

KAM KRÁČÍ RAMANOVA OPTICKÁ AKTIVITA ANEB OHLÉDNUTÍ ZA UPLYNULÝMI 40 LETY

VLADIMÍR KOPECKÝ JR.
a VLADIMÍR BAUMRUK

Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2
kopecky@karlov.mff.cuni.cz, baumruk@karlov.mff.cuni.cz

Došlo 14.1.10, přijato 19.5.10.

Klíčová slova: Ramanova optická aktivita, Ramanova spektroskopie, vibrační optická aktivita, chiralita

Obsah

1. Historický exkurz
2. Co je Ramanova optická aktivita?
3. Experimentální přístupy
4. Některé z aplikací ROA
 - 4.1. Absolutní konfigurace molekul
 - 4.2. Enantiomerní přebytek
 - 4.3. Cukry
 - 4.4. Peptidy a proteiny
 - 4.5. Nukleové kyseliny
 - 4.6. Viry
5. Perspektivy
 - 5.1. *Ab initio* výpočty spekter ROA
 - 5.2. Denaturované stavy proteinů
 - 5.3. Povrchem zesílená ROA
6. Závěr

1. Historický exkurz

Ramanova optická aktivita (ROA) patří mezi málo známé a poněkud exotické techniky optické spektroskopie – a není se čemu divit, vždyť byla teoreticky předpovězena teprve v roce 1969 Atkinsem a Barronem v článku nazvaném „Rayleighův rozptyl polarizovaných fotonů molekulami“¹. Tehdy se výpočtem polarizačních charakteristik Rayleighova a Ramanova rozptylu podařilo ukázat, že „rozptýlené záření nese velmi malý stupeň cirkulární polarizace, přičemž jeho intenzita je mírně odlišná pro pravo- a levotočivě kruhově polarizované budící záření“. Šlo však pouze o teoretickou předpověď, která odstartovala honbu za experimentálním potvrzením tohoto nového chiroptického jevu. Jestliže je ale Ramanův rozptyl velmi slabým jevem v porovnání s Rayleighovým (elastickým) rozptylem světla (přibližně jen jeden z 10⁶ fotonů je rozptýlen neelasticky), potom je ROA ještě nejméně o tři řády slab-

ším signálem než Ramanův rozptyl. Po experimentální stránce tak šlo o velice tvrdý oříšek, jehož rozlousknutí bylo na samé hranici možností tehdejší experimentální techniky. V následujících letech tak řada skupin publikovala spektra ROA, která se však posléze ukázala být experimentálními artefakty. První skutečné spektrum ROA změřili teprve Barron, Bogaard a Buckingham v roce 1973 v Cambridge², přičemž toto měření bylo nezávisle potvrzeno Hugem a dalšími v Berkeley³ až v roce 1975. První měření pokrývala pouze úzký spektrální rozsah ~300 až 400 cm⁻¹ a týkala se dvou enantiomerů 1-fenylethylaminu a 1-fenylethanolu, které mají v této spektrální oblasti dvojici spřažených pásů ROA. Od té doby ale ROA urazila notný kus cesty (dobře dokumentovaný v cit.⁴) a postupně se z exotické fyzikálně-chemické techniky rozvinula v nenahraditelný nástroj strukturní analýzy chirálních molekul v roztocích. Paralelně s ROA se rozvíjela i komplementární technika – vibrační cirkulární dichroismus (VCD), která měří rozdíl v absorpci levo- a pravotočivě kruhově polarizovaného infračerveného záření⁵. Souhrnně jsou tyto obě metody označovány termínem vibrační optická aktivita (VOA).

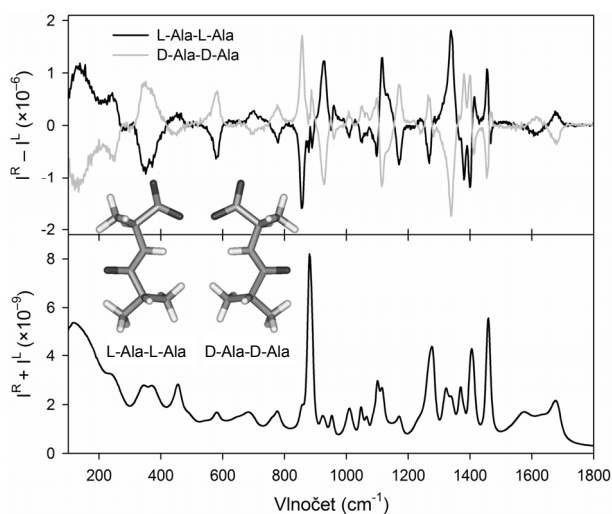
2. Co je Ramanova optická aktivita?

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

$$\Delta = (I^R - I^L) / (I^R + I^L)$$

a kterou lze experimentálně určit na základě měření intenzity rozptylu dopadajícího pravo- (I^R) a levotočivě (I^L) kruhově polarizovaného záření. Tato veličina je analogem faktoru chiralit g (dissymmetry factor), který je používán pro popis cirkulárního dichroismu (CD), avšak narozdíl od něj z historických důvodů ROA používá opačnou konvenci, tedy $I^R - I^L$, zatímco v CD se užívá rozdíl v absorbanci mezi levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením ($A^L - A^R$).

