

Широкополосные спектры отражения сахаридов в ТГц и ИК диапазонах

© Г.А. Командин^{1,2}, В.С. Ноздрин¹, С.В. Чучупал¹, А.А. Гавдуш^{1,2}, Г.Р. Мусина^{1,2}, И.Е. Спектор¹

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва, Россия

² Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
105005 Москва, Россия

e-mail: gakomandin@mail.ru

Поступила в редакцию 13.01.2022 г.

В окончательной редакции 21.01.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

Проведены измерения спектров отражения чистых однофазных прессованных образцов сахаридов методами когерентной субмиллиметровой, импульсной терагерцовой и широкополосной ИК фурье-спектроскопии, выполнена оценка параметров их полос поглощения по аддитивной модели классического осциллятора. Показана возможность анализа колебательного спектра с коррекцией рассеяния по калибровочным данным видимого и терагерцового диапазонов. Чувствительность и точность данного подхода ограничены низкими величинами коэффициента отражения и, как следствие, малым отношением сигнал/шум, а также несимметричным уширением полос, связанным с ангармонизмом колебаний и перекрытием линий поглощения.

Ключевые слова: широкополосная оптическая спектроскопия, функция диэлектрического отклика, рассеяние, сахариды, микрокристаллические образцы.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52626.24-22

Введение

Анализ колебательных спектров микрокристаллических образцов органических соединений методом ИК спектроскопии затруднен сильным рассеянием излучения в средней ИК области. Именно в этом частотном диапазоне активны большинство основных линий их колебательного спектра. Сахариды являются одним из основных органических соединений, непосредственно вовлеченных в процессы метаболизма. Они участвуют как в энергетических циклах клеток, так и являются структурными элементами для формирования различных клеточных структур. Биоактивность этих соединений определяет их широкое использование в фармакологии, пищевой индустрии, а также биомедицинских исследованиях. Оценка их качества и определение трансформаций состава и структуры при внешних воздействиях, таких как температура и влажность, является востребованной прикладной задачей [1–3]. Известной и активно используемой техникой бесконтактного и неразрушающего определения компонентного состава и структуры органических соединений является широкополосная оптическая спектроскопия [4,5]. Исследования трансформации колебательного спектра сахаридов активно и успешно проводятся с использованием методов терагерцовой (ТГц) спектроскопии [6]. Участок спектра от 0.1 до 3 ТГц имеет свои неоспоримые преимущества, но очевидно недостаточен для полного перекрытия всего колебательного спектра. Большая часть электродипольных колебаний сахаридов приходится на дальний и

средний ИК диапазон, охватывая частотную область вплоть до 150 ТГц.

Таким образом, для изучения изменения характеристик органических материалов, индуцированных внешними воздействиями, актуальным является определение широкополосного референтного колебательного спектра интактного соединения. Для гетерогенных и пористых мелкодисперсных сред ключевой проблемой в спектроскопических исследованиях является искажение экспериментальных спектров вследствие рассеяния излучения. Микрокристаллические образцы как порошкообразные, так и прессованные не пригодны для прямого измерения спектров пропускания в области частот выше 3–4 ТГц. Изготовление проб сахаридов с использованием наполнителей, например, полиэтилена или бромида калия, дает возможность идентифицировать составы по характерным частотам полос поглощения, что является стандартной процедурой в аналитической химии. Однако интенсивности линий поглощения зависят от взаимной концентрации пробы и наполнителя, а также полярных свойств микрокристаллитов, описываемых соотношениями Бруггемана [7] и Лихтенекера [8]. Определение величины диэлектрического вклада $\Delta\epsilon_j$ каждой полосы изучаемого вещества таким методом является многостадийной многопараметрической задачей. Кроме того, необходимо учитывать возможные реакции между пробой и наполнителем, а также разложение самого наполнителя при высокотемпературных измерениях. Эти факторы затрудняют количественный анализ температурной эволюции диэлектрического вклада

