

Chiroptické metody



Spektrální metody - porovnání

Metoda	použití
Absorbanční spektroskopie v oblasti UV-Vis (UV-Vis)	Koncentrace látek, interakce molekul, změny konformace
Infračervená spektroskopie (IR)	Identifikace látek, sekundární struktura
Luminiscenční spektroskopie	Koncentrace látky, interakce molekul, měření vzdálenosti mezi molekulami (FRET)
Chiroptické metody: ORD a CD	Určení sekundární struktury, isomery
Hmotnostní spektrometrie	Molekulová hmotnost, určení struktury molekuly (částečně)
Nukleární magnetická rezonance (NMR)	Struktury molekul, sekundární struktura
Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)	Struktura specifických míst v molekulách, radikály
Rentgenová strukturní analýza (X-ray)	Struktura krystalických látek
Ramanovská spektroskopie	Struktury specifickým míst v makromolekulách, analýza povrchu, identifikace látek

Opakování

IZOMERY

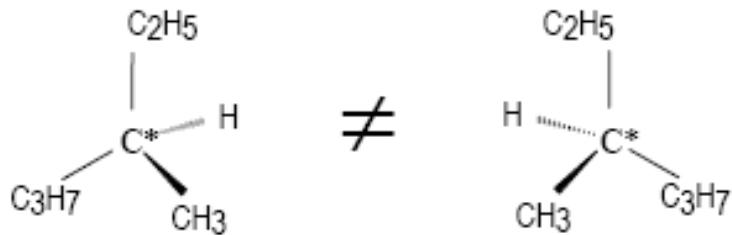
sloučeniny, které mají stejný chemický vzorec

STEREOIZOMERY

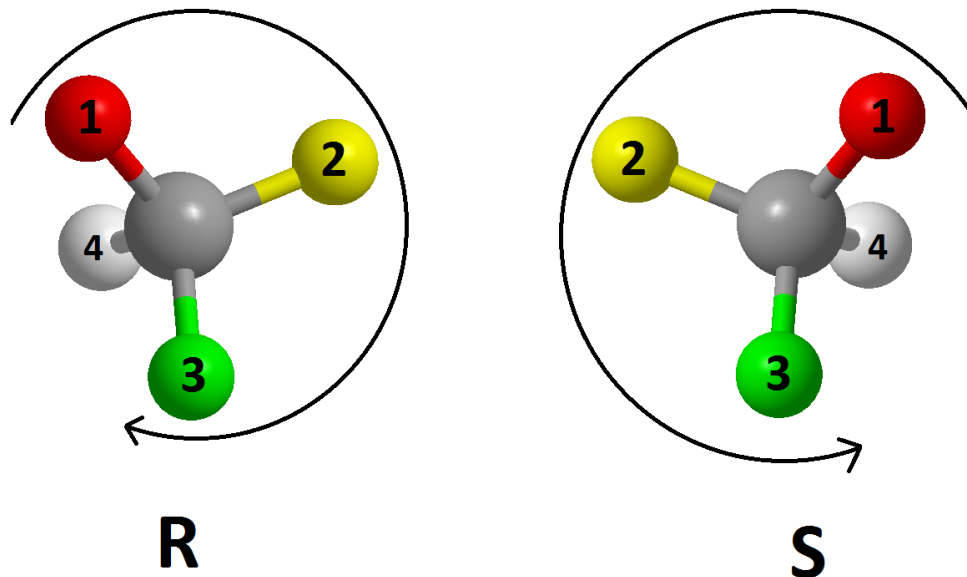
izomery, které se navzájem liší jen v orientaci atomů v prostoru. Atomy jsou v molekule spojeny ve stejném sledu. Existují dva typy

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

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

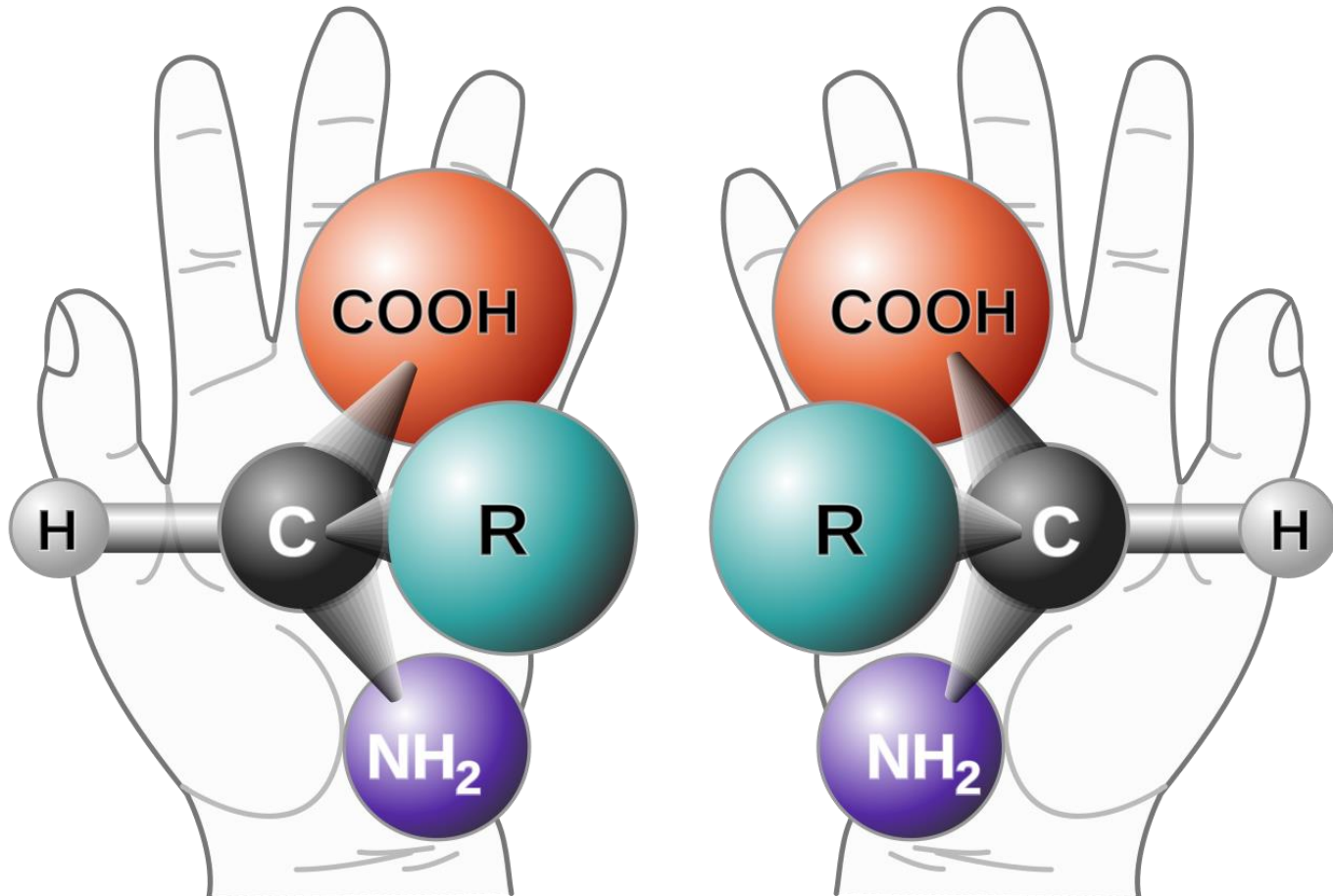


Cahnova-Ingoldova-Prelogova pravidla



- 1) substituent směřuje dozadu
- 2) priorita se určuje podle protonového čísla bezprostředně vázaného atomu, dále hmotnost, v případě izotopů.
- 3) při shodě se zohledňuje priorita v následné sféře porovnávaných substituentů. Při výskytu násobné vazby se posuzuje takto vázaný atom jako kdyby jich bylo navázán násobný počet, avšak případný následný řetězec je dále vázaný jen na jednom z nich, a na zbylých jsou jen tzv. "fantomové atomy", atd.

