

Infracrvena spektroskopija glukoze

Vrljić, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:241860>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Valentina Vrljić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA GLUKOZE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Infracrvena spektroskopija.....	3
2.1.1. <i>Uvod u infracrvenu spektroskopiju</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Elektromagnetsko zračenje i interakcija elektromagnetskog zračenja i molekule</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Molekulske vibracije.....</i>	<i>7</i>
2.1.4. <i>Infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (FT-IR spektrometar)</i>	<i>9</i>
2.1.5. <i>Priprava uzoraka za mjerenje</i>	<i>11</i>
2.1.6. <i>Interpretacija IR spektra</i>	<i>12</i>
2.2. Glukoza	14
2.3. Infracrveni spektar glukoze.....	16
2.4. Primjena IR spektroskopije za određivanje glukoze u krvi.....	18
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	21

§ Sažetak

Infracrvena (IR) spektroskopija je instrumentna metoda koja se većinom koristi za strukturnu analizu molekula. Za što učinkovitiju primjenu ove metode, poznavanje njezinih mogućnosti i granica od odlučujućeg je značaja. Stoga su u prvom dijelu ovog rada objašnjene osnove infracrvene spektroskopije, koje uključuju teorijsku osnovicu, instrumentaciju i pripravu uzoraka za mjerenje te asignaciju IR spektra.

U nastavku je opisana primjena IR spektroskopije pri strukturnoj analizi molekule glukoze, čiji je eksperimentalno izmjeren IR spektar detaljno asigniran i vibracijske vrpce uspoređene s vrpcama izračunatim metodom teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT). Zaključeno je da se rezultati DFT metode dobro slažu s eksperimentalnim podacima te se stoga ta metoda može koristiti za točan i precizan izračun strukture molekule i njenog infracrvenog spektra.

Glukoza je važna biomolekula koja ima vodeću ulogu u mnogim procesima važnima za život. Stoga je i konstantno praćenje količine glukoze u biološkim tekućinama od iznimne važnosti, posebice za osobe koje boluju od šećerne bolesti ili dijabetesa. Veliki je napredak ostvaren u razvoju i primjeni neinvazivnih metoda za određivanje glukoze u krvi, u koje se ubraja i infracrvena spektroskopija.

§ 1. UVOD

Infracrveno zračenje obuhvaća dio elektromagnetskog spektra između vidljivog i mikrovalnog područja, a obuhvaća raspon valnih duljina od 0,78 do 1000 μm . Unutarnja gibanja u molekuli koja pobuđuje zračenje u infracrvenom dijelu spektra nazivaju se vibracije. Vibracija predstavlja takvo gibanje kod kojeg se svi atomi gibaju istovremeno (simultano) i u fazi, pri čemu se ne mijenja težište molekule, već se mijenja položaj atoma. Skupine atoma i molekule vibriraju na različite načine, ali uvijek na određenim kvantiziranim energijskim razinama.

IR spektar je odraz strukture molekule. U IR spektroskopiji postoji povezanost između položaja vibracijskih vrpca u određenom području IR spektra i ogovarajućih strukturnih skupina. Tako IR spektar može uputiti na prisutnost primjerice karbonilnih, hidroksilnih, amino ili nitrilnih skupina, dvostrukih i trostrukih veza, aromatskih jedinica te mnogih drugih strukturnih elemenata. Mogućnost izravnog dokazivanja strukturnih skupina, koje je drugim metodama višestruko teže ili nemoguće prepoznati, čini bitno obilježje IR spektroskopije i utemeljuje njezino značenje kao jedne od vrlo važnih metoda instrumentne analitike.

Glukoza je najrasprostranjeniji monosaharid u prirodi. Sastojak je voća, meda, saharoze te različitih polisaharida (celuloza, škrob, glikogen). Glukoza je heksoza (šećer sa šest C-atoma) i aldoza jer sadrži aldehidnu skupinu, tj. glukoza je aldoheksoza. Rasprostranjena je u prirodi u D-obliku (gdje D označava konfiguraciju na C-atomu u položaju 5), no postoje i dvije cikličke forme D-glukoze, α - i β -anomerne forme, koje dominiraju u vodenim otopinama. S obzirom da je voda glavna komponenta krvi, glukoza je u krvi svih sisavaca većinom u cikličkom obliku. Ona je najznačajniji izvor energije, potreban kako za mišićni rad, tako i za sve procese u organizmu.

Metoda infracrvene spektroskopije je korisna za proučavanje i karakterizaciju svih ugljikohidrata. U ovom će radu biti detaljno analiziran IR spektar molekule α -D-glukoze te opisana primjena IR spektroskopije pri određivanju glukoze u krvi.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Infracrvena spektroskopija

2.1.1. Uvod u infracrvenu spektroskopiju

Infracrvena (IR) spektroskopija je jedna od važnih analitičkih metoda dostupnih suvremenom znanstveniku. Značenje IR spektroskopije temelji se na visokoj informacijskoj vrijednosti spektra i na raznovrsnim mogućnostima mjerenja uzoraka. Ona je u ravnopravnom položaju sa spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR), masenom spektrometrijom (MS) i ultraljubičastom (UV) spektroskopijom te je sposobna ovisno o vrsti problema, samostalno ili u prikladnoj kombinaciji s bilo kojom od njih, dovesti do željenog podatka ili barem tomu pridonijeti.

Na početku 20. stoljeća infracrveno zračenje je bilo fizički fenomen čije je detaljno proučavanje bila domena fizičara. Bilo je potrebno razviti dovoljno osjetljive detektore, pronaći odgovarajuće materijale za prizme i konačno uvesti difrakcijske rešetke. Infracrveno spektralno područje zadobilo je puno značenje za spektralnu analizu nakon što su mogli biti izrađeni potpuno automatizirani spektralni fotometri a prvo ostvarenje takvog uređaja dogodilo se 1937. godine. Nakon 1940. započeo je, prije svega u SAD-u, silovit tehnički razvoj uređaja i bilo je moguće snimiti dobro razlučeni IR spektar za nekoliko minuta u uobičajenom laboratorijskom prostoru. Najveći razvoj infracrvene spektroskopije dogodio se nakon pojave spektrometra s Fourierovom transformacijom u 60-im godinama prošloga stoljeća. S obzirom da takav uređaj koristi interferometar, Fourierova transformacija je predstavljala problem jer je na tadašnjim računalima bila ekstremno zahtjevna. Otkriće algoritma brze Fourierove transformacije (engl. *fast Fourier transform*, FFT) 1965. godine povoljno je djelovalo na širenje te interferometrijske tehnike, kao i računalna revolucija u osamdesetim godinama.

