



POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI
INSTYTUT INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I POMIAROWEJ

**Właściwości fizyczne l-alaniny jako elementu biosensora
promieniowania jonizującego**

mgr Grzegorz Cieślik

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Dr. hab. Krystiana Kubicy prof. nadzw.**

WROCŁAW 2011

Streszczenie

W pracy badano l-alaninę w postaci krystalicznej oraz w roztworze wodnym, która stanowiła element czynny biosensora (bioczuJNIKA) promieniowania jonizującego. Uzyskane wyniki pomiarów widm EPR dla postaci krystalicznej oraz widm ^1H NMR dla roztworu wodnego, uprzednio poddanych działaniu promieniowania jonizującego wskazują, iż l-alanina jest dobrym detektorem promieniowania jonizującego, ze względu na powstałe produkty jonizacji. Zastosowana w pracy metoda ^1H NMR do analizy napromienionych wodnych roztworów l-alaniny, wykazała występowanie kwasu pirogronowego jako produktu radiolizy. Ponadto eksperyment ten wnosi informacje o modelowym środowisku komórkowym poddanym działaniu promieniowania jonizującego. Zagadnienie to jest szczególnie ważne z punktu widzenia fizjologii organizmu ludzkiego leczonego radioterapią onkologiczną lub narażonego na promieniowanie jonizujące np. wśród pracowników instalacji jądrowych, personelu medycznego czy astronautów.

Z punktu widzenia zastosowań l-alaniny na potrzeby detekcji i pomiaru dawki promieniowania jonizującego, zasadnym jest scharakteryzowanie właściwości fizycznych, takich jak struktura geometryczna i właściwości spektroskopowe molekuł. W tym celu zastosowano złożone modele molekularne: ONIOM, CPCM i IEF-PCM oraz zaawansowane matematycznie metody obliczeniowe chemii kwantowej: HF, DFT i MP2, w połączeniu z dedykowanymi do tego typu obliczeń bazami funkcji: 6-31++g(d,p), aug-cc-pVTZ-J, pcJ-n, EPR-III, IGLO-III. Uzyskane wyniki obliczeń stanowią uzupełnienie dotychczasowej wiedzy w dziedzinie spektroskopii EPR rodników l-alaniny oraz pozwalają na symulację widm i opis fizycznych przyczyn ich powstawania dla poszczególnych struktur rodników R1, R2, R3 l-alaniny, co nie jest możliwe w przypadku eksperymentu ze względu na polimorfizm rodnikowy w objętości czynnej biosensora alaninowego. Również wyniki obliczeń dla modeli molekularnych l-alaniny i kwasu pirogronowego w roztworze wodnym stanowią uzupełnienie dotychczasowej wiedzy oraz potwierdzają zgodność zastosowanych modeli i metod obliczeniowych, z danymi uzyskanymi doświadczalnie na podstawie widm ^1H NMR. Rozszerzeniem badań są symulacje widm ^1H NMR, które pozwalają na opis fizycznych przyczyn powstawania widma doświadczalnego oraz obliczenia parametrów spektroskopowych niemożliwych do wyznaczenia doświadczalnie.

Składam gorące podziękowania:

- promotorowi prof. dr hab. Krystianowi Kubicy za cenne wskazówki i korekty pracy oraz wszelką okazaną pomoc w toku studiów doktoranckich;
- kierownikowi Studiów Doktoranckich prof. dr hab. Karinie Weron za wszelką życzliwość i pomoc;
- mgr inż. Katarzynie Gałęckiej za pomoc w przeprowadzeniu pomiarów EPR oraz cenne wskazówki;
- pracownikom Katedry Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego Instytutu Fizyki Uniwersytetu Opolskiego: prof. dr. hab. Marianowi Podolakowi, dr. Dariuszowi Manowi, dr. Grzegorzowi Engelowi za wszelką pomoc i wskazówki w pracy badawczej;
- dr. Markowi Duskoczeni za pomoc i cenne rady w dziedzinie spektroskopii NMR oraz modelowania molekularnego;
- doktorantkom: mgr inż. Hannie Misiak, mgr Sylwii Wiśniewskiej – Kubka za pomoc koleżeńską, szczególnie dotyczącą zajęć dydaktycznych;
- kierownikowi Zakładu Fizyki Medycznej – Dolnośląskiego Centrum Onkologii, dr n. med. Marzenie Janiszewskiej wraz z zespołem fizyków medycznych za możliwość przeprowadzenia napromieniowań próbek l-alaniny;
- pracownikom Zespołu Fizyków Medycznych Zakładu Radioterapii Opolskiego Centrum Onkologii: mgr Annie Michalskiej, mgr Sabinie Borbulak, mgr Łukaszowi Mach, mgr Tomaszowi Wiśniewskiemu za pomoc i wskazówki w pisaniu niniejszej rozprawy;
- żonie Kasi oraz całej rodzinie za pomoc, cierpliwość, i prace związane z poprawkami korekcyjnymi niniejszej pracy.

Autor

SPIS TREŚCI:

Rozdział 1.....	5
Wstęp.....	5
Rozdział 2.....	7
Wprowadzenie do metod spektroskopii EPR i NMR.....	7
2.1 Elektronowy rezonans magnetyczny.....	7
2.1.1 Efektywny hamiltonian spinowy EPR.	9
2.1.2 Tensor g.....	11
2.1.3 Tensor struktury nadsubtelnej A.	13
2.2 Jądrowy rezonans magnetyczny.....	14
2.2.1 Efektywny hamiltonian NMR.	16
Rozdział 3.....	20
Metody chemii kwantowej stosowane w modelowaniu układów molekularnych.	20
3.1 Podział metod obliczeniowych chemii kwantowej.	20
3.1.1 Metody półempiryczne (semi – empirical).	20
3.1.2 Metody ab initio (tzw. „z pierwszych zasad”).	21
3.1.2.1 Metoda Hartree – Focka.	21
3.1.2.2 Metoda funkcjonału gęstości DFT.	24
3.1.2.3 Metoda Møllera – Plesseta.	26
3.2 Dobór bazy funkcji.....	27
3.2.1 Funkcje Slatera.	28
3.2.2 Funkcje Gaussa.	28
3.2.3 Baza minimalna.....	29
3.2.4 Bazy z podzielonymi powłokami walencyjnymi.	29
3.2.5 Bazy „double-”, „triple-“, itd. zeta”.	30
Rozdział 4.....	32
Przegląd literaturowy wyników badań dotyczących zastosowania l-alaniny jako elementu biosensora promieniowania jonizującego.	32
4.1 Zastosowanie dozymetrii alaninowej do pomiarów dawek promieniowania jonizującego w medycynie.	37
4.2 Przegląd dotychczasowych badań dotyczących właściwości fizykochemicznych l-alaniny.	38
4.2.1 Struktura geometryczna i właściwości spektroskopowe l-alaniny.....	38
4.2.2 Struktura geometryczna i właściwości spektroskopowe rodników l-alaniny.	51
Rozdział 5.....	72
Cel i tezy pracy.....	72
Rozdział 6.....	74
Badania własne.....	74
6.1 Materiały i metody badań.....	74
6.2 Wyniki i obliczenia.	77
6.2.1 Badania EPR właściwości fizycznych rodników l-alaniny.....	77
6.2.2 Badania ¹ H NMR właściwości fizycznych produktów radiolizy wodnych roztworów l-alaniny.	78
Rozdział 7.....	83
Modelowanie układów molekularnych l-alaniny.....	83
7.1 Wprowadzenie.....	83
7.2 Konstrukcja modeli molekularnych l-alaniny i optymalizacja geometrii.	84
7.3 Geometria optymalna l-alaniny w kryształach oraz w roztworze wodnym.	89
7.4 Modele ciągle l-alaniny w roztworze wodnym.....	93

7.5 Modele ONIOM rodników R1, R2 i R3 l-alaniny.	96
Rozdział 8.....	101
Obliczenia i analiza parametrów widma EPR rodników R1, R2 i R3 l-alaniny.	101
Rozdział 9.....	109
Obliczenia i analiza parametrów widma ¹ H NMR produktów jonizacji roztworu wodnego l-alaniny.....	109
Rozdział 10.....	116
Podsumowanie i wnioski.....	116
Bibliografia.....	119
Spis rysunków.....	132
Spis tabel.....	136
Załącznik 1.....	139
Załącznik 2.....	148

Rozdział 1

Wstęp

Zastosowanie promieniowania jonizującego w medycynie ma swe początki w odkryciach pierwiastków promieniotwórczych polonu i radu przez małżeństwo Marię Skłodowską-Curie i Piotra Curie. W 1896 roku Henri Becquerel odkrył zjawisko promieniotwórczości, natomiast na przełomie XIX i XX wieku Wilhelm Roentgen odkrył promienie X, które następnie zastosowano w diagnostyce obrazowej. Z inicjatywy Marii Skłodowskiej-Curie w 1932 roku otworzono Instytut Radowy w Warszawie, który dziś nosi nazwę Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. Równocześnie z rozwojem medycyny nuklearnej, diagnostyki obrazowej oraz radioterapii następował postęp w metodach i materiałach stosowanych w dozymetrii promieniowania jonizującego, która polega na precyzyjnych pomiarach i obliczeniach dawki ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na organizmy żywe. Do głównych przyrządów do pomiaru dawki promieniowania jonizującego, stosowanych nie tylko w medycynie, zaliczamy: komory jonizacyjne, liczniki scyntylacyjne, radiometry, detektory półprzewodnikowe, detektory żelowe, detektory chemiczne, detektory typu Termoluminescent Dosimeter (TLD) oraz dozymetry alaninowe. Ten ostatni typ dozymetru możemy traktować jako rodzaj biosensora (bioczuJNIKA), ze względu na zastosowany rodzaj substancji aktywnej - l-alaninę zaliczaną do grupy aminokwasów prostych. Alanina posiada tą właściwość, iż w wyniku napromieniania promieniowaniem jonizującym X, gamma, protonami, elektronami itp. powstają z niej wolne rodniki, których koncentracja jest proporcjonalna do dawki pochłoniętej w objętości biosensora alaninowego. Do pomiaru dawek promieniowania jonizującego jest stosowana krystaliczna alanina, w której wytworzone po napromienieniu rodniki są na tyle trwałe i odporne na rekombinacyjne wpływy otoczenia, że można wykryć ich występowanie za pomocą metody spektroskopii Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR). Wszystkie te właściwości dozymetru alaninowego sprawiły, iż znalazł on zastosowanie w przemysłowych instalacjach służących do napromieniania np. żywności, krwi w stacjach krwiodawstwa oraz w radioterapii onkologicznej: audyt dozymetryczny, dozymetria in vivo - w tym dozymetria procedur TBI (ang. Total Body Irradiation), IMRT (ang. Intensity-Modulated Radiation Therapy). Również liczba publikacji dotyczących dozymetrii z zastosowaniem alaniny stanowi pokaźny zbiór literaturowy. Nieco mniej miejsca poświęcono w literaturze właściwościom fizycznym i chemicznym rodników alaniny powstałych na skutek jonizacji krystalicznej alaniny. Także niewiele uwagi poświęcono

dotychczas produktem radiolizy wodnego roztworu alaniny, który może stanowić model aminokwasu w środowisku komórkowym poddanym działaniu promieniowania jonizującego. Co za tym idzie rozwinięcie tego zagadnienia może wnieść wiele informacji o środowisku komórkowym i procesach fizjologicznych zachodzących w tkankach pacjentów poddawanych radioterapii onkologicznej.

Wszystko to sprawia, że badania na poziomie molekularnym właściwości fizycznych biosensora alaninowego są prowadzone nie tylko z zastosowaniem metod doświadczalnych (w tym EPR), ale również rozważań teoretycznych tj. modelowania molekularnego z zastosowaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej.

Rozdział 2

Wprowadzenie do metod spektroskopii EPR i NMR.

Zjawisko rezonansu magnetycznego jest podstawą metod spektroskopowych stosowanych w badaniach właściwości fizyko – chemicznych molekuł znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym. Wnosi ono również wiele informacji o strukturze molekularnej, rodzaju oraz wielkości oddziaływań zachodzących w badanej cząsteczce. Ze względu na obiekty badań metody spektroskopii rezonansu magnetycznego możemy podzielić na dwie główne grupy tj. metody EPR i metody NMR. Natomiast rozwój techniki pomiarowej w dziedzinie spektroskopii rezonansu magnetycznego pozwala na szerokie zastosowanie tego rodzaju metod eksperymentalnych w dziedzinach nauki takich jak medycyna, biologia, chemia i fizyka.

2.1 Elektronowy rezonans magnetyczny.

Elektronowy rezonans magnetyczny (EPR – z ang. electron paramagnetic resonance) - jest zjawiskiem polegającym na wybiórczym pochłanianiu fal elektromagnetycznych o określonej częstotliwości przez substancję paramagnetyczną znajdującą się w polu magnetycznym. Rezonans możliwy jest jedynie wtedy, gdy energia fal pochłaniana jest przez cząstki posiadające moment magnetyczny. Dla uproszczonego modelu elektronu krążącego wokół jądra atomowego mamy do czynienia z układem ładunków (czyli dipolem), w którym elektron posiada magnetyczny moment dipolowy μ_L . Można go wyrazić poprzez orbitalny moment pędu elektronu L_e :

$$\mu_L = -\gamma_e L_e \quad (1)$$

gdzie: $\gamma_e = \frac{e}{2m_e}$ - współczynnik giromagnetyczny, e , m_e - ładunek i masa elektronu.

W uproszczonym opisie ruchu elektronu zachodzi także wokół jego własnej osi. Ruch ten nazywamy spinem elektronu i jest on związany ze spinowym momentem pędu określonym wektorem S . Ruch elektronu wokół własnej osi generuje prąd związany z ruchem jego ładunku, czego efektem jest spinowy moment magnetyczny μ_s , określane spinowym magnetycznym momentem dipolowym i dany równaniem:

$$\boldsymbol{\mu}_s = -g_e \frac{\beta_e}{\hbar} \mathbf{S} \quad (2)$$

gdzie: g_e - czynnik rozszczepienia spektroskopowego (czynnik Landego) dla swobodnego elektronu, którego wartość wynosi 2.00232 [4]; β_e - magneton Bohra, \hbar (h kreślone) jest stałą Plancka, podzieloną przez 2π .

Cząstka posiadająca niezerowy magnetyczny moment dipolowy wprowadzona w obszar pola magnetycznego o indukcji \mathbf{B} , ma niezerową energię, wyrażoną równaniem:

$$E_n = -\boldsymbol{\mu}_z \circ \mathbf{B} = -\mu_z \cdot B \cdot \cos \angle(\boldsymbol{\mu}; \mathbf{B}) = -\mu_z \cdot B \quad (3)$$

gdzie: μ_z - rzut wektora spinowego momentu magnetycznego dipolowego na kierunek zewnętrznego pola magnetycznego \mathbf{B} .

Dipol znajdujący się w zewnętrznym polu magnetycznym ma najwyższą energię, jeżeli jest skierowany przeciwnie do kierunku pola. Natomiast, jeżeli dipol jest skierowany zgodnie z kierunkiem pola wykazuje najniższą energię. Wszystkie substancje posiadające niesparowany elektron są substancjami paramagnetycznymi i mają charakter dipolowy. Zatem w zewnętrznym polu magnetycznym układają się równolegle do linii sił pola, czyli mają w tym stanie najniższą energię.

Zarówno elektrony, jak i jądra atomów podlegają zasadom mechaniki kwantowej tj. orbitalny i spinowy moment pędu mogą przyjmować w polu magnetycznym tylko ściśle określone orientacje. Wobec tego następuje również kwantowanie spinowego momentu magnetycznego dipolowego elektronu, a co za tym idzie kwantowanie energii elektronu w zewnętrznym polu magnetycznym. Fakt ten opisuje równanie:

$$E_n = g_e \beta_e B S_z = g_e \beta_e B M_s \quad (4)$$

gdzie: M_s - spinowa magnetyczna liczba kwantowa, S_z - rzut wektora spinu na kierunek zewnętrznego pola magnetycznego, n numer poziomu energetycznego.

W przypadku izolowanego niesparowanego elektronu kwantowa liczba spinowa przyjmuje wartość $S = \frac{1}{2}$. Magnetyczna spinowa liczba kwantowa może przyjmować dwie wartości

$M_s \in \left\{-\frac{1}{2}; \frac{1}{2}\right\}$, a co za tym idzie energia elektronu w zewnętrznym polu magnetycznym także przyjmuje dwie wartości:

$$E_n\left(M_s = +\frac{1}{2}\right) = \frac{1}{2} g_e \beta_e B \text{ oraz } E_n\left(M_s = -\frac{1}{2}\right) = -\frac{1}{2} g_e \beta_e B, \quad (5)$$

Poziomy energetyczne można oznaczyć jako: $E_n\left(M_s = +\frac{1}{2}\right) = E_2$ oraz $E_n\left(M_s = -\frac{1}{2}\right) = E_1$.

Niniejsze poziomy energetyczne noszą nazwę poziomów Zeemana. Różnica między poziomami energetycznymi jest równa energii przejścia elektronu z wyższego poziomu energetycznego na niższy i opisana równaniem:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g_e \beta_e B \quad (6)$$

W przypadku absorpcji kwantów promieniowania elektromagnetycznego o energii $h\nu_0$ równej różnicy poziomów ΔE istnieje możliwość generowania przejść elektronów pomiędzy tymi poziomami. Jest to zjawisko fizyczne elektronowego rezonansu paramagnetycznego i określane jest równaniem:

$$h\nu_0 = g_e \beta_e B \quad (7)$$

Rozważania dotyczące zagadnienia spektroskopii EPR przeprowadzono na podstawie pozycji literaturowej [1].

2.1.1 Efektywny hamiltonian spinowy EPR.

W ujęciu mechaniki kwantowej energia przejścia opisana jest hamiltonianem tj. operatorem energii całkowitej. W przypadku centrum paramagnetycznego jakim jest niesparowany elektron o spinowym momencie pędu \mathbf{S} , który oddziałuje z otaczającymi elektronami o spinowym momencie pędu \mathbf{S} i jądrami atomów sąsiedztwa o spinowym momencie pędu \mathbf{I} oraz zewnętrznym polem magnetycznym \mathbf{B} , należy mówić o tzw. efektywnym hamiltonianie spinowym \hat{H}_S .

W ogólnej postaci dla zjawiska EPR efektywny hamiltonian spinowy wyrażony jest równaniem:

$$\hat{H}_S = \hat{H}(S, B) + \hat{H}(S, I) + \hat{H}(S, S) + \hat{H}(I, I) \quad (8)$$

Jednakże dla większości rodników o spinie $\mathbf{S} = 1/2$, w tym rodników cząsteczek związków biologicznie aktywnych takich jak aminokwasy [2] (także dla alaniny będącej przedmiotem badań w niniejszej pracy), hamiltonian spinowy przyjmuje nieco prostszą formę i redukowany jest do postaci:

$$\hat{H}_S = \hat{H}(S, B) + \hat{H}(S, I) = \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{B} + \sum_N \mathbf{S} \cdot \mathbf{A}_N \cdot \mathbf{I}_N \quad (9)$$

gdzie: $\hat{H}(S, B)$ jest to człon opisujący oddziaływanie Zeemana niesparowanego spinu \mathbf{S} z zewnętrznym polem magnetycznym \mathbf{B} , $\hat{H}(S, I)$ jest to człon związany z oddziaływaniem nadsubtelnym niesparowanego spinu \mathbf{S} z jądrami atomów otoczenia o spinowym momencie pędu \mathbf{I} . Tensor \mathbf{g} jest tensorem drugiego rzędu związanym z wielkością oddziaływania Zeemana (w literaturze określany terminem: *electronic g – tensor*), tensor \mathbf{A}_N jest tensorem drugiego rzędu związanym z wielkością oddziaływania nadsubtelnego (w literaturze określany terminem: *hyperfine A – tensor*).

Człon $\hat{H}(S, S)$ równania (8) uwzględniany jest dla układów molekularnych złożonych z kilku niesparowanych elektronów, tj. takich dla których spin przyjmuje wartość $\mathbf{S} > 1/2$. Nosi on nazwę *zero field splitting* i opisany jest równaniem:

$$\hat{H}(S, S) = \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S} \quad (10)$$

gdzie: \mathbf{D} jest tensorem zwanym *zero field splitting tensor*.

Człon $\hat{H}(I, I)$ równania (8) opisuje wewnętrzne oddziaływania kwadrupolowe pomiędzy jądrami molekuly paramagnetycznej i zazwyczaj nie jest on brany pod uwagę w analizie

doświadczalnych widm EPR, ze względu na niewielki wkład do hamiltonianu spinowego. Określany jest równaniem:

$$\hat{H}(I, I) = \sum_N \mathbf{I}_N \cdot \mathbf{Q}_{NN} \cdot \mathbf{I}_N \quad (11)$$

gdzie: \mathbf{Q}_{NN} - jest to tensor sprzężenia kwadrupolowego.

Materiały do opisanego powyższego podrozdziału pracy zaczerpnięto z pozycji literaturowej [3].

2.1.2 Tensor \mathbf{g} .

W niniejszej pracy zastosowano hamiltonian uwzględniający dwa główne efekty mające wpływ na kształt widma EPR, uzyskanego w wyniku eksperymentalnej analizy rodników l-alaniny. Jest on opisany równaniem (9). Analiza teoretyczna widma EPR została przeprowadzona z zastosowaniem wybranych metod obliczeniowych chemii kwantowej: metody Hartree – Focka, metody DFT i metody Møllera – Pleseta. Głównym celem zastosowania tych metod jest obliczenie głównych wartości własnych oraz wartości izotropowych tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} . W teoretycznych rozważaniach tensor \mathbf{g} jest opisany przez drugą pochodną cząstkową całkowitej energii molekularnej E po polu magnetycznym \mathbf{B} i spinowym momencie pędu \mathbf{S} . Natomiast tensor \mathbf{A} jest opisany przez drugą pochodną cząstkową całkowitej energii molekularnej E po spinowym momencie pędu \mathbf{S} i spinowym jądrowym momencie pędu \mathbf{I} .

Zależności te opisują poniższe równania:

$$\mathbf{g} = \frac{1}{\beta_e} \left. \frac{\partial^2 E}{\partial \mathbf{B} \partial \mathbf{S}} \right|_{\mathbf{B}=\mathbf{S}=0} \quad (12)$$

$$\mathbf{A} = \left. \frac{\partial^2 E}{\partial \mathbf{I} \partial \mathbf{S}} \right|_{\mathbf{I}=\mathbf{S}=0} \quad (13)$$

Oddziaływanie spinowego momentu magnetycznego elektronu z zewnętrznym polem magnetycznym jest dane przez człon hamiltonianu opisujący oddziaływanie Zeemana w EPR.

Wielkość tego oddziaływania jest definiowana przez tensor \mathbf{g} , na który składają się dwa czynniki. Pierwszy wynika z wartości tensora \mathbf{g} dla swobodnego elektronu $g_e = 2.002319$ [4], a drugi czynnik $\Delta\mathbf{g}$ uwzględnia interakcję niesparowanego elektronu z lokalnym środowiskiem w cząsteczce i w związku z tym jest unikalną cechą każdego badanego układu. Możemy zapisać ten fakt w postaci równania:

$$\mathbf{g} = g_e \mathbf{1} + \Delta\mathbf{g} \quad (14)$$

gdzie: $\mathbf{1}$ - jest to macierz jednostkowa o wymiarach 3×3 .

Wartości tensora \mathbf{g} można wyznaczyć doświadczalnie, ale ze względu na trudności w interpretacji eksperymentalnych widm, rozważania teoretyczne są bardzo pomocne w celu obliczenia jego prawidłowej wartości, a także do przewidywania wyników przyszłych eksperymentów EPR a także symulacji widma.

Składnik korekcyjny $\Delta\mathbf{g}$ tensora \mathbf{g} zawiera dodatkowe poprawki, które wyznacza się za pomocą pierwszego i drugiego rzędu rachunku zaburzeń oraz równania (12) jako wartości oczekiwane odpowiedniego operatora Hamiltona wprowadzonego przez Breit-Pauli [5].

Poprawki dla tensora \mathbf{g} opisuje poniższe równanie:

$$\mathbf{g} = g_e \mathbf{1} + \Delta\mathbf{g}^{RMC} \mathbf{1} + \Delta\mathbf{g}^{GC} + \Delta\mathbf{g}^{OZ/SOC} \quad (15)$$

To samo równanie możemy wyrazić w postaci skalarnej w przypadku wartości własnych, tj. składowych tensora \mathbf{g} :

$$g_{rs} = g_e \delta_{rs} + \Delta g_{rs}^{RMC} \delta_{rs} + \Delta g_{rs}^{GC} + \Delta g_{rs}^{OZ/SOC} \quad (16)$$

gdzie: δ_{rs} jest deltą Kroneckera, r i s określają osie główne układu x, y, z . Zatem $r, s = (x, y, z)$

Czynnik Δg^{RMC} jest to wyrażenie uwzględniające poprawkę na masę relatywistyczną w energii kinetycznej. Wyrażenie to opisane jest równaniem:

$$\Delta g^{RMC} = \frac{\alpha^2}{S} \sum_{\mu, \nu} P_{\mu, \nu}^{\alpha-\beta} \left\langle \varphi_{\mu} \left| \frac{-\nabla^2}{2} \right| \varphi_{\nu} \right\rangle \quad (17)$$

gdzie: α - stała struktury subtelnej, S - spin całkowity układu, $P_{\mu,\nu}^{\alpha-\beta}$ jest to μ,ν - ty element macierzy gęstości spinowej w postaci: $\mathbf{P}^{\alpha-\beta} = \mathbf{P}^\alpha - \mathbf{P}^\beta$, $\{\varphi\}$ - orbitalne funkcje bazy,

$\hat{T} = \frac{-\nabla^2}{2}$ - operator energii kinetycznej.

Czynnik Δg^{GC} uwzględnia poprawkę diamagnetyczną, która obejmuje efektywne oddziaływanie sprzężenia spin – orbita $\xi(A, i)$ elektronu i z jądrem A . Wyrażenie to opisane jest równaniem:

$$\Delta g_{rs}^{GC} = \frac{1}{2S} \sum_{\mu,\nu} P_{\mu,\nu}^{\alpha-\beta} \left\langle \varphi_\mu \left| \sum_A \left[\frac{\alpha^2 Z_{eff}^4}{2 |\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|^3} \right] (\mathbf{r}_A \mathbf{r}_O - \mathbf{r}_{A,r} \mathbf{r}_{O,s}) \right| \varphi_\nu \right\rangle \quad (18)$$

gdzie: Z_{eff} - jest to efektywny ładunek jądra dla atomu A znajdującego się w pozycji \mathbf{R}_A , wektor \mathbf{r}_A i jego wartość to odległość między elektronem a jądrem A , wektor \mathbf{r}_O i jego wartość to odległość od początku układu współrzędnych.

Wyrażenie $\Delta g^{OZ/SOC}$ uwzględnia poprawkę związaną ze złożeniem sprzężenia orbitalno – Zeemanowskiego (OZ) i sprzężenia spin – orbita (SOC). Opisuje to poniższe równanie:

$$\Delta g_{rs}^{OZ/SOC} = -\frac{1}{\beta_e S} \sum_{\sigma-\alpha,\beta} (-1)^{\delta_{\sigma,\beta}} \sum_i \sum_{a \in \sigma} \frac{\langle \varphi_a^{\sigma(0)} | \beta \ell_r | \varphi_i^{\sigma(0)} \rangle}{\varepsilon_a^{\sigma(0)} - \varepsilon_i^{\sigma(0)}} \times \left\langle \varphi_i^{\sigma(0)} \left| \sum_A \sum_j \left[\frac{\alpha^2 Z_{eff}^A}{2 |\mathbf{r}_j - \mathbf{R}_A|^3} \right] \ell_{A,s} \right| \varphi_a^{\sigma(0)} \right\rangle \quad (19)$$

gdzie: $\hat{\ell}$ - jest operatorem momentu kąowego, $\varepsilon_a^{\sigma(0)}$ - to energia orbitalna.

Materiały do opisanego powyższego podrozdziału pracy zaczerpnięto z pozycji literaturowej [6, 7].

2.1.3 Tensor struktury nadsubtelnej A.

Na skutek oddziaływania spinowego momentu magnetycznego niesparowanego elektronu z momentem magnetycznym jąder otoczenia, w widmie EPR obserwujemy kilka linii absorpcyjnych. Zjawisko to jest określane terminem struktury nadsubtelnej EPR.

Wielkością fizyczną opisującą to zjawisko jest tensor sprzężenia nadsubtelnego \mathbf{A} składający się z dwóch członów.

Pierwszy z nich opisuje wielkość oddziaływania kontaktowego Fermiego i przyjmuje on wartość izotropową, w literaturze określaną jako stała struktury nadsubtelnej lub stała sprzężenia nadsubtelnego (ang. hyperfine coupling constant, (HCC)). Bezpośrednio związana ona jest z gęstością spinową $\rho_N^{\alpha-\beta}(R_N)$, czyli gęstością niesparowanego elektronu na jądrze N i opisana równaniem:

$$A_{iso} = \frac{4\pi}{3} \beta_e \beta_N g_e g_N \langle S_z \rangle^{-1} \rho_N^{\alpha-\beta} \quad (20)$$

gdzie: β_e to magneton Bohra, β_N to magneton jądrowy, $g_e = 2.002319$ to wartość izotropowa tensora \mathbf{g} dla swobodnego elektronu, g_N to jądrowy analogon współczynnika g_e . Składowa wektora spinu całkowitego dla kierunku z oznaczona jest przez $\langle S_z \rangle$. Gęstość spinowa dla położenia jądra N w punkcie R_N opisana jest wyrażeniem $\rho_N^{\alpha-\beta}(R_N)$.

Drugi człon w równaniu na tensor struktury nadsubtelnej \mathbf{A} opisuje oddziaływanie dipolowe pomiędzy ładunkami elektronu i jąder otoczenia. Jest to wielkość anizotropowa określona tensorem \mathbf{T} . Składowe tensora \mathbf{T} opisuje równanie:

$$T_{kl} = \frac{1}{2} \beta_e \beta_N g_e g_N \langle S_z \rangle^{-1} \sum_{\mu, \nu} P_N^{\alpha-\beta} \langle \varphi_\mu | \mathbf{r}_N^{-5} (\mathbf{r}_N^2 \delta_{kl} - 3r_{N,k} r_{N,l}) | \varphi_\nu \rangle \quad (21)$$

gdzie: $\mathbf{r}_N = \mathbf{r} - \mathbf{R}_N$.

Materiały do opisanie powyższego podrozdziału pracy zaczerpnięto z pozycji literaturowej [8].

2.2 Jądrowy rezonans magnetyczny.

Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR – z ang. *nuclear magnetic resonance*) jest to zjawisko fizyczne związane z rezonansową absorpcją energii kwantów promieniowania elektromagnetycznego $h\nu$, jaka towarzyszy zmianie orientacji jądrowego momentu spinowego \mathbf{I} , jądra K atomu znajdującego się w zewnętrznym polu magnetycznym \mathbf{B} . Ze spinem \mathbf{I} jądra jest związany moment magnetyczny jądra $\boldsymbol{\mu}_K$, którego jednostką jest

magneton jądrowy β_N , stanowiący analogon magnetonu Bohra. Dla jądra związek między momentem pędu \mathbf{I} i momentem magnetycznym $\boldsymbol{\mu}_K$ dany jest równaniem:

$$\boldsymbol{\mu}_K = \gamma_K \hbar \mathbf{I} \quad (22)$$

gdzie: γ_K jest to współczynnik giromagnetyczny, którego wartość jest charakterystyczna dla danego jądra.

W molekułach jądra atomów otoczone są powłokami elektronowymi, które osłaniają je niczym ekran przed działaniem zewnętrznego pola magnetycznego. Dzięki temu oddziaływanie pola zewnętrznego jest mniejsze od pola przyłożonego. Zjawisko to nazywane jest mechanizmem ekranowania, a główny udział w nim mają elektrony walencyjne. Ekranowanie jest tym większe, im większa jest gęstość elektronowa wokół jądra, natomiast jego wielkość jest wprost proporcjonalna do indukcji \mathbf{B} pola zewnętrznego. W związku z tym pole efektywne \mathbf{B}_{ef} działające na jądro wynosi:

$$\mathbf{B}_{ef} = \mathbf{B} - \Delta\mathbf{B} = \mathbf{B} - \sigma_K \mathbf{B} \quad (23)$$

gdzie: $\Delta\mathbf{B}$ to indukowane na elektronach pole, które jest proporcjonalne do pola zewnętrznego \mathbf{B} , a σ_K to tensor ekranowania. Jest on jednocześnie współczynnikiem proporcjonalności i miarą gęstości elektronowej wokół jądra. W przypadku gdy przedmiotem badań NMR jest substancja w fazie ciekłej lub gazowej będąca środowiskiem izotropowym, główne składowe tensora ekranowania uśredniają się, co pozwala na wyrażenie go w postaci stałej ekranowania NMR, która jest wielkością skalarną σ_K^{iso} . Fakt ten wyraża równanie:

$$\sigma_K^{iso} = \frac{1}{3}[(\sigma_K)_{xx} + (\sigma_K)_{yy} + (\sigma_K)_{zz}] \quad (24)$$

Położenie sygnałów w doświadczalnym widmie NMR określa się w częściach na milion - ppm, względem przyjętego sygnału wzorca:

$$\delta = \sigma_{ref} - \sigma_{sam} \quad (25)$$

Położenie sygnałów jest definiowane jako przesunięcie chemiczne δ .

W wyniku ekranowania na jądro oddziałuje efektywne pole magnetyczne o indukcji \mathbf{B}_{ef} .
Zatem warunek rezonansowy w tej sytuacji przyjmuje postać, będącą analogonem równania (7) jak w przypadku EPR i opisany jest równaniem:

$$h\nu = g_N \beta_N B_{ef} \quad (26)$$

Materiały do opisanego powyższego podrozdziału pracy zaczerpnięto z pozycji literaturowej [1].

2.2.1 Efektywny hamiltonian NMR.

W analogii do zjawiska EPR, również w przypadku zjawiska NMR można zastosować metody obliczeniowe mechaniki kwantowej. W tym celu równanie na warunek rezonansowy (26) zostaje zastąpione równaniem na efektywny hamiltonian NMR, który opisany jest wyrażeniem:

$$\hat{H} = -\sum_K \mathbf{B}^T (\mathbf{a} - \boldsymbol{\mu}_K)_K + \frac{1}{2} \sum_{k \neq l} \mathbf{D}_K^T (\mathbf{K}_{KL} + \boldsymbol{\mu}_{KL})_L \quad (27)$$

Oddziaływanie pomiędzy momentami magnetycznymi jąder atomowych K i L opisane jest poprzez tensor bezpośredniej stałej jądrowego sprzężenia spin – spin, oznaczany symbolem \mathbf{D}_{KL} i opisany równaniem:

$$\mathbf{D}_{KL} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{3\mathbf{R}_{KL} \mathbf{R}_{KL} - 1\mathbf{R}_{KL}^2}{R_{KL}^5} \quad (28)$$

gdzie: \mathbf{R}_{KL} wektor, którego wartość R_{KL} określa odległość między jądrami K i L .

Istnieje również oddziaływanie pomiędzy momentami magnetycznymi jąder atomowych K i L , które jest przenoszone przez elektrony znajdujące się wokół nich. Ten rodzaj sprzężenia spin – spin opisuje tensor pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego oznaczany symbolem \mathbf{J}_{KL} i dany równaniem:

$$\mathbf{J}_{KL} = h \frac{\gamma_K \gamma_L}{2\pi 2\pi} \mathbf{K}_{KL} \quad (29)$$

Podobnie jak w przypadku tensora ekranowania, w cieczech i gazach główne wartości własne tensora \mathbf{J}_{KL} również ulegają uśrednieniu. Dzięki temu tensor ten możemy wyrazić w postaci skalarnej tj. pośredniej stałej sprzężenia spinowo – spinowego J_{KL} opisanej równaniem:

$$J_K^{iso} = \frac{1}{3} [(J_K)_{xx} + (J_K)_{yy} + (J_K)_{zz}] \quad (30)$$

Pośrednia stała sprzężenia spinowo – spinowego zależy od wartości współczynników giromagnetycznych γ_K i γ_L , sprzężonych jąder K i L oraz struktury elektronowej cząsteczki, w której się znajdują, a poprzez nią od geometrii cząsteczki. Wielkość oznaczona symbolem \mathbf{K}_{KL} to używana w chemii kwantowej postać tensora zredukowanej pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego, niezależnego od współczynników magnetogirycznych. Jest on definiowany jako druga pochodna mieszana energii po momentach magnetycznych jąder K i L minus tensor bezpośredniej stałej jądrowego sprzężenia spin – spin \mathbf{D}_{KL} . Fakt ten wyrażony jest wzorem:

$$\mathbf{K}_{KL} = \left. \frac{\partial^2 E(\mathbf{B}\boldsymbol{\mu})}{\partial \boldsymbol{\mu}_K \partial \boldsymbol{\mu}_L} \right|_{\mathbf{B}=0, \mathbf{M}=0} - \mathbf{D}_{KL} \quad (31)$$

Wielkość \mathbf{D}_{KL} w przypadku cieczy i gazów ulega uśrednieniu do zera, zatem zwykle obserwuje się tylko pośrednią stałą sprzężenia spinowo-spinowego J_{KL} i związaną z nią zredukowaną stałą sprzężenia spinowo-spinowego K_{KL} . W związku z tym równanie (31) można zapisać w postaci:

$$\mathbf{K}_{KL} = \left. \frac{\partial^2 E(\mathbf{B}\boldsymbol{\mu})}{\partial \boldsymbol{\mu}_K \partial \boldsymbol{\mu}_L} \right|_{\mathbf{B}=0, \mathbf{M}=0} \quad (32)$$

Podobne rozważania można przeprowadzić dla członu efektywnego hamiltonianu spinowego (równanie (27) związane z tensorem ekranowania), który jest definiowany jako druga pochodna mieszana energii po zewnętrznym polu magnetycznym i momencie magnetycznym jądra. Możemy to zapisać w postaci równania:

$$\sigma_K = \left. \frac{\partial^2 E(\mathbf{B}\boldsymbol{\mu})}{\partial \mathbf{B} \partial \boldsymbol{\mu}_K} \right|_{\mathbf{B}=0, \mathbf{M}=0} + \mathbf{1} \quad (33)$$

gdzie: $\mathbf{1}$ jest macierzą jednostkową 3 x 3 elementową.

Podejście nierelatywistyczne, zaproponowane przez Ramseya, zakłada wprowadzenie czterech odrębnych składników do opisu pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego będących konsekwencją nadsubtelnego sprzężenia spinu jądra z ruchem orbitalnym elektronów i ich spinami. Oddziaływania te można zapisać w postaci pochodnych hamiltonianu elektronowego określającego cząsteczkę w zewnętrznym polu magnetycznym z którym oddziałuje, po momentach magnetycznych jąder.

- Sprzężenie spinowo – orbitalne (SO) jest związane z oddziaływaniem spinu jądra z obdarzonymi ładunkiem elektronami, poruszającymi się w potencjale wektorowym $\mathbf{A}_{nuc}(\mathbf{r})$ jądra. Tego typu oddziaływanie jest opisane za pomocą operatora diamagnetycznego spinowo-orbitalnego (DSO), wyrażonego równaniem:

$$\mathbf{h}_{KL}^{DSO} = \alpha^4 \sum_i \frac{\mathbf{r}_{iK}^T \mathbf{r}_{iL} \mathbf{1} - \mathbf{r}_{iK} \mathbf{r}_{iL}^T}{r_{iK}^3 r_{iL}^3} \quad (34)$$

oraz operatora paramagnetycznego spinowo – orbitalnego (PSO), wyrażonego równaniem:

$$\mathbf{h}_K^{PSO} = \alpha^2 \sum_i \frac{\mathbf{r}_{iK} \times \mathbf{p}_i}{r_{iK}^3} \quad (35)$$

gdzie: \mathbf{p}_i jest operatorem momentu pędu i – tego elektronu,

- Kolejnymi składnikami pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego są operatory związane z oddziaływaniem pola magnetycznego jądra $\mathbf{B}_{nuc}(\mathbf{r})$ ze spinem elektronów. Oddziaływanie kontaktowe Fermiego (FC) opisuje operator \mathbf{h}_K^{FC} , który jest związany z bezpośrednim oddziaływaniem spinu jądra ze spinem elektronu znajdującego się w pozycji jądra i jest dany równaniem:

$$\mathbf{h}_K^{FC} = \frac{8\pi\alpha^2}{3} \sum_i \delta(\mathbf{r}_{iK}) \mathbf{s}_i \quad (36)$$

Oddziaływanie spinowo – dipolowe (SD) reprezentowane przez operator \mathbf{h}_K^{SD} , opisuje się bezpośrednim oddziaływaniem spinu jądra ze spinem elektronu znajdującego się w pewnej odległości od jądra i jest dany równaniem:

$$\mathbf{h}_K^{SD} = \alpha^2 \sum_i \frac{3\mathbf{r}_{iK} \mathbf{r}_{iK}^T - \mathbf{r}_{iK}^2 \mathbf{I}}{\mathbf{r}_{iK}^5} \mathbf{s}_i \quad (37)$$

gdzie: \mathbf{s}_i spin elektronów.

Materiały do opisanego powyższego podrozdziału pracy zaczerpnięto z pozycji literaturowej [9, 10, 11].

Rozdział 3

Metody chemii kwantowej stosowane w modelowaniu układów molekularnych.

W celu lepszego zinterpretowania uzyskanych doświadczalnie wyników badań prowadzone są rozważania teoretyczne z wykorzystaniem odpowiednich modeli matematycznych i metod obliczeniowych. Obecnie stosowane metody obliczeniowe w teoretycznej analizie układów molekuł wieloelektrodowych opierają się na podstawach mechaniki kwantowej. Określa się je terminem metod obliczeniowych chemii kwantowej. Metody te pozwalają na określenie właściwości fizycznych nawet złożonych układów molekularnych, takich jak fragmenty DNA czy białka. Istotnym z punktu widzenia niniejszej rozprawy jest zastosowanie metod obliczeniowych chemii kwantowej do zbadania parametrów fizycznych układów molekularnych aminokwasu l-alaniny.

Przeprowadzona analiza teoretyczna jest dopełnieniem badań doświadczalnych wykonanych metodami elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR).

3.1 Podział metod obliczeniowych chemii kwantowej.

3.1.1 Metody półempiryczne (semi – empirical).

Metody półempiryczne stosowane są do przeprowadzania obliczeń kwantowo-chemicznych wybranych układów molekularnych. Cechą charakterystyczną obliczeń prowadzonych tą metodą jest stosowanie, w celu konstrukcji modelu obliczeniowego (będącego dobrym przybliżeniem układu rzeczywistego), danych doświadczalnych badanego układu takich jak: potencjały jonizacji, długość wiązań chemicznych molekuly, powinowactwo elektronowe. Procedura ta stosowana jest ponieważ w metodach półempirycznych duża część danych o badanym układzie bywa przybliżana lub zaniechana (głównie chodzi tu o całki dwuelektrodowe). Dzięki temu istnieje również możliwość korekcji błędów wynikających ze stosowanych przybliżeń. Ponadto półempiryczne metody obliczeniowe

w porównaniu z metodami ab initio są mniej czasochłonne i bardziej oszczędne jeżeli chodzi o zasoby komputerowe. Omawiane metody obecnie stosowane są do obliczeń dla złożonych układów molekularnych oraz do obliczeń wstępnych przed bardziej zaawansowanymi metodami ab initio. Przykładami metod półempirycznych są: CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) [104], MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) [105], INDO

(Intermediate Neglect of Differential Overlap) [106], AM1 (Austin Model 1) [103], PM3 (Parameterized Model number 3) [107], itp.

3.1.2 Metody ab initio (tzw. „z pierwszych zasad”).

W obliczeniach chemii kwantowej najczęściej stosowane są metody ab initio, które dają wyniki bliższe do danych uzyskanych doświadczalnie. Można wyróżnić następujące rodzaje metod ab initio:

- Metoda Hartree – Focka (metoda pola samo uzgodnionego),
- Metoda DFT (metoda funkcjonału gęstości),
- Metoda Møllera – Plesseta (MP) (metoda wykorzystująca rachunek zaburzeń).

Opis metod stosowanych w niniejszej pracy opisano poniżej.

3.1.2.1 Metoda Hartree – Focka.

Metoda Hartree – Focka jest podstawową metodą obliczeniową chemii kwantowej ab initio, uwzględniającą korelację elektronową. W metodzie tej poszukiwana jest optymalna postać funkcji falowej badanego układu molekularnego, w oparciu o zasadę wariacyjną. Uzyskuje się w ten sposób minimalną wartość oczekiwaną operatora energii w postaci:

$$E = \int \Phi^* \hat{H} \Phi d\tau \quad (38)$$

Funkcja falowa w metodzie Hartree – Focka opisana jest przez tzw. wyznacznik Slatera, który zapewnia asymetryczność względem permutacji elektronów:

$$\Phi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_1(2) & \cdots & \phi_1(n) \\ \phi_2(1) & \phi_2(2) & \cdots & \phi_2(n) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_n(1) & \phi_n(2) & \cdots & \phi_n(n) \end{vmatrix} \quad (39)$$

gdzie ϕ_i stanowi oznaczenie spinorbitalu, czyli funkcji opisującej i – ty elektron, zależnej od trzech współrzędnych położenia i współrzędnej spinowej.

Natomiast hamiltonian wyrażony w jednostkach atomowych jest opisany równaniem:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \hat{h}(i) + \sum_{i>j=1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (40)$$

gdzie $\hat{h}(i)$ to operator jednoelektrodowy, w skład którego wchodzi operator energii kinetycznej i – tego elektronu i operator energii potencjalnej opisujący oddziaływanie i – tego elektronu z jądrami atomowymi. Operator ten wyrazić można wzorem:

$$\hat{h}(i) = -\frac{1}{2}\Delta_i - \sum_{\alpha=1}^A \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} \quad (41)$$

gdzie $r_{i\alpha}$ oznacza odległość pomiędzy i – tym elektronem i jądrem atomowym α , a N to liczba elektronów w układzie.

Tak określoną funkcję falową oraz operator Hamiltona możemy podstawić do równania na wartość oczekiwaną operatora energii układu molekularnego. Po zastosowaniu reguł Slatera – Condon otrzymujemy wzór:

$$E = \langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle = \sum_{i=1}^N \langle i | \hat{h} | i \rangle + \sum_{i>j=1}^N (\langle ij | ij \rangle - \langle ij | ji \rangle) \quad (42)$$

gdzie $\langle ij | ij \rangle$ to dwuelektronowa całka kulombowska oznaczana symbolem J_{ij} , natomiast wyrażenie w postaci $\langle ij | ji \rangle$ to całka wymienna oznaczana symbolem K_{ij} .

W kolejnym etapie rozważań dotyczących niniejszej metody obliczeniowej dokonuje się minimalizacji energii poprzez wariacje spinorbitali. W efekcie tej operacji uzyskujemy równanie Hartree – Focka:

$$\hat{F}(p)\phi_i(p) = \varepsilon_i\phi_i(p) \quad (43)$$

gdzie \hat{F} jest jednoelektronowym operatorem Focka, ϕ_i to spinorbital, ε_i to energia orbitalna, będąca wartością własną operatora \hat{F} . Jest to energia, która określa energię elektronu poruszającego się w polu jąder i uśrednionym polu pozostałych elektronów. Natomiast

zmienna p numeruje elektrony $p = 1, 2, 3 \dots N$. Operator Focka można przedstawić w postaci wyrażenia:

$$\hat{F}(p) = \hat{h}(p) + \sum_{i=1}^N [J_i(p) - K_i(p)] \quad (44)$$

Operator kulombowski J i operator wymienny K można zdefiniować poprzez ich działanie na dowolną funkcję elektronu p , oznaczoną jako $u(p)$.

Zatem:

$$K_i(p)u(p) = \int d\tau_q \frac{1}{r_{pq}} \phi_i^*(q)u(q)\phi_i(p) \quad (45)$$

$$J_i(p)u(p) = \int d\tau_q \frac{1}{r_{pq}} \phi_i^*(q)\phi_i(q)u(p) \quad (46)$$

Aby rozwiązać równanie HF stosuje się metody iteracyjne. Rozwiązanie polega na przyjęciu założenia wyjściowych postaci orbitali, a następnie obliczeniu potencjału $\sum_{q=1}^N [J_q(i) - K_q(i)]$ w zerowym przybliżeniu. Następnie wyrażenie na potencjał wstawia się do równań Hartree – Focka i po rozwiązaniu otrzymuje się nowy zestaw orbitali (w pierwszym przybliżeniu). Orbitale te służą do wyznaczenia nowego potencjału, następnie cykl ten powtarza się aż do momentu, gdy kolejne wyznaczone orbitale nie różnią się od poprzednich (czyli do momentu samouzgodnienia orbitali).

Równania różniczkowo – całkowe Hartree – Focka są możliwe do rozwiązania, jeżeli elektron porusza się w polu potencjału o symetrii sferycznej. W takim przypadku można rozdzielić zmienne w orbitalu na część kątową i radialną. W przypadku większości cząsteczek pole potencjału nie ma symetrii sferycznej, zatem numeryczne rozwiązanie równań HF jest trudne. Problem ten można jednak rozwiązać wprowadzając przybliżenie Roothaana. W metodzie tej orbital ma postać kombinacji liniowej funkcji bazy:

$$\phi_p = \sum_{i=1}^m C_{pi} x_i \quad (47)$$

Po podstawieniu rozwinięcia do równań Hartree – Focka otrzymuje się równania dla współczynników C_{pi} . Równania różniczkowe zastępowane są w ten sposób przez równania algebraiczne, których rozwiązanie zależy od długości rozwinięcia, a więc od doboru bazy funkcyjnej.

W metodzie Hartree – Focka realizowanej w ramach przybliżenia jednoelektrodowego zaniedbywana jest korelacja elektronowa. Elektron w tej metodzie znajduje się w jądrze oraz uśrednionym polu pozostałych elektronów. W rzeczywistości stan wybranego elektronu zależy od aktualnego położenia każdego z elektronów w danym układzie molekularnym. Zależność ruchu elektronów od wzajemnego chwilowego położenia wynikająca z oddziaływań kulombowskich określana jest terminem korelacji elektronowej. W metodzie HF energia korelacji stanowi błąd metody i zazwyczaj przyjmuje wartości poniżej 1% całkowitej energii cząsteczki. Jednakże korelacja elektronowa ma zasadnicze znaczenie w przypadku obliczeń właściwości molekularnych. Energia korelacji elektronowej jest definiowana jako różnica pomiędzy energią rzeczywistą układu molekularnego a energią Hartree – Focka w przybliżeniu nierelatywistycznym.

$$E_{kor} = E_{tot} - E_{HF} \quad (48)$$

gdzie, E_{kor} jest to energia korelacji elektronowej, E_{tot} to energia całkowita cząsteczki, a E_{HF} stanowi energię Hartree – Focka.

3.1.2.2 Metoda funkcjonału gęstości DFT.

Teoretyczne podstawy metody funkcjonału gęstości (ang. Density Functional Theory, DFT) stanowią twierdzenia Hohenberga – Kohna [12], które przedstawiają się następująco:

- Gęstość elektronowa niezdegenerowanego stanu podstawowego ρ_0 daje możliwość wyznaczenia elektronowego hamiltonianu układu, a zatem niesie o nim (teoretycznie) pełną informację.
- Istnieje funkcjonał energii $E_v^{HK}[\rho]$ taki, że dla zadanej całkowitej liczby elektronów spełniona jest zasada wariacyjna:

$$E_v^{HK}[\rho] \geq E_v^{HK}[\rho_0] = E_0 \quad (49)$$

Zasadniczym problemem nasuwającym się w obliczeniach z zastosowaniem metody DFT jest to, że twierdzenie Hohenberga – Kohna mówi o istnieniu funkcjonału spełniającego zasadę wariacyjną, nie definiuje natomiast wyrażenia opisującego ten funkcjonał.

Wyrażenie w postaci równania (50) opisuje energię w metodzie DFT:

$$E = T_0 + \int v(r)\rho(r)dr + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (50)$$

gdzie T_0 to energia kinetyczna układu nieoddziałujących elektronów, $\int v(r)\rho(r)dr$ to energia potencjalna oddziaływania elektronów z jądrami, a $J[\rho]$ to wielkość opisująca oddziaływanie kulombowskie elektronów w chmurze elektronowej ρ . Wielkość ta opisana jest zależnością:

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (51)$$

E_{xc} - jest to energia wymiennie – korelacyjna, której postać jest nieznana. Zazwyczaj bywa przybliżana przez różnej konstrukcji funkcjonały.

Aby przeprowadzić obliczenia metodą DFT dla wybranego układu molekularnego korzysta się z faktu, iż gęstość elektronowa jest równa kwadratowi modułu funkcji falowej:

$$\rho(r) = N \sum_{\sigma_1 = \pm \frac{1}{2}}^{1/2} \int d\tau_2 d\tau_3 \dots d\tau_N |\psi(r_1, \sigma_1, r_2, \sigma_2, \dots, r_N, \sigma_N)|^2 \quad (52)$$

Następnie postać wieloelektronowej funkcji falowej jest przedstawiana w formie wyznacznika zbudowanego z funkcji jednoelektronowych (spinorbitali), aby w rezultacie uzyskać układ równań Kohna – Shama, których rozwiązanie polega na zastosowaniu procedur iteracyjnych, jak w przypadku rozwiązania równań Focka.

