

# A kiroptikai spektroszkópia

Hollósi Miklós<sup>1</sup>, Vass Elemér<sup>1</sup>, Laczkó Ilona<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék, Budapest

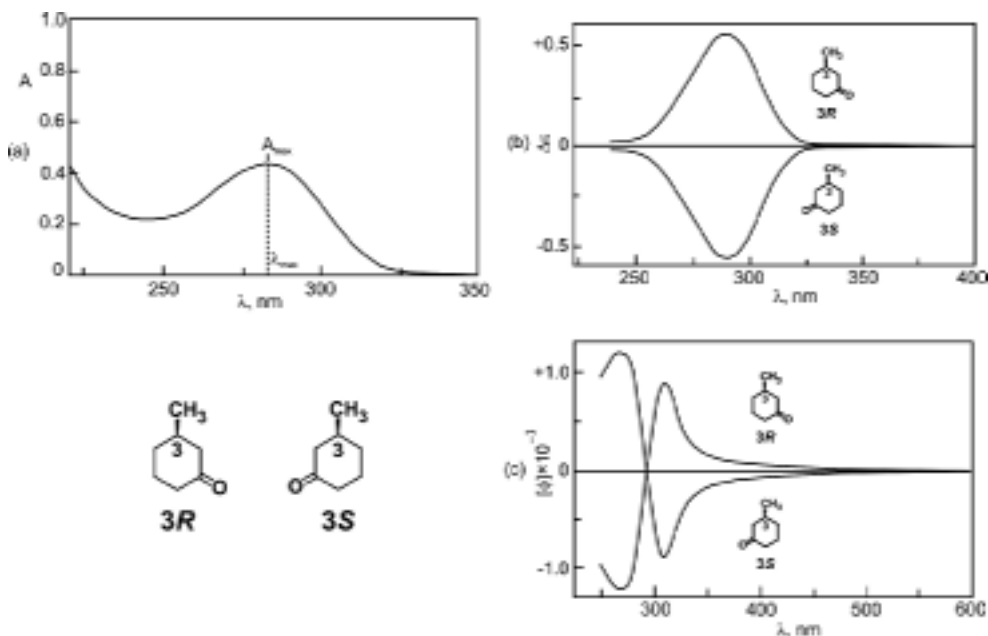
<sup>2</sup>Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged

## Abstract

*This paper gives a short summary on the theory and fields of application of chiroptical spectroscopy. Special attention is paid to exciton coupling that plays a role in governing the chiroptical properties of biopolymers (protein  $\alpha$ -helix, DNA double helix). Another main issue is the vibrational optical activity (VOA). This relatively new technique can be used for the determination of the absolute configuration or (in the case of biopolymers) absolute conformation in solution.*

Az optikai aktivitás jelensége közel két évszázada ismert. Az optikai forgatóképesség mérésére szolgáló eszközök – a polariméterek – jelentős mértékben segítették a sztereokémia fejlődését. Kiderült, hogy a forgatóképesség függ a polarizált fény hullámhosszától: az esetek zömében az ultraibolya tartomány felé haladva a forgatás abszolút értéke rohamosan nő. Ez a felismerés vezetett az *optikai rotációs diszperzió* (ORD) spektroszkópia kialakulásához. A Drude-egyenlet már a *kromofor fogalom* kialakulását készítette elő. A jelenség kvantumkémiai értelmezése Rosenfeld (1928) nevéhez fűződik, ő vezette be a *rotátorerősség* (R) fogalmát.

Méréstechnikai szempontból a nagy áttörést a *cirkuláris dikroizmus* (CD) spektrométerek elterjedése jelentette a 60-as évek közepétől. A CD görbe lényegesen egyszerűbb és matematikailag könnyebben kezelhető (Gauss-függvénnyel leírható), mint az ORD görbe. Az ultraibolya és látható (UV-*vis*) spektrum és a CD spektrum közötti kapcsolat nyilvánvalóvá vált (1. ábra) és már csak a rotátorerősség abszolút konfigurációtól (vagy abszolút konformációtól) való függésének felderítése maradt hátra.



