

**Justyna Łoch, Anna Michońska, Rafał Kurczab\***

Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Tarnowie, Instytut Matematyczno-Przyrodniczy  
State Higher Vocational School in Tarnow, Institute of Mathematical and Natural Science,  
Poland

\*corresponding author: r\_kurczab@pwszstar.edu.pl

# **Badanie wpływu promieniowania UV oraz temperatury na degradację preparatów farmaceutycznych zawierających aspirynę metodami spektroskopii FTIR i chemometrycznymi**

Study of the influence of the UV radiation  
and temperature on the degradation of  
pharmaceutical formulations containing  
aspirin using FTIR spectroscopy and  
chemometrics

## Streszczenie

**Wstęp:** Promieniowanie UV oraz temperatura to dobrze znane czynniki, które destrukcyjnie wpływają na stabilność chemiczną produktów spożywczych i farmaceutycznych. W szczególności ekspozycja na promieniowanie UV może powodować degradację substancji chemicznych i tym samym prowadzić do obniżenia jakości substancji czynnej oraz co gorsze powodować powstawanie produktów szkodliwych dla zdrowia.

**Materiał i metody:** W niniejszej pracy zbadano wpływ ekspozycji na promieniowanie UV i podwyższoną temperaturę sześciu produktów farmaceutycznych zawierających aspirynę. Do mierzenia zmian zachodzących w trakcie ekspozycji użyto spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) połączonej z metodami chemometrycznymi, tj. analizą czynników głównych (PCA) oraz analizą skupień (CA). Dodatkowym badanym czynnikiem był wpływ otoczki tabletki oraz czas ekspozycji na stopień zmian w składzie preparatu. Wyniki pokazały, że zarówno temperatura jak i promieniowanie UV wpływają w zasadniczy sposób na zmianę składu preparatów farmaceutycznych, przy czym zależy to istotnie od długości ekspozycji oraz obecności warstwy osłonowej leku. Większe zmiany w składzie preparatów zaobserwowano dla przypadków dłuższej ekspozycji na czynniki degradujące oraz braku otoczki. Zastosowana metodologia może zostać z powodzeniem zastosowana jako szybka metoda kontroli jakości przechowywanych produktów farmaceutycznych.

**Słowa kluczowe:** spektroskopia FTIR, chemometria, analiza czynników głównych, analiza skupień, aspiryna, postarzenie UV

## Abstract

The UV radiation and temperature are well-known external factors, which adversely affect the chemical stability of food, pharmaceuticals and various construction materials. In particular, the exposure to UV radiation may cause degradation of chemical substances and thus lead to reduced strength, the content of active substance or also to the formation of harmful substances for health.

In the present study, the effect of exposure to UV radiation and increased temperature of six pharmaceutical products containing aspirin were investigated. To measure the changes occurring during exposure, the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with chemometrics methods, i.e. principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were used. An additional examined factor was the impact of tablet coating and exposure time on the degree of change in the chemical composition of the pharmaceutical products. The results showed that both the temperature and UV radiation influenced significantly the composition of pharmaceutical formulations, which vary considerably depending on the exposure time and the presence of covering layer of the drug. More substantial changes in the composition of the tablets were observed for longer exposure to the degrading factors and lack of covering. The methodology can be successfully used as a quick quality control of

stored pharmaceutical products.

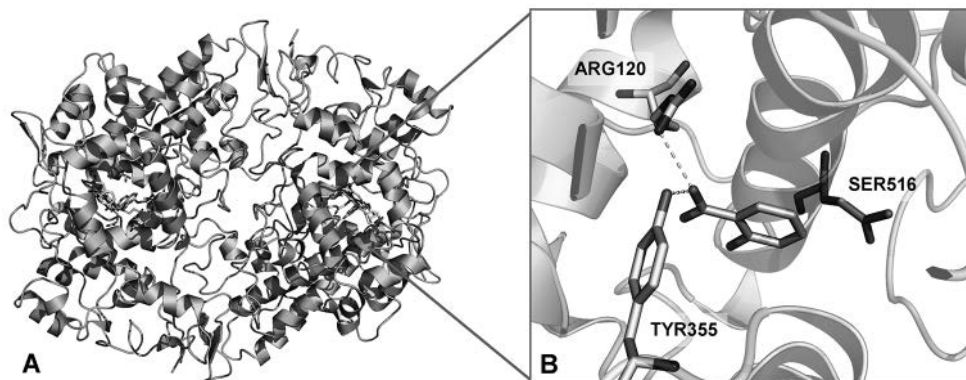
**Keywords:** FTIR spectroscopy, chemometrics, principal component analysis, cluster analysis, aspirin, UV ageing