Při zběžném pohledu by se mohlo zdát, že ROA v porovnání s elektronovým CD (ECD) nepřináší nové informace, avšak je třeba si uvědomit, že přínos ROA tkví v tom, že měří vibrační optickou aktivitu a tudíž poskytuje mnohem bohatší stereochemickou informaci než ECD, který měří elektronovou optickou aktivitu. Spektrum ROA chirální N -atomové molekuly může obsahovat až $3N-6$ fundamentálních pásů, z nichž každý je spjat s jedním



Obr. 1. Zrcadlová symetrie dvou enantiomerů se odráží v zrcadlové symetrii jejich spekter ROA. Ramanovo spektrum (dole) a odpovídající spektra ICP ROA (nahore) 2M vodného roztoku L-alanyl-L-alaninu (černě) a D-alanyl- D-alaninu (šedě) měřená v geometrii zpětného rozptylu. Pro ROA spektra jsou charakteristické dvojice pásů opačných znamének (spřažené ROA pásy, anglicky couplet)

normálním vibračním módem a každý ve své intenzitě a znaménku nese informaci o konformaci a absolutní konfiguraci té části struktury, která se dané normální vibrace účastní (viz obr. 1). ROA (stejně jako VCD) sonduje stereochemii molekulárního skeletu přímo, zatímco elektronová optická aktivita sonduje stereochemii pouze nepřímo prostřednictvím elektronových přechodů často delokalizovaných přes chromofory zahrnující desítky atomů. Enormní nárůst stereochemické informace obsažené ve spektru vibrační optické aktivity tak představuje její hlavní výhodu ve srovnání s elektronovým cirkulárním dichroismem. Cenou, kterou za toto platíme, je nízká rotační síla vibračních přechodů ve srovnání s přechody elektronovými. Chirální molekuly, které v oblasti UV-VIS neabsorbují (např. cukry) a které tedy nelze zkoumat pomocí ECD, jsou přístupné studiu metodami vibrační optické aktivity.

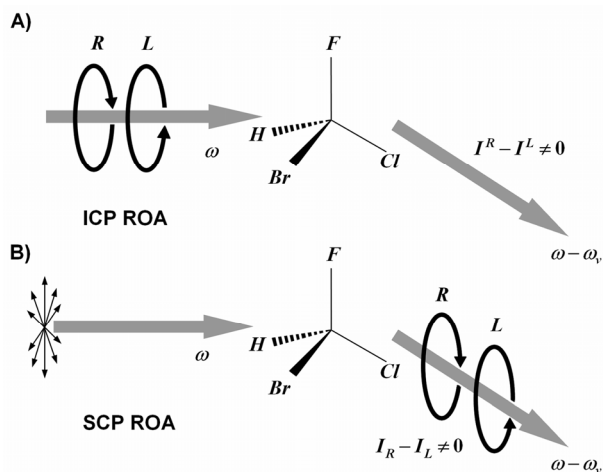
Událost rozptylu navíc probíhá v časové škále $\sim 10^{-14}$ s, která je mnohem kratší než i ty nejrychlejší konformační změny. Spektrum ROA tedy představuje superpozici příspěvků od všech konformerů, které jsou ve vzorku v rovnováze přítomny. Intenzita ROA je závislá na absolutní chiralitě, a proto může dojít i 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)molekul v roztoku⁶.

3. Experimentální přístupy

ROA je spojena s fundamentálním přechodem mezi vibračními hladinami normálního vibračního módu

v základním elektronovém stavu. Ramanův rozptyl je na rozdíl od absorpce dvoufotonový proces, a proto je ROA ve srovnání s VCD mnohem komplexnější, a to jak teoreticky (složitý nepřilíš 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 teoretickou předpovědí ukazuje, že v tomto uspořádání je poměr ROA ke zdrojovému Ramanovu signálu nejpříznivější. Raná měření ROA však byla až do konce 80. let realizována v pravotočivé geometrii (90°). Pokud jde o modulační schéma, historicky první byla ICP (incident circular polarization) varianta, která je založena na modulaci polarizace dopadajícího záření (obr. 2), kdy střídavě přepínáme mezi pravo- 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 resp. depolarizovanou složku (v 90° geometrii při použití analyzátoru). V této variantě ROA tedy neměříme I^R a I^L signál současně, ale v různých časech. ICP variantu využívá např. i ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu UK (cit.⁷). Experimentálně byly realizovány i varianty DCP (dual circular polarization), kdy modulujeme kruhovou polarizaci dopadajícího záření a zaznamenáváme intenzitu kruhově polarizované složky v rozptýleném záření – DCP₁ (ve fázi, kdy měříme



Obr. 2. Dva ekvivalentní experimenty ROA. (a) v ICP ROA měříme $I^R - I^L$, kde I^R a I^L jsou intenzity rozptýleného záření (nepolarizované) pro dopadající pravo- resp. 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 nepolarizované. Podle užívané konvence horní indexy označují polarizaci dopadajícího záření a dolní indexy polarizaci rozptýleného záření

$I_R^R - I_L^L$) a DCP_{II} (v protifázi, kdy měříme $I_L^R - I_R^L$) (cit. 8).