Sacharidy a aminokyseliny: D a L antipody



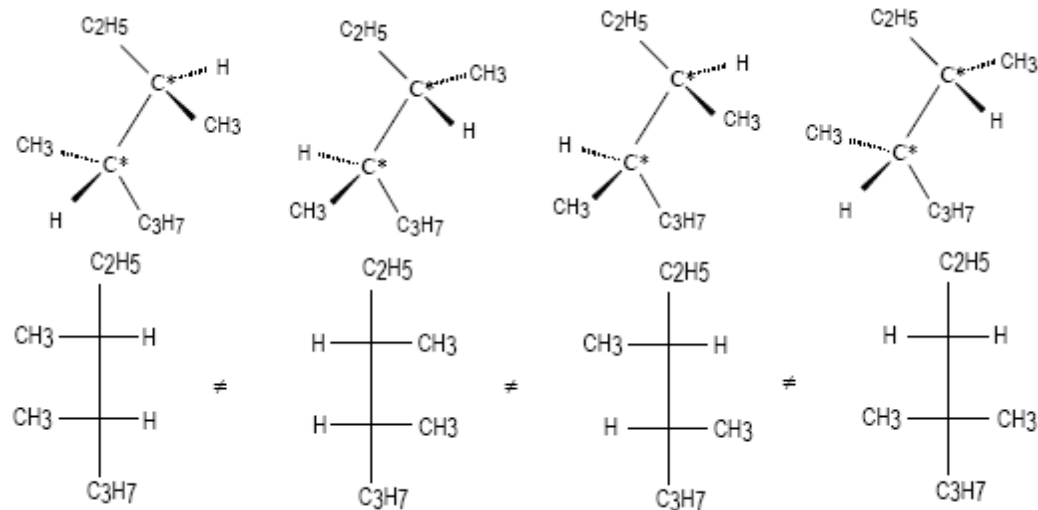
RACEMICKÁ SMĚS

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

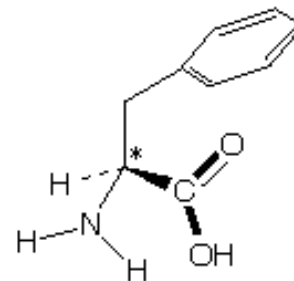
stereoizomery, které nejsou svými zrcadlovými obrazy. Mají podobné, ale ne identické chemické vlastnosti (stejně funkční skupiny), odlišné fyzikální vlastnosti.



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 chiralidy, má 2^n stereoizomerů a 2^{n-1} dvojic antipodů.

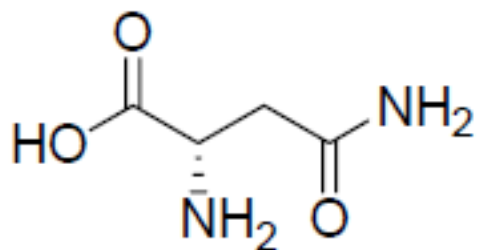
L-fenylalanin s asymetrickým C



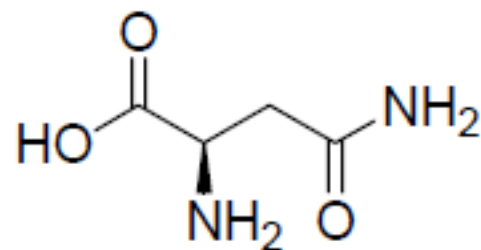
Opticky aktivní látky

- 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
- biopolymery (proteiny, peptidy, NK) jsou opticky aktivní jak díky optické aktivitě základních stavebních jednotek (cukry, aminokyseliny, atd.), tak hlavně díky vyšším strukturám, které jsou schopny v prostoru zaujímat

Dva izomery téže látky mohou mít zcela odlišné účinky
– lepší varianta



L-arginin má hořkou chuť



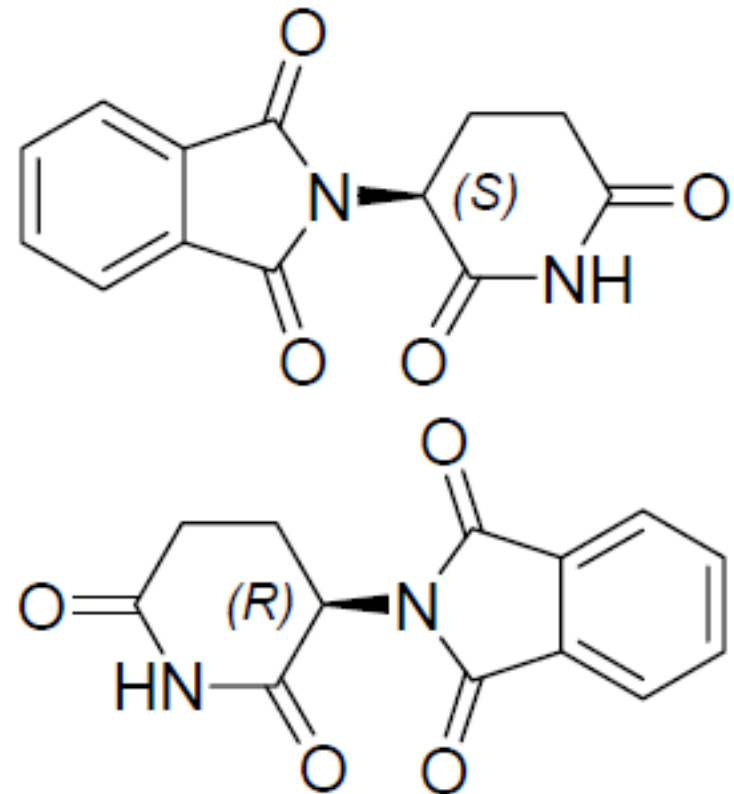
D-arginin je sladký

Dva izomery téže látky mohou mít zcela odlišné účinky - Conterganová aféra

Thalidomid (obchodní název Contergan) – tento lék byl zaveden do praxe v roce 1957 v Německu. Byl indikován těhotným ženám na překonání nevolnosti a dalších obtíží (jako sedativum a hypnotikum). V důsledku jeho užívání se narodilo přibližně 12 tisíc postižených dětí (chybějící končetiny nebo uši). Teprve v listopadu 1961 si německý pediatr Widukind Lenz všiml souvislosti mezi postiženými dětmi a lékem Contergan, kterým byly léčeny jejich matky.

R-isomer je sedativní, S-isomer je teratogenní. Za fyziologických podmínek navíc dochází k racemizaci.

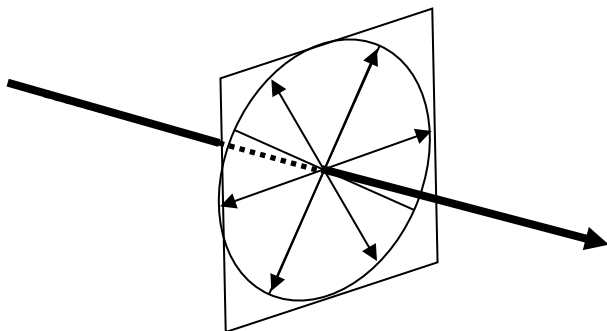
Dnes je lék opět používán na léčbu mnoha závažných onemocnění (lepra, mnohočetný myelon, atd.)



