

Chiroptické metody



Opakování

IZOMERY

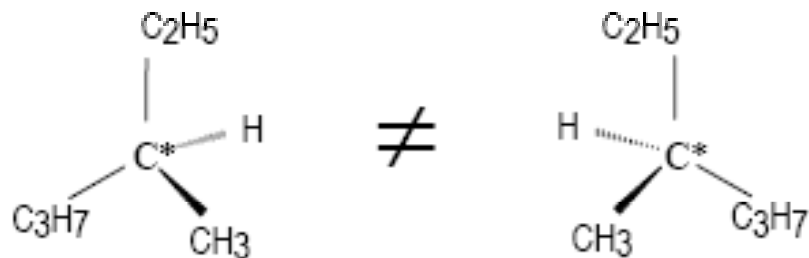
sloučeniny, které mají stejný chemický vzorec

STEREOIZOMERY

izomery, které se navzájem liší jen v orientaci atomů v prostoru. Atomy jsou v molekule spojeny ve stejném sledu. Existují dva typy

stereoizomerů - (1) *enantiomery* a (2) *diastereomery*

(1) **ENANTIOMER** = **OPTICKÝ ANTIPOD**: izomerní sloučenina, jejíž vzorec **nemůže** být převeden (bez přerušování vazby) na svůj zrcadlový obraz



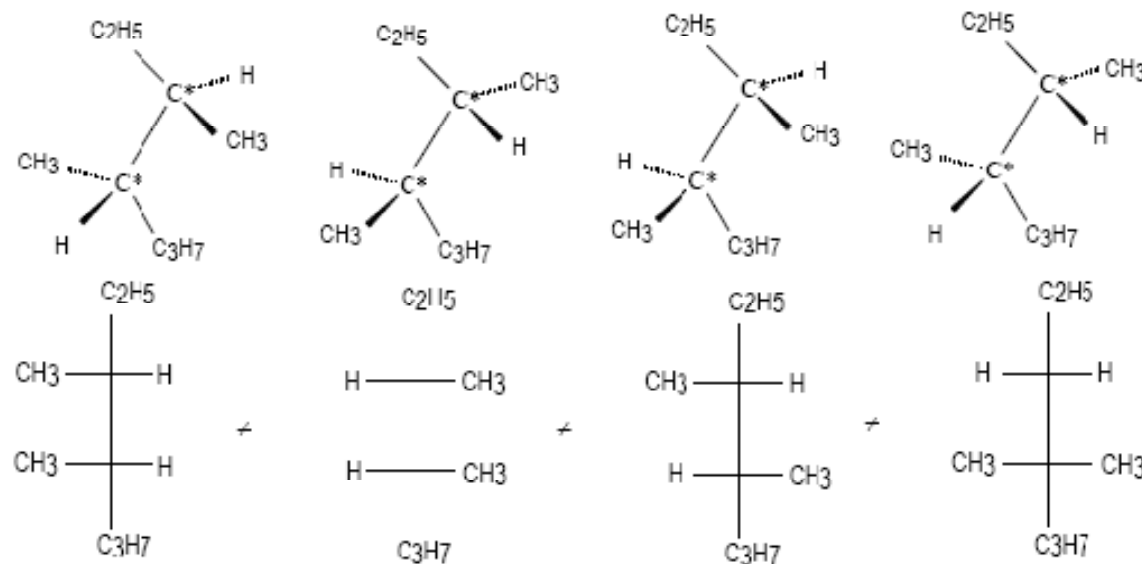
RACEMICKÁ SMĚS

směs složená ze stejného množství (50/50) enantiomerů

Není opticky aktivní. Fyzikální i chemické vlastnosti racemické směsi jsou často mírně odlišné od vlastností čistých enantiomerů.

(2) DIASTEREOMERY

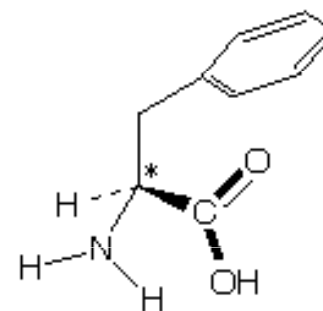
stereoizomery, které nejsou svými zrcadlovými obrazy. Mají podobné, ale ne identické chemické vlastnosti (stejně funkční skupiny), odlišné fyzikální vlastnosti.



Asymetrický uhlík

- většina opticky aktivních látek má asymetrický uhlík (čtyři odlišné substituenty)
- neplatí vždy: jsou známy i molekuly s asymetrickými C, které nejsou opticky aktivní, protože mají rovinu, nebo střed souměrnosti, naopak, některé opt.aktivní látky asymetrický uhlík nemají a jejich aktivitu působí asymetrie celé molekuly. Např.deriváty bifenyly, allenů, kde jsou roviny dvojných vazeb k sobě kolmé.
- **Pravidlo:** má-li sloučenina n středů chiraloty, má 2^n stereoizomerů a 2^{n-1} dvojic antipodů.