Stupa li elektromagnetsko zračenje u interakciju s tvari, može doći do prijenosa energije prilikom kojeg energija zračenja biva u molekulskom sustavu apsorbirana i pretvorena npr. u toplinsku energiju. Taj prijenos energije infracrvenog zračenja vezan je uz jedan sasvim određeni uvjet. Na taj je način neka tvar u širokom spektralnom području propusna za

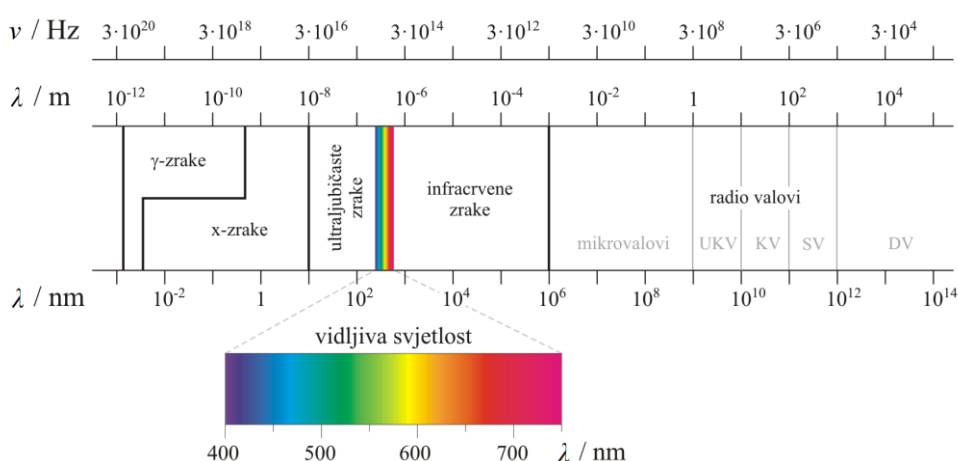
zračenje, dakle ne stupa u interakciju sa zračenjem, dok je u ostalim područjima potpuno ili dijelom nepropusna.

IR spektroskopija temelji se na apsorpciji zračenja. To praktično znači da se količina kroz uzorak propuštenog svjetla uspoređuje s propusnosti pozadine u spektrometru. Rezultat se obično prikazuje kao transmitancija, T , uz $T = I / I_0$, pri čemu je I intenzitet propuštenog zračenja, a I_0 intenzitet zračenja iz izvora. Umjesto transmitancije, T , na ordinati IR spektra navodi se i apsorbanacija, A , osobito u kvantitativnim analizama. Apsorbancija i transmitancija povezani su sljedećim izrazom:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

2.1.2. Elektromagnetsko zračenje i interakcija elektromagnetskog zračenja i molekule

Električni naboj u gibanju inducira magnetsko polje, a promjene magnetskog toka, s druge strane, uzrokuju nastajanje električnog polja.¹ Vibrirajući električni naboji uzrokuju stoga periodične promjene elektromagnetskog polja, koje se kao elektromagnetski valovi šire radijalno u prostoru brzinom svjetlosti. Ovisno o njihovom pojavnom obliku ili njihovom djelovanju na tvar i ljudska osjetila, postoje različite vrste zračenja (npr. svjetlost, toplina, rendgenske zrake), koja se razlikuju jedna od druge samo s obzirom na valne duljine, odnosno frekvencije, a fizički su posve jednaka. Područje valnih duljina elektromagnetskog spektra obuhvaća široku skalu i proteže se od γ -zraka do radiovalova (slika 2.1).



Slika 2.1. Elektromagnetski spektar.²

Infracrveno zračenje je elektromagnetsko zračenje valnih duljina od 0,78 do 1000 μm . Naziv mu potječe od energije koja je manja od energije vidljivog dijela spektra na koji se i nastavlja. Općenito je prihvaćeno izražavanje energije zračenja pomoću valnih brojeva, $\tilde{\nu}$. Valni broj je recipročna vrijednost valne duljine, jedinice cm^{-1} :

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda [\text{cm}]} = \frac{1 \cdot 10^4}{\lambda [\mu\text{m}]} \quad (2.2)$$

Najvažniji argument za primjenu valnog broja kao mjerne veličine u IR spektroskopiji jest njegova proporcionalnost frekvenciji, ν , i energiji, E , elektromagnetskog polja. Odnos valnog broja i frekvencije dan je sljedećim izrazom:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} \text{ cm}^{-1} \quad (2.3)$$

gdje je c brzina elektromagnetskog zračenja u vakuumu (brzina svjetlosti) i iznosi $2,997\,925 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$. Energija elektromagnetskog zračenja, jedinice J, u odnosu je s frekvencijom zračenja prema sljedećem izrazu:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2.4)$$

Veličina $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$ je Planckova konstanta. Frekvencija zračenja i energija su prema tome međusobno izravno proporcionalne.

Infracrveno zračenje dijeli se na tri područja: blisko (engl. *near infrared*, NIR), srednje (engl. *mid infrared*, MIR) i daleko (engl. *far infrared*, FIR) (tablica 2.1).

Tablica 2.1. Područja infracrvenog zračenja.¹

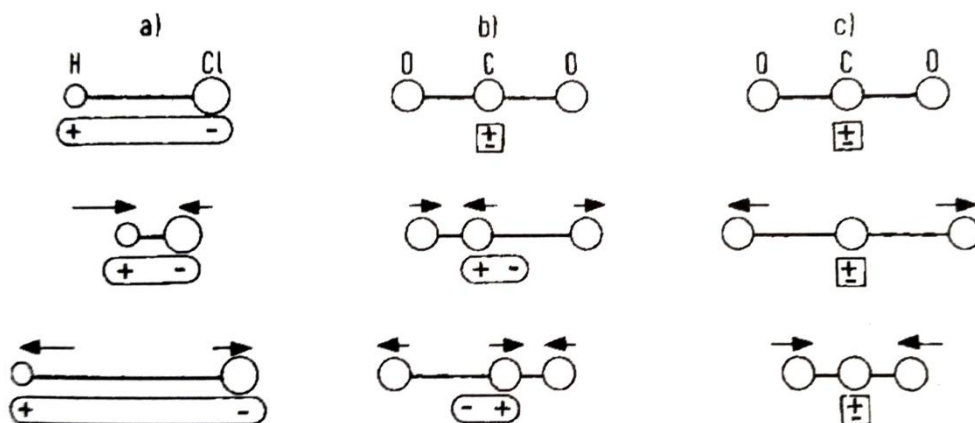
	$\lambda / \mu\text{m}$	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$
blisko	0,78–2,50	12 800–4000
srednje	2,50–25	4000–400
daleko	25–1000	400–10