1. ábra

A kiroptikai spektroszkópia – elsősorban a CD módszer – sikere elsősorban a biopolimerek és a természetes szénvegyületek szerkezetvizsgálatában elért látványos eredményeknek köszönhető. Említést érdemel Fasman munkássága, aki a fehérjék CD spektrumának három-komponensű felbontásával olyan módszer alapjait fektette le, amely a fehérjék szerkezetvizsgálatának első hatékony eszköze lett.

Az UV-*vis* spektroszkópia *nempolarizált*, más néven *izotróp* fényt használ. Az optikailag aktív (királis) molekulák vizsgálatához *lineárisan* (síkban) *polarizált* vagy *anizotróp* fényre van szükség. A lineárisan polarizált fény két cirkulárisan polarizált komponensre bontható, ezek a *balra* és *jobbra cirkulárisan polarizált* állapotok. Az abszorpciós sáv  $\lambda_{\max}$  értékéhez közeli hullámhosszaknál a *bcp* és a *jcp* fénykomponensnek nemcsak a sebessége különbözik egymástól, de különböző mértékben abszorbeálja őket az optikailag aktív közeg ( $A_b \neq A_j$ ) és  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_b - \varepsilon_j$ . A közegből kilépve a fáziskülönbség mellett a két vektor amplitúdója is különbözik egymástól ( $E_b \neq E_j$ ). Az eredő vektor nem egy egyenes mentén (síkban) oszcillál, hanem egy ellipszis mentén, vagyis a fény elliptikusan polarizált lesz. A kémikusok a sávok intenzitását gyakran a maximumoknak megfelelő  $\varepsilon_{\max}$  illetve  $\Delta\varepsilon_{\max}$  moláris extinkciós koefficiensekkel jellemzik. Ezeknek azonban nincs közvetlen kapcsolata az elméletből levezethető mennyiségekkel. Milliken javaslatára vezették be az elektronátmenetek gerjesztési intenzitásának jellemzésére a *dipólerősséget* ( $D$ ), amely nem más, mint az abszorpciós sáv hullámhosszal redukált (súlyozott) integrált intenzitása:

$$D = 9,188 \times 10^{-39} \int_0^{\infty} \frac{\varepsilon}{\lambda} d\lambda$$

Az elektrongerjesztés során változik a töltésselölés (töltéssűrűség) a molekulán belül, ez *átmeneti elektromos* vagy *dipólusmomentumot* ( $\mu$ ) hoz létre, amely iránnyal és intenzitással rendelkező vektormennyiség és nem más, mint  $\sqrt{D}$ , azaz  $D = \mu^2$

A CD spektroszkópiában a CD görbe alatti, hullámhosszal redukált integrált intenzitás a *rotátorerősség*,  $R$ :

$$R = 2,297 \times 10^{-39} \int_0^{\infty} \frac{\Delta\varepsilon}{\lambda} d\lambda$$

A CD átmenethez átmeneti elektromos momentum,  $\mu$  és átmeneti mágneses momentum,  $m$  szükséges