## Wstęp

Promieniowanie UV oraz temperatura to czynniki, które destrukcyjnie wpływają na stabilność chemiczną produktów spożywczych [1] i farmaceutycznych [2]. Ekspozycja na promieniowanie UV może indukować ciąg przemian chemicznych prowadzących do obniżenia jakości substancji czynnej oraz co gorsze powodować powstawanie produktów szkodliwych dla zdrowia.

Produkty lecznicze mają bardziej lub mniej złożony skład chemiczny oraz różnorodną budowę chemiczną. Spotykamy leki, które składają się z jednego pierwiastka, z prostego związku nieorganicznego, a także takie złożone z mieszaniny skomplikowanych związków organicznych. W dzisiejszych czasach jest duże zapotrzebowanie na produkty lecznicze, dlatego firmy farmaceutyczne tworzą coraz nowsze, syntetycznie wytwarzane preparaty, a odchodzą od leków pochodzenia naturalnego, głównie z powodów ekonomicznych.

Aspiryna (znana także jako kwas acetylosalicylowy) stosowana w celach leczniczych była już w starożytności, ale produkowana i sprzedawana jest dopiero od roku 1899. Jej działanie łączy się ze zwalczaniem bólu, który jest efektem tworzenia prostaglandyn z kwasu arachidonowego przez enzym znany jako cyklooksygenaza (Rysunek 1A) [3]. Aspiryna wprowadzona do organizmu ulega przy pomocy enzymów trawiennych lub samoistnie hydrolizie do grupy acylowej i reszty kwasu salicylowego. Grupa acylowa powoduje nieodwracalną acetylację seryny w miejscu aktywnym cyklooksygenazy (Rysunek 1B), a cząsteczka kwasu salicylowego blokuje (inhibicja) miejsce aktywnego enzymu, co w rezultacie powoduje zablokowanie produkcji prostaglandyny i uśmierzanie bólu. Aspiryna oprócz działania przeciwbólowego stosowana jest przeciwgorączkowo, przeciwreumatycznie, przeciwzapalnie i w chorobach układu krążenia [4, 5]. Z jednej strony długotrwałe jej stosowanie może uszkodzić błonę śluzową żołądka i powodować krwawienia z przewodu pokarmowego oraz do mózgu [6], ale z drugiej może zmniejszać częstość występowania nowotworów [7].



**Rysunek 1.** Dimer cyklooksygenazy-1 (PDB ID: 1pth, COX-1) z zaznaczonym miejscem aktywnym (A). Schemat blokowania miejsca aktywnego COX-1 przez zdeacetylowaną formę aspiryny, liniami przerywanymi zaznaczono kluczowe wiązania wodorowe z ARG120 i TYR355 (B)