Komerční spektrometr ChiralRAMAN™, který vychází z novátorské koncepce Huga a Hangartnera⁹ a který využívá i sofistikované postupy potlačující experimentální artefakty,¹⁰ je naopak založen na variantě SCP (scattered circular polarization) (obr. 2). Její hlavní předností je současné zaznamenávání intenzity pravo- (I_R) a levotočivě (I_L) kruhově polarizované složky v rozptýleném záření. Tím se automaticky zbavíme složky šumu (tzv. flicker noise), která je vyvolaná přítomností prachových částic ve vzorku, fluktuacemi hustoty, kolísáním výkonu laseru a dalšími náhodnými ději. To představuje nesmírnou výhodu oproti spektrometrům ICP ROA, kde je odečítán signál měřený v různých časech. Šum má potom jinou než čistě stochastickou povahu a nelze ho tedy v měřených spektrech ROA běžnými postupy potlačit.

Experimentální rozvoj ROA 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 technice (především díky využití mnohokanálových detektorů CCD v Ramanově spektroskopii) nastal prudký rozvoj této metody. Současný typický spektrometr ROA se tedy skládá z budícího kontinuálního laseru, vysoce světelného zobrazovacího spektrografu (ideálně $f/1,4$) a chlazeného CCD detektoru⁴. Spektrometr ICP ROA má navíc v excitační větvi elektrooptický modulátor (Pockelsovu celu), pomocí kterého přepínáme mezi pravo- a levotočivou kruhovou polarizací dopadajícího záření. Jádrem spektrometru SCP ROA je naopak polarizační dělič, který dokáže prostorově oddělit pravo- a levotočivě kruhově polarizované komponenty v rozptýleném záření, pomocí vláknové optiky je přivést na vstup spektrografu a obě současně nad sebe zobrazit na CCD detektoru. Spektrum ROA potom získáme jejich odečtením.

Komerční dostupnost spektrometru ROA otevírá prostor pro rozvoj řady aplikací. Přestože je rutinní použití tohoto přístroje stále velmi náročné, zpřístupňuje tuto jinak experimentálně složitou techniku širokému spektru uživatelů. Kvalitní ROA spektra proteinů (ca. 40 μl vzorku o koncentraci 30 mg ml^{-1}) lze na tomto zařízení při excitačním výkonu 500 mW získat již za 2 až 5 hodin.

Z hlediska experimentálního měření přináší ROA ve srovnání s komplementární technikou VCD 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 nižších vlnočtů však doposud zůstává pro VCD experimentálně nepřístupná. Přitom 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 má naopak pouze slabý Ramanův rozptyl a představuje tak pro tuto spektroskopickou metodu téměř ideální rozpouštědlo. Nevýhodou však pro obě výše zmíněné techniky zůstává

značná náročnost na koncentraci studovaného vzorku (minimálně desítky až stovky mM).

4. Některé z aplikací ROA

4.1. Absolutní konfigurace molekul

Máme-li vzorek čistého enantiomeru, potom základním problémem stereochemie je určit pomocí fyzikálně-chemických metod, o který ze dvou enantiomerů se jedná. Spektra ROA v kombinaci s kvantově-chemickými simulacemi spekter lze užít pro stanovení absolutní konfigurace malých až středně velkých chirálních molekul, a to následujícím postupem: na základě výpočtu *ab initio* pro zvolenou absolutní konfiguraci je simulováno spektrum ROA a pokud si simulované a změřené spektrum odpovídají jak ve znamencích pásů ROA, tak i alespoň přibližně v jejich polohách a relativních intenzitách, je konfigurace molekuly zvolená pro výpočet totožná s konfigurací měřené molekuly.

Přesvědčivým testem schopnosti ROA bylo určení absolutní konfigurace chirálně deuterovaného 2,2-dimethylpropanu $\text{C}(\text{CH}_3)_4$ (cit. 11). Tato molekula neobsahuje žádný těžký atom, proto anomální rozptyl rentgenových 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 signál je navíc v tomto případě velmi slabý ($\Delta \sim 10^{-5}$). Situaci komplikuje i existence celkem devíti různých rotačních konformerů ve vzorku, neboť každá ze skupin CH_2D a CHD_2 může mít tři různé orientace. Proto bylo pro každý rotamer spočítáno spektrum ROA a výsledné spektrum ROA bylo následně 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 stanovit absolutní konfiguraci deuterovaného 2,2-dimethylpropanu jako *R*.

4.2. Enantiomerní přebytek

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

$$f_{EE} = (c_R - c_S) / (c_R + c_S) [\%]$$

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 spektra ROA je

přímo úměrná enantiomernímu přebytku. Pro kvantitativní stanovení je však nezbytné provést kalibrační měření na souboru vzorků o různé ale známé enantiomerní čistotě. Namísto spekter ROA je při určování enantiomerního přebytku vhodnější pracovat s podílovými spektry ROA/Raman, neboť ta jsou normována na zdrojový Ramanův signál. Toto podílové spektrum je pak vlastně spektrem diferenční cirkulární intenzity Δ definované výše.

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 jednotlivých komponent i signál rozpouštědla. 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 složek¹².