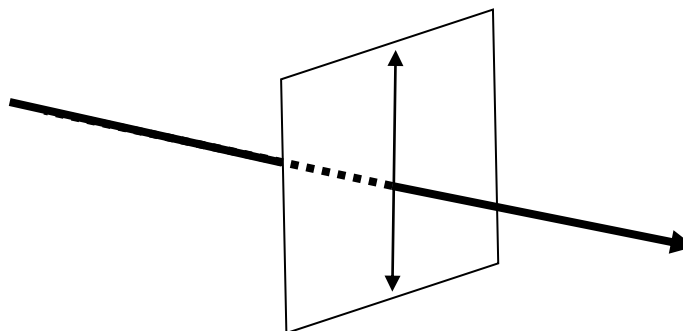
Princip chiroptických metod

- 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



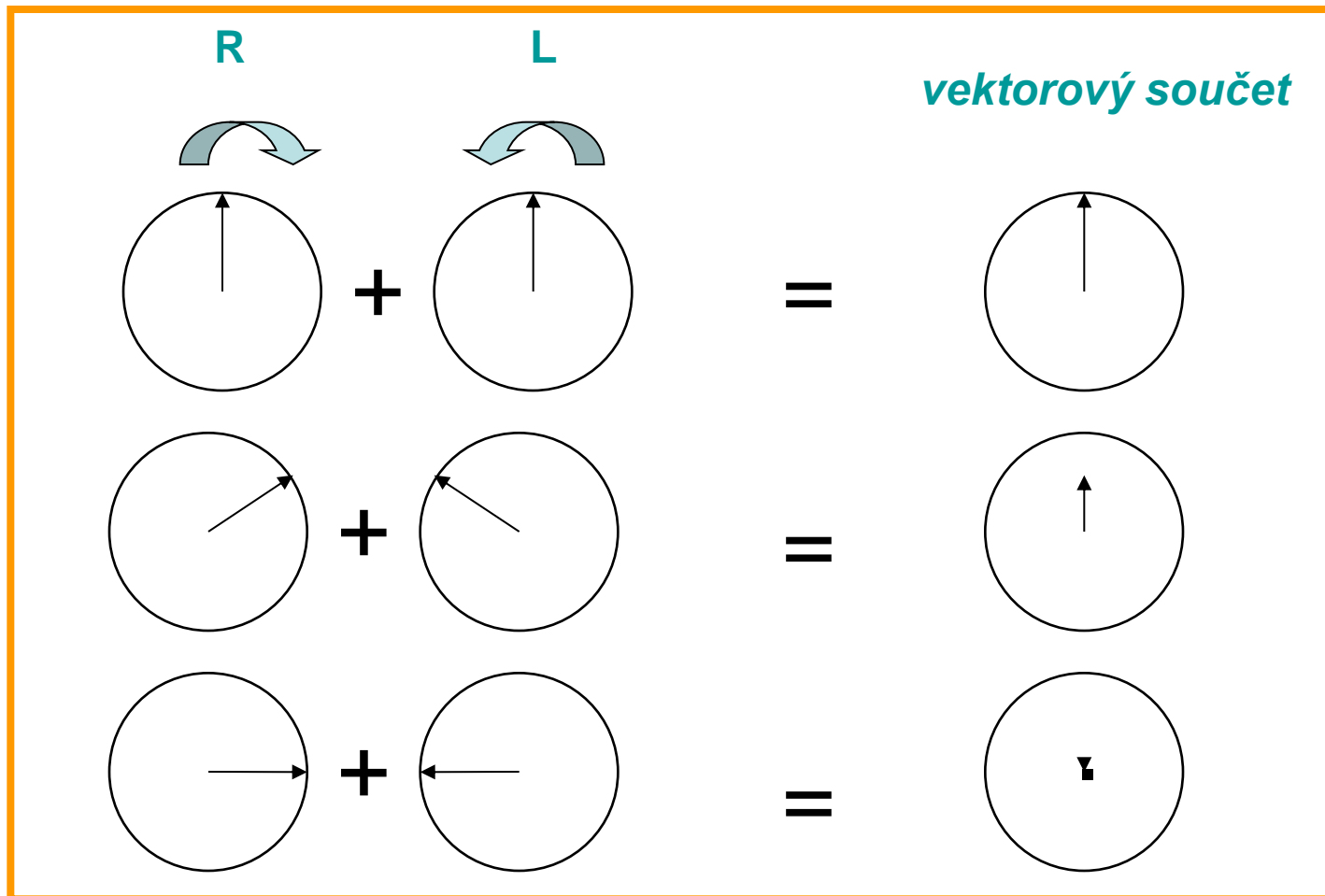
a) nepolarizované světlo



b) rovinně polarizované světlo

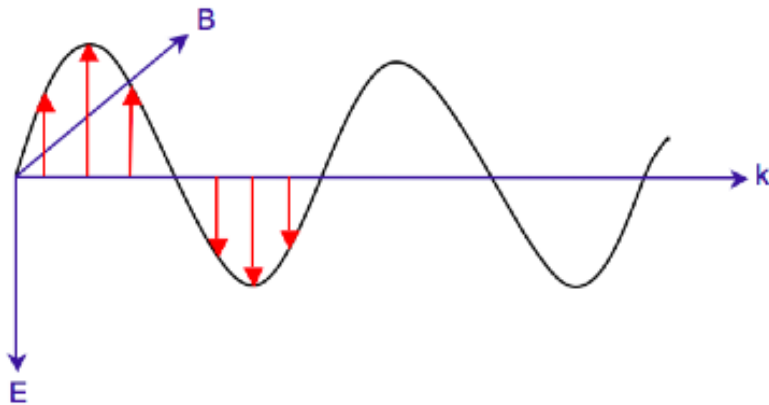
Rovinně a cirkulárně polarizované světlo

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

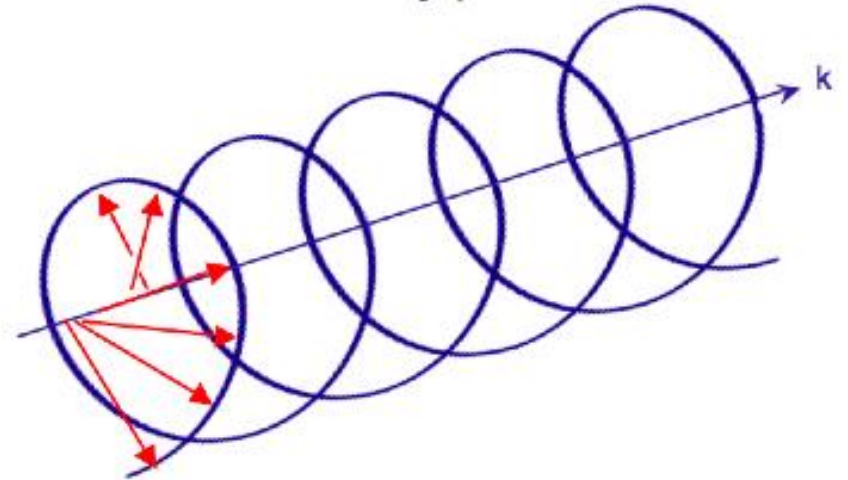


Rovinně a cirkulárně polarizované světlo

Linearly polarized



Circularly polarized



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)

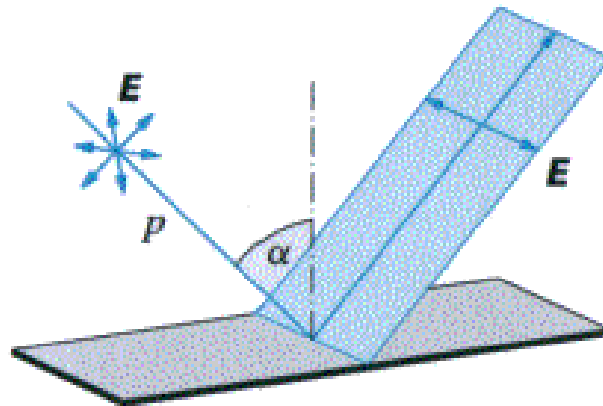
$$[\alpha]_{\lambda}^t = [\alpha]^{20}c + k(t - 20)$$

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

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

Polarimetrie

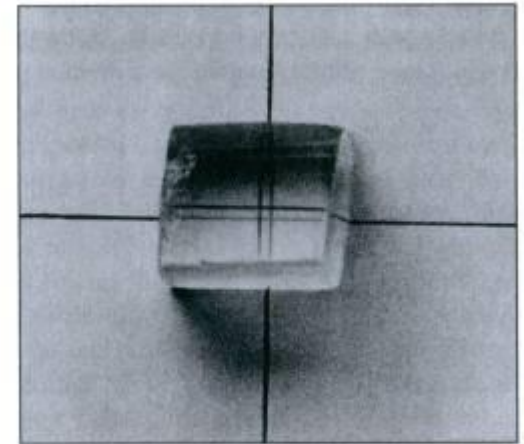
- většinou se uvádí pro záření vlnovou délkou dubletu sodíkové výbojky (D) – 589 nm
- polarizované světlo vzniká při odrazu, lomu, dvojlomu, absorpci, pomocí polarizátorů, atd.
- u klasických polarimetrů je to zpravidla dvojlom na nikolu (islandský vápenec)



Polarizace světla odrazem

Dvojlom

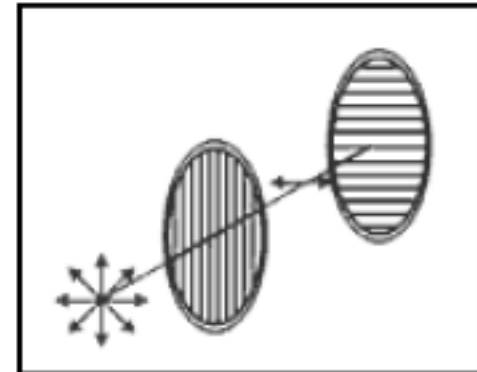
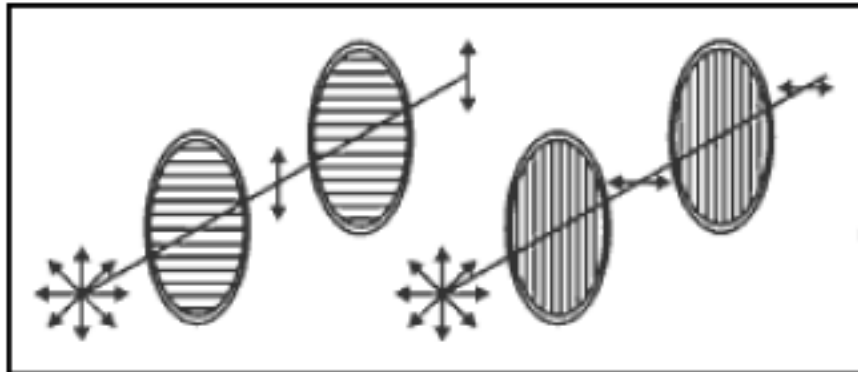
- V opticky stejnorodém prostředí se světlo šíří všemi směry a stejnou rychlostí, ale krystaly některých látek jsou z hlediska šíření světla nestejnorodé rychlost světla v různých směrech různá. Jestliže na takový krystal dopadá světlo, nastává **dvojlom**. Světelný paprsek se na rozhraní s krystalem rozdělí na dva paprsky: paprsek **mimořádný** a **paprsek řádný**. Oba paprsky jsou lineárně polarizované.
- Nejznámějším 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 (polymery). 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.