L-fenylalanin s asymetrickým C



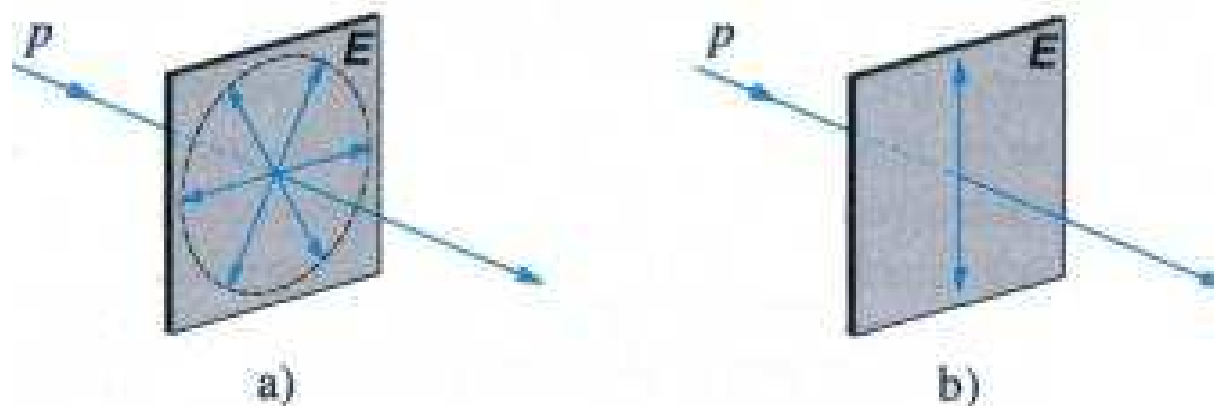
Opticky aktivní látky

- podle stáčení roviny polarizovaného světla rozlišujeme látky na levo- a pravotočivé (**L** a **D**).
- pravo- a levotočivé izomery se nazývají enantiomery (optické antipody)
- směs enantiomerů v poměru 1:1 – racemická směs (opticky neaktivní)
- opticky aktivní látky jsou často organické molekuly s asymetrickým uhlíkem, ale existuje i celá řada anorganických látek s optickou aktivitou

Princip chiroptických metod

- využíváme schopnosti opticky aktivních látek **stáčet rovinu polarizovaného světla**
- **světlo je elektromagnetické vlnění**, které obsahuje dvě vlnové složky – elektrickou (E) a magnetickou (M). Vektor E složky kmitá kolmo ke směru šíření světla.
- **nepolarizované světlo** – směr vektoru E se nahodile mění
- **lineárně (rovinně) polarizované světlo**: elektrická a magnetická složka jsou na sebe kolmé, E kmitá jen v jednom směru (v jedné rovině)
- **kruhově (cirkulárně) polarizované světlo** – elektrický (i magnetický) vektor koná rotační pohyb (buď doprava, nebo doleva) ve směru šíření paprsku

