

Skrypt do ćwiczeń laboratoryjnych z biofizyki

Mikrospektroskopia FTIR

Wprowadzenie

Agnieszka Drózdź

Kraków 2019

Spis treści

1. Wstęp.....	3
2. Podstawy fizyczne metody	3
2.1 Promieniowanie podczerwone.....	3
2.2 Oddziaływanie promieniowania IR z materią	4
2.3 Rodzaje drgań molekuł.....	5
2.4 Model oscylatora harmonicznego.....	7
2.5 Model oscylatora anharmonicznego.....	10
2.6 Reguły wyboru dla absorpcji promieniowania IR przez molekuły	10
3. Charakterystyka mikrospektroskopii FTIR	12
4. Źródła promieniowania podczerwonego	16
5. Detektory promieniowania podczerwonego.....	17
6. Charakterystyczne pasma absorpcji biomolekuł oraz najczęściej analizowane parametry biochemiczne.....	18
7. Zjawiska zakłócające w mikrospektroskopii FTIR	20
7.1 Rozproszenie Mie'go	20
7.2 Efekt fali stojącej pola elektrycznego.....	21
7.3 Dyfrakcja	21
7.4 Nakładanie się pasm absorpcji	22
8. Charakterystyka systemu do obrazowania w podczerwieni Nicolet iN10MX.....	24
9. Wykorzystanie mikrospektroskopii FTIR w badaniach biomedycznych.....	25
10. Sprawozdanie	26
10.1 Cel ćwiczenia	26
10.2 Wstęp teoretyczny	26
10.3 Przebieg ćwiczenia	26
10.4 Wyniki.....	26
10.5 Wnioski	26
10.6 Bibliografia.....	26
11. Pytania kontrolne.....	27
12. Literatura	28

1. Wstęp

Technika mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) powstała z połączenia dwóch technik – mikroskopii optycznej oraz spektroskopii w podczerwieni. Obecnie mikrospektroskopia FTIR pozwala uzyskać mikrometrową rozdzielczość przestrzenną, co przekłada się na możliwość gromadzenia informacji biochemicznej pochodzącej z mikroobszarów badanego materiału. Te cechy sprawiają, że technika mikrospektroskopii FTIR cieszy się szczególnym zainteresowaniem w analizie składu biochemicznego próbek biologicznych. W widmach otrzymanych za jej pomocą można wyróżnić charakterystyczne pasma absorpcji pochodzące od aktywnych w podczerwieni drgań wiązań chemicznych obecnych w tkankach makromolekuł takich jak lipidy, białka czy kwasy nukleinowe.

2. Podstawy fizyczne metody

2.1 Promieniowanie podczerwone

Promieniowanie podczerwone (*ang.* infrared radiation, IR) jest falą elektromagnetyczną, której energię można opisać wzorem 1.

$$E = h \cdot \vartheta = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1)$$

Energia kwantów IR świadczy o korpuskularnej naturze tego promieniowania. Natura falowa reprezentowana jest przez długość fali λ oraz odpowiadającą jej liczbę falową $\bar{\nu}$. Wielkości te są powiązane z częstotliwością promieniowania ν w sposób opisany równaniami 2 i 3 [1]:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2)$$

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (3)$$

gdzie:

λ – długość fali promieniowania elektromagnetycznego [m],

c – prędkość światła w próżni równa $299\,792\,458 \frac{\text{m}}{\text{s}}$,

ν – częstotliwość fali elektromagnetycznej [Hz],

$\bar{\nu}$ – spektroskopowa liczba falowa $\left[\frac{1}{\text{m}}\right]$.

Długość fali, jej częstotliwość i liczba falowa to wielkości charakteryzujące promieniowanie IR w sposób jakościowy. Do ilościowego opisu służą intensywność I oraz gęstość ρ promieniowania [2].

Intensywność promieniowania określa energię przechodzącą w ciągu 1 s przez 1 m^2 powierzchni prostopadłej do kierunku jego rozchodzenia. Dla promieniowania monochromatycznego intensywność rozumie się jako liczbą fotonów przechodzącą w ciągu 1 s przez 1 m^2 powierzchni. Gęstość promieniowania, zwana inaczej stężeniem objętościowym fotonów, jest to energia lub proporcjonalna do niej liczba monochromatycznych kwantów

zawarta w 1 m³ napromienionego układu. Zależność pomiędzy tymi dwoma wielkościami dana jest wzorem 4 [2]:

$$I = \rho \cdot c \quad (4)$$

gdzie:

I – intensywność promieniowania $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$,

ρ – gęstość promieniowania $\left[\frac{\text{J}}{\text{m}^3}\right]$,

c – prędkość światła w próżni równa 299 792 458 $\frac{\text{m}}{\text{s}}$.

Wzór 4 dotyczy promieniowania rozchodzącego się w próżni. W ośrodku materialnym o współczynniku załamania światła n przyjmuje on postać daną wzorem 5 [2]:

$$I = \rho \cdot u = \frac{\rho \cdot c}{n} \quad (5)$$

gdzie:

u – prędkość światła w ośrodku materialnym $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$,

pozostałe oznaczenia jak we wzorze 4.

Podczerwień obejmuje zakres liczb falowych 13·10³ cm⁻¹ do 1·10² cm⁻¹, który można podzielić na trzy regiony – bliską (*ang.* near-infrared, NIR), średnią (*ang.* mid-infrared, MIR) oraz daleką (*ang.* far-infrared, FIR) podczerwień. Umowne zakresy liczb falowych dla poszczególnych obszarów promieniowania IR przedstawiono w tabeli **Tab. 1** [1].

Tab. 1 Umowne granice obszarów promieniowania IR. Na podstawie [1].

Zakres	Liczba falowa [cm ⁻¹]
NIR	13000 – 4000
MIR	4000 – 400
FIR	400 – 100

W badaniach analitycznych prowadzonych metodą mikrospektroskopii FTIR wykorzystuje się obszar MIR, który związany jest z oscylacjami wewnątrz-molekularnymi. W tym zakresie znajdują się pasma charakterystyczne dla określonych rodzajów drgań deformacyjnych molekuł, konformacji oscylujących grup atomów oraz ich liczby, a także obszar „odcisku palca” obejmujący zakres 1700 do 500 cm⁻¹ [1], [3].

2.2 Oddziaływanie promieniowania IR z materią

Uzyskanie widm cząsteczkowych jest możliwe dzięki absorpcji promieniowania w próbce, dlatego z punktu widzenia spektroskopii IR jest to najważniejszy mechanizm oddziaływania promieniowania podczerwonego z ośrodkiem materialnym. Ilościowo zjawisko to opisuje prawo Lamberta-Beera (zwane również prawem Bougera-Lamberta-Beera), zgodnie z którym absorbancja A danego ośrodka materialnego (próbki) jest proporcjonalna do jego grubości oraz stężenia molowego próbki zgodnie z równaniem 6 [1]–[3]:

$$A = \varepsilon \cdot c_{mol} \cdot l \quad (6)$$

gdzie:

ε – molowy współczynnik absorpcji ośrodka, zależny od częstotliwości padającego promieniowania $\left[\frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$,

c_{mol} – stężenie molowe ośrodka $\left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}\right]$,

l – grubość ośrodka (odległość jaką pokonuje promieniowanie przechodząc przez próbkę) [cm].

Po przejściu przez ośrodek materialny intensywność promieniowania maleje eksponencjalnie, co opisuje zależność 7 [4]:

$$I = I_0 \exp(-\varepsilon \cdot c_{mol} \cdot l) \quad (7)$$

gdzie:

I_0 – intensywność promieniowania padającego na ośrodek $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$,

I – intensywność promieniowania po przejściu przez ośrodek $\left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right]$,

pozostałe oznaczenia jak we wzorze 6.

Absorbancję ośrodka materialnego można wyznaczyć w oparciu o pomiar intensywności promieniowania padającego i transmitowanego zgodnie z równaniem 8 [1], [2]:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (8)$$

Stosunek $\frac{I}{I_0}$ nosi nazwę transmitancji oznaczanej jako T . Stąd absorbancję, zgodnie z równaniem 9, można wyrazić również jako logarytm dziesiętny z odwrotności transmitancji [1], [2]:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (9)$$

Widma IR najczęściej prezentowane są jako zależność absorbancji lub transmitancji w funkcji liczby falowej.

2.3 Rodzaje drgań molekuł

Drgania cząsteczki, zwane inaczej oscylacjami, to powtarzające się w czasie zmiany jej przestrzennego uporządkowania, które związane są ze zmianą długości wiązań między atomami cząsteczki i/lub kątów między nimi [2]. Wyróżnia się również dwa inne rodzaje ruchów cząstki; translacyjne, polegające na zmianie położenia całej cząsteczki oraz rotacyjne, związane z ruchem obrotowym cząsteczki wokół własnych osi [4].

W wyniku absorpcji promieniowania podczerwonego dochodzi do zmiany energii oscylacyjnej molekuł ośrodka [2]. Atomy w oscylującej cząsteczce zachowują się jak masy

połączone sprężyną, która reprezentuje wiązanie chemiczne utworzone przez elektrony walencyjne. Częsteczka złożona z n atomów posiada $3n$ stopni swobody, z których 3 stopnie przypadają na ruch translacyjny, a kolejne 3 na rotacyjny. Stąd na drgania cząsteczki nieliniowej pozostaje $3n - 6$ stopni swobody. W przypadku cząsteczek liniowych, natomiast, oś obrotu wokół której następuje rotacja cząsteczki pokrywa się z linią, na której leżą atomy tej cząsteczki. Dlatego też, w cząsteczkach liniowych, na rotacje przypadają 2 stopnie swobody, stąd liczba stopni swobody dla oscylacji wynosi $3n - 5$ [1], [2], [4]. Drgania nie powodują przemieszczenia środka masy cząsteczki ani jej obrotu, a ich liczba jest równa liczbie stopni swobody oscylacji [2], [4].

Ze względu na to, że drgania własne mają różne częstotliwości, konieczne jest rozłożenie ich na drgania składowe. Istniejący w molekuale podział drgań własnych wynika natomiast stąd, że oscylacje te są wzajemnie ortogonalne, czyli niezależne od siebie i nie oddziałujące na siebie energetycznie [2]. Ortogonalne drgania własne cząsteczki nazywane są drganiami normalnymi, podczas których wszystkie atomy molekuly przechodzą przez położenie równowagi zgodnie w fazie i z jednakową częstotliwością [2], [4].

Można wyróżnić kilka rodzajów drgań normalnych w zależności od przyjętego kryterium podziału. Podział ze względu na zmiany w długości wiązania lub kątów pomiędzy nimi pozwala wyróżnić odpowiednio drgania rozciągające (walencyjne) oraz drgania zginające (deformacyjne). W przypadku cząsteczek płaskich drgania deformacyjne można dodatkowo podzielić na odbywające się w płaszczyźnie molekuly, na które składają się drania wahadłowe (kołyszące) i nożycowe, oraz oscylacje poza płaszczyznę molekuly, do których zaliczamy drgania wachlarzowe oraz skręcające. Istotnym kryterium podziału drgań rozciągających jest z kolei symetria obserwowanych wychyleń, stąd drgania te dzielimy dodatkowo na symetryczne (zgodne w fazie) i asymetryczne (niezgodne w fazie) [1], [2], [4].

