

## ROZMANITOST SPEKTROSKOPIE RAMANOVY OPTICKÉ AKTIVITY

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

**PETR BOUŘ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika  
bour@uochb.cas.cz

Došlo 18.8.23, přijato 10.10.23.

Spektroskopie Ramanovy optické aktivity (ROA) je poměrně vzácná vzhledem k experimentální náročnosti a často pracné interpretaci spekter. Přesto se neustále rozvíjí a v poslední desetiletí výzkum v tomto směru přinesl podstatné zdokonalení experimentálních a teoretických metod. S tím bylo získáno mnoho nových poznatků o struktuře a chování molekul a jejich interakcích se světlem. V článku se pokusíme podat stručný přehled našich i obecných zkušeností s touto metodou. Ukazuje se, že ROA spektroskopie poskytuje unikátní informace o molekulách, je vhodná nejen ke stanovení absolutní konfigurace molekul, ale i jejich optické čistoty, zkoumání konformačních stavů a elektronové struktury.

**Klíčová slova:** Ramanova optická aktivita, rezonance, cirkulárně-polarizovaná luminiscence, simulace spekter

### Obsah

1. Úvod, historie
2. Fyzikální principy a souvislosti Ramanovy optické aktivity
3. Příklady nerezonanční spektroskopie
4. Magnetická rezonanční měření v plynech
5. Chirální rozptyl v kombinaci s povrchovým Ramanovým zesílením
6. Rezonanční Ramanova optická aktivita a interference s cirkulárním dichroismem
7. Cirkulárně polarizovaná luminiscence
8. Závěr

### 1. Úvod

Úvahy o optické aktivitě, rozdílném chování pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného světla v chirálním prostředí, se v souvislosti s Ramanovým rozptylem objevily krátce po jeho objevení<sup>1,2</sup>. První pokusy s optickými izomery molekul ale nebyly úspěšné, výsledky se zpravidla ukázaly jako nereprodukovatelné, vysvětlitelné chybami, artefakty měření<sup>3-5</sup>. Dnes víme, že Ramanova optická aktivita (ROA) pravděpodobně ani nebyla tehdejšími přístroji zachytitelná.

„Moderní“ ROA spektroskopie se zrodila v 60. letech 20. století, nejprve ve formě důkladných teoretických úvah<sup>6,7</sup>. Ale ani v následujících letech nebyly experimentální pokroky přímočaré, a „výsledky“ byly záhy připsány nepřesnostem přístrojů<sup>8,9</sup>. Za první ROA spektra se považují data z roku 1973 pro 1-fenylethanol a 1-fenylethylamin<sup>10</sup>.



**Prof. RNDr. Petr Bouř, DSc.** studoval Matematicko-fyzikální fakultu Univerzity Karlovy v Praze, titul CSc. získal na ÚOCHB v roce 1993. Absolvoval vědecké stáže v USA, Kanadě a Norsku, zabývá se teorií a experimentální metodologií související s optickou spektroskopií. V současné době je vedoucím skupiny Biomolekulární spektroskopie na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, a profesorem na Ústavu analytické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Publikoval 240 prací v odborných časopisech.

Metoda se dlouhou dobu držela v několika specializovaných laboratořích (např. prof. Barrona (Glasgow)<sup>11</sup>, Nafieho (Syracuse)<sup>12</sup> a Huga (Freiburg)<sup>13</sup>). W. Hug je také považován za „otce“ prvního komerčního ROA spektrometru firmy Biotools, dostupného zhruba od roku 2005. Částečně vlivem historických náhod, například osobních kontaktů s dalším průkopníkem vibrační optické aktivity, prof. Keiderlingem (Chicago), se metoda relativně brzy objevila i v Praze na Univerzitě Karlově<sup>14</sup>, poté na Vysoké škole chemicko-technologické<sup>15</sup>, Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR<sup>16</sup> a Univerzitě Palackého v Olomouci<sup>17</sup>.