Princip

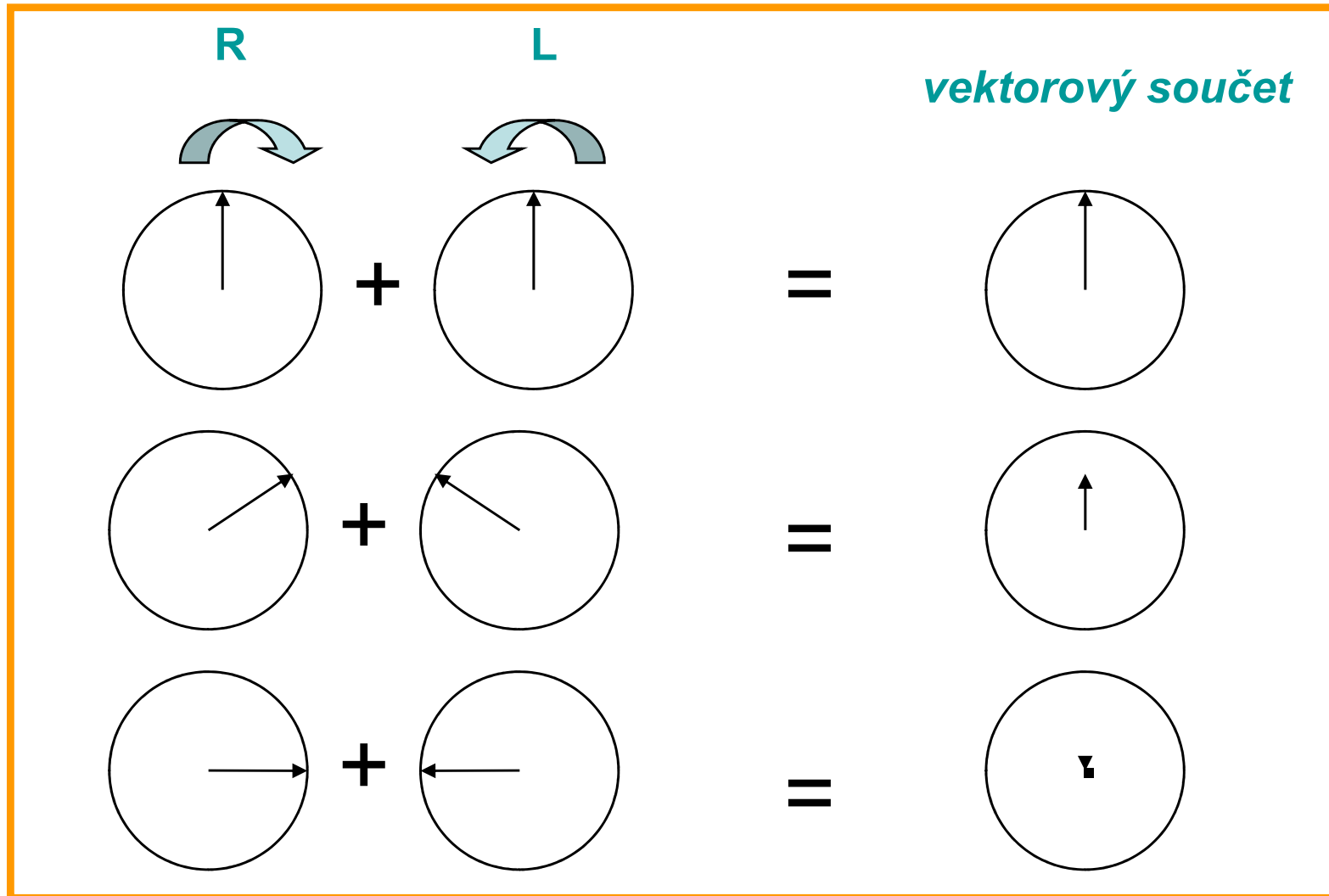


a) nepolarizované světlo

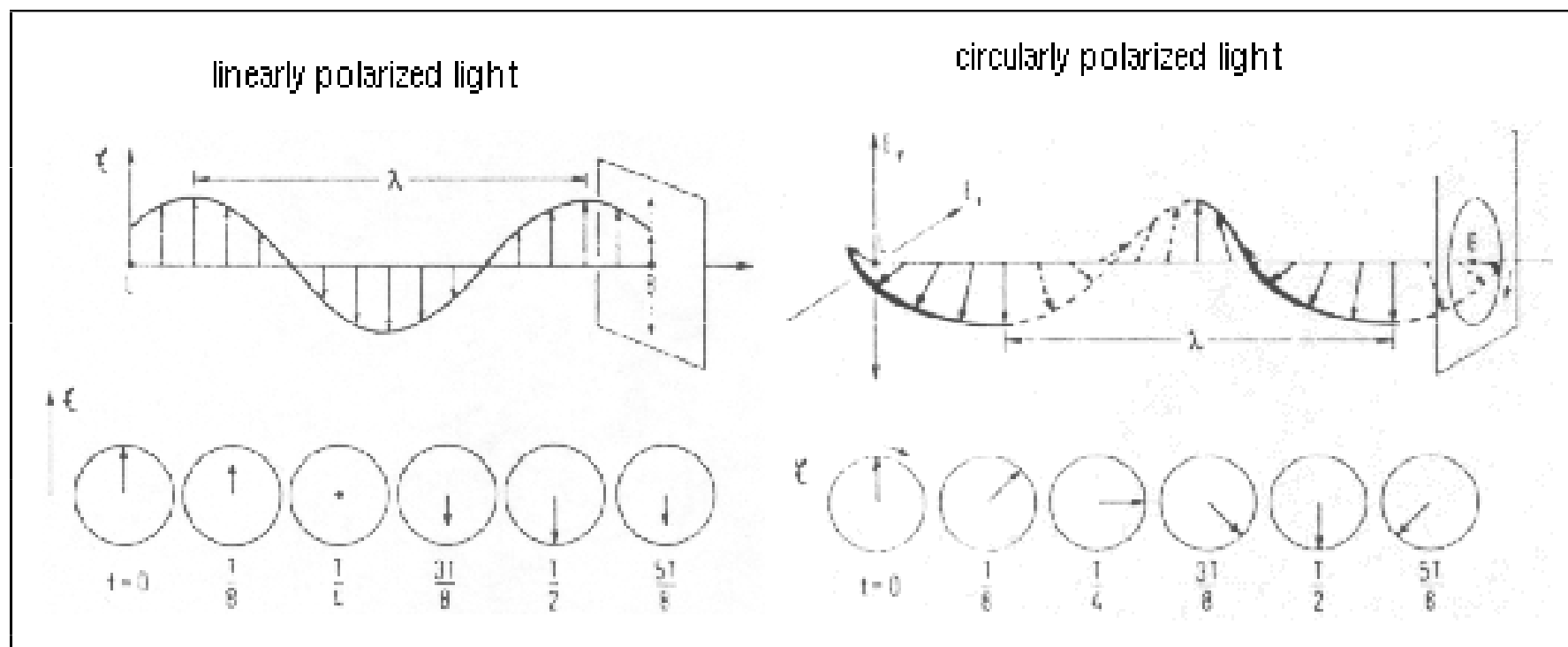
b) rovinně polarizované světlo

Rovinně a cirkulárně polarizované světlo

Rovinně polarizované světlo je složené z doprava (R) a doleva (L) **kruhově polarizovaného** světla se shodnou vlnovou délkou (resp. frekvencí) a amplitudou.



Rovinně a cirkulárně polarizované světlo



Otáčivost

- opticky aktivní látky mají různý index lomu pro **R** a **L** složky polarizovaného světla (= rychlost světla v tomto prostředí pro **R** složku je jiná, než pro **L** složku, složka pro kterou index lomu nižší se šíří rychleji)
- mezi složkami vzniká fázový rozdíl, protože rychlejší paprsek má větší vlnovou délku.
- vektorový součet obou složek dává rovinu polarizovaného světla potočenou doprava, nebo doleva
- fázový rozdíl a úhel otočení roviny polarizovaného světla je přímo úměrný počtu opticky aktivních molekul v dráze paprsku

