

## INSTYTUT FIZYKI UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI

Jan Kobierski

# Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant

Praca na stopień doktora nauk biofizycznych wykonana w Zakładzie Radiospektroskopii Instytutu Fizyki UJ pod kierunkiem dr. hab. Huberta Harańczyka

Kraków 2013

Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant

Is life just a game where we make up the rules while we're searching for something to say Or are we just simply spiralling coils Of self-replicating DNA?

> Monty Python's "The Meaning of Life"

Kraków, 20 czerwca 2013 r.

### Oświadczenie

Ja niżej podpisany Jan Kobierski (nr indeksu: 1052907), doktorant Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. "*Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant*" przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr. hab. Huberta Harańczyka. Pracę napisałem samodzielnie.

Oświadczam, że moja praca dyplomowa została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadomy, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawnioną w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie tytułu nabytego na podstawie tej pracy.

Kraków, 20 czerwca 2013 r.

## Oświadczenie

Oświadczam, że przedłożone egzemplarze pracy doktorskiej Jana Kobierskiego pt. "*Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant*" stanowią wersję ostateczną.

dr hab. Hubert Harańczyk

Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi, Panu Dr. hab. Hubertowi Harańczykowi za wszechstronną pomoc i wsparcie, poświęcony czas oraz przekazaną wiedzę.

Szczególnie dziękuję Panu Dr. Jackowi Niziołowi z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej, za konsultacje, a także za wykonanie niektórych pomiarów.

Dziękuję Panu Prof. dr. hab. Kazimierzowi Łątce za udzielane wsparcie i pomoc w trakcie studiów doktoranckich.

Składam też podziękowania Pani Dr hab. Monice Marzec za wykonanie pomiarów kalorymetrycznych.

Podziękowania kieruję do Pani Dr inż. Edyty Hebdy z Samodzielnej Katedry Chemii Technologii Polimerów Politechniki Krakowskiej, za zsyntetyzowanie próbek.

Serdecznie dziękuję Panu inż. Tomaszowi Malarzowi za niezawodną pomoc w obsłudze spektrometrów.

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Spektroskopii, w szczególności Pani mgr inż. Dorocie Zalitacz oraz Pani Malwinie Kowalskiej za pomoc w wykonaniu pomiarów.

Przede wszystkim dziękuję moim Rodzicom.

## Spis treści

| W | /stęp.                       |                         |   | 15 |  |
|---|------------------------------|-------------------------|---|----|--|
| 1 | D                            | NA                      |   | 17 |  |
|   | 1.1                          | Skła                    | ad i struktura molekularna DNA  | 17 |  |
|   | 1.                           | 1.1                     | B-DNA   | 20 |  |
|   | 1.                           | 1.2                     | B'-DNA  | 20 |  |
|   | 1.                           | 1.3                     | A-DNA   | 21 |  |
|   | 1.                           | 1.4                     | Z-DNA   | 21 |  |
|   | 1.1.5<br>1.1.6               |                         | ps-DNA  | 21 |  |
|   |                              |                         | Tripleksy DNA   | 22 |  |
|   | 1.                           | 1.7                     | Kwadrupleksy DNA  | 22 |  |
|   | 1.2                          | Buc                     | lowa RNA  | 23 |  |
|   | 1.3                          | Zna                     | czenie biologiczne DNA  | 24 |  |
|   | 1.                           | 3.1                     | Replikacja  | 24 |  |
|   | 1.                           | 3.2                     | Transkrypcja DNA  | 26 |  |
|   | 1.4                          | Uw                      | odnienie DNA  | 27 |  |
|   | 1.5                          | Zas                     | tosowanie DNA w elektronice i fotonice  | 33 |  |
| 2 | St                           | urfakta                 | nty   | 35 |  |
| 3 | 3 Kompleksy DNA – surfaktant |                         |   |    |  |
|   | 3.1                          | Kor                     | nformacja DNA w środowisku mieszanin kationowych na przykładzie DNA-CTAB      | 40 |  |
| 4 | El                           | lement                  | y teorii magnetycznego rezonansu jądrowego                                    | 44 |  |
|   | 4.1                          | Kla                     | syczny opis procesu magnetycznego rezonansu jądrowego                         | 44 |  |
|   | 4.2                          | Zjav                    | wisko magnetycznego rezonansu jądrowego jako absorpcja kwantów promieniowania | 48 |  |
|   | 4.3                          | Opi                     | s procesów relaksacyjnych   | 49 |  |
|   | 4.                           | 3.1                     | Równania Blocha   | 49 |  |
|   | 4.                           | 3.2                     | Relaksacja spinowo-spinowa  | 52 |  |
|   | 4.                           | 3.3                     | Relaksacja spinowo-sieciowa i pomiar czasu <i>T</i> <sub>1</sub>              | 53 |  |
|   | 4.4                          | 4 Mechanizmy relaksacji |   |    |  |
|   | 4.4                          | 4.1                     | Oddziaływanie dipolowe  | 54 |  |
|   | 4.5                          | Rela                    | acja między czasem relaksacji T1 a czasem relaksacji T2                       | 55 |  |
|   | 4.6                          | Syg                     | nał swobodnej precesji FID  | 57 |  |
|   | 4.                           | 6.1                     | Transformacja Fouriera  | 57 |  |
|   | 4.                           | 6.2                     | Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów w ciele stałym                  | 58 |  |
|   | 4.0                          | 6.3                     | Zastosowanie funkcji Gaussa w analizie widma NMR oraz FID                     | 58 |  |
|   | 4.0                          | 6.4                     | Model funkcji Abragama  | 60 |  |
|   | 4.0                          | 6.5                     | Dublet Pake'a   | 60 |  |

|   | 4.6.0         | 6 Zastosowanie funkcji Lorentza w analizie widma NMR   | 62      |
|---|---------------|--|---------|
| 4.6.7   |               | 7 Sygnał pochodzący od protonów z ciała stałego oraz cieczy  | 63      |
| 5 Izoterma  |               | erma sorpcyjna   | 64      |
|   | 5.1           | Model Langmuira  | 64      |
| 5.2 Izot  |               | Izoterma sorpcyjna model BET   | 64      |
|   | 5.3           | Izoterma sorpcyjna model Denta   | 67      |
|   | 5.4           | Izoterma sorpcyjna model GDW   | 71      |
| 6   | Mat           | eriały i metody  | 72      |
|   | 6.1           | Preparatyka próbek   | 72      |
|   | 6.1.          | 1 Surfaktanty użyte w eksperymentach   | 72      |
|   | 6.1.2         | 2 Synteza kompleksów DNA surfaktant  | 73      |
|   | 6.1.          | 3 Oznaczanie zawartości metali w DNA oraz kompleksach DNA-surfaktant                               | 73      |
|   | 6.1.4         | 4 Pomiary masy   | 74      |
|   | 6.1.          | 5 Wyznaczanie suchej masy  | 74      |
|   | 6.1.0         | 6 Określanie poziomu uwodnienia  | 75      |
|   | 6.1.          | 1 Dehydratacja próbek  | 75      |
| 6.2 Skaningowa kalorymetria różnicowa – v<br>DNA-surfaktant   |               | Skaningowa kalorymetria różnicowa – wyznaczani temperaturowej stabilności kompleksó<br>surfaktant  | w<br>75 |
|   | 6.3           | Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego  | 77      |
|   | 6.3.          | 1 Spektrometr MRJ 30 MHz   | 77      |
|   | 6.3.2         | 2 Spektrometr MRJ Bruker Avance III 300 MHz  | 78      |
| 7   | Pom           | iary hydratacji kompleksu DNA-surfaktant   | 80      |
|   | 7.1           | Kinetyka hydratacji  | 80      |
|   | 7.2           | Pęcznienie   | 83      |
|   | 7.3           | Izoterma sorpcyjna   | 84      |
| 8   | Pom           | niary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów                     | 89      |
|   | 8.1<br>komple | Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów dla eksu DNA-BA   | 89      |
|   | 8.1.          | 1 Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-BA                          | 89      |
|   | 8.1.2<br>kom  | 2 Analiza amplitudy sygnału $L_2$ na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla pleksu DNA-BA    | 90      |
|   | 8.2<br>komple | Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów dla eksu DNA-CTMA | 91      |
| 8.2.1   |               | 1 Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-CTMA                        | 91      |
|   | 8.2.2<br>kom  | Analiza amplitud sygnału $L_2$ na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla pleksu DNA-CTMA.    | 94      |
| 8.3 Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla proto<br>kompleksu DNA-DDCA |               |  | 95      |

|                        | 8.3.1                           |            | Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-DDCA                           | . 95       |  |  |  |
|------------------------|---------------------------------|------------|---|------------|--|--|--|
|                        | 8.3.2                           |            | Zależność hydratacyjna składowych cieczowych dla kompleksu DNA-DDCA                                 | . 96       |  |  |  |
|                        | 8.3.3<br>kompleksi              |            | Analiza amplitud sygnału $L_2$ na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla u DNA-DDCA           | . 98       |  |  |  |
| 9                      | Pomiary widm <sup>1</sup> H-NMR |            |   | . 99       |  |  |  |
| 9                      | .1                              | Hydi       | ratacyjne pomiary widm <sup>1</sup> H-NMR   | . 99       |  |  |  |
|                        | 9.1.1                           |            | Analiza kształtu i hydratacyjne pomiary widm <sup>1</sup> H-NMR dla DNA                             | . 99       |  |  |  |
|                        | 9.1.2                           |            | Analiza kształtu widm <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA 1                    | 104        |  |  |  |
| 9                      | 0.2 Spel                        |            | troskopia relaksacyjna <sup>1</sup> H-NMR   | 114        |  |  |  |
|                        | 9.2.                            | 1          | Spektroskopia relaksacyjna <sup>1</sup> H-NMR kompleksu DNA-CTMA                                    | 114        |  |  |  |
|                        | 9.2.2                           |            | Spektroskopia relaksacyjna <sup>1</sup> H-NMR kompleksu DNA-DDCA                                    | 117        |  |  |  |
| 9<br>s                 | 9.3 Pom<br>surfaktant           |            | iary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup> H-NMR dla stałych kompleksów DNA-                 | 119        |  |  |  |
|                        | 9.3.1<br>niskiego               |            | Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA d<br>uwodnienia   | lla<br>120 |  |  |  |
|                        | 9.3.2 P<br>wysokiego            |            | Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA d<br>o uwodnienia | lla<br>123 |  |  |  |
|                        | 9.3.3<br>niskiego               |            | Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA d<br>uwodnienia   | la<br>126  |  |  |  |
|                        | 9.3.4<br>wyse                   | 4<br>okieg | Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA d<br>o uwodnienia | la<br>128  |  |  |  |
| 9                      | .4                              | Pom        | iar czasu relaksacji podłużnej $T_I$ w funkcji temperatury  | 131        |  |  |  |
|                        | 9.4.1                           |            | Temperaturowe pomiary czasu relaksacji podłużnej $T_I$ dla kompleksu DNA-CTMA                       | 131        |  |  |  |
|                        | 9.4.2                           | 2          | Temperaturowe pomiary czasu relaksacji podłużnej $T_I$ dla kompleksu DNA-DDCA                       | 133        |  |  |  |
| 10                     | D                               | yskus      | sja1  | 136        |  |  |  |
| 1                      | 0.1                             | Kine       | tyka hydratacji   | 136        |  |  |  |
| 1                      | 0.2                             | Izote      | erma sorpcyjna  | 137        |  |  |  |
| 1                      | 0.3                             | Pom        | iary <sup>1</sup> H-NMR w domenie czasu   | 137        |  |  |  |
| 1                      | 0.4                             | Pom        | iary <sup>1</sup> H-NMR w domenie częstości   | 138        |  |  |  |
| 11                     | W                               | /niosl     | <b>ci</b>   | 142        |  |  |  |
| Bibliografia           |                                 |            |   |            |  |  |  |
| Spis publikacja autora |                                 |            |   |            |  |  |  |
| Spis rysunków          |                                 |            |   |            |  |  |  |
| Spi                    | Spis tabel 156                  |            |   |            |  |  |  |

#### Wstęp

Odkąd odkryto rolę kwasu deoksyrybonukleinowego (w skrócie DNA) w genetyce, jest on w centrum zainteresowania wielu dziedzin nauki, bada się jego budowę, strukturę i funkcje. Wyniki tych badań dały medycynie nowe możliwości w zakresie prewencji, diagnozowania i leczenia chorób. Rozwój biotechnologii pozwolił na tworzenie zmodyfikowanych organizmów o pożądanych dla człowieka cechach. Niezwykłe właściwości DNA znalazły się w centrum zainteresowań także elektroniki i fotoniki. Od lat próbuje się tam wykorzystywać materiały biopochodne, starając się zastąpić polimery syntetyczne innymi, biodegradowalnymi, o pożądanych właściwościach. DNA, posiadający zdolność transportu ładunku, został już wykorzystany w elektronice. Jednakże hydrofilowość DNA wyklucza jego powszechne zastosowanie. Istnieją metody modyfikacji DNA, prowadzące do powstawania kompleksów DNA z innymi cząsteczkami, które to kompleksy są bardziej odporne na warunki atmosferyczne, w szczególności nie ulegają tak łatwo rozpuszczeniu w wodzie jak czyste DNA. Jedną z takich modyfikacji jest łączenie DNA w kompleksy z surfaktantami. Kompleks DNA-CTMA został z sukcesem zastosowany jako warstwa hamująca elektrony w diodach BioLED, zwiąkszając luminację o rząd wielkości (Hagen i inni, 2006).

Wpływ hydratacji na elektronowe własności kompleksów DNA-surfaktant nie jest jeszcze dokładnie zbadanym zjawiskiem. Ważną, lecz niezbadaną dotychczas cechą tych układów jest trwałość kompleksu związana z zawartością wody. Zebraniu danych doświadczalnych obrazujących proces hydratowania kompleksów DNA-surfaktant poświęcona została niniejsza praca.

W pracy opisano wyniki badań kompleksów DNA z następującymi surfaktantami: chlorkiem benzalkoniowym (BA), chlorkiem cetylotrimetyloamoniowym (CTMA) oraz chlorkiem didecylodimetyloamoniowym DDCA. Badano kinetykę i sposób hydratacji tych kompleksów oraz zachodzące pod wpływem obniżania temperatury unieruchamianie molekuł wody. Poznanie i zrozumienie tych procesów wydaje się niezbędne dla konstrukcji urządzeń technicznych opartych o DNA, a działających w różnych warunkach atmosferycznych.

W rozdziałach od 1 do 5 zawarto podstawowe informacje teoretyczne, kolejno o DNA, surfaktantach oraz kompleksach DNA-surfaktant. Następnie omówiono elementy teorii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz opisano teoretyczne modele izoterm sorpcyjnych. W rozdziale 6 opisano materiały i metody wykorzystane w zrealizowanych badaniach. Rozdziały 7 do 9 zawierają wyniki doświadczalne, przy czym w rozdziale 7 opisana została kinetyka hydratacji badanych kompleksów oraz izotermy sorpcyjne. Rozdział 8 zawiera wyniki hydratacyjnych pomiarów sygnału zaniku swobodnej precesji. W rozdziale 9 omówiono pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR w funkcji hydratacji oraz temperatury. Rozdział 10 omawia i podsumowuje uzyskane wyniki badań. Wnioski zawarte są w rozdziale 11.

#### 1 DNA

#### 1.1 Skład i struktura molekularna DNA

Makrocząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) zawierają w sobie zapis całej informacji genetycznej definiującej postać i funkcje organizmu. Różnorodność form życia obecnego na Ziemi, odpowiada istnieniu odpowiednio licznej populacji różnych makrocząsteczek DNA. Jednakże różnice te ograniczają się do kolejności występowania zasad. Własności fizykochemiczne makrocząsteczki DNA jako całości są niezależne od organizmu, z którego została wydzielona. W przeciwnym razie podstawowe procesy życiowe musiałyby różnić się nie tylko pomiędzy gatunkami taksonomicznymi, ale także poszczególnymi osobnikami.

Po raz pierwszy strukturę molekularną DNA poprawnie opisali w swojej pracy Watson i Crick, 1953. Molekuła DNA według ich modelu ma postać podwójnej helisy. Każda z nich złożona jest z monomerów – nukleotydów, będących estrami nukleozydów oraz kwasu fosforowego. Nukleozydy są z kolei związkami zasad azotowych i cukru, w przypadku DNA, deoksyrybozy (Rysunek 1.1). Fragment pojedynczej nici DNA przedstawiony jest na Rysunku 1.2.



Rys. 1.1. Cząsteczka deoksyrybozy.



Rys. 1.2. Graficzne przedstawienie fragmentu pojedynczej nici DNA.

Zasadami wchodzącymi w skład kwasu deoksyrybonukleinowego są zasady purynowe: adenina (A) i guanina (G) oraz zasady pirymidynowe: tymina (T) i cytozyna (C), przedstawione na Rysunku 1.3.



Rys. 1.3. Zasady azotowe wchodzące w skład DNA: adenina (a), guanina (b), tymina (c) i cytozyna (d).

Między zasadami mogą tworzyć się wiązania wodorowe. Ze względu na budowę chemiczną, powstawanie dwóch lub trzech koplanarnych wiązań tego typu jest możliwe tylko w parach adenina-tymina oraz guanina-cytozyna (Rysunek 1.4). Zasady należące do jednej pary nazywa się komplementarnymi. Dzięki tej własności dwie pojedyncze nici DNA o komplementarnych ciągach zasad mogą się trwale ze sobą połączyć wieloma wiązaniami wodorowymi równocześnie. Mimo, że pojedyncze wiązanie wodorowe jest znacznie słabsze od kowalencyjnego, ich liczba zapewnia stabilność makrocząsteczki złożonej z dwóch nici.



Rys. 1.4. Wiązania wodorowe pomiędzy adeniną a tyminą oraz między guaniną a cytozyną.

Na Rysunku 1.5 przedstawiono model podwójnej helisy DNA wg Watsona i Cricka, w którym helisy obrazują łańcuchy fosforanowo cukrowe, natomiast poziome poprzeczki oznaczają pary nukleotydów.



**Rys. 1.5.** Model podwójnej helisy DNA. (a) Oryginalny rysunek z pracy Watsona i Cricka (Watson i Crick, 1953) oraz (b) schemat współczesny (http://www.astrochem.org).

Ze względu na odstęp między nićmi tworzącymi helisę, można w tej ostatniej wyróżnić dwa też ukształtowane helikalnie obszary: dużą bruzdę (*major groove*) oraz małą bruzdę (*minor groove*). Bruzdy te odgrywają istotna rolę w komórce, podczas specyficznego wiązania z białkami, zachodzącego dzięki przestrzennemu dopasowaniu oraz obecności grup funkcyjnych wiążących ligand (Leszczyński i Duński, 2006).

Cząsteczki DNA mogą różnić się od siebie liczbą par zasad przypadających na jeden skręt helisy, kątem skręcenia między sąsiednimi parami zasad, skokiem helisy i kierunkiem skręcenia, tworząc w ten sposób rożne konformacje, m. in.: B-DNA, A-DNA i Z-DNA (Ry-sunek 1.6) (Frank-Kamenetskii, 2006). W następnej części opisano krótko podstawowe formy, a także kilka innych, egzotycznych, otrzymanych na drodze syntetycznej.



Rys. 1.6 Różne konformacje DNA: (a) B-DNA, (b) A-DNA, (c) Z-DNA (Neidle, 1999).

#### 1.1.1 B-DNA

W przypadku konformacji B-DNA obydwie helisy są prawoskrętne, na każdy skok helisy przypada 10 par nukleotydów. Pary nukleotydów są izomorficzne, tzn. długości wiązań glikozydowych (między deoksyrybozą a zasadą azotową) są takie same. Dzięki izomorfizmowi powstaje podwójna helisa o regularnej budowie, co umożliwia zapisanie informacji genetycznej o nieograniczonej długości.

Ponieważ grupy chemiczne nukleotydów wiążące się z sąsiednimi nukleotydami w nici DNA są różne, dla każdego nukleotydu można zdefiniować kierunek. Dzięki temu, pojedynczy łańcuch główny również posiadać będzie określony kierunek. W podwójnej helisie B-DNA splecione łańcuchy mają przeciwne kierunki, czyli są antyrównoległe. Pierścienie węglowe związanych w pary zasad wyznaczają natomiast powierzchnię płaską, zorientowaną prostopadle do podłużnej osi symetrii cząsteczki DNA.

W warunkach fizjologicznych (środowisko o pH=7, temperaturze 20°C i stężeniu NaCl około 200 mM) DNA najczęściej przyjmuje formę B. Dotychczasowe badania wskazują, że to samo dotyczy warunków *in vivo*. Niewykluczone jednak, że mogą we wnętrzu komórki występować cząsteczki DNA zawierające specjalne sekwencje nukleotydów i będące w innych konformacjach (Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.1.2 B'-DNA

Z dotychczasowych obserwacji wynika, że jedynie konformacja B-DNA niewątpliwie występuje w organizmach żywych. Jednak w przypadku, gdy w łańcuchu dominującą zasadą

azotową jest adenina, a co za tym idzie, w przeciwnym łańcuchu najczęściej występującą jest tymina, DNA przyjmuje konformacje B'. Konformacja B' jest podobna do konformacji B z tym, że powierzchnia wyznaczona przez związane w parach zasady nie jest płaska, lecz skręcona na kształt śmigła pod kątem około 20° (Frank-Kamenetskii, 2006).

Przewaga adeniny w składzie DNA powoduje silniejsze skręcenie helisy (Sinden, 1994). Inne konformacje helis DNA odkryte podczas badań biofizycznych różnią się znacznie bardziej od B-DNA, niż B'-DNA i dlatego formę B' traktuje się jako wariant formy B (Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.1.3 A-DNA

Podobnie jak w przypadku konformacji B'-DNA, konformacja A-DNA może być wymuszana poprzez sekwencję zasad budujących cząsteczkę. Tutaj również istnieją dwie komplementarne, antyrównoległe nici budujące prawoskrętną helisę. Przejście z konformacji B do A odbywa się w warunkach spadku uwodnienia (Ivanov i Krylov, 1992). Powierzchnia wiązania nukleotydów w A-DNA jest płaska, płaszczyzna ta jednak nie jest prostopadła do podłużnej osi symetrii cząsteczki DNA Dzięki temu związane pary zasad skręcając swoją płaszczyznę, odsuwają się od podłużnej osi symetrii i tworzą w ten sposób otwarty kanał wzdłuż cząsteczki DNA (Rysunek 1.6) (Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.1.4 Z-DNA

Z-DNA jest konformacją znacznie różniącą się od opisanych powyżej. Składa się ona również z dwóch antyrównoległych nici, jednak są one zwinięte lewoskrętnie, w przeciwieństwie do prawoskrętnie zwiniętych nici w B-DNA, B'-DNA czy A-DNA. Powstanie tej konformacji wymaga odpowiedniej sekwencji zasad azotowych, ale także innych czynników zewnętrznych, przez co nie powstaje ona w warunkach fizjologicznych. Jej biologiczne znaczenie nie jest znane (Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.1.5 ps-DNA

Komplementarne nici podwójnej helisy DNA mogą być również ułożone równolegle. Taką konformację nazywamy ps-DNA (*paralel stranded DNA*). Powstaje ona w przypadku, gdy jedynymi zasadami wchodzącymi w skład nukleotydów są adenina i tymina, a ich sekwencja wyklucza antyrównoległe związanie łańcuchów (Rippe i Jovin, 1992). Jeśli warunek ten jest spełniony, to ps-DNA może formować się nawet w warunkach fizjologicznych. Jest on prawoskrętny, jednak tworzone pary AT są nazywane odwróconymi parami Watsona-Cricka. Możliwe jest również tworzenie ps-DNA z równoległych nici przy innych sekwencjach, na przykład w środowisku kwaśnym, w którym może dojść do tworzenia podwójnej helisy wiązanej protonowanymi parami CC+, czyli parami cytozyny z przyłączonym protonem (Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.1.6 Tripleksy DNA

Jeśli DNA składa się z nici homopurynowej oraz homopiramidynowej, homopiramidynowy oligonukleotyd może związać się z istniejącą cząsteczką DNA, wiążąc się w głębokiej bruździe i tworząc z obecnymi w DNA zasadami tzw. pary Hoogsteena (Moser i Dervan, 1987). Zasady budujące DNA tworzą wtedy tzw. triady: C<sup>+</sup>GC, AAT, TAT, GGC pokazane na Rysunku 1.7. Tak powstałą strukturę nazywa się tripleksem DNA. Powstawanie tripleksów DNA może zachodzić jedynie w szczególnych warunkach (Frank-Kamenetskii, 2006).



Rys. 1.7. Przykłady związanych wodorowo zasad azotowych budujących tripleksy: (a) C+GC, (b)AAT, (c) TAT, (d) GGC.

#### 1.1.7 Kwadrupleksy DNA

Nukleotydy, w skład których wchodzi guanina, tworzą najbardziej różnorodne struktury. Mogą tworzyć pary GG, jednak najbardziej stabilną w obecności kationów (w szczególności potasowych) otrzymaną strukturą jest związek czterech guanin (G4), widoczny na Rysunku 1.8. Struktura taka umożliwia powstawanie czterech zwiniętych helis, nazywanych kwadrupleksem DNA.



Rys. 1.8. Cztery związane guaniny umożliwiające powstawanie kwadrupleksu DNA.

Inną strukturą budującą kwadrupleksowe DNA jest zbudowana z cytozyny. Dwa równoległe łańcuchy połączone protonowanymi parami cytozyny (CC<sup>+</sup>) tworzą podwójną helisę i wiążą się antyrównolegle z identyczną parą (Gehring i inni, 1993; Frank-Kamenetskii, 2006).

#### 1.2 Budowa RNA

Cząsteczka kwasu rybonukleinowego (RNA), z chemicznego punktu widzenia, jest bardzo podobna do DNA, jednak w przeciwieństwie do niego jest molekułą jednoniciową (z wyjątkiem występowania jako nośnik informacji genetycznej u niektórych wirusów). Ta cecha RNA pozwala mu przybierać postaci złożonych struktur i pełnić dodatkowo inne role w komórce, w przeciwieństwie do DNA, które służy jedynie jako magazyn informacji. Różnica tkwi także w budowie chemicznej, mianowicie zamiast deoksyrybozy występuje ryboza, w której na 2' pozycji mieści się grupa OH, natomiast w przypadku deoksyrybozy sam wodór. Inną różnicą jest występowanie zasady azotowej uracylu (U) (Rysunek 1.9) zamiast tyminy (T). Te dwie cząsteczki różnią się jedynie dodatkową grupą metylową obecną w tyminie.



Rys. 1.9. Uracyl, wchodzący w skład RNA

#### 1.3 Znaczenie biologiczne DNA

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) ma ogromne znaczenie dla organizmów żywych. Gromadzi bowiem, reprodukuje i umożliwia realizację informacji genetycznych. DNA jest heteropolimerem, w skład którego wchodzą cztery rodzaje nukleotydów, których sekwencja jest kodem genetycznym. Molekuły zasad (adenina A, tymina T, cytozyna C i guanina G) są więc pewnego rodzaju alfabetem umożliwiającym zapisanie w postaci sekwencji dowolnej informacji genetycznej. Ciąg ułożony z nukleotydów podzielony jest z kolei na sekcje, również posiadające biologiczne znaczenie, nazywane genami. Bezpośrednie informacje zawarte w genach, to informacje o aminokwasach mających budować białka wchodzące w skład danego organizmu żywego (Frank-Kamenetskii, 2006).

W jądrze komórkowym informacja genetyczna przepisywana jest do RNA, co nazywane jest transkrypcją. Informacyjny RNA (*messenger* RNA, mRNA) jest dalej przetwarzany w rybosomach, gdzie wykorzystując niesione w kodzie genetycznym informacje, syntetyzowane są białka. Proces ten nazywany jest translacją. Uważa się, że przepływ informacji w komórce (DNA  $\rightarrow$  RNA  $\rightarrow$  białko) jest jednokierunkowy (Crick, 1970).

Trudno przecenić znaczenie DNA. Z tego też powodu jest on od lat 50-tych XX wieku intensywnie badany i leży w zakresie zainteresowań nie tylko genetyki i medycyny, ale także biologii, fizyki i chemii. Uczestniczy w kluczowych dla organizmów żywych procesach: transkrypcji i replikacji. Obydwa te procesy są bardzo skomplikowane, ze względu na złożoną strukturę chemiczną DNA oraz RNA, które także uczestniczy w transkrypcji. Musi zostać spełniony szereg warunków, aby te procesy mogły zajść. Jednym z wymagań jest, by łańcuchy DNA miały odpowiednie zakończenia. Z jednej strony helisa musi kończyć się grupą 3'-hydroksylową (3'-end), a z drugiej grupą 5'-fosforanową (5'-end). W organizmach żywych synteza DNA nie może się rozpocząć, jeśli nie jest obecny koniec 3'. Inaczej jest w przypad-ku transkrypcji. Synteza DNA inicjowana z RNA może odbywać się bez takiego ograniczenia (Murray i inni, 2008).

#### 1.3.1 Replikacja

Komórki budujące organizmy żywe cyklicznie się dzielą. Aby przekazać informacje genetyczną każda z nich przed swoim podziałem, musi skopiować swój genom, czyli całość materiału genetycznego (Murray i inni, 2008). Odbywa się to przez replikację nici DNA. Dzięki komplementarności nukleotydów na każdym z dwóch łańcuchów nici, każdy z nich może pełnić rolę matrycy. Jeśli wyjściowa nić DNA zostanie rozdzielona na dwa łańcuchy, to do każdego z nich może zostać dołączony uzupełniający łańcuch nukleotydów. W wyniku

tego procesu powstaną dwie identyczne podwójne helisy DNA, każda z nich zawierać będzie jeden łańcuch stary i jeden nowy. Replikacja wymaga więc przed inicjalizacją rozdzielenia nici helisy (denaturacji). DNA, dzięki dużej liczbie wiązań pomiędzy zasadami azotowymi, jest w warunkach fizjologicznych cząsteczką stabilną. Energia pojedynczego wiązania nie jest jednak duża i z łatwością może ono zostać zerwane. Pracę tę wykonują wyspecjalizowane białka inicjalizujące. Łączą się one w miejscach, w których sekwencja nukleotydów na to pozwala, zwanych miejscami początku replikacji lub *ori* (ang. *origin*). Łatwiej rozplatane będą odcinki zawierające więcej par AT niż GC, ze względu na mniejszą ilość wiązań łączą-cych zasady. Dalej w procesie replikacji zaangażowane jest coraz więcej wyspecjalizowanych białek (zwanych "maszyną białkową"). Rozwinięta z jednej strony nić DNA zaczyna tworzyć widełki replikacyjne. Rozplatanie nici rozpoczyna się w wielu miejscach na raz. W każdym takim miejscu powstaje para widełek skierowanych przeciwnie i przesuwających się w miarę rozplątywania odpowiednio w lewo i prawo, a w miejscach gdzie łańcuch jest już pojedynczy, zachodzi syntetyzowanie komplementarnego łańcucha, dlatego proces ten nazywany jest replikacją dwukierunkową (Fouche i inni, 2006).

Przyłączanie komplementarnych nukleotydów do rozwiniętego łańcucha w widełkach dokonywane jest przez polimerazę DNA. Działając między końcami 3' i 5' starego łańcucha tworzy ona wiązania fosfodiestrowe budując w ten sposób nowy łańcuch. Przyłączane nukleotydy mają postać wysokoenergetycznych trifosforanów i są dzięki temu źródłem energii odbywającej się polimeryzacji. Polimeraza nie odłącza się każdorazowo po związaniu jednego nukleotydu, lecz przesuwa się kolejno, w kierunku polimeryzacji, budując nowe fragmenty łańcucha w kierunku od końca 5' do końca 3'. Ponieważ łańcuchy DNA są chemicznie antyrównoległe, a syntetyzowanie nowych łańcuchów odbywa się równolegle i jednocześnie, dlatego w miarę przesuwania się widełek replikacyjnych, jeden z łańcuchów budowany jest w sposób ciągły, zgodnie z kierunkiem syntezy 5' $\rightarrow$ 3' (zwany nicią wiodącą), a drugi w kierunku przeciwnym (nić opóźniona). Widełki replikacyjne są więc antysymetryczne. Budowanie nici opóźnionej odbywa się poprzez syntetyzowanie krótkich odcinków (zgodnie z kierunkiem syntezy 5'  $\rightarrow$  3'), zwanych fragmentami Okazaki, a następnie przesunięcie się w kierunku przeciwnym do kierunku syntetyzowania. Mechanizm ten nazywa się ściegiem wstecznym i widoczny jest na Rysunku 1.10.



Rys. 1.10. Schemat replikacji nici DNA.

Polimeraza DNA, dołączając do łańcucha coraz to nowe nukleotydy, sprawdza jednocześnie poprawność ostatniej pary zasad. Pozwala to na wykrycie i zminimalizowanie błędów podczas replikacji. Jest to jednak jednocześnie utrudnieniem, ponieważ polimeraza potrzebuje do działania odcinka już istniejącego. Do inicjalizowania replikacji musi więc służyć inny mechanizm. Odbywa się on z udziałem enzymu nazywanego prymazą. Syntetyzuje on na podstawie matrycy krótki odcinek RNA (około 10 nukleotydów), nazywany starterem. Jak wiadomo, budowa RNA jest zbliżona do DNA, możliwe jest więc zbudowanie pojedynczego łańcucha RNA komplementarnego do DNA. Tak powstały krótki odcinek RNA służy polimerazie DNA jako miejsce rozpoczęcia tzw. elongacji. O ile w przypadku nici wiodacej wystarczy jeden starter do inicjacji, to w przypadku nici opóźnionej potrzebne jest ciągłe działanie prymazy i powstawanie nowych starterów, w celu inicjowania tworzenia nowych fragmentów Okazaki. Aby nić opóźniona stała się ciągłą nicią DNA, potrzebne jest działanie trzech enzymów. Pierwszy z nich, nukleaza, usuwa niepotrzebny już starter RNA. Kolejny, naprawcza polimeraza, wykorzystując sąsiedni fragment Okazaki, wprowadza nowe deoksyrybonukleotydy, czyli związki deoksyrybozy z zasadą azotową. Trzeci enzym, ligaza DNA, wykorzystując ATP lub NADH, wiąże fosforan na końcu 5' z końcem 3' kolejnego fragmentu (Murray i inni, 2008).

#### 1.3.2 Transkrypcja DNA

Transkrypcja jest obok translacji procesem dzięki któremu informacja genetyczna z DNA jest przekazywana do poszczególnych miejsc w komórce i interpretowana jako instrukcje potrzebne do syntetyzowania nowych białek. Pomimo różnic w budowie chemicznej DNA i RNA, język za pomocą którego zapisywane są informacje jest taki sam. Pozwala to na bezpośrednie przepisywanie sekwencji DNA na sekwencję RNA. Proces transkrypcji wykazuje pewne podobieństwa do replikacji. Również tutaj, mechanizm rozpoczyna się od rozplecenia krótkiego odcinka nici DNA. Dzięki temu odsłonięte zostają zasady azotowe i jeden z łańcuchów może dalej służyć jako matryca. Do nowo powstającego RNA dołączane są kolejno rybonukleotydy, spełniające warunek komplementarności względem istniejącej nici DNA (Murray i inni, 2008).

Najbardziej istotną różnicą między replikacją a transkrypcją jest to, że w przypadku transkrypcji, nowo powstałe nici RNA nie są wiązane wodorowo do matrycy, lecz są od razu usuwane, a w ich miejscu zostaje odtworzona komplementarna nic DNA. Z tego też względu produkowane odcinki RNA są o wiele krótsze. Cząsteczki RNA maja długość maksymalnie kilku tysięcy nukleotydów, co jest liczbą niewielka w porównaniu do 250 milionów par zasad które mogą budować cząsteczkę DNA ludzkiego chromosomu (Murray i inni, 2008).