V České republice je proto výzkum v tomto směru relativně „předimenzován“ (ROA se ovšem stala rychle populární i v jiných zemích, např. v Polsku, Belgii nebo Japonsku). Jeden ze světových odborníků na experimentální aspekty ROA, J. Kapitán (Univerzita Palackého, Olomouc), dokonce v současnosti vyvíjí se svými spolupracovníky vlastní komerční verzi ROA spektrometru<sup>17</sup>.

Během času si tato spektroskopie našla uplatnění zejména při studiu „biomolekul“, jako jsou cukry, peptidy, bílkoviny, nukleotidy a nukleové kyseliny<sup>12</sup>. Velkou pozornost vzbudilo i určení absolutní konfigurace bromchlorfluormethanu<sup>18</sup>. Příkladem unikátní informace, kterou je možné získat pouze touto metodou, je analýza konformačního chování deuterovaného neopentanu (2,2-dimethylpropan)<sup>19</sup>. Objevily se různé „odrůdy“ experimentů, jako ROA zesílená na kovových površích<sup>20,21</sup>, vzbuzená agregací karotenoidů<sup>22</sup>, indukovaná aplikací magnetického pole<sup>23</sup>, měřená v plynném stavu<sup>24</sup> nebo za podmínek „rezonance“ pro barevné vzorky<sup>25</sup>. Mimo standardního laseru o vlnové délce 532 nm se experimentuje s excitací ultrafialovou<sup>26</sup> nebo v blízké infračervené oblasti<sup>27</sup>. Pro

chemiky je určitě zajímavá možnost přesně stanovit pomocí této metody enantiomerní přebytek<sup>28</sup> a uvažuje se i o jejím použití jako diagnostické metody v lékařství<sup>29</sup>. Samostatnou kapitolou jsou dva jiné jevy, mimo vlastní vibrační ROA, které lze také sledovat pomocí ROA spektrometru: cirkulárně polarizovaná luminiscence (CPL)<sup>30</sup> a kombinace elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) s Ramanovým rozptylem cirkulárně-polarizovaného záření (ECD-Raman)<sup>31</sup>.

Poměrně unikátní pro spektrální metodu je úzké sepětí ROA a kvantově-chemických výpočtů. Polohy, intenzity a znaménka spektrálních páسů lze přiřadit struktuře na základě empirických vztahů<sup>32</sup>; daleko univerzálnější je ale interpretace spekter na základě jejich „*ab initio*“ simulací. Ty navíc poskytují doplňkové informace o studovaných systémech. Výpočetní metody a experiment se v tomto směru vzájemně doplňovaly, inspirovaly a podněcovaly. Teoretickými milníky bylo např. zavedení Londonových orbitalů do výpočtů<sup>33</sup>, což odstranilo závislost výsledků na zvolení souřadné soustavy, spojení simulací s „rychlými“ výpočty založenými na teorii elektronové hustoty<sup>34</sup>, a přenos vibračních parametrů umožňující simulovat vibrační spektra proteinů i jiných systémů až o desítkách tisíc atomů<sup>35</sup>.

## 2. Fyzikální principy a souvislosti

Pro představu o možnostech a omezeních ROA je užitečné zařadit ji mezi ostatní spektroskopické metody využívající chiralitu molekul a cirkulárně-polarizované světlo (tab. I). Jako forma vibrační optické aktivity (VOA), ROA zkoumá vibrační přechody. Ty je možné sledovat

