

SPEKTROSKOPIE VIBRAČNÍHO CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU JAKO NOVÝ NÁSTROJ STRUKTURNÍ ANALÝZY

MARIE URBANOVÁ^a, VLADIMÍR SETNÍČKA^b
a KAREL VOLKA^b

^aÚstav fyziky a měřicí techniky a ^bÚstav analytické chemie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6
e-mail: marie.urbanova@vscht.cz, vladimir.setnicka@vscht.cz,
karel.volka@vscht.cz

Došlo dne 30.I.2002

Klíčová slova: vibrační cirkulární dichroismus, konformace,
konfigurace, interakce, porfyrin, polypeptid

Obsah

1. Úvod
2. Spektroskopie VCD
3. Konfigurace farmakologicky významných molekul
4. Konformace polypeptidů a bílkovin
5. Sledování samoskladby

1. Úvod

Spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu (VCD) (cit.^{1–4}) je moderní spektroskopická metoda, která se v poslední době stává významným nástrojem strukturní analýzy. Zatímco spektroskopie elektronického cirkulárního dichroismu (ECD) je poměrně rozšířená díky dostupným komerčním spektrometrům, spektroskopie VCD byla donedávna pro svou experimentální obtížnost doménou jen několika málo laboratoří na světě. Cílem tohoto příspěvku je uvést tuto moderní metodu a ukázat některé výsledky získané v laboratoři VŠCHT Praha.

2. Spektroskopie VCD

Cirkulární dichroismus ΔA je pro daný vlnčet σ dán rozdílem mezi absorbancí vlevo A_L a vpravo A_R cirkulárně polarizovaného záření

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R)cl \quad (1)$$

kde ϵ_L a ϵ_R jsou molární absorpční koeficienty, c je látková koncentrace a l je tloušťka absorbující vrstvy. Zatímco ECD je vázán na přechody mezi elektronickými hladinami, za VCD jsou zodpovědné přechody mezi hladinami vibračními.

Podmínkou pro nenulový VCD je chiralita dané látky či směsi látek. Kvantově mechanické vyjádření vede k tomu, že intenzita cirkulárně dichroického pásu při přechodu ze stavu

g_0 do stavu g_1 je dána tzv. rotační silou přechodu vyjádřenou vztahem²

$$R_{01} = Im [\langle g_0 | \hat{\mu} | g_1 \rangle \cdot \langle g_1 | \hat{m} | g_0 \rangle] \quad (2)$$

Rotační síla přechodu je tedy určena nejen velikostí elektrického $\hat{\mu}$ a magnetického \hat{m} momentu molekuly, ale také jejich vzájemnou orientací. Proto lze z intenzity, znaménka a polohy VCD pásů získat dodatečnou informaci o prostorovém uspořádání molekuly.

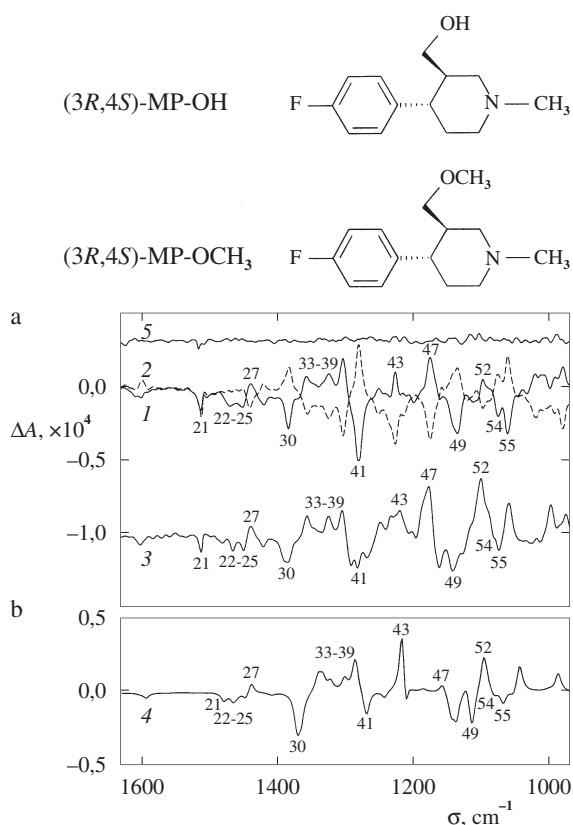
Chiralitu vykazují jak molekuly malých a středních rozměrů, jako jsou například vitaminy, léčiva nebo antibiotika, tak také obří biologicky významné polymerní molekuly, jako jsou polypeptidy, bílkoviny nebo DNA. Odtud plyne význam a perspektiva metody: VCD umožňuje studovat konformace všech těchto biologicky významných molekul bez ohledu na jejich molekulovou hmotnost za různých fyzikálně-chemických podmínek v roztocích, kdy je použití jiných metod, jako spektrometrie NMR či rentgenové strukturní analýzy, omezené.