#### 1.4 Uwodnienie DNA

Franklin i Gosling, 1953, zaobserwowali, że uwodnienie zmienia rentgenogramy DNA. Kolejne badania potwierdzały istnienie powłok hydratacyjnych (*hydration shell*) z cząsteczek wody zachowujących się inaczej niż woda swobodna oraz wpływ tej hydratacji na konformację. Obserwowanie wody wiązanej do DNA możliwe jest za pomocą krystalografii rentgenowskiej oraz metod NMR (Liepinsh i inni, 1992; Edwards i inni, 1992). Zrozumienie mechanizmów uwadniania jest niezwykle ważne, ponieważ tworzone wiązania wodorowe pomiędzy wodą a cząsteczką DNA mają wpływ na wiązania między DNA a innymi cząstecz-kami DNA, a także białkami lub lekami. Szereg czynników wpływa bezpośrednio na uwod-nienie DNA. Na przykład, DNA w konformacji B jest uwodniony bardziej, niż DNA w konformacji A, w tych samych warunkach (Breslauer i inni, 1987). DNA zbudowany z równole-głych łańcuchów uwodniony jest mniej od DNA o łańcuchach ułożonych antyrównolegle, zaś homopolimerý DNA utworzone z par nukleotydów AT mają inne właściwości uwadniania od homopolimerów utworzonych z par AG. Dupleksy DNA składające się w 55-60 % par AT wykazują znacząco niższy poziom uwodnienia (Breslauer i inni, 1987). Zwiększenie względ-nego udziału par AT powoduje także większą hydratację (Neidle, 1999).

Molekuły wody mogą wiązać się zarówno z zasadami azotowymi, cukrem bądź resztą fosforanową. Wiążąc się ze sparowanymi zasadami woda zlokalizowana jest w okolicach małej i dużej bruzdy. Cząsteczka wody wiąże się wiązaniem wodorowym z atomami azotu, tlenu lub wodoru wchodzącymi w skład zasad, co jest widoczne na Rysunku 1.11. Badania d[GAATTC]<sub>2</sub> wykazały, że woda wiązana jest w małej bruździe, w regionie AATT (Drew i inni, 1981). Molekuła wody wiąże się poprzez wodór wiązaniem wodorowym z atomem N3 w zasadzie purynowej lub O2 w zasadzie piramidynowej, co jest widoczne na Rysunku 1.12a. Dodatkowo wiązanie wodorowe może nastąpić z cząsteczką O4' w cukrze. W przypadku większych rozmiarów małej bruzdy (jak na przykład dla d[CCAACGTTGG]<sub>2</sub>) może się w niej utworzyć podwójny rząd molekuł wody (Rysunek 1.12b) (Prive i inni, 1991). Woda może gromadzić się także w dużej bruździe, np. w d[CGATCGATCG]<sub>2</sub> (Rysunek 1.12c) (Grzeskowiak i inni, 1991).



**Rys. 1.11.** Schemat przyłączania molekuł wody poprzez wiązania wodorowe do par zasad wchodzących w skład DNA: (a) adenina – tymina oraz (b) guanina – cytozyna (Neidle, 1999).





**Rys. 1.12.** Uwodnienie B-DNA. Cienkie linie symbolizują wiązania wodorowe. Woda wiąże się do zasady jednym wiązaniem wodorowym; (a) Wiązanie wody w małej bruździe dla d[CGCGAATTCGCG]<sub>2</sub>. Wodę wiązana z miejscami pierwotnie wiążącymi symbolizują duże kule. Woda wtórnie związana oznaczona jest małymi kulami. (b) Podwójny rząd wody związanej w małej bruździe w d[CCAACGTTGG]<sub>2</sub>. (c) Woda wiązana w dużej bruździe w d[CGATCGATCG]<sub>2</sub>. Dwie cząsteczki związane z guaniną, wiążą się z wodą związaną z tyminą. (d) Woda wiążąca się do grup fosforanowych w d[CTCTCGAGAG]<sub>2</sub> (Neidle, 1999).

W takcie przyłączania cząsteczek wody do nici DNA zbudowanych z takich samych par zasad azotowych, cząsteczki te tworzą zgrupowania kilku lub kilkunastu nazywanych klastrami. W Tabeli 1.1 przedstawiono lokalizacje wody wiązanej z zasadami azotowymi wchodzącymi w skład DNA, w trakcie uwadniania konformacji B-DNA, A-DNA oraz Z-DNA. Dla zasady purynowej budującej B-DNA hydratacja następuje w dwóch miejscach wiążących w małej bruździe i w jednym w dużej bruździe. Zasady pirymidynowe mają za to jedynie po jednym miejscu wiążącym w każdej bruździe. Woda zaznaczona przy węglu C6 w tyminie to woda uwięziona między właśnie tym węglem, a atomem O2P w reszcie fosforanowej. W przypadku konformacji A-DNA wiązanie wody jest podobne, jednak uwodnienie w dużej bruździe jest dużo większe niż w małej, co jest w szczególności widoczne dla guaniny (Eisenstein i Shakked, 1995), co również widoczne jest w Tabeli 1.1. Uwadnianie konformacji Z-DNA różni się od innych, ze względu na lewoskrętność helisy. W przypadku guaniny, w miejscu małej bruzdy woda wiąże się częściej z atomem N2 niż z N3. W dużej bruździe natomiast wiążąca się woda tworzy poczwórną strukturę przestrzenną: w dwóch miejscach wiążącą się z atomem O6, a w dwóch z N7 (Neidle, 1999).



**Tabela 1.1.** Lokalizacja cząsteczek wody wiązanych z zasadami azotowymi budującymi DNA. W każdym przypadku duża bruzda znajduje się w lewym górnym rogu od zasady (Neidle, 1999).

W przypadku przyłączania molekuł wody do reszt fosforanowych klastry już nie są tworzone, geometria struktur utworzonych przez związaną wodę jest bardziej skomplikowana i silniej zależna od konformacji (Neidle, 1999).

Konformacja B-DNA w stanie natywnym jest uwodniona do poziomu powyżej 30% masy. Sieć utworzona przez związaną wodę utrzymuje typowe dla koformacji B wielkości bruzd. Dehydratacja poniżej poziomu 30% powoduje utratę tej sieci i zmianę rozmiarów bruzd. Duża bruzda staje się węższa i głębsza, mała bruzda natomiast szersza i płytsza. Zmiany te powodują przejście do konformacji A-DNA (Neidle, 1999).

Pierwszym zbadanym uwodnieniem DNA o konformacji A było uwodnienie oligomeru o sekwencji d[GGBr<sup>5</sup>UABr<sup>5</sup>UACC]<sub>2</sub> (Kennarda i inni, 1986). Woda tworzy tutaj w dużej bruździe pentagonalne pierścienie, co jest widoczne na Rysunku 1.13. Dla niektórych oligomerów uwodnienie było silnie zależne od temperatury (dla sekwencji d[GGGTACCC]<sub>2</sub>) (Eisenstein i inni, 1990), w innych przypadkach jest od temperatury niezależne (dla d[GGGCGCCC]<sub>2</sub>) (Eisenstein i Shakked, 1995). W przypadku kilku struktur zawierających parę CG, dochodzi do tworzenia łańcucha z molekuł wody w małej bruździe, które pośredniczą w oddziaływaniu pary zasad CG z łańcuchem fosforanowo cukrowym. Dochodzi więc do tak zwanego oddziaływania bruzda-bruzda oraz bruzda-szkielet (*groove-backbone interaction*).



**Rys. 1.13.** Uwodnienie A-DNA na przykładzie d $[GGBr^{5}UABr^{5}UACC]_{2}$ . Cienkie linie symbolizują wiązania wodorowe. Woda przedstawiona jest za pomocą kul (Neidle, 1999).

Tworzenie klastrów wokół eksponowanych atomów dla konformacji A i B wygląda podobnie. Różnica pojawia się w różnej ilości obsadzeń w dużej i małej bruździe. W przypadku B-DNA woda gromadzi się mniej więcej równomiernie w małej i dużej bruździe, natomiast w A-DNA bardziej obsadzana jest duża bruzda. Wykazywano również, że woda wiąże się z helisą B-DNA słabiej niż z helisą A-DNA. W przypadku A-DNA tworzą się także mostki wodne między molekułami wody związanymi z sąsiednimi resztami fosforanowymi (Neidle, 1999).

Mechanizm uwadniania helisy Z-DNA różni się znacząco od uwadnia A-DNA oraz B-DNA. W helisie Z-DNA woda penetruje głęboko małą bruzdę. Sieć molekuł wody powstaje z cząsteczek powiązanych przede wszystkim z atomami zasad, z obu nici jednocześnie (Rysunek 1.14a). W przypadku niektórych sekwencji nukleotydów woda może tworzyć mostki pomiędzy zasadami azotowymi z obu przeciwległych nici, łącząc na przykład dwa atomy O2 lub dwa atomy N4 cytozyny w parach GC (Rysunek 1.14b). Stwierdzono również tworzenie mostków wodnych pomiędzy sąsiednimi helisami, które powstają gdy cząsteczka wody wiąże się z resztami fosforanowymi z dwóch sąsiednich helis Z-DNA (Rysunek 1.15).



b)

a)



Rys. 1.14. Uwodnienie helisy Z-DNA dla dwóch różnych sekwencji: (a) d[CGU'ACG]<sub>2</sub> oraz (b) d[CGCGCG]<sub>2</sub>.

W trakcie uwadniania B-DNA i A-DNA tworzą się klastry wody. W przypadku Z-DNA tworzona struktura związanych molekuł wody jest już bardziej złożona od tej tworzonej z B-DNA oraz A-DNA. W małej bruździe wiązana woda łączy się z atomem N2 guaniny, a nie z N3 jak w przypadku A-DNA i B-DNA. Przyłączanie wody do puryn następuje z kolei na trzy główne sposoby, miejscach zlokalizowanych na zewnątrz płaszczyzn zasad azotowych (Neidle, 1999).



**Rys. 1.15.** Tworzenie mostków wodnych miedzy helisami Z-DNA (oznaczonych literami alfabetu). Cyfry rzymskie numerują kolejność nukleotydów (Neidle, 1999).

#### 1.5 Zastosowanie DNA w elektronice i fotonice

W ciągu ostatnich lat podejmowano skuteczne próby zastosowania DNA w elektronice i fotonice. Udało się je wykorzystać jako element diod elektroluminescencyjnych (Gomez i inni, 2011), tranzystorów polowych (Li i inni, 2004), czy światłowodów (Yaney i inni, 2005).

Mechanizm transportu nośników ładunku w DNA jest od wielu lat intensywnie badany. Powstało wiele prac sugerujących z pozoru sprzeczne wnioski, że DNA jest przewodnikiem, półprzewodnikiem lub izolatorem. Rozbieżności te biorą się z faktu, że przewodnictwo elektryczne w bardzo silnym stopniu zależy od czynników takich jak uwodnienie, temperatura, długość, sekwencja nukleotydów, stopień w jakim komplementarne nici DNA są połączone. Zmiana konformacji DNA może zarówno zwiększać jak i zmniejszać przewodność (Genereux i Barton, 2010).

W elektronice opartej na materiałach organicznych DNA stosowane jest, podobnie jak inne polimery, w postaci cienkiej warstwy uzyskiwanej metodą *spin-coating* (Ye i inni, 2000). Kwas deoksyrybonukleinowy jest jednak związkiem hydrofilowym, co wiąże się z silną rozpuszczalnością w wodzie. Właściwość ta utrudnia tworzenie cienkich warstw, a także negatywnie wpływa na przydatność elementów w których zastosowano DNA (poprzez degradację chemiczną DNA (Bonnet i inni, 2010)), używanych w różnych warunkach atmosferycznych. Z tego też powodu podjęto próby zastosowania kompleksów DNA z surfaktantami. Otrzymane w ten sposób struktury są rozpuszczalne w alkoholach i rozpuszczalnikach niepolarnych (Sergeyev, 1997), zachowują jednak pożądane właściwości elektryczne (Wang i inni, 2001). Wykorzystując kompleks DNA z surfaktantem CTMA jako warstwę hamującą elektrony, udało się już zbudować diodę elektroluminescencyjną (Hagen i inni, 2006). Ciągle podejmowane są próby znalezienia kompleksów DNA z innymi surfaktantami o bardziej ko-rzystnych własnościach elektrycznych, a jednocześnie bardziej odpornych na zmiany warun-ków atmosferycznych jak temperatura lub wilgotność.

#### 2 Surfaktanty

Surfaktany (*surface active agents*), zwane inaczej środkami powierzchniowo czynnymi, są związkami amfifilowymi. Oznacza to, że składają się z dwóch części: jednej rozpuszczalnej w danym rozpuszczalniku – liofilowej oraz drugiej, nierozpuszczalnej – liofobowej. W przypadku, gdy rozpuszczalnikiem jest woda części te nazywa się hydrofilową (łatwo rozpuszczalną w wodzie) i hydrofobową (łatwo rozpuszczalną w rozpuszczalnikach niepolarnych i trudno rozpuszczalną w wodzie). Hydrofilowa grupa jest najczęściej przedstawiana jako jonowa bądź dipolowa głowica, natomiast hydrofobowa jako pojedynczy, podwójny, bądź (rzadziej) rozgałęziony węglowodorowy ogon.

Ze względu na ładunek grup chemicznych w głowicy polarnej, surfaktanty dzieli się na niejonowe (nie mają naładowanych grup głowicy), anionowe i kationowe (o odpowiednio ładunku ujemnym i dodatnim) oraz zwitterjonowe (o głowicy zawierającej przeciwnie naładowane grupy chemiczne).

Cechą surfaktantów jest tworzenie agregatów w roztworze. Gdy stężenie cząsteczek amfifilowych jest nieduże, występują one jako monomery. Pojedyncze cząsteczki surfaktantu otaczane są wtedy przez cząsteczki wody, które tworzą "klatkę" powiązaną wiązaniami hydrofobowymi. Dla wyższych stężeń, następuje samorzutna asocjacja cząsteczek, prowadząca do tworzenia agregatów o rozmiarach koloidalnych, zwanych micelami. W środowisku wodnym micela tworzy agregat z hydrofilowymi głowicami wystawionymi do otaczającego ją solwentu, kierując hydrofobowe ogony ku swojemu środkowi. Taki typ miceli nazywa się micelą prostą (*oil-in-water micelle*). W środowisku niepolarnym wystawienie głowic hydrofilowych do otoczenia jest energetycznie niekorzystne, dlatego powstaje układ inwertowany (*water-in-oil*), w którym grupy hydrofobowe skierowane są na zewnątrz, a hydrofobowe głowice ukryte są we wnętrzu miceli (Harańczyk, 2013).

W Tabeli 2.1 umieszczono przykłady granic fazowych wraz z nazwami tworzonych koloidów oraz przykładami. W dalszej części rozważane będzie zachowanie i rola surfaktantów na granicy ciecz – ciecz, gdzie jedną z cieczy jest najczęściej woda. Tabela 2.1. Podział układów koloidalnych ze względu na stan skupienia (Sobczyk i Kisza, 1981; Harańczyk, 2013).

| Faza        | Faza Rod<br>rozproszona kolo | Rodzaj<br>koloidu             | Deers data day                                    | Nazwa                                     |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|---|---|
| ciągła      |                              |                               | РГДукладу   | szczegółowa                               |
|             | gaz                          |                               | nie istnieje                                      |   |
| gaz         | ciecz                        | aerozole<br>(gazozole)        | mgła, chmury,<br>opary                            | aerozole cie-<br>kłe (mgły<br>koloidalne) |
|             | ciało stałe                  |                               | dym, kurz   | aerozole stałe<br>(dymy<br>koloidalne)    |
|             | gaz                          |                               | piana mydlana                                     | piany                                     |
| ciecz       | ciecz                        | zole (roztworu<br>koloidalne) | mleko, białko                                     | lizole,<br>emulsje<br>(emulsoidy)         |
|             | ciało stałe                  |                               | zole tlenków<br>metali, wodoro-<br>tlenków, farby | zawiesiny<br>koloidalne<br>(suspensoidy)  |
|             | gaz                          | pirozole                      | Pumeks, styro-<br>pian                            | piany stałe                               |
| ciało stałe | ciecz                        |                               | kwarc mleczny,<br>żelatyna, sery                  | piany stałe<br>(emulsje<br>stałe), żel    |
|             | ciało stałe                  |                               | szkło rubinowe,<br>perły fosforowe                | zole stałe                                |

Tworzenie miceli rozpoczyna się przy pewnej progowej wartości koncentracji surfaktantów, zwanej CMC (*Critical Micelle Concentration*), będącej jedną z ważniejszych wielkości charakteryzujących surfaktanty. Powyżej CMC spadek entropii wywołany gromadzeniem się molekuł surfaktantu nie jest tak znaczny, jak spadek entropii wywołany tworzeniem klatki z molekuł wody otaczającej monomer. Po wprowadzeniu surfaktantu gromadzi się on w międzyfazie, obniżając entalpię swobodną przez obniżenie energii powierzchniowej międzyfazy (iloczynu powierzchni i napięcia powierzchniowego) oraz usunięcie hydrofobowych części
molekuły surfaktantu z pobliża środowiska wodnego. Gdy pokrycie powierzchniowe surfaktantu zwiększy się i swobodna energia powierzchniowa (napięcie powierzchniowe) obniży się, molekuły surfaktantu zaczynają agregować w micele, dalej zmniejszając energię swobodną układu przez dalsze zmniejszenie powierzchni styku części hydrofobowych surfaktantu z wodą. Zwiększanie ilości surfaktantu powyżej CMC zwiększa jedynie liczbę miceli. (Harańczyk, 2013)





Kształt surfaktantów wchodzących w skład miceli opisuje się za pomocą parametru zwanego CPP (*Critical Packing Parameter*) (Israelachvili i inni, 1976), którego wartość określa równanie

$$CPP = \frac{V}{l_{\max}a},$$
 2.1

gdzie V to objętość zajmowana przez hydrofobowy łańcuch, a to pole powierzchni przekroju poprzecznego hydrofilowej głowicy, a  $l_{max}$  to długość łańcucha hydrofobowego. Powyższe wielkości przedstawione są na Rysunku 2.1 (Holmberg i inni, 2002).

W koloidach dochodzi do uporządkowania i tworzenia struktur przedstawionych na Rysunku 2.2 (Holmberg i inni, 2002).



Rys. 2.2. Fazy koloidów (Holmberg i inni, 2002).

## **3** Kompleksy DNA – surfaktant

Mieszaniny rozpuszczalnych w wodzie polimerów oraz surfaktantów są obecnie układami szeroko stosowanymi w wielu gałęziach przemysłu, takich jak farmacja, technologia żywienia, kosmetologia, chemia przemysłowa. Wśród nich układy biopolimerów i surfaktantów są intensywnie badane, ze względu na ich szczególne właściwości. Oddziaływanie pomiędzy amfifilowymi cząsteczkami a biopolimerami zyskały zainteresowanie nie tylko ze strony chemii fizycznej, ale także biomedycyny, elektroniki i fotoniki (Dias i inni, 2000).

Aby zastosować DNA w elektronice bądź fotonice należy wytworzyć z niego cienką warstwę. Warstwy te tworzy się najczęściej techniką *spin-coating*, która wymaga stosowania dla substancji nanoszonej szybko parującego rozpuszczalnika (Strawhecker i inni, 2001). Utrudnia to zastosowanie DNA rozpuszczalnego w wodzie. Z tego też powodu zaczęto owocnie stosować w tych dziedzinach techniki DNA w kompleksach z surfaktantami, które rozpuszcza się w szybciej parujących rozpuszczalnikach.

W mieszaninach cząsteczka DNA łączy się z cząsteczką surfaktantu wiązaniem jonowym tworząc kompleks. Kompleksy DNA i kationowych surfaktantów mają wiele zastosowań. Surfaktanty były używane do renaturacji (ponownego łączenia komplementarnych nici DNA, po uprzedniej denaturacji, czyli separacji tych nici) i ligacji DNA (łączenia dwóch fragmentów podwójnej helisy DNA), w tym celu użyto m.in. CTAB (bromku cetylotrimetyloamoniowego) (Pontius i Berg, 1991). Podejmowano także próby zastosowania kompleksów DNA-surfaktant do dostarczania informacji genetycznej do komórek (tzw. transfekcja). W tym celu wykorzystywano układy koloidalne, w których fazą rozpraszaną był kompleks DNA-surfaktant. Rozmiar i gęstość ładunku uniemożliwia bowiem czystemu DNA przedarcie się przez błony biologiczne i dotarcie do wnętrza komórki (Lasic, 1997; Ghirlando i inni, 1992).

Surfaktanty kationowe, o głowicy naładowanej dodatnio i hydrofobowym ogonie, są szeroko stosowane dla transfekcji drogą niewirusową, dzięki ich zdolności przestrzennego zwijania DNA, przyłączaniu do błon komórkowych oraz ich destabilizowaniu. Rozmiar głowy hydrofilowej oraz długość hydrofobowego ogona oraz termiczna stabilność tworzonych struktur, umożliwiają surfaktantom kationowym większe upakowanie powstających kompleksów z DNA i dzięki temu pozwalają na zachodzenie zjawiska transfekcji. Efektywność transfekcji kompleksów DNA-surfaktant jest ściśle związana z ich właściwościami, wynikającymi z oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych oraz geometrii tworzonej struktury. Możliwość łatwej zmiany parametrów kompleksów poprzez używanie różnych surfaktantów jest

powodem dla którego te układy biologiczne mają przewagę nad całkowicie syntetycznymi układami (Lasic, 1997).

Wykazano zależność pomiędzy strukturą surfaktantów kationowych a efektywnością transfekcji. Na przykład CTAB (bromek cetylotrimetyloamoniowy), surfaktant z jednym ogonem, jest bardziej cytotoksyczny i mniej zdolny do transfekcji niż surfaktanty z dwoma ogonami. Struktury tworzone przez kompleksy DNA oraz surfaktanty kationowe różnią się w zależności od zastosowanego surfaktantu. Za pomocą mikroskopii elektronowej stwierdzono tworzenie miceli, faz typu prętów lub toroidalnych (Sternberg i inni, 1994).

Surfaktanty stosowane w badaniach referowanych w niniejszej pracy, dysocjują w wodzie na anion chloru oraz część kationową, posiadającą dodatni ładunek na atomie azotu. Również DNA rozpuszczone w wodzie dysocjuje na aniony sodu (przyłączone do ujemnie naładowanej reszty fosforanowej) oraz ujemnie naładowane nici, tworząc w ten sposób tzw. polielektrolit (elektrolit, w którym przynajmniej jeden z nośników ładunku jest polimerem).

Jeżeli w tym samym roztworze obecne będą cząsteczki DNA oraz surfaktantu, dochodzić będzie na drodze wymiany jonowej do wiązania się molekuł. Elektrostatyczne łączenie DNA oraz surfaktantów, zachodzi w roztworach, w których koncentracja surfaktantu, jest poniżej poziomu CMC. Ilość tworzonych wiązań jest w tym przypadku liniowo zależna od koncentracji surfaktantu. Istnieje jednak pewna graniczna koncentracja (niższa od CMC), zwana CAC (*Critical Association Concentration*), powyżej której łączeniu DNA i surfaktantów towarzyszyć będzie agregacja tworzonych kompleksów. Jeżeli koncentracja DNA będzie dostatecznie duża, może dojść do wytrącania tworzonych kompleksów w postaci osadu (Holmberg i inni, 2002).

## 3.1 Konformacja DNA w środowisku mieszanin kationowych na przykładzie DNA-CTAB

Zastosowane eksperymenty synchrotronowe SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) do badań nad samoporządkującymi się strukturami utworzonymi przez kompleksy DNAsurfaktant o rozmiarach rzędu setek nanometrów pozwoliły stwierdzić tworzenie się fazy lamelarnej  $L_{\alpha}$  oraz inwertowanej (typu woda-w-oleju) fazy heksagonalnej H<sub>II</sub>, ułożonej z podłużnych nici DNA naprzemiennie z tubularnymi micelami utworzonymi z surfaktantów (Koltover i inni, 1998). Przejście z fazy lamelarnej do inwertowanej heksagonalnej może być realizowane dwiema drogami. Pierwsza to zmiana krzywizny monowarstwy poprzez dodanie neutralnego lipidu (*helperlipid*). Druga to zmniejszenie sztywności błony poprzez dodanie heksanolu oraz neutralnego lipidu. Obydwa sposoby wymuszania przejścia fazowego, wraz z omawianymi fazami, lamelarną  $L_{\alpha}$  oraz inwertowaną heksagonalną  $H_{II}$ , przedstawiono schematycznie na Rysunku 3.2 (Koltover i inni, 1998).

Istnieje zależność pomiędzy strukturą tworzonych faz ciekłokrystalicznych, a ich zdolnością do transfekcji. Dla kompleksu w fazie heksagonalnej znacznie łatwiej dochodzi do transfekcji w komórkach ssaków niż dla kompleksu w fazie lamelarnej (Legendre i inni, 1997). Posługując się mikroskopią optyczną zaobserwowano, że liposomy wielowarstwowe wiążą się stabilnie do liposomów utworzonych z błon biologicznych lub modelowych, natomiast kompleksy w fazie heksagonalnej są niestabilne, gdyż dochodzi do szybkiej fuzji z materiałem budującym pęcherzyki, a DNA jest uwalniane z kompleksu (Zhou i Chu, 2000).



**Rys. 3.1.** Schemat obrazujący dwie różne drogi przejścia fazowego z fazy lamellarnej  $L_{\alpha}$  do odwróconej heksagonalnej  $H_{II}$  (Koltover i inni, 1998).

Powstało wiele modeli opisujących stabilność, oddziaływania i budowę kompleksów DNA – surfaktant w przypadku tworzenia przez nie struktur lamelarnych, heksagonalnych i struktur typu *random coil* (nieuporządkowanego kłębka) (Zhou i Chu, 2000). Na tworzenie liposomów DNA-surfaktant wpływ mają takie czynniki, jak siła tworzonych wiązań jonowych, koncentracja DNA oraz surfaktantu, natura przeciwjonów i kationowej części surfaktantów (Zhou i Chu, 2000). Kompleksy powstające w różnych roztworach buforowych wykazują różną efektywność transfekcji. Mikrogramy elektronowe uzyskane techniką kriorytu pokazały, że przy wysokich koncentracjach DNA w roztworze, preferowane jest tworzenie pojedynczych liposomów, natomiast przy niskich koncentracjach DNA powstawały układy lamelarne, zawierające powyżej dziesięciu dwuwarstw (Koltover i inni, 1998). Badania spektroskopii w podczerwieni wykazały, że w agregatach lipidowych DNA, kwas deoksyrybonukleinowy może przyjmować nie tylko konformację B, ale także A, a nawet mieszaniny tych konformacji (Pohle i inni, 2000). Dla układu DNA z bromkiem cetylotrimetyloamoniowym (CTAB) za pomocą eksperymentów dichroizmu kołowego pokazano, że CTAB pozostaje w kompleksie związane z DNA w konformacji B. Dzieje się tak jednak tylko wtedy, gdy stężenie surfaktantu jest względnie nieduże (poniżeń wartości, dla której następuje wytrącanie – precypitacja) (Leal i inni, 2004), dla którego stopień wiązania surfaktantu do DNA nie przekracza 60% (Mel'nikov i inni, 1995).

Pomimo wielu prac nad układami DNA-surfaktant struktura tych kompleksów nie została poznana do końca. Tworzenie agregatów surfaktantów odbywa się spontanicznie, niezależnie od warunków. W rozważanych układach występują jednak konformacje DNA, najczęściej A i B. Konformacja A występuje częściej, gdy dochodzi do redukcji ładunku cząsteczki DNA, na przykład na skutek działania niskiego ciśnienia atmosferycznego lub w obecności soli. Można więc podejrzewać, że po dodaniu dodatnio naładowanego przeciwjonu surfaktantu, na skutek redukcji ładunku ujemnego DNA, dojść może do przejścia z konformacji B, częściej występującej w naturze, do konformacji A. Istnieją jednak doniesienia o badaniach spektroskopii dichroizmu kołowego, potwierdzające, że DNA w kompleksie z surfaktantem pozostaje w konformacji B (Spink i Chaires, 1997; Budker i inni, 2002).

Dokonywano także teoretycznej analizy parametrów struktur fazy heksagonalnej H<sub>I</sub> tworzonej przez kompleksy DNA-surfaktant, na przykładzie DNA-CTAB (Leal i inni, 2004). Promień przekroju poprzecznego miceli cylindrycznej utworzonej z CTBA jest w przybliżeniu dwa razy większy od promienia przekroju poprzecznego DNA, dlatego rozsądnie jest umieścić micelę CTAB w środku symetrii. Daje to trzy możliwe rodzaje rozmieszczenia helis DNA wokół CTAB, pozwalające neutralizować ładunek DNA. Na Rysunku 3.2 przedstawiono struktury w fazie heksagonalnej H<sub>I</sub> prostej kompleksów DNA-CTBA dla różnego upakowania, w zależności od stosunku helis DNA (czarne kółka) do cylindrów utworzonych z CTBA: 2:1 (a), 3:1 (b) oraz 5:1 (c). Przyjmując promień helisy DNA równy 10 Å i promień cylindra CTBA równy 21.5 Å przekroje poprzeczne wynosza odpowiednio (a) 62 nm<sup>2</sup>, (b) 72 nm<sup>2</sup> oraz (c) 90 nm<sup>2</sup>. Rysunek 3.2a przedstawia przypadek stosunku 2:1, który odpowiada sytuacji, gdy ilość surfaktantu jest zbyt mała by zneutralizować ładunek DNA. Struktura przedstawiona na Rysunku 3.2b zapewnia neutralizację dla DNA w konformacji B, natomiast na Rysunku 3.2c dla konformacji A. Zakładając, że w formie naturalnej najczęściej występuje konformacja B, należy przyjąć, że zwykle będzie dochodzić do tworzenia struktury widocznej na Rysunku 3.2b (Lasic, 1997).



Rys. 3.2 Schemat różnego rodzaju upakowania elektroobojętnych struktur DNA-CTMA (Lasic, 1997).

W wyniku łączenia się możliwie największej ilości jonów dochodzi do zmiany kształtu i pola powierzchni przekroju poprzecznego omawianych struktur. Otrzymany w ten sposób model upakowania widoczny jest na Rysunku 3.3 (Lasic, 1997).



**Rys. 3.3** Schematyczne przedstawienie przekroju poprzecznego heksagonalnej struktury kompleksu DNA-CTAB (Lasic, 1997).

## 4 Elementy teorii magnetycznego rezonansu jądrowego

#### 4.1 Klasyczny opis procesu magnetycznego rezonansu jądrowego

Jądra atomowe, z wyjątkiem parzysto-parzystych, posiadają niezerowy kręt własny nazywany spinem jądrowym i oznaczany  $\vec{K}$ . Spin jądrowy wiąże się z momentem magnetycznym  $\vec{\mu}$  zależnością

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{K} \cdot \mathbf{4.1}$$

Moment magnetyczny jest wprost proporcjonalny do spinu jądrowego, współczynnikiem proporcjonalności jest jądrowy współczynnik giromagnetyczny, a zwroty obu wektorów są takie same. Wartość współczynnika giromagnetycznego oblicza się ze wzoru:

$$\gamma = g_n \frac{e}{2m_p}, \qquad 4.2$$

gdzie  $g_n$  jest czynnikiem Landego dla jądra, *e* ładunkiem elektronu, a  $m_p$  masą protonu. Zgodnie z teorią magnetycznego rezonansu jądrowego, jeśli jądro posiadające moment magnetyczny  $\vec{\mu}$  zostanie umieszczone w zewnętrznym, stałym polu magnetycznym o indukcji  $\vec{B}_0$ , to jego energia wyraża się wzorem (Hennel, 1997; Hennel i Klinowski, 2000):

$$E = -\vec{\mu} \circ \vec{B}_0. \tag{4.3}$$

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ lub NMR, z ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) polega na selektywnym pochłanianiu energii promieniowania elektromagnetycznego o częstości spełniającej warunek  $\omega = \gamma B_0$ , przez jądra o niezerowym spinie umieszczone w zewnętrznym polu magnetycznym. Konsekwencją takiego pochłonięcia jest zmiana zeemanowskich poziomów energetycznych.

Suma momentów magnetycznych próbki na jednostkę objętości próbki, jest wielkością makroskopową nazywaną magnetyzacją jądrową,  $\vec{M}$ :

$$\vec{M} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \vec{\mu}_i}{V}.$$

Jeżeli próbka znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej, to magnetyzacja przyjmuje kierunek równoległy z kierunkiem indukcji zewnętrznego pola magnetycznego, czyli:  $\vec{M} \| \vec{B}_0$ , wtedy wypadkowy wektor indukcji magnetycznej w próbce jest równy:

$$\vec{B} = \vec{B}_0 + \mu \vec{M} \cdot 4.5$$

Magnetyzacja jest wprost proporcjonalna do wypadkowego krętu, a współczynnikiem proporcjonalności jest czynnik giromagnetyczny:

$$\vec{M} = \gamma \vec{K}$$
.

Jeżeli wektor magnetyzacji zostanie umieszczony w polu magnetycznym o indukcji  $\vec{B}_0$  i wychylony z położenia równowagi, to pojawi się moment siły zdefiniowany wzorem:

$$\vec{T} = \vec{M} \times \vec{B}_0 \,. \tag{4.7}$$

Magnetyzacja rozpocznie precesję wokół kierunku wyznaczonego przez oś  $B_0$ , zwaną precesją Larmora, z prędkością kątową

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma \vec{B}_0 \,. \tag{4.8}$$

Z równań 4.6 i 4.7 oraz zasady zachowania momentu pędu  $(\frac{d\tilde{K}}{dt} = \vec{T})$  wynika następujące równanie ruchu wektora magnetyzacji:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0.$$

Rozważmy układ współrzędnych (X', Y', Z'=Z), wirujący z prędkością kątową  $\vec{\omega}$ . W układzie wirującym prędkość liniowa  $\vec{v}_a$  związana jest z prędkością liniową w laboratoryjnym układzie współrzędnych XYZ relacją

$$\vec{v} = \vec{v}_a + \vec{\omega} \times \vec{r} , \qquad 4.10$$

gdzie  $\vec{r}$  jest wektorem wodzącym, łączącym wspólny środek układów wirującego i laboratoryjnego z rozpatrywanym punktem. Równanie to obowiązuje też dla ruchu magnetyzacji jądrowej opisanej wzorem 4.9. Można wtedy przyjąć, że rozpatrywany punkt jest końcem wek-

tora magnetyzacji, czyli 
$$\vec{r} = \vec{M}$$
, a  $\vec{v} = \frac{d\vec{r}}{dt} = \left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)$  oraz  $\vec{v}_a = \left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)$ .

Podstawiając powyższe zależności do równania 4.10 otrzymamy:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)' + \vec{\omega} \times \vec{r} .$$
4.11

A uwzględniając relację 4.9 dostaniemy:

$$\gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 = \left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)' + \vec{\omega} \times \vec{r},$$
 4.12

co po przekształceniu przyjmie postać równania ruchu magnetyzacji jądrowej w wirującym układzie odniesienia:

$$\left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right) = \gamma \vec{M} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}\right).$$
4.13

Jeżeli więc układ wirujący będzie poruszać się z prędkością kątową  $\vec{\omega} = -\gamma \vec{B}_0 \equiv \vec{\omega}_0$ , to w tym układzie wektor  $\vec{M}$  będzie nieruchomy. W układzie laboratoryjnym natomiast, wektor  $\vec{M}$  precesować będzie z prędkością kątową  $\vec{\omega}_0$  wokół wektora indukcji zewnętrznego pola magnetycznego  $\vec{B}_0$ . Jeżeli wprowadzimy efektywną indukcję pola magnetycznego w układzie wirującym jako  $\vec{B}_{ef} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ , to równanie 4.13 przybierze postać analogiczną do równania 4.9:

$$\left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)' = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_{ef} \,. \tag{4.14}$$

Ruch magnetyzacji będzie więc zarówno w układzie laboratoryjnym, jak i rotującym z prędkością  $\vec{\omega}$ , polegać na precesji wokół osi wyznaczonej przez wektor  $\vec{B}_{ef}$  z prędkością kątową  $-\gamma \vec{B}_0$ .