Metody obliczeniowe DFT stosowane w praktyce różnią się między sobą wyrażeniem na funkcjonał wymiennie – korelacyjny i są wybierane na zasadzie dobrego dopasowania wyników obliczeń do wyników eksperymentalnych. Cztery główne grupy funkcjonałów to:

- LDA (przybliżenie lokalnej gęstości lub spinowej lokalnej gęstości),
- GGA (funkcjonały gradientowe, ang. Generalized Gradient Approximation),

- meta-GGA (funkcjonały meta-gradientowe),
- funkcyjonały hybrydowe.

Jednym z najczęściej stosowanych funkcyjonałów DFT jest funkcyjonał o nazwie B3LYP. Jest to przybliżenie hybrydowe wymiennie - korelacyjnym, gdzie człon opisujący energię wymienną został zaproponowany przez Becke [13], natomiast funkcyjonał korelacyjny przez Lee, Yanga i Parra [14] i Vasko, Wilk, Nusair [15]. Zatem przybliżenie hybrydowe funkcyjonału B3LYP jest opisane przez sumę kilku potencjałów w taki sposób, aby wyniki obliczeń były zgodne z eksperymentem:

$$E_{xc} = E_{xc}^{LSDA} + a_0(E_x^{HF} - E_x^{LSDA}) + a_x E_x^{B88} + a_c E_c^{LYP} \quad (53)$$

gdzie, E_{xc}^{LSDA} - jest wyrażeniem na energię wymiennie – korelacyjną w przybliżeniu LSDA (ang. Local Spin – Density Approximation), E_x^{HF} - jest wyrażeniem na energię wymienną Hartree – Focka, E_x^{LSDA} - jest wyrażeniem na energię wymienną w przybliżeniu LSDA, E_x^{B88} - jest wyrażeniem na energię wymienną Becke’go (z poprawkami gradientowymi z roku 1988), E_c^{LYP} - jest to człon korelacyjny Lee – Yanga – Parra, natomiast a_0, a_x, a_c to współczynniki wagowe.

Zastosowanie funkcyjonału B3LYP daje dobrą zgodność wyników z eksperymentem, szczególnie w przypadku optymalizacji geometrii oraz obliczenia widm oscylacyjnych kilku atomowych molekuł. Metoda ta z powodzeniem może być stosowana do układów molekularnych zawierających nawet kilkaset atomów. Do mankamentów metody DFT należy brak możliwości uwzględnienia w obliczeniach energii dyspersyjnej występującej w przypadku oddziaływań molekularnych.

3.1.2.3 Metoda Møllera – Plesseta.

Kolejną z metod ab initio, którą zastosowano w niniejszej pracy jest metoda Møllera – Plesseta (MP). Jest to metoda perturbacyjna pozwalająca na przybliżone uwzględnienie korelacji elektronowej. Podstawą teorii metody MP jest niezaburzony hamiltonian układu N – elektronów, który jest sumą jednoelektronowych operatorów Focka:

$$\hat{H}^{(0)}(1, 2, 3, \dots, N) = \sum_{i=1}^N \hat{F}(i) \quad (54)$$

Następnie rozwiązując równanie Schrödingera dla tak wyrażonego hamiltonianu otrzymuje się funkcje własne w postaci jednowyznacznikowych funkcji Hartree – Focka i odpowiednie wartości własne energii:

$$\hat{H}^{(0)} \psi_{HF} = E_0^{(0)} \psi_{HF} \quad (55)$$

gdzie $E_0^{(0)} = \sum_i^n \varepsilon_i$ jest sumą energii orbitalnych.

W rzeczywistych układach molekularnych N – elektronowych postać hamiltonianu \hat{H} jest różna od sumy operatorów Focka. Zatem różnica między operatorem \hat{H} i operatorem $\hat{H}^{(0)}$ będzie wyrażona równaniem:

$$\hat{H}^{(1)} = \hat{H} - \hat{H}^{(0)} \quad (56)$$

Operator $\hat{H}^{(1)}$ jest traktowany jako operator zaburzenia. Stosując w kolejnym kroku rachunek zaburzeń Rayleigha – Schrödingera uzyskujemy równanie na energię układu w postaci:

$$E_{MP2} = E_0^{(0)} + \left\langle \psi_{HF} \left| \hat{H}^{(1)} \right| \psi_{HF} \right\rangle + \sum_k \frac{\left| \left\langle \psi_k^{(0)} \left| \hat{H} \right| \psi_{HF} \right\rangle \right|^2}{E_0^{(0)} - E_0^{(k)}} \quad (57)$$

Trzeci składnik tego równania jest poprawką drugiego rzędu, w której funkcja falowa została wyrażona w postaci wyznaczników Slatera $\psi_k^{(0)}$, odpowiadających energiom $E_k^{(0)}$ i spełniających warunek $\langle \psi_k^{(0)} | \psi_{HF} \rangle = 0$. Poprawka ta została wprowadzona w celu uwzględnienia dynamicznej korelacji elektronowej.

3.2 Dobór bazy funkcji.

W celu przeprowadzenia obliczeń metodami chemii kwantowej dla układów molekularnych należy zastosować skończoną bazę funkcyjną. Zagadnienie to oparte jest na fakcie, iż funkcje falowe brane pod uwagę w obliczeniach są reprezentowane przez wektory,

których składowe odpowiadają współczynnikom w liniowej kombinacji wybranej do obliczeń funkcji bazy.

Przybliżenie orbitali molekularnych jako liniowa kombinacja orbitali atomowych (LCAO ang., Linear Combination of Atomic Orbitals) zostało wprowadzone przez Johna Leonard – Jonesa do metod obliczeniowych chemii kwantowej. Należy podkreślić że orbitale molekularne były konstruowane w następujący sposób:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^n C_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (58)$$

gdzie: ϕ_i - orbitale molekularne, $C_{\mu i}$ - współczynnik kombinacji liniowej, ϕ_{μ} - orbitale atomowe, n - liczba orbitali atomowych. Zatem orbitale atomowe są rozwiązaniami równań Hartree – Focka dla atomu, co oznacza, że są funkcjami falowymi pojedynczego elektronu w atomie.

3.2.1 Funkcje Slatera.

Pierwotnie stosowane w obliczeniach kwantowo – chemicznych funkcje bazy, określone zostały w literaturze terminem orbitali typu Slatera (STO, ang. Slater Type Orbitals). Charakterystyczną cechą tych funkcji jest ich zanik wykładniczy wraz z odległością od jądra atomowego, analogicznie jak orbitale atomowe atomu wodoru. Orbitale Slatera przyjmują postać we współrzędnych sferycznych:

$$\phi_i(\zeta, n, l, m; r, \theta, \phi) = N \cdot r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (59)$$

gdzie: N - stała normalizacyjna, n, m, l - główna, orbitalna i magnetyczna liczba kwantowa, r, θ, ϕ - współrzędne sferyczne, ζ - stała określająca efektywny ładunek danego atomu, Y_{lm} - część kątowa funkcji falowej.

3.2.2 Funkcje Gaussa.

Kombinacje orbitali typu Gaussa (GTO, ang. Gaussian Type Orbitals) są zazwyczaj stosowane w celu przybliżenia orbitali typu Slatera. Stosując funkcje Gaussa jest dużo łatwiej

obliczyć całki (nakrywania itp.), co powoduje znaczne przyspieszenie obliczeń. Orbitale Gaussa wyraża równanie:

$$g(\alpha, l, m, n; x, y, z) = N \cdot e^{-\alpha r^2} x^l y^m z^n \quad (60)$$

gdzie: N - stała normalizacyjna; α - jest wykładnikiem orbitalnym, x, y, z - współrzędne kartezyjskie, l, m, n - dodatnie liczby całkowite, $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$.

3.2.3 Baza minimalna.

Baza minimalna to baza, w której jedna funkcja typu Slatera definiuje orbital atomowy. W jej skład wchodzi funkcje Slatera odpowiadające orbitalom atomowym powłoki walencyjnej i powłok wewnętrznych. Tego typu bazy najczęściej oznaczane są skrótem STO-xG, gdzie x jest liczbą całkowitą określającą funkcje Gaussa, które tworzą orbitale atomowe wewnętrzne i walencyjne.

3.2.4 Bazy z podzielonymi powłokami walencyjnymi.

Elektrony walencyjne atomów biorą bezpośredni udział w tworzeniu wiązania chemicznego. W związku z tym ważnym faktem, zaproponowano aby do opisu orbitali walencyjnych stosować więcej niż jedną funkcję bazy. Z kolei każda z funkcji bazy jest liniową kombinacją funkcji Gaussa. Wprowadzona notacja dla baz z podzielonymi powłokami walencyjnymi jest zgodna z terminologią People'a i przyjmuje zapis: x - yz G. Gdzie x określa liczbę funkcji Gaussa zastosowanych do konstrukcji orbitali atomowych powłok wewnętrznych. Wartości liczbowe y i z oznaczają, że każdy z orbitali walencyjnych jest utworzony z dwóch funkcji bazy. Zarówno y , jak i z są liniowymi kombinacjami funkcji Gaussa. Istnieje również możliwość, iż orbitale walencyjne zbudowane są z trzech funkcji bazy, z których odpowiednio każda jest liniową kombinacją y , z i w funkcji Gaussa. Taką bazę oznacza się symbolem x - yzw G. W praktyce stosuje się również rozszerzenie baz People'a o funkcje polaryzacyjne. Polega to na dodaniu orbitali atomowych o wyższych wartościach pobocznej liczby kwantowej l niż dla zajętych orbitali atomowych w stanie podstawowym atomów izolowanych. Funkcje polaryzacyjne dają możliwość kątowej polaryzacji atomów w cząsteczce. Dodanie funkcji polaryzacyjnych typu d do atomów ciężkich oznacza się gwiazdką np. x - yzG^* . Następnie możemy dodać funkcje polaryzacyjne typu p do atomów lekkich, takich jak wodór czy hel zaznaczamy tą operację dwoma gwiazdkami np. x - yzG^{**} . W praktyce często stosuje się notację w postaci np. x - $yzG(a,b)$, gdzie a określa liczbę i typ

funkcji na atomach ciężkich, natomiast b określa liczbę i typ funkcji na atomach lekkich. Tak więc notacja $6-31G^{**}$ jest analogiem notacji $6-31(d,p)$. Jako przykład można przytoczyć bazę w postaci: $6-31(2p,3pd)$, gdzie baza funkcyjna to $6-31G$, która dodatkowo jest rozszerzona o dwie funkcje typu p na atomach ciężkich oraz trzy funkcje typu p i jedną funkcję typu d na atomach lekkich.

Innym rodzajem modyfikacji bazy funkcji jest dodanie funkcji dyfuzyjnych, oznaczanych symbolem plus (+). Jeden znak plus oznacza, iż funkcję dyfuzyjną dodano do atomów ciężkich, natomiast dwa znaki plus (++) oznaczają, że funkcję dyfuzyjną dodano do atomów lekkich. Funkcje dyfuzyjne (najczęściej funkcje typu s i p) są funkcjami Gaussa i posiadają cechę charakterystyczną, tj. zanikają powoli wraz z odległością od atomów, dlatego że są to funkcje o małym wykładniku. Są one wprowadzane głównie po to, aby lepiej opisać orbitale atomowe dla dużych odległości od jądra atomowego.

Funkcje dyfuzyjne najczęściej stosowane są do poprawnego opisu anionów, opisu słabych wiązań, a także w celu wyznaczenia takich wielkości jak momenty dipolowe czy polaryzowalność. Jako przykład można przedstawić bazę funkcyjną $6-31G$ poszerzoną o funkcję dyfuzyjną na atomach ciężkich. Bazę tą będziemy określać symbolem $6-31+G$.

3.2.5 Bazy „double-”, „triple-“, itd. zeta”.

Kolejnym rodzajem baz funkcyjnych często stosowanym w obliczeniach kwantowo chemicznych są bazy, w których kombinacje kilku funkcji opisują każdy z orbitali atomowych walencyjnych oraz orbitale wewnętrzne. Funkcje te określane są terminem z języka angielskiego: „double-”, „triple-” oraz „quadruple – zeta”, w zależności od liczby funkcji Gaussa opisujących daną powłokę. Oznaczenia tych baz to (DZ), (TZ), (QZ). Bazy „zeta” bywają również rozszerzane o funkcje polaryzacyjne. Wówczas mają one oznaczenia: DZP (double – zeta plus funkcja polaryzacyjna), TZP (triple zeta plus funkcja polaryzacyjna).

Wynikiem rozbudowy baz zeta są bazy typu cc-pVNZ (correlation consistent), które zostały wprowadzone przez Dunninga [16], w celu obliczeń energii metodami uwzględniającymi korelację elektronową. Baza taka zawiera rozszerzone funkcje polaryzacyjne dla orbitali walencyjnych. Dalszą modyfikacją baz cc-pVNZ jest konstrukcja stworzona przez Dunning i Woon [17] w postaci bazy aug-ccpVNZ (augmented correlation consistent), która dodatkowo zawiera funkcje dyfuzyjne i polaryzacyjne odnoszące się do orbitali walencyjnych. Bazy rozszerzone są przeznaczone do obliczeń energii, właściwości stanów wzbudzonych, właściwości elektrycznych oraz poprawnego opisu anionów.

Zastosowanie tego rodzaju baz pozwala uzyskiwać wyniki, które stanowią dobrą zgodność z eksperymentem. Wynikiem tego jest fakt, iż bazy cc-pVNZ oraz aug-cc-pVNZ są jednymi z najczęściej wykorzystywanych baz funkcyjnych w obliczeniach kwantowo-chemicznych. Jednakże systematyczność generowania baz typu aug-cc-pVNZ powoduje szybki wzrost liczby funkcji, co znacząco zwiększa koszty obliczeń, jak i czas obliczeń.

Wybór odpowiedniej bazy, w zależności od celu i metody obliczeń kwantowo chemicznych, stanowi kompromis pomiędzy kosztami, czasem a potrzebną dokładnością obliczeń.

Szczególnym przypadkiem baz funkcyjnych typu „double-”, „triple- zeta”, są bazy określane w literaturze terminem EPR – II i EPR – III. Bazy te zostały skonstruowane przez Barone poprzez modyfikację baz „double-”, „triple- zeta”, w postaci dodatkowych funkcji polaryzacyjnych i dyfuzyjnych [18]. Celem konstruktora była optymalizacja obliczeń parametrów struktury nadsubtelnej rodników, które były prowadzone głównie z zastosowaniem metody DFT i funkcjonału B3LYP. Innym przykładem baz funkcyjnych stosowanych na potrzeby obliczeń dla rodników a w szczególności obliczenia parametrów EPR są bazy funkcyjnych oznaczane w literaturze jako IGLO-III. Konstruktor tych baz jest Feller, który zaproponował kształt bazy IGLO-III jako modyfikację bazy typu „triple- zeta” oraz dodanie funkcji polaryzacyjnych do wszystkich analizowanych atomów [19].

Szczególnym przypadkiem baz są bazy funkcyjnych stosowane do obliczeń parametrów spektroskopowych NMR. Zaliczamy do nich m. in. bazę aug-cc-pVTZ-J, skonstruowaną przez Sauera w wyniku modyfikacji bazy aug-cc-pVTZ tak aby można było przeprowadzić obliczenia wielkości sprzężenia spinowo – spinowego [20]. Innym przykładem jest baza pcJ-n, [21] która została skonstruowana przez Jansena w tym samym celu co powyższa baza.

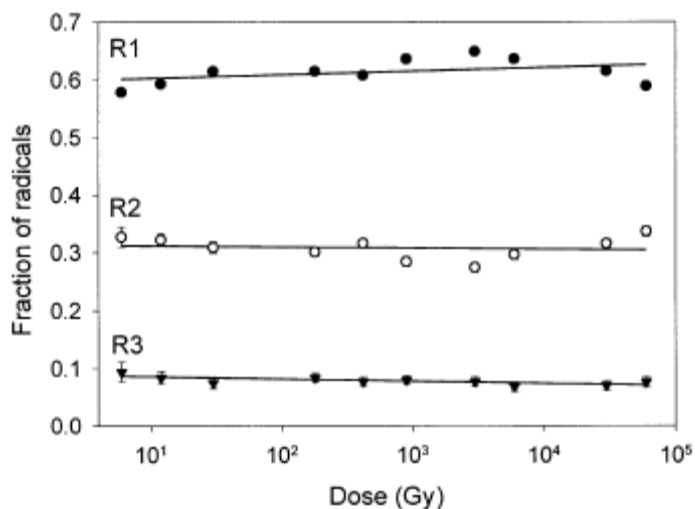
Rozdział 4

Przegląd literaturowy wyników badań dotyczących zastosowania l-alaniny jako elementu biosensora promieniowania jonizującego.

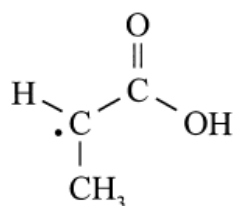
Alanina jest jednym z dwudziestu aminokwasów wchodzących w skład białek występujących w organizmach żywych. Wzór sumaryczny alaniny to $C_3H_7NO_2$ [22]. Jej masa molowa wynosi 89,0932g/mol, a skład atomowy cząsteczki tego aminokwasu sprawia, że posiada on właściwości fizyczne i chemiczne związane m. in. z absorpcją promieniowania jonizującego zbliżone do tkanki miękkiej pozbawionej wody [23]. Średnia efektywna liczba porządkowa alaniny, która wynosi $Z_{ala}=7,2$, jest zbliżona do analogicznej wartości tkanki mięśniowej, która jest określona jako $Z_{tk}=7,64$ [24]. Z uwagi na te cechy można wysnuć wniosek, iż procesy absorpcji i rozpraszania energii promieniowania jonizującego w tkankach mięśniowych i alaninie będą przebiegały podobnie. Alanina wykazuje również właściwości dozymetryczne, ponieważ pod wpływem promieniowania jonizującego tworzą się z niej stabilne czasowo rodniki, których koncentracja jest proporcjonalna do dawki pochłoniętej w objętości próbki. Po odkryciu tych właściwości, stała się ona przedmiotem zainteresowania badaczy, szczególnie tych zajmujących się tematyką EPR, ponieważ metoda ta zajmuje się badaniami związków wolnorodnikowych. Na początku lat 60-tych XX w. ukazały się pierwsze prace dotyczące stabilnych rodników tworzonych w strukturze alaniny [25], a także charakterystyki sygnału EPR powstałego po napromienieniu tego aminokwasu [26]. Tematykę tą poruszał m.in. Bradshaw i wps. [120] Jednak w tym czasie alanina nie była jeszcze zbyt popularnym przedmiotem badań dozymetrycznych. Ponadto początkowo zastosowanie alaniny znajdowano wyłącznie w technice i przemyśle. W latach 80-tych XX w. Regulla wraz ze współpracownikami [27, 28, 29, 30], szczegółowo scharakteryzował właściwości dozymetryczne alaniny, zoptymalizował pomiar sygnału EPR, a także zbadał wpływ czynników fizycznych na wielkość sygnału oraz jego stabilność w czasie. Regulla do swoich badań najczęściej używał pastylek wytworzonych z mieszaniny alaniny i parafiny. Z biegiem lat technika pomiarowa wykorzystywana przez różnych badaczy ulegała ciągłemu doskonaleniu. Ponadto aparatura pomiarowa tj. spektrometry EPR stawały się coraz nowocześniejsze i stale zwiększały swoją czułość. Skutkiem tego jest możliwość zastosowania właściwości dozymetrycznych alaniny w medycynie, a szczególnie w dozymetrii promieniowania jonizującego [31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

W temperaturze pokojowej w próbce alaniny rodniki występują w trzech formach [42, 43, 44, 45], a ich udział w widmie EPR nie jest równy. Formy rodników oznaczane są jako

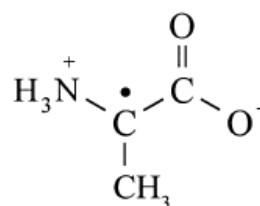
R1, R2 oraz R3, a ich udział procentowy w widmie wynosi odpowiednio: (55 do 60)%, (30 do 35)% oraz (5 do 10)% [42, 43], (rysunek 4.1). Rodniki powstałe na skutek jonizacji cząsteczki l-alaniny przedstawia poniższy (rysunek 4.2).



Rysunek 4.1 Koncentracja rodników R1, R2 i R3 l-alaniny w funkcji dawki promieniowania [44].

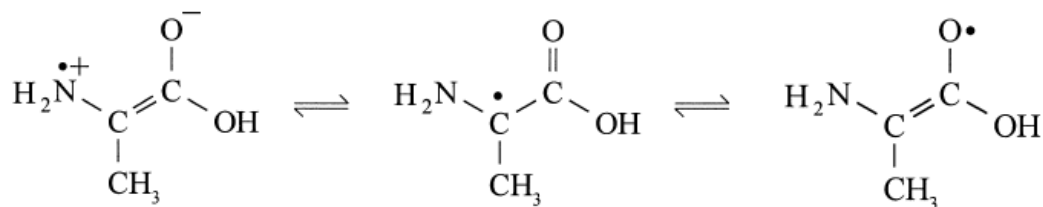


Struktura R1 (SAR)



Struktura R2

Struktura R3

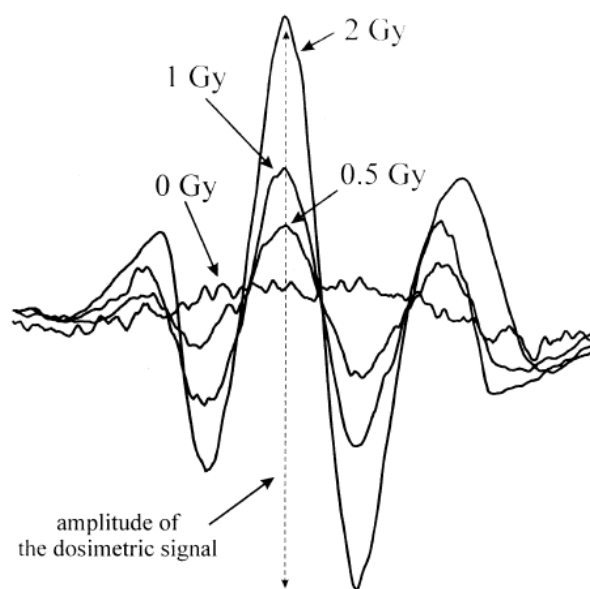


Rysunek 4.2 Rodniki R1, R2, R3, powstałe na skutek radiolizy l-alaniny [42, 43].

Największy udział w strukturze widma EPR wykazuje forma rodnika R1, która powstaje w wyniku deaminacji cząsteczki l-alaniny (dane literaturowe określają rodnik R1 terminem SAR1 – Stable Alanine Radical) [42]. Widmo EPR napromienionej alaniny jest efektem

występowania struktury nadsubtelnej centrum paramagnetycznego, która powstaje w wyniku oddziaływania niesparowanego spinu elektronu pozostałego po wiązaniu grupy aminowej w cząsteczce alaniny, z protonem przy węglu C(2) oraz trzema protonami grupy metylowej. W efekcie otrzymywane jest widmo EPR, typowe dla oddziaływań spinu z czterema równocennymi protonami, czyli kwintet o stosunku amplitud 1:4:6:4:1 [46].

W alaninie koncentracja wolnych rodników powstałych w wyniku absorpcji promieniowania jonizującego stanowi miarę dawki pochłoniętej. Koncentrację rodników można określić przez dwukrotne całkowanie sygnału pierwszej pochodnej krzywej absorpcji, mierzona jest wtedy intensywność linii absorpcji. Istnieje również inny sposób określenia intensywności sygnału EPR próbki. Dzięki niezmienności kształtu sygnału w funkcji pochłoniętej dawki, ilość wolnych rodników w naświetlanej próbce jest proporcjonalna do amplitudy pierwszej pochodnej sygnału EPR, (rysunek 4.3).

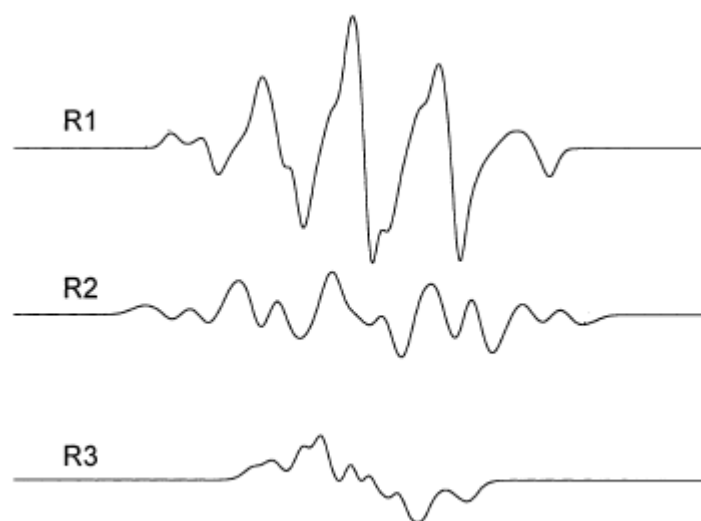


Rysunek 4.3 Widmo EPR dla detektora l-alaninowego napromienionego typowymi dawkami promieniowania jonizującego stosowanymi w obrębie jednej frakcji terapeutycznej radioterapii (0.5Gy, 1Gy, i 2Gy). Widmo dla przypadku 0 Gy, to widmo dla detektora nienapromienionego [31].

Metoda ta jest znacznie dokładniejsza od pomiaru na podstawie podwójnego całkowania linii powstałego widma. Przy użyciu tego sposobu badacz jest w stanie określić liczbę wolnych rodników nawet w próbkach dających słabe, zaszumione sygnały [31]. W związku z tym metoda ta jest zalecana przez protokoły dozymetryczne i znajduje się w powszechnym użyciu [47, 48]. Jednak w badaniach opartych na pomiarach amplitudy sygnału EPR potrzebna jest

kalibracja próbki referencyjnej względem sygnału EPR oraz kalibracja względem innego rodzaju dozymetru np. komory jonizacyjnej posiadającej aktualne świadectwo kalibracji .

Czynnikami wpływającymi niekorzystnie na kształt i intensywność widma EPR rodników alaniny są temperatura i promieniowanie UV. Po pierwsze, efekt rekombinacji powoduje wysoka temperatura 80°C [49, 50, 51, 52], a po drugie światło słoneczne lub sztuczne, oddziałujące na badaną próbkę [54, 53]. Według Malinena, który badał powyższe zagadnienie, teoretyczne widma rodników R1, R2 oraz R3 wyglądałyby następująco (rysunek 4.4):



Rysunek 4.4 Widmo EPR dla trzech różnych rodników l-alaniny uzyskane metodą symulacji [44].

Ponadto Ciesielski oraz jego współpracownicy [53, 54] wykazali, iż sztuczne światło działające na napromienioną promieniowaniem γ próbkę alaniny powoduje zanik rodników R1, zwiększenie liczby rodników R2 i nie ma wpływu na ilość rodników R3. Przy oddziaływaniu na taką samą próbkę światła słonecznego zaobserwowali zanik zarówno rodników R1 jak i rodników R2, natomiast liczba rodników R3 uległa zwiększeniu. Ponadto badacze udowodnili, że oba rodzaje światła - tak naturalne, jak i sztuczne – powodują znaczny zanik amplitudy centralnej linii widma EPR (rysunek 4.3), która wykorzystywana jest jako wskaźnik dawki w badaniach dozymetrycznych.

Zagadnienie zmiany intensywności sygnału EPR próbek l-alaniny w przedziale kilku godzin po napromienieniu badali Nagy i Desrosiers [55]. Uzyskane dane przedstawiają spadek i późniejszą stabilizację intensywności sygnału EPR na poziomie 1,5% w odniesieniu do wartości wyjściowej, po upływie trzech godzin od napromienienia próbki alaniny dawkami od

10Gy do 100 kGy. Bardzo ważnym i ciekawym wnioskiem z powyższej pracy jest fakt, iż czas stabilizacji sygnału EPR jest zależny od dawki promieniowania jonizującego pochłoniętego przez próbkę alaniny. Im większa dawka pochłonięta promieniowania tym dłuższy czas stabilizacji sygnału EPR.

W roku 2000 Nagy i wsp. [56] opublikowali wyniki badań dotyczące wpływu temperatury otoczenia na koncentrację rodników w dozymetrze alaninowym w trakcie jego napromieniania. Badanie dotyczyło dozymetrów wyprodukowanych przez National Institute of Standards and Technology oraz firmę Bruker, które składały się z mieszaniny alaniny i polietylenu. Wyniki badań okazały się zgodne z wynikami poprzednich prac [57, 58], tj. czułość dozymetru alaninowego w funkcji temperatury zależy od dawki promieniowania jonizującego pochłoniętej w objętości dozymetru. W odpowiedzi na publikacje dotyczące wpływu temperatury na pomiary dozymetryczne z zastosowaniem l-alaniny powstała ciekawa praca dotycząca stabilizacji termicznej dozymetrów alaninowych [59].

Wyniki badań przedstawiające wpływ wilgotności otoczenia na napromienione i przechowywane w warunkach laboratoryjnych dozymetry alaninowe (80% L-alaniny, 20% polietylenu) przedstawił w swej pracy Slepthonok [60]. Publikacja ta zawiera wyniki analizy spadku natężenia sygnału EPR dozymetrów alaniny w ciągu roku od napromienienia. Zebrane wyniki badań przedstawia tabela 4.1.

Tabela 4.1 Wpływ upływu czasu na intensywność sygnału EPR dla dozymetrów l-alaninowych, [60].

Dawka D [kGy]	Wilgotność względna [%]	Czas po napromienieniu	Spadek natężenia sygnału EPR [%]
1			
10	0	6 miesięcy	1
100		3 miesiące	
1			
10	60	1 rok	5
100			7 - 8

4.1 Zastosowanie dozymetrii alaninowej do pomiarów dawek promieniowania jonizującego w medycynie.

L-alanina jest aktualnie stosowanym i uznanym materiałem do budowy detektorów promieniowania jonizującego na potrzeby radioterapii onkologicznej oraz medycyny nuklearnej. Dozymetria alaninowa/EPR posiada również akredytację takich organizacji jak: International Atomic Energy Agency (IAEA) [48] i może być stosowany jako alternatywny dozymetr do stosowanego rutynowo detektora typu Termoluminescent Dosimeter (TLD) [61] oraz National Institute of Standards and Technology (NIST) [62]. Na przestrzeni lat opublikowano wiele prac dotyczących pomiarów dawek promieniowania jonizującego, pochodzących od wiązek fotonów, elektronów, protonów i neutronów przeprowadzanych za pomocą dozymetrów alaninowych, które wykorzystywane są w radioterapii onkologicznej [63, 64, 65, 66, 67, 68]. Do najważniejszych należą m.in. prace grupy badawczej Ciesielski i wsp. [31] przedstawiające możliwości zastosowania dozymetrów alaninowych do pomiarów dawek promieniowania *in vivo*, weryfikacji planów leczenia radioterapią, audytu dozymetrycznego liniowych akceleratorów medycznych.

Powyższą tematykę poruszali także inni badacze. W pracach Haskell i wsp. (1998) [69] oraz Hayes i wsp. (2000) [70] wykazano, iż niepewność pomiarowa dla dawki promieniowania 100mGy wynosi 5%. Jest to wielkość dopuszczająca dozymetry alaninowe do pomiarów dawek promieniowania w obrębie jednej frakcji terapeutycznej (seansu) (0.5Gy do 5Gy [71]). Zaletą dozymetru alaninowego jest również efekt kumulacji dawki promieniowania jonizującego w objętości dozymetru [46], dzięki czemu może on być stosowany w trakcie całego okresu trwania leczenia radioterapią. Ważnym aspektem dozymetrii alaninowej jest możliwość stosowania jej w przypadku mieszanych wiązek promieniowania (np. wiązek fotonów i elektronów) podczas radioterapii, ponieważ alanina wykazuje stałą wydajność radiacyjną niezależną od rodzaju promieniowania [31, 36]. Przeprowadzono również analizę zastosowania dozymetrów alaninowych w radioterapii śródtkankowej tj. brachyterapii, gdzie stosuje się głównie źródła promieniowania gamma: ^{192}Ir , ^{60}Co , ^{137}Cs [72]. Interesujące z punktu zastosowania dozymetrów alaninowych są również prace [73] dotyczące terapii protonowej stosowanej np. w leczeniu radioterapeutycznym czerniaka oka. Innym przykładem zastosowania dozymetrów alaninowych jest weryfikacja planów leczenia radioterapią realizowanych techniką Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) [73], oraz Total Body Irradiation (TBI) [74]. TBI jest to

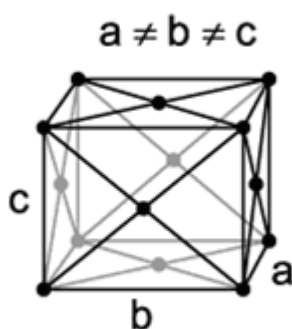
technika napromieniania dróg limfatycznych, węzłów chłonnych i szpiku kostnego, stosowana przed jego przeszczepem w nowotworach złośliwych układu limfatycznego.

4.2 Przegląd dotychczasowych badań dotyczących właściwości fizykochemicznych l-alaniny.

Prace obejmujące obszar zastosowań l-alaniny do pomiarów dawki promieniowania jonizującego były prowadzone równocześnie z badaniami właściwości fizycznych rodników l-alaniny. Były to prace, zarówno teoretyczne jak i doświadczalne, dotyczące właściwości spektroskopowych produktów jonizacji l-alaniny. Poniżej przedstawione zostaną wybrane zagadnienia związane z badaniami właściwości fizykochemicznych l-alaniny.

4.2.1 Struktura geometryczna i właściwości spektroskopowe l-alaniny.

W roku 1966 Simpson i Marsh opublikowali jedną z pierwszych prac dotyczących analizy krystalograficznej l-alaniny. W swych badaniach kryształy l-alaniny badali metodami analizy dyfrakcyjnej promieni rentgenowskich X. Wynikiem badań było stwierdzenie, że l-alanina należy do układu krystalograficznego rombowego, o grupie przestrzennej $P2_12_12_1$, a wymiary komórki elementarnej kryształu to $a = 5,784 \text{ \AA}$, $b = 12,343 \text{ \AA}$, $c = 6,032 \text{ \AA}$ [75], (rysunek 4.5).



Rysunek 4.5 Układ rombowy, wraz z zaznaczonymi krawędziami komórki przestrzennej $a \neq b \neq c$, [75]. Węzły stanowią atomy cząsteczki l-alaniny.

Powyższe wyniki badań zostały potwierdzone także przez inne grupy badawcze [76]. Przy zastosowaniu do badań kryształu l-alaniny metody analizy dyfrakcyjnej neutronów, wyznaczone eksperymentalnie wymiary komórki elementarnej przedstawiają się następująco: $a = 5,783 \text{ \AA}$, $b = 12,324 \text{ \AA}$ $c = 6,025 \text{ \AA}$.

W 2003 r. Rodney Sullivan, Marek Pyda i wsp. w opublikowanej pracy [77] przedstawili studium krystalograficzne kilku aminokwasów, w tym l-alaniny. Wyznaczone przez nich wymiary komórki elementarnej, metodami dyfrakcji rentgenowskiej, są zgodne z poprzednimi i wynoszą odpowiednio: $a = 5,781 \text{ \AA}$, $b = 12,340 \text{ \AA}$, $c = 6,028 \text{ \AA}$.

Oprócz badań nad strukturą krystalograficzną prowadzono doświadczenia mające na celu scharakteryzowanie innych właściwości fizykochemicznych l-alaniny m.in. związanych z amfoterycznością tego prostego aminokwasu [22]. Badania prowadzono dla l-alaniny występującej zarówno w fazie stałej, gazowej, jak i w roztworze wodnym.

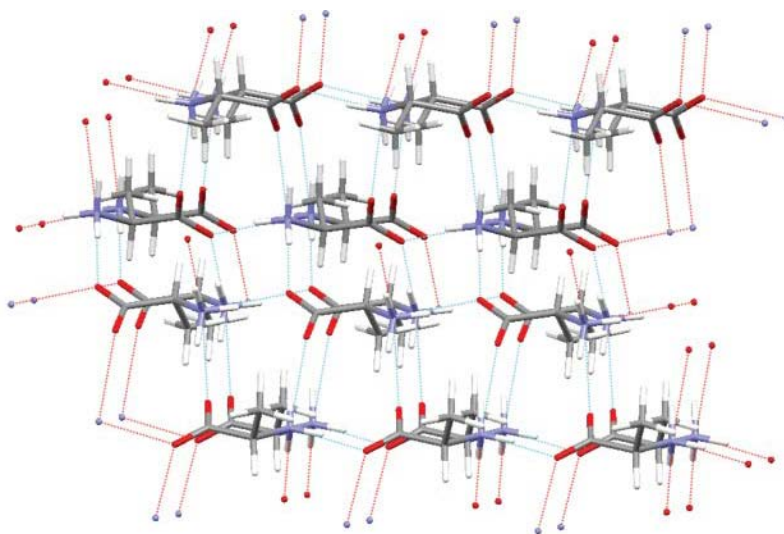
l-alanina, jak większość aminokwasów, w fazie gazowej nie występuje w postaci jonu, co zostało przedstawione w pracy [78]. Jest to wnikliwa analiza konformerów geometrycznych l-alaniny, z zastosowaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej. Metody te posłużyły do określenia długości wiązań i kątów w cząsteczce, a także symulacji teoretycznego widma oscylacyjnego molekuly l-alaniny w fazie gazowej. Inne prace dotyczące tego zagadnienia to m.in. [78, 79, 80, 81].

W roztworach wodnych, jak i w fazie stałej, alanina występuje w postaci jonu obojnaczego tzw. zwitterionu, w szerokim zakresie pH. Efekt ten jest uzyskiwany na skutek stabilizującego oddziaływania elektrostatycznego otoczenia jonu obojnaczego. Junk i Svec w roku 1963 opublikowali pracę, w której wykorzystali do analizy l-alaniny metodę spektroskopii masowej oraz opisali występowanie zjonizowanych form cząsteczek l-alaniny w tym jonu obojnaczego [82]. Rozwinięciem tych badań były prace zaprezentowane m.in. przez Emadeddin Tajkhorshid, K. J. Jalkanen i Sandor Suhai [83]. W/w badacze zastosowali do studiów nad konformacją geometryczną i modelami widm oscylacyjnych l-alaniny w roztworze wodnym metodę obliczeniową chemii kwantowej DFT (*Density Functional Theory*). W wyniku prowadzonych prac stwierdzili występowanie sześciu głównych form konformacyjnych jonu obojnaczego l-alaniny w roztworze wodnym. Wykonali obliczenia optymalizacji geometrii dla modelu cząsteczki l-alaniny, w otoczeniu kilku molekuł wody w połączeniu z modelem roztworu Onagera, który pozwala definiować stałą dielektryczną rozpuszczalnika [84]. Następnie dla tak zoptymalizowanego modelu uzyskali teoretyczne widmo oscylacyjne l-alaniny. Do obliczeń zastosowali metodę DFT z funkcjonalem B3LYP oraz bazą funkcyjną 6-31G*. Należy dodać, iż wszystkie obliczenia zostały wykonane przy pomocy popularnego pakietu do obliczeń chemii kwantowej Gaussian 94 [85, 86]. Efektem pracy w/w grupy badawczej [83] jest uzyskanie dla modelu cząsteczki l-alaniny w roztworze wodnym wyników w postaci widma oscylacyjnego bliższych danym doświadczalnym niż analogiczne wyniki obliczeń dla l-alaniny w fazie gazowej. Obliczenia przeprowadzone metodą DFT,

B3LYP/6-31G* dla l-alaniny w roztworze wodnym pozwoliły stwierdzić że: długości wiązań, wartości kątów oraz model widma oscylacyjnego dla atomów molekuly są zbliżone do wartości doświadczalnych.

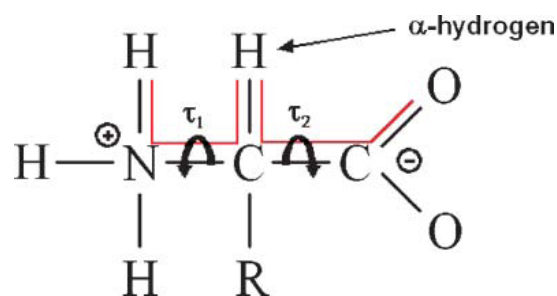
Kontynuacją wyżej opisanych prac zajęli się Ana R. Garcia i wsp., wykonując badania zależności widma oscylacyjnego l-alaniny w roztworze wodnym o zmiennym pH [87]. W toku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że przy wartościach pH powyżej punktu $pK_{aII} = 9.69$ występuje większa koncentracja anionów l-alaniny w odniesieniu do koncentracji jonów obojnych, natomiast przy wartościach pH poniżej punktu $pK_{aI} = 2.34$ występuje wyższa koncentracja kationów l-alaniny [88]. Ponadto potwierdzona została dotychczasowa wiedza dotycząca występowania l-alaniny w roztworze wodnym w postaci zwitterionu w szerokim zakresie pH.

Większość dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących fizycznych i chemicznych właściwości l-alaniny opiera się na teoretycznych metodach chemii kwantowej i modelowaniu molekularnym, a także na weryfikacji doświadczalnej z zastosowaniem metod spektroskopii molekularnej. Jako przykład można przytoczyć tu pracę m.in. Timothy'ego G. Coopera, Williama Jonesa i wsp., [89] w której poddano analizie model periodycznej siatki molekuł l-alaniny, mających symulować l-alaninę w formie krystalicznej (rysunek 4.6).



Rysunek 4.6 Model kryształu l-alaniny [89].

Przy zastosowaniu metody DFT z potencjałem B3LYP/6-31G** przeprowadzono analizę konformerów l-alaniny. Obliczono również energię potencjalną konformerów w funkcji kątów torsyjnych τ_1 i τ_2 (rysunek 4.7).



Rysunek 4.7 Cząsteczka l-alaniny z zaznaczonymi kątami τ_1 i τ_2 [89].

Kąty torsyjne τ_1 i τ_2 odgrywają ważną rolę w upakowaniu cząsteczek l-alaniny w postaci kryształu. Zmiany ich wartości są brane pod uwagę w analizie drgań skręcających grupy aminowej, kąt τ_1 i kąt τ_2 dla grupy karboksylowej. Według danych literaturowych, na których opiera się również niniejsza praca, optymalne pod względem energetycznym wartości kątów torsyjnych przyjmują wartości: $\tau_1 = 176^\circ$ i $\tau_2 = 45^\circ$. Analiza przeprowadzona przez Timothy'ego G. Coopera, Williama Jonesa i wsp. z zastosowaniem metody DFT wykazała, że wartości kątów torsyjnych τ_1 i τ_2 są nieco różne od tych wyznaczonych doświadczalnie i wynoszą odpowiednio: $\tau_1 = 120^\circ$ i $\tau_2 = 61^\circ$.

Dopełnieniem badań dotyczących konformerów l-alaniny w postaci krystalicznej są prace związane z analizą konformerów l-alaniny w roztworze wodnym. Można tu odnieść się do pracy Osamu Kikuchi i wsp. [90]. W publikacji tej przedstawiono obliczenia optymalizacji geometrii cząsteczki l-alaniny w roztworze wodnym z zastosowaniem metody obliczeniowej chemii kwantowej orbitali molekularnych (MO) [91], połączonej z modelem solwatacyjnym opartym na ogólnym równaniu Borna (GB) [92] i bazą funkcyjną 6-31++G*. Zastosowano także metodę obliczeniową chemii kwantowej z grupy metod ab initio zwaną metodą MP2, która oparta jest na teorii perturbacji Møller–Plesseta. W pracy tej przeprowadzono obliczenia energii solwatacji molekuly l-alaniny oraz optymalizację geometrii konformerów l-alaniny dla zmiennych wartości kątów Φ i Θ . Są to kąty analogiczne do kątów torsyjnych τ_1 i τ_2 występujących w modelu, w pracy [89]. Uzyskane przez badaczy wyniki zaprezentowano w tabelach 4.2 i 4.3, zamieszczonych poniżej.

Tabela 4.2 Energia solwatacji (kcal mol⁻¹) dla czterech konformerów – (0,0), (60,0), (60,9), (0,90) jonu obojnego l-alaniny w roztworze wodnym, [90].

Metoda	(0,0)	(60,0)	(60,90)	(0,90)
MIDI-4(d)	-43.5 (0.0)	-45.1 (-1.6)	-46.7 (-3.2)	-47.7 (-4.2)
6-31++G*	-53.5 (0.0)	-54.3 (-0.8)	-56.3 (-2.8)	-56.9 (-3.4)
MP2/MIDI-4(d)	-38.5 (0.0)	-40.4 (-1.9)	-42.1 (-3.6)	-
MP2/6-31++G*	-48.6 (0.0)	-49.6 (-1.0)	-51.8 (-3.2)	-
Monte Carlo	(0.0)	(-2.5)	(-3.7)	-

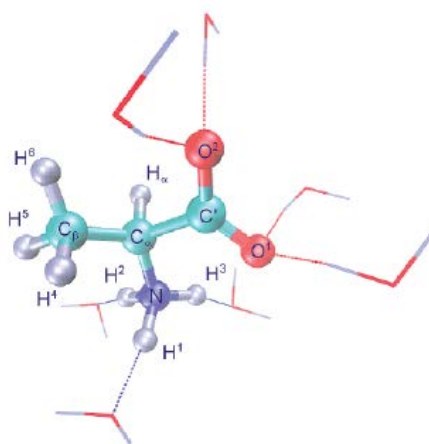
^aWartości względne podano w nawiasach.

Tabela 4.3 Długości wiązań i wartości kątów dla jonu obojnego l-alaniny w roztworze wodnym, po optymalizacji geometrii metodą: 6-31++G*/GB, [90]. Oznaczenia atomów przedstawiono na rysunku 4.8.

Długość wiązania (Å)		Kąt między wiązaniami (°)		Kąt między płaszczyznami (°)	
C ^α – C ¹	1.531	C ^α C ¹ O ¹	116.2	NC ^α C ¹ O ¹	9.1
C ¹ – O ¹	1.240	C ^α C ¹ O ²	115.4	NC ^α C ¹ O ²	187.5
C ¹ – O ²	1.237	NC ^α C ¹	109.6	C ¹ C ^α NH ¹	-39.0
C ^α – N	1.488	C ¹ C ^α C ²	114.7	C ¹ C ^α NH ²	199.8
C ^α – C ²	1.521	C ¹ C ^α H ^α	107.3	C ¹ C ^α NH ³	80.3
C ^α – H ^α	1.084	C ^α NH ¹	111.2	C ¹ C ^α C ² H ^β	177.9
N– H ¹	1.014	C ^α NH ²	111.5	O ¹ C ¹ C ^α C ²	132.8
N– H ²	1.107	C ^α NH ³	112.7	O ¹ C ¹ C ^α H ^α	104.9
N– H ³	1.013	C ^α C ² H ^β	110.7		
C ² – H ^β	1.084				

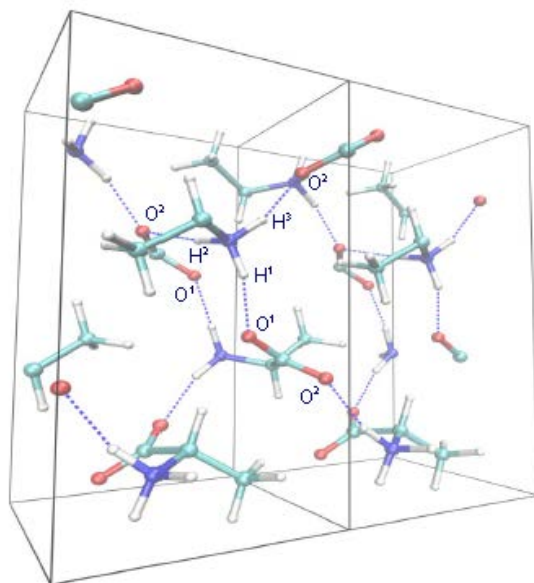
W 2007 roku Ivan M. Degtyarenko i wsp. opublikowali pracę [94] opisującą wyniki prowadzonych badań aminokwasów gdzie autorzy zastosowali metodę obliczeniową chemii kwantowej (zwaną metodą dynamiki molekularnej Borna – Oppenheimera [93]). Poddali oni analizie w/w metodą skonstruowane przez siebie modele l-alaniny w roztworze wodnym. Ze względu na wieloatomowy skład klastra obliczeniowego optymalizacja geometrii molekuly została przeprowadzona w trzech etapach obliczeniowych. Model obliczeniowy l-alaniny w

wodzie to jon obojnaczy l-alaniny w otoczeniu molekuł wody. Centralnie położona molekula l-alaniny stabilizowana jest w tym modelu poprzez wiązania wodorowe grupy aminowej NH_3^+ z atomami tlenu otaczających ją molekuł wody. Proces stabilizacji jonu obojnego l-alaniny zachodzi również poprzez wiązanie wodorowe atomów tlenu grupy karboksylowej COO^- i atomów wodoru otaczających molekuł wody. W pracy przeprowadzono obliczenia optymalizacji geometrii cząsteczki l-alaniny dla modelu molekularnego określanego jako „first hydration shell”, który przedstawiony został na rysunku 4.8.



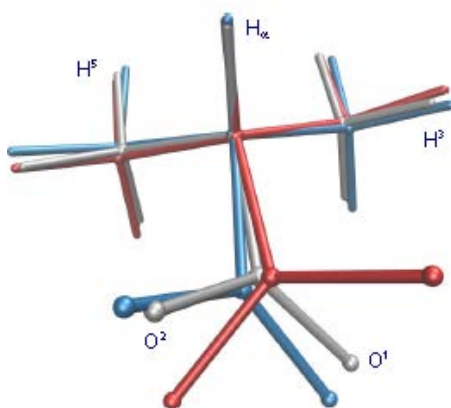
Rysunek 4.8 Model „bulk water” i „hydration Shell” dla l-alaniny w roztworze wodnym [94].

W kontynuacji poprzednich prac badania prowadzone przez Ivan M. Degtyarenko i wsp. zostały rozszerzone o analizę l-alaniny w kryształach. Zastosowano metody obliczeniowe mechaniki kwantowej, głównie metody dynamiki molekularnej Borna – Oppenheimera i opisano w pracy [95]. Model do obliczeń optymalizacji geometrii molekuly l-alaniny przedstawiony w powyższym opracowaniu bazuje na przestrzennym upakowaniu cząsteczek l-alaniny w kryształach, który jako pierwszy zaproponował Lehmann i wsp. [76]. Cząsteczka l-alaniny w postaci jonu obojnego w tym modelu, stabilizowana jest poprzez wiązania wodorowe grupy aminowej z atomami tlenu molekuł sąsiadujących oraz poprzez wiązania wodorowe pomiędzy grupą karboksylową a atomami wodoru sąsiadujących molekuł. Model ten przedstawiono na poniższym rysunku (rysunek 4.9).



Rysunek 4.9 Model dwóch sąsiadujących komórek elementarnych kryształu l-alaniny [95].

Wszystkie obliczenia dotyczące optymalizacji geometrii molekuly l-alaniny w kryształach również zostały wykonane w trzech etapach, tak jak w przypadku modelu l-alaniny w roztworze wodnym. Uzyskane wyniki porównano z danymi otrzymanymi dla modelu l-alaniny w wodzie, a także skonfrontowano z danymi doświadczalnymi uzyskanymi metodą dyfrakcji neutronowej. Zebrane wyniki badań zostały przedstawione w tabelach 4.4 i 4.5 oraz na rysunku molekuly l-alaniny w kryształach (rysunek 4.10). Rysunek obrazuje zmiany geometrii cząsteczki, tj. długości wiązań oraz wartości kątów między atomami dla proponowanych modeli l-alaniny w wodzie, w postaci krystalicznej i z danymi doświadczalnymi.



Rysunek 4.10 Struktura przestrzenna jonu obojnaczego l-alaniny: kolorem srebrnym zaznaczono eksperymentalną strukturę postaci krystalicznej l-alaniny, kolorem czerwonym zaznaczono eksperymentalną strukturę l-alaniny w roztworze wodnym, kolorem niebieskim zaznaczono strukturę obliczoną metodami mechaniki kwantowej [95].

Tabela 4.4 Wybrane dane struktury jonu obojnaczego l-alaniny w postaci długości wiązań i wartości kątów między odpowiednimi atomami w cząsteczce. Pierwsze dwie kolumny stanowią obliczenia uzyskane na podstawie modelu l-alaniny w otoczeniu 50 molekuł wody. Trzecia kolumna zawiera dane, uzyskane na podstawie obliczeń dla modelu l-alaniny w postaci krystalicznej. Dwie ostatnie kolumny to dane doświadczalne uzyskane na podstawie badań dyfrakcyjnych [95].