Symetria budowy wielu molekuł sprawia, iż pewne znajdujące się w nich oscylatory posiadają identyczne poziomy energetyczne oraz częstotliwości przejść między nimi. Są to tak zwane oscylatory zdegenerowane dwukrotnie, trzykrotnie etc. w zależności od liczby jednakowych oscylatorów w cząsteczce. W widmie IR widoczne są jako pasmo wspólne dla oscylatorów zdegenerowanych [2].

Dla wartości częstotliwości oscylacji można zauważyć pewne zależności:

- częstotliwość drgań rozciągających jest większa od częstotliwości drgań deformacyjnych oraz wzrasta ze zwiększaniem się krotności wiązania chemicznego;
- częstotliwość drgań spada wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej;
- ugrupowaniom atomów, posiadających pasma absorpcji w tym samym przedziale częstotliwości, lecz znajdujących się w różnych molekułach, przypisuje się tzw. częstotliwości grupowe (np. drgania rozciągające grupy karbonylowej w aldehydach, ketonach, estrach czy kwasach karboksylowych odbywają się w zakresie liczby falowej $1720 - 1780\text{ cm}^{-1}$) [4].

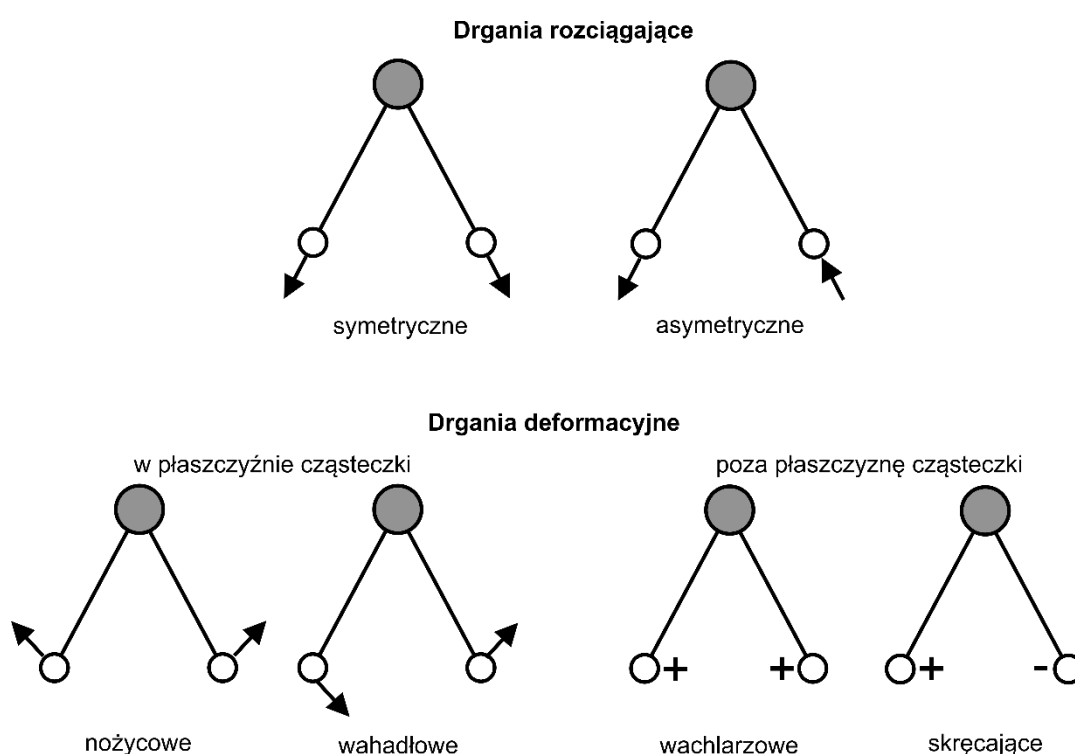
Opisane rodzaje drgań, dla cząsteczki trójatomowej, zostały przedstawione graficznie na rysunku **Rys. 1** [1], [2].

W rzeczywistym widmie oscylacyjnym, oprócz tzw. tonów podstawowych reprezentujących drgania normalne, występują również nadtony, pasma złożone oraz pasma powstałe wskutek rezonansu Fermiego [1], [2].

Nadtony powstają na skutek przejść pomiędzy oscylacyjnymi poziomami energetycznymi odpowiadającymi całkowitej wielokrotności częstotliwości podstawowej. W widmie IR

obserwowane są jako pasma o intensywności mniejszej od pasm podstawowych [1]. Jednakowa absorpcja promieniowania podczerwonego przez dwa lub więcej oscylatorów powoduje pojawienie się w widmie pasm (tonów) złożonych [1], [2]. Dodatkowo wyróżnia się złożone tony sumaryczne oraz różnicowe. Pasma sumaryczne powstają na skutek jednoczesnej absorpcji jednego fotonu o odpowiednio dużej energii na poziomach co najmniej dwóch drgających molekuł. Tony różnicowe natomiast pojawiają się, gdy procesowi absorpcji kwantu przez jeden oscylator towarzyszy jednoczesna emisja w innym [2].

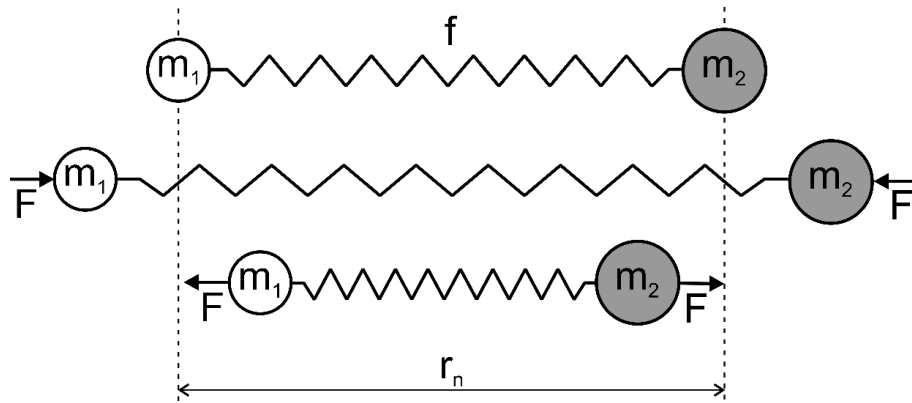
W sytuacji, gdy nadton lub ton złożony jakiegoś oscylatora mają częstotliwość równą lub zbliżoną do częstotliwości własnej innej drgającej molekule oraz drgania te należą do tego samego typu symetrii, może nastąpić sprzężenie zwane rezonansem Fermiego. W widmie IR zjawisko to przejawia się obecnością dwóch linii odpowiadających częstotliwościom wyższej i niższej od częstotliwości pasma odpowiadającego drganiom własnym rezonujących oscylatorów [1], [2].



Rys. 1 Drgania normalne w trójatomowej cząsteczce. Na podstawie [1], [2].

2.4 Model oscylatora harmonicznego

Modelem mechanicznym, który pozwala w pierwszym przybliżeniu opisać absorpcję promieniowania podczerwonego przez molekułę, jest model oscylatora harmonicznego. Dwuatomową cząsteczkę możemy rozpatrywać jako układ dwóch mas m_1 i m_2 połączonych ze sobą sprężyną **Rys. 2** [1], [2].



Rys. 2 Fazy drgań oscylatora harmonicznego. F - siła oddziaływania sprężyny (wiązania) o stałej sprężystości f na połączone nią masy, r_n - odległość między masami m_1 i m_2 w stanie równowagi. Na podstawie [1], [2].

Oscylator harmoniczny spełnia, opisane równaniem 10, prawo Hooke'a, zgodnie z którym siła, jaką sprężyna oddziałuje na połączone nią masy m_1 i m_2 jest proporcjonalna do wielkości wychYLENIA x i skierowana przeciwnie [2]:

$$F = -f \cdot x \quad (10)$$

gdzie:

f - stała sprężystości $\left[\frac{\text{N}}{\text{m}}\right]$,

x - wychylenie z położenia równowagi [m].

Wychylenie x jest równe różnicy odległości r drgających mas w danej chwili i odległości tych mas w stanie równowagi r_n , co przedstawia równanie 11:

$$x = r - r_n \quad (11)$$

Zatem w stanie równowagi x jest równe 0. Ruch oscylatora harmonicznego opisuje równanie 12 [1], [2]:

$$m_r \frac{d^2 x}{dt^2} + f x = 0 \quad (12)$$

gdzie:

m_r - masa zredukowana oscylatora równa $\frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ [kg],

x - wychylenie z położenia równowagi [m],

f - stała sprężystości $\left[\frac{\text{N}}{\text{m}}\right]$.

Rozwiązanie powyższego równania prowadzi do otrzymania zależności 13 opisującej zmiany wychYLENIA oscylatora w trakcie drgań:

$$x = x_m \cdot \cos(2\pi\nu_o t) \quad (13)$$

gdzie:

x_m – amplituda wychylenia [m],

ν_o – częstotliwość drgań oscylatora [Hz],

t – czas trwania drgań [s].

Podstawienie wzoru 13 oraz wartości $\frac{d^2x}{dt^2} = -4\pi^2\nu_o^2x$ do równania 12, przy założeniu warunków brzegowych $t = 0$, $x = x_m$, prowadzi do zależności 14 opisującej związek częstotliwości drgań dwumasowego oscylatora harmonicznego ν_o z masą zredukowaną oraz stałą siłową [1], [2]:

$$\nu_o = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{m_r}} \quad (14)$$

gdzie:

m_r – masa zredukowana oscylatora,

ν_o – częstotliwość drgań oscylatora [Hz],

f – stała sprężystości $\left[\frac{\text{N}}{\text{m}}\right]$.

Energia oscylacji zębów atomowych w molekuale jest skwantowana, co wynika z rozwiązania równania Schrödingera dla oscylatora harmonicznego opisanego wzorem 15 [2]:

$$E_H = h\nu_o \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (15)$$

gdzie:

E_H – energia oscylatora harmonicznego [J],

h – stała Plancka [J·s],

ν_o – częstotliwość drgań oscylatora [Hz],

n – kwantowa liczba oscylacyjna, która może przyjmować wartości 0, 1, 2, 3, ...

Poziomy energetyczne w skwantowanym oscylatorze harmonicznym są równoodległe. Różnicę energii oscylacji ΔE_o między dwoma dowolnymi sąsiadującymi stanami oscylacyjnymi o liczbach kwantowych $n+1$ i n można obliczyć korzystając z równania 16 [2]:

$$\Delta E_H = E_H^{n+1} - E_H^n = h\nu_o \left(n + 1 + \frac{1}{2}\right) - h\nu_o \left(n + \frac{1}{2}\right) = h\nu_o \quad (16)$$

Stąd, po uwzględnieniu równania 14, różnicę energii oscylacji dwóch sąsiednich poziomów można zapisać wzorem 17:

$$\Delta E_o = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{m_r}} \quad (17).$$

2.5 Model oscylatora anharmonicznego

Opis oscylacji molekuł przy pomocy modelu oscylatora harmonicznego stanowi jedynie niezbyt dokładne przybliżenie zjawiska oscylacji w cząsteczkach. Aby model mechaniczny drgań jak najlepiej oddawał rzeczywisty układ oscylujących atomów, należy uwzględnić m.in. spadek wartości stałej siłowej f wraz z oddalaniem się drgających molekuł. Przy dostatecznie dużej wartości wychylenia stała siłowa spada do zera, co prowadzi do rozerwania wiązania i dysocjacji cząsteczki na atomy. W modelu mechanicznym można przedstawić to zjawisko jako rozerwanie sprężyny [2]. Ponadto w oscylatorze rzeczywistym nie jest spełnione prawo Hooke'a, a zależność siły od wychylenia opisana jest bardziej skomplikowaną funkcją matematyczną, której postać zależy od molekuły [2].