Jeśli rozważana próbka znajdzie się w obecności pola magnetycznego złożonego z dwóch składowych: stałego o indukcji  $\vec{B}_0$  oraz wirującego z prędkością kątową  $\vec{\omega}_e$  zmiennego pola  $\vec{B}_1$ , to efektywne pole w układzie wirującym będzie dane wzorem:

$$\vec{B}_{ef} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}_e}{\gamma} + \vec{B}_1.$$
4.15

Jeśli dodatkowo spełniony będzie warunek

$$\vec{\omega}_e = -\gamma \vec{B}_0, \qquad 4.16$$

to efektywna indukcja pola magnetycznego w wirującym układzie będzie równa jedynie indukcji pola rotującego, czyli  $\vec{B}_{ef} = \vec{B}_1$ . Magnetyzacja "widzieć" więc będzie tylko pole  $\vec{B}_1$  (nieruchome w wirującym układzie) i wokół kierunku indukcji tego pola odbywać się będzie precesja.

Wirujące pole można wytworzyć w taki sposób, że wektor  $\vec{B}_1$  będzie wirować w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku  $\vec{B}_0$ , wtedy kierunek wektora prędkości kątowej będzie równy kierunkowi wektora indukcji magnetycznej stałego pola  $\vec{B}_0$ , a pole efektywne składać się będzie z wektora  $\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}_e}{\gamma}$  oraz prostopadłego wektora  $\vec{B}_1$ . Jeżeli zastosuje się pole magnetyczne  $\vec{B}_0$  wielokrotnie większe od  $\vec{B}_1$ , to w przybliżeniu  $\vec{B}_{ef} || Z$ . Jeżeli jednak spełniony będzie warunek rezonansu  $\vec{\omega}_e = -\gamma \vec{B}_0$ , wtedy  $\vec{B}_{ef} \perp Z$ , magnetyzacja rozpoczyna precesje wokół nowego kierunku i może zostać obrócona o dowolny kąt z przedziału od 0 do  $2\pi$ .

Za pomocą słabego, wirującego pola  $\vec{B}_1$  można więc z łatwością zmienić położenie wektora magnetyzacji, o ile zostanie spełniony warunek rezonansu, czyli prędkość kątowa wirowania pola  $\vec{\omega}$  będzie równe prędkości kątowej precesji Larmora 4.8.

Metody impulsowe stosowane w magnetycznym rezonansie jądrowym polegają na stosowaniu zmiennego pola  $\vec{B}_1$  spełniającego warunek rezonansu, w postaci krótkich impulsów. Podczas trwania impulsu trwa obrót magnetyzacji o kąt  $\theta = \gamma B_1 t_w$ , gdzie  $t_w$  oznacza czas trwania impulsu. W praktyce stosuje się impulsy pozwalające obrócić magnetyzację o kąt  $\pi$  lub  $\frac{\pi}{2}$ .

Do wytworzenia wirującego pola wykorzystuje się jedną cewkę ułożoną w płaszczyźnie XY, w kierunku X, wewnątrz której umieszcza się próbkę. Przepływ przez cewkę zmiennego prądu elektrycznego o częstotliwości  $v_e$  spowoduje wygenerowanie oscylującego pola magnetycznego. Wytwarzane pole będzie równe:

$$\vec{B}_{osc} = \hat{i} 2B_1 \cos(\omega_e t), \qquad 4.17$$

gdzie  $\hat{i}$  jest wersorem na osi X, a  $\omega_e = 2\pi v_e$ .

Drgający w kierunku osi X wektor  $\vec{B}_1$  można jednak zgodnie ze wzorem Eulera rozłożyć na dwa wirujące w przeciwnych kierunkach składowe wektory:

$$\vec{B}_{osc} = \hat{i} \left[ B_1 \exp(i\omega_e t) + B_1 \exp(-i\omega_e t) \right].$$
4.18

Jeśli spełniony jest warunek

$$2\pi v_e = |\gamma| B_0, \qquad 4.19$$

to jeden z wirujących wektorów składowych będzie mieć prędkość kątową równą prędkości Larmora i zajdzie zjawisko rezonansu. Drugi wektor, mający prędkość kątową antylarmorowską nie będzie mieć wpływu na układ spinów (wypadkowa wartość pola magnetycznego wynosić będzie  $B_{ef} = 2B_0+B_1$ , czyli  $\vec{B}_{ef}$  będzie niemal równoległe do  $B_0$ , więc nie wywoła obrotu magnetyzacji jądrowej wokół kierunku  $B_1$ ).

# 4.2 Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego jako absorpcja kwantów promieniowania

Magnetyczny rezonans jądrowy można traktować jako pochłanianie kwantów energii promieniowania elektromagnetycznego. Jeśli w chwili początkowej próbka znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej, to energia oddziaływania z zewnętrznym stałym polem  $\vec{B}_0$  przyjmuje możliwą najmniejszą wartość (E<0), przy czym kierunek i zwrot wektora magnetyzacji i indukcji pola  $\vec{B}_0$  są zgodne. Wychylenie magnetyzacji z tego położenia będzie więc wymagać pochłonięcia energii.

Traktując klasyczny spin jądra jako operator kwantowy  $I' = \hbar I$ , można równanie 4.1 zapisać w postaci:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}$$
 4.20

Energia jądrowego momentu magnetycznego oddziałującego z polem magnetycznym jest określona zależnością 4.3, którą można w następujący sposób rozpisać:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -B_0 \mu_z = -B_0 \gamma \hbar I_z$$
4.21

Korzystając z tego klasycznego wyrażenia, można zapisać wyrażenie opisujące operator energii, zwany hamiltonianem zeemanowskim. Zakładając, że  $\vec{B}_0$  jest równoległe do kierunku Z:

$$H_z = -B_0 \eta h I_z. \tag{4.22}$$

Operatory  $H_z$  i  $I_z$  posiadają te same wartości własne, ponieważ komutują, dlatego:

$$E(m) = -B_0 \gamma \hbar m. \tag{4.23}$$

Równaniu 4.23 odpowiadają dozwolone wartości poziomów energetycznych jądra o współczynniku giromagnetycznym  $\gamma$  i spinową liczbą kwantową I, umieszczonego w zewnętrznym, stałym polu magnetycznym. Ponieważ wartości *m* mogą wynosić:

$$m = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$$
, 4.24

dlatego różnica energii między sąsiednimi poziomami jest równa:

$$\Delta E = E(m) - E(m-1) = -\gamma \hbar B_0.$$
 4.25

Spin jądrowy może więc zostać przeniesiony na wyższy poziom energetyczny, przy równoczesnym pochłonięciu kwantu promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości spełniającej warunek:

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{|\gamma|B_0}{2\pi},$$
4.26

co jest równoznaczne warunkowi rezonansu określonego zależnością 4.19. Widać więc, że zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego można także rozumieć jako pochłanianie przez jądra o niezerowym spinie, umieszczone w zewnętrznym, stałym polu magnetycznym, kwantów energii promieniowania elektromagnetycznego o rezonansowej częstotliwości.

## 4.3 Opis procesów relaksacyjnych

#### 4.3.1 Równania Blocha

Stosowane w badaniach laboratoryjnych próbki składają się z bardzo dużej ilości spinów jądrowych, 1 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O zawiera 10<sup>22</sup> jąder wodoru. W sytuacji równowagi termodynamicznej, bez obecności zewnętrznego pola magnetycznego, wszystkie spiny ułożone są przypadkowo, tak że całkowita wypadkowa magnetyzacja jest równa zero. W próbce umieszczonej w zewnętrznym polu magnetycznym następuje porządkowanie momentów magnetycznych. Część z nich zorientuje się zgodnie z kierunkiem wektora indukcji magnetycznej  $\vec{B}_0$ , część zaś przeciwnie. Niech oś Z ma kierunek wektora  $\vec{B}_0$ . Jeżeli spiny, których składowa  $I_z$ jest równoległa do  $\vec{B}_0$  oznaczymy  $N^+$ , a spiny których  $I_z$  ma kierunek przeciwny N, to stosunek populacji obu poziomów energetycznych opisany jest w stanie równowago termodynamicznej rozkładem Boltzmanna:

$$\frac{N^{-}}{N^{+}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_{B}T}\right),$$
4.27

gdzie  $\Delta E$  oznacza różnicę energii dostępnych poziomów, a  $k_B$  stałą Boltzmanna. Z rozkładu tego wynika, że więcej momentów magnetycznych ustawionych będzie równolegle do kierunku indukcji pola magnetycznego, co oznacza większe obsadzenie poziomu o niższej energii. Różnica ta jednak nie jest duża, mianowicie w polu magnetycznym o indukcji 1 *T* i temperaturze pokojowej, stosunek  $N^-/N^+$  wynosi 10<sup>-6</sup>, co jednak wystarcza do wytworzenia mierzalnej równowagowej magnetyzacji  $\vec{M}_0$ . W stanie równowago termodynamicznej magnetyzacja ta będzie równoległa to indukcji zewnętrznego pola magnetycznego.

Wzbudzony uprzednio układ spinów, będzie wracać do stanu równowagi termodynamicznej. Proces ten nazywa się relaksacją. Przywracanie boltzmannowskiego rozkładu odbywa się poprzez oddawanie energii do otoczenia termodynamicznego, zwyczajowo zwanego siecią. Stąd relaksację z-towej składowej magnetyzacji nazywa się relaksacją spinowosieciową. Makroskopowo polega ona na powrocie składowej magnetyzacji  $M_z$  do wartości  $M_0$ . Ponieważ jest to relaksacja składowej równoległej do osi pola  $B_0$  relaksację tę nazywa się również podłużną.

Po wychyleniu magnetyzacji z położenia równowagi, wartości składowych  $M_x$  i  $M_y$ będą wracać do równowagi. Wartością równowagową obu tych składowych jest 0. Oznacza to, że proces relaksacji spinowo-spinowej jest zanikiem obu tych składowych.

Powrót składowej  $M_z$  do wartości  $M_0$  oraz zanik nierównowagowych wartości składowych  $M_x$  i  $M_y$  w wirującym z prędkością Larmora układzie współrzędnych opisane są równaniami:

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2},$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2},$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1},$$
4.28

gdzie  $T_1$  i  $T_2$  są stałymi czasowymi procesu relaksacji, nazywanymi odpowiednio czasem relaksacji podłużnej oraz czasem relaksacji poprzecznej. Jeżeli precesję magnetyzacji opisuje równie:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \left( \vec{B} \times \vec{M} \right), \qquad 4.29$$

to całkowity ruch magnetyzacji opisany będzie następującymi równaniami, zwanymi równaniami Blocha (Bloch, 1946):

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \left(\vec{B} \times \vec{M}\right)_x - \frac{M_x}{T_2},$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \left(\vec{B} \times \vec{M}\right)_y - \frac{M_y}{T_2},$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \left(\vec{B} \times \vec{M}\right)_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1}.$$
4.30

Jak wiadomo w eksperymentach magnetycznego rezonansu jądrowego stosuje się dodatkowo oscylujące z rezonansową częstością  $\vec{\omega}$  pole magnetyczne o indukcji  $\vec{B}_1$ , niewielkiej w porównaniu z polem  $\vec{B}_0$ . Zgodnie z rozdziałem 4.1 całkowite pole magnetyczne oddziałujące z magnetyzacją będzie opisane wektorem indukcji magnetycznej:

$$\vec{B} = \hat{i}B_1\cos(\omega t) + \hat{j}B_1\sin(\omega t) + \hat{k}B_0, \qquad 4.31$$

gdzie  $\hat{i}, \hat{j}, \hat{k}$  to wektory jednostkowe w kierunkach odpowiednio x, y, z. W takim przypadku równania opisujące ruch magnetyzacji będą miały postać:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \left( M_y B_0 - M_z B_1 \sin(\omega t) \right) - \frac{M_x}{T_2},$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \left( M_z B_1 \cos(\omega t) - M_x B_0 \right) - \frac{M_y}{T_2},$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \left( M_x B_1 \sin(\omega t) - M_y B_1 \cos(\omega t) \right) + \frac{M_0 - M_z}{T_1}.$$
4.32

W układzie wirującym z prędkością kątową równą prędkości rezonansowej równania Blocha przyjmują ostateczna postać:

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = (\omega_I - \omega)M_{y'} - \frac{M_{x'}}{T_2},$$

$$\frac{dM_{y'}}{dt} = -(\omega_I - \omega)M_{x'} + \gamma B_1 M_z - \frac{M_{y'}}{T_2},$$

$$\frac{dM_{z'}}{dt} = -\gamma B_1 M_{y'} + \frac{M_0 - M_{z'}}{T_1},$$
4.33

gdzie  $\omega_I = \gamma B_1$  jest prędkością kątową wirowania magnetyzacji wokół efektywnego pola, które w układzie wirującym równe jest  $\vec{B}_1$  (Hausser i Kalbitzer, 1993).

#### 4.3.2 Relaksacja spinowo-spinowa

Jeżeli na układ spinów w stanie równowagi termodynamicznej zadziałamy impulsem  $\frac{\pi}{2}$ , to magnetyzacja zostanie obrócona do płaszczyzny prostopadłej do kierunku wektora indukcji zewnętrznego pola  $\vec{B}_0$ . Po zakończeniu impulsu, układ spinów zacznie precesować wokół kierunku wyznaczonego przez wektor  $\vec{B}_0$  z częstością Larmora. Różny rzut sąsiedniego spinu powoduje niejednorodność pola w miejscu spinu relaksującego opisaną funkcją chwilowego rozkładu pola. Spiny, których odpowiedzialne za relaksację sąsiedzi mają różny rzut momentu magnetycznego jądra będą precesowały z różnymi prędkościami kątowymi. Jedne szybciej, inne wolniej od częstotliwości  $\omega_0 = -\gamma B_0$ . Skutkiem tego dochodzi do nieodwracalnego rozfazowania spinów nazywanego relaksacją poprzeczną. Długość wektora magnetyzacji będzie maleć eksponencjalnie zgodnie z procesami opisanymi równaniami Blocha:

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right).$$
 4.34

Na relaksację prostopadłej składowej magnetyzacji wpływ będzie miał jeszcze jeden czynnik. Mianowice zewnętrzne pole magnetyczne  $\vec{B}_0$  nie jest jednorodne w całej objętości próbki. Powoduje to dodatkowe rozfazowanie spinów i amplituda sygnału zanikać będzie z efektywnym czasem relaksacji poprzecznej  $T_2^*$  związanym czasem relaksacji poprzecznej  $T_2$  zależnością (Timur, 1969):

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2},$$
 4.35

gdzie  $\Delta B_0$  jest miarą niejednorodności zewnętrznego stałego pola magnetycznego w obszarze próbki.

#### 4.3.3 Relaksacja spinowo-sieciowa i pomiar czasu T<sub>1</sub>

Równania Blocha opisują zachowanie powrót magnetyzacji jądrowej do stanu równowagowego po zadziałaniu impulsu. Rozwiązanie równania ze względu na składową z, daje informację o wielkości składowej w kierunku przyłożonego zewnętrznego pola  $\vec{B}_0$  w chwili t:

$$M_{z}(t) = M_{0} \left[ 1 - 2 \exp\left(-\frac{t}{T_{1}}\right) \right]$$
4.36

gdzie  $T_1$  jest czasem relaksacji spinowo-sieciowej. Aby wyznaczyć  $T_1$  stosuje się impuls  $\pi$ , który odwraca magnetyzację do wartości antyrównowagowej –  $M_z$ . Trwające procesy relaksacyjne sprawiają, że po pewnym czasie  $\tau$  osiąga wartość  $M_z(\tau)$ , wtedy zastosowanie impulsu  $\frac{\pi}{2}$ odwróci magnetyzację na płaszczyznę XY. To z kolei spowoduje wyindukowanie w cewce detekcyjnej siły elektromotorycznej, proporcjonalnej do  $M_z(t)$ . Eksperyment powtarza się dla innych wartości  $\tau$ , mierząc aktualne wartości magnetyzacji jądrowej. Metoda ta nosi nazwę *Inverion Recovery* i schematycznie została przedstawiona na Rysunku 4.1.



**Rys. 4.1.** Schematyczne przedstawienie działania impulsów  $\pi - \tau - \pi/2$  w metodzie *Inversion Recovery*.

## 4.4 Mechanizmy relaksacji

Za relaksację, zarówno poprzeczną jak i podłużną, odpowiedzialne są oddziaływania spinów jądrowych z najbliższym otoczeniem chemicznym, a szybkość relaksacji jest wprost proporcjonalna do kwadratu natężenia tych oddziaływań (Hausser i Kalbitzer, 1993). Relaksacja podłużna wiąże się z wymianą energii z otoczeniem, natomiast relaksacja poprzeczna z utratą koherencji fazowej pomiędzy spinami jądrowymi.

Wyróżnić można co najmniej pięć oddziaływań powodujących procesy relaksacyjne: oddziaływanie dipolowo-dipolowe, anizotropia przesunięcia chemicznego, oddziaływanie skalarne, oddziaływanie kwadrupolowe, oddziaływanie jąder z niesparowanymi elektronami w wolnych rodnikach lub jonach paramagnetycznych (Hausser i Kalbitzer, 1993).

#### 4.4.1 Oddziaływanie dipolowe

Protony posiadają duży moment magnetyczny, a ich koncentracjach w próbkach jest zazwyczaj duża. Z tego też powodu oddziaływanie dipolowo-dipolowe protonów ma na ogół największy wpływ na relaksację w próbce.

Oddziaływanie dipolowo-dipolowe homojądrowe bierze się stąd, że dipol magnetyczny  $\vec{\mu}$  oddziałuje nie tylko z zewnętrznym stałym polem magnetycznym  $\vec{B}_0$ , ale także z polem magnetycznym wytwarzanym przez sąsiedni taki sam dipol. Na całkowite pole magnetyczne, pod wpływem którego znajduje się dany spin, oprócz pola  $\vec{B}_0$ , składać się więc też będzie dodatkowe pole lokalne  $\vec{B}_{loc}$ . Składowa tego pola w kierunku wektora indukcji magnetycznej pola  $\vec{B}_0$  opisana jest zależnością (Hausser i Kalbitzer, 1993):

$$B_{loc} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\mu_z (3\cos^2 \theta - 1)}{r^3},$$
 4.37

gdzie  $\mu_0$  to przenikalność magnetyczna próżni, *r* odległość między dipolami,  $\mu_z$  składowa momentu magnetycznego  $\vec{\mu}$  w kierunku  $\vec{B}_0$ , a  $\theta$  to kąt między wektorem  $\vec{B}_0$  a wektorem  $\vec{r}$  łączącym dwa dipole. Oddziaływanie dipolowo-dipolowe maleje z trzecią potęgą odległości między nimi. Jest anizotropowe, zależy od orientacji wektora łączącego parę spinów relaksujących i znika, gdy  $\cos^2 \theta = \frac{1}{3}$  (co odpowiada wartości kąta  $\theta$  około 55°). Ze względu na tę szczególną właściwość ów kat nazywa się "katem magicznym".

Oddziaływanie dipolowe odgrywa szczególną rolę w ciałach stałych. W próbkach amorficznych bądź polikrystalicznych dochodzi do sprzężenia dipolowego zarówno pomiędzy sąsiednimi jądrami, ale także z jądrami z sąsiednich cząsteczek. W wyniku tego dochodzić będzie do poszerzania linii rezonansowej. W cieczach natomiast oddziaływanie to nie ma większego znaczenia, bowiem w wyniku ruchów Browna, powodujących szybką reorientację cząsteczek, lokalne pole zostaje uśrednione do zera i oddziaływanie dipolowe zanika. W niektórych układach biologicznych obserwuje się poszerzenie linii, zaś np. w płynach tkankowych linie są wąskie.

Protony mogą również oddziaływać z innymi jądrami o spinie ½. Szybkość relaksacji wywołanej oddziaływaniem dipolowo-dipolowym heterojądrowym, tj. pomiędzy spinem A i innym spinem X opisana jest równaniem (Hausser i inni, 1993):

$$\frac{1}{T_{1,2}^{DD}} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_A^2 \gamma_X^2 \hbar^2 \tau_{rot}}{r^6},$$
**4.38**

gdzie  $\tau_{rot}$  to czas korelacji rotacyjnej, będący miarą wykonywanych przez cząsteczkę rotacji. Z powodu ruchów Browna oddziaływanie to jest zmienne w czasie, a miarą szybkości zmian jest czas korelacji rotacyjnej. Jeżeli spiny należą do różnych cząsteczek, to z powodu dyfuzji rotacyjnej lub translacyjnej zmianie ulegać będzie także odległość miedzy spinami *r*.

## 4.5 Relacja między czasem relaksacji T<sub>1</sub> a czasem relaksacji T<sub>2</sub>

Dla relaksacji zachodzącej w układzie dwóch identycznych spinów, można wykorzystując kwantową teorię oddziaływań momentów magnetycznych obliczyć szybkość relaksacji podłużnej (Hennel i Klinowski, 2000):

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2}\right),$$
**4.39**

gdzie  $\mu_0$  to przenikalność magnetyczna próżni,  $\tau_c$  to czas korelacji, mający interpretację fizyczną jako czas w przybliżeniu równy czasowi potrzebnemu na zmianę położenia drobiny średnio o kąt równy  $\sqrt{\frac{2}{3}}$  radiana. Szybkością relaksacji nazywamy odwrotność czasu relaksacji.

Podobnie można obliczyć szybkość relaksacji poprzecznej:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2}\right).$$
 4.40

Zakładając, że proces reorientacji molekularnej polega na przeskokach pomiędzy dwoma równocennymi położeniami równowagi, oddzielonymi barierą energetyczną o wysokości  $E_a$ , czas korelacji zależy od temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa:

$$\tau_c = \tau_0 \exp\left(-\frac{E_A}{k_B T}\right),$$
4.41

gdzie  $k_B$  to stała Boltzmanna, a  $E_A$  to energia aktywacji wyrażona w jednostkach energii na mol.

Z równania 4.40 i 4.41 można wyznaczyć zależność szybkości relaksacji podłużnej i poprzecznej od temperatury.

Na Rysunku 4.2 przedstawione są symulacje zależności szybkości relaksacji podłużnej  $\frac{1}{T_1}$ i poprzecznej  $\frac{1}{T_2}$  od temperatury, przy założeniu częstotliwości rezonansowej v = 300 MHz, energii aktywacji  $E_A = -23.7$  kJ/mol (przybliżona energia wiązania wodorowego dla wody (Suresh i Naik, 2000)) oraz odległości między spinami r = 1.97 Å.



Rys. 4.2. Zależności szybkości relaksacji podłużnej i poprzecznej od temperatury.

## 4.6 Sygnał swobodnej precesji FID

Stosowane w impulsowych badaniach MRJ krótkie impulsy elektromagnetyczne wysokiej częstotliwości powodują wychylenie magnetyzacji z położenia równowagi. Po wyłączeniu impulsu magnetyzacja rozpoczyna precesję, wracając jednocześnie, zgodnie z procesami relaksacyjnymi, do położenia równowagowego. Ruch ten wywoływać będzie przestrzenną modulację pola magnetycznego (Hausser i Kalbitzer, 1993). Zmiana indukcji powstałego w ten sposób pola magnetycznego powoduje powstawanie siły elektromotorycznej na zaciskach cewki stosowanej także do generowania sygnałów wysokiej częstotliwości (Hennel i Klinowski, 2000). Siła elektromotoryczna jest rejestrowana i dalej przetwarzana, a nosi nazwę sygnału swobodnej precesji FID (*Free Induction Decay*). Jest on zależny od częstości rezonansowej  $\omega$  oraz amplitudy magnetyzacji (Fukushima i Roeder, 1981).

## 4.6.1 Transformacja Fouriera

Sygnał zaniku swobodne precesji FID jest obserwowany w domenie czasu. Przejście do domeny częstotliwości pozwala uzyskać informację o częstościach  $\omega$  fali elektromagnetycznej emitowanej przez spiny podczas relaksacji. Przejście to nazywamy transformacją Fouriera.

Jeżeli mamy funkcję czasu F(t), taką że istnieją całki:  $\int_{-\infty}^{+\infty} F(t)dt$  oraz  $\int_{-\infty}^{+\infty} |F(t)|^2 dt$ , to transformacja Fouriera pozwala uzyskać funkcję  $f(\omega)$  w następujący sposób (Hennel i inni, 2000):

$$f(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(t) \exp(-i\omega t) dt.$$
 4.42

Dodatkowo mając funkcję  $f(\omega)$  można dostać funkcję F(t) stosują odwrotną transformację Fouriera:

$$F(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} f(\omega) \exp(i\omega t) dt$$
 4.43

W badaniach magnetycznego rezonansu jądrowego, w celu wzbudzenia spinów stosuje się krótkie impulsy o częstotliwości radiowej. Każdy taki impuls, nie jest monochromatyczny, lecz polega na wygenerowaniu fali elektromagnetycznej o częstotliwościach z pewnego zakresu zbliżonego do częstości rezonansowej  $\omega$ . Wraz ze skróceniem czasu trwania impulsu, szerokość tego przedziału częstości poszerza się (Hausser i Kalbitzer, 1993). W wyniku działania twardego (bardzo krótkiego) impulsu o poszerzonej szerokości spektralnej wszystkie, nawet nierównoważne protony zostaną wzbudzone. Rejestrowany zanik swobodnej precesji nie będzie w takim przypadku pojedynczą funkcją eksponencjalną, lecz złożeniem wielu różnych funkcji (Hausser i Kalbitzer, 1993). W przypadku gdy badana próbka jest układem biologicznym o niskiej hydratacji sygnał swobodnej precesji jest sumą sygnału pochodzącego od frakcji stałej  $F_s$  oraz od frakcji cieczowej  $F_L$ .

#### 4.6.2 Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów w ciele stałym

Przy założeniu, że hamiltonian jest sumą tak dużej liczby oddziaływań dipolowych, że prowadzi do szerokiej linii z niemal lub wcale nierozdzieloną strukturą, sygnał zaniku swobodnej precesji można rozwinąć w szereg momentów linii:

$$F_{S}(t) = \sum_{n=0}^{\infty} M_{2n} \frac{(-1)^{n} t^{2n}}{(2n)!} = 1 - \frac{M_{2}t^{2}}{2!} + \frac{M_{4}t^{4}}{4!} - \frac{M_{6}t^{6}}{6!} + \dots,$$
 4.44

gdzie  $M_{2n}$  to kolejne parzyste momenty linii rezonansowej. N-ty moment linii rezonansowej  $f(\omega)$  względem punktu  $\omega_0$  zdefiniowany jest następująco:

$$M_{n} = \frac{\int_{0}^{\infty} (\omega - \omega_{0})^{n} f(\omega) d\omega}{\int_{0}^{\infty} f(\omega) d\omega},$$

przy czym momenty nieparzyste wynoszą zero (Abragam, 1961).

#### 4.6.3 Zastosowanie funkcji Gaussa w analizie widma NMR oraz FID

W ciele stałym pola lokalne nie uśredniają się do zera i jądra wchodzące w skład badanej próbki oddziałują zarówno z zewnętrznym, stałym polem magnetycznym o indukcji  $\vec{B}_0$ , jak i z lokalnymi polami wytwarzanymi przez sąsiadujące jądra. W każdym więc miejscu lokalne pole będzie inne, w zależności od tego jakie jądra sąsiadują z jądrem rezonansowym. W przypadku substancji amorficznej rozkład pól lokalnych (a co za tym idzie częstości rezonansowych) jest przypadkowy i dobrze opisany funkcją Gaussa (Fukushima i Roeder, 1981):

$$f(\omega) \propto \exp\left(-\frac{\omega^2}{2\sigma^2}\right),$$
 4.45

gdzie σ jest stałą.

Ważną własnością funkcji Gaussa jest to, że jej transformacja Fouriera również jest funkcją Gaussa:

$$F(t) \propto \exp\left(-\frac{\sigma^2 t^2}{2}\right).$$
 4.46

Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od ciała stałego będzie więc opisywana krzywą Gaussa. Model ten wielokrotnie pomyślnie wykorzystywano do opisu układów biologicznych, takich jak plechy grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i inni, 2000; Harańczyk i inni, 1998), dentyna (Funduk i inni, 1984; Funduk i inni, 1986; Harańczyk i inni, 1994), ziarna pszenicy (Harańczyk i inni, 1996) czy DNA (Harańczyk i inni, 2010) lub jego kompleksy z surfaktantami (Harańczyk i inni, 2012; Harańczyk i inni, 2013).

Funkcję Gaussa można rozwinąć w następujący szereg momentów (Abragam, 1961):

$$F_{G}(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{T_{2G}}\right)^{2}\right] = \exp\left(-\frac{M_{2}t^{2}}{2}\right) = \exp\left(-\frac{a^{2}t^{2}}{2}\right) = \sum_{n=0}^{\infty} a^{2n} \frac{(-1)^{n}t^{2n}}{n!2^{n}}.$$
4.47

Drugi moment oznaczono w powyższym wzorze jako:

$$M_2 = a^2 = \frac{2}{T_{2G}},$$
 4.48

gdzie  $T_{2G}$  oznaczany jest przez  $T_2^*$ i ma fizyczny sens efektywnego czasu relaksacji poprzecznej.

Ponieważ:

$$(2n)!!=2^n n!(2n-1)!!,$$
 4.49

można zapisać:

$$M_{2n} = a^{2n} (2n-1)!!.$$
 4.50

Korzystając z zależności 4.48 oraz 4.50 można zapisać równanie:

$$\frac{M_{2n}}{(M_2)^n} = (2n-1)!!,$$
4.51

co pozwala obliczyć wartości momentów:

$$\frac{M_4}{(M_2)^2} = 3,$$
 4.52

$$\frac{M_6}{(M_2)^3} = 15.$$
 4.53

Powyższe zależności mogą służyć do analizy części sygnału zaniku swobodnej precesji pochodzącego od frakcji stałej.

#### 4.6.4 Model funkcji Abragama

Rozwinięcie sygnału zaniku swobodnej precesji w szereg momentów (4.44) wykazuje pewne podobieństwo iloczynu funkcji Gaussa oraz funkcji sincus, tj. funkcji Abragama (Abragam, 1961):

$$F_M(t) = \exp(-\frac{1}{2}a^2t^2)\frac{\sin bt}{bt},$$
**4.54**

dającą się rozwinąć w szereg:

$$F_{M}(t) = 1 - (a^{2} + \frac{1}{3}b^{2})\frac{t^{2}}{2!} + (3a^{4} + 2a^{2}b^{2} + \frac{1}{5}b^{4})\frac{t^{4}}{4!} - \dots,$$
4.55

gdzie drugi i czwarty moment są równe:

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2$$
 4.56

$$M_4 = 3a^4 + 2a^2b^2 + \frac{1}{5}b^4.$$
 4.57

Funkcja ta daje lepsze dopasowania do sygnałów zaniku swobodnej precesji od funkcji Gaussa w przypadku niektórych próbek składających się z protonów o małej ruchliwości, w układach krystalicznych, bądź w fazie szklistej (Dries Van Den i inni, 1998). Sygnał FID opisywany funkcją Abragama oraz odpowiadające mu widmo NMR, mające kształt kapelusza, przedstawiony jest na Rysunku 4.3.

#### 4.6.5 Dublet Pake'a

W przypadku, gdy za relaksację jądrową odpowiada dipolowo-dipolowe oddziaływanie par spinów, a na dodatek orientacja spinów w próbce, będącej ciałem stałym jest izotropowa (proszek izotropowy), otrzymane widmo NMR ma charakterystyczny kształt dubletu Pake'a. W przypadku próbki proszkowej, rejestrowany sygnał jest zdominowany przez oddziaływanie dipolowo-dipolowe między dwoma najbliższymi spinami, modyfikowany jednak (poszerzony) oddziaływaniem ze spinami dalszymi. Otrzymane widmo  $G_P(\omega)$  będzie sumą dwóch składników  $G_1(\omega)$  oraz  $G_2(\omega)$ , odpowiadającym dwóm stanom spinowym sąsiada (Derbyshire i inni, 2004):

$$G_{P}(\omega) = G_{1}(\omega) + G_{2}(\omega), \qquad 4.58$$

gdzie:

$$\begin{cases} G_{1}(\omega) = \left(\frac{1}{2}L + \omega\right)^{-\frac{1}{2}} & \text{w przedziale:} -\frac{1}{2}L < \omega < L \\ G_{1}(\omega) = 0 & \text{pozapowyższy mprzedzialem} \end{cases}$$
4.59

oraz

$$\begin{cases} G_2(\omega) = \left(\frac{1}{2}L - \omega\right)^{-\frac{1}{2}} & \text{w przedziale:} \quad -L < \omega < \frac{1}{2}L \\ G_2(\omega) = 0 & \text{pozapowyższymprzedzialem.} \end{cases}$$
**4.60**

Parametr *L* w powyższych zależnościach jest parametrem określającym maksymalne rozszczepienie, którego wartość można obliczyć ze wzoru:

$$L = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3},$$
**4.61**

gdzie r to odległość między sąsiednimi oddziałującymi spinami.

Sygnał zaniku swobodnej precesji można wtedy policzyć korzystając z transformacji Fouriera, uwzględniając dodatkowo poszerzenie wynikające z oddziaływania z bardziej odległymi spinami (Derbyshire i inni, 2004):

$$F_P(t) = \exp\left(-\frac{1}{2}a^2t^2\right) \int_0^\infty G_P(\omega) \exp(-\omega t) d\omega, \qquad 4.62$$

gdzie *a* jest odchyleniem standardowym gaussowskiego poszerzenia funkcji, będącym miarą stopnia poszerzenia rejestrowanego sygnału. Przykładowe widmo z widocznym dubletem Pake'a wraz z odpowiadającym mu sygnałem FID przedstawiony jest na Rysunku 4.3.



**Rys. 4.3.** Widoczny na widmie NMR dublet Pake'a. Poniżej widoczny sygnał FID opisywany funkcją Abragama oraz jego transformacja Fouriera do domeny częstości (Derbyshire i inni, 2004).

#### 4.6.6 Zastosowanie funkcji Lorentza w analizie widma NMR

W przypadku próbki cieczowej, szybkie ruchy molekularne powodują uśrednianie pól lokalnych, wskutek czego linia rezonansowa będzie miała kształt funkcji Lorentza:

$$f(\omega) = \frac{\Delta \omega_{1/2}}{\left(\Delta \omega_{1/2}\right)^2 + \left(\Delta \omega\right)^2},$$
4.63

gdzie  $\Delta \omega_{1/2}$  oznacza szerokość połówkową linii rezonansowej, natomiast  $\Delta \omega = \omega_0 - \omega$ . Istnieje związek pomiędzy szerokością połówkową linii rezonansowej, a czasem relaksacji poprzecznej  $T_2$ :

$$\Delta \omega_{1/2} = \frac{1}{T_2}.$$

Często jednak, wskutek niejednorodności pola  $\vec{B}_0$  linie rezonansowe są poszerzone. W takim przypadku miarą szerokości połówkowej jest efektywny czas relaksacji poprzecznej  $T_2^*$ :

$$\Delta \omega_{1/2} = \frac{1}{T_2^*}.$$
 4.65

Transformacja Fouriera funkcji Lorentza jest funkcją eksponencjalną. Dlatego też sygnał zaniku swobodnej precesji sygnału pochodzącego od cieczy jest funkcją eksponencjalną. W przypadku sygnału pochodzącego z N różnych rezerwuarów cieczowych FID ma postać:

$$F_{L}(t) = \sum_{j=1}^{N} L_{j} \exp\left(-\frac{t}{T_{2Lj}^{*}}\right),$$
4.66

gdzie *N* oznacza liczbę różnych składowych cieczowych,  $L_j$  ich amplitudy, a  $T_{2Lj}^*$  ich efektywne czasy relaksacji poprzecznej.

#### 4.6.7 Sygnał pochodzący od protonów z ciała stałego oraz cieczy

W niektórych próbkach sygnał pochodzi zarówno od ciała stałego, jak i od cieczy, będąc superpozycją sygnału pochodzącego od protonów o małej oraz od protonów o dużej ruchliwości. Rejestrowany sygnał zaniku swobodnej precesji będzie wtedy sumą (Derbyshire i inni, 2004):

$$F(t) = f_{S}F_{S}(t) + f_{L}F_{L}(t), \qquad 4.67$$

gdzie  $F_S(t)$  to sygnał pochodzący od ciała stałego, równy  $F_G(t)$ ,  $F_M(t)$  lub  $F_P(t)$ , natomiast  $F_L(t)$  to całkowity sygnał pochodzący od protonów cieczy, omówiony w rozdziale 4.6.6. Miarą udziału składowej stałej oraz składowej cieczowej w sygnale, są współczynniki  $f_S$  i  $f_L$ . Schematyczny sygnał FID wraz z widmem NMR pochodzącym z układu dającego sygnał ciała stałego oraz cieczy, przedstawiony jest na Rysunku 4.3.