4.3. Cukry

Cukry jsou velice vděčnými objekty spektroskopie ROA, protože dávají velmi bohatá, snadno identifikovatelná a dobře interpretovatelná spektra (což je v silném kontrastu s CD, protože oblast pozorování leží v daleké UV oblasti, a navíc se ukázalo, že i tak nejsou spektra CD cukrů příliš informačně bohatá). Do dnešní doby již bylo proměřeno velké množství monosacharidů a je tedy k dispozici jakýsi klíč k přiřazení spektroskopické a strukturní informace. Mimo jiné bylo ukázáno, že spektra ROA poskytují informaci o konformaci cukerného kruhu a vzájemném uspořádání –OH skupin v cukerném kruhu (v oblasti tzv. charakteristických vibrací – fingerprint region ~ 950 až 1200 cm^{-1}), absolutní konfiguraci a axiální či ekvatoriální orientaci skupin navázaných na anomerní uhlík (~ 750 až 950 cm^{-1}) a o konformaci exocyklické CH_2OH skupiny (v oblasti CH_2 a C–O–H vibrací ~ 1200 – 1500 cm^{-1}) (cit.^{13,14}).

Z hlediska glykobiologie je však zdaleka nejdůležitější informace o konformaci glykosidické vazby C–O–C , utvořené při vazbě dvou monosacharidových podjednotek, která je určující pro konformaci di-, tri-, ..., oligo- a polysacharidů. Její valenční a deformační vibrace se projevují v oblasti ~ 850 – 950 cm^{-1} . ROA je zvláště citlivá k typu vazby neboť D-maltosa a D-gentobiosa (tedy $\alpha(1\text{--}4)$ vs. $\beta(1\text{--}6)$) mají v této oblasti ROA spřažené pásy opačných znamének, zatímco D-gentobiosa v porovnání s D-celobiosou sice vykazuje rozdílnou spektrální charakteristiku, s ohledem na přítomnost $\beta(1\text{--}4)$ glykosidické vazby, nikoli však přítomností pásů opačných znamének^{14–16}.

4.4. Peptidy a proteiny

ROA se zdá být vynikající technikou pro studium peptidů a proteinů v roztocích, protože spektrům dominují vibrace proteinové páteře, které jsou přímým odrazem struktury proteinu v roztoku. Již z Ramanovy spektroskopie je známo, že se vibrace proteinového skeletu vyskytují dominantně ve třech oblastech: ~ 870 – 1150 cm^{-1} , kde pochází především z valenčních vibrací $\text{C}_\alpha\text{--C}$, $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta$ a $\text{C}_\alpha\text{--N}$ vazeb; oblasti amidu III ~ 1230 – 1310 cm^{-1} , které dominují rovinné deformační vibrace N–H ; a oblasti amidu I ~ 1630 – 1700 cm^{-1} , která má původ ve valenčních vibracích C=O (cit.¹⁷). V případě spektroskopie ROA peptidů se ukazuje, že je třeba uvažovat rozšířený amid III až do oblasti $\sim 1340\text{ cm}^{-1}$, protože zde se ještě nachází informačně bohaté strukturní pásy valenčních vibrací $\text{C}_\alpha\text{--H}$ (cit.^{14,18}). Ačkoli vibrace postranních aminokyselinových řetězců generují řadu charakteristických pásů v Ramanových spektrech¹⁷, jsou tyto vibrace mnohem méně nápadné ve spektrech ROA. Přesto i zde lze nalézt pásy, které nesou informaci o absolutní konfiguraci proteinové části – například pás $\sim 1554\text{ cm}^{-1}$ odráží v Ramanových spektrech, prostřednictvím vibrací indolového kruhu tryptofanu, absolutní velikost torzního úhlu $\chi^{2,1}$ vůči hlavnímu peptidovému řetězci – ze spektra ROA lze odvodit tutéž informaci, avšak znaménko pásu ROA dodává informaci o kompletní stereochemii tryptofanového postranního řetězce – tedy informaci, která je jinak dostupná pouze ze struktur atomárním rozlišením¹⁹.

Doposud byly změřeny desítky spekter ROA různých proteinů a modelových peptidů, které umožnily určit charakteristické vibrace jednotlivých typů sekundárních struktur^{14,18}. Aplikace chemometrických metod na velký soubor těchto spekter (více jak 80) však umožnila postoupit dále – ukázalo se, že spektra ROA nesou jasně identifikovatelnou informaci o terciární struktuře proteinů. Je tedy možné pomocí referenčních spekter určit typ sbalení proteinu ve smyslu strukturní klasifikace proteinů databáze SCOP (cit.²⁰), avšak s tím rozdílem, že chemometrická analýza spekter ROA vzájemně nerozlišuje $\alpha + \beta$ a α/β struktury (cit.^{21,22}).

Přestože bylo první spektrum glykoproteinu změřeno již roku 1994 (cit.²³), další rozvoj ROA v oblasti glykoproteinů je brzděn velmi složitou identifikací a interpretací spektrální informace. Poslední práce, studující glykosylaci hovězího α_1 -kyselého glykoproteinu²⁴, dává naději (i když jde zatím pouze o identifikaci signálu cukerných antén), že pomocí ROA bude možné nezávisle studovat strukturu proteinové i cukerné části intaktních glykoproteinů, což je v současnosti velmi obtížně dosažitelné jakoukoli jinou technikou.

