

Elektronový cirkulární dichroismus a možnosti jeho využití

pragolab

Stability

Modularity

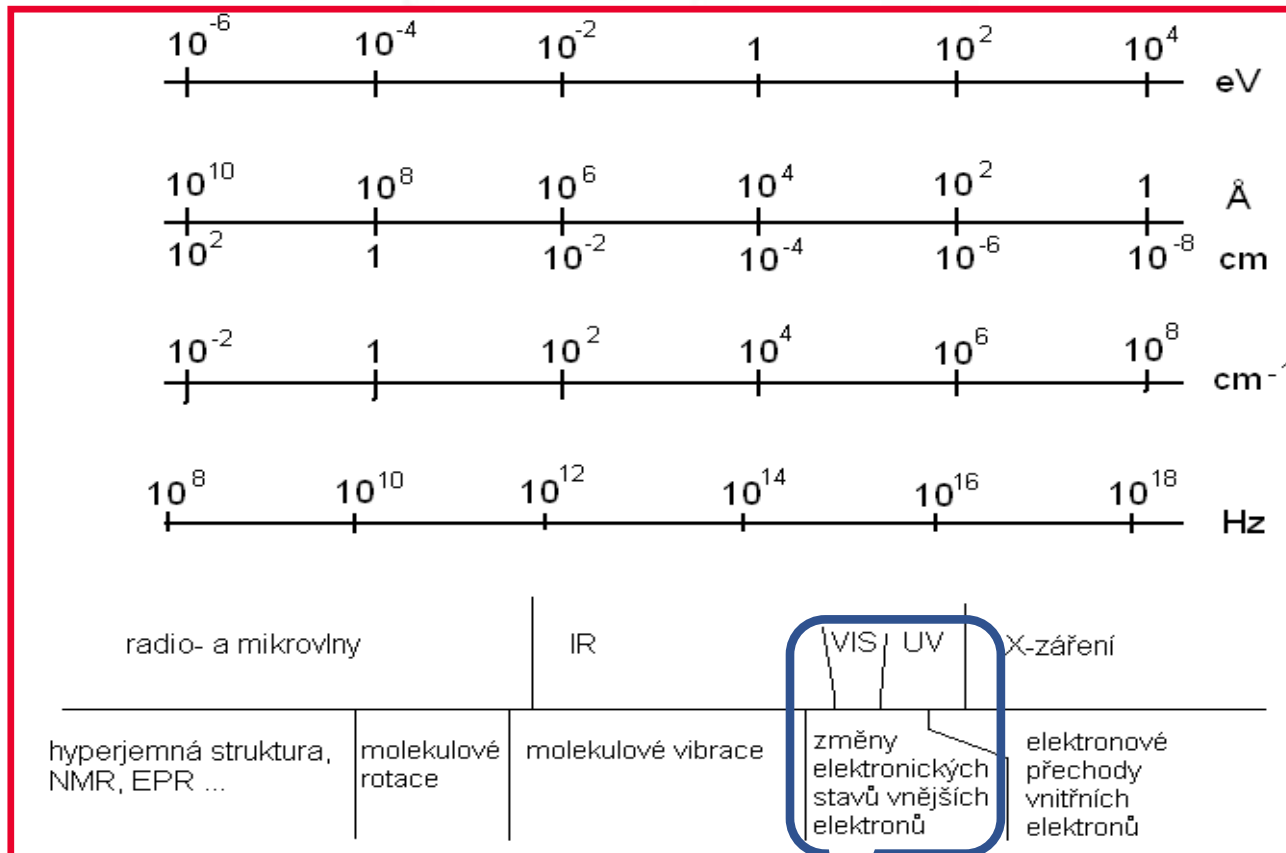
Steady state CD

Pavel Janderka
janderka@pragolab.cz

Kinetics

Molekulová spektroskopie

Rozsáhlá skupina spektroskopických metod pokrývající široký rozsah energetických přechodů



$$E = h\nu$$

$$E = h \frac{c}{\lambda} = h\tilde{\nu}$$

**Elektronická
spektra**

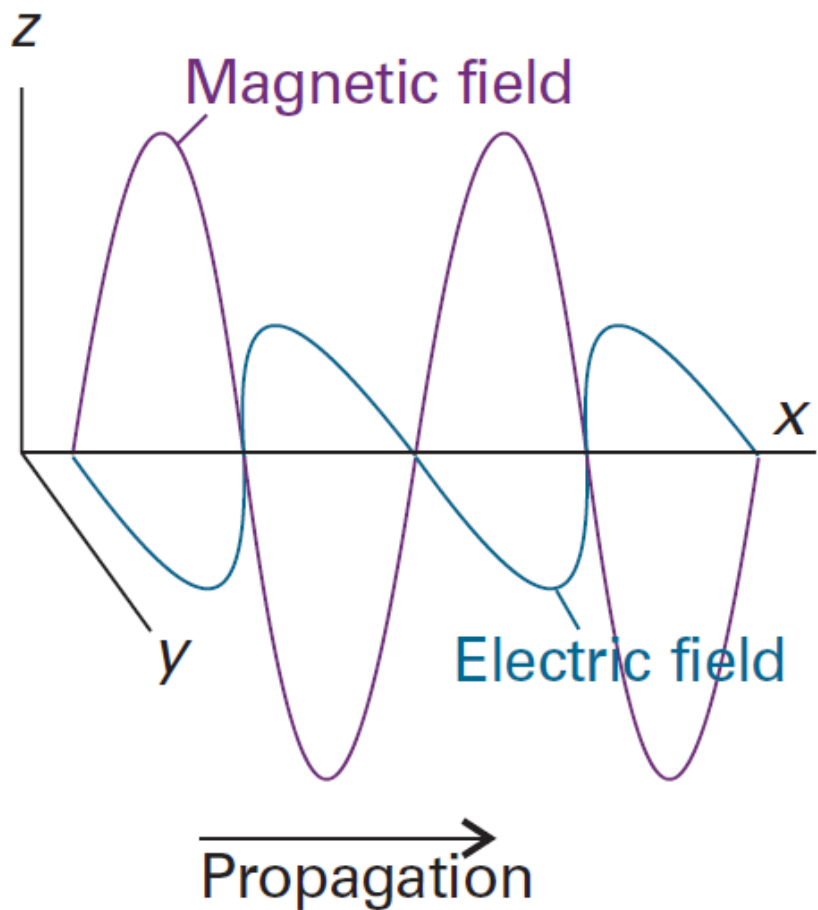
Souvisí s energetickými přechody elektronů mezi molekulovými orbitály, ale navíc reflektují 3D - absolutní konfigurace molekul a klastrů, často biologicky významných

Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření má dvě složky

Vlny elektrického pole a magnetického pole, které jsou navzájem kolmé a kolmé (ortogonální) ke směru šíření záření.

když je při experimentu použito polarizované světlo, tj. elektromagnetické záření s elektrickým a magnetickým polem oscilujícími pouze v určitém směru, elektronická spektra mohou přinést unikátní informace o molekulové struktuře - **Chiroptické metody**.

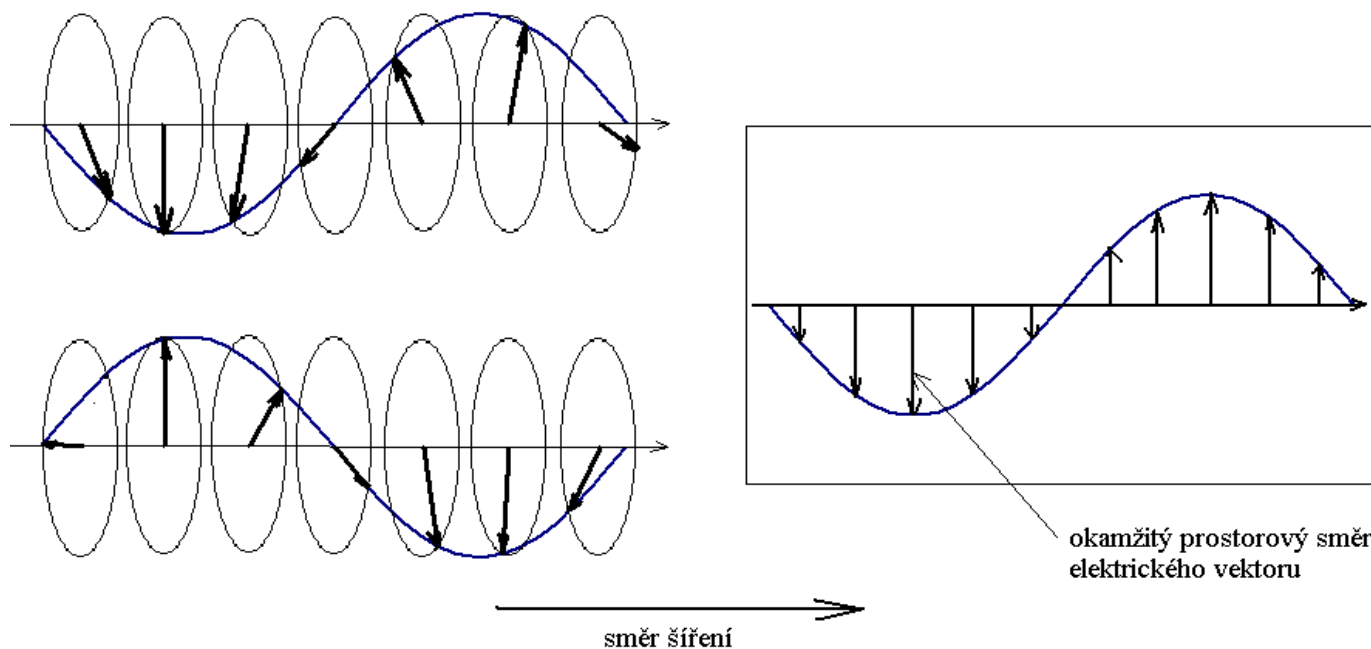


Lineárně - kruhově - elipticky polarizované světlo

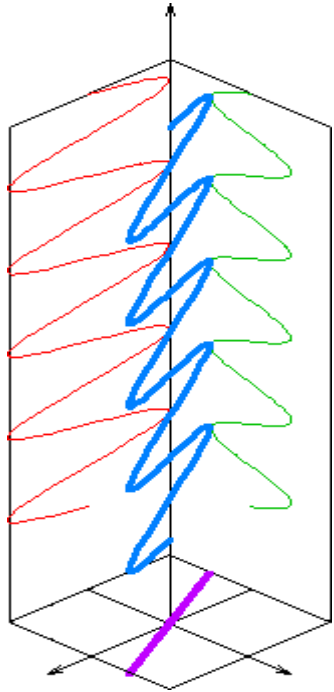
popis chování paprsku světla pomocí elektromagnetické vlny - elektrického a magnetického vektoru, pro další popis je dostačující elektrický vektor (jsou ortogonální)

paprsek lineárně polarizovaného světla = výslednici po složení dvou paprsků opačně kruhově polarizovaného světla, L a R, „ve směru“ a „proti směru“ otáčení hodinových ručiček