**Rys. 4.4.** Zestawienie zaników swobodnej precesji oraz widm NMR pochodzących od próbki zawierającej zarówno frakcję stałą, jak i frakcję cieczową (Derbyshire i inni, 2004).

## 5 Izoterma sorpcyjna

Zależność pomiędzy masą wody adsorbowanej do powierzchni układu a względną wilgotnością otoczenia, czyli stosunkiem panującego ciśnienia pary wodnej względem ciśnienia pary nasyconej ( $h = p/p_0$ ), nazywa się izotermą sorpcyjną. Różne modele teoretyczne opisują izotermę sorpcyjną. Warto wymienić cztery z nich: model sorpcji jednowarstwowej Langmuira, oraz modele sorpcji wielowarstwowej Brunauer-Emmett-Teller (BET), model Denta (zwany też modelem GAB – Guggenheima, Andersona i De Boera) oraz model GDW (D'Arcy'ego i Watta).

## 5.1 Model Langmuira

Model Langmuira zakłada jednowarstwową adsorpcję cząsteczek sorbatu do powierzchni sorbentu (Langmuir, 1918). Jego stosowanie dobrze opisuje sorpcję molekuł wody dla niskich poziomów wilgotności środowiska (poniżej poziomu h = 0.1). Równanie izotermy sorpcyjnej Langmuir'a ma postać:

$$\frac{y}{y_m} = \frac{b_1 h}{1 + b_1 h}$$
. 5.1

Odwrotność parametru  $b_1$  wyraża wkład od nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących wodę dla wilgotności względne  $p/p_0 = 100\%$ . Jeżeli liczbę molekuł wody na miejsce wiążące  $y/y_m$  wyrazi się w jednostkach względnego przyrostu masy, wtedy równanie przyjmie postać:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{1 + b_1 h},$$
 5.2

gdzie  $\Delta M/m_0$  jest masą wody nasycającej miejsca pierwotnie wiążące (Langmuir, 1918).

## 5.2 Izoterma sorpcyjna model BET

Kolejny z modeli opisuje sorpcję wielowarstwową. Zakłada przyłączanie się do powierzchni sorbentu pierwszej warstwy molekuł wody, a do niej kolejnych warstw, w sposób sekwencyjny. Został zaproponowany przez Brunauera, Emmetta i Tellera (Brunauer i inni, 1938). Dobrze opisuje on sorpcję molekuł wody dla wilgotności środowiska nie przekraczające poziomu h = 0.4. Oznaczmy przez  $s_n$  liczbę miejsc wiążących po *n* cząsteczek wody. W równowadze termodynamicznej,  $s_0$  musi pozostać stałe, a liczba molekuł związanych do powierzchni jest równa liczbie molekuł, które opuściły pierwszą warstwę, dlatego:

$$a_1 p s_0 = z_1 s_1 e^{-E_1 / RT}, 5.3$$

gdzie p to ciśnienie,  $E_1$  to ciepło adsorpcji pierwszej warstwy,  $a_1$  i  $z_1$  są natomiast stałymi. Powyższa zależność jest równaniem Langmuira dla jednocząsteczkowej adsorpcji uzupełnionym o fakt, że parametry  $a_1$  i  $z_1$  oraz  $E_1$  są niezależne od liczby molekuł które zostały zaadsorbowane w pierwszej warstwie.

W stanie równowagi termodynamicznej również s<sub>1</sub> pozostaje stałe. Warunek ten może zostać utrzymany poprzez wymianę molekuł czterema różnymi sposobami: przez kondensację na pierwszej warstwie, przez parowanie z pierwszej warstwy, przez parowanie z drugiej warstwy i przez kondensację na powierzchni. Procesy te opisuje równanie:

$$a_2ps_1 + z_1s_1e^{-E_1/RT} = z_2s_2e^{-E_2/RT} + a_1ps_0$$
, 5.4

gdzie parametry  $a_2$ ,  $z_2$  i  $E_2$  są zdefiniowane analogicznie do  $a_1$ ,  $z_1$  i  $E_1$ .

Z równań 5.3 i 5.4 dostajemy:

$$a_2 p s_1 = z_2 s_2 e^{-E_2/RT}$$
. 5.5

Kondensacja na pierwszej warstwie musi być równa prędkości parowania z drugiej warstwy. Dla kolejnych warstw zachodzą procesy opisane następującymi równaniami:

$$a_{3}ps_{2} = z_{3}s_{3}e^{-E_{3}/RT},$$
  
:  
 $a_{i}ps_{i-1} = z_{i}s_{i}e^{-E_{i}/RT}.$ 
5.6

Powierzchnia całego układu jest równa sumie:

$$A = \sum_{i=0}^{\infty} s_i , \qquad 5.7$$

natomiast objętość adsorbentu na powierzchni jest równa:

$$v = v_0 \sum_{i=0}^{\infty} i s_i , \qquad 5.8$$

gdzie  $v_0$  oznacza objętość gazu zaadsorbowaną na centymetr kwadratowy adsorbującej powierzchni, pokrytej monowarstwą. Z dwóch powyższych równań wynika:

$$\frac{v}{Av_0} = \frac{v}{v_m} = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} is_i}{\sum_{i=0}^{\infty} s_i},$$
 5.9

gdzie  $v_m$  jest objętością gazu zaadsorbowanego, kiedy powierzchnia adsorbentu jest pokryta monowarstwą.

Następnie można przyjąć, że ciepła adsorpcji  $E_i$  kolejnych warstw są równe ciepłu skroplenia  $E_L$ , czyli:

$$E_2 = E_3 = \dots = E_i = E_L$$
. 5.10

a ponadto:

$$\frac{z_2}{a_2} = \frac{z_3}{a_3} = \dots \frac{z_i}{a_i} = g, \qquad 5.11$$

gdzie g jest stałą,  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_3$ ,... $s_i$  można z kolei zapisać w jednostkach  $s_0$ :

$$s_1 = ys_0$$
, gdzie  $y = (a_1 / z_1) p^{E_1 / RT}$ , 5.12

$$s_2 = hs_1$$
, gdzie  $h = (p/g)e^{E_L/RT}$ , 5.13

$$s_3 = hs_2 = h^2 s_1$$
, 5.14

$$s_i = hs_{i-1} = h^{i-1}s_1 = yh^{i-1}s_0 = ch^i s_0$$
, 5.15

gdzie 
$$b_1 = \frac{y}{h} = \frac{a_1 g}{z_1} e^{(E_1 - E_L)/RT}$$
. 5.16

Z zależności 5.9 wynika wtedy:

$$\frac{v}{v_m} = \frac{b_1 s_0 \sum_{i=1}^{\infty} i h^i}{s_0 \{1 + b_1 \sum_{i=1}^{\infty} h^i\}}.$$
 5.17

Suma w mianowniku powyższego równania może być zapisana jako:

$$\sum_{i=1}^{\infty} h^{i} = \frac{h}{(1-h)}.$$
 5.18

Suma z licznika jest z kolei równa:

$$\sum_{i=1}^{\infty} ih^{i} = h \frac{d}{dh} \sum_{i=1}^{\infty} h^{i} = \frac{h}{(1-h)^{2}}.$$
 5.19

Podstawiając 5.18 i 5.19 do 5.17 dostajemy

$$\frac{v}{v_m} = \frac{b_1 h}{(1-h)(1-h+b_1h)}.$$
 5.20

W sytuacji nasycenia, czyli gdy  $p=p_0$ , adsorbować do powierzchni może nieskończona ilość warstw. Wtedy  $v = \infty$ , a względna wilgotność *h* jest równa jedności. Równanie 5.13 daje wtedy:

$$(p_0/g)e^{E_L/RT} = 1.$$
 5.21

Podstawiając powyższe równanie do 5.20 oraz wiedząc, że  $h=p/p_0$  dostaniemy ostatecznie równanie izotermy:

$$v = \frac{v_m b_1 p}{(p_0 - p)\{1 + (b_1 - 1)(p / p_0)\}}.$$
 5.22

Zależność 5.22 opisuje izotermę w kształcie litery S.

W przypadku, gdy  $p \ll p_0$  równanie 5.22 przyjmuje postać:

$$v = \left(\frac{v_m b_1}{p_0} p\right) / \left(1 + \frac{b_1}{p_0} p\right),$$
 5.23

co jest szczególnym przypadkiem równania Langmuira.

#### 5.3 Izoterma sorpcyjna model Denta

W 1977 Dent zaproponował inny model izotermy sorpcyjnej dla sorpcji wielowarstwowej. W modelu zakłada się dwa rodzaje miejsc wiążących molekuły wody: pierwotnie wiążące oraz wiążące wtórnie do wcześniej już związanych cząsteczek wody (Dent, 1977). Model ten definiuje N miejsc wiążących na powierzchni adsorbentu, spośród których  $S_0$  jest pustych,  $S_1$  ma zaadsorbowaną jedną molekułę,  $S_2$  dwie itd. Nie wyróżnia się za to molekuł zaadsorbowanych w drugiej i kolejnych warstwach.

W stanie równowagi na powierzchni adsorbenta istnieje N miejsc wiążących wodę, to tzn. tyle samo molekuł jest przyłączana co odłączana od powierzchni. W takim przypadku stosunki liczb poszczególnych rodzajów miejsc wiążących wodę do całkowitej liczby miejsc wiążących są stałe i wynoszą odpowiednio:  $\frac{S_0}{N}, \frac{S_1}{N}, \frac{S_2}{N}...$  itd. W takim przypadku można zapisać równania:

$$\frac{1}{N}\frac{dS_0}{dt} = C_0\frac{S_1}{N} - ap\frac{S_0}{N} = 0,$$
  

$$\frac{1}{N}\frac{dS_1}{dt} = C\frac{S_2}{N} - ap\frac{S_1}{N} - C_0\frac{S_1}{N} + ap\frac{S_0}{N} = 0,$$
  

$$\frac{1}{N}\frac{dS_2}{dt} = C\frac{S_3}{N} - ap\frac{S_2}{N} - C\frac{S_2}{N} + ap\frac{S_1}{N} = 0,$$
  
5.24

gdzie *a* jest współczynnikiem przyłączania molekuł do wszystkich warstw,  $C_0$  jest współczynnikiem odłączania molekuł z pierwotnych miejsc wiążących, a *C* jest współczynnikiem odłączania molekuł dla wszystkich kolejnych warstw.

Z równań 5.24 wynika:

$$\frac{S_{1}}{N} = \frac{a}{C_{0}} p \frac{S_{0}}{N},$$

$$\frac{S_{2}}{N} = \frac{a}{C} \frac{a}{C_{0}} p^{2} \frac{S_{0}}{N},$$

$$\frac{S_{3}}{N} = \left(\frac{a}{c}\right)^{2} \frac{a}{C_{0}} p^{3} \frac{S_{0}}{N}.$$
5.25

Powyższe równania można zapisać w postaci ogólnej:

$$\frac{S_i}{N} = \left(\frac{a}{C}\right)^{i-1} \frac{a}{C_0} p^i \frac{S_0}{N}.$$
 5.26

Jeżeli na powierzchni istnieje  $S_0$  pustych miejsc wiążących molekuły,  $S_1$  miejsc wiążących po jednej molekule i  $S_2$  miejsc wiążących po dwie molekuły itd., to średnia liczba molekuł jest równa:

$$\overline{S} = \sum_{i=0}^{\infty} i \frac{S_i}{N} = \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} \left[ 1 + 2\left(\frac{a}{C}\right)p + 3\left(\frac{a}{C}\right)^2 p^2 + 4\left(\frac{a}{C}\right)^3 p^3 + \dots \right].$$
 5.27

W powyższym równaniu występuje szereg geometryczny, którego sumę można obliczyć, wtedy:

$$S = \left(\frac{a}{C_0}\right) p\left(\frac{S_0}{N}\right) \frac{1}{\left[1 - \left(\frac{a}{C}\right)p\right]^2}.$$
 5.28

Wiedząc, że:

$$\sum_{i=0}^{\infty} \frac{S_i}{N} = 1$$
5.29

równanie 5.27 można zapisać w postaci:

$$1 = \frac{S_0}{N} + \frac{a}{C_0} p \left(\frac{S_0}{N}\right) \left[ 1 + \left(\frac{a}{C}\right)p + \left\{ \left(\frac{a}{C}\right)p \right\}^2 + \dots \right].$$
 5.30

Ponownie stosując sumowanie szeregu geometrycznego dostajemy:

$$\frac{S_0}{N} = \frac{1 - \left(\frac{a}{C}\right)p}{1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p}.$$
5.31

Podstawiając powyższe równanie do 5.28 dostaniemy:

$$\overline{S} = \frac{\left(\frac{a}{C_0}\right)p}{\left[1 - \left(\frac{a}{C}\right)p\right]\left[1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p\right]}.$$
5.32

Pamiętając, że  $h = \frac{p}{p_0}$  oraz podstawiając  $b_1 = \frac{a}{C_0} p_0$  i  $b = \frac{a}{C} p_0$  otrzymamy wyrażenie na

średnią ilość cząsteczek wody wiążącą się z jednym miejscem:

$$\frac{y}{y_m} = \frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1h-bh)},$$
5.33

gdzie:  $h = \frac{p}{p_0}$  oznacza wilgotność względną wyrażoną ułamkiem,  $b_1 = \frac{a}{C_0} p_0$ , (Dent, 1977).

Wyrażając liczbę molekuł przypadającą na jedno miejsce wiążące  $y / y_m$  za pomocą przyrostu masy  $\Delta m / m_0$  dostaniemy wzór izotermy sorpcyjnej Denta w postaci:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1h-bh)},$$
 5.34

gdzie:  $\Delta M / m_0$  jest masą wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące, wyrażoną w jednostkach suchej masy,  $b = \frac{S_{n+1}}{S_n} \Big|_{h=1}$  jest ilorazem liczby miejsc wiążących, do których jest przyłączonych n+1 molekuł, do liczby miejsc wiążących, do których jest przyłączonych n

molekuł, dla wilgotności h = 1, natomiast  $\frac{1}{b_1} = \frac{S_0}{S_1}\Big|_{h=1}$  jest liczbą pustych miejsc wiążących do liczby miejsc związanych z jedną molekułą wody dla wilgotności h = 1.

W modelu Denta parametr *b* może się zmieniać w przedziale od 0 do 1, co modeluje sytuację tworzenia klastrów. Model BET z kolei zakłada stałą wartość parametru równą 1 (b=1), co nie do końca odpowiada stanowi fizycznemu:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)}.$$
 5.35

Biorąc z kolei wartość parametru b = 0 dostaniemy opis pokrycia powierzchni przez monowarstwę, czyli model Langmuira:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{1 + b_1 h} \,.$$
 5.36

Równanie 5.35 zapisuje się także w postaci parabolicznej:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + B \cdot h - C \cdot h^2 \,.$$
5.37

Można również wyrazić parametry  $\frac{\Delta M}{m_0}$ ,  $b_1$ , b za pomocą stałych A, B i C:

$$\frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{Ab_1},$$
 5.38

$$b_1 = \frac{B}{A} + 2b, \qquad 5.39$$

$$b = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC} - B}{2A}.$$
 5.40

## 5.4 Izoterma sorpcyjna model GDW

Model izotermy sorpcyjnej GDW opisuje sytuację, w której molekuła związana do powierzchni może być miejscem wiążącym dla więcej niż jednej molekuły z kolejnej warstwy. Izoterma ta opisana jest równaniem (D'Arcy i Watt, 1970):

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \Delta M / m_0 \frac{Kh}{1 + Kh} \frac{1 - b(1 - w)h}{1 - bh}.$$
 5.41

Parametry izotermy sorpcyjnej według modelu GDW związane są z parametrami izotermy sorpcyjnej według modelu Denta następującymi zależnościami (Furmaniak i Terzyk, 2009):

$$\left(\frac{\Delta M}{m_0}\right)_{Dent} = \left(\frac{\Delta M}{m_0}\right)_{GDW} \frac{K_{GDW}}{K_{GDW} - b_{GDW}},$$
5.42

$$b_{1Dent} = b_{GDW} + K_{GDW}, \qquad 5.43$$

$$b_{Dent} = b_{GDW} \cdot 5.44$$

W modelu GDW pojawia się dodatkowy parametr w, nieobecny w modelu Denta, będący stosunkiem molekuł wiązanych wtórnie, do ilości molekuł wysycających pierwotne miejsca wiążące. W przypadku, gdy parametr w = 1 (woda związana do miejsca pierwotnie wiążącego staje się miejscem wiążącym dla jednej molekuły wody z kolejnej warstwy), model GDW upraszcza się do modelu Denta. Wartość parametru w < 1 oznacza, że nie wszystkie molekuły pierwotnie wiązane do powierzchni sorbentu są dostępne dla molekuł z kolejnych warstw – przypadek porowatych powierzchni (Rysunek 5.1).



**Rys. 5.1.** Schematyczne przedstawienie wiązania molekuł wody do powierzchni sorbentu, w zależności od wartości parametru *w*; pomarańczowe kółka – miejsca pierwotnie wiążące wodę, niebieskie kółka – molekuły wody (Furmaniak i inni, 2007).

## 6 Materialy i metody

#### 6.1 Preparatyka próbek

#### 6.1.1 Surfaktanty użyte w eksperymentach

Badaniom poddano kompleksy DNA z trzema surfaktantami: BA, CTMA oraz DDCA. Poniżej przedstawiona jest specyfikacja każdego z tych surfaktantów.

Chlorek benzalkoniowy (ang. *benzalkonium chloride*, w skrócie BA) jest związkiem o wzorze sumarycznym  $C_{17}H_{30}$ ClN. W warunkach normalnych jest amorficznym ciałem stałym, mającym postać białego proszku, lub żelowatych fragmentów. Jest substancją łatwopalną, higroskopijną i łatwo rozpuszczalną w wodzie. Temperatura topnienia BA jest równa 40°C, gęstość w temperaturze 20°C wynosi 0.98 g/cm<sup>3</sup>, natomiast pH zawiera się w przedziale 5 – 6. Wzór strukturalny BA przedstawiony jest na Rysunku 6.1.



Rys. 6.1. Wzór strukturalny chlorku benzalkoniowego.

Chlorek cetylotrimetyloamoniowy (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>ClN, ang. *cetyltrimethylammonium chloride* lub *hexadecyltrimethylammonium chloride*, w skrócie CTMA) jest amorficznym ciałem stałym o postaci białego proszku. Jest substancją higroskopijną, łatwo rozpuszczalną w wodzie. Jego temperatura topnienia jest równa 234°C, masa molowa 320.01 g/mol, gęstość w 20°C wynosi wynosi 0.968 g/cm<sup>3</sup>, natomiast pH zawiera się w przedziale 6 – 8. Wzór strukturalny CTMA przedstawiony jest na Rysunku 6.2.



Rys. 6.2. Wzór strukturalny chlorku cetylotrimetyloamoniowego.

Chlorek didecylodimetyloamoniowy ( $C_{22}H_{48}ClN$ , ang. *didecyldimethylammonium chloride*, w skrócie DDCA) w warunkach normalnych jest bezbarwną, łatwopalną cieczą. Masa molowa jest równa 362.08 g/mol, gęstość w 20°C wynosi 0.95 g/cm<sup>3</sup>, natomiast pH 6.5. Wzór strukturalny DDCA przedstawiony jest na Rysunku 6.3.


Rys. 6.3. Wzór strukturalny chlorku didecylodimetyloamoniowego.

#### 6.1.2 Synteza kompleksów DNA surfaktant

Sól sodowa DNA (aniony sodu przyłączone do ujemnie naładowanej reszty fosforanowej), uzyskana z mleczu oraz ikry łososia, zakupiona została od Chitose Institute of Science and Technology w Japonii (CIST). Masa atomowa molekuł była równa średnio  $1.3 \cdot 10^6$  Da, a czystość preparatu była większa niż 96%.

Do 33.3 ml dejonizowanej wody dodano 200 mg soli sodowej DNA. Następnie roztwór mieszano przez trzy godziny mieszadłem magnetycznym w temperaturze pokojowej, co pozwalało uzyskać przejrzysty, homogeniczny i lepki roztwór. Następnie preparat poddano przez 100 minut sonifikacji (działaniu ultradźwięków) w stabilizowanej temperaturze, w celu fragmentacji DNA i zredukowania tym samym masy atomowej oraz zmniejszenia lepkości roztworu. Następnie przez 20 godzin kroplami dodawano uprzednio przygotowany roztwór 200 mg surfaktantu do 150 ml dejonizowanej wody, czemu towarzyszyło ciągłe mieszanie. Tak przygotowana mieszanina była filtrowana, przepłukiwana dejonizowaną wodą w celu pozbycia się nieaktywnych cząsteczek surfaktantu i powstałej soli NaCl, a następnie suszona (Harańczyk i inni, 2012). Otrzymane substancje miały postać białego proszku o małej ziarnistości. Wszystkie wykorzystane kompleksy DNA z surfaktantami zsyntetyzowano w Samodzielnej Katedrze Chemii i Technologii Polimerów Politechniki Krakowskiej.

#### 6.1.3 Oznaczanie zawartości metali w DNA oraz kompleksach DNA-surfaktant

Zawartość zanieczyszczeń badanych substancji metalami były wykonane za pomocą spektrofluorymetru całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego (TXRF, ang. *Total Reflection X-ray Fluorescence*) Rigaku NANOHUNTER. Pomiar TXRF polega na analizie rejestrowanego promieniowania charakterystycznego pierwiastków, wzbudzanych uprzednio promieniowaniem rentgenowskim. Oznaczanie wykonywane było względem dodanego do badanych preparatów germanu. Substancje badane były w postaci cienkich warstw otrzyma-nych metodą *spin-coating* z roztworów isopropanolu. Zawartości zanieczyszczeń zamiesz-czone są w Tabeli 6.1.

| pierwiastek | ppm (wt.) | pierwiastek | ppm (wt.) |
|-------------|-----------|-------------|-----------|
| DNA         |           | DNA-BA      |           |
| Ca          | 25.551    | Ca          | 9.096     |
| Fe          | 0.938     | Fe          | 2.483     |
| Cu          | 0.433     | Ni          | 0.267     |
| Zn          | 0.393     | Cu          | 0.749     |
| Ge          | 381.000   | Zn          | 7.567     |
|             |           | Ga          | 0.547     |
|             |           | Br          | 0.213     |
|             |           | Ge          | 158.000   |
| DNA-CTMA    |           | DNA-DDCA    |           |
| Ca          | 14.154    | Ca          | 19.602    |
| Cr          | 0.424     | Fe          | 3.487     |
| Fe          | 6.241     | Ni          | 0.481     |
| Cu          | 1.425     | Cu          | 1.804     |
| Br          | 1.203     | Zn          | 11.572    |
| Ge          | 255.000   | Ga          | 0.569     |
|             |           | Ge          | 267.000   |

**Tabela 6.1.** Oznaczone techniką TXRF zawartości metali w DNA oraz kompleksach DNA-surfaktant; german został dodany do badanych próbek jako wzorzec.

Stwierdzono obecność metali bloku d: żelaza, niklu, miedzi i cynku, ponadto wapnia, gadolinu i bromu. Zwraca uwagę kilkukrotnie wyższa zawartość żelaza i miedzi w kompleksach DNA-surfaktant w porównaniu do zawartości tych metali w natywnym DNA.

#### 6.1.4 Pomiary masy

Masa mierzona była grawimetrycznie na wagach elektronicznych. Do zgrubnego pomiaru służyła waga WPS 600/C, podająca masę z dokładnością 10<sup>-2</sup> g. Do dokładniejszych pomiarów posługiwano się wagą Radwag WAX 110 mierzącą z dokładnością 10<sup>-5</sup> g. Pomiary wykonywane były w temperaturze pokojowej.

#### 6.1.5 Wyznaczanie suchej masy

Sucha masa wyznaczana była po wygrzewaniu próbki w temperaturze 70°C. Pomiar masy dokonywany był co pół godziny. Po pięciu dniach nie stwierdzano dalszego ubytku masy. Temperatura była tak dobrana, aby uniknąć ewentualnej zmiany struktury próbki. Powyżej niej w roztworze rozpoczyna się bowiem proces odwracalnej denaturacji DNA. Nie wiadomo, czy i jak analogiczny proces przebiega w przypadku stałych kompleksów DNA. Temperatura 70°C jest jednak używana do wyprażania innych układów biologicznych, jak np. plechy porostów i pozwala uniknąć rozkładu niektórych organicznych składników plechy (Gaff, 1977), dlatego przyjęto ją jako odnośnik we wszystkich pomiarach.

#### 6.1.6 Określanie poziomu uwodnienia

Poziom uwodnienia badanych próbek określany był jako przyrost masy  $\Delta m/m_0$ , zgodnie z równaniem:

$$\Delta m/m_0 = \frac{m - m_0}{m_0}, \qquad 6.1$$

gdzie m to masa próbki o danym uwodnieniu, a  $m_0$  to sucha masa, której wyznaczanie opisane jest powyżej.

#### 6.1.1 Dehydratacja próbek

Przed uwadnianiem, próbki były inkubowane przez 240 godzin w środowisku nad żelem krzemionkowym, o względnej wilgotności  $h = p/p_0 = 0$ . W wyniku dehydratacji próbki osiągnęły następujące uwodnienie  $\Delta m/m_0 = 0.064 \pm 0.001$  (DNA-BA),  $\Delta m/m_0 = 0.108 \pm 0.001$ (DNA-CTMA) oraz  $\Delta m/m_0 = 0.082 \pm 0.002$ .

Pomiary tras hydratacyjnych wykonywane były w środowiskach o różnej wilgotności utrzymujących się nad roztworami przesyconymi soli, kwasu fosforowego oraz nad powierzchnią wody. Wykorzystane substancje oraz uzyskane dzięki nim względne wilgotności zamieszczono w Tabeli 6.2.

| substancja                                    | $h = p/p_0$ | substancja                      | $h = p/p_0$ |
|---|-------------|---------------------------------|-------------|
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                | 9 %         | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 63 %        |
| KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 23 %        | $Na_2S_2O_3$                    | 76 %        |
| CaCl <sub>2</sub>                             | 32 %        | $K_2CrO_3$                      | 88 %        |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                | 44 %        | $Na_2SO_4$                      | 93 %        |
| $Na_2Cr_2O_7$                                 | 52 %        | $K_2SO_4$                       | 97 %        |

Tabela 6.2. Substancje wykorzystywane do uzyskiwania odpowiednich wilgotności względnych w trakcie hydratacji próbek.

Próbki do pomiarów hydratacyjnych NMR uwadniano w dedykowanych probówkach NMR nad powierzchnią wody, aż do uzyskania odpowiedniego poziomu uwodnienia.

# 6.2 Skaningowa kalorymetria różnicowa – wyznaczani temperaturowej stabilności kompleksów DNA-surfaktant

Kalorymetr do pomiarów skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) składa się z dwóch takich samych układów. W jednym z nich umieszczone jest aluminiowe naczynko, z badaną próbką w środku. Część tę oznacza się literą S (ang. *Sample*). W drugim podukładzie znajduje się identyczne, naczynko z substancją wzorcową (R, ang. *Reference*) lub puste. Oba układy wyposażone są w osobne grzałki i termometry oporowe.



Rys. 6.4. Schemat ideowy kalorymetru DSC (Wróbel i inni, 2006).

Ideą doświadczenia jest podgrzewanie lub chłodzenie obu naczynek, przy utrzymywaniu w obydwóch takiej samej temperatury. Ponieważ naczynko z badaną substancją oraz referencyjne mają różną pojemność cieplną, różna musi być moc dostarczana do obu grzałek. Różnica wartości tych dwóch mocy przedstawiona jako funkcja temperatury nazywana jest krzywą DSC. Ponieważ w próbce referencyjnej nie zachodzą żadne przejścia fazowe, nagła zmiana mocy grzałki S świadczyć będzie przejściu fazowym, a jej wartość będzie miarą ciepła. Uzyskane w ten sposób krzywe, oprócz informacji o przejściach fazowych i odpowiadających im temperaturach, pozwalają wyznaczyć entropię oraz entalpię przejścia. Entalpię przejścia  $\Delta H$  liczy się ze wzoru:

$$\Delta H = k \cdot A_{p}, \qquad 6.2$$

gdzie k jest stałą wyznaczoną na podstawie analizy próbek o znanej entalpii, natomiast  $A_p$  jest polem powierzchni pod pikiem opisującym przejście.

Pomiary kalorymetryczne wykonano w Zakładzie Inżynierii Nowych Materiałów Instytutu Fizyki UJ na kalorymetrze DSC Perkin Elmer Diamond 6000 DSC i przeprowadzone zostały dla czystego DNA oraz dla kompleksów DNA-BA, DNA-CTMA oraz DNA-DDCA dla próbek uwodnionych w atmosferze o względnej wilgotności p = 0.76% do poziomów: DNA  $\Delta m/m_0 = 0.50$ , DNA-BA  $\Delta m/m_0 = 0.13$ , DNA-CTMA  $\Delta m/m_0 = 0.20$  oraz DNA-DDCA  $\Delta m/m_0 = 0.18$ . Pomiary wykonywano z szybkością grzania i chłodzenia 10°C/min.

Podczas ogrzewania czystego DNA pojawia się pik, niewidoczny podczas chłodzenia oraz podczas ponownego ogrzewania próbki. Onset piku znajduje się w temperaturze 74.1°C, maksimum w 81.88°C, a koniec w 86.09°C. Położenie tego piku w innych pomiarach kalorymetrycznych wyniosło 75.5°C i było interpretowane jako denaturacja DNA (Duguid i inni, 1996; Lee i inni, 2006). Entalpia przejścia wyniosła  $\Delta H = 13$  kJ/g, co odpowiada wartości  $10^{-5}$  kJ/mol.



**Rys. 6.5.** Skany kalorymetryczne DSC czystego DNA o wysokim poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.50$ ); widoczny pik odpowiadający denaturacji; linia ciągła – grzanie, linia przerywana – chłodzenie, linia kropkowana – ponowne grzanie.

Dla kompleksów DNA-surfaktant w zakresie temperatur od 30°C do 160°C nie zaobserwowano pików odpowiadających przejściom fazowym lub denaturacji.

W celu analizy pirolizy i rozkładu substancji wszystkie próbki ogrzano do temperatur przekraczających 200°C. Rozkład nastąpił w temperaturach T = 177°C dla czystego DNA oraz T = 172°C dla DNA-BA, T = 161°C dla DNA-CTMA oraz T = 162°C dla DNA-DDCA.

#### 6.3 Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego

#### 6.3.1 Spektrometr MRJ 30 MHz

Badania relaksacyjne magnetycznego rezonansu jądrowego wykonano na impulsowym spektrometrze MRJ WNS HB65 skonstruowanym przez Waterloo NMR Spectrometers, Waterloo, Onario, Kanada. Wytwarzane przez elektromagnes pole magnetyczne o indukcji 0.7 T odpowiada częstotliwości rezonansowej protonów 30 MHz. Stosowano czasy impulsów  $\pi/2 = (1.4 - 1.5) \mu$ s, dla mocy impulsu równej 400 W. Czas repetycji wynosił 2.003s. Pomiary przeprowadzano w temperaturze pokojowej, a każdy pomiar akumulowany był z 2000 akwizycji. Czas martwy spektrometru wynosił 10 µs.

Do projektowania impulsów służył komputer typu IBM-PC. Posługiwano się programem TEX, dostarczonym przez producenta spektrometru, pracującym w systemie operacyjnym DOS. Zaimplementowana sekwencja przekazywana była do programatora impulsów, który generował schodkowy sygnał elektryczny o amplitudzie 5 V i zadanym czasie trwania. W czasie nadawania impulsu generowany jest sinusoidalny sygnał o częstotliwości 10 MHz, który po dostarczeniu do powielacza częstotliwości modulowany jest do sygnału o częstotliwości 80 MHz. Dalej sygnał jest rozdzielany do czterech mieszaczy, w którym następuje amplitudowa modulacja impulsami prostokątnymi generowanymi przez programator impulsów. Następnie impulsy mieszane są z sygnałem 110 MHz. Po przejściu przez filtr dolnoprzepustowy powstaje sygnał 30 MHz, czyli o częstotliwości larmorowskiej dla protonów i o zadanym czasie trwania. Sygnał ten jest następnie wzmacniany i przesyłany do głowicy pomiarowej.

Między nabiegunnikami elektromagnesu wytwarzającego stałe pole magnetyczne o indukcji  $\vec{B}_0$  znajduje się głowica pomiarowa (*Probehead*), będąca układem LC, służąca zarówno do nadawania, jak i odbierania sygnału. Głowicę dostraja się do częstotliwości rezonansowej za pomocą kondensatora o zmiennej pojemności. Wirująca magnetyzacja próbki znajdującej się wewnątrz cewki nadawczo-odbiorczej indukuje w niej siłę elektromotoryczną. Sygnał ten jest wstępnie wzmacniany w przedwzmacniaczu, następnie mieszany z sygnałem o częstotliwości 110 MHz. Dalej następuje wyodrębnienie sygnału o częstotliwości 80 MHz filtrem pasmowo-przepustowym i dalsze wzmocnienie o zadanej wielkości w segmencie GAIN. Po demodulacji synchronicznej lub diodowej, sygnał poprzez dzielenie elektroniczne jest odfiltrowywany od częstotliwości larmorowskiej. Uzyskuje się w ten sposób zanik swobodnej precesji (FID), czyli obwiednię rejestrowanego sygnału, przesyłany ostatecznie do oscyloskopu oraz do karty cyfrowego oscyloskopu Compuscope 2000 znajdującej się w komputerze PC 80386.

Otrzymane dane analizowano za pomocą programu CracSpin, który powstał w Zakładzie Radiospektroskopii IF UJ (Węglarz i inni, 2000).

#### 6.3.2 Spektrometr MRJ Bruker Avance III 300 MHz

Badania MRJ w domenie częstotliwości wykonywane były na spektrometrze Bruker Avance III z serii Bruker Biospin, wyposażonym w magnes nadprzewodzący o średnicy otworu 89 mm, wytwarzający pole magnetyczne o indukcji 7 T, co odpowiada częstotliwości rezonansowej protonów 300 MHz, a także w głowice pomiarowe wysokiej mocy (umożliwiające pomiary NMR jąder <sup>19</sup>F i <sup>1</sup>H oraz <sup>15</sup>N i <sup>31</sup>P), stabilizator temperatury oraz komputer PC. Magnes nadprzewodzący umieszczony jest w ciekłym helu (w temperaturze około -270°C) oraz otoczony płaszczem izolującym, zawierającym ciekły azot (o temperaturze poniżej -196°C). Spektrometr można podzielić na cztery części: blok kontroli akwizycji (*Acquisition Control System*), przedwzmacniacz wysokiej wydajności (*High Performance Preampfiler*), system wzmacniaczy oraz blok kontroli magnetycznej (*Bruker Smart Magnet System*).

Blok kontroli akwizycji składa się z kolei z części generującej impulsy o częstotliwościach radiowych wykorzystywane do rezonansowego wzbudzania próbek (*Signal Generate Unit*) oraz z części odbierającej sygnał z badanej próbki (*Digital Receiver Unit*).

W systemie wzmacniaczy następuje wzmocnienie generowanych w bloku kontroli akwizycji sygnałów.

Przedwzmacniacz wysokiej wydajności wzmacnia sygnał wygenerowany przez pobudzoną uprzednio próbkę. Wzmacnia także i filtruje sygnał wzmocniony w systemie wzmacniaczy, który transmituje następnie do cewki nadawczo-odbiorczej.

System kontroli magnetycznej kontroluje stałe pole magnetyczne. Odpowiada za jego stabilizację oraz kompensuje niejednorodności.

Czas martwy spektrometru wynosił 6.5  $\mu$ s. Stosowano szerokość pasma 500 kHz, wzmocnienie impulsów 400 W oraz czas repetycji 1.5 s. Dla pomiarów w pokojowej temperaturze stabilizowano temperaturę na poziomie 22°C. Długość impulsu  $\pi/2$  wynosiła dla CTMA 2.2  $\mu$ s, natomiast dla DDCA 2.45  $\mu$ s.