Chemometria to dziedzina nauki, która wykorzystuje metody komputerowe i matematyczne, statystykę, rachunek prawdopodobieństwa do analizy danych wielowymiarowych dostarczanych przez np. nowoczesne techniki pomiarowe w chemii lub fizyce [9]. Chemometria jest szeroko wykorzystywana m.in. w farmaceutyce [8], ochronie środowiska [10-13], w przemyśle spożywczym [14] i petrochemicznym. Metody chemometryczne możemy podzielić na metody z nadzorem (nauczycielem, z ang. supervised), które wykorzystuje się do badania zagadnień klasyfikacji, regresji oraz predykcji. Drugą grupę stanowią metody bez nadzoru (bez nauczyciela, z ang. unsupervised), które nie wymagają wiedzy *a priori* dotyczącej przynależności obiektów do danej kategorii. Mają one za zadanie w oparciu o zbiór zmiennych ułatwić zidentyfikowanie grup obiektów o podobnych cechach (właściwościach) lub wykrycie próbek znacznie różniących się od pozostałych. Przykładem technik bez nauczyciela są: analiza głównych składowych (z ang. Principal Component Analysis, PCA), techniki grupowania danych (klastrowania), czy samoorganizujące się mapy Kohonena [15].

Wiele leków dostępnych bez recepty można dziś kupić nie tylko w aptece, ale również w niemal każdym sklepie spożywczym. To powoduje, że kontrola sposobu przechowywania, terminu ważności, czy źródła pochodzenia danego leku jest bardzo mocno ograniczona. Niejednokrotnie, „zwykłe tabletki przeciwbólowe” przebijają się w witrynach sklepowych, wystawione na długotrwałe działanie promieniowania słonecznego oraz ekstremalnych temperatur. Dlatego w niniejszej pracy,

podjęto wstępne badania wpływu najbardziej szkodliwej składowej promieniowania słonecznego (UV) i podwyższonej temperatury na zmiany w składzie chemicznym leków dostępnych bez recepty na przykładzie aspiryny.

## Material i metody

Do badań użyto 6 produktów farmaceutycznych w postaci stałej, zawierających aspirynę, które dostępne są na polskim rynku. Szczegółowa charakterystyka chemiczna użytych preparatów została przedstawiona w Tabeli 1.

**Tabela 1.**

Charakterystyka badanych produktów leczniczych zawierających aspirynę. Informacje dostarczane przez producenta na opakowaniu lub ulotce informacyjnej

Nazwa preparatu (producent)	Substancja czynna	Substancja pomocnicza	Skład otoczki
Salprin (Sun Farm)	500 mg kwasu acetylosalicylowego	skrobia kukurydziana, celuloza mikrokrystaliczna, talk	kwas metakrylowy i akrylan etylu, cytrynian trietylu, powidon, talk, dwutlenek tytanu, żółty tlenek żelaza
Acesan (Sun Farm)	50 mg kwasu acetylosalicylowego	celuloza mikrokrystaliczna, glikolan sodowy skrobi, kwas stearynowy, żółcień chinolinowa, lak	-
Encopirin (Omega Rex S.J.)	325 mg kwasu acetylosalicylowego	skrobia, celuloza mikrokrystaliczna, talk, karboksymetyloskrobia sodowa (typ A)	otoczka Opadry: hypromeloza, dwutlenek tytanu, triacetyna, otoczka ACRYL-EZE: kopolimer kwasu metakrylowego i akrylanu etylu, talk, dwutlenek tytanu, bezwodna krzemionka koloidalna, wodorowęglan sodu, laurylosiarczan sodu, cytrynian trietylu

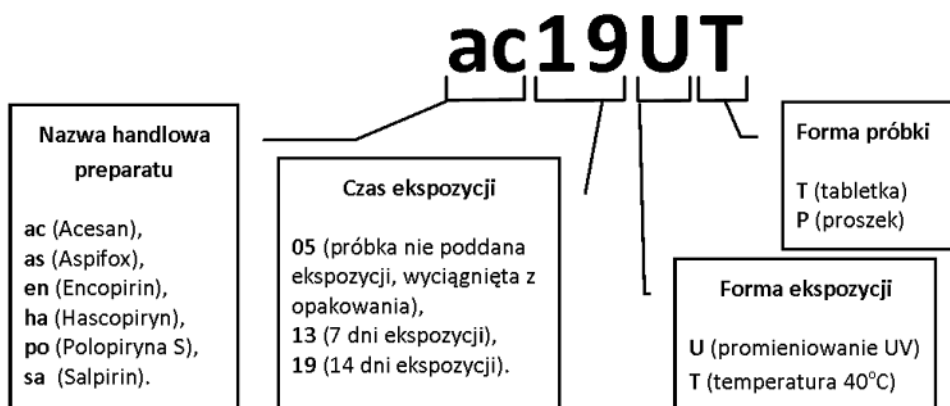
Aspifox (Actavis)	75 mg kwasu acetylosalicylowego	celuloza mikrokrystalicz- na, skrobia kukurydziana, krzemionka koloidalna bezwodna, kwas steary- nowy	akrylan kwasu meta- krylowego i etylu, po- lisorbat 80, laurylosiar- czan sodu, cytrynian trietylu, talk
Hascopiryn (Hasco-Lek)	500 mg kwasu acetylosalicylowego	celuloza mikrokrystaliczna, skrobia kukurydziana żelo- wana, talk	-
Polopiryna S (Polpharma)	300 mg kwasu acetylosalicylowego	skrobia kukurydziana, celu- loza sproszkowana, celu- loza mikrokrystaliczna	-