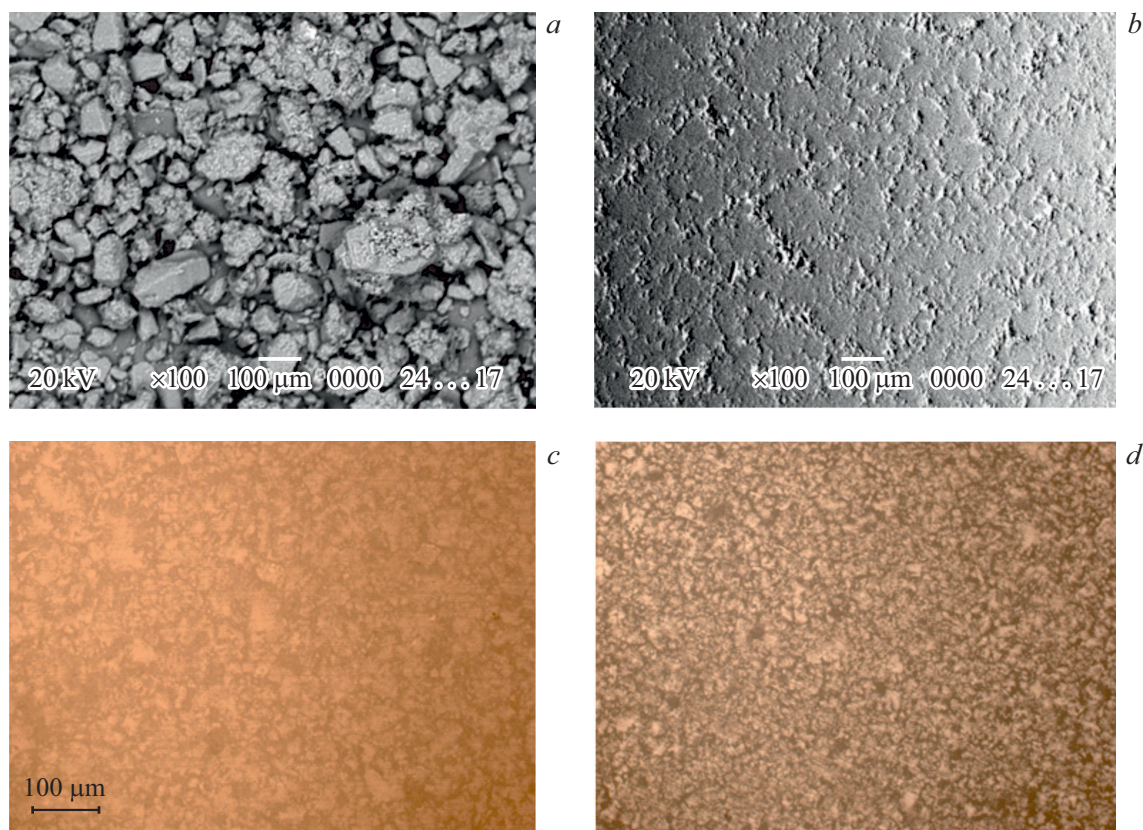


Рис. 1. (а) Изображения исходного порошка альфа-лактозы моногидрата, полученные сканирующим электронным микроскопом (SEM). (b) SEM-изображение поверхности спрессованного образца, (c) и (d) — изображения тонкого образца в режиме пропускания, полученные с помощью оптического микроскопа.

и ширины характерных колебательных полос в спектрах.

Целью нашей работы является изучение спектров отражения однофазных образцов сахаридов для выяснения их применимости для количественного анализа трансформаций молекулярных и фоновых колебаний в частотном диапазоне, полностью охватывающем область существования таких колебаний.

Изготовление и характеристика образцов

Для изготовления образцов использованы микрокристаллические порошки: целлюлоза и α -лактоза моногидрат SuperTab 30GR (DFE Pharma), D(-)-Фруктоза pharma grade (PanReac AppliChem), галактоза $-D(+)$ extra pure (Диаэм) и глюкоза кристаллическая моногидрат (Купавнареактив). Из этих порошков методом прессования гидравлическим прессом (LabTools, Russia) в откачной прессформе (Specas, UK) изготовлены плоскопараллельные образцы диаметром 13 mm с различными толщинами. Усилие прессования составило 20–30 kN. Установлено, что это давление является оптимальным, поскольку при больших усилиях прессования образцы

растрескиваются, а при меньших — не обладают достаточной прочностью и плотностью.