4.5. Nukleové kyseliny

Ačkoli je studium spekter ROA nukleových kyselin stále ještě v počátcích, je zjevné, že jejich spektra ROA jsou odrazem chiralit tří rozdílných částí – chirálního stohového uspořádání jinak achirálních bází, orientace

báze vůči cukernému zbytku kolem N-glykosidické vazby a chiralidy asymetrických center cukerných kruhů¹⁸. Jistý vhléd do interpretace spekter ROA DNA a RNA poskytly studie na modelových systémech pyrimidinových nukleotidů²⁵ a syntetických polyribonukleotidů²⁶. Ukázalo se, že oblast $\sim 1550\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ obsahuje ROA pásy charakteristické pro jednotlivé báze a jejich stohové uspořádání. Oblasti $\sim 1200\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ pak dominují smíšené vibrace bází a cukerných kruhů. Ačkoli se spektra ROA DNA a dvojláčkové RNA příliš vzájemně neliší, v oblasti ~ 900 až 1150 cm^{-1} , kde je možno pozorovat vibrace cukr-fosfátové páteře nukleové kyseliny, je možné jasně rozpoznat rozdíly mezi konformací cukerného zbytku C2'-endo, převažující v B-DNA, a C3'-endo, jež převažuje ve dvojláčkové A-RNA (cit.^{27,28}). To otevírá možnost studovat složitější formy terciární struktury nukleových kyselin.

4.6. Viry

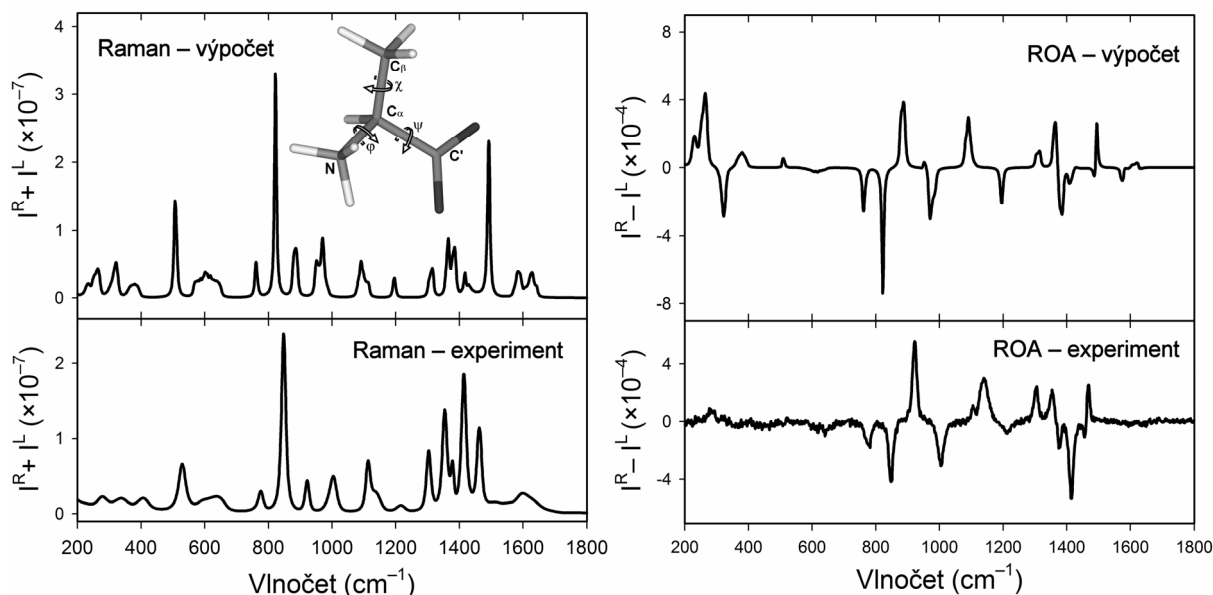
Znalost struktury virů na molekulární úrovni je klíčová pro design antivirotik. Navzdory velké snaze však techniky rentgenostrukturní analýzy čelí s ohledem na rozměry virů (řádově stovky nm) značným obtížím při získávání kompletní 3D struktury. Užití Ramanovy spektroskopie se ukázalo v této oblasti jako velmi přínosné, neboť tato technika umožňuje současně studovat jak proteinovou část, tak nukleovou kyselinu²⁹. Strukturní citlivost ROA navíc slibuje získat ještě detailnější vhléd do struktury virů, avšak její aplikace není v této oblasti jednoduchá vzhledem k depolarizačním efektům, silnému nárůstu Rayleighova rozptylu a náročnosti na koncentraci virových vzorků (nejméně $\sim 10\text{--}20\text{ mg ml}^{-1}$ v závislosti na typu viru)¹⁸.

Z těchto důvodů se první spektrum virů, vláknitých bakteriofágů, podařilo změřit až v roce 1999 (cit.³⁰). Od té doby však byla získána spektra řady virů, přičemž se ukázalo, že ROA je nejen schopna poměrně snadno vzájemně odlišovat jednotlivé typy virů, ale především může díky své strukturní citlivosti popsané výše poskytnout strukturní informace o proteinech virových kapsid a současně rovněž informace o konformaci nukleové kyseliny přítomné v kapsidě, přičemž strukturní informace o ní jsou jinak prakticky nedostupné i pro rentgenostrukturní analýzu^{31,32}.