Dla każdego z badanych preparatów pobrano po 5 tabletek. Pierwszą tabletkę każdego z preparatów roztarto w moździerzu porcelanowym i dla powstałego proszku zarejestrowano widmo FTIR za pomocą spektrofotometru FTIR Thermo Scientific Nicolet iS5 na jedno odbiciowej przystawce ATR (wykonana z selenku cynku). Każde widmo powstało przez uśrednienie 32 skanów, rejestrowanych z rozdzielczością  $2\text{ cm}^{-1}$  w zakresie  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ .

Kolejno, dwie z pobranych wcześniej tabletek umieszczono w suszarce SML firmy ZALMED 30/250 ustawiając temperaturę na  $40^{\circ}\text{C}$ , natomiast kolejne dwie umieszczono pod lampą UV firmy Benefit 29EAB o mocy 18 W. Sproszkowana tabletkę podzielono na dwie części i umieszczono w suszarce i pod lampą UV. Po 7 dniach wyciągnięto po jednej tabletkę danego preparatu z komory naświetlania lampą UV i z suszarki. Tabletki rozdrobniono i zarejestrowano ich widma. Po kolejnych 7 dniach ekspozycji pobrano do analizy pozostałe tabletki badanych preparatów, które roztarto w moździerzu i zarejestrowano ich widma FTIR. Sproszkowane na początku eksperymentu tabletki, zostały wyciągnięte z suszarki i komory naświetlania i również zmierzono ich widma.

Dla każdego widma FTIR wykonano korektę linii bazowej oraz standardową korekcję ATR za pomocą programu OMNIC. Wszystkie otrzymane widma FTIR leków zawierających aspirynę wykorzystano jako dane wejściowe w analizie chemometrycznej, wykonanej przy użyciu biblioteki ChemoSpec [14] dostępnej w programie RStudio [15].

W celu ułatwienia analizy otrzymanych wyników wprowadzono oznaczenia odpowiednich widm próbek na kolejno prezentowanych wykresach (Rysunek 2).