U području bliskog infracrvenog zračenja događaju se elektronski prijelazi nižih energija kao i odgovarajući vibracijski, odnosno rotacijski prijelazi. U tom području spektra javljaju se viši tonovi i kombinirane vrpce, koje uključuju vibracije skupina CH, OH i NH. Klasična primjena infracrvene spektroskopije koristi većinom srednje infracrveno područje. To je područje u kojem se nalaze osnovne (IR aktivne) vibracije, kao i viši tonovi i kombinacije osnovnih vibracija nižih frekvencija. U dalekom infracrvenom području nalaze se osnovne i

kombinirane vibracije skupina koje sadrže teške atome. Nadalje, u području nižih valnih brojeva javljaju se i molekulske skeletne vibracije, molekulske torzije, vibracije kristalne rešetke te rotacijski spektri malih molekula. U području dalekog infracrvenog zračenja često se opažaju samo rotacijski prijelazi u molekuli, za razliku od bliskog i srednjeg, gdje se prijelazi između rotacijskih stanja superponiraju s prijelazima između vibracijskih stanja.

Za načelno razumijevanje interakcije između zračenja i tvari nevažno je gleda li se na model atoma sa stajališta kvantne mehanike (Bohr) ili valne mehanike (Schrödinger). Lako je uvidjeti, ako se krene od Bohrovog atomskog modela, da elektromagnetsko zračenje s elektronom kao električnim nabojem u gibanju stupa u interakciju pri čemu se energija može predati bilo kojem od njih. Sada se, pak, na isti način neka vibrirajuća ili rotirajuća atomska skupina može povezati s gibanjem električnog naboja, i to onda kada naboji atoma u molekuli nisu simetrično raspodijeljeni ili kada raspodjela naboja zbog vibracijskog gibanja postaje nesimetrična. U slučajevima dipolnog momenta takvih atomskih skupina, govori se o dipolnim momentima veza.

Prema tome, elektromagnetsko zračenje odgovarajuće frekvencije molekula može apsorbirati samo kada je s pobuđenom vibracijom odgovarajuće atomske skupine povezana promjena dipolnog momenta. Vibracije dvoatomnih molekula s jednakim atomima ne mogu se pobuditi IR zračenjem, jer takve molekule ne posjeduju dipolni moment. Molekule koje se sastoje od različitih atoma su, nasuprot tomu, u stanju s infracrvenim zračenjem stupati u interakciju (slika 2.2.a). Kada dipolni moment ne postoji u stanju mirovanja, tada će biti pobuđene barem one vibracije kod kojih zbog asimetrične promjene položaja težišta naboja nastaje dipolni moment (slika 2.2.b). Vibracije s kojima nije povezana promjena dipolnog momenta, opisuju se kao IR neaktivne (slika 2.2.c).



Slika 2.2. Promjena dipolnog momenta pri molekularnim vibracijama.¹

- a) Klorovodik: dipolni moment se mijenja pri vibriranju.
- b) Ugljikov dioksid, asimetrična vibracija: nasuprot ravnotežnom položaju bez dipolnog momenta, težište negativnog naboja atoma kisika i težište pozitivnog naboja atoma ugljika udaljavaju se jedan od drugoga prilikom vibriranja.
- c) Ugljikov dioksid, simetrična vibracija: težište negativnog naboja atoma kisika i pozitivnog naboja atoma ugljika prostorno se poklapaju u svakoj fazi, nema promjene dipolnog momenta.

Pobuđivanje molekularnih rotacija, odnosno prijelaza u stanje veće rotacijske energije, može, shodno tome, uslijediti samo onda kada molekula ima dipolni moment ili kada se pri vibraciji dipolni moment inducira.

2.1.3. Molekularne vibracije

Dvoatomne molekule mogu izvoditi samo jedno vibracijsko gibanje.¹ Kod višeatomnih molekula svaki se pojedini atom može gibati u tri prostorna smjera, pa je za njihovo opisivanje, kada je N broj atoma, potrebno $3N$ prostornih koordinata. Sustav od N točkastih masa raspolaže s $3N$ stupnjeva slobode gibanja. U trima od tih gibanja ne pomiču se atomi jedan prema drugome, nego se svi gibaju u istom smjeru uz istovremenu promjenu položaja centra mase. To su translacijska gibanja molekule. Daljnja tri složena gibanja uzrokuju rotaciju oko centra mase, tako da broj vibracijskih stupnjeva slobode iznosi:

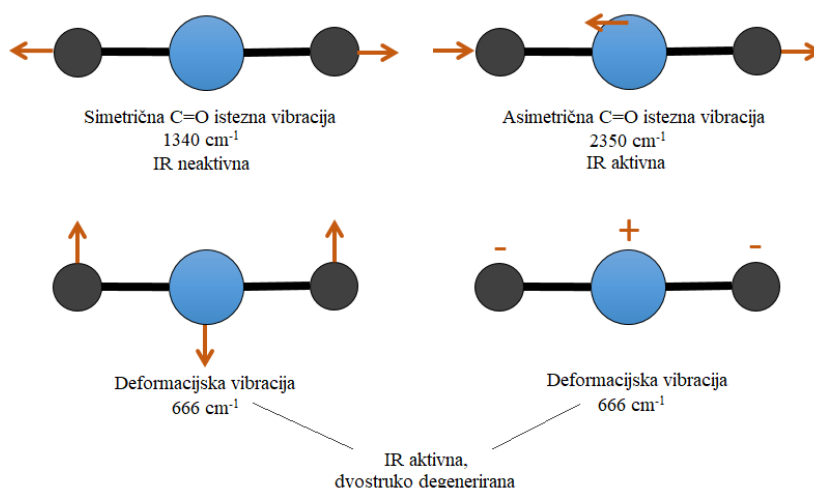
$$Z = 3N - 6 \quad (2.5)$$

Linearne molekule, međutim, imaju samo dva rotacijska stupnja slobode, jer rotacija oko molekularne osi nije vezana ni za kakvo gibanje atoma ili centra mase. Ta vrsta molekula raspolaže stoga jednim vibracijskim stupnjem slobode više:

$$Z = 3N - 5 \quad (2.6)$$

Vibracije neke molekule izračunate na taj način, a koje se mogu pobuditi neovisno jedna od druge, nazivaju se osnovnim ili normalnim vibracijama, odnosno osnovnim ili normalnim modovima.