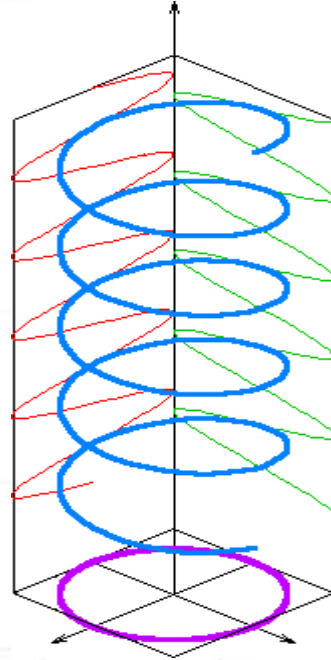
„clockwise - anti-clockwise“



Nelineární optické vlastnosti materiálu



lineární polarizace



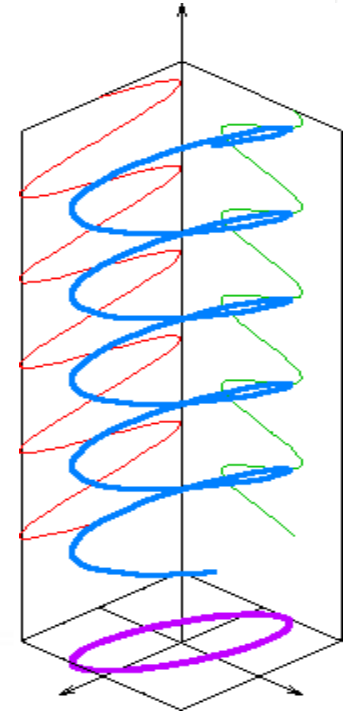
kruhová (cirkulární) polarizace

dva paprsky L-R, které jsou asymetrickou molekulou různě absorbován

Absorbance A má pak dvě složky A_L a A_R

Cirkulární dichroismus vzorku s molární koncentrací $[J]$, je dána vztahem

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{A_L - A_R}{[J]l}$$

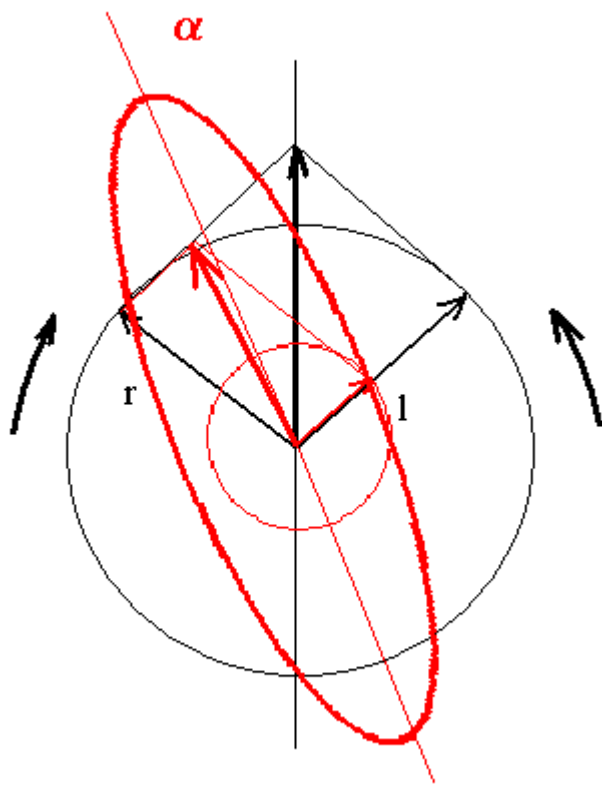


eliptická polarizace

Elipticky polarizované světlo

prof. Antonín Vašíček (+ 1966), profesor brněnské Masarykovy univerzity

dojde-li při průchodu paprsku rozhraním ke **zpoždění** a k rozdílné **absorpci** paprsku l a r , po složení různě absorbovaných vektorů se lineárně polarizované světlo změní na elipticky polarizované



popis: **fyzikální parametry**

azimut φ , (souvisí s poměrem amplitud obou vln r a l)

rozdíl fází Δ , souvisí s fázovým posunem obou vln

geometrické parametry

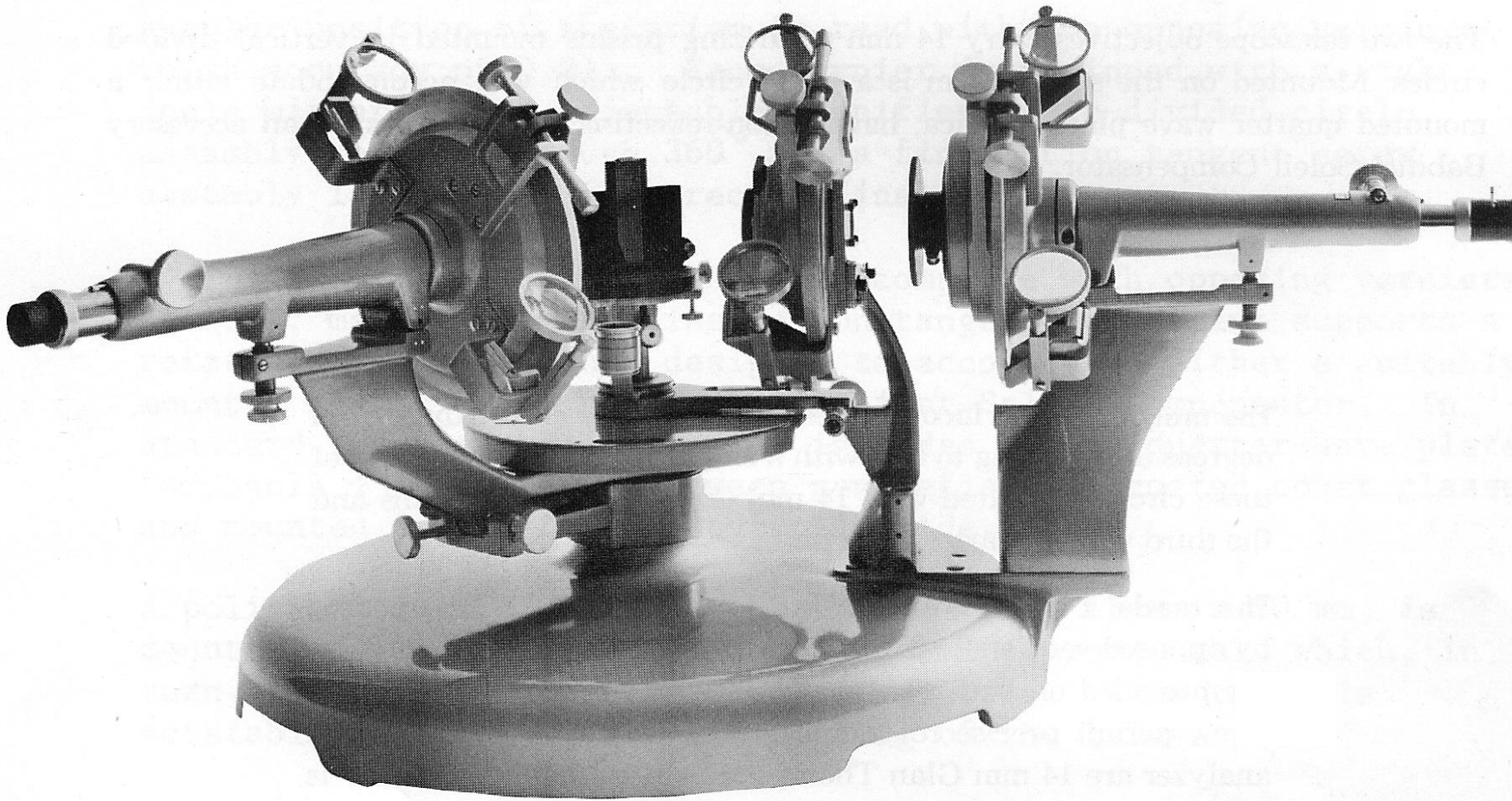
orientace elipsy a excentricita

θ, γ > navzájem lze přepočítat



z nich lze „určit“ optické konstanty n – index lomu, k – absorptivita, d – tloušťka optické vrstvy

Elipsometr „vašičkostroj“



Spektroskopie cirkulárního dichroismu - CD v UV-VIS

- Na rozdíl od standardní UV-VIS spektroskopie se měří interakce vzorku s levotočivě cirkulárně polarizovaným a s pravotočivě cirkulárně polarizovaným světlem, obvykle střídavě, typicky v rozsahu vlnových délek cca 165 - 950 nm až do NIR cca 1250 nm.
- Použití polarizovaného světla významně rozšiřuje možnosti standardní UV-VIS spektroskopie - též **ECD** na rozdíl od **VCD** v IČ a Ramanově spektroskopii
- **Další „doprovodné“ metody:**
 - **FD-CD** - fluorescenčně detekovaný CD
 - **LD** - lineární dichroismus (rozdíl absorpce rovnoběžně a kolmo lineárně polarizovaného světla)
 - **ORD** - optická rotační disperze (stáčení roviny lineárně polarizovaného světla jako funkce vlnové délky)
 - **Fluorescence anisotropie a polarizace**
 - **HPLC-CD** - možnost využití k detekci při HPLC,
 - **DR-CD (LD)**, (Diffuse Reflectance Circular/Linear Dichroism)
 - Stopped-flow, a titrace, CD/Absorbance/HV, Fluorescence

Optická aktivita vs. molekulární chiralita

Chirální molekuly jsou opticky aktivní = stáčí rovinu polarizovaného světla

Optická aktivita

měřitelná molekulární vlastnost, která je výsledkem interakce hmoty a záření, zahrnuje všechny jevy spojené s rozdílnou interakcí objektu RCP a LCP

Molekulární chiralita

je obecnější vlastnost, která je spojená s molekulou, nezávislá na interakci se zářením.