$$\alpha = [\alpha]^{20}_\lambda / c$$

- α = úhel otočení roviny polarizovaného světla
- l = tloušťka opticky aktivní vrstvy (v dm)
- c = koncentrace látky v g/cm³
- $[\alpha]^{20}_\lambda$ = měrná otáčivost pro danou látku a vlnovou délku, $t = 20$ °C

Další vztahy

- otáčivost je závislá na teplotě (s rostoucí teplotou klesá)

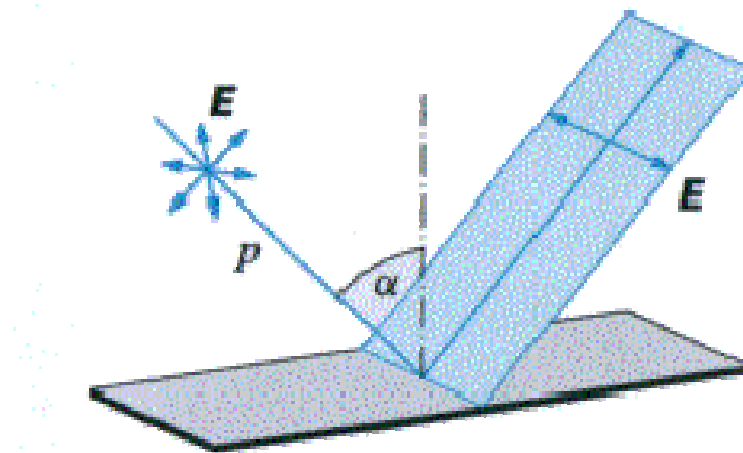
$$[\alpha]_{\lambda}^t = [\alpha]^{20}c + k(t - 20)$$

- pracujeme-li v širokém koncentračním rozmezí, tak platí:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = A + Bc + Cc^2$$

Polarimetrie

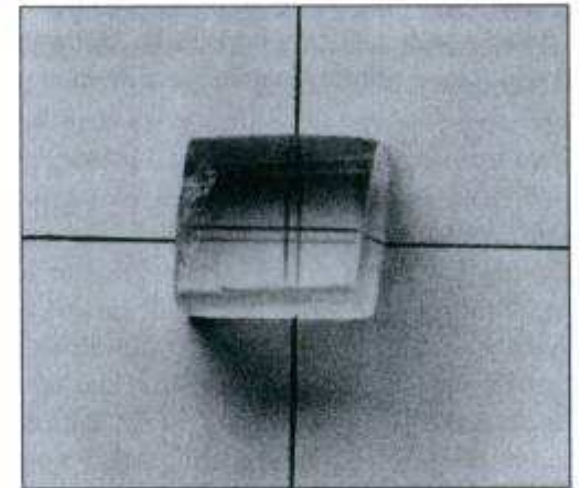
- většinou se uvádí pro záření vlnovou délkou dubletu sodíkové výbojky (D) – 589 nm
- rovinně polarizované světlo vzniká při odrazu, lomu, dvojlomu, atd.
- u klasických polarimetrů je to zpravidla dvojlom na nikolu (islandský vápenec)