Fotografování s polarizačním filtrem

Polarizační filtry odstraňují polarizované světlo

Polarizované světlo může vznikat: odrazem od lesklého povrchu, průchodem materiálem, který polarizuje světlo, rozptylem světla, lomem světla, absorpcí.

Proto polarizační filtr na fotoaparátu může: odstranit odlesky, zvyšuje sytost barev, ztmavuje oblohu, odstraňuje z fotografie opar na obzoru, atd.

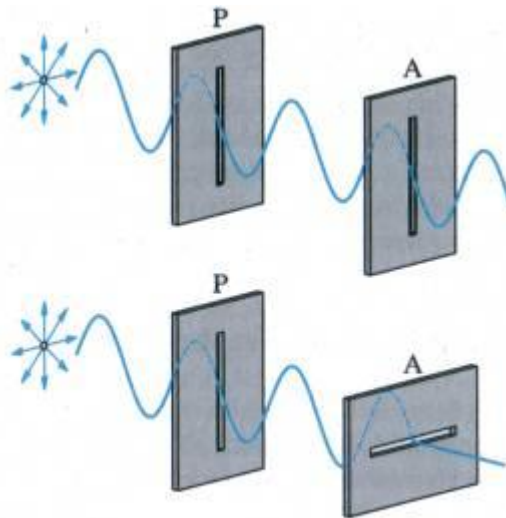
Polarizační filtr funguje nejvíce tehdy, je-li namířen kolmo ke slunci. Naopak pokud polarizační filtr namíříte ve směru rovnoběžném jako sluneční světlo, má nulový efekt.

V praxi tedy polarizační filtr nemá efekt, pokud fotíte proti Slunci a nebo ve směru slunečního svitu.



Analyzátoři

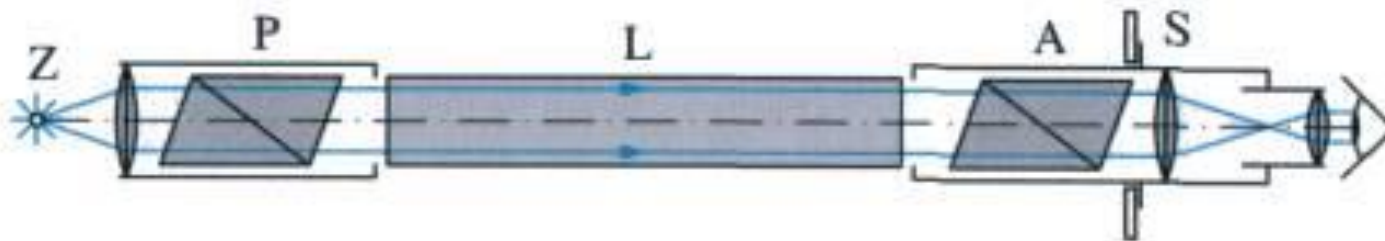
- Polarizované světlo se nijak od světla přirozeného nijak neliší. K tomu abychom určili orientaci roviny polarizovaného světla musíme zařízení zvané **analyzátor**. Ten tvoří opět vhodný polarizační prostředek, který propouští světlo jen s určitou orientací kmitové roviny.
- Podstata funkce **analyzátoru**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



Model polarizátoru a analyzátoru

Princip polarimetru

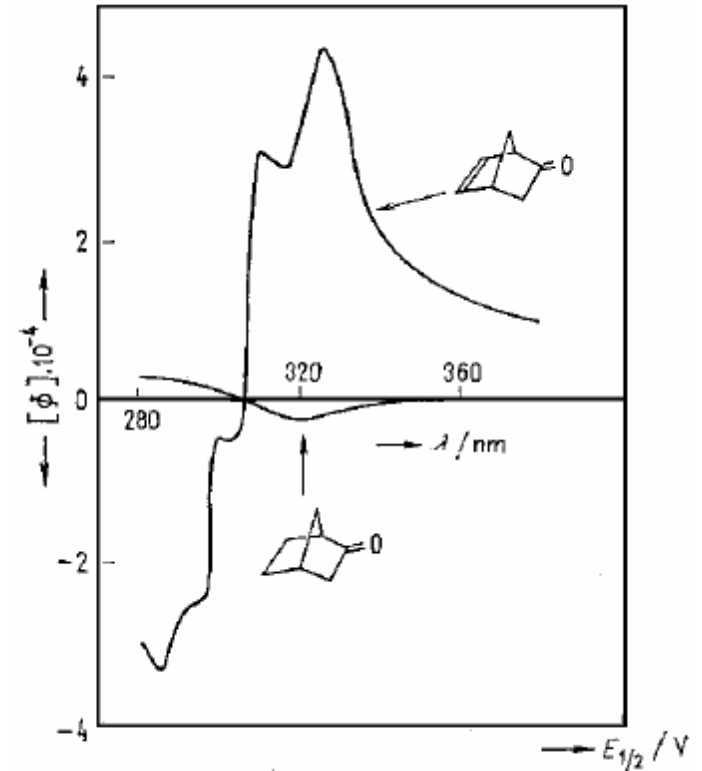
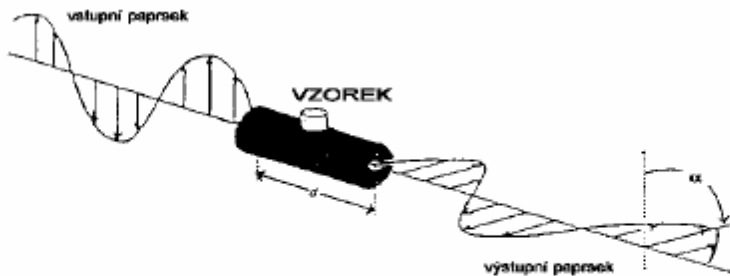
Polarizované světlo se používá ke zkoumání opticky aktivních látek. To jsou látky, které mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Mezi opticky aktivní látky můžeme zařadit roztok cukru, bílkovin, oleje apod. Stáčení kmitové roviny polarizovaného světla měříme **polarimetrem**. Přirozené světlo 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.



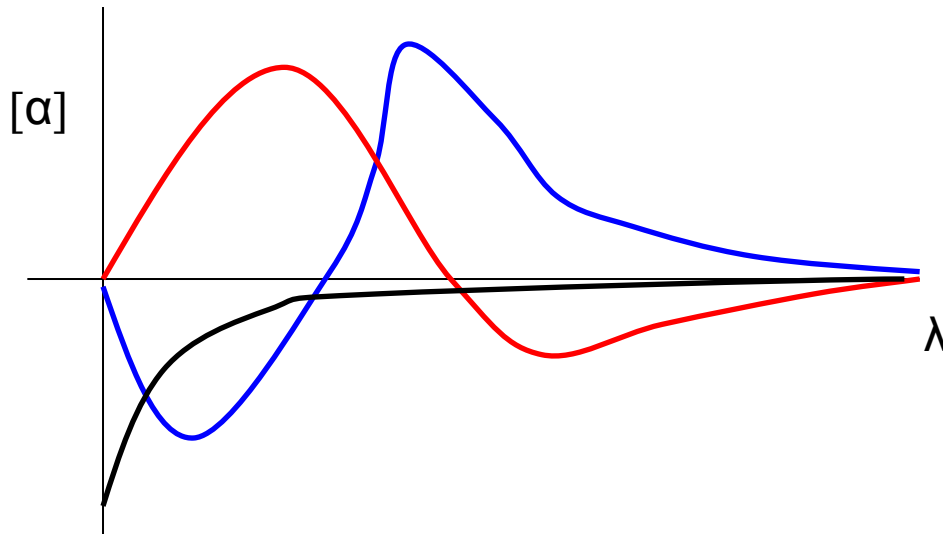
Princip polarimetru

ORD

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



Cotonův efekt



Molekuly nemající chromofory, které by absorbovaly při daných vlnových délkách mají ORD křivky s monotónním průběhem (se zvyšující se λ klesá $[\alpha]$)