Rozwiązanie równania Schrödingera dla oscylatora anharmonicznego pozwala określić charakterystyczną dla niego energię, opisaną wzorem 18 [2]:

$$E_{AH} = h\nu_o \left(n + \frac{1}{2} \right) - h\nu_o a \left(n + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (18)$$

gdzie:

E_{AH} – energia oscylatora anharmonicznego [J],

ν_o – częstość drgań oscylatora na poziomie podstawowym [H],

n – kwantowa liczba oscylacyjna, która może przyjmować wartości 0, 1, 2, 3, ... ,

a – współczynnik anharmoniczności.

Poziomy energetyczne w oscylatorze anharmonicznym nie są równoodległe. Odległości ΔE_{AH} między sąsiednimi stanami energetycznymi E_{AH}^{n+1} i E_{AH}^n , zbliżają się do siebie wraz ze wzrostem wartości oscylacyjnej liczby kwantowej, co opisuje równanie 19 [2]:

$$\Delta E_{AH} = E_{AH}^{n+1} - E_{AH}^n = h\nu_o [1 - 2a(n + 1)] \quad (19)$$

2.6 Reguły wyboru dla absorpcji promieniowania IR przez molekuły

Absorpcja promieniowania IR przez molekułę jest możliwa, gdy przejście między danymi dwoma poziomami oscylacyjnymi spełnia tzw. reguły wyboru. Ponadto przejście między stanami oscylacyjnymi określone jest przez prawdopodobieństwo przejścia, które warunkuje intensywność pasm absorpcyjnych. Intensywność pasma w widmie IR rośnie wraz ze wzrostem prawdopodobieństwa przejścia pomiędzy odpowiadającymi mu poziomami oscylacyjnymi [2].

W układzie, który znajduje się w stanie równowagi termicznej, obsadzenie poziomów energetycznych opisane jest funkcją rozkładu energii Boltzmanna daną równaniem 20 [2], [5]:

$$\frac{N^{n+1}}{N^n} = e^{-\frac{E^{n+1} - E^n}{kT}} \quad (20)$$

gdzie:

N^{n+1} – liczba molekuł w stanie o wyższej energii E^{n+1} ,

N^n – liczba molekuł w stanie o niższej energii E^n ,

k – stała Boltzmanna $\left[\frac{J}{K}\right]$,

T – temperatura [K].

Z powyższego równania wynika, że w miarę wzrostu odległości między poziomami, spada obsadzenie poziomu o wyższej energii oscylacyjnej. Podobnie, im niższa temperatura otoczenia, tym mniejsze obsadzenie wyższego poziomu energetycznego. W stanie równowagi dynamicznej mają miejsce jedynie spontaniczne, występujące z małym prawdopodobieństwem przejścia pomiędzy poziomami oscylatora. Oddziaływanie układu z promieniowaniem o energii odpowiadającej różnicy między stanami oscylacyjnymi molekuly prowadzi do absorpcji, która wymusza przejście oscylatora na poziom o wyższej energii. Warunek ten określa pierwsza (podstawowa) reguła wyboru, dana wzorem 21[2]:

$$\Delta E = h\nu \quad (21)$$

gdzie:

ΔE – różnica energii poziomów oscylatora (molekuly) [J],

ν – częstotliwość padającego fotonu [Hz],

h – stała Plancka [J·s].

Przejścia wymuszone absorpcją kwantu promieniowania zachodzą z większym prawdopodobieństwem niż przejścia spontaniczne. Liczba takich przejść absorpcyjnych w jednostce czasu, jest proporcjonalna do liczby oscylatorów na niższym poziomie energetycznym oraz gęstości promieniowania wzbudzającego zgodnie z równaniem 22 [2], [5]:

$$Z_w = B_w \cdot N_n \cdot \rho_\nu \quad (22)$$

gdzie:

Z_w – liczba wymuszonych przejść absorpcyjnych z poziomu niższego n na wyższy $n+1$ na jednostkę czasu $\left[\frac{1}{s}\right]$,

B_w – współczynnik Einsteina, określający prawdopodobieństwo absorpcji $\left[\frac{m^3}{J \cdot s}\right]$,

N_n – liczba molekuł na niższym poziomie oscylacyjnym,

ρ_ν – gęstość promieniowania wzbudzającego o częstotliwości spełniającej podstawową regułę wyboru $\left[\frac{J}{m^3}\right]$.

Współczynnik Einsteina B_w , wyrażony jest wzorem 23:

$$B_w = \frac{8\pi^3}{3h^2} |\mu_w|^2 \quad (23)$$

Symbol μ_w w powyższym wzorze to moment przejścia określony równaniem 24 [2]:

$$\mu_w = \int_{-\infty}^{+\infty} \psi_n^* \mu \psi_{n+1} dx \quad (24)$$

gdzie:

ψ_n^*, ψ_{n+1} – funkcje falowe poziomów oscylacyjnych niższego i wyższego,

μ – elektryczny moment dipolowy, zależny od współrzędnej normalnej drgania x [$C \cdot m$].

Drugą regułą wyboru definiuje rozwiązanie równania 24. Zgodnie z tą regułą, pojawienie się tonów podstawowych (odpowiadających przejściu między stanami o oscylacyjnych liczbach kwantowych 0 i 1) w widmie IR jest możliwe tylko dla oscylatorów, których moment dipolowy μ zmienia się w trakcie ich drgania wzdłuż współrzędnej normalnej x , co opisuje zależność 25 [2]:

$$\frac{d\mu}{dx} \neq 0 \quad (25)$$

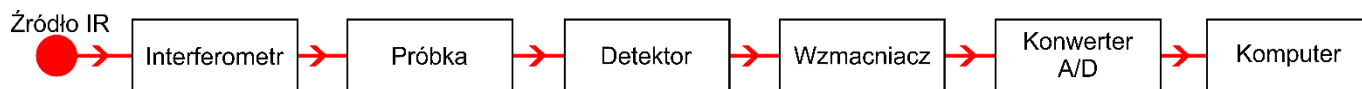
Trzecia reguła wyboru związana jest ze skwantowaniem energii stanów oscylacyjnych drgającej molekuly. Według tej reguły, przejścia pomiędzy poziomami możliwe są tylko wtedy, gdy odpowiadająca im zmiana kwantowej liczby oscylacyjnej Δn , przedstawiona równaniem 26, jest liczbą całkowitą [2]:

$$\Delta n = 1, 2, 3, \dots \quad (26)$$

Przejścia, dla których $\Delta n = 1$ odpowiadają tonom podstawowym o największym prawdopodobieństwie przejścia (największej intensywności). Jeżeli natomiast zmiana kwantowej liczby oscylacyjnej $\Delta n > 1$, pojawiają się nadtony, których istnienie wyjaśnia model oscylatora anharmonicznego.

3. Charakterystyka mikrospektroskopii FTIR

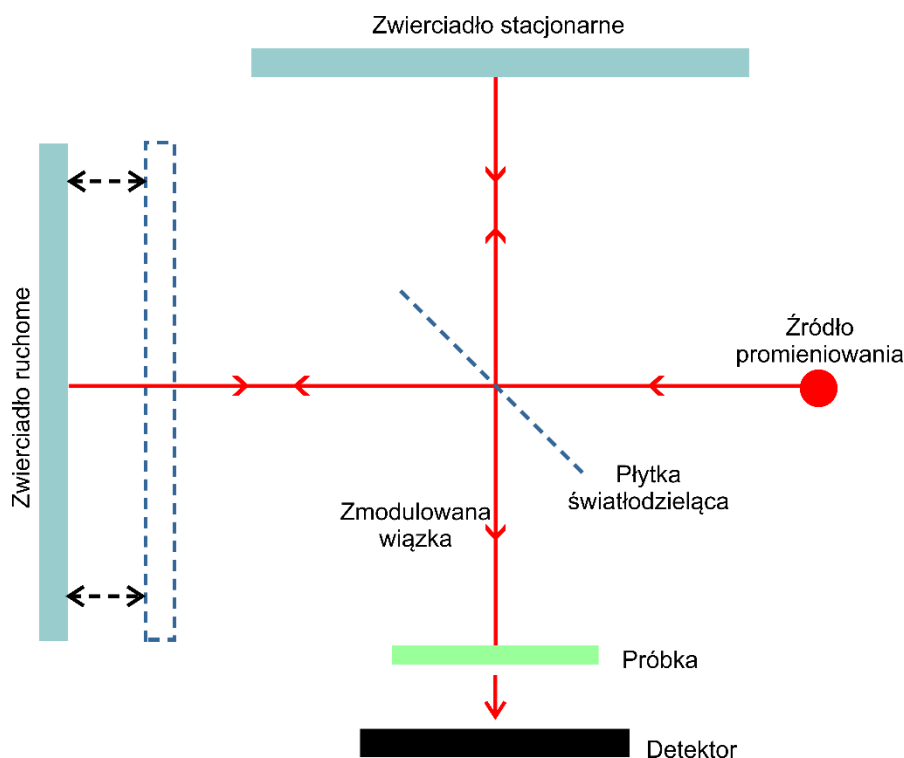
Mikrospektroskopia FTIR opiera się na idei interferencji promieniowania podczerwonego pomiędzy dwiema wiązkami w celu uzyskania informacji widmowej w postaci tak zwanego interferogramu. Stąd głównym elementem spektrometru FTIR jest interferometr. Podstawowe komponenty spektrometru fourierowskiego zostały przedstawione na **Rys. 3** [1].



Rys. 3 Schemat blokowy spektrometru FTIR. Na podstawie [1].

Promieniowanie podczerwone ze źródła przechodzi przez interferometr, następnie kierowane jest na próbkę, po czym dociera do detektora. Po wzmacnieniu sygnału, w trakcie którego składowe o wysokiej częstotliwości zostają wyeliminowane przez filtr, następuje jego konwersja do postaci cyfrowej przez przetwornik analogowo-cyfrowy (konwerter A/D). W dalszej kolejności sygnał cyfrowy zostaje przesłany do komputera, gdzie podlega transformacji Fouriera [1], [4].

Najczęściej stosowanym w spektrometrach fourierowskich interferometrem jest interferometr Michelsona, którego budowę przedstawiono na rysunku **Rys. 4** [1], [2], [4].



Rys. 4 Budowa interferometru Michelsona. Na podstawie [148].