Polarizace světla odrazem

Dvojlom

- V opticky stejnorodém prostředí se světlo šíří všemi směry a stejnou rychlostí, ale krystaly některých látek jsou z hlediska šíření světla nestejnorodé rychlost světla v různých směrech různá. Jestliže na takový krystal dopadá světlo, nastává **dvojlom**. Světelný paprsek se na rozhraní s krystalem rozdělí na dva paprsky: paprsek **mimořádný** a **paprsek řádný**. Oba paprsky jsou lineárně polarizované.
- Neznámějším minerálem s touto vlastností je islandský vápenec, který tvoří čiré a často poměrně velké krystaly. Položíme-li krystal na kresbu uvidíme ji zdvojeně (obr.). to je způsobeno zdvojením paprsku.



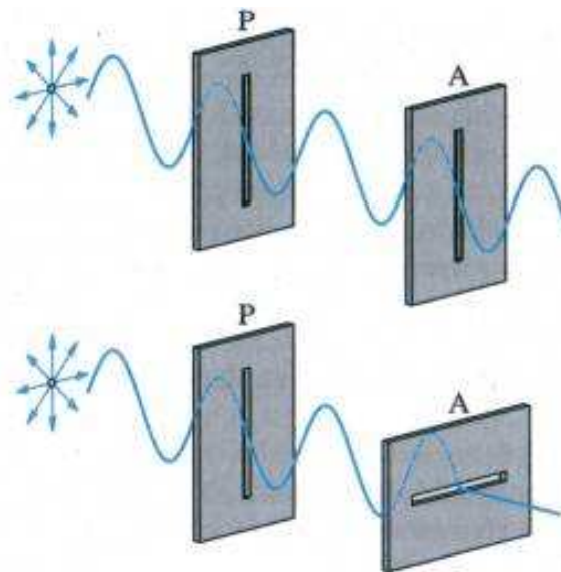
Islandský vápenec

Polarizace absorpcí světla

- V technické praxi se k polarizaci světla používají speciální **polarizační filtry (polaroidy)**. Jsou zhotoveny z plastického materiálu, který obsahuje látku s poměrně dlouhými molekulami. Ty jsou vhodným technologickým postupem srovnány, tak že osy molekul jsou rovnoběžné. Proto když světlo prochází polarizačním filtrem je elektrická složka světelného vlnění, která není kolmá na osy molekul ve filtru filtrem neprochází. To znamená, že polaroid procházející světlo zeslabuje.

Analyzátor

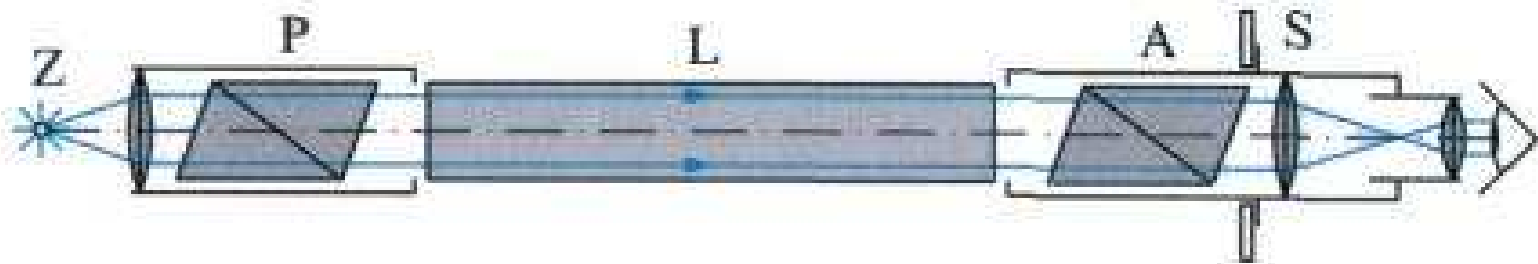
- Polarizované světlo se nijak od světla přirozeného nijak neliší. K tomu abychom určili orientaci roviny polarizovaného světla musíme zařízení zvané **analyzátor**. Ten tvoří opět vhodný polarizační prostředek, který propouští světlo jen s určitou orientací kmitové roviny.
- Podstata funkce **analyzátoru** a **polarizátoru**. Pokud jsou štěrby polarizátoru i analyzátoru rovnoběžné světlo prochází. Pokud nejsou štěrby rovnoběžné světlo neprochází a analyzátor se jeví jako temný (obr.)