5. Perspektivy

5.1. *Ab initio* výpočty spekter ROA

Tyto výpočty nacházejí uplatnění při studiu konformace malých biomolekul ve vodném roztoku, neboť na rozdíl od spektroskopie NMR, která pozoruje průměrnou strukturu biomolekuly v delším časovém úseku, ROA „vidí“ superpozici jednotlivých krátkých snímků odpovídajících jednotlivým konformerům přítomným v roztoku. Například mapování konformačního prostoru obojetného iontu L-alaninu ukázalo, že tvar Ramanových pásů a pásů ROA je do značné míry ovlivněn rotací skupin NH_3^+ a COO^- (cit.⁶). Molekulu v roztoku nelze popisovat jako rigidní systém, naopak pro dosažení lepší shody s experimentem je nezbytné do výpočtu zahrnout nejen vliv rozpouštědla (klíčový zejména v případě podvojných iontů), ale i dynamiku její struktury (obr. 3). Na takto „jednoduchých“ systémech lze potom výpočetně testovat implicitní i explicitní modely rozpouštědla³³.



Obr. 3. Srovnání změřených a simulovaných spekter. Ve spodní části jsou uvedena Ramanova spektra a spektra ICP ROA 1,6M roztoku L-alaninu (ve formě obojetného iontu) ve vodě. V horní části jsou uvedena vypočtená spektra (DFT, implicitní model rozpouštědla, Boltzmannovo konformační středování)

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. 4, cit.⁶). Rigidita Gly–Pro je dána tím, že se prolin nachází na C-konci dipeptidu, kdy je rotace kolem vazby C_{α} –N (torzní úhel Φ), jež je součástí pětičlenného kruhu, 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. 4 je zřejmé, že u flexibilního systému je spektrum ROA díky vyrušení příspěvků od různých konformerů velmi jednoduché, pásy v ROA i v Ramanově spektru jsou rozšířené, zejména v oblasti torzních vibrací (200 – 750 cm^{-1}) jsou Ramanovy pásy široké a signál ROA je zde velmi slabý. Naopak u rigidního systému je spektrum zřetelně bohatší, s úzkými dobře rozlišenými pásy a relativně intenzivním signálem ROA i v oblasti torzních vibrací.

Síla spojení výpočtů s experimentem ROA se rovněž prokázala při studiu β -peptidů³⁴, jejichž rychlé konformační změny velice ztěžují studium pomocí NMR, která je schopna pozorovat jevy na škále 10^{-6} s, což je o mnoho řádů delší čas než ROA. Srovnání experimentálních a simulovaných spekter ROA umožnilo stanovit míru uspořádanosti struktury β -peptidů, stejně tak dobře jako chiralitu a celkové uspořádání helikálních struktur³⁴. Narůstající výpočetní výkon počítačů tak dává do budoucna naději nahlédnout prostřednictvím *ab initio* vypočtených spekter detailně do konformačního prostoru i relativně velkých biomolekul.

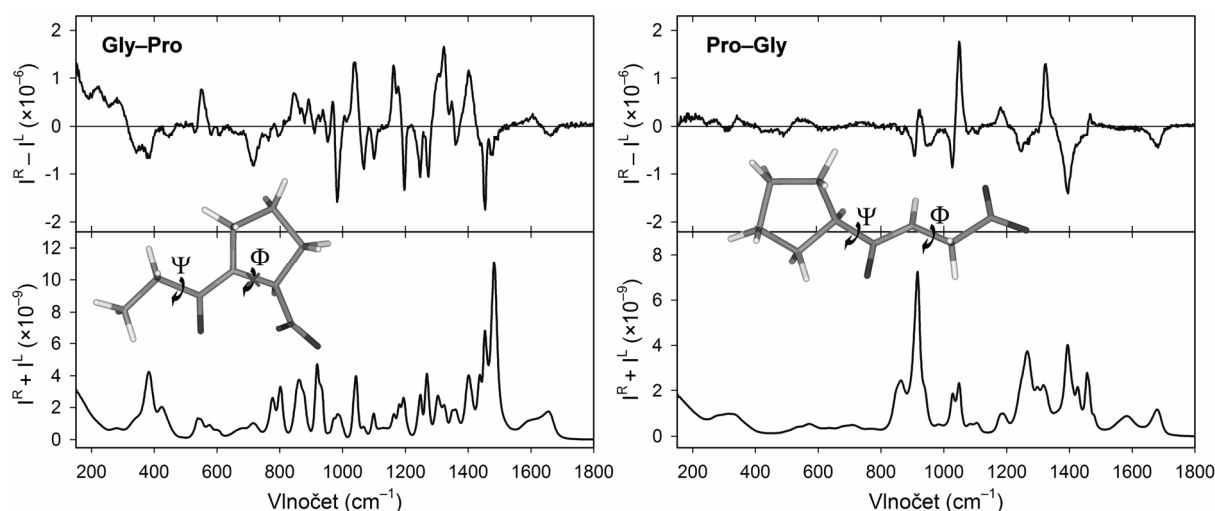
5.2. Denaturované stavy proteinů

ROA má mezi ostatními spektroskopickými technikami unikátní schopnost rozlišit míru hydratace α -helixu³⁵

a β -skládaného listu³⁶. Míra hydratace souvisí s chováním toho kterého segmentu sekundární struktury. ROA tak představuje mimořádně vhodný nástroj ke studiu vzniku denaturovaných, částečně denaturovaných nebo fibrilárních proteinových struktur³⁷. Ačkoli je studium plně denaturovaných stavů proteinů stále nesmírně obtížné, protože při denaturaci narůstá Rayleighův rozptyl²⁸, podařilo se např. ukázat, že hydratované α -helixy, které mají sklon indukovat rozbalení proteinu, tak činí nikoli přechodem do neuspořádaného klubka, ale za vzniku polyprolinového helixu II (cit.³⁸). ROA tak může přinést řadu nových poznatků o dynamice vzniku fibrilárních struktur, které jsou zodpovědné za vznik řady neurodegenerativních onemocnění^{32,37}.