Tabulka I  
Zjednodušený přehled chiroptických metod

Chiroptická metoda	Pro elektronové přechody	Pro vibrační přechody
<i>Využívající přírodní chiralitu:</i>		
Optická rotační disperze (ORD)	standardní, většinou nahrazena ECD	VORD, známá, ne moc rozšířená <sup>58</sup>
Cirkulární dichroismus (CD)	elektronický CD (ECD), standardní metoda	vibrační cirkulární dichroismus (VCD), pozorován poprvé v roce 1974 (cit. <sup>59</sup> ), komerčně dostupný po roce 1997
Cirkulárně polarizovaná luminiscence (CPL)	začíná být komerčně dostupná	neznámá
Ramanova optická aktivita (ROA)	neznámá	pozorovaná od r. 1973 (cit. <sup>10</sup> ), komercializovaná od roku 2005 (cit. <sup>60</sup> )
<i>Chiralita buzená magnetickým polem:</i>		
Magnetická ORD	Faradayův efekt	nepoužívá se
Magnetický cirkulární dichroismus	MCD, poměrně častá metoda	Magnetický VCD (MVCD), pozorován od r. 1984 (cit. <sup>61</sup> ), teoretický popis 2018 (cit. <sup>62</sup> ), používán vzácně
Magnetická CPL	dostupná, spíše ojedinělá	neznámá
Magnetická ROA	pozorovaná <sup>63</sup>	pozorovaná pro absorbující vzorky <sup>64</sup> i plyny <sup>43</sup>

i pomocí jiné chiroptické metody, vibračního cirkulárního dichroismu (VCD)<sup>36</sup>. Vůči němu ROA nabízí větší rozsah vibračních frekvencí (např. 50–4500 cm<sup>-1</sup>)<sup>17</sup> a pohodlnější práci s vodnými roztoky. Ty jsou tradičně problematické v infračervené spektroskopii, tedy i pro VCD, neboť voda silně absorbuje infračervené záření. Ramanův signál vody je poměrně slabý. Naopak, výhodou VCD jsou menší nároky na čistotu vzorku. Fluorescenční pozadí v Ramanově spektru způsobené nečistotami může zcela znehodnotit ROA experiment, neboť ROA šum je zhruba úměrný odmocnině Ramanova signálu. VCD technika je také po experimentální a teoretické stránce jednodušší, a „přemíra“ informace v ROA spektru může být i rušivá. Typickým příkladem je sekundární struktura proteinů daná konformací hlavního peptidového řetězce. Ta se ve VCD projevuje specifickým tvarem pásů tzv. amidu I (z velké části valenční vibrace karbonylové skupiny, ~1650 cm<sup>-1</sup>). V ROA je amid I méně specifický, a do spekter zasahují i postranní peptidové řetězce komplikující jejich interpretaci. Společnou nevýhodou VCD a ROA je potřeba velkého množství vzorku (zpravidla více než 1 mg) a velkých koncentrací (ideálně >10 mg ml<sup>-1</sup>).

Oproti elektronovým chiroptickým metodám (ECD, ORD, CPL) vibrační spektra poskytují zpravidla více rozlišených pásů, tedy více nebo alespoň lépe čitelnou informaci. Také interpretace VOA spekter pomocí kvantově-mechanických výpočtů je jednodušší. Ty jsou notoricky pomalé a nespolehlivé pro excitované elektronové stavy, zatímco vibrační spektra zpravidla vyžadují jen popis základního elektronového stavu molekuly. Další výhodou VOA je „lokalita“ vibračních interakcí, výhodná pro určení struktury spekter. Elektronová spektra pro jednu a tu samou molekulu/skupinu daleko více závisí na okolí, např. na rozpouštědle.

Magnetické analogy chirálních spektroskopii jsou zajímavé v tom, že jsou univerzálně použitelné, tj. i nechirální molekuly dávají chirální signál. To může být důležité pro jistější identifikaci látek, přiřazení přechodů ke kvantovým stavům, a rozlišení pásů splývajících při použití metod necitlivých k polarizaci světla.