Model polarizátoru a analyzátoru

Princip polarimetru

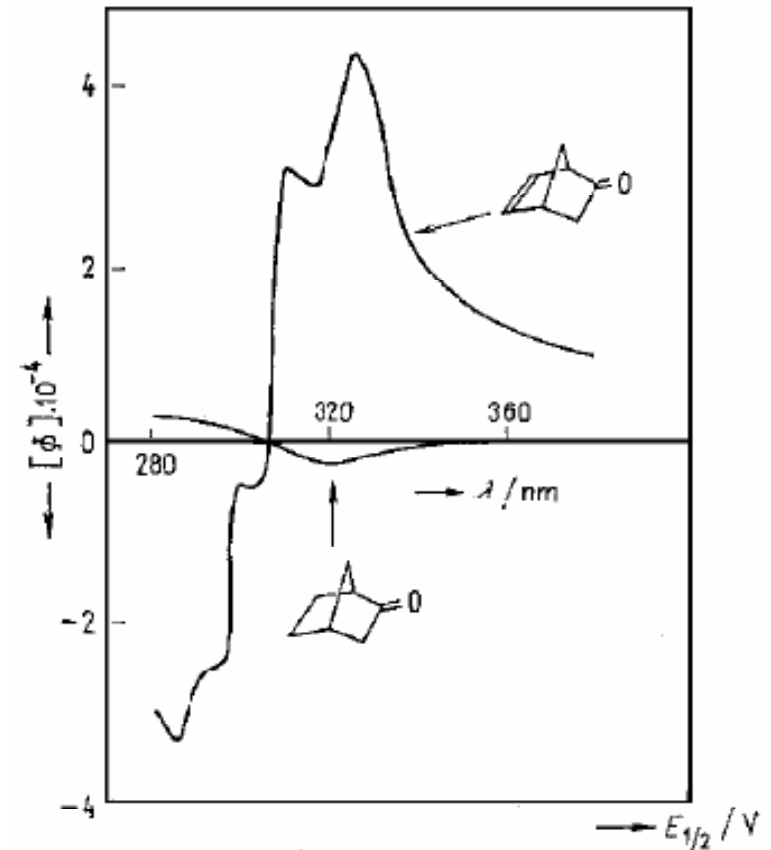
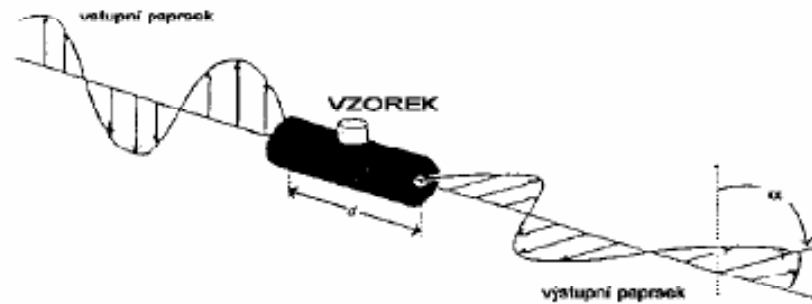
Polarizované světlo se používá ke zkoumání opticky aktivních látek. To jsou látky, které mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Mezi opticky aktivní látky můžeme zařadit roztok cukru, bílkovin, oleje apod. Stáčení kmitové roviny polarizovaného světla měříme **polarimetrem**. Přirozené světlo se nejprve polarizuje polarizátorem P, prochází opticky aktivní látkou L a vstupuje do analyzátoru A. před vložením látky do analyzátoru jsou roviny A a P zkřížené, takže zorné pole je temné. Po vložení látky se zorné pole rozjasní a otáčením analyzátoru se vyhledá poloha, při níž je pole analyzátoru opět temné. Úhel otočení analyzátoru se odečítá na stupnici S. Úhel stočení roviny polarizovaného světla je přímo úměrné koncentraci aktivní látky v roztoku.



Princip polarimetru

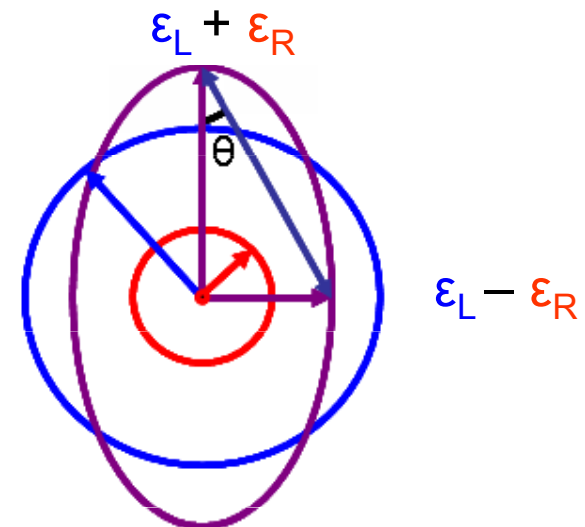
ORD

- Optická Rotační Disperze (ORD) – závislost velikosti optické aktivity (závislost úhlu stočení) na vlnové délce.



