7. CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS AS A SUITABLE TECHNIQUE FOR STUDYING THE INTERACTIONS BETWEEN ANALYTES AND (CHIRAL) SELECTORS

RNDr. Kateřina Ušelová, PhD., RNDr. Iva Zusková, CSc.

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Albertov 2030, CZ 128 43 Praha 2
vcelakov@natur.cuni.cz

7.1 Capillary electrophoresis (CE)

The distribution of charged analytes in an electric field according to their electrophoretic mobilities is the basic separation principle common to all electromigration separation methods. Usually, the separation process is performed in a narrow bore silica capillary (inner diameter about 10-100 μm) permitting the application of high voltage and demanding only small volumes of the sample containing low concentrations of analytes. Due to the idea of a usage of narrow capillaries the capillary electromigration techniques generally does not suffer from long analysis times, low efficiencies, and difficulties in detection and automation.

7.1.1 Capillary zone electrophoresis (CZE)

The following text will be focused on capillary zone electrophoresis (CZE) which is the most exploited technique of CE in practice. CZE is an analytical technique for charged analytes, which move in the electric field in a capillary and form the migrating zones according to their electrophoretic mobilities. The electrophoretic migration of charged analytes usually takes place in a buffer that is called the background electrolyte (BGE). The UV/VIS spectrophotometer is mostly used for detection of separated zones, but also other detection methods are often applied (conductivity, fluorescence, mass spectrometry detection).

7.1.1.1 Electrophoretic mobilities

As is clear from the definition, electrophoretic mobility plays a key role in all electrophoretic separations. The electrophoretic mobility of *i*-th ion u_i is defined as

$$u_i = \frac{v_i}{E} \tag{7.1}$$

where v_i is the velocity of *i*-th ion and E is the electric field strength. The formula expressing the mobility of the ion in terms of physical parameters can be derived at stationary conditions, when the migration velocity is constant, as

$$u_i = \frac{|z_i| e}{6 \pi \eta r_i} \tag{7.2}$$

where e is the elementary charge, η is the viscosity coefficient of the medium and r_i means the Stokes radius of the ion. The radius r_i is actually the radius of the spherical ion including the solvent shell surrounding the charged particle.

In a real solution the electrostatic (Coulombic) forces between ions play a role, and consequently the mobility is also a function of ionic strength of the solution. The ionic mobility in the solution at a given ionic strength is the actual mobility $u_{act,i}$. The actual mobility generally increases with decreasing ionic strength and at infinitive dilution (at zero ionic strength) attains a value, which is called the limiting mobility $u_{lim,i}$. It is the physical constant dependent on the solvent and temperature; it is usually found in standard tables. The effective mobility u_{eff} was introduced for the compounds consisting of more than one form among which the fast equilibrium is established. The effective mobility represents the migration of the whole compound and is given by

$$u_{eff} = \frac{\sum_{i=1}^{n} c_i u_{act,i} sign(z_i)}{c} \tag{7.3}$$

where c is the analytical concentration of the compound.

7.1.1.2 Electroosmotic flow

A fundamental and very important aspect in open tubes is electroosmosis, or electroosmotic flow (EOF), which originates from the surface charges on the inner capillary wall and causes a flow of liquids in a capillary in the electric field.

The surface charge may stem from the ionization of the solid interface and also from the absorption of ions from the electrolyte on the surface. This charge is in the solution compensated by the ions of opposite charge so the electric double layer is created.

The most commonly used capillaries in capillary electrophoresis are made from fused silica. Depending on the pH of the BGE, silanol groups can be ionized. In water solutions they are positively charged at pH ~1, neutral at pH ~2 and negatively charged at pH >2. The opposite charge of the diffuse layer causes the motion of the whole solution towards the appropriate electrode. The EOF drifts all the ions and neutral species with the same velocity, so from the viewpoint of separation it is non-selective, but it considerably influences the velocity of the analytes.

7.2 Stability constant

7.2.1 Determination of physicochemical parameters by CZE

CZE can serve not only for the separation of the analytes in the sample, but also can be used as an easy and accurate method for determination of physicochemical characteristics of ionisable compounds (dissociation constant – dissociation equilibria, stability constant – complexation equilibria, mobility and other related properties). These parameters are important for the choice of a suitable BGE for the separation and/or enantioseparation of various components as well as they serve as necessary input parameters for all theoretical models of electromigration.

7.2.2 Complexation and stability constant

Complexation is a general concept involving, among others, complex formation (affinity) of an enantiomer to a suitable chiral selector. Enantiomers do not differ in their electrophoretic mobility in the free solutions. This means that they are unresolvable in an ideal free solution. Thus, to obtain chiral separations one needs a chiral selector which can recognize both enantiomers stereoselectively. A migration mechanism should be realized through the capillary, which enables to differentiate between the mobilities of free and bonded analytes effectively. Many chiral separations have been described in buffer solutions containing various chiral selectors, or in coated capillaries with a chiral selector.

The important parameter describing the formation of complex AC from free analyte A and complexing agent (ligand) C is the stability constant (affinity, association, binding, complexation, formation constant). Schematically, the complexation equilibrium for the most common 1:1 stoichiometry can be expressed as

$$\mathrm{A} + \mathrm{C} \rightleftharpoons \mathrm{AC} \tag{7.4}$$

with the corresponding thermodynamic stability constant K defined as

$$K = \frac{a_{\mathrm{AC}}}{a_{\mathrm{A}} a_{\mathrm{C}}} \tag{7.5}$$

where a stands for the activities of the species. In the majority of the published papers, the thermodynamic stability constant is replaced by the apparent stability constant, K', in $\mathrm{dm^3\,mol^{-1}}$, where the activities are replaced by the molar concentrations

$$K' = \frac{[\mathrm{AC}]}{[\mathrm{A}][\mathrm{C}]} \tag{7.6}$$

According to Eq. (7.6), K' depends on the ionic strength of the solution. Thus, it is important to distinguish between the two quantities, K and K' . As mentioned above, 1:1 stoichiometry is encountered most commonly in the interacting systems. In the case of a more complex stoichiometry, the quantity known as nonspecific apparent stability constant, nK', is to be considered. Here n is used for the number of the binding sites.

7.2.2.1 Techniques used for the determination of stability constants

Several techniques are available to investigate analyte-complexing agent (ligand) interactions. From the techniques available and suitable for the determination of stability constants, capillary zone electrophoresis becomes very often the technique of the choice. CZE offers a fully automated, fast and reasonably simple experimental arrangement utilizing relatively cheap instrumentation (e.g. in comparison with NMR). The advantages of electrophoretic techniques used for the determination of stability constants include : experimental speed, resolving power, and the consumption of small amounts of analytes or ligands. Due to the separation ability of CZE, one can determine the binding constants of multiple analytes to the ligand of interest in one experimental run. Several modifications of CZE are regarded as suitable for the determination of stability constants – affinity capillary electrophoresis (ACE), Hummel-Dreyer method (HD), vacancy affinity capillary electrophoresis (VACE), vacancy peak method (VP), frontal analysis (FA) and continual frontal analysis in capillary electrophoresis (FACCE). In all cases, the concentration of one component is fixed,

whereas the concentration of the other component is changed. The primary prerequisite is the requirement of sufficiently different migration times between the free and the bound forms of one of the species studied.

Some of the electrophoretic methods have the same experimental setups (ACE and HD or VACE and VP) but differ in the experimental quantity used for the determination of the stability constant. In ACE and HD, one of the interacting species is added to the background electrolyte and the other one is injected. The methods differ in the parameter which is measured to obtain the binding constant. In ACE, it is the mobility of the injected species forming a complex with the component present in the background electrolyte; in HD, it is the area of the vacancy peak of the component added to the background buffer. Similarly, the methods of VACE and VP have identical experimental setups: both interacting species are added to the background electrolyte (the concentration of one is kept constant, the concentration of the other one is varied) and the neat buffer is injected. In VACE, the change in the mobilities of the species due to complex formation are used to calculate the binding constant. In VP, the area of the vacancy peak of the component added to the background electrolyte is used for that purpose.

FA has a different experimental setup: the equilibrium between the analyte and the ligand is established in the sample vial. After injection of the relatively large amount of the equilibrated sample into the capillary filled with background electrolyte, the free and bound components are separated. Injection of the large sample plug provides peaks with plateaus when the mobility of the free analyte is sufficiently different from that of the ligand. The stability constant is calculated from the plateau height of the free analyte, which is proportional to the concentration of the free analyte in the original sample. The degree of binding can be determined by means of a calibration curve.

In contrast to all the CE techniques mentioned, FACCE involves continuous sample introduction. The capillary is filled and equilibrated with the ligand-containing background electrolyte before the sample (analyte + ligand) is introduced. The inlet of the capillary is then immersed into the sample vial and the voltage is applied across the capillary to start the injection and separation process. The separated analytes appear as progressive plateaus in the electropherogram.

Of all the electrophoretic techniques mentioned above, affinity capillary electrophoresis, ACE, is the most frequently exploited technique, because it is used both for the determination of the stability constants and for the separation of the enantiomers. The experiments can be realized by one of two analogous settings: either the ligand is added to the running buffer and the analyte is injected or vice versa. When assuming that the complexation process is much faster than the migration process and the stoichiometry is 1:1, the effective electrophoretic mobility of analyte A, $\mu_{A,eff}$, can be expressed as

$$\mu_{A,eff} = \frac{[A]}{[A]+[AC]}\mu_A + \frac{[AC]}{[A]+[AC]}\mu_{AC} \tag{7.7}$$

where μ_A and μ_{AC} are the electrophoretic mobilities of the free analyte and the complex, respectively. The combination of the Eq.(7.6) and Eq.(7.7) gives the relation

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AC}K'[C]}{1+K'[C]} \tag{7.8}$$

which can be used as a regression function in the nonlinear regression methods. Equation (7.8) can also be rearranged into various linear forms used in the mobility ratio difference method (MR), the double reciprocal method (DR), the *y*-reciprocal method (*y*-R) and the *x*-reciprocal (*x*-R) method. The double reciprocal plot is also known as the Benesi-Hildebrand plot in spectrophotometry and the Lineweaver-Burk plot in enzyme studies, while the *x*-reciprocal plot is called the Eadie plot in enzyme kinetics and Scatchard plot in protein binding studies. The accuracy and precision of stability constant determination methods by nonlinear regression was analyzed by many authors and it was showed by Monte Carlo simulations that the stability constants obtained by nonlinear regression are more accurate and more precise than those obtained by the other methods.

7.3 Problems in the determination of stability constants

In general, the approaches providing stability constant values can be split into two groups: the approach is directly concerned with the determination of stability constants, while in the second group, the approach is concerned with the successful enantioseparation and stability constants are obtained as a "byproduct". The authors in the second group usually concentrate on finding the optimum separation conditions and are not forced to (or care to) determine the ionic strength of the separation buffer. Consequently, in many cases, the stability constants determined by these authors are related to particular experimental conditions and can only serve as estimates of binding strength.

7.3.1 Ionic strength

As the apparent stability constants are strongly dependent on the ionic strength of the separation media (*cf.* Eq (5) and Eq (6)), it is necessary to precisely define the composition of the running buffers when thermodynamic binding constants are to be to obtained. Knowledge of the concentrations of all substances used to reach a desired pH in the background electrolyte is necessary for the calculation of the ionic strength of the BGE. BGEs are often prepared by titration of a solution to a desired pH value. However, in this approach the accurate composition of the BGE is unknown, so the ionic strength of the BGE cannot be calculated. Often, BGEs with very high ionic strength are used (e.g., to achieve a sufficient detector response), so the relevant corrections at high ionic strengths may not be accurate. Not only the stability constants, but also the electrophoretic mobilities used for the determination of the stability constants are dependent on the ionic strength of the BGE.

Some researchers tried to correct the electrophoretic mobilities and stability (or dissociation) constants for the ionic strength of the background electrolyte. The situation becomes even more complicated when the ligand is highly charged. Indeed, addition of a charged ligand to the separation buffer considerably increases its ionic strength and calculation of the value of ionic strength becomes problematic, especially for ligands (such as, e.g., randomly sulfated cyclodextrins) where even the real charge number is unknown. Regrettably, the majority of researchers completely omit the effects of ionic strength. Consequently, the stability constant values published by these authors can serve only as a rough estimate of the binding interactions. Additionally, as it was pointed out by many authors, high ionic strength of the running buffer leads to high electrophoretic current. Subsequently, Joule heating causes a significant increase in temperature inside the capillary (especially, when the capillaries are in still air) which alters the electrophoretic mobilities of the investigated compounds, and the calculated stability constants.

7.3.2 Viscosity of the buffer

Changes in both the electrophoretic and electroosmotic mobilities are observed when the concentration of the ligand added to the buffer is increased, which causes a change in the viscosity of the BGE.

Several approaches were introduced for viscosity correction of the mobilities. The mobility ratio method, which relates the apparent electrophoretic mobility of the analyte to the mobility of electroosmosis and does not require direct measurement of buffer viscosity is the preferred one. Some of the researches used adjusted electrophoretic mobilities obtained by multiplying the experimental mobilities by the ratio of the current obtained with and without the buffer additive. In some papers the authors employed a viscosity correction marker and the viscosity correction factor v was then calculated as $v = t_1 / t_2$, where t_1 and t_2 stand for the migration times of the viscosity correction marker in the presence and absence of the BGE additive, respectively. This approach presumes that the electroosmotic mobility depends only on viscosity. The viscosity correction marker must be carefully chosen not to interact with the ligand, with the capillary wall, etc.

7.3.3 Electroosmotic flow

The fluctuation of the electroosmotic mobility is important to consider when determining the electrophoretic mobilities of compounds. In order to obtain reproducible electroosmotic flows, the inner capillary surface must be in most cases conditioned. An EOF marker used for determination of the electroosmotic mobility must be chosen to be absolutely neutral in the working pH range and not to interact with the ligand used. The presumption of negligible EOF in uncoated capillaries used in the acidic pH range as done by some authors should be applied very cautiously. The approach used in, where the authors obtained the EOF mobility by the aid of an ion not binding to the ligand and migrating closely to the investigated species is more accurate.

7.3.4 Data evaluation and detection

Since computer programs for regression of experimental data by nonlinear curve fitting are readily available nowadays, the nonlinear regression of experimental data evaluation should be recommended.

Due to the limited sensitivity of some of the CE detectors, highly concentrated BGEs were sometimes used. The lack in sensitivity and impossibility of characterization and identification of analytes provided by standard CE systems equipped only with UV detectors has been significantly improved by using CE systems coupled with mass spectrometric (MS) detectors or by instruments equipped with conductivity detectors.

7.4 Concluding remarks

We are fully aware of the limitations which hamper the procedures used for the determination of stability constants. Our intention was review the literature and point out the problems which can significantly decrease the accuracy and reliability of stability constants and which, in some cases, make the values determined by some authors almost unusable. According to our experience, accurate determination of physico-chemical parameters is often accompanied by serious problems, which cannot be solved easily. In our opinion, authors engaged in the determination of stability constants by CE methods should focus on (i) accurate determination of the composition of the BGEs, (ii) calculation of the ionic strength of the BGE (ionic strength should be as low as possible), (iii) corrections for the ionic strength effects, (iv) corrections for the viscosity changes and (v)

choice of a suitable EOF marker. With these requirements in mind, one can conclude that almost all stability constants published in literature have smaller or greater errors and, in some cases, can hardly be compared with each other.

References

Ušelová-Včeláková, K., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2007, accepted.

Connors, K.A., *Binding constants: The measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York 1987.

Chankvetadze, B, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester, 1997.

Schneider, H.J., Hacket, F., Rüdiger, V., Ikeda H., *Chem. Rev*. 1998, *98*, 1755-1785.

Tanaka, Y., Terabe, S., *Electrophoresis* 2002, *768*, 81-92.

Østergaard, J., Heegaard, N.H.H., *Electrophoresis* 2003, *24*, 2903-2913.

Guijt-van Duijn, R.M., Frank, J., van Dedem, G.W.K., Baltussen, E., *Electrophoresis* 2000, *21*, 3905-3918.

Rundlett, K.L., Armstrong, D.W., *J.Chromatogr.* 1996, *721*, 173-186.

Bowser, MT., Chen, DDY., *J. Phys. Chem. A* 1998, *102*, 8063-8071.

Bowser, MT., Chen, DDY., *J. Phys. Chem. A* 1999, *103*, 197-202.

Busch M.H.A., Kraak, J.C., Poppe, H., *J.Chromatogr. A* 1997, *777*, 329-353.

Heegaard, N.H.H., Nilsson, S., Guzman, N.A., *J.Chromatogr. B* 1998, *715*, 29-54.

Heegaard, N.H.H., Kennedy, R.T., *Electrophoresis* 1999, *20*, 3122-3133.

8. CHIROPTICKÉ SPEKTROSKOPIE VE STRUKTURNÍ CHEMII

Ing. Petr Petr Maloň, CSc.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
pmalon@email.cz

Chiroptické metody, cirkulární dichroismus (CD) a optická rotační disperze (ORD), která je pozorována jako optická rotace, pokud je experiment proveden při jediné vlnové délce, představují chirální varianty běžné konvenční absorpční spektroskopie a měření indexu lomu. Narozdíl od těchto metod, využívají polarizované světlo a podstatně rozšiřují informace, které tyto spektroskopické techniky poskytují za cenu toho, že je lze aplikovat pouze na chirální vzorky. Zatímco absorpční spektroskopie se v průběhu let vyvinula v obecný analytický nástroj pro výzkum chemických elektronových a vibračníchvlastností molekulárních systémů, chiroptické metody se specializovaly na výzkum trojrozměrného stavu hmoty, který umožňují studovat s velkou citlivostí a při současné rozmanitosti dostupných chiroptických postupů i s přijatelným rozlišením a selektivitou. Chirální objekty absorbují levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované záření lehce rozdílnou měrou. Tento jev je podstatou cirkulárního dichroismu a stal se základem většiny rozšířených chiroptických metod. Existují ale i další chiroptické metody, které jsou rovněž založeny na interakci chirální hmoty s kruhově polarizovaným světlem: optická rotační disperze je založena na zcela analogickém rozdílu v lomu levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla v chirálním prostředí, Ramanova optická aktivita měří obdobnou diferenci Ramanova rozptylu a cirkulárně polarizovaná luminiscence sleduje rozdíly v emisi světla chirálním vzorkem.

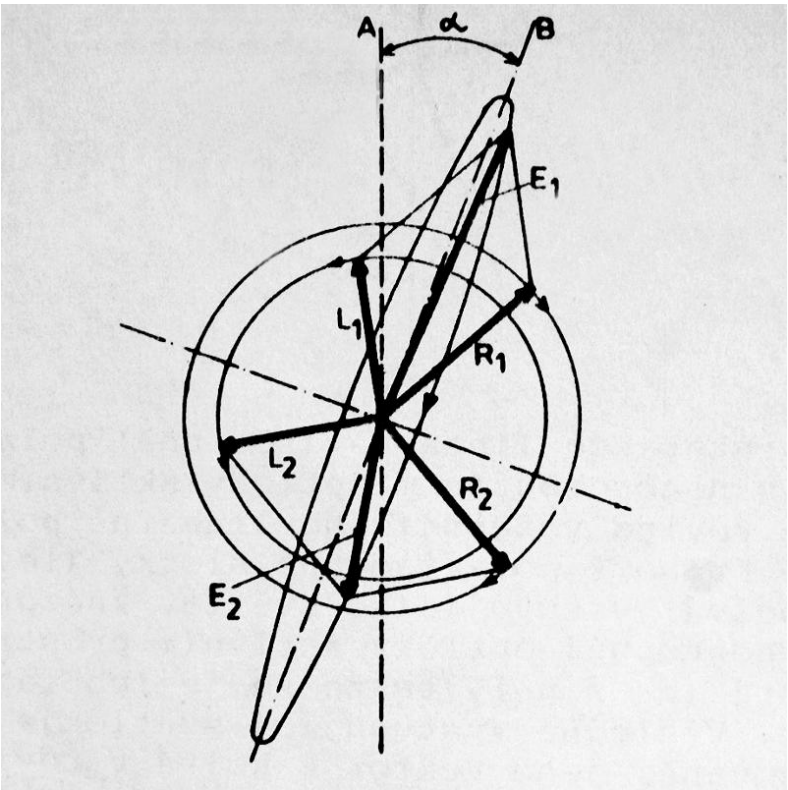
8.1 Základní veličiny

Chiroptické metody používají fyzikální veličiny odvozené z konvenčních nechirálních variant těchto metod. CD spektroskopie měří rozdíl v absorbanci pro levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované světlo. Veličiny užívané v absorpční spektroskopii jsou proto v CD spektroskopii nahrazeny jejich diferencemi. Definice, vztahy a jednotky užité v CD spektroskopii jsou uvedeny v tab. 8.1.

Navíc, jako důsledek cirkulárního dichroismu je lineárně polarizované světlo přeměněno ve světlo elipticky polarizované (viz obr. 8.1). Relevantní fyzikální veličina, elipticita, $\theta = \arctan(b/a)$, kde b a a jsou délky poloos elipsy opisované světelným paprskem, koresponduje s diferencí v absorpci a představuje alternativní možnost jak cirkulární dichroismus vyjádřit jako fyzikální veličinu. Odpovídající vztahy jsou rovněž uvedeny v tab. 8.1. V podstatě z tradicionalistických důvodů jsou CD data malých organických molekul obvykle uváděna jako rozdíly v absorbanci, zatímco zejména elektronová CD data biopolymerů jsou často uváděna v elipticitách. Výše uvedené veličiny se užívají jak ve viditelné a ultrafialové spektrální oblasti tak v oblasti infračervené.

Tab. 8.1: Veličiny a jednotky užívané v konvenční a chiroptické spektroskopii

Veličina	Definice a vztahy	Jednotky
Absorbance	$A(\nu) = \log_{10}(I_0/I)$ I_0 – intenzita světla vstupujícího do kyvety, I – intenzita světla opouštějícího kyvetu	bezrozměrná
Molární absorpční koeficient	$\varepsilon(\nu) = A(\nu)/cl$ c – molární koncentrace (mol L^{-1}), l – délka kyvety (cm)	L mol^{-1} cm^{-1}
Cirkulární dichroismus	$\Delta A(\nu) = A_L(\nu) - A_R(\nu)$, $A_L(\nu)$, $A_R(\nu)$ absorbance pro levotočivé a pravotočivé kruhově polarizované světlo	bezrozměrné
Molární CD	$\Delta\varepsilon(\nu)=\Delta A(\nu)/cl$	L mol^{-1} cm^{-1}
Elipticita	$\theta(\nu)=32\,980\ \Delta A(\nu)$	mdeg
Molární elipticita	$[\theta](\nu) = \theta(\nu)/(10\ c\ l)$	deg $cm^2 dmol^{-1}$

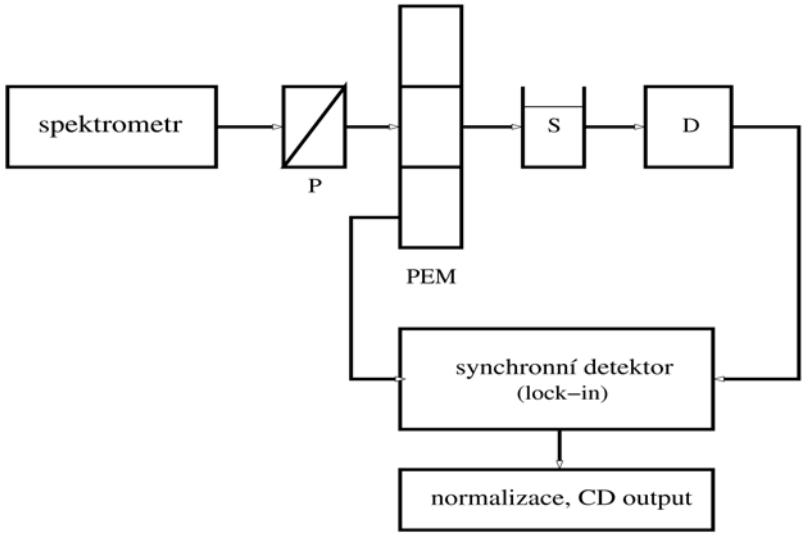


Obr. 8.1: Vznik cirkulárního dichroismu, eliptická polarizace světla

8.2 Měření chiroptických vlastností

Skutečnost, že chiroptická spektra jsou spektra diferenční nabízí teoretickou možnost jejich měření jako prostou diferenci dvou spekter získaných při dvou opačných polarizacích dopadajícího kruhově polarizovaného záření. Tento koncept je ve velmi sofistikované digitální podobě využíván při

měření ROA spekter. Avšak signál cirkulárního dichroismu je typicky o 3-5 řádů slabší nežli odpovídající signál absorpční a tato relace je dodržena ve všech variantách chiroptické spektroskopie. Přímé měření není proto hlavně z důvodů instrumentálního driftu praktické (vyžadovalo by neúnosně vysokou stabilitu spektrometrů) a pro experimenty je třeba využít specializovanějších technik a přístrojů (obr. 8.2). Polarizační optika typického CD spektrometru pracuje s lineárně polarizovaným paprskem, který se střídavě převádí na pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaný pomocí specializovaného optomechanického prvku – fotoelastického modulátoru. Tento proces střídání pravotočivé a levotočivé kruhové polarizace probíhá velmi rychle, typicky při frekvenci několika desítek kHz a změny intenzity světla procházejícího opticky aktivním vzorkem jsou elektronicky vyhodnocovány ve fázi s okamžitým stavem fotoelastického modulátoru. K tomu slouží další specializovaný tentokrát elektronický prvek, synchronní detektor – lock-in amplifier. Světlo o periodicky se měnícím stavu polarizace, ale s konstantní intenzitou se v opticky aktivním prostředí vzorku mění na světlo modulované i v intenzitě s velikostí a fází odpovídající mohutnosti a smyslu optické aktivity vzorku. Chiroptickou reakci vzorku na obě opačné kruhové polarizace působícího paprsku tedy získáváme prakticky současně a zároveň přímo, nejsme nuceni vyhodnocovat malé rozdíly velkých čísel. Aby výstup ze synchronního detektoru byl úměrný cirkulárnímu dichroismu vzorku musíme jej ještě normalizovat signálem celkové transmise, čehož je možné dosáhnout různými způsoby, jak je to pro konkrétní uspořádání experimentu výhodné. Doposud jsou chiroptické spektrometry komerčně dostupné pro dvě spektrální oblasti: ultrafialovou-viditelnou (UV-vis) a infračervenou (IR). V obou spektrálních oblastech se využívá uvedený princip měření jak pro skenující přístroje opatřené monochromátorem tak pro FT spektrometry využívající interferometrů. CD měřené v oblasti UV-vis se nazývá elektronové CD (ECD nebo jen CD), protože se zde převážně zabýváme chiroptickými vlastnostmi spojenými s elektronovými přechody, zatímco CD měřené v infračervené spektrální oblasti nazýváme vibrační CD (VCD) – zabývá se převážně vibračními přechody v molekulách. Posledně jmenovaná spektrální oblast je v poslední době dostupná zkoumání též pomocí Ramanovy optické aktivity (ROA). Lze říci, že pro CD a VCD platí zcela analogické výhody a omezení které jsou typické pro původní achirální varianty těchto metod.



