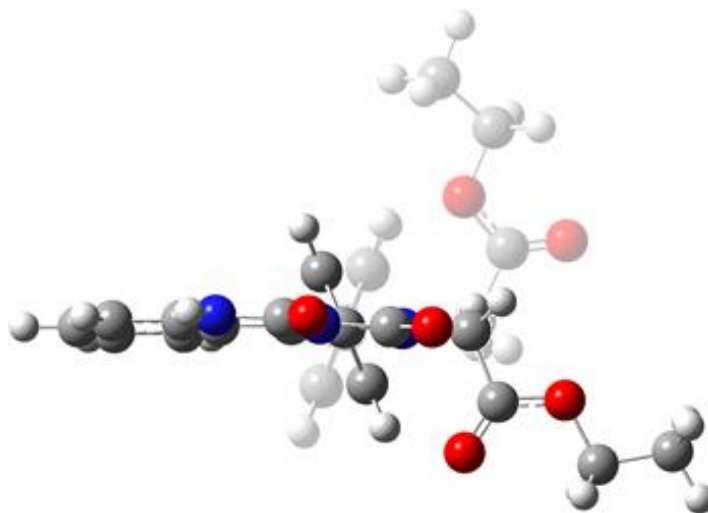
Rys. 7. Widmo IR 2-(etoksykarbonylometylo)-1-fenyl-6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu

W celu wyjaśnienia przyczyn preferowanego podstawienia przy atomie azotu nr 2 i przy jednoczesnym braku monoestru podstawionego przy atomie azotu nr 6 przeprowadzono obliczenia kwantowo-mechaniczne.

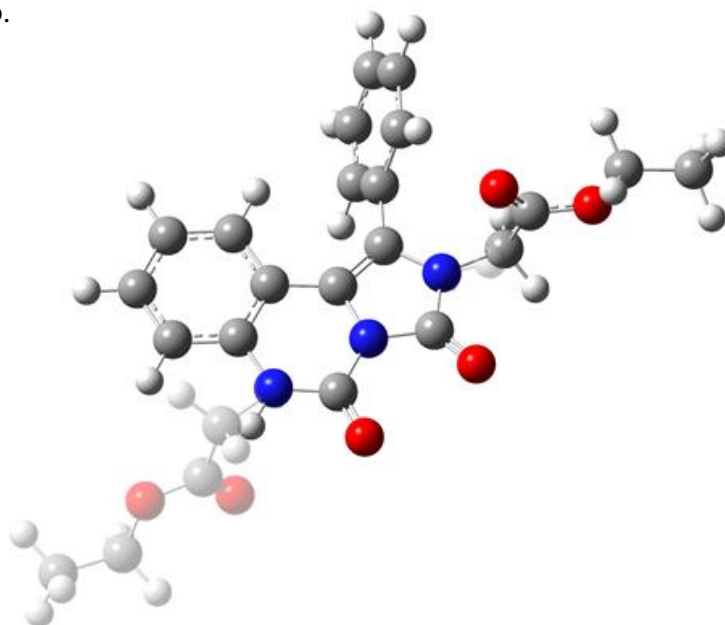
Na rysunku 8 pokazano struktury przestrzenne możliwych konformerów monoestrów 1-fenyl-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu podstawionych przy atomie azotu nr 2

oraz 6. Pierścień imidazochinazoliny jest płaski, natomiast pierścień fenyłowy ustawiony jest pod pewnym kątem w stosunku do płaszczyzny pierścienia imidazochinazolinowego. Podstawnik estrowy (etoksykarbonylometylenowy) przy danym podstawieniu może znajdować się poniżej lub powyżej płaszczyzny pierścienia imidazochinazolinowego, przy czym w każdej z tych pozycji może być ustawiony prostopadłe lub równoległe do tego pierścienia. Wskutek tego każdy monoester może teoretycznie występować w formie ośmiu konformerów.

a.

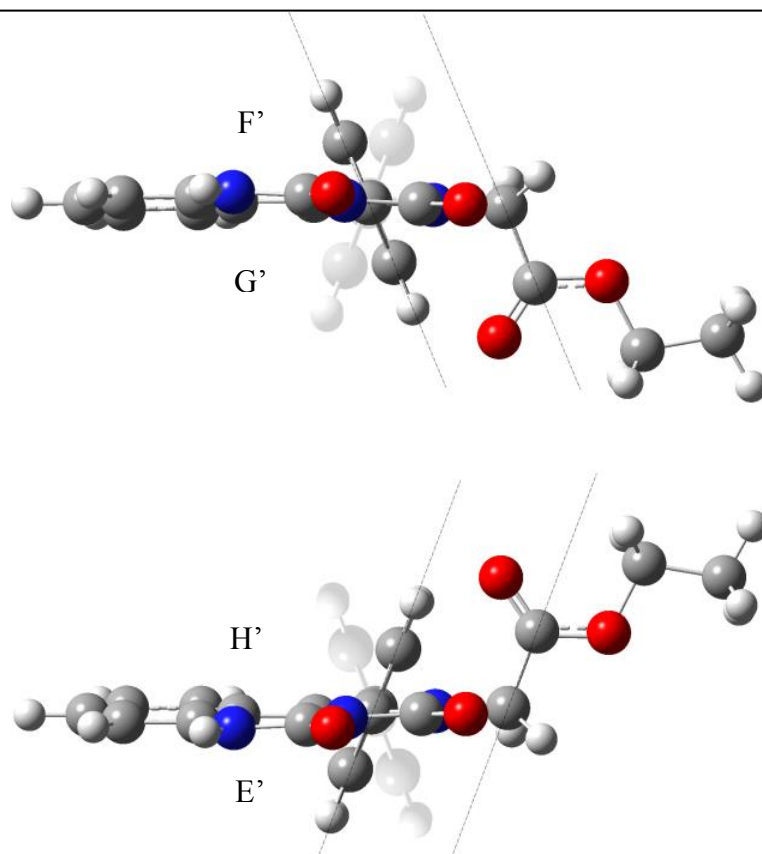


b.



Rys. 8. Możliwe konformacje monoestrów 1-fenylo-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu, podstawionych przy atomie azotu: a. 2, b. 6

Obliczenia kwantowo-mechaniczne uwzględniające energię konformeru jako kryterium optymalizacyjne pokazały, iż stabilnych konformerów podstawionych przy atomie azotu nr 6 jest osiem (czego należało się spodziewać), natomiast podstawionych przy atomie azotu nr 2 jest ich tylko sześć. Na rysunku 9 pokazano cztery zaproponowane konformery monoestru podstawionego przy atomie azotu nr 2 (G', F', H', E').