Řada úrovní definice

- Molekula je chirální, pokud není ztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem - **disymetrická molekula**
- Molekula je chirální tehdy a pouze tehdy, když nemá inverzní osu symetrie S_n

Molekulární chiralita – prvky symetrie

Chirální vs. achirální molekuly

asymetrická molekula - žádný prvek symetrie, ani osa S_n , ani střed symetrie i , ani rovina symetrie σ = molekula je chirální

disymetrická molekula - jen rotační osu, je chirální

Bodové grupy symetrie:

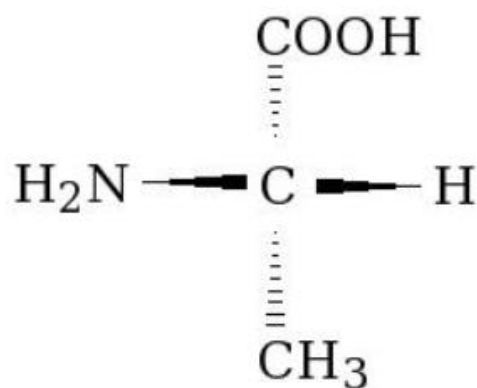
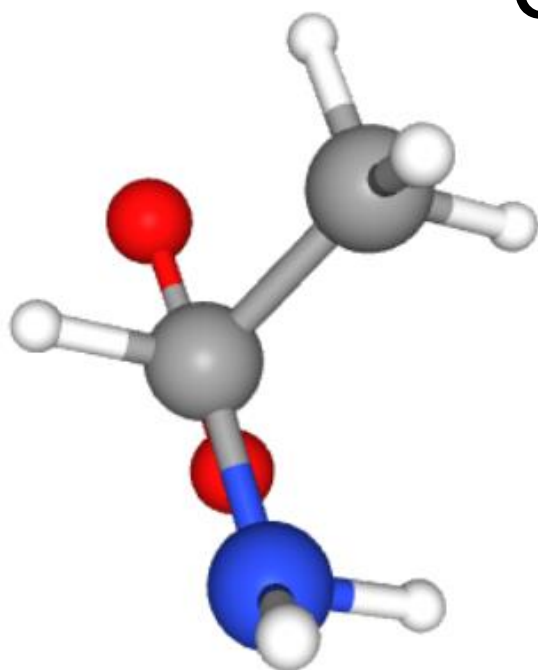
C_1 - asymetrická molekula, je chirální

C_n , $n > 1$ - disymetrická molekula, je chirální

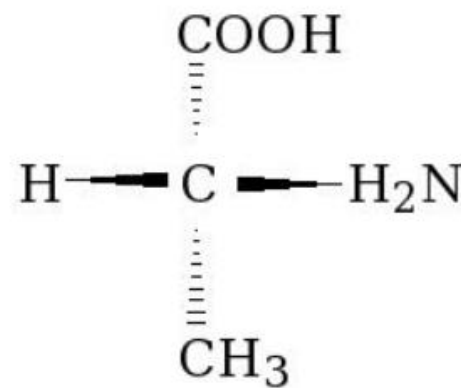
D_n - disymetrická, je chirální, pozn.: grupa symetrie D v případě přítomnosti svislé (Diedrické) roviny σ_d

Příklad jednoduché chirální molekuly Alanin
 L-(+)-Alanin , (R)-2-aminopropanová kyselina
 D-(-)-Alanin, (S)-2-aminopropanová kyselina

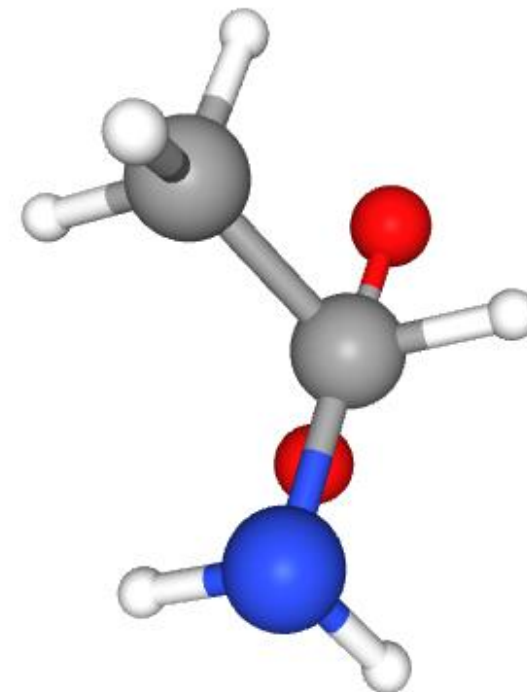
Optické izomery - enantiomery



L-Alanin

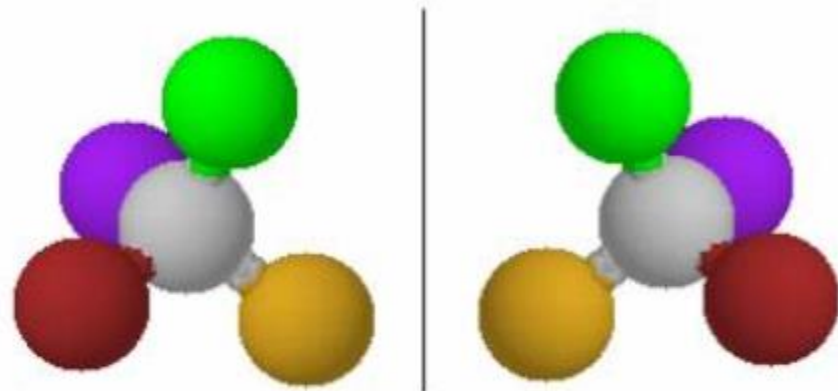


D-Alanin

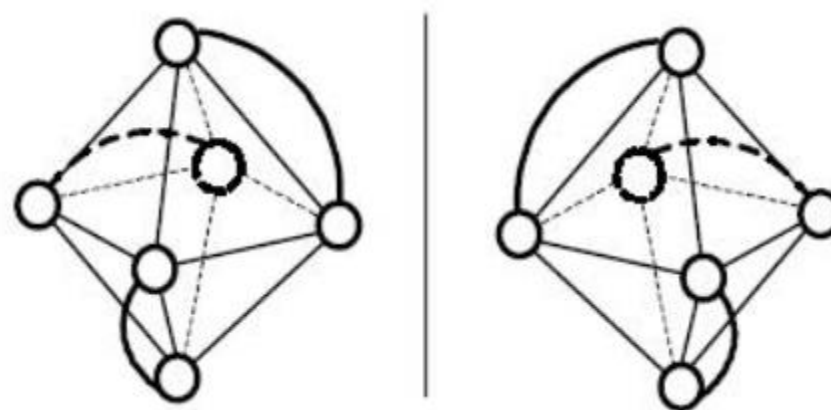


V molekule může být i více center asymetrie - chirality

Asymetrické sloučeniny

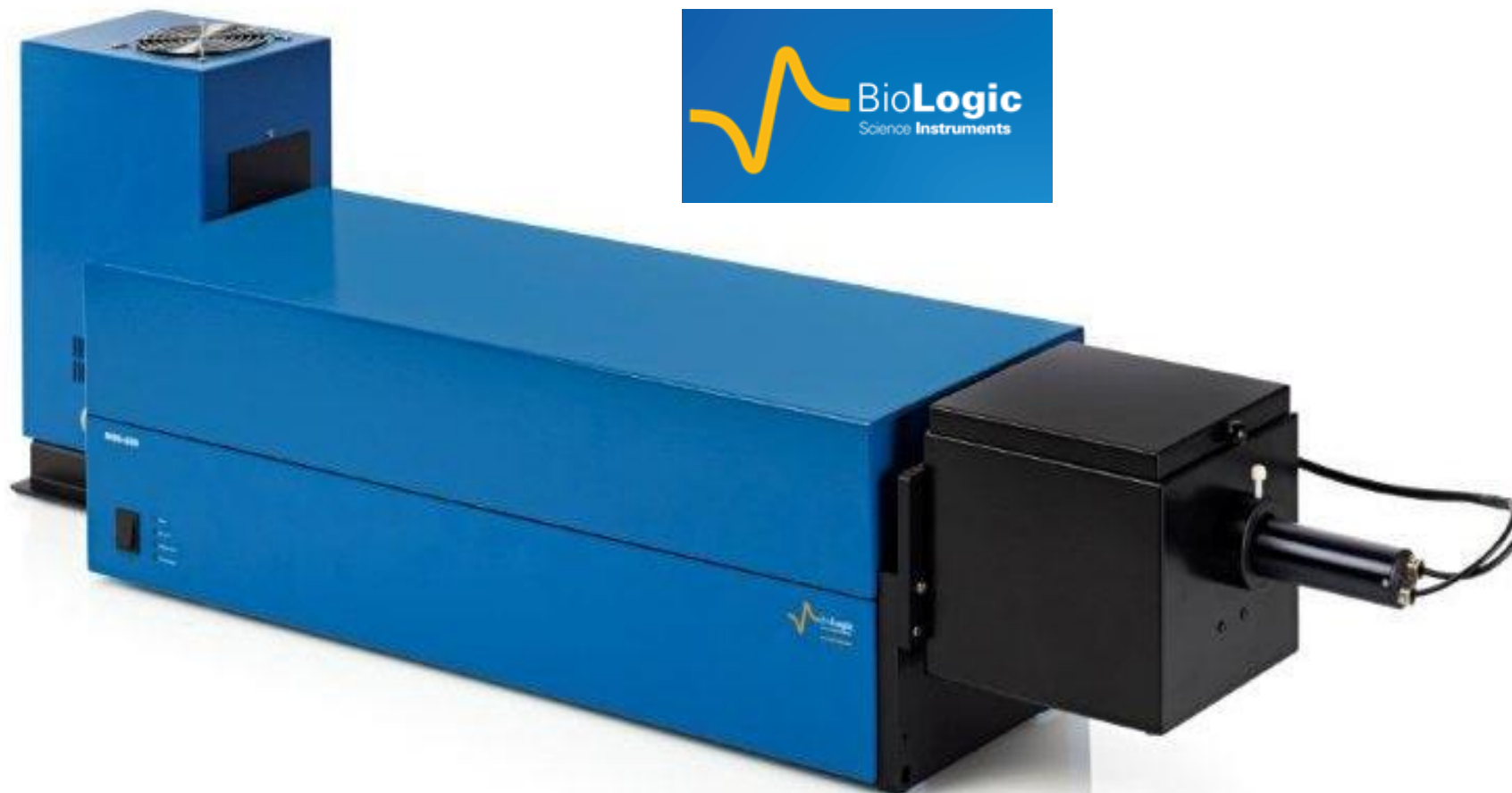


Nejen s asymetrickým uhlíkem



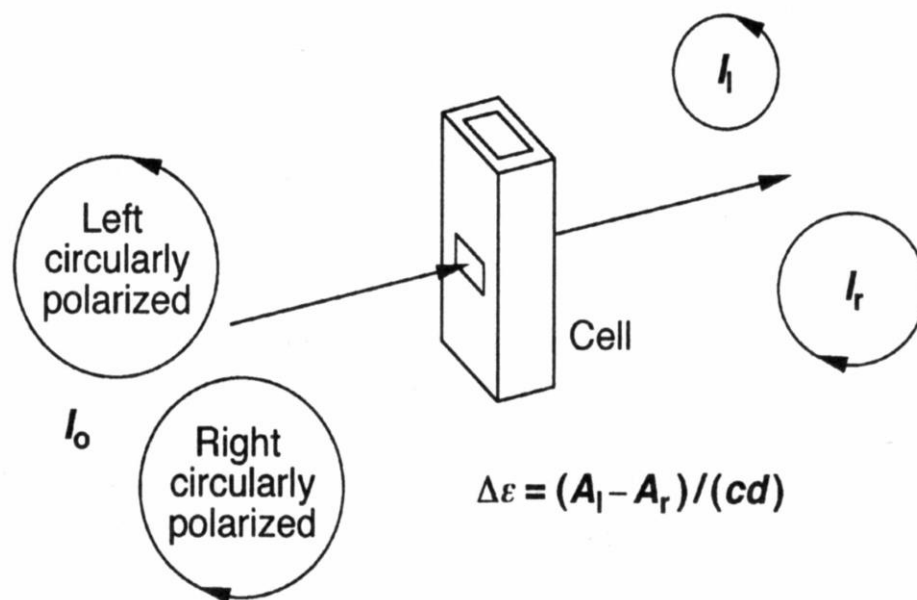
Také komplexy a klastry,
čtvercových, tetraedrických a
oktaedrických komplexů

CD spektrometr – dichrometr - spektropolarimetr



Proteiny, nukleové kyseliny, cukry, chirální molekuly obecně...