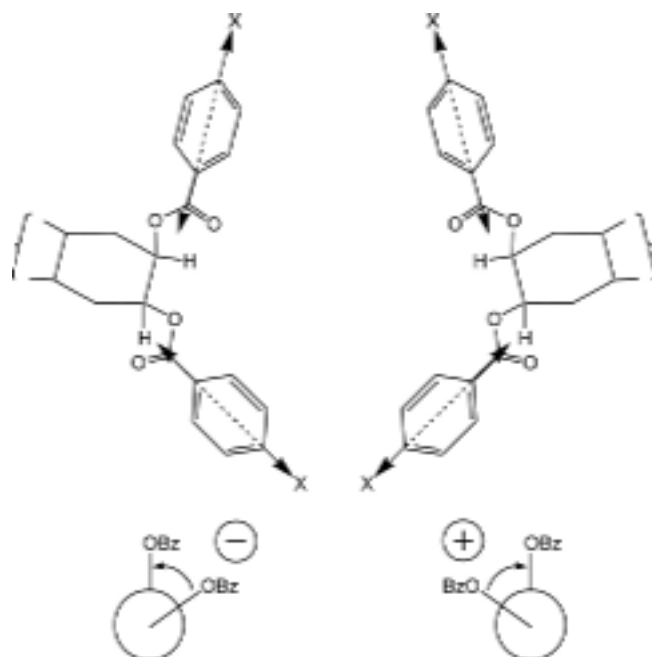
$$R = \mu m = |\mu| |m| \cos\beta$$

$\beta$  az átmeneti momentumvektorok által bezárt szög. Ha  $|\mu|$  vagy  $|m|$  nulla,  $R$  értéke nulla.  $R$  akkor is nulla, ha a két vektor merőleges egymásra. Ha  $\beta$  hegyesszög ( $0^\circ < \beta < 90^\circ$ ), a Cotton-effektus pozitív, ha pedig tompaszög ( $90^\circ < \beta < 180^\circ$ ) akkor negatív.

Az  $R = \mu m$  összefüggést kitűnően szemléltetik a királis hexahelicének. A  $\sim 325$  nm-nél mérhető CD sáv a  $\pi\pi^*$  jellegű HOMO-LUMO átmenetnek tulajdonítható. A gerjesztés során helikális töltéssűrűség-változás következik be, ami az enantiomer [(*M*)-hélix, illetve (*P*)-hélix] molekuláknál ellentétes irányú átmeneti mágneses momentumot indukál. Az (*M*)-hélixnél  $\beta = 180^\circ$ , a (*P*)-hélixnél pedig  $\beta = 0^\circ$ , vagyis az (*M*)-hélixnél  $R$  negatív (a CD sáv negatív), a (*P*)-hélixnél pedig  $R$  pozitív (a CD sáv pozitív).

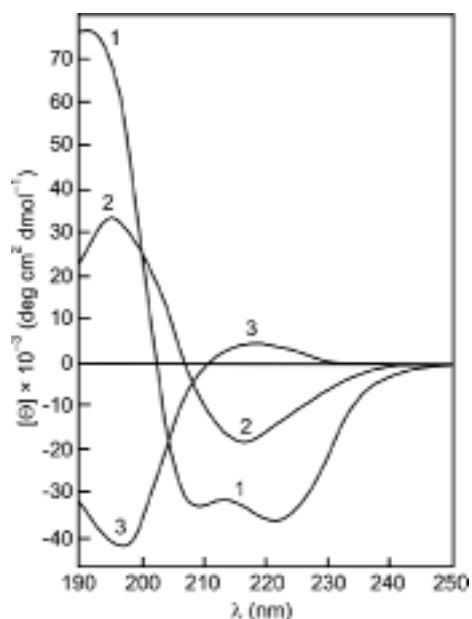
A királis ketonok kiroptikai tulajdonságainak vizsgálata Djerassi (1954) nevéhez fűződik. A vizsgált vegyületek a gyógyszeripari szempontból is rendkívül jelentős, merev térszerkezetű szteroid-ketonok voltak. Az oxocsoport  $n\pi^*$  elektronátmenete 300 nm táján jelentkezik a spektrumban, távol a következő nagyobb energiájú, 190 nm-nél található  $\pi\pi^*$  átmenettől. Az *oktáns szabály* teremt kapcsolatot a spektrum és a térszerkezet között.

Két egymáshoz térben közeli, nagy átmeneti elektromos momentummal rendelkező független kromofor királis (csavart) elrendeződése olyan kölcsönhatáshoz (dinamikus csatolás) vezet, amelynek eredményeképpen egy ellentétes előjelű sávpár (*exciton couplet*, EC) jelenik meg a CD spektrumban. A couplet előjeléből, amely nem más, mint a nagyobb  $\lambda$  értéknél jelentkező sávkomponens előjele, következtetni lehet a kromoforok konfigurációjára. Az OH-csoport nem kromofor, ezért a CD vizsgálatok előtt a glikolokat dibenzoil-származékká alakították. Az *exciton-csatolt cirkuláris dikroizmus* (EC-CD) mára az abszolút konfiguráció meghatározásának egyik legmegbízhatóbb módszerévé vált, amely a Bijvoet-féle röntgenkristallográfiai eljárással hasonlítható össze. A dibenzoát-észterek esetében az UV spektrumban 230 nm táján megfigyelhető intenzív elnyelés a (*p*-szubsztituált) benzolgyűrűt és a COOR csoportot magába foglaló töltésátviteli sávnak ( ${}^1L_a$ ) felel meg. Az átmeneti elektromos momentum (TEM) nagy és nagyjából a benzoátcsoportok hosszú tengelyével párhuzamos (2. ábra). A benzoátok konformációját jól ismerjük: a hosszú tengely az ábrán látható módon párhuzamos a glikol C-O kötésével, vagyis a TEM vektorok által bezárt vetületi szög előjelét és nagyságát tekintve is meg egyezik a C-O kötések  $\omega$  torziószögével.