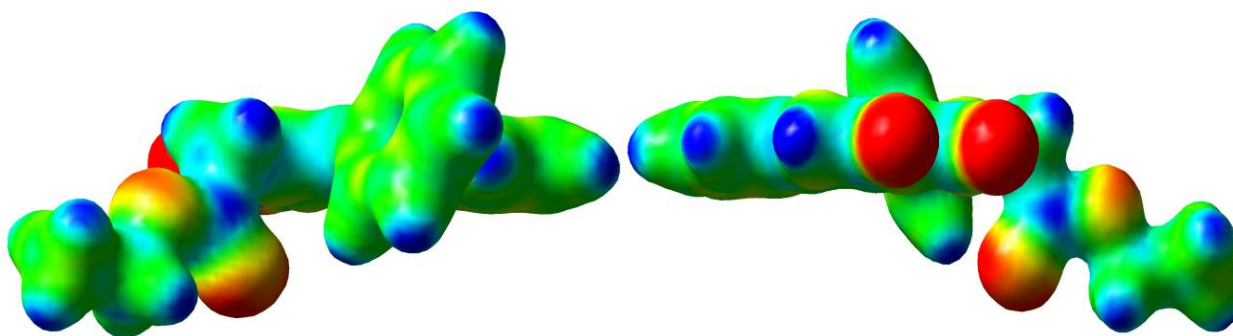


Rys. 9. Proponowane konformery monoestru podstawionego przy atomie azotu nr 2 (G', F', H', E')

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykazały, że stabilne spośród tych czterech są tylko konformery E' i F', które na rysunku zostały przedstawione pełnymi kolorami. W wyniku przeprowadzonej optymalizacji struktury okazało się, że następuje przekształcenie konformerów G' i H' odpowiednio w konformery F' i E', co jest jednoznaczne z zerowym udziałem tych ostatnich w omawianej populacji konformerów. Tłumaczy to zmniejszenie liczby konformerów z ośmiu do sześciu.

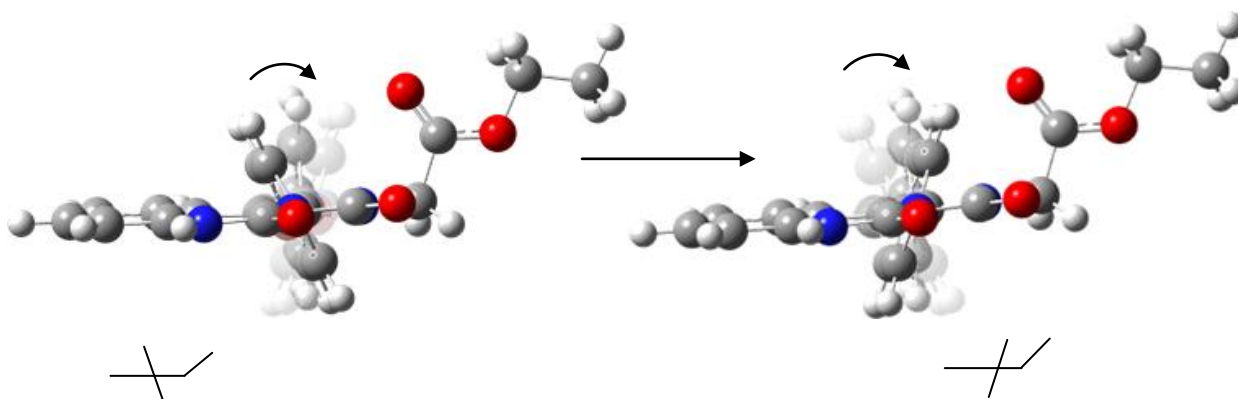
Natomiast w wypadku podstawienia przy atomie azotu nr 6, osiem zaproponowanych konformerów wykazuje stabilność. Dlatego w dalszych rozważaniach uwzględniano sumarycznie 14 konformerów.

Zarówno w konformacji E' jak i F', płaszczyzna pierścienia fenyłowego jest równoległa do płaszczyzny wiązania C-C (grupa metylenowa – węgiel karbonyłowy). Wówczas odległość pomiędzy grupą karbonyłową a pierścieniem fenyłowym jest najmniejsza (odległość między atomem tlenu grupy karbonyłowej a najbliższym jej atomem wodoru pierścienia fenyłowego wynosi 2,46 Å). Powoduje to oddziaływanie elektrostatyczne między tymi grupami - duża gęstość elektronowa na atomie tlenu grupy karbonyłowej i mała gęstość elektronowa na skraju pierścienia fenyłowego i sprawia, że konformer staje się bardziej stabilny (Rys. 10). Natomiast w konformacjach G' oraz H' odległości te są większe (~4 Å), ale z racji oddziaływań elektrostatycznych pierścien jest „ściągany” w kierunku grupy karbonyłowej przez istniejący tam ładunek na atomie tlenu.



Rys. 10. Rozkład gęstości elektronowej konformeru F'

Omawiane oddziaływanie elektrostatyczne jest odpowiedzialne za przechodzenie konformeru H' w E' oraz G' w F' wskutek zmiany kąta nachylenia płaszczyzny pierścienia fenylowego (rys. 11).



Rys. 11. Przechodzenie konformeru H' w E'

Ponadto zauważyć, że poszczególne konformery monoestrów podstawionych w pozycji nr 2 i 6, stanowią pary enancjomerów ze względu na niesymetryczną strukturę wyjściowego związku np. A i B, A' i B'.

Na podstawie energii swobodnej Gibbsa wszystkich czternastu konformarów określono ich ilościowy udział procentowy, co przedstawiono w tabeli 1.

W ten sposób wykazano, iż w 99,84 % tworzenie monoestru następuje w pozycji nr 2, co potwierdza wyniki eksperymentalne. Wśród sześciu konformarów 1-fenylo-2-(etoksykarbonylo-metylo)-6H-imidazo[1,5c]chinazolino-3,5-dionu największy udział (69,22%) ma para enancjomerów E' i F', pokazana na rysunku 9. Resztę stanowią enancjomery, w których podstawnik etoksykarbonylometylenowy jest ustawiony prostopadle do pierścienia imidazochinazolinowego. Równoległe ustawienie podstawnika jest odpowiedzialne za rozładowanie przestrzenne (podobnie jak w wypadku konformacji łódkowej i krzesłowej cykloheksanu) i mniejszą energię konformarów, a co za tym idzie większy udział konformarów w całej populacji.

Tabela 1. Udziały procentowe N-podstawionych monoestrów 1-fenylo-2H,6H-imidazo[1,5-c]-chinazolino-3,5-dionu

Nazwa związku	Konformer	Rysunek ideowy konformera	Udział konformerów [% mol]	Udział pochodnych [% mol]
1-fenylo-6-(etoksykarbonylometylo)-2H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dion	A		0,02	0,16
	B		0,02	
	C		0,01	
	D		0,01	
	E		0,03	
	F		0,03	
	G		0,02	
	H		0,02	
1-fenylo-2-(etoksykarbonylometylo)-6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dion	A'		8,03	99,84
	B'		6,49	
	C'		8,04	
	D'		8,05	
	E'		35,25	
	F'		33,97	
	G'		0,00	
	H'		0,00	

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Zastosowanie metod modelowania kwantowo-mechanicznego pozwoliło wyjaśnić przyczynę chemoselektywności reakcji 1-fenylo-2H,6H-imidazo[1,5-c]chinazolino-3,5-dionu z bromooctanem etylu. O selektywności reakcji decyduje energia (entalpia) swobodna Gibbsa izomerów szkieletowych obliczona z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości (DFT).

5. PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają podziękowania dla Interdyscyplinarnego Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego w Warszawie za możliwość wykonania obliczeń kwantowo-mechanicznych w ramach grantu G49-12.