Pomiary spektroskopii relaksacyjnej wykonywane były z użyciem sekwencji impulsów  $\pi - \tau - \pi/2$ , gdzie czasy pomiędzy impulsami wynosiły  $\tau = 5$  ms, 14 ms, 24 ms, 32 ms, 46 ms, 56 ms, 68 ms, 81 ms, 97 ms, 116 ms, 135 ms, 215 ms, 298 ms, 474 ms, 696 ms, 1.295 s, 1.945 s, 3.485 s, 6.124 s, 8.540 s.

Otrzymane dane analizowane były za pomocą programu dostarczonego przez producenta spektrometru TopSpin 3, oraz za pomocą programu OriginPro 9.0.

#### 7 Pomiary hydratacji kompleksu DNA-surfaktant

#### 7.1 Kinetyka hydratacji

Próbki hydratowano z fazy gazowej umieszczając w atmosferze o kontrolowanej wilgotności względnej,  $p/p_0$ . Zadaną wilgotność atmosfery uzyskiwano przez umieszczenie nad powierzchniami kwasu fosforowego, soli oraz wody (Rysunek 7.1a, b, c). W trakcie procesu uwadniania dokonywano pomiarów masy. W zakresie względnych wilgotności 9% - 52% dla kompleksu DNA-BA, 9% - 44% dla DNA-CTMA oraz 9% - 52% dla DNA-DDCA, otrzymane trasy hydratacyjne dobrze opisywane były krzywą jednoeksponencjalną:

$$\Delta m/m_0 = A_0^h + A_1^h \cdot \left( 1 - \exp(-t/t_1^h) \right),$$
**7.1**

gdzie  $\Delta m/m_0$  jest względnym przyrostem masy,  $A_0^h$  jest poziomem hydratacji dla względnej wilgotności 0%,  $A_1^h$  jest nasyceniowym poziomem hydratacji dla składowej, a  $t_1^h$  jest czasem hydratacji.

Dla uwodnień z zakresu 63% - 97% lepsze dopasowania uzyskiwania były dzięki zastosowaniu krzywej dwueksponencjalnej:

$$\Delta m/m_0 = A^h + A_1^h \cdot \left(1 - \exp(-t/t_1^h)\right) + A_2^h \cdot \left(1 - \exp(-t/t_2^h)\right),$$
 7.2

gdzie  $A_2^h$  i  $t_2^h$  oznaczają odpowiednio nasyceniowy poziom hydratacji oraz czasem hydratacji drugiej, wolniejszej składowej.

a)





c)



**Rys. 7.1.** Kinetyka hydratacji z fazy gazowej dla kompleksów DNA-surfaktant wyrażona jako względny przyrost masy (a) DNA-BA, (b) DNA-CTMA oraz (c) DNA-DDCA. Hydratację prowadzono dla różnych wartości wilgotności względnych, p/p<sub>0</sub>, atmosfery. Wilgotności środowisk wynosiły odpowiednio: ( $\blacksquare$ ) 9%, ( $\bigcirc$ ) 23%,( $\blacktriangle$ ) 32%, ( $\bigtriangledown$ ) 44%, ( $\blacklozenge$ ) 52%,( $\triangleleft$ ) 63%, ( $\blacklozenge$ ) 76%,( $\blacklozenge$ ) 88%, ( $\bigstar$ ) 93%, ( $\blacklozenge$ ) 97%.

W procesie hydratacji wyodrębniono dwie składowe, posiadające różne czasy hydratacji. Składowa wiążąca się z czasem  $t_1$  odpowiada wodzie ściśle związanej, wiążącej się najszybciej. Składowa charakteryzowana dłuższym czasem hydratacji,  $t_2$ , odpowiada frakcji wody luźno związanej. Wyodrębniono też składową wody wiążącą się w czasie krótszym od 10 minut (przed dokonaniem pierwszego pomiaru), wody najściślej związanej, a opisanej stałą  $A_0^h$ . Dla kompleksu DNA-BA wartość  $A_0^h$ , poziom hydratacji dla względnej wilgotności 0% (poziom hydratacji nasycenia frakcji wody bardzo ściśle związanej), wspólny dla wszystkich tras, wyniósł 0.038±0.001, dla DNA-DDCA 0.033±0.001, natomiast dla DNA-CTMA był wyższy i wynosił 0.061±0.004. Wartości te zbliżone są do poziomu wyznaczonego dla czystego DNA, gdzie wynosił on 0.057±0.010 (Harańczyk i inni, 2010).

Amplituda frakcji wody ściśle związanej,  $A_1^h$ , dla DNA-BA wyniosła 0.061±0.014, dla DNA-DDCA 0.062±0.043, dla DNA-CTMA była z kolei najniższa i równała się 0.039±0.011. Były to wartości znacznie niższe niż wyznaczona dla czystego DNA, w przypadku którego dało się wyróżnić wodę bardzo ściśle związaną, dla której amplituda  $A_1^h = 0.149 \pm 0.007$  oraz ściśle związana z amplitudą  $A_2^h = 0.694 \pm 0.039$ , co jest przypadkiem szczególnym, bowiem w niewielu przypadkach obecne są dwie składowe wody ściśle związanej (Harańczyk i inni, 2010). Wartości amplitudy wody luźno związanej były różne dla poszczególnych tras hydratacyjnych i wzrastały wraz z uwodnieniem.

Czasy hydratacji frakcji wody ściśle związanej  $t_1^h$  wyniosły dla DNA-BA (1.86±0.11) h, dla DNA-CTMA (1.04±0.21) h, a dla DNA-DDCA (0.59±0.04) h. Czasy hydratacji frakcji wody luźno związanej  $t_2^h$  równały się kolejno dla DNA-BA (32.1±2.4) h, dla DNA-CTMA (19.1±3.2) h oraz dla DNA-DDCA (20.9±1.3) h. Wartości te są znacznie różne od wartości dla czystego DNA, dla którego czasy hydratacji dwóch frakcji wody ściśle związanej wynosiły  $t_1^h = (0.27 \pm 0.08)$  h i  $t_2^h = (9.8 \pm 3.2)$  h, a czas hydratacji wody luźno związanej  $t_3^h = (44\pm14)$  h (Harańczyk i inni, 2010).

Parametry kinetyki hydratacji dla różnych kompleksów DNA-surfaktant zestawiono w Tabeli 7.1

| Parametr    | DNA-BA      | DNA-CTMA    | DNA-DDCA    |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| $A_0^h$     | 0.038±0.001 | 0.061±0.004 | 0.033±0.001 |
| $A_{l}^{h}$ | 0.061±0.014 | 0.039±0.011 | 0.062±0.043 |
| $t_1^h$ [h] | 1.86±0.11   | 1.04±0.21   | 0.59±0.04   |
| $t_2^h$ [h] | 32.1±2.4    | 19.1±3.2    | 20.9±1.3    |

Tabela 7.1. Porównanie parametrów kinetyki hydratacji kompleksów DNA-surfaktant.

## 7.2 Pęcznienie

Dla próbek uwadnianych w środowisku o wilgotności względnej 100% zaobserwowano dodatkowy, opóźniony proces hydratacji, rozpoczynający się po około 150 godzinach uwadniania, który zinterpretowany został jako pęcznienie. Proces hydratacji dla atmosfery o  $p/p_0 = 100\%$  opisano dwustopniową funkcją:

$$\Delta m(t)/m_0 = A_0^h + A_1^h \cdot \left[1 - \exp\left(-t/t_1^h\right)\right] + A_2^h \cdot \left[1 - \exp\left(-t/t_2^h\right)\right] \\ + \begin{cases} 0 & t < t_0 \\ A_3^h \cdot \left[1 - \exp\left(-t/t_3^h\right)\right] & t > t_0 \end{cases}$$
7.3

gdzie  $A_3^h$  jest amplitudą pęcznienia,  $t_3^h$  czasem pęcznienia, zaś  $t_0$  czasem, po którym rozpoczyna się pęcznienie. Trasy hydratacyjne z widocznym procesem pęcznienia widoczne są na Rysunkach 7.2a, b i c.

a)



b)





**Rys. 7.2.** Trasy hydratacyjne kompleksu (a) DNA-BA, (b) DNA-CTMA oraz (c) DNA-DDCA zmierzone w atmosferze o wilgotności  $p/p_0$ : ( $\blacksquare$ ) 93%, ( $\triangle$ ) 97% oraz ( $\bigcirc$ ) 100%. Dla uwodnienia 100% widoczny jest proces pęcznienia.

Proces pęcznienia zaczynał się dla kompleksu DNA-BA po czasie  $t_0 = (153.4 \pm 3.7)$  h od rozpoczęcia trasy hydratacyjnej, dla DNA-CTMA po  $t_0 = (152.6 \pm 2.5)$  h, natomiast dla DNA-DDCA po  $t_0 = (150.5 \pm 2.4)$  h. Amplitudy pęcznienia  $A_3^h$  wynosiły odpowiednio dla DNA-BA 0.161±0.011, dla DNA-CTMA 0.140±0.016, a dla DNA-DDCA 0.180±0.022. Czasy pęcznienia równały się natomiast dla DNA-BA  $t_3^h = (29.1 \pm 4.5)$  h, dla DNA-CTMA  $t_3^h = (12.5 \pm 5.4)$  h, a dla DNA-DDCA  $t_3^h = (40.6 \pm 1.5)$  h. Dla czystego DNA zarówno amplituda pęcznienia i czas po jakim się ono zaczynało zależało od próbki. Amplitudy zawierały się w przedziale od 0.215±0.065 do 2.014±0.023, natomiast  $t_0$  w przedziale od (25±23) h do (202±5) h (Harańczyk i inni, 2010).

Dla próbki uwadnianej w środowisku o wilgotności 100% wyznaczono także całkowity nasyceniowy poziom uwodnienia bez uwzględnienia procesu pęcznienia, czyli  $A_0^h + A_1^h + A_2^h$ , który wyniósł dla DNA-BA 0.449±0.019, dla DNA-CTMA 0.535±0.023, a dla DNA-DDCA 0.473±0.026.

#### 7.3 Izoterma sorpcyjna

W celu wyznaczenia izoterm sorpcyjnych wyznaczono całkowity poziom hydratacji nasyceniowej dla wszystkich wilgotności, jako sumę wyodrębnionych amplitud frakcji wody, a z pominięciem dodatkowej hydratacji wynikającej z procesu pęcznienia: Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant

$$C^{h} = A_{0}^{h} + A_{1}^{h} + A_{2}^{h}.$$
 7.4

Dla oceny stosowalności różnych modeli sorpcji wielowarstwowej, uzyskane izotermy sorpcyjne przedstawiono w postaci parabolicznej (równanie 5.37). W takiej reprezentacji krzywa opisująca izotermę dla modelu BET przechodzi dla wilgotności 100% przez 0. Odchylenie od tej wartości jest miarą stosowalności modelu Denta.

a)



b)





**Rys. 7.3.** Izotermy sorpcyjne Denta oraz BET dla kompleksów DNA-surfaktant przedstawione w postaci parabolicznej: (a) dla DNA-BA, (b) dla DNA-CTMA oraz (c) dla DNA-DDCA. Linia ciągła to dopasowany model izotermy Denta, linia prze-rywana – model izotermy BET.

Znaczne odchylenie od 0 wartości dla h = 0 sugeruje, że modelem lepiej opisującym badane układy jest model izotermy Denta (GAB).

Z dopasowania izotermy sorpcyjnej wg modelu Denta do danych hydratacyjnych wyznaczono poziom frakcji wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące dla kompleksu DNA-BA jako  $\Delta M/m_0 = 0.0568\pm0.0046$ , dla kompleksu DNA-CTMA jako  $\Delta M/m_0 = 0.102\pm0.021$ , natomiast dla DNA-DDCA wyniósł on  $\Delta M/m_0 = 0.043\pm0.006$ . Wartość poziomu frakcji wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące dla czystego DNA wynosił  $\Delta M/m_0 = 0.114$ (Harańczyk i inni, 2010).

Wartości parametru *b*, którego różnica od wartości 1 jest miarą stosowalności modelu Denta, wyniosły dla DNA-BA  $0.873 \pm 0.012$ , dla DNA-CTMA  $0.814 \pm 0.040$ , a dla DNA-DDCA  $0.932 \pm 0.010$ . Wartość tego parametru dla czystego DNA jest wyższa i wynosi 0.965 (Harańczyk i inni, 2010).

Wkład od nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących wodę dla wilgotności względnej  $p/p_0 = 100\%$  wyniósł 4.5% dla kompleksu DNA-BA, 6.85% dla DNA-CTMA oraz 2.3% dla DNA-DDCA, co świadczy o podwyższonej hydrofobowości kompleksu DNA-CTMA względem pozostałych badanych kompleksów. Dla DNA wartość ta równała się 2.95% (Harańczyk i inni, 2010).

Wartości parametrów dla kompleksów DNA-surfaktant zestawiono w Tabeli 7.2.

| Tabela 7.2. Porównanie parametrów i | zoterm sorpcyjnych dopasowanych | dla kompleksów DNA-surfaktant wg modelu |
|-------------------------------------|---------------------------------|---|
| Denta.                              |                                 |   |

| Parametr         | DNA-BA        | DNA-CTMA    | DNA-DDCA    |
|------------------|---------------|-------------|-------------|
| $\Delta M/m_0$   | 0.0568±0.0046 | 0.102±0.021 | 0.043±0.006 |
| b                | 0.873±0.012   | 0.814±0.040 | 0.932±0.010 |
| 1/b <sub>1</sub> | 4.5%          | 6.85%       | 2.4%        |

a)



b)





**Rys. 7.4.** Izoterma sorpcyjna dla kompleksów (a) DNA-BA, (b) DNA-CTMA, (c) DNA-DDCA. Linia przerywana – model BET, linia ciągła – model Denta, linia kropkowana – model GDW.

#### W Tabeli 7.3 zestawiono parametry dopasowań modelu GDW.

| Parametr       | DNA-BA            | DNA-CTMA          | DNA-DDCA            |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| $\Delta M/m_0$ | $0.082 \pm 0.015$ | $0.146 \pm 0.062$ | $0.0518 \pm 0.0034$ |
| K              | $10.5 \pm 3.5$    | $49 \pm 21$       | 8.6 ± 3.0           |
| b              | $0.905 \pm 0.015$ | $0.90 \pm 0.12$   | $0.9334 \pm 0.0093$ |
| W              | $0.51 \pm 0.16$   | $0.27 \pm 0.47$   | $0.906 \pm 0.083$   |

Tabela 7.3. Porównanie parametrów izoterm sorpcyjnych wg modelu GDW kompleksów DNA-surfaktant.

Parametry *b* dla modelu Dent i GDW różnią się niewiele (dla kompleksu DNA-CTMA oraz DNA-DDCA są równe w granicach niepewności). Parametr *w* dla wszystkich badanych kompleksów DNA-surfaktant jest mniejszy od 1, co oznacza, że populacja kolejnych warstw znacząco spada wraz liczbą kolejnych molekuł związanych do danego miejsca wiążącego.

# 8 Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów

W celu analizy wpływu wilgoci atmosferycznej na kompleksy DNA-surfaktant, zmierzono na relaksometrze <sup>1</sup>H-NMR (30 MHz) zaniki swobodnej precesji dla kompleksów DNA z surfaktantami BA (rozdział 8.1), CTMA (rozdział 8.2) oraz DDCA (rozdział 8.3) w funkcji hydratacji z fazy gazowej.

# 8.1 Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów dla kompleksu DNA-BA

#### 8.1.1 Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-BA

Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów stałego kompleksu DNA-BA, dla niższych poziomów hydratacji ( $\Delta m/m_0 \leq 0.08$  dla DNA-BA) jest dobrze opisywany superpozycją funkcji Gaussa o amplitudzie *S*, pochodzącej od protonów matrycy stałej kompleksu oraz jednej składowej eksponencjalnej o amplitudzie *L*<sub>1</sub>, pochodzącej od wody ściśle związanej na powierzchni badanych układów:

$$FID(t) = S \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S}^*}\right)^2\right) + L_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_1}^*}\right),$$
8.1

gdzie  $T_{2S}^*$  jest czasem relaksacji spinowo-spinowej dla protonów matrycy stałej kompleksu DNA-surfaktant, będącym czasem po którym wartość składowej gaussowskiej sygnału spada do poziomu 1/e wartości początkowej, a  $T_{2L_1}^*$  jest czasem relaksacji spinowo-spinowej frakcji wody ściśle związanej.

Dla uwodnień pośrednich ( $0.08 \le \Delta m/m_0 \le 0.27$ ) sygnał pochodzący od protonów matrycy stałej nie jest już widoczny, pojawia się za to sygnał od frakcji wody luźno związanej:

$$FID(t) = L_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_1}^*}\right) + L_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_2}^*}\right).$$
8.2

Dwie frakcje wody: ściśle oraz luźno związane są rozróżnialne dzięki różnej dynamice molekularnej atomów wodoru wchodzących w ich skład, czyli z różnymi czasami relaksacji poprzecznej.

Dla wyższych hydratacji ( $\Delta m/m_0 \ge 0.29$ ) przestaje być obserwowany także sygnał pochodzący od wody ściśle związanej i rejestrowany jest jedynie sygnał pochodzący od wody luźno związanej:

$$FID(t) = L_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_2}^*}\right).$$
8.3

Czas relaksacji spinowo-spinowej dla frakcji protonów matrycy stałej kompleksu wynosi  $T_{2S}^* \approx 20 \ \mu$ s.

Wartość czasu relaksacji poprzecznej frakcji protonów  $L_1$  słabo zależy od poziomu hydratacji i dla kompleksu DNA-BA jest równa około  $T_{2L_1}^* \approx 50 \ \mu$ s, natomiast dla składowej o najdłuższym czasie zaniku  $L_2$  zaobserwowano wartość  $T_{2L_2}^* \approx 600 \ \mu$ s.

Hydratacyjne zależności czasów relaksacji poprzecznej wszystkich zaobserwowanych frakcji dla kompleksu DNA-BA przedstawiono na Rysunku 8.1.



**Rys. 8.1.** Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej dopasowana z sygnałów zaniku swobodnej precesji dla protonów w kompleksie DNA-BA; ( $\bullet$ ) frakcja stała, ( $\triangle$ ) frakcja wody ściśle związanej, (O) frakcja wody luźno związanej.

## 8.1.2 Analiza amplitudy sygnału L<sub>2</sub> na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla kompleksu DNA-BA

Dla wyższych poziomów uwodnienia kompleksu, dla których nie udało się wyodrębnić sygnału S od matrycy stałej, sygnał pochodzący od frakcji wody luźno związanej wyrażono w jednostkach całkowitego sygnału zmierzonego. Poziom sygnału od frakcji wody luźno związanej,  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ , dla kompleksu DNA-BA wzrasta liniowo wraz z poziomem hydratacji.

Powyższa zależność opisana jest funkcją fenomenologiczną:

$$\frac{L_2}{(L_1+L_2)} (\Delta m/m_0) = (5.49 \pm 0.47) \cdot \Delta m/m_0 - (0.423 \pm 0.070).$$
8.4



**Rys. 8.2.** Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$  wyrażona w jednostkach amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-BA w funkcji hydratacji próbki.

Graniczna wartość poziomu uwodnienia,  $\Delta m_{L_2}/m_0$ , dla którego pojawia się frakcja wody luźno związanej wynosi:  $\Delta m_{L_2}/m_0 = 0.0770 \pm 0.0067$ . Tymczasem wartość sumy całkowitych poziomów hydratacji nasycenia wody bardzo ściśle i ściśle związanej wyznaczone grawimetrycznie dla kompleksu DNA-BA wynosi  $\Delta M/m_0 = 0.099 \pm 0.015$ , co jest wartością zbliżoną.

# 8.2 Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów dla kompleksu DNA-CTMA

#### 8.2.1 Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-CTMA

Kształt zaniku sygnału swobodnej precesji dla kompleksu DNA-CTMA zachowuje się podobnie wraz ze zmianą hydratacji, jak dla kompleksu DNA-BA. Dla najniższych uwodnień  $\Delta m/m_0 \leq 0.1$  opisywany jest superpozycją funkcji Gaussa o amplitudzie *S* oraz jednej składowej eksponencjalnej o amplitudzie  $L_1$  (równanie 8.1). Dla zakresu uwodnień pośrednich  $(0.128 \le \Delta m/m_0 \le 0.25)$  pojawia się sygnał o amplitudzie  $L_2$  (równanie 8.2). Natomiast dla uwodnień najwyższych ( $\Delta m/m_0 \ge 0.41$ ) obserwowano jedynie sygnał od wody luźno związanej (równanie 8.3).

Przykładowe sygnały FID obserwowane dla kompleksu DNA-CTMA widoczne są na Rysunku 8.3. Na wykresach przedstawiających zanik swobodnej precesji od frakcji stałej sygnału nie widać charakterystycznej "falki" typowej dla funkcji Abragama (równanie 4.54), co uniemożliwiło zastosowanie tego modelu (rozdział 4.6.4).









**Rys. 8.3.** Sygnały zaniku swobodnej precesji dla protonów stałego kompleksu DNA-CTMA zarejestrowane dla częstości rezonansowej 30 MHz (długość impulsu  $\pi/2 = 1.5 \mu$ s). Względny przyrost masy wynosił odpowiednio dla (a) i (b)  $\Delta m/m_0 = 0.132$  oraz dla (c) i (d)  $\Delta m/m_0 = 0.261$ . Ciągła linia przedstawia dopasowanie metodą najmniejszych kwadratów do danych doświadczalnych funkcji opisanych równaniem 8.1 (a) oraz równaniem 8.2 (b). Na rysunkach (c) i (d) przedstawiono funkcje rezydualne, nie przekraczające dla (c) 1.1% oraz dla (d) 0.8%.

Zmierzona wartość czasu relaksacji spinowo-spinowej dla frakcji protonów matrycy stałej kompleksu DNA-CTMA wynosi  $T_{2s}^* \approx 30 \ \mu$ s. Czas relaksacji poprzecznej frakcji protonów  $L_1$  równy jest  $T_{2L_1}^* \approx 80 \ \mu$ s, natomiast dla składowej  $L_2$  zaobserwowano wartość  $T_{2L_2}^* \approx 700 \ \mu$ s.

Rysunek 8.4 przedstawia hydratacyjną zależność czasów relaksacji poprzecznej zaobserwowanych frakcji dla kompleksu DNA-CTMA.



**Rys. 8.4.** Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej dopasowana z sygnałów zaniku swobodnej precesji dla protonów w kompleksie DNA-CTMA; ( $\bullet$ ) frakcja stała, ( $\triangle$ ) frakcja wody ściśle związanej, (O) frakcja wody luźno związanej.

## 8.2.2 Analiza amplitud sygnału *L*<sub>2</sub> na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla kompleksu DNA-CTMA

W zakresie wyższych poziomów hydratacji kompleksu DNA-CTMA, gdzie podobnie jak dla DNA-BA, również nie udało się wyodrębnić sygnału S od matrycy stałej kompleksu, sygnał pochodzący od frakcji wody luźno związanej wyrażono w jednostkach całkowitego sygnału zmierzonego. Poziom tego sygnału,  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ , wzrasta liniowo wraz z poziomem hydratacji.

Powyższa zależność opisana jest funkcją:

$$\frac{L_2}{(L_1 + L_2)} (\Delta m/m_0) = (3.39 \pm 0.11) \cdot \Delta m/m_0 - (0.235 \pm 0.025).$$
8.5



**Rys. 8.5.** Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$  wyrażona w jednostkach amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-CTMA w funkcji hydratacji próbki.

Graniczna wartość poziomu uwodnienia,  $\Delta m_{L_2} / m_0$ , dla której pojawia się frakcja wody luźno związanej dla DNA-CTMA wynosi  $\Delta m_{L_2} / m_0 = 0.0693 \pm 0.0077$ . Natomiast wartość sumy całkowitych poziomów nasycenia hydratacji frakcji wody bardzo ściśle i ściśle związanej wyznaczonych grawimetrycznie wynosi  $\Delta M / m_0 = 0.100 \pm 0.015$ .

# 8.3 Pomiary zależności hydratacyjnych sygnału zaniku swobodnej precesji dla protonów dla kompleksu DNA-DDCA

#### 8.3.1 Analiza kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji dla kompleksu DNA-DDCA

Dla najniższych poziomów hydratacji kompleksu DNA-DDCA ( $\Delta m/m_0 \le 0.11$ ) sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów, podobnie jak w przypadku kompleksów DNA-BA oraz DNA-CTMA dobrze opisywany jest superpozycją funkcji Gaussa o amplitudzie *S* oraz jednej składowej eksponencjalnej o amplitudzie *L*<sub>1</sub>, opisaną równaniem 8.1.

Dla uwodnień pośrednich ( $0.128 \le \Delta m/m_0 \le 0.25$ ) pojawia się sygnał pochodzący od wody luźno związanej o amplitudzie  $L_2$ :

$$FID(t) = S \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S}^*}\right)^2\right) + L_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L_1}^*}\right) + L_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{SL_2}^*}\right).$$
8.6

Dla jeszcze wyższych poziomów uwodnienia ( $\Delta m/m_0 \ge 0.27$ ) przestał być obserwowany sygnał pochodzący od frakcji wody ściśle związanej, a zanik swobodnej precesji można było skutecznie przybliżyć superpozycją dwóch funkcji eksponencjalnych:

$$FID(t) = S \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S}^*}\right)^2\right) + L_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{SL_2}^*}\right).$$
8.7

Wyznaczony w ten sposób czas relaksacji spinowo-spinowej dla frakcji protonów matrycy stałej kompleksu wynosi  $T_{25}^* \approx 20 \,\mu$ s, dla frakcji protonów  $L_I T_{2L_1}^* \approx 80 \,\mu$ s, natomiast dla  $L_2 T_{2L_2}^* \approx 600 \,\mu$ s. Na Rysunku 8.6 przedstawiono hydratacyjne zależności czasów relaksacji poprzecznej wszystkich wyodrębnionych frakcji sygnału zaniku precesji swobodnej dla protonów.



**Rys. 8.6.** Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej dopasowana z sygnałów zaniku swobodnej precesji dla protonów w kompleksie DNA-DDCA; ( $\bullet$ ) frakcja stała, ( $\triangle$ ) frakcja wody ściśle związanej, (O) frakcja wody luźno związanej.

#### 8.3.2 Zależność hydratacyjna składowych cieczowych dla kompleksu DNA-DDCA

Zależność hydratacyjna amplitudy sygnału sumarycznej frakcji cieczowej wyrażona w stosunku do amplitudy sygnału od frakcji stałej,  $\frac{L_1 + L_2}{S}$ , dla kompleksu DNA –DDCA przedstawiona jest na Pusupku 8.7

przedstawiona jest na Rysunku 8.7.

W funkcji poziomu uwodnienia sygnał pochodzący od wody związanej opisany jest funkcją liniową:

$$\frac{(L_1 + L_2)}{S} (\Delta m/m_0) = (59.5 \pm 4.9) \cdot \Delta m/m_0 - (1.04 \pm 0.87).$$
8.8



**Rys. 8.7.** Całkowity sygnał cieczowy wyrażony w jednostkach ciała stałego,  $\frac{L_1 + L_2}{S}$ , w funkcji hydratacji dla kompleksu

DNA-DDCA.

Liniowa forma zależności hydratacyjnej wskazuje na nieobecność w kompleksie DNA-DDCA frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie, gdyż w takim przypadku krzywa 8.8 opisywana byłaby funkcją wymierną (Harańczyk i inni, 1996, Harańczyk i inni, 1999).

Zależność hydratacyjna frakcji wody luźno związanej wyrażonej w jednostkach sygnału ciała stałego dla kompleksu DNA-DDCA,  $L_2/S$ , (Rysunek 8.8), opisywana jest również funkcją liniową:

$$\frac{L_2}{S}(\Delta m/m_0) = (83.8 \pm 5.8) \cdot \Delta m/m_0 - (9.4 \pm 1.2).$$
8.9



**Rys. 8.8.** Sygnał pochodzący od wody luźno związanej wyrażony w jednostkach ciała stałego, L<sub>2</sub>/S, w funkcji hydratacji dla kompleksu DNA-DDCA.

Wyznaczona wartość uwodnienia,  $\Delta m_{L_2} / m_0$ , dla którego pojawia się składowa wody luźno związanej wynosi  $\Delta m_{L_2} / m_0 = 0.112 \pm 0.016$ , co jest wartością zbliżoną do sumy całkowitych poziomów hydratacji nasycenia frakcji wody bardzo ściśle i wody ściśle związanej  $(A_0^h + A_1^h)$ , której wartość wyznaczono w pomiarach grawimetrycznych  $\Delta M / m_0 = 0.095 \pm 0.044$ .

Dla kompleksu DNA-BA oraz dla kompleksu DNA-CTMA zaobserwowano frakcję stałą w zbyt małym zakresie uwodnień (od 0.014 do 0.036 dla DNA-BA oraz od 0.055 do 0.091 dla DNA-CTMA), aby można było trafnie opisać taką zależność.

# 8.3.3 Analiza amplitud sygnału L<sub>2</sub> na jednostkę całkowitego sygnału cieczowego dla kompleksu DNA-DDCA

Sygnał pochodzący od frakcji wody luźno związanej wyrażony w jednostkach całkowitego sygnału zmierzonego,  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ , wzrastający liniowo wraz z poziomem hydratacji, przedstawiono na Rysunku 8.9.

Graniczna wartość poziomu uwodnienia,  $\Delta m_{L_2} / m_0$ , powyżej którego udaje się wyodrębnić sygnał od frakcji wody luźno związanej dla kompleksu DNA-CTMA wynosi  $\Delta m_{L_2} / m_0 = 0.077 \pm 0.014$ . Natomiast wartość sumy całkowitych poziomów hydratacji nasycenia wody bardzo ściśle i ściśle związanej wyznaczonych grawimetrycznie wynosi  $\Delta M / m_0 = 0.095 \pm 0.044$ . Powyżej granicznego poziomu zależność opisana jest funkcją:

$$\frac{L_2}{(L_1+L_2)} (\Delta m/m_0) = (5.49 \pm 0.37) \cdot \Delta m/m_0 - (0.424 \pm 0.014).$$
8.10



**Rys. 8.9.** Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej  $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$  wyrażona w jednostkach amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-DDCA w funkcji hydratacji próbki.

### **9** Pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR

Wpływ poziomu uwodnienia i temperatury na DNA oraz na jego kompleksy DNA-CTMA i DNA-DDCA badano również metodą NMR w domenie częstości (dla 300 MHz).

### 9.1 Hydratacyjne pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR

Dla czystego DNA oraz kompleksów DNA-CTMA i DNA-DDCA wykonano pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR w funkcji uwodnienia.

### 9.1.1 Analiza kształtu i hydratacyjne pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR dla DNA

Widmo <sup>1</sup>H-NMR dla czystego DNA o niskim poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 < 0.51$ ) jest superpozycją dwóch szerokich linii o kształcie dobrze opisywanym funkcją Gaussa, pochodzących od ciała stałego oraz jednej wąskiej, cieczowej, dobrze przybliżanej funkcją Lorentza (Rysunek 9.1a):

$$A(v) = \frac{A_{S_{1}}}{\Delta v_{G_{1}} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi/2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G_{1}})}{\Delta v_{G_{1}}}\right)^{2}\right] + \dots + \frac{A_{S_{2}}}{\Delta v_{G_{2}} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi/2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G_{2}})}{\Delta v_{G_{2}}}\right)^{2}\right] + \frac{2A_{L}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L}}{4 \cdot (v - v_{L})^{2} + \Delta v_{L}^{2}}\right], \quad 9.1$$

gdzie  $\Delta v_{G_1}$ ,  $\Delta v_{G_2}$  i  $\Delta v_L$  są szerokościami połówkowymi funkcji Gaussa i funkcji Lorentza, odpowiednio,  $v_{G_1}$ ,  $v_{G_2}$  oraz  $v_L$  są położeniami środków linii Gaussa i składowej dopasowanej funkcją Lorentza, natomiast  $A_{S_1}$ ,  $A_{S_2}$  i  $A_L$  są polami powierzchni pod pikami Gaussa i Lorentza, odpowiednio.

Dla poziomu uwodnienia przekraczającego  $\Delta m/m_0 = 0.52$  obie składowe linii o kształcie funkcji Gaussa nie są wyróżniane w widmie DNA(Rysunek 9.1b), a stwierdza się tylko jedną wąską linię cieczową o kształcie funkcji Lorentza:

$$A(v) = \frac{2A_L}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_L}{4 \cdot (v - v_L)^2 + \Delta v_L^2} \right].$$
9.2



b)

0.5

0.0

-40

-30

-20

**Rys. 9.1.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla DNA uwodnionego do poziomu (a)  $\Delta m/m_0 = 0.018$  oraz (b)  $\Delta m/m_0 = 1.92$ ; linia ciągła – zmierzone widmo , linia przerywana –dopasowany kształt (równanie 9.1 dla (a) oraz 9.2 dla (b))

0

-10

10

20

30 40 f [kHz]

Widma zebrane dla całego zakresu hydratacji przedstawione są na Rysunku 9.2. Z powodu dużej i szybko narastającej wraz z uwodnieniem amplitudy linii cieczowej, linie od ciała stałego widoczne są tylko w niewielkim stopniu dla najniższej hydratacji.



**Rys. 9.2.** Widma <sup>1</sup>H-NMR w funkcji poziomu hydratacji dla czystego DNA zarejestrowane w temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez czynnik  $k \cdot (1 + \Delta m/m_0)$ .

Położenia środków gaussowskich składowych linii dla czystego DNA wynoszą  $v_{G_1} \approx -100 \text{ kHz}$  oraz  $v_{G_2} \approx -25 \text{ kHz}$ , względem częstotliwości rezonansowej protonów swobodnych w polu magnetycznym o indukcji 7T. Szerokość połówkowa obu składowych linii pochodzących od ciała stałego jest równa  $\Delta v_{G_1} = (134.0 \pm 1.4) \text{ kHz}$  oraz  $\Delta v_{G_2} = (74.7 \pm 8.3) \text{ kHz}$ (Rysunek 9.4).



**Rys. 9.3.** Położenia środków linii składowej cieczowej widma (O) <sup>1</sup>H-NMR dla czystego DNA wyrażone w funkcji uwodnienia.



**Rys. 9.4.** Szerokości połówkowe składowej cieczowej (O) widma <sup>1</sup>H-NMR dla czystego DNA wyrażone w funkcji uwodnienia; we wstawce widoczne także szerokości połówkowe linii od ciała stałego: ( $\bullet$ ) składowa  $G_1$  oraz ( $\blacksquare$ ) składowa  $G_2$ .

Dla składowej stałej widma, czas relaksacji spinowo-spinowej  $T_{2G}^*$  może zostać wyznaczony z równania:

$$T_{2G}^* = \frac{\sqrt{2}}{\pi \Delta v_G}.$$
 9.3

Wynosi on dla składowej  $G_1$ :  $T_{2G_1}^* = (3.36 \pm 0.35) \,\mu$ s, a dla składowej  $G_2$ :  $T_{2G_2}^* = (6.03 \pm 0.67) \,\mu$ s. Obserwacja obu linii jest utrudniona, ponieważ stała czasowa zaniku jest porównywalna z czasem martwym spektrometru.

Położenie linii sygnału cieczowego *L* dla niskich uwodnień zmienia się w funkcji rosnącego uwodnienia, następnie powyżej  $\Delta m/m_0 = 0.4$  przyjmuje średnią wartość  $v_L = (1.733 \pm 0.036)$  kHz (Rysunek 9.3). Szerokość połówkowa linii *L* dla najniższego uwodnienia przyjmuje wartość  $\Delta v_L \approx 6.2$  kHz, charakteryzując frakcję wody ściśle związanej, by po osiągnięciu poziomu hydratacji  $\Delta m/m_0 = 0.4$  zwęzić się do  $\Delta v_L = (1.022 \pm 0.021)$  kHz (Rysunek 9.4), co jest zbliżone do naturalnej szerokości linii dla spektrometru i oznacza sygnał dla mobilnej frakcji wody luźno związanej.