Z čeho se skládá spektropolarimetr

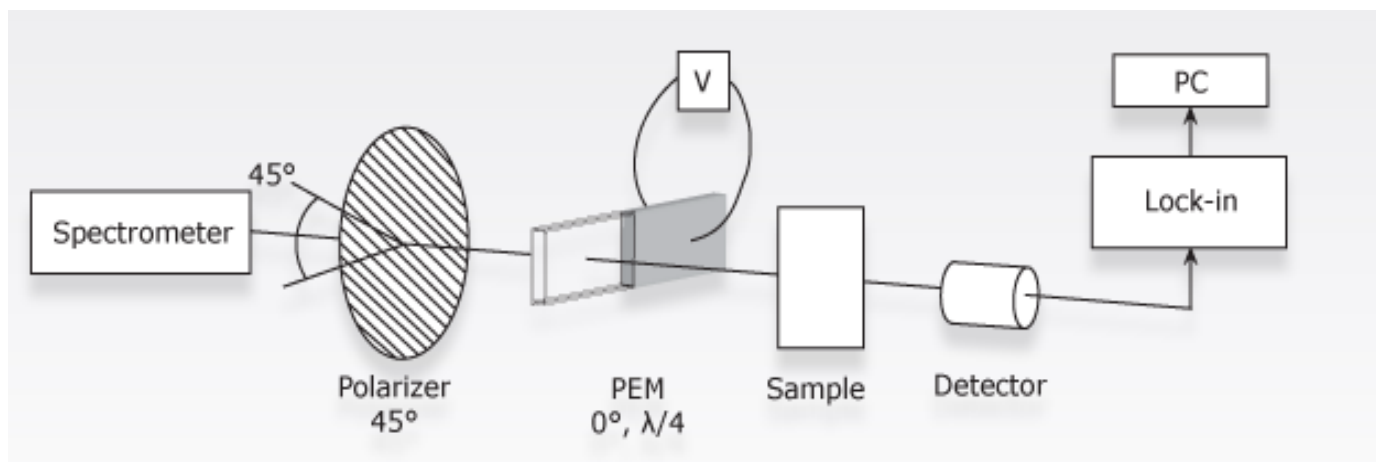


Circular dichroism is the difference between the absorptions for left, A_l , and right, A_r , circularly polarized light. Alternately left and right circularly polarized light with the initial intensity I_0 is passed through the sample cell. In most CD spectrometers, the difference between A_l and A_r is calculated using solely the final intensities, I_l and I_r

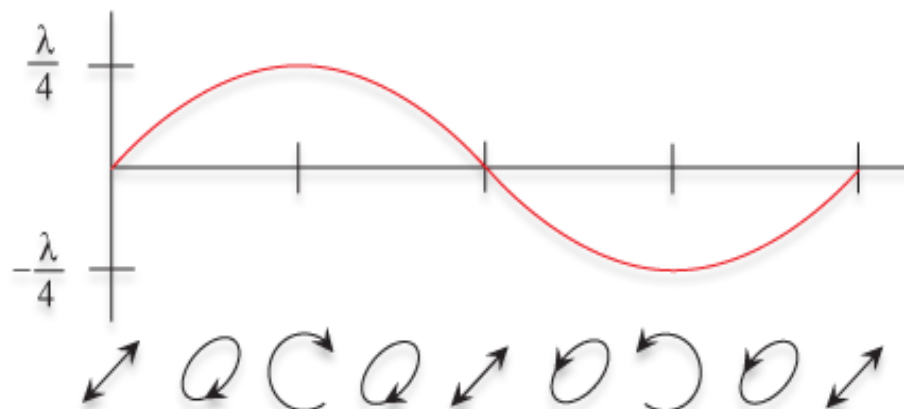
- zdroj světla
- monochromátor
- polarizátor
- PEM
- držák vzorku - kyveta
- detektor

Kvalita jednotlivých dílů určuje kvalitu celého spektrometru

Jak vzniká CD – Fotelastický modulátor - PEM



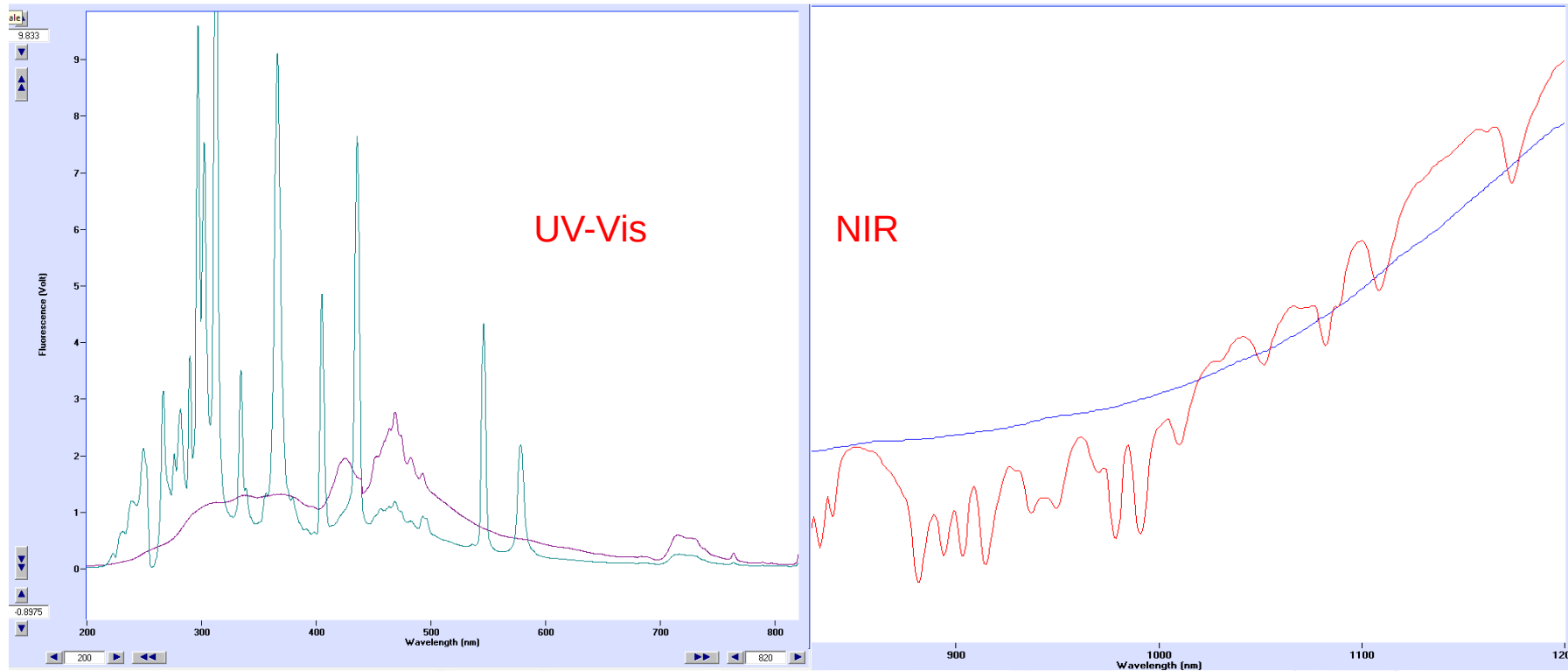
PEM je zařízení, generující střídavě levotočivě a pravotočivě polarizované světlo s frekvencí 50 kHz



PMT (typicky fotonásobič) měří v obou fázích polarizace a tak generuje CD

Zdroj světla

- duální světelný zdroj: Xe a Xe/Hg lampa nebo wolframová
- uživatel si může zvolit lampu pro svou aplikaci



— Xe spectrum
— Xe/Hg spectrum

— Xe
spectrum
— Tungsten
spectrum

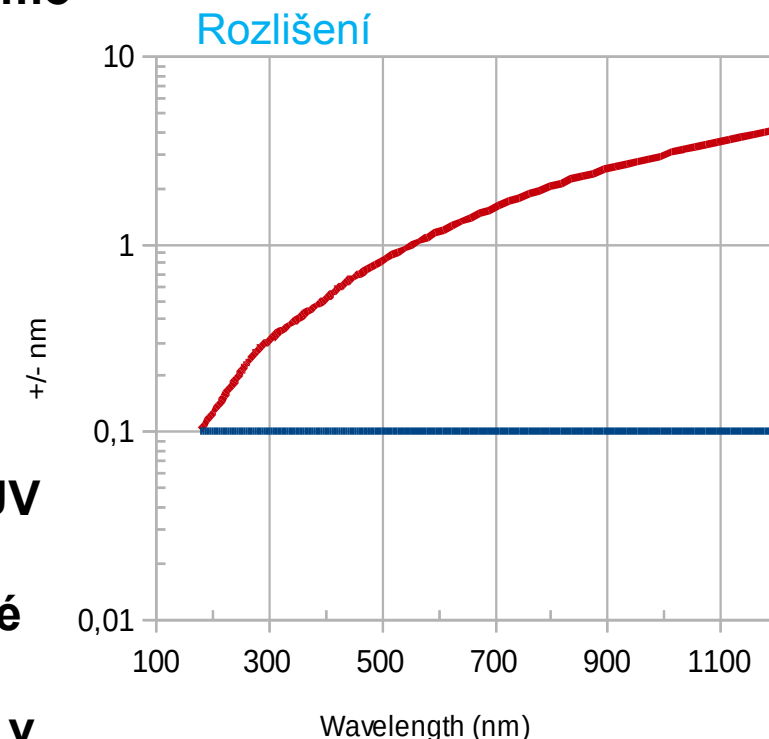


Disperze světla

Konvenční CD spektrometry používají hranolové monochromátory, což má pro některé aplikace (zejména SFM) a mimo UV oblast - nedostatky