Opticky aktivní molekuly s vhodnými chromofory mohou mít průběh křivky (závislost $[\alpha]$ na λ) narušený přechodem přes nulovou hodnotu a vykazovat maxima (anomální křivka)

Jestliže křivka napřed klesá a potom stoupá, pak mluvíme o pozitivním Cottonově efektu

U negativního Cottonova efektu křivka nejdříve stoupá a potom klesá

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

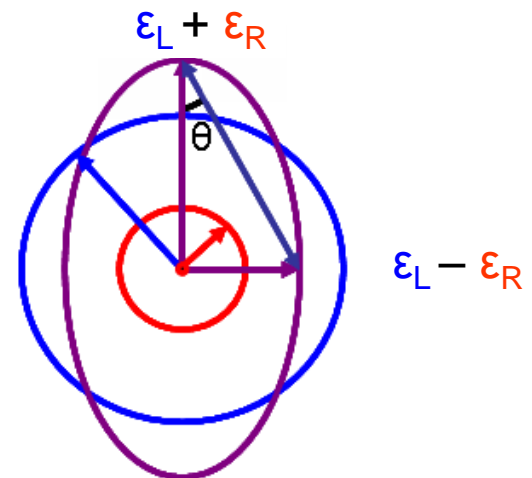
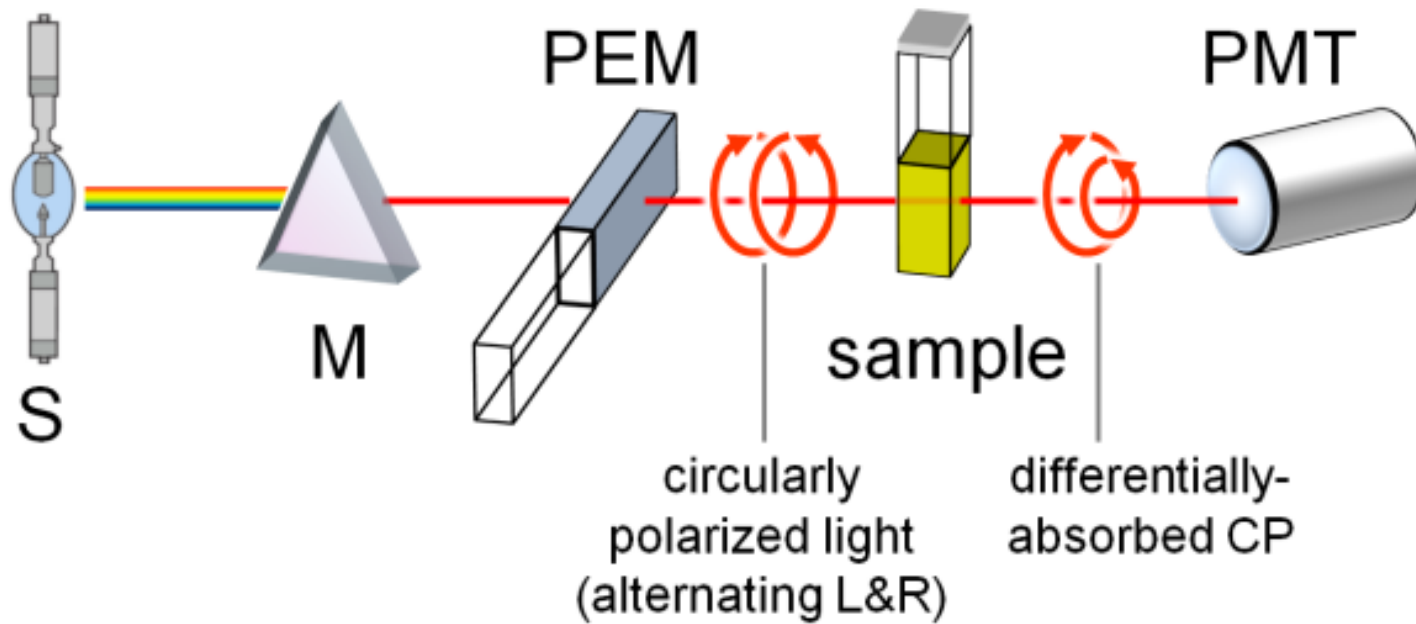
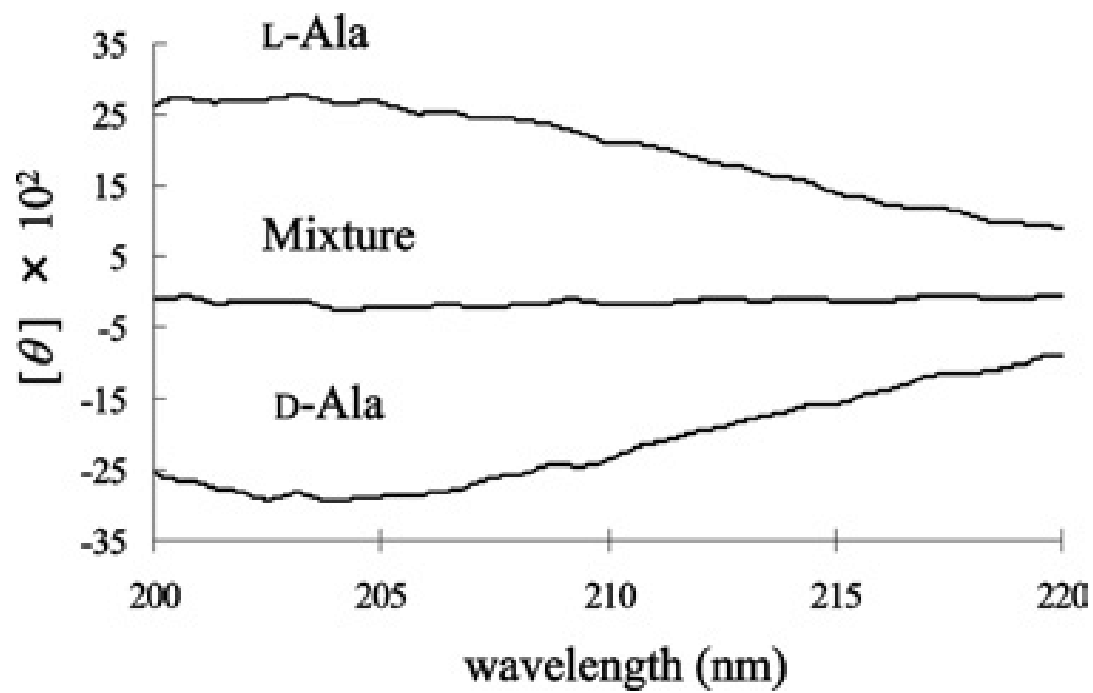
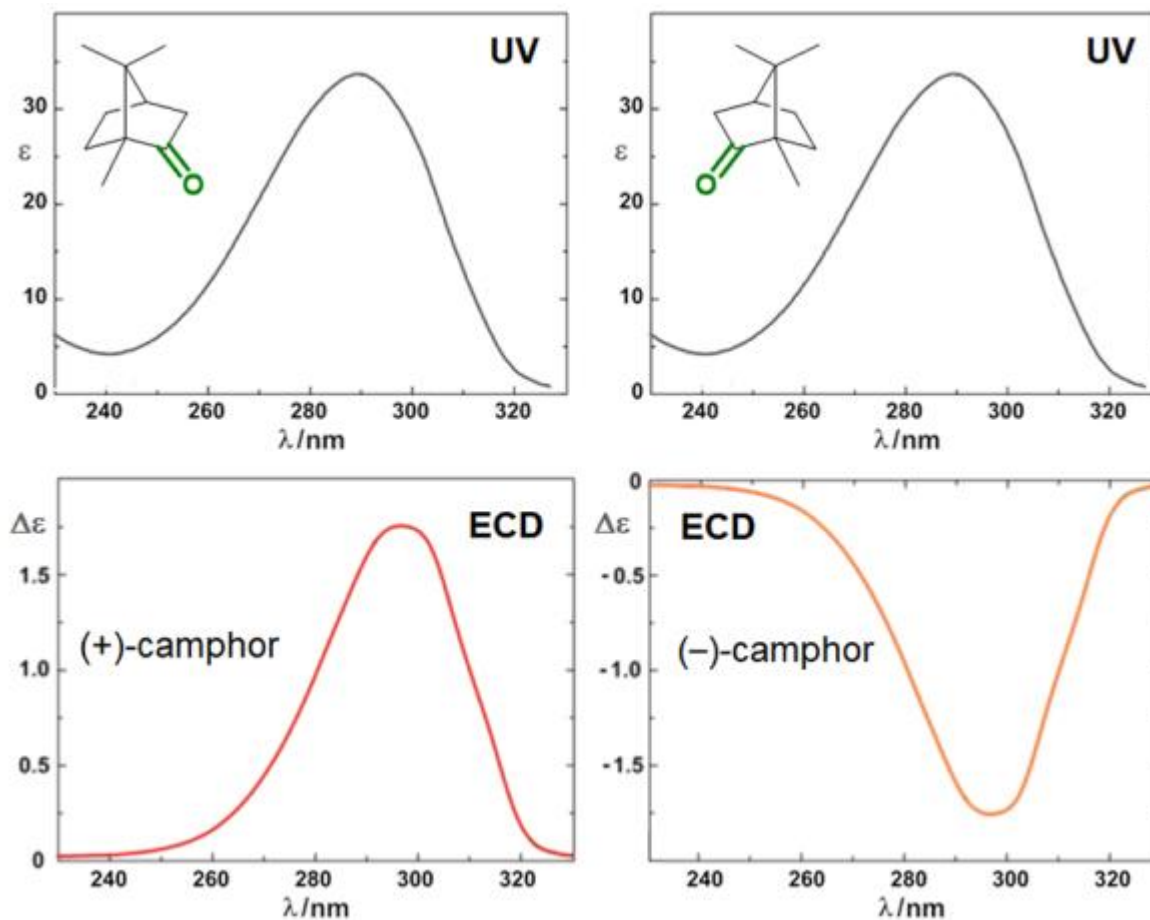