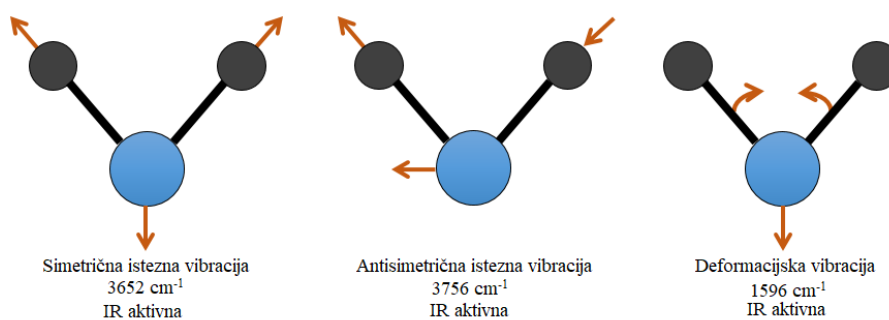
Prema tome, linearna troatomna molekula je u stanju izvoditi četiri vibracije (slika 2.3). Pri načinu vibriranja ν_1 dva vanjska atoma molekule se gibaju simetrično prema ili od centralnog atoma uzduž međunuklearne osi. Ako je masa tih dvaju atoma jednaka, tada se centar mase poklapa sa centralnim atomom. Kako s ovom simetričnom isteznom vibracijom nije povezana nikakva promjena dipolnog momenta, ne može ju pobuditi IR zračenje. Vibracija je IR neaktivna. Pri načinu vibriranja ν_2 oba vanjska atoma se gibaju u istom smjeru, a time asimetrično prema centralnom atomu. Ta antisimetrična istezna vibracija je IR aktivna. Pri vibraciji ν_3 atomi se gibaju okomito na smjer veza, i to vanjski atomi u istom smjeru, a centralni atom u suprotnome. Ova vibracija dovodi do promjene ravnotežne vrijednosti valentnog kuta od 180° , zbog čega se ta vrsta vibracije naziva deformacijska vibracija. Također se i pri toj vibraciji inducira dipolni moment, pa je vibracija zato IR aktivna. Vibracija ν_4 odgovara po svom načinu u potpunosti vibraciji ν_3 , jedino što se gibanje odvija izvan ravnine za razliku od vibracije ν_3 koja se odvija u ravnini. Vibracijske frekvencije u oba slučaja imaju jednaku vrijednost. Takve vibracije iste frekvencije nazivaju se degeneriranima, a opisuje ih stupanj degeneracije, koji odgovara broju normalnih modova iste frekvencije. U ovom slučaju radi se o dvostruko degeneriranoj vibraciji. Kao tipičan primjer za jednu takvu simetričnu linearnu troatomnu molekulu navodi se ugljikov dioksid.



Slika 2.3. Načini vibriranja linearne troatomne molekule.³

S druge strane, nesimetrična linearna troatomna molekula, kao što je karbonil sulfid, ima permanentni dipolni moment, pa su obje istežne vibracije IR aktivne.

Nelinearna troatomna molekula je voda. U ovom slučaju očekujemo $3N - 6 = 3$ normalne vibracije (slika 2.4). Kod ν_1 radi se o simetričnoj istežnoj vibraciji. Zbog zakrivljene strukture ta vibracija je povezana s promjenom težišta naboja, tako da pri tome dolazi do promjene već postojećeg dipolnog momenta. Zbog toga je ta vibracija IR aktivna. Ovdje se, kao i kod asimetrične istežne vibracije ν_2 , ne gibaju samo atomi vodika, nego u odgovarajućem manjem stupnju također i kisik, da bi centar mase ostao mirovati. Kod ovakve molekule samo je jedno deformacijsko vibriranje zamislivo, budući da bi odgovarajuće gibanje atoma okomito na molekulsku ravninu imalo isto značenje kao i molekulska rotacija.



Slika 2.4. Načini vibriranja nelinearne troatomne molekule.³

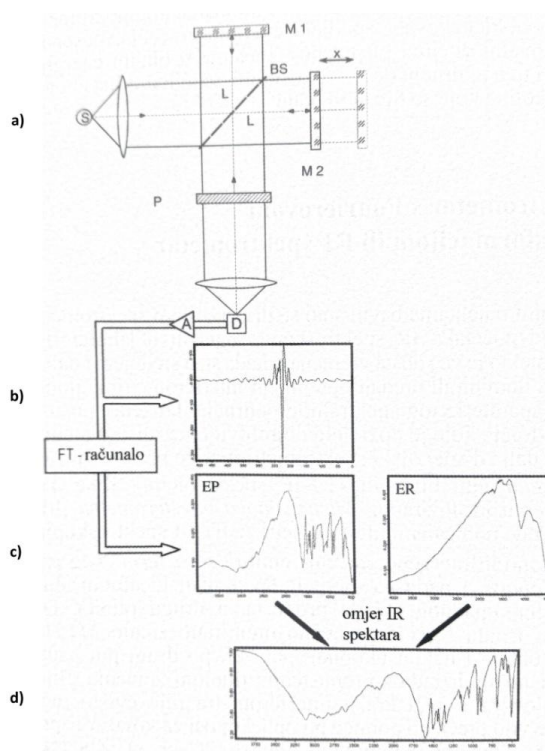
Također su moguća i sprezanja vibracija koja nastaju kada su skupine atoma koje vibriraju vrlo blizu, odnosno kada vibriraju približno istim frekvencijama. Sprezanje se najčešće javlja kod vibracija istežanja za veze koje imaju zajednički atom, a kod vibracija deformacije kada vibrirajuće skupine dijele zajedničku kemijsku vezu. Sprezanja su moguća i kada je veza koja se rasteže i steže ujedno i veza skupine atoma uključena u deformaciju.⁴

2.1.4. Infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (FT-IR spektrometar)

Infracrveni spektrometri s Fourierovom transformacijom su razvijeni kako bi se prevladala ograničenja koja imaju disperzivni instrumenti. Stoga je konstruiran jednostavan optički uređaj, interferometar (slika 2.5). Većina interferometara sadrži djelitelj zrake (polupropusni element) na koje pada širokopolasno infracrveno zračenje, pri čemu jednu polovinu tog zračenja djelitelj zrake propušta, a drugu odbija. Odbijeni dio se reflektira od ravnog zrcala koje je fiksirano u mjestu, a propušteni dio se reflektira od ravnog zrcala koje je na

mehanizmu koji dozvoljava tom zrcalu da se pomiče po kratkoj udaljenosti (par milimetara) od djelitelja zraka. Zbog toga što je put zrake reflektirane od nepomičnog zrcala konstantne duljine, a druge se konstantno mijenja kako se zrcalo pomiče, signal koji izlazi iz interferometra je rezultat djelovanja između te dvije zrake. Dakle, može se dogoditi konstruktivna interferencija između oba snopa zračenja i tada sveukupno zračenje pada na detektor ili destruktivna interferencija kada nikakva svjetlost ne pada na detektor. Rezultirajući signal se zove interferogram i nosi informacije o svakoj frekvenciji IR zračenja iz izvora. To znači da se sve frekvencije istovremeno mjere, što dovodi do vrlo kratkih vremena mjerenja.