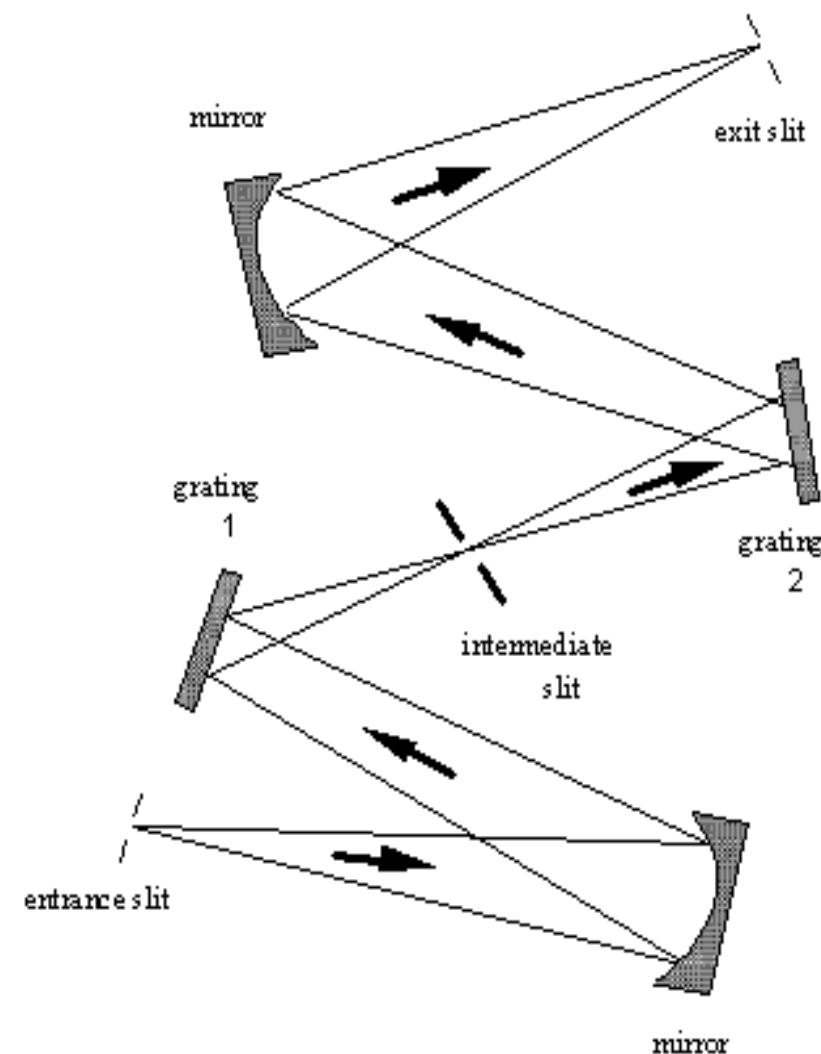
Alternativně jsou vhodnější CD spektrometry s dvojitým mřížkovým monochromátorem.

- je dosaženo vysokého výkonu v UV i ve Vis a NIR oblasti
- možnost úplného otevírání optické štěrby,
- konstantní rozlišení vlnové délky v celém rozsahu vlnových délek
- mimořádně nízké „stray light“, (< 3ppm).



Profil rozlišení vlnové délky pro mřížku (modře) a hranol (červeně)

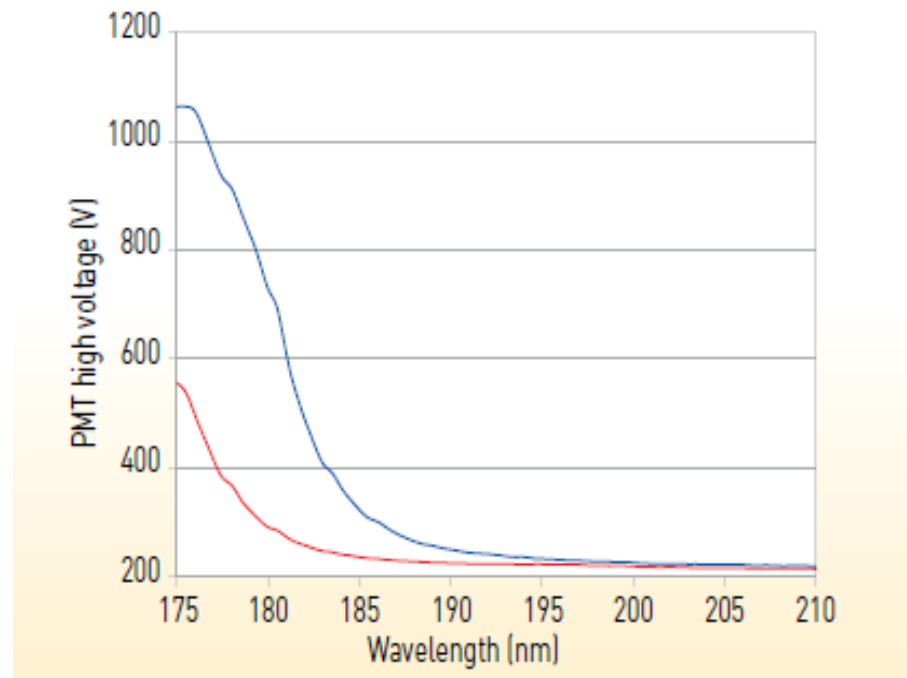
20krát lepší rozlišení v NIR!!



Proplachování dusíkem

Historicky všechny CD spektrometry vyžadují permanentní proplachování dusíkem

Ve skutečnosti je to potřebné pouze pro vlnové délky pod 195 nm, zejména proto, aby nedocházelo k poškození optiky ozonem.

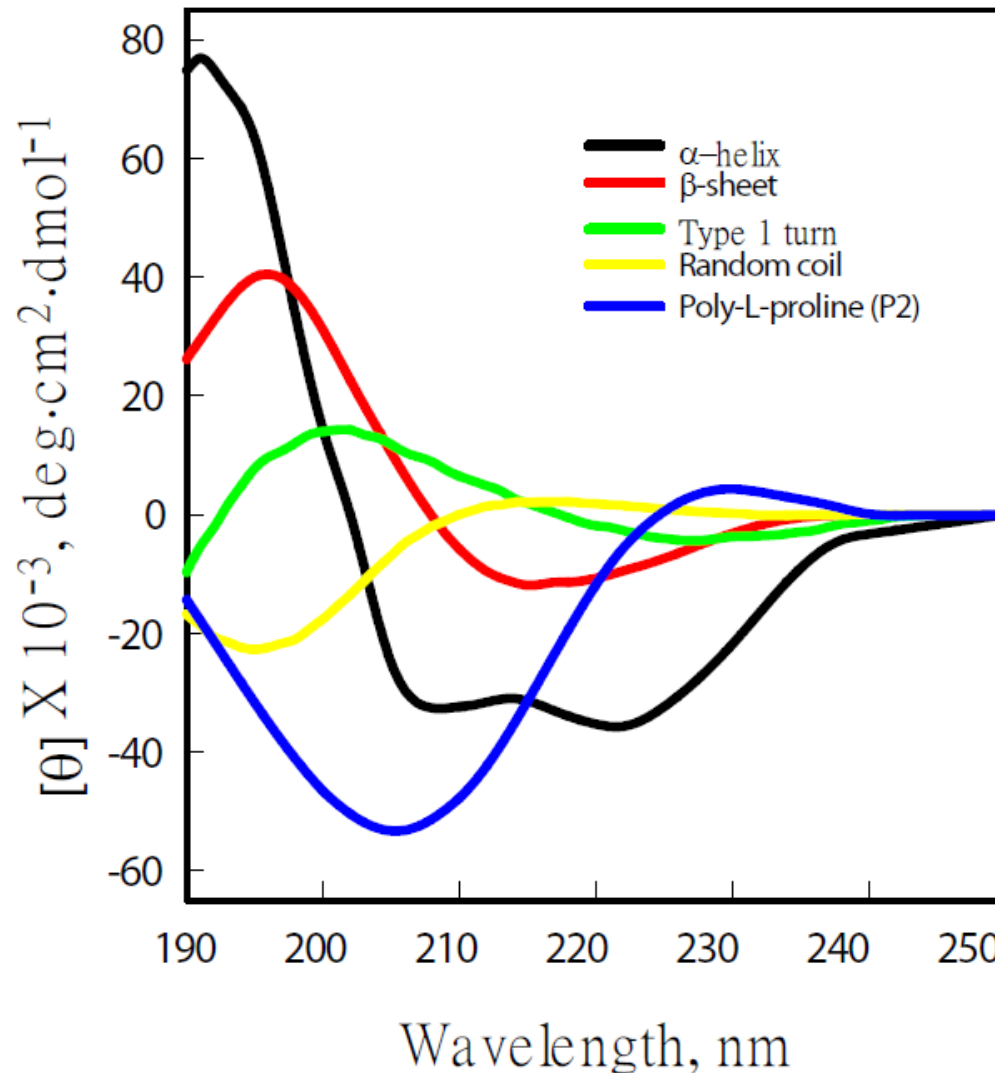


HV spectra with N₂ flushing (red)
and without N₂ flushing (blue)