Přednosti infračervené spektroskopie ve srovnání s absorpční spektroskopii v ultrafialové a viditelné oblasti, pokud jde o strukturní analýzu, jsou dobře známé. Zatímco ultrafialová a viditelná spektra jsou obvykle tvořena několika širokými, silně se překrývajícími absorpčními pásy, jejichž přítomnost je nejčastěji vázána na elektronické přechody v rámci dvojných vazeb či volných elektronových párů v molekule, infračervená spektra jsou informačně nepoměrně bohatší a dovolují získat strukturní informace o celé molekule. Interpretaci spektra je možné provádět už na úrovni empirického přiřazení absorpčních pásů jednotlivým funkčním skupinám. Přiřazení pásů infračerveného spektra lze pak přenést také na VCD spektrum. Detailní analýzu však dovoluje teprve kvantově-mechanický výpočet.

Signály VCD jsou ve srovnání s ECD výrazně menší: $\Delta A/A \sim 10^{-4} - 10^{-5}$. To je také důvod, proč je vlastní měření VCD spektra poměrně obtížné, proč je potřebná vyšší koncentrace vzorků v roztocích a je omezené použití vody jako rozpouštědla, ale hlavně proč je dosud spektroskopie VCD méně rozšířená než spektroskopie ECD. Na Ústav analytické chemie VŠCHT v Praze byl v rámci projektu VS 97135 zakoupen první komerční spektrometr firmy Bruker, a tak se tento ústav stal jedním z řádově deseti světových pracovišť, kde je možné měřit kvalitní VCD spektra kapalných vzorků ve střední infračervené oblasti. Přístroj je tvořen spektrometrem s Fourierovou transformací IFS 66/S, který je opatřen VCD/IRRAS modulem PMA 37. Metodika měření VCD byla publikována dříve⁵.

3. Konfigurace farmakologicky významných molekul

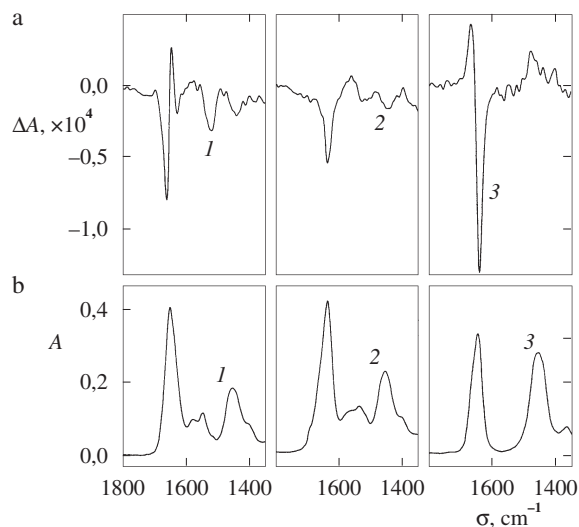
Spektra VCD v kombinaci s jejich *ab initio* simulací mohou být použita k určení absolutní konfigurace malých až středních chirálních molekul; např. se mohou s výhodou uplat-



Obr. 1. Experimentální (a) a simulovaná (b) VCD spektra prekurzoru chirálního léčiva femoxetinu; $c = 0,64 \text{ mol.l}^{-1}$ v CDCl_3 , (3*R*,4*S*)-MP-OH (1), (3*S*,4*R*)-MP-OH (2), experimentální (3) a simulované (4) VCD spektrum derivátu (3*R*,4*S*)-MP-OCH₃, typické spektrum šumu (5); čísla u jednotlivých pásů simulovaného spektra 4 značí normální módy a jejich přiřazení ve spektrech 1, 2 a 3

nit při studiu chirálních léčiv, zejména těch, jejichž léčebné účinky se pojí s určitou enantiomerní formou. Obecný postup² určení absolutní konfigurace je následující: Na základě kvantově mechanického *ab initio* výpočtu je simulováno VCD spektrum molekuly pro odhadnutou absolutní konfiguraci. Jestliže simulované a experimentální VCD spektrum sobě odpovídají v polohách, relativních intenzitách a znaménkách VCD pásů, je konfigurace molekuly zvolená pro *ab initio* výpočty totožná s konfigurací měřené molekuly. Stereochemická VCD studie tohoto typu je ukázána na následujícím příkladu.