Obr. 8.2: ***Základ měření cirkulárního dichroismu (*P *– polarizátor,* PEM *– fotoelastický modulátor,* S *– vzorek,* D *- detektor)***

8.3 Strukturní parametry, teorie a výpočty

Výsledkem typického chiroptického experimentu je spektrum cirkulárního dichroismu. Skládá se z jednotlivých dichroických pásů přesně analogicky tomu, jak se absorpční spektrum skládá z pásů absorpčních. Individuální absorpční a CD pásy jsou charakterizovány polohou jejich maxim (λ_{max}, ν_{max}) a intenzitou v maximu (A_{max}, ΔA_{max}, ε_{max}, $\Delta\varepsilon_{max}$) Pokud pro tvar pásu předpokládáme vhodnou matematickou formu (Gaussův nebo Lorentzův pás) přibývá další parametr – pološířka pásu ($\Delta\lambda$, $\Delta\nu$). Avšak je zde jeden principiální rozdíl: diferenční povaha CD spektroskopie vede k tomu, že dichroické pásy mohou mít kladné i záporné znaménko v závislosti na absolutní konfigutaci studovaného vzorku. V rámci jednoho spektra se tak typicky překrývají pásy kladných i záporných znamének a v důsledku toho výsledná obalová křivka nemusí představovat jednoznačnou informaci o všech pásech, které jsou přítomny.

Pro srovnání s teoretickými veličinami získanými výpočtem existuje numerický parametr analogický pro chirální i konvenční varianty absorpční spektroskopie. Je jím dipólová síla v absorpci D [$C^2\ m^2$] a optická rotační síla R [$C\ m\ J\ T^{-1} = C^2\ m^3\ s^{-1}$] pro cirkulární dichroismus. Obě veličiny mohou být experimentálně získány integrací plochy pod odpovídajícím pásem:

$$D = (3 \ln 10\, c\varepsilon_0 h)/(\pi N_A) \int \varepsilon(\nu)/(10\nu)\, d\nu = 1.022 \cdot 10^{-61} \int \varepsilon(\nu)\, d\nu$$

$$R = (3 \ln 10\, c^2\varepsilon_0 h)/(4\pi N_A) \int \varepsilon(\nu)/(10\nu)\, d\nu = 7.659 \cdot 10^{-54} \int \varepsilon(\nu)\, d\nu$$

kde ε_0 je permitivita vakua, N_A Avogadrova konstanta, c rychlost světla, h Diracova konstanta ($h/2\pi$) a ε molární absorpční koeficient. V situacích, kdy z nejrůznějších důvodů nelze přesně vyjádřit koncentraci vzorku, je výhodné chiroptická spektra vyjadřovat jako poměr CD signálu k absorpci, tzv. faktor chirality (angl. dissymmetry factor) $g = \Delta\varepsilon/\varepsilon = \Delta A/A$. Pomocí rotační a dipólové síly lze tuto veličinu vyjádřit jako $g = 4R/cD$.

Teoretický výpočet cirkulárního dichroismu vychází z výpočtu rotační síly a řídí se Rosenfeldovou rovnicí: $R = \mathrm{Im}\ \{\boldsymbol{\mu}^{if} \cdot \boldsymbol{m}^{if}\}$, kde Im znamená imaginární část skalárního součinu a vektory $\boldsymbol{\mu}^{if}$ a $\boldsymbol{m}^{if}$ jsou odpovídající elektrický a magnetický tranzitní dipólový moment pro přechod ze stavu i do stavu f. Můžeme si představit že vektor elektrického momentu $\boldsymbol{\mu}^{if}$ reprezentuje lineární posun nábojového mraku v průběhu přechodu (směr a velikost). Vektor magnetického tranzitního momentu $\boldsymbol{m}^{if}$ pak představuje analogickou rotaci náboje v průběhu přechodu. Z Rosenfeldovy rovnice plynou dva důležité závěry: (a) protože nábojová hustota je určena strukturou molekuly, je strukturou molekuly určena i rotační síla a v důsledku toho i optická aktivita včetně cirkulárního dichroismu; (b) Skutečnost, že rotační síla je dána jako skalární produkt stanoví, že rotační síla je pseudoskalár, tj. kromě velikosti disponuje i znaménkem. Hodnota R není dána pouze velikostí obou tranzitních momentů, ale také jejich vzájemnou orientací – úhlem, který v prostoru svírají. Odtud pochází enormní citlivost chiroptických metod i k malým změnám geometrického uspořádání studovaných systémů. A navíc rotační síla může nabýt nenulových hodnot pouze když oba vektory jsou zároveň nenulové a nejsou navzájem kolmé. Ve strukturních termínech to znamená, že nenulové rotační síly mohou odpovídat pouze chirálním strukturám a také, že enantiomery pro odpovídající přechody vykazují navzájem opačné hodnoty rotačních sil. Teoretický výpočet cirkulárního dichroismu jak elektronového tak vibračního je na základě Rosenfeldovy rovnice alespoň v principu přímo proveditelný a je možné simulovat teoretická CD spektra. Moderní kvantověchemické programy obsahují možnost takové výpočty provádět jak pro ECD tak VCD. Stále však tyto vý-

počty zůstávají poměrně rozsáhlé a náročné. Výpočet ROA je rovněž proveditelný, je však obtížnější, protože přes formální podobnost jde o principiálně odlišný jev odrážející především polarizovatelnost molekul.

8.4 Varianty chiroptických metod

Koncepčně velmi jednoduchý chiroptický experiment představuje měření optické rotace vzorku, tj. měření úhlu stočení roviny polarizovaného světla při průchodu opticky aktivním prostředím. Za standardních podmínek je tento úhel charakteristickou veličinou a, pokud je vyjádřen jako molekulární vlastnost při vhodné vlnové délce (obvykle avšak nikoli nutně sodíkové D-čáře), představuje důležitou fyzikální konstantu, která charakterizuje příslušný chirální materiál. Byly činěny pokusy intrerpretovat tuto veličinu ve vztahu ke struktuře a je dokonce možné ji teoreticky vypočítat. Optická rotace měřená v závislosti na vlnové délce se stává spektrem optické rotační disperze (ORD), kterou je rovněž možné získat teoreticky. Po jistou dobu byla spektra optické rotační disperze hlavní metodou měření chiroptických vlastností pro účely strukturní analýzy a byla široce využívána zejména při studiu opticky aktivních ketonů. V dnešní době však byla víceméně opuštěna a nahrazena spektry cirkulárního dichroismu, která jsou matematicky ekvivalentní (CD a ORD křivky lze převádět jednu v druhou prostřednictvím Kronigovy-Krammersovy transformace), mají jednodušší tvar a snadněji se experimentálně získávají. Cirkulární dichroismus ať již elektronový nebo vibrační poskytuje informace o trojrozměrné struktuře molekul v jejich základním elektronovém stavu. Experimentální uspořádání pro měření CD může být jednoduše modifikováno (pouze změnou konfigurace detektoru) pro záznam cirkulárního dichroismu ve fluorescenci (tzv. FDCD – z anglického fluorescence detected circular dichroism). Přestože jde o rozdílnou metodu, poskytuje rovněž analogické informace – cirkulární dichroismus vzorku v základním elektronovém stavu. Je však možné měřit a interpretovat chiroptické vlastnosti vztažené k elektronově vzbuzeným stavům molekul – cirkulárně polarizovanou luminiscenci – CPL. V tomto případě je vzorek excitován nepolarizovaným zářením a signál luminiscence je analyzován na obsah kruhově polarizovaných složek. Bylo vyvinuto několik variant tohoto konceptu, avšak aplikace směřují spíše k analýze elektronové struktury excitovaných stavů nežli ke geometrické struktuře molekul. Chiroptické vlastnosti vibračních přechodů lze studovat nejen pomocí vibračního CD, ale také pomocí chirální varianty Ramanovy spektroskopie – Ramanovy optické aktivity (ROA). Tato metoda dosáhla praktické využitelnosti teprve nedávno, je však velmi slibná a podobně jako ve vztahu IR spektroskopie-Ramanova spektroskopie je s výhodou použitelná tam, kde VCD selhává, tj. při měření spekter v oblasti nízkých vlnočtů a ve vodných roztocích. ROA experiment je možné uspořádat několika navzájem neekvivalentními způsoby, které se liší jednak tím, zda budíme Ramanův rozptyl kruhově polarizovaným zářením (ICP) nebo analyzujeme rozptýlené světlo na obsah kruhově polarizovaných složek (SCP) a také geometrií uspořádání experimentu (dnes nejčastěji tzv. zpětný rozptyl - back scattering).

8.5 Aplikace chiroptických metod

Oblast strukturních aplikací chiroptických metod je rozsáhlá a lze říci, že se poslední dobou stále významě rozšiřuje. Nezastupitelnou úlohu má při přímém studiu chirálních sloučenin, protože alternativou je pouze buď anomální difrakce X záření, nebo převedení chirality na diastereoizomerní vztah, což však již není přímé studium. Detekce chirality a charakterizace enantiomerní čistoty je doménou již optické rotace a lze zde užít i ostatní chiroptické metody, zejména potřebujeme li jinou oblast vlnových délek, nežli sodíkovou D-čáru. Zajímavé využití představují chiroptické detek-

tory při HPLC separaci enantiomerů na chirálních nosičích. Jinak má ve strukturních otázkách optická rotace minimální využití. Chiroptické metody lze využít i při řešení otázek konstituce a nábojové (elektronové) struktury, např při detekci n-π* přechodů, které jsou z důvodu magnetického zákazu v absorpčních spektrech zpravidla velmi slabé, zatímco vykazují významné CD pásy (karbonylové sloučeniny, heterocykly).

Velmi důležitou aplikací je stanovení absolutní konfigurace, v poslední době často ve spojení s přímým výpočtem a simulací teoretického spektra, obvykle VCD nebo ROA. Existují představy, že stanovení absolutní konfigurace měřením a výpočtem chiroptických vlastností relativně rigidních farmaceuticky zajímavých preparátů by mohlo nahradit stále poměrně pracné stanovení absolutní konfigurace rentgenovou difrakcí. Dlouhodobou doménou chiroptických metod je studium konformace. Využívá se přitom měření teplotně závislého CD a měření serií modelových látek, často ve spojení s výpočty nebo molekulárními simulacemi. CD zde působí ve spolupráci s metodami o vyšším rozlišení jako NMR. Využívá se nedestruktivní povahy CD experimentu, rychlosti a relativní dopstupnosti i když za cenu nižšího strukturního rozlišení. CD se uplatňuje při studiu chromoforů zejména těch, které se uplatňují v živé hmotě jako stavební kameny biopolymerů. Zde máme zejména na mysli chirální karbonylové sloučeniny, amidy, peptidy, laktamy, laktony, aromáty, heteroaromáty, disulfidy. Studium biopolymerů v roztoku za relativně nízkých koncentrací je chiroptickým metodám vlastní. Základní referenční konformační analýza proteinů (procentické zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur) vychází z ECD dat a byla rozvedena do většího detailu aplikací vibrační optické activity. Při těchto analýzách se uplatňují metody statistické analýzy společných rysů a významných rozdílů v rozsáhlých souborech CD dat jako faktorová analýza, neuronové sítě apod. Obdobně přispívají chiroptická data ke konformační znalosti nukleových kyselin a sacharidů.

Nelze zapomínat ani na studium molekulárních komplexů a indukované optické aktivity, kdy sledujeme chiroptické vlastnosti nechirálních avšak spektroskopicky výrazných chromoforů (např. porfyriny) zabudovaných v interakci s chirální maticí biopolymeru. Indukovaná optická aktivita je potom indikátorem uspořádání achirálních chromoforů v celkové chirální supramolekule.

CD rovněž bylo a je využíváno ke studiu rovnováh několikasložkových systémů (např. chirální ionofory) I ke kinetickým studiím včetně rychlých reakcí sledovaných pomocí technik stopped-flow, případně T-jump.

9. SPEKTROSKOPIE VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU

doc. RNDr. Marie Urbanová, CSc.

Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
marie.urbanova@vscht.cz

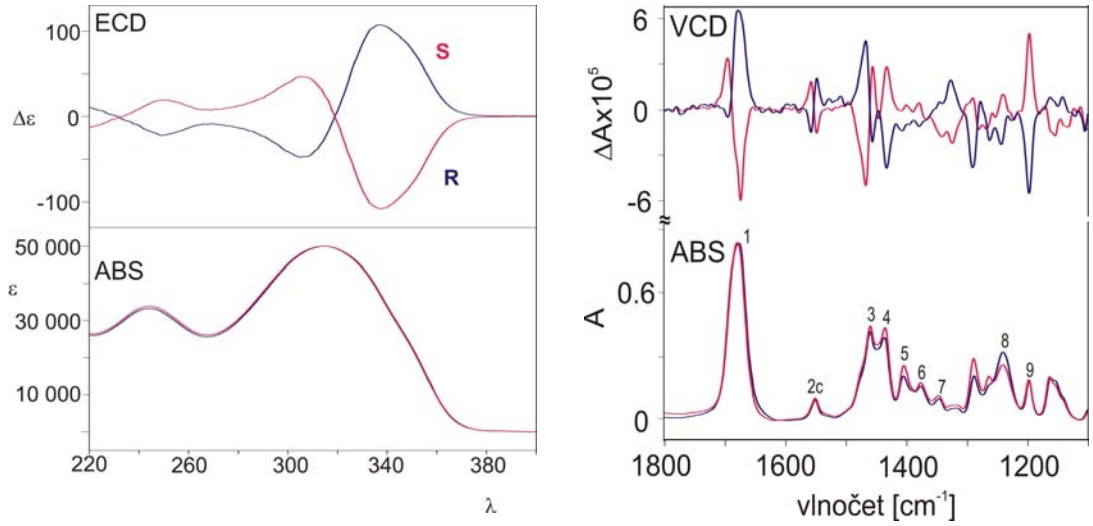
9.1 Úvod

Cirkulární dichroismus byl definován v předchozí kapitole jako rozdíl absorbance vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření. Absorpce infračerveného záření (IR) vyvolává přechody mezi vibračními hladinami studovaného molekulární systému, hovoříme pak o **vibračním cirkulárním dichroismu (VCD).** Setkáme-li se v literatuře s označením cirkulární dichroismus (CD), pak se s velkou pravděpodobností jedná o podstatně více rozšířenou spektroskopii cirkulárního dichroismu ve viditelném (VIS) a ultrafialovém (UV) oboru spektra, kdy dochází k přechodům mezi elektronovými hladinami. Konzistentně s označení vibračního cirkulárního dichroismu je tato spektroskopie přesněni označovaná jako spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu (ECD). Komplementarita a rozdílnost obou spektroskopií jsou znázorněny na obr. 9.1. Zatímco spektroskopie ECD spíše odráží vlastnosti celé molekuly, resp. chromoforu, VCD má spíše lokální charakter, protože infračerveným "chromoforem" může být vibrace lokalizovaná v molekule (charakteristická vibrace). Výhodou VCD je, že každá chirální sloučenina vykazuje VCD, zatímco ECD je pozorovatelné pouze v případě, kdy molekula nebo molekulární systém obsahuje chromofor.

Wavelength	200 nm	400 nm		800 nm	1 μm	10 μm
Wavenumber	5×10^4				1×10^4	1×10^3 /cm^{-1}
Type of radiation	UV	VIS			IR	
Transitions	Electronic				Vibrational	
Spectroscopy	Electronic circular dichroism ECD				Vibrational circular dichroism VCD	
Signal observed for	UV-VIS chromophores e.g. aromatics				all compounds	

Obr. 9.1: ***Srovnání spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu a vibračního cirkulárního dichroismu***

Vzhledem k tomu, že nelineární molekula o N atomech má $3N - 6$ normálních vibračních modů, je vibrační spektrum a tedy i spektrum VCD bohatší na jednotlivé pásy, než je tomu v případě ECD. Zároveň však je poměr signálu VCD a příslušné absorbance menší než ve spektrech ECD. Porovnání spekter ECD a VCD spolu s příslušnými absorpčními spektry distamycinového derivátu Trögerovy báze je ukázáno na obr. 9.2.



Obr. 9.2: ***Srovnání spekter ECD a VCD pro roztoky enantiomerů distamycinového derivátu Trögerovy báze***

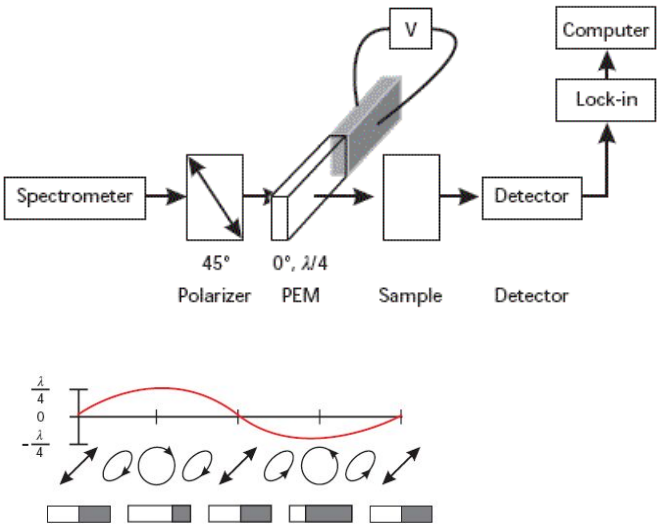
Pro svou experimentální náročnost je spektroskopie VCD podstatně méně rozšířená, než je tomu v případě spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu, která se rutinně používá v bio-chemických a biofyzikálních laboratořích již několik desítek let. První publikovaná měření spekter VCD pocházejí ze 70. let. Dlouhou dobu byla tato metodika výsadou několika málo laboratoří na světe. Od roku 1997 jsou spektrometry k měření VCD komerčně dostupné a v současné době je nabízejí čtyři významné firmy, Bruker, Biotools, Nicolet a Jasco. V současné době je experimentálně dostupná oblast 4 000-900 cm^{-1}, rutinně se měří VCD v oblasti 2 000-900 cm^{-1}, jsou ovšem publikovaná měření až do 6 150 cm^{-1} a v oblasti pod 600 cm^{-1}.

9.2 Metodologie měření vibračního cirkulárního dichroismu

Definice cirkulárního dichroismu jako rozdíl absorbance vlevo a vpravo $A_R(\nu)$ cirkulárně polarizovaného záření

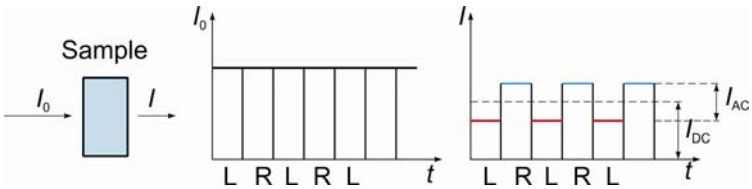
$$\Delta A(\nu) = A_L(\nu) - A_R(\nu) \tag{9.1}$$

by mohla vést k tomu, že získání spekter VCD spočívá ve změření absorbance vlevo cirkulárně polarizovaného záření $A_L(\nu)$ následované změřením absorbance vpravo cirkulárně polarizovaného záření $A_R(\nu)$ a jejich následného odečtení. Rozdíl absorbancí polarizovaných záření je pro obor vibračních přechodů o 4 až 6 řádu slabší než vlastní signály absorbance. Proto se ve spektroskopii VCD, stejně jako v ECD, tento sériový postup nepoužívá. Vyžadoval by spektrometry s velkou stabilitou měřicích systémů. Namísto toho se odezva na absorpci vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření měří synchronně a rozdíl absorbance se získává přímo za použití nejdůležitější části spektrometru pro měření cirkulárního dichroismu – fotoeleastického modulátoru. Zde se lineárně polarizované záření, získané předchozím průchodem polarizátorem, periodicky mění na vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření s frekvencí několika desítek kHz. Podstata spočívá v tom, že piezoelektricky řízený mechanický tlak způsobuje, že optický prvek fotoelastického modulátoru během jedné periody vytváří čtvrtvlnnou destičkou se zpožděním řádného a mimořádného paprsku $-\lambda/4$ a $+\lambda/4$ (obr. 9.3). Výsledkem je, že vystupující záření je střídavě vlevo a vpravo cirkulárně polarizované s frekvencí, na níž pracuje fotoelastický modulátor.



Obr. 9.3: ***Vznik vlevo a vpravo cirkulárně polarizovaného záření ve fotoelastickém modulátoru***

Po průchodu optický aktivním vzorkem, jehož absorpce je odlišná pro vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření, je polarizační modulace převedena na intenzitní modulaci (obr. 9.4). Rozdíl v intenzitě pro obě vpravo (R) a vlevo (L) cirkulárně polarizovaná záření je detekován fázově citlivou detekcí v tzv. lock-in zesilovači.



Obr. 9.4: ***Polarizační modulace je po průchodu vzorkem převedena na intenzitní modulaci***

Za použití vztahu mezi intenzitami záření dopadajícími na vzorek a prošlé vzorkem, I_0 a I, a absorbance A

$$I / I_0 = 10^{-A} \tag{9.2}$$

dostáváme pro intenzitu prošlou opticky aktivním vzorkem

$$I = I_{0R} 10^{-A_R} + I_{0L} 10^{-A_L} \tag{9.3}$$

kde intenzity I_{0L} a I_{0R} jsou intenzity dopadající na vzorek, jejichž cirkulární polarizace vpravo a vlevo je modulovaná s fází α:

$$I_{0L} = (I_0/2)(1+\sin\alpha),\ \ I_{0R} = (I_0/2)(1-\sin\alpha) \tag{9.4}$$

Po dosazení (9.4) do (9.3) dostáváme, že intenzita prošlá vzorkem má nemodulovanou a modulovanou část I_{DC} a I_{AC}:

$$I = I_0 \frac{10^{-A_R} + 10^{-A_L}}{2} + I_0 \frac{10^{-A_R} - 10^{-A_L}}{2} \sin\alpha = I_{DC} + I_{AC} \tag{9.5}$$

Po matematické úpravě dostáváme pro poměr nemodulované a modulované části intenzity vztah

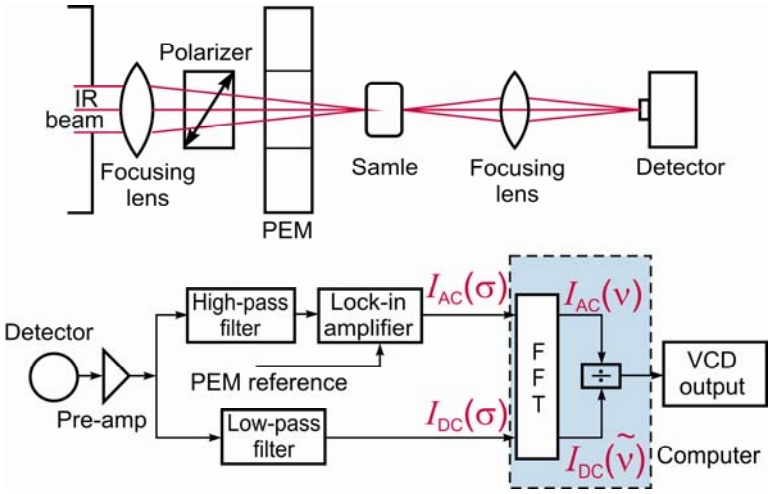
$$\frac{I_{AC}}{I_{DC}} = 2J_1(\alpha_0)[1.15(A_L - A_R)]\, g \tag{9.6}$$

kde $J_1(\alpha_0)$ je Besselova funkce 1. řádu a g je instrumentální faktor. Průběh $2J_1(\alpha_0)\, g$ získáme kalibrací (odd. 9.3). Pro malé hodnoty rozdílu $A_L - A_R$ dostáváme, že cirkulární dichroismus je úměrný poměru modulované a nemodulované intenzity:

$$\boxed{\Delta A = A_L - A_R \sim \frac{I_{AC}}{I_{DC}}} \tag{9.7}$$

Experimentální získání spektra cirkulárního dichroismu spočívá v měření nemodulované a modulované intenzity I_{DC} a I_{AC} doprovázené kalibrací a je založeno na vztahu (9.7).