Interferogram se uporabom dobro poznate matematičke tehnike zvane Fourierova transformacija prevodi u spektar. Ova transformacija se izvodi pomoću računala te osigurava spektar podataka potrebnih za analizu.



Slika 2.5.

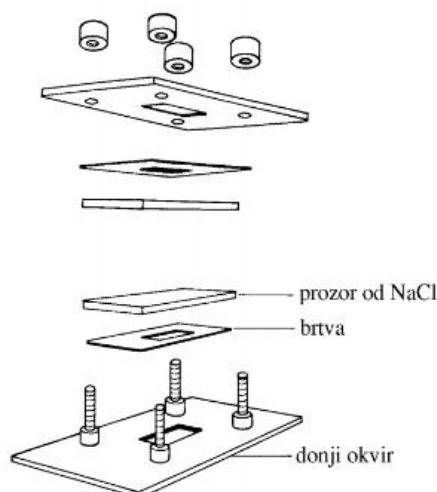
- a) Shema Michelsonova interferometra: S - izvor zračenja, BS - djelitelj zrake, M1 - nepomično zrcalo, M2 - pomično zrcalo, x - pomak zrcala, P - uzorak, D - detektor, A - pojačalo.
- b) Detektorom registrirani signal: interferogram.
- c) Fourierovom transformacijom (FT) iz interferograma dobiveni spektri: EP - spektar uzorka, ER - spektar pozadine.
- d) IR spektar: razlika spektara uzorka i pozadine.¹

2.1.5. Priprava uzoraka za mjerenje

IR spektre moguće je snimiti krutim, tekućim i plinovitim uzorcima, tako da priprava uzorka za snimanje infracrvenog spektra ovisi o agregatnom stanju uzorka.⁴

Kruti uzorak se za snimanje IR spektra pripravlja u obliku KBr pastile ili kao suspenzija u parafinskom ulju. KBr pastila priprema se miješanjem uzorka sa suhim kalijevim halogenidom, najčešće kalijevim bromidom (1 mg uzorka : 100 mg KBr). Smjesu je potrebno dobro usitniti, kako ne bi došlo do prevelikog rasipanja zračenja na kristalima uzorka i kalijeva bromida, koja se zatim preša u tanku pastilu debljine oko 1 mm i promjera 1 cm. KBr pastila se stavlja u odgovarajući nosač te se snima IR spektar. KBr ne apsorbira zračenje u srednjem IR području, pa se ova tehnika pripreme krutih uzoraka najčešće koristi. Drugim postupkom pomiješa se 2–5 mg uzorka s jednom kapi parafinskog ulja i dobivena suspenzija nanese između pločica natrijevog klorida. U snimljenom spektru javljaju se tri karakteristične vrpce pri 1370, 1460 i 2910 cm^{-1} , koje potječu od isteznih i deformacijskih vibracija parafinskog ulja. Ako se vibracijske vrpce analiziranog uzorka očekuju u području u kojem apsorbira parafinsko ulje, može ga se zamijeniti kloriranim ili fluoriranim uljima (npr. heksaklorbutadien).

Tekući uzorci snimaju se tako da se kap ili dvije uzorka nanese na pločicu natrijevog klorida i prekrije drugom takvom pločicom. Laganim pritiskom i rotacijom pločica stvori se tanki i jednolični sloj uzorka. Pločica se pomoću odgovarajućeg nosača stavi u spektrometar i snimi se spektar (slika 2.6). Za pripravu otopina obično se kao otapala koriste kloroform, tetraklormetan i ugljični disulfid. Otopinom se pune za tu svrhu posebno konstruirane kivete, koje između pločica od materijala propusnih za IR zračenje (KBr, NaCl, CaF_2), sadrže prsten za razmak čija debljina određuje debljinu sloja otopine, odnosno duljinu puta zračenja kroz uzorak. Zbog toga što i otapalo može apsorbirati IR zračenje, potrebno je izabrati ono koje ne apsorbira u području u kojem se očekuju vibracijske vrpce analiziranog uzorka.



Slika 2.6. Metalni nosač i pločice natrijeva klorida za snimanje tekućih uzoraka.⁵

Za snimanje plinovitih uzoraka koriste se kivete koje se pune plinom ili smjesom plinova. Kiveta se prvo evakuira, a zatim se napuni plinom do određenog tlaka čime se postiže optimalna koncentracija za snimanje kvalitetnog spektra.

2.1.6. Interpretacija IR spektra

Analiza IR spektra prilično je složen postupak i asignacija svih prisutnih vibracijskih vrpca često nije moguća. Postupak asignacije vrpca olakšavaju brojne tablice u kojima se nalaze podaci o vibracijama različitih molekula, odnosno vrsta spojeva. Područja vibracija pojedinih funkcionalnih skupina prikazana su na slici 2.7.