Literatura

1. W. Stadlbauer, R. Laschober, H. Lutschounig, G. Schindler, T. Kappe, Halogenation reactions in position 3 of quinoline-2,4-dione systems by electrophilic substitution and halogen exchange, Monatshefte für Chemie, Vol. 123, No. 6, 1992, p. 617–636.

2. G. Li, R. Kakarla, S. W. Gerritz, A. Pendri, B. Mac, A facile one-step synthesis of 5-chloroimidazo[1,5-a]quinazoline by microwave irradiation, *Tetrahedron Letters*, Vol. 50, No. 44, 2009, p. 6048–6052.
3. Z. Chena, X. Huangb, H. Yanga, W. Dingd, L. Gaoa, Z. Yea, Y. Zhangd, Y. Yud, Y. Loua, Anti-tumor effects of B-2, a novel 2,3-disubstituted 8-arylamino-3H-imidazo[4,5-g]quinazoline derivative, on the human lung adenocarcinoma A549 cell line in vitro and in vivo, *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 189, No. 1-2, 2011, p. 90–99.
4. G. Domány, T. Gizur, A. Gere, K. Takács-Novák, G. Farsang, G. G. Ferenczy, G. Tárkányi, M. Demeter, Imidazo[1,2-c]quinazolines with lipid peroxidation inhibitory effect, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 33, No. 3, 1998, p. 181–187.
5. V. Mrkvicka, A. Lycka, O. Rudolf, A. Klásek, Reaction of 3-aminoquinoline-2,4-diones with isothiocyanic acid - an easy pathway to thioxo derivatives of imidazo[1,5-c]quinazolin-5-ones and imidazo[4,5-c]quinolin-4-ones, *Tetrahedron*, Vol. 66, No. 43, 2010, p. 8441–8445.
6. V. Mrkvicka, O. Rudolf, A. Lycka, A. Klasek, Reaction of 3-aminoquinoline-2,4-diones with isothiocyanic acid-an easy pathway to thioxo derivatives of imidazo[1,5-c]quinazolin-5-ones and imidazo[4,5-c]quinolin-4-ones, *Tetrahedron*, Vol. 67, No. 13, 2011, p. 2407–2413.
7. A. Klasek, K. Koristek, A. Lycka, M. Holcapek, Unprecedented reactivity of 3-amino-1H,3H-quinoline-2,4-diones with urea: an efficient synthesis of 2,6-dihydro-imidazo[1,5-c]quinazoline-3,5-diones, *Tetrahedron*, Vol. 59, No. 8, 2002, p. 1283–1288.
8. Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
9. A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing, *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 104, 1996, p. 1040–1046.
10. C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical Review B*, Vol. 37, 1988, p. 785–789.
11. R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, J. A. Pople, Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wavefunctions, *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 72, 1980, p. 650–654.
12. L. Piela, *Idee chemii kwantowej*, PWN, Warszawa, 2003.

IMPEDANCJA JAKO PARAMETR RÓŻNICUJĄCY GATUNKI DREWNA

Tobiasz Wysoczański^{1a}, Deta Łuczycka^{1b}, Katarzyna Pentos^{1c}

¹Institut Inżynierii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

^atobiasz.wysoczanski@up.wroc.pl

^bdeta.luczycka@up.wroc.pl

^ckatarzyna.pentos@up.wroc.pl

1. WSTĘP

Drewno jest materiałem szeroko wykorzystywanym w wielu dziedzinach takich jak budownictwo, przemysł meblarski a także jako biomasa w procesie spalania. Jest to lekki, łatwy w obróbce materiał charakteryzujący się niską przewodnością temperaturową oraz nieodporny na procesy próchnicze i deformacje. Można zaobserwować zasadnicze różnice w mikrostrukturze między drewnem liściastym i iglastym, co skutkuje między innymi większą porowatością drewna iglastego [1].

Do elektrycznych właściwości drewna zaliczane są: opór właściwy i związane z nim przewodnictwo właściwe, wytrzymałość na przebicie oraz dielektryczne właściwości drewna [2]. Drewno suche (0% wilgotności) posiada opór właściwy w granicach od 10^{13} do $10^{14} \frac{\Omega}{cm}$. W przedziale 0-30% wilgotności opór ten zmniejsza się odwrotnie proporcjonalnie do wartości wilgotności. Przy wilgotności około 30% opór właściwy osiąga wartość między 10^5 a $10^6 \frac{\Omega}{cm}$ [2]. Zasadniczy wpływ na przewodnictwo elektryczne drewna ma jego wilgotność oraz kierunek anatomiczny: przewodnictwo elektryczne wzdłuż włókien jest około 2 razy większe niż w poprzek włókien [2]. Wpływ różnych czynników, takich jak gatunek drewna, temperatura, gęstość, właściwości chemiczne, częstotliwość pola elektromagnetycznego lub impregnacja, na parametry elektryczne i dielektryczne drewna jest przedmiotem wielu badań [3-10]. Kol (2009) przeprowadził badania termicznych i dielektrycznych właściwości drewna sosnowego o różnej wilgotności w zakresie 0-22%, metodą mikrofalową w kierunku stycznym i promieniowym do ułożenia słoików [11]. Z badań tych wynika, że wilgotność drewna wpływa na jego właściwości, natomiast wpływ kierunku anatomicznego jest niewielki. Przedmiotem badań była również zależność między oporem właściwym a wilgotnością w przypadku różnych gatunków drewna oraz w przypadku drewna tego samego gatunku ale o różnym pochodzeniu geograficznym [12, 13]. Tomografia elektrooporowa (ERT) została wykorzystana do ustalenia granicy między twardzielą i bielą sosny (*Pinus*) [14], mapowania zmian wilgotności pnia w zależności od czasu w przypadku drzew topoli (*Populus*) [15] oraz do wykrywania uszkodzeń spowodowanych przez grzyby [16, 17]. Spektroskopia terahercowa (TDS) została wykorzystana między innymi do określania wilgotności i gęstości drewna [18], wykrywania uszkodzeń [19] oraz określania związku pomiędzy anizotropową przenikalnością względną a gęstością drewna bez naruszania

jego struktury [20]. W doniesieniach literaturowych można znaleźć informacje o zastosowaniu cech dielektrycznych drewna do wykrywania sęków i uszkodzeń [9] oraz określania różnic w porowatości [1]. Impedancja została wykorzystana do rozróżniania próbek drewna sosny zwyczajnej (*Scots pine*) odpornych i nieodpornych na brunatną zgniliznę [10]. Grupowanie jest jedną z podstawowych metod analizy danych. Jego celem jest dokonanie podziału danych na grupy w taki sposób aby elementy należące do tej samej grupy były do siebie jak najbardziej podobne a jednocześnie wyraźnie różniły się od elementów zakwalifikowanych do innych grup. Analiza skupień (Cluster analysis) stanowi grupę metod i algorytmów, które mogą być wykorzystywane do ustalenia struktury danych bez wyjaśnienia ich rzeczywistej natury. Jest ona stosowana w wielu dziedzinach takich jak biologia, medycyna, technologia żywności i inżynieria rolnicza [21-24]. Poza klasycznymi algorytmami analizy skupień stosuje się także mniej popularne metody, do których należą np. sztuczne sieci neuronowe.