Zatímco spektrometry pro měření spekter ECD jsou budovány výlučně (téměř) jako disperzní, tj. používají k spektrálnímu rozkladu záření disperzní prvky, většinou hranoly, spektrometry pro měření VCD jsou budovány jako disperzní, kdy využívají ke spektrálnímu rozkladu záření mřížky, nebo jako přístroje s Fourierovou transformací (FT). Funkční disperzní přístroje byly postaveny v několika laboratořích na světě jako speciální zařízení používaná k měření omezených částí spektra, např. oblasti zahrnující amid I a amid II, nebo oblast valenčních vibrací C-H, O-H. Přístroje s Fourierovou transformací mají známé výhody plynoucí z toho, že na vzorek dopadá větší energie, protože dopadající záření není spektrálně rozkládáno, neprochází štěrbinami a optická dráha obsahuje méně optických elementů. Většího rozlišení se dosáhne delší dráhou pohybujícího se zrcátka v interferometru. Všechna dosud dostupná komerční zařízení k měření VCD využívají Fourierovu transformaci. Schéma optické a elektronické části přístrojů FT VCD je na obr. 9.5.



Obr. 9.5: ***Optické a elektronické schéma části spektrometru VCD s Fourierovou transformací, která navazuje na Michelsonův interferometr***

V optické části spektrometru je IR-záření produkované běžným zdrojem IR-záření nejdřív v Michelsonově interferometru modulováno a potom přivedeno do nástavce určeného k měření VCD. Optický filtr s dolní propustí zabraňuje tomu, aby detektor byl přesycen širokým oborem frekvencí. Kombinace lineárního polarizátoru a fotoelastického modulátoru vytváří střídavě vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření s frekvencí, na níž pracuje fotoelastický modulátor, která je typicky desítky kHz a která je výrazně vyšší než obor používaných FT frekvencí. V této chvíli je záření dvojnásobně modulované - jednak intenzitně s frekvencí interferometru a jednak polarizačně s frekvencí fotoelastického modulátoru. Po průchodu opticky aktivním vzorkem je polarizační modulace převedena v intenzitní modulaci v důsledku toho, že opticky aktivního vzorek odlišně absorbuje vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření. Dvojím způsobem modulovaný svazek je fokusován na rychlý, kapalným dusíkem chlazený detektor. V elektronické části přístroje je signál zesílen a rozdělen na dva svazky. Jeden optický svazek je po průchodu filtrem s dolní propustí podroben FT a představuje „nemodulovaný“ signál I_{DC}. Druhý optický svazek je po průchodu filtrem s horní propustí přiveden do fázově citlivého detektoru (lock-in), který je naladěn na frekvenci fotoelastického modulátoru, a citlivě zesiluje slabý signál, který po FT odpovídá „modulované“ intenzitě I_{AC}. Poměr I_{AC} / I_{DC} je úměrný ΔA a je dále zpracován podle vztahu (9.7) na spektrum $\Delta A(\nu)$. Zpracování signálů se provádí pomocí programového vybavení počítače, který řídí experiment a provádí FT.

Spektrální obor a obor intenzit je pro spektroskopii VCD v porovnání s absorpční vibrační spektroskopií poněkud omezen. Spektrální omezení je dáno materiálem speciálních optických elementů, jako je fotoelastický modulátor, a také oborem citlivého rychlého detektoru. Vzhledem k malé intenzitě signálu VCD a velké citlivosti na zkreslení spektra v důsledku parazitních efektů, hlavně dvojlomu, je třeba měřit při optimálním optickém naladění přístroje. Současnými přístroji FT VCD se nejsnadněji získává spektrum VCD v oblasti 2 000-800 cm^{-1}, která je naštěstí pro většinu látek zároveň oblastí s velmi bohatým vibračním spektrem. Spektrometry s Fourierovou transformací v IR oboru jsou schopné snímat infračervené spektru v širokém dynamickém oboru. Pro měření VCD však celková absorbance měřeného vzorku musí zpravidla ležet v oblasti hodnot 0,1-1,0. Optimální hodnota absorbance je asi 0,4-0,6. Tato hodnota bývá dosahována kombinací vhodné koncentrace vzorku, tloušťky kyvety a vhodným rozpouštědlem. Ve spektroskopii VCD se používají tloušťky kyvet od 5 μm do několika mm. Jestliže měřený vzorek poskytuje spektrum s pásy velmi odlišných intenzit, musí být experimentem proveden pro několik kombinací koncentrace a tloušťky kyvety, aby se docílilo uspokojivého výsledku. Rozpouštědla běžně používaná pro měření VCD ve střední IR oblasti a příslušná „spektrální okna“ jsou uvedena v tab. 9.1. Měření VCD vyžaduje poněkud vyšší koncentrace, typicky ~ 0,05 až 1 mol l^{-1}. Vzhledem k tomu, že se používají kyvety s malou optickou tloušťkou, stačí malé objemy vzorku, typicky 50 až 100 μl, které obsahují ~ 1 až 15 mg látky. V závisti na použitém rozpouštědle mohou být vzorky po měření VCD znovu regenerovány.

Tab. 9.1: Rozpouštědla pro měření VCD ve střední IR oblasti a příslušná „spektrální okna“

Rozpouštědlo	Spektrální okno / cm^{-1}	Rozpouštědlo	Spektrální okno / cm^{-1}
CCl_4	2 000-850	DMSO-d_6	2 000-1 100; 970-700
CS_2	2 000-1 640; 1 350-700	methanol-d_6	2 000-1 200
$CHCl_3$	2 000-1260; 1 175-700	H_2O[a]	2 000-1 770; 1 525-1000
$CDCl_3$	2 000-975	D_2O	2 000-1 300; 1 100-800 [a]
propanol	2 000-1 500	trifluorethanol	2 000-1 500

[a] jen jestliže je použita kyveta o tloušťce < 6 μm a vyšší koncentrace

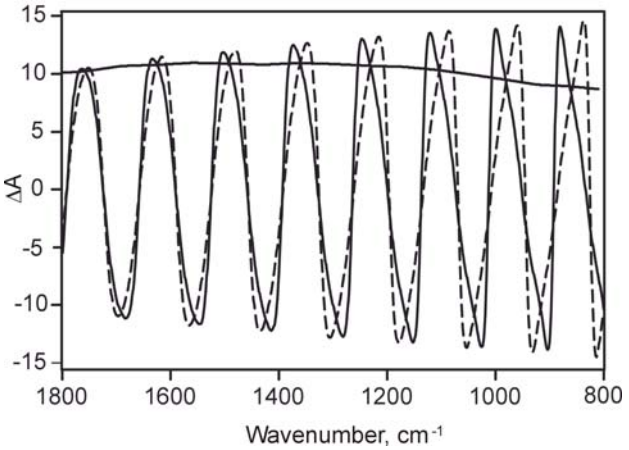
Samostatnou skupinou vzorků, pro které je měření VCD zvlášť přínosné, tvoří chirální biomolekuly a biologicky významné polymery, jako jsou cukry, polypeptidy, bílkoviny, DNA. V těchto případech bývá požadováno měření ve vodných roztocích. D_2O poskytuje výhodnější „spektrální okna“ ve střední IR oblasti než H_2O. Proto všude, kde je to možné, se provádí měření v D_2O. Měření v H_2O, vzhledem k vlastní vysoké absorpci ve střední IR oblasti, vyžaduje použití velmi tenkých kyvet, s nimiž se obvykle pracuje obtížněji.

9.3 Zpracování spekter vibračního cirkulárního dichroismu

Protože spektra CD se získávají jednopaprskovým měřením, jejich zpracování vyžaduje korekci na nulovou linii a intenzitní kalibraci. Řídicí počítače současných spektrometrů jsou vybaveny programovými procedurami, které umožňuji pohodlnou korekci na nulovou linii, průměrování spekter a další zpracování včetně převodu do požadovaných jednotek. Pro spektroskopii VCD se slabým signálem je typické získávání většího počtu spekter a jejich následné průměrování. Průměrování N spekter zlepšuje poměr signál/šum faktorem $\sqrt{N}$

Kalibrace intenzity

Spektroskopie VCD vyžaduje několik speciálních postupů, mezi nimi je nejvýznamnější intenzitní kalibrace. Ta se provádí pomocí pseudovzorku, který je tvořen kombinací čtvrtvlnné destičky a lineárního polarizátoru. Tato kombinace poskytuje pseudosignál CD nabývající hodnoty $\Delta A = \pm 1$ ve speciálních bodech spektra. Interpolace mezi těmito body pak poskytuje kalibrační křivku (obr. 9.6).



Obr. 9.6: Pseudosignál kalibračního vzorku. Průsečíky křivek jsou body s hodnotou signálu $\Delta A = \pm 1$. Jimi prochází kalibrační křivka získaná interpolací

Kalibrace pomocí kalibračního vzorku se rutinně provádí před každou sérií měření. Dalším účelem měření psoudovzorkuje získání fázové korekce potřebné pro FT signálu k získání I_{AC}. Korekce používané běžně pro FT absorpčních signálů, které mají stále stejné znaménko, selhává u spekter CD, které poskytují signály obou znamének. Absolutní kalibrace založená na měření kalibračního pseudovzorku vychází z prvotních fyzikálních principů a má proto jasné výhody. Intenzitní kalib-

race a fázová korekce se běžně provádí pomocí programového vybavení spektrometru a bývá při současné úrovni komerčních spektrometrů snadným úkonem.

Kromě toho se občas doporučuje ověřit funkci spektrometru VCD změřením vzorku, jejichž spektra byla získána pečlivým měřením v několika světových laboratořích a byla publikovaná. Spektra VCD těchto vzorků jsou známá s přesností několika procent v intenzitní škále (přesně na úrovni rozlišení ve škále frekvencí) a jsou obecně považována za standarty VCD. K těmto účelům se používá snadno dostupný (*S*)-(−)-α-pinen a (*R*)-(+)-α-pinen v oblasti pod 1 800 cm^{-1}, v oblasti vibrací X-H nad 2 000 cm^{-1} se používá roztok kafru v CCL_4. Roztok hovězího sérového hemoglobinu v D_2O se používá jako standard VCD pro měření vzorků ve vodných roztocích, které poskytují slabý signál VCD.

Korekce na nulovou linii

VCD je v porovnání s ECD ještě více citlivý na jakékoli změny stavu polarizace, které mohou nastat při průchodu paprsku spektrometrem. Dvojlom v optických materiálech čoček, filtrů, kyvet a dalších oken, a odrazy od povrchů všech prvků mohou způsobit artefakty, které jsou co do velikosti srovnatelné se signálem vzorku. Důsledkem je to, že základní linie se liší nulové hodnoty a korekce na nulovou linii by měla být prováděna pro každé měření VCD. V případě, že přístroj je dobře opticky naladěn, postačí korekci na nulovou linii provádět odečtením spektra příslušného rozpouštědla, které bylo měřeno ve stejné kyvetě a za stejných podmínek jako spektrum vzorku.

Další zdroje artefaktů se vztahuje k vlastní absorpci vzorku. V oblasti absorpčního pásu dochází k anomální disperzi, která může porušit rovnováhu při odezvě na vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření. K popsanému jevu dochází zejména v případě úzkých ostrých absorpčních pásů. Optimální základní linie se získá jako VCD spektrum racemátu stejné absorpce jako má měřený enantiomer. Ve skutečnosti jsou oba enantioméry měřených vzorků dostupné zřídka, zejména to platí pro biologicky důležité vzorky jako jsou bílkoviny, DNA, alkaloidy a podobně. V případě jakýchkoli pochyb o reálnosti naměřeného spektra VCD je třeba ověřit reálnost signálu například změřením série spekter o různé koncentraci.V poslední době se využívá experimentální metoda k redukci artefaktů, která spočívá ve využití dvou fotoelastických modulátorů; jeden je umístěn před vzorkem a druhý za ním.

Nejkvalitnější spektra VCD se získají, jsou-li dostupné oba enantioméry. Z principu CD plyne, že spektra CD příslušných enantiomerů, např. enantiomerů *S* a *R*, mají pro stejné koncentrace a stejné tloušťky kyvet stejný průběh CD spekter. CD spektra se liší pouze znaménkem, zatímco jejich absorbance jsou stejné:

$$A_S(\nu) = A_R(\nu) \tag{9.8}$$

$$\Delta A_S(\nu) = -\Delta A_R(\nu) \tag{9.9}$$

Experimentální spektra $\Delta A_S^{\exp}$, a $\Delta A_R^{\exp}$ v sobě obsahují spektrální distorzi způsobenou polarizačními a absorpčními artefakty $D(\nu)$, o které můžeme předpokládat, že je pro oba stejně absorbující enantioméry stejná:

$$\Delta A_S^{\exp}(\nu) = \Delta A_S(\nu) + D(\nu),\ \Delta A_R^{\exp}(\nu) = \Delta A_R(\nu) + D(\nu) \tag{9.10}$$

Ze vztahů (9.9) a (9.10) plyne, že součet experimentálních spekter obou enantiomerů poskytne dvojnásobnou hodnotu spektrálního průběhu distorze. V případě ideálního stavu by spektrální průběh $D(\nu)$ představoval nulovou linii. Poloviční součet experimentálních spekter opačných enantiomerů charakterizují poruchu spektra CD, která je způsobená měřícím zařízením a absorpčními artefakty, se považuje za tzv. „spektrum šumu“ $N(\nu)$.

$$N(\nu) = \frac{1}{2}\left(\Delta A_S^{\exp}(\nu) + \Delta A_R^{\exp}(\nu)\right) \tag{9.11}$$

Poloviční rozdíl experimentálních spekter obou enantiomerů pak poskytuje korigované spektrum jednoho enantiomeru, např. enantiomeru *S*.

$$\Delta A_S(\nu) = \frac{1}{2}\left(\Delta A_S^{\exp}(\nu) - \Delta A_R^{\exp}(\nu)\right) \tag{9.12}$$

Pro efektivní měření spekter VCD, která jsou z principu slabá a snadno ovlivnitelná artefakty, je třeba dodržovat protokol měření s přesnou dokumentací a stále ověřovat reálnost získaných slabých signálů. Spektra VCD měřená na spektrometrech s FT se měří v blocích zahrnujících tisíce měřených interferogramů a přestavují měřící čas typicky 20-30 min. Počet měřených bloků bývá 2 až 10 a je určen vlastní intenzitou signálu a žádanou úrovní signál/šum. Jednotlivé získané bloky mohou být testovány na stabilitu. V případě náhodné chyby mohou být některé bloky vyloučeny ze zpracování, a zbytek bloků použit. Měřící systém musí být natolik stabilní, aby bylo spektrum vzorku a základní linie získáno za přesně stejných podmínek, neboť v pouze v tomto případě je možné odečtením obou spekter získat korekci na nulovou linii.

Pokročilé metody zpracování

Důležitá část strukturních informací je ve spektroskopii VCD obsažena v intenzitách pásů a v celkovém tvaru spektra. Jednotlivé spektrální pásy vzorků v roztocích jsou rozšířené a mohou se překrývat, takže výsledné spektrum je superpozicí jednotlivých pásů. Tento obecný spektrální problém je závažnější v případě spektroskopií CD, protože intenzity blízkých sousedních pásů mohou mít opačné znaménko a mohou se efektivně v experimentálním spektru vyrušit. Spektra CD jsou obecně obtížněji rozložitelná do jednotlivých pásů, než je tomu v případě nepolarizovaných spektroskopií, kde intenzity všech pásů mají stejné znaménko. V omezených spektrálních oblastech, jako je např. amid I nebo valenční vibrace C-H, je možné experimentální spektrum rozložit do jednotlivých pásů s Lorenzovým, Gaussovým, nebo smíšený tvarem komerčně dostupnými programy, např. Grams. Optimalizované parametry spektrálních pásů pak souvisí s parametry přechodu. Integrovaná intenzita odpovídá rotační síle přechodu. Poloha pásu odpovídá energii přechodu. Výsledek optimalizační procedury, která představuje nelineární úlohu, je většinou velmi závislá na prvotním nástřelu. Při změně počtu optimalizovaných pásů a jiných parametrů se můžeme dostat ke zcela jiným výsledkům. Ke spolehlivým závěrům můžeme zpravidla dojít jen při pečlivém zpracování celých sérií spekter.

Experimentální spektra VCD jsou přirozeně často zatížená šumem. To může vést experimentátory k vyhlazování spekter. Je na místě zde varovat před těmito postupy, které jsou dnes možné pomocí běžně dostupných programů. Analýza spekter CD je kriticky závislá na tvaru spektra, další vyhlazovací postupy vedou k významné distorzi. V případě spekter CD je lepší je presentovat tak, jak byla naměřena, i když zašuměná, než publikovat vyhlazená, avšak ve svých informacích ochuzená spektra.

9.4 Vztah struktury a spektra CD

V kapitole 10 je teorie CD probírána podrobněji. Zde jen uvedeme stručně semiklasický postup, který dává do souvislosti strukturu molekuly a její spektrum CD.

Elektromagnetické záření je popsáno dvěma vektory, které popisují elektromagnetické pole, vektorem intenzity elektrického pole $\boldsymbol{E}$ a vektorem indukce magnetického pole $\boldsymbol{B}$. Tyto vektory jsou závislé a proto elektromagnetické záření je zcela popisováno jedním z těchto vektorů, např. vektorem $\boldsymbol{E}$. Vlevo a vpravo cirkulárně polarizované záření je popsáno komplexními polarizačními vektory

$$\hat{\mathbf{e}}_L = \frac{1}{\sqrt{2}}\{(0,1,i)\exp(i(kx-\omega t))\}, \qquad \hat{\mathbf{e}}_R = \frac{1}{\sqrt{2}}\{(0,1,-i)\exp(i(kx-\omega t))\} \tag{9.13}$$

kde k je vlnové číslo, ω je kruhová frekvence a t je čas.

Při interakci elektromagnetického záření s molekulou se uplatňují elektrické a magnetické vlastnosti molekuly, které jsou popsány elektrickým dipólovým momentem $\boldsymbol{\mu}$

$$\boldsymbol{\mu} = e\sum_i \boldsymbol{r}_i \tag{9.14}$$

a magnetickým dipólovým momentem $\boldsymbol{m}$

$$\boldsymbol{m} = \frac{e}{2m_e}\sum_i \boldsymbol{r}_i \times \boldsymbol{p}_i \tag{9.15}$$

Interakce elektromagnetického pole a molekuly je v kvantové mechanice popsána interakčním hamiltoniánem

$$\hat{H}^{\text{int}} = -\hat{\boldsymbol{\mu}} \bullet \boldsymbol{E} - \hat{\boldsymbol{m}} \bullet \boldsymbol{B} + \textit{vyšší řád} \tag{9.16}$$

kde $\hat{\boldsymbol{\mu}}$ a $\hat{\boldsymbol{m}}$ jsou operátory elektrického a magnetického dipólového momentu. V poruchové teorii je absorbance, která doprovází přechod z počátečního stavu $|i\rangle$ do konečného stavu $|f\rangle$, úměrná pravděpodobnosti přechodu, který je dán čtvercem maticového elementu interakčního hamiltoniánu:

$$A(|i\rangle \to |f\rangle) \sim P(|i\rangle \to |f\rangle) = k\left|\langle f|\hat{H}^{\text{int}}|i\rangle\right|^2 = k'(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b})^*(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b}) \tag{9.17}$$

kde $\boldsymbol{\mu}^{if}$ a $\boldsymbol{m}^{if}$ jsou maticové elementy operátorů elektrického a magnetického dipólového momentu mezi stavy $|i\rangle$ a $|f\rangle$, symbol • vyjadřuje znaménko skalárního součinu dvou vektorových veličin a k, k' jsou multiplikativní konstanty. Po úpravě, bereme-li v úvahu vztah mezi elektrickou a magnetickou složkou $\boldsymbol{e}$ a $\boldsymbol{b}$ elektromagnetického (nepolarizovaného) vlnění, dostáváme, že absorbance je úměrná tzv. síle oscilátoru D^{if}, tj. čtverci maticového elementu elektrického dipólového momentu, který je někdy označován jako transitní elektrický dipólový moment.

$$\boxed{A \sim D^{if} = \left|\boldsymbol{\mu}^{fi}\right|^2} \tag{9.18}$$

Z tohoto vztahu triviálně plyne, že absorpční spektrum je tvořeno pásy stejného (kladného) znaménka. Pro cirkulární dichroismus, tedy rozdíl absorpcí pro opačně cirkulárně polarizované záření, dostaneme

$$\Delta A = A_L - A_R =$$

$$= k'(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e_L} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b_L})^*(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e_L} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b_L}) - k'(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e_R} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b_R})^*(\boldsymbol{\mu}^{if} \bullet \boldsymbol{e_R} + \boldsymbol{m}^{if} \bullet \boldsymbol{b_R}) \tag{9.19}$$

Po úpravě, použijeme-li vyjádření polarizačních vektorů (9.13) a vztah mezi elektrickou a magnetickou složkou elektromagnetického záření, dostaneme, že CD je úměrný veličině označované jako **rotační síla přechodu**, která je dána imaginární částí skalárního součinu elektrického a magnetického transitního momentu.

$$\boxed{\Delta A \sim R^{if} = \mathrm{Im}\left[\boldsymbol{\mu}^{fi} \bullet \boldsymbol{m}^{if}\right]} \tag{9.20}$$

Z výrazu (9.20) plyne několik důsledků

1. Cirkulární dichroismus nabývá obou znamének, neboť skalární součin nabývá obou znamének podle úhlu, který spolu vektorové veličiny svírají. To je ve shodě s definicí CD jako rozdílu dvou veličin.
2. Velikost cirkulární dichroismu závisí na elektrickém a magnetickém transitním momentu přechodu $\boldsymbol{\mu}^{if}$ a $\boldsymbol{m}^{if}$ a jejich vzájemném směru.
3. Cirkulární dichroismu je nulový, jestliže elektrický a magnetický transitní moment $\boldsymbol{\mu}^{if}$ a $\boldsymbol{m}^{if}$ jsou k sobě kolmé.
4. Struktura molekul jednoznačně určuje rozložení náboje a tedy elektrický a magnetický transitní moment $\boldsymbol{\mu}^{if}$ a $\boldsymbol{m}^{if}$ a jejich vzájemný směr, a proto jednoznačně určuje velikost a znaménko CD. Spektrum CD je v prvním řádu určováno strukturou molekuly.

Z těchto vlastností a charakteristických rysů vibrační spektroskopie pak plyne využití VCD, jako jedné z důležitých metod studia struktury chirálních molekul.

9.5 Využití spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu

Spektroskopie VCD existuje jako spektrální technika od 70. let minulého století a její rozvoj přinesl řadu strukturních poznatků. Téměř od samého začátku byla spektroskopie VCD používána ve strukturních studiích chirálních molekul bez rozdílu jejich velikostí, od relativně malých organických molekul, přes rigidní alkaloidy až k biomolekulám včetně velkých biopolymerů jako jsou polypeptidy, bílkoviny nukleové kyseliny. Ačkoli VCD nepatří k metodám s velkým rozlišením, má ve srovnání se strukturními metodami první volby, rentgenovou strukturní analýzou a NMR, řadu výhod. Ve srovnání s rentgenovou strukturní analýzou nepotřebuje, aby látka vytvářela kvalitní krystal, protože měření VCD se provádí v roztocích. Semiempirická analýza spekter VCD pro vyžaduje několika hodin, zpracování na základě srovnání s *ab initio* výpočty trvá dny, u složitých problému týdny, zatímco zpracování na základě rentgenového měření trvá pro složité systémy měsíce až řádově rok. Ve srovnání s NMR je spektroskopie VCD výrazně méně náročná ve finančních požadavcích na pořízení aparatury, stejně tak zpracování NMR spektra složitých systému je náročné na čas, vzdělání a zkušenosti badatelů. Využití spektroskopie VCD shrneme do následujících bodů.