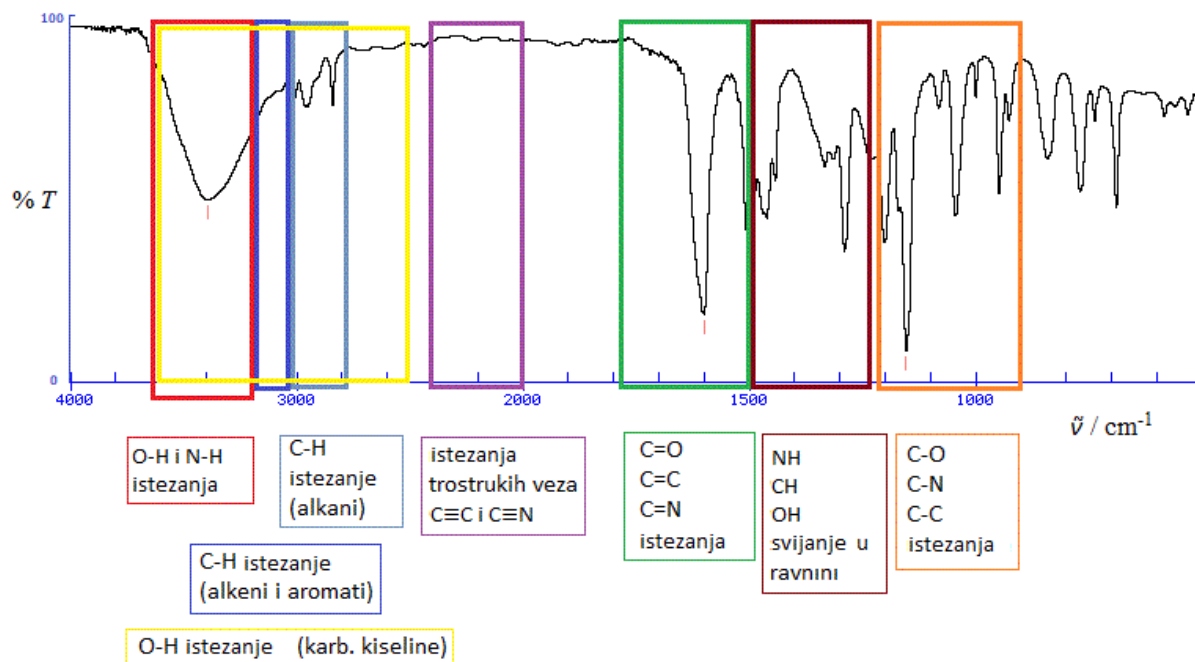
Svaki IR spektar općenito se dijeli na:

- a) područje funkcionalnih skupina
- b) područje otiska prsta (engl. *fingerprint region*).

Područje funkcionalnih skupina je dio spektra između 4000 i 1400 cm^{-1} u kojem se javljaju vrpce isteznih vibracija većine funkcionalnih skupina u nekoj molekuli, neovisno o njenoj strukturi. Vibracijska vrpca u ovom području spektra ukazuje na prisutnost određene funkcionalne skupine u analiziranoj molekuli.

Dio spektra ispod 1400 cm^{-1} naziva se područje otiska prsta i obuhvaća veliki broj vibracijskih vrpca koje se uglavnom teško pripisuju pojedinim funkcionalnim skupinama i većinom su posljedica sprežanja. Osim nekoliko karakterističnih vrpca istezanja, ovdje se

uglavnom javljaju vrpce deformacijskih vibracija. Područje je korisno za identifikaciju uzorka, jer se istim spojevima područje otiska prsta u potpunosti podudara.

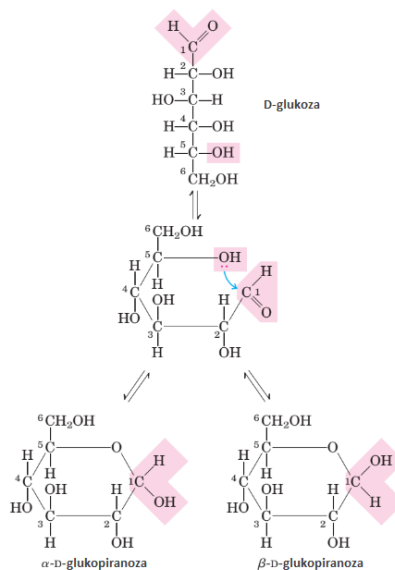


Slika 2.7. Područja karakterističnih vibracijskih vrpce u IR spektru.

2.2. Glukoza

Glukoza (groždani šećer, krvni šećer) ugljikohidrat je iz skupine monosaharida ili jednostavnih šećera kemijske formule $C_6H_{12}O_6$. Stari naziv dekstroza potječe od toga što glukoza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u desno. Sadrži šest ugljikovih atoma i aldehidnu skupinu u svojoj molekuli, te se stoga naziva i aldoheksoza. Glukoza je najrasprostranjeniji šećer u prirodi. Ona je sastavni dio mnogih disaharida (saharoze, maltoze, laktoze), polisaharida (škroba, glikogena, celuloze) i raznih drugih spojeva, a slobodna se nalazi u raznom voću, povrću i medu. Glikogen je razgranati polimer glukoze i glavni je oblik pohrane glukoze kod ljudi (mišići i jetra). Enzim glikogen-fosforilaza katalizira fosforolitičko cijepanje glikogena pri čemu nastaje fosforilirana glukoza koja se procesom glikolize oksidira do piruvata uz oslobađanje energije. Biljke sintetiziraju glukozu procesom fotosinteze i pohranjuju u polimernom obliku kao škrob. U probavnom sustavu škrob se hidrolizira u glukozu koja se zatim iskorištava u stanicama za dobivanje energije. Ukupno se iz jedne molekule glukoze mogu dobiti 30–32 molekule adenozin trifosfata (ATP).

Postoji i ciklička struktura glukoze koja nastaje zbog nukleofilnog napada hidroksilne skupine vezane na petom ugljikovom atomu na karbonilnu skupinu pri čemu nastaje poluacetal, odnosno šesteročlani heterociklički prsten. Time se javlja još jedan asimetrični centar na atomu C-1, tako da D-glukoza može postojati u dva anomerna oblika, kao α -D-glukopiranoza i β -D-glukopiranoza (slika 2.8). Ta su dva ciklička oblika u ravnoteži, tj. oni mogu preći jedan u drugog preko aldehidnog oblika i taj se proces zove mutarotacija.



Slika 2.8. Fischerova projekcijska formula D-glukoze i stvaranje dviju cikličkih formi D-glukoze.⁶

Glukoza se u prirodi nalazi kao ravnotežna smjesa lančanog oblika i prstenastih oblika, a u krvi i drugim tjelesnim tekućinama se nalazi većinom u obliku dva stereoizomerna ciklička poluacetala.

Upotreba vibracijske spektroskopije u biomedicinske svrhe je strahovito porasla posljednjih godina. Posebno važan zadatak kliničke kemije je određivanje količine glukoze u tjelesnim tekućinama. Tako je do sad proveden velik broj istraživanja i napisan velik broj znanstvenih radova na temu korištenja infracrvene spektroskopije u srednjem i bliskom IR području za mjerenje količine glukoze u krvi, intersticijskim tekućinama, tkivima ili očnoj vodici.

2.3. Infracrveni spektar glukoze

Upotrebom računalnih metoda i eksperimentalnim mjerenjima istražena je struktura i analiziran vibracijski spektar glukoze u obliku α -anomera i β -anomera monohidrata. Uzorak α -D-glukoze pripremljen je tehnikom KBr pastile te IR spektar snimljen pomoću FT-IR spektrometra. IR spektri α -D-glukoze i β -D-glukoze monohidrata izračunati su pomoću metode teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT). Uočeno je dobro slaganje eksperimentalnih s teorijski izračunatim vrijednostima (tablica 2.2).