Když se vrátíme k vlastní ROA, můžeme rozlišit několik druhů experimentů. Spektrum  $S$  získáme vždy jako odezvu detektoru,  $S(\omega) = I_R - I_L$ , kde  $\omega$  je Ramanův posun frekvence (zpravidla v cm<sup>-1</sup>) a  $I_{R/L}$  intenzity pro pravo/levotočivě polarizované světlo. Úhel mezi dopadajícím a analyzovaným paprskem může být různý, nejčastěji 0° (dopředný rozptyl), 90°, nebo 180° (zpětný rozptyl). Navíc vzorek může být ozařován nepolarizovaným světlem, a rozdíl  $I_R - I_L$  detegován na výstupu (modulace cirkulární polarizace na výstupu – scattered circular polarization, SCP), nebo střídavě pravo- a levotočivým světlem, a detegována celková intenzita (kruhová polarizace na vstupu, incident circular polarization, ICP). Při kontrole vstupní (horní index) i výstupní (dolní index) polarizace můžeme měřit rozdíl ve fázi ( $I_R^R - I_L^L$  kruhová polarizace, dual circular polarization, DCP<sub>I</sub>) i opačnou kombinaci ( $I_L^R - I_R^L$ , DCP<sub>II</sub>). Díky komercializaci se pod „ROA spektrem“ zpravidla míní SCP (180°) experiment, ale při srovnávání

různých pramenů je třeba druh spektra zkontrolovat. U jednotlivých druhů experimentů se liší i celková Ramanova intenzita, definovaná jako  $I_R + I_L$ .

Poměr ROA a Ramanových intenzit (normalizovaný rozdíl kruhově-polarizovaných intenzit, normalized circular intensity difference, CID) je zpravidla malý, CID ~10<sup>-4</sup>, a měření i na moderních přístrojích může být obtížné a zdlouhavé (hodiny, dny). Slabé signály mohou být přehlášeny artefakty. Pokud je to možné, je dobré ověřit, že optické antipody, enantiomery, dávají „zrcadlově obrácená“ spektra, tj. ROA pásy stejné intenzity ale opačného znaménka. Důležité je také uvědomit si, že šum v ROA signálu je přibližně úměrný odmocnině Ramanova signálu. Pokud je tedy např. pozadí v Ramanově spektru vysoké, typicky vlivem fluorescenčních nečistot nebo fluorescence zkoumané látky, snadno může překazit ROA experiment.

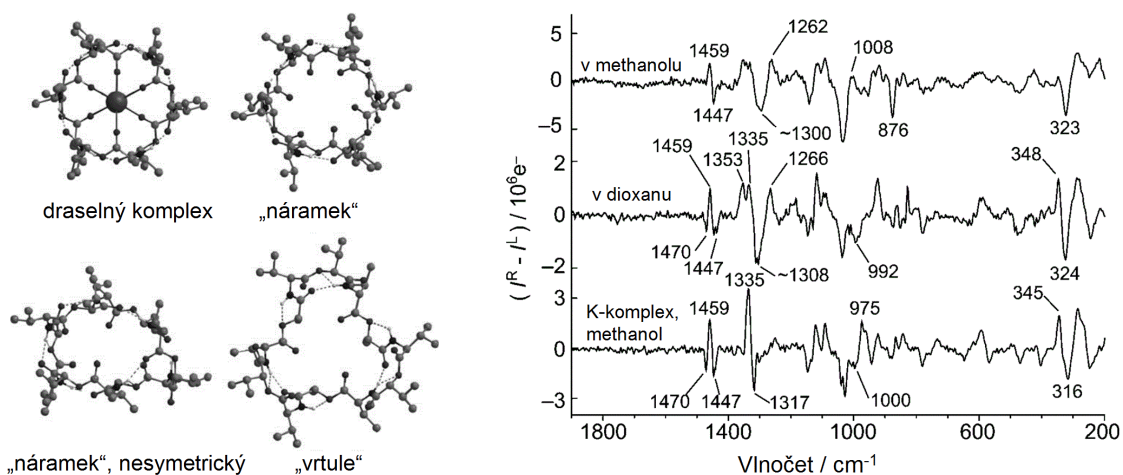
Pro experimentování s různými excitačními vlnovými délkami ( $\lambda$ ) je důležité, že intenzita Ramanova signálu je úměrná  $\lambda^{-4}$  a u ROA je to dokonce  $\lambda^{-5}$ . V komerčním přístroji se pracuje s vlnovou délkou 532 nm. Pokud bychom prováděli měření s 785 nm laserem jako v laboratoři prof. Unna<sup>27</sup>, signál by pak byl (785/532)<sup>5</sup> ~7krát slabší. Naopak, ultrafialový ROA spektrometr prof. Barrona a Dr. Kapitána s vlnovou délkou 244 nm zesílí signál (532/244)<sup>5</sup> ~50krát (cit.<sup>26</sup>). V posledním případě ale může docházet k rozkladu vzorku a jiným parazitním jevům. V tomto smyslu je vlnová délka 532 nm rozumný kompromis.