На рис. 1 приведены результаты сканирующей электронной микроскопии исходного порошка и поверхности спрессованного образца. Как следует из рис. 1, а, средний размер кристаллитов составляет 50–100 μm . Неоднородности поверхности спрессованного образца также не превышают 50 μm . Полученные образцы имеют плоскую поверхность, хотя остаются многочисленные дефекты, преимущественно поры, как показано на рис. 1, b. На рис. 1, c и d показана оптическая неоднородность тонкого образца в видимом диапазоне. Для этих измерений был изготовлен образец толщиной 0.3 mm. Изображения получены с использованием оптического микроскопа в прошедшем через образец излучении. Из этих изображений видно, что оптическая плотность образца неоднородна по площади с характерными размерами областей, не превышающими $\sim 100 \mu\text{m}$.

Аттестация образцов методами сканирующей электронной и оптической микроскопии показала, что поверхность образцов плоская, хотя остаются многочисленные дефекты — поры. Для рентгенофазового анализа использованы исходный порошок и два образца, спрессованных при давлениях 15 и 40 kN. Рентгенофазовый анализ показал, что они представляют собой моно-

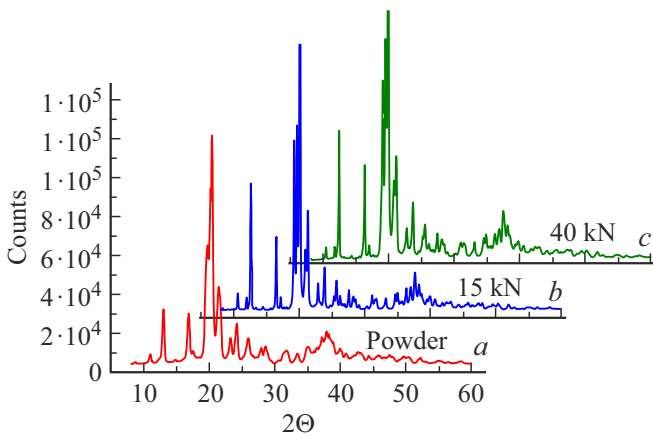


Рис. 2. Дифрактограммы образцов альфа-лактозы моногидрата. (а) Исходный микрокристаллический порошок; (б) образец, спрессованный при давлении 15 kN; (с) образец, спрессованный при давлении 40 kN.

гидрат лактозы состава $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, принадлежащий к моноклинной сингонии, пространственная группа $P2_1$ [9–11]. Как видно из сравнения рентгенограмм, показанных на рис. 2, основное их отличие состоит в ширине рефлексов, что свидетельствует об изменении размеров областей когерентного рассеяния (ОКР) в них.

Экспериментальные исследования и моделирование спектров

В ТГц области частот спектры отражения измерены на лабораторном импульсном спектрометре (Terahertz pulsed spectrometer — TPS) [12]. В стандартную оптическую схему спектрометра были добавлены дополнительные элементы для измерений спектров отражения при нормальном падении излучения на образец, как показано на рис. 3. Таким образом исключено влияние р-поляризованной компоненты излучения на экспериментальные данные.

Использованная схема требует минимальных перестроек оптического тракта спектрометра между измерениями спектров пропускания и отражения. Однако ее недостатком является использование делителя ТГц пучка (2^*), что приводит к снижению сигнала примерно в 4 раза по отношению к исходному за счет двукратного прохождения излучения через делитель. В результате снижается отношение сигнал/шум, отсекаются частотные участки со слабым сигналом, и рабочий диапазон сужается до 0.3–2 ТГц. Все измерения проведены при остаточном давлении в камере спектрометра не более 10^{-2} mbar, что исключило искажение спектров линиями поглощения атмосферной влаги.