Tablica 2.2. Asignacija vibracijskih vrpca α -D-glukoze i β -D-glukoze monohidrata.⁷

Vibracija	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ (α -D-glukoza) ^e	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ (α -D-glukoza) ⁱ	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$ (β -D-glukoza monohidrat) ⁱ
$\nu(\text{OH})$	3410, 3393	3418, 3408	3146, 3123
$\nu_s(\text{CH})$	2944	2963	3099
$\nu_{as}(\text{CH})$	2913	2939	3085
$\delta(\text{CH}_2) + \delta(\text{OCH}) + \delta(\text{CCH})$	1460	1441	1465
$\delta(\text{OCH}) + \delta(\text{COH}) + \delta(\text{CCH})$	1382	1352	1390
$\delta(\text{CCH}) + \delta(\text{OCH})$	1340	1333	1320
$\delta_{ip}(\text{CH}) + \delta_{ip}(\text{OH})$	1224, 1203	1218, 1220	1278, 1232
$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CC})$	1149, 1050, 995	1137, 1058, 944	1205, 1088, 1032
$\nu(\text{CO})$	1111, 1025	1116, 1026	1162, 1066
$\delta(\text{CH})$	837	834	909
$\delta(\text{CCO}) + \delta(\text{CCH})$	776	762	815

^e eksperimentalne vrijednosti

ⁱ izračunate vrijednosti

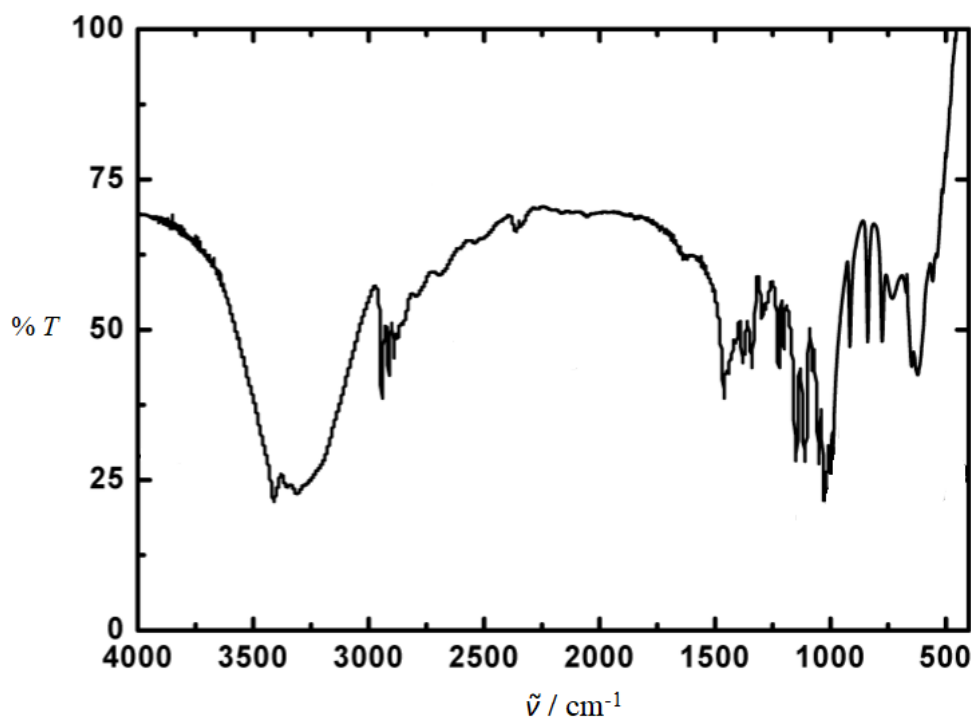
ν_s - simetrično istezanje

ν_{as} - asimetrično istezanje

δ_{ip} - deformacijska vibracija u ravnini

Eksperimentalni FT-IR spektar α -D-glukoze prikazan je na slici 2.9. Široka vrpca istezanja skupina OH nalazi se u području $3500\text{--}3005 \text{ cm}^{-1}$, a vrpce isteznih vibracija skupina CH u području $3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$. Vrpce u području $1526\text{--}1347 \text{ cm}^{-1}$ doprinose deformacijske vibracije troatomnih skupina OCH i COH, dok vrpce u području $1362\text{--}1191 \text{ cm}^{-1}$ odgovaraju deformacijama u ravnini skupina CH i OH. Vrpce istezanja veza C–O i C–C javljaju se u području od 1191 do 995 cm^{-1} . Prema tome, vibracijski spektar se može podijeliti na dva

glavna područja: područje od 750 do 1500 cm^{-1} u kojem su prisutne vibracije veza C–O i C–C i gdje ugljikohidrati općenito imaju karakteristične vrpce, te područje od 2800 do 3500 cm^{-1} u kojem se nalaze vrpce vibracija skupina CH i OH. Vrijedi napomenuti da s obzirom da su analizirane cikličke strukture glukoze, među navedenim podacima izostaje karakteristična vrpca istezanja karbonilne skupine C=O, za koju je izračunato da se javlja u području 1849–1634 cm^{-1} .



Slika 2.9. FT-IR spektar α -D-glukoze.⁷

Strukture oba anomera, α i β , mogu se proučavati u obliku monohidrata. Međutim, na korištenoj razini teorije (BLYP) α -anomer monohidrat je nestabilan i nije određena optimalna struktura. S druge strane, određena je optimalna struktura za β -anomer monohidrat te su zato u tablici 2.2 navedeni izračunati podaci i za tu strukturu. Mogu se uočiti veća odstupanja valnih brojeva vrpce β -anomera s obzirom na eksperimentalne i izračunate valne brojeve vrpce α -anomera u području vibracija skupina CH i OH, a relativno dobra slaganja u karakterističnom području ugljikohidrata.

2.4. Primjena IR spektroskopije za određivanje glukoze u krvi

Šećerna bolest ili dijabetes je poremećaj metabolizma koji može utjecati na sve vitalne organe i dovesti do ozbiljnih komplikacija. Pojava komplikacija može se spriječiti redovitim mjerenjem i održavanjem razine glukoze u normalnim granicama.