2. ábra

Az EC-CD módszer megbízható abszolút konfiguráció, illetve abszolút konformáció meghatározást tesz lehetővé. Alkalmazható szupramolekuláris komplexek esetében is. Az amidsoportok közötti exciton csatolás határozza meg az  $\alpha$ -hélix fehérjeszerkezet CD spektrumát is (3. ábra).



3. ábra

A *vibrációs optikai aktivitás* (VOA) a molekulák vibrációs átmeneteinek „balra” cirkulárisan polarizált (*bcp*) és „jobbra” cirkulárisan polarizált (*jcp*) elektromágneses sugázzal szembeni különböző viselkedésére vezethető vissza. Két fő méréstechnikai változata van: az infravörös és Raman forma. Az IR változat a *vibrációs cirkuláris dikroizmus* (VCD), a Raman pedig a *Raman optikai aktivitás* (ROA). A VCD a *bcp* és *jcp* IR sugárzás elnyelésének különbsége, ahogy a CD (ECD) esetében láttuk: ( $\Delta\varepsilon = \varepsilon_b - \varepsilon_j$ ).

VOA akirális, illetve racém mintáknál nem mérhető, ahogy CD sem. A VCD és ROA mérés sikerének feltétele a kitűnő minőségű IR, illetve Raman spektrum. A 90-es évek végén kerültek kereskedelmi forgalomba a rutin célokra használható VCD spektrométerek és nemrég megjelent a műszerpiacon a ROA műszer is.

A VCD legegyszerűbb alkalmazása a királis minta *optikai tisztaságának* meghatározása, de mindkét módszer sikere annak köszönhető, hogy alkalmasak *abszolút konfiguráció*, vagy biopolimerek esetében az *abszolút konformáció* (másodlagos szerkezet) meghatározására.

A VCD nagy előnye az ECD-vel szemben a kromoforok nagy száma és változatossága. Az IR spektrum a molekula 3n-6 normál rezgési módjának megfelelő sávokat tartalmazza. A VCD spektrumban a sávoknak előjele is van, ami megkettőzi a VCD spektrum információtartalmát. A kromofor csoportok nagy választéka megbízható *sztereokémiai vizsgálatokat* tesz lehetővé.

A VCD spektrumok *ab initio* szintű kvantumkémiai módszerekkel szimulálhatók, ami jelentősen megnöveli a szerkezetvizsgálat hatékonyságát. Elég az alap-elektronállapotot és annak a rezgések hatására bekövetkező változását figyelembe venni, szemben az ECD-vel, ahol a gerjesztett állapot kiszámítására is szükség van, ami ma még nem egy triviális feladat. A sztereokémiai VCD spektroszkópiája az  $\alpha$ -helikális homopolipeptidek vizsgálatával kezdődött. Ahogy az IR spektrumban, a VCD spektrumban is amid I (amid I' D<sub>2</sub>O-ban) tartomány vizsgálatát szolgálja a legtöbb adatot. Az  $\alpha$ -hélix jellegzetessége egy pozitív couplet, amelynek negatív ága az intenzívebb, valamint egy másik gyenge negatív sáv (4. ábra). Az antiparalel  $\beta$ -redőzött réteg spektrumában két elkülönült negatív sáv található, míg a rendezetlen konformáció egy intenzívebb negatív sávval jellemezhető negatív couplet-et mutat.