5.3. Povrchem zesílená ROA

V Ramanově spektroskopii je hojně užívána technika povrchového zesílení rozptylu (surface enhanced Raman scattering – SERS), při které jsou studované molekuly adsorbovány na kovové nanočástice, jež díky plazmonové rezonanci výrazně zesilují Ramanův signál. Pomocí SERS je možné studovat molekuly při nM-koncentracích a v limitě pozorovat Ramanův signál od jednotlivých molekul. Obdobný efekt povrchem zesílené ROA (surface enhanced ROA – SEROA), ovšem ne tak silný (teoreticky dosažitelné by měly být μM -koncentrace), by měl existovat i v ROA, kde je snížení koncentrace studovaných látek víc než žádoucí. Zvýšení citlivosti ROA je natolik lákavé, že se celá řada skupin pokouší tento efekt pozorovat. Vůbec první SEROA spektrum bylo „pozorováno“ na molekule adeninu³⁹, což je s ohledem na její achiralitu krajně podezřelý a komunitou ROA je považováno za artefakt. Od té doby byla učiněna řada pokusů o reprodukovatelné měření SEROA, jejichž přehled lze najít v cit.⁴⁰. Jedno-



Obr. 4. Srovnání spekter rigidní (Gly–Pro) a flexibilní (Pro–Gly) molekuly s naznačenými hlavními stupni volnosti. Vlevo: Ramanovo spektrum a spektrum ICP ROA 2M roztoku Gly–Pro ve vodě. Vpravo: Ramanovo spektrum a spektrum ICP ROA 0,89M roztoku Pro–Gly ve vodě

značné experimentální potvrzení existence SEROA, např. změřením obou optických antipodů, nebylo dosud dosaženo.

6. Závěr

Ramanova optická aktivita (ROA) představuje unikátní a dynamicky se rozvíjející metodu studia struktury chirálních molekul (od malých po supramolekulární struktury) v roztoku s velkým aplikačním potenciálem nejen v základním výzkumu. ROA spolu se svou sesterskou technikou VCD nabízí jedinečnou možnost stanovit absolutní konfiguraci malých až středně velkých molekul v roztoku. V případě biomolekul ROA dokáže, na rozdíl od konvenčních „chirálně slepých“ spektroskopických metod, vytáhnout ze spleti pášů třídídimenzionální informaci o nejrigidnějších, zkroucených (twisted) částech struktury. Sledování enantiomerní čistoty představuje jednu z možných analytických aplikací ROA, která může být zajímavá pro farmaceutický průmysl. Připočteme-li k tomu komerční dostupnost spektrometrů ROA a tím i narůstající počet jejich uživatelů ve světě, lze očekávat, že se v následujícím desetiletí ROA stane poměrně rozšířenou technikou zvláště u farmaceutických firem, kde se kontrola chirální čistoty léčiv jeví jako klíčová. Ač je v současnosti v tuzemsku dostupný pouze nekomerční ROA spektrometr na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy, věříme, že si ROA najde cestu i do dalších vědeckých a analytických laboratoří. V průběhu roku 2010 byly dva komerční ROA spektrometry firmy BioTools uvedeny do provozu – jeden na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR a druhý na Ústavu analytické chemie VŠCHT.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT (výzkumný záměr MSM 0021620835).