Interferometr Michelsona składa się z dwóch płaskich zwierciadeł ustawionych prostopadle do siebie, przy czym tylko jedno z nich zmienia swoje położenie względem źródła IR. Płaszczyznę wyznaczoną przez te lustra przecina płytkę światłodziącą w postaci zwierciadła półprzepuszczalnego. Emitowane przez źródło promieniowanie IR padając na płytkę światłodziącą zostaje podzielone na dwie wzajemnie prostopadłe wiązki. Jedna z wiązek odbija się od zwierciadła półprzepuszczalnego, a następnie od zwierciadła stacjonarnego. Pozostała część promieniowania przechodzi przez płytkę światłodziącą i ulega odbiciu na zwierciadle ruchomym, które porusza się ze stałą prędkością. Odbite wiązki, powracają do zwierciadła półprzepuszczalnego, gdzie zachodzi ich interferencja. Ruch jednego ze zwierciadeł sprawia, że obydwie części wiązki są przesunięte względem siebie w fazie. W konsekwencji wzmocnienie sygnału następuje, gdy różnica dróg optycznych odbitych wiązek stanowi całkowitą parzystą wielokrotność długości fali interferującego promieniowania. Z kolei dla opóźnienia optycznego wiązek, będącego nieparzystą całkowitą wielokrotnością połowy długości fali nakładających się wiązek, obserwuje się ich wygaszenie [1], [2], [4].

Wiązka polichromatyczna opuszczająca interferometr kierowana jest na próbkę, gdzie zachodzi absorpcja kwantów promieniowania o częstotliwościach odpowiadających częstotliwościom własnym oscylujących molekuł. Sygnał z ośrodka absorbującego trafia do detektora w wyniku czego powstaje interferogram, który przedstawia zależność intensywności promieniowania IR od czasu przesuwu zwierciadła lub różnicy dróg optycznych rozdzielonych wiązek (**Rys. 5**) [1].



Rys.5 Interferogram przedstawiający zależność intensywności promieniowania od czasu przesuwu zwierciadła.

Wielokrotne skanowanie próbki i gromadzenie interferogramów w pamięci komputera, a następnie ich uśrednianie prowadzi do zwiększenia stosunku sygnału do szumu, co przekłada się na poprawę czułości oraz rozdzielczości spektralnej metody [1], [2].

Interferogram jest niegasnącą funkcją periodyczną, która zgodnie z prawem Fouriera może zostać rozłożona na proste funkcje okresowe. W praktyce zabieg ten odpowiada rozkładowi promieniowania polichromatycznego na składowe monochromatyczne odpowiadające konkretnym częstościom promieniowania. Interferogram przedstawia zależność intensywności wiązki promieniowania polichromatycznego $I(x)$ trafiającego do detektora od różnicy dróg promieniowania w interferometrze x , co przedstawia równanie 27 [2]:

$$I(x) = \int_0^{\infty} 2I(\nu)R(\nu)T(\nu)[1 + \cos(2\pi\nu x)] d\nu \quad (27)$$

gdzie:

$I(\nu)$ – intensywność promieniowania o częstotliwości ν , padającego na zwierciadło półprzepuszczalne,

$R(\nu)$ i $T(\nu)$ – współczynniki odbicia i transmisji płytki światłodzielącej, dla których $R(\nu) + T(\nu) = 1$,

x – różnica dróg optycznych wiązek przepuszczonej i odbitej od zwierciadła półprzepuszczalnego lub odpowiadający jej czas przesuwu zwierciadła.

Wydajność zwierciadła półprzepuszczalnego jest równa 100%, gdy $R(\nu) = T(\nu) = 0,5$. Wówczas wzór 27 przyjmuje uproszczoną postać, daną równaniem 28 [2], [4]:

$$I(x) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} I(\nu)[1 + \cos(2\pi\nu x)] d\nu \quad (28)$$

Dla różnicy dróg optycznych rozdzielonych wiązek znacznie większej od największej długości fali w wiązce promieniowania wzbudzającego wyrażenia $\cos(2\pi\nu x)$ uśredniają się pod całką do zera, a intensywność wiązki wynosi $I(\infty)$. Stąd zmienną część interferogramu, zwaną funkcją interferogramu, można zapisać wzorem 29 [2]:

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\nu) \cos(2\pi\nu x) d\nu \quad (29)$$

gdzie:

$$A(\nu) = 2I(\nu)R(\nu)T(\nu).$$

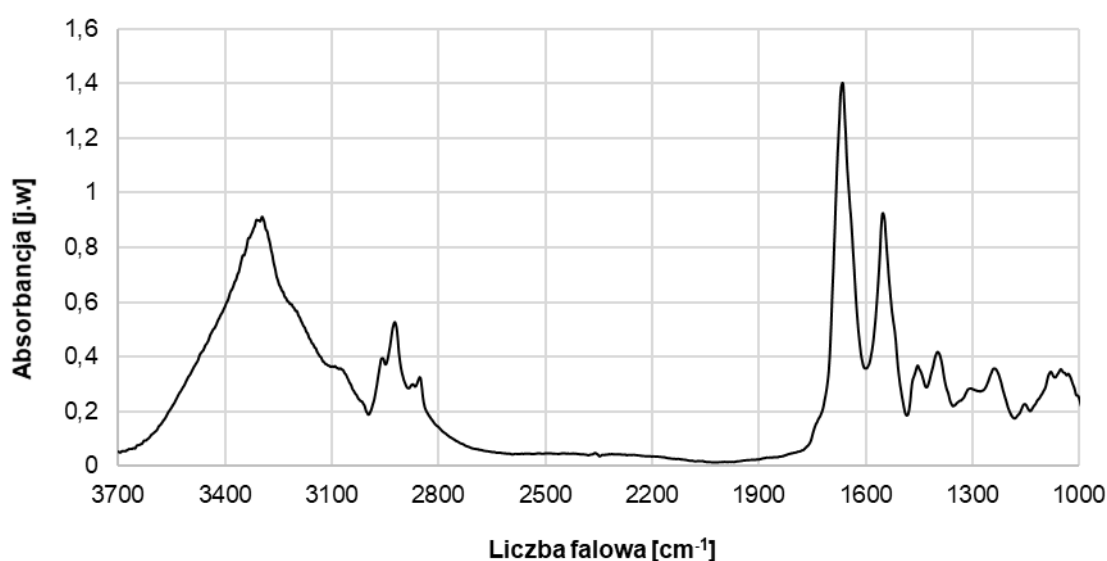
Zastosowanie transformacji Fouriera do wzoru 29 pozwala na przejście z dziedziny czasu (różnicy dróg optycznych) na dziedzinę częstotliwości (w spektroskopii FTIR wyrażonej w postaci liczby falowej $\bar{\nu}$). W ten sposób można otrzymać wyrażenie 30 opisujące intensywności spektralne $A(\bar{\nu})$:

$$A(\bar{\nu}) = 2 \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) \cos(2\pi\bar{\nu}x) dx \quad (30)$$

W celu uzyskania widma transmisyjnego FTIR rejestruje się w równych odstępach czasu interferogramy bez próbki (lub z kuletą porównawczą) oraz interferogramy z próbką. Transformacja Fouriera uzyskanych interferogramów pozwala otrzymać odpowiednio $A_0(\bar{\nu})$ i $A_{pr}(\bar{\nu})$. Widmo IR przedstawiające zależność transmitancji T od liczby falowej $\bar{\nu}$ uzyskuje się dzięki operacji przedstawionej wzorem 31 [2]:

$$T(\bar{\nu}) = \frac{A_{pr}(\bar{\nu})}{A_0(\bar{\nu})} \quad (31)$$

Podstawienie zależności 31 do wzoru 9 umożliwia otrzymanie ostatecznego widma absorpcyjnego badanej próbki (**Rys. 6**).



Rys. 6 Widmo absorpcyjne kory nerki otrzymane przy użyciu spektrometru FTIR.

W metodzie mikrospektroskopii FTIR najczęściej przeprowadza się tzw. skanowanie rastrowe badanej próbki. Skanowanie rastrowe polega na sekwencyjnym zbieraniu widm „punkt po punkcie” z wybranego obszaru i z określonym krokiem (rzędu mikrometrów). Dzięki temu uzyskuje się dwuwymiarową mapę biochemiczną próbki, w której każdy piksel stanowi oddzielne widmo IR. Następnie, wykorzystując metodę mapowania chemicznego pasm absorpcji, wykonuje się dwuwymiarowe mapy przedstawiające rozkład wybranych biomolekuł w badanym obszarze. Proces ten został schematycznie przedstawiony na **Rys. 7**.

W ostatnich latach, dzięki rozpowszechnieniu detektorów matrycowych FPA, na popularności zyskuje obrazowanie FTIR. W tym przypadku informacja widmowa jest zbierana jednocześnie z obszaru o wielkości kilkuset mikrometrów kwadratowych do kilku milimetrów kwadratowych (tzw. pole widzenia detektora, FOV) przez matrycę detektorów wielkości $\sim 10^2 \times 10^2$ piksel (przykładowo, rozmiar matrycy detektorów FPA w systemie obrazowania Agilent 600 Series to 128×128 pikseli). Aby uzyskać obraz fragmentu próbki większego niż pole widzenia detektora, wykonuje się mozaikę, będącą złożeniem kilku sekwencyjnie zebranych obszarów FOV. Zatem dzięki obrazowaniu FTIR, podobnie jak w przypadku skanowania rastrowego, uzyskujemy mapę biochemiczną, w której każdy piksel zawiera pełną informację widmową na temat odpowiadającego mu „punktu” próbki. Jednak, w przeciwieństwie do tradycyjnego skanowania próbki „punkt po punkcie”, metoda obrazowania FTIR umożliwia znacznie szybsze zbieranie informacji widmowej z badanego materiału. Dalsza analiza polega na mapowaniu chemicznym pasm charakterystycznych dla obecnych w próbce makromolekuł biologicznych.

4. Źródła promieniowania podczerwonego

Wykorzystywane w spektroskopii FTIR promieniowanie podczerwone powinno charakteryzować się stabilnością, ciągłością oraz wysoką intensywnością w całym zakresie widmowym. W badaniach analitycznych z wykorzystaniem średniej podczerwieni stosuje się trzy rodzaje źródeł IR – włókno Nernsta, globar lub promieniowanie synchrotronowe [1].

Włókno Nernsta to ceramiczny pręt z tlenku cyrkonu zawierający dodatki tlenków itru i innych pierwiastków ziem rzadkich oraz posiadający platynowe zakończenia umożliwiające jego połączenie elektryczne. Włókno nie przewodzi prądu w temperaturze pokojowej, stąd w celu wymuszenia przepływu prądu musi zostać ono rozżarzone. Po podgrzaniu włókna do temperatury ponad 1000°C (najczęściej 1900°C) emituje ono promieniowanie o rozkładzie spektralnym intensywności zbliżonym do promieniowania ciała doskonale czarnego. Zaletą tego rodzaju źródła jest duża intensywność emitowanego promieniowania w całym zakresie MIR [1], [2], [6].

Globar jest prętem ceramicznym wykonanym z węgla krzemu, emitującym skolimowaną wiązkę promieniowania IR o średnicy przekroju poprzecznego ok $1\ \mu\text{m}$, co zapewnia oświetlenie na próbce obszaru o średnicy od $20\ \mu\text{m}$ do $100\ \mu\text{m}$ [2], [7]. Dzięki globarowi można uzyskać dobrą rozdzielczość spektralną wynoszącą przeważnie od $4\ \text{cm}^{-1}$ do $8\ \text{cm}^{-1}$ [7]. Temperatura żarzenia źródła wynosi między 1200 a 1400°C , a emitowane promieniowanie cechuje duża stabilność oraz rozkład spektralny zbliżony do generowanego przez włókno Nernsta. Promieniowanie emitowane przez globar posiada większą intensywność w zakresie wyższych liczb falowych. Źródła globarowe, ze względu na krótki czas życia oraz konieczność chłodzenia wodą, są mniej popularne niż włókna Nernsta [6].