	Woda (300K)	Woda (0K)	Kryształ (0K)	Kryształ (298K)	Kryształ (23K)
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	1.542	1.532	1.533	1.523	1.526
$C_{\alpha}-N$	1.505	1.497	1.468	1.486	1.488
$C_{\alpha}-C'$	1.565	1.554	1.558	1.531	1.535
$C'-O^1$	1.290	1.301	1.261	1.240	1.248
$C'-O^2$	1.273	1.264	1.287	1.257	1.267
$N-H^i \pm \sigma$	1.067 ± 0.013	1.069 ± 0.011	1.075 ± 0.041	1.035 ± 0.011	1.048 ± 0.032
$C_{\beta}-H^i \pm \sigma$	1.122 ± 0.000	1.115 ± 0.001	1.116 ± 0.003	1.081 ± 0.001	1.096 ± 0.020
$\langle C'-C_{\alpha}-N$	110.2	109.5	111.6	110.1	110.0
$\langle C'-C_{\alpha}-C_{\beta}$	113.2	114.1	110.5	111.1	111.1
$\langle N-C_{\alpha}-C_{\beta}$	110.6	110.1	109.1	109.7	109.8
$\langle O^2-C'-O^1$	125.8	124.7	125.8	125.6	125.8
$\langle C_{\alpha}-C'-O^1$	117.1	115.8	120.4	118.4	118.3
$\langle C_{\alpha}-C'-O^2$	116.8	119.2	113.8	116.0	115.9
$\langle H^i-N-H^j \pm \sigma$	107.9 ± 1.020	107.9 ± 3.200	107.7 ± 1.500	109.0 ± 1.4	109.2 ± 0.56
$\langle H^i-C_{\beta}-H^j \pm \sigma$	108.4 ± 0.3	108.7 ± 0.3	108.3 ± 0.2	108.5 ± 0.4	108.9 ± 0.2
$N-C_{\alpha}-C'-C_{\beta}$	124.7	-123.8	121.5	-121.8	-121.8
$C_{\alpha}-C'-O^1-O^2$	174.2	178.7	-179.5	179.8	179.5
$O^1-C_{\alpha}-C'-H_{\alpha}$	98.7	-56.7	-142.0	-135.4	-135.4
$H^3-N-C_{\alpha}-H_{\alpha}$	60.4	51.6	53.0	53.7	55.5
$H^5-C_{\beta}-C_{\alpha}-H_{\alpha}$	58.96	58.9	59.7	55.5	55.2

Tabela 4.5 Długość wiązań i wartości kątów dla atomów wodoru (i połączonych z nimi innych atomów) w modelach l-alaniny w wodzie i kryształach [95].

	kryształ		woda	
H^1-O^1	1.861 ^a	1.850 ^b	(N)H ₃ -O _w	1.74 ^c
H^2-O^2	1.780	1.458	(C)O ₂ -H _w	1.74
H^3-O^2	1.828	1.876		
$N-O^1$	2.853	2.874	N-O _w	2.77
$N-O^2$	2.813	2.579	(C)O ₂ -O _w	2.68
$N-O^2$	2.832	2.918		
$\langle N-H^1..O^1$	160.9	163.1	$\langle N-H..O_w$	liniowy ^d
$\langle N-H^2..O^2$	168.1	177.5	$\langle O..H_w-O_w$	liniowy
$\langle N-H^3..O^2$	163.7	172.0		

^a Dane dotyczące struktury cząsteczki l-alaniny uzyskane na podstawie metody dyfrakcji neutronów w temp. 298K [76], bez optymalizacji geometrii przestrzennej.

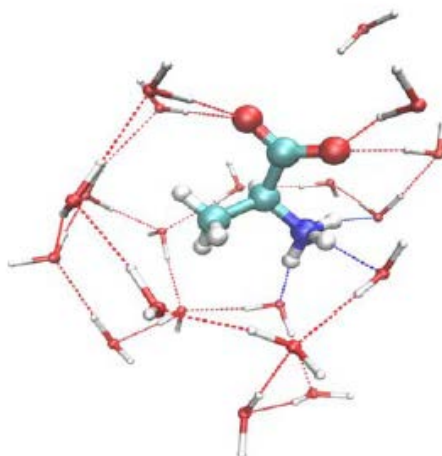
^b Pełna optymalizacja struktury krystalicznej.

^c Obliczenia odległości pomiędzy najbliższymi sąsiadującymi atomami przeprowadzona z zastosowaniem dystrybucji funkcji radialnej [94].

^d Wartości kątów między atomami po zastosowaniu korekcji stożka [94], [95].

W podsumowaniu pracy [95] autorzy zwracają uwagę na znaczne różnice długości wiązań i orientacji przestrzennej grupy karboksylowej (COO^-) w cząsteczce l-alaniny w roztworze wodnym i w postaci krystalicznej. W przypadku l-alaniny w roztworze wodnym długość wiązań pomiędzy atomami $\text{C}'\text{-C}^1$ oraz $\text{C}'\text{-C}^2$ jest silnie zależna od liczby molekuł wody ją otaczających oraz tworzących wiązania wodorowe z grupą karboksylową cząsteczki l-alaniny. Występują również oddziaływania wewnątrz molekularne pomiędzy atomami wodoru grupy aminowej $\text{H}^{1,2,3}$ i atomami tlenu grupy karboksylowej $\text{O}^{1,2}$.

Kontynuacje badań nad właściwościami fizycznymi l-alaniny w roztworze wodnym zawarte zostały w pracy K.J. Jalkanen, I.M. Degtyarenko i wsp. [96]. Badacze przedyskutowali wyniki analizy wodnych roztworów l-alaniny wykonanych metodami spektroskopii absorpcyjnej, w tym spektroskopii Ramana, spektroskopii VA (vibrational absorption) i spektroskopii VCD (vibrational circular dichroism absorption). Przeprowadzone zostały również obliczenia metodami chemii kwantowej dla modeli l-alaniny w roztworze wodnym w postaci modelu klastra składającego się z cząsteczki l-alaniny w otoczeniu 20 molekuł wody (rysunek 4.11), w połączeniu z modelami rozpuszczalnika: modelem Onagera, modelem PCM (Polarized Continuum Model) [97, 98] oraz modelem COSMO (Conductor Screening Model) [99].



Rysunek 4.11 L-alanina + 20 molekuł wody + COSMO, [96].

W celu obliczenia geometrii molekuł i symulacji widm absorpcyjnych l-alaniny w połączeniu z powyższymi modelami rozpuszczalnika, w badaniach zastosowano metody chemii kwantowej w tym metodę DFT tj. OPBE0/TZ2P. Metoda ta jest dostępna w oprogramowaniu obliczeniowym Amsterdam Density Functional (ADF) [100]. Zastosowano również metodę DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą funkcji 6-31G* oraz metodę DFT z funkcjonałem B3PW91 [101] i bazą funkcyjną 6-31G*. Uzyskane w ten sposób dane porównano z wynikami uzyskanymi doświadczalnie i za pomocą obliczeń chemii kwantowej zamieszczonymi w innych pracach. Całość zebrano i przedstawiono w poniższej tabeli (tabela 4.6).

Tabela 4.6 Dane strukturalne dla jonu obojcnazego l-alaniny, [96].

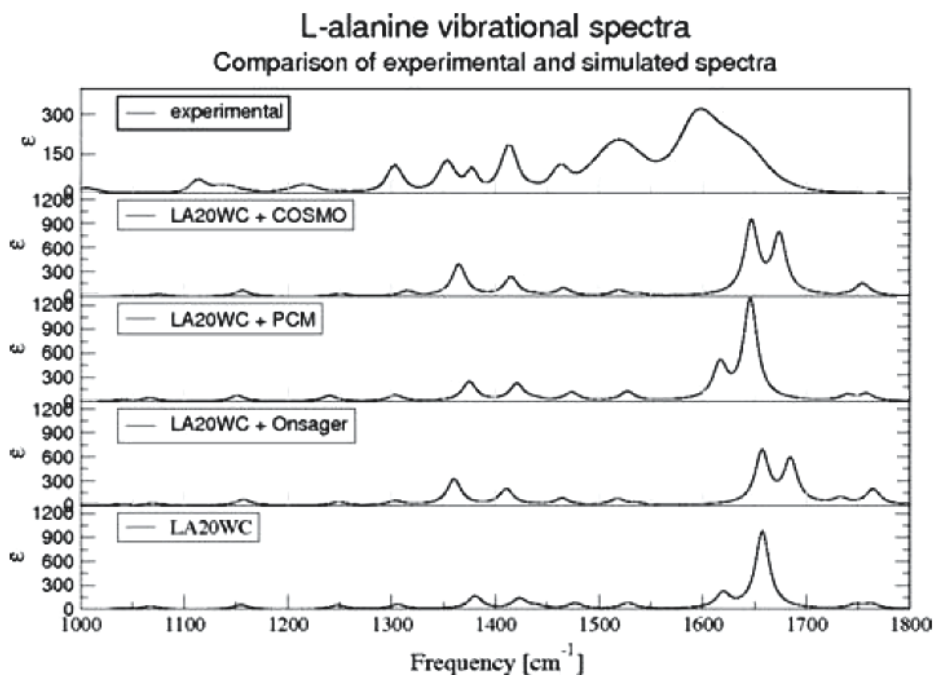
Współrzędne	F'	F''	Ba	Yu'	Lh	I	II	III	IV	I'	II'	III'	IV'
r(N2-C3)	1.5059	1.4975	1.5120	1.5123	1.495	1.489	1.489	1.491	1.490	1.480	1.482	1.482	1.481
r(C3-C4)	1.5621	1.5526	1.5714	1.5616	1.537	1.535	1.537	1.536	1.540	1.528	1.526	1.534	1.534
r(C4-O5)	1.2812	1.2649	1.2463	1.2329	1.266	1.266	1.247	1.264	1.249	1.250	1.256	1.245	1.247
r(C4-O6)	1.2461	1.2633	1.2061	1.2352	1.249	1.265	1.284	1.267	1.280	1.278	1.275	1.277	1.277
r(C3-C7)	1.5296	1.5322	1.5174	1.5223	1.534	1.532	1.530	1.530	1.532	1.526	1.527	1.526	1.526
r(C3-H8)	1.0945	1.0955	1.0810	1.0824	1.032	1.093	1.094	1.093	1.096	1.094	1.094	1.096	1.096
r(N2-H12)	1.0447	1.0477	1.0056	1.0140	1.050	1.033	1.044	1.036	1.053	1.036	1.036	1.056	1.054
r(N2-H13)	1.0442	1.0540	1.0654	1.0135	1.034	1.077	1.060	1.063	1.056	1.073	1.056	1.057	1.057
r(N2-H1)	1.0462	1.0519	1.0045	1.0112	1.039	1.054	1.047	1.055	1.055	1.056	1.063	1.056	1.057
r(C7-H9)	1.0958	1.0956	1.0863	1.0839	1.096	1.094	1.093	1.094	1.095	1.094	1.094	1.094	1.094
r(C7-H10)	1.0919	1.0947	1.0804	1.0806	1.097	1.091	1.089	1.091	1.091	1.091	1.091	1.091	1.091
r(C7-H11)	1.0948	1.0922	1.0862	1.0861	1.096	1.090	1.094	1.089	1.094	1.090	1.090	1.093	1.093
∅(N2-C3-C4)	112.14	113.52	103.87	109.27	110.00	111.14	110.87	110.67	110.17	110.68	110.63	110.34	110.55
∅(C3-C4-O5)	118.64	119.22	112.11	115.80	118.30	118.30	119.68	118.16	118.84	118.74	118.34	118.44	119.06
∅(C3-C4-O6)	114.46	114.85	115.17	115.34	116.00	115.90	115.21	115.95	115.81	116.00	116.76	116.05	115.68
∅(N2-C3-C7)	109.38	109.07	112.19	109.72	109.80	111.09	109.93	110.84	111.14	110.70	110.59	110.93	111.05
∅(C4-C3-C7)	112.02	111.69	113.55	115.02	111.20	108.57	111.42	108.86	110.70	108.14	108.18	110.12	110.71
∅(N2-C3-H8)	106.23	106.47	107.09	105.21	107.00	106.47	106.05	106.65	106.84	106.97	106.93	107.12	106.84
∅(C4-C3-H8)	115.12	106.48	108.83	107.44	108.34	109.13	108.69	109.34	108.20	110.05	110.20	108.48	107.94
∅(C3-N2-H12)	108.65	113.76	113.40	112.50	108.90	110.46	112.34	110.47	111.79	109.69	109.98	111.64	111.54
∅(C3-N2-H13)	109.71	111.76	97.53	107.96	109.30	107.15	110.57	108.01	108.40	107.29	108.11	108.60	108.38
∅(H12-N2-H13)	107.35	107.21	110.31	107.05	110.25	111.03	111.79	110.07	109.96	110.85	110.21	110.24	110.87
∅(C3-N2-H1)	111.83	105.65	114.57	113.45	111.20	109.81	107.31	110.64	110.08	110.01	109.88	109.88	109.87
∅(H12-N2-H1)	109.09	107.36	108.78	105.76	108.74	106.68	107.63	106.77	107.97	106.40	106.39	108.10	107.78
∅(C3-C7-H9)	110.61	110.53	111.02	111.09	110.10	110.88	111.04	110.88	111.34	110.78	111.03	111.20	111.21
∅(C3-C7-H10)	108.74	110.57	107.92	108.49	110.30	110.02	110.32	109.85	109.66	110.16	110.25	109.79	109.80
∅(H9-C7-H10)	108.68	108.44	107.58	113.40	108.33	108.31	108.40	108.41	108.18	108.69	108.72	108.28	108.29
∅(C3-C7-H11)	110.88	109.24	112.29	111.86	110.10	110.34	110.90	110.57	110.99	110.18	110.21	111.00	110.88
∅(H9-C7-H11)	108.61	108.82	108.92	108.32	110.68	108.63	108.41	108.75	108.53	108.43	108.40	108.44	108.46
τ(N2-C3-C4-O5)	-2.76	-3.54	4.29	8.28	-18.60	-34.60	-16.61	-34.02	-15.36	-29.48	-30.48	-15.51	-14.21
τ(N2-C3-C4-O6)	177.18	176.44	-175.92	-173.83	161.50	150.59	163.92	150.71	165.26	155.37	154.14	165.75	166.29
τ(C4-C3-N2-H12)	60.12	67.56	111.36	93.89	60.49	58.91	72.71	58.53	64.41	58.20	59.43	62.14	64.06
τ(C4-C3-N2-H13)	-56.96	-54.22	-4.66	-24.00	-60.01	-62.15	-52.94	-61.91	-58.95	-62.28	-60.95	-59.62	-58.27
τ(C4-C3-N2-H1)	-179.42	-175.00	-122.93	-146.11	-179.71	176.29	-169.19	176.54	-177.61	174.90	176.22	-177.94	-176.50
τ(H9-C7-C3-H8)	170.62	177.65	177.29	178.29	176.04	-169.39	-174.62	-170.26	-174.76	-171.97	-169.45	-174.49	-175.98
τ(H10-C7-C3-H8)	-70.10	-62.64	-65.05	-58.21	-64.46	-49.59	-54.42	-50.45	-55.03	-51.67	-48.89	-54.68	-56.14
τ(H11-C7-C3-H8)	50.06	57.55	55.08	57.11	53.74	70.21	64.77	69.04	64.26	68.06	70.43	64.69	63.25

Długości wiązań r wyrażono w [Å], kąty między atomami τ i θ wyrażono w stopniach. Źródła danych i ich oznaczenia w powyższej tabeli:

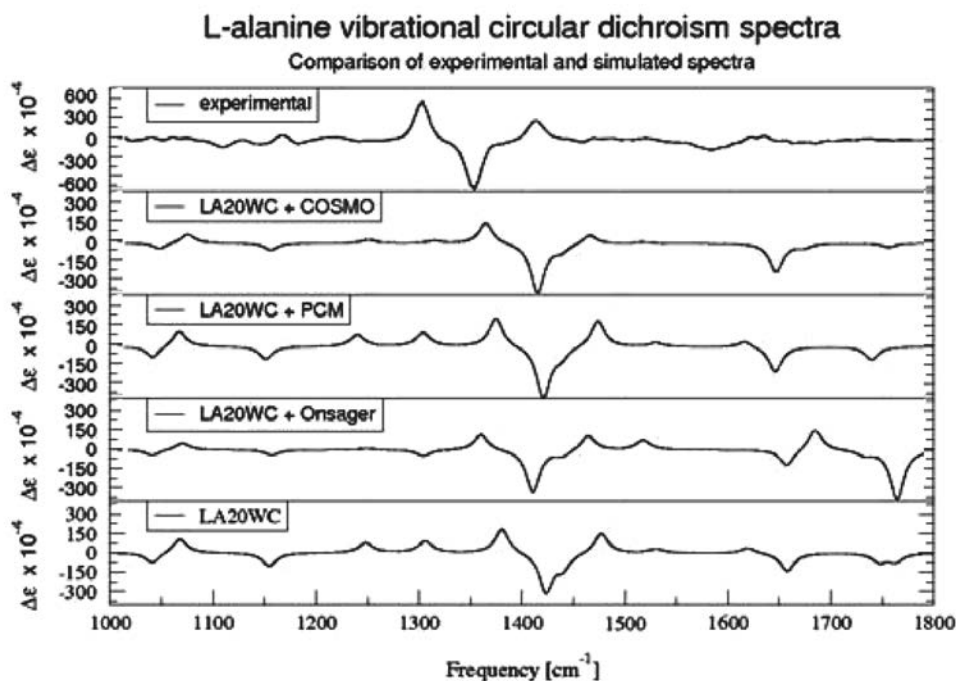
- F' - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 4 molekuły H₂O + model rozpuszczalnika Onsagera [57];
- F''' - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 9 molekuł H₂O [58];
- Ba - metoda obliczeniowa RHF/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny Barron i wsp. 1991 [144];
- Yu' - metoda obliczeniowa RHF/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny [145];
- Lh - dane eksperymentalne dla jonu obojnego l-alaniny w postaci krystalicznej [76];
- I - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O;
- II - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika Onagera;
- III - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika PCM;
- IV - metoda obliczeniowa B3LYP/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika COSMO;
- I' - metoda obliczeniowa B3PW91/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O;
- II' - metoda obliczeniowa B3PW91/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika Onagera;
- III' - metoda obliczeniowa B3PW91/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika PCM;
- IV' - metoda obliczeniowa B3PW91/6-31*, model jonu obojnego l-alaniny + 20 molekuł H₂O + model rozpuszczalnika COSMO.

Zamieszczone poniżej rysunki przedstawiają omawiane w powyższej pracy symulacje widm absorpcyjnych dla trzech różnych metod spektroskopowych, uzyskane z zastosowaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej DFT z funkcjonalem B3LYP i bazą funkcyjną

6-31* dla czterech różnych modeli l-alaniny w roztworze wodnym oraz dla widma doświadczalnego (rysunki 4.12 - 4.14).

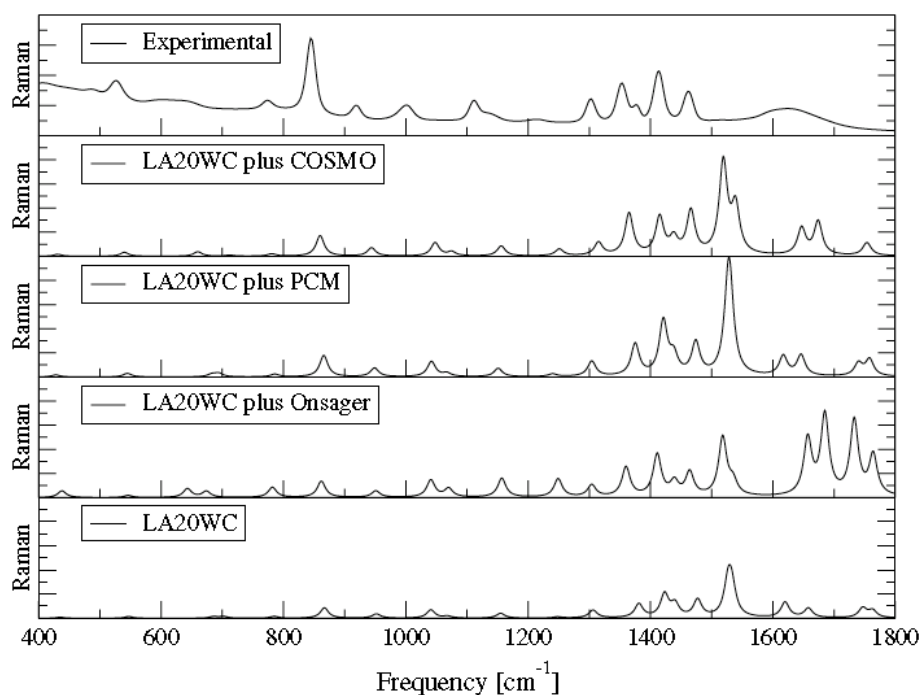


Rysunek 4.12 Porównanie widm VA uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onsager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].



Rysunek 4.13 Porównanie widm VCD uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onsager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].

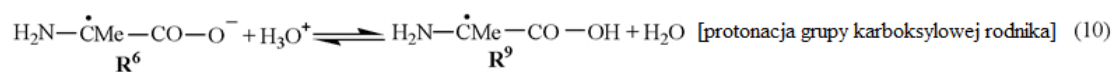
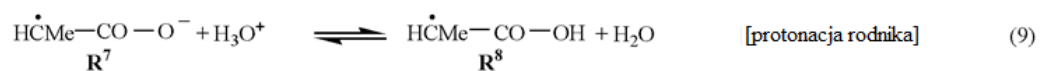
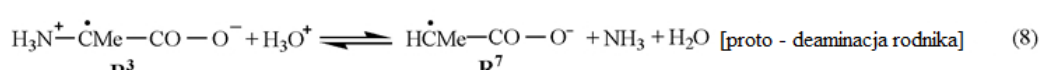
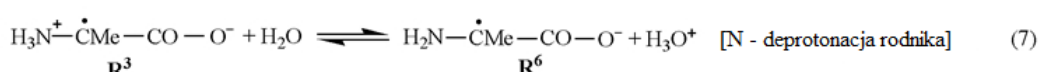
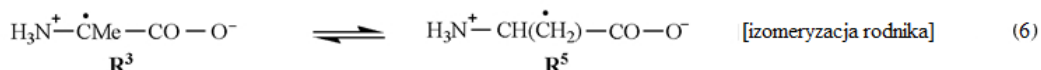
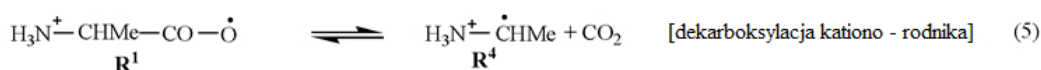
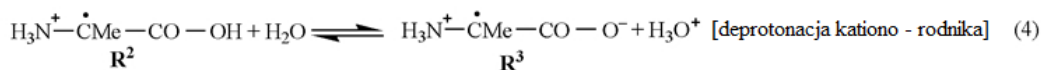
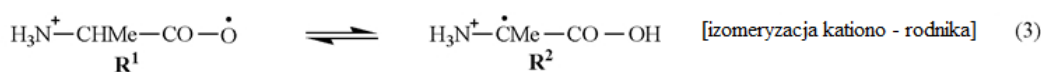
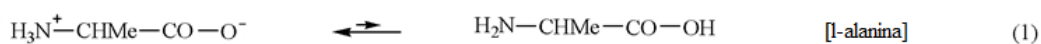
L-alanine Raman spectra
Comparison of experimental and simulated spectra



Rysunek 4.14 Porównanie widm Ramana uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].

4.2.2 Struktura geometryczna i właściwości spektroskopowe rodników l-alaniny.

Uzyskane modele dla l-alaniny w roztworze wodnym i dla l-alaniny w postaci krystalicznej pozwoliły na wyznaczenie kolejnych kierunków badań dotyczących właściwości fizycznych i chemicznych l-alaniny. Jedno z głównych zagadnień, które należy poruszyć związane jest z występowaniem rodników l-alaniny w fazie krystalicznej. Jak już wcześniej wspomniano rodniki takie wytwarzane są pod wpływem promieniowania jonizującego np. X lub γ bezpośrednio lub pośrednio oddziaływującego z cząsteczką l-alaniny i występują w trzech formach: R1, R2, R3 [42, 43, 44, 45]. Jednakże dokładna analiza radiolizy l-alaniny przedstawiona przez C. Simion w pracy [102] wskazuje na występowanie dziewięciu form rodnikowych będących produktami w opisanych poniżej reakcjach (rysunek 4.15).



Rysunek 4.15 Mechanizm tworzenia rodników od R1 do R9; Me to oznaczenie podstawnika w postaci grupy metylowej (CH₃), [102].

W trakcie prac badawczych z wykorzystaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej, w tym m.in. półempirycznej metody AM1, przeprowadzono optymalizację geometryczną oraz obliczenia energii dla wszystkich dziewięciu form rodników. Wszystkie obliczenia zostały przeprowadzone bez wpływu otoczenia na cząsteczkę l-alaniny, tj. w próżni. Należy nadmienić, iż oznaczenia rodników: R3, R8 i R9 w pracy [102] odpowiadają rodnikom R2, R1, i R3 z pracy [42]. Wyniki obliczeń zestawiono w poniższych tabelach 4.7 i 4.8.

Tabela 4.7 Wyniki obliczeń energii wiązania i ciepła tworzenia metodą MO w próżni [102].

Rodnik	Wzór cząsteczkowy	Wzór strukturalny	Energia wiązania kcal/mol	Ciepło tworzenia kcal/mol
R1	C ₃ H ₇ NO ₂	H ₃ N ⁺ HC(CH ₃)COO [•]	989.9	+119.6
R2	C ₃ H ₇ NO ₂	H ₃ N ⁺ •C(CH ₃)COOH	1026.8	+82.6
R3	C ₃ H ₆ NO ₂	H ₃ N ⁺ •C(CH ₃)COO	1097.1	39.7
R4	C ₂ H ₇ N	H ₃ N ⁺ •CHCH ₃	652.4	+167.1
R5	C ₃ H ₆ NO ₂	H ₂ C [•] CH(•NH ₃)COO	1090.6	33.2
R6	C ₃ H ₅ NO ₂	H ₂ N [•] C(CH ₃)COO	1110.2	104.9
R7	C ₃ H ₄ O ₂	H ₃ C [•] CHCOO	932.8	92.6
R8	C ₃ H ₅ O ₂	H ₃ C [•] CHCOOH	972.0	79.7
R9	C ₃ H ₆ NO ₂	H ₂ N [•] C(CH ₃)COOH	1148.2	90.8

Tabela 4.8 . Entalpia reakcji w przypadku formowania rodników l-alaniny od R1 do R9, [102].

Reakcja	Entalpia reakcji, kcal/mol
(1)	38.38; reakcja endotermiczna formowania l-alaniny.
(2)	+185.95; reakcja endotermiczna pośredniego formowania rodnika R1.
(3)	36.92; reakcja egzotermiczna pośredniego formowania rodnika R2.
(4)	+159.73; reakcja endotermiczna formowania rodnika R3.
(5)	32.33; reakcja egzotermiczna formowania rodnika R4.
(6)	+6.46; reakcja endotermiczna formowania rodnika R5.
(7)	+137.49; reakcja endotermiczna formowania rodnika R6.
(8)	263.00; reakcja egzotermiczna formowania rodnika R7.
(9)	189.82; reakcja egzotermiczna formowania rodnika R8.
(10)	188.65; reakcja egzotermiczna formowania rodnika R9.

Badania, których głównym przedmiotem są rodniki l-alaniny opierają się nie tylko na obliczeniach teoretycznych i symulacjach, ale przede wszystkim na analizie doświadczalnej z zastosowaniem metody spektroskopii EPR w paśmie X, K lub Q [108, 109, 42, 110, 111, 112] oraz metody Electron-Nuclear Double Resonance (ENDOR) [108, 113, 42].

Spektroskopia EPR w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi przeprowadzanymi metodami chemii kwantowej dostarcza wielu ważnych informacji o właściwościach fizycznych l-alaniny, takich jak np. struktura molekularna i parametry spektroskopowe. Duży wkład naukowy w tej dziedzinie posiadają Einar Sagstuen i wsp. W pracy [42] uzyskali oni metodami doświadczalnymi EPR i ENDOR widma dla rodnika l-alaniny R1 (zwanego w literaturze jako SAR) oraz rodników R2 i R3. Na podstawie uzyskanych widm obliczono wartości tensora **g** związanego z efektem Zeemana oraz tensora struktury nadsubtelnej **A**. Wyniki badań przedstawiają poniższe tabele (tabele 4.9 - 4.12).

Tabela 4.9 Współrzędne atomów w [Å] dla Stabilnego Rodnika Alaninowego (SAR). Dane referencyjne zawiera praca [146], [42].

atom	x	y	z
C1	2.93	1.44	4.05
O1	3.95	0.79	3.77
O2	2.79	2.04	5.15
C2	1.80	1.51	3.02
H	0.90	2.08	3.27
Cm ^a	1.97	0.76	1.69
Cm(II) ^b	1.36	-1.13	4.64

^a Atom węgla znajdujący się w grupie metylowej.

^b Atom węgla znajdujący się w grupie metylowej dla odpowiedniej molekuly o symetrii w pozycji II, ((1/2-x, -y, (1/2)+z), [146].

Tabela 4.10 Parametry magnetyczne dla rodnika R1 zwanego Stabilnym Rodnikiem Alaninowym (Stable Alanine Radical), metoda pomiarowa to EPR i ENDOR, temperatura pomiaru 295K^{a,b}, [42].

Rodnik/ tensor	g _{iso} /H _{iso}	Główne wartości własne	Wektor własny ^c		
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
R1/ g	2.0033	2.0041	0.828	0.030	0.559
		2.0034	-0.428	0.678	0.598
		2.0024	0.362	0.735	-0.574
R1/ H_α	-56.1(3)	-87.9(2)	0.467(4)	0.416(6)	0.780(4)
		-52.2(4)	0.310(11)	0.749(8)	-0.586(6)
		-28.2(6)	0.828(5)	-0.515(11)	-0.221(8)
R1/ H_β	69.9(1)	74.7(2)	-0.173(20)	0.581(13)	0.795(09)
		67.6(2)	-0.896(230)	-0.428(400)	0.117(340)
		67.3(2)	0.408(500)	-0.693(240)	0.594(66)
R1/ H_{dip}	0.1(1)	5.0(2)	0.203(25)	0.810(15)	-0.551(20)
		-2.1(3)	0.921(180)	-0.348(260)	-0.172(446)
		-2.5(3)	0.331(500)	0.472(195)	0.817(93)

^a Tensor struktury nadsubtelnej (hyperfine coupling tensor), wyrażony w MHz.

^b Niepewności są podane na 95% poziomie ufności w postaci cyfr w nawiasach.

^c Odległości między atomami uzyskane na podstawie danych z tabeli 9:

Odległości między atomami C2-Cm: -0.1107 0.4882 0.8657.

Odległości między atomami C2-Cm: 0.8225 -0.5209 -0.2285.

Odległości między atomami C2---Cm(II): 0.1407 0.8439 -0.5178.

Prostopadłe do płaszczyzny C1-C2-Cm 0.4192 0.8126 -0.4048

Tabela 4.11 Parametry magnetyczne dla rodnika R2 uzyskanego po napromienieniu pojedynczych kryształów l-alaniny, metoda pomiarowa ENDOR w paśmie X i paśmie K, temperatury pomiaru 295K i 220K^{a,b}, [42].

Rodnik/tensor	H _{iso}	Główne wartości własne	Wektor własny ^c		
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
R2 ^c /H _β	70.8(1)	76.1(2)	0.925(8)	0.248(22)	0.288(23)
		68.3(2)	0.150(170)	0.458(440)	-0.876(200)
		68.0(2)	0.349(83)	-0.853(230)	-0.386(450)
R2 ^d /H _β	70.8(2)	76.4(3)	0.921(9)	0.264(24)	0.286(21)
		68.1(2)	0.273(320)	0.083(-)	-0.958(008)
		67.9(3)	0.276(312)	-0.961(95)	-0.005(-)
R2 ^d /H _β 1(N)	86.3(2)	95.8(3)	0.681(12)	-0.516(18)	-0.519(13)
		83.6(3)	0.182(44)	0.806(18)	-0.563(33)
		79.4(3)	0.709(15)	0.289(46)	0.643(33)
R2 ^d /H _β 2(N)	30.2(1)	40.9(3)	0.897(6)	0.270(13)	-0.349(12)
		25.5(2)	0.314(60)	0.163(179)	0.935(12)
		24.1(3)	0.310(60)	-0.949(30)	0.061(177)
R2 ^d /H _β 3(N)	10.2(1)	19.9(1)	0.199(14)	-0.032(14)	-0.980(03)
		5.4(3)	0.466(-)	-0.876(705)	0.123(234)
		5.3(3)	0.862(683)	0.481(-)	0.159(181)

^a Tensor struktury nadsubtelnej (hyperfine coupling tensor), wyrażony w MHz.

^b Niepewności są podane na 95% poziomie ufności w postaci cyfr w nawiasach.

^c Pomiary ENDOR w paśmie X przeprowadzono w temp. 295K.

^d Pomiary ENDOR w paśmie X przeprowadzono w temp. 220K.

Odległości między atomami to dane krystalograficzne z pracy [147]:

Dane krystalograficzne odległości między atomami C2 – Cm: 0.8000 0.5656 0.2007.

Przeliczone do układu osi głównych odl. między atomami C2 – Cm: 0.9317 0.2746 0.2376.

Przeliczone do układu osi głównych odl. między atomami C–H1(N): 0.7230 -0.4478 -0.5261.

Przeliczone do układu osi głównych odl. między atomami C–H2(N): 0.8190 0.3979 -0.4134.

Przeliczone do układu osi głównych odl. między atomami C–H3(N): 0.2787 0.1483 -0.9489.

Tabela 4.12 Parametry magnetyczne dla dwóch konformerów rodnika R3 uzyskanego po napromienieniu pojedynczych kryształów l-alaniny, metoda pomiarowa ENDOR, temperatura pomiaru 295K^{a,b}, [42].

Rodnik/tensor	H _{iso}	Główne wartości własne	Wektor własny ^c		
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
R3/H _β	39.5(1)	44.5(2)	0.954(08)	0.266(27)	0.141(29)
		37.3(2)	0.155(84)	-0.835(140)	0.528(270)
		36.8(2)	-0.258(56)	0.481(270)	0.837(172)
R3/H' _β	33.1(2)	37.7(2)	0.862(15)	0.428(27)	0.271(29)
		30.8(3)		⊥ above	
		30.8(3)		⊥ above	

^a Tensor struktury nadsubtelnej (hyperfine coupling tensor), wyrażony w MHz.

^b Niepewności są podane na 95% poziomie ufności w postaci cyfr w nawiasach.

^c Odległości między atomami to dane krystalograficzne z pracy [147]:

Dane krystalograficzne odległości między atomami C–Cm: 0.8000 0.5656 0.2007.

Przeliczone do układu osi głównych odległości między atomami C–Cm: 0.9317 0.2746 0.2376.

Uzupełnieniem wyników badań zawartych w pracy [42] są badania mające na celu doświadczalne wyznaczenie tensora \mathbf{g} zawarte w pracy [108]. W toku badań przeprowadzono doświadczalną analizę metodami spektroskopii EPR i ENDOR rodników l-alaniny dla próbek w formie proszku oraz przeprowadzono symulacje komputerowe widm spektroskopowych w celu dokładnego wyznaczenia głównych wartości własnych tensora \mathbf{g} . Wyniki przedstawiono w postaci poniższych tabel (tabela 4.13 i 4.14).

Tabela 4.13 Wartości tensora \mathbf{g} dla rodników R1 i R2 powstałych na skutek jonizacji cząsteczki l-alaniny promieniowaniem X w temp. 295K. Pomiar dokonano w paśmie Q metodą EPR, [108].

Rodnik/tensor	g_{iso}	Główne wartości własne	Wektor własny ^c		
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
R1/ \mathbf{g}	2.0033	2.0043	0.7148	0.1057	0.6913
		2.0038	0.5546	-0.6878	-0.4683
		2.0021	0.4260	0.7181	-0.5503
R2/ \mathbf{g}	2.0030	2.0038	-0.1191	-0.0627	0.9980
		2.0032	0.7502	0.6593	0.0501
		2.0022	0.6611	-0.7492	-0.0392
R1 ^d / \mathbf{g}	2.0033	2.0041	0.828	0.030	0.559
		2.0034	0.428	-0.678	-0.598
		2.0024	0.362	0.735	-0.574

^dDane pochodzą z pracy [42], gdzie stosowano metodę EPR w paśmie X.

Tabela 4.14 Parametry spektralne zastosowane do symulacji widma EPR dla rodnika R3 powstałego na skutek jonizacji cząsteczki l-alaniny promieniowaniem X w temp. 295K. (Stała struktury nadsubtelnej wyrażona została w MHz), [108].

	Parametry spektralne			
	g^a	$A[\text{CH}_3]^b$	$A[\text{N}_\beta]^c$	$A[\text{H}(\text{N}_\beta)](2)^d$
Główne wartości własne	2.0040	44.5	11.2	-25.2
	2.0030	37.3	-8.4	-16.8
	2.0020	36.8	-5.6	0.0

^a Wektory własne skierowane wzdłuż wiązania C=O, (maksymalna wartość), prostopadle do płaszczyzny N-C_α-C (wartość minimum) i prostopadle do tych dwóch wiązań (wartość średnia).

^b Wektory własne z pracy [42] przyjmują maksymalną wartość wzdłuż wiązania C_α-CH₃.

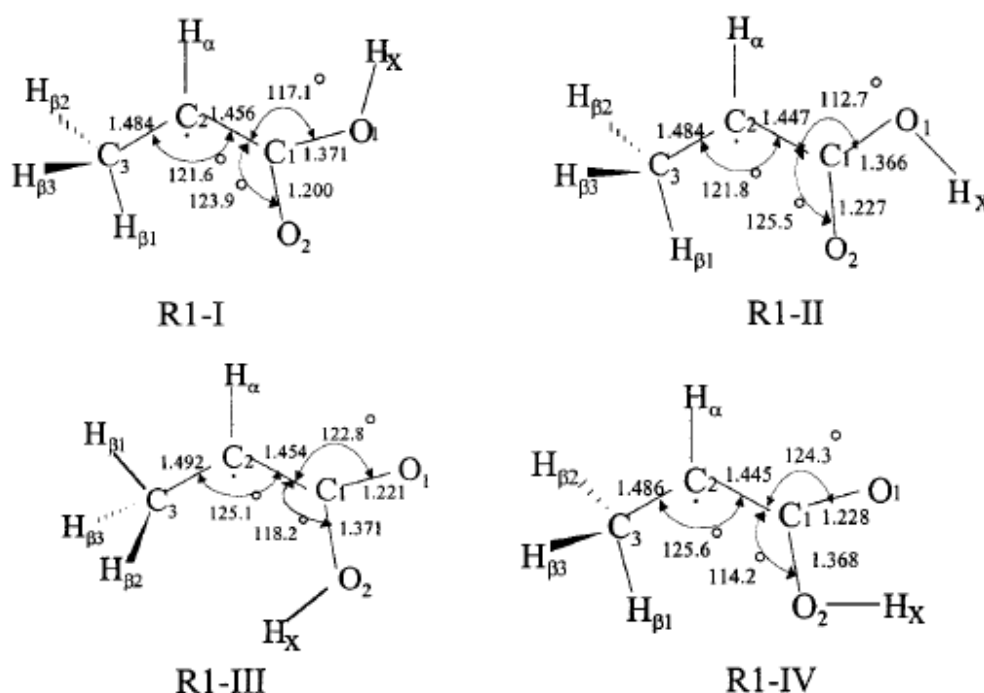
^c Wektory własne położone wzdłuż prostopadłej do płaszczyzny N-C_α-C (o największej liczebności), wiązania pomiędzy atomami N-C_α (średnia wartość) i prostopadle do tych dwóch wiązań (o najmniejszej liczebności).

^d Wektory własne położone wzdłuż prostopadłej do płaszczyzny N-C_α-C (wartość średnia), każdego z dwóch N-H wiązań (o najmniejszej liczebności) i prostopadle do tych wiązań (o największej liczebności).

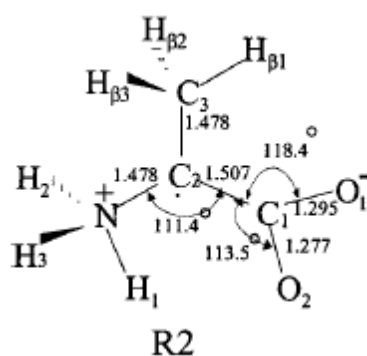
Wartości główne tensora \mathbf{g} w przypadku rodnika R3, zostały zaproponowane przez autorów na podstawie wnikliwej analizy wyników badań dotyczących innych rodników molekuł biologicznie czynnych [114, 115]. Wartości te nie zostały wyznaczone bezpośrednio na

podstawie badań, ponieważ udział rodnika R3 w widmie EPR jest niewielki w odniesieniu do pozostałych rodników.

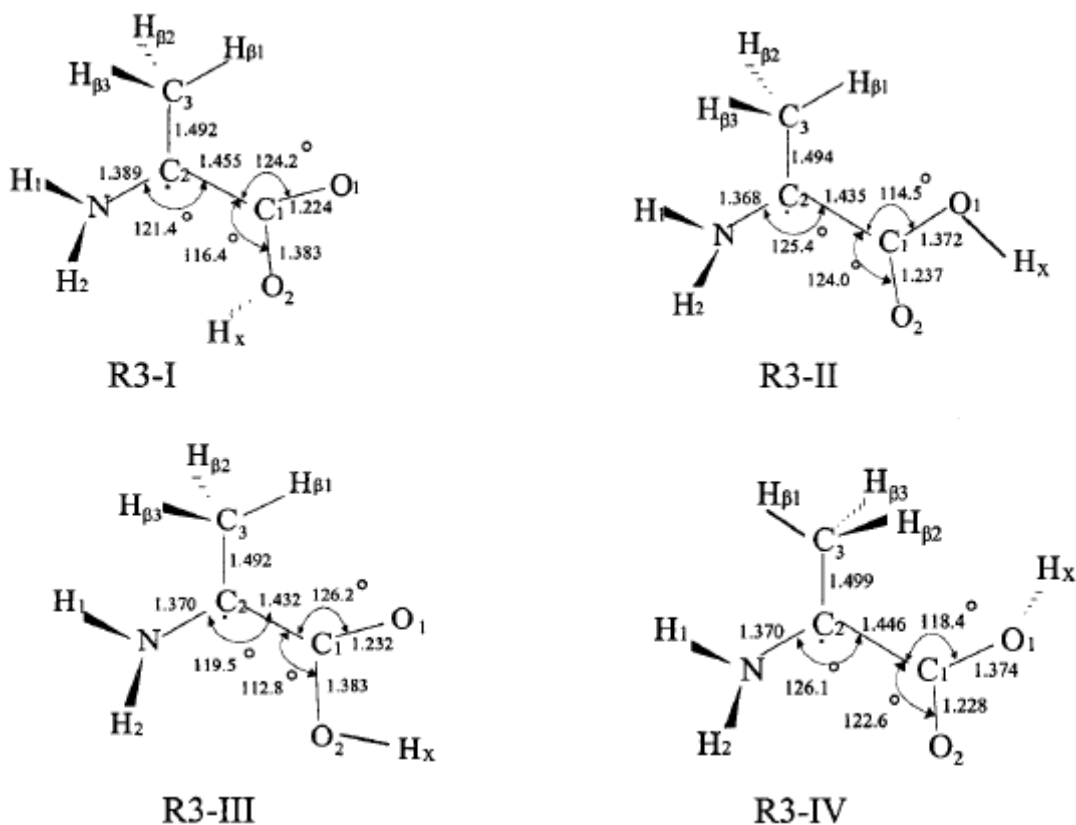
Rozważania teoretyczne dotyczące obliczeń w celu wyznaczenia głównych wartości własnych oraz wartości izotropowej tensora A_{ij} zostały opublikowane m.in. w pracach [116, 117]. W obu cytowanych opracowaniach przedstawiono wyniki obliczeń uzyskane metodą chemii kwantowej DFT. Praca [117] zawiera wyniki obliczeń optymalizacji geometrii dla czterech różnych konformerów rodników R1 i R3, wykonanych z zastosowaniem metody DFT i funkcjonału hybrydowego B3LYP w połączeniu z bazą funkcyjną Poplea 6-31+G(d,p). Przedstawia ona również wyniki obliczeń optymalizacji geometrii dla jednego konformera rodnika R2, dla którego zastosowano model rozpuszczalnika Onsagera (przy założeniu stałej dielektrycznej ϵ o wartości 78.39 i promienia r równego 3.76 Å sfery, wewnątrz której znajduje się cząsteczka rodnika R2). Zastosowana metoda, funkcjonał i baza funkcyjna były takie same jak w przypadku obliczeń dla rodników R1 i R3. Strukturę przestrzenną wraz z długościami wiązań i wartościami kątów między atomami przedstawiają poniższe rysunki (rysunki 4.16 - 4.18).



Rysunek 4.16 Optymalizacja geometrii struktur rodnika R1 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p), (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117]



Rysunek 4.17 Optymalizacja geometrii struktury rodnika R2 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p) w połączeniu z modelem Onsagera, (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117].



Rysunek 4.18 Optymalizacja geometrii struktur rodnika R3 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p), (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117].

Obliczenia stałych struktury nadsubtelnej w omawianej pracy zostały przeprowadzone dla wymienionych konformerów rodników R1, R2, R3 z zastosowaniem metody DFT, funkcjonału PWP86 [118], który stanowi połączenie funkcjonału wymiennego Perdew i Wang (PW) i funkcjonału nielokalnie korelacyjnego Perdew (P86). Wszystkie uzyskane

wyniki obliczeń porównano z wynikami doświadczalnymi z prac poprzednich i zebrano w postaci poniższych tabel (tabele 4.15 – 4.17). Warto zauważyć, iż wartość tensora struktury nadsubtelnej to suma dwóch składowych $A_{ii}=A_{iso}+T_{ii}$, gdzie: A_{ii} – to główna wartość własna tensora struktury nadsubtelnej wzdłuż osi (i) układu osi głównych, A_{iso} – to izotropowa wartość tensora struktury nadsubtelnej, a T_{ii} – to główna wartość własna tensora oddziaływania dipolowego, wzdłuż osi (i) układu osi głównych.

Tabela 4.15 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R1, [117].

Tensor	HFCC	R1-I	R1-II	R1-III	R1-IV	Eksp.
H_{α}	A_{iso}	-52.0	-54.0	-54.9	-52.9	-56.1
	T_{xx}	-32.5	-32.1	-31.7	-30.9	-31.8
	T_{yy}	-1.4	-1.7	-1.8	-2.1	+3.9
	T_{zz}	33.9	33.8	33.5	33.0	27.9
	A_{xx}	-84.5	-84.0	-86.6	-83.5	-87.9
	A_{yy}	-53.4	-52.8	-56.7	-54.7	-52.7
	A_{zz}	-18.1	-17.8	-21.4	-21.4	-28.3
$H_{\beta 1}$	A_{iso}	1.7	1.7	2.0	1.5	
	T_{xx}	-3.9	-4.0	-3.9	-3.6	
	T_{yy}	-2.8	-2.8	-3.4	-3.4	
	T_{zz}	6.7	6.8	7.3	7.1	
$H_{\beta 2}$	A_{iso}	96.3	96.9	93.6	97.0	
	T_{xx}	-4.8	-4.8	-4.7	-4.8	
	T_{yy}	-3.0	-3.0	-3.1	-3.0	
	T_{zz}	7.8	7.8	7.8	7.8	
$H_{\beta 3}$	A_{iso}	97.5	98.3	95.2	98.6	
	T_{xx}	-4.8	-4.8	-4.6	-4.8	
	T_{yy}	-3.0	-3.1	-3.1	-3.1	
	T_{zz}	7.9	7.9	7.7	7.9	
$H_{\beta(sr.)}$	A_{iso}	65.2	65.6	63.4	65.7	69.9
	T_{xx}	-4.5	-4.5	-4.5	-4.4	-2.6
	T_{yy}	-2.9	-3.0	-3.2	-3.2	-2.3
	T_{zz}	7.5	7.5	7.5	7.6	4.8

Tabela 4.16 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R2, [117].

Tensor	$A_{\text{iso}}^{\text{obl.}}$	$T_{\text{xx}}^{\text{obl.}}$	$T_{\text{yy}}^{\text{obl.}}$	$T_{\text{zz}}^{\text{obl.}}$	$A_{\text{iso}}^{\text{eksp}}$	$T_{\text{xx}}^{\text{eks}}$	$T_{\text{yy}}^{\text{eks}}$	$T_{\text{zz}}^{\text{eksp}}$
						P	P	
H_1	2.4	-5.6	-4.9	10.6	86.3	-6.9	-2.7	9.5
H_2	69.9	-4.9	-4.5	9.4	30.2	-6.1	-4.7	10.7
H_3	69.9	-4.8	-4.5	9.3	10.2	-4.9	4.8	9.7
$H_{\text{amino(}\beta\text{)}}$	47.4	-5.1	-4.6	9.8	42.2	-6.0	-4.1	10.0
$H_{\beta 1}$	2.2	-4.1	-3.9	8.0				
$H_{\beta 2}$	95.5	-4.6	-3.4	8.0				
$H_{\beta 3}$	95.7	-4.6	-3.4	8.0				
$H_{\beta(\text{sr.})}$	64.5	-4.3	-3.6	8.0	70.8	-2.9	-2.7	5.6

Tabela 4.17 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R3, [117].

Tensor	HFCC	R3-I	R3-II	R3-III	R3-IV	Eksp.
$H_{\beta 1}$	A_{iso}	1.5	2.0	46.9	19.0	
	T_{xx}	-3.9	-3.4	-3.7	-3.5	
	T_{yy}	-2.7	-3.2	-2.7	-3.2	
	T_{zz}	6.6	6.6	6.4	6.6	
$H_{\beta 2}$	A_{iso}	61.1	61.2	56.0	71.7	
	T_{xx}	-3.5	-3.3	-3.5	-3.5	
	T_{yy}	-3.2	-3.0	-2.8	-2.9	
	T_{zz}	6.7	6.4	6.3	6.4	
$H_{\beta 3}$	A_{iso}	60.5	43.7	1.4	15.7	
	T_{xx}	-3.6	-3.5	-3.5	-3.3	
	T_{yy}	-2.9	-2.8	-2.7	-2.8	
	T_{zz}	6.6	6.3	6.2	6.1	
$H_{\beta(\text{sr.})}$	A_{iso}	41.3	35.6	34.8	35.4	39.5, 33.1
	T_{xx}	-3.7	-3.4	-3.6	-3.4	-2.7, -2.3
	T_{yy}	-3.2	-3.0	-2.7	-3.0	-2.2, -2.3
	T_{zz}	6.6	6.3	6.3	6.4	5.0, 4.6

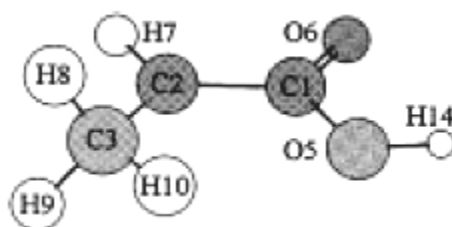
Druga z wyżej cytowanych prac, dotycząca zastosowania metody DFT do obliczeń wartości własnych tensora struktury nadsubtelnej [116], zawiera podsumowanie dotychczasowych wyników obliczeń tensora dla rodników alaninowych. Publikacja ta zawiera również poszerzoną analizę wartości tensora struktury nadsubtelnej dla rodników l-alaniny o obliczenia dla atomów wodoru występujących w grupie metylowej i przy węglu C2 w cząsteczce rodnika R1. Wszystkie obliczenia zostały przeprowadzone metodą DFT z zastosowaniem funkcjonału UB3LYP i bazy funkcyjnej 6-311G(d) dla obliczeń optymalizacji geometrii cząsteczki rodnika R1 oraz metody DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą funkcyjną 6-31G(d) dla obliczeń głównych wartości własnych tensora struktury

nadsubtelnej. Należy zaznaczyć, iż obliczenia w obu poruszonych w tym rozdziale publikacjach [116, 117] dotyczą modelu rodnika l-alaniny w postaci pojedynczej molekuly (rysunek 4.19), bez uwzględnienia wpływu otoczenia. Wyniki obliczeń zamieszczone w pracy [116] przedstawiają poniższe tabele (tabele 4.18-4.19):

Tabela 4.18 Obliczone i eksperymentalne wartości tensora struktury nadsubtelnej, dla α protonu H7 oraz protonów grupy metylowej H8,H9,H10, dla rodnika R1 (model rodnika przedstawia rysunek 4.19). Metoda obliczeniowa UB3LYP/6-311G(d)// B3LYP/6-31G(d). Wszystkie wartości wyrażono w (MHz), [116].