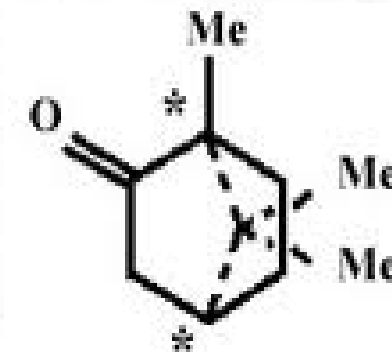
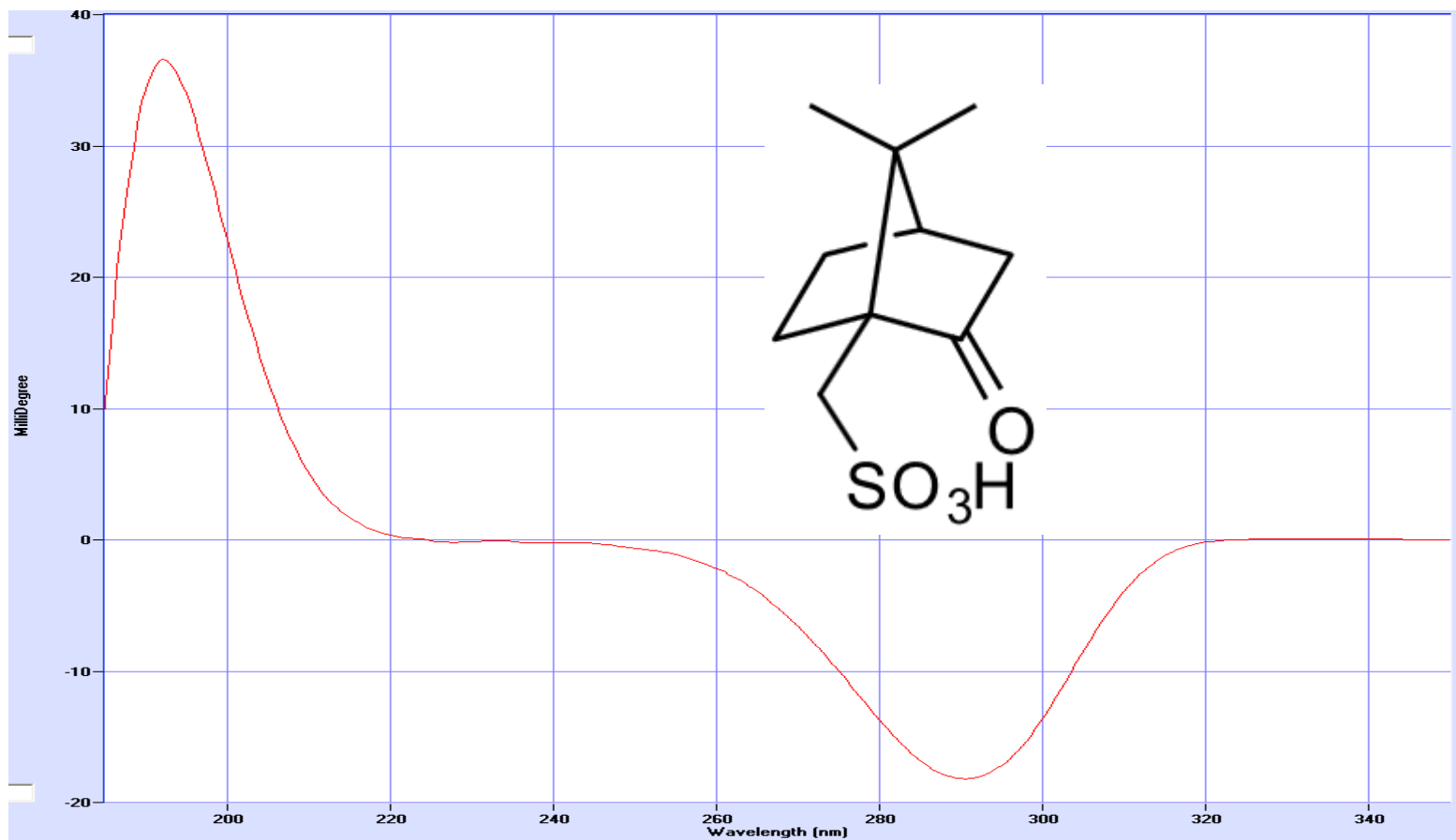
U MOS-500 je optická komora oddělena od skříně s optickým zdrojem, tím je toto riziko vyloučeno a proplachování dusíkem je nutně jen pokud to vyžadují podmínky experimentu.

Příklady aplikací: far UV možnost analýzy sekundárních strukturních motivů



Accuracy of the CD method
(compared to known structures):
helix 95-100%
sheet < 75%
turn < 25%
other < 90 %

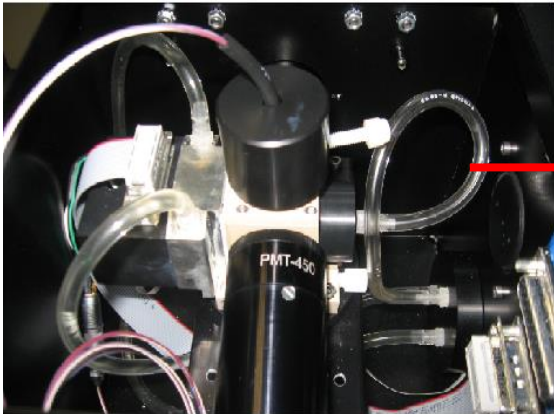
CD: příklady aplikací



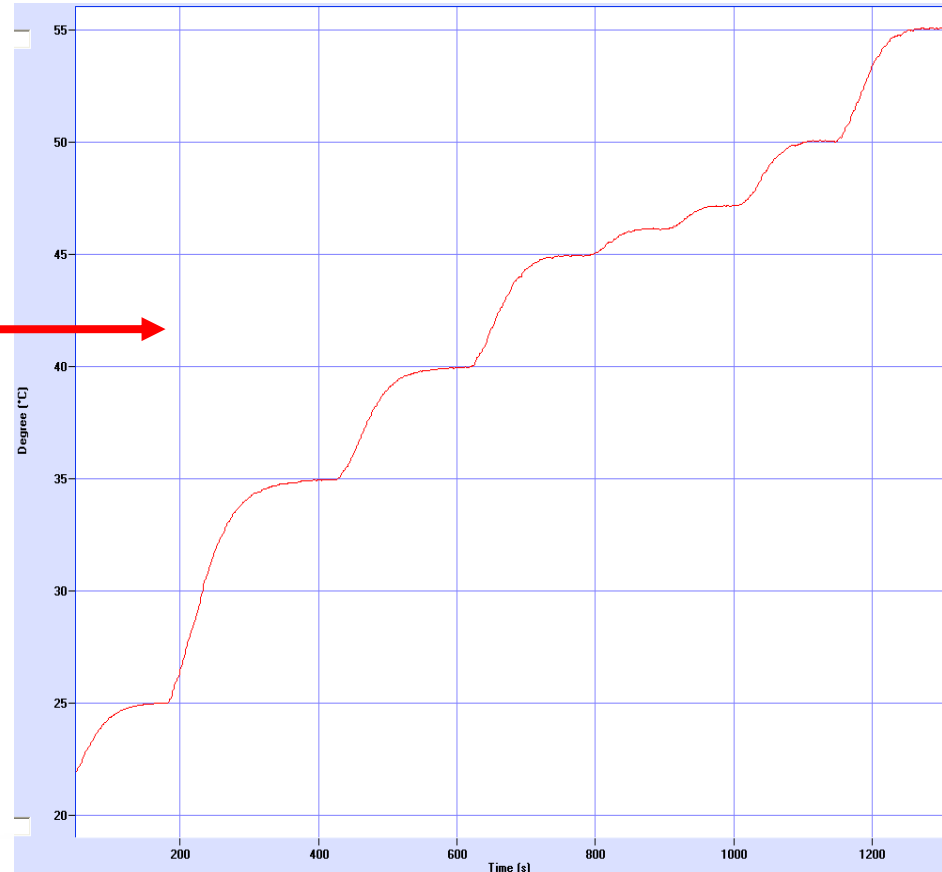
***0.06% Camphor sulfonic acid 0.2 s/pt, 1 mm light path
-> solution used for checking CD instrument***

Řízení teploty vzorku

Kyvetový držák s
peltierovým článkem



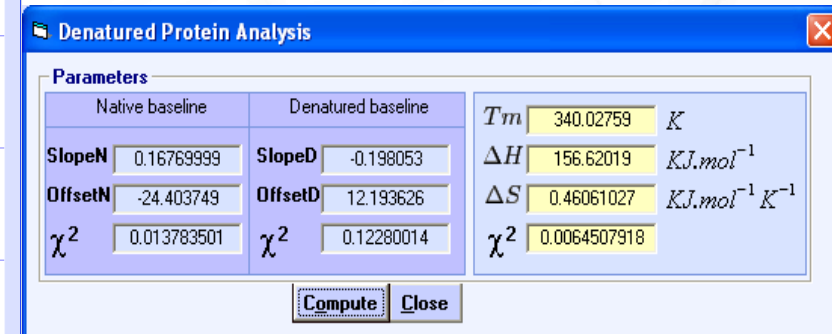
Držák na čtyři kvety



Teplotní čidlo je ve vzorku.
Regulace pracuje v režimu teplotní rampy, což
umožňuje precizní nastavení a kontrolu teploty s
teplotním skokem již od 1°C s přesností 0.01°C,