Na obr. 1 jsou VCD spektra (3*R*,4*S*)-4-(4-fluorofenyl)-3-hydroxymethyl-1-methylpiperidinu ((3*R*,4*S*)-MP-OH), látky, která je meziproduktem při výrobě antidepressivního léčiva femoxetinu, a jejíž předpokládaná absolutní konfigurace byla dokázána výše uvedeným postupem v naší práci⁶. Spektra VCD je možné velmi spolehlivě odlišit jednotlivé enantiomery, jak je na obr. 1 ukázáno pro (3*R*,4*S*)-MP-OH a (3*S*,4*R*)-MP-OH. Opačné enantiomery poskytují VCD spektra, která jsou zrcadlově symetrická vzhledem k nulové linii. Spektra VCD byla dále použita při sledování vlivu substituce na absolutní konfiguraci léčiva. Na obr. 1 je VCD spektrum derivátu ((3*R*,4*S*)-MP-OCH₃), ve kterém je postranní skupina –OH na



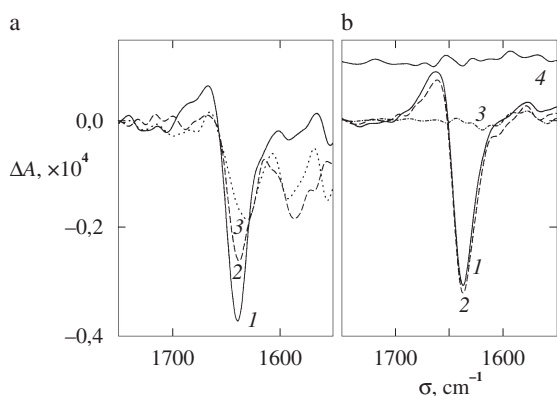
Obr. 2. Korelace mezi sekundárními strukturami bílkovin a polypeptidů a jejich VCD (a) a infračervenými (b) spektry v oblasti amid I' a II'; $\rho = 50 \text{ g.l}^{-1}$ v D_2O , hemoglobin – vysoký obsah α -šroubovice (1), konkanavalin A – vysoký obsah β -struktury (2), poly(L-lysin) – struktura náhodného klubka (3)

chirálním uhlíku C3 nahrazena skupinou –OCH₃. Z obrázku je patrná velmi dobrá shoda mezi experimentálními a simulovanými spektry (3*R*,4*S*)-MP-OCH₃, která umožňuje přiřadit spektrální pásy jednotlivým vibračním módům. Ze srovnání VCD spekter 1 a 3 plyne, že derivát (3*R*,4*S*)-MP-OCH₃ má absolutní konfiguraci shodnou s (3*R*,4*S*)-MP-OH, určité konformační odlišnosti jsou patrné z tvaru VCD pásů, které odpovídají skeletálním vibračním v blízkosti atomu C3 (např. módy 47–49).

4. Konformace polypeptidů a bílkovin

VCD spektroskopie je dobře využitelná ke studiu konformace a konformačních změn peptidů a bílkovin v roztocích. Tyto studie zároveň patří k nejzajímavějším aplikacím spektroskopie VCD. Využívají se zejména infračervené pásy označované jako amid I a amid II, příp. amid I' a II' pro deuterované vzorky. Amid I a I' (1800–1600 cm^{-1}) je vyvolán především valenční vibrací skupiny C=O peptidové vazby, amid II (1600–1500 cm^{-1}) a amid II' (1500–1400 cm^{-1}) je projevem rovinné deformační N–H (popř. N–D) vibrace smíšené s valenční C–N vibrací. Mezi sekundárními strukturami peptidů a bílkovin a jejich VCD spektry v oblasti amid I a II existuje semiempirická korelace¹, kterou na obr. 2 demonstrují VCD spektra bílkovin a polypeptidů, jejichž obsah sekundárních struktur je znám z rentgenové strukturální analýzy. Obrázek ukazuje, že VCD pás amidu I' je charakteristický pro jednotlivé sekundární struktury, a dokumentuje, oč zřejmější je rozdíl mezi jednotlivými konformacemi ve spektrech VCD ve srovnání s nepolarizovanými infračervenými absorpčními spektry.