LITERATURA

- Atkins P. W., Barron L. D.: *Molec. Phys.* 16, 453 (1969).
- Barron L. D., Bogaard M. P., Buckingham A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 603 (1973).
- Hug W., Kint S., Bailey G. F., Scherer J. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 97, 5589 (1975).
- Barron L. D., Hecht L., McColl I. H., Blanch E. W.: *Molecular Physics* 102, 731 (2004).
- Holzwardt G., Hsu E. C., Mosher H. S., Faulkner T. R., Moscowitz A.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, 251 (1974).
- Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V. Jr., Bouř P.: *J. Phys. Chem., A* 110, 4689 (2006).
- Hanzlíková J., Praus P., Baumruk V.: *J. Mol. Struct.* 480–481, 431 (1999).
- Nafie L. A.: *Appl. Spectrosc.* 50, 14A (1996).
- Hug W., Hangartner G.: *J. Raman Spectrosc.* 30, 841 (1999).
- Hug W.: *Appl. Spectrosc.* 57, 1 (2003).
- Haesler J., Schindelholz I., Riguet E., Rochet C. G., Hug W.: *Nature* 446, 526 (2007).
- Hecht L., Phillips A. L., Barron L. D.: *J. Raman Spectrosc.* 26, 727 (1995).
- Wen Z. Q., Barron L. D., Hecht L.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 285 (1993).
- Barron L. D., Hecht L., Blanch E. W., Bell A. F.: *Progress Biophys. Mol. Biol.* 73, 1 (2000).
- Bell A. F., Hecht L., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5155 (1994).
- Zhu F., Isaacs N. W., Hecht L., Tranter G. E., Barron L. D.: *Chirality* 18, 103 (2005).
- Miura T., Thomas Jr. G. J., v knize: *Subcellular Biochemistry*, sv. 24, *Proteins: Structure, function and engineering* (Biswas B. B., Roy S., ed.), str. 55–99. Plenum Press, New York 1995.
- Barron L. D., Blanch E. W., McColl I. H., Syme C. D., Hecht L., Nielsen K.: *Spectroscopy* 17, 101 (2003).
- Blanch E. W., Hecht L., Day L. A., Pederson D. M., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4863 (2001).
- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C.: *J. Mol. Biol.* 247, 536 (1995).
- Zhu F., Isaacs N. W., Hecht L., Barron L. D.: *Structure* 13, 1409 (2005).
- Blanch E. W., McColl I. H., Hecht L., Nielsen K., Barron L. D.: *Vib. Spectrosc.* 35, 87 (2004).
- Bell A. F., Ford S. J., Hecht L., Wilson G., Barron L. D.: *Int. J. Biol. Macromol.* 16, 277 (1994).
- Zhu F., Isaacs N. W., Hecht L., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6142 (2005).
- Bell A. F., Hecht L., Barron L. D.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 93, 553 (1997).
- Bell A. F., Hecht L., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6006 (1997).
- Bell A. F., Hecht L., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5820 (1998).
- Blanch E., Hecht L., Barron L. D.: *Methods* 29, 196 (2003).
- Thomas Jr. G. J.: *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 1 (1999).
- Blanch E. W., Bell A. F., Hecht L., Day L. A., Barron L. D.: *J. Mol. Biol.* 290, 1 (1999).
- Blanch E. W., Hecht L., Syme C. D., Volpetti V., Lomonosoff G. P., Nielsen K., Barron L. D.: *J. Gen. Virol.* 83, 2593 (2002).
- Blanch E. W., Gill A. C., Rhie A. G. O., Hope J., Hecht L., Nielsen K., Barron L. D.: *J. Mol. Biol.* 343, 467 (2004).
- Kapitán J., Baumruk V., Kopecký V. Jr., Pohl R., Bouř P.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13451 (2006).
- Kapitán J., Zhu F., Hecht L., Gardiner J., Seebach D., Barron L. D.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 6392 (2008).
- McColl I. H., Blanch E. W., Hecht L., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8181 (2004).
- McColl I. H., Blanch E. W., Gill A. C., Rhie A. G. O., Ritchie M. A., Hecht L., Nielsen K., Barron L. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10019 (2003).
- Barron L. D., Blanch E. W., Hecht L.: *Adv. Protein Chem.* 62, 51 (2002).

38. Blanch E. W., Morozova-Roche L. A., Cochran D. A. E., Doig A. J., Hecht L., Barron L. D.: *J. Mol. Biol.* 301, 553 (2000).
39. Kneipp H., Kneipp J., Kneipp K.: *Anal. Chem.* 78, 1363 (2006).
40. Abdali S., Blanch E. W.: *Chem. Soc. Rev.* 37, 980 (2008).

V. Kopecký Jr. and V. Baumruk (*Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Institute of Physics, Prague*): **Where Is The Raman Optical Activity Heading, or Looking Back over Past 40 Years**

In this article we introduce Raman optical activity (ROA) and summarize its development over past 40 years and future prospects. ROA measures vibrational optical activity by means of a small difference in the intensity of Raman scattering from chiral molecules in right- and left-circularly polarized incident light or, equivalently, a small

circularly polarized component in the scattered light. Thanks to new developments in instrumentation, ROA may be applied to a wide range of chiral molecular species. Application of *ab initio* methods to the analysis of experimental ROA spectra holds great promise for the determination of the three-dimensional structure and conformational distribution in unprecedented detail. Determination of absolute configuration of small and medium sized molecules in solution highlights the power of ROA. The many structure-sensitive bands in the ROA spectra of aqueous solutions of biomolecules provide detailed structural information including, in the case of proteins, the tertiary fold in addition to secondary structure elements such as helix and sheet. ROA studies of unfolded and partially folded proteins can provide new insight into the residual structure in denatured proteins and the abnormal behavior of proteins responsible for misfolding diseases. Hopefully this review will stimulate interest in this technique, and will open it up to the spectroscopic community in the Czech Republic.

Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně
pořádá při příležitosti oslav 100 let od založení Fakulty chemické
ve dnech 14.9.-16.9.2011

5. ročník konference Chemistry and Life

Odborný program konference zahrnuje všechny oblasti chemie. Hlavními sekcemi konference jsou chemie potravin a biotechnologie, chemie a technologie ochrany životního prostředí, fyzikální a spotřební chemie a chemie a vlastnosti materiálů.

Organizační výbor: P. Diviš (předseda), R. Herrmannová, I. Pipková, M. Weiter, L. Poláček, H. Alexová, J. Brada

Vědecký výbor: J. Havlica (předseda), L. Berglund, J. Čáslavský, M. Chaplin, J. Jančář, J. Kubová, A.J. Leader, L. Omelka, J. Omelková, T. Rustad, P. Šimko, P. Šimon, M. Pekař, M. Veselý

Korespondenční adresa:

5th meeting on Chemistry and Life

Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, Brno 612 00

email: chl2011@fch.vutbr.cz, http://www.fch.vutbr.cz/chl_2011.html

telefon : 541 149 301, fax: 541 211 697