Celem badań było ustalenie czy impedancja może zostać wykorzystana jako parametr różnicujący drewno w kontekście jego gatunku, a jeśli tak to w jakim zakresie częstotliwości należy wykonywać pomiary.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1 PRÓBKII DREWNA

W badaniach wykorzystano próbki siedmiu gatunków drewna. Wśród nich znalazły się gatunki drewna iglastego i liściastego. Szczegółowe informacje dotyczące badanych próbek obejmujące gatunek oraz zakres wilgotności próbek danego gatunku przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Opis próbek wykorzystanych w badaniach

Gatunek drewna	Nazwa botaniczna	Zakres wilgotności [%]
Czereśnia	<i>Prunus avium L.</i>	10.0 – 15.5
Brzoza	<i>Betula pendula Roth</i>	12.5 – 15.5
Dąb	<i>Quercus robur L.</i>	13.5 – 18.0
Jesion	<i>Fraxinus excelsior L.</i>	14.0 – 16.0
Modrzew	<i>Larix decidua Mill.</i>	10.5 – 15.5
Sosna	<i>Pinus sylvestris L.</i>	9.5 – 15.0
Świerk	<i>Picea abies L.</i>	8.5 – 12.0

Dla każdego gatunku drewna przygotowano cztery próbki pochodzące z różnych części pnia i oznaczono je numerując od 0 do 3 np. sosna, sosna1, sosna2, sosna3. Następnie z każdej takiej próbki wycięto po cztery prostopadłościanny o wymiarach (60 x 60 x 15 mm, szerokość x długość x wysokość). Prostopadłościanny te zostały wycięte w taki sposób aby dwa z nich pochodziły z bieli i dwa z twardzieli. Dodatkowo, jeden z prostopadłościannów pochodzących z konkretnej części pnia wycięto tak aby powierzchnie przylegające do elektrod były prostopadłe do kierunku słoików a drugi wycięto tak aby powierzchnie przylegające do elektrod były równoległe do kierunku słoików. W ten sposób, z każdej próbki numerowanej od 0 do 3 uzyskano 4 próbki docelowe:

- próbka pochodząca z twardzieli z powierzchnią przylegającą do elektrod równoległą do kierunku słoików,

- próbka pochodząca z twardzieli z powierzchnią przylegającą do elektrod prostopadłą do kierunku słoików,
- próbka pochodząca z bieli z powierzchnią przylegającą do elektrod równoległą do kierunku słoików,
- próbka pochodząca z bieli z powierzchnią przylegającą do elektrod prostopadłą do kierunku słoików.

Powierzchnie próbek przylegające do powierzchni elektrod zostały wyszlifowane papierem ściernym aby zapewnić możliwie najlepsze przyleganie próbki do elektrody. Dla wszystkich próbek zmierzono wilgotność za pomocą przyrządu Brookhuis Micro-Electronics FME. Następnie dla każdej z próbek zmierzono impedancję w zakresie częstotliwości pola elektromagnetycznego od 10 Hz do 1 MHz za pomocą analizatora impedancji ATLAS 0441 HIA wraz z płaskim układem elektrod wykonanych z miedzi. Sposób ułożenia próbki w przestrzeni międzyelektrodowej został przedstawiony na rysunku 1.



Rys. 1. Badana próbka w przestrzeni międzyelektrodowej

Impedancja jest parametrem charakteryzującym element elektryczny w obwodzie prądu zmiennego. Jest ona wypadkową oporu czynnego (rezystancji) i biernego (reaktancji). Impedancja może być przedstawiona w postaci algebraicznej:

$$Z = R + iX \quad (1)$$

gdzie:

$R = \text{Re}(Z)$ – rezystancja, Ω ,

$X = \text{Im}(Z)$ – reaktancja, Ω .

Moduł impedancji (zawada) wyrażony jest wzorem:

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad (2)$$

W wyniku pomiarów, dla każdej próbki oznaczonej numerami od 0 do 3, uzyskano zestaw danych składający się z ośmiu elementów: rezystancji i reaktancji dla części próbki pochodzącej z twardzieli i bieli mierzonej równoległe i prostopadłe do kierunku słoików. Dodatkowo, na podstawie wartości rezystancji i reaktancji, w każdym przypadku obliczono moduł impedancji zgodnie z zależnością przedstawioną w równaniu 2.

2.2 ANALIZA SKUPIEŃ

W badaniach wykorzystane zostały dwie metody analizy skupień zaimplementowane w środowisku *Statistica 10*.

Drzewo hierarchiczne

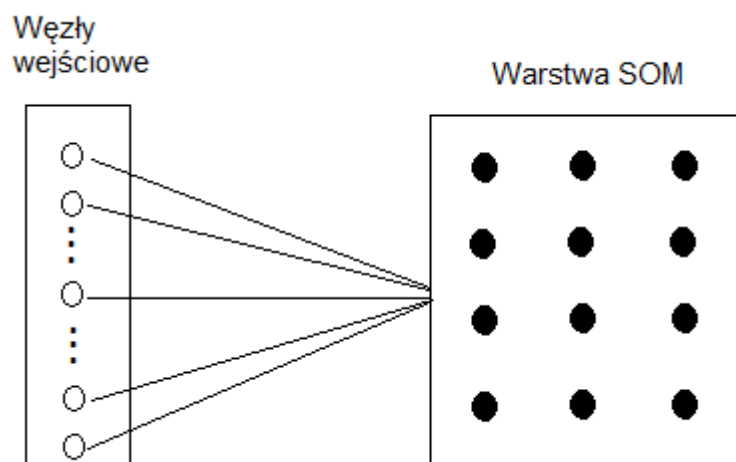
W przypadku tej metody grupowania, w pierwszym kroku każdy element zbioru traktowany jest jako oddzielna klasa. W kolejnych krokach algorytmu łączymy elementy zbioru danych w coraz większe grupy poprzez stopniowe osłabianie kryterium, które decyduje o tym na ile poszczególne elementy zbioru różnią się między sobą. Dzięki temu elementy przypisane do tej samej grupy coraz bardziej różnią się między sobą. Ostatecznie, wszystkie elementy analizowanego zbioru zostają połączone w jedną grupę. Wyniki kolejnych kroków działania algorytmu prezentowane są w postaci wykresu (drzewa). W przypadku poziomego wykresu drzewa hierarchicznego na osi poziomej przedstawiona jest odległość aglomeracyjna co pozwala na ocenę tej odległości dla każdego węzła wykresu gdzie uformowało się nowe skupienie. Stosowanie tej metody analizy danych wymaga podania dwóch parametrów: miary odległości oraz metody łączenia lub wiązania. Najbardziej intuicyjną miarą odległości jest odległość euklidesowa czyli odległość geometryczna w przestrzeni wielowymiarowej obliczana ze wzoru:

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_i (x_i - y_i)^2} \quad (3)$$

Inne miary odległości dostępne w środowisku *Statistica 10* to kwadrat odległości euklidesowej, odległość miejska (Manhattan, City block), odległość Czebyszewa, odległość potęgowa i niezgodność procentowa. W przypadku dużych różnic w wartościach parametrów opisujących element zbioru danych zaleca się dokonanie standaryzacji danych. Najbardziej popularne metody łączenia lub wiązania dostępne w środowisku *Statistica 10* to metoda pojedynczego wiązania (najbliższego sąsiedztwa) gdzie odległość między dwoma skupieniami jest określona przez odległość między dwoma najbliższymi obiektami należącymi do różnych skupień, metoda pełnego wiązania (najdalszego sąsiedztwa) gdzie odległość między skupieniami jest obliczana jako największa odległość między dwoma dowolnymi obiektami należącymi do różnych skupień i metoda średnich połączeń gdzie odległość między dwoma skupieniami oblicza się jako średnią odległość między wszystkimi parami obiektów należących do dwóch różnych skupień (www.statsoft.pl).