1. Určení absolutní konfigurace a detailních strukturních parametrů

VCD se stala spektroskopickou metodou schopnou přímo určit absolutní konfiguraci. Výhoda této metody se projevuje zejména tehdy, jestliže je chirální látka dostupná jen jako kapalná fáze nebo v roztoku a příprava monokrystalu pro rentgenovou strukturní analýzu není z nějakého důvodu možná nebo účelná. Výpočet VCD spektra k určení absolutní konfigurace vychází ze základních fyzikálních principů a není ovlivněno experimentem. V současné době převážně používá teoriích funkcionálu hustoty (density functional theory, DFT). Spektrum VCD je možné počítat komerčně dostupnými programy jako je Gaussian. Jediný empirický parametr, který se zavádí při porovnání vypočteného a experimentálního spektra je pološířka pásů simulovaného spektra. Do současné doby byla pomocí VCD určena absolutní konfigurace několika stovek chirálních molekul, mezi nimi mnoha farmaceuticky významných molekul nebo jejich chirálních prekurzorů. Podrobně je toto využití metody VCD pojednáno v kapitole 10.

2. Strukturní studie biomolekul v roztocích

Porovnáme-li mezi sebou obě metody CD, pak ECD je rozšířenější spektrální metodou využívanou při studiu biologicky významných chirálních molekul. Přesto, že bílkoviny, polypeptidy a DNA poskytuji v UV a VIS oboru jen několik málo přechodů, které se často silně překrývají, poskytla ECD spektroskopie řadu významných informací o sekundární struktuře polypeptidů a bílkovin a strukturách oligonukleotidů (jednovláklnové a vícevlaknové helixy) a závislosti těchto struktur na fyzikálně chemických podmínkách. Ačkoli spektroskopie VCD není zdaleka tak rozšířená jako ECD, dosáhla komplementárních pozoruhodných výsledků a poskytla řadu často detailních informací o struktuře polypeptidů, bílkovin, DNA a sekvenčních oligonukleotidů v roztocích.

Při studiu *polypeptidů a bílkovin* využívá VCD zejména vibračních přechody lokalizované v amidové skupině. Je to přechod označovaný amid I, který představuje hlavně valenční vibraci C=O, a amid II, který je především zpraženou deformační vibrací N-H a valenční vibrací C-N. Jestliže amidová skupina je deuterovaná, pak se příslušné přechody označují amid I´ a amid II´. Jednotlivé sekundární struktury polypeptidů, α-šroubovice, β-struktura a struktura obdobná polyprolinu II (někdy označovaná struktura náhodného klubka) mají zcela charakteristický průběh spektra VCD v oblasti amid I a amid II. Tyto dva přechody jsou velmi citlivé na strukturu biopolymerů a umožňují tak sledovat jemné změny v sekundární struktuře způsobené změněnou fyzikálně-chemických podmínek v roztocích. Další detailní strukturní studie jsou umožněny cílenou izotopickou substitucí: Využívají tak velkou citlivost vibrační spektroskopie na hmotnost jader.

VCD se také používá při studia přírodních *DNA a sekvenčních oligonukleotidů* a jejich komplexů s kovy. Přitom se využívají především dvě IR oblasti spektra: oblast 1 800-1 500 cm^{-1}, kde se nacházejí pásy přiřazené vibracím C=O a C=N bazí, a oblast 1 300-1 000 cm^{-1}, kde jsou pozorovány vibrace charakteristické pro fosfátovou skupinu PO_2^- cukr-fosfátové páteře.

3. Strukturní studie biologicky významných interakcí

Na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha se spektroskopie VCD úspěšně využívá při studiu strukturních změn, které jsou vyvolány interakcemi biologicky významných polymerů, polypeptidů a oligonukleotidů, s dalšími molekulami, např. porfyriny, bilirubinovámi pigmenty nebo farmakologicky významnými molekulami.

4. Strukturní studie supramolekulárních systémů

Většina aplikací CD v supramolekulární chemii, jichž jsou stovky, představuje využití spektroskopie ECD jako důkaz chirality systémů, popř. k charakterizování chirality potenciálně chirálních struktur. Konvergence amplitudy ECD pak je brána jako kritérium enantiomerní čistoty a naopak zmenšení signálu ECD vyvolané změnou fyzikálních podmínek jako ztrátu chirální struktury či enantiomerního přebytku. Přednosti VCD, které byly popsány, umožňují využití této spektroskopie ve všech situacích, kdy jsou v supramolekulární struktuře obsaženy chirální elementy, nebo když dochází k chirálnímu uspořádání chirálních či achirálních složek.

Prvním úspěšným zapojením VCD do supramolekulární chemie bylo spektrální charakterizování přechodu roztok-gel tetrabrucinového derivátu porfyrinu a nalezení teploty přechodu roztok-gel spektrální metodou VCD, které se uskutečnilo na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha.

Dalším uplatněním VCD v supramolekulární chemii je sledování dendritického efektu, dendrimerů s chirálním centrem a achirálními větvemi. Charakteristické vibrace lokalizované v chirálních větvích se při jejich zapojení do dendritických struktur stávají chirální. Jejich pozorování pomocí VCD tak dokazuje chirální uspořádání těchto obřích molekul.

Spojení experimentálního VCD a *ab initio* výpočtů umožnilo určit s překvapujícím rozlišením strukturu supramolekulárního tetrametru tvořeného čtyřmi binaftylovámi deriváty spojenými dvojicemi vodíkových vazeb.

Spektroskopie VCD ve spojení s *ab initio* výpočty byla dále použita k objasnění struktury supramolekulární struktury tvořené tetrametry guanosinových derivátů.

Zkratky

CD cirkulární dichroismus
ECD elektronový cirkulární dichroismu
IR infračervený
FT Fourierova transformace
FTIR Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací
UV ultrafialový
VCD vibrační cirkulární dichroismus
VIS viditelný

Literatura

Spektroskopie VCD, principy, přehledné články a kapitoly

L. A. Nafie, T. B. Freedman, in *Circular Dichroism. Principles and Applications*, *Vol.*, (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), John Wiley & Sons, Inc., **2000**, pp. 97-131.

P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. S. Ashvar, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *Faraday Discuss.* **1994**, 103-119.

L. A. Nafie, T. B. Freedman, *Enantiomer* **1998**, *3*, 283-297.

T. A. Keiderling, in *Circular Dichroism. Principles and Applications*, *Vol.*, (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), John Wiley & Sons, Inc., **2000**, pp. 621-656.

R. K. Dukor, L. A. Nafie, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, *Vol.*, (Ed.: R. A. Meyers), John Wiley & Sons Ltd, **2000**, pp. 662-676.

P. J. Stephens, F. J. Devlin, *Chirality* **2000**, *12*, 172-179.

T. B. Freedman, X. L. Cao, R. K. Dukor, L. A. Nafie, *Chirality* **2003**, *15*, 743-758.

M. Urbanová, P. Maloň, Circular dichroism Spectroscopy in *Analytical methods in Supramolecular Chemistry*, (Ed. C. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, Chapter 8, 265– 304.

Instrumentace VCD

L. A. Nafie, T. A. Keiderling, P. J. Stephens, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2715-2723.

L. A. Nafie, M. Diem, *Appl. Spectrosc.* **1979**, *33*, 130-135.

E. D. Lipp, C. G. Zimba, A. A. Nafie, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *90*, 1-4.

T. A. Keiderling, in *Practical Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, *Vol.*, (Eds.: J. R. Ferraro, K. Krishnan), Academic Press, San Diego, CA., **1990**, pp. 203-284.

T. A. Keiderling, in *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, *Vol.*, (Ed.: G. D. Fasman), Plenum Press, **1996**, pp. 555-598.

F. Long, T. Freedman, T. J. Tague, L. A. Nafie, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 508-511.

P. Maloň, T. A. Keiderling, *Appl. Optics* **1997**, *36*, 6141-6148.

M. Urbanová, V. Setnička, K. Volka, *Chirality* **2000**, *12*, 199-203.

L. A. Nafie, R. K. Dukor, J. R. Roy, A. Rilling, X. Cao, H. Buijs, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1245-1249.

Struktura biomolekuly

P. Pancoska, S. C. Yasui, T. A. Keiderling, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5917-5923.

M. Urbanová, R. K. Dukor, P. Pancoska, V. P. Gupta, T. A. Keiderling, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10479-10485.

V. P. Gupta, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **1992**, *32*, 239-248.

T. A. Keiderling, in *Biomolecular Spectroscopy, Part B*, *Vol.*, (Eds.: R. J. H. Clark, R. E. Hester), John Wiley, **1993**, pp. 267-314.

L. J. Wang, T. A. Keiderling, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*, 4127-4132.

M. Urbanová, P. Pancoska, T. A. Keiderling, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1203*, 290-294.

T. A. Keiderling, P. Pancoska, L. J. Wang, R. Dukor, M. Urbanová, *Biophys. J.* **1993**, *64*, A245.

V. Baumruk, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6939-6942.

T. B. Freedman, L. A. Nafie, T. A. Keiderling, *Biopolymers* **1995**, *37*, 265-279.

M. Urbanová, T. A. Keiderling, P. Pancoska, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *41*, 77-80.

P. L. Polavarapu, C. X. Zhao, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 727-734.

V. Andrushchenko, J. L. Mccann, J. H. van de Sande, H. Wieser, *Vib. Spectrosc.* **2000**, *22*, 101-109.

V. Andrushchenko, Z. Leonenko, D. Cramb, H. van de Sande, H. Wieser, *Biopolymers* **2001**, *61*, 243-260.

J. Kubelka, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6142-6150.

T. A. Keiderling, Q. Xu, *Adv. Protein Chem.* **2002**, *62*, 111-161.

V. Andrushchenko, H. V. de Sande, H. Wieser, *Biopolymers* **2003**, *69*, 529-545.

A. Synytsya, M. Urbanová, V. Setnička, M. Tkadlecová, J. Havlíček, I. Raich, P. Matějka, A. Synytsya, J. Čopíková, and K. Volka, *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 2391-2405

A. Polyanichko, H. Wieser, *Biopolymers* **2005**, *78*, 329-339.

Interakce biologicky významných molekul pomocí VCD

M. Urbanová, V. Setnička, V. Král, K. Volka, *Biopolymers* **2001**, *60*, 307-316.

J. Nový, M. Urbanová, K. Volka, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 1799-1810.

J. Nový, M. Urbanová, K. Volka, *J. Mol. Struct.* **2005**, *748*, 17-25.

L. Palivec, M. Urbanová, K. Volka, *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 536-545.

L. Palivec, M. Valík, V. Král, M. Urbanová, *Tetrahedron-Asymmetry* **2006**, *17*, 1049-1055.

M. Valík, J. Malina, L. Palivec, J. Foltýnová, M. Tkadlecová, M. Urbanová, V. Brabec, V. Král, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8591-8600.

J. Nový, M. Urbanová, K. Volka, *Vibrat. Spectr.* **2007**, *43*, 71-77.

J. Nový, M. Urbanová, *Biopolymers* **2007**, *85*, 349-358.

VCD v supramolekulární chemii

V. Setnička, M. Urbanová, S. Pataridis, V. Král, K. Volka, *Tetrahedron-Asymmetry* **2002**, *13*, 2661-2666.

V. Král, S. Pataridis, V. Setnička, K. Záruba, M. Urbanová, K. Volka, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5499-5506.

M. Urbanová, V. Setnička, F. J. Devlin, P. J. Stephens, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6700-6711.

V. Setnička, M. Urbanová, K. Volka, S. Nampally, J-M. Lehn, *Chem. Eur.* J. **2006**, *12*, 8735 – 8743.

U. Hahn, A. Kaufmann, M. Niefer, O. Julínek, M. Urbanová, F. Vogtle, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1237-1244.

10. VÝPOČTY CHIRÁLNÍCH VLASTNOSTÍ MOLEKUL A SIMULACE SPEKTER

doc. RNDr. Petr Bouř, CSc.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR a Vysoká škola chemicko-technologická Praha
bour@uochb.cas.cz

Zkratky

AAT atomový axiální tenzor
APT atomový polární tenzor, dipólové derivace
CAS complete active space (elektronových stavů)
CC coupled cluster, pokročilý druh CI
CI konfigurační interakce (např. CIS, CISD)
CNDO complete neglection of differential overlap
DFT density functional theory, teorie elektronové hustoty
DOG distributed origin gauge
GIAO gauge independent atomic orbitals, také "Londonovy orbitaly"
FCI full CI
HF Hartree-Fockova aproximace
IR infrared, zpravidla označuje infračervenou absorpční spektroskopii
MD molekulová dynamika
MFP magnetic field perturbation theory
MM molekulová mechanika
MP2 poruchová teorie Møllera a Plesseta v 2. řádu (podobně MP3, MP4, ...)
NMR nukleární magnetická rezonance
PCM polarizable continuum model
QM kvantová mechanika
SCRF self-consistent reaction field (pole rozpouštědla)
SP silové pole, matice druhých derivací
SR Schrödingerova rovnice
ROA Ramanova optická aktivita
TD DFT time dependent, časově závislá DFT
VCD vibrační cirkulární dichroismus

10.1 Interakce světla s molekulami

10.1.1 Fyzikální popis světla

Zopakujme si některé pojmy používané ve fyzikálním popisu světla. Samotná otázka "Co je světlo?" není nijak jednoduchá. Zaobíral se jí už Issac Newton (1642-1727) a navzdory mínění většiny současníků se držel korpuskulární teorie. Základem dnešního popisu jsou rovnice Jamese Clerka Maxwella (1831-1879), rozeznávající světlo jako druh elektromagnetického vlnění. Od zrodu kvantové mechaniky v 1. polovině 20. století ovšem víme, že i světlo má duální charakter: jednou se chová jako proud částic, "fotonů", jednou jako vlna.

Duální charakter světla v celistvosti popisuje kvantová elektrodynamika. Pro mnoho praktických aplikací, například pro výpočty absorpce a rozptylu světla na molekulách, je ovšem kvantový popis světla zbytečně složitý. Na druhou stranu, při spolehlivém předvídání vlastností molekul se bez kvantování neobejdeme. Proto se často při výpočtech mluví o *kvaziklasické aproximaci*, kdy se molekula popisuje "správně" kvantově a záření, vnější pole "klasicky", tj. podle Maxwellových rovnic.

Základní veličiny popisující maxwellovské elektromagnetické **pole** jsou: elektrická intenzita $\boldsymbol{E}$ a indukce $\boldsymbol{D}$, magnetická intenzita $\boldsymbol{H}$ a indukce $\boldsymbol{B}$. **Zdroji** pole jsou pak nábojová hustota ρ a proudová hustota $\boldsymbol{j}$. Veličiny spojené s určitým směrem v prostoru (vektory) označujeme tučným písmem. V moderním zápisu napíšeme Maxwellovy vztahy jako

$$\nabla \cdot \boldsymbol{D} = \rho \tag{10.1}$$

$$\nabla \times \boldsymbol{H} = \boldsymbol{j} + \frac{\partial \boldsymbol{D}}{\partial t} \tag{10.2}$$

$$\nabla \cdot \boldsymbol{B} = 0 \tag{10.3}$$

$$\nabla \times \boldsymbol{E} = -\frac{\partial \boldsymbol{B}}{\partial t} \tag{10.4}$$

První dvě "zřídlové" rovnice obsahují zdroje elektrického a magnetického pole, druhé dvě "vektorové" upravují vztahy mezi vektory. První rovnice nám říká, že elektrická indukce "vytéká" z uzavřené plochy uzavírající elektrický náboj, naopak třetí zapovídá existenci magnetického náboje (při nulové divergenci musí být siločáry $\boldsymbol{B}$ uzavřené, tj. nejjednodušším zdrojem magnetického pole je až magnetický dipól). Z druhé a čtvrté rovnice, které míchají elektrické a magnetické veličiny, můžeme odvodit existenci elektromagnetických vln; skutečně po zveřejnění rovnic (1864 a 1873) tyto vlny experimentálně prokázal Heinrich Hertz (v roce 1887).

Tyto čtyři rovnice však všechny veličiny jednoznačně neurčují. K tomu je musíme doplnit o **materiálové vztahy**:

$$\boldsymbol{D} = \varepsilon_r \varepsilon_0 \boldsymbol{E} \tag{10.5}$$

$$\mathbf{B} = \mu_r \mu_0 \mathbf{H} \tag{10.6}$$

Přísně vzato, měli bychom elektrickou permitivitu $(\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0)$ a magnetickou permeabilitu ($\mu = \mu_r \mu_0$) psát jako tenzory, spokojíme se však s výrazy pro izotropní prostředí. Ve vakuu jsou relativní veličiny rovny jedné $(\varepsilon_r = \mu_r = 1)$ a permitivita (ε_0) i permeabilita (μ_0) vakua jsou skaláry (čísla).

Jedna z možností řešení rovnic (10.1) až (10.6) spočívá v zavedení skalárního (φ) a vektorového ($\boldsymbol{A}$) potenciálu. Pokud je totiž zvolíme tak, že platí

$$\boldsymbol{E} = -\nabla \varphi - \frac{\partial \boldsymbol{A}}{\partial t} \tag{10.7}$$

$$\boldsymbol{B} = \nabla \times \boldsymbol{A} \tag{10.8}$$

budou dvě vektorové rovnice automaticky splněné pro libovolné funkce souřadnic $\varphi(\boldsymbol{r})$ a $\boldsymbol{A}(\boldsymbol{r})$. Jako obecné řešení zbývajících rovnic pak dostaneme retardované potenciály (v jednotkách SI):

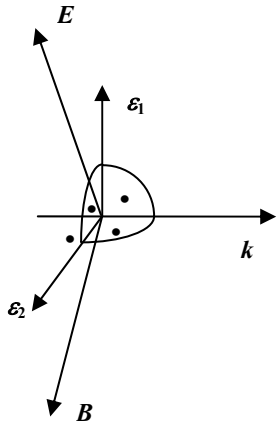
$$\varphi(r,t) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0}\int \frac{\rho(r',t-\frac{|r-r'|}{v})}{|r-r'|}\,\mathrm{d}r' \tag{10.9}$$

$$\vec{A}(r,t) = \frac{\mu_r\mu_0}{4\pi}\int \frac{\vec{j}(r',t-\frac{|r-r'|}{v})}{|r-r'|}\,\mathrm{d}r' \tag{10.10}$$

Například pro bodový náboj je $\varphi = q/(4\pi\varepsilon R)$, tj. dostaneme notoricky známý Coulombův zákon. Pokud nestudujeme mezihvězdné mlhoviny, určitě se u molekul nesetkáme s relativistickou retardací a ve výše uvedených výrazech nás bude zajímat nábojová a proudová hustota v jednom čase, $\rho(r',t) = \rho(r')$ a $\boldsymbol{j}(r',t) = \boldsymbol{j}(r')$. Musíme ovšem stále integrovat přes celý objem ($\mathrm{d}r'$), kde se náboj a proud vyskytuje.

10.1.2 Polarizované světlo

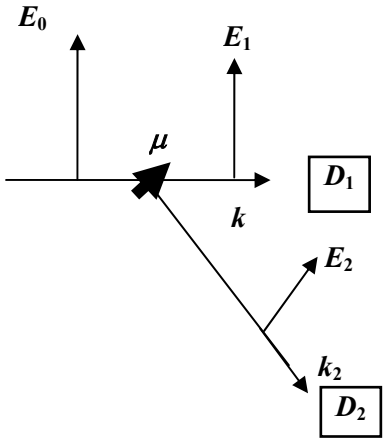
Pokud přeskočíme analýzy řešení Maxwellových rovnic, můžeme se spokojit s charakteristikou rovinné vlny, kterou v převážné většině spektroskopických experimentů světlo nahrazujeme. Světlo je pak plně charakterizováno směrem šíření, daným například směrem vlnového vektoru $\boldsymbol{k}$, a polarizací, danou polarizačními vektory $\boldsymbol{\varepsilon}_1$, $\boldsymbol{\varepsilon}_2$ kolmými na $\boldsymbol{k}$. Intenzity elektrického a magnetického pole jsou kolmé k sobě navzájem i k vektoru $\boldsymbol{k}$, a v čase se periodicky mění. Pokud ve svazku světla všechny fotony mají intenzitu $\boldsymbol{E}$ orientovanou např. ve směru $\boldsymbol{\varepsilon}_1$, mluvíme o záření polarizovaném *lineárně* nebo *rovinně*, neboť vektor $\boldsymbol{E}$ kmitá jen v rovině dané veltory $\boldsymbol{k}$, $\boldsymbol{\varepsilon}_1$. Takové záření dostaneme snadno pomocí laseru nebo po průchodu nebo odrazu opticky nehomogenním prostředí, polarizátorem. Obecně dochází k superpozici případů polarizovaných v obou směrech $\boldsymbol{\varepsilon}_1$, $\boldsymbol{\varepsilon}_2$. Například žárovka poskytuje světlo s náhodnou polarizací, tj. **nepolarizované**. Zvláštní případ je, když při kmitání světla složka intenzity např. ve směru $\boldsymbol{\varepsilon}_2$ zaostává za složkou ve směru $\boldsymbol{\varepsilon}_1$ takovým způsobem, že špička vektoru $\boldsymbol{E}$ opisuje při šíření spirálu, eventuelně při pohledu zepředu nebo zezadu kružnici. Získáme tak světlo *kruhově* polarizované. Podle směru rotace vektoru $\boldsymbol{E}$ pak rozlišujeme levo- a pravotočivé kruhově polarizované světlo. Pokud nejsou amplitudy obou složek $\boldsymbol{\varepsilon}_1$, $\boldsymbol{\varepsilon}_2$ stejně velké, $\boldsymbol{E}$ začne opisovat elipsu a světlo bude polarizované **elipticky**.



Pro rozpoznávání chirálních molekul má největší význam právě kruhová polarizace, neboť levo- a pravotočivě kruhově polarizované světlo má onu "šroubovou" symetrii, kterou se také liší levá a pravá ruka a která způsobuje rozdílnou interakci s podobně nesymetrickými systémy. Na závěr poznamenejme, že mimo uvedený popis polarizace se často používá ekvivaletní Stokesův formalismus, kde se charakteristika světla vyjadřuje pomocí čtyř parametrů, tzv. Stokesova vektoru.

10.1.3 Multipólový rozvoj

Studujeme-li vlastnosti molekul v laboratoři, zpravidla je zkoumáme ze vzdálenosti o hodně větší, než jsou jejich rozměry. Stejně tak vlnové délky světla, ať už infračerveného nebo ultrafialového, jsou větší než běžné molekuly. To umožňuje v konečném efektu zjednodušit matematický popis jejich interakce se zářením. Například ve vztahu (10.10) nemusí být molekula reprezentována obecnou nábojovou hustotou ρ, závislou na všech bodech v prostoru, ale třeba jen nábojem nebo elektrickým dipólem. Klasický případ, kdy molekulu zastupuje dipól $\boldsymbol{\mu}$ indukovaný dopadajícím světlem s intenzitou $\boldsymbol{E}_0$, je znázorněn zde na obrázku (měřitelná intenzita světla $I_0 = |\boldsymbol{E}_0|^2$). Za normálních okolností platí lineární vztah:



$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\alpha} \cdot \boldsymbol{E} \qquad (10.11)$$

kde $\boldsymbol{\alpha}$ je elektrická polarizovatelnost molekuly (tenzor). Pokud se část záření dipólem $\boldsymbol{\mu}$ absorbuje, podobně jako např. záření televizní anténou, intenzita za vzorkem $\boldsymbol{E}_1$ bude menší a na detektoru $\boldsymbol{D}_1$ můžeme sledovat absorpci záření dané vlnové délky vzorkem. Pokud můžeme vlnovou délku záření procházejícího vzorkem plynule měnit, získáme takto absorpční spektrum vzorku. Naše "anténa" může ovšem také záření vysílat a za příznivých okolností můžeme na detektoru $\boldsymbol{D}_2$ sledovat rozptýlené záření, například Ramanův rozptyl.

Předpovídání toho, jak molekuly interagují se světlem, se tedy dá redukovat na výpočty např. molekulových dipólů a polarizovatelností, eventuelně jejich závislosti na vlnové délce. Nejdůležitější multipóly, které lze potkat v teorii spektroskopie chirálních sloučenin, jsou (sčítá se přes všechny náboje i, tj. jádra a elektrony):

(náboj, monopól) $$q = \sum_i q_i \qquad (10.12a)$$

(elektrický dipól) $$\boldsymbol{\mu} = \sum_i q_i \boldsymbol{r}_i \qquad (10.12b)$$

(elektrický kvadrupól) $\boldsymbol{\Theta} = \sum_i q_i \boldsymbol{r_i} \cdot \boldsymbol{r_i}$ (10.12c)

(magnetický dipól) $\boldsymbol{m} = \frac{1}{2} \sum_i q_i \boldsymbol{r_i} \times \boldsymbol{v_i}$ (10.12d)

kde $\boldsymbol{r_i}$ a $\boldsymbol{v_i}$ je poloha a rychlost částice.