Popsanou semiempirickou korelací jsme využili ke sledování změny struktury poly(L-lysinu) (PL), ke které dochází při komplexaci s meso-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinem

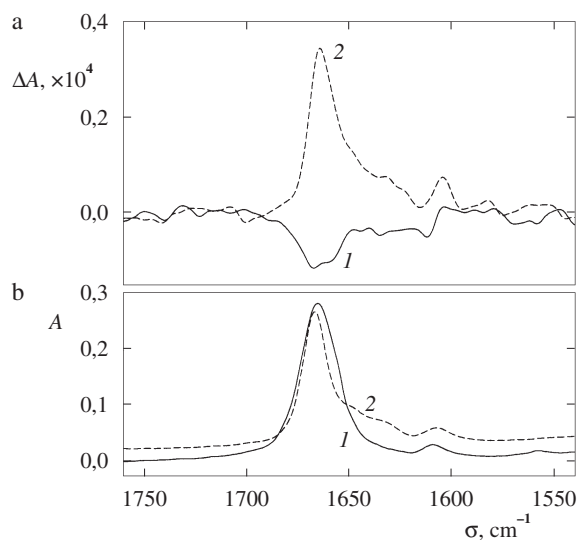
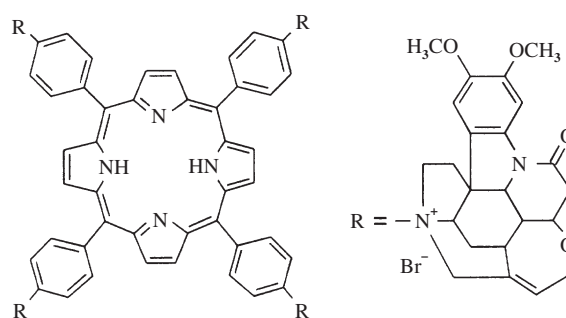


Obr. 3. VCD spektra komplexů PL_{1250} (a) a PL_{34300} (b) s TPPS; $c(PL) = 0,39 \text{ mol.l}^{-1}$; a – čistý PL_{1250} (1), $c(PL)/c(TPPS) = 20$ (2), $c(PL)/c(TPPS) = 5$ (3); b – čistý PL_{34300} (1), $c(PL)/c(TPPS) = 20$ (2), čistý TPPS (3), typické spektrum šumu (4); $c(PL)$ je látková koncentrace přepočtená na lysinové zbytky

(TPPS). Byly zvoleny dva různě dlouhé řetězce PL se středními molekulovými hmotnostmi 1250 a 34 300 (PL_{1250} , PL_{34300}), které byly tvořeny v prvním případě deseti a ve druhém stovkami aminokyselinových zbytků. Zatímco se nepolarizovaná infračervená absorpční spektra peptidové a porfyrinové části komplexu ve střední infračervené oblasti překrývají, porfyrinová část komplexu nepřispívá ke spektru VCD v této oblasti (obr. 3b). Tato skutečnost umožňuje sledovat změnu konformace polymerní peptidové matrice při interakci s porfyrinem. Obě peptidové matrice PL_{1250} a PL_{34300} bez přítomnosti porfyrinu poskytují VCD spektrum charakteristické¹ pro konformaci tradičně označovanou jako „náhodné klubko“ (obr. 3). Vznik komplexu, který je ověřen fluorescencí, ECD a absorpčními spektry ve viditelné oblasti⁷, je doprovázen výraznou změnou tvaru VCD spektra TPPS/ PL_{1250} v amidové oblasti (obr. 3a), zatímco komplexace TPPS/ PL_{34300} vyvolává pouze změny ve spektru na úrovni šumu (obr. 3b). Interakce porfyrinu a PL_{1250} vede tedy k lokální destabilizaci původní konformace a ke vzniku nové, dobře definované lokální struktury, která je pravděpodobně tvořena úseky šroubovice nebo β -struktury. Z nezměněného tvaru VCD spektra v případě TPPS/ PL_{34300} plyne, že při interakci s TPPS nedochází ke změně konformace polypeptidové matrice s dlouhým řetězcem. Spektroskopie VCD tak doplňuje obraz o struktuře peptidové části hojně sledovaných porfyrin-peptidových komplexů, které jsou modelovým systémem porfyrin-bílkovinných komplexů, majících význam v primárních stádiích fotosyntézy, přenosu energie a také ve fotodynamické terapii.