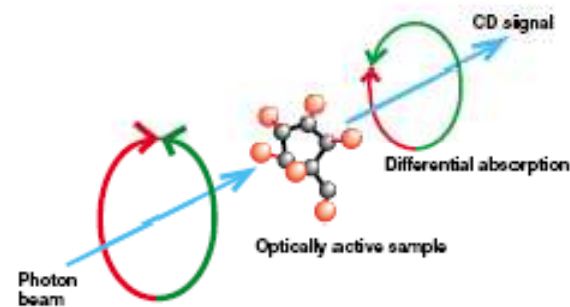
CD

- Cirkulární Dichroismus (CD) – jestliže absorpce R a L kruhově polarizované složky záření opticky aktivní látkou je různá.
- křivky CD spektrometrie vyjadřují závislost rozdílu molárních absorpčních koeficientů pro L a R složku na vlnové délce
- Jednotka: $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$
- Jiná jednotka je (molární) elipticita $[\theta]$
- Přepočítání mezi elipticitou a $\Delta\varepsilon$: $[\theta] = 3298,2 \Delta\varepsilon$
- Jednotka $[\theta]$: stupně elipticity

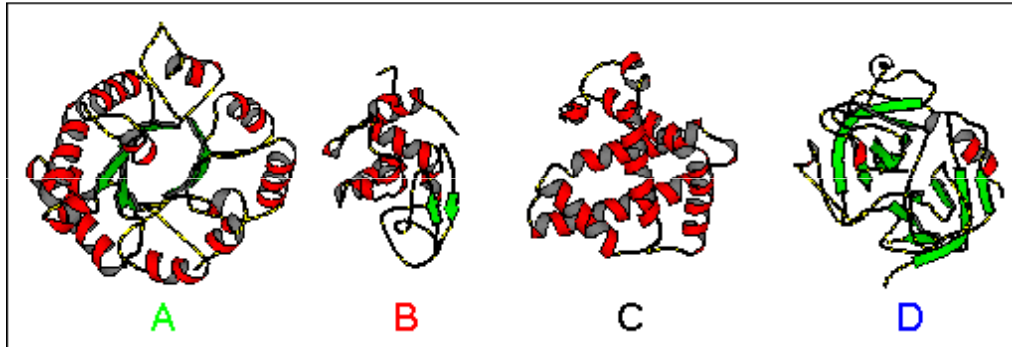


Využití CD

- konformační studia peptidů, proteinů, DNA
- studium denaturace biopolymerů (tepelná, chemická, atd)
- studium strukturních změn



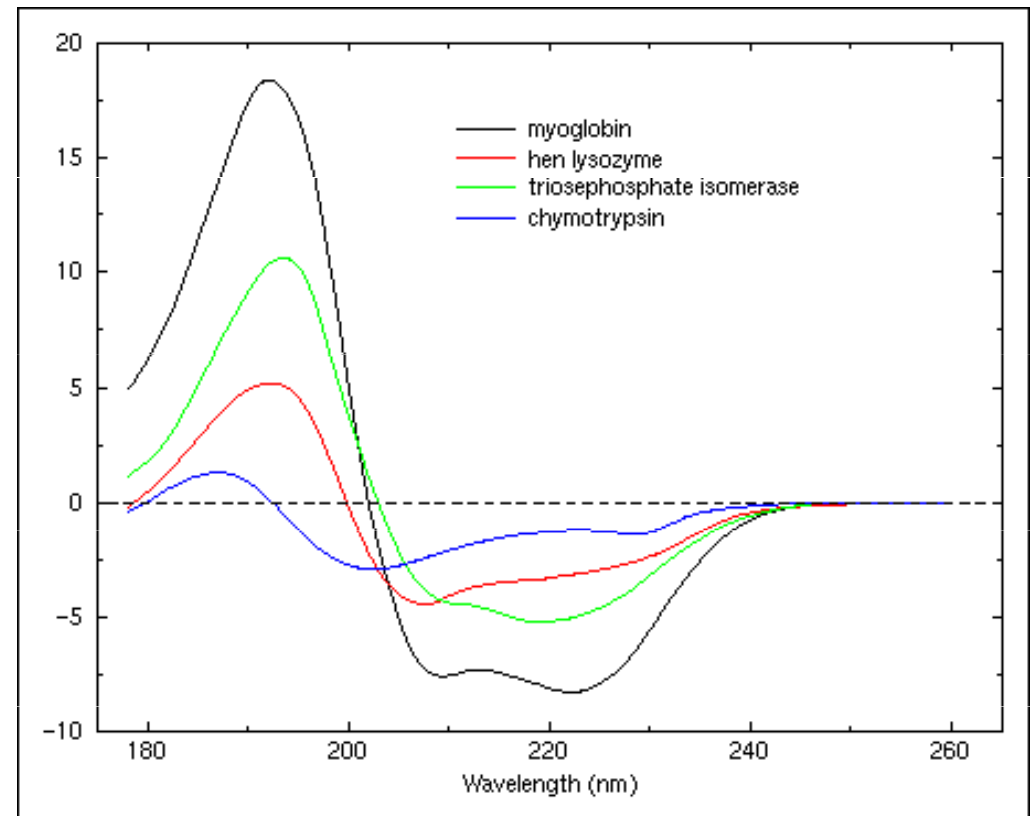
Využití CD pro studium sekundárních struktur proteinů