10.2 Hlavní metody výpočtů vlastností molekul

Současný aparát výpočetní chemie nabízí širokou škálu možností, jak molekulové systémy modelovat. Podle základního filosofického přístupu je můžeme rozdělit na tzv. metody **empirické**, kdy do výpočtů už na počátku vstupuje mnoho experimentálních nebo odhadnutých parametrů charakteristických pro modelovaný systém. Například pokud atomům vodíku a kyslíku přiřadíme nějaké parciální náboje, můžeme potom modelovat elektrickou permitivitu kapalné vody. Druhou skupinu tvoří tzv. metody *ab initio*, kde se vlastnosti odhadují z "prvotních principů", tj. jenom z pohybových rovnic, vycházejících z kvantové mechaniky. Na atomy a molekuly je pohlíženo jako na soustavu jader a elektronů. Takové rozdělení je samozřejmě velmi přibližné a mezi oběma metodami existuje široká šedá zóna metod **semiempirických**.

Fyzikální podstatu výpočtů lépe vystihuje jiné rozdělení, které se ovšem v praxi s tím předchozím téměř překrývá, a to sice na výpočty pomocí **molekulové mechaniky nebo dynamiky** (MM, MD) a na metody založené na **kvantové mechanice** (QM). První skupina je založena na pohybových rovnicích Isaaca Newtona (1642-1727), tedy na předpokladu, že zrychlení tělesa ($\boldsymbol{a}$) je přímo úměrné síle ($\boldsymbol{F}$)

$$\boldsymbol{F} = m\boldsymbol{a} \tag{10.13}$$

Konstanta m je hmotnost. Přesně vzato tato tzv. klasická mechanika pro mikroskopické jevy, obzvláště pro chemické děje, neplatí. Mnoho jiných vlastností molekul se však dá s rozumnou přesností "klasicky" modelovat. Příkladem je konformační chování proteinů nebo interakce enzymů se substráty. Zopakujme, že síla působící na částici (každý atom) je

$$\boldsymbol{F} = -\frac{\partial V}{\partial \boldsymbol{r}} \tag{10.14}$$

tj. záporná derivace potenciální energie V podle polohy (gradient). Typickým potenciálem, se kterým se v MM výpočtech můžeme setkat, je např. tento

$$V = \sum_{i,j=1,N,i<j} 4\varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] + \sum_{\text{vazby},i} k_i\left(d_i - d_{0i}\right)^2 + \sum_{\text{úhly},i} k_{\alpha i}\left(\alpha_i - \alpha_{0i}\right)^2 +$$
$$+ \sum_{\text{torzní úhly},i} A_{1i}\cos(n_i\tau_i) + \sum_{i,j=1,N,i<j} \frac{1}{4\pi\varepsilon}\frac{Q_iQ_j}{r_{ij}} \tag{10.15}$$

kde poznáváme dispersní van der Waalsovu interakci s parametry ε_{ij} a σ_{ij} pro každou dvojici atomů, harmonický potenciál pro deformaci vazebných délek a úhlů (od rovnovážných poloh d_{0i} a α_{0i}), goniometrickou část pro změnu torzních úhlů a nakonec coulombickou interakci atomů. Všechny

parametry v MM potenciálech tvoří tzv. **silové pole**, a získává se nejrůznějšími způsoby, od kvantových výpočtů přes extrapolaci experimentálních dat po pouhý odhad. Zpravidla se MM metodami myslí výpočty, kde nevystupuje čas, např. rovnovážné geometrie, a v MD se systém nechá vyvíjet v čase. Jako příklad mnoha volných nebo komerčních MD/MM programů uveďme GROMOS, MM2, MM3, produkty firmy Biosym, Tinker, CHARMM, apod.

Kvantové metody jsou založeny na více nebo méně přesném řešení Schrödingerovy rovnice (Erwin Schrödinger, 1887-1961),

$$\hat{H}\psi = i\hbar\dot{\psi} \tag{10.16}$$

(případně relativistické extenze, Diracovy rovnice), kde $\hat{H}$ je Hamiltonův operátor, Hamiltonián a ψ je vlnová funkce systému. Podle postulátů kvantové teorie popisuje vlnová funkce všechny vlastnosti každého systému. Její nultá, první a druhá derivace je spojitá, konečná, jednoznačná a obecně komplexní. Kvantová mechanika platí pro mikrosvět a Newtonovy rovnice jsou v případě makroskopických objektů její limitou. Protože žijeme v makrosvětě, některé kvantové vlastnosti hmoty jsou pro nás těžko pochopitelné. Např. nikdy nemůžeme přesně určit současně polohu a rychlost částice (atomu, elektronu).

Typický kantově-chemický výpočet sestává z těchto kroků:

1. Sestavení klasického Hamiltoniánu H (celkové energie systému).
2. Převedení H do operátorového tvaru.
3. Řešení Schrödingerovy rovnice a normalizace vlnové funkce ψ.
4. Získání libovolné vlastnosti systému z ψ jako střední hodnoty.

Přesné řešení Schrödingerovy rovnice je možné jen v několika málo případech. Pro molekuly se musíme uchýlit k přibližným postupům, např. Hartree-Fockově (HF) aproximaci, ze které se lze systematickým zlepšováním (např. pomocí metod MP2, MP4, CIS, CISD, CC, FCI) přesnému řešení přiblížit. Méně systematické, ale výpočetně efektivnější jsou metody založené na elektronové hustotě (DFT, density functional theory), např. "LSDA" nebo "Becke3LYP". Vlnové funkce se konstruují z konečného počtu tzv. atomových orbitalů. Pro pochopení základu všech kvantových výpočtů je nezbytné osvojit si následující schéma, tj. uvědomit si, že přesných výsledků (Schrödingerova limitu) dosáhneme jen postupnou iterací, kdy *současně* zkoušíme v rámci dostupných výkonů počítačů zlepšovat jak metodu, tak i orbitalovou bázi.

Velikost báze atomových orbitalů →

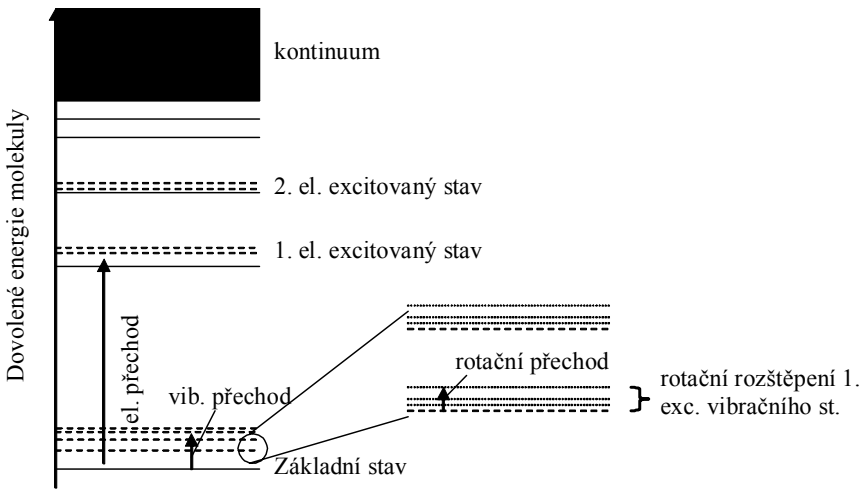
Metoda výpočtu ↓	**STO-3G**	**6-31G**	**6-311++G****	**AUG-cc-pVTZ**	**...**	**∞**
CNDO, PM3						
HF, LSDA						
MP2, Becke3LYP						
CISD						
CCSD						
CCSDT(Q)						
...						
FCI						**SR**

Za všechny dostupné kvantově-chemické programy uveďme GAUSSIAN, TURBOMOLE, MOLPRO, DALTON, SPARTAN, CADPAC, ADF a GAMMES.

10.3 Simulace spekter

10.3.1 Vibrační stavy molekul

Schrödingerova rovnice dovoluje změnu energie molekuly jen po disktrétních kvantech a odpovídající změny můžeme zhruba rozdělit na přechody rotační, vibrační a elektronové, neboť tyto energie jsou zpravidla řádově odlišné, $\Delta E_{\mathrm{ROT}} << \Delta E_{\mathrm{VIB}} << \Delta E_{\mathrm{EL}}$:



Obr. 10.1: Zjednodušené schéma molekulárních energií

Pro vibrační přechody musíme vyřešit Schrödingerovu rovnici s Hamiltoniánem pro jádra:

$$H = \sum_J \frac{P_J^2}{2M_J} + V(R_1, R_2 ... R_M) \tag{10.17}$$

kde potenciál v nejjednodušší,aproximaci, tzv. **harmonickém přiblížení**, je kvadratická funkce výchylek jader od jejich rovnovážných poloh R_I^0:

$$V(R_1, R_2 ... R_M) \approx \frac{1}{2} \sum_{\beta=x,y,z} \sum_{K=1}^{M} \sum_{\alpha=x,y,z} \sum_{J=1}^{M} \frac{\partial^2 V}{\partial R_{J,\alpha} \partial R_{K,\beta}} (R_{J,\alpha} - R_{J,\alpha}^0)(R_{K,\beta} - R_{K,\beta}^0)$$

Druhé derivace potenciálu tak mají zásadní význam pro simulaci infračervených spekter a označují se také jako silové pole (force field), matice silových konstant, nebo **Hessián**. Výpočet Hessiánu bývá pro nejpoužívanější metody (HF, MP2, DFT) implementován analyticky, což je obvykle rychlejší a přesnější; vždy ho ale můžeme spočítat numerickou diferenciací gradientů nebo dvojnásobným numerickým derivováním energií.

Vibrační Schrödingerovu rovnici v harmonické aproximaci vyřešíme velice snadno - zavedením tzv. **souřadnic normálních módů** (*normal mode coordinates*), **Q**, spojených s kartézskými souřadnicemi lineární transformací, transformační matice se označuje jako matice **S : R = S · Q.** Úloha pak vede k diagonalizaci silového pole a molekula se chová jako soubor nezávislých harmonických oscilátorů.

Pro interpretaci vibračních spekter nás zajímají nejčastěji **fundamentální** přechody, kdy se kvantové číslo nějakého vibračního módu mění o jedničku ze základního stavu $n_j = 0 \rightarrow n_j = 1$. Metody *ab initio* obecně dávají poměrně dobré vibrační frekvence, tj. většinou můžeme na základě výpočtů říci, v oblasti jakých energií vibrují např. charakteristické skupiny v molekule. HF metoda zpravidla poskytuje harmonické frekvence *vyšší* než experimentální, často o 10 i více procent. To je velmi nepříjemné zejména pro vysokoenergetické vibrační módy jako valenční vibrace C-H, O-H nebo N-H (stretching), kde chyba činí i několik stovek cm^{-1}. Pokročilejší metody (DFT, MP2...) poskytují daleko přesnější frekvence.

10.3.2 Absorpční spektra

Zopakujme si některé základní pojmy z absorpční spektroskopie. Pokud na izotropní vzorek dopadá záření o intenzitě I_0, jeho intenzita I po průchodu vzorkem bude menší a poměr bude vyhovovat Lambertovu–Beerovu zákonu

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon c b \tag{10.18}$$

A je **absorbance** úměrná koncentraci látky c a tloušťce kyvety b; konstanta úměrnosti ε je **molární absorpční koeficient**. V rámci výše naznačené **dipólové aproximace** bude plocha absorpčního pásu ve spektru (tj. závislosti ε na vlnočtu) úměrná tzv. **dipólové síle** D_{12} příslušného přechodu ze stavu 1 do stavu 2 ($|1\rangle \rightarrow |2\rangle$) definované vztahem:

$$D_{12} = |\boldsymbol{\mu}_{1\rightarrow 2}|^2 \tag{10.19}$$

kde $\boldsymbol{\mu}_{1\rightarrow 2} = \langle 1|\boldsymbol{\mu}|2\rangle$ je tranzitní (přechodový) dipólový moment (integrál). Pro vibrační harmonické přechody ho můžeme získat jako

$$\boldsymbol{\mu}_{12} = \sqrt{\frac{1}{2\omega_k}} \sum_{J,\alpha} P^J_{\alpha\beta} S_{J\alpha,k} \tag{10.20}$$

kde $P^J_{\alpha\beta}$ je derivace β-složky molekulového dipólového momentu ($\beta = x,y,z$) podle α-výchylky jádra J z rovnovážné polohy, tj. tzv. tenzor dipólových derivací (dipole derivatives) nebo také atomový polární tenzor (atomic polar tensor). Polární tenzory je dnes možné získat pomocí většiny kvantově-chemických programů.

Příklad: typický výpočet vibračního spektra programem Gaussian

1. Zoptimalizujeme geometrii minimalizací energie na *stejné úrovni*, jako budeme počítat silové pole. Musíme zvolit správnou konformaci nebo více konformerů, což je pro mnoho systémů dost obtížný úkol. Začínáme tak vlastně "nelogicky" výsledkem celého procesu měření a simulace spektra, tj. strukturou studovaného systému. Viz klíčové slovo OPT v návodu k programu.

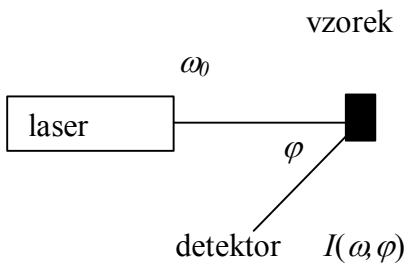
2. Spočteme harmonické silové pole (SP, matici druhých derivací energie) a atomový polární tenzor (APT). Výpočet v Gaussianu (klíčové slovo FREQ) pro základní metody zahrnuje vyčíslení těchto tenzorů automaticky a také diagonalizaci SP, tj. program vypíše harmonické frekvence. Podobně automaticky zkombinuje S-matici s APT, takže získáme i spektrální intenzity.

3. Pro některé experimenty potřebujeme spektra látek obsahujících minoritní izotopy. Jejich elektronová struktura však zůstává nezměněna, a tak např. pro záměnu $CH_3OH \rightarrow CH_3OD$ můžeme použít již spočtené silové pole metanolu a diagonalizaci provést se změněnými hmotnostmi izotopů, což je velice rychlý proces (na rozdíl od nového výpočtu matice druhých derivací).

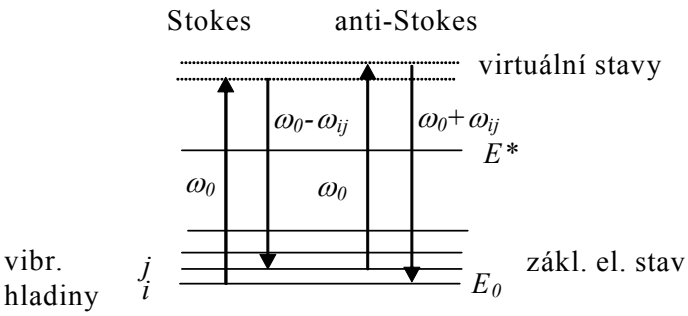
4. Pro posouzení kvality výpočtu je velmi užitečné simulovat celé spektrum a srovnat ho s měřeným signálem. Zpravidla neumíme spočítat šířku spektrálních čar, kterou v simulaci nastavíme podle experimentu.

10.3.3 Ramanova spektra

V Ramanově spektroskopii nás zajímá záření rozptýlené vzorkem. Zdrojem světla bývá viditelný nebo UV laser poskytující záření o vlnové délce okolo 500-800 nm.



Experimentální uspořádání můžeme klasifikovat podle úhlu mezi budícím a výstupním paprskem φ, nejčastěji se setkáme s $\varphi \rightarrow 0°$ (backscattering), $\varphi = 90°$ a $\varphi \rightarrow 180°$ (forward scattering). Ve spektru můžeme pozorovat Stokesovy a anti-Stokesovy linie podle toho, jestli zaznamenáváme frekvence menší nebo větší, než má budící záření. Pokud je energie budícího záření blízká energii nějakého elektronového přechodu ve studované molekule, $\hbar\omega_0 = E^* - E_0$, mluvíme o **rezonančním** Ramanově spektru (to nás dále zajímat nebude). Běžnější je ovšem **nerezonanční (obyčejný)** případ, kdy $\hbar\omega_0 < E^* - E_0$. Často se Ramanův rozptyl vysvětluje pomocí virtuálních hladin v molekule (ty skutečně mohou i v souladu s kvantovou teorií existovat, ovšem pouze na omezený čas). Po opuštění virtuální hladiny molekula vyzáří foton, jehož energie se od budícího liší. Tato odchylka odpovídá energetickému rozdílu počáteční a koncové vibrační hladiny.



Výpočty Ramanových spekter. Podobně jako u absorpčních spekter, i simulace Ramanových spekter neobyčejně usnadňuje vyhodnocení experimentálních dat. Vidíme, že přestože v experimentu používáme jako primární záření viditelné světlo, ve spektrech zaznamenáváme energii vibračních přechodů. Proto frekvence ramanovských pásů získáme, stejně jako pro absorpci, ze silového pole molekuly. Podobně jako v případě výpočtu intenzit absorpce, i zde můžeme molekulu považovat za dipól. Ramanova spektra ovšem nezaznamenávají, jak se mění dipólový moment při vibracích molekuly, ale změnu její **polarizovatelnosti**. Polarizovatelnost molekuly je obecně **závislá na frekvenci** záření, pro jednoduchost ji ale budeme označovat symbolem $\boldsymbol{\alpha}$, stejně jako **statickou** polarizovatelnost (pro neměnné pole) uvedenou výše. Intenzita Ramanova záření závisí na experimentálním uspořádání a polarizaci světla, pro příklad si uveďme bez odvození výraz pro zpětný rozptyl (backscattering):

$$I_{180} = k\,[7\alpha^{(i)}{}_{\alpha\beta}\,\alpha^{(i)}{}_{\alpha\beta} + \alpha^{(i)}{}_{\alpha\alpha}\,\alpha^{(i)}{}_{\beta\beta}] \tag{10.21}$$

kde k je konstanta (absolutní hodnota intenzity se zpravidla neměří) a

$$\alpha_{\alpha\beta}{}^{(i)} = \frac{\partial\alpha}{\partial q_i} = \sum_{\lambda,\gamma}\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial R_\gamma^\lambda}\frac{\partial R_\gamma^\lambda}{\partial q_i} = \sum_{\lambda,\alpha}\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial R_\gamma^\lambda}S_i^{\lambda\gamma} \tag{10.22}$$

je změna polarizovatelnosti způsobená změnou souřadnice normálního módu q_i. Vidíme, že tuto změnu získáme pomocí známé matice **S** (definující transformaci mezi kartézskými a normálními souřadnicemi) a kartézských derivací polarizovatelnosti. Již jsme uvedli, jak se spočítá statická polarizovatelnost, v nejhorším bychom tedy její derivaci (změnu podle souřadnic) uměli spočítat numerickou diferenciací. Tak se skutečně také někdy získává. Pro běžnější metody (DFT, HF, MP2) bývá implementován přímo analytický (poruchový, coupled-perturbed) výpočet derivací polarizovatelnosti.

Program Gaussian 98/03 např. pro HF-metodu počítá polarizovatelnosti a intenzity Ramanových spekter automaticky při výpočtu silových polí, podobně jako intenzity absorpčních spekter. Pro velké molekuly je ale výpočet derivací polarizovatelnosti velice náročný. Pro DFT a CC/CI metody je zřídka implementována analyticky a získá se numerickým derivováním. Některé programy (DALTON, nová verze Gaussianu) umožňují spočítat i frekvenčně závislou (a ne jen statickou) polarizovatelnost; v takových případech je možné zadat jako vstupní parametr frekvenci/vlnovou délku světla, které vyzařuje laser. Obvykle pro interpretaci Ramanova experimentu, podobně jako u infračervené absorpce, je přesnost výpočtu intenzit dostatečná a větší potíže působí určení frekvencí.

10.3.4 Vibrační cirkulární dichroismus

Vibrační cirkulární dichroismus (VCD, vibrational circular dichroism) je typická experimentální metoda, jejíž rozvoj je do velké míry závislý na výpočtech *ab initio*. Měří se zde rozdíl absorpcí (absorpčních indexů) pro levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované světlo

$$\Delta\varepsilon = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \tag{10.23}$$

Tento rozdíl je relativně velice slabý, $|\varepsilon_L - \varepsilon_R|/|\varepsilon_L + \varepsilon_R| \sim 10^{-4}$, ovšem poskytuje cennou dodatečnou informaci o struktuře molekul. Je totiž obvykle více než absorpční signál ovlivněn konformací molekul a také dokáže rozlišit optické antipody, jejichž VCD spektra jsou "zrcadlově" symetrická.

Jak vypočítat frekvence vibračních přechodů ze silového pole, to už víme. Poznamenejme jen, že pro interpretaci spekter musíme Hessián znát s daleko větší přesností než v případě absorpce, neboť tvar VCD spektra (znaménka a intenzity pásů) je dán jemným rozštěpením a pořadím vibračních přechodů. Např. silové pole spočtené na HF úrovni je pro interpretaci VCD spekter větších molekul zpravidla nepoužitelné.

Veličina, kterou potřebujeme znát pro modelování spektrálních intenzit, se nazývá **rotační síla přechodu** (*optical rotatory strength*) |0> → |1>, *R*, a je úměrná ploše cirkulárně dichroického pásu. Znovu zdůrazněme, že může být kladná i záporná. Je definována jako imaginární část skalárního součinu tranzitního integrálu elektrického a magnetického dipólového momentu:

$$R = \mathrm{Im} \langle 0|\mu|1\rangle . \langle 1|m|0\rangle \tag{10.24}$$

Již víme, že elektrický moment získáme z atomového polárního tenzoru a matice S. Analogicky, magnetický vibrační přechodový moment je možné vyjádřit jako součin matice S a *atomového axiálního tenzoru* A (atomic axial tensor, AAT):

$$\langle 1_k | m_\beta | 0_k \rangle = \sqrt{2\omega_k} \sum_{J,\alpha} S_{J\alpha,i} A^J_{\alpha\beta} \tag{10.25}$$

Jak název napovídá, AAT se transformuje opačně než souřadnice při inverzi souřadného systému, neboť obsahuje axiální ("nepravý") vektor - magnetický moment. Nejedná se o derivace molekulového magnetického momentu podle změny souřadnic jader, neboť ta je vždy nulová, ale AAT je úměrný (existuje několik definic AAT lišících se konstantním faktorem) derivaci magnetického momentu molekuly podle *hybností* jader:

$$A^J_{\alpha\beta} \propto \frac{\partial m_\beta}{\partial P_{J,\alpha}} \tag{10.26}$$

Hybnost jader je ovšem matematicky obtížně uchopitelná veličina - vzpomeňme na princip neurčitosti a nemožnost stanovit polohu i hybnost současně atd. Dokonce se ukazuje, že elektronová část AAT je v rámci Born-Oppenheimerovy aproximace nulová, což je výsledek, který je zjevně nefyzikální - při pohybu jader musí mít elektrony možnost se tomuto pohybu přizpůsobovat, a tím vyvolat nenulovou proudovou hustotu, a tedy i magnetický moment. Tento paradox byl rozřešen a pomocí Stephensovy teorie (magnetic field perturbation, MFP) nalezen výraz pro výpočet elektronové části AAT pomocí obvyklé elektronové funkce základního stavu ψ:

$$A^J_{\alpha\beta}(el.) = \left\langle \frac{\partial \psi}{\partial B_\beta} \middle| \frac{\partial \psi}{\partial R^J_\alpha} \right\rangle \tag{10.27}$$

Jedná se tedy o integrál derivace vlnové funkce podle intenzity magnetického pole a derivace podle změn poloh jader. Obě derivace se dají vypočítat běžnými metodami poruchového počtu (coupled-perturbed); ostatně seznámili jsme se s nimi již dříve. Jadernou část AAT vypočteme z atomových nábojů a poloh.

$$A^J_{\alpha\beta}(jad.) = \frac{i}{4} \sum_\gamma Z_J \varepsilon_{\alpha\beta\gamma} R^J_\gamma \tag{10.28}$$

Výpočet VCD intenzit ovšem trpí, podobně jako mnoho ostatních magnetických vlastností molekul, závislostí na souřadném systému. Historicky bylo navrženo několik způsobů speciálně pro VCD, jak tuto závislost odstranit, zmiňme např. tzv. distributed origine gauge (DOG) založený na transformaci počátku do poloh jader. V současné době je preferováno použití GIAO orbitalů, které současně odstraní tento problém i pro jiné magnetické veličiny, např. susceptibilitu a NMR parametry.

10.3.5 Ramanova optická aktivita (ROA)

Tato speciální spektroskopická metoda představuje analogii VCD spektroskopie pro Ramanova spektra, tj. měří se rozdílný rozptyl pro pravo- a levotočivě kruhově polarizované světlo:

$$\Delta I = I_{\mathrm{R}} - I_{\mathrm{L}} \tag{10.29}$$

Tento vztah je nutno chápat spíše symbolicky, neboť existuje mnoho variant ROA experimentu podle toho, jestli je polarizátor před vzorkem, nebo za ním, podle geometrie vstupního a výstupního paprsku apod.; také, na rozdíl od VCD, nelze měřit absolutní intenzity, podobně jako u obyčejných Ramanových spekter.