5. Sledování samoskladby

Populární tematikou současné supramolekulární chemie je samoskladba (self-assembly), spontánní asociace molekul do uspořádaných agregátů. Během procesu samoskladby může dojít v agregátu ke vzniku indukované chiralitě, která se projevuje cirkulárním dichroismem. Oproti častěji používanému ECD má VCD výhodu v tom, že umožňuje sledovat indukovanou optickou aktivitu spojenou s charakteristickými vibracemi funkčních skupin zapojených do procesu samo-



Obr. 4. VCD (a) a infračervená (b) spektra tetrabrucein-porfyrinového konjugátu v závislosti na rozpouštědle: DMSO- d_6 , pravý roztok (1), CD_3OD , gel (2); struktura

skladby. Tvorba supramolekulárních útvarů může být doprovázena i fázovým přechodem roztoku v gel (přechod sol-gel), při kterém jsou molekuly organických rozpouštědel imobilizovány nízkomolekulárními látkami, tzv. gelátory⁸.

Spektroskopii VCD lze použít při sledování fázového přechodu sol-gel v roztocích tetrabrucein-porfyrinového konjugátu, jehož struktura je na obr. 4. Vznik gelu za účasti této látky je podmíněn volbou rozpouštědla: roztok v CD_3OD přechází po sonifikaci v gel⁹, látka rozpuštěná v $CDCl_3$ nebo DMSO- d_6 zůstává v roztoku. Zatímco přechod sol-gel se v nepolarizovaných absorpčních spektrech ve střední infračervené oblasti projevuje jen malou změnou intenzit a poloh pásů (obr. 4b), ve spektrech VCD pozorujeme změnu znaménka a intenzity pásu u 1660 cm^{-1} , který přísluší charakteristické vibraci skupin C=O v bruceinové části konjugátu (obr. 4a). Při procesu gelování dochází tedy ke změně chiralitě v oblasti vazby C=O. Podle našich znalostí se jedná o vůbec první využití spektroskopie VCD k detekci fázového přechodu sol-gel. VCD pás u 1660 cm^{-1} jsme dále využili ke sledování vlivu fyzikálně-chemických podmínek na přechod sol-gel. Ukázali jsme¹⁰, že k přechodu do fáze gelu dochází pro objemový poměr $CD_3OD/DMSO-d_6 \geq 4/1$ a gel je stabilní při teplotách 20–50 °C. Při vyšších teplotách dochází k postupnému fázovému přechodu zpět do roztoku.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy v rámci projektu VS 97135 a výzkumného záměru CB MSM 223400008 a Grantovou agenturou AV ČR (IAA4055104).

LITERATURA

1. Keiderling T. A., v knize: *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Berova N., Nakanishi K., Woody R. W., ed.), str. 621. Wiley, New York 2000.
2. Nafie L. A., Freedman T. B.: *Enantiomer* 3, 283 (1998).
3. Polavarapu P. L., Zhao Ch.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366, 727 (2000).
4. Stephens P. J.: *J. Phys. Chem.* 89, 748 (1985).
5. Urbanová M., Setnička V., Volka K.: *Chirality* 12, 199 (2000).
6. Bouř P., Navrátilová H., Setnička V., Urbanová M., Volka K.: *J. Org. Chem.* 67, 161 (2002).
7. Urbanová M., Setnička V., Král V., Volka K.: *Biopolymers* 60, 307 (2001).
8. Terech P., Weiss R. G.: *Chem. Rev.* 97, 3133 (1997).
9. Král V., Schmidtchen F. P., Lang K., Berger M., Pataridis S., Setnička V.: *9th Meeting on Stereochemistry, Book of Abstracts*, str. 169. VŠCHT Praha a ČSCH, Praha 2001.
10. Setnička V., Urbanová M., Pataridis S., Král V., Volka K.: *9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Prague, 8–13 September 2001, Book of Abstracts* (Kopecký V., Ruzová K., Štěpánek J., ed.), str. 212. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2001.

M. Urbanová^a, V. Setnička^b, and K. Volka^b (^a*Department of Physics and Measurements, ^bDepartment of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy as a Novel Tool for Structure Analysis**

Vibrational circular dichroism spectroscopy is briefly characterized and its application to stereochemical analysis is described. As examples, determination of absolute configuration of a pharmaceutically interesting precursor of femoxetine, monitoring of conformational changes of the peptide part of porphyrin-polypeptide complexes and of the sol-gel phase-transition process in tetrabrucine-porphyrin system are given.