Спектры отражения в ИК области спектра измерены с помощью фурье-спектрометра Bruker IFS-113v с разрешением 1 cm^{-1} . Использован комплект параболических и плоских зеркал, обеспечивающих фокусировку ИК

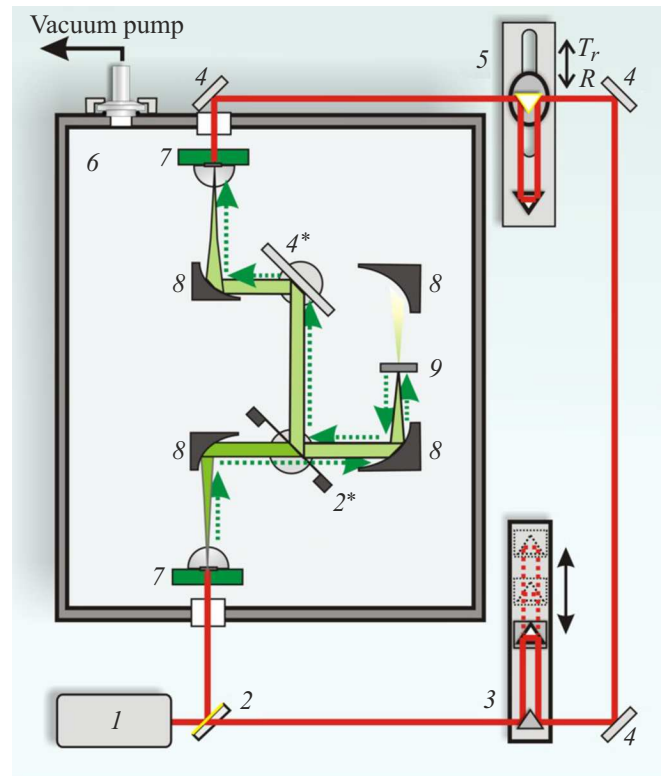


Рис. 3. Схема TPS для измерения спектров отражения при нормальном падении излучения на образец. 1 — фемтосекундный волоконный лазер, 2 — делитель на длину волны 780 нм, 3 — линия задержки, 4 — зеркало, 5 — компенсирующая задержка, 6 — вакуумная камера, 7 — фотопроводящая антенна, 8 — внеосевое параболическое зеркало, 9 — образец, 2^* — тонкопленочный делитель ТГц излучения, 4^* — широкоапертурное плоское зеркало. Элементы 2^* , 4^* , 5 устанавливаются в оптический тракт при измерении спектров отражения.

излучения и его падения на образец под углом, не превышающим 6 градусов к нормали. Для получения референтного спектра отражения использована плоская полированная серебряная пластина. Калибровочные спектры отражения сахаридов в субмиллиметровом диапазоне измерены на когерентном квазимонохроматическом спектрометре с генератором излучения на основе лампы обратной волны [13].

Расчет модельных спектров отражения

$$R = \frac{(n-1)^2 + k^2}{(n+1)^2 + k^2} \quad (1)$$

выполнен по аддитивной модели гармонического осциллятора

$$\varepsilon^*(\nu) = \varepsilon'(\nu) + i\varepsilon''(\nu) = \varepsilon_\infty + \sum_{j=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_j \nu_j^2}{\nu_j^2 - \nu^2 + i\nu\gamma_j} \quad (2)$$

с тремя подгоночными параметрами: $\Delta\varepsilon_j$ — диэлектрический вклад моды, ν_j — частота и γ_j — константа затухания. Высокочастотный вклад в диэлектрическую

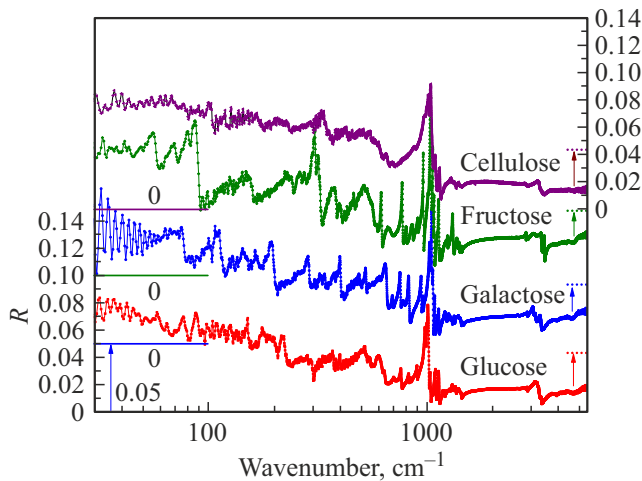


Рис. 4. Спектры отражения в ИК диапазоне моносахаридов — глюкозы, галактозы и фруктозы и полисахарида — целлюлозы.