Metoda dosud není příliš rozšířena, přesto se objevují první komerční spektrometry a současně implementace výpočtů ROA intenzit v komerčních či volně dostupných kvantověchemických programech. Výpočet frekvencí je založen na výpočtu Hessiánu stejně jako u předcházejících metod monitorujících vibrační stavy molekul. Pro intenzity je kromě elektrické dipól-dipólové polarizovatelnosti α, kterou jsme již poznali, potřeba ještě derivace dvou dalších tenzorů, **elektrické dipól - elektrické kvadrupólové polarizovatelnosti** A a **elektrické dipól - magnetické dipólové polarizovatelnosti** G'**.** Poslední tenzor G' se někdy také nazývá **tenzor optické aktivity** a **tenzor optické otáčivosti**. Tyto tenzory popisují interakci molekuly s elektromagnetickým polem - v tomto případě viditelným světlem - a na rozdíl od "obyčejné“ polarizovatelnosti α jsou schopné vyjádřit rozdílnou odezvu izotropního vzorku na rozdílnou kruhovou polarizaci světla. Výpočet těchto tenzorů a zvláště jejich derivací je neobyčejně náročný a dosud nebyl implementován analyticky. Mnoho programů (Dalton, Cadpac, Gussian) je však dokáže spočítat pomocí numerického derivování.

10.3.6 Spektroskopie ve viditelné oblasti

Pro modelování spekter ve viditelné a UV spektroskopii potřebujeme znát excitované elektronové stavy molekul. Připomeňme, že Schrödingerova rovnice

$$H\,\varphi_{\mathrm{n}} = E_n\,\varphi_{\mathrm{n}} \tag{10.30}$$

dovoluje stavy s různou energií. Pro vysoké energie se počet stavů zhušťuje a energie se mění spojitě - ve spektru se to projeví jako **spojité** spektrum. V oblasti malých energií získáváme **diskrétní** spektrum složené z jednotlivých elektronových přechodů. Přesně bychom elektronové excitované stavy dostali přímo pomocí metody FCI. Přibližnou představu o elektronových excitovaných stavech (energiích, symetriích) dostaneme z CIS nebo CISD výpočtů. Ty lze zpřesňovat za pomoci pokročilejších metod (MCSCF, CAS, CASSD), jejichž použití je však poměrně náročné. Nejedná se obvykle o "černou skřínku" (black box), kdy zadáme jen vstupní souřadnice, ale metody např. vyžadují počáteční odhad Slaterových determinantů (konfigurací), které se v žádaném elektronovém excitovaném stavu nejvíce vyskytují. Často dobrou shodu vypočtených energií s experimen-

tem poskytují i semiempirické metody, ovšem optimalizované pro excitované stavy (CNDO-S aj.) a zpravidla jen pro úzkou třídu molekul.

Velmi nadějná alternativa k metodám založených na vlnové funkci je tzv. **časově závislá** (*time-dependent*) **teorie elektronové hustoty** (TD DFT). I za její rozpracování byla ostatně v roce 1997 udělena W. Kohnovi Nobelova cena. TD DFT využívá všech možností elektronové teorie, jako například soustavné vylepšování/ladění funkcionálů, a hlavní výhodou je pochopitelně její rychlost, a tím i dostupnost pro poměrně velké molekuly. Byla implementována pro výpočet absorpčních spekter stejně tak jako pro elektronový (UV-vis) cirkulární dichroismus (ECD, UVCD). Zopakujme si, že intenzita signálu je pro absorpční spektrum úměrná dipólové síle přechodu, $D_{ij} = |\langle i|\boldsymbol{\mu}|j\rangle|^2 = = \langle i|\boldsymbol{\mu}|j\rangle \cdot \langle j|\boldsymbol{\mu}|i\rangle$, a pro cirkulární dichroismus rotační síle přechodu $i \rightarrow j$, $R_{ij} = \mathrm{Im}\ \langle i|\boldsymbol{\mu}|j\rangle \cdot \langle j|\boldsymbol{m}|i\rangle$, které v tomto případě můžeme počítat rovnou z elektronových vlnových funkcí.

10.3.7 Modelování rozpouštědla

Většina molekulových výpočtů *ab initio* v minulosti vliv okolí ignorovala. Pro mnoho vlastností molekul je vliv okolí málo podstatný. Pro spolehlivé výsledky je ovšem nutné vliv rozpouštědla do výpočtu zahrnout nebo alespoň odhadnout, jakou nepřesnost by mohlo způsobit. Při modelování máme vždy možnost zahrnout rozpouštědlo *explicitně*, tj. obalit zkoumanou molekulu např. dostatečným množstvím molekul vody. To lze v praxi dělat jen omezeně.

Za kompromisní variantu můžeme považovat **implicitní** modely, kdy se zpravidla rozpouštědlo aproximuje **kontinuem**, např. dielektrikem (izolantem). Za první takový model, dodnes používaný, můžeme považovat dipólovou aproximaci (L. Onsager, 1936) kdy molekulu nahradíme bodovým dipólem a umístíme ji do kulové dutiny v dielektriku charakterizovaném hodnotou dielektrické konstanty (ε). Tato jednoduchost umožňuje model implementovat analyticky pro výpočet mnoha molekulových vlastností. Pro větší nebo složitější molekuly je však jeho použití zcela nesmyslné.

Dokonalejší přístupy modelují realističtěji tvar kavity, ve které se molekula nachází, podle molekulárního povrchu a lépe popisují i vzájemné působení elektrostatických polí molekuly a dielektrika. Mluvíme v takovém případě o *self-consistent reaction field* (SCRF), tj. molekula na povrchu nebo uvnitř dielektrika indukuje náboje, které zpětně působí na rozložení jader a elektronů v molekule, až se při řešení SR dosáhne konsistence, konvergence. Obecně se tyto metody také nazývají *polarizable continuum models* (PCM). Povrch dutiny se zpravidla popisuje konečným počtem elementárních plošek, které nesou parciální náboj.

Tyto modely jsou užitečné při modelování konformačních rovnováh, rozpouštěcích tepel i spektrálních vlastností. Zpravidla však nejsou schopny popsat vliv *silných* interakcí mezi molekulou a rozpouštědlem, především **vodíkových vazeb**. V takovém případě se doporučuje kombinovat implicitní a explicitní přístup, tj. uzavřít do dielektrické dutiny klastr, tj. komplex složený z molekul rozpouštědla i studované molekuly.

Literatura

Základní

Barron, L. D. *Molecular light scattering and optical activity*, Cambridge University Press, Cambridge **2004**.

Moore, W. J. *Fyzikální chemie*, SNTL Praha, **1976**.

Parr, R. G.; Yang, W. *Density functional theory of atoms and molecules*, Oxford University Press Oxford, **1989**.

Zahradník, R.; Polák, R. *Kvantová chemie: základy teorie a aplikace,* SNTL Praha 1985.

Kvasnica, J. *Teorie elektromagnetického pole*, Academia, Praha, 1985.

III, F.; Schreiner, P. R. (Eds) *The Encyclopedia of Computatinal Chemistry,* John Wiley & Sons, Chichester, **1998**.

Pokročilá

Formánek, J. *Úvod do kvantové teorie*, Academia Praha, **1983**.

Horák, Z.; Krupka, F. *Fyzika*, SNTL Praha, **1981**.

D. P. Craig, T. Thirunamachandran, *Molecular Quantum Electrodynamics, An Introduction to Radiation Molecule Interactions*, Academic Press, London, 1984.

Landau, L. D.; Lifšic, J. M. *Úvod do teoretickej fyziky 2 (Kvantová mechanika)*, Alfa Bratislava, **1982**.

Papoušek D.; Aliev, M.R. *Molecular vibrational rotational spectra*, Academia Prague, **1982**.

Seminario, J. M.; Politzer, P. *Modern density functional theory*, Elsevier Amsterdam, **1995**.

Pople, J. A.; Krishnan, R.; Schlegel, H. B.; Binkley, J. S. *Int. Quantum Chem. J.: Quantum Chem. Symp. 13,* 225, **1979.**

Schleyer, P., v. R.; Allinger, N. L.; Clark, T. ; Gasteiger, J.; Kollman, P. A.; Schaefer H.

Stephens, P. J. *J. Phys. Chem. 91,* 1712*,* **1987.**

11. RAMANOVA OPTICKÁ AKTIVITA – PROČ A NAČ ?

doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK
baumruk@karlov.mff.cuni.cz

11.1 Úvod

Na přelomu 60. a 70. let minulého století bylo na základě obecné teorie polarizačních vlastností Rayleighova (pružného) a Ramanova (nepružného) rozptylu světla chirálními molekulami ukázáno, že rozptýlené světlo obsahuje velmi slabou složku s kruhovou polarizací, a naopak že intenzita rozptylu dopadajícího pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného záření je poněkud rozdílná.[1] Tento objev vedl k rozvoji zcela nové chiroptické metody, která je nyní známa jako Ramanova optická aktivita (ROA) a která se rozvinula ve významnou spektroskopickou techniku aplikovatelnou na širokou škálu chirálních vzorků počínaje jednoduchými molekulami až po viry.[2]

ROA, která je ve své podstatě technikou diferenční spektroskopie, měří rozdíl v odezvě **chirální** molekuly vůči **pravotočivě** a **levotočivě kruhově polarizovanému záření**. Výsledkem měření ROA jsou vždy dvě spektra – vlastní ROA (tedy diferenční) spektrum a zdrojové Ramanovo (sumární) spektrum. V teorii ROA zavádíme bezrozměrnou veličinu Δ pojmenovanou **diferenční cirkulární intenzita** (*circular intensity difference*), která je definována jako podíl ROA ke zdrojovému Ramanovu signálu vztahem

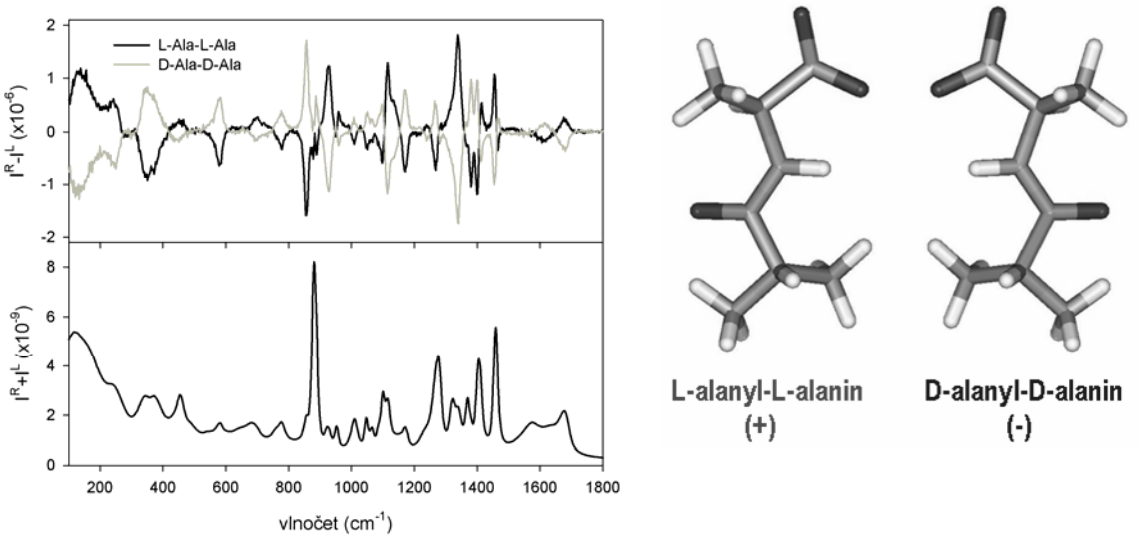
$$\Delta \equiv \frac{I^R - I^L}{I^R + I^L}$$

a kterou lze experimentálně určit na základě měření intenzity rozptylu dopadajícího pravotočivě (I^R) a levotočivě (I^L) kruhově polarizovaného záření. Tato veličina je analogem faktoru chirality g (*dissymmetry factor*), který je používán pro popis cirkulárního dichroismu (CD). Povšimněme si, že z historických důvodů ROA používá konvenci R minus L, zatímco CD konvenci opačnou (L minus R).

ROA je velmi slabým jevem, neboť Δ nabývá v nejlepším případě hodnot $\leq 10^{-3}$. Přitom i konvenční Ramanův jev má jako nepružný rozptyl velmi malý účinný průřez (z 10^6 rozptýlených fotonů je jen jeden rozptýlen nepružně). Experimentálně byla ROA prokázána v roce 1973,[3] avšak její rozvoj byl až do počátku 90. let 20. století výrazně omezen tehdejšími experimentálními možnostmi (jednokanálová detekce a měření spekter bod po bodu). Od počátku 90. let však díky pokroku v experimentální technice (především díky využití mnohokanálových CCD detektorů v Ramanově spektroskopii) nastal prudký rozvoj této metody, který byl završen v roce 2002, kdy se na trhu objevil první (a zatím jediný) komerční ROA spektrometr Chiral*RAMAN*™ od firmy BioTools.

Význam ROA tkví v tom, měří vibrační optickou aktivitu a poskytuje tedy ve srovnání se standardní chiroptickou technikou viditelného a ultrafialového cirkulárního dichroismu (ECD), který měří elektronovou optickou aktivitu, mnohem bohatší stereochemickou informaci. To je na první pohled zřejmé z ROA spektra l-alanylu-l-alaninu (obr. 11.1), kde pozorujeme ROA pásy téměř pro všechny pásy vibračního Ramanova spektra, přičemž znaménko a intenzita každého z nich odráží stereochemii včetně absolutní chirality té části molekuly, která se příslušné normální vibrace účast-

ní. ROA, podobně jako komplementární technika vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), sonduje stereochemii molekulárního skeletu přímo, zatímco elektronová optická aktivita sonduje stereochemii pouze nepřímo prostřednictvím chromoforu. Opticky aktivní molekuly, které postrádají elektronový chromofor, nelze zkoumat pomocí ECD, lze je ale zkoumat pomocí ROA a VCD.



Obr. 11.1: ***Zrcadlová symetrie dvou enantiomerů se odráží v zrcadlové symetrii jejich ROA spekter. Ramanovo spektrum (vlevo dole) a odpovídající ICP ROA spektrum (vlevo nahoře) 2M roztoku ve vodě L-alanyl-L-alaninu (černě) a D-alanyl-D-alaninu (šedě) měřená v geometrii zpětného rozptylu***

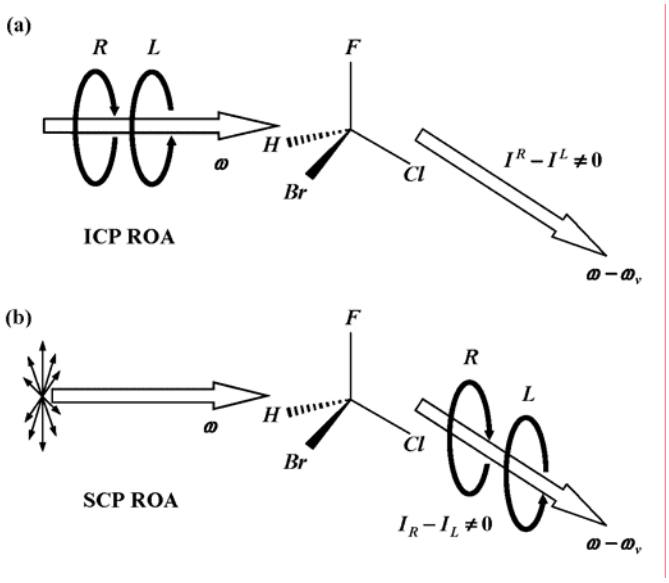
Událost rozptylu probíhá v časové škále ~10^{-14} s, která je mnohem kratší než i ty nejrychlejší konformační změny. ROA spektrum tedy bude superpozicí příspěvků od všech konformací, které jsou přítomny ve vzorku v rovnováze. Intenzita ROA závisí na absolutní chiralitě, a proto může dojít k vyrušení příspěvků enantiomerních struktur, jež mohou vznikat při tom, jak pohyblivé části molekuly procházejí celou škálou dostupných konformací. To je zdrojem zvýšené citlivosti ROA k dynamickému chování (bio)molekulárních struktur.

11.2 Experimentální přístupy

Ramanova optická aktivita je spojena s fundamentálním přechodem mezi vibračními hladinami normálního vibračního módu v základním elektronovém stavu, podobně jako při vibračním cirkulárním dichroismu, což umožňuje přímé srovnání VCD a ROA spekter měřených ve stejném spektrálním oboru. Ramanův rozptyl je ale na rozdíl od absorpce dvoufotonový proces, a proto je ROA ve srovnání s VCD mnohem komplexnější, a to jak teoreticky (složitý nepříliš názorný formalismus) tak experimentálně (tady komplexnost umožňuje větší variabilitu). Díky tomu lze při měření ROA použít různá experimentální uspořádání, kdy volitelnými parametry jsou geometrie experimentu (úhel rozptylu) a modulační schéma (to jest způsob jak ROA měříme). V současnosti je nejběžnější měření v geometrii zpětného rozptylu (180°), neboť se ve shodě s teorií ukazuje, že v této geometrii je poměr ROA ke zdrojovému Ramanovu signálu nejpříznivější. Avšak ranná ROA měření až do konce 80. let byla realizována v pravoúhlé geometrii (90°). Pokud jde o modulační schéma historicky první byla ICP (incident circular polarization) varianta, která je založena na **mo-**

dulaci polarizace dopadajícího záření (obr. 11.2a), kdy pomocí elektrooptického modulátoru střídavě přepínáme mezi pravotočivou a levotočivou kruhovou polarizací, synchronně s tím zaznamenáváme intenzity rozptýleného záření I^R a I^L a měříme buď totální rozptyl (v geometrii 180°) nebo jeho polarizovanou respektive depolarizovanou složku (v 90° geometrii při použití analyzátoru). V této variantě ROA tedy neměříme signál I^R a I^L současně, ale v různých časech. ICP variantu využívá i ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu UK.

Komerční spektrometr Chiral*RAMAN*™ naopak využívá SCP (scattered circular polarization) variantu (obr. 11.2b) vycházející z originální koncepce W. Huga.[4] Její hlavní předností je současné zaznamenávání intenzity **pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření**. Tím se automaticky zbavíme složky šumu označované jako "flicker noise", která je vyvolaná přítomností prachových částic ve vzorku, fluktuacemi hustoty, kolísáním výkonu laseru a dalšími náhodnými ději. Šum je potom v tomto případě čistě statistické povahy a je možno ho vyhlazovacími procedurami minimalizovat. Experimentálně byly realizovány i DCP (dual circular polarization) varianty, kdy modulujeme kruhovou polarizaci dopadajícího záření a zaznamenáváme intenzitu kruhově polarizované složky v rozptýleném záření - DCP_I (ve fázi, kdy měříme $I_R^R - I_L^L$) a DCP_{II} (v protifázi, kdy měříme $I_L^R - I_R^L$).[5]



Obr. 11.2: ***Dva ekvivalentní ROA experimenty. (a) v ICP ROA měříme I^R-I^L, kde I^R a I^L jsou intenzity rozptýleného záření (nepolarizované) pro dopadající pravo- respektive levotočivě kruhově polarizované záření. (b) v SCP ROA měříme I_R-I_L, kde I_R a I_L jsou intenzity pravo- a levotočivě kruhově polarizované komponenty v rozptýleném záření, zatímco dopadající záření je buď lineárně polarizované nebo případně nepolarizované (jak je ukázáno zde). Podle užívané konvence horní indexy označují polarizaci dopadajícího záření a dolní indexy polarizaci rozptýleného záření***

Typický ROA spektrometr se tedy skládá z budícího laseru (zpravidla argonový nebo diodami čerpaný pevnolátkový), rychlého (ideálně f/ 1,4) zobrazovacího spektrografu a chlazeného CCD detektoru.[2] ICP ROA spektrometr má navíc v excitační větvi elektrooptický modulátor (Pockelsova cela), pomocí kterého přepínáme mezi pravotočivou a levotočivou kruhovou polarizací dopadajícího záření. Jádrem SCP ROA spektrometru je naopak polarizační dělič, který dokáže

oddělit pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované komponenty v rozptýleném záření, pomocí vláknové optiky je přivést na vstup spektrografu a obě je zobrazit na CCD detektoru (nad sebou). ROA spektrum potom získáme jejich odečtením.

Ve srovnání s VCD přináší ROA dvě podstatné výhody. Tou první je spektrální rozsah měření. VCD je zpravidla měřeno v oblasti nad 900 cm^{-1}, výjimečně lze měřit již od 600 cm^{-1}, oblast vlnočtů nižších než 600 cm^{-1} však doposud zůstává pro VCD nepřístupná. ROA lze dnes standardně měřit již od 200 cm^{-1} a v příznivém případě dokonce od 100 cm^{-1}. Druhou výhodou ROA oproti VCD je možnost měření ve vodném roztoku. Voda jako polární molekula silně absorbuje infračervené záření a to komplikuje či dokonce znemožňuje měření VCD v oblastech silné absorpce rozpouštědla. Voda naopak má pouze slabý Ramanův rozptyl a představuje tak pro tuto spektroskopickou metodu téměř ideální rozpouštědlo.

11.3 Nástin teorie

Výrazy pro veličinu Δ můžeme odvodit pro různé experimentální varianty ROA na základě semiklasické teorie tak, že si vyjádříme vektory intenzity elektrického a magnetického pole oscilujícího elektrického dipólu, magnetického dipólu a elektrického kvadrupólu, které jsou indukovány dopadající světelnou vlnou (v případě ICP ROA kruhově polarizovanou), a přímo vyjádříme $I^R - I^L$ (ROA) a $I^R + I^L$ (Raman). Pro popis Ramanova rozptylu je postačující tzv. dipólová aproximace omezující se pouze na indukovaný elektrický dipól, při popisu ROA však musíme vyjít za její rámec a zahrnout do výpočtu i indukovaný magnetický dipól a elektrický kvadrupól. Příspěvky od jednotlivých členů můžeme vyjádřit pomocí tenzoru molekulární polarizovatelnosti $\alpha_{\alpha\beta}$ (elektrické dipól-dipólové), a dvou tenzorů optické aktivity $G'_{\alpha\beta}$ (elektrické dipól-magnetické dipólové polarizovatelnosti) a $A_{\alpha\beta\gamma}$ (elektrické dipól-elektrické kvadrupólové polarizovatelnosti). Pro izotropní soubor chirálních molekul (přechod k němu představuje středování přes všechny orientace rozptylujících molekul a přechod od složek tenzorů k jejich invariantům) potom například pro ICP ROA v geometrii zpětného rozptylu dostaneme pro Δ vztah

$$\Delta(180°) \equiv \frac{I^R - I^L}{I^R + I^L} = \frac{48\left[\beta(G')^2 + (1/3)\beta(A)^2\right]}{2c\left[45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2\right]}$$

kde α je izotropní invariant tenzoru polarizovatelnosti,

$$\alpha = (1/3)\alpha_{\alpha\alpha} = (1/3)\left(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}\right)$$

a $\beta(\alpha)^2$, $\beta(G')^2$ a $\beta(A)^2$ jsou anizotropní invarianty tenzoru polarizovatelnosti a tenzorů optické aktivity,

$$\beta(\alpha)^2 = (1/2)\left(3\alpha_{\alpha\beta}\alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}\alpha_{\beta\beta}\right)$$

$$\beta(G')^2 = (1/2)\left(3\alpha_{\alpha\beta}G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}G'_{\beta\beta}\right)$$

$$\beta(A)^2 = (1/2)\,\omega\alpha_{\alpha\beta}\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}A_{\gamma\delta\beta}$$

Striktně vzato platí výše uvedené vztahy pro Rayleighův (pružný) rozptyl. V případě Ramanova rozptylu musíme ve výrazu pro Δ tenzory molekulárních vlastností nahradit Ramanovými tenzory přechodu mezi počátečním a konečným vibračním stavem n_v a m_v. Tedy například $\alpha_{\alpha\beta}$ je nahrazeno $\langle m_v|\alpha_{\alpha\beta}(Q)|n_v\rangle$ atd., kde $\alpha_{\alpha\beta}(Q)$ atd. jsou operátory polarizovatelnosti a optické aktivity, které parametricky závisí na normální vibrační souřadnici Q. V rámci Placzekovy teorie polarizovatelnosti potom bude ROA intenzita záviset na součinech typu $(\partial\alpha_{\alpha\beta}/\partial Q)_0(\partial G'_{\alpha\beta}/\partial Q)_0$ a $(\partial\alpha_{\alpha\beta}/\partial Q)_0\,\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}(\partial A_{\gamma\delta\beta}/\partial Q)_0$.[6]

11.4 Interpretace ROA spekter

ROA spektra mohou být interpretována na několika úrovních – od čistě empirické korelace užívané v počátcích rozvoje, přes sofistikovanější přístupy založené na statistických metodách, jako je například faktorová analýza, až po modelové *ab initio* kvantově-chemické výpočty spekter. Výpočet zahrnuje několik kroků – optimalizaci geometrie (výpočet rovnovážné konfigurace jader), výpočet silového pole a frekvencí vibrací (zpravidla v harmonické aproximaci) a konečně výpočet intenzit pásů v Ramanově i v ROA spektru. V poslední době je zřejmá snaha zahrnout do výpočtu i vliv rozpouštědla, především pro podvojné ionty, pro které výpočty ve vakuu nevedou k realistické rovnovážné konfiguraci. Základním kritériem úspěšnosti výpočtu ROA spekter je dosažení shody znaménka pásů, popřípadě i relativní intenzity, s experimentálními daty. Lepší shody s experimentem obecně dosahují výpočty zahrnující elektronovou korelaci, ať už teorie elektronové hustoty (DFT) či poruchová teorie MP2, jež vedou k realističtějšímu silovému poli a tudíž i k přesnějšímu popisu vibračních pohybů jader. *Ab initio* metody výpočtu ROA spekter jsou podrobněji probírány jiné kapitole těchto skript.