Sztuczne sieci neuronowe Kohonena

Sieci neuronowe Kohonena czyli samoorganizujące się mapy cech są specyficznym rodzajem sieci neuronowych, chętnie wykorzystywanym w zadaniach grupowania. Typowa sieć Kohonena składa się z dwóch warstw w sposób pokazany na rysunku 2.



Rys. 2. Typowa struktura sieci neuronowej Kohonena

Węzły wejściowe służą tylko do przekazania informacji wejściowej do warstwy SOM (*Self Organizing Map*). Każdy neuron w tej warstwie jest połączony z każdym z węzłów wejściowych, natomiast neurony znajdujące się w warstwie SOM nie są ze sobą połączone. Sieci tego typu uczone są metodą bez nauczyciela co oznacza, że w czasie uczenia na wejściach sieci pojawiają się wyłącznie przypadki obejmujące tylko zmienne wejściowe, bez informacji o oczekiwanej wartości wyjść sieci. W ten sposób sieć neuronowa próbuje nauczyć się struktury danych. W pierwszym kroku algorytmu uczenia, wagi każdego neuronu w warstwie SOM przyjmują losowe wartości. Następnie obliczana jest odległość między danymi z wektora wejściowego a wagami zgodnie z zależnością:

$$d(x, w_i) = \|x - w_i\| = \sqrt{\sum_{j=1}^N (x_j - w_{ij})^2} \quad (4)$$

gdzie:

x - wektor wejściowy,

w_i - wektor wag i -tego neuronu w warstwie SOM,

N - liczba wag pojedynczego neuronu.

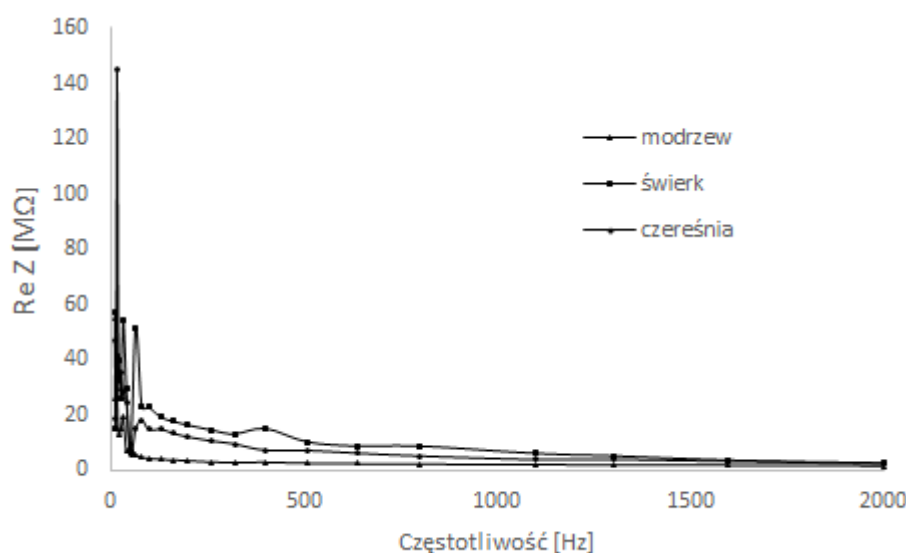
W dalszych iteracjach algorytm stopniowo modyfikuje wagi w taki sposób, aby odzwierciedlić skupienia występujące w danych uczących. Jest to realizowane w taki sposób, że wszystkie neurony sieci wyznaczają swoje sygnały wyjściowe, stanowiące odpowiedź na podane wejścia. Na tej podstawie wybierany jest neuron zwycięski, dla którego odległość obliczona zgodnie z zależnością 3 jest najmniejsza. Wagi tego neuronu modyfikowane są w sposób powodujący zmniejszenie tej odległości. Równocześnie w podobny sposób modyfikowane są wagi sąsiadów zwycięskiego neuronu (sąsiedzi są wyznaczeni w oparciu o przyjęty wzór topologii sieci). Ostatecznie, neurony reprezentujące centra położone blisko siebie w przestrzeni wejść są również usytuowane blisko siebie w warstwie SOM. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące sieci Kohonena przedstawione zostały w wielu pozycjach literaturowych [25-27].

W badaniach, których wyniki zostały przedstawione w niniejszej pracy, dane pomiarowe wykorzystane do przeprowadzenia analizy skupień metodami opisanymi powyżej zostały znormalizowane do zakresu $\langle 0.1 - 1 \rangle$. W metodzie drzewa hierarchicznego, jako metoda

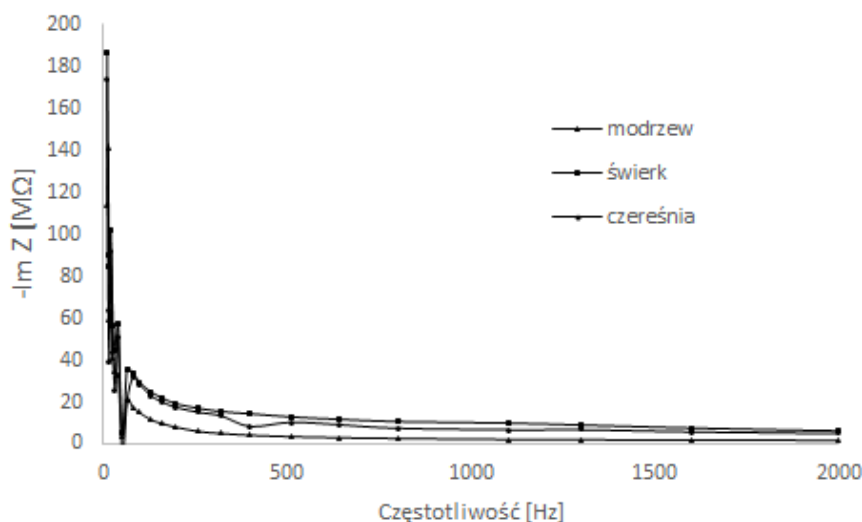
łączenia lub wiązania została wykorzystana metoda najbliższego sąsiedztwa a jako miara odległości – odległość euklidesowa. W czasie uczenia sieci Kohonena liczba epok uczenia wynosiła 2000, współczynniki uczenia zmienił się od 0.1 do 0.02, promień sąsiedztwa wynosił 1 a wartości początkowe wag w sieci zostały dobrane losowo zgodnie z rozkładem Gausa. Zbiór danych został podzielony na zestaw uczący (80% danych) i testujący (20% danych).