Schéma CD

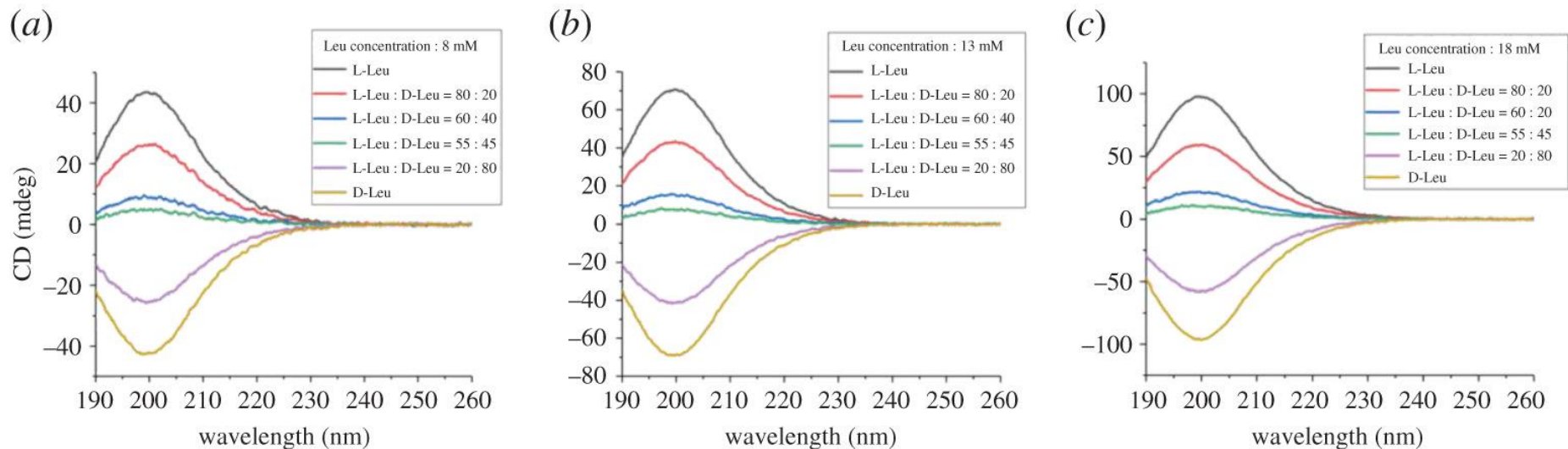




Využití CD



L a D aminokyseliny

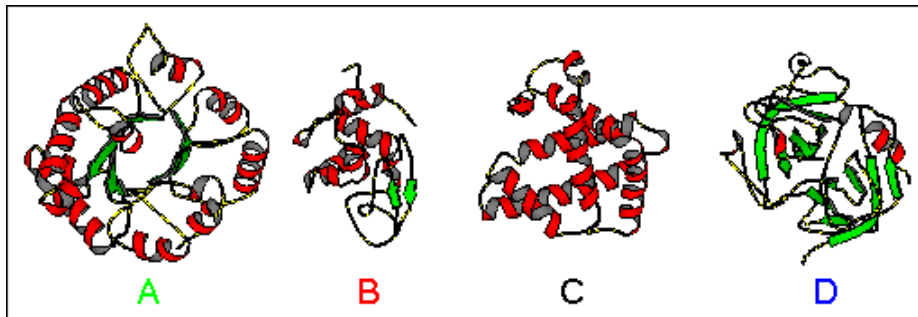


Využití CD

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



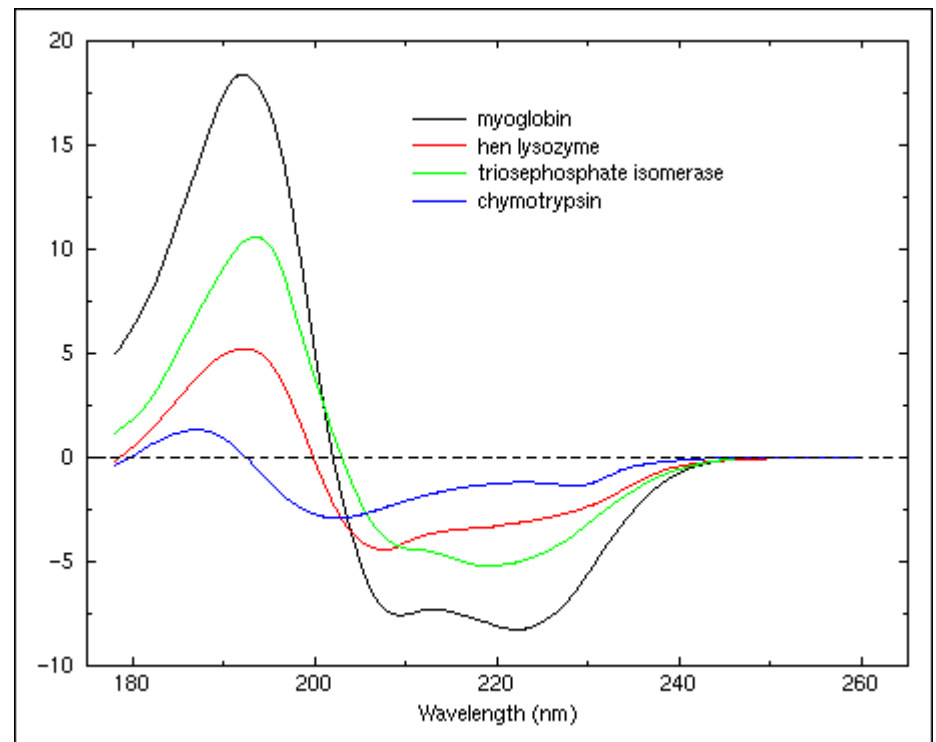
Využití CD pro studium sekundárních struktur proteinů