11.5 Vybrané příklady využití ROA

Základními aplikacemi ROA spektroskopie jsou: ***(1)*** určování absolutní konfigurace opticky aktivních molekul v roztoku, ***(2)*** měření enantiomerní čistoty a ***(3)*** studium struktury (bio)molekul v roztoku.

Ad (1): Máme-li vzorek čistého enantiomeru, potom základním problémem stereochemie je určit pomocí fyzikálních metod, který ze dvou enantiomerů to je. ROA spektra v kombinaci s jejich kvantově-chemickou simulací lze užít pro určení absolutní konfigurace malých až středně velkých chirálních molekul. Postup je následující: na základě *ab initio* výpočtu je pro zvolenou absolutní konfiguraci simulováno ROA spektrum. Pokud simulované a změřené spektrum sobě odpovídají jak ve znaméncích ROA pásů, tak v jejich polohách a relativních intenzitách, je konfigurace molekuly zvolená pro výpočet totožná s konfigurací měřené molekuly.

Přesvědčivým testem schopnosti ROA je určení absolutní konfigurace chirálně deuterovaného neopentanu $C(CH_3)_4$.[7] Tato molekula neobsahuje žádný těžký atom, proto anomální rozptyl X-paprsků není v tomto případě použitelný. Chiralita je zde indukována pouhou izotopickou záměnou

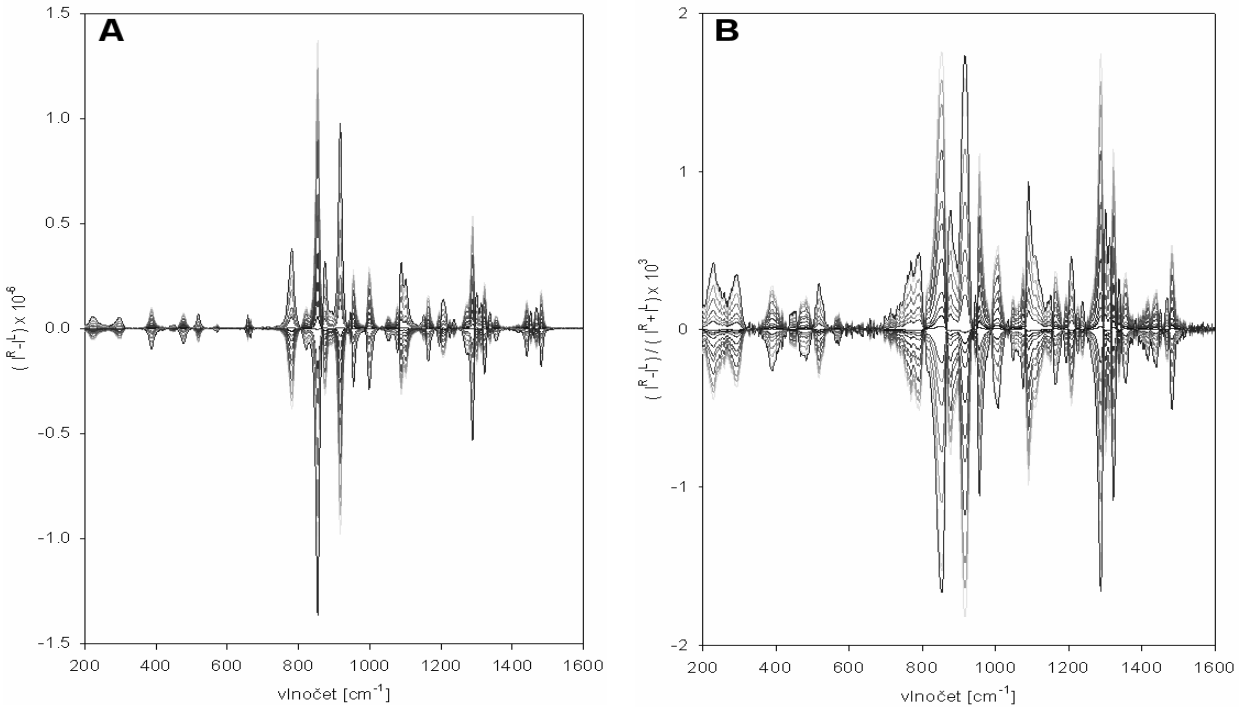
vodíku za deuterium ve třech ze čtyř CH_3 skupin, tak aby molekula obsahovala po jedné skupině CH_3, CH_2D, CHD_2 a CD_3. ROA je navíc velmi slabá ($\Delta \leq 10^{-5}$). Situaci komplikuje i existence celkem devíti různých rotačních konformerů ve vzorku, neboť každá z CH_2D a CHD_2 skupin může mít tři různé orientace. Proto bylo pro každý rotamer spočítáno ROA spektrum a výsledné ROA spektrum bylo získáno jako jejich průměr (díky vyrušení signálu je Δ ve výsledném spektru řádově menší ve srovnání se spektry jednotlivých rotamerů!). Impozantní shoda s experimentem, primárně ve znaménku ale i v intenzitě pásů, umožnila jednoznačně stanovit absolutní konfiguraci jako *R*.

Ad (2): Sledování enantiomerní čistoty je jednou z možných analytických aplikací Ramanovy optické aktivity (ROA), která může být potenciálně zajímavá pro farmaceutický průmysl. Optická aktivita vzorku se projevuje pouze tehdy, je-li v měřeném vzorku buď čistá enantiomerní forma nebo přebytek jedné z enantiomerních forem. V případě, kdy jsou ve vzorku přítomny pouze dva optické antipody o různých koncentracích, je užitečné definovat enantiomerní přebytek (enantiomeric excess) f_{EE} jako přebytečné množství jednoho enantiomeru (*R*) nad druhým (S) vztažený k celkovému množství obou enantiometů ve vzorku

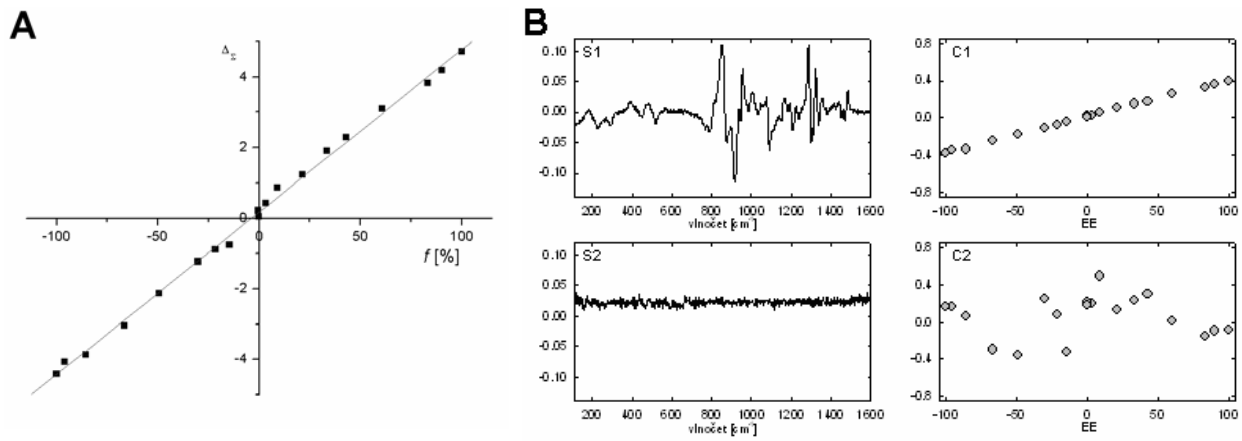
$$f_{EE} = \frac{c_R - c_S}{c_R + c_S} \quad [\%]$$

Veličina f_{EE} nabývá hodnoty 100 % pro čistý enantiomer *R*, –100 % pro čistý enantiomer *S* a 0 % pro racemickou směs. Je zřejmé, že intenzita pásů ROA spektra je přímo úměrná enantiomernímu přebytku. Pro kvantitativní stanovení je však nezbytné provést kalibrační měření na souboru vzorků o různé ale známé enantiomerní čistotě (jako příklad mohou sloužit data uvedená na obr. 11.3). Namísto ROA spekter je při určování enantiomerního přebytku vhodnější pracovat s podílovými spektry ROA/Raman, neboť ta jsou normována na zdrojový Ramanův signál. Toto podílové spektrum je vlastně spektrem diferenční cirkulární intenzity Δ definované v úvodu.

Informaci o enantiomerním přebytku lze z kalibračních měření vyhodnotit několika způsoby. Ten nejjednodušší pracuje s intenzitou jednoho či několika vybraných pásů, ten pokročilejší využívá statistických metod zpracování dat, např. faktorovou analýzu. Předností druhého přístupu je, že pro vyhodnocení využívá celé spektrum a nikoli jen několik vybraných pásů. V případě roztoků nebo směsí obsahujících více různých chirálních molekul je použití statistických metod nutností, protože umožňuje separovat signál od jednotlivých komponent i signál rozpouštědla. Příklad kalibrační křivky získané pomocí intenzity tří nejvýraznějších pásů (854, 917 a 1322 cm^{-1}) v podílových spektrech ROA/Raman (obr. 11.3B) je uveden na obr. 11.4A. Na obr. 11.4B je uveden výsledek faktorové analýzy stejného souboru dat. Faktorová dimenze 1, která udává počet významných komponent, není překvapením, neboť ROA spektra dvou enantiomerů jsou až na znaménko shodná (jedno převedeme v druhé prostým vynásobením faktorem –1).



Obr. 11.3: A: Soubor ROA spekter 19 vzorků trans-pinanu o různé enantionerní čistotě. B: Soubor odpovídajících podílových (ROA/Raman) spekter diferenční cirkulární intenzity Δ



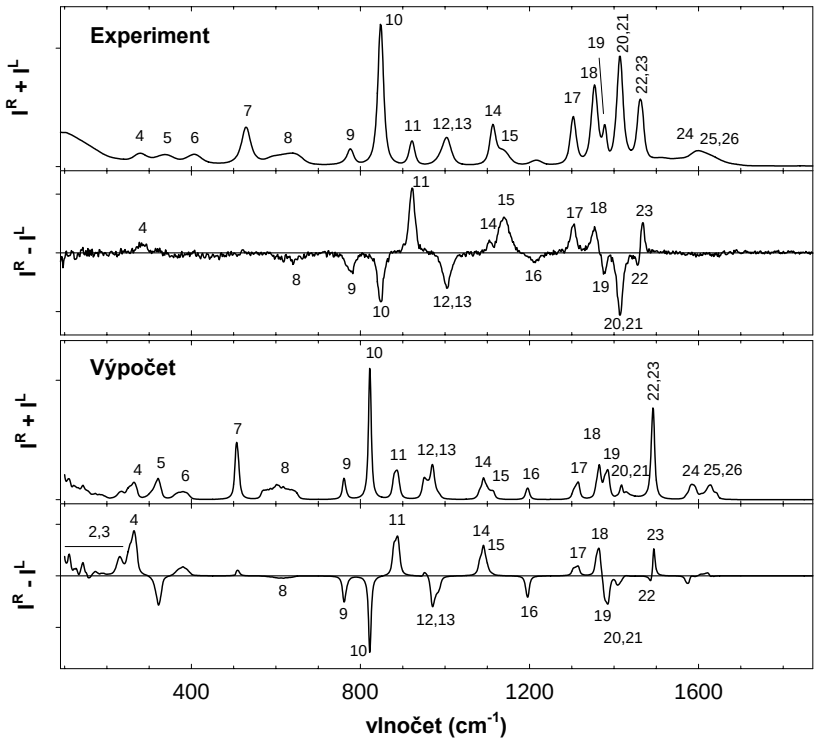
Obr. 11.4: A: Kalibrační křivka pro stanovení enantiomerní čistoty na základě intenzity tří nejvýraznějších pásů (854, 917 a 1322 cm^{-1}) v podílových spektrech z obr. 11.3B

B: Výsledek faktorové analýzy souboru 19 podílových spekter ROA/Raman z obr. 11.3A. Významné je pouze první subspektrum (označené S1), tedy faktorová dimenze je 1. Lineární závislost koeficientu C1 na enantiomerním přebytku je analogem kalibrační křivky

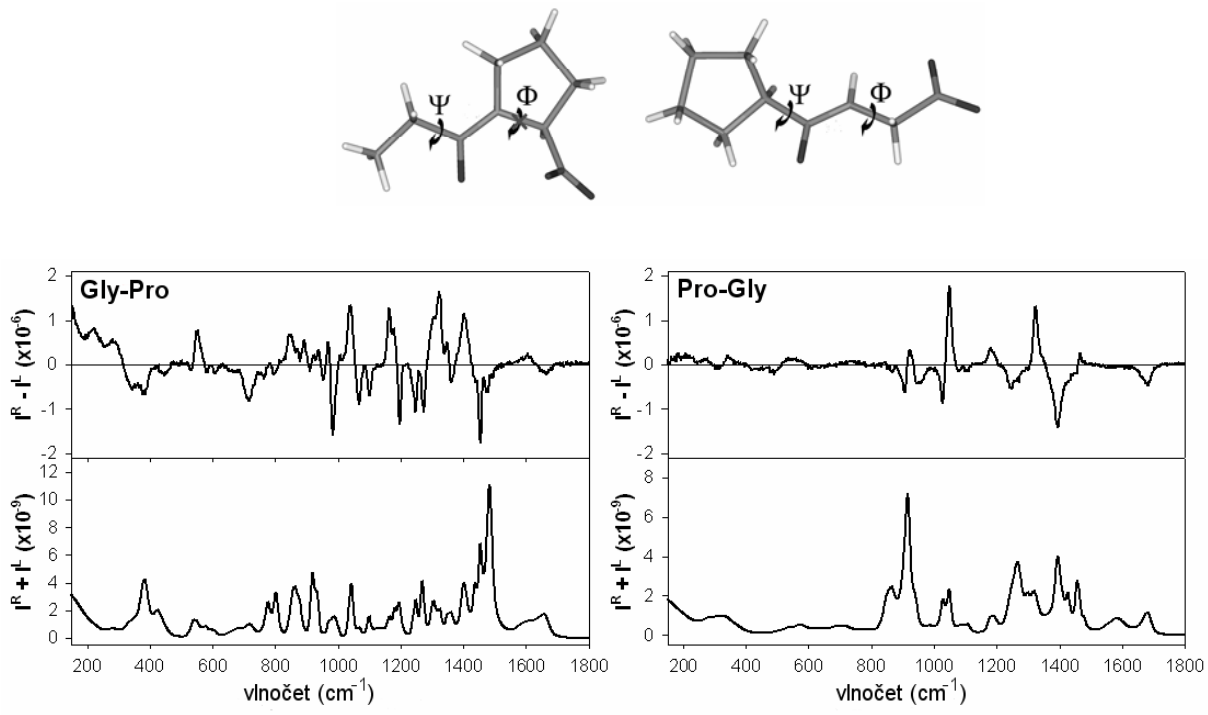
V jednosložkovém vzorku (směs dvou enantiomerů jedné chirální molekuly) lze pomocí ROA za příznivých podmínek stanovit již 0,1% přebytek, ve dvousložkové směsi různých chirálních molekul lze odhalit 1-2% enantiomerní přebytek jedné ze složek.[8]

Ad (3): *Ab initio* výpočty ROA spekter začínají mít dopad i na studium konformace malých biomolekul ve vodném roztoku. Mapování konformačního prostoru zwitterionického L-alaninu ukázalo, že tvar Ramanových a ROA pásů je do značné míry ovlivněn rotací skupin NH_3^+ a COO^-.[9] Molekulu v roztoku nelze popisovat jako rigidní systém, naopak pro dosažení lepší shody s experimentem je nezbytné do výpočtu zahrnout i dynamiku její struktury (obr. 11.5). Na takto „jednoduchých" systémech lze také testovat implicitní i explicitní modely rozpouštědla.[10]

Na příkladu dvou jednoduchých dipeptidů Gly-Pro a Pro-Gly ve vodném roztoku lze demonstrovat, jak výrazným způsobem se konformační flexibilita molekul projevuje v ROA a Ramanových spektrech (obr. 11.6).[8] Rigidita Gly-Pro je dána tím, že prolin je na C konci dipeptidu a že rotace kolem vazby C_α-N (torzní úhel Φ) je pětičlenným kruhem výrazně omezena. Pro-Gly je ve srovnání s Gly-Pro mnohem flexibilnější, neboť prolin se nachází na N konci dipeptidu a rotace kolem torzního úhlu Φ je v tomto případě volná. Z obr. 11.6 je zřejmé, že u flexibilního systému je ROA spektrum díky vyrušení signálu od různých konformerů velmi jednoduché, pásy v ROA i v Ramanově spektru jsou rozšířené, v oblasti torzních vibrací (200-750 cm^{-1}) jsou Ramanovy pásy široké a ROA signál je zde velmi slabý. Naopak u rigidního systému je spektrum zřetelně bohatší, s úzkými dobře rozlišenými pásy a relativně intenzivním ROA signálem i v oblasti torzních vibrací.



Obr. 11.5: ***Srovnání experimentálních Ramanových a ICP ROA spekter 1,6molárního roztoku zwitterionického L-alaninu ve vodě se simulovanými spektry (ab initio DFT, implicitní model rozpouštědla, Boltzmannovo konformační středování)***



Obr. 11.6: ***Srovnání spekter rigidní (Gly-Pro) a flexibilní (Pro-Gly) molekuly s naznačenými hlavními stupni volnosti. Vlevo Ramanovo a ICP ROA spektrum 2molárního roztoku Gly-Pro ve vodě. Vpravo Ramanovo a ICP ROA spektrum 0,89molárního roztoku Pro-Gly ve vodě***

11.6 Závěr

Ramanova optická aktivita představuje unikátní a dynamicky se rozvíjející metodu studia struktury chirálních molekul v roztoku s velkým aplikačním potenciálem nejen v základním výzkumu. Sledování enantiomerní čistoty představuje jednu z možných analytických aplikací ROA, která může být zajímavá pro farmaceutický průmysl. V České republice je dostupný nekomerční ROA spektrometr, vybudovaný na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy v Praze.

Literatura

1. Atkins P.W., Barron L.D., *Mol. Phys.* **16**, 453 (1969).
2. Barron L.D., Hecht L., McColl I.H., Blanch E.W., *Mol. Phys.* **102**, 731 (2004).
3. Barron L.D:, Boggard M.P., Buckingham A.D., *Nature* **241**, 113 (1973).
4. Hug W., Hangartner G., *J. Raman Spectrosc.* **30**, 841-852 (1999).
5. Nafie L.A., *Appl. Spectrosc.* **50**, 14A (1996).

6. Barron L.D., *Molecular Light Scattering and Optical Activity, Second Edition*. Cambridge University Press, Cambridge 2004.

7. Haesler J., Schindelholz I., Riguet E., Bochet C.G., Hud W., *Nature* **446**, 526 (2007).

8. Hecht L., Phillips A.L., Barron L.D., *J. Raman Spectrosc.* **26**, 727 (1995).

9. Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V. Jr., Bouř P., *J. Phys. Chem.* **110**, 4689 (2007).

10. Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V. Jr., Pohl R., Bouř P., *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13451 (2006).

12. VYUŽITÍ CD SPEKTROSKOPIE PŘI STUDIU KONFORMAČNÍCH VLASTNOSTÍ DNA

doc. RNDr. Michaela Vorlíčková, DrSc., RNDr. Jaroslav Kypr, CSc.

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
mifi@ibp.cz

12.1 Úvod

Všechny známé autonomní formy života počínaje bakteriemi a konče člověkem mají své genetické informace uloženy v molekulách dvouřetězcové DNA. DNA je obrovská molekula, jejíž velikost činí statisíce nukleotidových párů u nejmenších baktérií a stamilióny u člověka. U některých organismů jsou tyto molekuly ještě větší. Obrovské molekuly DNA jsou u člověka sbaleny v relativně maličkém prostoru buněčného jádra.

Základní uspořádání DNA ve formě pravotočivé dvojité šroubovice typu B bylo objeveno v roce 1953. Od té doby bylo zjištěno, že DNA může nabývat i řadu jiných struktur jako je pravotočivá dvoušroubovice typu A, které konstitutivně nabývá RNA, levotočivá dvoušroubovice typu Z, různé typy vlásenek a struktur obsahujících posunuté či paralelně orientované řetězce, různé typy triplexů a tetraplexů a další méně přesně charakterizované struktury. Dnes je již více než pravděpodobné, že tyto struktury se vyskytují v buněčném jádře v důsledku vysokého stupně natěsnání, působení nadšroubovicového vinutí, různých proteinů a vlivem nízké aktivity vody. Lze považovat za prokázané, že konformační přechody DNA se uplatňují v její funkci.

12.2 Cirkulárně dichroická spektroskopie

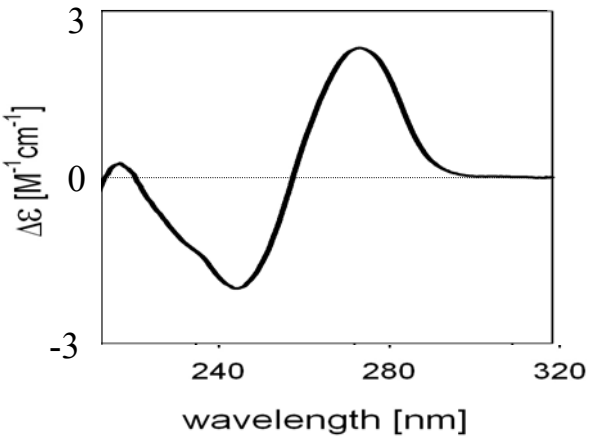
Cirkulární dichroismus je jev, který vykazují chirální molekuly při interakci s elektromagnetickým polem. K výzkumu DNA se nejvíce využívá ultrafialové světlo v rozmezí 180 – 300 nm, kde báze DNA silně absorbují. Při ozáření DNA cirkulárně polarizovaným světlem dochází k odlišné absorpci jeho pravotočivé a levotočivé složky. Rozdíl těchto dvou absorpcí je cirkulární dichroismus.

Teoretický, tj. kvantově chemický popis cirkulárního dichroismu u DNA je velice složitý. U těchto obrovských molekul dosud nebylo dosaženo shody teorie s experimentem, a proto se CD spektroskopie používá ke studiu DNA téměř výlučně empiricky. Naproti tomu má CD spektroskopie před jinými metodami řadu výhod. V prvé řadě je extrémně citlivá, což umožňuje pracovat s relativně velice malými množstvími DNA (30 μg) a řídkými roztoky DNA (20 μg ml^{-1}). Za druhé, studované molekuly DNA mohou být nejen krátké, ale i dlouhé, což neumožňuje NMR, X-ray ani molekulárně dynamická simulace. Za třetí, vzorky je možné snadno titrovat různými agens jako jsou soli, alkoholy, změny pH apod., které indukují konformační změny v DNA. To umožňuje mapovat celý konformační prostor studované molekuly, nejen její jednu vybranou strukturu. Za čtvrté, CD spektroskopie odlišuje konformační přechody mezi různými konformery od postupných změn v rámci jedné struktury. Toto rozlišení je velmi důležité, protože tyto děje mají odlišnou fyzikální podstatu a možná i odlišnou biologickou relevanci. Za páté, CD spektroskopie umožňuje měřit nejen roztoky, ale i filmy DNA, což dovoluje přímo korelovat výsledky CD spektroskopie s X-ray difrakcí a infračervenou spektroskopií. Za šesté, měření CD spekter je relativně snadné

a velice rychlé, což umožňuje provádět komparativní studie více příbuzných molekul DNA. To je další důležitý zdroj informací. Tyto vlastnosti způsobily, že CD spektroskopie se podílela prakticky na všech významných událostech v historii studia konformačních vlastností DNA.

12.3 Forma B a vlásenka

Forma B je nejčastějším uspořádáním DNA. Je stabilní zejména ve vodných roztocích. Spektrum sekvenčně heterogenní DNA je konzervativní (plocha pozitivních pásů je rovna ploše negativních pásů) a má nízké amplitudy. Lze to vysvětlit tím, že páry bází ve formě B jsou kolmé k podélné ose dvojité šroubovice, což struktuře propůjčuje jen malou chiralitu. Ve spektru (obr. 12.1) dominuje pozitivní pás kolem 275 nm a negativní pás kolem 245 nm. Oba mají elipticitu kolem 2 M^{-1} cm^{-1}.