проницаемость учтен константой ϵ_∞ . Связь между комплексными диэлектрической проницаемостью $\epsilon' + i\epsilon''$ и показателем преломления $n + ik$ задана известными соотношениями $\epsilon' = n^2 + k^2$ и $\epsilon'' = 2nk$.

Результаты

На рис. 4 показаны экспериментальные спектры отражения моносахаридов глюкозы, галактозы и фруктозы, а также полисахарида — микрокристаллической целлюлозы. Каждый последующий спектр смещен вверх по оси отражения на величину 0.05 и соответствующие им нулевые уровни отражения показаны линиями в левой части рисунка. Общей особенностью всех представленных спектров является нелинейное снижение базовой линии спектров по мере роста частоты. Оценка влияния рассеяния на такое искажение спектра проведена сравнением величины экспериментально полученного коэффициента отражения и данных, рассчитанных по показателю преломления сахаридов в видимом диапазоне из работы [14]. В соответствии с этими данными величины показателя преломления n данных сахаридов различаются во втором знаке. Рассчитанный по формуле (1) коэффициент отражения R с учетом малости коэффициента экстинкции k для всех образцов составляет около 4%. Этот уровень отражения показан точками рядом с правой шкалой для соответствующих спектров. Для всех измененных спектров рассеяние уменьшает величину отражения на высокочастотном краю не менее чем вдвое. Следующей особенностью является малая величина коэффициента отражения во всем диапазоне и низкое отношение сигнал/шум в дальней ИК области спектра. В ТГц области спектра помимо полос поглощения спектры отражения дополнены интерференцией в плоскопараллельном образце. Наиболее явно интерференция проявляется в низкочастотном участке

спектра галактозы. Из рис. 4 видно, что для описания интерференции в ТГц и дальней ИК области требуется высокое спектральное разрешение. Из опубликованных данных по пропусканию—поглощению известно [15,16], что в спектрах моно- и дисахаридов в ТГц области частот присутствуют полосы поглощения. Наличие этих полос изменяет простую интерференционную картину. Таким образом, для полного анализа колебательного спектра необходима привязка также и к низкочастотным данным ТГц измерений. Еще более точные значения показателя преломления получены с применением когерентной субмиллиметровой спектроскопии в области частот ниже колебательного спектра. Эти данные являются точными калибровочными величинами, определяющими оптические свойства данного образца. Разность между показателями преломления в ТГц и видимом диапазонах используется для оценки суммарного вклада полос поглощения в ИК диапазоне и является критерием для коррекции спектров в соответствии с аддитивной моделью классического осциллятора.

На рис. 5 точками показан набор спектров отражения, полученный с помощью фурье ИК, TPS и субмиллиметрового ЛОВ-спектрометров на образцах альфа-лактозы моногидрата. Спектр отражения в ИК области качественно аналогичен спектрам остальных сахаридов. Участок спектра выше 800 cm^{-1} нормирован на величину отражения, рассчитанную по данным [14] в видимой области спектра. Основным источником искажения спектров в ТГц и субмиллиметровой областях является