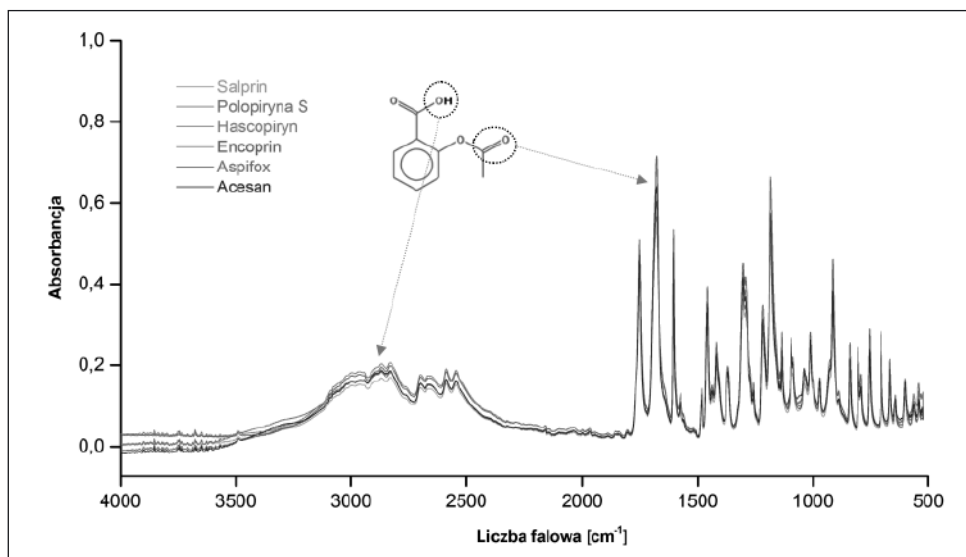


**Rysunek 2.** Schemat tworzenia oznaczeń próbek preparatów farmaceutycznych w wykonanych badaniach

## Wyniki

### Widma absorpcyjne FTIR

Na Rysunku 3. przedstawiono widma FTIR zarejestrowane dla wszystkich użytych w badaniach preparatów zawierających aspirynę. Charakterystyczne drgania dla aspiryny zaznaczono na widmie, tj. drgania rozciągające grupę karbonylową (C=O) przy  $1680\text{ cm}^{-1}$  oraz pasmo w zakresie  $2700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ , pochodzące od drgań rozciągających grupy hydroksylowej (O-H). Ponieważ grupa hydroksylowa zaangażowana jest w tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych (dimerów kwasu acetylosalicylowego), pasmo to jest poszerzone i wykazuje złożoną strukturę [16]. Pomimo, różnej zawartości aspiryny i zróżnicowania w składzie wypełnienia tabletki i otoczki w badanym zestawie preparatów, nie zanotowano istotnych zmian w widmach FTIR.



**Rysunek 3.** Widma FTIR w zakresie długości fali 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  otrzymane dla sześciu dostępnych handlowo produktów farmaceutycznych zawierających aspirynę. Widma otrzymano dla sproszkowanych tabletek, zaraz po wyciągnięciu z oryginalnego opakowania, rysunek wykonano przy użyciu oprogramowania OriginPro 2016. Na rysunku zaznaczono charakterystyczne pasma pochodzące od drgań grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce aspiryny

## Analiza skupień

Jedną z metod podziału otrzymanych widm FTIR na grupy łączące w swoim zakresie najbardziej zbliżone do siebie próbki jest analiza skupień (klastrowanie). Z uwagi na jej wrażliwość na przypadki odstające od pozostałych danych, stosuje się ją we wstępnych etapach analizy chemometrycznej, co pozwala na weryfikację otrzymanego zbioru danych. Wynikiem działania algorytmu analizy skupień (HCA) jest dendrogram (Rysunek 4.), który ilustruje w postaci drzewka zależność podobieństwa (odległości w przestrzeni wielowymiarowej) poszczególnych widm próbek. Uwzględniając punkt odcięcia (średnia odległość mniejsza niż 6,5), widma FTIR badanych próbek podzielono na dwa skupiska. W pierwszym znajdują się preparaty, dla których widma wykonano bezpośrednio po wyjęciu z opakowania oraz tabletki, które przez 7 dni były poddane działaniu temperatury 40°C i promieniowania UV. Pierwszy klaster następnie podzielono jeszcze na dwie podgrupy:

- pierwsza zawierająca trzynaście próbek. Znajdują się w niej wszystkie preparaty, które zostały poddane działaniu temperatury 40°C, dwie próbki poddane działaniu promieniowania UV (Encopirin i Hascopiryn) oraz pięć wzorcowych