Součástí je termodynamická analýza

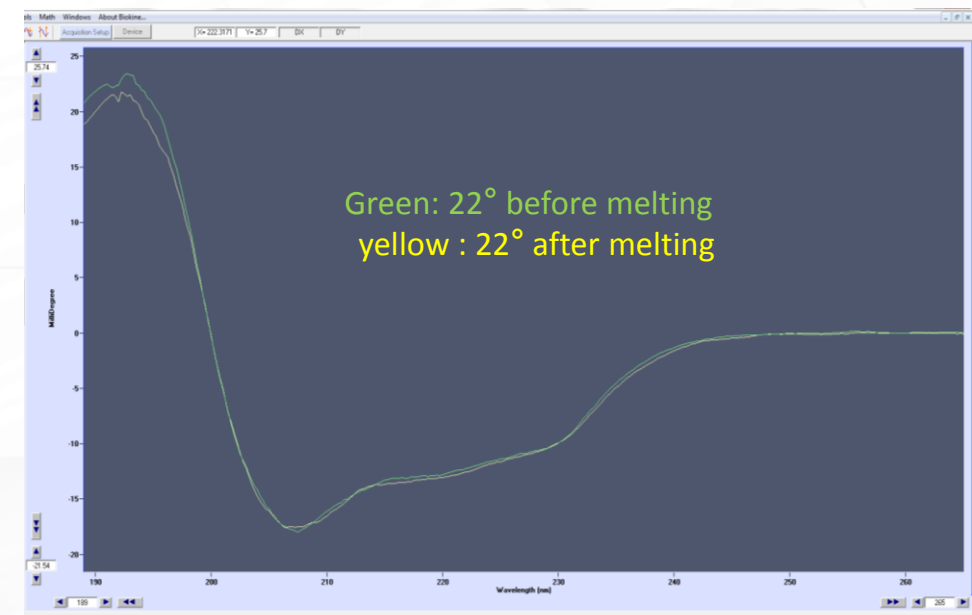
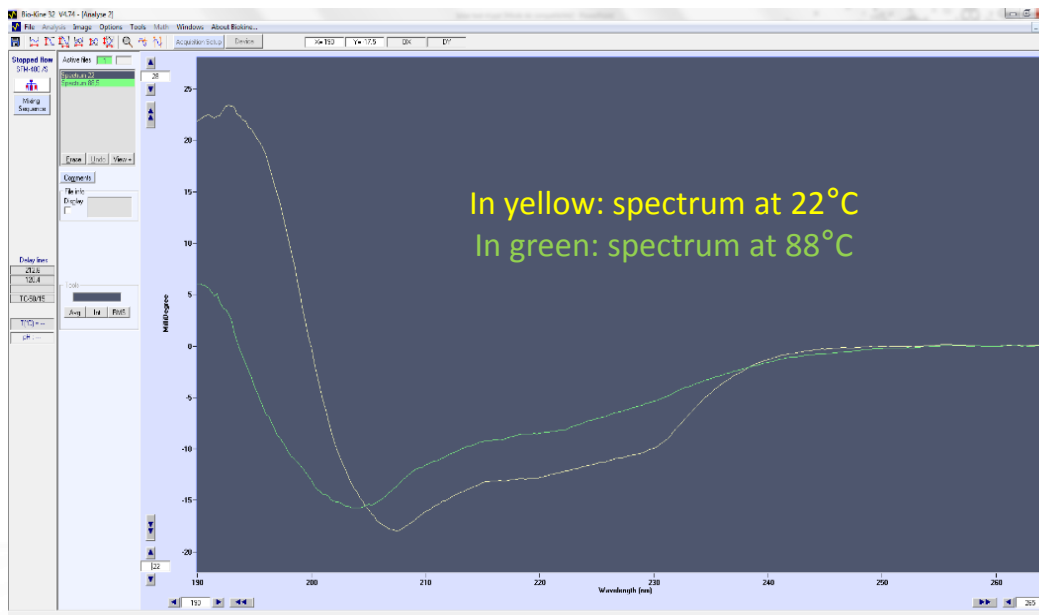
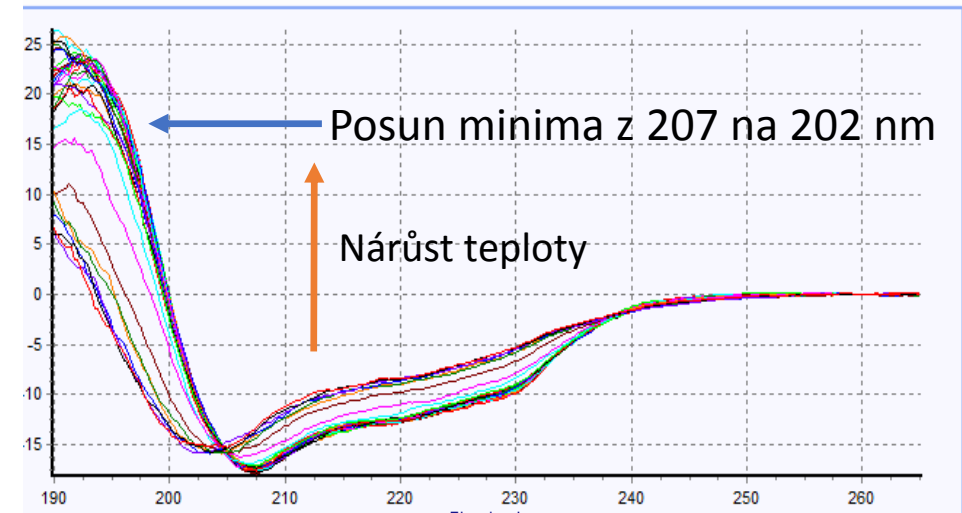
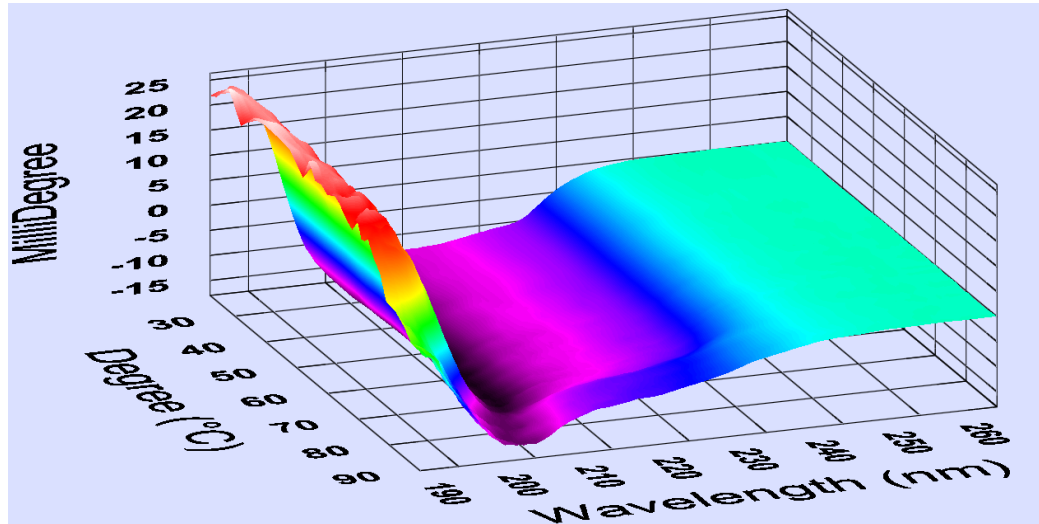
Entalpie (ΔH), entropie (ΔS)
výpočet T_m



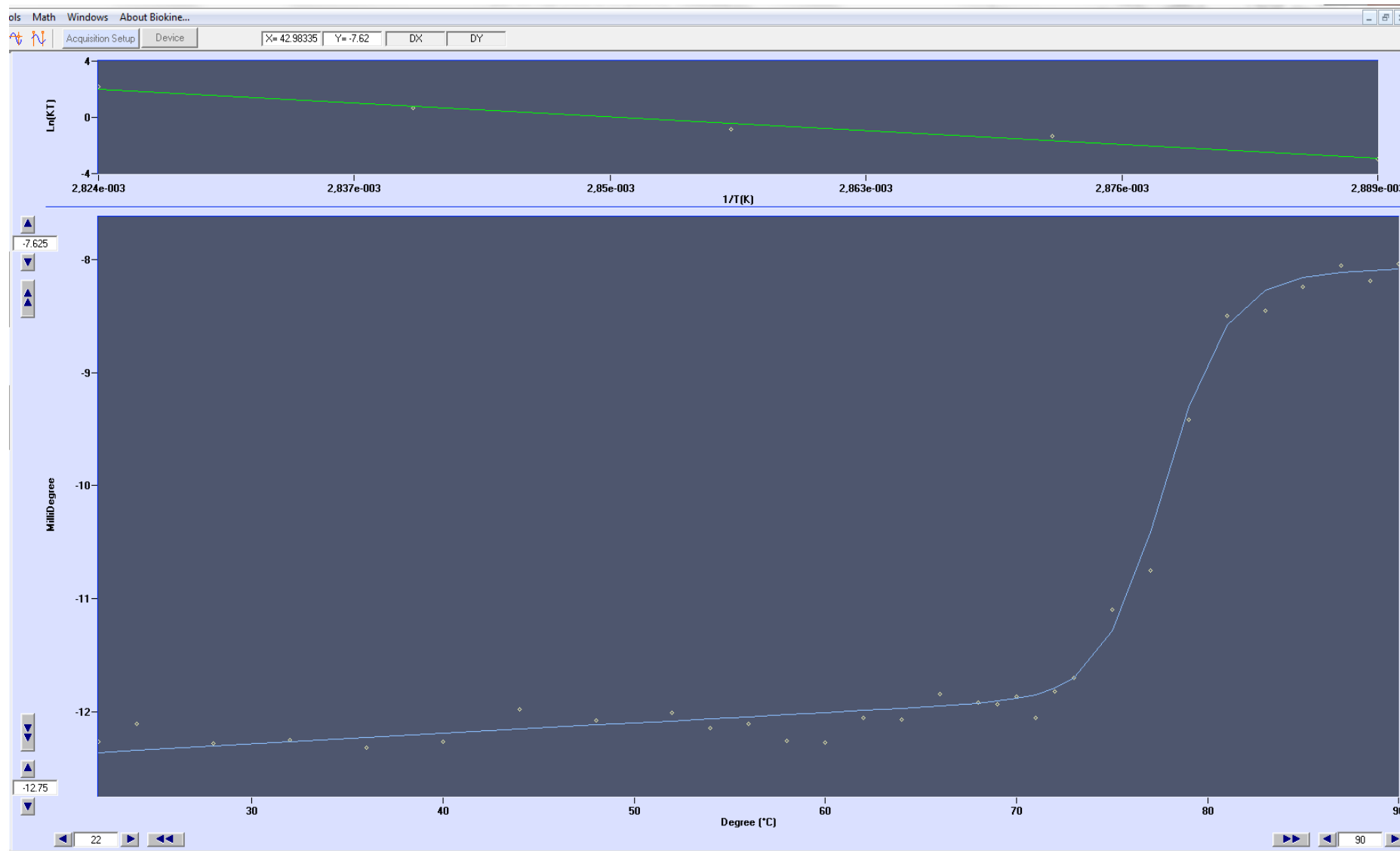
CD termální denaturace pomocí plných spekter



Lysosyme melting – 0,2 mg/ml in 1 mm cell,, no gaz, 1 nm BDW, 190-265 nm, 2°C steps, 1 minute per step, 0,5 s/point, no filtering



Denaturace sledovaná při konstantní vlnové délce 222 nm včetně arrheniova grafu



$T_m = 351 \text{ K}$

Kompletní spektroskopická „Workstation“

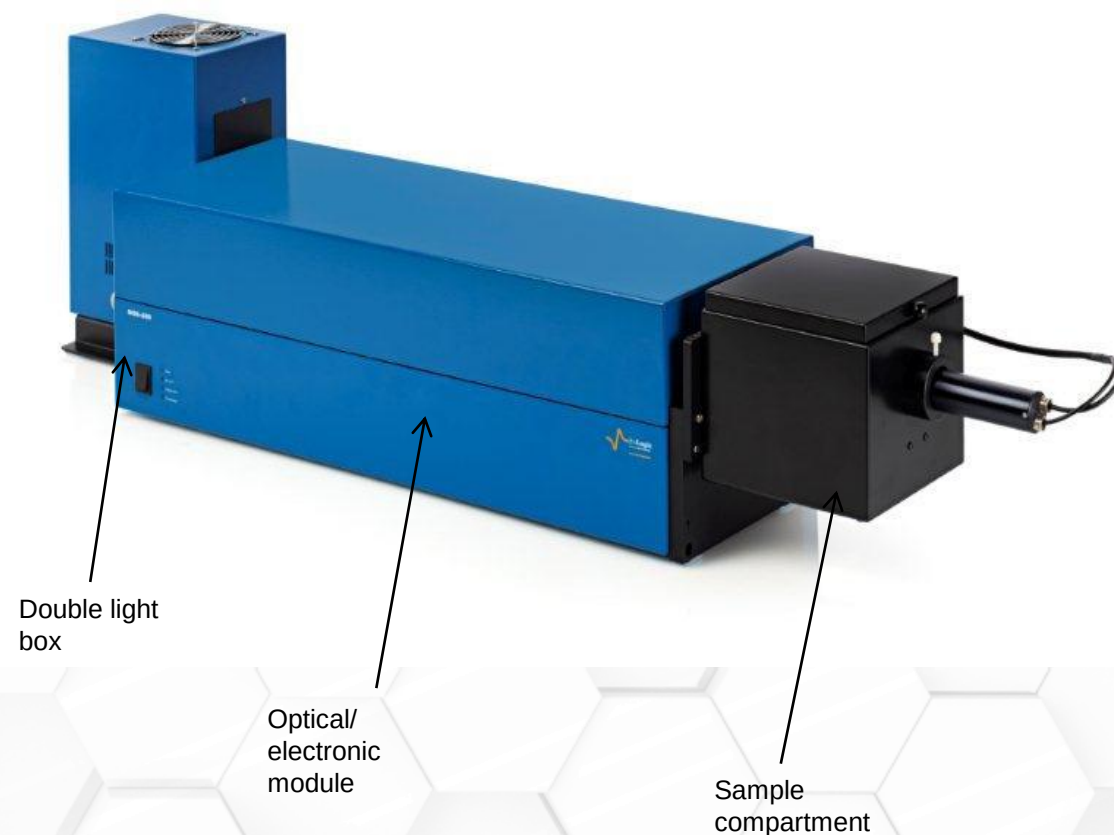
MOS-500 spectrometer – ne jen pro jednu aplikaci !