Jako excitační zdroj se tedy používá výhradně monochromatické záření laseru. Podle klasické představy světlo molekulu polarizuje, indukuje v ní elektrické proudy, a molekula jako anténa se stává zdrojem Ramanova signálu, který se deteguje. Nahlíženo z jiné strany, můžeme si také představit, že molekula pohltí kvantum elektromagnetického záření, foton, a vypustí jiné. Pro simulace ROA spekter musíme spočítat polarizovatelnost molekuly a její vibrační energie, což je dnes úloha dobře zvládnutá v kvantově-chemických programech, např. v Gaussianu<sup>37</sup>.

### 3. Příklady nerezonanční ROA spektroskopie

Nerezonanční ROA se rozumí spektroskopie vzorků neabsorbujících excitační laserové záření. Sem patří převážná většina dosavadních experimentů. Jako příklady použití uvádíme tři aplikace, určení konformerů valinomycinu, simulace spekter globulárních proteinů, a pokročilou analýzu ROA spekter.

Valinomycin je flexibilní molekula a např. NMR spektroskopie není schopna rozlišit signály jednotlivých konformací. ROA spektrum je prostý součet sub-spekter všech komponent ve směsi. NMR a ROA jsou jedny z mála metod vhodných ke studiu molekul v roztoku, a tento případ dobře dokládá „konkurenceschopnost“ optických metod. V naší práci<sup>38</sup> jsme zjistili, že v roztoku, stejně jako v krystalu, převládá nesymetrická konformace, kde část peptidového řetězce zaujímá tzv.  $\beta$ -turn (obr. 1). Tuto formu není možné přímo detegovat pomocí NMR. V ROA