Czas relaksacji spinowo-spinowej  $T_{2L_i}^*$  dla składowej cieczowej opisywanej funkcją Lorentza, może być policzony z zależności: Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant

$$\Gamma_{2L_i}^* = \frac{1}{\pi \cdot \Delta \nu_L}$$
9.4

i dla wyższych uwodnień wynosi on  $T_{2L}^* = (311 \pm 6) \,\mu \text{s}$ , co jest wartością zbliżoną do zmierzonej w domenie czasu z zaniku swobodnej precesji wartości czasu relaksacji spinowospinowej  $T_{2L}^* \approx 100 \,\mu \text{s}$  (Harańczyk i inni, 2010).

Dla próbki czystego DNA składowa cieczowa *L* wyrażona w jednostkach suchej masy, wzrasta liniowo wraz hydratacją (Rysunek 9.5), zgodnie z równaniem:

$$L/S = (3.80 \pm 2.0) \cdot \Delta m / m_0 + (0.137 \pm 0.027).$$
 9.5

Jest to zachowanie podobne do zaobserwowanego dla DNA w domenie czasu, gdzie wyznaczony współczynnik nachylenia prostej opisującej narastanie składowej cieczowej wyniósł  $2.80 \pm 0.09$  (Harańczyk i inni, 2010). Różnica nachyleń mogła wynikać z różnego osłabienia sygnału od ciała stałego, wynikającego z różnej zawartości jonów paramagnetycznych w różnych seriach materiału doświadczalnego.



**Rys. 9.5.** Hydratacyjna zależność składowej cieczowej *L* wyrażonej w jednostkach składowej stałej, *L/S*, suchej masy dla czystego DNA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki wyrażony w jednostkach suchej masy.

### 9.1.2 Analiza kształtu widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA

Widmo <sup>1</sup>H-NMR kompleksów DNA-surfaktant, dla najniższych poziomów uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.057$  dla DNA-CTMA oraz w zakresie od  $\Delta m/m_0 = 0.048$  do 0.069 dla DNA-DDCA) może być przedstawione jako superpozycja szerokiej składowej *G* pochodzącej od frakcji stałej kompleksu, dobrze dopasowywanej funkcją Gaussa oraz jednej wąskiej składowej *L*<sub>1</sub> o kształcie funkcji Lorentza, pochodzącej od cieczy:

$$A(v) = \frac{A_{S}}{\Delta v_{G} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi/2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G})}{\Delta v_{G}}\right)^{2}\right] + \frac{2A_{L_{1}}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L_{1}}}{4 \cdot (v - v_{L_{1}})^{2} + \Delta v_{L_{1}}^{2}}\right], \quad 9.6$$

gdzie  $\Delta v_G$  i  $\Delta v_{L_1}$  są szerokościami połówkowymi odpowiednio funkcji Gaussa i Lorentza, składających się na widmo,  $v_G$  oraz  $v_{L_1}$  są położeniami środków linii Gaussa i Lorentza, natomiast  $A_S$  i  $A_{L_1}$  są polami powierzchni pod liniami Gaussa i Lorentza.

Wraz ze wzrastającym uwodnieniem pojawia się druga, wąska składowa, *L*<sub>2</sub>, dopasowywana funkcją Lorentza. Widmo jest dobrze opisane superpozycją funkcji Gaussa oraz dwóch wąskich składowych o kształcie funkcji Lorentza, pochodzących z dwóch frakcji wody związanej w stałym kompleksie DNA-surfaktant:

$$A(v) = \frac{A_{s}}{\Delta v_{G} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi / 2}} exp \left[ -2\ln 4 \cdot \left( \frac{(v - v_{G})}{\Delta v_{G}} \right)^{2} \right] + \frac{2A_{L_{I}}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_{I}}}{4 \cdot (v - v_{L_{I}})^{2} + \Delta v_{L_{I}}^{2}} \right] + \dots \\ \dots + \frac{2A_{L_{2}}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_{2}}}{4 \cdot (v - v_{L_{2}})^{2} + \Delta v_{L_{2}}^{2}} \right], \qquad 9.7$$

gdzie  $\Delta v_{L_2}$ ,  $v_{L_2}$   $A_{L_2}$  oznaczają odpowiednio szerokość połówkową linii, położenie środka linii oraz pole powierzchni pod drugą linią o kształcie funkcji Lorentza.

Dla jeszcze wyższych poziomów hydratacji ( $\Delta m/m_0 > 0.137$  dla DNA-CTMA oraz  $\Delta m/m_0 > 0.163$  dla DNA-DDCA) składowa o kształcie funkcji Gaussa nie jest już wyodrębniana z widm, które składają się wyłącznie z dwóch wąskich linii o kształcie funkcji Lorentza:

$$A(v) = \frac{2A_{L_{I}}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_{I}}}{4 \cdot (v - v_{L_{I}})^{2} + \Delta v_{L_{I}}^{2}} \right] + \frac{2A_{L_{2}}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_{2}}}{4 \cdot (v - v_{L_{2}})^{2} + \Delta v_{L_{2}}^{2}} \right].$$
9.8

## 9.1.2.1 Hydratacyjne pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA

Na Rysunku 9.6a i b przedstawiono widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA w temperaturze pokojowej dla dwóch przykładowych uwodnień.

a)



b)



**Rys. 9.6.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane przy częstości 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA uwodnionego do poziomu (a)  $\Delta m/m_0 = 0.06$ , (b)  $\Delta m/m_0 = 0.53$ ; linia ciągła – widmo zmierzone, linia przerywana –dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.6 oraz (b) równaniem 9.8.

Widma dla całego zakresu hydratacji zestawiono na Rysunku 9.7.



**Rys. 9.7.** Widma <sup>1</sup>H-NMR w funkcji poziomu hydratacji dla kompleksu DNA-CTMA zebrane w temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez czynnik k· $(1 + \Delta m/m_0)$ .

Pozycja linii o kształcie funkcji Gaussa jest równa dla kompleksu DNA-CTMA  $v_G = (2.99 \pm 0.52)$  kHz. Szerokość połówkowa linii od ciała stałego maleje od wartości  $\Delta v_G = (26.054 \pm 0.026)$  kHz do wartości  $\Delta v_G = (20.272 \pm 0.020)$  kHz, wraz ze wzrastającym uwodnieniem od  $\Delta m/m_0 = 0.057$  do 0.117. Jest to spowodowane zmianą zakresu pól lokalnych, na skutek rosnącego ich uśrednienia wywołanego wzrastającą mobilnością składników matrycy stałej kompleksu. Na Rysunku 9.8 przedstawiono pozycje środków składowych cieczowych linii. Rysunek 9.9 przedstawia szerokości połówkowe składowych stałych i cieczowych linii dla kompleksu DNA-CTMA.



**Rys. 9.8.** Położenia środków linii składowych cieczowych widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA wyrażone w funkcji uwodnienia; ( $\Delta$ ) składowa  $L_1$ , (O) składowa  $L_2$ .



**Rys. 9.9.** Szerokości połówkowe pików składowych cieczowych w widmie <sup>1</sup>H-NMR hydratowanego kompleksu DNA-CTMA w funkcji poziomu uwodnienia; ( $\triangle$ ) składowa  $L_1$ , (O) składowa  $L_2$ ; na wstawce widoczna dodatkowo szerokość połówkowa składowej stałociałowej ( $\blacksquare$ ).

Dla kompleksu DNA-CTMA obliczony z równania 9.3 czas relaksacji spinowospinowej wynosi  $T_{2G}^* \approx (19 \pm 2)$ , co jest wartością zbliżoną do wartości otrzymanych z eksperymentów NMR wykonywanych w domenie czasu dla wielu układów biologicznych o niskiej hydratacji (Harańczyk i inni, 2006; Harańczyk i inni, 2008; Harańczyk i inni, 2010).

Pochodzące od mobilnych protonów, wąskie linie o kształcie funkcji Lorentza głównie pochodzą od wody związanej, gdyż ich amplituda wzrasta wraz z uwodnieniem. Jako pierwszy pojawia się sygnał od frakcji  $L_1$  (od wody ściśle związanej), wykrywany od poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.05$ . Położenie linii pochodzącej od składowej  $L_1$  zmienia się wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. Dla  $\Delta m/m_0 \le 0.27$  pozycja tego piku jest równa wartości  $v_{L_1} = (174 \pm$ 54) Hz. Wraz ze wzrastającym uwodnieniem, powyżej  $\Delta m/m_0 = 0.27$  pozycja tej linii stopniowo przesuwa się osiągając wartość  $v_{L_1} = (-157 \pm 2)$  Hz (Rysunek 9.8). Szerokość połówkowa linii  $L_1$  dla niskich uwodnień równa jest  $\Delta v_{L_1} = (5.22 \pm 0.29)$ .

Wyznaczony z równania 9.4 czas relaksacji dla składowej  $L_1$  dla niskich poziomów hydratacji wynosi  $T_{2L_1}^* = (61 \pm 3) \mu s$ . Wartość ta zbliżona jest do wartości czasu relaksacji  $T_{2L_1}^*$  otrzymanego z eksperymentu w domenie czasu dla frakcji wody ściśle związanej. Jest także podobna do wartości otrzymywanych dla wielu układów biologicznych o niskiej hydratacji, gdzie sygnał od wody ściśle związanej również udało się wyodrębnić.

Wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia kompleksu szerokość połówkowa linii  $L_1$  zmniejsza się do wartości  $\Delta v_{L1} = (1.206 \pm 0.028)$  kHz, co odpowiada wyliczonemu z rów-

nania 9.4 czasowi relaksacji poprzecznej równym  $T_{2L_1}^* = (264 \pm 6)$ . Wartość ta jest zbliżona do wartości czasu relaksacji poprzecznej wody luźno związanej, otrzymanej z eksperymentu w domenie czasu. Czas relaksacji spinowo-spinowej jest jednak wartością uśrednioną czasu relaksacji wody ściśle oraz luźno związanej, co jest spowodowane szybką wymianą magnetyzacji.

Dla wyższych poziomów uwodnienia, powyżej  $\Delta m/m_0 = 0.06$ , pojawia druga linia cieczowa  $L_2$ , dobrze opisywana funkcją Lorentza. Jej pozycja jest przesunięta względem pozycji linii  $L_1$  i jest równa  $v_{L_2} = (831 \pm 23)$  Hz. Szerokość połówkowa linii  $L_2$  nie zmienia się wraz ze wzrostem poziomu hydratacji i wynosi  $\Delta v_{L_2} = (0.836 \pm 0.012)$ , co odpowiada czasowi relaksacji spinowo-spinowej równemu  $T_{2L_2}^* = (381 \pm 5)$  µs. Jest to wartość charakterystyczna dla frakcji wody luźno związanej obserwowanej w różnych układach mikrohetegennych.

Obserwowane szerokości linii pochodzących od frakcji cieczowych dla wysokich uwodnień są bliskie naturalnej szerokości linii dla spektrometru, wynikającej z niejednorodności pola magnetycznego o indukcji  $B_0$ , wynoszącej  $\gamma \cdot \Delta B_0$ .

#### 9.1.2.2 Zależność hydratacyjna składowych cieczowych dla kompleksu DNA-CTMA

Dla kompleksu DNA-CTMA składowa stała linii rezonansowej <sup>1</sup>H-NMR przestaje być wyróżniana już dla stosunkowo niskich uwodnień  $\Delta m/m_0 \leq 0.12$ , dlatego udało się skutecznie wyznaczyć zależność jedynie dla sumy sygnałów cieczowych wyrażonych w jednostkach suchej masy  $\frac{L_1 + L_2}{S}$ . Zależność ta, widoczna na Rysunku 9.10, jest dobrze przybliżana funkcją liniową i opisana równaniem:

$$\frac{L_1 + L_2}{S} = (31.6 \pm 5.2) \cdot \Delta m / m_0 - (0.93 \pm 0.44).$$
9.9



**Rys. 9.10.** Hydratacyjna zależność składowych cieczowych  $L_1+L_2$  wyrażone w jednostkach składowej stałej,  $(L_1+L_2)/S$ , suchej masy dla czystego DNA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki wyrażony w jednostkach suchej masy.
## 9.1.2.3 Hydratacyjne pomiary widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA

Rysunek 9.11a i b przedstawia widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksów DNA-DDCA w temperaturze pokojowej dla dwóch różnych uwodnień. Liczba i intensywność tych składowych zmienia się wraz ze wzrostem poziomu hydratacji.

Widmo poniżej uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.069$  jest złożeniem szerokiej składowej *G* pochodzącej od matrycy stałej kompleksu, dobrze dopasowywanej funkcją Gaussa oraz jednej wąskiej cieczowej składowej  $L_1$  (równanie 9.6). Powyżej tego uwodnienia daje się dodatkowo wyróżnić druga składowa cieczowa  $L_1$  (równanie 9.7). Dla najwyższych uwodnień ( $\Delta m/m_0 >$ 0.163) nie daje się już wyodrębnić składowa o kształcie funkcji Gaussa, a widmo składa się jedynie z dwóch wąskich linii cieczowych (równanie 9.8).

Widma dla całego zakresu hydratacji widoczne są na Rysunku 9.12.

a)



b)

**Rys. 9.11.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane przy częstości 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA uwodnionego do poziomu (a)  $\Delta m/m_0 = 0.048$ , (b)  $\Delta m/m_0 = 0.44$ ; linia ciągła – widmo zmierzone, linia przerywana –dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.6 oraz (b) równaniem 9.8.



**Rys. 9.12.** Widma <sup>1</sup>H-NMR w funkcji poziomu hydratacji dla kompleksu (a) DNA-CTMA oraz (b) DNA-DDCA zebrane w temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez czynnik  $k \cdot (1 + \Delta m/m_0)$ 

Pozycja środka linii o kształcie funkcji Gaussa jest równa dla kompleksu DNA-DDCA  $v_G = (3.00 \pm 0.37)$  kHz. Szerokość połówkowa linii od ciała stałego maleje od wartości  $\Delta v_G = (38.08 \pm 0.19)$  kHz do wartości  $\Delta v_G = (19.79 \pm 0.24)$  kHz, dla uwodnień w zakresie od  $\Delta m/m_0 = 0.05$  do 0.17.

Obliczony z równania 9.3 czas relaksacji spinowo-spinowej wynosi  $T_{2G}^* \approx (18 \pm 4) \,\mu\text{s}.$ 

Dla uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.048$  pojawia się linia pochodząca od frakcji  $L_1$  (wody ściśle związanej). Wraz z rosnącym uwodnieniem zmienia ona położenie. Otóż dla  $\Delta m/m_0 \le 0.14$ pozycja jej środka wynosi  $v_{L_1} = (279 \pm 68)$  Hz, natomiast dla uwodnienia powyżej  $\Delta m/m_0 =$ 0.16 pozycja stopniowo przesuwa się, osiągając wartość  $v_{L_1} = (-329 \pm 15)$  Hz (Rysunek 9.13). Szerokość połówkowa linii  $L_1$  dla niskich uwodnień równa jest  $\Delta v_{L_1} = (5.12 \pm 0.34)$  kHz, co sugeruje pochodzenie tej linii od frakcji wody ściśle związanej (Rysunek 9.14).

Wyznaczony z równania 9.4 czas relaksacji dla składowej  $L_1$  dla niskich poziomów hydratacji wynosi  $T_{2L_1}^* = (62 \pm 4) \mu s$ . Wartość ta jest w przybliżeniu równa czasowi relaksacji  $T_{2L_1}^*$  otrzymanemu z eksperymentu w domenie czasu dla frakcji wody ściśle związanej.

Wraz ze wzrastającym poziomem hydratacji próbki szerokość połówkowa linii  $L_1$ zmniejsza się do wartości  $\Delta v_{L1} = (1.168 \pm 0.066)$  kHz dla uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.16$ . Wartość ta odpowiada czasowi relaksacji poprzecznej  $T_{2L_1}^* = (273 \pm 15)$  µs, zbliżonemu do czasu relaksacji poprzecznej dla frakcji wody mobilnej, luźno związanej, zaobserwowanego w eksperymencie w domenie czasu.

Dla jeszcze wyższych poziomów uwodnienia, powyżej  $\Delta m/m_0 = 0.09$ , pojawia się druga linia cieczowa  $L_2$ , opisywana funkcją Lorentza. Jej pozycja jest przesunięta względem pozycji linii  $L_1$  i jest równa  $v_{L_2} = (783.9 \pm 6.2)$  Hz (Rysunek 9.13). Szerokość połówkowa linii  $L_2$  nie zmienia się wraz ze wzrostem poziomu hydratacji i wynosi  $\Delta v_{L_2} = (0.853 \pm 0.013)$ kHz, co odpowiada czasowi relaksacji spinowo-spinowej równemu  $T_{2L_2}^* = (370 \pm 58)$  µs, co podobnie jak w przypadku kompleksu DNA-CTMA jest wartością charakterystyczną dla wody luźno związanej obserwowanej w różnych układach mikrohetegennych (Harańczyk i inni, 2006; Harańczyk i inni, 2008; Harańczyk i inni, 2010).



**Rys. 9.13.** Położenia środków linii składowych cieczowych widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA wyrażone w funkcji uwodnienia; ( $\triangle$ ) składowa  $L_1$ , ( $\bigcirc$ ) składowa  $L_2$ .



**Rys. 9.14.** Szerokości połówkowe pików składowych cieczowych w widmie <sup>1</sup>H-NMR hydratowanego DNA-DDCA w funkcji poziomu uwodnienia; ( $\triangle$ ) składowa  $L_1$ , (O) składowa  $L_2$ ; na wstawce widoczna dodatkowo szerokość połówkowa składowej stałociałowej ( $\blacksquare$ ).

#### 9.1.2.4 Zależność hydratacyjna składowych cieczowych dla kompleksu DNA-DDCA

Frakcja wody związanej,  $L_1$ , dla kompleksu DNA-DDCA wyrażona w jednostkach suchej masy  $L_1/S$  liniowo wzrasta wraz z poziomem uwodnienia (Rysunek 9.15) i opisana jest następującą funkcją:

$$L_1 / S = (8.15 \pm 2.0) \cdot \Delta m / m_0 + (1.15 \pm 0.17).$$
 9.10

Liniowa zależność  $L_1/S$  od poziomu hydratacji sugeruje nieobecność frakcji stałej, rozpuszczalnej w wodzie (Harańczyk i inni, 1999).



**Rys. 9.15.** Hydratacyjna zależność składowej cieczowej  $L_1$  wyrażonej w jednostkach składowej stałej,  $L_1/S$ , suchej masy dla kompleksu DNA-DDCA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki wyrażony w jednostkach suchej masy.

Druga składowa wody związanej, L<sub>2</sub>, dla kompleksu DNA-DDCA wyrażona w jednostkach suchej masy również wzrasta liniowo wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia (Rysunek 9.16), zgodnie z zależnością:

$$L_2 / S = (16.5 \pm 1.9) \cdot \Delta m / m_0 - (1.11 \pm 0.23).$$
 9.11

Graniczny poziom hydratacji kompleksu DNA-DDCA, powyżej którego stwierdza się obecność frakcji wody luźno związanej  $L_2$  wynosi  $\Delta m_{L_2} / m_0 = 0.067 \pm 0.016$ .

Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant



**Rys. 9.16.** Hydratacyjna zależność składowej cieczowej  $L_2$  wyrażonej w jednostkach składowej stałej,  $L_2/S$ , suchej masy dla kompleksu DNA-DDCA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki wyrażony w jednostkach suchej masy.

Wydaje się, że niejednorodność pola  $B_0$  wpływa na obydwie składowe cieczowe  $L_1$  i  $L_2$  w taki sam sposób, skracając  $T_2$  według równania 4.35.

Wyliczone dla obu linii czasy relaksacji spinowo-spinowej obydwu frakcji są jednakże różne, co oznacza istnienie dodatkowego mechanizmu relaksacji, w różnym stopniu wzmacniającego proces relaksacji dla obu składowych wody związanej.

#### 9.2 Spektroskopia relaksacyjna <sup>1</sup>H-NMR

W celu zmierzenia czasów relaksacji spinowo-sieciowej dla poszczególnych składowych widma <sup>1</sup>H-NMR wykonano eksperymenty spektroskopii relaksacyjnej na spektrometrze 300 MHz (rozdział 4.3.3). Rodziny widm zarejestrowano w temperaturze pokojowej dla próbek odwodnionych ( $\Delta m/m_0 = 0.06$  dla DNA-CTMA,  $\Delta m/m_0 = 0.05$  dla DNA-DDCA) oraz dla porównania, dla próbek o najwyższym uzyskanym z fazy gazowej poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.55$  dla DNA-CTMA,  $\Delta m/m_0 = 0.44$  dla DNA-DDCA).

Dla każdej wyodrębnionej składowej linii widma <sup>1</sup>H-NMR niezależnie dopasowywano wieloeksponencjalną zależność opisującą relaksację spinowo-sieciową:

$$A_{i}(\tau) = \frac{1}{A} \sum_{j} A_{i}^{j} \left[ 1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_{1,i}^{j}}\right) \right],$$
 9.12

gdzie i = S,  $L_1$ ,  $L_2$  to oznaczenie analizowanej składowej widma, j = 1 lub 2 są liczbą dopasowywanych eksponent dla danej linii,  $T_{1,i}^{j}$  jest czasem relaksacji spinowo-sieciowej *j*-tej składowej, natomiast  $A_i^{j}$  jest j-tową komponentą i-tej linii w widmie, A jest całkowitym polem pod widmem zarejestrowanym dla badanej próbki, przy czym:

$$A = \sum_{i,j} A_i^j \,. \tag{9.13}$$

#### 9.2.1 Spektroskopia relaksacyjna <sup>1</sup>H-NMR kompleksu DNA-CTMA

Rodziny widm uzyskane dla różnych wartości czasu  $\tau$  (czasu między impulsami  $\pi$  oraz  $\pi/2$ ) dla dwóch uwodnień zebrane są na Rysunkach 9.17a i b.

a)



b)



**Rys. 9.17.** Widma <sup>1</sup>H-NMR w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia (a)  $\Delta m/m_0 = 0.06$  oraz (b)  $\Delta m/m_0 = 0.55$ .

Dla próbki stałego kompleksu DNA-CTMA uwodnionego do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.06$ odrost podłużnej składowej magnetyzacji jądrowej dla frakcji stałej opisany jest funkcją jednoeksponencjalną (równanie 9.12) stanowiącą  $A_s = 51.2$  % pola powierzchni pod widmem i charakteryzuje się czasem relaksacji podłużnej  $T_{1G} = (350 \pm 17)$  ms. Ponadto w widmie da się wyróżnić także dwie składowe cieczowe  $L_1$  i  $L_2$ , stanowiące odpowiednio  $A_{L_1} = 26.6$  % i  $A_{L_2} = 22.2$  % pola powierzchni pod widmem i relaksujące z czasami  $T_{1L_1} =$  $(215 \pm 11)$  ms oraz  $T_{1L_1} = (303.7 \pm 7.5)$  ms (Rysunek 9.18a).

Uwodnione do wysokiego poziomu hydratacji kompleksy DNA-surfaktant wykazują inny mechanizm procesu relaksacji podłużnej. Obserwowane są jedynie dwie wąskie linie o kształcie opisywanym funkcją Lorentza  $L_1$  i  $L_2$ , pochodzące z dwóch frakcji wody związanej. Relaksacja składowej  $L_1$  jest dobrze opisana superpozycją dwóch eksponent. Pierwsza składowa linii  $L_1$  stanowi  $A_{L1}^1 = 17.5\%$ , a druga składowa  $L_2$   $A_{L1}^2 = 48.7\%$  pola powierzchni pod widmem. Składowe te relaksują z czasami  $T_{1L1}^1 = (90 \pm 20)$  ms oraz  $T_{1L1}^2 = (345 \pm 39)$  ms. Sygnał pochodzący od wody  $L_2$  związanej stanowi  $A_{L2} = 33.8\%$  oraz pola powierzchni pod widmem, a jego relaksacja opisana jest krzywą jednoeksponencjalną o czasie relaksacji  $T_{1L2} =$  $(424 \pm 7)$  ms. Dopasowanie superpozycji dwóch eksponent nie poprawiało jakości dopasowania (Rysunek 9.18b).



**Rys. 9.18.** Funkcja magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych widma <sup>1</sup>H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjne w temperaturze pokojowej dla kompleksu DNA-CTMA; pomiar dla poziomu uwodnienia (a)  $\Delta m/m_0 = 0.06$  oraz (b)  $\Delta m/m_0 = 0.55$ ; widoczne składowe: (**I**) G, ( $\Delta$ ) L<sub>1</sub>, (O) L<sub>2</sub>.

b)

Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant

## 9.2.2 Spektroskopia relaksacyjna <sup>1</sup>H-NMR kompleksu DNA-DDCA

Na Rysunku 9.19 przedstawiono widma uzyskane dla różnych wartości czasu  $\tau$  czasu między impulsami  $\pi$  oraz  $\pi/2$ .

a)



b)



**Rys. 9.19.** Widma <sup>1</sup>H-NMR w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej dla kompleksu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia (a)  $\Delta m/m_0 = 0.05$  oraz (b)  $\Delta m/m_0 = 0.44$ .

W przypadku zdehydratowanego kompleksu DNA-DDCA relaksacja spinowosieciowa Gaussowskiej składowej pochodzącej od frakcji stałej próbki opisana jest krzywą dwueksponencjalną (równanie 9.12). Krótsza składowa stanowi  $A_s^1 = 11.4\%$  całego sygnału i charakteryzuje się czasem relaksacji podłużnej  $T_{1G}^1 = (6 \pm 1)$  ms. Dłuższa składowa o czasie relaksacji  $T_{1G}^2 = (370 \pm 33)$  stanowi  $A_s^2 = 29.4$  % całkowitego pola powierzchni pod widmem. Składowa cieczowa sygnału opisywana funkcją Lorentza dla zdehydratowanego kompleksu DNA-DDCA stanowi  $A_{L_1} = 59.2$  % pola powierzchni pod widmem. Jej relaksacja spinowosieciowa opisywana jest krzywą jednoeksponencjalną, o czasie relaksacji podłużnej równym  $T_{1L_1} = (298 \pm 15)$  ms. Dopasowywanie dwueksponencjalnej krzywej nie dawało lepszego wyniku.

Dla kompleksu DNA-DDCA uwodnionego do wysokiego poziomu obserwowano jedynie dwie wąskie linie o kształcie opisywanym funkcją Lorentza  $L_1$  i  $L_2$ , pochodzące z dwóch frakcji wody związanej. Relaksacja składowej  $L_1$  jest dobrze opisana superpozycją dwóch eksponent. Krótsza, stanowiąca  $A_{L1}^1 = 20.0$  % pola powierzchni pod widmem, charakteryzuje się czasem relaksacji  $T_{1L1}^1 = (38 \pm 7)$  ms, podczas gdy dłuższa, relaksująca z czasem  $T_{1L1}^2 = (159 \pm 22)$  ms, stanowi  $A_{L1}^2 = 27.8$  % pola powierzchni pod widmem.

Sygnał  $L_2$  pochodzący od wody związanej stanowi  $A_{L2} = 52.2 \%$  pola powierzchni pod widmem, a jego relaksacja opisana jest krzywą jednoeksponencjalną o czasie relaksacji  $T_{1L2} = (267 \pm 8)$  ms.





b)



**Rys. 9.20.** Funkcja magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych widma <sup>1</sup>H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjne w temperaturze pokojowej dla kompleksu DNA-DDCA; pomiar dla poziomu uwodnienia (a)  $\Delta m/m_0 = 0.05$  oraz (b)  $\Delta m/m_0 = 0.44$ ; widoczne składowe: (**I**) G, ( $\Delta$ ) L<sub>1</sub>, (O) L<sub>2</sub>.

# 9.3 Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup>H-NMR dla stałych kompleksów DNA-surfaktant

Spektroskopowe pomiary hydratacyjne wykonane były na spektrometrze 300 MHz dla kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA w trybie schładzania próbki, w zakresie temperatur od 290 K do 210 K oraz w trybie grzania w zakresie od 290 K do 380 K, co 10 K. Eksperymenty przeprowadzone były dla próbek odwodnionych oraz dla próbek maksymalnie uwodnionych, w celu porównania procesu zamarzania w układach o znacząco różnym poziomie uwodnienia.

Widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksów DNA-surfaktant o niskich poziomów uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.06$  dla DNA-CTMA oraz  $\Delta m/m_0 = 0.05$  dla DNA-DDCA) i w niskich temperaturach są superpozycjami dwóch linii pochodzących od ciała stałego oraz prawdopodobnie szczątkowej wody związanej, znajdującej się na powierzchniach badanych struktur, mających kształt funkcji Gaussa, *G* oraz *G*<sub>1</sub>.

$$A(v) = \frac{A_{s}}{\Delta v_{G} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi / 2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G})}{\Delta v_{G}}\right)^{2}\right] + \dots$$

$$\dots + \frac{A_{s_{1}}}{\Delta v_{G_{1}} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi / 2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G_{1}})}{\Delta v_{G_{1}}}\right)^{2}\right],$$
9.14

gdzie  $\Delta v_G$  i  $\Delta v_{G_1}$  są szerokościami połówkowymi funkcji Gaussa, ,  $v_G$  i  $v_{G_1}$  są położeniami środków linii Gaussa, natomiast  $A_s$  i  $A_{S_1}$  są polami powierzchni pod pikami Gaussa.

Wraz ze wzrostem temperatury linie się zwężają. Dla najwyższych temperatur widmo składało się z linii o kształcie funkcji Gaussa G oraz drugiej o kształcie funkcji Lorentza  $L_1$ :

$$A(v) = \frac{A_{S}}{\Delta v_{G} \cdot \sqrt{\ln 4 \cdot \pi / 2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{(v - v_{G})}{\Delta v_{G}}\right)^{2}\right] + \frac{2A_{L_{1}}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L_{1}}}{4 \cdot (v - v_{L_{1}})^{2} + \Delta v_{L_{1}}^{2}}\right],$$
 9.15

gdzie  $\Delta v_G$  i  $\Delta v_{L_1}$  są szerokościami połówkowymi odpowiednio funkcji Gaussa i funkcji Lorentza,  $v_G$  oraz  $v_{L_1}$  są położeniami środków linii Gaussa i składowej dopasowanej funkcją Lorentza, natomiast  $A_S$  i  $A_{L_1}$  są polami powierzchni pod pikami Gaussa i Lorentza, odpowiednio.

Dla wysokiego poziomu uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.55$  dla DNA-CTMA oraz  $\Delta m/m_0 = 0.44$  dla DNA-DDCA) i niskich temperatur, widma (podobnie jak dla niskiego uwodnienia) składają się wyłącznie z dwóch linii mających kształt funkcji Gaussa (równanie 9.14). Dla wyższych temperatur obie linie zwężają się i są opisywane funkcją Lorentza:

$$A(v) = \frac{2A_{L_1}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_1}}{4 \cdot (v - v_{L_1})^2 + \Delta v_{L_1}^2} \right] + \frac{2A_{L_2}}{\pi} \left[ \frac{\Delta v_{L_2}}{4 \cdot (v - v_{L_2})^2 + \Delta v_{L_2}^2} \right],$$
9.16

gdzie  $\Delta v_{L_1}$  i  $\Delta v_{L_2}$  są szerokościami połówkowymi funkcji Lorentza, składających się na widmo,  $v_{L_1}$  oraz  $v_{L_2}$  są położeniami środków linii Lorentza, natomiast  $A_{L_1}$  i  $A_{L_2}$  są polami powierzchni pod liniami opisywanymi funkcją Lorentza.

# 9.3.1 Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA dla niskiego uwodnienia

Przykładowe widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA dla niskiego poziomu uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.06$ ) dla dwóch temperatur (260 K oraz 300 K) przedstawione są na Rysunku 9.21. Rodzina widm dla całego zakresu zmierzonych temperatur przedstawiona jest na Rysunku 9.22.

b)



**Rys. 9.21.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.06$ , temperatura (a) 260 K, (b) 300 K; linia ciągła – widmo doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem 9.15.



**Rys. 9.22.** Widma <sup>1</sup>H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.06$ .

Wraz z rosnącą temperaturą od T = 210 do T = 380 K szerokość połówkowa linii *G* zmniejsza się od  $\Delta v_G = (50.205 \pm 0.073)$  kHz dla kompleksu DNA-CTMA do szerokości  $\Delta v_G$  = (14.05 ± 0.05) kHz. W temperaturze pokojowej szerokość połówkowa jest równa  $\Delta v_G = (15.085 \pm 0.060)$  kHz (Rysunek 9.23a).

Zachowanie składowej  $G_I$  jest inne. Od szerokości połówkowej w temperaturze T = 210 K równej  $\Delta v_{GI} = (14.455 \pm 0.058)$  kHz zmniejsza się do  $\Delta v_{GI} = (6.350 \pm 0.015)$  kHz w temperaturze T = 290 K. Wraz z dalszym ogrzewaniem próbki linia ta dopasowywana jest lepiej funkcją Lorentza o szerokości  $\Delta v_L = (3.401 \pm 0.015)$  kHz w temperaturze T = 300 K, by dla temperatury T = 380 K osiągnąć szerokość  $\Delta v_L = (3.365 \pm 0.011)$  kHz (Rysunek 9.23a).

a)





**Rys. 9.23.** Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych oraz (b) położenia linii dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.06$ ; widoczne składowe: ( $\bullet$ ) G, ( $\blacksquare$ ) G<sub>1</sub>, ( $\triangle$ ) L<sub>1</sub>.

# 9.3.2 Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA dla wysokiego uwodnienia

Widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-CTMA dla wysokiego poziomu uwodnienia i niskich temperatur są złożeniem dwóch linii od ciała stałego opisywanych funkcją Gaussa (równanie 9.14). Wraz ze wzrostem temperatury szerokości połówkowe linii zwężają się i dla wyższych temperatur (powyżej około 265 K) składają się z dwóch linii opisywanych funkcją Lorentza (równanie 9.16). Przykładowe widma dla hydratacji  $\Delta m/m_0 = 0.55$ , zebrane w temperaturze 260 K oraz 300 K przedstawione są na Rysunkach 9.24a i b. Rodzina widm dla całego zakresu zmierzonych temperatur przedstawiona jest na Rysunku 9.25.

a)



b)



**Rys. 9.24.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.55$ , temperatura (a) 260 K, (b) 300 K; linia ciągła – widmo doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem 9.16.



**Rys. 9.25.** Widma <sup>1</sup>H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.55$ .

Dla kompleksu DNA-CTMA uwodnionego do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.55$  dla najniższych temperatur widmo można opisać jako superpozycję dwóch linii o kształcie funkcji Gaussa. Składowa  $G_I$  ma w temperaturze 220 K szerokość połówkową  $\Delta v_{GI} = (11.074 \pm 0.033)$  kHz. Ze wzrostem temperatury linia się zwęża, aż w temperaturze 280 K linia lepiej opisywana jest funkcją Lorentza o szerokości połówkowej  $\Delta v_{LI} = (1.423 \pm 0.035)$  kHz, a następnie dalej się zwęża, do szerokości  $\Delta v_{LI} = (0.842 \pm 0.011)$  kHz w temperaturze 330 K.

Obserwowana w zakresie temperatur od 220 K do 260 K linia G w najniższej zmierzonej temperaturze (220 K) ma szerokość  $\Delta v_G = (58.00 \pm 0.11)$  kHz, a w najwyższej (260 K)  $\Delta v_G = (4.036 \pm 0.067)$  kHz. W zakresie temperatur 260 K do 340 K linia ta jest lepiej opisywana funkcją Lorentza, której szerokość wraz ze wzrostem temperatury zmniejsza się od  $\Delta v_{L2} = (1.004 \pm 0.003)$  kHz do  $\Delta v_{L2} = (0.972 \pm 0.016)$  kHz (Rysunek 9.26a). Położenia środków linii składających się na widmo przedstawione są na Rysunku 9.27b.

a)



b)



**Rys. 9.26.** Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych oraz (b) położenia linii dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.55$ ; widoczne składowe: ( $\bullet$ ) G, ( $\blacksquare$ ) G<sub>1</sub>, ( $\triangle$ ) L<sub>1</sub>, (O) L<sub>2</sub>.