H7		H8,H9,H10		Dane referencyjne (metoda pomiarowa, temperatura).
A_{iso}	A_{11}	A_{iso}	A_{11}	
	A_{22}		A_{22}	
	A_{33}		A_{33}	
	-87.9		74.7	
-56.1	-52.2	70.0	67.6	[23] (ENDOR, 220K)
	-28.2		67.3	
	-72.8			
-59.0	-54.9			[20] (EPR, 77K)
	-49.2			
	-88.1		71.7	[19] (ENDOR, 77K)
-59.8	-53.3	66.6	64.6	
	-37.9		63.5	
	-89.7 ^a		77.1	[18] (ENDOR, 77K)
-53.2 ^a	-46.5 ^a	72.4	70.1	[17] (EPR, 293K)
	-23.5 ^a		70.1	
	-73 ^a		73	[21] (EPR, 300K)
-60.3 ^a	-57 ^a	70.3	71	
	-51 ^a		67	
	-83.8		73.5	W tej pracy.
-53.3	-57.7	65.7	62.5	
	-18.3		61.1	

^aEksperymentalne wartości absolutne.



Rysunek 4.19 Geometryczny model rodnika R1, [116].

Tabela 4.19 Obliczone i eksperymentalne wartości tensora struktury nadsubtelnej, dla protonów grupy metylowej H8,H9,H10, dla rodnika R1, temp. pomiaru 77K. Metoda obliczeniowa UB3LYP/6-311G(d)// B3LYP/6-31G(d). Wszystkie wartości wyrażono w (MHz), [116].

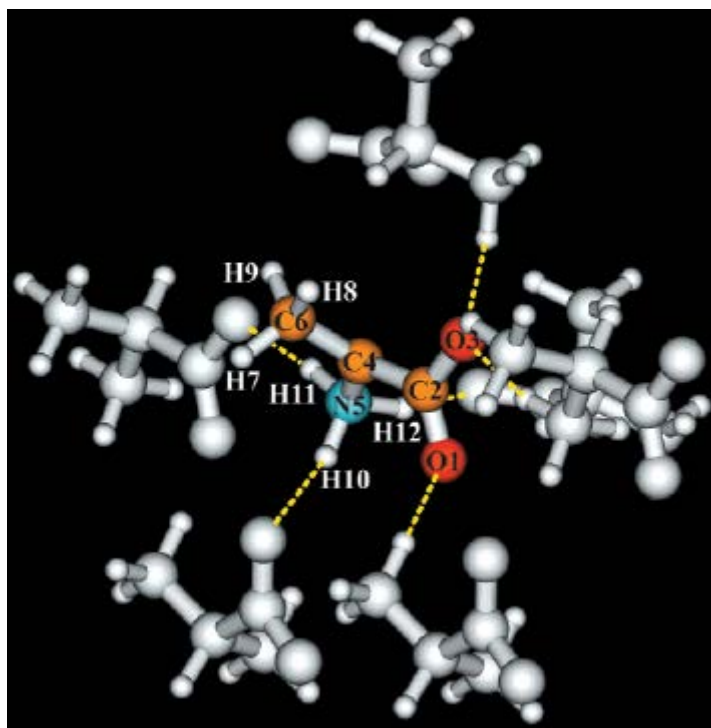
H8	H9		H10		Dane referencyjne (metoda pomiarowa, temperatura).
A_{iso}	A_{11} A_{22} A_{33}	A_{iso}	A_{11} A_{22} A_{33}	A_{iso} A_{11} A_{22} A_{33}	
121.3	129.2 118.0 116.6	77.6	84.1 75.1 73.7	14.9 15.1 10.1	
118.5	126.5 115.4 113.6	71.3	79.0 68.0 66.8	10.8 7.3 6.9	W tej pracy.

W czasie badań opublikowanych w pracach [116] przeprowadzono także obliczenia dla rodników R2 i R3 z zastosowaniem metody obliczeniowej tożsamej, jak w przypadku obliczeń dla rodnika R1. Dodatkowo zastosowano bazę funkcyjną IGLO–III [140]. Wszystkie uzyskane wyniki uznano jako zbieżne z eksperymentalnymi.

Rozważania teoretyczne dotyczące rodników l-alaniny prowadzono również z uwzględnieniem wpływu otoczenia molekuł sąsiadujących na molekułę rodnika. Tematykę opisującą w szerokim zakresie konstrukcję modeli teoretycznych, dobór metody obliczeniowej oraz wyniki obliczeń przedstawiają praca [119].

Model klastra w postaci centralnie położonej molekuły rodnika R2, w otoczeniu jonów obojnaczych l-alaniny (rysunek 4.20), proponują w swej pracy E. Pauwels i wsp.[119] jako model rodnika w kryształce l-alaniny. Model ten zakłada stabilizację rodnika R2 l-alaniny, poprzez oddziaływanie elektrostatyczne atomów otoczenia składającego się z 14 molekuł l-alaniny w pierwszym etapie optymalizacji geometrii klastra oraz 6 molekuł l-alaniny w drugim etapie optymalizacji geometrii klastra. Model klastra zaproponowany w niniejszych pracach oparty jest na badaniach krystalograficznych struktury przestrzennej l-alaniny i zakłada, iż odległość między atomami otoczenia a atomami rodnika R2 wynosi 3.7 Å. Atomy zewnętrzne takiej struktury są ułożone sferycznie wokół centralnie położonej molekuły rodnika R2. Skonstruowany w ten sposób model w postaci klastra molekuł jest poddawany obliczeniom mającym na celu optymalizację geometryczną układu, która jest przeprowadzana z zastosowaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej DFT z funkcjonałem B3LYP oraz metod półempirycznych PM3 [107] i AM1 [103]. W celu zminimalizowania czasu

i kosztów obliczeń dla klastra będącego złożonym układem molekularnym, podzielono układ na dwie warstwy obliczeniowe „low” i „high” za pomocą metody ONIOM (Our own N-layered Integrated molecular orbital and Molecular mechanics) [121]. Optymalizację geometryczną cząsteczki rodnika R2 i molekuł sąsiedztwa l-alaniny w modelu klastra przedstawiono na rysunku 20. Zastosowane bazy funkcyjne to 6-31G** oraz bazy I, II i III, które są odpowiednikami baz: single - ζ , double- ζ , double - ζ rozszerzonych o funkcję polaryzacyjną [122]. Tabela 4.20 zamieszczona poniżej zawiera opis zastosowanych metod, oprogramowania oraz modelu.



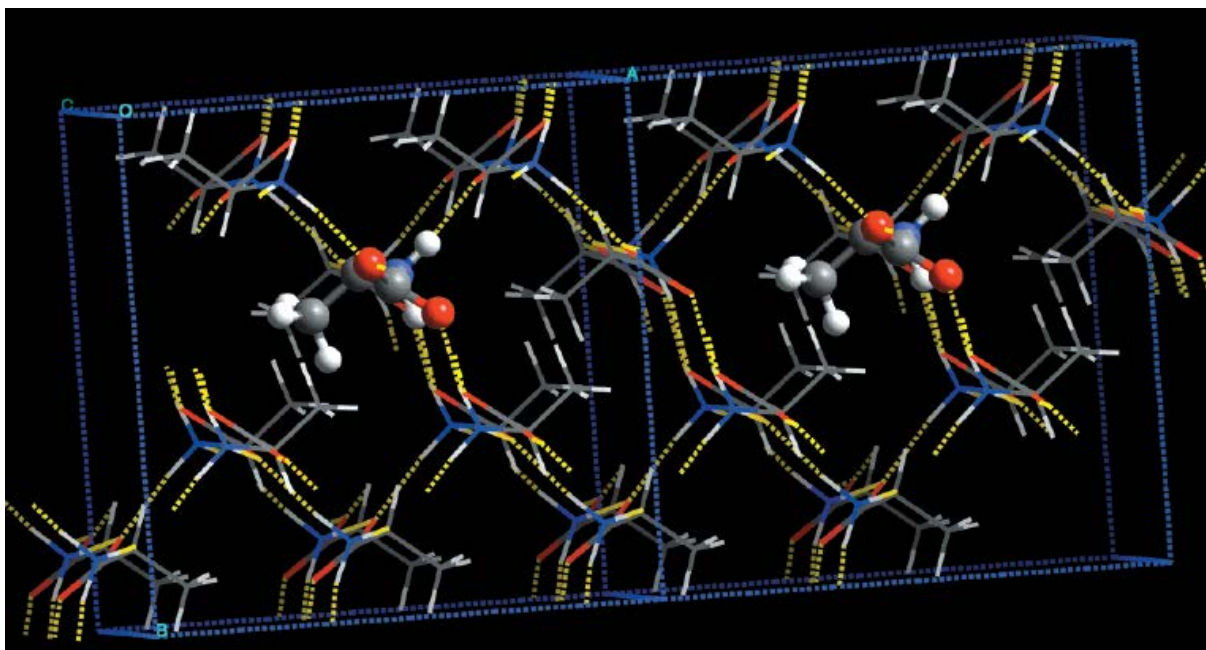
Rysunek 4.20 Optymalizacja geometryczna cząsteczki rodnika R2 i molekuł sąsiedztwa l-alaniny w modelu klastra, metoda obliczeniowa B3LYP/PM3/6, [119].

Tabela 4.20 Metody obliczeniowe, stosowane oprogramowanie i zastosowany model do obliczeń ONIOM, [119].

	Rodnik centralny	Otoczenie, klaster alaniny	Notacja
G98	PM3	14 cząsteczek, PM3	PM3/ PM3/14
G98	PM3	6 cząsteczek, PM3	PM3/ PM3/6
G98	B3LYP/6-31G**	14 cząsteczek, PM3	B3LYP/ PM3/14
G98	B3LYP/6-31G**	6 cząsteczek, PM3	B3LYP/ PM3/6
G98	B3LYP/6-31G**	14 cząsteczek, AM1	B3LYP/AM1/14
G98	B3LYP/6-31G**	6 cząsteczek, AM1	B3LYP/ AM1/6
ADF	BLYP/I	6 cząsteczek, BLYP/I	BLYP/I/6
ADF	BLYP/II	6 cząsteczek, BLYP/II	BLYP/II/6
ADF	BLYP/III	6 cząsteczek, BLYP/III	BLYP/III/6
AIMD	BP86/PW	15 cząsteczek, BP86/PW	BP86/PW
G94	B3LYP/6-31G*	0 cząsteczek	B3LYP/0/0*
G94	B3LYP/6-31+G*	0 cząst. Model Onsagera, woda	B3LYP/Onsager/0*

*Model B3LYP/0/0 i B3LYP/Onsager/0, zaprezentowano w pracy Lahore i wsp. [116] oraz Ban i wsp. [117].

Autorzy cytowanej pracy zaproponowali również inny model dla rodnika R2 w otoczeniu cząsteczek l-alaniny. Model ten opiera się na periodycznych komórkach elementarnych krystalicznej l-alaniny z wbudowanym rodnikiem R2 w strukturę kryształu (rysunek 4.21). Obliczenia dla tak skonstruowanego modelu przeprowadzono metodą chemii kwantowej DFT z funkcjonałem BP86/PW, będącym połączeniem funkcjonałów BP86 (zaproponowanym przez Perdew [123] i Becke [124]) oraz funkcjonału PW. Wszystkie obliczenia w omawianej pracy przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania Gaussian 94 i Gaussian 98 [85,86], oprogramowania ADF (Amsterdam Density Functional) [125] oraz oprogramowania AIMD (Ab Initio Quantum Molecular Dynamic) [126] bazującego na kodzie Car – Parrinello [127].



Rysunek 4.21 Optymalizacja geometryczna cząsteczki rodnika R2 i molekuł sąsiedztwa l-alaniny w modelu periodycznych komórek elementarnych, metoda obliczeniowa DFT z funkcjonałem BP86, [119].

Wyniki przeprowadzonych obliczeń, mających na celu optymalizację geometrii rodnika R2 w przedstawionych modelach w postaci klastra i periodycznych komórek elementarnych oraz obliczeń głównych wartości własnych i wartości izotropowych tensora struktury nadsubtelnej, przedstawiono w poniższych tabelach (tabela 4.21 i 4.22).

Tabela 4.21 Wybrane wartości kątów i długości wiązań dla różnych metod optymalizacji geometrii, [119].

	B3LYP/ 0/0	B3LYP/ Onsager/0	PM3/ PM3/ 14	PM3/ PM3/ 6	B3LYP/ PM3/14	B3LYP/ PM3/6	B3LYP/ AM1/14	B3LYP/ AM1/6	B3LYP/ I/6	B3LYP/ II/6	B3LYP/ III/6	BP86/ PW
Długość wiązań ^a												
O1-C2	1.271	1.277	1.254	1.251	1.261	1.264	1.272	1.277	1.335	1.317	1.278	1.285
C2-O3	1.242	1.295	1.264	1.272	1.282	1.292	1.270	1.277	1.399	1.339	1.302	1.307
C2-C4	1.511	1.507	1.507	1.500	1.466	1.455	1.468	1.464	1.540	1.450	1.465	1.467
C4-N5	1.492	1.478	1.460	1.458	1.503	1.503	1.465	1.466	1.563	1.489	1.472	1.464
C4-C6	1.479	1.478	1.463	1.461	1.487	1.484	1.478	1.475	1.547	1.492	1.484	1.483
H7-C6	1.102	1.100	1.105	1.099	1.107	1.103	1.104	1.101	1.118	1.110	1.107	1.114
H8-C6	1.093	1.090	1.103	1.097	1.094	1.090	1.092	1.087	1.105	1.096	1.093	1.103
H9-C6	1.102	1.100	1.102	1.133	1.102	1.107	1.104	1.112	1.110	1.104	1.102	1.106
H10-N5	1.023	1.030	1.025	1.005	1.058	1.053	1.044	1.040	1.100	1.047	1.043	1.064
H11-N5	1.025	1.030	1.024	1.015	1.055	1.051	1.038	1.034	1.125	1.057	1.054	1.109
H12-N5	1.037	1.052	1.024	1.025	1.052	1.057	1.039	1.043	1.222	1.076	1.078	1.054
Wartości kątów między wiązaniami												
O1-C2-O3	132.98	128.10	120.62	118.04	126.70	124.90	127.08	125.02	117.71	121.81	123.85	124.16
O1-C2-C4	111.27	113.50	116.96	120.62	116.40	118.18	116.21	117.35	127.63	119.11	117.94	116.19
C2-C4-N5	108.37	111.40	116.22	115.25	112.66	114.22	112.18	113.29	116.39	115.69	115.51	114.78
C2-C4-C6	131.77	130.20	122.05	124.07	124.52	126.72	128.41	128.94	114.74	125.74	125.12	119.59
Wartości kątów dwuściennych między wiązaniami												
O1-C2-C4-C6	180.0	180.0	122.73	120.47	115.27	125.69	153.77	163.76	99.51	137.81	134.40	114.67
O3-C2-C4-C6	0.00	0.00	-59.88	-63.95	-66.18	-55.55	-28.16	-17.32	-83.88	-42.96	-46.03	-61.55
H8-C6-C4-C2	0.00	0.00	26.21	351.25	34.62	23.13	9.22	355.62	42.47	8.97	14.10	42.56
H10-N5-C4-C2	82.40	79.00	82.39	80.40	71.04	73.45	10.79	10.77	60.36	77.76	75.20	71.77
Niewłaściwy kąt skręcania												
O1-O3-C4-C2	0.00	0.00	1.52	2.47	0.83	0.70	1.11	0.62	1.69	0.44	0.24	2.21
C2-N5-C6-C4	0.00	0.00	6.60	1.57	17.22	11.62	1.22	-4.79	25.99	7.70	9.88	20.14
Długości wiązań wodorowych ^b												
O1-H*	?	?	1.84	1.83	1.87	1.86	2.13	2.13	1.61	2.10	2.10	2.01
O3-H*	?	?	1.78	1.73	1.78	1.80	1.91	1.94	1.79	1.74	1.76	1.78
O3-H*	?	?	1.81	1.74	1.79	1.76	1.95	1.97	1.47	1.74	1.74	1.49
H10-O*	?	?	1.84	2.51	1.81	1.87	2.70	2.93	2.04	1.94	1.99	1.83
H11-O*	?	?	1.76	1.76	1.76	1.79	2.47	2.52	1.75	1.75	1.77	1.52
H12-O*	?	?	1.83	1.75	1.83	1.78	2.38	2.28	1.37	1.71	1.68	1.85

^a Długość wiązań wyrażono w angstrmach [Å]. ^bH* i O* przedstawiają jeden z najbliższych atomów tlenu lub wodoru otoczenia molekuly R2.

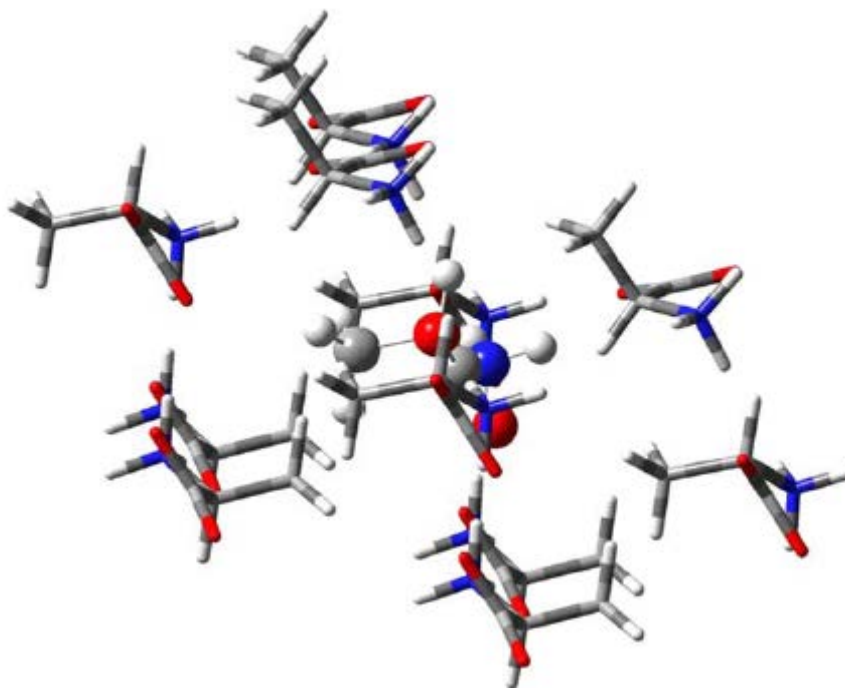
Tabela 4.22 Podsumowanie obliczeń wartości tensora struktury nadsubtelnej, [119].

	Dane eksperymentalne				B3LYP/0/0				B3LYP/Onsager/0				PM3/PM3/14				PM3/PM3/6			
	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz
O1													-2.6	-51.4	19.8	23.7	-0.4	-47.5	21.3	25.1
C2													-28.6	-34.5	-26.0	-25.2	-30.7	-36.4	-28.1	-27.5
O3													-0.7	-44.7	18.7	23.9	-2.6	-61.9	25.5	28.7
C4					94.0	16.5	17.6	247.9					82.0	12.0	13.8	220.1	71.5	3.7	5.1	205.7
N5	7.3	5.5	8.2	8.3	-8.0	-8.5	-7.8	-7.6					-3.7	-4.1	-3.8	-3.2	-6.5	-6.7	-6.6	-6.1
C6					-31.6	-34.0	-32.0	-29.7					-28.9	-30.9	-29.0	-26.8	-28.7	-30.4	-29.1	-26.6
H7	70.8	67.9	68.1	76.4	68.4	63.7	64.6	76.9	95.5	90.9	92.1	103.5	114.3	109.8	111.4	121.5	61.4	57.4	58.2	68.5
H8									2.2	-1.9	-1.7	10.2	11.6	7.7	8.1	19.1	6.5	2.6	3.5	13.5
H9									95.7	91.1	92.3	103.7	53.9	49.8	50.2	61.6	111.7	107.8	108.5	118.8
H10	86.3	79.4	83.6	95.8	80.3	74.8	75.5	90.6	86.0	81.2	81.5	95.3	86.8	81.6	82.0	96.7	76.2	70.9	71.5	86.3
H11	10.2	5.3	5.4	19.9	13.9	8.7	9.5	23.5	12.0	7.1	7.5	21.4	12.1	6.5	7.7	22.0	8.0	2.8	3.9	17.2
H12	30.2	24.1	25.5	40.9	29.9	24.0	24.6	41.2	30.0	24.4	25.1	40.6	23.8	18.4	19.2	33.7	32.6	27.9	28.1	41.9
	B3LYP/PM3/14				B3LYP/PM3/6				B3LYP/AM1/14				B3LYP/AM1/6				B3LYP/I/6			
	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz
O1	-0.9	-38.5	14.1	21.7	-0.7	-38.5	13.8	22.4	-2.1	30.6	10.1	14.1	-1.0	-30.1	11.3	15.8	1.0	-42.9	16.2	29.6
C2	-23.9	-31.4	-21.5	-18.8	28.4	-36.5	-25.2	-23.4	-32.8	-41.4	-29.4	-27.6	-33.1	-42.3	-29.7	-27.4	-21.0	-29.8	-17.5	-15.7
O3	-4.8	-54.3	18.6	21.4	-6.2	-68.3	23.1	26.5	-4.8	-53.3	17.0	21.9	-6.6	-64.7	19.7	25.3	-10.7	-116.7	39.6	45.1
C4	152.3	84.5	86.0	286.4	116.9	50.0	51.2	249.7	81.2	8.5	9.7	225.4	74.5	4.2	5.1	214.1	271.9	222.8	224.8	368.1
N5	7.7	6.9	7.5	8.7	2.7	2.1	2.5	3.5	-7.2	-7.6	-7.3	-6.6	-8.4	-8.7	98.7	-7.9	15.5	14.5	15.1	16.9
C6	-21.7	-23.8	-22.4	-19.0	-25.4	-27.3	-25.7	-23.2	-28.6	-30.6	-28.4	-26.8	-25.2	-27.1	-25.3	-23.1	-7.0	-9.1	-8.3	-3.7
H7	100.2	96.2	98.0	106.4	90.4	86.4	88.0	96.8	95.9	91.4	92.6	103.6	77.2	72.8	73.8	85.1	58.8	55.8	57.4	63.1
H8	4.2	0.0	0.3	12.2	2.0	-1.9	-1.6	9.6	2.8	-1.2	-1.0	10.7	1.7	-2.3	-1.8	9.3	0.8	-2.6	-1.7	6.8
H9	54.5	50.2	50.3	63.1	69.0	64.8	65.1	77.0	81.7	77.3	78.3	89.3	95.7	91.6	92.7	102.7	23.8	19.9	20.3	31.0
H10	84.6	80.3	80.9	92.7	80.7	76.3	76.8	88.9	4.5	-0.9	-0.3	14.8	2.7	-2.5	-1.7	12.5	61.3	58.4	58.8	66.7
H11	5.2	-0.5	0.8	15.3	4.8	-0.5	0.6	14.3	65.9	61.4	61.6	74.7	65.7	61.1	61.3	74.8	-1.4	-6.0	-4.6	6.4
H12	17.6	11.8	12.9	28.2	22.3	16.9	17.8	32.3	72.3	67.0	67.7	82.2	69.8	65.1	65.6	78.9	10.4	6.1	7.0	18.2
	B3LYP/II/6				B3LYP/III/6				BP86/PW											
	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz	Aiso	Axx	Ayy	Azz								
O1	0.1	-43.5	15.2	28.6	-1.2	-39.8	13.9	22.2	-1.8	47.2	16.7	25.0								
C2	-35.1	-45.7	-30.8	-28.7	-31.2	-40.1	-27.7	-25.8	-23.8	-32.3	-21.4	-17.5								

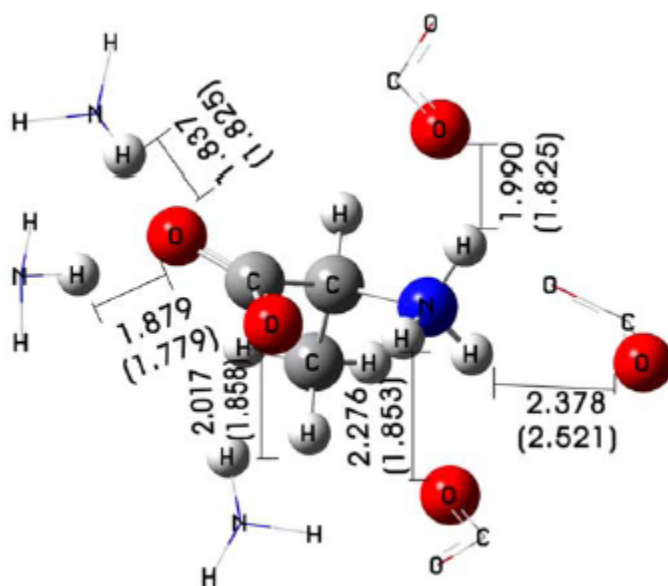
O3	-8.7	-90.5	30.4	33.9	-4.7	-63.4	23.1	26.4	-4.0	-50.7	17.8	20.9
C4	84.7	21.7	22.7	209.8	99.0	31.0	32.4	233.7	143.4	77.4	79.1	273.7
N5	-2.0	-2.4	-2.2	-1.5	-1.6	-2.2	-1.8	0.9	6.6	5.6	6.4	7.8
C6	-24.9	-26.6	-24.6	-23.4	-26.7	-28.7	-26.6	-24.9	-20.9	-22.7	-21.7	-18.3
H7	71.6	67.6	69.1	78.1	84.7	80.4	82.1	91.6	105.1	101.3	102.8	111.1
H8	1.6	-2.2	-1.1	8.0	1.4	-2.5	-1.9	8.5	9.6	5.7	6.0	17.1
H9	74.9	71.1	71.6	82.1	77.8	73.6	74.2	85.7	41.0	36.8	37.0	49.2
H10	74.3	70.1	70.5	82.4	85.1	80.6	81.0	93.7	95.2	90.9	91.7	103.2
H11	4.9	0.0	1.1	13.7	6.0	0.7	1.9	15.3	6.7	1.3	2.8	16.0
H12	26.4	21.9	22.3	35.0	30.0	25.0	25.5	39.3	17.0	11.4	12.6	27.0

^a Wartości mierzone w MHz, obliczone metodą B3LYP/6-311G** dla rodnika R2, optymalizacja geometrii przeprowadzono wymienionymi w tabeli metodami. Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42].

W przypadku konstrukcji modelu klastra molekuł, w celu przeprowadzenia obliczeń wartości tensorów $\sigma_{\mathbf{k}}$ i $\mathbf{J}_{\mathbf{k}}$ spektroskopii NMR dla trzech różnych aminokwasów w postaci krystalicznej m.in. l-alaniny, stosowana jest także metoda warstw obliczeniowych ONIOM. Wyniki przeprowadzonych tym sposobem badań umieszczone zostały w pracy [128]. Autorzy przeprowadzili optymalizację geometrii klastra składającego się z centralnie położonej cząsteczki l-alaniny stabilizowanej poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne otoczenia kilkunastu molekuł l-alaniny. Odległość między atomami molekuly centralnej a atomami otoczenia w proponowanym modelu wynosi 3 Å, natomiast dane dotyczące długości wiązań i wartości kątów między nimi zostały zaczerpnięte z bazy danych molekularnych, uzyskanych metodą dyfrakcji promieni X [46]. Następnie, dla tak skonstruowanych modeli „supermolekularnych” przeprowadzono obliczenia głównych wartości własnych tensora przesunięcia chemicznego dla przypadku widma spektroskopii ^{13}C NMR. Rysunki 4.22 i 4.23 przedstawiają model „supermolekularny” dla l-alaniny analizowany w cytowanej pracy.



Rysunek 4.22 Struktura molekularna klastra l-alaniny, na którym przeprowadzono obliczenia. Warstwa „high” atomy w postaci kuleczek, warstwa „low” atomy w postaci pręcików. Oznaczenia dla metody ONIOM, [128].



Rysunek 4.23 Odległości między atomami obliczone metodą B3LYP/6-311G:AM1 oraz umieszczone w nawiasie dane eksperymentalne. Dla sześciu molekuł l-alaniny otoczenia. Na rysunku przedstawiono tylko grupy aminowe NH₃ i grupy karboksylowe COO, [128].

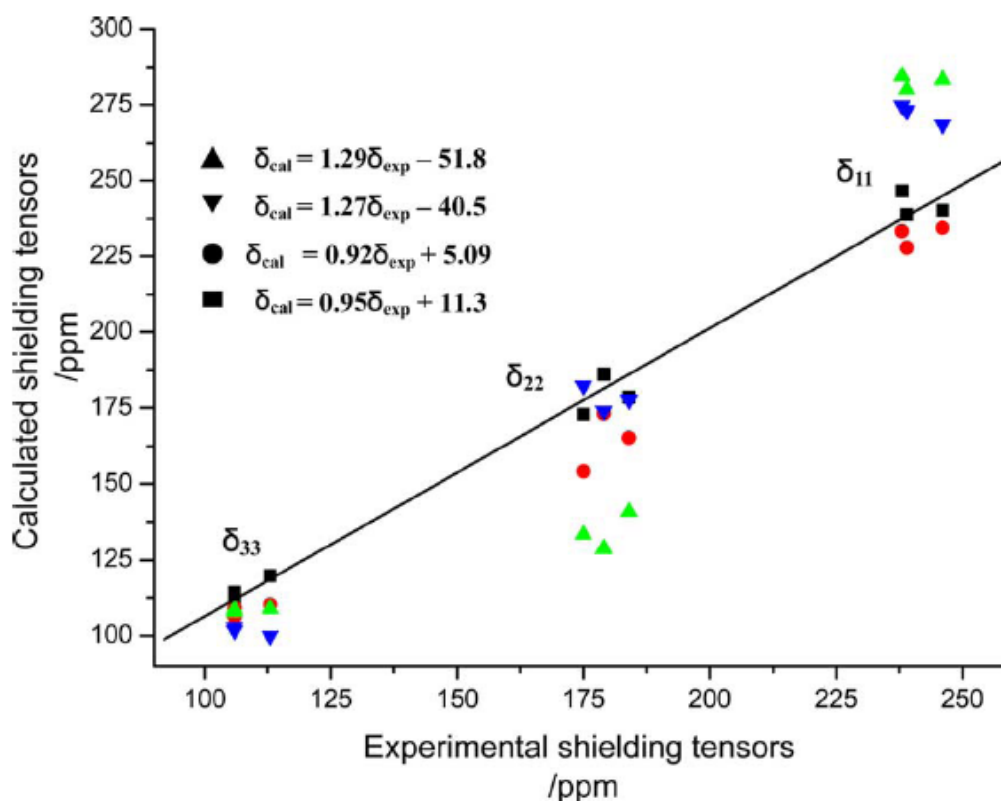
Obliczenia głównych wartości własnych tensora przesunięcia chemicznego dla części klastra w postaci otoczenia molekuly centralnej tj. warstwy „low”, zostały przeprowadzone z zastosowaniem metody DFT, funkcjonału B3LYP oraz bazy funkcyjnej 6-31G. Natomiast obliczenia dla molekuly centralnej będącej w modelu klastra warstwą „high” przeprowadzono metodą MP2 z bazą funkcyjną 6-311G. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 4.23 i porównano z wynikami uzyskanymi podczas innych badań z zastosowaniem innych modeli i metod obliczeniowych.

Tabela 4.23 Obliczone i eksperymentalne główne wartości własne i wartość izotropowa tensora ekranowania dla widma ¹³C NMR l-alaniny, [128].

Aminokwas	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	δ_{izo}
L-alanina	239	184	106	176.8
	(280.0)	(140.7)	(107.6)	(176.1)
	[273.1]	[177.6]	[101.7]	[184.1]
	{227.8}	{165.2}	{109.0}	{167.3}
	238.7*	178.4*	114.2*	177.1*

^a Wartości podane w tabeli bez nawiasów, to dane eksperymentalne zaczerpnięte z pracy [4]; dane w nawiasach () są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu pojedynczej molekuly l-alaniny zaczerpniętymi z pracy [5]; dane w nawiasach [] są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie uproszczonego modelu wiązań wodorowych l-alaniny zaczerpniętymi z pracy [6]; dane w nawiasach { } są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu supermolekularnego l-alaniny przedstawionego cytowanej pracy [128]; dane strukturalne zostały zaczerpniętymi z pracy [46]; dane oznaczone symbolem * są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu supermolekularnego l-alaniny przedstawionego cytowanej pracy [128]; dane strukturalne zostały zaczerpnięte z pracy [46]; zastosowano metodę ONIOM oraz obliczenia optymalizacji geometrii metodami: (MP2/6-311+G(d,p):B3LYP/6-31G).

Przedstawione w pracy porównanie obliczeń składowych tensora przesunięcia chemicznego wskazują na słusność zastosowania modelu supermolekularnego, gdyż uzyskane wartości teoretyczne są zbliżone do wartości uzyskanych doświadczalnie. Powyższą prawidłowość przedstawia również rysunek 4.24.



Rysunek 4.24 Korelacja, obliczonych na podstawie modelu i uzyskanych doświadczalnie, głównych wartości własnych tensora przesunięcia chemicznego dla widma ^{13}C NMR dla trzech aminokwasów w tym l-alaniny.

Dane oznaczone symbolem ▲ są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu pojedynczej molekuly l-alaniny zaczerpniętymi z pracy [5]; dane oznaczone symbolem ▼ są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie uproszczonego modelu wiązań wodorowych l-alaniny zaczerpniętymi z pracy [6]; dane oznaczone symbolem ● są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu supermolekularnego l-alaniny przedstawionego w cytowanej pracy [128]; dane strukturalne zostały zaczerpniętymi z pracy [46]; dane oznaczone symbolem ■ są danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie modelu supermolekularnego l-alaniny przedstawionego cytowanej pracy [128]; dane strukturalne zostały zaczerpniętymi z pracy [46]; zastosowano metodę ONIOM oraz obliczenia optymalizacji geometrii metodami:(MP2/6-311+G(d,p):B3LYP/6-31G), [128].

Rozdział 5

Cel i tezy pracy

Celem niniejszej pracy jest zbadanie właściwości fizycznych l-alaniny jako elementu czynnego biosensora (bioczuJNIKA) promieniowania jonizującego na tle istniejącej wiedzy, szczegółowo opisanej w studium literaturowym. Poza sensem poznawczym, celem pracy są również rozwiązania aplikacyjne w postaci detektora l-alaninowego własnej konstrukcji, na potrzeby pomiarów dawek promieniowania jonizującego oraz propozycja biosensora promieniowania jonizującego, gdzie element aktywny stanowi roztwór wodny l-alaniny, natomiast metodą detekcji produktów jonizacji l-alaniny jest spektroskopia ^1H NMR.

Przegląd literatury dotyczący l-alaniny poddanej działaniu promieniowania jonizującego obejmuje dwa główne nurty. Pierwszy z nich opisuje możliwości zastosowania l-alaniny w dozymetrii promieniowania jonizującego w radioterapii onkologicznej. Drugi to opis właściwości fizycznych i chemicznych rodników l-alaniny, powstałych wskutek absorpcji promieniowania jonizującego przez kryształ l-alaniny. W studium literaturowym wyszczególniono również pracę, dotyczącą wpływu promieniowania jonizującego na wodny roztwór aminokwasów l-alaniny i glicyny. Badania szczegółowo opisane w studium literaturowym oparte są o metodę doświadczalną EPR, która zastosowana została do analizy produktów jonizacji l-alaniny w postaci krystalicznej. Natomiast w przypadku roztworu wodnego l-alaniny zastosowano spektroskopię masową. Dopełnieniem prac doświadczalnych dotyczących produktów jonizacji l-alaniny są obliczenia teoretyczne, dotyczące geometrii molekuł oraz wybranych wielkości spektroskopowych, wykonane dla mało zaawansowanych modeli molekularnych i przy użyciu prostych metod mechaniki kwantowej.

W związku z przedstawionymi faktami zaproponowano następujące tezy:

- Istnieje potrzeba konstrukcji biosensora l-alaninowego/EPR pełniącego rolę dozymetru promieniowania jonizującego oraz wykonania pomiarów kalibracyjnych dla tego dozymetru w celu wykazania możliwości zastosowania w rutynowych pomiarach dozymetrycznych np. jako system indywidualnej kontroli dawki pacjenta leczonego za pomocą radioterapii onkologicznej.
- Niezbędnym jest wykorzystanie odpowiednich modeli molekularnych i metod modelowania molekularnego w celu analizy właściwości fizyko - chemicznych poszczególnych rodników l-alaniny, powstałych w objętości czynnej biosensora l-alaninowego po napromienieniu, których mieszanina daje doświadczalne widmo EPR.

- Istotnym z punktu widzenia wpływu promieniowania jonizującego na organizmy żywe jest zbadanie roztworów wodnych aminokwasu l-alaniny poddanych działaniu promieniowania jonizującego w celu wykrycia produktów jonizacji wodnych roztworów l-alaniny przy zastosowaniu metody ^1H NMR, a tym samym przydatności wodnego roztworu l-alaniny do zastosowania jako element aktywny biosensora promieniowania jonizującego.
- Niezbędnym jest wykorzystanie odpowiednich modeli molekularnych i metod modelowania molekularnego w celu określenia właściwości fizyko – chemicznych wodnych roztworów l-alaniny i produktów jej jonizacji, powstałych w roztworze po napromienieniu promieniowaniem jonizującym, widocznych w widmie ^1H NMR.

Do udowodnienia tak sformułowanych tez niezbędne było:

- Napromienienie biosensorów l-alaniny zarówno w postaci krystalicznej jak i roztworu wodnego oraz analiza metodami spektroskopii EPR i ^1H NMR.
- Skonstruowanie złożonych modeli molekularnych (dwóch warstw ONIOM) w celu uwzględnienia wpływu otoczenia molekularnego na strukturę cząsteczki l-alaniny oraz trzech głównych form rodników R1, R2, R3 l-alaniny w kryształach.
- Zastosowanie zaawansowanych metod chemii kwantowej takich jak: HF, DFT, MP2 ze standardowymi bazami funkcji w celu optymalizacji geometrii molekularnej i wyboru najbardziej zgodnego modelu z rzeczywistym układem molekularnym l-alaniny i jej rodników w kryształach.
- Zastosowanie zaawansowanych metod chemii kwantowej takich jak: HF, DFT, MP2 ze specjalnymi bazami funkcji tj. EPR-III i IGLO-III w celu obliczenia i analizy parametrów EPR, takich jak składowe tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} rodników R1, R2 i R3 l-alaniny i symulacji widma EPR.
- Skonstruowanie złożonych modeli molekularnych (dwóch warstw ONIOM, CPCM, IEF-PCM) w celu uwzględnienia wpływu otoczenia molekularnego na strukturę cząsteczki l-alaniny i produktów jej jonizacji w roztworach wodnych.
- Zastosowanie zaawansowanych metod chemii kwantowej takich jak: HF, DFT, MP2 ze standardowymi bazami funkcji w celu optymalizacji geometrii molekularnej i wyboru najbardziej zgodnego modelu z rzeczywistym układem molekularnym dla wodnego roztworu l-alaniny i produktów jego jonizacji oraz wzorca, dla spektroskopii ^1H NMR związku TSP.
- Zastosowanie zaawansowanych metod chemii kwantowej takich jak: HF, DFT, MP2 ze specjalnymi bazami funkcji tj. aug-cc-pVTZ-J i pcJ-n w celu obliczenia i analizy parametrów spektroskopowych ^1H NMR, takich jak J_K^{iso} , K_K^{iso} , σ_K^{iso} , δ_{iso} , dla wodnego roztworu l-alaniny

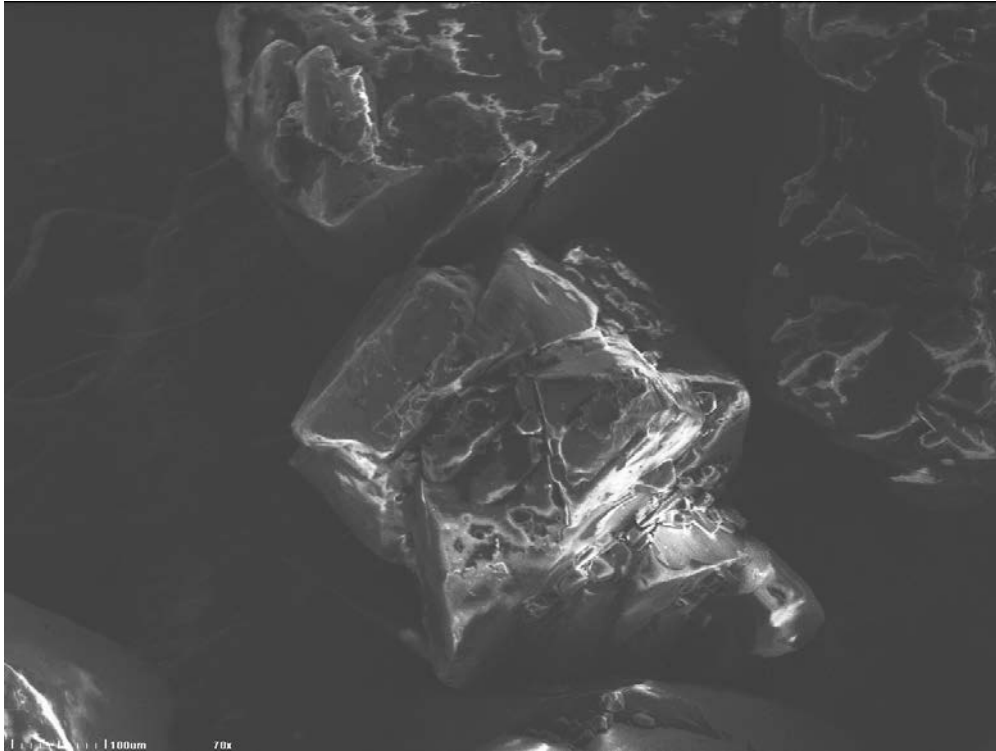
i produktów jego jonizacji oraz wzorca, związku TSP. Rezultatem obliczeń może być symulacja widma ^1H NMR.

Rozdział 6

Badania własne.

6.1 Materiały i metody badań.

Obiekt badań stanowiły kryształy l-alaniny, w postaci proszku zamkniętego w hermetycznym opakowaniu, produkt handlowy firmy MERCK o numerze katalogowym 101007.0025. W celu zwiększenia gęstości upakowania próbki, jej przygotowanie do analizy EPR było poprzedzone rozdrobnieniem kryształków l-alaniny z zastosowaniem młódky agatowej. W wyniku rozdrabniania uzyskano polikrystaliczne ziarna l-alaniny o rozmiarach od kilku do kilkuset μm (rysunek 6.1). Następnie sproszkowaną l-alaninę umieszczono w kwarcowej rurce o średnicy wewnętrznej 0.7 mm i długości 50 mm (kapilary zostały pozyskane z firmy MEDLAB). Oba końce kapilary zostały zabezpieczone parafiną przed wnikaniem pary wodnej. Wysokość słupa proszku l-alaninowego w rurce kapilarnej wynosiła 10 mm. Przygotowano również próbki do analizy H-NMR. Stanowiły one roztwór l-alaniny rozpuszczonej w D_2O w proporcji 10mg l-alaniny na 0.6 ml D_2O . Roztwór umieszczono w szklanej kuwecie stosowanej w standardowych pomiarach NMR.



Rysunek 6.1 Kryształy l-alaniny w postaci proszku [Zdjęcie wykonane na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki w Laboratorium Urządzeń Elektronooptycznych przez Prof. dr hab. inż. Witolda Słótko, za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego typu Jeol JSM–335CF w 70 krotnym powiększeniu].

Tak przygotowane próbki l-alaniny poddano ekspozycji wysokoenergetycznym promieniowaniem jonizującym X. Napromienianie próbek l-alaniny przeprowadzono z zastosowaniem akceleratora medycznego Varian – Clinac 2100 CD, który był przystosowany do generowania wiązek promieniowania jonizującego X o energii kwantów 6MeV i 18MeV. W obu przypadkach próbki l-alaniny umieszczano w specjalnie przygotowanym fantomie z tworzywa sztucznego Polimethyl Methacrylate (w skrócie PMMA) na głębokości 5 cm dla energii 6 MeV oraz 10 cm dla energii 18 MeV. Fantom z PMMA został wykorzystany w badaniach ze względu na ekwiwalentność procesów rozpraszania promieniowania jonizującego ze środowiskiem wodnym stanowiącym model tkanki miękkiej. Czas napromieniania dla każdej z wartości dawki pochłoniętej ściśle związanej z energią oraz głębokością pomiaru, ustalano przygotowując odpowiednie plany leczenia w Systemie Planowania Leczenia Eclipse (SPL Eclipse). W celu precyzyjnego określenia dawki, czasy napromieniania z SPL Eclipse skorygowano o różnicę wydajności referencyjnej (wydajności wprowadzonej w SPL) i wydajności zmierzonej w warunkach referencyjnych przy użyciu wzorcowanej komory jonizacyjnej, dla obu zastosowanych w etapie kalibracji wartości energii promieniowania elektromagnetycznego. System Planowania

Leczenia Eclipse zawierający dane konfiguracyjne akceleratora, na którym przeprowadzono kalibrację, został uprzednio poddany pozytywnej weryfikacji w programie – Audyt Dozymetryczny (TL) prowadzonym przez Laboratorium Wtórnych Wzorców Dozymetrycznych w Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie. Wszystkie prace dotyczące napromieniania próbek l-alaniny przeprowadzone zostały w Dolnośląskim Centrum Onkologii – w Zakładzie Fizyki Medycznej.

Próbki zawierające l-alaninę w postaci proszku po napromienieniu zostały poddane analizie EPR na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki w laboratorium Instytutu Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechniki Wrocławskiej. Analiza EPR została wykonana przy użyciu spektrometru fali ciągłej (CW) firmy Bruker model ELEXYS E500, którego parametry pracy w przypadku analizowanych próbek l-alaniny odpowiednio wynoszą: częstotliwość mikrofal pasma X 9,5GHz, amplituda modulacji 1,25mT, stała czasowa 0,1s, moc mikrofal 5mW, szerokość przemiatania pola magnetycznego 20mT, natężenie pola magnetycznego dla linii centralnej 339mT, temperatura pomiaru $T=298K$. Spektrometr był połączony z komputerem klasy PC, na którym zainstalowano oprogramowanie DATA EPR umożliwiające cyfrowy zapis i analizę widma.

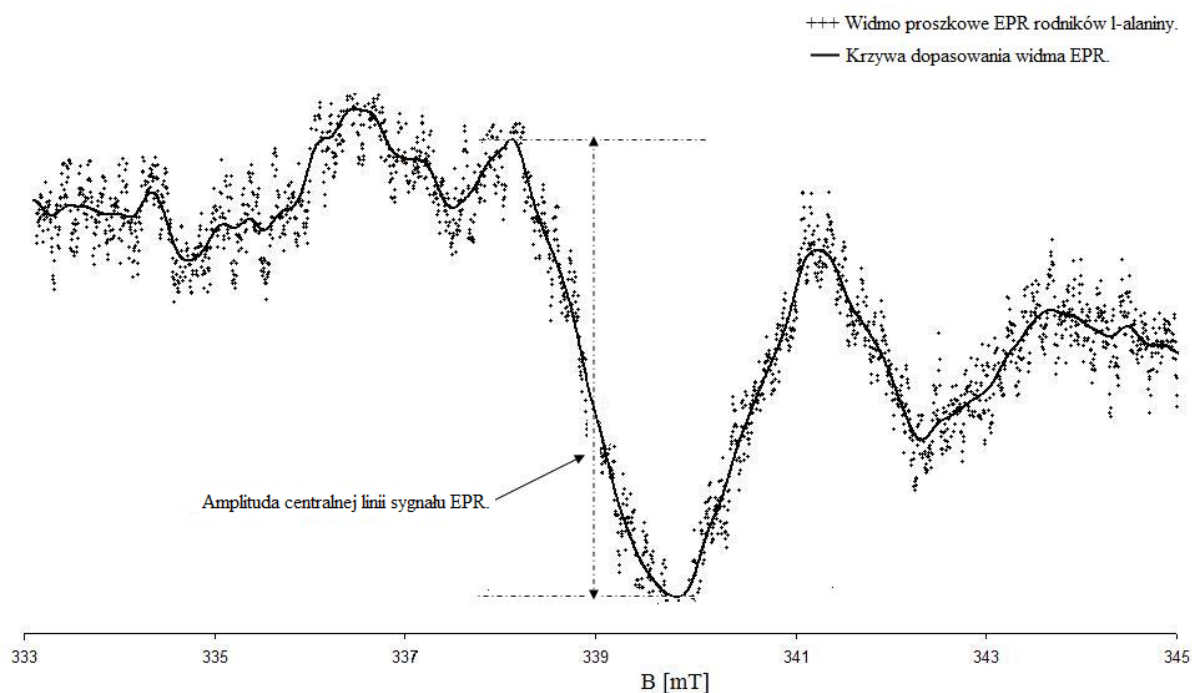
Próbki zawierające l-alaninę w postaci roztworu D_2O po napromienieniu zostały poddane analizie NMR na Wydziale Chemii w Laboratorium Badań Strukturalnych, Politechniki Wrocławskiej. Do pomiarów NMR zastosowano spektrometr firmy Bruker typu AvanceTM 600MHz. Spektrometr wyposażony był w kriosondę – sondę trzykanałową $^1H/^{13}C/^{15}N$, z odwrotnym układem cewek, pracującą w zakresie temperatur (0 do 60) $^{\circ}C$. Za pomocą niniejszego spektrometru wykonano pomiary widma protonowego tzw. 1H NMR dla próbki l-alaniny rozpuszczonej w D_2O . Parametry pomiaru spektrometru NMR to: temperatura $T=300K$, liczba skanów $n = 256$, wyłączony spin próbki (tzn. próbka znajdowała się w tej samej pozycji podczas całego pomiaru). Spektrometr NMR połączony był z komputerem klasy PC, na którym zapisywano uzyskane widmo w postaci cyfrowej przy użyciu oprogramowania firmy Bruker. W celu analizy widma NMR zastosowano niekomercyjny pakiet oprogramowania firmy MestReNova [130].

Analiza teoretyczna uzyskanych doświadczalnie widm EPR i NMR przeprowadzona została z zastosowaniem komercyjnego oprogramowania komputerowego Gaussian 09 oraz GaussView 3.09 [85]. Dostęp do zaawansowanych pakietów modelowania molekularnego uzyskano dzięki grantowi obliczeniowemu ufundowanemu przez *Wrocławskie Centrum Sieciowo – Superkomputerowe* (WCSS). Do graficznej prezentacji teoretycznie obliczonego widma EPR zastosowano oprogramowanie MATLAB z modulem EasySpin [ES].

6.2 Wyniki i obliczenia.

6.2.1 Badania EPR właściwości fizycznych rodników l-alaniny.

Alanina jest jednym z podstawowych aminokwasów budulcowych białek, występujących u większości organizmów żywych na naszej planecie. Pod wpływem promieniowania jonizującego cząsteczki tego aminokwasu występujące w postaci krystalicznej ulegają radiolizie, której produktem są rodniki l-alaniny. Czas życia uzyskanych w ten sposób rodników jest na tyle długi aby można było badać je metodą EPR. W niniejszej pracy uzyskano widmo EPR dla próbek zawierających rodniki l-alaniny powstałe po uprzednim napromienieniu l-alaniny promieniowaniem X. Widmo to jest nieregularne ze względu na polikrystaliczną strukturę próbki, wynika z występowania trzech głównych struktur rodników R1, R2, R3 l-alaniny oraz form przejściowych w postaci innych rodników szczegółowo opisanych w pracy [102]. W celu lepszego zobrazowania kształtu widma, przy pomocy programu komputerowego EPR System, dopasowano krzywą wyznaczoną metodą średniej ruchomej do widma doświadczalnego. Widmo proszkowe l-alaniny wraz z dopasowaną krzywą przedstawia rysunek 6.2.



Rysunek 6.2 Widmo doświadczalne EPR rodników l-alaniny wraz z dopasowaną krzywą wyznaczoną metodą średniej ruchomej oraz zaznaczoną amplitudą linii centralnej, której wartość stosowana jest w pomiarach dozymetrycznych

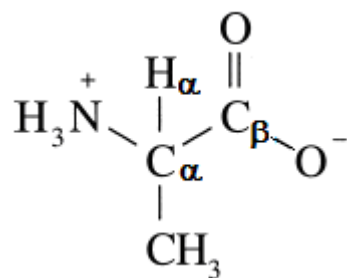
Uzyskane w ten sposób widma EPR napromienionych próbek l-alaniny pozwoliły skonstruować dozometr promieniowania jonizującego, dla którego wykonano szereg pomiarów kalibracyjnych i wykazano możliwość zastosowania w rutynowych pomiarach dozymetrycznych np. w radioterapii onkologicznej. Wyniki tych badań przedstawione zostały w pracy [131], gdzie porównano dwa dozymetry: l-alaninowy i hydroksyapatytowy, na potrzeby pomiarów dawki promieniowania jonizującego w radioterapii onkologicznej.

Jednakże uzyskane widma EPR dla proszku l-alaniny będącego mieszaniną rodników nie pozwalają na wyodrębnienie struktur występujących w niej rodników, a co za tym idzie opisu ich właściwości fizycznych. W tym celu zastosowano wybrane modele i metody obliczeniowe chemii kwantowej co przedstawiono w rozdziale 3.