3. WYNIKI I DYSKUSJA

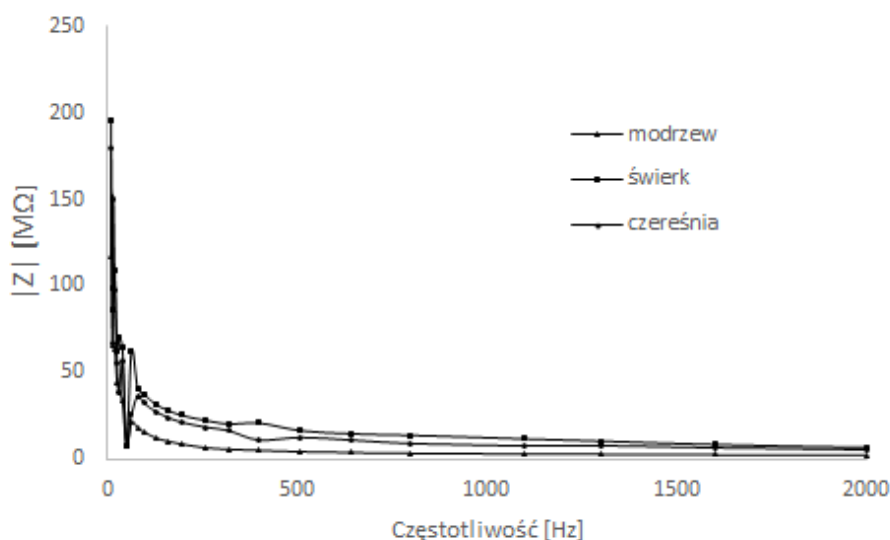
Impedancja próbek została zmierzona w zakresie częstotliwości od 10 Hz do 1 MHz. Na rysunkach 3 – 5 przedstawiono zależność rezystancji, reaktancji oraz modułu impedancji od częstotliwości dla trzech wybranych gatunków drewna. Pomiary, których wyniki zostały przedstawione na rysunkach 3 – 5, wykonano dla próbek pochodzących z bieli równoległe do kierunku słoików. Zakres częstotliwości przedstawiony na rysunkach został ograniczony do 10 Hz – 2 kHz, dla wyższych częstotliwości nie zaobserwowano istotnych zmian w wartościach impedancji.



Rys. 3. Zależność części rzeczywistej impedancji od częstotliwości dla drewna modrzewiowego, świerkowego i czereśniowego



Rys. 4. Zależność części urojonej impedancji od częstotliwości dla drewna modrzewiowego, świerkowego i czereśniowego



Rys. 5. Zależność modułu impedancji od częstotliwości dla drewna modrzewiowego, świerkowego i czereśniowego

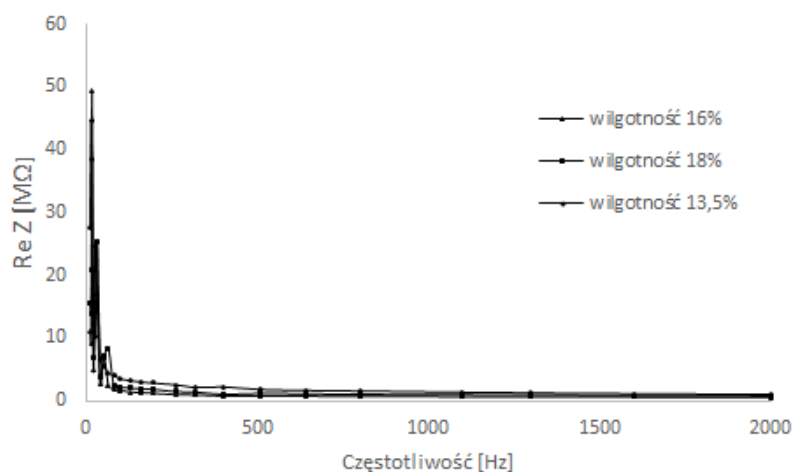
Z danych przedstawionych na rysunkach 3 – 5 wynika, że wyraźne różnice w wartościach impedancji zmierzonej dla różnych gatunków drewna obserwuje się dla częstotliwości nie przekraczających 2 KHz. Z tego powodu do przeprowadzenia zadania klasyfikacji wybrano wartości impedancji zmierzone dla częstotliwości 800 Hz.

Ważnym parametrem, który zgodnie z doniesieniami literaturowymi, wyraźnie wpływa na parametry elektryczne drewna jest jego wilgotność. Dlatego obliczony został współczynnik korelacji liniowej między wilgotnością próbek a impedancją. Wyniki przedstawione w tabeli 2 wskazują, że wilgotność nie ma decydującego wpływu na wartość impedancji.

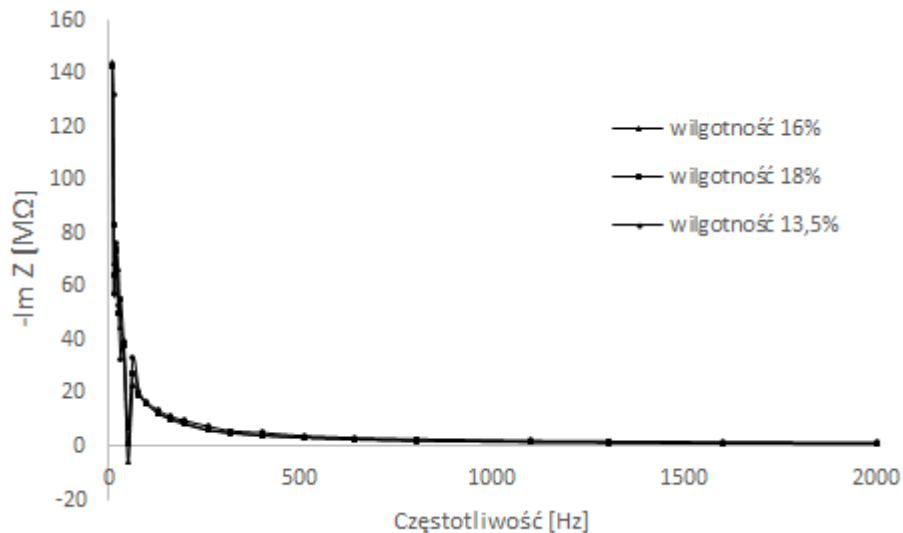
Tabela 2. Wartości współczynników korelacji Pearsona dla wilgotności i impedancji drewna ($p < 0.05$)

	Część rzeczywista impedancji	Część urojona impedancji
Wilgotność	-0.60	-0.76

Dodatkowo, wpływ wilgotności na impedancję próbki został zobrazowany na rysunkach 6–7. Wykresy przedstawiają zależność części rzeczywistej i urojonej impedancji od częstotliwości dla próbek dębu o różnej wilgotności (od 13,5% do 18%). Analiza danych przedstawionych na wykresach potwierdza niewielki wpływ wilgotności zarówno na część rzeczywistą jak i urojoną impedancji.