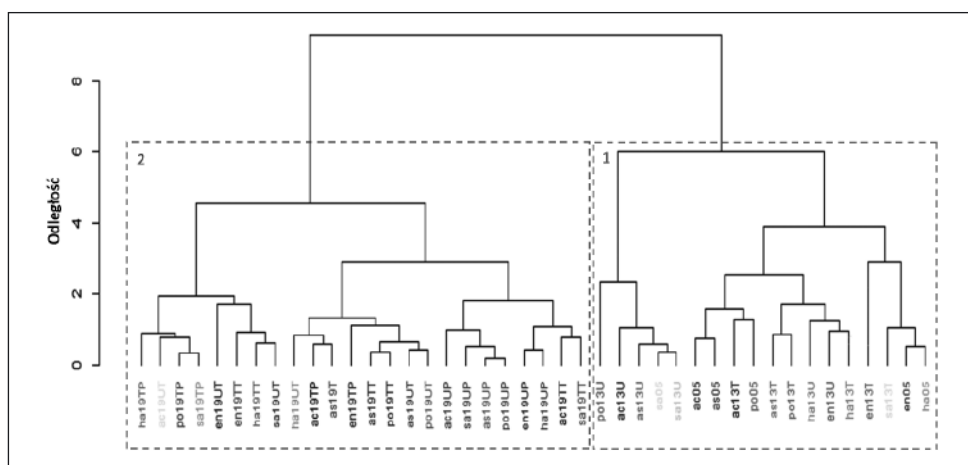


próbek (Acesan, Aspifox, Polopiryna S, Encopirin i Hascopirin),

- druga zawierała pięć próbek. Tylko jedna z nich była próbką wzorcową (Salpirin), pozostałe cztery to próbki naświetlane przez 7 dni lampą UV (Acesan, Aspifox, Salpirin oraz Polopiryna S).

Drugi klastrowanie zawiera tylko te próbki, dla których widma zostały zarejestrowane po 14 dniach ekspozycji na promieniowanie UV i temperaturę 40°C. Wewnątrz tego klastra widoczne są jeszcze dwie istotne podgrupy:

- pierwsza zawiera szesnaście próbek wszystkich leków, które zostały poddane promieniowaniu UV przez 14 dni w postaci proszku oraz cztery pomiary dla tabletek: Aspifoxu, Hascopirynu oraz Polopiryny S.
- cztery pomiary dla tabletek Acesanu, Aspifoxu, Salpirinu oraz Polopiryny S, które poddane były działaniu temperatury 40°C. Ostatnie trzy próbki były w postaci proszku (Acesan, Aspifox oraz Encopirin), które utrzymywano w suszarce w 40°C przez 14 dni.



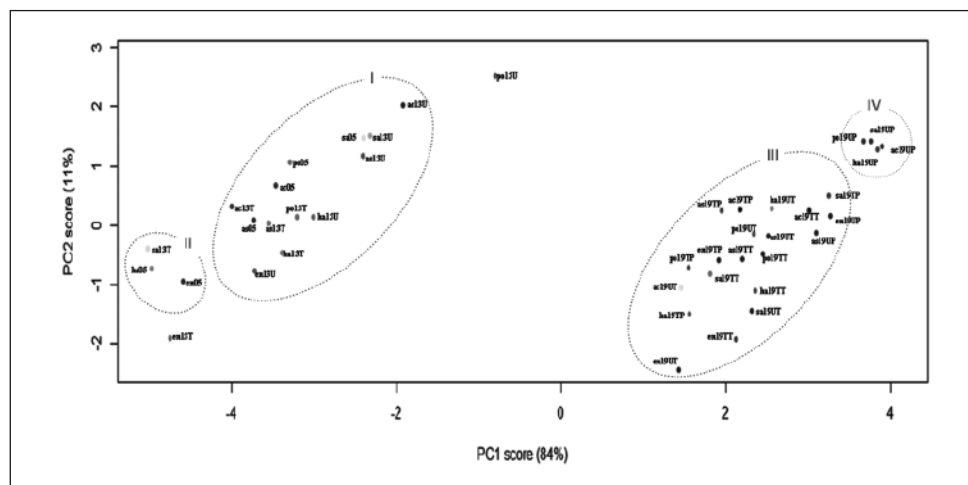
**Rysunek 4.** Wykres klastrowania (grupowania) widm FTIR metodą HCA (Hierarchiczna Analiza Skupień) z uwzględnieniem punktu odcięcia. Do grupowania próbek użyto metody średnich połączeń oraz metryki euklidesowej do pomiaru odległości między próbkami