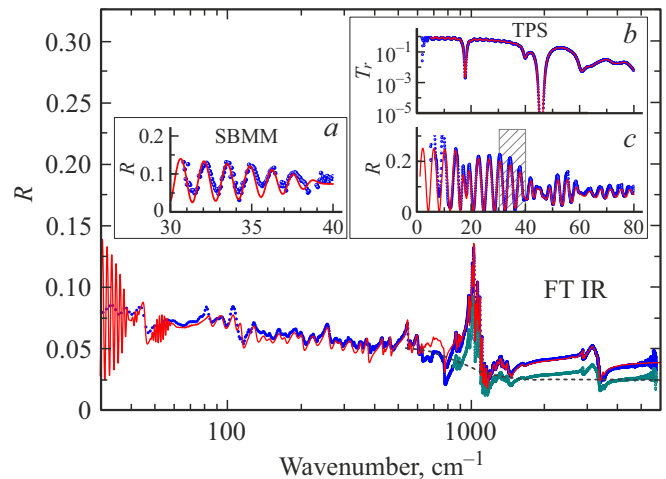


Рис. 5. Широкополосный спектр отражения прессованного образца альфа-лактозы моногидрата. Точки — экспериментальные данные. Сплошная линия — результат расчета с использованием формул (1) и (2). На вставке (a) показаны экспериментальные данные и модельный спектр отражения, полученные на когерентном субмиллиметровом спектрометре. На вставках (b) и (c) точками показаны соответственно спектры пропускания и отражения, измеренные на TPS. Заштрихованный прямоугольник на вставке (c) соответствует частотному диапазону, измеренному на ЛОВ-спектрометре (вставка a). Сплошными линиями показаны расчетные спектры.

пористость образца, которая в соответствии с соотношениями Бруггемана приводит к изменению эффективной диэлектрической проницаемости образца [7]. Эффекты деполяризации значительно меньше влияют на изменение диэлектрической проницаемости среды, поскольку параметр Лихтенекера, определенный в работе [12], близок к нулю. Для измерения спектра отражения в ТГц диапазоне был использован образец меньшей толщины, чем при измерениях на ЛОВ-спектрометре. В этом случае период интерференции уменьшается, одновременно увеличивается диапазон достоверных данных за счет меньшего поглощения излучения в образце при многолучевой интерференции. Частотный участок, в котором получены данные на ЛОВ-спектрометре на графике со спектром отражения в ТГц диапазоне, показан заштрихованным прямоугольником.

Обсуждение

Основной структурной единицей сахаридов является пиранозное кольцо с одной карбонильной и несколькими гидроксильными группами. За исключением моносахаридов, пиранозные кольца объединены гликозидной связью, формирующей ди- и полисахариды. Сахариды кристаллизуются в моноклинной симметрии с пространственной группой $P2_1$ [10,11] и в зависимости от аномера имеют большое число ИК активных колебаний, проявляющихся в диапазоне от 17 до 4000 см^{-1} . Анализ колебательных мод альфа-лактозы моногидрата в ТГц области спектра с использованием теории функционала плотности (DFT) [17] показал наличие более 20 молекулярных вращательных и трансляционных типов колебаний. Экспериментальные данные, полученные в ТГц диапазоне при комнатной температуре, сложно интерпретировать, поскольку, ассоциированные с определенным типом колебаний резонансы перекрываются, формируя асимметричные широкие полосы поглощения. Разрешение отдельных линий возможно при анализе спектров, полученных при криогенных температурах. Однако наряду с сужением контуров при охлаждении заметно изменяются также собственные частоты резонансов [18], что может быть причиной расхождения результатов расчетов DFT и эксперимента.

Основными факторами, влияющими на искажения спектров отражения в ИК области однофазных микрокристаллических образцов, являются рассеяние и пористость. Рассеяние определено размерами кристаллитов, в то время как пористость влияет на величину эффективной диэлектрической проницаемости среды [19]. Кроме того, пористость образца способствует адсорбции атмосферной влаги, что также изменяет вид широкополосных спектров. Интерференция в спектрах отражения в ТГц области частот является прямым доказательством прозрачности образца и минимизации влияния рассеяния на полученные спектры. На рис. 5 показаны экспериментальные данные и расчетные спектры отражения для

прессованного дисахарида альфа-лактозы моногидрата. Дополнительно на вставке (b) приведен спектр пропускания этого образца. Для описания полного спектра отражения использовано 88 модельных осцилляторов. Коррекция экспериментального спектра отражения в области выше 400 см^{-1} выполнена по привязке к рассчитанному значению величины отражения в видимой области спектра.