Rys. 6. Zależność części rzeczywistej impedancji od częstotliwości dla drewna dębowego o różnej wilgotności

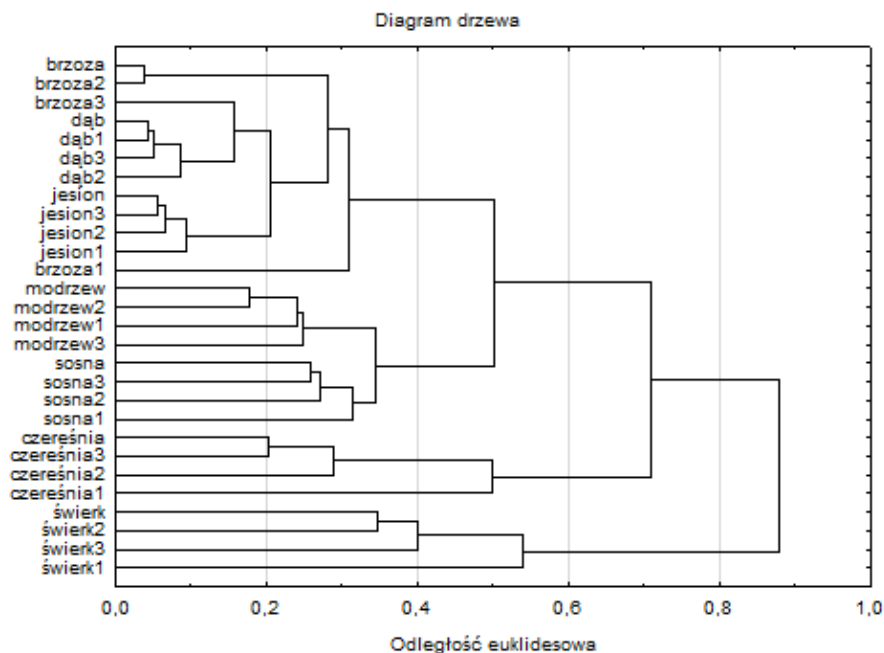


Rys. 7. Zależność części urojonej impedancji od częstotliwości dla drewna dębowego o różnej wilgotności

W badaniach wykorzystano dwie różne metody analizy skupień aby umożliwić porównanie uzyskanych wyników. Wynika to z faktu, że różne metody wykorzystane do analizy tego samego zbioru danych mogą generować różne wyniki.

3.1 WYNIKI GRUPOWANIA

Na rysunkach 8 i 9 przedstawiono wyniki grupowania w przypadku gdy próbki opisane były ośmioma parametrami: część rzeczywista i urojona impedancji mierzona równoległe i prostopadle do kierunku słoików dla próbki pobranej z bieli oraz z twardzieli.



Rys. 8. Diagram drzewa hierarchicznego przedstawiający proces grupowania próbek opisanych ośmioma parametrami

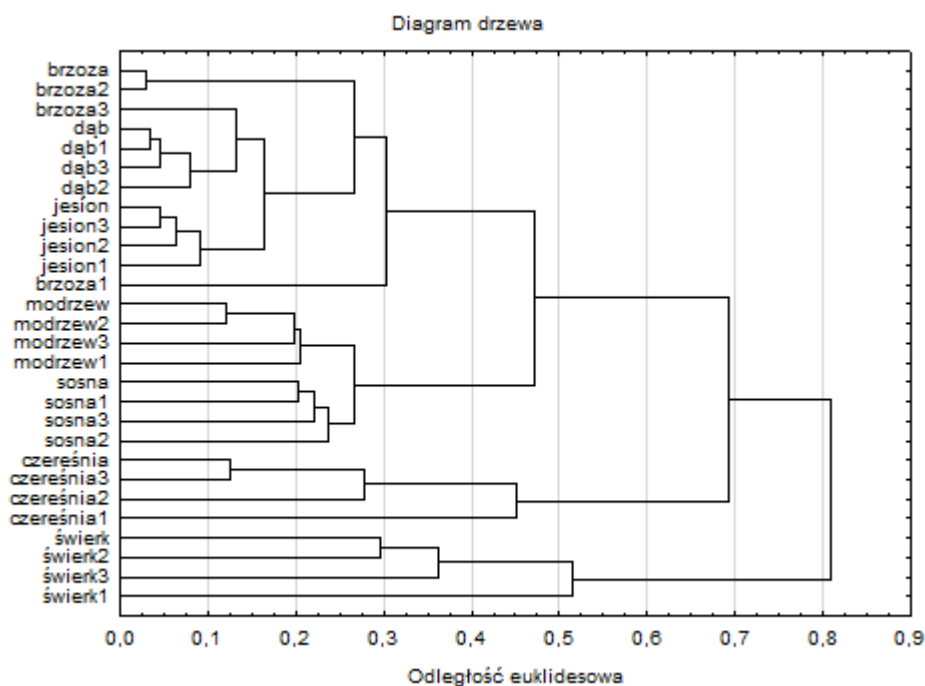
Rysunek 9 przedstawia mapę sieci Kohonena o wymiarach 3x3 neurony. W polach odpowiadającym poszczególnym neuronom umieszczone zostały nazwy próbek, które w wyniku procesu uczenia sieci zostały „rozpoznane” przez te neurony.

	1	2	3
1	brzoza3 dąb jesion dąb1 jesion1 dąb2 jesion2 dąb3 jesion3	czereśnia czereśnia2 czereśnia3	świerk świerk1 świerk2 świerk3
2	brzoza brzoza1 brzoza2		czereśnia1 sosna2
3	modrzew modrzew1 modrzew2 modrzew3		sosna sosna1 sosna3

Rys. 9. Mapa Kohonena dla próbek opisanych ośmioma parametrami

Wyniki uzyskane za pomocą obu metod grupowania dla próbek opisanych ośmioma parametrami wskazują, że próbki zostały pogrupowane zgodnie z gatunkami drewna. Uzyskane wyniki wskazują na podobieństwo między dębem, jesionem i brzozą oraz modrzewiem i sosną. Znacząco różne od pozostałych gatunków są czereśnia i świerk.

Rysunki 10 - 11 przedstawiają wyniki grupowania w przypadku gdy próbki zostały opisane przez cztery parametry: moduł impedancji mierzonej równoległe i prostopadle do kierunku słoików dla próbki pobranej z bieli oraz z twardzieli.



Rys. 10. Diagram drzewa hierarchicznego przedstawiający proces grupowania próbek opisanych czterema parametrami

	1	2	3
1	brzoza dąb jesion brzoza2 dąb1 jesion1 brzoza3 dąb2 jesion2 dąb3 jesion3	brzoza1 czereśnia czereśnia2 czereśnia3	świerk świerk1 świerk2 świerk3
2			czereśnia1
3	sosna sosna1 sosna3		modrzew modrzew1 modrzew2 modrzew3 sosna2

Rys. 11. Mapa Kohonena dla próbek opisanych czterema parametrami

Wyniki uzyskane dla próbek opisywanych za pomocą modułu impedancji są generalnie zbliżone z wynikami otrzymanymi dla próbek opisywanych oddzielnie za pomocą części rzeczywistej i urojonej impedancji. W przypadku metody drzewa hierarchicznego można zauważyć, że odległość euklidesowa dla poszczególnych węzłów grupowania jest nieco mniejsza dla próbek opisywanych modułem impedancji. Oznacza to, że podobieństwo próbek w tym przypadku jest nieco większe. W przypadku mapy Kohonena obserwujemy różnice dotyczące przypisania próbek do konkretnych neuronów na mapie. Numer neuronu, który „rozpoznaje” daną próbkę nie ma w tym przypadku znaczenia. Ważne jest jedynie czy podobne grupy próbek są rozpoznawane przez neurony sąsiadujące na mapie. Dla próbek opisanych przez moduł impedancji próbki drewna brzozy, dębu i jesionu są rozpoznawane przez ten sam neuron co potwierdza większe podobieństwo tych gatunków jeśli próbki opisywane są modułem impedancji.