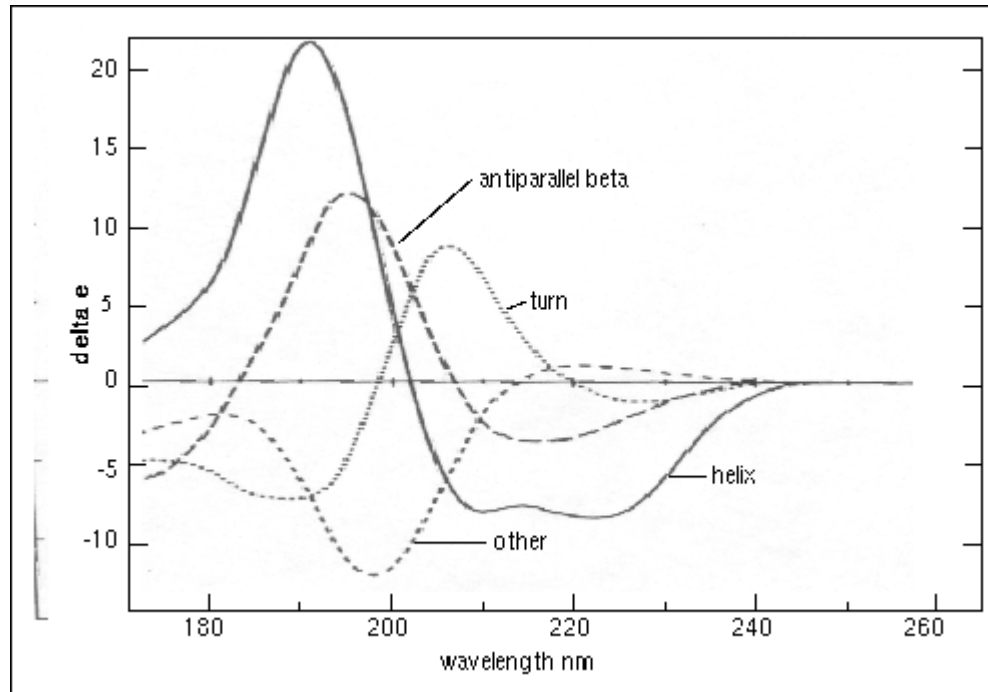
typy proteinových struktur

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 (dusíková atmosféra)



Studium sekundární struktury proteinů – „čistá“ spektra



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



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Classification of nucleic acids structures by means of the chemometric analysis of circular dichroism spectra

Joaquim Jaumot^{a,*,†}, Ramon Eritja^b, Susana Navea^c, Raimundo Gargallo^a

^a Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Diagonal 647, Barcelona E-08028, Spain

^b Department of Structural Biology, IBMB-CSIC, Jordi Girona 18-26, Barcelona E-08034, Spain

^c Acciona Agua, Av. de les Garrigues 22, El Prat de Llobregat E-08820, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2008

Received in revised form 19 December 2008

Accepted 24 December 2008

Available online 10 January 2009

ABSTRACT

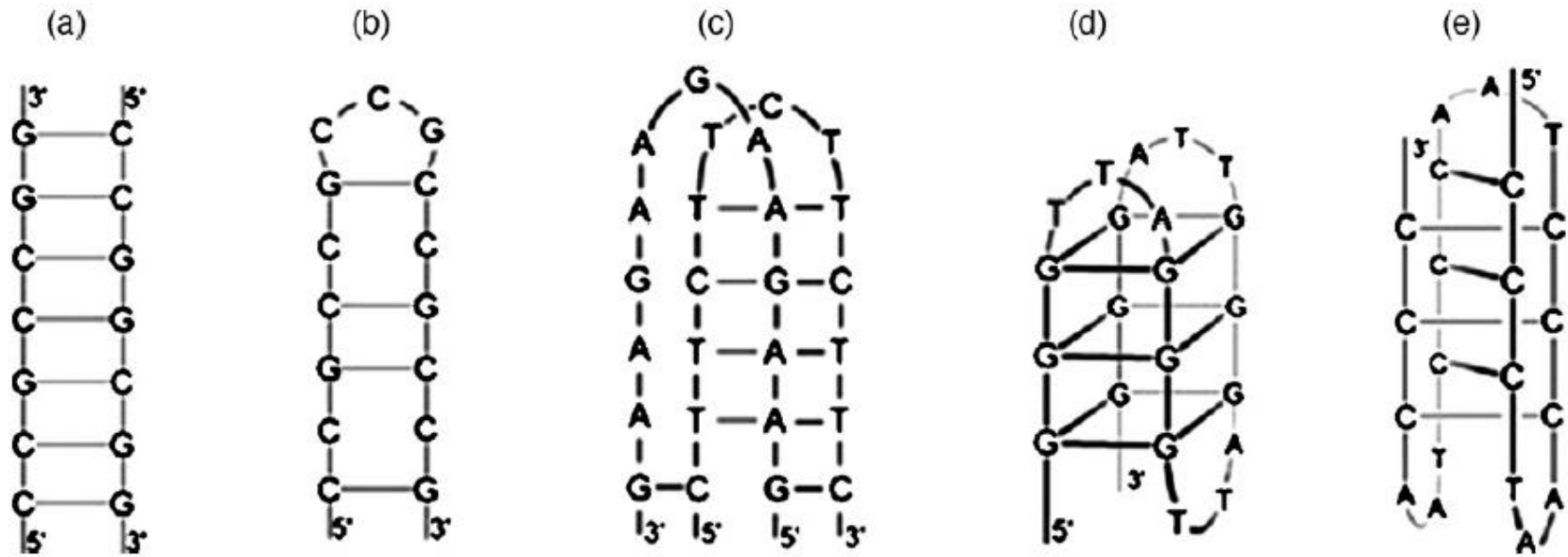
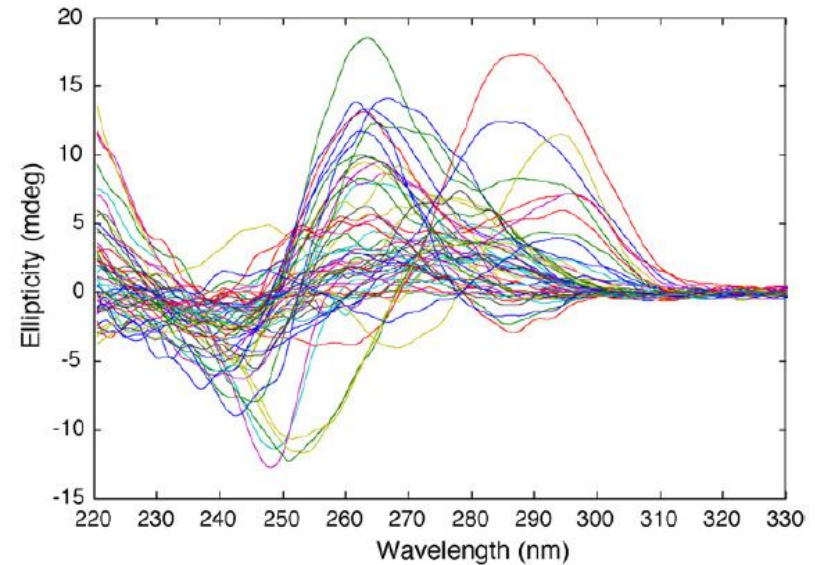
DNA can adopt structures in solution apart from the well-known Watson–Crick double helix, ranging from disordered single strands to high-order structures such as triplexes or quadruplexes. Moreover, different topologies can be adopted depending on the polarity of the DNA strands. The elucidation of the structure and topology adopted by a DNA sequence is usually carried out by means of spectroscopic techniques, such as circular dichroism.

In this work, the ability of several chemometric methods to efficiently classify DNA structures from circular dichroism data is tested. With this objective in mind, a dataset including 50 experimental spectra corresponding to different DNA structures (random coil, duplex, hairpin, reversed and normal triplex, parallel and antiparallel G-quadruplex, and *i*-motif) has been analyzed by means of unsupervised hierarchical clustering analysis, principal component analysis and partial least squares discriminant analysis. The results have shown that these methods allow efficiently the classification of DNA structures from circular dichroism spectra. Moreover, these classification methods also provided the most characteristic wavelengths used in the classification procedures.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