Danas se za mjerenje glukoze u krvi najčešće koristi elektronička naprava, glukometar. Trakica za mjerenje šećera (tzv. "listić") sastoji se od dvije Clarkove elektrode, kojima se mjeri koncentracija kisika u tekućini na temelju redukcije kisika.⁸ Jedna elektroda je prevučena enzimskim slojem (sadrži glukoza oksidazu), dok druga nije. Enzim razgrađuje glukozu i u toj reakciji troši kisik, pa ovisno o razini glukoze u mediju, elektroda prevučena enzimskim slojem mijenja potencijal. Razlika potencijala proporcionalna je koncentraciji glukoze u krvi (GUK), koja se na glukometru može očitati u mmol/L (u Republici Hrvatskoj) ili mg/dL (dio zemalja EU). Ova metoda je invazivna jer je na trakicu potrebno nanijeti kap krvi za analizu. U posljednje se vrijeme ubrzano razvijaju neinvazivne metode mjerenja količine glukoze u krvi. Takva metoda ne smije oštećivati tkivo i mora moći detektirati promjene jednakom brzinom i preciznošću kao i invazivna metoda.

Nekoliko je neinvazivnih metoda već korišteno za mjerenje glukoze u krvi, a neke od njih su i spektroskopija u srednjem i bliskom infracrvenom području.⁹

Velika prednost spektroskopije u srednjem infracrvenom području je što su vrpce glukoze u ovom području vrlo oštre, dok su u bliskom infracrvenom području široke i slabog intenziteta. No prodiranje srednjeg IR zračenja u tkivo vrlo je slabo, zbog velikog udjela vode u tkivu koja jako aporbira IR zračenje. Melanin, lipidi i proteini također doprinose izmjerenom spektru. Radi toga se mjeri zračenje reflektirano s kože. Prsti i oralna sluznica su jedina mjesta prikladna za ovakvo mjerenje.

Kako bi se izbjegao problem nedovoljnog prodiranja zračenja u kožu pri valnim duljinama srednjeg infracrvenog područja, koristi se spektroskopija bliskog infracrvenog zračenja, koje melanin, lipidi i voda apsorbiraju u značajno manjoj mjeri. Ljudska koža ima tri sloja: epidermis, dermis i hipodermis. Epidermis je vanjski sloj koji ne sadrži korisne informacije, a hipodermis je najdublji sloj kojeg čini masno tkivo. Središnji sloj (dermis) je najznačajniji za mjerenje glukoze jer sadrži krvne žile. S obzirom da se otprilike 80% ukupnog zračenja u interakciji s tkivom raspršuje, a samo 20% zračenja apsorbira, najčešće korištena metoda mjerenja glukoze je spektroskopija difuzno reflektiranog zračenja. Ovom tehnikom zračenje prodire u dubinu 1,3 do 2 mm do dermisa, ali ne i do hipodermisa. Mjesta na kojima su

izvršena mjerenja difuzne refleksije NIR zračenja su prsti, koža između prstiju i oko noktiju, podlaktica, obraz, usna i jezik. I ova metoda ima nedostatke jer pojedini parametri (tlak, temperatura, trigliceridi, albumin) interferiraju pri mjerenju glukoze. Isto tako, vanjski čimbenici (temperatura, vlažnost, hidratacija kože, ugljikov dioksid, atmosferski tlak) doprinose pogreškama u mjerenju. Daljnje komplikacije se javljaju i zbog heterogene raspodjele glukoze u intravaskularnom, intersticijskom i unutarstaničnom prostoru koji su povezani aktivnim i pasivnim transportnim procesima. Zato se mjerenja glukoze iz kapilarne krvi još uvijek smatraju “zlatnim standardom” za inzulinsku terapiju.

Nažalost, usprkos mnogim istraživanjima koja traju već 20 godina, pouzdan i točan NIR uređaj za neinvazivno kontroliranje glukoze u krvi još nije konstruiran. Signal generiran niskom razinom glukoze je teško detektirati zbog složenih signala pozadine. Ti signali pozadine, koji nastaju uslijed apsorpcije vode, hemoglobina i lipida, prekrivaju ionako slab spektar glukoze. IR apsorpcijske vrpce različitih bioloških komponenata dane su u tablici 2.3.

Tablica 2.3. Vibracijske vrpce različitih bioloških komponenata u NIR području.⁹

Biološke komponente	Najznačajnije apsorpcijske vrpce
Glukoza	1408 nm, 1536 nm, 1688 nm, 2261 nm, 2326 nm
Voda	1450 nm, 1787 nm, 1934 nm
Lipidi	2299 nm, 2342 nm
Protein	2174 nm, 2288 nm

Kako bi se odredila koncentracija glukoze na temelju snimljenih NIR spektara nužni su matematički modeli kojima se analizira šire područje u spektru ili čitav spektar. Pri tome se primjenjuju multivarijatne metode analize spektara, kao što su parcijalni postupak najmanjih kvadrata (engl. *partial least square*, PLS), regresija po glavnim komponentama (engl. *principal component regression*, PCR), višestruka linearna regresija (engl. *multiple linear regression*, MLR) ili umjetne neuronske mreže (engl. *artificial neural network*, ANN). Pri razvoju kalibracijskog modela koriste se podatci o koncentraciji dobiveni invazivnim metodama, a kvaliteta razvijenog modela procjenjuje se statističkim parametrima: koeficijentom korelacije (R^2), standardnom pogreškom predviđanja (engl. *standard error of prediction*, SEP), korijenom srednje kvadratne pogreške predviđanja (engl. *root mean square error of prediction*, RMSEP).

Osim za mjerenje glukoze u krvi, neinvazivne metode su korištene i za mjerenje glukoze u drugim biološkim tekućinama poput sline, urina, znoja i suza. Međutim, na taj način nije moguće kontinuirano pratiti koncentraciju glukoze.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. H. Günzler, H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 21, 241, 26, 31, 54.
2. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja> (datum pristupa 19. svibnja 2018.)
3. <http://brussels-scientific.com/?p=5975> (datum pristupa 30. svibnja 2018.)
4. Z. Popović, *Infracrvena spektroskopija* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 1999.
5. V. P. Peroković, D. Kidemet, R. Odžak, D. Parat, I. Primožić, V. Šimunić, *Praktikum iz organske kemije* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2004.
6. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4. izdanje, Freeman, 2004, str. 242.
7. M. Ibrahim, M. Alaam, H. El-Haes, A. F. Jalbout, A. de Leon, *Ecl. Quim.* **31** (2006) 15–21.
8. https://www.fer.unizg.hr/download/repository/ST11_BiokemijskiSenzori.pdf (datum pristupa 20. lipnja 2018.)
9. J. Yadav, A. Rani, V. Singh, B. M. Murari, *Biomed. Signal Proces.* **18** (2015) 214–227.