Standard, MOS-500:

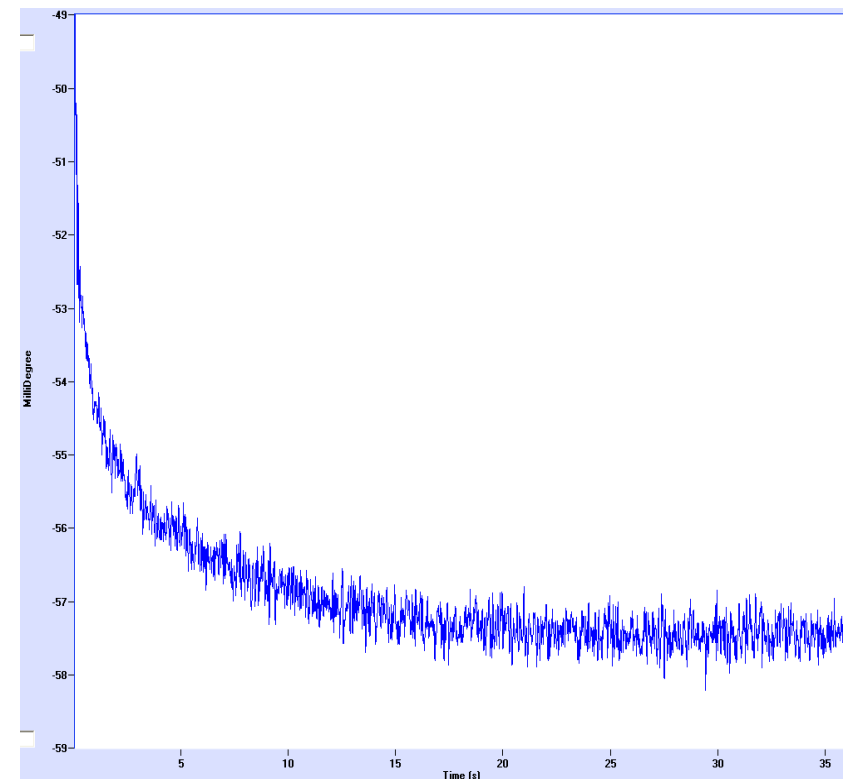
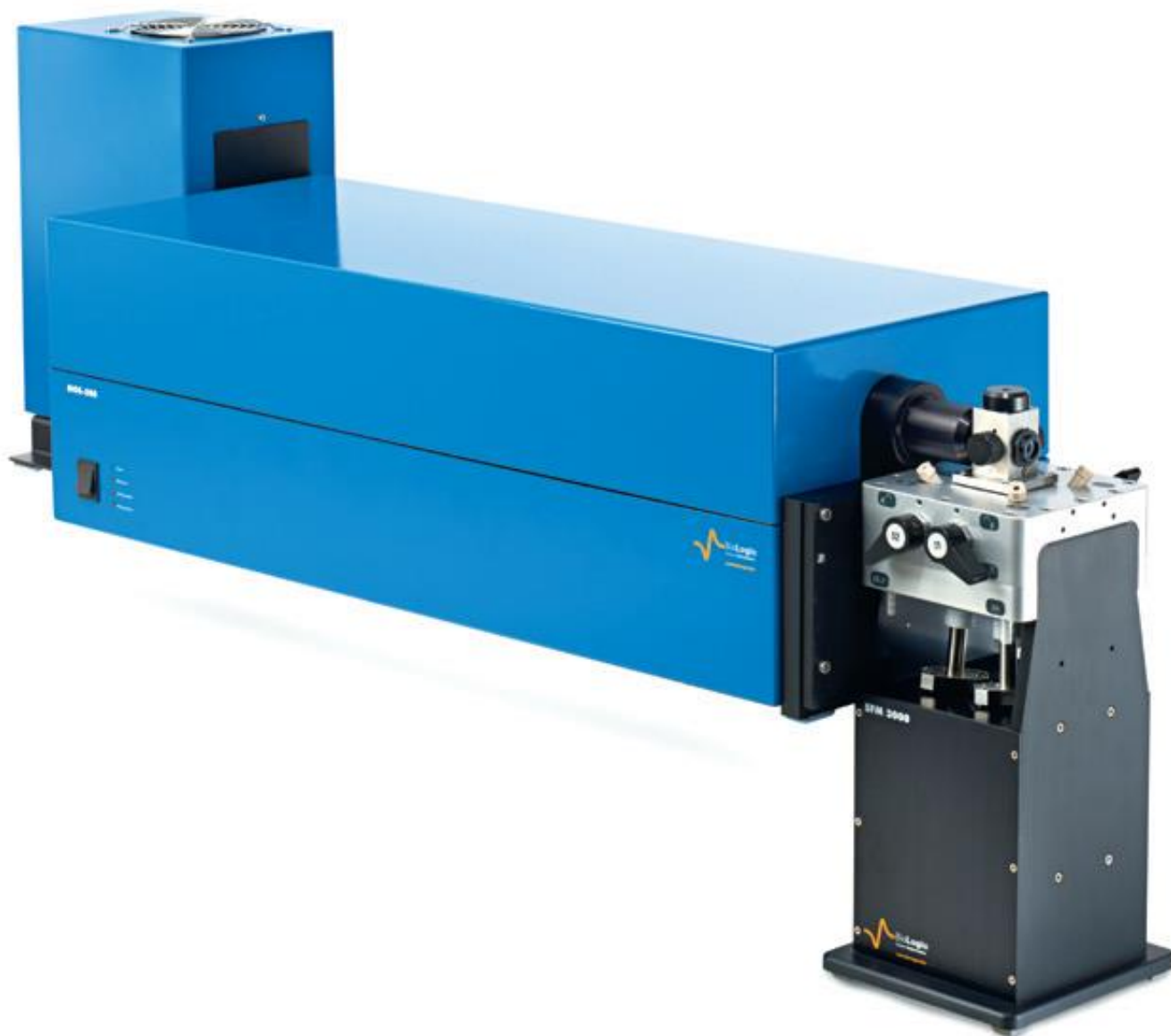
- Absorbance a HV (současně s CD)
 - Excitační fluorescence
 - FD-CD
 - Fluorescence Anisotropie and polarizace
 - Lineární Dichroismus
- Přemístěním
fotonásobiče

Volitelné rozšíření - MOS-500 může měřit:

- současně CD + fluo
- Emisní fluorescence
- ORD
- DR-CD (s integrační koulí)
- stopped-flow, titration...
- MCD



MOS-500 integrovaný se SFM-4000

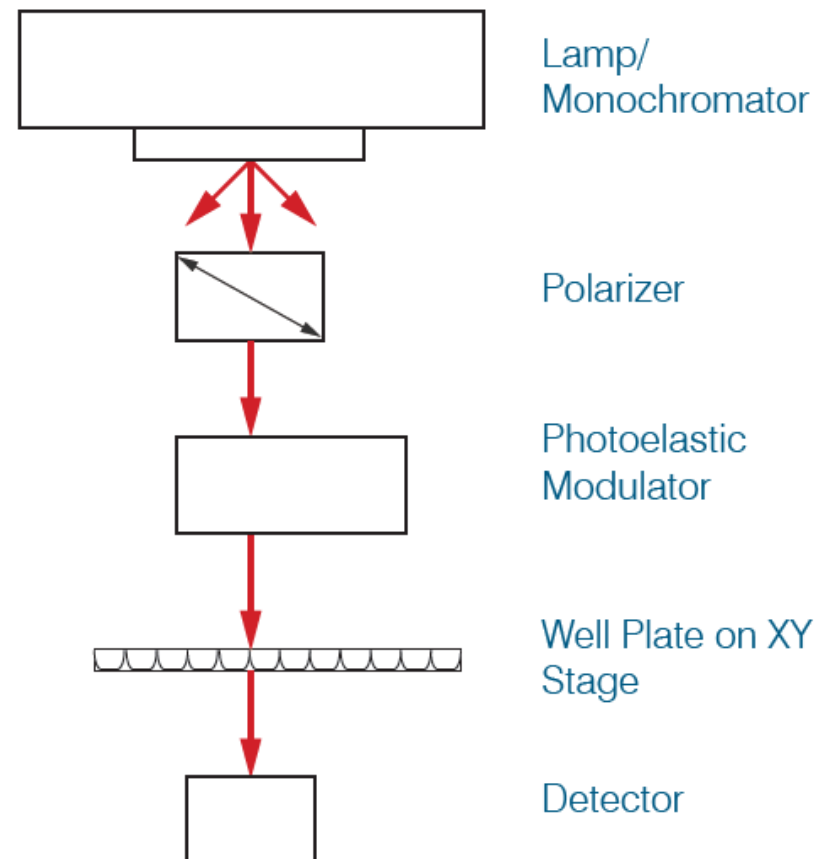


Refolding of 1 mg/ml BSA in GndHCl 6M (1:8
mixing ratio, 227 nm, 1.5 mm light path)

Mikrodestičkový CD reader EKKO

CD a absorbance, módy „spektrum“- konstantní vlnová délka

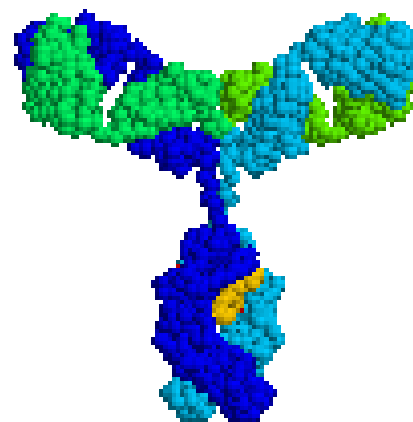
Za cca dvě minuty 96 vzorků, při jedné vlnové délce, 185-880 nm





pragolab

DĚKUJI ZA POZORNOST



www.pragolab.cz

janderka@pragolab.cz

www.biologic.net