Promieniowanie synchrotronowe generowane jest podczas ruchu relatywistycznych

cząstek naładowanych po zakrzywionych torach. W celu zakrzywienia torów cząstek stosuje się pole magnetyczne wytwarzane przez magnesy zakrzywiające lub urządzenia wstawkowe. Większe długości fali IR uzyskuje się dzięki wykorzystaniu promieniowania generowanego przez cząstki, które ulegają hamowaniu (przyspieszeniu) podczas wejścia w stałe pole magnetyczne wytworzone przez magnes dipolowy. Generowane w ten sposób promieniowanie podczerwone charakteryzuje ciągłość, naturalna kolimacja oraz znacznie większa, w porównaniu z konwencjonalnymi źródłami, jasność. Wadą promieniowania synchrotronowego jest z kolei niestabilność przestrzenna. Wykorzystanie promieniowania IR generowanego za pomocą synchrotronu pozwala na uzyskanie wysokiej rozdzielczości przestrzennej oraz zachowanie wysokiego stosunku sygnału do szumu, dzięki czemu możliwe jest badanie mikrometrowych obszarów próbek [8]–[10].

5. Detektory promieniowania podczerwonego

Obecnie można wyróżnić trzy typy detektorów stosowanych w rejestracji promieniowania z zakresu średniej podczerwieni. Pierwszy z nich to piroelektryczne detektory wykonane z deuterowanego tiosiarczanu trójglicyny (*ang.* deuterated triglycine sulfate, DTGS). Detektory DTGS pracują w temperaturze pokojowej i znajdują zastosowanie w rutynowych pomiarach nie wymagających wysokiej czułości [3], [11]. Działanie detektorów tego typu opiera się na zjawisku piroelektrycznym, w którym zmiana temperatury (ogrzanie lub schłodzenie) materiału prowadzi do powstania ładunku elektrycznego na jego powierzchni. Na przeciwległych końcach materiału piroelektrycznego generowane są ładunki o przeciwnych znakach, przy czym ich ilość zależy od szybkości zmian temperatury. Ważną zaletą detektorów DTGS jest krótki czas reakcji [11], [12].

Znacznie wyższą czułością, w porównaniu do DTGS, cechują się detektory fotoprzewodzące wykonane z materiału półprzewodnikowego, który stanowi roztwór tellurku kadmu i tellurku rtęci (*ang.* mercury cadmium telluride, MCT) [1]. Detektory MCT wykorzystują w swojej pracy zjawisko fotoelektryczne wewnętrzne, w którym pod wpływem padającego promieniowania obserwuje się wzrost przewodnictwa elektrycznego półprzewodnika [13]. Zaletą detektorów tego typu jest wysoki stosunek sygnału do szumu w całym zakresie długości fali [1], [3].

Szczególnym typem detektorów, które zyskują popularność w ostatnich latach, są detektory liniowe i matrycowe FPA (*ang.* Focal Plane Array) [3], [7]. Są to pozycjoczułe matryce detektorów półprzewodnikowych (fotodiod), stosowane głównie do rejestracji obrazów dwuwymiarowych. Do budowy detektorów FPA wykorzystuje się technologię krzemową CCD (*ang.* Charge-Coupled Device) lub CMOS (*ang.* Complementary Metal–Oxide–Semiconductor). Obraz próbki zostaje zogniskowany przez układ optyczny urządzenia na matrycy detektorów, której zadaniem jest przetworzenie sygnału optycznego na elektryczny. Następnie sygnał kierowany jest do zintegrowanego z matrycą układu odczytowego, gdzie jest przekształcany na obraz topograficzny. Główną zaletą detektorów FPA jest duża wydajność kwantowa, sięgająca nawet 90% a także dobry stosunek sygnału do szumu [7], [14]. Co więcej zastosowanie detektorów FPA w mikrospektroskopii FTIR pozwala znacznie skrócić czas niezbędny do otrzymania mapy chemicznej badanej próbki [15].

6. Charakterystyczne pasma absorpcji biomolekuł oraz najczęściej analizowane parametry biochemiczne

Mikrospektroskopia w podczerwieni pozwala określić skład biochemiczny badanych próbek biologicznych. Widmo IR dostarcza bowiem informacji na temat obecnych w danym materiale makromolekuł biologicznych takich jak białka, polipeptydy, kwasy nukleinowe, lipidy oraz węglowodany. Jest to możliwe dzięki identyfikacji pasm absorpcji, odpowiadających częstotliwościom drgań normalnych charakterystycznych dla grup funkcyjnych biomolekuł. Intensywności oraz względne intensywności niektórych pasm mogą być z kolei źródłem dodatkowych informacji pomocnych w określaniu struktury tych związków [1].

Białka to polipeptydy o masie przekraczającej 10 kDa, zawierające ponad 100 aminokwasów, powstające w wyniku połączenia grup α -karboksylowych z grupami α -aminowymi aminokwasów, które prowadzi do utworzenia wiązań peptydowych. W organizmie makromolekuły te pełnią role enzymatyczne, strukturalne, transportowe, immunologiczne, magazynujące itd. W strukturze białek można wyróżnić cztery poziomy budowy. Podstawowym jest struktura pierwszorzędowa, która określa sekwencję aminokwasów w łańcuchu białkowym. Rozmieszczenie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni decyduje o drugorzędowej strukturze białka, stabilizowanej wiązaniami wodorowymi. Najpowszechniej występujące typy struktury drugorzędowej to α -helisa (najczęściej spotykana struktura drugorzędowa białek, w której łańcuch polipeptydowy układa się w spiralę) oraz β -kartka (łańcuch białkowy rozwinięty w kierunku osiowym, przypominający kształtem harmonijkę). Struktura trzeciorzędowa, zdeterminowana przez dwie poprzednie, określa sposób trójwymiarowego, wtórnego pofałdowania cząsteczki białka i stabilizowana jest przez mostki dwusiarczkowe, wiązania hydrofobowe, wodorowe oraz jonowe. Ostatni poziom budowy białek, czyli ich struktura czwartorzędowa, zależy od wzajemnego ułożenia oligomerów (cząsteczek białkowych o dużej masie), których podjednostki połączone są za pomocą niskoenergetycznych wiązań hybrydowych, jonowych lub wodorowych [16].

Strukturę drugorzędową białek można określić analizując pasma charakterystyczne dla α -helisy ($1645 - 1662 \text{ cm}^{-1}$) oraz β -kartki ($1613 - 1637 \text{ cm}^{-1}$). Ponadto w widmach oscylacyjnych białek i polipeptydów można zidentyfikować dziewięć amidowych pasm absorpcji. Pośród nich największe znaczenie analityczne posiada pasmo pochodzące od amidu I ($1600 - 1690 \text{ cm}^{-1}$), które służy do określania struktur drugorzędowych obecnych w próbkach łańcuchów białkowych [6], [17], [18].

Lipidy stanowią heterogenną grupę związków hydrofobowych o dosyć nierównomiernym rozmieszczeniu w organizmie. Większość z nich znajduje się w błonach biologicznych oraz komórkach tkanki tłuszczowej. W organizmie ludzkim lipidy najczęściej występują w postaci kwasów tłuszczowych, cholesterolu, fosfolipidów oraz sfingolipidów. Charakterystyczną cechą budowy wszystkich lipidów jest obecność grupy karbonylowej $-\text{COOH}$ [16]. W widmie IR pasmo absorpcji charakterystyczne dla tej grupy molekuł biologicznych obejmuje zakres liczb falowych $2800 - 3050 \text{ cm}^{-1}$, w którym mieszczą się częstości drgań własnych nienasyconych ($\sim 3012 \text{ cm}^{-1}$) oraz nasyconych (2955 cm^{-1} i 2924 cm^{-1}) kwasów tłuszczowych [1], [6].

Kwasy nukleinowe są swego rodzaju biopolimerami złożonymi z wielu nukleotydów monofosforanowych. Pojedynczy nukleotyd zbudowany jest z zasady azotowej (adeniny, guaniny, cytozyny, tyminy lub uracylu), cukru (pentozy, którą jest ryboza lub deoksyryboza) i reszty kwasu fosforowego. Łączenie nukleotydów w kwasy nukleinowe jest możliwe dzięki wiązaniom

fosfodiesterowym. Wyróżnia się dwa rodzaje kwasów nukleinowych, którymi są kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) oraz rybonukleinowy (RNA), pełniące w organizmie rolę nośnika informacji genetycznej [16]. W badaniach analitycznych do detekcji zmian w zawartości kwasów nukleinowych metodą spektroskopii IR wykorzystuje się pasma absorpcyjne związane z oscylacjami wiązań obecnych w grupach fosforanowych tych makromolekuł (1080 cm^{-1} oraz 1240 cm^{-1}) [1], [6].

Najczęściej występującymi w przyrodzie związkami są węglowodany, zwane inaczej cukrami lub sacharydami. W organizmie pełnią one rolę substratów energetycznych a także są elementami składowymi glikoprotein, glikolipidów oraz kwasów nukleinowych. W budowie węglowodanów można wyróżnić dwie charakterystyczne grupy funkcyjne – aldehydową -CHO oraz ketonową >C=O [16]. Zakres widmowy IR, w którym absorbują sacharydy obejmuje liczby falowe $900 - 1200\text{ cm}^{-1}$, pokrywając się częściowo z pasmami absorpcji kwasów nukleinowych [1], [6].

W tabeli **Tab. 2** scharakteryzowano pasma absorpcyjne rejestrowane w widmach tkanek zwierzęcych. W tabeli **Tab. 3** zestawiono informacje jakich dostarczają poszczególne parametry biochemiczne na temat zawartości i struktury głównych biomolekuł.

Tab. 2 Charakterystyka pasm absorpcyjnych głównych makromolekuł biologicznych identyfikowanych w widmach IR tkanek zwierzęcych.

Liczba falowa [cm ⁻¹]	Pochodzenie		Rodzaj drgania
~3290	N-H	białka, amid A	rozciągające
Obszar 3050 – 2800 cm ⁻¹ – drgania grup CH charakterystyczne dla lipidów i białek			
~3012	=C-H	nienasycone kwasy tłuszczowe	rozciągające
~2955	C-H (-CH ₃)	nasycone kwasy tłuszczowe	rozciągające asymetryczne
~2924	C-H (-CH ₂)		rozciągające asymetryczne
~2872	C-H (-CH ₃)		rozciągające symetryczne
~2852	C-H (-CH ₂)		rozciągające symetryczne
Obszar 1740 – 1500 cm ⁻¹ – dominacja drgań charakterystycznych dla białek			
~1740	C=O	estry	rozciągające
~1600 – 1690	C-N	pasmo amidu I	rozciągające
	C=O		rozciągające
	N-H		deformacyjne
~1480 – 1580	C-N	pasmo amidu II	rozciągające
	N-H		deformacyjne
~1468	C-H (-CH ₂)	kwasy tłuszczowe, polisacharydy	deformacyjne asymetryczne
~1390 – 1400	COO ⁻		rozciągające symetryczne
~1380	C-H (-CH ₂)		deformacyjne symetryczne
Obszar 1350 – 1000 cm ⁻¹ – dominacja drgań charakterystycznych dla grup fosforanowych i węglowodanów			
~1200 – 1350	C-N	pasmo amidu III	rozciągające
	N-H		deformacyjne
~1240	-PO ₂ ⁻	wiązania fosfodiesterowe	rozciągające asymetryczne
~1200 – 900	C-O-C, C-O, C-C, C-O-P, P-O-P	(DNA, RNA, węglowodany, lipidy, białka)	rozciągające i zginające
~1080	-PO ₂ ⁻	wiązania fosfodiesterowe	rozciągające symetryczne

Tab. 3 Znaczenie wybranych parametrów biochemicznych.