6.2.2 Badania ^1H NMR właściwości fizycznych produktów radiolizy wodnych roztworów l-alaniny.

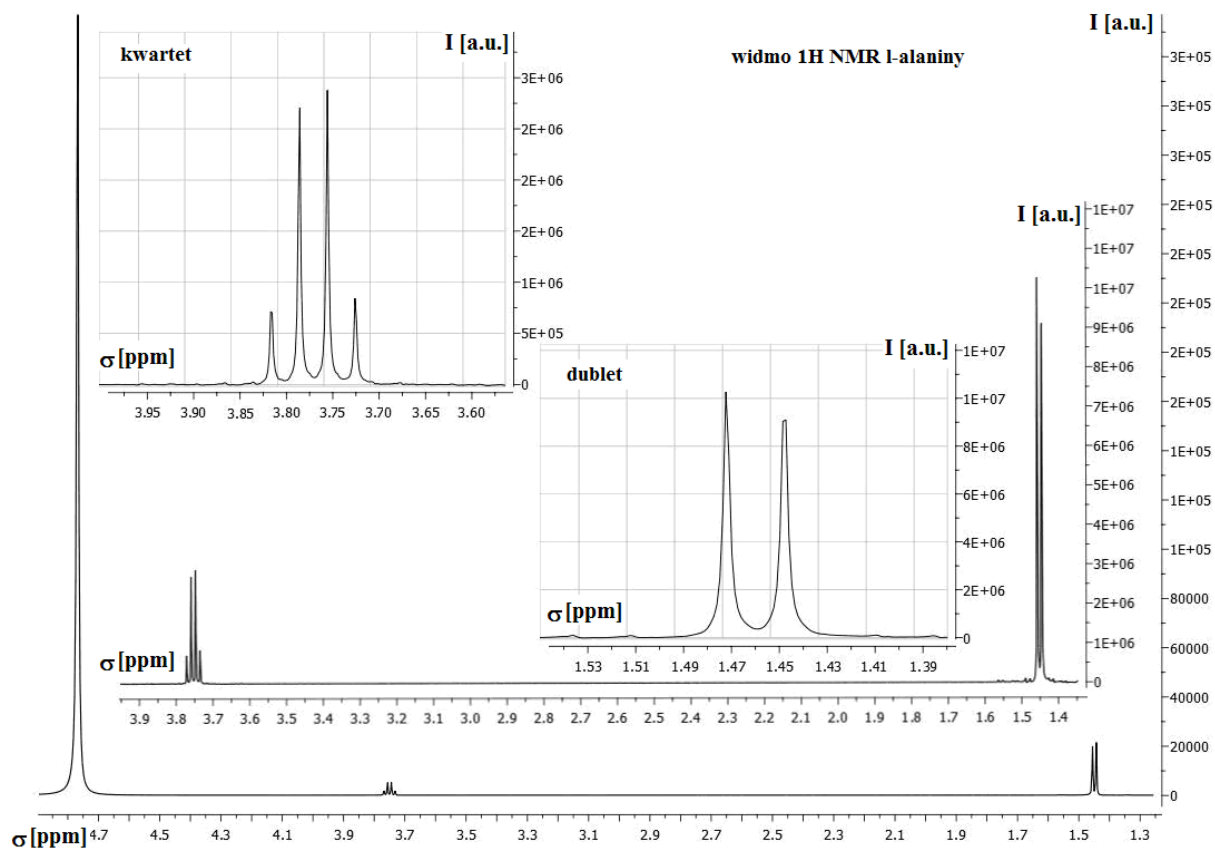
Jądrowy Rezonans Magnetyczny (NMR) to szeroko stosowana technika analizy spektralnej w chemii, biologii i medycynie. Szeroki zakres zastosowania metody obejmuje analizę od pojedynczych cząstek po złożone układy kwasów nukleinowych i białek. Kształt widma NMR wnosi wiele cennych informacji o fizycznych i chemicznych właściwościach badanej substancji. Do najważniejszych z nich należy wielkość sprzężenia spin – spin oraz przesunięcie chemiczne.

Istotnym z punktu widzenia wpływu promieniowania jonizującego na organizmy żywe było zbadanie roztworów wodnych aminokwasu l-alaniny poddanych działaniu megawoltowego promieniowania X. Celem niniejszych badań było wykrycie produktów jonizacji wodnych roztworów l-alaniny z zastosowaniem metody ^1H NMR. W wyniku pochłaniania promieniowania jonizującego przez wodne roztwory aminokwasów powstają rodniki: elektron hydratacji (e_{aq}), wodorowy (H) oraz hydroksylowe (OH^\bullet , HO_2^\bullet), będące produktami radiolizy cząsteczek wody oraz rodniki aminokwasu, które następnie ulegają deaminacji, dekarboksylacji, demetylacji. W wyniku tych reakcji powstają aldehydy i ketony [132]. W celu analizy produktów radiolizy wodnych roztworów l-alaniny zastosowano w niniejszej pracy metodę spektroskopii ^1H NMR.



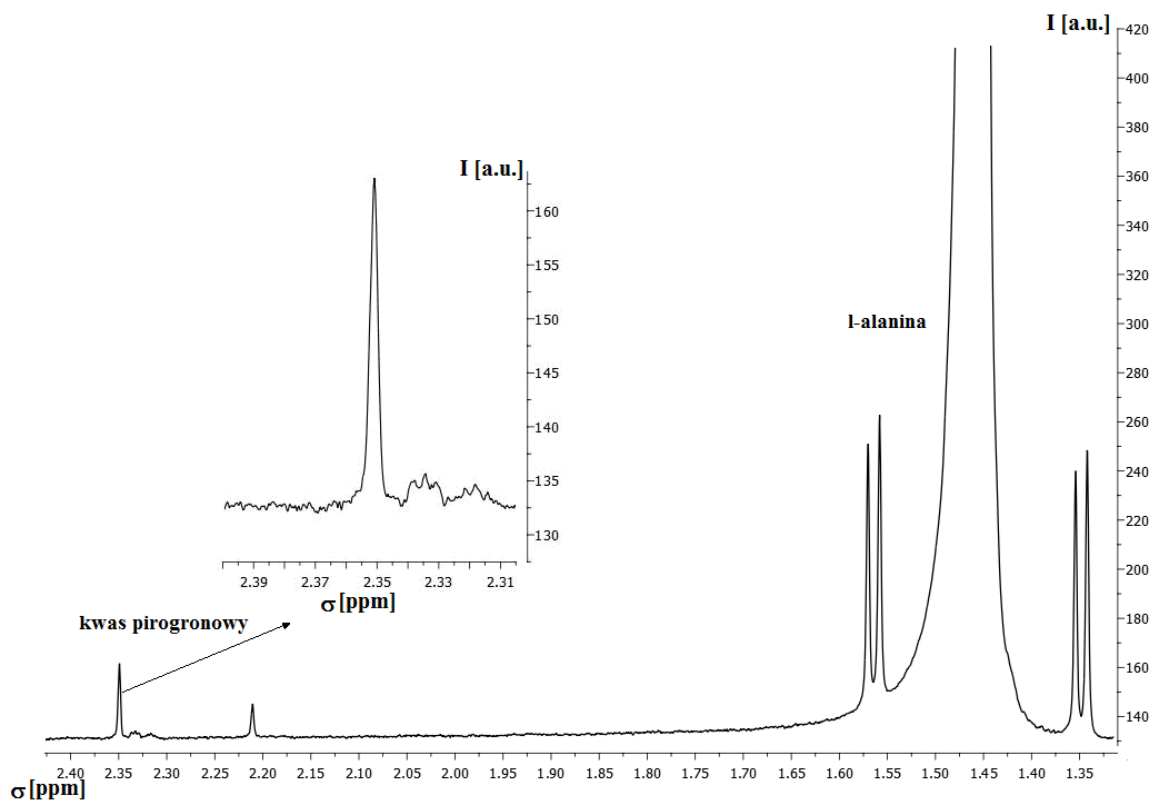
Rysunek 6.3 Wzór strukturalny cząsteczki l-alaniny (jon obojnaczy).

Uzyskane widmo doświadczalne ^1H NMR wodnego roztworu l-alaniny przedstawia rysunek 6.4 Jest to widmo protonowe l-alaniny (rysunek.6.3) powstałe w wyniku sprzężenia nierównocennych jąder, gdzie możemy zauważyć dublet 1.46ppm pochodzący od sprzężenia między protonami grupy metylowej CH_3 ($^3J_{\text{H,H}}=7.25\text{Hz}$) z protonem H_α przy atomie węgla C_α w cząsteczce l-alaniny. Obok pików dubletu możemy również zauważyć piki o nieco mniejszej intensywności. Są to sygnały satelitarne zwane dubletem dubletów będące efektem sprzężenia ^1H - ^{13}C protonów grupy metylowej CH_3 z jądrem atomu węgla C grupy metylowej CH_3 , ($^1J_{\text{H,C}} = 130\text{Hz}$). Kolejny sygnał, który możemy zaobserwować w widmie ^1H NMR wodnego roztworu l-alaniny jest to kwartet 3.76ppm pochodzący od sprzężenia protonu H_α przy węglu C_α ($^3J_{\text{H,H}}=7.25\text{Hz}$) z protonami grupy metylowej CH_3 . Obok pików kwartetu znajdują się również tak jak w przypadku dubletu sygnały satelitarne o mniejszej intensywności zwane dubletem kwartetów powstałe w wyniku sprzężenia ^1H - ^{13}C protonu H_α z jądrem atomem węgla C_α , ($^1J_{\text{H,C}}=145\text{Hz}$).



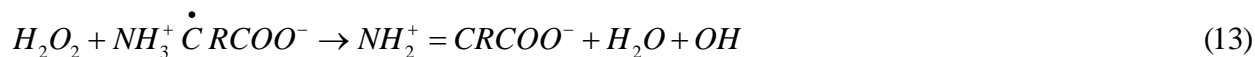
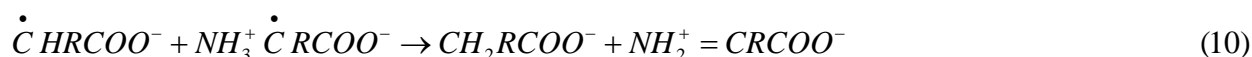
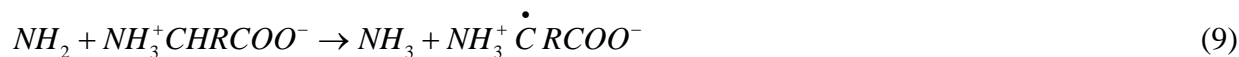
Rysunek 6.4 Widmo doświadczalne ^1H NMR roztworu wodnego l-alaniny przed napromienieniem.

Po napromienieniu wodnego roztworu l-alaniny poddano go analizie ^1H NMR, gdzie zaobserwowano występowanie nowego pikę sygnału, rysunek 6.5, w stosunku do próbki nienapromienionej, o przesunięciu chemicznym 2.354ppm.



Rysunek 6.5 Widmo ^1H NMR l-alaniny i kwasu pirogronowego w roztworze wodnym po napromienieniu.

Pik ten odpowiada występowaniu w analizowanym roztworze kwasu pirogronowego (2.46ppm) [133], który jest w tym przypadku produktem radiolizy roztworu wodnego l-alaniny. Występowanie tego związku zaobserwowano również przez Boyd M. Weeks, Sibyl A. Cole i Warren M. Garrison [134] jako produkt radiolizy wodnych roztworów l-alaniny, jednakże jako metodę analityczną zastosowano spektroskopię masową. Autorzy zaproponowali również schemat reakcji rodnikowych, w wyniku których powstają końcowe produkty radiolizy wodnego roztworu l-alaniny w tym kwas pirogronowy. Schemat ten przedstawia rysunek 6.6. W celu głębszego poznania właściwości fizycznych takich jak struktura molekularna i właściwości spektroskopowe cząsteczek l-alaniny oraz kwasu pirogronowego w roztworze wodnym, zaproponowano modele i metody badań wykorzystywane w chemii kwantowej. Rozważania na ten temat zawierają rozdziały 7 i 9 niniejszej pracy.



Rysunek 6.6 Schemat reakcji dla wodnego roztworu l-alaniny lub glicyny zaproponowany w pracy [134]. Punkty od 1 do 5 przedstawiają reakcje radiolizy cząsteczki wody i oddziaływanie elektronów rozproszonych, powstałych na skutek absorpcji energii pierwotnego promieniowania jonizującego. Punkty od 6 do 14a przedstawiają reakcje oddziaływania produktów radiolizy roztworu wodnego l-alaniny lub glicyny w zależności od podstawnika R.

Rozdział 7

Modelowanie układów molekularnych l-alaniny.

7.1 Wprowadzenie.

W części pracy dotyczącej modelowania molekularnego zastosowano wybrane metody konstrukcji i metody obliczeniowe chemii kwantowej w odniesieniu do krystalicznej postaci l-alaniny i jej rodników o strukturach molekularnych R1, R2, R3 [42, 43]. Rodniki te powstają na skutek oddziaływania promieniowania jonizującego na cząsteczkę badanego aminokwasu. W celu pogłębienia wiedzy o właściwościach fizycznych l-alaniny poddanej działaniu promieniowania jonizującego, w tejże pracy skonstruowano również modele molekularne dla l-alaniny występujące w roztworach wodnych oraz dla kwasu pirogronowego będącego produktem jonizacji l-alaniny w roztworze wodnym (rozdział 7). Pomocniczo przeprowadzono optymalizację struktury molekularnej i obliczono wielkość skalarną tensora ekranowania σ_K^{iso} dla wzorca spektroskopii ^1H NMR tj. związku określanego w literaturze jako Trimethylsilyl propanoic acid (w skrócie TSP) [135].

Wszystkie wyżej wymienione związki organiczne w swej budowie cząsteczkowej zawierają głównie atomy C, N, H i O. W przypadku radiacyjnie generowanych rodników w kryształach l-alaniny mamy do czynienia z powstawaniem trzech podstawowych struktur rodników R1, R2, R3, których centrum paramagnetyczne występuje w tym samym miejscu (rysunek 4.2). Rodniki typu R1 powstają na skutek radiacyjnej deaminacji cząsteczki l-alaniny, wskutek czego przy atomie węgla C_α tworzy się centrum paramagnetyczne. Rodniki R2 powstają poprzez oderwanie atomu wodoru od cząsteczki l-alaniny od atomu C_α , gdzie tak jak w przypadku rodnika R1 utworzone zostaje centrum paramagnetyczne. Rodnik typu R3 to forma molekularna, której centrum paramagnetyczne również występuje przy atomie węgla C_α [42, 43]. Ze względu na umiejscowienie centrum paramagnetycznego w cząsteczce rodnika l-alaniny oraz budowę orbitali molekularnych ten typ rodników nazywany jest również jako π - typ. Interesującym z punktu widzenia określenia właściwości fizycznych głównych form rodników R1, R2, R3 jest zbadanie wielkości oddziaływań nadsubtelnych centrum paramagnetycznego z atomami jego otoczenia oraz wielkości oddziaływań z zewnętrznym polem magnetycznym, co jest przydatne w analizie doświadczalnej wykonanej metodą EPR. W przypadku radiolizy wodnych roztworów l-alaniny, mamy do czynienia z produkcją kwasu pirogronowego, który jest wykrywany w roztworze metodą ^1H NMR (podrozdział 6.2.2).

W celu wyznaczenia właściwości fizycznych badanych roztworów, istotnym jest określenie takich wielkości jak geometria molekularna i parametry spektroskopowe: przesunięcie chemiczne δ_{iso} i wielkość sprzężenia spin – spin J_K^{iso} układów molekularnych l-alaniny oraz kwasu pirogronowego w roztworze wodnym.

Wszystkie te informacje posłużyły do znalezienia optymalnej geometrii cząsteczki i przeprowadzenia obliczeń odpowiednich wielkości fizycznych modeli molekularnych .

7.2 Konstrukcja modeli molekularnych l-alaniny i optymalizacja geometrii.

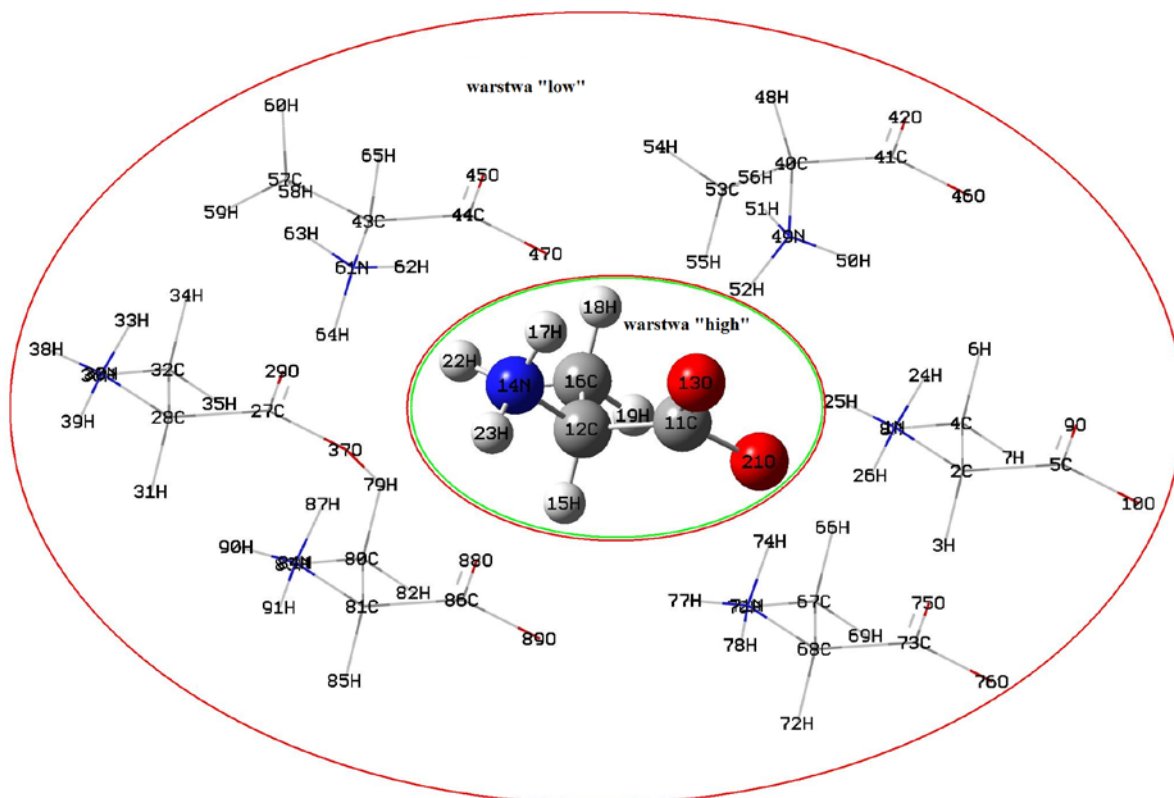
Punktem wyjścia do konstrukcji modeli molekularnych był przegląd literatury, zawierający szczegółowy przegląd metod konstrukcji modeli molekularnych zarówno dla l-alaniny w fazie stałej, w roztworach wodnych, jak i jej rodników. Do konstrukcji modelu pojedynczych molekuł l-alaniny posłużyły dane z pracy [68], w której doświadczalnie metodami dyfrakcyjnymi wyznaczono długości wiązań i wartości kątów między atomami molekuly l-alaniny.

W niniejszej pracy skupiono uwagę na konstrukcji następujących modeli molekularnych:

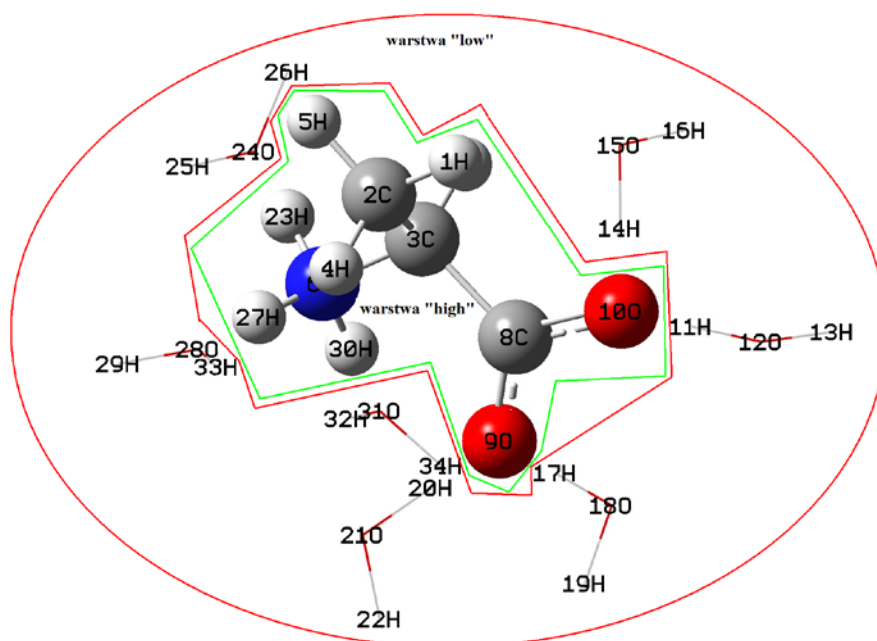
- modelu kryształu l-alaniny,
- modelu rodników R1, R2 i R3 l-alaniny w kryształach,
- modelu l-alaniny w roztworze wodnym,
- modelu kwasu pirogronowego w roztworze wodnym,
- modelu cząsteczek TSP w roztworze wodnym.

Jako wzorzec pliku wsadowego do programu Gaussian 03 i 09, zawierającego dane krystalograficzne oraz informacje o spinie i ładunku cząsteczki l-alaniny w postaci jonu obojnaczego, zastosowano plik typu input pobrany z bazy NIST [136]. Wzorzec ten po zmodyfikowaniu odległości między atomami i wartości kątów między atomami w molekułach l-alaniny na wartości doświadczalne zawarte w pracy [68], zastosowano do konstrukcji modelu kryształu l-alaniny oraz l-alaniny w roztworze wodnym.

Zarówno model kryształu, jak i model roztworu wodnego l-alaniny zostały skonstruowane w postaci tzw. modelu klastra z zastosowaniem metody dwóch warstw ONIOM (z ang. our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics) [121]. Modele te przedstawiają rysunki 7.1 i 7.2, gdzie możemy zauważyć centralnie położoną molekułkę l-alaniny -jest to tzw. warstwa „high” w metodzie ONIOM oraz molekuly otoczenia: l-alaninę dla modelu kryształu i wodę dla modelu roztworu wodnego l-alaniny, stanowiące warstwę „low” w metodzie ONIOM.



Rysunek 7.1 Model startowy dwóch warstw ONIOM, klastery l-alaniny w postaci kryształicznej. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.

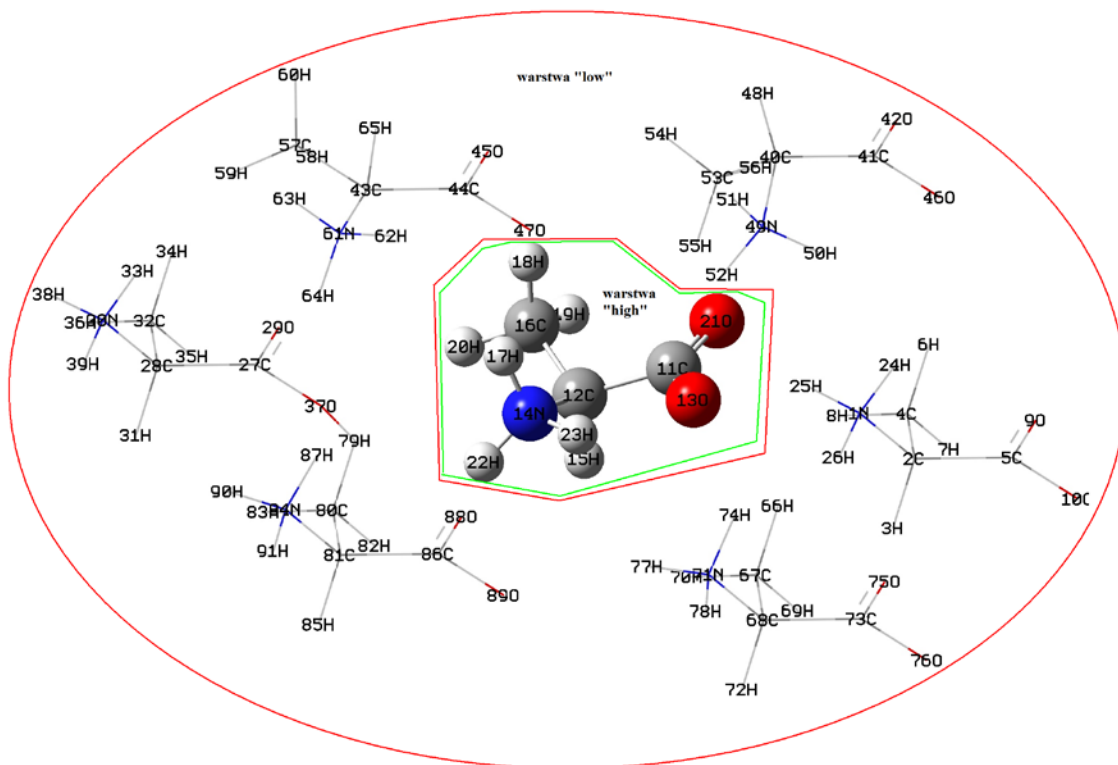


Rysunek 7.2 Model startowy dwóch warstw ONIOM, klastery l-alaniny w roztworze wodnym. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.

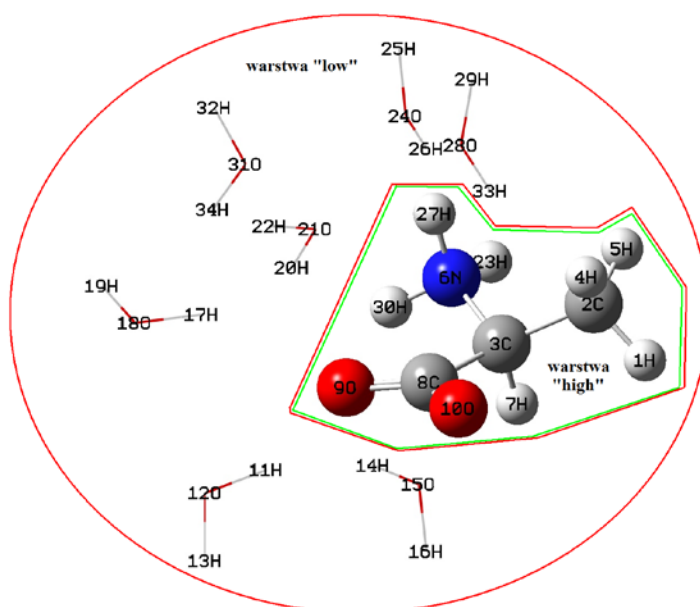
Następnie tak skonstruowane modele podano „optymalizacji geometrii”. Jest to proces obliczeniowy polegający na znalezieniu minimum energetycznego dla optymalnego położenia atomów w modelu molekularnym. W procesie optymalizacji geometrii układów molekularnych dwóch warstw ONIOM przyjęto następujące założenia:

- atomy otoczenia warstwy „low” są zamrożone („frozen”), tzn. geometria molekuł w tej warstwie nie ulega zmianie w procesie optymalizacji geometrii, natomiast ulega optymalizacji wzajemne położenie molekuł względem siebie i względem molekuly warstwy „high”,
- zastosowano zróżnicowane pod względem zaawansowania metody obliczeniowe stosowane w procesie optymalizacji, dla warstwy „low” metodą HF i AM1, a dla warstwy „high” HF, DFT, MP2 (rozdział 3),
- w modelach startowych (rysunki 7.1 i 7.2) najmniejsza odległość między atomami molekuly centralnej występującej w warstwie „high” a atomami otoczenia występującymi w warstwie „low” wynosiła ok. 2 Å.

Wszystkie te czynności modelowania molekularnego mają na celu jak najdokładniejsze przybliżenie dwuwarstwowych modeli ONIOM do rzeczywistych układów molekularnych. Przykładowe geometrie zoptymalizowanych układów molekularnych l-alaniny w kryształach oraz w roztworze wodnym przedstawiają rysunki 7.3 i 7.4.



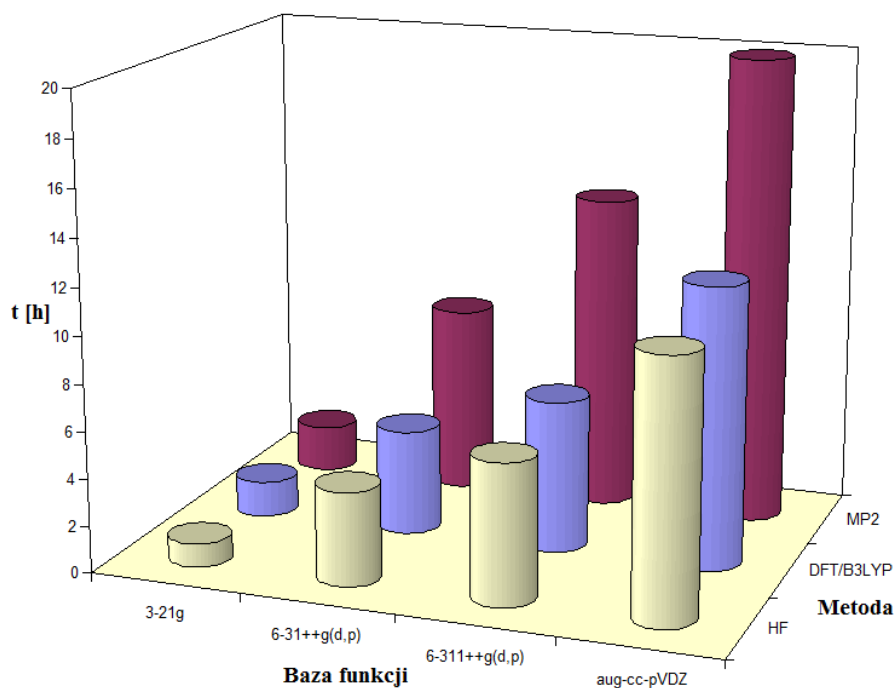
Rysunek 7.3 Model dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą HF/6-31++(d,p):AM1, klastery l-alaniny w postaci krystalicznej. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.



Rysunek 7.4 Model dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą HF/6-31++(d,p):HF/3-21g, klastery l-alaniny w roztworze wodnym. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.

Wybór metody ONIOM, a co za tym idzie konstrukcja modelu w postaci klastra pozwala na uwzględnienie oddziaływań elektrostatycznych atomów otoczenia na molekułę centralną, której właściwości fizyczne takie jak odległości między atomami i wartości kątów są przedmiotem badań. Zagadnienie konstrukcji modeli molekularnych wraz z optymalizacją geometrii układów molekularnych l-alaniny opisano w rozdziale 4 niniejszej pracy.

Optymalizację geometrii modeli układów molekularnych dla l-alaniny, mającą na celu przedstawienie elementu objętości klastrów zarówno kryształu, jak i roztworu wodnego l-alaniny wykonano przy użyciu trzech metod obliczeniowych mechaniki kwantowej, tj. metody HF, metody DFT i metody MP2. W celu uzyskania dobrego przybliżenia modelu do rzeczywistego układu molekularnego dla każdej z metod przeanalizowano kilka wybranych baz funkcji takich jak: 3-21g, 6-31g++, 6-311++, aug-cc-pVDZ (rozdział 3). Należy dodać iż baza 3-21g to najprostszy typ bazy Pople'a, natomiast bazy: 6-31g++, 6-311++, są bazami Pople'a bardziej złożonymi, które uwzględniają funkcje dyfuzyjne i polaryzacyjne na atomach bloku *p* oraz na atomach wodoru (podrozdział 3.2). W niniejszej pracy do optymalizacji geometrii stosowano również bazę aug-cc-pVDZ. Jest to baza z grupy baz Dunninga, skonstruowanych na potrzeby opisu efektów korelacji elektronowych, w tym elektronów walencyjnych. Zagadnienie baz funkcji opisano w podrozdziale 3.2 niniejszej pracy. Uzyskane wyniki czasu trwania obliczeń w przypadku procesu optymalizacji geometrii modeli układów molekularnych l-alaniny w zależności od zastosowanej metody i bazy funkcji przedstawia rysunek 7.5.



Rysunek 7.5 Optymalizacja geometrii modelu roztworu wodnego l-alaniny skonstruowanego w postaci klastra metodą dwóch warstw ONIOM. [Wykres przedstawia zależność czasu trwania obliczeń optymalizacji geometrii modelu molekularnego w funkcji zastosowanej metody obliczeniowej i bazy funkcji dla warstwy „high”, jednocześnie warstwa „low” optymalizowana była przy użyciu metody HF z bazą 3-21g dla wszystkich kombinacji warstwy „high”.

Jak łatwo zauważyć na rysunku, metodą która wykorzystuje najwięcej zasobów obliczeniowych i czasu obliczeniowego jest metoda MP2 w połączeniu z bazą Dunina cc-aug-pVDZ. Najmniej zaawansowaną metodą jest metoda HF w połączeniu z bazą 3-21g. Pośrednio między metodami HF i MP2 znajduje się wykres dla metody DFT w połączeniu z analizowanymi bazami. Zatem metody HF, DFT i MP2 stosowane były wyłącznie dla warstwy „high” w modelu molekularnym ONIOM obejmującym jedynie pojedynczą molekułę l-alaniny będącą przedmiotem badań. W celu oszczędzenia czasu i zasobów obliczeniowych, a także nie istotnych z punktu widzenia niniejszej pracy właściwości fizycznych, tj. długości wiązań i wartości kątów między atomami, warstwa „low” stanowiąca otoczenie molekulej centralnej w modelu ONIOM optymalizowana była za pomocą mniej zaawansowanej metody obliczeniowej AM1.

7.3 Geometria optymalna l-alaniny w kryształach oraz w roztworze wodnym.

Wyniki dotychczasowych badań, szczegółowo opisane w studium literaturowym, dotyczące modelowania molekularnego (w tym optymalizacji geometrii l-alaniny, zarówno w postaci krystalicznej jak i w roztworach wodnych) wskazują na brak systematycznych

analiz dotyczących modeli l-alaniny konstruowanych i zoptymalizowanych z zastosowaniem metody dwóch warstw ONIOM, trzech głównych metod obliczeniowych mechaniki kwantowej: HF, DFT, MP2 oraz czterech różnych baz funkcji. Jedynie Ivan M. Degtyarenko i wsp. [94, 68] podjęli tę tematykę. Optymalizowali oni metodami dynamiki molekularnej Borna – Oppenheimera układy molekularne składające się z kilku molekuł l-alaniny, mające na celu odtworzenie geometrii przestrzennej atomów l-alaniny w roztworze wodnym oraz w kryształach. Innym przykładem jest praca [128] autorstwa Anmin Zheng i wsp., w której umieszczono propozycję modeli molekularnych l-alaniny w kryształach oraz w roztworze wodnym, które skonstruowano i zoptymalizowano metodą dwóch warstw ONIOM. Jednakże analiza geometryczna nie stanowiła istoty pracy a jedynie przygotowanie modeli na potrzeby analizy NMR. Została przeprowadzona z zastosowaniem metody DFT dla warstwy „high” (molekuła centralna) i metody AM1 dla warstwy „low” (molekuły otoczenia).

Wyniki optymalizacji geometrii modeli ONIOM l-alaniny w kryształach i w roztworze wodnym przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy zaprezentowano i porównano z wynikami z prac [94, 68] w tabeli 7.1 i 7.2. Prace te zawierają tzw. geometrie referencyjne dla wyników uzyskanych w trakcie badań własnych. Referencyjny układ molekularny w przypadku kryształu l-alaniny opisany w pracy [68] został wyznaczony doświadczalnie metodami dyfrakcyjnymi. Natomiast referencyjny układ molekularny dla l-alaniny w roztworze wodnym opisany w pracy [94] uzyskano za pomocą metod teoretycznych, na podstawie modelu cząsteczki l-alaniny w otoczeniu 50 molekuł wody, ponieważ żadna z doświadczalnych metod badań strukturalnych nie może być zastosowana dla roztworu.

Tabela 7.1 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modelu ONIOM I-alaniny w kryształach.

Model [68]	Model ONIOM rys7	Dane dośw.[68]	hf /3-21g :aml	hf/ 6-31++g(d,p) :aml	hf/ 6-311++g(d,p) :aml	hf/ aug-cc-pvdz :aml	b3lyp/ 3-21g :aml	b3lyp/ 6-31++g(d,p) :aml	b3lyp/ 6-311++g(d,p) :aml	b3lyp/ aug-cc-pvdz :aml	mp2/ 3-21g :aml	mp2/ 6-31++g(d,p) :aml	mp2/ 6-311++g(d,p) :aml	mp2/ aug-cc-pvdz :aml
N-C α	12C-14N	1.486	1.527	1.501	1.500	1.499	1.531	1.512	1.511	1.509	1.545	1.500	1.498	1.504
C' - C α	11C-12C	1.531	1.550	1.532	1.535	1.530	1.567	1.547	1.547	1.544	1.577	1.538	1.544	1.543
C β - C α	16C-12C	1.523	1.519	1.518	1.517	1.519	1.522	1.521	1.520	1.521	1.532	1.515	1.517	1.522
C' - O1	11C-13O	1.24	1.285	1.262	1.255	1.264	1.320	1.296	1.290	1.296	1.325	1.303	1.294	1.306
C' - O2	11C-21O	1.257	1.223	1.211	1.205	1.211	1.245	1.233	1.226	1.232	1.261	1.243	1.232	1.243
C' - C α -N	11C-12C-14N	110.1	102.254	104.441	104.167	104.329	101.928	103.336	103.498	103.429	101.421	103.542	103.168	103.295
C' - C α -O1	11C-12C-13O	118.4	112.155	112.689	112.467	112.803	112.049	112.882	112.838	112.951	112.220	112.850	112.626	112.879
C' - C α -O2	11C-12C-21O	116	117.477	117.348	117.106	117.550	118.593	118.195	118.063	118.299	117.723	117.883	117.874	118.123
C' - C α -C β	11C-12C-16C	111.1	111.718	114.786	114.620	114.794	110.424	114.234	114.249	114.227	110.345	113.833	113.680	113.499
Test R2 zgodność długości wiązań, obliczonych do doświadczalnych[68].			0.955	0.974	0.974	0.972	0.936	0.959	0.959	0.958	0.945	0.959	0.960	0.957
Test R2 zgodność wartości kątów, obliczonych do doświadczalnych[68].			0.443	0.283	0.280	0.292	0.486	0.341	0.336	0.345	0.518	0.361	0.357	0.383

Tabela 7.2 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modelu ONIOM I-alaniny w roztworze wodnym.

Model [68]	Model ONIOM rys 8	Dane dośw.[68]	hf/ 3-21g :hf/3-21g	hf/ 6-31++g(d,p) :hf/3-21g	hf/ 6-311++g(d,p) :hf/3-21g	hf/ aug-cc-pvdz :hf/3-21g	b3lyp/ 3-21g :hf/3-21g	b3lyp/ 6-31++g(d,p) :hf/3-21g	b3lyp/ 6-311++g(d,p) :hf/3-21g	b3lyp/ aug-cc-pvdz :hf/3-21g	mp2/ 3-21g :hf/3-21g	mp2/ 6-31g(d,p) :hf/3-21g	mp2/ 6-311g(d,p) :hf/3-21g	mp2/ aug-cc-pvdz :hf/3-21g
N-C α	3C-6N	1.505	1.516	1.494	1.495	1.493	1.526	1.501	1.500	1.498	1.534	1.491	1.490	1.493
C' - C α	8C-3C	1.565	1.562	1.540	1.541	1.537	1.578	1.552	1.553	1.549	1.594	1.543	1.546	1.546
C β - C α	2C-3C	1.542	1.528	1.530	1.530	1.531	1.535	1.536	1.534	1.535	1.538	1.527	1.529	1.535
C' - O1	8C-9O	1.29	1.302	1.276	1.272	1.279	1.338	1.313	1.308	1.314	1.347	1.320	1.310	1.324
C' - O2	8C-10O	1.273	1.216	1.203	1.197	1.203	1.237	1.225	1.217	1.223	1.250	1.235	1.225	1.235
C' - C α -N	8C-3C-6N	110.2	104.177	108.079	108.266	108.125	103.528	107.459	107.583	107.348	103.099	107.666	107.864	107.388
C' - C α -O1	8C-3C-9O	117.1	111.453	113.199	113.074	113.282	111.368	113.097	112.925	113.040	111.160	113.112	112.790	113.080
C' - C α -O2	8C-3C-10O	116.8	118.684	117.874	117.888	118.082	119.584	119.026	119.005	119.253	118.998	118.631	118.572	118.952
C' - C α -C β	8C-3C-2C	113.2	116.593	116.921	117.017	116.860	114.672	116.988	116.984	116.988	115.504	116.321	116.512	116.276
Test R2 zgodność długości wiązań, obliczonych do doświadczalnych[68].			0.972	0.983	0.983	0.980	0.955	0.971	0.971	0.967	0.956	0.969	0.972	0.965
Test R2 zgodność wartości kątów, obliczonych do doświadczalnych[68].			0.441	0.427	0.401	0.442	0.547	0.451	0.432	0.452	0.504	0.486	0.435	0.497

Aby wybrać model będący dobrym przybliżeniem rzeczywistego układu molekularnego l-alaniny w kryształach i w roztworze wodnym, reprezentowany przez geometrie referencyjne zaczerpnięte z prac [94, 68], metodą R^2 przeprowadzono analizę zgodności między odpowiednio wybranymi danymi w postaci długości wiązań i wartości kątów między atomami. Jak wynika z danych umieszczonych w tabeli 7.1 najlepszą zgodnością odznacza się model ONIOM l-alaniny w kryształach, dla którego optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF z bazą 6-31++g(d,p) oraz bazą 6-311++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metodą AM1 dla warstwy „low”. Zgodność ta wynosi 97.4% dla obu przypadków baz funkcyjnych stosowanych dla warstwy „high”. W przypadku metody DFT i zastosowanego funkcjonału b3lyp geometrię optymalną otrzymano po zastosowaniu bazy 6-31++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metody AM1 dla warstwy „low”. Jest ona zgodna w 95.9% z danymi referencyjnymi. Podobny wynik otrzymano w przypadku zastosowania metody MP2 i bazy 6-311++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metody AM1 dla warstwy „low”, co daje optymalne wyniki geometrii na poziomie zgodności 96%. Wyniki te przedstawiają wybrane odległości między atomami w modelu l-alaniny w kryształach i stanowią dobre przybliżenie względem referencyjnych danych doświadczalnych. Różnice między odpowiednimi długościami wiązań dla modelu optymalizowanego metodą HF zawierają się w przedziale od 0.01 Å do 0.04 Å. Dla modeli molekularnych optymalizowanych metodą DFT różnice te są nieco większe i zawierają się w przedziale od 0.01 Å do 0.05 Å. W przypadku modeli optymalizowanych metodą MP2 różnice te wynoszą od 0.01 Å do 0.06 Å. Są to rozbieżności podane względem danych referencyjnych.

W analizowanych modelach ONIOM l-alaniny w kryształach optymalizowano również kąty między odpowiednimi atomami modelu, jednakże test metodą R^2 dał wyniki na poziomie ufności od 30% do 50% dla stosowanych metod obliczeniowych oraz baz funkcyjnych. Rozbieżności w wartościach kątów między odpowiednimi atomami w analizowanych modelach ONIOM a danymi referencyjnymi nie przekraczają 9° , np. dla kąta 11C-12C-14N rozbieżności te są największe i zawierają się w przedziale od 5° do 9° dla stosowanych metod optymalizacji. Zatem wydaje się za zasadne oparcie kryterium wyboru odpowiedniego modelu molekularnego ONIOM w kryształach l-alaniny, jedynie na porównaniu odpowiednich wartości odległości między atomami przy użyciu testu R^2 .

Podobne rozważania przeprowadzono dla modeli molekularnych ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym. Wyniki optymalizacji geometrii oraz wyniki testu R^2 zawiera tabela 7.2.

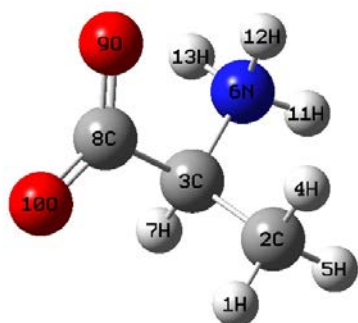
Najlepszą zgodnością z danymi referencyjnymi odznacza się model ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym, w przypadku którego optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF z bazą 6-31++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metodą HF/3-21g dla warstwy „low”. Zgodność ta wynosi 98.3%. W przypadku modelu molekularnego optymalizowanego metodą DFT z funkcjonałem b3lyp najbardziej zgodne wyniki otrzymano dla bazy 6-31++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metody HF i bazy 3-21g dla warstwy „low”. W tym przypadku zgodność ta wynosi 97.1%. Modele molekularne optymalizowane metodą MP2 są najbardziej zgodne względem modelu referencyjnego [68] w przypadku bazy funkcyjnej 6-311++g(d,p) dla warstwy „high” oraz metody HF i bazy 3-21g dla warstwy „low”, zgodność ta wynosi 97.2%. Łatwo zauważyć, iż najwyższym poziomem ufności odznaczają się modele molekularne ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym, w których zastosowano te same metody optymalizacji, jak w przypadku modeli molekularnych ONIOM l-alaniny w kryształach. Wyniki obliczeń odległości między odpowiednimi, wybranymi atomami pozwalają stwierdzić, iż modele molekularne ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym przyjmują optymalną geometrię względem geometrii referencyjnej. Różnice między odległościami nie przekraczają 0.02 Å dla przypadku trzech optymalnych geometrii układów molekularnych HF, DFT i MP2 opisanych powyżej. Podobnie jak w modelach ONIOM dla l-alaniny w kryształach również modele ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym po optymalizacji geometrii dają wyniki na poziomie ufności 40% do 50%, jeżeli chodzi o analizę wartości kątów między odpowiednimi atomami modeli. Rozbieżności w wartościach kątów między odpowiednimi atomami w analizowanych modelach ONIOM a danymi referencyjnymi nie przekraczają 6°, np. dla kąta 8C-3C-9O rozbieżności te są największe i zawierają się w przedziale od 2° do 6° dla stosowanych metod optymalizacji. Zatem podobnie jak w przypadku modeli ONIOM l-alaniny w kryształach również dla modeli ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym wydaje się mniej zasadne stosownie kryterium wartości kątów między odpowiednimi atomami przy wyborze optymalnego modelu molekularnego.

Wniosek płynący z tej części pracy to dobór metody i bazy optymalnej, zarówno w modelach molekularnych dwóch warstw ONIOM l-alaniny w kryształach, jak i w roztworze wodnym.

7.4 Modele ciągle l-alaniny w roztworze wodnym.

Oprócz modeli ONIOM dla l-alaniny w roztworze wodnym, przeanalizowano również dwa modele ciągle rozpuszczalnika (wody) otaczającego pojedynczą molekułę l-alaniny, tj.: model rozpuszczalnika IEF-PCM (ang. Integral Equation Formalism-PCM) [137] oraz model

rozpuszczalnika CPCM (ang. Conductor-like Polarizable Continuum Model) [138] (rysunek 7.6).



Rysunek 7.6 Model l-alaniny w roztworze wodnym na bazie modelu ciągłego rozpuszczalnika CPCM po przeprowadzeniu optymalizacji geometrii.

Oba modele rozpuszczalnika stosowano do optymalizacji geometrii molekuly l-alaniny w połączeniu z metodami HF, DFT i MP2 oraz bazami funkcji dającymi optymalne wyniki w przypadku modeli dwóch warstw ONIOM.

Tabela 7.3 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli ciągłych IEF-PCM i CPCM l-alaniny w roztworze wodnym.

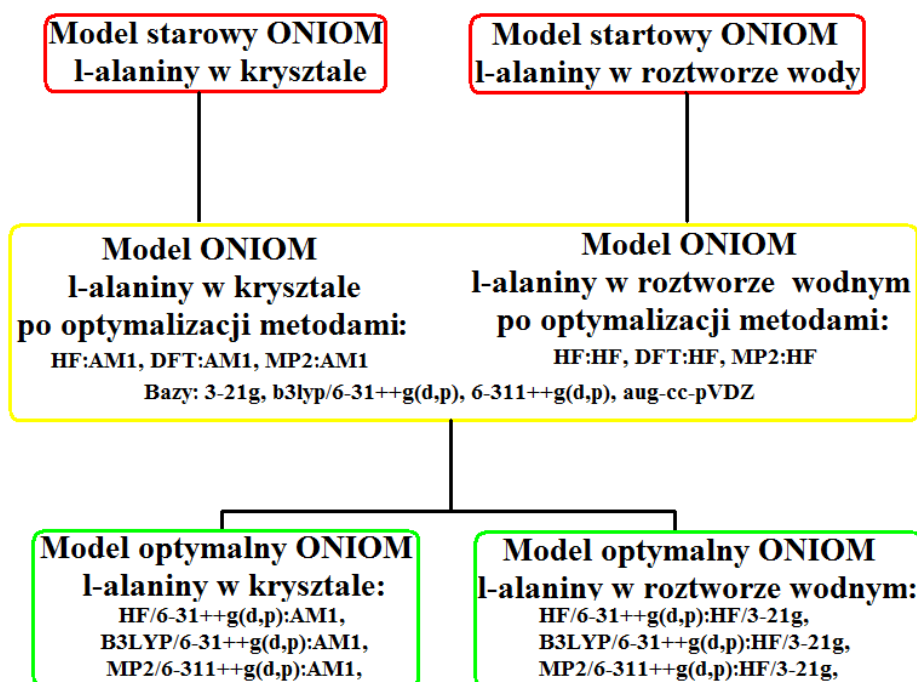
Model [68]	Model ONIOM		IEFPCM	IEFPCM	IEFPCM	CPCM	CPCM	CPCM
	rys10	Dane dośw.[33]	HF/ 6-31++ g(d,p).	B3LYP/ 6-31++ g(d,p).	MP2/ 6-311++ g(d,p).	HF/ 6-31++ g(d,p).	B3LYP/ 6-31++ g(d,p).	MP2/ 6-311++ g(d,p).
N-C α	3C-6N	1.505	1.496	1.512	1.498	1.4955	1.5115	1.4979
C' - C α	8C-3C	1.565	1.539	1.558	1.546	1.5388	1.558	1.546
C β - C α	2C-3C	1.542	1.524	1.524	1.523	1.5239	1.5239	1.523
C' - O1	8C-9O	1.29	1.237	1.265	1.261	1.2375	1.2655	1.2605
C' - O2	8C-10O	1.273	1.234	1.254	1.254	1.2343	1.2539	1.2541
C' - C α -N	8C-3C-6N	110.2	108.944	107.571	108.189	108.951	107.512	108.2172
C' - C α -O1	8C-3C-9O	117.1	116.694	116.010	115.777	116.714	115.8817	115.8063
C' - C α -O2	8C-3C-10O	116.8	115.178	115.909	115.080	115.188	116.0519	115.0763
C' - C α -C β	8C-3C-2C	113.2	112.663	114.674	111.054	112.667	114.9378	111.0515
Test R2 zgodność długości wiązań, obliczonych do doświadczalnych[95].			0.996	0.996	0.998	0.996	0.996	0.998
Test R2 zgodność wartości kątów, obliczonych do doświadczalnych[95].			0.971	0.833	0.996	0.971	0.807	0.995

Jak można zauważyć (tabela 7.3), najlepszą zgodnością względem danych doświadczalnych, wyznaczoną na podstawie testu R^2 , odznaczają się modele l-alaniny w ciągłym rozpuszczalniku (zarówno IEF-PCM jak i CPCM) optymalizowane metodą MP2, z bazą funkcji 6-311++g(d,p). Zgodność ta w obu przypadkach wynosi 99.8% dla oceny wybranych

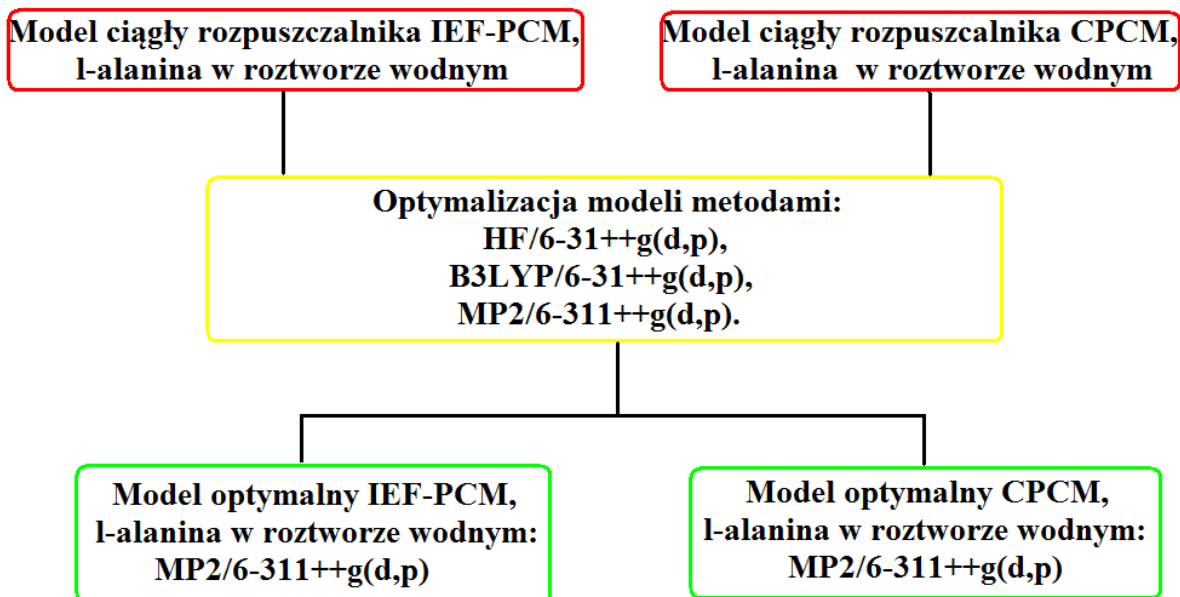
odległości między atomami, 99.6% dla modelu IEF-PCM oraz 99.5% dla modelu CPCM w przypadku oceny wybranych kątów między atomami cząsteczki l-alaniny. Wniosek płynący z powyższych rozważań jest następujący: modele ciągłe rozpuszczalnika dają lepszą zgodność względem danych referencyjnych geometrii cząsteczki l-alaniny w porównaniu z modelami ONIOM. Fakt ten może być spowodowany tym, iż w pracy [68] model l-alaniny w roztworze wodnym był zbudowany z większej liczby molekuł - warstwa „low” zawierała 50 molekuł wody.