## Analiza czynników głównych

W celu zobrazowania wzajemnych relacji dla analizowanych preparatów posłużono się inną metodą grupowania – analizą czynników głównych (PCA). Metoda polega na przekształceniu zmiennych opisujących badany układ (w tym przypadku wektor utworzony z wartości absorbancji i indeksowany wartościami liczb falowych) na

zbiór ortogonalnych czynników głównych, co powoduje redukcję wymiaru przestrzeni i tym samym otrzymanie łatwiejszego obrazu korelacji między badanymi próbkami. Redukcja liczby składowych opisujących poszczególne próbki (z 14936 będących wartościami absorbancji w badanym zakresie do kilku będącymi istotnymi składowymi głównymi) pozwala na wizualizację ich wariacji na wykresach rozrzutu.

Na otrzymanym wykresie PCA (Rysunek 5), rozpiętym na dwóch najbardziej istotnych składowych głównych (w sumie obrazują 95% zmienności danych) widoczna jest podobną zależność jak na dendrogramie – dwa dobrze odseparowane skupiska. Preparaty, których widma zarejestrowano bezpośrednio po wyjęciu z opakowania i 7 dni po naświetlaniu lampą UV oraz ekspozycji na temperaturę 40°C zajmują mniej więcej ten sam obszar wykresu (I i II), co oznacza, że mają zbliżony skład. W tym obszarze znajdują się dwie próbki istotnie odbiegające od pozostałych w tym skupisku, jest to próbka Polopiryny S po 7-dniowym naświetlaniu oraz próbka Encopirinu po 7-dniowej ekspozycji na temperaturę 40°C. Drugie skupisko (III i IV), grupuje próbki w postaci tabletek i sproszkowanej, których widma zostały zarejestrowane po 14-dniowej ekspozycji na działanie odpowiednio promieniowania UV oraz temperatury 40°C.



**Rysunek 5.** Wykres PCA. Elipsy obrazują pogrupowanie poszczególnych próbek w skupiska (I-IV)

## Dyskusja

Sprzężenie spektroskopii FTIR z analizą chemometryczną powoduje, że dane wielowymiarowe (wszystkie zmierzone wartości absorpcji dla danych liczb falowych) można przetworzyć w taki sposób, aby zredukować wymiar przestrzeni nie tracąc przy tym żadnych istotnych informacji o wzajemnych relacjach badanych próbek. Pozwala to przedstawić zależności między badanymi próbkami w postaci graficznej, dzięki czemu można łatwo je analizować.

Zarówno metodą klastrowania HCA, jak i analizą czynników głównych uzyskano pogrupowanie badanych próbek na dwa główne skupiska (Rysunek 4. i 5.). W pierwszym klastrze znalazły się próbki badane bezpośrednio po wyjęciu z opakowania (przyjęte jako standardy czystości) oraz po 7 dniach naświetlania i ekspozycji na temperaturę. W drugim klastrze natomiast znalazły się próbki, które były poddane czynnikom destrukcyjnym przez 14 dni. Wykorzystanie dwóch metod analizy danych wielowymiarowych pozwala na wyciągnięcie wielu cennych wniosków na temat zmiany w składzie preparatu po ekspozycji na warunki szkodliwe. Widać, że w czasie pierwszych 7 dni ekspozycji na podwyższoną temperaturę oraz promieniowanie UV nie zauważono zbyt dużych zmian w składzie preparatów. Istotny wpływ na ich stan zależy od tego czy preparat posiada otoczkę ochronną. Polopiryna S wypadła najgorzej w stosunku do pozostałych preparatów, co widoczne jest jej odizolowaniem na wykresach PCA i HCA już po 7 dniach naświetlania. Wydłużenie czasu ekspozycji powoduje istotną zmianę składu, nawet mimo wprowadzanych zabezpieczeń preparatu w postaci otoczki. Zaobserwowano również, że jeśli tabletki danego preparatu została zmielona, to była ona bardziej narażona na zmianę składu niż forma nierozdrobniona.