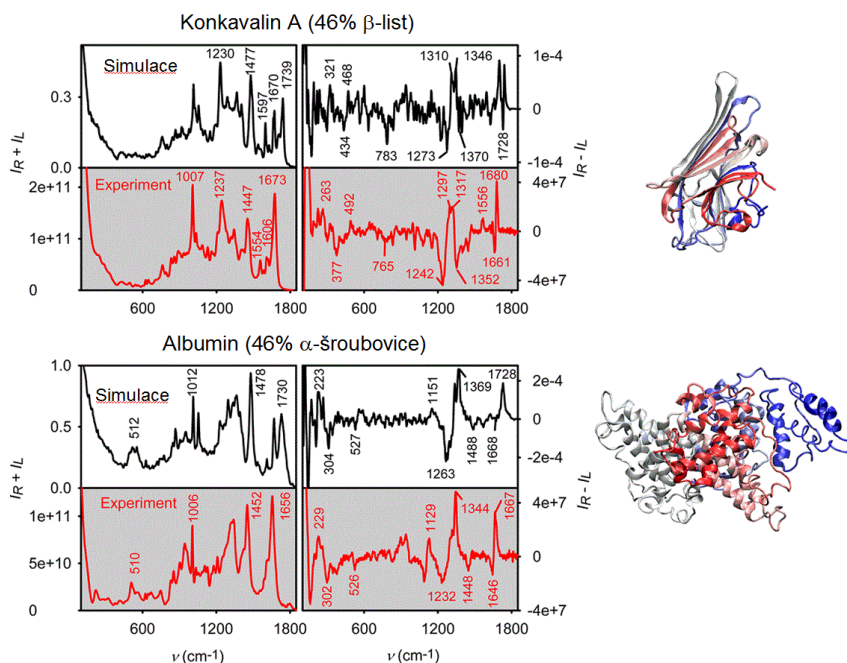


Obr. 1. Příklad konformerů valinomycinu, jeho ROA spektra měřená v methanolu a dioxanu, a komplex s draselnými ionty měřený v methanolu, podle cit.<sup>38</sup>

spektrech je také dobře vidět sbalení molekuly do komplexu s draselnými ionty, zejména u pásů v okolí  $1320\text{ cm}^{-1}$ .

Na globulárních proteinech byla z hlediska vývoje metodologie zajímavá především jejich velikost. Přímá simulace spekter kvantově-chemickými metodami nebyla možná. Proto jsme aplikovali metodu přenosu vibračních parametrů<sup>39</sup>. Krystalová struktura byla známa; zkoumané proteiny jsme proto rozložili do menších fragmentů

o  $\sim 100$  atomech, na kterých jsme pomocí dalších drobných výpočetních triků mohli s vysokou přesností spočítat silové pole a intenzitní parametry. Ty byly přeneseny zpět na původní protein, pro který tak bylo možné generovat Ramanovo i ROA spektrum. Z obr. 2 vidíme, že simulace poměrně věrně experiment reprodukuje. Např. jsou schopny zachytit rozdíly mezi strukturou proteinu založenou na  $\beta$ -listu (konkavalin A) a  $\alpha$ -šroubovice (albumin). Podobná



Obr. 2. Ukázka shody simulovaných a experimentálních Ramanových a ROA spekter dvou globulárních proteinů, konkavalinu A a lidského sérového albuminu, podle cit.<sup>39</sup>

přesnost simulací byla dosud možná jen u malých molekul. Trik s přenosem vibračních parametrů umožňuje posunout přesné simulace vibračních spekter k systémům o desítkách tisíc atomů, kde začíná být limitujícím faktorem diagonalizace silového pole.

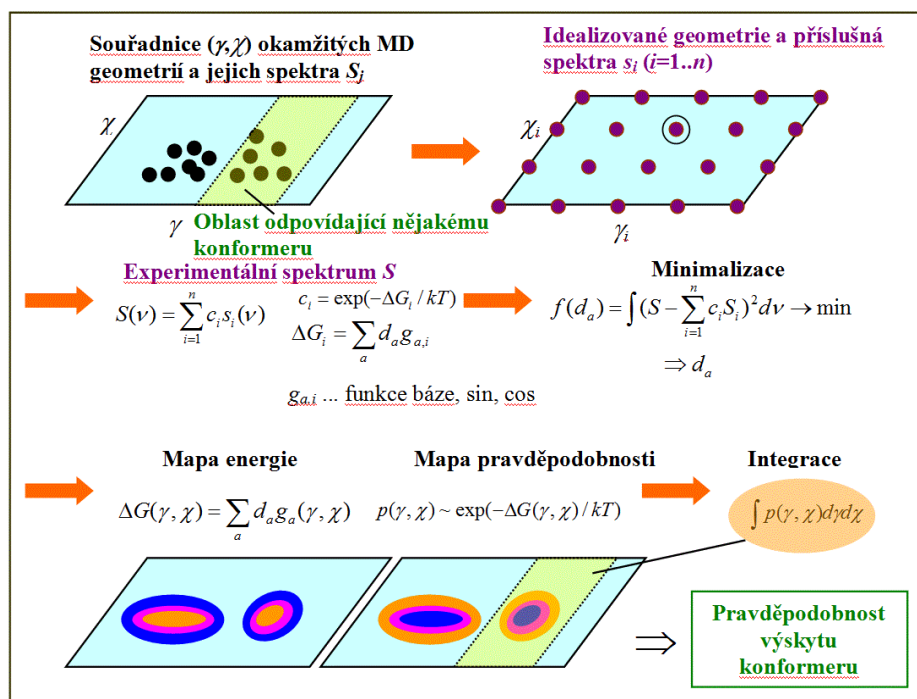
Prvotní simulace ROA, a obecně vibračních spekter, měly k realitě dost daleko. Rozdíl mezi experimentálními a vypočtenými frekvencemi často zabraňoval i základnímu přiřazení pozorovaných spektrálních pásů, velká chyba byla i v intenzitách. U tzv. biomolekul i jiných systémů přesné simulace spekter často ještě komplikuje jejich flexibilita a polarita. Ve vzorku je přítomno mnoho konformací, které silně interagují s rozpouštědlem, zpravidla s vodou. Modernější výpočetní postupy založené na spojení klasické a kvantové mechaniky (multi-scale methods) ale dokáží reálnou situaci zohlednit i pro tyto případy. Pokud pak věříme simulovaným spektrům, můžeme do nich rozložit spektra experimentální; koeficienty rozkladu pak přímo udávají zastoupení složek ve vzorku<sup>40</sup>. Nedávno jsme na příkladu modelových nukleotidů tento postup ještě rozvinuli a rozkladem experimentálních spekter získali celou konformační mapu, tj. závislost volné energie na vybraných souřadnicích v molekule (obr. 3, cit.<sup>41</sup>).