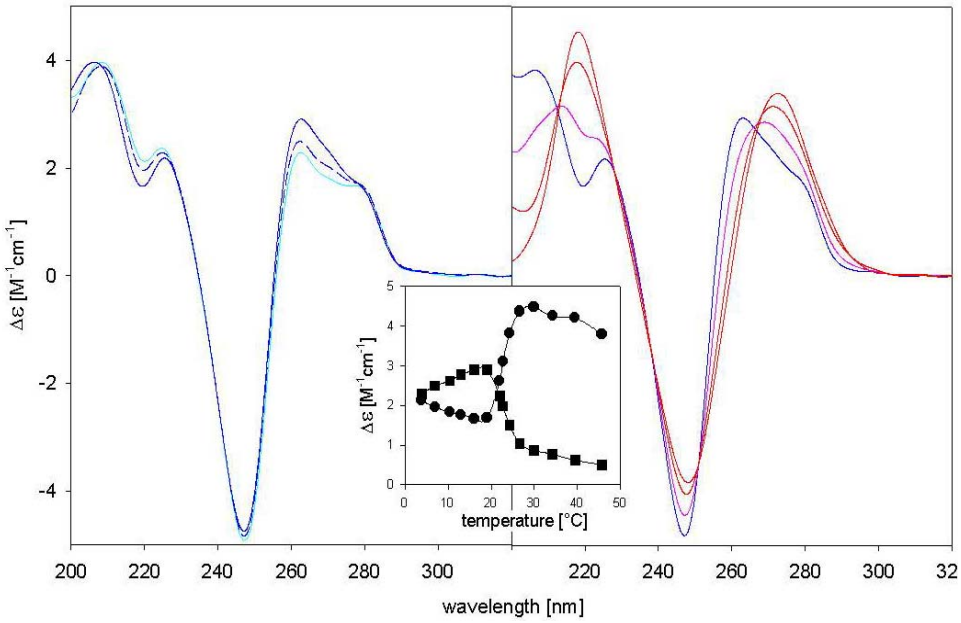


Obr. 12.1: CD spektrum B-formy sekvenčně heterogenní DNA z telecího thymu

B-formy syntetických oligonukleotidů se v závislosti na primární struktuře navzájem liší. Tvoří širokou rodinu struktur B se společnými globálními rysy. Rovněž CD spektra jednotlivých sekvenčně odlišných oligonukleotidů jsou různá – např. spektrum poly(dA-dT) v obr. 12.2. Všechna se ale vyznačují pozitivním pásem na straně dlouhých vlnových délek s maximem v rozmezí 260-280 nm a po něm následuje negativní pás při 245-255 nm. Vykazují však zpravidla větší amplitudy než sekvenčně heterogenní přirozená DNA.

CD spektroskopie rovněž reflektuje kooperativní přechod z uspořádané struktury do struktury denaturované. V obr. 12.2 jsou spektra poly(dA-dT) měřená za různých teplot. Spektra v levém obrázku reflektují nekooprativní změny ve struktuře poly(dA-dT) předcházející denaturaci, v obrázku pravém pak spektra v průběhu denaturace.

Vlásenka je z hlediska primární struktury zvláštní intramolekulární podobou formy B. Autokomplementární sekvence bází mohou v závislosti na délce molekuly nabývat jak duplexové formy B tak vlásenky a v důsledku změn podmínek v roztoku mezi sebou izomerizovat. Přechod homoduplex-vlásenka u krátkých autokomplementárních oligonukleotidů je v důsledku přítomnosti smyčky obvykle provázen redukcí amplitud.

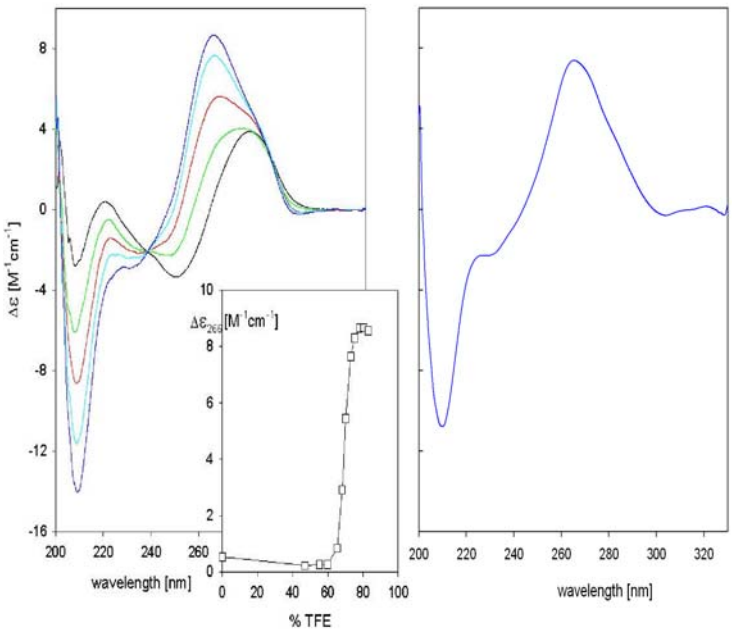


Obr. 12.2: ***B-Forma poly(dA-dT). V levé části obrázku nekooperativní změny v rámci B-formy vyvolané zvýšením teploty, vpravo kooperativní přechod B-formy poly(dA-dT) v denaturovanou. Insert: závislost Δε při (čtverečky) 260 nm a (kolečka) 275 nm na teplotě***

12.3 Forma A a přechod B-A

Formy A nabývá DNA zejména ve vodných roztocích etanolu. Některé molekuly DNA formy A nenabývají vůbec. Příkladem je poly(dA).poly(dT). Naopak jiné vykazují některé rysy formy A již ve vodném prostředí. Příkladem je poly(dG).poly(dC). Spektrum CD formy A-DNA je prakticky identické jako spektrum CD RNA se stejnou primární strukturou (obr.3). Spektrum CD formy A je nekonzervativní (plochy pozitivních a negativních pásů nejsou stejné) s dominantním pozitivním pásem při 260 nm, a negativním při 210 nm. Amplituda pozitivního pásu se v závislosti na sekvenci bází pohybuje mezi 7-12 M^{-1} cm^{-1}. Výrazné spektrum CD je pravděpodobně způsobeno tím, že páry bází jsou ve formě A nakloněny k ose dvojité šroubovice.

Přechod B-A je dvoustavový a velice kooperativní (obr. 12.3). To se projevuje přítomností izodichroických bodů ve spektrech a esovité závislostí elipticity na koncentraci indukujícího agens, tj. etanolu, či trifluoretanolu. Donedávna se myslelo, že základním rozdílem mezi formami A a B je zborcení cukerného kruhu (C2´endo ve formě B a C3´endo ve formě A). Pak ale byla nalezena zvláštní forma duplexu d(C_4G_4), která vykazuje charakteristiky formy A a má zborcení cukrů C2´endo. Tato zvláštní forma je stabilní už ve vodných prostředích. Kooperativně pak přechází do standardní formy A v etanolových prostředích. Standardní B-formy duplex d(C_4G_4) vůbec nenabývá. CD spektroskopie tuto skutečnost krásně odráží a ukazuje, že je tato vlastnost společná různě dlouhým molekulám d(C_nG_n).



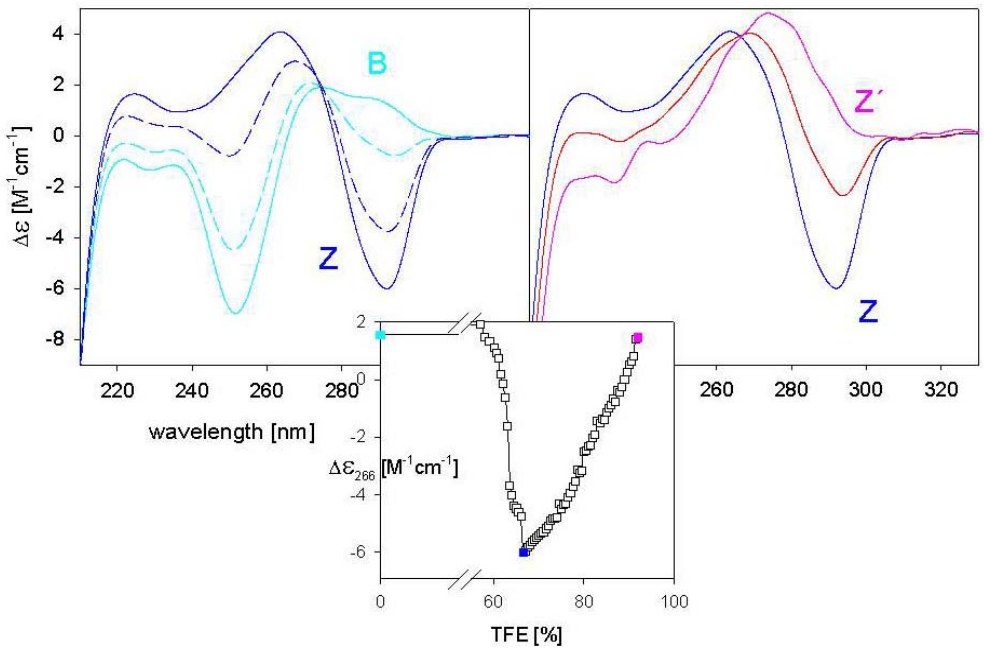
Obr. 12.3: ***Vlevo CD spekta DNA s primární strukturou d(GCGGCGACTGGTGAGTACGC) v duplexu se svou komplementární sekvencí měřená při různých koncentracíchTFE, který v ní indukuje B-A přechod. Insert: závislost Δε pozitivního maxima na koncentraci TFE. Vpravo CD spektrum RNA se stejnou primární strukturou***

12.4 Forma Z a přechod B-Z

Forma Z je levotočivá dvoušroubovice, která se od forem B a A zejména liší obrácenou topologii bází vůči 5´-3´směru cukr-fosfátové páteře. Řekneme-li, že páry bází směřují v B- a A-formě hřbetem vzhůru, směřují ve formě Z právě naopak. Odlišná molekulární struktura se projevuje v odlišném spektru CD, pro které je charakteristický negativní dlouhovlný pás a pozitivní krátkovlný (obr. 12.4), tj. spektrum je inverzí CD spektra formy B. Forem Z je, podobně jako forem B, několik druhů. Jejich CD spektra se dosti podstatně liší, ovšem přecházejí mezi sebou nekooperativně (obr. 12.4, insert), a tedy náležejí témuž strukturnímu typu. Na rozdíl od přechodu B-A má přechod B-Z pomalou kinetiku způsobenou pravděpodobně tím, že v jeho průběhu se uvnitř dvojité šroubovice musejí páry bází přetočit, což je kineticky velice náročný proces. Přechod B-Z byl pomocí CD spektroskopie pozorován dávno předtím než byla objevena molekulární struktura formy Z.

12.5 Triplexy

Triplexy DNA jsou pomocí CD spektroskopie studovány podstatně méně než třeba homoduplexy. Důvodem je skutečnost, že triplexy poskytují pro různé sekvence různá CD spektra, která se tedy špatně interpretují. Výtečnou komplementární metodou k CD spektroskopii je v tomto případě elektroforéza, která umožní CD spektrum triplexu příslušné studované sekvence identifikovat.



Obr. 12.4: ***Vlevo nahoře: B-Z přechod; vpravo nahoře přechod mezi dvěma formami Z, tj. Z a Z´. Insert: závislost elipticity při 266 nm na koncentraci TFE, který indukuje přechody B-Z-Z´***

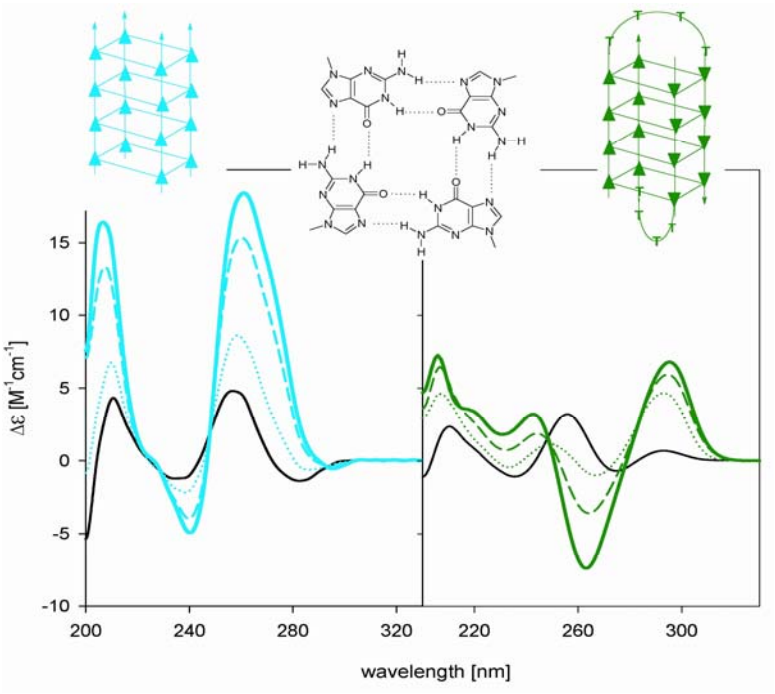
12.5.1 Guaninové tetraplexy

Základem guaninových tetraplexů je guaninová tetráda (obr. 5), která zůstává pro různá tetraplexová uskupení neměnná. Existují dva základní typy guaninových tetraplexů. Paralelní, které mají dominantní pozitivní pás při 260 nm a antiparalelní, které mají při stejné vlnové délce pás negativní a navíc pozitivní pás při 290 nm (obr. 5). Označení paralelní a antiparalelní se týká vzájemné orientace řetězců v tetraplexu, přičemž odlišný cirkulární dichroismus pravděpodobně souvisí s odlišnou orientací guaninových zbytků kolem glykosidické vazby. Glykosidická vazba všech guaninů je anti u paralelních tetraplexů, zatímco u antiparalelních má část guaninů, nejčastěji polovina, glykosidickou vazbu v orientaci syn. Vznik guaninových tetraplexů je, podobně jako je tomu u formy Z, pomalý proces. Jeho induktorem jsou fyziologické koncentrace iontů, zejména draselných, a ještě efektivnějším induktorem je etanol.

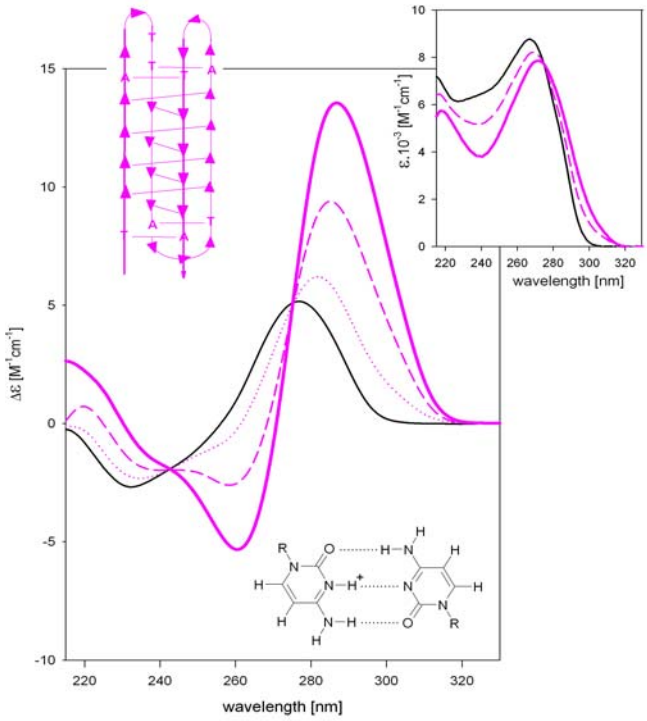
CD spektrum paralelního tetraplexu, zejména jeho dominantní pozitivní pás při 260 nm, je podezřele podobný CD spektru formy A. Na rozdíl od formy A má však namísto negativního krátkovlnného pásu pás pozitivní při 205 nm.

12.6 Cytosinové tetraplexy

Řetězce DNA bohaté na cytosin tvoří interkalované tetraplexy. Ty sestávají ze dvou paralelních duplexů spojených hemiprotonizovanými páry $C.C^+$, které jsou vzájemně interkalovány v antiparalelní orientaci (obr. 6). Cytosinové tetraplexy poskytují charakteristické CD spektrum s dominantním pozitivním pásem při 290 nm (obr. 6). Vznik cytosinových tetraplexů je indukován mírně kyselým pH, které je nutné pro stabilitu párů $C.C^+$.



Obr. 12.5: ***Uspořádání guaninových tetrád a CD spektra paralelního (vlevo dole) a antiparalelního (vpravo dole) guaninového tetraplexu***



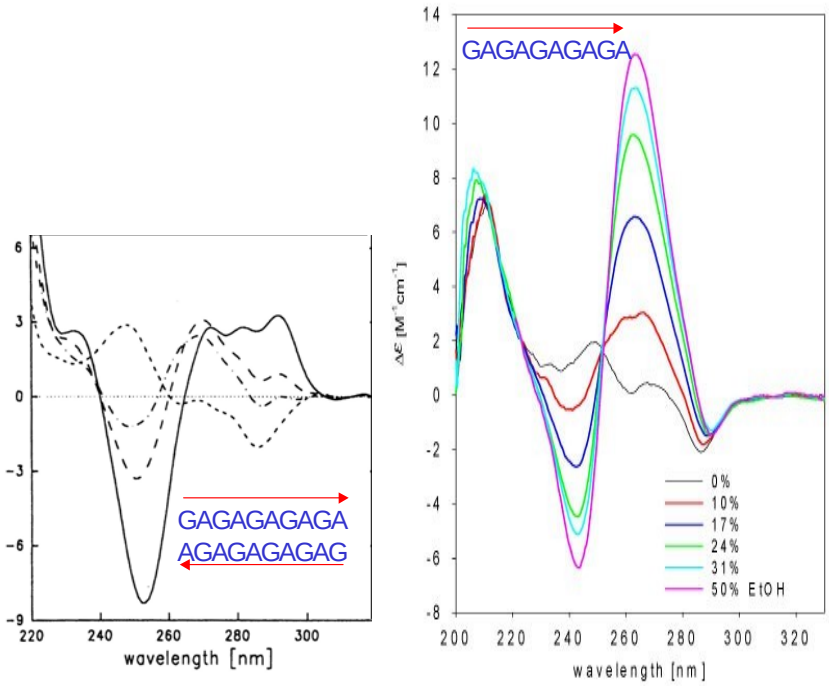
Obr. 12.6: ***Vlevo nahoře uspořádání cytosinového tetraplexu, (insert vpravo nahoře) jeho UV spektra a (hlavní obrázek) CD spektra v průběhu indukce kyselým pH***

12.7 Řetězce DNA bohaté na guanin a adenin

Řetězce DNA bohaté na guanin a adenin vykazují pozoruhodné kooperativně tající konformery, které se liší od klasických struktur. První z nich je antiparalelní homoduplex, obsahující pravděpodobně nestandardní páry G.A. Jeho CD spektrum je podobné B-formám (obr. 7A). Další strukturou je paralelní homoduplex, s páry G.G a A.A, který vykazuje výrazné CD spektrum podobné guaninovým tetraplexům (obr. 7B). V něm tedy opět dominuje pozitivní pás při 260 nm, což nasvědčuje tomu, že tento homoduplex obsahuje navrstvené guaninové zbytky a adeniny jsou vystrčeny na okraj šroubovice.

Dalším konformerem je uspořádaný jednořetězec obsahujícící protonovaný adenin. Tento jednořetězec přechází při zvýšených iontových silách v paralelní homoduplex aniž se jeho CD spektrum změní. Znamená to, že jednořetězec je jen disociovaný homoduplex, v němž jsou meziřetězcové interakce nahrazeny interakcemi protonovaného adeninu. Shodná CD spektra naznačují, že vrstvení guaninů je v obou konformerech shodné s vrstvením guaninů v tetraplexu.

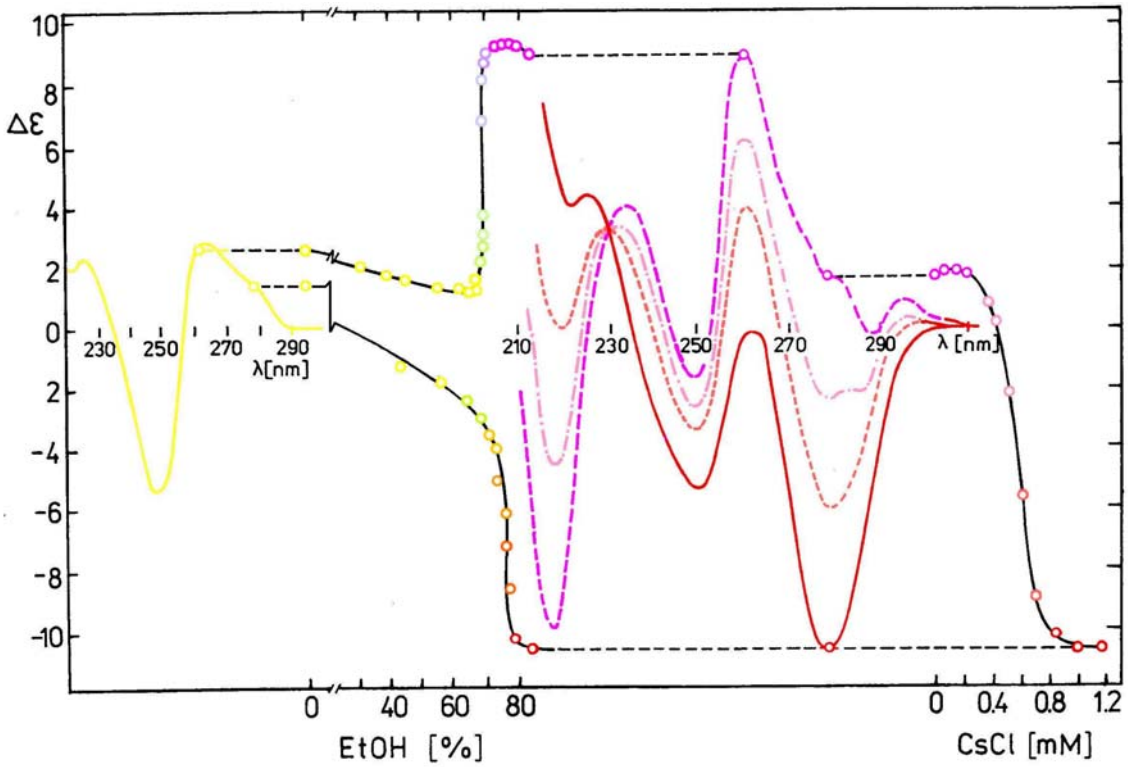
Je zajímavé, že stejné CD spektrum jaké způsobuje kyselé pH, vyvolává u G-A bohatého řetězce DNA etanol, a dokonce i dimetylsulfoxidu, který je denaturačním činidlem. Za těchto podmínek pravděpodobně není adenin protonizován. V nízké iontové síle je tato struktura jednořetězcová. Při zvýšení iontové síly jednořetězce asociují v paralelní homoduplex, a to opět bez výrazné změny CD spektra, a tedy struktury.



Obr. 12.7: ***Vlevo CD spektra antiparalelního homoduplexu (dG-dA)n. Vpravo CD spektrum jednořetězce $(dG\text{-}dA)_n$***

12.8 Střídavá posloupnost adeninu a tyminu

Poly(dA-dT) a také např. $(dT\text{-}dA)_4$ poskytují pozoruhodné CD spektrum ve vodných roztocích obsahujících vysoké koncentrace CsF a nebo ve vodném etanolu. Zatímco v přítomnosti milimolárních koncentrací sodných iontů přechází poly(dA-dT) při vysokých koncentracích etanolu kooperativně do formy A-DNA, nahrazení sodných iontů stejným množstvím iontů cesných dává vznik struktuře s inversním CD spektrem (obr. 8). Tato struktura byla nazvána X-DNA. Hluboký negativní pás při 275 nm tohoto spektra pravděpodobně souvisí se dvěma zřetelně separovanými signály ve spektru fosforové NMR. Tyto signály vykazují dinukleotidové struktury jako je forma Z. Kooperativní přechody mezi jednotlivými konforméry (obr. 8) prokazují, že foma X nepatří do třídy B- ani A-forem a fosforová NMR ukázala, že se liší rovněž od formy Z. Nedávno byla nakrystalována struktura, která je možným kandidátem na vysvětlení tohoto CD spektra. Páry bází jsou v ní vytvořeny pomocí Hoogsteenova párování.



Obr. 12.8: ***Závislost CD spektra poly(dA-dT) na koncentraci etanolu. Žluté spektrum B-formav absenci etanolu. Zvyšování koncentrace etanolu v přítomosti 1 mM Na^+ dává vznik A-formě (fialové spektrum), zvyšování koncentrace etanolu v přítomosti 1 mM Cs^+ indukuje formu X. Přidávání iontů Cs^+ k A-formě poly(dA-dT) ji převádí do X-formy***

Doporučená literatura

Johnson, W. C. (1994). CD of nucleic acids. In: Circular Dichroism: Principles and Applications. Eds. Nakanishi, K., Berova, N., Woody, R.U., New York, VCH Publishers, pp. 523-540.

Vorlíčková, M., J. Kypr, et al. (2005). Nucleic Acids: © Spectroscopic methods. In: Encyclopedia of Analytical Science, 2-nd Edition. Eds. Worsfold, P.J., Townshend, A., Poole, C.F., Oxford, Elsevier. 6: pp.391-399