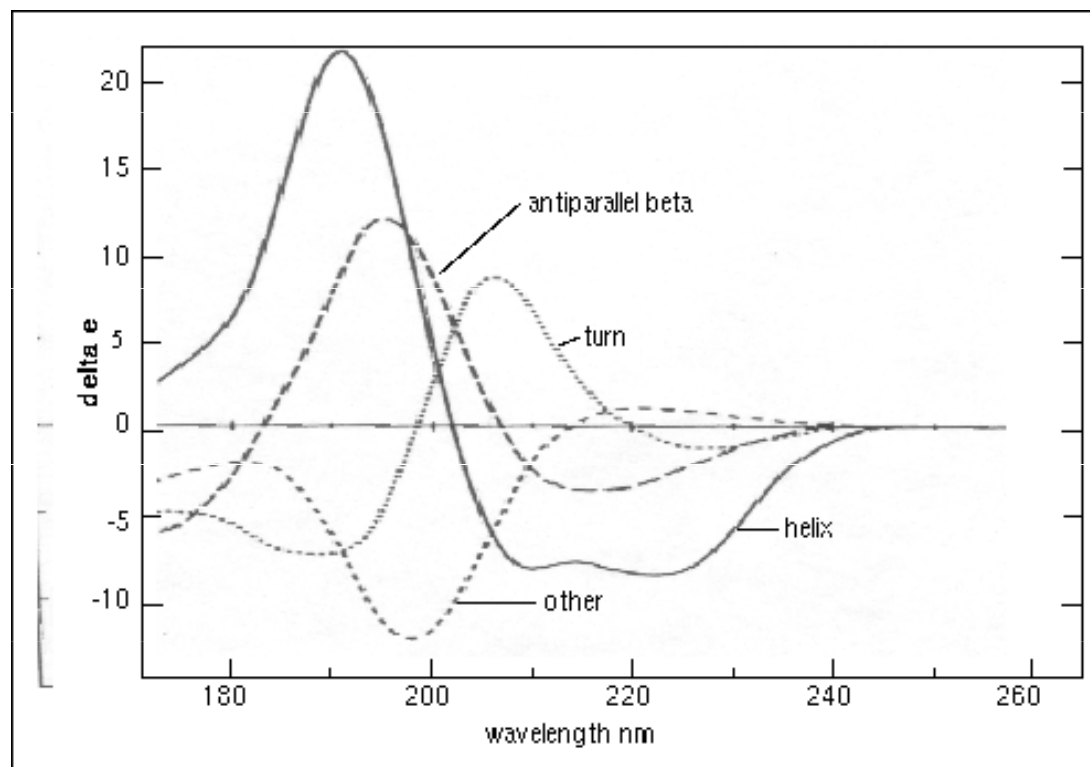
typy proteinových struktur

Sekundární struktura proteinu (hlavně vzdálená UV oblast): zpravidla kombinace různých základních sekundárních struktur - alfa helix, paralelní, antiparalelní, „beta sheet“ (skládaná struktura), „turn“ a dalších...

Terciární struktura proteinu: měříme hlavně v blízké UV



Studium sekundární struktury proteinů – „čistá“ spektra



*CD spektra „čistých“ (pure) sekundárních struktur proteinů
(Brahms & Brahms, 1980)*

Výhody x nevýhody

- není v určování sekundární struktury tak specifická jako NMR, nebo RTG strukturní analýza (proteinová krystalografie)
- + možnost použití při různých podmínkách (roztoky, teplota, pH)
- + komplementarita k metodám, kdy je možné měřit jen vzorky v pevné fázi