W modelu ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym zastosowanym w niniejszej pracy, ze względu na przestrzenny rozkład i czas obliczeń, warstwa „low” zawierała jedynie 7 molekuł wody.

W wyniku przeprowadzonej analizy geometrii optymalnych modeli molekularnych l-alaniny ONIOM oraz modeli l-alaniny w roztworze wodnym na bazie modeli ciągłych wybrano modele optymalne geometrycznie, które obrazują poniższe schematy (rysunki 7.7 i 7.8).



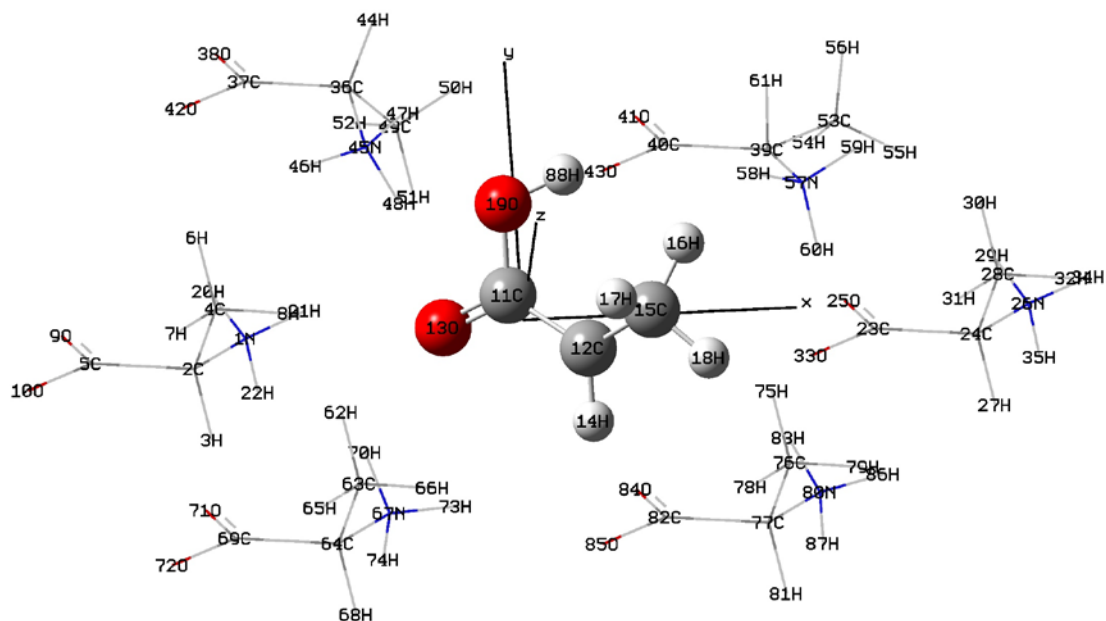
Rysunek 7.7 Schemat doboru optymalnych modeli molekularnych ONIOM l-alaniny w kryształach i w roztworze wodnym w stosunku do wartości referencyjnych.



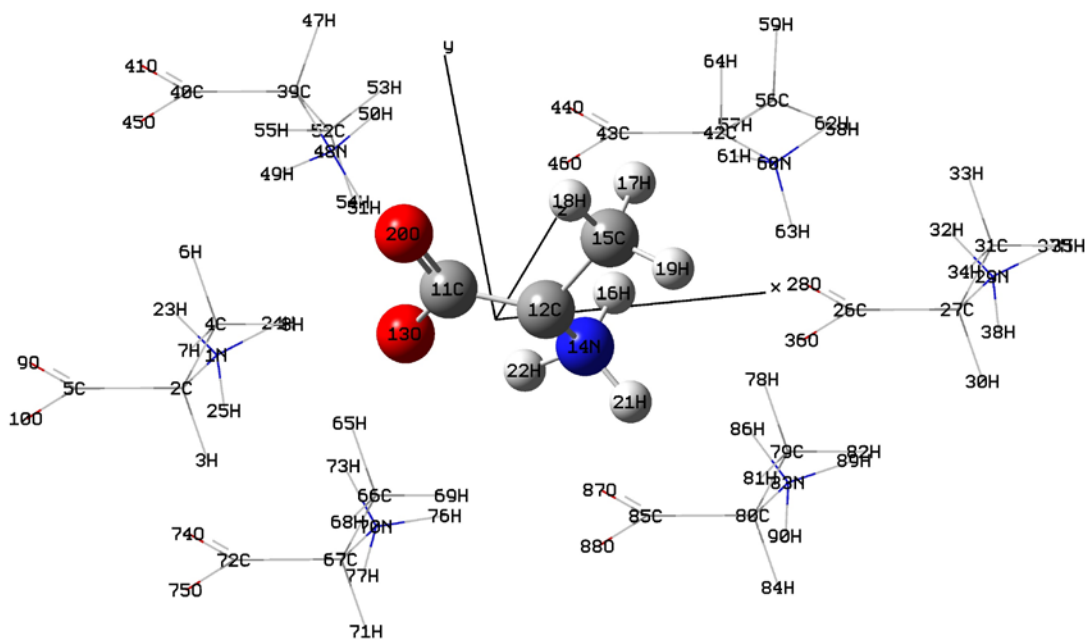
Rysunek 7.8 Schemat doboru optymalnych modeli molekularnych IEF-PCM oraz CPCM l-alaniny w roztworze wodnym.

7.5 Modele ONIOM rodniców R1, R2 i R3 l-alaniny.

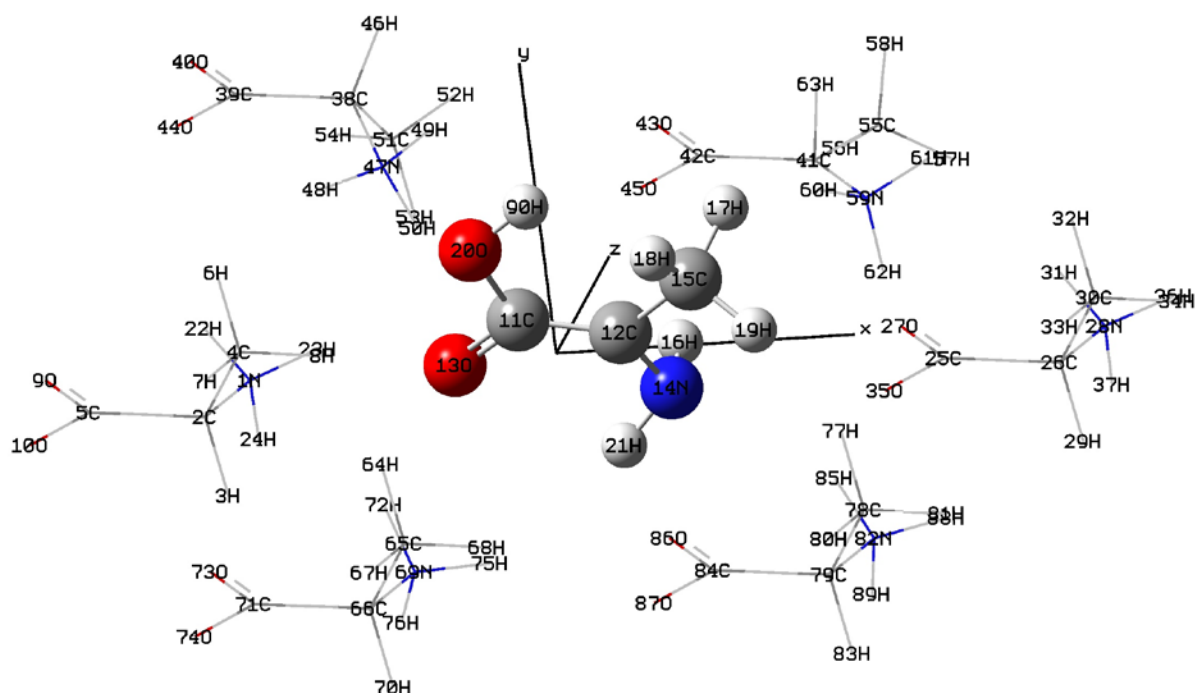
W wyniku optymalizacji geometrii modeli molekularnych ONIOM l-alaniny w kryształach uzyskano trzy główne modele oparte o metody i bazy: HF/6-31++g(d,p):AM1, B3LYP/6-31++g(d,p):AM1 i MP2/6-311++g(d,p):AM1. Geometrie przestrzenne tych układów molekularnych stanowiły punkt wyjścia do konstrukcji modeli molekularnych ONIOM rodniców R1, R2, R3 l-alaniny. Modele rodniców konstruowano poprzez bezpośrednie usunięcie części molekuly l-alaniny z pliku wejściowego programu Gaussian, a następnie optymalizację nowego klastra ONIOM w postaci centralnie położonej molekuly rodniczki warstwy „high” metodami HF/6-31++g(d,p), DFT/6-31++g(d,p), MP2/6-311++g(d,p) oraz otoczenia w postaci molekuł l-alaniny warstw „low” metodą AM1. Przykładowe wyniki optymalizacji modeli rodniców przedstawiono w postaci rysunków 7.9, 7.10, 7.11. Zestawienie odpowiednich odległości i wartości kątów między atomami dla modeli struktur geometrycznych ONIOM rodniców R1, R2, R3 zestawiono w tabelach 7.4 i 7.5.



Rysunek 7.9 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1; molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R1(SAR) l-alaniny w kryształ, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”.



Rysunek 7.10 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1, molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R2 l-alaniny w kryształ, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”.



Rysunek 7.11 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1, molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R3 l-alaniny w kryształach, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”.

Tabela 7.4 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli rodników l-alaniny R1, R2, R3 przedstawione w pozycjach literaturowych [117, 119].

	Model [119] R2	B3LYP/ AM1/6	Model [117] R1	B3LYP/ 6-31+g(d,p)	Model [117] R2	B3LYP/ 6-31+g(d,p)	Model [117] R3	B3LYP/ 6-31+g(d,p)
Odległości między atomami [Å]	4C-5N	1.466	-	-	2C-N	1.478	2C-N	1.389
	2C-4C	1.464	1C-2C	1.456	1C-2C	1.507	1C-2C	1.455
	4C-6C	1.475	2C-3C	1.484	2C-3C	1.478	2C-3C	1.492
	2C-1O	1.277	1C-2O	1.200	1C-2O	1.277	1C-2O	1.389
	2C-3O	1.277	1C-1O	1.371	1C-1O	1.295	1C-1O	1.224
Wartości kątów między wiązaniami [°]	2C-4C-5N	113.29	-	-	1C-2C-N	111.4	1C-2C-N	121.4
	4C-2C-1O	117.35	2C-1C-2O	123.9	2C-1C-2O	113.5	2C-1C-2O	116.4
	4C-2C-3O	-	2C-1C-1O	117.1	2C-1C-1O	118.4	2C-1C-1O	124.2
	2C-4C-6C	128.94	3C-2C-1C	121.6	3C-2C-1C	-	3C-2C-1C	-

Model rodnika R2 przedstawiony w literaturze [119] oparty jest na metodzie ONIOM i DFT z funkcjonałem B3LYP dla warstwy „high” stanowiącej pojedynczą molekułę rodnika R2 oraz metodą AM1 dla warstwy „low” stanowiącej sześć molekuł l-alaniny. Modele rodników R1, R2, R3 przedstawione w literaturze [117] to modele pojedynczych molekuł rodników w próżni optymalizowane metodą DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą funkcji 6-31+g(d,p).

Tabela 7.5 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli rodników l-alaniny R1, R2, R3 przeprowadzone metodą ONIOM wraz z HF, DFT i MP2 w niniejszej pracy.

	Model ONIOM R1	HF/ 6-31++g(d,p): AM1	B3LYP/ 6-31++g(d,p): AM1	MP2/ 6-311++g(d,p): AM1	Model ONIOM R2	HF/ 6-31++g(d,p): AM1	B3LYP/ 6-31++g(d,p): AM1	MP2/ 6-311++g(d,p): AM1	Model ONIOM R3	HF/ 6-31++g(d,p): AM1	B3LYP/ 6-31++g(d,p): AM1	MP2/ 6-311++g(d,p): AM1
Odległości między atomami [Å]	-	-	-	-	12C-14N	1.510	1.492	1.489	12C-14N	1.437	1.444	1.443
	11C-12C	1.476	1.494	1.486	11C-12C	1.437	1.426	1.439	11C-12C	1.346	1.357	1.361
	12C-15C	1.526	1.526	1.522	12C-15C	1.503	1.497	1.501	12C-15C	1.514	1.512	1.511
	11C-13O	1.208	1.229	1.236	11C-13O	1.312	1.357	1.351	11C-13O	1.287	1.313	1.306
	11C-19O	1.341	1.371	1.379	11C-20O	1.240	1.265	1.259	11C-20O	1.389	1.428	1.427
Wartości kątów między wiązaniami [o]	-	-	-	-	11C-12C-14N	106.948	108.232	106.554	11C-12C-14N	118.363	117.974	117.757
	11C-12C-13O	125.910	125.855	126.616	11C-12C-13O	117.014	116.726	116.579	11C-12C-13O	127.954	127.779	128.185
	11C-12C-19O	116.634	116.556	115.825	11C-12C-20O	120.500	121.826	121.344	11C-12C-20O	117.549	117.914	116.913
	11C-12C-15C	122.255	122.354	121.020	11C-12C-15C	118.632	120.799	117.636	11C-12C-15C	126.254	126.206	125.782

Uzyskane wyniki ujęte w tabeli 7.5 dla modeli ONIOM rodniczków R1, R2, R3 l-alaniny, można uznać za zbieżne z wynikami zamieszczonymi w tabeli 7.4 zaczerpniętymi z prac [117, 119]. Rozbieżności dla odpowiednich odległości między atomami nie przekraczają 0.1 Å, natomiast wartości kątów między odpowiednimi atomami różnią się maksymalnie o ok. 9°. Należy wspomnieć, iż zastosowane modele ONIOM uwzględniają oddziaływania molekuł l-alaniny otoczenia na molekułę centralną - w tym przypadku rodniczek R1, R2 lub R3. Zastosowane w badaniach własnych bazy funkcji były bardziej złożone w stosunku do baz funkcji stosowanych w pracy referencyjnej [117]. Zatem uzyskane wyniki optymalizacji modeli ONIOM rodniczków l-alaniny R1, R2, R3 można uznać za prawidłowe, a ogólnie czynności związanych z przygotowaniem i wyborem modeli oraz zastosowaną metodą ONIOM i metodami obliczeniowymi HF, DFT i MP2 za odpowiednie do tego typu symulacji i obliczeń chemii kwantowej.

Rozdział 8

Obliczenia i analiza parametrów widma EPR rodników R1, R2 i R3 l-alaniny.

W krystalicznej l-alaninie w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego powstają rodniki, spośród których przy pomocy metody EPR (Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego) można rejestrować trzy trwałe formy o strukturach molekularnych R1, R2, R3. Zagadnienie to szerzej opisano w części (rozdział 4) niniejszej pracy. Z punktu widzenia doświadczalnej analizy próbek l-alaniny zawierającej min. trzy główne formy rodników l-alaniny, które wnoszą odpowiedni wkład do widma EPR, zasadnym jest przeanalizowanie parametrów widma EPR dla poszczególnych struktur rodników R1, R2 i R3 l-alaniny. W trakcie badań przeprowadzono analizę parametrów EPR rodników l-alaniny w postaci obliczeń wielkości tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} dla modeli ONIOM oraz dla pojedynczych molekuł rodników R1, R2 i R3 występujących w badanych modelach ONIOM. Do obliczeń zastosowano metodę DFT z funkcjonalem B3LYP oraz specjalne bazy funkcji oznaczane w literaturze jako IGLO-III i EPR-III, które pobrano z bazy EMSL [139]. Są to bazy zalecane i stosowane w obliczeniach parametrów widm EPR rodników, dla których otrzymuje się dobrą zgodność wyników obliczeń z danymi doświadczalnymi [116, 140, 141]. Wyniki obliczeń składowych tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} dla rodników R1, R2 i R3 l-alaniny przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy oraz dane literaturowe przedstawiono w formie załącznika 1 do pracy natomiast przykładowe wyniki dla rodnika R1 przedstawiono w postaci tabel 8.1 i 8.2.

Tabela 8.1 Wyniki obliczeń tensora struktury nadsubtelnej dla rodnika R1 wykonanych metodą DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1, DFT:AM1 i MP2:AM1. (Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108]).

Ozn. atomu	Dane eksperymentalne dla molekuly rodnika R1				Ozn. atomu	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				HF/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik				
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz		Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	
H_{α}					13O	-12.8	30.0	28.8	-58.9	-12.8	30.5	29.1	-59.7	-5.7	31.0	29.6	-60.7	-12.8	30.5	29.1	-59.6	
					11C	-37.3	-9.2	1.6	7.6	-36.9	-9.1	1.6	7.6	-35.8	-9.2	1.7	7.6	-36.9	-9.2	1.6	7.6	
					19O	2.2	1.3	1.0	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3	2.3	1.3	1.00	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3	
					12C	86.1	-70.4	-70.2	140.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3	90.5	-72.0	-71.7	143.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3	
		-56.1	-31.8	3.9	27.9	14H	-49.8	-32.4	-2.3	34.8	-54.8	-32.1	-1.4	33.6	-52.3	-32.5	-1.0	33.6	-54.8	-32.1	-1.4	33.6
						15C	-27.4	-2.5	0.6	1.9	-27.0	-2.4	0.4	2.0	-28.1	-2.4	0.4	2.1	-27.0	-2.4	0.4	2.0
						17H	110.8	-4.9	-2.9	7.8	116.2	-4.9	-3.2	8.2	111.1	-4.9	-3.1	8.0	116.2	-5.0	-3.2	8.2
$H_{\beta(\text{sr.})}$	69.9	-2.6	-2.3	4.8	18H	7.7	-4.3	-3.6	7.9	8.0	-4.4	-3.5	8.0	7.6	-4.5	-3.5	8.0	8.1	-4.4	-3.5	8.0	
					16H	64.1	-4.6	-3.5	8.1	67.4	-4.7	-3.7	8.4	64.4	-4.9	-3.4	8.3	67.3	-4.7	-3.7	8.4	
					88H	-0.9	-4.0	-2.7	6.7	-1.0	-4.0	-2.7	6.6	-1.0	-4.0	-2.6	6.6	-1.0	-4.0	-2.7	6.6	

Tabela 8.2 Wyniki obliczeń tensora g dla rodników R1, R2 i R3 wykonanych metodą DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1. (Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108]).

Rodnik	Składowe tensora g	Główne wartości własne dane eksperymentalne	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1					HF/ B3LYP/EPR-III:AM1				
			ONIOM					ONIOM				
			g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
R1	g_{xx}	2.0043	2.0043	0.2068E-02	0.8839E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0043	0.2076E-02	0.7766E-04	-0.1699E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0038	2.0034	0.1206E-02	0.6891E-04			2.0034	0.1217E-02	0.5629E-04		
	g_{zz}	2.0021	2.0033	0.1096E-02	0.7800E-04			2.0033	0.1097E-02	0.6952E-04		
R2	g_{xx}	2.0038	2.0039	0.1796E-02	0.4474E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0039	0.1754E-02	0.6286E-04	-0.1836E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0032	2.0057	0.3569E-02	0.8493E-04			2.0057	0.3582E-02	0.1736E-04		
	g_{zz}	2.0022	2.0053	0.3118E-02	0.7252E-04			2.0053	0.3081E-02	0.9765E-04		
R3	g_{xx}	2.0040	2.0061	0.3917E-02	0.9086E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0061	0.3909E-02	0.9414E-04	-0.2046E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0030	2.0027	0.6089E-02	0.4287E-04			2.0027	0.6196E-02	0.3406E-04		
	g_{zz}	2.0020	2.0069	0.4772E-02	0.9217E-04			2.0069	0.4751E-02	0.9067E-04		

Dane uzyskane w wyniku obliczeń kwantowo chemicznych z zastosowaniem metody DFT z funkcjonalem B3LYP i ww. bazami specjalnymi funkcji stanowią obszerny materiał do analizy parametrów spektroskopowych EPR rodników l-alaniny w kryształach. W niniejszej pracy uzyskano wartości tensora struktury nadsubtelnej \mathbf{A} w postaci składnika izotopowego A_{iso} charakteryzującego wielkość oddziaływania kontaktowego Fermiego oraz drugiego składnika tj. głównych wartości własnych (T_{xx} , T_{yy} , T_{zz}) tensora oddziaływania dipolowego \mathbf{T} , pomiędzy ładunkami niesparowanego elektronu i jądrami otoczenia. Wymienione wielkości zostały wyznaczone dla każdego atomu wchodzącego w skład modelu rodnika R1, R2, R3 l-alaniny i porównane z odpowiednimi danymi doświadczalnymi w literaturze, porównanie to zawierają tabele 8.2, 8.1 i załącznik 1. Niestety w danych literaturowych [42, 117] odnaleziono jedynie wartości tensora oddziaływania nadsubtelnego dla przypadku atomów wodoru oznaczanych jako H_α i H_β , występujących w cząsteczce rodnika i oddziałujących z centrum paramagnetycznym dla rodników R1, R2 i R3. Fakt ten jest spowodowany tym, iż stosowane metody pomiarowe tj. EPR i ENDOR w analizie doświadczalnej rodników l-alaniny dają jedynie obraz atomów otoczenia centrum paramagnetycznego, których wkład do widma jest największy. Widma EPR i ENDOR są wynikiem występowania oddziaływania w postaci struktury nadsubtelnej niesparowanego elektronu będącego centrum paramagnetycznym z atomami otoczenia głównie: H_α i H_β . Jest to potwierdzeniem tezy o potrzebie stosowania modeli molekularnych i obliczeń kwantowych w celu uzupełnienia wiedzy o właściwościach fizycznych rodników l-alaniny, wyznaczenia wartości tensora struktury nadsubtelnej, których nie da się wyznaczyć doświadczalnie.

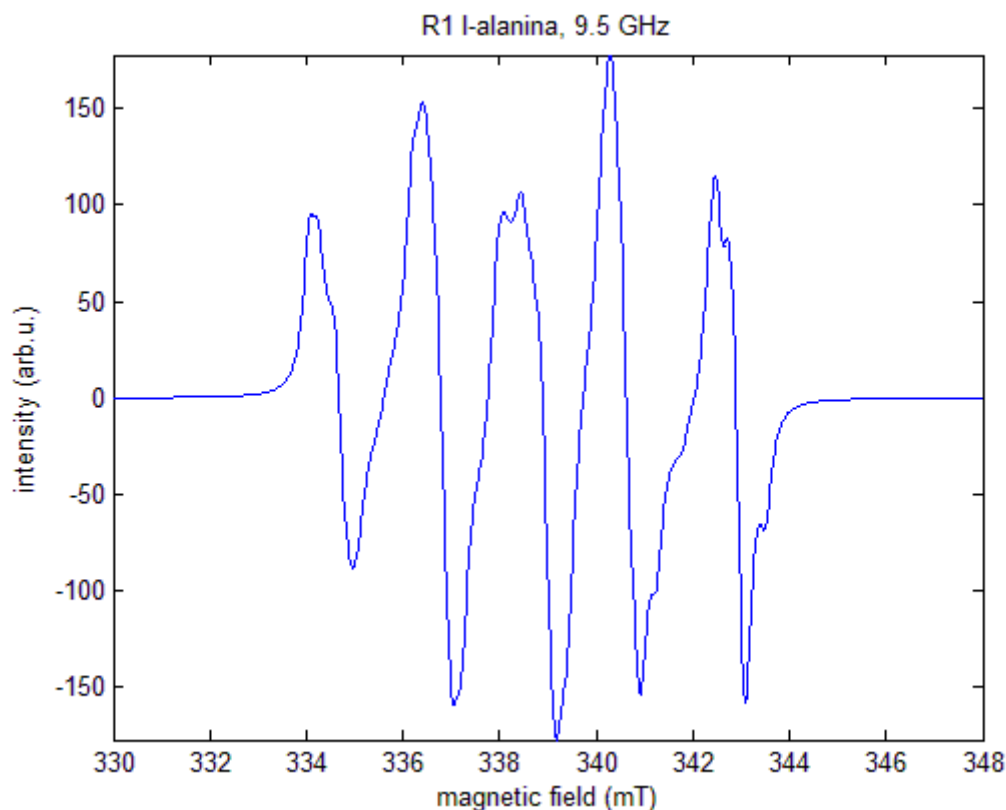
Wartości tensora struktury nadsubtelnej obliczone metodą DFT, zarówno dla modeli ONIOM jak i pojedynczych molekuł rodników R1, R2 oraz R3 l-alaniny nie są zbieżne z wartościami doświadczalnymi. Różnice między wartościami A_{iso} oraz T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} dla odpowiednich atomów sięgają od kilku do kilkudziesięciu MHz. Jako przykład można tu przytoczyć molekułę rodnika R1 i wartość składnika A_{iso} sprzężenia atomu H_α z centrum paramagnetycznym, która wyznaczona doświadczalnie wynosi -56.1MHz natomiast obliczona dla modelu ONIOM metodą DFT z funkcjonalem B3LYP i bazą funkcji IGLO-III wynosi -49.8MHz. Można to uznać za dobrą zgodność na tle pozostałych wyników. Dla rozważanego przypadku główne wartości własne tensora \mathbf{T} wyznaczone doświadczalnie wynoszą kolejno $T_{xx} = -31.8\text{MHz}$, $T_{yy} = 3.9\text{MHz}$, $T_{zz} = 27.9\text{MHz}$, natomiast obliczone na podstawie modelu wynoszą odpowiednio: $T_{xx} = 32.4\text{MHz}$, $T_{yy} = -2.3\text{MHz}$, $T_{zz} = 34.8\text{MHz}$.

Rozbieżności te należy tłumaczyć występowaniem konformerów rodników l-alaniny tj. nawet niewielkie różnice w długościach wiązań i wartościach kątów między atomami w molekuale rodnika wpływają na wartości składników tensora struktury nadsubtelnej. Fakt ten również opisano w pracy [119].

Oddziaływanie spinowego momentu magnetycznego niesparowanego elektronu z zewnętrznym polem magnetycznym jest dane przez człon hamiltonianu opisujący oddziaływanie Zeemana w EPR. Wielkość tego oddziaływania jest definiowana przez tensor \mathbf{g} , na który składają się dwa czynniki. Pierwszy wynika z wartości tensora \mathbf{g} dla swobodnego elektronu $g_e = 2.002319$, a drugi czynnik $\Delta\mathbf{g}$ uwzględnia interakcję niesparowanego elektronu z lokalnym środowiskiem w cząsteczce i w związku z tym jest unikalną cechą każdego badanego układu. Zagadnienie to szerzej opisano w podrozdziale 2.1.2 niniejszej pracy. W celu określenia składowych tensora \mathbf{g} dla badanych modeli molekularnych rodników R1, R2 i R3 l-alaniny przeprowadzono obliczenia metodą DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą funkcji IGLO-III lub EPR-III. Wskutek przeprowadzonych badań uzyskano główne wartości własne tensora \mathbf{g} wyrażone jako: g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , oraz składnik korekcyjny $\Delta\mathbf{g}$ w postaci kolejnych poprawek: $\Delta g_{\text{OZ/SOC}}$, Δg_{DC} , Δg_{RMC} . Wartość tensora \mathbf{g} dla swobodnego elektronu przyjęto jako $g_e = 2.0023$. Wymienione wielkości zostały wyznaczone dla modelu rodnika R1, R2, R3 l-alaniny i porównane z odpowiednimi danymi doświadczalnymi odnalezionymi w literaturze, porównanie to zawierają tabele 8.1, 8.2 oraz załącznik 1. Uzyskane wyniki nieznacznie tylko różnią się od doświadczalnych danych literaturowych, co świadczy o zastosowaniu poprawnych modeli molekularnych i metod obliczeniowych oraz niewielkiego wpływu różnic konformacji molekuł rodników na wartości tensora \mathbf{g} . Najlepszą zgodność danych obliczonych i doświadczalnych uzyskano dla rodnika R1, gdzie kolejne główne wartości własne obliczone np. dla modelu molekularnego ONIOM, metodą DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą EPR-III wynoszą odpowiednio: $g_{xx}=2.0043$, $g_{yy}=2.0034$, $g_{zz}=2.0033$, natomiast uzyskane doświadczalnie w pracy [42, 117] wynoszą odpowiednio: $g_{xx}=2.0043$, $g_{yy}=2.0038$, $g_{zz}=2.0021$. W przypadku rodników R2, R3, innych modeli molekularnych i bazy IGLO-III rozbieżności między danymi doświadczalnymi a obliczonymi są nieco większe, ale nie przekraczają 1%. Zaletą modelowania molekularnego i obliczeń DFT są uzyskane wartości składnika korekcyjnego $\Delta\mathbf{g}$ tensora \mathbf{g} w postaci poprawek $\Delta g_{\text{OZ/SOC}}$, Δg_{DC} , Δg_{RMC} , czego nie można wyznaczyć doświadczalnie. Należy zauważyć, iż wkład składnika korekcyjnego $\Delta\mathbf{g}$ do wielkości tensora \mathbf{g} jest niewielki, a jego główną wartość

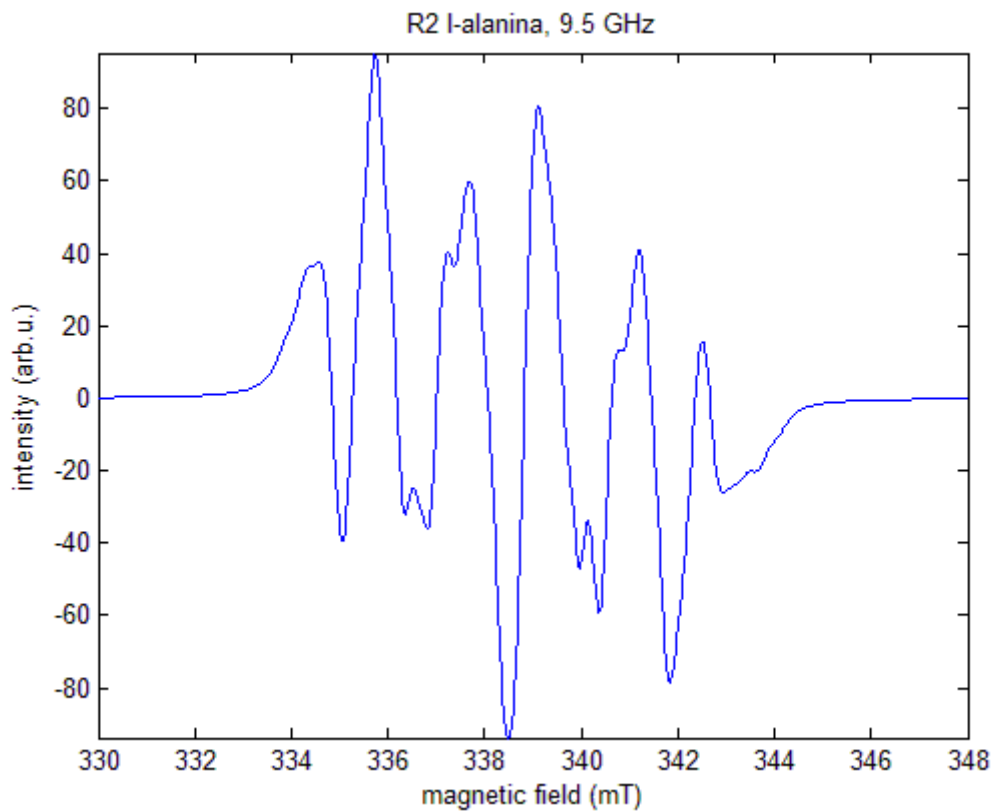
stanowi $g_e = 2.0023$. Niemniej jednak uzyskane w niniejszej pracy główne wartości własne tensora \mathbf{g} odpowiadają wartościom dla rodników związków organicznych [143].

Na podstawie parametrów EPR, takich jak składowe tensorów \mathbf{A} i \mathbf{g} obliczonych metodą DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1 dla modelu ONIOM rodników R1, R2 i R3 l-alaniny, przeprowadzono symulacje widm EPR z zastosowaniem oprogramowania MATLAB i pakietu EasySpin [129]. Efekty symulacji przedstawiają rysunki 8.1, 8.2 i 8.3.

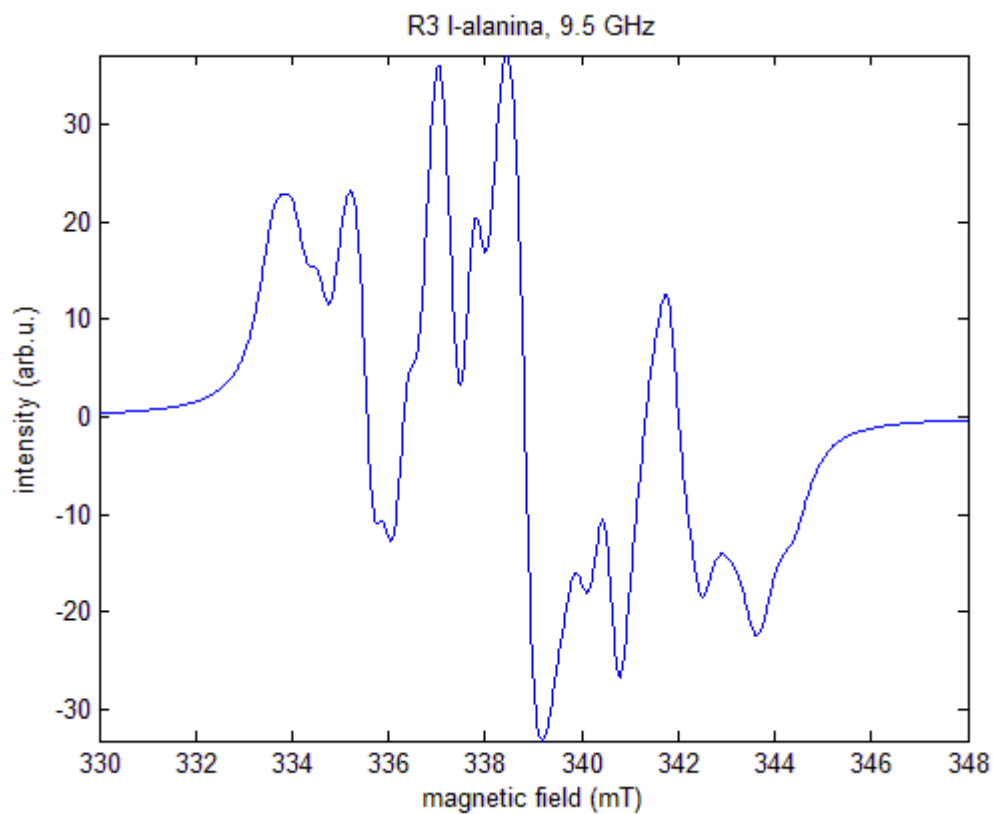


Rysunek 8.1 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R1 l-alaniny.

Wynik symulacji na rysunku 8.1 przedstawia widmo EPR dla rodnika R1, które zawiera pięć pochodnych linii absorpcyjnych będących bezpośrednim efektem struktury nadsubtelnej tj. oddziaływania centrum paramagnetycznego z trzema równocennymi protonami (17H, 16H, 18H) grupy metylowej i protonem (14H) przy węglu (12C). W efekcie otrzymujemy niesymetryczny kwintet pochodnych linii absorpcyjnych o różnym natężeniu. Widmo to jest zbliżone co do kształtu poszczególnych pochodnych linii z symulacją przeprowadzoną dla rodnika R1 l-alaniny w pracy [44].



Rysunek 8.2 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R2 l-alaniny.



Rysunek 8.3 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R3 l-alaniny.

Wynik symulacji na rysunku 8.2 przedstawia widmo EPR dla rodnika R2, które zawiera siedem pochodnych linii absorpcyjnych będących bezpośrednim efektem struktury nadsubtelnej tj. oddziaływania centrum paramagnetycznego z trzema równocennymi protonami (17H, 19H, 18H) grupy metylowej i trzema równocennymi protonami (22H, 21H, 16H) grupy aminowej. W efekcie otrzymujemy niesymetryczny septet pochodnych linii absorpcyjnych o różnym natężeniu. Widmo to jest zbieżne co do kształtu poszczególnych pochodnych linii z symulacją przeprowadzoną dla rodnika R2 l-alaniny w pracy [44].

W przypadku symulacji przedstawionych na rysunku 8.3 mamy do czynienia z widmem EPR dla rodnika R3, które zawiera sześć pochodnych linii absorpcyjnych będących efektem oddziaływania nadsubtelnego tj. oddziaływania centrum paramagnetycznego z trzema równocennymi protonami (17H, 19H, 18H) grupy metylowej i dwoma równocennymi protonami (21H, 16H) grupy aminowej. W skutek czego otrzymujemy niesymetryczny sekstet pochodnych linii absorpcyjnych o różnym natężeniu. Widmo to w pewnym stopniu jest zbieżne z symulacją widma EPR dla rodnika R3 l-alaniny w pracy [44].

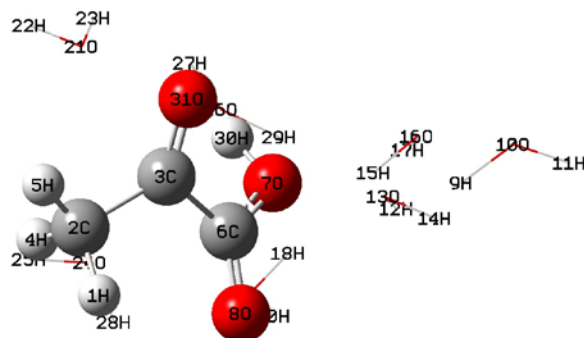
Rozdział 9

Obliczenia i analiza parametrów widma ^1H NMR produktów jonizacji roztworu wodnego l-alaniny.

W wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego na roztwory wodne aminokwasów - w tym l-alaniny, powstają produkty radiolizy (zjawisko szczegółowo omówiono w rozdziale 6 niniejszej pracy). Produkty jonizacji można rejestrować metodą spektroskopii masowej co opisano w pracy [134] oraz zaproponowaną w badaniach własnych metodą ^1H NMR, za pomocą której można rejestrować jeden z trwałych produktów radiolizy l-alaniny, tj. kwas pirogronowy. W celu określenia parametrów spektroskopowych ^1H NMR, takich jak stała ekranowania, wielkość przesunięcia chemicznego i sprzężenia spinowo-spinowego analizowanych roztworów można zastosować modele ONIOM, modele ciągłe IEF-PCM oraz CPCM rozpuszczalnika. Punktem wyjścia do obliczeń parametrów spektroskopii ^1H NMR w niniejszej pracy są modele molekularne l-alaniny w roztworze wodnym najbardziej zgodne układem rzeczywistym, które wyznaczono w podrozdziale rozdział 7.3. Są to modele molekularne będące wynikiem optymalizacji metodami chemii kwantowej: modele ONIOM HF/6-31++g(d,p):HF/3-21g, B3LYP/6-31++g(d,p):HF/3-21g, MP2/6-311++g(d,p):HF/3-21g (rysunek 9.1), oraz modele ciągłe rozpuszczalnika IEF-PCM MP2/6-311++g(d,p), CPCM MP2/6-311++g(d,p).

Do obliczeń parametrów spektroskopowych zastosowano metodę DFT z funkcjonałem B3LYP oraz specjalne bazy funkcji oznaczone w literaturze jako aug-cc-pVTZ-J i pcJ-n, które pobrano z bazy EMSL [139]. Bazy te są skonstruowane i stosowane w celu obliczeń parametrów spektroskopowych widm NMR takich jak: przesunięcie chemiczne i sprzężenie spinowo-spinowe, ponieważ wyniki obliczeń z ich zastosowaniem dają dobrą zgodność z doświadczeniem [142]. Analogiczne rozważania jak w przypadku wodnego roztworu l-alaniny przeprowadzono dla roztworu wodnego kwasu pirogronowego. Pomocniczo przeprowadzono również obliczenia stałej ekranowania dla modelu ONIOM i modeli roztworu ciągłego dla związku chemicznego o nazwie Trimethylsilyl propanoic acid (TSP). Do obliczeń wykorzystano metody chemii kwantowej analogiczne jak w przypadku l-alaniny i kwasu pirogronowego. TSP jest związkiem chemicznym stosowanym jako wzorzec w analizie przesunięć chemicznych na potrzeby spektroskopii ^1H NMR [135].

Wyniki obliczeń oraz dane doświadczalne uzyskane w niniejszej pracy przedstawiono w formie załącznika 2 do pracy, natomiast przykładowe wyniki dla wodnych roztworów l-alaniny i kwasu pirogronowego przedstawiono w tabelach 9.1 i 9.2.



Rysunek 9.1 Model ONIOM wodnego roztworu kwasu pirogronowego.

W wyniku obliczeń kwantowo chemicznych przeprowadzonych dla wodnych roztworów l-alaniny i kwasu pirogronowego otrzymano wartości izotropowe tensora ekranowania σ_K w postaci wielkości skalarnej σ_K^{iso} , co pozwoliło na wyznaczenie wielkości przesunięcia chemicznego δ [ppm] względem wzorca zaproponowanego w pracy związku TSP. Uzyskane wartości przesunięcia chemicznego δ_{iso} dla modeli molekularnych wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego porównano z danymi doświadczalnymi (tabela 9.1 i 9.2 oraz załącznik 2). Jak można zauważyć w przypadku modeli rozpuszczalników ciągłych CPCM i IEF-PCM dla wodnego roztworu l-alaniny uzyskano dobrą zgodność eksperymentu z zastosowanymi modelami i metodami obliczeniowymi. Nieco mniej zbieżne wyniki uzyskano dla wartości przesunięcia chemicznego doświadczalnej i obliczonej w przypadku zastosowania modeli dyskretnych ONIOM wodnego roztworu l-alaniny. Niemniej jednak w obu przypadkach rozbieżności sięgają od kilku do kilkudziesięciu procent. Zaskakująco dobrze zbieżne wyniki obliczeń z danymi doświadczalnymi uzyskano w przypadku modelu ONIOM wodnego roztworu kwasu pirogronowego: HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF. Wartość przesunięcia chemicznego odczytana z widma doświadczalnego ^1H NMR wynosi 2.354 [ppm], natomiast obliczona na podstawie modelu metodą DFT z funkcjonałem B3LYP i bazą funkcji aug-cc-pVTZ-J wynosi 2.357 [ppm]. Mamy tu do czynienia z bardzo dobrym doбором modelu molekularnego i metody obliczeniowej do rzeczywistego układu molekularnego.

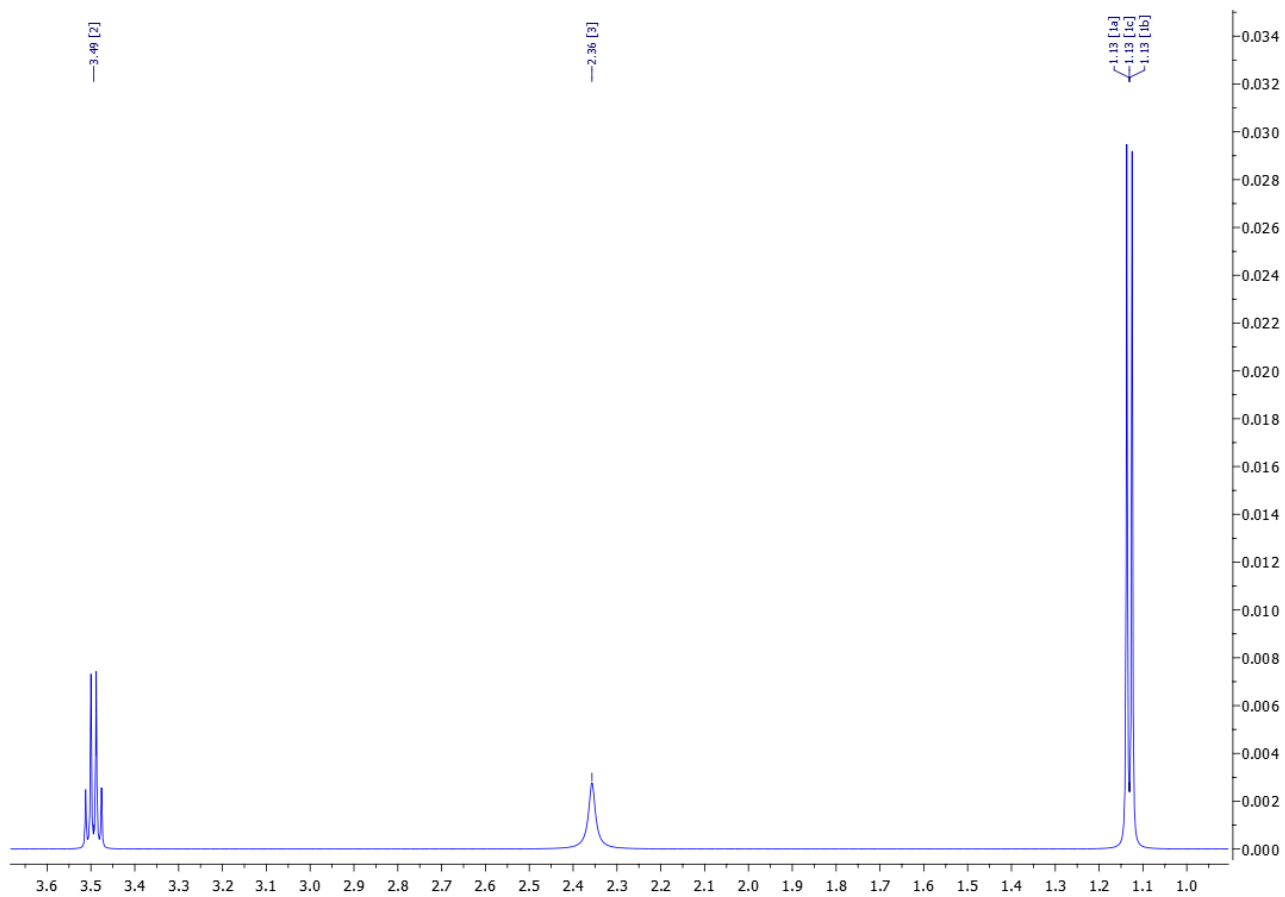
Kolejną ważną wielkością wyznaczoną za pomocą obliczeń kwantowo chemicznych w niniejszej pracy jest wielkość sprzężenia spinowo-spinowego, którą charakteryzują pośrednia stała sprzężenia spinowo-spinowego J_K^{iso} i zredukowana pośrednia stała sprzężenia spinowo-spinowego K_K^{iso} , które w ogólnym przypadku są tensorami drugiego rzędu natomiast w przypadku cieczy i roztworów będących przedmiotem badań przyjmują wartości

izotropowe (podrozdział 2.2.1). Oprócz wartości J_K^{iso} i K_K^{iso} dla analizowanych modeli ONIOM wodnych roztworów l-alaniny i kwasu pirogronowego oraz modeli ciągłych roztworów CPCM i IEF-PCM l-alaniny i kwasu pirogronowego w wodzie wyznaczono również wartości izotropowe poszczególnych składników stałych J_K^{iso} i K_K^{iso} w postaci: $J_K^{iso}(FC)$, $K_K^{iso}(FC)$, $J_K^{iso}(SD)$, $K_K^{iso}(SD)$, $J_K^{iso}(PSO)$, $K_K^{iso}(PSO)$, $J_K^{iso}(DSO)$, $K_K^{iso}(DSO)$, (załącznik nr 2). Szczegółowy opis oddziaływań spinowo-spinowych i związanych z nimi składników zawiera rozdział 2. Jednakże porównanie wielkości sprzężenia spinowo-spinowego można jedynie przeprowadzić dla pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego J_K^{iso} , ponieważ wartość tą można wyznaczyć bezpośrednio z widma doświadczalnego 1H NMR dla przypadku multipletowości sygnału 1H NMR (np. w przypadku wodnego roztworu l-alaniny). Obliczone wartości kolejnych składników charakteryzujących wielkość sprzężenia spinowo-spinowego przedstawiono w tabeli 9.1 i 9.2 oraz w załączniku nr 2. Przykładowe zestawienie wyników obliczeń i wyników doświadczenia przedstawia również tabela 9.1 i 9.2. Wartości doświadczalne stałej sprzężenia spinowo-spinowego oraz wartości obliczone metodą DFT, zarówno dla modeli ONIOM jak i modeli ciągłych roztworów CPCM i IEF – PCM są zbieżne. Różnice pomiędzy wartościami J_K^{iso} dla sprzężeń spinowo- spinowych odpowiednich atomów osiągają kilka Hz niezależnie od zastosowanego modelu molekularnego, metody optymalizacji geometrii, czy bazy funkcji. Jako przykład można przytoczyć tu model ONIOM optymalizowany metodą HF, gdzie obliczenia parametrów 1H NMR wykonano metodą DFT z funkcjonalem B3LYP z bazą funkcji aug-cc-pVTZ-J. Wartość pośredniej stałej sprzężenia spinowo-spinowego J_K^{iso} między atomami 1H, 4H, 5H – 7H molekuly l-alaniny w roztworze wodnym wynosi 8.528 Hz, między atomami 1H, 4H, 5H – 2C wynosi 139.271 Hz, natomiast między atomami 7H -3C wynosi 149.510 Hz. Odpowiadające im wyniki doświadczalne wynoszą: 7.25 Hz dla sprzężenia 1H, 4H, 5H – 7H, 130 Hz dla sprzężenia 1H, 4H, 5H – 2C oraz 145 Hz dla sprzężenia atomów l-alaniny 7H -3C. Rozbieżności te są spowodowane głównie różnicami konformacyjnymi cząsteczek l-alaniny w wodnym roztworze, analizowanej metodą 1H NMR a modelami wodnych roztworów l-alaniny. Niemniej jednak uzyskane wyniki są poprawne i potwierdzają zgodność zastosowanych modeli molekularnych i metod obliczeniowych chemii kwantowej (załącznik nr 2).

Analogiczne rozważania dotyczące określenia wielkości sprzężenia spinowo-spinowego przeprowadzono dla jednego produktu jonizacji l-alaniny w roztworze wodnym wykrytego metodą 1H NMR tj. kwasu pirogronowego. W widmie doświadczalnym 1H NMR rysunek 6.5

nie obserwujemy multipletu będącego sprzężeniem protonów w cząsteczce kwasu pirogronowego, a jedynie singlet będący efektem uśrednionego sygnału protonów 1H, 4H, 5H grupy metylowej rysunek 9.1. Z punktu widzenia rozważań teoretycznych na widmie doświadczalnym powinien być widoczny również singlet pochodzący od protonu 30H grupy hydroksylowej oraz dublet singletów wynikający ze sprzężenia ^1H - ^{13}C protonów z jądrem atomu węgla w grupie metylowej. Sygnały te jednak w badanym widmie doświadczalnym są poniżej progu detekcji metodą ^1H NMR. W związku z tym ich parametry mogą być jedynie oszacowane metodami obliczeniowymi chemii kwantowej. Przykładowe wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli 9.2 oraz załączniku nr 2.