Как видно из рис. 4 и 5, спектры отражения сахаридов в дальнем ИК диапазоне в силу низких величин отражения получены с невысоким отношением сигнал/шум. Выявление полос с использованием стандартных процедур сглаживания спектров равнозначны снижению разрешения, что приводит к искажениям формы узких пиков в спектрах отражения. Значительное количество линий и перекрытие их контуров также усложняет задачу модельного определения параметров полос поглощения. В качестве иллюстрации на рис. 5 сплошной линией показан расчетный спектр отражения. Наибольшие расхождения между расчетным спектром и экспериментом наблюдаются в дальней ИК области $100\text{--}800\text{ см}^{-1}$. В области частот ниже 100 см^{-1} спектры отражения содержат интерференционный вклад и их моделирование выполнено в когерентном режиме по матричной модели пропускания-отражения плоскопараллельного слоя [20,21]. Матричный метод расчета учитывает многолучевую интерференцию излучения в образце, что позволяет определить параметры полос поглощения с более высокой точностью. Точность определения параметров полос поглощения выше при моделировании спектров пропускания. Расчетный спектр отражения, полученный по этим параметрам (рис. 5, c), показывает хорошее соответствие с экспериментом, включая интерференцию.

Сравнение расчетного спектра с данными по отражению, полученному методом субмиллиметровой спектроскопии на образце с другой толщиной, также дает хорошее совпадение с экспериментальными данными. Влияние пористости на экспериментальные спектры может быть косвенно определено по плотности измеренных образцов. Плотность образцов $\rho \sim 1.41\text{ г/см}^3$ определена взвешиванием на весах AND HR-250AZG с точностью 0.1 мг и измерением их размеров микрометром с точностью 2 мкм . Полученная величина составила около 90% от рентгеновской плотности $\rho_{\text{ХГ}} = 1.543\text{ г/см}^3$ [10,11]. Таким образом, можно сделать вывод, что изменения в спектрах прессованных образцов связанные с остаточной пористостью, не превышают типичных погрешностей измерений и моделирования спектров в пределах 10%.

Заключение

Измерения однофазных прессованных образцов микрокристаллических сахаридов показали, что, несмотря на низкие величины коэффициента отражения, малое от-

ношение сигнал/шум и значительное влияние рассеяния, анализ колебательных спектров может быть проведен с приемлемой точностью. Влияние рассеяния на спектры отражения может быть учтено с использованием калибровочных величин показателей преломления на высоких и низких частотах. Однозначность выбора зависимости, компенсирующей рассеяние, осложнено колебательным спектром с большим количеством узких линий на длинах волн, соответствующих характерным размерам кристаллитов и невысоким отношениям сигнал/шум. Использование простой модели классического осциллятора дало хорошее соответствие расчетного и экспериментального спектров в средней ИК и ТГц областях спектра. Однако в дальней ИК области расхождения остаются значительными за счет больших экспериментальных погрешностей в этом диапазоне и заметных отклонений формы полос поглощения от лоренцевских контуров.