Pasma absorpcji	Pochodzenie	Opis
1658 cm ⁻¹ (Amid I)	Amidy	Dystrybucja protein
1635 cm ⁻¹ /1658 cm ⁻¹ (β-kartka/α-helisa)	Amidy	Zmiany w strukturze białek
1080 cm ⁻¹ 1240 cm ⁻¹	Grupy fosforanowe	Dystrybucja związków zawierających grupy fosforanowe (kw. nukleinowe, fosfolipidy, ufosforylowane węglowodory)
1360 – 1480 cm ⁻¹	Kwasy tłuszczowe, cholesterol, estry cholesterolu	Dystrybucja kwasów tłuszczowych, cholesterolu i jego estrów
1740 cm ⁻¹	Fosfolipidy, estry cholesterolu, grupy karbonyłowe	Dystrybucja fosfolipidów, estrów cholesterolu oraz związków zawierających grupy karbonyłowe
2924 cm ⁻¹ (C-H ₂) 2955 cm ⁻¹ (C-H ₃) 2800 – 3000 cm ⁻¹	Nasycone kwasy tłuszczowe	Dystrybucja lipidów
2924 cm ⁻¹ /2955 cm ⁻¹	Nasycone kwasy tłuszczowe	Zmiany strukturalne lipidów (poziom nasycenia, zmiany długości i stopnia rozgałęzienia łańcucha)
3012 cm ⁻¹ (H-C=)	Nienasycone kwasy tłuszczowe	Dystrybucja nienasyconych kwasów tłuszczowych
3012 cm ⁻¹ /2955 cm ⁻¹	Poziom nienasycenia lipidów	Zmiany w poziomie nienasycenia lipidów

7. Zjawiska zakłócające w mikrospektroskopii FTIR

Widma absorpcyjne, a także mapy chemiczne uzyskiwane metodą mikrospektroskopii FTIR mogą być zniekształcane przez różnego rodzaju niepożądane zjawiska. Może to prowadzić do uzyskania błędnych wyników, a w dalszej konsekwencji do wyciągnięcia nieprawidłowych wniosków badawczych. Dlatego, aby uzyskać miarodajne wyniki, niezbędna jest znajomość podstawowych zjawisk zakłócających, występujących w badaniach z wykorzystaniem mikrospektroskopii FTIR oraz ich wpływu na rejestrowane widma IR.

7.1 Rozproszenie Mie'go

Rozproszenie Mie'go to rozproszenie sprężyste, które podobnie jak absorpcja IR, powoduje osłabienie wiązki promieniowania. Jednak w przeciwieństwie do absorpcji IR, zjawisko to nie jest związane ze składem chemicznym lecz z morfologią badanej próbki. Rozproszenie Mie'go zachodzi na obiektach o rozmiarach większych lub porównywalnych z λ padającego promieniowania.

Wydajność rozpraszania Mie'go, a tym samym jego wpływ na rejestrowane widma, zależy od długości fali promieniowania, rozmiarów obiektu oraz współczynnika załamania próbki. W spektroskopii IR największe znaczenie ma tzw. rezonansowe rozpraszanie Mie'go, które występuje, gdy długość fali padającego promieniowania jest zbliżona do rozmiarów obiektów rozpraszających. Wynika to z faktu, iż długości fali odpowiadające promieniowaniu z zakresu średniej podczerwieni stosowane w analizie biochemicznej próbek biologicznych, są porównywalne z rozmiarami komórek oraz różnych struktur spotykanych w tkankach.

Największy wpływ rozpraszania Mie'go obserwuje się dla wyizolowanych komórek oraz obszarów brzegowych tkanek, gdzie następuje zmiana współczynnika załamania próbki. Zjawisko to powoduje przede wszystkim poszerzenie linii bazowej a także zmianę kształtu i położenia pasma amidu I w widmie IR.

Artefakty związane z rozproszeniem Mie'go można usunąć z widma stosując opracowane algorytmy korekcji EMSC lub RMies-EMSC. W przypadku badania tkanek, wpływu tego zjawiska zakłócającego można uniknąć poprzez wyłączenie z analizy obszarów brzegowych próbki [19].

7.2 Efekt fali stojącej pola elektrycznego

Wpływ zjawiska fali stojącej pola elektrycznego (EFSW) obserwuje się często w pomiarach FTIR wykonywanych w trybie transmisyjno-odbiciowym (tzw. transfelksyjnym), który jest szczególnie popularny w badaniach próbek biologicznych. W trybie tym tkanki (lub komórki) umieszcza się na nośniku odbijającym promieniowanie IR, w wyniku czego wiązka przechodzi przez próbkę dwukrotnie, a tym samym jest dwukrotnie absorbowana.

Zauważono, że pewna część wiązki odbitej od nośnika nie przechodzi do detektora, lecz ulega odbiciu na wewnętrznej, niejednorodnej powierzchni próbki. Taka wtórnie wiązka może ulec interferencji z promieniowaniem odbitym od podłoża, biegnącym w kierunku detektora. W wyniku tego zjawiska w materiale próbki powstaje sinusoidalna fala stojąca pola elektrycznego z węzłem na powierzchni próbki.

W widmach uzyskiwanych w podczerwieni EFSW efekt fali stojącej objawia się nieliniowym wzrostem absorbancji z grubością próbki (odstępstwo od prawa Lamberta-Beera), przy czym jego wpływ na rejestrowane spektrum zależy od długości fali oraz kąta padania promieniowania, a także grubości i współczynnika odbicia próbki.

Niestety jak dotąd nie opracowana wystarczająco dokładnych algorytmów umożliwiających eliminację artefaktów jakie EFSW wprowadza w widmach IR. Uniknięcie tego zjawiska jest natomiast możliwe poprzez wykonywanie pomiarów w trybie transmisyjnym [19].

7.3 Dyfrakcja

Ważnym parametrem wpływającym na jakość obrazów rejestrowanych w mikrospektroskopii FTIR jest przestrzenna zdolność rozdzielcza. Przestrzenną zdolność rozdzielczą definiuje się jako minimalną odległość między dwoma punktami, przy której można je rozróżnić jako osobne obiekty. W przyrządach optycznych wartość tego parametru jest ograniczona zjawiskiem dyfrakcji promieniowania. Stąd definiuje się tak zwany limit dyfrakcyjny Δx przestrzennej zdolności rozdzielczej, który można opisać poniższymi kryteriami:

$$\text{Rayleigha (dla promieniowania niespójnego)} \Delta x = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$$

$$\text{Sparrowa (dla promieniowania niespójnego)} \Delta x = \frac{0,47 \cdot \lambda}{NA}$$

$$\text{Sparrowa (dla promieniowania spójnego)} \Delta x = \frac{0,73 \cdot \lambda}{NA}$$

gdzie: λ – długość fali padającego promieniowania [m], NA – apertura numeryczna obiektywu.

Aperturę numeryczną obiektywu definiuje się jako:

$$NA = n \cdot \sin \sigma$$

gdzie: n – współczynnik załamania próbki, σ – kąt aperturowy obiektywu [°].

Dodatkowo:

W mikroskopach IR z obiektywem Schwarzschilda stosuje się przybliżenie $\Delta x = \frac{2 \cdot \lambda}{3}$

W konfokalnych mikroskopach IR limit dyfrakcji można przybliżyć $\Delta x = \frac{\lambda}{2}$.

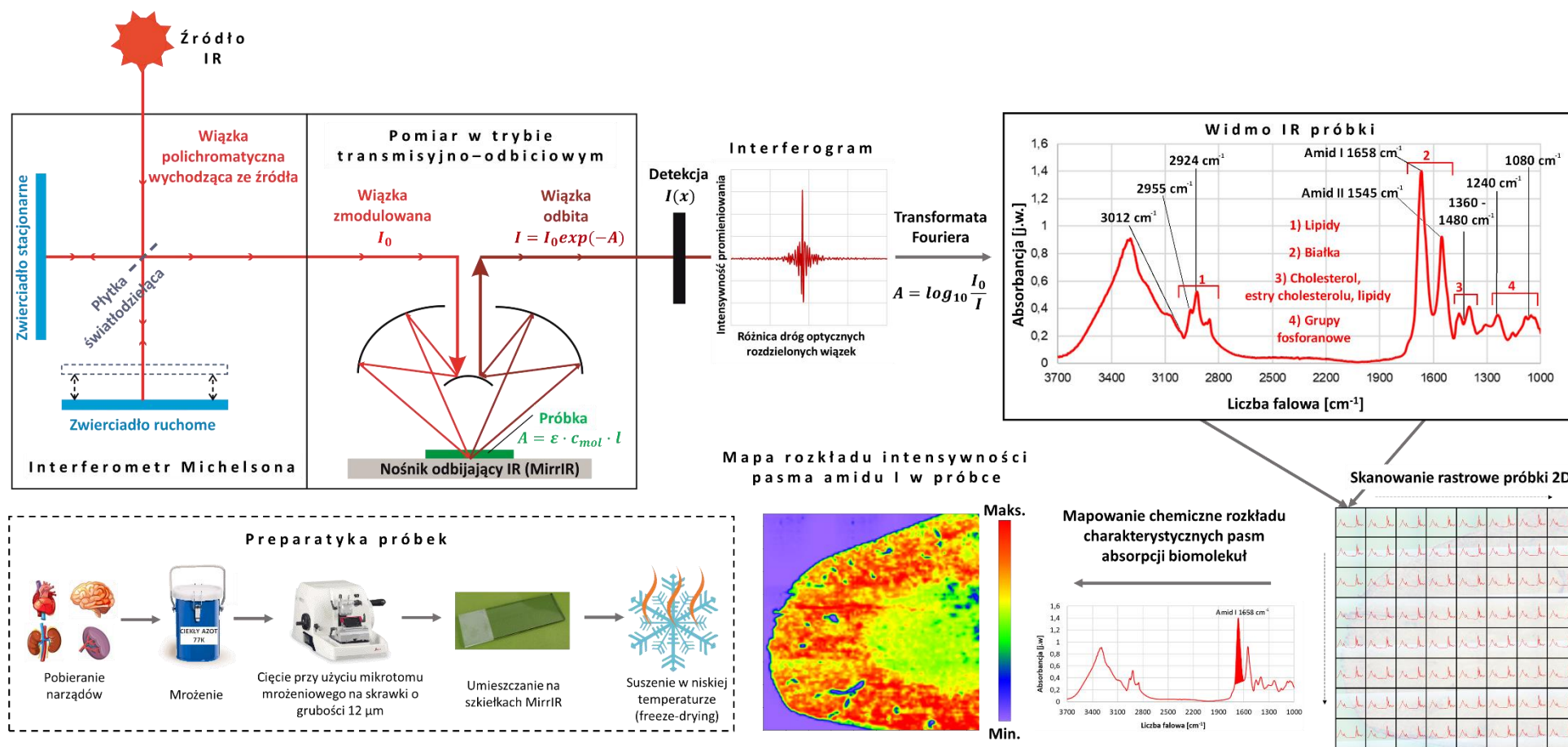
Limit dyfrakcji zależy od długości fali promieniowania oraz od własności obiektywu, którą jest apertura numeryczna. Jak widać z powyższych wzorów, dla mniejszych długości fali można osiągać się lepsze, czyli niższe, teoretyczne zdolności rozdzielcze.