Główną zaletą modelowania molekularnego z zastosowaniem metod obliczeniowych chemii kwantowej (w tym DFT), a zarazem wnioskiem płynącym z części pracy dotyczącej analizy ^1H NMR, jest fakt uzyskania wartości składników J_K^{iso} i K_K^{iso} czego nie można wyznaczyć metodą doświadczalną ^1H NMR. Pozwala to m. in. przewidywać kształt i położenie widma ^1H NMR analizowanych związków. Jako przykład można tu przedstawić symulację widma ^1H NMR rysunek 9.2 wodnego roztworu l-alaniny w przypadku obliczeń parametrów spektroskopowych wykonanych dla modelu: DFT/B3LYP/pcJ-n, CPCM w którym uzyskano wartości przesunięcia chemicznego δ_{iso} odpowiednio dla sprzężenia atomów 1H, 4H, 5H – 7H, wartość 1.131 [ppm] (na widmie widoczne jako dublet) oraz dla sprzężenia atomów 7H - 1H, 4H, 5H wartość: 3.497 [ppm] (na widmie widoczne jako kwartet). Dla omawianego przypadku wielkość sprzężenia spinowo-spinowego reprezentowana przez pośrednią stałą sprzężenia spinowo-spinowego J_K^{iso} , uzyskana na podstawie obliczeń przyjmuje odpowiednio dla sprzężenia atomów 1H, 4H, 5H – 7H, wartość 7.611 Hz oraz dla sprzężenia atomów 7H - 1H, 4H, 5H wartość: 152.597 Hz. Na widmie widoczny jest również singlet 2.357 [ppm] jest to sygnał symulacji wykonanej dla roztworu wodnego kwasu pirogronowego z zastosowaniem modelu ONIOM i metody HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF. Symulacje dotyczące widma ^1H NMR wykonano w pakiecie MestReNova [130].



Rysunek 9.2 Widmo symulacyjne ^1H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego.

Tabela 9.1 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych.

Oznaczenia atomów cząsteczki l-alaniny w rzeczywistym układzie molekularnym i wartości doświadczalne δ_{iso} [ppm]	Oznaczenia sprzężenia spin-spin w rzeczywistym układzie molekularnym l-alaniny i wartości doświadczalne J_K^{iso} [Hz]		Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny	Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny	HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				HF/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				
					Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		
					J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	
H ₃ -H _α	1.46	$^3J_{\text{H}_3\text{H}_\alpha}$	7.25	1H, 4H, 5H – 7H	$^3J_{(1,4,5),\text{H}(7)\text{H}}$	8.528	0.273	30.636	0.701	8.225	0.263	30.817	0.620
H ₃ -C ₃	1.46	$^1J_{\text{H}_3\text{C}_3}$	130	1H, 4H, 5H – 2C	$^1J_{(1,4,5)\text{H},(2)\text{C}}$	139.271	17.111	30.636	0.701	135.208	17.231	30.817	0.620
H _α -H ₃	3.76	$^3J_{\text{H}_\alpha\text{H}_3}$	7.25	7H - 1H, 4H, 5H	$^3J_{(7)\text{H},(1,4,5)\text{H}}$	8.528	0.273	26.065	5.272	8.225	0.263	26.467	4.970
H _α -C _α	3.76	$^1J_{\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha}$	145	7H -3C	$^1J_{(7)\text{H},(3)\text{C}}$	149.51	19.005	26.065	5.272	149.157	19.008	26.467	4.970

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM				HF/B3LYP/pcJ-n CPCM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				HF/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
7.844	0.251	30.386	0.966	7.508	0.240	30.480	0.978	7.839	0.251	30.385	0.967	7.504	0.240	30.480	1.002
135.993	17.331	30.386	0.966	136.654	17.414	30.480	0.978	135.995	17.331	30.385	0.967	136.655	17.415	30.480	1.002
7.844	0.251	27.743	3.609	7.508	0.240	28.146	3.312	7.839	0.251	27.745	3.607	7.504	0.240	28.148	3.334
154.812	19.727	27.743	3.609	153.584	19.572	28.146	3.312	154.809	19.729	27.745	3.607	153.589	19.573	28.148	3.334

Tabela 9.2 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu kwasu pirogronowego, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych.

Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, kwasu pirogronowego i wartości doświadczalne przesunięcia chemicznego δ_{iso} [ppm]		Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, kwasu pirogronowego	HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				HF/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM			
			Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
			J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
1H, 4H, 5H – 2C	-	$^1\text{J}_{(1,4,5)\text{H},(2)\text{C}}$	131.973	16.819	29.490	1.847	131.511	16.760	29.600	1.837	137.180	17.482	29.333	2.019
30H - 1H, 4H, 5H	-	$^5\text{J}_{(30)\text{H},(1,4,5)\text{H}}$	-1.773	-0.057	21.514	9.823	-1.830	-0.059	21.647	9.79	0.067	0.003	21.972	9.38
1H - 5H	2.354	$^2\text{J}_{(1)\text{H},(5)\text{H}}$	-9.916	-0.318	28.980	2.357	-9.937	-0.319	29.070	2.367	-13.034	-0.418	29.879	1.473
4H -5H	2.354	$^2\text{J}_{(4)\text{H},(5)\text{H}}$	-10.897	-0.349	28.980	2.357	-12.801	-0.347	29.085	2.352	-12.943	-0.415	29.879	1.473

HF/B3LYP/pcJ-n CPCM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				HF/B3LYP/ pcJ-n IEF-PCM				DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
136.738	17.425	29.429	1.923	150.296	19.153	28.118	3.340	149.800	19.091	28.279	3.203	160.531	20.458	29.072	3.911
-0.190	-0.001	22.190	9.162	0.519	0.017	20.955	10.50	0.379	0.012	21.050	10.43	7.937	0.254	20.070	12.913
-13.009	-0.417	29.959	1.393	-31.126	-0.998	28.656	2.802	-30.816	-0.988	28.726	2.756	-17.402	-0.558	28.609	4.374
-12.924	-0.414	29.959	1.393	-14.834	-0.475	28.656	2.802	-14.983	-0.480	28.726	2.756	-18.994	-0.609	28.534	4.449

Rozdział 10

Podsumowanie i wnioski.

W pracy przebadano aminokwas l-alaninę w postaci krystalicznej oraz w roztworze wodnym poddaną działaniu promieniowania jonizującego i mającą stanowić element czynny biosensora promieniowania jonizującego. Do analizy formy krystalicznej l-alaniny zastosowano metodę EPR, natomiast w przypadku l-alaniny w roztworze wodnym zastosowano metodę ^1H NMR. W celu pogłębienia wiedzy na temat właściwości fizycznych przedmiotu badań, zastosowano zaawansowane modele molekularne ONIOM, CPCM, IEF-PCM oraz metody obliczeniowe chemii kwantowej HF, DFT i MP2. Przeprowadzono również symulacje widm EPR rodników R1, R2, R3 l-alaniny oraz widma ^1H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego, stanowiącego produkt radiolizy wodnego roztworu l-alaniny.

Na podstawie uzyskanych w pracy wyników badań, można sformułować następujące wnioski:

1. Zarówno forma krystaliczna, jak i roztwór wodny l-alaniny mogą stanowić element czynny biosensora promieniowania jonizującego, ponieważ:

a) Zaobserwowane widmo EPR dla napromienionego dozymetru własnej konstrukcji jest efektem występowania produktów jonizacji w postaci rodników l-alaniny. Dozymetr ten nadaje się do pomiarów dawek promieniowania jonizującego w radioterapii onkologicznej, jako układ indywidualnej dozymetrii pacjenta, z uwagi na liniową zależność amplitudy linii centralnej sygnału EPR, w funkcji zaabsorbowanej dawki w objętości dozymetru dla zakresu dawek radioterapeutycznych, tj. od 0.5Gy do 90Gy.

b) Zaobserwowane widmo ^1H NMR dla napromienionego roztworu wodnego l-alaniny zawiera dodatkowy sygnał w postaci singletu 2.354 ppm w stosunku do widma ^1H -NMR roztworu wodnego l-alaniny przed napromienieniem. Sygnał ten zidentyfikowano jako wynik pojawienia się w roztworze kwasu pirogronowego, który jest produktem radiolizy wodnego roztworu l-alaniny.

2. Uzyskane informacje o produktach radiolizy wodnego roztworu l-alaniny w postaci kwasu pirogronowego mogą stanowić źródło wiedzy o środowisku komórkowym poddanym działaniu promieniowania jonizującego.

3. W wyniku konstrukcji modeli molekularnych kryształu l-alaniny, z zastosowaniem metody dwóch warstw ONIOM i przeprowadzonej optymalizacji geometrii tychże modeli metodami HF, DFT i MP2 wybrano modele molekularne o geometrii najbardziej zbieżnej z danymi

doświadczalnymi, których poziom ufności wynosi powyżej 95%. Są to modele: HF/6-31++g(d,p):AM1, B3LYP/6-31++g(d,p):AM1, MP2/6-311++g(d,p):AM1.

4. Uzyskano modele molekularne ONIOM trzech głównych form R1, R2, R3 rodników l-alaniny w kryształach, przy zastosowaniu tych samych metod obliczeniowych jak w przypadku kryształu l-alaniny. Na tej podstawie obliczono wartości kątów i długości wiązań między odpowiednimi atomami modeli molekularnych rodników R1, R2, R3 l-alaniny.

5. W wyniku konstrukcji modeli molekularnych roztworu wodnego l-alaniny z zastosowaniem metody dwóch warstw ONIOM i przeprowadzonej optymalizacji geometrii tychże modeli metodami HF, DFT i MP2, wybrano modele molekularne o geometrii najbardziej zbliżonej z danymi referencyjnymi odnalezionymi w literaturze, których poziom ufności wynosi powyżej 95%. Są to modele: HF/6-31++g(d,p):HF/3-21g, B3LYP/6-31++g(d,p):HF/3-21g, MP2/6-311++g(d,p):HF/3-21g. Również przy użyciu w/w metod i baz funkcji: HF/6-31++g(d,p), B3LYP/6-31++g(d,p), MP2/6-311++g(d,p) skonstruowano i zoptymalizowano modele molekularne roztworów ciągłych CPCM i IEF-PCM modelu wodnego roztworu l-alaniny. Metodę ONIOM oraz modele ciągłe i identyczne metody obliczeniowe, jak w przypadku l-alaniny w roztworze wodnym, zastosowano do skonstruowania i optymalizacji modelu roztworu wodnego kwasu pirogronowego. Skutkiem uzyskanych modeli jest opis geometrii przestrzennej wymienionych układów molekularnych w postaci wartości kątów oraz odległości między poszczególnymi atomami.

6. Na podstawie uzyskanych modeli ONIOM rodników (R1, R2, R3) w kryształach l-alaniny obliczono parametry widma EPR dla poszczególnych struktur rodników w postaci głównych wartości własnych tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} oraz ich składników. Wyniki obliczeń posłużyły do przeprowadzenia symulacji widma EPR dla poszczególnych struktur rodników l-alaniny R1, R2, R3 i opisu mechanizmów oddziaływań centrum paramagnetycznego rodnika z jego otoczeniem. Stwierdzono, iż głównym czynnikiem wpływającym na kształt widma EPR i wielkości oddziaływań centrum paramagnetycznego z otoczeniem jest struktura nadsubtelna oraz efekt Zeemana. Oba te zjawiska są charakterystyczne dla rodników związków organicznych.

7. Skonstruowanie złożonych modeli molekularnych (dwóch warstw ONIOM, CPCM, IEF-PCM) w celu uwzględnienia wpływu otoczenia molekularnego na strukturę cząsteczki l-alaniny i produkt jej jonizacji w roztworach wodnych w postaci kwasu pirogronowego, pozwoliło na obliczenie parametrów widma ^1H NMR. Uzyskano wartości izotropowe tensora

ekranowania σ_K^{iso} oraz wielkość przesunięcia chemicznego δ_{iso} względem wzorca chemicznego TSP. Obliczono również wielkość sprzężenia spinowo-spinowego w postaci wartości izotropowej tensorów J_K^{iso} i K_K^{iso} oraz ich składników $J_K^{iso}(FC)$, $K_K^{iso}(FC)$, $J_K^{iso}(SD)$, $K_K^{iso}(SD)$, $J_K^{iso}(PSO)$, $K_K^{iso}(PSO)$, $J_K^{iso}(DSO)$, $K_K^{iso}(DSO)$. Wyniki obliczeń pozwoliły na przeprowadzenie symulacji widma ^1H NMR wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego oraz pozwoliły na opis mechanizmów sprzężeń protonów odpowiedzialnych za kształt i wielkość widma ^1H NMR. Uznano, iż wyniki obliczeń teoretycznych zarówno w przypadku σ_K^{iso} , δ_{iso} jak i J_K^{iso} są zbieżne z wynikami uzyskanymi na podstawie widma doświadczalnego ^1H NMR wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego.

Bibliografia

- [1] J. Sadlej: *Spektroskopia molekularna*. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa (2002) 337-429.
- [2] P. Lahorte, F. De Proft, F. Callens, P. Geerlings, W. Mondelaers: *A Density Functional Study of Hyperfine Coupling Constants in Steroid Radicals*. J. Phys. Chem. A 103 (1999) 11130-11135.
- [3] M. Kaupp, M. Buhl, V. G. Malkin: *Calculation of NMR and EPR Parameters*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2004) 3-589.
- [4] B. Odom, D. Hanneke, B. D'Urso, G. Gabrielse: *New Measurement of the Electron Magnetic Moment Using a One-Electron Quantum Cyclotron*. Physical Review Letters 97 (2006) (3)-030801.
- [5] P. Manninen: *Breit – Puli Hamiltonian and Molecular Magnetic Resonance Properties*. Oulu University Press (2004) 15-64.
- [6] S. M. Mattar: *g-Tensor calculations of bicyclic 1,3,2-dithiazolyl radicals using the coupled-perturbed Kohn–Sham UB1LYP and UPBE0 hybrid density functionals*. Chemical Physics Letters 405 (2005) 382–388.
- [7] F. Neese: *Prediction of electron paramagnetic resonance g values using coupled perturbed Hartree–Fock and Kohn–Sham theory*. Journal of Chemical Physics 115 No 24 (2001) 11080-11096.
- [8] E. Pauwels, V. Van Speybroeck, M. Waroquier: *Evaluation of Different Model Space Approaches Based on DFT to Examine the EPR Parameters of a Radiation -Induced Radical in Solid-State *r*-Glycine*. J. Phys. Chem. A 108 (2004) 11321 -11332.
- [9] B. Mennucci, R. Cammi: *Continuum Solvation Models in Chemical Physics: From Theory to Applications*. John Wiley & Sons (2007).
- [10] T. Helgaker, M. Jaszuński, M. Pelcu: *The quantum-chemical calculation of NMR indirect spin–spin coupling constants*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 53 (2008) 249–268.
- [11] T. Helgaker, M. Jaszuński, K. Ruud: *Ab Initio Methods for the Calculation of NMR Shielding and Indirect Spin-Spin Coupling Constants*. Chem. Rev. 99 (1999) 293-352.
- [12] L. Piela: *Idee chemii kwantowej*. PWN 2003.
- [13] A.D. Becke: *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648-5652.

- [14] Ch. Lee, W. Yang, R. G. Parr: *Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Physical Rev. B 37 (1988) 785-789.
- [15] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair: *Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis*, Can. J. Phys. 58 (1980) 1200-1211.
- [16] T. H. Dunning: *Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen*. J. Chem. Phys. 90 (1989) 1007-1023.
- [17] D.E. Woon, T.H. Dunning: *Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. IV. Calculation of static electrical response properties*. J. Chem. Phys. 100 (1994) 2975-2988.
- [18] V. Barone: *Electronic, vibrational and environmental effects on the hyperfine coupling constants of nitroside radicals. H₂NO as a case study*. Chem. Phys. Lett. 262 (1996) 201-206.
- [19] J. W. Gault, L. A. Eriksson, L. Radom: *Assessment of Procedures for Calculating Radical Hyperfine Structures*. J. Phys. Chem. A 101 (1997) 1352-1359.
- [20] R. M. Gester, H. C. Georg, S. Canuto, M. C. Caputo, P. F. Provasi: *NMR Chemical Shielding and Spin-Spin Coupling Constants of Liquid NH₃: A Systematic Investigation using the Sequential QM/MM Method*. J. Phys. Chem. A 113 (52) (2009) 14936-14942.
- [21] F. Jensen: *The optimum contraction of basis sets for calculating spin-spin coupling constants*. Theor Chem Acc. 126 (2010) 371-382.
- [22] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell: *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa (1995).
- [23] R. Sullivan, M. Pyda, J. Pak, B. Wunderlich, J. R. Thompson, R. Pagni, H. Pan, C. Barnes, P. Schwerdtfeger, R. Compton: *Search for Electroweak Interactions in Amino Acid Crystals. II. The Salam Hypothesis*. J. Phys. Chem. A 107 (2003) 6674-6680.
- [24] D. A. Schauera, A. Iwasakib, A. A. Romanyukhaa, H. M. Swartzb, S. Onoric: *Electron paramagnetic resonance (EPR) in medical dosimetry*. Radiation Measurements 41 (2007) 117-123.
- [25] I. Miyagawa, W. Gordy: *Electron Spin Resonance of an Irradiated Single Crystal of Alanine: Second-Order Effects in Free Radical Resonances*. The Journal of Chemical Physics 32 (1) (1960) 255-263.
- [26] I. Miyagawa, K. Itoh: *Electron Spin Resonance of Irradiated Single Crystals of Alanines: Hindered Rotation of the Methyl Group in a Free Radical*. The Journal of Chemical Physics 36 (8) (1962) 2157-2163.

- [27] U. Deffner, D. F. Regulla: *Influences of physical parameters on high-level amino acid dosimetry*. Nuclear Instruments and Methods 175 (1) (1980) 134-135.
- [28] A. Wieser, R. Siegele, D.F. Regulla: *Influence of the irradiation temperature on the free-radical response of alanine*. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes 40 (10-12) (1989) 957-959.
- [29] D.F. Regulla, U. Deffner: *A system of transfer dosimetry in radiation processing*. Radiation Physics and Chemistry 22 (3-5) (1983) 305-309.
- [30] D.F. Regulla, U. Deffner: *Dosimetry by ESR spectroscopy of alanine*. The International Journal of Applied Radiation and Isotopes 33 (11) (1982) 1101-1114.
- [31] B. Ciesielski, K. Schultka, A. Kobierska, R. Nowak, Z. Pelmel-Stuglik: *In vivo alanine/epr dosimetry in daily clinical practice a feasibility study*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 56 (3) (2003) 899-905.
- [32] D. Nichiporov, V. Kostjuchenko, J. M. Puhl, D. L. Bensen, M. F. Desrosiers, C.E. Dick, W.L. McLaughlin, T. Kojima, B.M. Coursey, S. Zink: *Investigation of Applicability of Alanine and Radiochromic Detectors to Dosimetry of Proton Clinical Beams*. Appl. Radiat. Isotopes 46 (12) (1995) 1355-1362.
- [33] S. Olsson, E. S. Bergstrand, A. K. Carlsson, E. O. Hole, E. Lund: *Radiation dose measurements with alanine/agarose gel and thin alanine films around a ¹⁹²Ir brachytherapy source, using ESR spectroscopy*. Phys. Med. Biol. 47 (2002) 1333–1356.
- [34] B. Schaeken, P. Scalliet: *One Year of Experience with Alanine Dosimetry in Radiotherapy*. Appl. Radiat. Isotopes 47 (11-12) (1996) 1177- 1182.
- [35] E. H. Haskell, R. B. Hayes, G. H. Kenner: *A High Sensitivity EPR Technique for Alanine Dosimetry*. Radiation Protection Dosimetry 77 (1/2) (1998) 43–49.
- [36] C. De Angelis, A. Mattacchioni, S. Onori, D. Aragno, U. de Paula, V. Panichelli: *Electron arc therapy treatment planning verification with alanine/EPR dosimetry*. Applied Radiation and Isotopes 52 (2000) 1203-1207.
- [37] C. Fainstein, E. Winkler, M. Saravi: *ESR/Alanine γ -dosimetry in the 10±30 Gy range*. Applied Radiation and Isotopes 52 (2000) 1195-1196.
- [38] E. Marchioni, J. Y. Pabst, F. Kuntz: *Characterization and application of two kinds of ESR dosimeters*. Radiation Physics and Chemistry 65 (2002) 187–191.
- [39] V. Nagy, S. V. Sholom, V. V. Chumak, M. F. Desrosiers: *Uncertainties in alanine dosimetry in the therapeutic dose range*. Applied Radiation and Isotopes 56 (2002) 917–929.

- [40] K. E. Schultka, B. Ciesielski, P. Szewczyk: *In vivo dosimetry in ^{60}Co teletherapy using electron paramagnetic resonance in L-alanine*. Nowotwory Journal of Oncology 54 (5) (2004) 470-473.
- [41] K. Schultka, B. Ciesielski, K. Serkies, B. Wysocka, T. Sawicki, Z. Tarnawska, J. Jassem: *In vivo dosimetry using electron paramagnetic resonance in L-alanine in gynecological low dose rate brachytherapy*. Nowotwory Journal of Oncology 54 (6) (2004) 560-563.
- [42] E. Sagstuen, E. O. Hole, S. R. Haugedal, W. H. Nelson: *Alanine Radicals: Structure Determination by EPR and ENDOR of Single Crystals X-Irradiated at 295 K*. J. Phys. Chem. A 101 (1997) 9763-9772.
- [43] M. Z. Heydari, E. Malinen, Eli O. Hole, E. Sagstuen: *Alanine Radicals. 2. The Composite Polycrystalline Alanine EPR Spectrum Studied by ENDOR, Thermal Annealing, and Spectrum Simulations*. J. Phys. Chem. A 106 (2002) 8971-8977.
- [44] E. Malinen, M. Z. Heydari, E. Sagstuen, E. O. Hole: *Alanine Radicals, Part 3: Properties of the Components Contributing to the EPR Spectrum of X-Irradiated Alanine Dosimeters*. Radiation Research 159 (2003) 23-32.
- [45] E. Malinen, E.A. Hult, E. O. Hole, E. Sagstuen: *Alanine Radicals, Part 4: Relative Amounts of Radical Species in Alanine Dosimeters after Exposure to 6–19 MeV Electrons and 10 kV–15 MV Photons*. Radiation Research 159 (2003) 149-153.
- [46] B. Ciesielski, K. Schultka, Z. Stuglik, A. Kobierska, R. Nowak: *Dozymetria Alaninowa EPE IN-VIVO – Podstawy metodyczne*. Ana. Acad. Med. Gedan. 32 (2002) 1-10.
- [47] ICRU (The International Commission on Radiation Units and Measurements). Oxford University Press *Journal of the ICRU Report 80* 8 (2) (2008).
- [48] K. Mehta, R. Girzikowsky: *Reference Dosimetry System of The IAEA*. Radiat. Phys. Chem. 46 (4-6) (1995) 1247-1250.
- [49] M.F.Desrosiers, M.Peters, J.M.Puhl: *A study of the alanine dosimeter irradiation temperature coefficient from 25 to 80°C*. Radiation Physics and Chemistry 78 (2009) 465–467.
- [50] P.H.G.Sharpe, A.Miller, J.P.Sephton, C.A.Gouldstone, M.Bailey, J.Helt-Hansen: *The effect of irradiation temperatures between ambient and 80°C on the response of alanine dosimeters*. Radiation Physics and Chemistry 78 (2009) 473–475.

- [51] M. F. Desrosiers, S. Cooper, J. M. Puhl, A. L. McBain, G. W. Calvert: *A study of the alanine dosimeter irradiation temperature coefficient in the -77°C to +50°C range*. Radiation Physics and Chemistry 71 (2004) 363–368.
- [52] G. C.A.M. Vanhaelewyn, S. A. Amira, W. K.P.G. Mondelaers, F. J. Callens: *Decomposition study of the electron paramagnetic resonance spectrum of irradiated alanine*. Spectrochimica Acta Part A 56 (2000) 387–397.
- [53] B. Ciesielski, K. Schultka, M. Penkowski, E. Sagstuen: *EPR study of light illumination effects on radicals in gamma-irradiated l-alanine*. Spectrochimica Acta Part A 60 (2004) 1327–1333.
- [54] B. Ciesielski, M. Tyszkowska, A. Grudniewska, M. Penkowski, K. Schultka, Z. Peimel-Stuglik: *The effect of dose on light-sensitivity of radicals in alanine EPR dosimeters*. Spectrochimica Acta Part A 69 (2008) 1405–1416.
- [55] V. Y. Nagy, M. F. Desrosiers: *Complex Time Dependence of the EPR Signal of Irradiation L- α -alanine*. Appl. Radiat. Isot. 47 (8) (1996) 789-793.
- [56] O. F. Sleptchonok, V. Nagy, M. F. Desrosiers: *Advancements in accuracy of the alanine dosimetry system. Part 1. The effects of environmental humidity*. Radiation Physics and Chemistry 57 (2000) 115-133.
- [57] E. Tajkhorshid, K. J. Jalkanen, S. Suhai: *Structure and Vibrational Spectra of the Zwitterion L-Alanine in the Presence of Explicit Water Molecules: A Density Functional Analysis*. J. Phys. Chem. B 102 (30) (1998) 5899–5913.
- [58] K. Frimand, H. Bohr, K.J. Jalkanen, S. Suhai: *Structures, vibrational absorption and vibrational circular dichroism spectra of L-alanine in aqueous solution: a density functional theory and RHF study*. Chemical Physics 255 (2-3) (2000) 165-194.
- [59] N. Maltar-Strmecki, B. Rakvin: *Thermal stability of radiation-induced free radicals in γ -irradiated L-alanine single crystals*. Applied Radiation and Isotopes 63 (2005) 375–380.
- [60] O. F. Sleptchonok, V. Nagy, M. F. Desrosiers: *Advancements in accuracy of the alanine dosimetry system. Part 1. The effects of environmental humidity*. Radiation Physics and Chemistry 57 (2000) 115-133.
- [61] C. De Angelis, V. De Coste, P. Fattibene, S. Onori, E. Petetti: *Use of alanine for dosimetry intercomparisons among Italian radiotherapy centers*. Applied Radiation and Isotopes 62 (2005) 261–265.
- [62] S. M. Seltzer: *Recent Dosimetry Activities at the NIST*. CCRI(I)/09-07.

- [63] C. De Angelis, V. De Coste, P. Fattibene, S. Onori, E. Petetti: *Use of alanine for dosimetry intercomparisons among Italian radiotherapy centers*. Applied Radiation and Isotopes 62 (2005) 261–265.
- [64] A. Ismail, J.-Y. Giraud, G.N. Lu, R. Sihanath, P. Pittet, J.M. Galvan, J. Balosso: *Radiotherapy quality insurance by individualized in vivo dosimetry: State of the art*. Cancer/Radiothérapie 13 (2009) 182–189.
- [65] B. De Ost, B. Schaeken, T. Wauters, D. Van Gestel, A. Coelmont, D. Van den Weyngaert: *QA with alanine dosimetry for step and shoot IMRT of head and neck tumors*. Radiotherapy and Oncology 73 (1) (2004) S114.
- [66] F. Chen, C. F.O. Graeff, O. Baffa: *K-band EPR dosimetry: small-field beam profile determination with miniature alanine dosimeter*. Applied Radiation and Isotopes 62 (2005) 267–271.
- [67] M. Lin, T. Garcia, V. Lourenço, Y.Cui, Y. Z. Chen, F. Wang: *Bilateral comparison of an alanine/ESR dosimetry system at radiotherapy dose levels*. Radiation Measurements 45 (2010) 789-796.
- [68] E. Lund, H. Gustafsson, M. Danilczuk, M.D. Sastry, A. Lund, T.A. Vestad, E. Malinen, E.O. Hole, E. Sagstuen: *Formates and dithionates: sensitive EPR -dosimeter materials for radiation therapy*. Applied Radiation and Isotopes 62 (2005) 317–324.
- [69] E. H. Haskell, R. B. Hayes and G. H. Kenner: *A high sensitivity EPR technique for alanine dosimetry*. Radiation Protection Dosimetry 77 (1-2) (1998) 43-49.
- [70] R. B. Hayes, E. H. Haskell, A. Wieser, A. A. Romanyukha, B. L. Hardy, J. K. Barrus: *Assessment of an alanine EPR dosimetry technique with enhanced precision and accuracy*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 440 (2000) 453-461.
- [71] V. Nagy, S. V. Sholom, V.V. Chumak, M. F. Desrosiers: *Uncertainties in alanine dosimetry in the therapeutic dose range*. Applied Radiation and Isotopes 56 (2002) 917–929.
- [72] D. Wagner, M. Anton, H. Vorwerk, T. Gsanger, H. Christiansen, B. Poppe, C. F. Hess, R. M. Hermann: *In vivo alanine/electron spin resonance (ESR) dosimetry in radiotherapy of prostate cancer: A feasibility study*. Radiotherapy and Oncology 88 (2008) 140–147.
- [73] K. Gall, M. Desrosiers, D. Bensen, C. Serago: *Alanine EPR Dosimeter Response in Proton Therapy Beams*. Appl. Radiat. Isot. 47 (11-12) (1996) 1197-1199.

- [74] U. Quast: *Whole body radiotherapy: A TBI-guideline*. Journal of Medical Physics 31 (1) (2006) 5-12.
- [75] H. J. Simpson, E. Marsh: *The crystal structure of L-alanine*. Acta Cryst. 20 (1966) 550-555.
- [76] M. S. Lehmann, T. F. Koetzle, W. C. Hamilton: *Precision Neutron Diffraction Structure Determination of Protein and Nucleic Acid Components. I. The Crystal and Molecular Structure of the Amino Acid L-Alanine*. Journal of the American Chemical Society 94 (8) (1972) 2657-2660.
- [77] R. Sullivan, M. Pyda, J. Pak, B. Wunderlich, J. R. Thompson, R. Pagni, H. Pan, C. Barnes, P. Schwerdtfeger, R. Compton: *Search for Electroweak Interactions in Amino Acid Crystals. II. The Salam Hypothesis*. J. Phys. Chem. A 107 (2003) 6674-6680.
- [78] A. G. Csaszar: *Conformers of Gaseous α -Alanine*. J. Phys. Chem. 100 (1996) 3541-3551.
- [79] I. Powis, E. E. Rennie, U. Hergenhahn, O. Kugeler, R. Bussy-Socrate: *Investigation of the Gas-Phase Amino Acid Alanine by Synchrotron Radiation Photoelectron Spectroscopy*. J. Phys. Chem. A 107 (2003) 25-34.
- [80] J. M. Mullin, M. S. Gordon: *Alanine: Then There Was Water*. J. Phys. Chem. B 113 (2009) 8657-8669.
- [81] S. Blanco, A. Lesarri, J. C. Lopez, J. L. Alonso: *The Gas-Phase Structure of Alanine*. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 11675-11683.
- [82] G. Junk, H. Svec: *The Mass Spectra of the α -Amino Acids*. Journal of the American Chemical Society 85 (7) (1963) 839-845.
- [83] E. Tajkhorshid, K. J. Jalkanen, S. Suhai: *Structure and Vibrational Spectra of the Zwitterion L-Alanine in the Presence of Explicit Water Molecules: A Density Functional Analysis*. J. Phys. Chem. B 102 (1998) 5899-5913.
- [84] L. Onsager: *Electric Moments of Molecules in Liquids*. Journal of the American Chemical Society 58 (8) (1936) 1486-1493.
- [85] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J.

- Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian 09, Revision B.01., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
- [86] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian 03, Revision E.01., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [87] A. R. Garcia, R. Brito de Barros, J. P Lourenco, L. M. Ilharco: *The Infrared Spectrum of Solid L-Alanine: Influence of pH-Induced Structural Changes*. J. Phys. Chem. A 112 (2008) 8280–8287.
- [88] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer: *Biochemistry*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa (2009) wyd.4.
- [89] T. G. Cooper, W. Jones, W. D. Samuel Motherwell, G. M. Day: *Database guided conformation selection in crystal structure prediction of alanine*. Cryst. Eng. Como. 9 (2007) 595–602.
- [90] O. Kikuchi, T. Watanabe, Y. Ogawa, H. Takase, O. Takahashi: *Ab Initio MO and Monte Carlo Simulation Study on the Conformation of L-alanine Zwitterion in Aqueous Solution*. Journal of Physical Organic Chemistry 10 (1997) 145–151.
- [91] R. S. Mulliken: *Spectroscopy, molecular orbitals and chemical bonding*. Nobel Lecture (1966).

- [92] A. Onufriev, D. A. Case, D. Bashford: *Effective Born Radii in the Generalized Born Approximation: The Importance of Being Perfect*. J. Comput. Chem. 23 (2002) 1297–1304.
- [93] H. B. Schlegel: *Ab Initio Molecular Dynamics with Born-Oppenheimer and Extended Lagrangian Methods Using Atom Centered Basis Functions*. Bull. Korean Chem. Soc. 24 (6) (2003) 1-6.
- [94] I. M. Degtyarenko, K. J. Jalkanen, A. A. Gurtovenko, R. M. Nieminen: *L-Alanine in a Droplet of Water: A Density-Functional Molecular Dynamics Study*. J. Phys. Chem. B 111 (2007) 4227-4234.
- [95] I. M. Degtyarenko, K. J. Jalkanen, A. A. Gurtovenko, R. M. Nieminen: *The Aqueous and Crystalline Forms of L-alanine Zwitterion*. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience 5 (3) (2008) 277-285.
- [96] K. J. Jalkanen, I. M. Degtyarenko, R. M. Nieminen, X. Cao, L. A. Nafie, F. Zhu, L. D. Barron: *Role of Hydration in Determining the Structure and Vibrational Spectra of L-alanine and N-acetyl L-alanine N-methylamide in Aqueous Solution: A Combined Theoretical and Experimental Approach*. Theor Chem Account 119 (2008) 191–210.
- [97] F. J. Luque, J. M. Lopez, M. Orozco: *Perspective on “Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects”*. Theor. Chem. Acc. 103 (2000) 343-345.
- [98] M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, J. Tomasi: *Ab initio study of solvent molecules: a new implementation of the polarizable continuum model*. Chemical Physics Letters 255 (1996) 327-335.
- [99] A. Klamt, G. Schuurmann: *COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and its Gradient*. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2 (1993) 799-805.
- [100] V. P. Nicu, J. Neugebauer, S. K. Wolff, E. J. Baerends: *A vibrational circular dichroism implementation within a Slater-type-orbital based density functional framework and its application to hexa- and hepta-helicenes*. Theor Chem Account 119 (2008) 245–263.
- [101] R. Arratia-Perez, L. Alvarez-Thon, P. Fuentealba: *Calculated geometry and paramagnetic hyperfine structure of the Cu₇ cluster*. Chemical Physics Letters 397 (4-6) (2004) 408-411.

- [102] C. Simion: *Theoretical investigation of radical species formed from L- α -alanine under gamma-irradiation*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 275 (2) (2008) 331–335.
- [103] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart: *AMI: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model*. J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 3902-3909.
- [104] J. A. Pople, D. P. Santry, G. A. Segal: *Approximate Self-Consistent Molecular Orbital Theory. I. Invariant Procedures*. The Journal of Chemical Physics 43 (10) (1965) 129-135.
- [105] E. Fos, J. Vilarrasa, Javier Fernandez: *MNDO Semiempirical and 4-31G ab Initio SCF-MO Calculations of Heteroaromatic Compounds*. J. Org. Chem. 50 (1985) 4894-4899.
- [106] M.C. Böhm, H. Vogler: *Band structures of one-dimensional mixed donor-acceptor systems: A semiempirical INDO crystal orbital study*. Physics Letters A 96 (1) (1983) 41-44.
- [107] J. J. P. Stewart: *Optimization of parameters for semiempirical methods. III Extension of PM3 to Be, Mg, Zn, Ga, Ge, As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Te, Hg, Tl, Pb, and Bi*. Journal of Computational Chemistry 12 (3) (1991) 320–341.
- [108] M. Z. Heydari, E. Malinen, E. O. Hole, E. Sagstuen: *Alanine Radicals. 2. The Composite Polycrystalline Alanine EPR Spectrum Studied by ENDOR, Thermal Annealing, and Spectrum Simulations*. J. Phys. Chem. A 106 (2002) 8971-8977.
- [109] E. Malinen, E. A. Hult, E. O. Hole, E. Sagstuen: *Alanine Radicals, Part 4: Relative Amounts of Radical Species in Alanine Dosimeters after Exposure to 6–19 MeV Electrons and 10 kV–15 MV Photons*. Radiation Research 159 (2003) 149-153.
- [110] G. C.A.M. Vanhaelewyn, S. A. Amira, W. K.P.G. Mondelaers, F. J. Callens: *Decomposition study of the electron paramagnetic resonance spectrum of irradiated alanine*. Spectrochimica Acta Part A 56 (2000) 387–397.
- [111] F. U. Ermawati: *EPR Analysis on Radiation Dosimetry Material Spectra*. Kontribusi Fisika Indonesia 12 (4) (2001) 105-110.
- [112] J. W. Sinclair, M. W. Hanna: *Electron Paramagnetic Resonance Study of L-Alanine Irradiated at Low Temperatures*. The Journal of Physical Chemistry 71 (1) (1967) 84-88.
- [113] Y. Zhou: *EPR, ENDOR and DFT Studies on X-Irradiated Single Crystals of L-Lysine Monohydrochloride Monohydrate and L-Arginine Monohydrochloride Monohydrate*.

Georgia State University, Digital Archive @ GSU, Physics & Astronomy Dissertations (2009).

- [114] A. Hosseini, A. Lund, E. Sagstuen: *EPR and ENDOR studies of single crystals of 2-oxazolidinone X-irradiated at 295 K*. Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 6086–6091.
- [115] A. Sanderud, E. Sagstuen: *EPR and ENDOR Studies of Single Crystals of *r*-Glycine X-ray Irradiated at 295 K*. J. Phys. Chem. B 102 (1998) 9353-9361.
- [116] P. Lahorte, F. De Proft, G. Vanhaelewyn, B. Masschaele, P. Cauwels, F. Callens, P. Geerlings, W. Mondelaers: *Density Functional Calculations of Hyperfine Coupling Constants in Alanine-Derived Radicals*. J. Phys. Chem. A 103 (1999) 6650-6657.
- [117] F. Ban, S. D. Wetmore, R. J. Boyd: *A Density-Functional Theory Investigation of the Radiation Products of L- α -Alanine*. J. Phys. Chem. A 103 (1999) 4303-4308.
- [118] L. A. Eriksson, F. Himo, P. E. M. Siegbahn, G. T. Babcock: *Electronic and Magnetic Properties of Neutral and Charged Quinone and Plastoquinone Radicals*. J. Phys. Chem. A 101 (1997) 9496-9504.
- [119] E. Pauwels, V. V. Speybroeck, P. Lahorte, M. Waroquier: *Density Functional Calculations on Alanine-Derived Radicals: Influence of Molecular Environment on EPR Hyperfine Coupling Constants*. J. Phys. Chem. A 105 (2001) 8794-8804.
- [120] W. W. Bradshaw, D.G. Cadena: *The Use of Alanine as a Solid Dosimeter*. Radiation Research 17 (1962) 11-21.
- [121] S. Dapprich, I. Komaromi, K. S. Byun, K. Morokuma, M. J. Frisch: *A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives*. Journal of Molecular Structure Theochem (1-21) (1999) 461-462.
- [122] K. G. Dyall: *Relativistic double-zeta, triple-zeta, and quadruple-zeta basis sets for the 5d elements Hf–Hg*. Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 403–409.
- [123] J. P. Perdew: *Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas*. J. P. Phys. ReV. B 33 (1986) 8822-8824.
- [124] A. D. Becke: *Density - functional thermochemistry. I. The effect of the exchange - only gradient correction*. J. Chem. Phys. 96 (1992) 2155.
- [125] V. P. Nicu, J. Neugebauer, S. K. Wolff, E. J. Baerends: *A vibrational circular dichroism implementation within a Slater-type-orbital based density functional framework and its application to hexa- and hepta-helicenes*. Theor. Chem. Account. 119 (2008) 245–263.

- [126] M. Ben-Nun, T. J. Martinez: *Ab Initio Quantum Molecular Dynamics*. Advances in Chemical Physics 121 (2002) 439–512.
- [127] R. Car, M. Parrinello: *Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory*. Phys. Rev. Lett. 55 (1985) 2471–2474.
- [128] A. Zheng, M. Yang, Y. Yue, Ch. Ye, F. Deng: *¹³C NMR shielding tensors of carboxyl carbon in amino acids calculated by ONIOM method*. Chemical Physics Letters 399 (2004) 172–176.
- [129] S. Stoll, A. Schweiger: *EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR*. Journal of Magnetic Resonance 178 (2006) 42–55.
- [130] www.mestrelab.com/
- [131] G. Cieřlik, K. Gaćecka, M. Janiszewska, M. Raczkowski, T. Siudziński: *Epr measurements of concentration of l-alanine and hydroxyapatite for the needs of dosimetry in oncological radiotherapy*. “Metrologia dzisiaj i jutro” Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej (2010) 389-396.
- [132] J. Sobkowski: *Chemia Radiacyjna i ochrona radiologiczna*. ADAMANTAN (2009).
- [133] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00243>
- [134] B. M. Weeks, S. A. Cole, W. M. Garrison: *Reactions of Alanine with the Reducing Species Formed in Water Radiolysis*. The Journal of Physical Chemistry 69 (1) (1966) 4131-4137.
- [135] L. Pohl, M. Eckle: *Sodium 3-Trimethylsilyltetradeuteriopropionate, a New Water-Soluble Standard for ¹H-NMR*. Angewandte Chemie International Edition in English 8 (5) (1969) 381.
- [136] www.cccbdb.nist.gov/
- [137] A. Trummal, A. Rummel, E. Lippmaa, P. Burk, I. A. Koppel: *IEF-PCM Calculations of Absolute pKa for Substituted Phenols in Dimethyl Sulfoxide and Acetonitrile Solutions*. J. Phys. Chem. A 113 (2009) 6206–6212.
- [138] Y. Takano, K. N. Houk: *Benchmarking the Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM) for Aqueous Solvation Free Energies of Neutral and Ionic Organic Molecules*. J. Chem. Theory Comput. 1 (2005) 70-77.
- [139] www.bse.pnl.gov/bse/portal
- [140] M. Schindler: *Magnetic Properties in Terms of Localized Quantities. 5. Carbocations*. J. Am. Chem. Soc. 109 (4) (1987) 1020-1033.

- [141] L. Hermosilla, P. Calle, J. M. Garcia de la Vega, C. Sieiro: *Density Functional Theory Study of ^{14}N Isotropic Hyperfine Coupling Constants of Organic Radicals*. J. Phys. Chem. A 110 (2006) 13600-13608.
- [142] T. Kupka, M. Stachów, M. Nieradka, J. Kaminsky, T. Pluta: *Convergence of Nuclear Magnetic Shieldings in the Kohn-Sham Limit for Several Small Molecules*. J. Chem. Theory Comput. 6 (2010) 1580–1589.
- [143] J. Stankowski, W. Hilczer: *Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*. PWN Warszawa (2005).
- [144] L.D. Barron, A.R. Gargaro, L. Hecht, P.L. Polavarapu: *Experimental and ab initio theoretical vibrational Raman optical activity of alanine*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy 47 (8) (1991) 1001-1016.
- [145] Gu-Sheng Yu, T. B. Freedman, L. A. Nafie, Z. Deng, P. L. Polavarapu: *Experimental Measurement and Ab Initio Calculation of Raman Optical Activity of L-Alanine and Its Deuterated Isotopomers*. J. Phys. Chem. 99 (2) (1995) 835–843.
- [146] S. Kuroda, I. Miyagawa: *ENDOR study of an irradiated crystal of L - alanine: Environment of the stable $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HCO}_2^-$ radical*. J. Chem. Phys. 76 (1982) 3933.
- [147] H. M. McConnell, C. Heller, T. Cole, R. W. Fessenden: *Radiation Damage in Organic Crystals. I. $\text{CH}(\text{COOH})_2$ in Malonic Acid*. J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 766-775.

Spis rysunków:

Rysunek 4.1 Koncentracja rodników R1, R2 i R3 l-alaniny w funkcji dawki promieniowania [44].	33
Rysunek 4.2 Rodniki R1, R2, R3, powstałe na skutek radiolizy l-alaniny [42, 43].	33
Rysunek 4.3 Widmo EPR dla detektora l-alaninowego napromienionego typowymi dawkami promieniowania jonizującego stosowanymi w obrębie jednej frakcji terapeutycznej radioterapii (0.5Gy, 1Gy, i 2Gy). Widmo dla przypadku 0 Gy, to widmo dla detektora nienapromienionego [31].	34
Rysunek 4.4 Widmo EPR dla trzech różnych rodników l-alaniny uzyskane metodą symulacji [44].	35
Rysunek 4.5 Układ rombowy, wraz z zaznaczonymi krawędziami komórki przestrzennej $a \neq b \neq c$, [75]. Węzły stanowią atomy cząsteczki l-alaniny.	38
Rysunek 4.6 Model kryształu l-alaniny [89].	40
Rysunek 4.7 Cząsteczka l-alaniny z zaznaczonymi kątami τ_1 i τ_2 [89].	41
Rysunek 4.8 Model „bulk water” i „hydration Shell” dla l-alaniny w roztworze wodnym [94].	43
Rysunek 4.9 Model dwóch sąsiadujących komórek elementarnych kryształu l-alaniny [95].	44
Rysunek 4.10 Struktura przestrzenna jonu obojnaczego l-alaniny: kolorem srebrnym zaznaczono eksperymentalną strukturę postaci krystalicznej l-alaniny, kolorem czerwonym zaznaczono eksperymentalną strukturę l-alaniny w roztworze wodnym, kolorem niebieskim zaznaczono strukturę obliczoną metodami mechaniki kwantowej [95].	44
Rysunek 4.11 L-alanina + 20 molekuł wody + COSMO, [96].	47
Rysunek 4.12 Porównanie widm VA uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].	50
Rysunek 4.13 Porównanie widm VCD uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].	50
Rysunek 4.14 Porównanie widm Raman uzyskanych na podstawie metody obliczeniowej B3LYP/6-31*, dla modeli LA20WC, LA20WC + Onager, LA20WC + PCM, LA20WC + COSMO, oraz widma doświadczalnego, [96].	51
Rysunek 4.15 Mechanizm tworzenia rodników od R1 do R9; Me to oznaczenie podstawnika w postaci grupy metylowej (CH ₃), [102].	52

Rysunek 4.16 Optymalizacja geometrii struktur rodnika R1 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p), (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117].	57
Rysunek 4.17 Optymalizacja geometrii struktury rodnika R2 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p) w połączeniu z modelem Onsagera, (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117].	58
Rysunek 4.18 Optymalizacja geometrii struktur rodnika R3 z zastosowaniem metody DFT, B3LYP/6-31+G(d,p), (wartości kątów wyrażono w stopniach, długości wiązań wyrażono w Å), [117].	58
Rysunek 4.19 Geometryczny model rodnika R1, [116].	61
Rysunek 4.20 Optymalizacja geometryczna cząsteczki rodnika R2 i molekuł sąsiedztwa l-alaniny w modelu klastra, metoda obliczeniowa B3LYP/PM3/6, [119].	63
Rysunek 4.21 Optymalizacja geometryczna cząsteczki rodnika R2 i molekuł sąsiedztwa l-alaniny w modelu periodycznych komórek elementarnych, metoda obliczeniowa DFT z funkcjonalem BP86, [119].	65
Rysunek 4.22 Struktura molekularna klastra l-alaniny, na którym przeprowadzono obliczenia. Warstwa „high” atomy w postaci kuleczek, warstwa „low” atomy w postaci pręcików. Oznaczenia dla metody ONIOM, [128].	69
Rysunek 4.23 Odległości między atomami obliczone metodą B3LYP/6-311G:AM1 oraz umieszczone w nawiasie dane eksperymentalne. Dla sześciu molekuł l-alaniny otoczenia. Na rysunku przedstawiono tylko grupy aminowe NH ₃ i grupy karboksylowe COO, [128].	70
Rysunek 4.24 Korelacja, obliczonych na podstawie modelu i uzyskanych doświadczalnie, głównych wartości własnych tensora przesunięcia chemicznego dla widma ¹³ C NMR dla trzech aminokwasów w tym l-alaniny.	71
Rysunek 6.1 Kryształy l-alaniny w postaci proszku [Zdjęcie wykonano na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki w Laboratorium Urządzeń Elektronooptycznych przez Prof. dr hab. inż. Witolda Słwko, za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego typu Jeol JSM–335CF w 70 krotnym powiększeniu].	75
Rysunek 6.2 Widmo doświadczalne EPR rodników l-alaniny wraz z dopasowaną krzywą wyznaczoną metodą średniej ruchomej oraz zaznaczoną amplitudą linii centralnej, której wartość stosowana jest w pomiarach dozymetrycznych	77
Rysunek 6.3 Wzór strukturalny cząsteczki l-alaniny (jon obojnaczy).	79
Rysunek 6.4 Widmo doświadczalne ¹ H NMR roztworu wodnego l-alaniny przed napromienieniem.	80

Rysunek 6.5 Widmo ^1H NMR l-alaniny i kwasu pirogronowego w roztworze wodnym po napromienieniu.....	81
Rysunek 6.6 Schemat reakcji dla wodnego roztworu l-alaniny lub glicyny zaproponowany w pracy [134]. Punkty od 1 do 5 przedstawiają reakcje radiolizy cząsteczki wody i oddziaływanie elektronów rozproszonych, powstałych na skutek absorpcji energii pierwotnego promieniowania jonizującego. Punkty od 6 do 14a przedstawiają reakcje oddziaływania produktów radiolizy roztworu wodnego l-alaniny lub glicyny w zależności od podstawnika R.....	82
Rysunek 7.1 Model startowy dwóch warstw ONIOM, klaster l-alaniny w postaci kryształicznej. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.....	85
Rysunek 7.2 Model startowy dwóch warstw ONIOM, klaster l-alaniny w roztworze wodnym. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.....	85
Rysunek 7.3 Model dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą HF/6-31++(d,p):AM1, klaster l-alaniny w postaci kryształicznej. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.	87
Rysunek 7.4 Model dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą HF/6-31++(d,p):HF/3-21g, klaster l-alaniny w roztworze wodnym. Na rysunku zaznaczono warstwy „low” i „high” w metodzie ONIOM.....	87
Rysunek 7.5 Optymalizacja geometrii modelu roztworu wodnego l-alaniny skonstruowanego w postaci klastra metodą dwóch warstw ONIOM. [Wykres przedstawia zależność czasu trwania obliczeń optymalizacji geometrii modelu molekularnego w funkcji zastosowanej metody obliczeniowej i bazy funkcji dla warstwy „high”, jednocześnie warstwa „low” optymalizowana była przy użyciu metody HF z bazą 3-21g dla wszystkich kombinacji warstwy „high”.....	89
Rysunek 7.6 Model l-alaniny w roztworze wodnym na bazie modelu ciągłego rozpuszczalnika CPCM po przeprowadzeniu optymalizacji geometrii.....	94
Rysunek 7.7 Schemat doboru optymalnych modeli molekularnych ONIOM l-alaniny w kryształce i w roztworze wodnym w stosunku do wartości referencyjnych.....	95
Rysunek 7.8 Schemat doboru optymalnych modeli molekularnych IEF-PCM oraz CPCM l-alaniny w roztworze wodnym.....	96
Rysunek 7.9 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1; molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R1(SAR) l-alaniny w kryształce, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”.	97

Rysunek 7.10 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1, molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R2 l-alaniny w kryształach, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”. ..	97
Rysunek 7.11 Model klastra dwóch warstw ONIOM po zoptymalizowaniu geometrii metodą DFT(b3lyp)/6-31++(d,p):AM1, molekula centralna stanowi warstwę „high” i jest modelem rodnika R3 l-alaniny w kryształach, cząsteczki l-alaniny otoczenia stanowią warstwę „low”. ..	98
Rysunek 8.1 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R1 l-alaniny.	106
Rysunek 8.2 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R2 l-alaniny.	107
Rysunek 8.3 Symulacja widma EPR dla modelu ONIOM, HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 rodnika R3 l-alaniny.	107
Rysunek 9.1 Model ONIOM wodnego roztworu kwasu pirogronowego.	110
Rysunek 9.2 Widmo symulacyjne ¹ H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny i kwasu pirogronowego.	113

Spis tabel:

Tabela 4.1 Wpływ upływu czasu na intensywność sygnału EPR dla dozymetrów l-alaninowych, [60].	36
Tabela 4.2 Energia solwatacji (kcal mol ⁻¹) dla czterech konformerów – (0,0), (60,0), (60,9), (0,90) jonu obojnego l-alaniny w roztworze wodnym, [90].	42
Tabela 4.3 Długości wiązań i wartości kątów dla jonu obojnego l-alaniny w roztworze wodnym, po optymalizacji geometrii metodą: 6-31++G*/GB, [90]. Oznaczenia atomów przedstawiono na rysunku 8.	42
Tabela 4.4 Wybrane dane struktury jonu obojnego l-alaniny w postaci długości wiązań i wartości kątów między odpowiednimi atomami w cząsteczce. Pierwsze dwie kolumny stanowią obliczenia uzyskane na podstawie modelu l-alaniny w otoczeniu 50 molekuł wody. Trzecia kolumna zawiera dane, uzyskane na podstawie obliczeń dla modelu l-alaniny w postaci krystalicznej. Dwie ostatnie kolumny to dane doświadczalne uzyskane na podstawie badań dyfrakcyjnych [95].	45
Tabela 4.5 Długość wiązań i wartości kątów dla atomów wodoru (i połączonych z nimi innych atomów) w modelach l-alaniny w wodzie i kryształach [95].	45
Tabela 4.6 Dane strukturalne dla jonu obojnego l-alaniny, [96].	48
Tabela 4.7 Wyniki obliczeń energii wiązania i ciepła tworzenia metodą MO w próżni [102].	53
Tabela 4.8 . Entalpia reakcji w przypadku formowania rodników l-alaniny od R1 do R9, [102].	53
Tabela 4.9 Współrzędne atomów w [Å] dla Stabilnego Rodnika Alaninowego (SAR). Dane referencyjne zawiera praca [11+], [42].	54
Tabela 4.10 Parametry magnetyczne dla rodnika R1 zwanego Stabilnym Rodnikiem Alaninowym (Stable Alanine Radical), metoda pomiarowa to EPR i ENDOR, temperatura pomiaru 295K ^{a,b} , [42].	54
Tabela 4.11 Parametry magnetyczne dla rodnika R2 uzyskanego po napromienieniu pojedynczych kryształów l-alaniny, metoda pomiarowa ENDOR w paśmie X i paśmie K, temperatury pomiaru 295K i 220K ^{a,b} , [42].	55
Tabela 4.12 Parametry magnetyczne dla dwóch konformerów rodnika R3 uzyskanego po napromienieniu pojedynczych kryształów l-alaniny, metoda pomiarowa ENDOR, temperatura pomiaru 295K ^{a,b} , [42].	55

Tabela 4.13 Wartości tensora g dla rodników R1 i R2 powstałych na skutek jonizacji cząsteczki l-alaniny promieniowaniem X w temp. 295K. Pomiar dokonano w paśmie Q metodą EPR, [108].	56
Tabela 4.14 Parametry spektralne zastosowane do symulacji widma EPR dla rodnika R3 powstałego na skutek jonizacji cząsteczki l-alaniny promieniowaniem X w temp. 295K. (Stała struktury nadsubtelnej wyrażona została w MHz), [108].	56
Tabela 4.15 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R1, [117].	59
Tabela 4.16 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R2, [117].	60
Tabela 4.17 Porównanie obliczonych i eksperymentalnych [42] wartości tensora struktury nadsubtelnej (MHz) w przypadku rodnika R3, [117].	60
Tabela 4.18 Obliczone i eksperymentalne wartości tensora struktury nadsubtelnej, dla α protonu H7 oraz protonów grupy metylowej H8,H9,H10, dla rodnika R1 (model rodnika przedstawia rysunek 19). Metoda obliczeniowa UB3LYP/6-311G(d)// B3LYP/6-31G(d). Wszystkie wartości wyrażono w (MHz), [116].	61
Tabela 4.19 Obliczone i eksperymentalne wartości tensora struktury nadsubtelnej, dla protonów grupy metylowej H8,H9,H10, dla rodnika R1, temp. pomiaru 77K. Metoda obliczeniowa UB3LYP/6-311G(d)// B3LYP/6-31G(d). Wszystkie wartości wyrażono w (MHz), [116].	62
Tabela 4.20 Metody obliczeniowe, stosowane oprogramowanie i zastosowany model do obliczeń ONIOM, [119].	64
Tabela 4.21 Wybrane wartości kątów i długości wiązań dla różnych metod optymalizacji geometrii, [119].	66
Tabela 4.22 Podsumowanie obliczeń wartości tensora struktury nadsubtelnej, [119].	67
Tabela 4.23 Obliczone i eksperymentalne główne wartości własne i wartość izotropowa tensora przesunięcia chemicznego dla widma ^{13}C NMR l-alaniny, [128].	70
Tabela 7.1 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modelu ONIOM l-alaniny w kryształach.	91
Tabela 7.2 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modelu ONIOM l-alaniny w roztworze wodnym.	91
Tabela 7.3 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli ciągłych IEF-PCM i CPCM l-alaniny w roztworze wodnym.	94

Tabela 7.4 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli rodników l-alaniny R1, R2, R3 przedstawione w pozycjach literaturowych [117, 119].	98
Tabela 7.5 Wyniki optymalizacji geometrii, wybrane długości wiązań i wartości kątów, modeli rodników l-alaniny R1, R2, R3 przeprowadzone metodą ONIOM wraz z HF, DFT i MP2 w niniejszej pracy.	99
Tabela 8.1 Wyniki obliczeń tensora struktury nadsubtelnej dla rodnika R1 wykonanych metodą DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1, DFT:AM1 i MP2:AM1. ((Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108]).	102
Tabela 8.2 Wyniki obliczeń tensora g dla rodników R1, R2 i R3 wykonanych metodą DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1. (Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108]).	103
Tabela 9.1 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych.	114
Tabela 9.2 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu kwasu pirogronowego, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych.	115

Załącznik 1

Tabela 1 Wyniki obliczeń tensora struktury nadsubtelnej dla rodnika R2 wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1, DFT:AM1 i MP2:AM1.