Благодарности

Авторы признательны Л.Д. Исхаковой за рентгеноструктурные и электронно-микроскопические измерения образцов альфа-лактозы моногидрата.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 21-72-00069.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] H-B. Liu, X-C. Zhang. *Chem. Phys. Lett.*, **429** (1–3), 229 (2006). DOI: 10.1016/j.cplett.2006.07.100
- [2] R. Rani, A. Kumar, R.K. Bamezai. *J. Molecular Liquids*, **240**, 642 (2017). DOI: 10.1016/j.molliq.2017.05.127
- [3] S. Yan, H. Zhang, Z. Yang, M. Tang, M. Zhang, C. Du, H-L. Cui, D. Wei. *RSC Advances*, **7**, 41667 (2017). DOI: 10.1039/C7RA07118C
- [4] J.H. Kirk, S.E. Dann, C.G. Blatchford. *Int. J. Pharmaceutics*, **334** (1–2), 103 (2007). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.026
- [5] L. Guo, X. Wang, P.Han, W. Sun, S. Feng, J. Ye, Y. Zhang. *Appl. Opt.*, **56** (13), F173 (2017). DOI: 10.1364/AO.56.00F173
- [6] Y. Shen, P.F. Taday. *IEEE J. of Selected Topics in Quantum Electronics*, **14** (2), 407 (2008). DOI: 10.1109/JSTQE.2007.911309
- [7] D.A.G. Bruggeman. *Annalen der Physik*. **416** (7), 636 (1935). DOI: 10.1002/andp.19354160705
- [8] K. Lichtenecker. *Physik. Z.*, **27**, 115 (1926)
- [9] J.N. Noordik, P.T. Beurskens, P. Bennema, R.A. Visser, R.O. Gould. *Zeitschrift für Kristallographie* **168**, 59 (1984). DOI: 10.1524/zkri.1984.168.14.59
- [10] E.A. Beevers, H.N. Hansen. *Acta Cryst.*, **B27** (7), 1323 (1971). DOI: 10.1107/S0567740871003947
- [11] D.C. Fries, S.T. Rao, M. Sundaralingam. *Acta Cryst.*, **B27** (5), 994 (1971). DOI: 10.1107/S567740871003364
- [12] Г.А. Командин, А.А. Гавдуш, Ю.Г. Гончаров, О.Е. Породинков, В.С. Ноздрин, С.В. Чучупал, И.Е. Спектор. *Опт. и спектр.*, **125** (5), 596 (2019). DOI: 10.21883/OS.2019.05.47658.7-19 [G.A. Komandin, A.A. Gavdush, Yu.G. Goncharov, O.E. Porodinkov, V.S. Nozdrin, S.V. Chuchupal, I.E. Spektor. *Opt. Spectrosc.*, **126** (5), 514 (2019). DOI: 10.1134/S0030400X1905014X].
- [13] G.A. Komandin, S.V. Chuchupal, S.P. Lebedev, Yu.G. Goncharov, A.F. Korolev, O.E. Porodinkov, I.E. Spektor, A.A. Volkov. *I.E.E.E. Trans. Terahertz Sci. Technol.*, **3** (4), 440 (2013). DOI: 10.1109/TTHZ.2013.2255914
- [14] A. Watanabe. *XIX. Yakugaku Zasshi*, **122** (8), 595 (2002). DOI: 10.1248/yakushi.122.595
- [15] S. Yamauchi, S. Hatakeyama, Y. Imai, M. Tonouchi. *Am. J. of Analytical Chemistry.*, **4** (12), 756 (2013). DOI: 10.4236/ajac.2013.412092
- [16] Z.-P. Zheng, W.-H. Fan, Y.-Q. Liang, H. Yan. *Opt. Commun.*, **285** (7), 1868 (2012). DOI: 10.1066/j.optcom.2011.12.016
- [17] S. Saito, T.M. Inerbaev, H. Mizuseki, N. Igarashi, R. Note, Y. Kawazoe. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**, L1156 (2006). DOI: 10.1143/JJAP.45.L1156
- [18] Г.А. Командин, О.Е. Породинков, В.С. Ноздрин, Г.Р. Мусина, Н.В. Черномырдин, К.И. Зайцев, И.Е. Спектор. *Опт. и спектр.*, **128** (6), 746 (2020). DOI: 10.21883/OS.2020.06.49406.20-20 [G.A. Komandin, O.E. Porodinkov, V.S. Nozdrin, G.R. Musina, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, I.E. Spektor. *Opt. Spectrosc.*, **128** (6), 752 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20060119].
- [19] D. Markl, P. Wang, C. Ridgway, A-P. Karttunen, M. Chakraborty, P. Bawuah, P. Paakkonen, P. Gane, J. Ketolainen, K-E. Peiponen, J. Axel Zeitler. *J. Pharm. Sci.*, **106** (6), 1586 (2017). DOI: 10.1016/j.xphs.2017.02.028
- [20] B. Harbecke. *Appl. Phys. B*, **39**, 165 (1986). DOI: 10.1007/BF00697414
- [21] P. Grosse, B. Harbecke, B. Heinz, R. Meyer, M. Offenbergl. *Appl. Phys. A*, **39**, 257 (1986). DOI: 10.1007/BF00617270