W praktyce wiązka promieniowania przebywając drogę ze źródła do próbki ulega ugięciu nie tylko na aperturze ograniczającej jej rozmiar, ale także na obiektywie oraz różnych strukturach próbki. Co więcej, zjawiska te mają również miejsce kiedy wiązka przebywa drogę z próbki do detektora. Stąd niestety trudno jest osiągnąć przestrzenną zdolność rozdzielczą na poziomie limitu dyfrakcji [20].

7.4 Nakładanie się pasm absorpcji

Pełną interpretację widma IR ogranicza nakładanie się pasm absorpcyjnych pochodzących od różnych molekuł. W obrębie jednej cząsteczki występuje wiele różnych wiązań, a tym samym wiele odmiennych drgań własnych. Widmo IR zawiera zatem złożenie pasm odpowiadających tym drganiom.

Poszczególne rodzaje wiązań, mające podobną różnicę energii pomiędzy poziomami oscylacyjnymi, absorbują promieniowanie o charakterystycznej częstotliwości dając pasmo w tym samym zakresie długości fali niezależnie od innych szczegółów struktury cząsteczki. Oznacza to, że te same grupy funkcyjne (np. C=O, N-H, O-H) w różnych związkach dają charakterystyczne pasma absorpcyjne, które znajdują się w porównywalnym zakresie liczb falowych. Dlatego też w spektroskopii w podczerwieni nie jest możliwe określenie zawartości konkretnych związków. Można natomiast oszacować ogólną zawartość, a nawet w pewnym stopniu strukturę głównych biomolekuł, których charakterystyczne grupy funkcyjne absorbują promieniowanie IR w określonym zakresie liczb falowych, czyli lipidów, białek, czy też związków zawierających grupy fosforanowe [1].

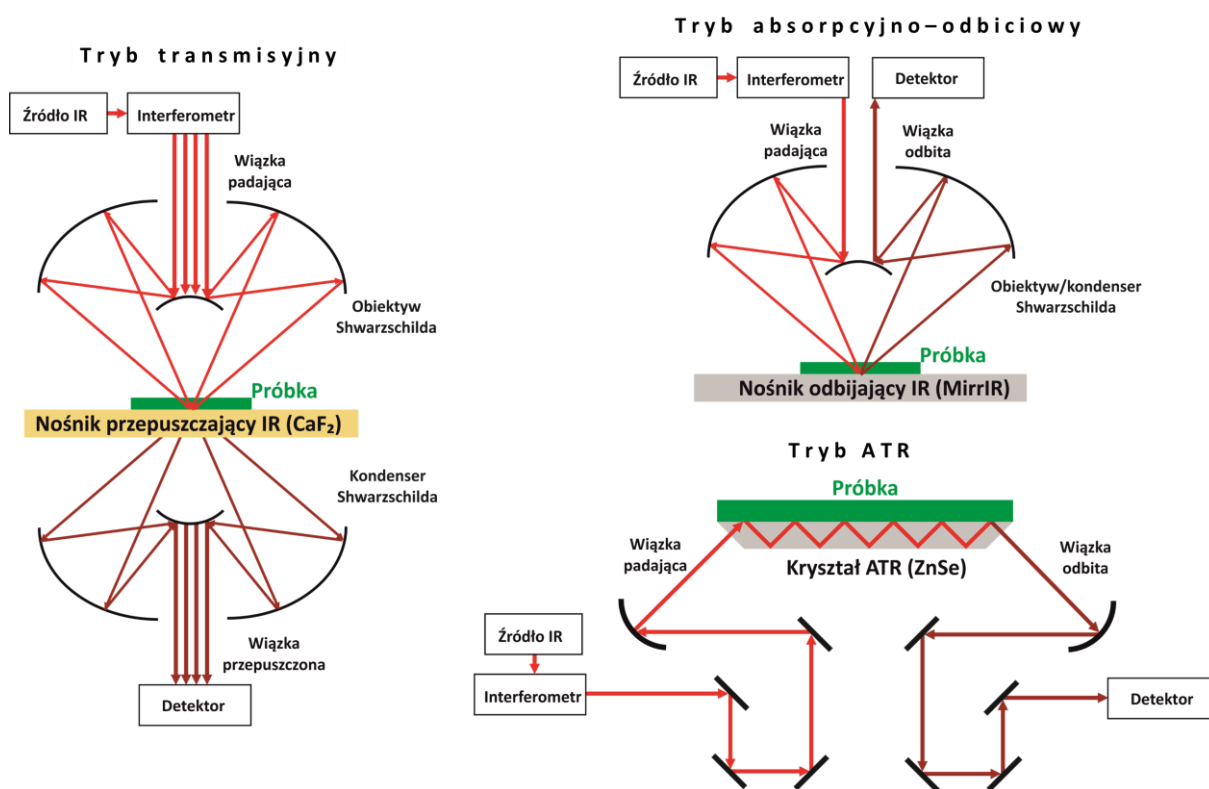


Rys. 7 Schematy obrazujące pomiar metodą mikrospektroskopii FTIR w trybie transmisyjno-odbiciowym, analizę metodą mapowania chemicznego wybranych pasm absorpcji oraz preparatykę próbek.

8. Charakterystyka systemu do obrazowanie w podczerwieni Nicolet iN10MX

Tab. 4 Parametry techniczne systemu do obrazowania w podczerwieni Nicolet iN10MX.

Optyka mikroskopu			
Obiektyw i kondenser IR/VIS	Typu Schwarzschild		
Powiększenie	15x		
Apertura numeryczna	0.7		
Spektrometr			
Typy detektorów	Punktowy DLaTGS	Punktowy MCT-A	Liniowy MCT-A
Zakres spektralny	7600-450 cm ⁻¹	7800-650 cm ⁻¹	7800-720 cm ⁻¹
Rozdzielczość spektralna w zakresie 2100-2000 cm ⁻¹	4 cm ⁻¹	4 cm ⁻¹	4 cm ⁻¹
Stosunek sygnału do szumu (apertura 25 μm x 25 μm)	-	25 000: 1	500 :1
Czas pomiaru	-	4.5 min (mapa 1.2x1.2 mm, krok 25 μm, RS 16 cm ⁻¹)	20 s (mapa 1.2x1.2 mm, krok 25 μm, RS 16 cm ⁻¹)
Chłodzenie	Niewymagane	Ciekły azot	
Tryby pomiarowe	Transmisyjny, absorpcyjno-odbiciowy, ATR		
Grubość próbek	Typowo kilka-kilkanaście μm, maksymalnie do 20 mm (tryb ATR)		
Optyka spektrometru			
Interferometr	Michelsona justowany dynamicznie w trakcie skanowania		
Płytką światłodzielną	Wielowarstwowa KBr/Ge		
Apertura/przesłony	Sterowanie zautomatyzowane		



Rys. 8 Charakterystyka trybów pomiarowych stosowanych w mikrospektroskopii FTIR.

9. Wykorzystanie mikrospektroskopii FTIR w badaniach biomedycznych

Obrazowanie z zastosowaniem mikrospektroskopii FTIR jest potężnym narzędziem w analizie biochemicznej próbek biologicznych. Wysoka rozdzielczość przestrzenna metody pozwala uzyskać informację na temat zawartości, struktury i dystrybucji głównych molekuł biologicznych takich jak lipidy, białka czy kwasy nukleinowe w mikroskopowych obszarach badanej próbki. Mikrospektroskopia FTIR cieszy się szczególnie dużym zainteresowaniem w badaniach dotyczących patogenezy nowotworów [21]–[25] oraz chorób neurodegradacyjnych [26]–[32]. Poniżej przedstawiono kilka przykładowych zastosowań tej metody w analizie próbek pochodzenia biologicznego.

M. Szczerbowska-Boruchowska *i wsp.* [31] przy pomocy mikrospektroskopii FTIR z synchrotronowym źródłem promieniowania podczerwonego (SR-FTIR) badali istotę czarną śródmózgowia pochodzącą od pacjentów zdrowych (grupa kontrolna) oraz cierpiących na chorobę Parkinsona (PD). Po pobraniu próbki zostały zamrożone w temperaturze -30°C , a następnie pocięte na skrawki o grubości $20\text{ }\mu\text{m}$ przy użyciu mikrotomu mroźniowego i wysuszone w temperaturze -20°C . Autorzy zauważyli, że główne różnice spektralne pomiędzy tkankami pochodzącymi od grupy kontrolnej i pacjentów z PD występują przy następujących częstotliwościach: 2930 , 2850 , 1655 , 1380 , 1236 , 1173 i 1086 cm^{-1} . Obrazowanie rozkładu tych biomarkerów wykazało, że w tkankach zdrowych grupy funkcyjne białek i kwasów nukleinowych zlokalizowane są głównie w ciele komórkowym. Z kolei w przypadku tkanek PD nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w spektralnym regionie odcisku palca pomiędzy ciałem komórkowym a jego otoczeniem. Co więcej, w próbkach pochodzących od pacjentów dotkniętych PD stwierdzono spadek względnej zawartości białek i lipidów (spadek stosunku $1655\text{ cm}^{-1}/2924\text{ cm}^{-1}$) a także wzrost względnej zawartości amidu I i amidu II (wzrost stosunku $1655\text{ cm}^{-1}/1545\text{ cm}^{-1}$). Wstępne wyniki uzyskane przez M. Szczerbowską-Boruchowską *i wsp.* potwierdzają hipotezę o wielopodłożowym charakterze choroby Parkinsona. Ponadto autorzy wykazali, że zmiany funkcjonalne w neuronach tkanki nerwowej, przejawiające się zaburzeniem dystrybucji i struktury głównych makromolekuł biologicznych, występują przed ich morfologicznym zanikiem.

J. Chwiej *i wsp.* [32] przeprowadzili analizę topograficzną oraz półilościową formacji hipokampa szczurów zdrowych (kontrolnych) i epileptycznych z drgawkami wywołanymi pilokarpiną. Mózgi pobrane od zwierząt pochodzących z obydwu grup zostały zamrożone w ciekłym azocie, a następnie pocięte na skrawki grubości $10\text{ }\mu\text{m}$ i umieszczone na szkiełkach MirrIR w celu przeprowadzenia analizy biochemicznej. Dzięki skanowaniu rastrowemu próbek z zastosowaniem mikrospektroskopii SR-FTIR uzyskano dwuwymiarowe mapy rozkładu lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Bazując na doświadczeniu wyniesionym ze swoich poprzednich badań autorzy skupili się na dwóch regionach hipokampa: sektorze trzecim rogu Ammona (CA3) oraz zakręcie zębatym (DG). Analiza spektralna wykazała zmiany w stopniu nasycenia fosfolipidów oraz drugorzędowej strukturze białek (wzrost względnych zawartości struktury β -kartki i α -helisy oraz amidu II i amidu I) u zwierząt epileptycznych w odniesieniu do grupy kontrolnej. Anomalie te były zlokalizowane w warstwie komórek piramidowych sektora CA3 oraz w warstwach komórek wielokształtnych i drobinowych obszaru DG. Wyniki uzyskane przez Chwiej *i wsp.* sugerują, że obserwowane nieprawidłowości w drugorzędowej strukturze białek oraz wzrost poziomu nasycenia lipidów mogą być związane ze zmianami neurodegradacyjnymi będącymi następstwem stresu oksydacyjnego występującego w obszarach mózgu dotkniętych indukowanymi pilokarpiną drgawkami.