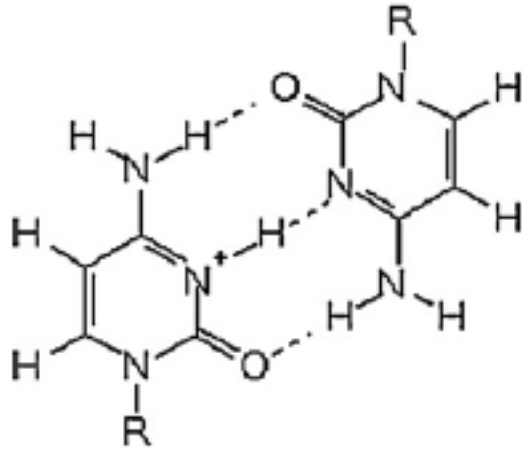
Struktura DNA – analýza pomocí CD

Ukázky spekter a struktur
DNA a oligonukleotidů

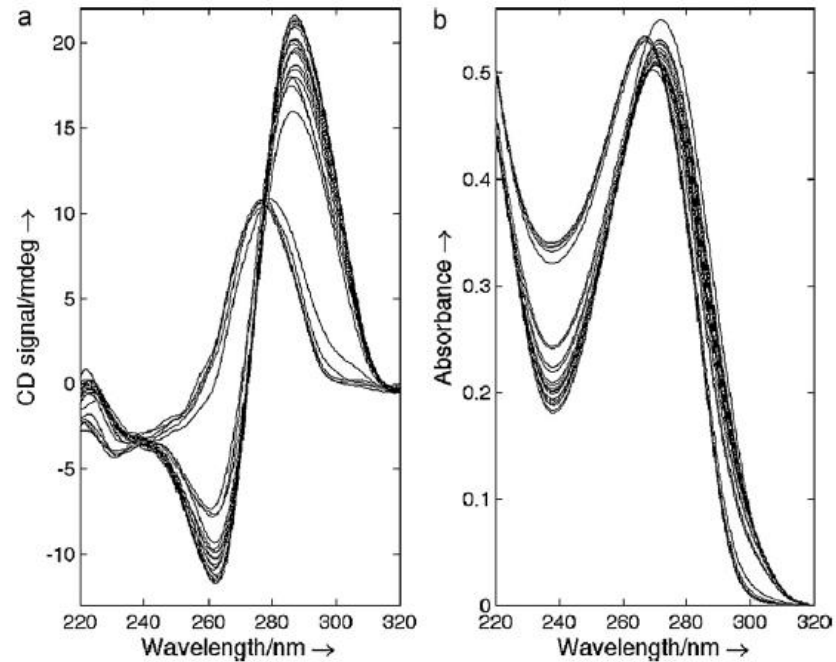


a) Duplex-dvoušroubovice (antiparalelní, intermolekulární), b) hairpin-vlášenka (antiparalelní, intramolekulární), c) triplex (paralelní, intermolekulární), d) G-kvadruplex (antiparalelní, intramolekulární), e) i-motiv (intramolekulární)

Neobvyklé struktury DNA



- Hemiprotonovaný cytosin (C⁺C)
- pro i-motiv strukturu je charakteristický nárůst pozitivního CD signálu při 288 nm

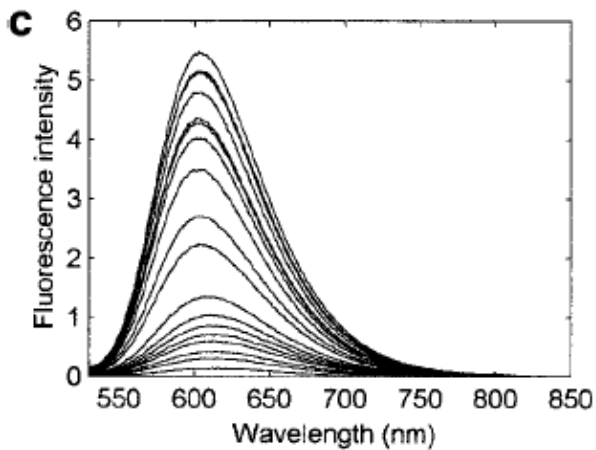
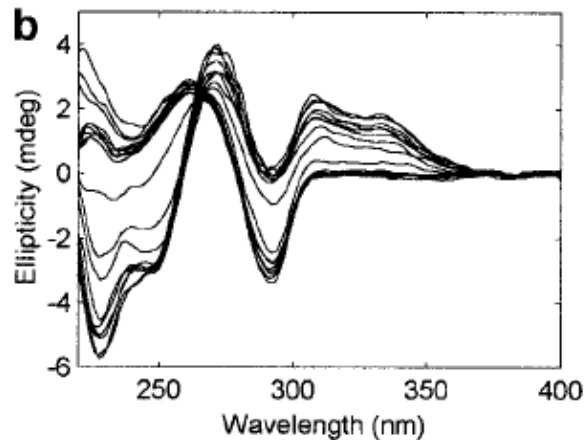
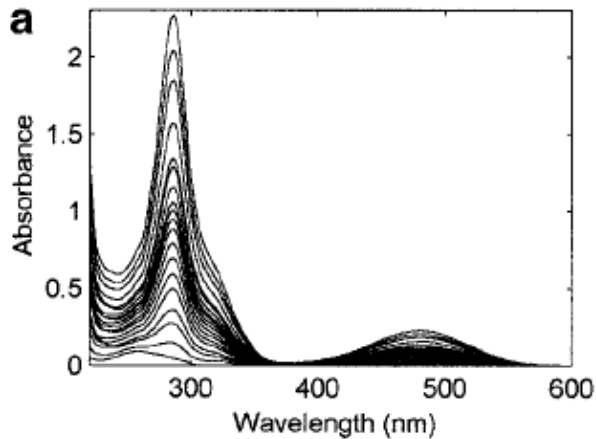


a) CD spektrum, b) UV-Vis spektrum

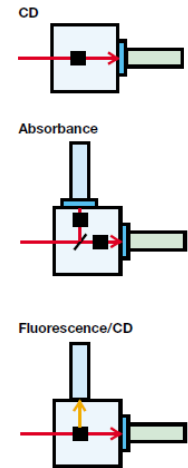
CD: výhody x nevýhody

- 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

Spektroskopie: CD, UV-Vis a fluorescenční



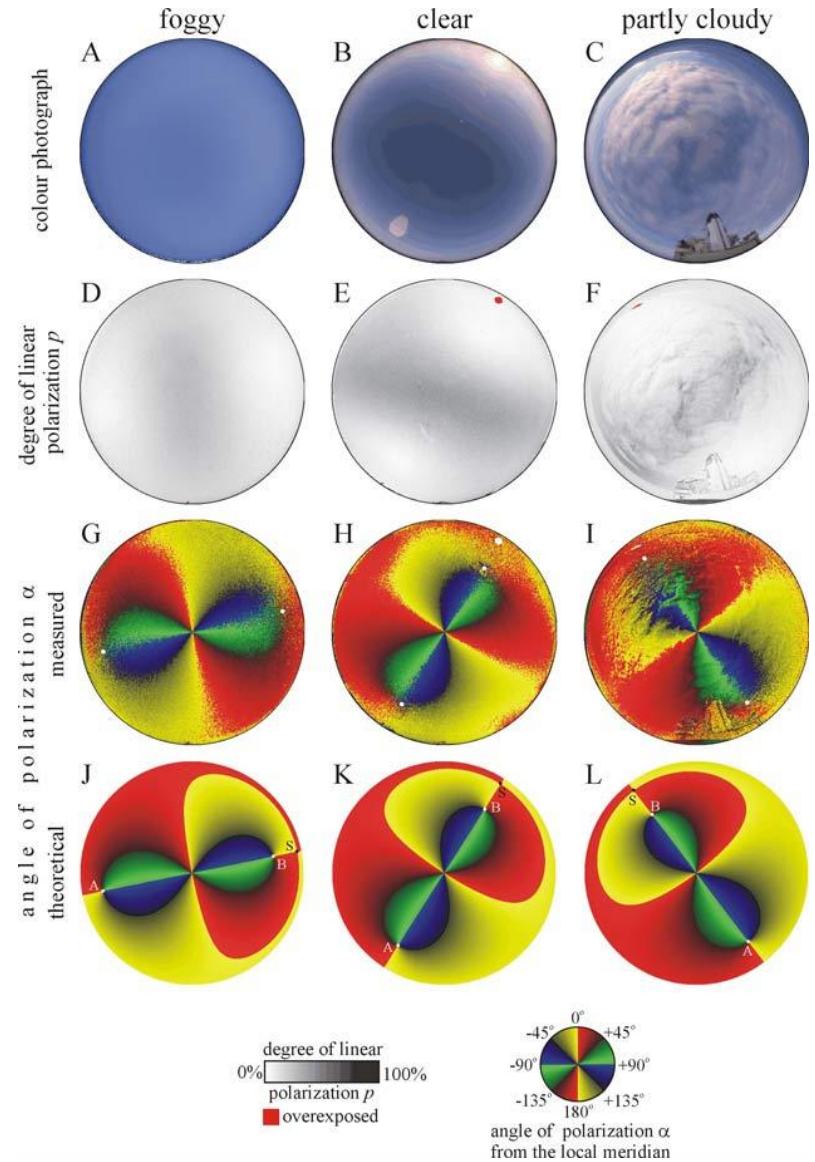
Modes of operation



Studium změny struktury oligonukleotidu poly (dG-dC)*poly (dG-dC) pomocí UV-Vis (a), CD (b), fluorescenční (c) spektroskopie



Top images show the Arctic sky on day of (a) fog, (b) sun, and (c) clouds. Images d-f show patterns of the degree of linear polarization. The faint gray line delineates between the sun and the anti-sun. The direction of polarization is perpendicular to the plane of scattering determined by the sun, the observer and the celestial point observed. Readings from two different points in the sky allow one to draw circles passing through these points perpendicularly to the direction of light polarization, and the circles intersect at the sun and anti-sun. The angle of polarization can be seen in images g-i. Click to enlarge



Fluorescenční anizotropie