## Wnioski

Na podstawie wykonanych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- otoczka tabletek nie daje całkowitej ochrony przed działaniem zewnętrznych czynników destrukcyjnych, jak promieniowanie UV lub podwyższona temperatura. Warstwa ochronna preparatu farmaceutycznego, jest jednak tylko dodatkową barierą. Po wielodniowej ekspozycji na promieniowanie UV i podwyż-

- szoną temperaturę skład preparatu może ulec istotnym zmianom,
- wykorzystana kombinacja techniki FTIR oraz chemometrii może posłużyć jako wstępna analiza jakości i trwałości przechowywanych produktów farmaceutycznych,
  - konieczna jest ściślejsza kontrola warunków przechowywania preparatów farmaceutycznych w punktach sprzedaży innych niż apteka.

## Piśmiennictwo

- [1] Koutchma T., Forney L.J., Moraru C.I. Ultraviolet light in food technology: principles and applications. CRC Press, New York, 2009.
- [2] Tonnesen H.H. Photostability of drugs and drugs formulations. CRC Press, New York, 2004.
- [3] Loll P.J., Picot D., Garavito R.M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(8), 637-43.
- [4] Campbell C.L., Smyth S., Montalescot G., Steinhubl S.R. Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease. A systematic review. *JAMA*, 2007, 297(18), 2018-24.
- [5] Brotons C., Benamouzig R., Filipiak K.J., Limmroth V., Borghi C. A systematic review of aspirin in primary prevention: is it time for a new approach? *Am J Cardiovasc Drugs*, 2015, 15 (2), 113-33.
- [6] Czyż M., Watał C. Aspiryna cudowne panaceum? Molekularne działania kwasu acetylosalicylowego w organizmie. *Postepy Hig Med Dosw*, 2005, 59, 105-15.
- [7] Thun M.J., Jacobs E.J., Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncology*, 2012, 9, 259-67.
- [8] PyMOL Molecular Graphics System, <https://sourceforge.net/projects/pymol/>
- [9] Mazerski J. Chemometria w analityce chemicznej. *Analityka: nauka i praktyka*. 2005, 3, 11-4.
- [10] El-Gindy A., Hadad G.M. Chemometrics in pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives. *J AOAC Int*, 2012, 95(3), 609-23.
- [11] Astel A., Mazerski J., Namieśnik J. Rozdział 7. Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach analitycznych, 131-161. W: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. Red. Namieśnik J., Chrzanow-

- ski W., Szpinek P. Wydawca: Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.
- [12] Astel A., Mazerski J., Polkowska Z., Zygmunt B., Namieśnik J. Effect of trans-regional transport of pollutants on atmospheric air quality in the Tricity area of Poland. *Pol J Environ Stud*, 2003, 12, 27-33.
- [13] Mas S., de Juan A., Tauler R., Olivieri A.C., Escandar G.M. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta*, 2010, 80(3), 1052-67.
- [14] Guidetti R., Beghi R., Giovenzana V. *Chemometrics in food technology*. 2012, INTECH Open Access Publisher.
- [15] Stanimirova I., Daszykowski M., Walczak B. *Metody uczenia z nadzorem – kalibracja, dyskryminacja i klasyfikacja*. W: Zuba D., Parczewski A., *Chemometria w analityce*, IES, Kraków, 2008.
- [16] Hanson B.A., *ChemoSpec: Exploratory chemometrics for spectroscopy*. R package version 4.3.17, 2016, <https://github.com/bryanhanson/ChemoSpec>.
- [17] <https://www.rstudio.com/>.
- [18] Boczar M., Boda Ł, Wójcik M.J. Theoretical model for a tetrad of hydrogen bonds and its application to interpretation of infrared spectra of salicylic acid. *J Chem Phys*, 2006, 124, 084306.