# 9.3.3 Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA dla niskiego uwodnienia

Przykładowe widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA dla niskiego poziomu uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.05$ ) dla dwóch różnych temperatur (260 K i 300 K) przedstawione są na Rysunku 9.27. W niskich temperaturach (poniżej 290 K) widmo jest sumą dwóch linii pochodzących od ciała stałego, opisywanych funkcją Gaussa, *G* oraz *G*<sub>1</sub> (równanie 9.14). Wraz ze wzrostem temperatury linie zwężają się i powyżej 300 K widmo jest opisywane linią od ciała stałego *G* oraz linią opisywaną funkcją Lorentza *L*<sub>1</sub>. Widma zmierzone dla całego zakresu temperatur przedstawiono na Rysunku 9.28.

a)

b)



**Rys. 9.27.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.05$ , temperatura (a) 260 K, (b) 300 K; linia ciągła – widmo doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem 9.15.



**Rys. 9.28.** Widma <sup>1</sup>H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.05$ .

Szerokość połówkowa linii *G* zmniejsza się od  $\Delta v_G = (91.56 \pm 0.55)$  kHz do szerokość i  $\Delta v_G = (11.48 \pm 0.04)$  kHz wraz z rosnącą temperaturą od T = 210 do T = 380 K. W temperaturze pokojowej szerokość połówkowa dla DNA-CTMA jest równa  $\Delta v_G = (27.50 \pm 0.09)$  kHz (Rysunek 9.29a).

W przypadku składowej  $G_I$  szerokość połówkowa w temperaturze T = 210 K jest równa  $\Delta v_{GI} = (40.43 \pm 0.11)$  kHz i spada do wartości  $\Delta v_{GI} = (5.897 \pm 0.018)$  kHz w temperaturze T = 290 K. Wraz z dalszym ogrzewaniem próbki linia ta zamienia się w linię o kształcie funkcji Lorentza o szerokości  $\Delta v_L = (4.579 \pm 0.018)$  kHz w temperaturze T = 300 K i dla temperatury T = 380 K osiąga szerokość  $\Delta v_L = (2.583 \pm 0.009)$  kHz. Położenia środków linii składających się na widmo przedstawione są na Rysunku 9.29b.

a)





**Rys. 9.29.** Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych i (b) położenia linii dla komplesu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.05$ ; widoczne składowe: (•) G, (•) G<sub>1</sub>, ( $\Delta$ ) L<sub>1</sub>.

# 9.3.4 Pomiary zależności temperaturowych widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA dla wysokiego uwodnienia

Widma <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksu DNA-DDCA dla wysokiego poziomu uwodnienia ( $\Delta m/m_0 = 0.44$ ) dla zakresu niskich temperatur (od 220 K do 260 K) składa się z dwóch szerokich linii pochodzących od matrycy stałej, dobrze opisywanych funkcją Gaussa, *G* oraz *G*<sub>1</sub> (równanie 9.14). Dla wyższych temperatur, tj. od 260 K do 330 K linie te są węższe i dobrze opisywane funkcją Lorentza ,L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub> (równanie 9.16), co jest charakterystyczne dla frakcji cieczowych. Przykładowe widma dla temperatur 260 K oraz 300 K przedstawione są na Rysunku 9.30a i b. Rodzina widm dla całego zakresu zmierzonych temperatur przedstawiona jest na Rysunku 9.31.

a)



b)



**Rys. 9.30.** Widma <sup>1</sup>H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.44$ , temperatura (a) 260 K,(b) 300 K; linia ciągła – widmo doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem 9.16.



**Rys. 9.31.** Widma <sup>1</sup>H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.44$ .

Składowa  $G_I$  ma w temperaturze 220 K szerokość połówkową  $\Delta v_{GI} = (13.891 \pm 0.055)$  kHz. Ze wzrostem temperatury linia ta zwęża się, a w temperaturze 270 K linia przyjmuje kształt funkcji Lorentza o szerokości  $\Delta v_{LI} = (1.441 \pm 0.013)$  kHz, która dalej się zwęża, do szerokości  $\Delta v_{LI} = (0.962 \pm 0.003)$  kHz w temperaturze 330 K. Widoczna w zakresie temperatur od 220 K do 260 K linia *G* ma w najniższej zmierzonej temperaturze (220 K) szerokość  $\Delta v_G = (44.034 \pm 0.099)$  kHz, a w 240 K  $\Delta v_G = (8.550 \pm 0.110)$  kHz. W zakresie temperatur 250 K do 330 K widoczna jest już jako linia lepiej opisywana funkcją Lorentza, której szerokość wraz ze wzrostem temperatury zmniejsza się od  $\Delta v_{L2} = (1.622 \pm 0.010)$  kHz do  $\Delta v_{L2} = (0.749 \pm 0.016)$  kHz (Rysunek 9.32a). Położenia środków linii wyżej omówionych widoczne są na Rysunku 9.32b.

a)



 $\triangle$   $\triangle$ 

3.5

b)



4.0

4.5 1000/T

 $\land \land \land \land$ 

1

0.1

3.0

#### 9.4 Pomiar czasu relaksacji podłużnej $T_1$ w funkcji temperatury

Dla kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA wykonano na spektrometrze 300 MHz pomiary temperaturowej zależności czasu relaksacji spinowo-sieciowej, dla próbek zdehydratowanych oraz dla próbek maksymalnie uwodnionych.

#### 9.4.1 Temperaturowe pomiary czasu relaksacji podłużnej $T_1$ dla kompleksu DNA-CTMA

Dla kompleksu DNA-CTMA odwodnionego do poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.06$ czas relaksacji spinowo-sieciowej w temperaturze T = 220 K jest równy  $T_1 = (811 \pm 5)$  ms. Wraz z rosnącą temperaturą wartość czasu relaksacji spada, by w temperaturze T = 290 K osiągnąć minimum równe  $T_1 = (288 \pm 3)$  ms, następnie znów rośnie i w temperaturze T = 370K osiąga wartość  $T_1 = (651 \pm 6)$  ms (Rysunek 9.33).

Do zmierzonych wartości czasu relaksacji dopasowano zależność zakładającą arrheniusowską zależność czasu relaksacji od temperatury:

$$T_1 = T_1^0 \exp\left(-\frac{E_A}{k_B T}\right),$$
9.17

otrzymując następujące wartości energii aktywacji:  $E_A = (14.8 \pm 0.8)$  kJ/mol dla zależności malejącej, oraz  $E_A = -(9.7 \pm 0.2)$  kJ/mol dla rosnącej.



**Rys. 9.33.** Temperaturowa zależność czasu relaksacji podłużnej  $T_1$  dla DNA-CTMA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.06$ .

Dopasowanie równania 4.39 do temperaturowej zależności szybkości relaksacji podłużnej  $R_1=1/T_1$ , pozwoliło uzyskać uśrednioną wartość odległości między oddziałującymi spinami, równą dla DNA-CTMA  $r = (1.626 \pm 0.004)$  Å oraz energię aktywacji  $E_A = -(15.7 \pm$  0.5) kJ/mol (Rysunek 9.34). Z uwagi na mikroheterogenność próbki uzyskana odległość między relaksującymi spinami na dla kompleksów DNA-CTMA wyłącznie wartość szacunkową.



**Rys. 9.34.** Zależności temperaturowe szybkości relaksacji podłużnej  $R_I$  dla DNA-CTMA; względny przyrost masy  $\Delta m/m_0 = 0.06$ .

Dla próbek uwodnionych do  $\Delta m/m_0=0.55$  temperaturowe zależności czasu relaksacji spinowo-sieciowej są bardziej złożone.

W przypadku kompleksu DNA-CTMA, dla najniższej temperatury T = 220 K czas relaksacji podłużnej wynosi  $T_I = (970 \pm 10)$  ms, następnie skraca się wraz ze wzrastającą temperaturą. W temperaturze T = 270 K zaobserwowano minimum o wartości  $T_I = (149 \pm 3)$  ms. Powyżej temperatury T = 310 K dochodzi do wyraźnego rozszczepienia linii, dzięki czemu udało się wyznaczyć dwa czasy relaksacji podłużnej, których wartości rosną wraz z temperaturą, by osiągnąć wartości  $T_I = (322 \pm 6)$  ms i  $T_I = (351 \pm 4)$  ms w temperaturze T = 330 K. Wyznaczone energie aktywacji wynoszą  $E_A = -(4.4 \pm 0.4)$  kJ/mol i  $E_A = (13.8 \pm 0.5)$  kJ/mol odpowiednio dla temperatur poniżej i powyżej minimum T<sub>1</sub>.



**Rys. 9.35.** Temperaturowe zależności czasu relaksacji podłużnej  $T_I$  dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.55$  dla kompleksu DNA-CTMA; (**I**) składowa obecna w całym zakresie temperatur (O) składowa pojawiająca się powyżej temperatury 310 K.

#### 9.4.2 Temperaturowe pomiary czasu relaksacji podłużnej *T*<sub>1</sub> dla kompleksu DNA-DDCA

Temperaturowy przebieg czasu relaksacji podłużnej dla kompleksu DNA-DDCA ( $\Delta m/m_0 = 0.05$ ) jest podobny jak dla kompleksu DNA-CTMA. Minimum wartości czasu relaksacji spinowo-sieciowej równe  $T_1 = (288 \pm 6)$  ms zaobserwowano w temperaturze T=310 K. Dla temperatury T = 210 K zmierzono wartość czas  $T_1 = (599 \pm 5)$  ms, zaś dla najwyższej, T = 370 K,  $T_1 = (558 \pm 7)$  ms.

Do zmierzonych wartości czasu relaksacji dopasowano arrheniusowską zależność czasu relaksacji od temperatury (równanie 9.17), otrzymując wartości energii aktywacji:  $E_A =$ (16.4± 0.1) kJ/mol i  $E_A = -(4.5 \pm 0.1)$  kJ/mol odpowiednio dla zależności malejącej oraz rosnącej (Rysunek 9.36).



**Rys. 9.36.** Zależności temperaturowe czasu relaksacji podłużnej  $T_1$  dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.05$  dla kompleksu DNA-DDCA.

Dopasowanie do temperaturowa zależność szybkości relaksacji  $R_I = 1/T_I$  od temperatury funkcji opisanej 4.39 nie jest satysfakcjonujące (Rysunek 9.37), pozwala jednak uzyskać szacunkową uśrednioną wartość odległości między oddziałującymi spinami, równą  $r = (1.646 \pm 0.012)$  Å. Różne nachylenia krzywych opisujących temperaturową zależność szybkości relaksacji poniżej i powyżej minimum, może świadczyć o przejściu fazowym zachodzącym w tej temperaturze (320 K).



**Rys. 9.37.** Temperaturowe zależności szybkości relaksacji podłużnej  $R_1$  dla najniższych poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.05$ , dla kompleksu DNA-DDCA.

Dla kompleksu DNA-DDCA uwodnionego do poziomu  $\Delta m/m_0 = 0.44$  dla temperatury T = 220 K zaobserwowano najdłuższy czas relaksacji podłużnej  $T_I = (680 \pm 8)$  ms oraz jego spadek wraz ze wzrostem temperatury. W temperaturze T = 270 K dochodzi do wyraźnego

rozdzielenia linii i natychmiastowego wzrostu czasu relaksacji jednej z linii wraz ze wzrostem temperatury do wartości  $T_I = (330 \pm 7)$  ms w T = 330 K. Czas relaksacji drugiej linii skraca się do wartości  $T_I = (120 \pm 6)$  ms w temperaturze T = 280 K i nie zmienia się znacznie wraz z dalszym wzrostem temperatury. Wartości energii aktywacji wyznaczone z dopasowania funkcji opisanej równaniem 9.17 do temperaturowej zależności czasu relaksacji podłużnej wynoszą odpowiednio dla zależności malejącej oraz rosnącej  $E_A = (13.8 \pm 0.5)$  kJ/mol i  $E_A = (4.4 \pm 0.3)$  kJ/mol (Rysunek 9.36). Różne energie aktywacji dla zależności powyżej i poniżej minimum mogą także sugerować istnienie przejścia fazowego w okolicach temperatury 270 K.



**Rys. 9.38.** Temperaturowe zależności czasu relaksacji podłużnej  $T_1$  dla poziomu uwodnienia  $\Delta m/m_0 = 0.44$  dla kompleksu DNA-DDCA; ( $\blacksquare$ ) składowa obecna w całym zakresie temperatur, ( $\Box$ ) składowa pojawiająca się powyżej temperatury 270 K.

#### **10** Dyskusja

#### 10.1 Kinetyka hydratacji

W stałych kompleksach DNA-surfaktant, analiza kinetyki procesu hydratacji przeprowadzanej z fazy gazowej, pozwoliła wyróżnić trzy frakcje wody związanej: (i) bardzo ściśle związanej, pozostającej w kompleksie przy wilgotności względnej otoczenia  $p/p_0 = 0\%$ , a usuwanej z układu dopiero przy podgrzewaniu do temperatury 70°C, frakcję wody (ii) ściśle związanej, wreszcie frakcję wody (iii) luźno związanej, której ilość rośnie proporcjonalnie do wilgotności atmosfery w której przeprowadzano uwadnianie. Poniżej względnej wilgotności, średnio h = 50%, przebieg hydratacji jest jednoeksponencjalny, a powyżej h = 50%, opisywany superpozycją dwóch eksponent, co sugeruje, że dopiero od tej wartości wiąże się w układzie woda luźno związana. Podobny proces kinetyki hydratacji, polegający na pojawianiu się wody luźno związanej powyżej pewnego poziomu uwodnienia, stwierdzono w ekstremofilnym organiźmie żywym, a mianowicie w plesze plechy grzyba zlichenizowanego Umbilica*ria aprina* w zakresie wilgotności wzglednych otoczenia od h = 88% do h = 100% (Harańczyk i inni, 2008) oraz w polisacharydzie, w skrobi ziemniaczanej w zakresie h = 52% do h = 100%(Blicharska i inni, 2010). Oznacza to, że natura procesu hydratacji odzwierciedla ogólniejszą prawidłowość tego procesu, charakterystyczną dla różnych układów biologicznych, polegającą na obecności dwóch frakcji wody związanej. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją układy, w których hydratacja opisywana jest funkcją jednoeksponencjalną. Na przykład, jednoeksponencjalną kinetykę procesu hydratacji zaobserwowano dla wstępnych faz uwadniania nasion pszenicy (Harańczyk, 2003), dla rehydratacji liofilizatów błon fotosyntetycznych pszenicy (Harańczyk i inni, 1996), jak również dla rehydratacji liofilizatów DGDG (Harańczyk i inni, 2009).

Dla próbek kompleksów DNA-surfaktant uwadnianych w atmosferze h = 100% po 150 godzinach uwadniania zaobserwowano proces pęcznienia, objawiający się rozpoczęciem dodatkowego, jednego, procesu hydratacji (opisanego funkcją jednoeksponencjalną). Wydaje się, że wraz z hydratacją modyfikuje się matryca stała kompleksu, umożliwiając dalszą penetrację wilgoci w głąb struktury.

Kinetyka procesu hydratacji w przypadku czystego DNA pozwala wyodrębnić dodatkową składową wody ściśle związanej. Podobnie jak w kompleksach DNA-surfaktant w czystym DNA również stwierdza się występowanie procesu pęcznienia (Harańczyk i inni, 2010).

#### 10.2 Izoterma sorpcyjna

Dla wielu układów biologicznych izoterma sorpcyjna ma postać sigmoidy i jest skutecznie opisywana modelem Denta. Dla naturalnej skrobi masa wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące wyniosła  $\Delta M / m_0 = 0.086$ , a dla skrobi modyfikowanej miedzią  $\Delta M / m_0 = 0.096$ , wkładem pustych miejsc wiążących wodę równym odpowiednio  $1/b_1 =$ 0.1% i  $1/b_1 = 0.64\%$  (Witek, 2006). Dla plech porostów parametr ten wyniósł: dla *Himantormia lugubris*  $1/b_1 = 1.11\%$ , dla *Usnea aurantiaco-atra*  $1/b_1 = 1.46\%$ , dla *Caloplaca regalis*  $1/b_1 = 1.93\%$ , natomiast dla *Usnea antarctica*  $1/b_1 = 2.59\%$  (Harańczyk i inni, 2006,Harańczyk i inni, 2003).

Masa wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące dla czystego DNA wynosi  $\Delta M/m_0 = 0.114$  (Harańczyk i inni, 2010). Dla kompleksów DNA-surfaktant masa wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące waha się od wartości zmierzonych dla żywych organizmów ekstremofilnych ( $\Delta M/m_0 = 0.054$  dla plechy *Umbilicaria aprina* (Harańczyk i inni, 2008)) do wartości zmierzonej dla czystego DNA. Dla suchych kompleksów DNA-BA wynosi  $\Delta M/m_0 = 0.0568$ , dla DNA-DDCA  $\Delta M/m_0 = 0.043$ , natomiast dla DNA-CTMA  $\Delta M/m_0 = 0.102$ .

Wkład od pustych miejsc wiążących wodę dla wilgotności względnej 100% wyrażony w procentach, będący miarą hydrofobowości powierzchni sorbentu, wynosi  $1/b_1 = 4.5\%$  dla kompleksu DNA-BA,  $1/b_1 = 6.85\%$  dla DNA-CTMA oraz  $1/b_1 = 2.3\%$  dla DNA-DDCA. Dla DNA wartość ta jest zbliżona i równa się  $1/b_1 = 2.95\%$  (Harańczyk i inni, 2010). Większy udział nieobsadzonych miejsc więżących sugeruje zwiększoną hydrofobowość kompleksu DNA-CTMA.

Parametr *w* izotermy według modelu GDW dla wszystkich zbadanych kompleksów DNA-surfaktant był mniejszy od 1. Oznacza to, że nie wszystkie molekuły wiążące się bezpośrednio do powierzchni sorbentu są dostępne dla molekuł kolejnych warstw. Sugeruje to dużą porowatość układu. Najmniejszą wartość parametru *w* zaobserwowano dla kompleksu DNA-CTMA (w = 0.27), podczas gdy dla DNA-BA w = 0.51, a dla DNA-DDCA w = 0.906.

## 10.3 Pomiary <sup>1</sup>H-NMR w domenie czasu

Analiza pomiarów relaksacyjnych <sup>1</sup>H-NMR w domenie czasu pozwoliła wyodrębnić w kompleksach DNA-surfaktant frakcje wody ściśle związanej oraz frakcję wody luźno związanej. Tak wyodrębnione obie frakcje wody związanej różnią się dynamiką molekularną, nie siłą wiązania do powierzchni sorbentu, jak w przypadku kinetyki hydratacji.

Frakcja mobilnej wody luźno związanej pojawia się dla uwodnień przekraczających  $\Delta m/m_0 \approx 0.08$  dla DNA-BA,  $\Delta m/m_0 \approx 0.13$  dla DNA-CTMA oraz  $\Delta m/m_0 \approx 0.18$ .

Składowa sygnału pochodząca od matrycy stałej kompleksu DNA-surfaktant wygląda podobnie jak w innych skrajnie suchych układach biologicznych, czy w organizmach ekstremofilnych, potwierdzając tezę Pintara o stosunkowo niewielkim zróżnicowaniu grup chemicznych w układach biologicznych oraz podobieństwie pół lokalnych w skali odległości testowanej w eksperymencie NMR (Pintar, 1991). Czas relaksacji spinowo-spinowej dla frakcji protonów nieruchomych wyniósł dla kompleksu DNA-BA  $T_{2S}^* \approx 20$  µs, dla DNA-CTMA  $T_{2S}^* \approx 30$  µs, a dla DNA-DDCA  $T_{2S}^* \approx 20$  µs, co jest wartościami bliskimi do stwierdzonych w innych suchych układów biologicznych takich jak: muszla małża (Harańczyk i inni, 1993), dentyna (Funduk i inni, 1986), szkliwo zęba (Funduk i inni, 1984) czy martwica korkowa i łyko (Hartley i inni, 1994).

Składowa stała zaniku swobodnej precesji została skutecznie opisana funkcją Gaussa. Użycie funkcji Abragama, opisywanej większą liczbą parametrów, nie było konieczne.

Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, została opisana funkcją liniową, co raczej wyklucza obecność znaczących ilości frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie, jak to jest na przykład w łyku kasztanowca (Harańczyk i inni, 1999).

### 10.4 Pomiary <sup>1</sup>H-NMR w domenie częstości

Pomiary zależności hydratacyjnych widm <sup>1</sup>H-NMR dla kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA dostarczyły nowych informacji w porównaniu do pomiarów w domenie czasu. Potwierdziły obecność frakcji wody luźno związanej. Kształt linii pochodzącej od matrycy stałej opisany był skutecznie funkcją Gaussa, jednakże sygnał od wody związanej dał się nieoczekiwanie rozdzielić na dwie przesunięte względem siebie linie, obie dla frakcji wody niewiele różniącej się mobilnością molekularną. Może to świadczyć o obecności wody związanej w różnych rodzajach kawern układu, zatem w innym otoczeniu chemicznym.

Dla matrycy stałej kompleksu czas relaksacji spinowo-spinowej obliczony z szerokości połówkowej linii od ciała stałego wyniósł dla DNA-CTMA  $T_{2G}^* \approx (19\pm 2)$  µs oraz  $T_{2G}^* \approx (18\pm 4)$  µs dla DNA-DDCA, co jest wartościami zbliżonymi do otrzymanych w pomiarach prowadzonych w domenie czasu. Czasy relaksacji  $T_{2G}^*$  mają wartości zbliżone do tych otrzymanych z eksperymentów NMR wykonywanych w domenie czasu dla wielu układów biologicznych o niskiej hydratacji, jak kiełkujące nasiona we wstępnych fazach rozwoju (Harańczyk i inni, 1996), czyste DNA (Harańczyk i inni, 2010), membrany lipidowe (Harańczyk i inni, 2009), błony fotosyntetyczne (Harańczyk i inni, 2006), a także wiele ekstremofilnych organizmów żywych, które mogą dehydratować do poziomu kryptobiozy, jak plechy grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i inni, 2006, 2008, 2009, 2012).

Podobne wartości czasu relaksacji  $T_{2G}^*$  świadczą o podobnych własnościach magnetycznych matryc stałych suchych układów biologicznych, formowanych przez relatywnie niewielką różnorodność grup chemicznych, wytwarzających podobne lokalne pola magnetyczne (Pintar, 1991).

Dla czystego DNA wyodrębniono dwie linie od ciała stałego, o szerokościach, które odpowiadają czasom relaksacji poprzecznej  $T_{2G_1}^* = (3.36 \pm 0.35) \,\mu s$  oraz  $T_{2G_2}^* = (6.03 \pm 0.67) \,\mu s$ .

Zaobserwowane wartości szerokości połówkowych są charakterystyczne dla wielu układów biologicznych o niskim uwodnieniu, jak m.in. dla egzoszkieletu skorupiaków (Harańczyk i inni, 2012), dla zdehydratowanych tkanek oraz całych organizmów żywych, jak np. plech grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i inni, 2008).

Obecność jonów paramagnetycznych powoduje poszerzenie linii (wpływa bowiem na skrócenie czasu relaksacji poprzecznej  $T_2$ ) oraz przesunięcie jej położenia. W stałym polu magnetycznym  $B_0$  dochodzi bowiem do częściowego porządkowania momentów magnetycznych niesparowanych elektronów. Powstaje w ten sposób wypadkowe pole magnetyczne dodające się do zewnętrznego pola  $B_0$ . Jeżeli koncentracja jonów jest duża, czas relaksacji spinowo-spinowej  $T_2$  jest skrócony na tyle, że staje się krótszy od czasu martwego spektrometru, co uniemożliwia jego obserwacje. Zwiększona zawartość żelaza i miedzi stwierdzona w kompleksach DNA-surfaktant spowodowała skrócenie czasu relaksacji poniżej czasu martwego spektrometru, który wynosi 6.5 µs dla spektrometru 300 MHz oraz 10 µs dla relaksometru 30 MHz. Z tego powodu nie zaobserwowano dla nich drugiej, szerszej linii pochodzącej od ciała stałego.

Zachowanie dwóch linii cieczowych  $L_1$  i  $L_2$  dla kompleksów DNA-surfaktant w trakcie hydratacji jest różne. Wraz z rosnącym poziomem uwodnienia czas relaksacji spinowospinowej odpowiadający składowej  $L_1$  wzrasta, co sugeruje, że obserwowany sygnał pochodzi od wody ściśle oraz luźno związanej i jest uśredniony w wyniku szybkiej wymiany protonowej między obiema frakcjami wody. Wydaje się więc, że woda zlokalizowana jest w na tyle dużych w porach stałego kompleksu DNA-surfaktant, że sygnał pochodzący od wody ściśle w nich związanej majoryzuje sygnał od wody luźno związanej dla niskich poziomów uwodnienia.

Druga linia pochodząca od protonów mobilnych,  $L_2$ , pojawia się dla wyższych hydratacji niż linia  $L_1$ . Jej mniejsza szerokość sugeruje większy udział frakcji wody luźno związanej, już dla niższych poziomów hydratacji. Większa dostępność dla wody luźno związanej może być spowodowana inną lokalizacją, na przykład na zewnątrz powierzchni miceli tworzonych przez kompleksy DNA-surfaktant lub w wolnych przestrzeniach między granulatami próbki.

Obydwie linie cieczowe,  $L_1$  i  $L_2$ , różnią się także położeniem pików, co może być spowodowane przesunięciem chemicznym, jak również obecnością niesparowanych elektronów od pobliskich jonów paramagnetycznych. Różne czasy relaksacji spinowo-sieciowej dla obserwowanych frakcji także sugerują inny mechanizm relaksacji, wynikający z różnej koncentracji jonów paramagnetycznych w miejscach gdzie frakcje te są zlokalizowane.

Wyznaczone zależności składowych cieczowych wyrażone w jednostkach składowej stałej, są niezwykle wysokie i niespotykane w innych układach biologicznych. Współczynnik nachylenia prostej opisującej tę zależność oznacza, że sygnał od protonów mobilnych narasta szybciej niż ilość wody wiązanej do układu.

Duża zawartość żelaza i miedzi znacząco wpływa na procesy relaksacji w badanych kompleksach DNA-surfaktant. Ten dodatkowy mechanizm relaksacji jest tak skuteczny, że znacząca część sygnału od ciała stałego nie jest obserwowana, co przełożyło się na wysoki współczynnik nachylenia prostej opisującej zależność *L/S* w badanych kompleksach DNA-surfaktant.

Niezwykła czułość metody NMR na obecność metali z grupy d, przejawiająca się dużym wpływem ich koncentracji na obserwowane wyniki, sugeruje, że eksperymenty <sup>1</sup>H-NMR mogą być wykorzystywane jako metoda badania czystości suchych kompleksów DNAsurfaktant.

Wartości energii aktywacji i odległości między oddziałującymi spinami, otrzymane z dopasowania funkcji opisanej równaniem 4.39 wyniosły dla DNA-CTMA  $r = (1.626 \pm 0.004)$ Å oraz  $E_A = -(15.7 \pm 0.5)$  kJ/mol, a dla DDCA  $r = (1.646 \pm 0.012)$  Å oraz  $E_A = -(11 \pm 1)$  kJ/mol. Wartości te nie są odległe od podawanych dla wiązania wodorowego, którego długość szacuje się na r = 1.97 Å, a energię na  $E_A = -23.7$  kJ/mol (Suresh i Naik, 2000).

### 11 Wnioski

- Kinetyka hydratacji badanych kompleksów DNA-surfaktant ma charakter eksponencjalny, obserwowany dla wielu układów biologicznych. Ponadto kinetyka hydratacji ujawniła obecność trzech frakcji wody: związanej bardzo ściśle, związanej ściśle, wreszcie frakcję wody luźno związanej.
- Zaobserwowano proces pęcznienia, ujawniający się także podczas hydratacji czystego DNA.
- Izoterma sorpcyjna została dobrze opisana modelem sorpcji wielowarstwowej Denta. Parametry dopasowania sugerują, że kompleksem o największej hydrofobowości jest DNA-CTMA, o najmniejszej zaś DNA-DDCA. Dopasowanie modelu GDW sugeruje, że kompleks DNA-CTMA charakteryzuje się największą porowatością, DNA-DDCA najmniejszą.
- 4. Sygnał zaniku swobodnej precesji <sup>1</sup>H-NMR w domenie czasu był sumą sygnału od matrycy stałej kompleksów DNA-surfaktant, opisywanego funkcją Gaussa oraz sygnałów od wody różniącej się mobilnością: od wody ściśle oraz od wody luźno związanej na powierzchniach kompleksu. Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego jest dobrze opisywana funkcją liniową, co sugeruje brak frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie.
- 5. Pomiary hydratacyjne widm <sup>1</sup>H-NMR kompleksów DNA-CTMA oraz DNA-DDCA potwierdziły obecność frakcji wody luźno związanej, jednakże sygnał od wody dawał się rozdzielić na dwie przesunięte względem siebie linie, pochodzące od wody niewie-le różniącej się mobilnością molekularną, co oznacza, że obie frakcje wody różnią się z uwagi na obecność dodatkowych centrów relaksacji, prawdopodobnie jonów para-magnetycznych. Kształt linii pochodzącej od matrycy stałej opisany był skutecznie funkcją Gaussa.
- Dla czystego DNA zaobserwowano w widmach <sup>1</sup>H-NMR dwie linie od ciała stałego oraz linię pochodzącą od wody luźno związanej.
- Większa zawartość jonów paramagnetycznych w kompleksach DNA-surfaktant niż w czystym DNA powoduje skrócenie czasu relaksacji jednej z frakcji ciała stałego znacząco poniżej czasu martwego spektrometru, co uniemożliwia obserwację drugiej, szerszej linii pochodzącej od ciała stałego.

## Bibliografia

- 1. Abragam, A., 1961. The principles of nuclear magnetism. Oxford: Clarendon Press.
- 2. Blicharska, B., Peemoeller, H. i Witek, M., 2010. Hydration water dynamics in biopolymers from NMR relaxation in the rotating frame. *Journal of Magnetic Resonance* **207**, 287-93.
- 3. Bonnet, J., Colotte, M., Coudy, D., Couallier, V., Portier, J., Morin, B. i Tuffet, S., 2010. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acids Research* **38**, 1531-1546.
- 4. Breslauer, K., Remeta, D., Chou, W.-Y., Ferrante, R., Curry, J. i Zaunczkowski, D., 1987. Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 8922-8926.
- 5. Brunauer, S., Emmett, P. i Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* **60**, 309-319.
- 6. Budker, V. G., Slattum, P. M., Monahan, S. D. i Wolff, J. A., 2002. Entrapment and condensation of DNA in neutral reverse micelles. *Biophysical Journal* **82**, 1570–1579.
- 7. Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. Nature 227, 561 563.
- 8. D'Arcy, R. i Watt, I., 1970. Analysis of sorption isotherms of non-homogeneous sorbents. *Transactions of the Faraday Society* **66**, 1236-1245.
- 9. Dent, R., 1977. A multilayer theory for gas sorption. Part I: Sorption of a single gas. *Textile Research Journal* **47**, 145-152.
- Derbyshire, W., Van Den Bosch, M., Van Dusschoten, D., MacNaughtan, W., Farhat, I., Hemminga, M. i Mitchell, J., 2004. Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions. *Journal of Magnetic Resonance* 168, 278–283.
- 11. Dias, R. i Lindman, B., 2008. *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- 12. Dias, R., Mel'nikov, S., Lindman, B. i Miguel, M. G., 2000. DNA Phase Behavior in the Presenece of Oppositely Charged Surfactants. *Langmuir* **16**, 9577-9583.
- Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. i Dickerson, R. E., 1981. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 2179–2183.
- 14. Dries Van Den, I., Dusschoten Van, D. i Hemminga, M., 1998. Mobility in Maltose-Water Glasses Studied with 1H NMR. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 10483-10489.
- Duguid, J. G., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M. i Thomas, G. J., 1996. DNA melting investigated by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy. *Biophysical Journal* 71, 3350-60.

- Edwards, K., Brown, D. S., Skelly, J. i Neidle, S., 1992. Molecular structure of the B-DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub>. An examination of propeller twist and minor-groove water structure at 2.2 A resolution. *Journal of Molecular Biology* 226, 1161-1173.
- Eisenstein, M. i Shakked, Z., 1995. Hydration patterns and intermolecular interactions in A-DNA crystal structures. Implications for DNA recognition. *Journal of Molecular Biology* 248, 662-678.
- Eisenstein, M., Frolow, F., Shakked, Z. i Rabinovich, D., 1990. The structure and hydration of the A-DNA fragment d(GGGTACCC) at room temperature and low temperature. *Nucleic Acids Research* 18, 3185–3194.
- 19. Fouche, N., Özgür, S., Roy, D. i Griffith, J. D., 2006. Replication fork regression in repetitive DNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6044–6050.
- 20. Frank-Kamenetskii, M. D., 2006. Self-assembly, pattern formation, and growth phenomena in nano-systems. Dordrecht: Springer.
- 21. Franklin, R. E. i Gosling, R. G., 1953. The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content . *Acta Crystallographica* **6**, 673-677.
- 22. Fukushima, E. i Roeder, S., 1981. *Experimental pulse NMR*. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company Inc.
- Funduk, N., Kydon, D. S., Peemoeller, H., Milijković i Pintar, M. M., 1984. Composition and Relaxation of the Proton Magnetization of Human Enamel and its Contribution to the Tooth NMR Image. *Magnetic Resonance in Medicine* 1, 66-75.
- Funduk, N., Lahajnar, G., Milijković, L., Skočajić, S., Kydon, D., Schreiner, L. i Pintar, M. M., 1986. A Comparative NMR Study of Proton Groups in Dentin of 20 and 50 Years Old Donors. *Zobozdravstveni Vestnik* 41, 139-160.
- Furmaniak, S. i Terzyk, A. P., 2009. Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Research International* 42, 1203– 1214.
- 26. Furmaniak, S., Terzyk, A. P. i Gauden, P. A., 2007. The general mechanism of water sorption on foodstuffs Importance of the multitemperature fitting of data and the hierarchy of models. *Journal of Food Engineering* **82**, 528-535.
- 27. Gaff, D., 1977. Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. Oecologia 31, 95-109.
- 28. Gehring, K., Leroy, J.-L. i Guéron, M., 1993. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **363**, 561-565.
- 29. Genereux, J. C. i Barton, J., 2010. Mechanisms for DNA Charge Transport. *Chemical Reviews* **110**, 1642-1662.
- Ghirlando, R., Wachtel, E. J., Arad, T. i Minsky, A., 1992. DNA Packaging Induced by Micellar Aggregates: A Novel in Vitro DNA Condensation System. *Biochemistry* 31, 7110-7119.
- 31. Gomez, E. F., Spaeth, H. D., Steckl, A. J. i Grote, J. G., 2011. Fabrication of natural DNAcontaining organic light emitting diodes. *Proceedings of SPIE* **8103**, 81030A - 81030A-6.
- 32. Grzeskowiak, K., Yanagi, K., Privé, G. i Dickerson, R., 1991. The structure of B-helical C-G-A-T-C-G-A-T-C-G and comparison with C-C-A-A-C-G-T-T-G-G. The effect of base pair reversals. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8861-8883.
- Hagen, J. A., Li, W., Steckl, A. i Grote, J., 2006. Enhanced emission efficiency in organic light-emitting diodes using deoxyribonucleic acid complex as an electron blocking layer. *Applied Physics Letters* 88, 171109-171109.
- 34. Harańczyk, H., 2003. *On water in extremely dry biological systems*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
- 35. Harańczyk, H., 2013. Układy ciekłokrystaliczne w biologii. Wykład monograficzny.
- 36. Harańczyk, H., Bacior, M. i Olech, M., 2008. Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm. *Antarctic Science* **20**, 527-535.
- Harańczyk, H., Bacior, M., Jamróz, J., Jemioła-Rzemińska, M. i Strzałka, K., 2009. Rehydration of DGDG (digalactosyl diacylglicerol) model membrane lyophilizates observed by NMR and sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A* 115, 521-525.
- Harańczyk, H., Bacior, M., Jastrzębska, P. i Olech, M., 2009. Deep dehydration of Antarctic lichen *Leptogium puberulum* Hue observed by NMR and sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A* 115, 516-520.
- 39. Harańczyk, H., Czak, J., Nowak, P. i Nizioł, J., 2010. Initial Phases of DNA Rehydration by NMR and Sorption Isotherm. *Acta Physica Polonica A* **117**, 397-402.
- 40. Harańczyk, H., Gaździński, S. i Olech, M., 1998. The initial stages of lichen hydration as observed by proton magnetic relaxation. *New Phytologist* **138**, 191-202.
- 41. Harańczyk, H., Gaździński, S. i Olech, M., 2000. Freezing protection mechanism in Cladonia mitisas observed by proton magnetic relaxation. *New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen. Bibliotheca Lichenologica* **70**, 265-274.
- Harańczyk, H., Gaździński, S. i Olech, M., 2000. Low temperature effect on the thallus of Cladonia mitisas observed by proton spin-lattice relaxation. *Molecular Physics Reports* 29, 135-138.
- Harańczyk, H., Głąb, H. i Róg, T., 1994. Human dentine degradation as observed by nuclear magnetic relaxation. W: Mat. XXVII Ogólnopolskiego Seminarium MRJ, Kraków 1-2 grudnia 1994, IFJ Raport Nr 1695/PL, 425-428.
- 44. Harańczyk, H., Grandjean, J. i Olech, M., 2003. Freezing of water bound in lichen thallus as observed by 1H NMR. I. Freezing of loosely bound water in *Cladonia mitis* at different hydration levels. *Colloids & Surfaces, B: Biointerfaces* 28, 239-249.
- 45. Harańczyk, H., Kobierski, J., Nizioł, J., Hebda, E., Pielichowski, J., Zalitacz, D., Marzec, M. i El-Ghayoury, A., 2013. Mild hydration of didecyldimethylammonium chloride modified DNA by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance and by sorption isotherm. *Journal of Applied Physics* 113, 044702-7.
- Harańczyk, H., Kobierski, J., Zalitacz, D., Nowak, P., Romanowicz, A., Marzec, M., Nizioł, J., Hebda, E. i Pielichowski, J., 2012. Rehydration of CTMA Modified DNA Powders Observed by NMR. *Acta Physica Polonica A* 121, 485-490.