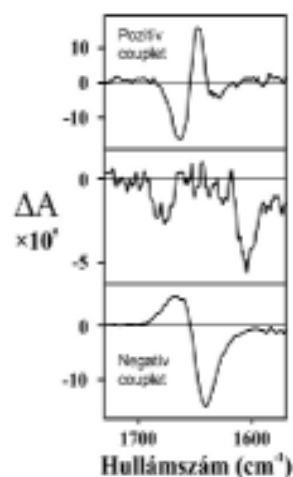
A VCD spektroszkópia sávgazdagsága, változatos előjel és intenzitás mintázata következtében alkalmas egyes konformációs altípusok megkülönböztetésére. Nem elég az amid I (I') tartományára hagyatkozni, ki kell aknázni az amid II és amid III sávok információtartalmát is. Talán a legfontosabb alkalmazási terület az  $\alpha$ -hélix és a  $\beta$ -hélix megkülönböztetése. Jelentősen különbözik egymástól az  $\alpha$ -hélix és a  $\beta$ -redőzött réteg konformáció amid II sávja is. Az  $\alpha$ -hélixre egy negatív sáv, míg a  $\beta$ -konformációra negatív couplet jellemző. Az amid III tartományban ( $\sim 1350 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ ) az  $\alpha$ -hélix többnyire pozitív, míg a  $\beta$ -konformáció negatív sávot mutat.

A rendezetlen vagy „random coil” konformációra általában egy intenzív negatív couplet jellemző. VCD spektroszkópiái adatok alátámasztják azt a korábbi CD (ECD) feltételezést, hogy a rendezetlen konformáció nem más, mint hosszabb-rövidebb balmenetű nyújtott helikális szakaszok [poli(prolin) II vagy PPII konformáció] együttese.

A múlt század végén úgy tűnt, hogy a CD spektroszkópia végleg a tudomány lomtárába kerül. De nem ez történt! A 90-es évek végétől a rekombináns DNS technika és *proteoma projektek* beindulása olyan szerkezetvizsgáló módszert igényelt, amely egyszerű, gyors és megbízható, továbbá anyagigénye kicsi (<1 mg). Így az érdeklődés ismét a CD módszer felé fordult, rohamosan nőtt az évente eladott CD spektrométerek (dikrográfok) száma. Újabb kihívást jelentett az „enantiomer-tiszta” kémia térhódítása. Az egyetlen enantiomert tartalmazó gyógyszerek, mezőgazdasági vegyszerek és egyéb készítmények kifejlesztése és piacra vitele alapos kiroptikai szerkezetjellemezést és analízist igényel. Ma már a műszerpiacon is kaphatók HPLC-CD rendszerek. Az új, szép „enantiomer-tiszta” világ pezsdítőleg hatott a műszerfejlesztő cégekre is. Néhány éve kereskedelmi forgalomba kerültek a *vibrációs optikai aktivitás* (VOA) vizsgálatára legalkalmasabbnak tűnő VCD és ROA spektrométerek. A fejlődés elméleti és gyakorlati síkon is töretlen. Hamarosan pályára állítják a kozmikus szerves minták optikai aktivitásának *in situ* regisztrálására alkalmas szuperérzékenységű kiroptikai és elválasztástechnikai műszerekkel felszerelt űrszondákat is.

## Ajánlott irodalom

- 1] E.L. Eliel; S.H. Wilen, Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994
- 2] J.B. Lambert; H.F. Shurvell; D.A. Lightner; R.G. Cooks, Organic Structural Spectroscopy, Prentice-Hall (New Jersey, USA), 1998
- 3] N. Berova; K. Nakanishi; R.W. Woody, Circular Dichroism Principles and Applications, J. Wiley & Sons, Inc. 2000
- 4] E. Vass, M. Hollósi, F. Besson, R. Buchet, Vibrational Spectroscopic Detection of Beta and Gamma Turns in Synthetic and Natural Peptides and Proteins, Chem. Rev. 103, (2003) 1917-1954
- 5] Molekulaspektroszkópia, (Szerk. Kovács István és Szőke József), 5. fejezet, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1987
- 6] A. Perczel; I. Laczkó; M. Hollósi, Peptidek térszerkezet-vizsgálata, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1994



4. ábra

*Polipeptidek és fehérjék VCD spektrumának amid I tartománya.*

*Fölül:  $\alpha$ -hélix, középen:  $\beta$ -réteg vagy szalag, alul: rendezetlen.*