4. PODSUMOWANIE

Impedancja jest parametrem drewna, który z powodzeniem może być stosowany do różnicowania drewna zgodnie z jego gatunkiem. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunek drewna wpływa na impedancję w większym stopniu niż wilgotność. Nie zaobserwowano znaczącej różnicy w wynikach uzyskanych w przypadku gdy próbki opisane były za pomocą modułu impedancji i za pomocą rezystancji i reaktancji. Zastosowanie modułu impedancji powodowało nawet niewielki wzrost podobieństwa między próbkami pochodzącymi z gatunków drewna o podobnych wartościach impedancji. Takie podobieństwa można zauważyć dla próbek drewna brzożowego, dębowego i jesionowego oraz modrzewiowego i sosnowego.

Literatura

1. K. J. Duchow, R. A. Gerhardt, Dielectric characterization of wood and wood infiltrated with ceramic precursors, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic Materials Sensors and Systems*, Vol. 4, 1996, p. 125–131.
2. F. Krzysik, *Nauka o drewnie*, PWN, Warszawa, 1975.
3. S. Avramidis, L. Iliadis, S. D. Mansfield, Wood dielectric loss factor prediction with artificial neural networks, *Wood Science and Technology*, Vol. 40, 2006, p. 563–574.
4. C. Brischke, S. C. Lampen, Resistance based moisture content measurements on native, modified and preservative treated wood, *European Journal of Wood and Wood Products*, Vol. 72, 2014, p. 289–292.
5. C. Brischke, K. A. Sachse, C. R. Welzbacher, Modeling the influence of thermal modification on the electrical conductivity of wood, *Holzforschung*, Vol. 68, 2014, p. 185–193.
6. J. B. Forrer, J. W. Funck, Dielectric properties of defects on wood surfaces, *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, Vol. 56, 1998, p. 25–29.
7. M. Fredriksson, L. Wadso, P. Johansson, Small resistive wood moisture sensors: A method for moisture content determination in wood structures, *European Journal of Wood and Wood Products*, Vol. 71, 2013, p. 515–524.
8. I. Husein, S. Sadiyo, N. Nugroho, I. Wahyudi, A. Agustina, R. N. Komariah, J. Khabibi, C. Y. C. Purba, D. Ali, M. Iftor, T. P. Kahar, A. Wijayanto, M. Jamilah, Electrical properties of indonesian hardwood. Case study: *Acacia mangium*, *swietenia macrophylla* and *maesopsis eminii*, *Wood Research*, Vol. 59, 2014, p. 695–703.
9. M. F. Kabir, W. M. Daud, K. Khalid, H. A. A. Sidek, Dielectric and ultrasonic properties of rubber wood. Effect of moisture content, grain direction and frequency, *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, Vol. 56, 1998, p. 223–227.
10. M. Tiitta, P. Kainulainen, A. M. Harju, M. Venalainen, A. M. Manninen, M. Vuorinen, H. Viitanen, Comparing the effect of chemical and physical properties on complex electrical impedance of scots pine wood, *Holzforschung*, Vol. 57, 2003, p. 433–439.
11. H. S. Kol, Thermal and dielectric properties of pine wood in the transverse direction, *Bioresources*, Vol. 4, 2009, p. 1663–1669.
12. C. Brischke, A. O. Rapp, R. Bayerbach, Measurement system for long-term recording of wood moisture content with internal conductively glued electrodes, *Building and Environment*, Vol. 43, 2008, p. 1566–1574.
13. H. Forse'n, V. Tarvainen, Accuracy and functionality of hand held wood moisture content meters VTT Publications 420, VTT Building Technology, Espoo 2000.
14. A. Guyot, K. T. Ostergaard, M. Lenkopane, J. Fan, D. A. Lockington, Using electrical resistivity tomography to differentiate sapwood from heartwood: Application to conifers, *Tree Physiology*, Vol. 33, 2013, p. 187–194.
15. H. Wu, Q. Zhou, H. Liu, M. Tang, Application of electrical resistivity tomography in studying water uptake process in tree trunk, *Chinese Journal of Ecology*, Vol. 28, 2009, p. 350–356.
16. D. Bieker, R. Kehr, G. Weber, S. Rust, Non-destructive monitoring of early stages of white rot by *trametes versicolor* in *fraxinus excelsior*, *Annals of Forest Science*, Vol. 67, 2010, p. 210–220.

17. N. J. Brazee, R. E. Marra, L. Goecke, P. Van Wassenaeer, Non-destructive assessment of internal decay in three hardwood species of northeastern north america using sonic and electrical impedance tomography, *Forestry*, Vol. 84, 2011, p. 33–39.
18. T. Inagaki, B. Ahmed, I. D. Hartley, S. Tsuchikawa, M. Reid, Simultaneous prediction of density and moisture content of wood by terahertz time domain spectroscopy, *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves*, Vol. 35, 2014, p. 949–961.
19. Y. Oyama, L. Zhen, T. Tanabe, M. Kagaya, Sub-terahertz imaging of defects in building blocks, *Ndt & E International*, Vol. 42, 2009, p. 28–33.
20. S. Tanaka, Y. Fujii, K. Shiraga, Y. Ogawa, Relation between anisotropic relative permittivity and density of wood evaluated using THz time domain transmission spectroscopy, 38th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz), 2013, DOI: 10.1109/IRMMW-THz.2013.6665580
21. J. Andres-Agustin, F. Gonzalez-Andres, R. Nieto-Angel, A. F. Barrientos-Priego, Morphometry of the organs of cherimoya (anona cherimola mill.) and analysis of fruit parameters for the characterization of cultivars, and mexican germplasm selections, *Scientia Horticulturae*, Vol. 107, 2006, p. 337–346.
22. C. R. Arciola, D. Campoccia, L. Baldassarri, V. Pirini, J. Huebnere, L. Montanaro, The role of enterococcus faecalis in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis, *Biomaterials*, Vol. 28, 2007, p. 3987–3995.
23. W. Medina, O. Skurtys, J. M. Aguilera, Study on image analysis application for identification quinoa seeds (chenopodium quinoa willd) geographical provenance, *Lwt-Food Science and Technology*, Vol. 43, 2010, p. 238–246.
24. A. F. Rahman, J. A. Gamon, Detecting biophysical properties of a semi-arid grassland and distinguishing burned from unburned areas with hyperspectral reflectance, *Journal of Arid Environments*, Vol. 58, 2004, p. 597–610.
25. W. Melssen, R. Wehrens, L. Buydens, Supervised kohonen networks for classification problems, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Vol. 83, 2006, p. 99–113.
26. F. A. L. Ribeiro, F. F. Rosario, M. C. M Bezerra, Rd. C. C. Wagner, A. L. M. Bastos, V. Melo, R. J. Poppi, Evaluation of chemical composition of waters associated with petroleum production using kohonen neural networks, *Fuel*, Vol. 117, 2014, p. 381–390.
27. X. Song, P. K. Hopke, Kohonen neural network as a pattern recognition method based on the weight interpretation, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 334, 1996, p. 57–66.