- 47. Harańczyk, H., Leja, A. i Strzałka, K., 2006. The effect of water accessible paramagnetic ions on subcellular structures formed in developing wheat photosynthetic membranes as observed by NMR and by sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A* **109**, 389-398.
- Harańczyk, H., Nizioł, J. i Falniowski, A., 1993. *The proton NMR investigations of water* bound in shell of mussel (Mytilius edulis). W: Materiały XXVI Ogólnopolskiego Seminarium MRJ, Kraków 1-2 grudnia 1993, IFJ Raport Nr 1658/PL, 179-185.
- Harańczyk, H., Pater, Ł., Nowak, P., Bacior, M. i Olech, M., 2012. Initial phases of Antarctic Ramalina terebrata Hook f. & Taylor thalli rehydration observed by proton relaxometry. Acta Physica Polonica 121, 478-482.
- 50. Harańczyk, H., Pietrzyk, A., Leja, A. i Olech, M., 2006. Bound water structure on the surfaces of *Usnea antarctica* as observed by NMR and sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A* **109**, 411-416.
- Harańczyk, H., Strzałka, K., Jasiński, G. i Mosna-Bojarska, K., 1996. The initial stages of wheat (*Triticum aestivum* L.) seed imbibition as observed by proton nuclear magnetic relaxation. *Colloids and Surfaces A* 115, 47-54.
- 52. Harańczyk, H., Węglarz, W. i Sojka, S., 1999. The investigation of hydration processes in horse chestnut (*Aesculus Hippocastanu*, L.) and pine (Pinus silvestri, L.) bark and bast using proton magnetic relaxation. *Holzforschung* **53**, 299-310.
- 53. Hartley, I., Kamke, F. i Peemoeller, H., 1994. Absolute moisture content determination of aspen wood below the Fiber Saturation Point using pulsed NMR. *Holzforschung* **48**, 474-479.
- 54. Hausser, K. H. i Kalbitzer, H. R., 1993. *NMR w biologii i medycynie*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM.
- 55. Hennel, J. W., 1997. *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego*. Kraków: Wydawnictwo IFJ.
- 56. Hennel, J. W. i Klinowski, J., 2000. *Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM.
- 57. Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. i Lindman, B., 2002. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- 58. Israelachvili, J. N., 1985. Itermolecular and Surface Forces, with Applications to Colloidal and Biological Systems. Londyn: Academic Press.
- 59. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. i Ninham, B. W., 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 2 **72**, 1525-1568.
- 60. Ivanov, V. I. i Krylov, D. Y., 1992. A-DNA in solution as studied by diverse approaches. *Methods in Enzymology* **211**, 111–127.
- Kennarda, O., Crusea, W., Nachmana, J., Prangeb, T., Shakkedc, Z. i Rabinovichc, D., 1986. Ordered Water Structure in an A-DNA Octamer at 1.7 Å Resolution. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 3, 623-647.

- Koltover, I., Salditt, T., R\u00e4dler, J. O. i Safinya, C. R., 1998. An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery. *Science* 281, 78-81.
- 63. Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society* **40**, 361-1403.
- 64. Lasic, D. D., 1997. Liposomes in Gene Delivery. Boca Raton: CRC PressINC.
- 65. Leal, C., Wadso, L., Olofsson, G., Miguel, M. i Wennerstrom, H., 2004. The Hydration of a DNA-Amphiphile Complex. *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 3044-3050.
- 66. Lee, S. L., Debenedetti, P. G., Errington, J. R., Pethica, B. A. i Moore, D. J., 2004. A Calorimetric and Spectroscopic Study of DNA at Low Hydration. *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 3098–3106.
- Legendre, J. Y., Trzeciak, A., Bohrmann, B., Deuschle, U., Kitas, E. i Supersaxo, A., 1997. Dioleoylmelittin as a Novel Serum-Insensitive Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells. *Bioconjugate Chemistry* 8, 57–63.
- 68. Leszczyński, T. i Duński, H., 2006. Sposoby wiązania cząsteczek ligandów z DNA. Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej **984**, 65-77.
- 69. Li, Z., Chen, Y., Li, X., Kamins, T. I., Nauka, K. i Williams, R. S., 2004. Sequence-Specific Label-Free DNA Sensors Based on Silicon Nanowires. *Nano Letters* **4**, 245–247.
- Liepinsh, E., Otting, G. i Wüthrich, K., 1992. NMR observation of individual molecules of hydration water bound to DNA duplexes: direct evidence for a spine of hydration water present in aqueous solution. *Nucleic Acids Research* 20, 6549–6553.
- 71. Mel'nikov, S. M., Sergeyev, V. G. i Yoshikawa, K., 1995. Transition of Double-Stranded DNA Chains between Random Coil and Compact Globule States Induced by Cooperative Binding of Cationic Surfactant. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 9951–9956.
- 72. Moser, H. i Dervan, P., 1987. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* **238**, 645-650.
- 73. Murray, R. K., Granner, D. K. i Rodwell, V. W., 2008. *Biochemia Harpera ilustrowana*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- 74. Neidle, S., 1999. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. Oxford: Oxford Science Publications.
- 75. Pintar, M., 1991. Some considerations of the round table subject. *Magnetic Resonance Imaging* **9**, 753-754.
- Pohle, W., Selle, C., Gauger, D. R., Zantl, R., Artzner, F. i Radler, J. O., 2000. FTIR spectroscopic characterization of a cationic lipid-DNA complex and its components. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2, 4642-4650.
- 77. Pontius, B. W. i Berg, P., 1991. Rapid renaturation of complementary DNA strands mediated by cationic detergents: A role for high-probability binding domains in enhancing the kinetics of molecular assembly processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 8237-8241.

- Prive, G., Yanagi, K. i Dickerson, R., 1991. Structure of the B-DNA decamer C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and comparison with isomorphous decamers C-C-A-A-G-A-T-T-G-G and C-C-A-G-G-C-C-T-G-G. *Journal of Molecular Biology* 217, 177–199.
- 79. Rippe, K. i Jovin, T. M., 1992. Parallel-stranded duplex DNA. *Methods in Enzymology* **211**, 199–220.
- Sergeyev, V. G., 1997. DNA-surfactant complexes in organic media. W: Formation and Dynamics of Self-Organized Structures in Surfactants and Polymer Solutions. Darmstadt: Springer, 198 - 203.
- 81. Sinden, R. R., 1994. DNA Structure and Function. Oxford: Gulf Professional Publishing.
- 82. Sobczyk, L. i Kisza, A., 1981. *Chemia fizyczna dla przyrodników*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- 83. Spink, C. H. i Chaires, J. B., 1997. Thermodynamics of the Binding of a Cationic Lipid to DNA. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 10920–10928.
- 84. Sternberg, B., Sorgi, F. L. i Huang, L., 1994. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **356**, 361-366.
- Strawhecker, K. E., Kumar, S. K., Douglas, J. F. i Karim, A., 2001. The Critical Role of Solvent Evaporation on the Roughness of Spin-Cast Polymer Films. *Macromolecules* 34, 4669-4672.
- 86. Suresh, S. J. i Naik, V. M., 2000. Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. *Journal of Chemical Physics* **113**, 9727-9732.
- 87. Timur, A., 1969. Pulsed nuclear magnetic resonance studies of porosity, movable fluid permeability of sandstones. *Journal of Petroleum Technology* **21**, 775-786.
- 88. Wang, L., Yoshida, J. i Ogata, N., 2001. Self-Assembled Supramolecular Films Derived from Marine Deoxyribonucleic Acid (DNA)–Cationic Surfactant Complexes: Large-Scale Preparation and Optical and Thermal Properties. *Chemistry of Materials* 13, 1273–1281.
- 89. Watson, J. i Crick, F., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids. Nature 171, 737-740.
- 90. Węglarz, W. i Harańczyk, H., 2000. Two-dimensional analysis of the nuclear relaxation function in the time domain: the program CracSpin. *Journal of Physics D* **33**, 1909-1920.
- 91. Witek, M., 2006. *Badanie magnetycznej relaksacji jądrowej w amorficznych układach biologicznych*. Praca doktorska. Kraków: Uniwersytet Jagielloński.
- 92. Wróbel, S. i Marzec, M., 2006. Różnicowa kalorymetria skaningowa . W: E. Mikuli i A. Migdał-Mikuli, *Komplementarne metody badań przemian fazowych*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
- 93. Yaney, P. P., Heckman, E. M., Diggs, D. E., Hopkins, F. K. i Grote, J. G., 2005. Development of chemical sensors using polymer optical waveguides fabricated with DNA. *Proceedings of SPIE* **5724**, 224 233.

- 94. Ye, J., Umemura, K., Ishikawa, M. i Kuroda, R., 2000. Atomic force microscopy of DNA molecules stretched by spin-coating technique. *Analytical biochemistry* **281**, 21-25.
- 95. Zhou, S. i Chu, B., 2000. Assembled Materials: Polyelectrolyte–Surfactant Complexes. *Advanced Materials* **12**, 545–556.

## Spis publikacja autora

- Harańczyk, H., Kobierski, J., Zalitacz, D., Nowak, P., Romanowicz, A., Marzec, M., Nizioł, J., Hebda, E. i Pielichowski, J., 2012. Rehydration of CTMA Modified DNA Powders Observed by NMR. *Acta Physica Polonica A* 121, 485-490 (IF = 0.531).
- Harańczyk, H., Kobierski, J., Nizioł, J., Hebda, E., Pielichowski, J., Zalitacz, D., Marzec, M. i El-Ghayoury, A., 2013. Mild hydration of didecyldimethylammonium chloride modified DNA by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance and by sorption isotherm. *Journal of Applied Physics* 113, 044702-7 (IF = 2.210).
- 3. Nizioł, J., Harańczyk, H., Kobierski, J., Hebda, E., Pielichowski, J. Ostachowicz, B. Atmospheric moisture absorption effect on solid DDCA/DNA complexes measured using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Submitted to *Journal of Applied Physics* (IF = 2.210).
- 4. Nizioł, J., Harańczyk, H., Kobierski, J., Zalitacz, D., Hebda, E., Pielichowski, J. Hydratacja wybranych lipidowych kompleksów DNA. Submitted to *Polimery* (IF = 0.470).

## Spis rysunków

| Rys. 1.1. Cząsteczka deoksyrybozy.   | 17  |
|--|-----|
| Rys. 1.2. Graficzne przedstawienie fragmentu pojedynczej nici DNA  | 17  |
| Rys. 1.3. Zasady azotowe wchodzące w skład DNA: adenina (a), guanina (b), tymina (c) i cytozyna                                |     |
| (d)  | 18  |
| Rys. 1.4. Wiązania wodorowe pomiędzy adeniną a tyminą oraz między guaniną a cytozyną   | 18  |
| Rys. 1.5. Model podwójnej helisy DNA. (a) Oryginalny rysunek z pracy Watsona i Cricka (Watson                                  | i   |
| Crick, 1953) oraz (b) schemat współczesny (http://www.astrochem.org).  | 19  |
| Rys. 1.6 Różne konformacje DNA: (a) B-DNA, (b) A-DNA, (c) Z-DNA (Neidle, 1999)   | 20  |
| Rys. 1.7. Przykłady związanych wodorowo zasad azotowych budujących tripleksy: (a) C+GC,  |     |
| (b)AAT, (c) TAT, (d) GGC.  | 22  |
| Rys. 1.8. Cztery związane guaniny umożliwiające powstawanie kwadrupleksu DNA   | 23  |
| Rys. 1.9. Uracyl, wchodzący w skład RNA  | 23  |
| Rys. 1.10. Schemat replikacji nici DNA.  | 26  |
| Rys. 1.11. Schemat przyłączania molekuł wody poprzez wiązania wodorowe do par zasad  |     |
| wchodzących w skład DNA: (a) adenina – tymina oraz (b) guanina – cytozyna (Neidle, 1999)                                       | 28  |
| Rys. 1.12. Uwodnienie B-DNA. Cienkie linie symbolizują wiązania wodorowe. Woda wiąże się do                                    |     |
| zasady jednym wiązaniem wodorowym; (a) Wiązanie wody w małej bruździe dla  |     |
| d[CGCGAATTCGCG] <sub>2</sub> . Wodę wiązana z miejscami pierwotnie wiążącymi symbolizują duże kule.                            |     |
| Woda wtórnie związana oznaczona jest małymi kulami. (b) Podwójny rząd wody związanej w małej                                   | j   |
| bruździe w d[CCAACGTTGG] <sub>2</sub> . (c) Woda wiązana w dużej bruździe w d[CGATCGATCG] <sub>2</sub> . Dwie                  | ;   |
| cząsteczki związane z guaniną, wiążą się z wodą związaną z tyminą. (d) Woda wiążąca się do grup                                |     |
| fosforanowych w d[CTCTCGAGAG]2 (Neidle, 1999)  | 29  |
| Rys. 1.13. Uwodnienie A-DNA na przykładzie d[GGBr <sup>5</sup> UABr <sup>5</sup> UACC] <sub>2.</sub> Cienkie linie symbolizują |     |
| wiązania wodorowe. Woda przedstawiona jest za pomocą kul (Neidle, 1999)  | 31  |
| Rys. 1.14. Uwodnienie helisy Z-DNA dla dwóch różnych sekwencji: (a) d[CGU'ACG] <sub>2</sub> oraz (b)                           |     |
| d[CGCGCG] <sub>2</sub>   | 32  |
| Rys. 1.15. Tworzenie mostków wodnych miedzy helisami Z-DNA (oznaczonych literami alfabetu).                                    |     |
| Cyfry rzymskie numerują kolejność nukleotydów (Neidle, 1999)   | 33  |
| Rys. 2.1. Graficzne przedstawienie wielkości charakteryzujących kształt surfaktantów wchodzących                               | ı w |
| skład miceli (Israelachvili, 1985)   | 37  |
| Rys. 2.2. Fazy koloidów (Holmberg i inni, 2002)  | 38  |
| Rys. 3.1. Schemat obrazujący dwie różne drogi przejścia fazowego z fazy lamellarnej $L_{\alpha}$ do                            |     |
| odwróconej heksagonalnej H <sub>II</sub> (Koltover i inni, 1998).  | 41  |
| Rys. 3.2 Schemat różnego rodzaju upakowania elektroobojętnych struktur DNA-CTMA (Lasic, 199                                    | 7). |
|  | 43  |
| Rys. 3.3 Schematyczne przedstawienie przekroju poprzecznego heksagonalnej struktury kompleksu                                  |     |
| DNA-CTAB (Lasic, 1997).  | 43  |
| Rys. 4.1. Schematyczne przedstawienie działania impulsów $\pi - \tau - \pi/2$ w metodzie <i>Inversion</i>                      |     |
| Recovery   | 53  |
| Rys. 4.2. Zależności szybkości relaksacji podłużnej i poprzecznej od temperatury   | 56  |
| Rys. 4.3. Widoczny na widmie NMR dublet Pake'a. Poniżej widoczny sygnał FID opisywany funkci                                   | ją  |
| Abragama oraz jego transformacja Fouriera do domeny częstości (Derbyshire i inni, 2004).                                       | 62  |
| Rys. 4.4. Zestawienie zaników swobodnej precesji oraz widm NMR pochodzących od próbki  |     |
| zawierającej zarówno frakcję stałą, jak i frakcję cieczową (Derbyshire i inni, 2004).  | 63  |

| Rys. 5.1. Schematyczne przedstawienie wiązania molekuł wody do powierzchni sorbentu, w   |
|--|
| zależności od wartości parametru w; pomarańczowe kółka – miejsca pierwotnie wiążące wodę,  |
| niebieskie kółka – molekuły wody (Furmaniak i inni, 2007)  |
| Rys. 6.1. Wzór strukturalny chlorku benzalkoniowego  |
| Rys. 6.2. Wzór strukturalny chlorku cetylotrimetyloamoniowego  |
| Rys. 6.3. Wzór strukturalny chlorku didecylodimetyloamoniowego   |
| Rys. 6.4. Schemat ideowy kalorymetru DSC (Wróbel i inni, 2006)   |
| Rys. 6.5. Skany kalorymetryczne DSC czystego DNA o wysokim poziomie uwodnienia ( $\Delta m/m_0 =$  |
| 0.50); widoczny pik odpowiadający denaturacji; linia ciągła – grzanie, linia przerywana – chłodzenie,  |
| linia kropkowana – ponowne grzanie   |
| Rys. 7.1. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej dla kompleksów DNA-surfaktant wyrażona jako   |
| względny przyrost masy (a) DNA-BA, (b) DNA-CTMA oraz (c) DNA-DDCA. Hydratację  |
| prowadzono dla różnych wartości wilgotności względnych, $p/p_0$ , atmosfery. Wilgotności środowisk   |
| wynosiły odpowiednio: ( $\blacksquare$ ) 9%, ( $\bigcirc$ ) 23%, ( $\blacktriangle$ ) 32%, ( $\bigtriangledown$ ) 44%, ( $\blacklozenge$ ) 52%, ( $\triangleleft$ ) 63%,     |
| (►) 76%,(●) 88%, (★) 93%, (●) 97%  |
| Rvs. 7.2. Trasy hydratacyjne kompleksu (a) DNA-BA. (b) DNA-CTMA oraz (c) DNA-DDCA  |
| zmierzone w atmosferze o wilgotności p/p <sub>0</sub> : ( $\blacksquare$ ) 93%, ( $\triangle$ ) 97% oraz ( $\bigcirc$ ) 100%. Dla uwodnienia                                 |
| 100% widoczny jest proces pecznienia   |
| Rys. 7.3. Izotermy sorpcyine Denta oraz BET dla kompleksów DNA-surfaktant przedstawione w  |
| postaci parabolicznei: (a) dla DNA-BA, (b) dla DNA-CTMA oraz (c) dla DNA-DDCA. Linia ciagła to   |
| dopasowany model izotermy Denta, linia przerywana – model izotermy BET,  |
| Rvs. 7.4. Izoterma sorpcvina dla kompleksów (a) DNA-BA. (b) DNA-CTMA. (c) DNA-DDCA. Linia  |
| przerywana – model BET, linia ciagła – model Denta, linia kropkowana – model GDW   |
| Rys. 8.1. Zależnośc hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej dopasowana z sygnałów zaniku   |
| swobodnej precesij dla protonów w kompleksie DNA-BA: ( $\bullet$ ) frakcja stała. ( $\Delta$ ) frakcja wody ściśle   |
| zwiazanej. (O) frakcja wody luźno zwiazanej  |
| Rys. 8.2. Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ wyrażona w jednostkach   |
| amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-BA w funkcji hydratacji próbki 91  |
| Rys 8.3. Sygnały zaniku swobodnej precesij dla protonów stałego kompleksu DNA-CTMA   |
| zarejestrowane dla czestości rezonansowej 30 MHz (długość impulsu $\pi/2 = 1.5$ us). Względny  |
| przyrost masy wynosił odpowiednio dla (a) i (b) $\Delta m/m_0 = 0.132$ oraz dla (c) i (d) $\Delta m/m_0 = 0.261$   |
| Ciagła linia przedstawia dopasowanie metoda naimniejszych kwadratów do danych doświadczalnych  |
| funkcji opisanych równaniem 8.1 (a) oraz równaniem 8.2 (b) Na rysunkach (c) i (d) przedstawiono  |
| funkcje rezvdualne, nje przekraczające dla (c) $1.1\%$ oraz dla (d) $0.8\%$  |
| Rys. 8.4. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej donasowana z sygnałów zaniku   |
| swohodnej precesij dla protonów w kompleksie DNA-CTMA: ( $\bullet$ ) frakcja stała ( $\Lambda$ ) frakcja wody  |
| swoodunej precesji ula protonow w kompleksie DIVA-CTIVIA, ( $\bullet$ ) nakeja stala, ( $\Delta$ ) nakeja wody<br>ściśle związanej ( $\Omega$ ) frakcja wody luźno związanej |
|  |
| Rys. 8.5. Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ wyrażona w jednostkach   |
| amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-CTMA w funkcji hydratacji próbki   |
| Rys. 8.6. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji spinowo-spinowej dopasowana z sygnałów zaniku   |
| swobodnej precesji dla protonów w kompleksie DNA-DDCA; ( $\bullet$ ) frakcja stała, ( $\Delta$ ) frakcja wody  |
| ściśle związanej, ( <b>O</b> ) frakcja wody luźno związanej96  |
| Rys. 8.7. Całkowity sygnał cieczowy wyrażony w jednostkach ciała stałego, $\frac{L_1 + L_2}{S}$ , w funkcji  |
|  |

| Rys. 8.8. Sygnał pochodzący od wody luźno związanej wyrażony w jednostkach ciała stałego, L <sub>2</sub> /S, w funkcji hydratacji dla kompleksu DNA-DDCA   |
|--|
| Rys. 8.9. Zależność sygnału pochodzącego od składowej cieczowej $\frac{L_2}{L_1 + L_2}$ wyrażona w jednostkach   |
| amplitudy całkowitego sygnału dla DNA-DDCA w funkcji hydratacji próbki   |
| Rys. 9.1. Widma <sup>1</sup> H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla DNA uwodnionego do poziomu (a)   |
| $\Delta m/m_0 = 0.018$ oraz (b) $\Delta m/m_0 = 1.92$ ; linia ciągła – zmierzone widmo , linia przerywana –  |
| dopasowany kształt (równanie 9.1 dla (a) oraz 9.2 dla (b)) 100   |
| Rys. 9.2. Widma <sup>1</sup> H-NMR w funkcji poziomu hydratacji dla czystego DNA zarejestrowane w  |
| temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez czynnik k $(1 + \Delta m/m_0)$ 101  |
| Rys. 9.3. Położenia środków linii składowej cieczowej widma ( <b>O</b> ) <sup>1</sup> H-NMR dla czystego DNA   |
| wyrażone w funkcji uwodnienia 101  |
| Rys. 9.4. Szerokości połówkowe składowej cieczowej (O) widma <sup>1</sup> H-NMR dla czystego DNA   |
| wyrażone w funkcji uwodnienia; we wstawce widoczne także szerokości połówkowe linii od ciała   |
| stałego: ( $\bullet$ ) składowa $G_1$ oraz ( $\blacksquare$ ) składowa $G_2$ 102   |
| Rys. 9.5. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej L wyrażonej w jednostkach składowej stałej,   |
| L/S, suchej masy dla czystego DNA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki wyrażony w  |
| jednostkach suchej masy 103  |
| Rys. 9.6. Widma <sup>1</sup> H-NMR zebrane przy częstości 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA   |
| uwodnionego do poziomu (a) $\Delta m/m_0 = 0.06$ , (b) $\Delta m/m_0 = 0.53$ ; linia ciągła – widmo zmierzone, linia   |
| przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.6 oraz (b) równaniem 9.8 105  |
| Rys. 9.7. Widma <sup>1</sup> H-NMR w funkcji poziomu hydratacji dla kompleksu DNA-CTMA zebrane w   |
| temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez czynnik k $(1 + \Delta m/m_0)$ 106  |
| Rys. 9.8. Położenia środków linii składowych cieczowych widma <sup>1</sup> H-NMR dla kompleksu DNA-  |
| CTMA wyrażone w funkcji uwodnienia; ( $\Delta$ ) składowa $L_1$ , ( <b>O</b> ) składowa $L_2$  |
| Rys. 9.9. Szerokości połówkowe pików składowych cieczowych w widmie 'H-NMR hydratowanego   |
| kompleksu DNA-CTMA w funkcji poziomu uwodnienia; ( $\Delta$ ) składowa $L_1$ , ( <b>O</b> ) składowa $L_2$ ; na  |
| wstawce widoczna dodatkowo szerokość połówkowa składowej stałociałowej (■) 107   |
| Rys. 9.10. Hydratacyjna zależność składowych cieczowych $L_1+L_2$ wyrażone w jednostkach składowej   |
| stałej, $(L_1+L_2)/S$ , suchej masy dla czystego DNA. Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki  |
| 108 IV I I I I I I I I I I I I I I I I I I   |
| Rys. 9.11. Widma H-NMR zebrane przy częstości 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA   |
| uwodnionego do poziomu (a) $\Delta m/m_0 = 0.048$ , (b) $\Delta m/m_0 = 0.44$ ; linia ciągła – widmo zmierzone, linia  |
| przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) rownaniem 9.6 oraz (b) rownaniem 9.8 109  |
| Rys. 9.12. włama H-NMR w funkcji poziomu nydratacji dla kompleksu (a) DNA-CTMA oraz (b)  |
| DNA-DDCA zeorane w temperaturze pokojowej. Składowa cieczowa przeskalowana jest przez $110$  |
| CZYNNIK K'(1 + $\Delta m/m_0$ )  |
| Rys. 9.15. Położenia słodków inili składowych cieczowych widina H-inik dla kompleksu DINA-<br>DDCA wyrażona w funkcji uwodnienie: ( $\Delta$ ) składowe $I_{-}(\Omega)$ składowe $I_{-}$                     |
| DDCA wyłażone w funkcji uwodnienia, ( $\Delta$ ) składowa $L_1$ , ( $\bigcirc$ ) składowa $L_2$ 111<br>Pvs. 0.14. Szerokości połówkowe pików składowach cieczowach w widmie <sup>1</sup> H NMP bydratowanego |
| NA DDCA w funkcji poziomu uvodnjenje: ( $\Delta$ ) składowa $L_{-}$ ( $\Omega$ ) składowa $L_{-}$ in wstawce   |
| widoczna dodatkowo szerokość połówkowa składowa stałociałowa ( $\blacksquare$ ) ( $\blacksquare$ ) składowa $L_2$ , na wstawce   |
| Rys 9 15 Hydratacyjna zależność składowej cieczowej L, wyrażonej w jednostkach składowej stałej  |
| $L_{\rm V}$ S suchei masy dla kompleksu DNA-DDCA Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki   |
| $L_{P}$ s, such of masy the complexity brock. Considering wyrazono jako przyrost masy problem 112 wyrażony w jednostkach suchej masy 112   |
| Rys 9 16 Hydratacyjna zależność składowej cieczowej La wyrażonej w jednostkach składowej stałej  |
| $L_{S}$ , suchej masy dla kompleksu DNA-DDCA Uwodnienie wyrażono jako przyrost masy próbki   |
| wyrażony w jednostkach suchej masy   |
| ······································   |

| Rys. 9.17. Widma <sup>1</sup> H-NMR w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej   |
|--|
| dla kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia (a) $\Delta m/m_0 = 0.06$ oraz (b) $\Delta m/m_0 = 0.55$ 115  |
| Rvs. 9.18. Funkcia magnetyzacii spinowo-sieciowei dla obu składowych widma <sup>1</sup> H-NMR  |
| wyodrebnionych w eksperymencje spektroskonji relaksacyjne w temperaturze nokojowej dla   |
| komplakcu DNA CTMA: pomiar dla poziomu uwodnjanja (a) $4m/m_{\odot} = 0.06$ oraz (b) $4m/m_{\odot} = 0.55$ :   |
| wides the derive: $(\blacksquare) C_1(A) I_2(O) I_3$   |
| WINGOZZIE SKINGOWE. ( $\blacksquare$ ) G, ( $\Delta$ ) L <sub>1</sub> , ( $\bigcirc$ ) L <sub>2</sub> .  |
| Rys. 9.19. Widma 'H-NMR w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej   |
| dla kompleksu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia (a) $\Delta m/m_0 = 0.05$ oraz (b) $\Delta m/m_0 = 0.44117$   |
| Rys. 9.20. Funkcja magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych widma 'H-NMR  |
| wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjne w temperaturze pokojowej dla   |
| kompleksu DNA-DDCA; pomiar dla poziomu uwodnienia (a) $\Delta m/m_0 = 0.05$ oraz (b) $\Delta m/m_0 = 0.44$ ;   |
| widoczne składowe: ( $\blacksquare$ ) G, ( $\triangle$ ) L <sub>1</sub> , ( <b>O</b> ) L <sub>2</sub>  |
| Rys. 9.21. Widma <sup>1</sup> H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA;   |
| względny przyrost masy $\Delta m/m_0 = 0.06$ , temperatura (a) 260 K, (b) 300 K; linia ciągła – widmo  |
| doświadczalne linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9 14 (b) równaniem  |
| 9 15   |
| Rys 9.22 Widma <sup>1</sup> H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-CTMA dla  |
| $r_{22}$ , widnia 11-1000 da zinicizonego zakresu temperatur dia kompleksu DIVA-e 100A, dia<br>noziomu uvodnjonjo $4m/m = 0.06$                          |
| poziolnu uwodinelna $\Delta m/m_0 = 0.00$ . 122<br>Para 0.22. Torre creature and in a fair a fair (a) aparalez fair rahávila una (b) rahataria linii dla |
| Rys. 9.23. Temperaturowe zależności (a) szerokości połowkowych oraz (b) położenia inii dla $(\mathbf{r}) \in (\mathbf{r})$                               |
| kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.06$ ; widoczne składowe: ( $\bullet$ ) G, ( $\blacksquare$ ) G <sub>1</sub> ,               |
| $(\Delta) L_1123$  |
| Rys. 9.24. Widma 'H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-CTMA;   |
| względny przyrost masy $\Delta m/m_0 = 0.55$ , temperatura (a) 260 K, (b) 300 K; linia ciągła – widmo  |
| doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem   |
| 9.16   |
| Rys. 9.25. Widma <sup>1</sup> H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-CTMA, dla   |
| poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.55$   |
| Rys. 9.26. Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych oraz (b) położenia linii dla  |
| kompleksu DNA-CTMA, dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.55$ ; widoczne składowe; ( $\bullet$ ) G, ( $\blacksquare$ ) G <sub>1</sub> ,               |
| $(A) L_{4} (Q) L_{2}$ [25]   |
| Rys 9.27 Widma <sup>1</sup> H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA:   |
| względny przyrost masy $\Delta m/m_c = 0.05$ temperatura (a) 260 K. (b) 300 K: linia ciagła – widmo  |
| doświadozalna linia przerawana donasowana krzywa opisana (a) równaniam $0.14$ (b) równaniam  |
| 0.15   |
| 9.10. 120  |
| Rys. 9.28. widma H-INMR dia zmierzonego zakresu temperatur dia kompleksu DNA-DDCA, dia   |
| poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.05$   |
| Rys. 9.29. Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych i (b) położenia linii dla komplesu  |
| DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.05$ ; widoczne składowe: (•) G, (•) G <sub>1</sub> , ( $\Delta$ ) L <sub>1</sub> . 128                |
| Rys. 9.30. Widma <sup>1</sup> H-NMR zebrane na spektrometrze 300 MHz dla kompleksu DNA-DDCA;   |
| względny przyrost masy $\Delta m/m_0 = 0.44$ , temperatura (a) 260 K,(b) 300 K; linia ciągła – widmo   |
| doświadczalne, linia przerywana – dopasowane krzywe opisane (a) równaniem 9.14 (b) równaniem   |
| 9.16   |
| Rys. 9.31. Widma <sup>1</sup> H-NMR dla zmierzonego zakresu temperatur dla kompleksu DNA-DDCA, dla   |
| poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.44$   |
| Rys. 9.32. Temperaturowe zależności (a) szerokości połówkowych oraz (b) położenia linii dla  |
| kompleksu DNA-DDCA, dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.44^{\circ}$ widoczne składowe: (•) G (•) G  |
| $(\Delta) L_1 (\mathbf{O}) L_2 $   |
| Rys. 9.33 Temperaturowa zależność czasu relaksacji podłużnej T. dla DNA_CTMA: względny   |
| $\frac{121}{121}$  |
| $p_{12}y_{10}$ $m_{0} = 0.00$  |

| Rys. 9.34. Zależności temperaturowe szybkości relaksacji podłużnej $R_1$ dla DNA-CTMA; względny              |    |
|--|----|
| przyrost masy $\Delta m/m_0 = 0.06$  | 32 |
| Rys. 9.35. Temperaturowe zależności czasu relaksacji podłużnej $T_1$ dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0$ = | =  |
| 0.55 dla kompleksu DNA-CTMA; (■) składowa obecna w całym zakresie temperatur ( <b>O</b> ) składowa           |    |
| pojawiająca się powyżej temperatury 310 K 13   | 33 |
| Rys. 9.36. Zależności temperaturowe czasu relaksacji podłużnej $T_1$ dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0$ = | =  |
| 0.05 dla kompleksu DNA-DDCA  | 34 |
| Rys. 9.37. Temperaturowe zależności szybkości relaksacji podłużnej $R_1$ dla najniższych poziomu             |    |
| uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.05$ , dla kompleksu DNA-DDCA  | 34 |
| Rys. 9.38. Temperaturowe zależności czasu relaksacji podłużnej $T_1$ dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0$ = | =  |
| 0.44 dla kompleksu DNA-DDCA; (■) składowa obecna w całym zakresie temperatur, (□) składowa                   |    |
| pojawiająca się powyżej temperatury 270 K 13   | 35 |

## Spis tabel

| Tabela 1.1. Lokalizacja cząsteczek wody wiązanych z zasadami azotowymi budującymi DNA. W      |    |
|---|----|
| każdym przypadku duża bruzda znajduje się w lewym górnym rogu od zasady (Neidle, 1999)3       | 0  |
| Tabela 2.1. Podział układów koloidalnych ze względu na stan skupienia (Sobczyk i Kisza, 1981; |    |
| Harańczyk, 2013)  | 6  |
| Tabela 6.1. Oznaczone techniką TXRF zawartości metali w DNA oraz kompleksach DNA-surfaktant   | ;  |
| german został dodany do badanych próbek jako wzorzec7   | 4  |
| Tabela 6.2. Substancje wykorzystywane do uzyskiwania odpowiednich wilgotności względnych w    |    |
| trakcie hydratacji próbek7  | 5  |
| Tabela 7.1. Porównanie parametrów kinetyki hydratacji kompleksów DNA-surfaktant8              | 52 |
| Tabela 7.2. Porównanie parametrów izoterm sorpcyjnych dopasowanych dla kompleksów DNA-        |    |
| surfaktant wg modelu Denta  | 57 |
| Tabela 7.3. Porównanie parametrów izoterm sorpcyjnych wg modelu GDW kompleksów DNA-           |    |
| surfaktant  | 8  |