S. Mordechai *i wsp.* [33] wykorzystali mikrospektroskopię FTIR do identyfikacji potencjalnych biomarkerów raka szyjki macicy i czerniaka, które mogą zostać użyte do różnicowania tych nowotworów złośliwych od tkanki zdrowej. Badania przeprowadzono na próbkach biopsyjnych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Tkanki były pobierane w taki sposób, aby obejmowały zarówno obszar zdrowy (kontrolny) jak i zmieniony nowotworowo. Analiza spektralna skupiała się na ocenie poziomu biomolekuł takich jak RNA, DNA (względna intensywność pasm absorpcji RNA i DNA $1121\text{ cm}^{-1}/1020\text{ cm}^{-1}$) fosforany ($1185 - 1300\text{ cm}^{-1}$) i węglowodany (w szczególności glikogen absorbujący w zakresie $900 - 1185\text{ cm}^{-1}$). Uzyskane wyniki sugerują, że poziom glikogenu wykazuje duży potencjał w diagnostyce raka szyjki macicy, jednak nie jest użyteczny w przypadku czerniaka. Za potencjalny, wspólny dla obydwu typów nowotworów, biomarker autorzy uznali natomiast względną zawartość RNA i DNA. Stosunek RNA/DNA zarówno w przypadku raka szyjki macicy jak i czerniaka okazał się być wyższy niż w próbkach kontrolnych.

10. Sprawozdanie

10.1 Cel ćwiczenia

Zapoznanie się z metodą mikrospektroskopii FTIR. Określenie różnic w składzie biochemicznym trzech badanych obszarów mózgu szczura: obszaru zdrowego, marginesu, tkanki nowotworowej.

10.2 Wstęp teoretyczny

Trzy akapity (1 strona) na temat zastosowań mikrospektroskopii FTIR w biologii/medycynie – na podstawie trzech wybranych publikacji (baza PubMed) z lat 2015-2020.

10.3 Przebieg ćwiczenia

10.4 Wyniki

- 1) Wybrać po 20 reprezentatywnych widm dla każdego z badanych obszarów. Wyrysować wybrane widma dla każdego z obszarów osobno (skale liczb falowych na osi poziomej ustalić na od 4000 do 1000 cm^{-1}).
- 2) Dla każdego z badanych obszarów próbki wyznaczyć średnie widmo IR.
- 3) Wyrysować średnie widma dla badanych obszarów na jednym wykresie w celu porównania (skala pozioma 4000 do 1000 cm^{-1}).
- 4) Na podstawie średnich widm, dla każdego z obszarów zidentyfikować i scharakteryzować obecne w nim pasma absorpcji (Tabela: Kolumna 1: liczba falowa dla maksimum absorpcji pasma lub zakres pasma, kolumna 2: opis tj. jakim biomolekułom odpowiadają zidentyfikowane pasma).
- 5) Dla badanych obszarów porównać wysokości maksimumów absorpcji lipidów i amidów (od linii bazowej do maksimum piku) oraz kształt pasma amidu I.

10.5 Wnioski

Czy są widoczne różnice w widmach badanych obszarów. Dla jakich pasm są najwyraźniejsze?

10.6 Bibliografia

11. Pytania kontrolne

- a) Jaki jest cel niniejszego ćwiczenia?
- b) Czym jest promieniowanie podczerwone?
- c) Czym jest mikrospektroskopia FTIR w podczerwieni i czym różni się od standardowej spektroskopii IR?
- d) Który zakres promieniowania IR i dlaczego jest najczęściej wykorzystywany w mikrospektroskopii FTIR?
- e) Na jakim zjawisku opiera się spektroskopia IR? Scharakteryzuj to zjawisko.
- f) Zdefiniuj absorbancję i transmitancję.
- g) Wymień rodzaje ruchów cząsteczki.
- h) Czym są oscylacje?
- i) Co dzieje się po absorpcji promieniowania IR na poziomie molekularnym?
- j) Wymień rodzaje drgań.
- k) Kiedy możliwa jest absorpcja promieniowania IR?
- l) Wymień najważniejsze elementy spektrometru fourierowskiego.
- m) Do czego służy interferometr Michelsona?
- n) Opisz zasadę działania interferometru Michelsona?
- o) Scharakteryzuj źródła promieniowania IR.
- p) Scharakteryzuj detektory promieniowania IR.
- q) Czym jest interferogram?
- r) Do czego służy transformata Fouriera w mikrospektroskopii FTIR?
- s) Czym jest widmo IR?
- t) Jakich informacji na temat badanej próbki biologicznej dostarcza widmo IR?
- u) Scharakteryzuj zjawiska zakłócające, z którymi można spotkać się podczas wykonywania pomiarów z użyciem mikrospektroskopii FTIR?
- v) Wymień i scharakteryzuj tryby pomiarowe stosowane w spektroskopii IR.
- w) Na czym polega półilościowa analiza danych spektralnych uzyskanych metodą mikrospektroskopii FTIR?
- x) Podaj przykłady zastosowania mikrospektroskopii FTIR w badaniach biomedycznych.

12. Literatura

- [1] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. WILEY, 2004.
- [2] Z. Kęcki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998.
- [3] G. S. Nikolić, *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR Strategies*. INTECH open, 2011.
- [4] A. Z. Hryniewicz and E. Rokita, *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*. Warszawa: Wydawnictwo naukowe PWN, 1999.
- [5] Z. Kąkol, "Fizyka." Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH, 2015.
- [6] J. Twardowski and L. M. Proniewicz, *Biospektroskopia: 4*. Państwowe Wydaw. Naukowe, 1990.
- [7] M. J. Baker *et al.*, "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 8, pp. 1771–1791, 2014.
- [8] L. M. Miller and P. Dumas, "Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1758, no. 7, pp. 846–857, 2006.
- [9] L. M. Miller and R. J. Smith, "Synchrotrons versus globars, point-detectors versus focal plane arrays: Selecting the best source and detector for specific infrared microspectroscopy and imaging applications," *Vib. Spectrosc.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 237–240, 2005.
- [10] G. L. Carr and G. P. Williams, "Infrared Microspectroscopy with Synchrotron Radiation source point," *Accel. Infrared Sources Appl. SPIEC Conf. Proc.*, vol. 51, pp. 51–59, 1997.
- [11] "FT-IR microscopy using DTGS detectors," *Bruker*. [Online]. Available: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/Hyperion/AN/AN413_DTGS-detectors_EN.pdf. [Accessed: 22-May-2018].
- [12] "Detektory promieniowania temperaturowego," *Materiały otwarte AGH*. [Online]. Available: <http://layer.uci.agh.edu.pl/pl/dydaktyka/lab-sens/cw6.html#5>. [Accessed: 22-May-2018].
- [13] L. Bychto and A. Patryn, *Detektory i nadajniki optoelektroniczne*. Koszalin: Wydział Elektroniki i Informatyki Politechniki Koszalińskiej, 2010.
- [14] A. Rogalski, "Optical detectors for focal plane arrays," *Opto-Electronics Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 221–245, 2004.
- [15] C. Petibois, M. Piccinini, M. C. Guidi, and A. Marcelli, "Facing the challenge of biosample imaging by FTIR with a synchrotron radiation source," *J. Synchrotron Radiat.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [16] E. Bańkowski, *Biochemia. Podręcznik dla studentów studiów licencjackich i magisterskich*, II. Wrocław: MedPharm Polska, 2014.
- [17] Q. Wang, A. Kretlow, M. Beekes, D. Naumann, and L. Miller, "In situ characterization of prion protein structure and metal accumulation in scrapie-infected cells by synchrotron infrared and X-ray imaging," *Vib. Spectrosc.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 61–69, 2005.
- [18] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1767, no. 9, pp. 1073–1101, 2007.

- [19] H. Palonek, "Zjawiska zakłócające w badaniach tkanek z wykorzystaniem mikrospektroskopii w podczerwieni," AGH University of Science and Technology, 2014.
- [20] M. Woźny, "Problem przestrzennej zdolności rozdzielczej w badaniach tkanek z użyciem mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera," AGH University of Science and Technology, 2017.
- [21] C. Petibois and G. Délérís, "Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 10, pp. 455–462, 2006.
- [22] J. Dudala *et al.*, "Biomolecular characterization of adrenal gland tumors by means of SR-FTIR," *Analyst*, vol. 140, no. 7, pp. 2101–2106, 2015.
- [23] J. Dudala *et al.*, "Investigation of biochemical composition of adrenal gland tumors by means of FTIR," vol. 67, no. 1, pp. 60–68, 2016.
- [24] J. Nallala, G. R. Lloyd, N. Shepherd, and N. Stone, "High-resolution FTIR imaging of colon tissues for elucidation of individual cellular and histopathological features," *Analyst*, vol. 141, no. 2, pp. 630–639, 2016.
- [25] H. Sreedhar *et al.*, "High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Imaging of Human Tissue Sections towards Improving Pathology," *J. Vis. Exp.*, no. 95, pp. 1–10, 2015.
- [26] J. Chwiej *et al.*, "The biochemical changes in the hippocampal formation occurring in normal and seizure experiencing rats as a result of ketogenic diet," *Analyst*, vol. 140, no. 7, pp. 2190–2204, 2015.
- [27] A. Skoczen, Z. Setkowicz, K. Janeczko, C. Sandt, F. Borondics, and J. Chwiej, "The influence of high fat diets with different ketogenic ratios on the hippocampal accumulation of creatine – FTIR microspectroscopy study," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 184, pp. 13–22, 2017.
- [28] J. Chwiej *et al.*, "Elemental changes in the hippocampal formation following two different formulas of ketogenic diet: an X-ray fluorescence microscopy study," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 20, pp. 1277–1286, 2015.
- [29] A. Kretlow *et al.*, "FTIR-microspectroscopy of prion-infected nervous tissue," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1758, no. 7, pp. 948–959, 2006.
- [30] A. D. Surowka *et al.*, "FTIR imaging of the molecular burden around A β deposits in an early-stage 3-Tg-APP-PSP1-TAU mouse model of Alzheimer's disease," *Analyst*, vol. 142, no. 1, pp. 156–168, 2017.
- [31] M. Szczerbowska-Boruchowska *et al.*, "Biomolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 459, no. 2, pp. 241–248, 2007.
- [32] J. Chwiej *et al.*, "Synchrotron FTIR micro-spectroscopy study of the rat hippocampal formation after pilocarpine-evoked seizures," *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 40, no. 2, pp. 140–147, 2010.
- [33] S. Mordechai *et al.*, "Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma," *J. Microsc.*, vol. 215, no. 1, pp. 86–91, 2004.