Ozn. atomu	Dane eksperymentalne dla molekuly rodnika R2				Ozn. atomu	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				HF/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz		Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
O1					13O	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.8	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.8
C2					11C	-19.3	-10.9	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3	-19.3	-11.0	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3
O3					20O	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.6	19.9	-47.5	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.5	19.9	-47.5
C4					12C	221.5	-69.7	-68.7	138.5	219.7	-70.2	-69.1	139.3	221.5	-69.7	-68.7	138.4	219.8	-70.2	-69.1	139.3
N5	7.3	5.5	8.2	8.3	14N	0.1	-0.6	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7	0.1	-0.7	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7
C6					15C	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0
H7	70.8	67.9	68.1	76.4	17H	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3
H8					18H	3.6	-4.6	-3.8	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5	3.6	-4.6	-3.8	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5
H9					19H	42.2	-5.0	-4.5	9.5	44.6	-5.1	-4.6	9.7	42.2	-4.9	-4.5	9.5	44.6	-5.1	-4.6	9.7
H10	86.3	79.4	83.6	95.8	16H	54.2	-4.4	-3.2	7.7	56.3	-4.5	-3.4	7.8	54.1	-4.3	-3.2	7.7	56.4	-4.5	-3.4	7.8
H11	10.2	5.3	5.4	19.9	22H	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.4	-5.3	-4.5	9.8	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.5	-5.3	-4.5	9.8
H12	30.2	24.1	25.5	40.9	21H	32.7	-6.2	-5.2	11.4	33.8	-6.3	-5.3	11.6	32.6	-6.2	-5.2	11.4	33.9	-6.3	-5.3	11.6

Ozn. atomu	DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				DFT/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.8	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.9
11C	-19.3	-11.0	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3	-19.3	-11.0	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3
20O	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.6	19.9	-47.5	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.6	19.9	-47.5
12C	221.5	-69.7	-68.7	138.5	219.8	-70.2	-69.1	139.4	221.5	-69.7	-68.7	138.5	219.8	-70.2	-69.1	139.4
14N	0.1	-0.7	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7	0.1	-0.7	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7
15C	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0
17H	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3
18H	3.6	-4.6	-3.8	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5	3.6	-4.6	-3.8	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5
19H	42.2	-5.0	-4.5	9.5	44.6	-5.1	-4.6	9.7	42.2	-5.0	-4.5	9.5	44.6	-5.0	-4.6	9.7
16H	54.2	-4.5	-3.2	7.7	56.4	-4.5	-3.4	7.8	54.2	-4.5	-3.2	7.7	56.4	-4.5	-3.4	7.8
22H	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.4	-5.3	-4.5	9.8	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.3	-5.3	-4.5	9.8
21H	32.7	-6.2	-5.2	11.4	33.9	-6.3	-5.3	11.6	32.7	-6.201	-5.209	11.410	33.9	-6.3	-5.3	11.6

Ozn. atomu	MP2/B3LYP/IGLO-III:AM1				MP2/ B3LYP/EPR-III:AM1				MP2/ B3LYP/IGLO-III				MP2/ B3LYP/EPR-III			
	ONIOM				ONIOM				Pojedynczy rodnik				Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.8	-1.6	14.2	12.4	-26.6	-1.4	14.3	12.5	-26.9
11C	-19.3	-11.0	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3	-19.3	-11.0	0.7	10.3	-19.2	-11.0	0.7	10.3
20O	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.6	19.9	-47.5	-6.7	26.9	19.5	-46.4	-6.8	27.6	19.9	-47.5
12C	221.5	-69.7	-68.7	138.5	219.8	-70.2	-69.1	139.4	221.5	-69.7	-68.7	138.5	219.8	-70.2	-69.1	139.4
14N	0.1	-0.7	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7	0.1	-0.7	-0.1	0.8	0.2	-0.7	-0.1	0.7
15C	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0	-2.1	-2.8	-1.4	4.2	-2.1	-2.7	-1.3	4.0
17H	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3	101.3	-3.7	-2.3	6.0	106.2	-3.8	-2.5	6.3
18H	3.6	-4.6	-3.9	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5	3.6	-4.6	-3.8	8.4	3.8	-4.7	-3.8	8.5
19H	42.2	-5.0	-4.5	9.5	44.6	-5.1	-4.6	9.7	42.2	-5.0	-4.5	9.5	44.6	-5.1	-4.6	9.7
16H	54.2	-4.5	-3.2	7.7	56.4	-4.5	-3.4	7.8	54.2	-4.5	-3.2	7.7	56.4	-4.5	-3.4	7.8
22H	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.4	-5.3	-4.5	9.8	1.3	-5.3	-4.5	9.8	1.4	-5.3	-4.5	9.8
21H	32.7	-6.2	-5.2	11.4	33.9	-6.3	-5.3	11.6	32.7	-6.2	-5.2	11.4	33.9	-6.3	-5.3	11.6

Wartości tensora struktury nadsubtelnej wyrażono w MHz. Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42].

Tabela 2 Wyniki obliczeń tensora struktury nadsubtelnej dla rodnika R3 wykonanych metoda DFT z funkcjonalem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1, DFT:AM1 i MP2:AM1.

Ozn. atomu	Dane eksperymentalne dla molekuly rodnika R3				Ozn. atomu	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				HF/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz		Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
$H_{\beta(sr.)}$					13O	-20.2	47.6	47.3	-94.9	-20.4	48.2	48.2	-96.4	-20.2	47.6	47.3	-94.9	-20.3	48.3	48.1	-96.4
					11C	-38.9	-9.3	0.5	8.9	-38.6	-9.3	0.4	8.9	-38.9	-9.3	0.5	8.9	-38.6	-9.3	0.4	8.9
					20O	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7
					12C	67.6	-60.5	-59.5	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4	67.6	-60.5	-59.4	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4
					14N	1.9	-2.1	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.7	3.9	1.9	-2.1	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.73	3.9
					15C	-25.1	-1.883	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.5	1.3	-25.1	-1.9	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.5	1.3
					17H	95.1	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0	95.2	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0
					18H	15.2	-3.7	-2.8	6.5	16.0	-3.8	-2.9	6.6	15.2	-3.7	-2.8	6.5	15.9	-3.8	-2.9	6.6
					19H	39.3	-4.0	-2.8	6.9	41.3	-4.1	-3.0	7.1	39.3	-4.0	-2.8	6.8	41.3	-4.1	-3.0	7.1
					90H	-1.54	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3	-1.5	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3
		39.5	44.5	37.3	36.8	16H	90.2	-5.5	-4.6	10.1	93.8	-5.7	-4.8	10.5	90.3	-5.4	-4.6	10.0	93.8	-5.7	-4.8
	33.1	37.7	30.8	30.8	21H	28.8	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3	28.8	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3

Ozn. atomu	DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				DFT/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-20.3	47.6	47.3	-94.9	-20.4	48.7	48.2	-96.4	-20.3	47.6	47.3	-94.9	-20.3	48.3	48.2	-96.4
11C	-38.9	-9.3	0.5	8.9	-38.6	-9.3	0.4	8.9	-38.9	-9.3	0.5	8.9	-38.6	-9.3	0.4	8.9
20O	3.5	4.7	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.7	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7
12C	67.6	-60.5	-59.5	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4	67.6	-60.5	-59.5	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4
14N	1.9	-2.0	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.7	3.9	1.9	-2.1	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.7	3.9
15C	-25.1	-1.9	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.5	1.3	-25.1	-1.9	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.486	1.3
17H	95.2	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0	95.2	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0
18H	15.2	-3.7	-2.8	6.5	16.0	-3.8	-2.9	6.6	15.2	-3.7	-2.8	6.5	16.0	-3.8	-2.9	6.6
19H	39.3	-4.0	-2.8	6.9	41.3	-4.1	-3.0	7.1	39.3	-4.0	-2.8	6.9	41.3	-4.1	-3.0	7.1
90H	-1.5	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3	-1.5	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3
16H	90.3	-5.5	-4.6	10.1	93.8	-5.7	-4.8	10.5	90.3	-5.5	-4.6	10.1	93.8	-5.7	-4.8	10.5
21H	28.8	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3	28.8	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3

Ozn. atomu	MP2/B3LYP/IGLO-III:AM1				MP2/ B3LYP/EPR-III:AM1				MP2/ B3LYP/IGLO-III				MP2/ B3LYP/EPR-III			
	ONIOM				ONIOM				Pojedynczy rodnik				Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-20.3	47.6	47.3	-94.9	-20.4	48.3	48.2	-96.4	-20.3	47.6	47.3	-94.9	-20.3	48.3	48.2	-96.4
11C	-38.9	-9.3	0.5	8.9	-38.6	-9.3	0.4	8.9	-38.9	-9.3	0.457	8.9	-38.6	-9.3	0.424	8.9
20O	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7	3.5	4.9	2.8	-7.7
12C	67.6	-60.5	-59.5	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4	67.6	-60.5	-59.5	120.0	67.1	-60.8	-59.6	120.4
14N	1.9	-2.1	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.7	3.9	1.9	-2.0	-1.8	3.8	1.9	-2.1	-1.7	3.9
15C	-25.1	-1.9	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.5	1.3	-25.1	-1.9	0.6	1.2	-24.8	-1.8	0.5	1.3
17H	95.2	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0	95.2	-3.8	-2.9	6.7	99.9	-3.9	-3.1	7.0
18H	15.2	-3.7	-2.8	6.5	16.0	-3.8	-2.9	6.6	15.2	-3.7	-2.8	6.5	16.0	-3.8	-2.9	6.6
19H	39.3	-4.0	-2.8	6.9	41.3	-4.1	-3.0	7.1	39.3	-4.0	-2.8	6.9	41.3	-4.1	-3.0	7.1
90H	-1.5	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3	-1.5	-5.0	-1.3	6.3	-1.7	-5.0	-1.3	6.3
16H	90.3	-5.4	-4.6	10.1	93.8	-5.7	-4.8	10.5	90.3	-5.5	-4.6	10.1	93.8	-5.7	-4.8	10.5
21H	28.8	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3	29.0	-7.6	0.4	7.2	30.0	-7.7	0.4	7.3

Wartości tensora struktury nadsubtelnej wyrażono w MHz. Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42].

Tabela 3 Wyniki obliczeń tensora struktury nadsubtelnej dla rodnika R1 wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1, DFT:AM1 i MP2:AM1.

Ozn. atomu	Dane eksperymentalne dla molekuly rodnika R1				Ozn. atomu	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				HF/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				HF/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik				
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz		Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	
H _α					13O	-12.8	30.0	28.8	-58.9	-12.8	30.5	29.1	-59.7	-5.7	31.0	29.6	-60.7	-12.8	30.5	29.1	-59.6	
					11C	-37.3	-9.2	1.6	7.6	-36.9	-9.1	1.6	7.6	-35.8	-9.2	1.7	7.6	-36.9	-9.2	1.6	7.6	
					19O	2.2	1.3	1.0	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3	2.3	1.3	1.00	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3	
					12C	86.1	-70.4	-70.2	140.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3	90.5	-72.0	-71.7	143.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3	
		-56.1	-31.8	3.9	27.9	14H	-49.8	-32.4	-2.3	34.8	-54.8	-32.1	-1.4	33.6	-52.3	-32.5	-1.0	33.6	-54.8	-32.1	-1.4	33.6
						15C	-27.4	-2.5	0.6	1.9	-27.0	-2.4	0.4	2.0	-28.1	-2.4	0.4	2.1	-27.0	-2.4	0.4	2.0
H _{β(sr.)}					17H	110.8	-4.9	-2.9	7.8	116.2	-4.9	-3.2	8.2	111.1	-4.9	-3.1	8.0	116.2	-5.0	-3.2	8.2	
					18H	7.7	-4.3	-3.6	7.9	8.0	-4.4	-3.5	8.0	7.6	-4.5	-3.5	8.0	8.1	-4.4	-3.5	8.0	
		69.9	-2.6	-2.3	4.8	16H	64.1	-4.6	-3.5	8.1	67.4	-4.7	-3.7	8.4	64.4	-4.9	-3.4	8.3	67.3	-4.7	-3.7	8.4
						88H	-0.9	-4.0	-2.7	6.7	-1.0	-4.0	-2.7	6.6	-1.0	-4.0	-2.6	6.6	-1.0	-4.0	-2.7	6.6

Ozn. atomu	DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/EPR-III:AM1 ONIOM				DFT/ B3LYP/IGLO-III Pojedynczy rodnik				DFT/ B3LYP/EPR-III Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-12.8	30.0	28.9	-58.9	-12.8	30.5	29.2	-59.7	-12.8	30.0	28.9	-58.9	-12.8	30.5	29.2	-59.7
11C	-37.3	-9.2	1.6	7.6	-36.9	-9.2	1.6	7.6	-37.3	-9.2	1.6	7.6	-36.9	-9.2	1.6	7.6
19O	2.2	1.3	1.0	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3	2.2	1.3	1.0	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3
12C	86.1	-70.5	-70.3	140.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3	86.1	-70.4	-70.3	140.7	85.8	-70.8	-70.5	141.3
14H	-49.8	-32.5	-2.3	34.8	-54.8	-32.1	-1.4	33.6	-49.8	-32.5	-2.3	34.7	-54.8	-32.1	-1.4	33.6
15C	-27.4	-2.5	0.6	1.9	-27.0	-2.4	0.4	2.0	-27.4	-2.5	0.6	1.9	-27.0	-2.4	0.4	2.0
17H	110.8	-4.8	-2.9	7.8	116.2	-5.0	-3.2	8.2	110.8	-4.9	-2.9	7.8	116.2	-4.9	-3.2	8.2
18H	7.7	-4.3	-3.6	7.9	8.1	-4.	-3.5	8.0	7.7	-4.3	-3.6	7.9	8.1	-4.4	-3.5	8.0
16H	64.2	-4.6	-3.5	8.1	67.4	-4.7	-3.7	8.4	64.2	-4.6	-3.5	8.1	67.4	-4.7	-3.7	8.4
88H	-0.9	-4.0	-2.7	6.7	-1.0	-4.0	-2.7	6.6	-0.9	-4.0	-2.7	6.7	-1.0	-4.0	-2.7	6.6

Ozn. atomu	MP2/B3LYP/IGLO-III:AM1				MP2/ B3LYP/EPR-III:AM1				MP2/ B3LYP/IGLO-III				MP2/ B3LYP/EPR-III			
	ONIOM				ONIOM				Pojedynczy rodnik				Pojedynczy rodnik			
	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz	Aiso	Txx	Tyy	Tzz
13O	-14.1	33.0	31.9	-64.9	-14.2	33.6	32.2	-65.8	-12.8	30.0	28.9	-58.9	-12.8	30.5	29.2	-59.7
11C	-39.9	-10.4	2.1	8.2	-39.4	-10.3	2.2	8.2	-37.3	-9.2	1.6	7.6	-36.9	-9.2	1.6	7.6
19O	2.8	1.2	0.6	-1.8	2.7	1.2	0.6	-1.8	2.2	1.3	1.0	-2.3	2.1	1.3	1.0	-2.3
12C	87.2	-69.5	-69.3	138.7	86.9	-69.9	-69.4	139.3	86.1	-70.5	-70.3	140.7	85.8	-70.8	-70.5	141.4
14H	-49.2	-31.5	-2.6	34.1	-54.1	-31.2	-1.7	32.9	-49.8	-32.5	-2.3	34.8	-54.8	-32.2	-1.4	33.6
15C	-27.1	-2.6	0.6	2.0	-26.7	-2.5	0.4	2.1	-27.4	-2.5	0.6	1.9	-27.0	-2.4	0.4	2.0
17H	98.1	-4.9	-2.8	7.7	102.9	-5.0	-3.1	8.0	110.8	-4.9	-2.9	7.8	116.2	-5.0	-3.2	8.2
18H	2.4	-4.2	-3.4	7.6	2.5	-4.4	-3.3	7.7	7.7	-4.3	-3.6	7.9	8.1	-4.4	-3.5	8.0
16H	83.5	-4.7	-3.4	8.2	87.6	-4.8	-3.7	8.5	64.2	-4.6	-3.5	8.1	67.4	-4.7	-3.7	8.4
88H	-1.1	-3.8	-2.7	6.6	-1.2	-3.8	-2.7	6.6	-0.9	-4.0	-2.7	6.7	-1.0	-4.0	-2.7	6.6

Wartości tensora struktury nadsubtelnej wyrażono w MHz. Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42].

Tabela 4 Wyniki obliczeń tensora \mathbf{g} dla rodników R1, R2 i R3 wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą HF:AM1.

Rodnik	Składowe tensora \mathbf{g}	Główne wartości własne dane eksperymentalne	HF/B3LYP/IGLO-III:AM1				HF/ B3LYP/EPR-III:AM1					
			ONIOM				ONIOM					
			\mathbf{g}	$\Delta\mathbf{g}_{\text{OZ/SOC}}$	$\Delta\mathbf{g}_{\text{DC}}$	$\Delta\mathbf{g}_{\text{RMC}}$	\mathbf{g}_e	\mathbf{g}	$\Delta\mathbf{g}_{\text{OZ/SOC}}$	$\Delta\mathbf{g}_{\text{DC}}$	$\Delta\mathbf{g}_{\text{RMC}}$	\mathbf{g}_e
R1	\mathbf{g}_{xx}	2.0043	2.0043	0.2068E-02	0.8839E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0043	0.2076E-02	0.7766E-04	-0.1699E-03	2.0023
	\mathbf{g}_{yy}	2.0038	2.0034	0.1206E-02	0.6891E-04			2.0034	0.1217E-02	0.5629E-04		
	\mathbf{g}_{zz}	2.0021	2.0033	0.1096E-02	0.7800E-04			2.0033	0.1097E-02	0.6952E-04		
R2	\mathbf{g}_{xx}	2.0038	2.0039	0.1796E-02	0.4474E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0039	0.1754E-02	0.6286E-04	-0.1836E-03	2.0023
	\mathbf{g}_{yy}	2.0032	2.0057	0.3569E-02	0.8493E-04			2.0057	0.3582E-02	0.1736E-04		
	\mathbf{g}_{zz}	2.0022	2.0053	0.3118E-02	0.7252E-04			2.0053	0.3081E-02	0.9765E-04		
R3	\mathbf{g}_{xx}	2.0040	2.0061	0.3917E-02	0.9086E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0061	0.3909E-02	0.9414E-04	-0.2046E-03	2.0023
	\mathbf{g}_{yy}	2.0030	2.0027	0.6089E-02	0.4287E-04			2.0027	0.6196E-02	0.3406E-04		
	\mathbf{g}_{zz}	2.0020	2.0069	0.4772E-02	0.9217E-04			2.0069	0.4751E-02	0.9067E-04		

HF/B3LYP/IGLO-III:AM1					HF/ B3LYP/EPR-III:AM1				
Pojedynczy rodnik					Pojedynczy rodnik				
g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
2.0049	0.2763E-02	0.8514E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0050	0.2770E-02	0.8414E-04	-0.1699E-03	2.0023
2.0037	0.1551E-02	0.7180E-04			2.0037	0.1551E-02	0.7334E-04		
2.0022	0.8819E-02	0.2826E-04			2.0022	0.8770E-02	0.2978E-04		
2.0049	0.2744E-02	0.7554E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0049	0.2705E-02	0.7859E-04	-0.1836E-03	2.0023
2.0054	0.3229E-02	0.6861E-04			2.0054	0.3196E-02	0.9168E-04		
2.0046	0.2455E-02	0.4798E-04			2.0046	0.2485E-02	0.4778E-04		
2.0069	0.4798E-02	0.8476E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0069	0.4789E-02	0.8201E-04	-0.2046E-03	2.0023
2.0067	0.4498E-02	0.9732E-04			2.0066	0.4487E-02	0.9185E-04		
2.0021	0.5204E-02	0.5018E-04			2.0020	0.9092E-02	0.4557E-04		

Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108].

Tabela 5 Wyniki obliczeń tensora **g** dla rodników R1, R2 i R3 wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą DFT:AM1.

Rodnik	Składowe tensora g	Główne wartości własne dane eksperymentalne	DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1					DFT/ B3LYP/EPR-III:AM1				
			ONIOM					ONIOM				
			g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
R1	g_{xx}	2.0043	2.0043	0.2068E-02	0.8839E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0043	0.2076E-02	0.7766E-04	-0.1699E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0038	2.0034	0.1206E-02	0.6891E-04			2.0034	0.1217E-02	0.5629E-04		
	g_{zz}	2.0021	2.0033	0.1096E-02	0.7800E-04			2.0033	0.1097E-02	0.6952E-04		
R2	g_{xx}	2.0038	2.0039	0.1796E-02	0.4474E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0039	0.1754E-02	0.6286E-04	-0.1836E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0032	2.0057	0.3569E-02	0.8493E-04			2.0057	0.3582E-02	0.1736E-04		
	g_{zz}	2.0022	2.0053	0.3118E-02	0.7252E-04			2.0053	0.3081E-02	0.9765E-04		
R3	g_{xx}	2.0040	2.0061	0.3917E-02	0.9086E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0061	0.3909E-02	0.9414E-04	-0.2046E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0030	2.0027	0.6089E-02	0.4287E-04			2.0027	0.6196E-02	0.3406E-04		
	g_{zz}	2.0020	2.0069	0.4772E-02	0.9217E-04			2.0069	0.4751E-02	0.9067E-04		

DFT/B3LYP/IGLO-III:AM1					DFT/ B3LYP/EPR-III:AM1				
Pojedynczy rodnik					Pojedynczy rodnik				
g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
2.0050	0.2772E-02	0.9155E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0050	0.2770E-02	0.8414E-04	-0.1699E-03	2.0023
2.0037	0.1551E-02	0.7637E-04			2.0037	0.1551E-02	0.7334E-04		
2.0022	0.7501E-02	0.4226E-04			2.0022	0.8770E-02	0.2978E-04		
2.0049	0.2744E-02	0.7554E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0049	0.2705E-02	0.7859E-04	-0.1836E-03	2.0023
2.0054	0.3229E-02	0.6861E-04			2.0054	0.3196E-02	0.9168E-04		
2.0046	0.2455E-02	0.4798E-04			2.0046	0.2485E-02	0.4778E-04		
2.0069	0.4798E-02	0.8476E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0069	0.4789E-02	0.8201E-04	-0.2046E-03	2.0023
2.0067	0.4498E-02	0.9732E-04			2.0066	0.4487E-02	0.9185E-04		
2.0021	0.5204E-02	0.5018E-04			2.0021	0.9092E-02	0.4557E-04		

Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108].

Tabela 6 Wyniki obliczeń tensora **g** dla rodników R1, R2 i R3 wykonanych metoda DFT z funkcjonalem B3LYP dla modeli ONIOM i modelu pojedynczego rodnika. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodą MP2:AM1.

Rodnik	Składowe tensora g	Główne wartości własne dane eksperymentalne	MP2/B3LYP/IGLO-III:AM1					MP2/ B3LYP/EPR-III:AM1				
			ONIOM					ONIOM				
			g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{oz/soc}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
R1	g_{xx}	2.0043	2.0046	0.2381E-02	0.9176E-04	-0.1731E-03	2.0023	2.0046	0.2387E-02	0.8110E-04	-0.1730E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0038	2.0034	0.1228E-02	0.6765E-04			2.0034	0.1238E-02	0.5562E-04		
	g_{zz}	2.0021	2.0034	0.1238E-02	0.7729E-04			2.0034	0.1238E-02	0.6873E-04		
R2	g_{xx}	2.0038	2.0039	0.1796E-02	0.4474E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0039	0.1754E-02	0.6286E-04	-0.1836E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0032	2.0057	0.3569E-02	0.8493E-04			2.0057	0.3582E-02	0.1736E-04		
	g_{zz}	2.0022	2.0053	0.3118E-02	0.7252E-04			2.0053	0.3081E-02	0.9765E-04		
R3	g_{xx}	2.0040	2.0061	0.3917E-02	0.9086E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0061	0.3909E-02	0.9414E-04	-0.2046E-03	2.0023
	g_{yy}	2.0030	2.0027	0.6089E-02	0.4287E-04			2.0027	0.6196E-02	0.3406E-04		
	g_{zz}	2.0020	2.0069	0.4772E-02	0.9217E-04			2.0069	0.4751E-02	0.9067E-04		

MP2/B3LYP/IGLO-III:AM1					MP2/ B3LYP/EPR-III:AM1				
Pojedynczy rodnik					Pojedynczy rodnik				
g	$\Delta g_{OZ/SOC}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e	g	$\Delta g_{OZ/SOC}$	Δg_{DC}	Δg_{RMC}	g_e
2.0050	0.2772E-02	0.9155E-04	-0.1699E-03	2.0023	2.0050	0.2770E-02	0.8414E-04	-0.1699E-03	2.0023
2.0037	0.1551E-02	0.7637E-04			2.0037	0.1551E-02	0.7334E-04		
2.0022	0.7501E-02	0.4226E-04			2.0022	0.8770E-02	0.2978E-04		
2.0049	0.2744E-02	0.7554E-04	-0.1834E-03	2.0023	2.0049	0.2705E-02	0.7859E-04	-0.1836E-03	2.0023
2.0054	0.3229E-02	0.6861E-04			2.0054	0.3196E-02	0.9168E-04		
2.0046	0.2455E-02	0.4798E-04			2.0046	0.2485E-02	0.4778E-04		
2.0069	0.4798E-02	0.8476E-04	-0.2045E-03	2.0023	2.0069	0.4789E-02	0.8201E-04	-0.2046E-03	2.0023
2.0067	0.4498E-02	0.9732E-04			2.0066	0.4487E-02	0.9185E-04		
2.0021	0.5204E-02	0.5018E-04			2.0021	0.9092E-02	0.4557E-04		

Dane eksperymentalne zostały zaczerpnięte z pracy [42] oraz [108].

Załącznik 2

Tabela 1 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu l-alaniny, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych.

Oznaczenia atomów cząsteczki l-alaniny w rzeczywistym układzie molekularnym i wartości doświadczalne δ_{iso} [ppm]		Oznaczenia sprzężenia spin-spin w rzeczywistym układzie molekularnym l-alaniny i wartości doświadczalne J_K^{iso} [Hz]		Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny		Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny		HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				HF/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM			
								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
								J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
$\text{H}_3\text{-H}_\alpha$	1.46	$^3J_{\text{H}_3,\text{H}_\alpha}$	7.25	1H, 4H, 5H – 7H	$^3J_{(1,4,5),\text{H}(7)\text{H}}$	8.528	0.273	30.636	0.701	8.225	0.263	30.817	0.620		
$\text{H}_3\text{-C}_3$	1.46	$^1J_{\text{H}_3,\text{C}_3}$	130	1H, 4H, 5H – 2C	$^1J_{(1,4,5)\text{H},(2)\text{C}}$	139.271	17.111	30.636	0.701	135.208	17.231	30.817	0.620		
$\text{H}_\alpha\text{-H}_3$	3.76	$^3J_{\text{H}_\alpha,\text{H}_3}$	7.25	7H - 1H, 4H, 5H	$^3J_{(7)\text{H},(1,4,5)\text{H}}$	8.528	0.273	26.065	5.272	8.225	0.263	26.467	4.970		
$\text{H}_\alpha\text{-C}_\alpha$	3.76	$^1J_{\text{H}_\alpha,\text{C}_\alpha}$	145	7H -3C	$^1J_{(7)\text{H},(3)\text{C}}$	149.51	19.005	26.065	5.272	149.157	19.008	26.467	4.970		

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM				HF/B3LYP/pcJ-n CPCM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				HF/B3LYP/ pcJ-n IEF-PCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
7.844	0.251	30.386	0.966	7.508	0.240	30.480	0.978	7.839	0.251	30.385	0.967	7.504	0.240	30.480	1.002
135.993	17.331	30.386	0.966	136.654	17.414	30.480	0.978	135.995	17.331	30.385	0.967	136.655	17.415	30.480	1.002
7.844	0.251	27.743	3.609	7.508	0.240	28.146	3.312	7.839	0.251	27.745	3.607	7.504	0.240	28.148	3.334
154.812	19.727	27.743	3.609	153.584	19.572	28.146	3.312	154.809	19.729	27.745	3.607	153.589	19.573	28.148	3.334

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				DFT/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM				DFT/B3LYP/pcJ-n CPCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
8.470	0.271	30.226	2.757	8.295	0.266	30.339	3.000	7.933	0.254	30.018	1.037	7.611	0.244	30.125	1.131
135.957	17.326	30.226	2.757	135.156	17.224	30.339	3.000	137.447	17.516	30.018	1.037	138.280	17.892	30.125	1.131
8.470	0.271	25.711	7.272	8.295	0.266	26.142	5.366	7.933	0.254	27.398	3.657	7.611	0.244	27.759	3.497
151.844	19.351	25.711	7.272	151.301	19.281	26.142	5.366	153.449	19.555	27.398	3.657	152.597	19.447	27.759	3.497

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				DFT/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM				MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				MP2/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
7.933	0.254	30.019	1.036	6.748	0.244	30.125	1.043	8.701	0.279	30.321	0.735	8.394	0.270	32.078	0.619
137.503	17.523	30.019	1.036	138.325	17.628	30.125	1.043	135.535	17.606	30.321	0.735	136.527	17.400	32.078	0.619
7.933	0.254	27.397	3.658	6.748	0.244	27.763	3.405	8.701	0.279	25.683	5.373	8.394	0.270	27.919	4.778
154.177	19.648	27.397	3.658	156.280	19.534	27.763	3.405	151.196	19.268	25.683	5.373	151.015	19.245	27.919	4.778

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM				MP2/B3LYP/pcJ-n CPCM				MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				MP2/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
7.913	0.254	30.129	0.972	7.57	0.242	30.206	1.000	7.915	0.254	30.130	0.971	7.572	0.243	30.207	1.002
137.483	17.523	30.129	0.972	138.168	17.608	30.206	1.000	137.491	17.521	30.130	0.971	138.161	17.607	30.207	1.002
7.913	0.254	27.490	3.611	7.57	0.242	27.907	3.299	7.915	0.254	27.492	3.609	7.572	0.243	27.910	3.299
160.288	20.427	27.490	3.611	159.086	20.274	27.907	3.299	160.335	20.433	27.492	3.609	159.133	20.280	27.910	3.299

Tabela 2 Wyniki obliczeń parametrów ^1H NMR dla wodnego roztworu kwasu pirogronowego, wykonanych metoda DFT z funkcjonalem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach CPCM i IEF-PCM.

Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, roztworu wodnego kwasu pirogronowego i wartości doświadczalne przesunięcia chemicznego δ_{iso} [ppm]		Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, wodnego roztworu kwasu pirogronowego	HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				HF/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM			
			Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
			J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
1H, 4H, 5H – 2C	-	$^1\text{J}_{(1,4,5)\text{H},(2)\text{C}}$	131.973	16.819	29.490	1.847	131.511	16.760	29.600	1.837	137.180	17.482	29.333	2.019
30H - 1H, 4H, 5H	-	$^5\text{J}_{(30)\text{H},(1,4,5)\text{H}}$	-1.773	-0.057	21.514	9.823	-1.830	-0.059	21.647	9.79	0.067	0.003	21.972	9.38
1H - 5H	2.354	$^2\text{J}_{(1)\text{H},(5)\text{H}}$	-9.916	-0.318	28.980	2.357	-9.937	-0.319	29.070	2.367	-13.034	-0.418	29.879	1.473
4H -5H	2.354	$^2\text{J}_{(4)\text{H},(5)\text{H}}$	-10.897	-0.349	28.980	2.357	-12.801	-0.347	29.085	2.352	-12.943	-0.415	29.879	1.473

HF/B3LYP/pcJ-n CPCM				HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				HF/B3LYP/ pcJ-n IEF-PCM				DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
136.738	17.425	29.429	1.923	150.296	19.153	28.118	3.340	149.800	19.091	28.279	3.203	160.531	20.458	29.072	3.911
-0.190	-0.001	22.190	9.162	0.519	0.017	20.955	10.50	0.379	0.012	21.050	10.43	7.937	0.254	20.070	12.913
-13.009	-0.417	29.959	1.393	-31.126	-0.998	28.656	2.802	-30.816	-0.988	28.726	2.756	-17.402	-0.558	28.609	4.374
-12.924	-0.414	29.959	1.393	-14.834	-0.475	28.656	2.802	-14.983	-0.480	28.726	2.756	-18.994	-0.609	28.534	4.449

DFT/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM				DFT/B3LYP/pcJ-n CPCM				DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
159.845	20.370	29.187	3.938	138.864	17.697	28.902	2.153	138.208	17.613	28.990	2.065	138.825	17.692	28.716	2.540
7.884	0.397	20.250	12.88	0.050	0.002	20.869	10.19	-0.033	-0.001	21.135	9.920	0.024	0.001	20.955	10.30
-17.443	-0.559	28.708	4.417	-13.014	-0.417	29.402	1.653	-13.005	-0.417	29.482	1.573	-13.108	-0.420	29.375	1.881
-18.922	-0.606	28.647	4.478	-12.904	-0.414	29.402	1.653	-12.901	-0.413	29.482	1.573	-13.119	-0.420	29.375	1.881

DFT/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM				MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM				MP2/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM				MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
138.217	17.614	29.002	2.166	162.352	20.690	29.069	1.987	161.699	20.619	29.185	3.512	139.094	17.726	28.934	2.167
-0.053	-0.002	21.308	9.860	7.626	0.244	20.663	10.393	7.575	0.243	20.837	11.86	0.052	0.002	21.164	9.937
-13.100	-0.420	29.436	1.732	-18.053	-0.579	28.641	2.415	-18.089	-0.580	28.735	3.962	-12.747	-0.409	29.433	1.668
-13.111	-0.420	29.436	1.732	-18.797	-0.602	28.466	2.590	-18.750	-0.601	28.590	4.107	-12.824	-0.411	29.433	1.668

MP2/B3LYP/pcJ-n CPCM				MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM				MP2/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM			
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]		Przesunięcie chemiczne [ppm]	
J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}	J_K^{iso}	K_K^{iso}	σ_K^{iso}	δ_{iso}
138.472	17.647	29.034	2.067	139.094	17.726	28.934	2.272	138.472	17.647	29.034	2.175
-0.029	-0.001	21.438	9.663	0.052	0.002	21.170	10.036	-0.029	-0.001	21.444	9.765
-12.750	-0.409	29.512	1.589	-12.821	-0.411	29.432	1.774	-12.829	-0.411	29.511	1.698
-12.822	-0.411	29.512	1.589	-12.740	-0.408	29.432	1.774	-12.743	-0.408	29.511	1.698

Tabela 3 Wyniki obliczeń, składników J_K^{iso} i K_K^{iso} dla wodnego roztworu l-alaniny, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych .

Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny	Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM roztworu wodnego l-alaniny	HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM								HF/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM							
		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
		J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
1H, 4H, 5H – 7H	$^3J_{(1,4,5),H(7)H}$	8.142	0.261	0.061	0.002	0.841	0.027	-0.871	-0.017	7.856	0.252	0.061	0.002	0.823	0.026	-0.515	-0.017
1H, 4H, 5H – 2C	$^1J_{(1,4,5)H,(2)C}$	132.284	16.858	0.067	0.009	1.101	0.140	0.819	0.104	133.075	16.960	0.216	0.009	1.088	0.139	0.829	0.106
7H - 1H, 4H, 5H	$^3J_{(7)H,(1,4,5)H}$	8.142	0.261	0.061	0.002	0.841	0.027	-0.871	-0.017	7.856	0.252	0.061	0.002	0.823	0.026	-0.515	-0.017
7H -3C	$^1J_{(7)H,(3)C}$	148.208	18.887	0.136	0.017	-0.269	-0.034	0.075	0.183	147.623	18.813	0.299	0.038	-0.208	-0.026	0.075	0.184

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								HF/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.841	0.251	0.067	0.002	0.247	0.033	-0.909	-0.029	7.512	0.241	0.070	0.002	1.031	0.033	-0.035	-0.029
134.206	17.103	0.065	0.008	3.819	0.132	0.691	0.088	134.713	17.168	0.213	0.027	1.027	0.131	0.089	0.089
7.841	0.251	0.067	0.002	0.247	0.033	-0.909	-0.029	7.512	0.241	0.070	0.002	1.031	0.033	-0.035	-0.029
153.805	19.601	0.070	0.009	-0.212	-0.027	1.137	0.145	152.379	19.419	0.215	0.027	-0.160	-0.020	0.146	0.146

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								HF/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.836	0.251	0.067	0.002	1.042	0.033	-0.910	-0.029	7.508	0.241	0.070	0.002	1.031	0.033	-0.908	-0.035
134.207	17.103	0.065	0.008	1.032	0.132	0.691	0.088	134.715	17.168	0.213	0.027	1.027	0.131	0.701	0.089
7.836	0.251	0.067	0.002	1.042	0.033	-0.910	-0.029	7.508	0.241	0.070	0.002	1.031	0.033	-0.908	-0.035
153.815	19.602	0.070	0.009	-0.213	-0.027	1.137	0.145	152.384	19.420	0.215	0.027	-0.159	-0.020	0.115	0.146

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM								DFT/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
8.093	0.259	0.075	0.002	0.848	0.027	-0.524	-0.017	7.938	0.254	0.052	0.002	0.830	0.027	-0.525	-0.017
134.030	17.081	0.050	0.006	1.085	0.138	0.791	0.101	133.084	16.960	0.192	0.025	1.079	0.137	0.800	0.102
8.093	0.259	0.075	0.002	0.848	0.027	-0.524	-0.017	7.938	0.254	0.052	0.002	0.830	0.027	-0.525	-0.017
150.575	19.189	0.131	0.017	-0.249	-0.032	1.388	0.177	149.798	19.090	0.285	0.036	-0.178	-0.023	1.395	0.178

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								DFT/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.930	0.254	0.066	0.002	1.015	0.033	-1.078	-0.035	7.616	0.244	0.067	0.002	1.003	0.032	-1.077	-0.035
135.715	17.295	0.044	0.006	1.022	0.130	0.666	0.084	136.400	17.383	0.187	0.024	1.019	0.130	0.674	0.086
7.930	0.254	0.066	0.002	1.015	0.033	-1.078	-0.035	7.616	0.244	0.067	0.002	1.003	0.032	-1.077	-0.035
152.473	19.431	0.043	0.006	-0.151	-0.19	1.084	0.138	151.411	19.296	0.179	0.023	-0.086	-0.011	1.092	0.139

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								DFT/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.933	0.254	0.066	0.002	1.016	0.033	-1.079	-0.035	7.617	0.244	0.070	0.004	1.004	0.032	-0.263	-0.035
135.774	17.303	0.045	0.006	1.019	0.130	0.665	0.085	136.448	17.389	0.188	0.024	1.015	0.129	0.675	0.086
7.933	0.254	0.066	0.002	1.016	0.033	-1.079	-0.035	7.617	0.244	0.070	0.004	1.004	0.032	-0.263	-0.035
153.207	19.525	0.048	0.006	-0.160	-0.020	1.083	0.138	152.101	19.384	0.183	0.023	-0.097	-0.012	1.092	0.139

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM								MP2/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
8.316	0.267	0.057	0.002	0.843	0.027	-0.516	-0.017	8.027	0.257	0.057	0.002	0.825	0.026	-0.516	-0.017
133.603	17.026	0.047	0.006	1.081	0.138	0.803	0.102	134.452	17.134	0.190	0.024	-0.017	0.137	0.812	0.104
8.316	0.267	0.057	0.002	0.843	0.027	-0.516	-0.017	8.027	0.257	0.057	0.002	0.825	0.026	-0.516	-0.017
149.918	19.105	0.116	0.015	-0.250	-0.032	1.412	0.180	149.506	19.053	0.271	0.034	0.18	-0.023	1.420	0.181

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								MP2/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.912	0.254	0.065	0.002	1.043	0.033	-1.107	-0.035	7.577	0.243	0.068	0.002	1.032	0.033	-1.106	-0.035
135.772	17.303	0.044	0.006	1.004	0.128	0.679	0.086	136.290	17.369	0.188	0.024	1.003	0.128	0.688	0.088
7.912	0.254	0.065	0.002	1.043	0.033	-1.107	-0.035	7.577	0.243	0.068	0.002	1.032	0.033	-1.106	-0.035
159.352	20.308	0.062	0.008	-0.235	-0.03	1.109	0.141	157.949	20.129	0.199	0.025	-0.182	-0.023	1.121	0.143

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								MP2/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
7.914	0.254	0.065	0.010	1.044	0.033	-1.107	-0.035	7.577	0.243	0.068	0.002	1.032	0.033	-1.106	-0.035
135.764	17.302	0.044	0.006	1.004	0.128	0.679	0.086	136.290	17.369	0.188	0.024	1.003	0.128	0.688	0.087
7.914	0.254	0.065	0.010	1.044	0.033	-1.107	-0.035	7.577	0.243	0.068	0.002	1.032	0.033	-1.106	-0.035
159.339	20.314	0.625	0.008	-0.235	-0.030	1.109	0.141	157.949	20.129	0.199	0.025	-0.182	-0.023	0.112	0.143

Tabela 4 Wyniki obliczeń, składników J_K^{iso} i K_K^{iso} dla wodnego roztworu kwasu pirogronowego, wykonanych metoda DFT z funkcjonałem B3LYP dla modeli ONIOM i modeli ciągłych: CPCM i IEF-PCM. Optymalizację geometrii przeprowadzono metodami HF:HF, DFT:HF i MP2:HF w modelach ONIOM oraz metodami HF, DFT, MP2 w modelach ciągłych .

Oznaczenia atomów w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, roztworu wodnego kwasu pirogronowego	Oznaczenia sprzężenia spin-spin w modelu ONIOM, CPCM i IEF-PCM, wodnego roztworu kwasu pirogronowego	HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF/3-21g ONIOM								HF/B3LYP/pcJ-n:HF/3-21g ONIOM							
		Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
		J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
1H, 4H, 5H – 2C	$^1J_{(1,4,5)H,(2)C}$	129.986	16.565	0.060	0.008	1.094	0.139	0.833	0.106	129.361	16.486	0.216	0.028	1.092	0.139	0.842	0.107
30H - 1H, 4H,5H	$^5J_{(30)H,(1,4,5)H}$	-2.043	-0.065	0.020	0.001	0.624	0.020	-0.374	-0.012	-2.047	-0.066	0.020	0.001	0.569	0.018	-0.372	-0.012
1H - 5H	$^2J_{(1)H,(5)H}$	-10.620	-0.340	0.306	0.010	2.887	0.093	-2.489	-0.080	-10.457	-0.335	0.167	0.005	2.842	0.911	-2.490	-0.080
4H -5H	$^2J_{(4)H,(5)H}$	-11.735	-0.376	0.294	0.009	2.868	0.092	-2.330	-0.075	-11.460	-0.367	0.151	0.005	2.817	0.090	-2.327	-0.075

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								HF/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
135.360	17.250	0.052	0.007	1.084	0.138	0.684	0.087	134.755	17.173	0.209	0.027	1.081	0.138	0.693	0.088
0.104	0.003	0.002	0.0001	1.244	0.040	-1.284	-0.041	0.100	0.003	0.003	0.0001	1.160	0.037	-1.282	-0.041
-13.511	-0.433	0.321	0.010	2.931	0.094	-2.774	-0.089	-13.299	-0.426	0.183	0.006	2.882	0.092	-2.775	-0.089
-13.420	-0.430	0.320	0.010	2.932	0.094	-2.776	-0.089	-13.212	-0.423	0.183	0.006	2.883	0.092	-2.777	-0.090

HF/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								HF/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
148.764	12.044	0.054	0.007	0.768	0.098	0.710	0.090	134.755	17.173	0.209	0.027	1.081	0.138	0.693	0.088
0.515	0.017	0.038	0.001	1.244	0.040	-1.278	-0.041	0.100	0.003	0.003	0.0001	1.160	0.037	-1.282	-0.041
-31.525	-1.010	0.269	0.009	2.625	0.084	-2.495	-0.080	-13.299	-0.426	0.183	0.006	2.882	0.092	-2.776	-0.089
-15.424	-0.494	0.458	0.015	2.724	0.087	-2.562	-0.083	-13.212	-0.423	0.183	0.006	2.883	0.092	-2.777	-0.089

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF/3-21g ONIOM								DFT/B3LYP/pcJ-n:HF/3-21g ONIOM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
136.628	17.412	-0.330	-0.042	1.131	0.144	0.921	0.117	157.744	20.103	0.223	0.028	1.058	0.135	0.820	0.104
1.248	0.040	-0.054	-0.002	0.137	0.004	-0.265	-0.008	7.807	0.250	-0.127	-0.004	0.505	0.016	-0.300	-0.010
-27.133	-0.870	0.530	0.017	0.953	0.031	-2.158	-0.069	-17.944	-0.575	0.161	0.005	2.759	0.088	-2.419	-0.078
-28.382	-0.910	0.515	0.017	0.907	0.029	-2.011	-0.064	-19.596	-0.628	0.188	0.006	2.759	0.088	-2.273	-0.073

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								DFT/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
137.120	17.474	0.030	0.004	1.055	0.134	0.660	0.084	136.303	17.370	0.180	0.023	1.056	0.135	0.668	0.085
0.085	0.003	0.003	0.0001	1.184	0.038	-1.222	-0.039	0.083	0.003	0.004	0.0001	1.102	0.035	-1.220	-0.039
-13.471	-0.432	0.313	0.010	2.841	0.091	-0.270	-0.086	-13.276	-0.426	0.180	0.006	2.792	0.089	-2.700	-0.087
-13.360	-0.428	0.312	0.010	2.844	0.091	-0.270	-0.087	-13.171	-0.422	0.180	0.006	2.794	0.089	-2.703	-0.087

DFT/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								DFT/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
137.078	17.469	0.029	0.004	1.060	0.135	0.658	0.084	136.313	17.372	0.179	0.023	1.059	0.135	0.666	0.085
0.059	0.002	0.004	0.0001	1.153	0.037	-1.191	-0.038	0.056	0.002	0.006	0.0002	1.073	0.034	-1.186	-0.038
-13.562	-0.435	0.312	0.010	2.856	0.092	-2.715	-0.087	-13.368	-0.428	0.179	0.006	2.806	0.090	-2.717	-0.087
-13.573	-0.435	0.312	0.010	2.856	0.092	-2.715	-0.087	-13.378	-0.429	0.179	0.006	2.806	0.090	-2.718	-0.087

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J:HF ONIOM								MP2/B3LYP/pcJ-n:HF ONIOM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
160.402	20.441	0.080	0.010	1.050	0.134	0.821	0.105	159.589	20.338	0.231	0.029	1.050	0.134	0.830	0.106
7.502	0.241	-0.136	-0.003	0.533	0.017	-0.272	0.005	7.948	0.240	-0.136	-0.004	0.483	0.016	-0.270	-0.009
-18.740	-0.601	0.294	0.009	2.811	0.090	-2.419	-0.078	-18.596	-0.596	0.158	0.005	2.768	0.089	-2.420	-0.078
-19.676	-0.631	0.330	0.011	2.827	0.091	-2.277	-0.073	-19.438	-0.623	0.189	0.006	2.779	0.089	-2.280	-0.073

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J CPCM								MP2/B3LYP/pcJ-n CPCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
137.346	17.503	0.033	0.004	1.048	0.133	0.666	0.085	136.564	17.404	11.753	0.024	1.049	0.134	0.675	0.086
0.088	0.003	0.003	0.0001	1.181	0.038	-1.219	-0.039	0.084	0.003	0.004	0.0001	1.099	0.035	-1.217	-0.039
-13.201	-0.423	0.310	0.01	2.860	0.092	-2.716	-0.087	-13.019	-0.417	17.541	0.006	2.813	0.090	-2.719	-0.087
-13.278	-0.426	0.310	0.01	2.859	0.092	-2.715	-0.087	-13.092	-0.419	17.576	0.006	2.811	0.090	-2.717	-0.087

MP2/B3LYP/aug-cc-pVTZ-J IEF-PCM								MP2/B3LYP/pcJ-n IEF-PCM							
Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]								Wartość sprzężenia spin-spin w [Hz]							
J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)	J_K^{iso} (FC)	K_K^{iso} (FC)	J_K^{iso} (SD)	K_K^{iso} (SD)	J_K^{iso} (PSO)	K_K^{iso} (PSO)	J_K^{iso} (DSO)	K_K^{iso} (DSO)
137.346	17.503	0.033	0.004	1.048	0.134	0.666	0.085	136.564	17.404	0.185	0.024	0.320	0.134	0.675	0.086
0.087	0.003	0.003	0.0002	1.180	0.038	-1.219	-0.039	0.084	0.003	0.004	0.0001	1.099	0.035	-1.217	-0.039
-13.285	-0.426	0.310	0.010	2.859	0.092	-2.715	-0.087	-13.099	-0.420	0.176	0.006	2.811	0.090	-2.717	-0.087
-13.194	-0.423	0.310	0.010	2.860	0.092	-2.717	-0.087	-13.012	-0.417	0.175	0.006	2.813	0.090	-2.719	-0.087