#### 4. Magnetická rezonanční měření v plynech

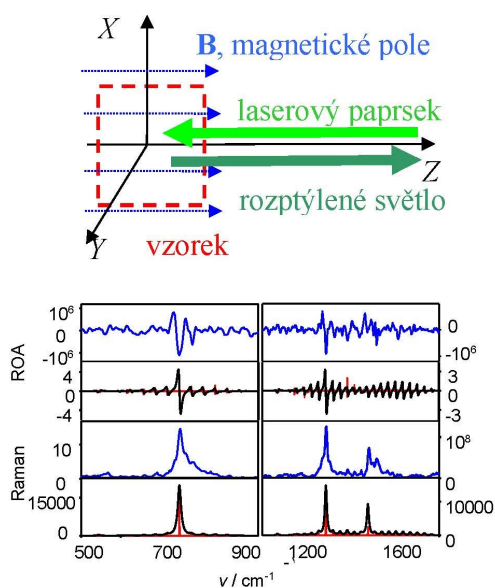
ROA měření v plynech jsou podstatně exotičtější než pro roztoky. Dosáhnout měřitelné koncentrace v plynu je obtížné a pro nativní ROA signál se to povedlo jen pro methyloxiran<sup>24</sup>. Jeho signál byl srovnatelný s falešnými signály od stěny kvivety. Abychom eliminovali artefakty, během měření jsme nechali plyn uniknout. Signál kvivety, která neměnila polohu, byl stále stejný, a dal se tak lépe odečíst. Měření má význam pro kalibraci výpočetních metod, často aplikovaných ve vakuu, nebo pro zkoumání interakce s rozpouštědlem<sup>42</sup>. Methyloxiran s teplotou varu 34 °C je ovšem výjimečná chirální molekula.

Zajímavý byl také pokus, kdy se plynný NO<sub>2</sub> nacházel v magnetickém poli<sup>23</sup>. NO<sub>2</sub> má lichý počet elektronů a je to tedy paramagnetická molekula. Magnetické pole silně štěpí jeho rotační hladiny. Navíc také tento oxid absorbuje excitační laserové záření, což všechno spolu s výběrovými pravidly pro rotačně-vibrační přechody vede k silnému ROA signálu (obr. 4), který bychom tak mohli označit jako (para)magnetickou rezonanční rotačně-rozlišenou ROA. Spektra tak odráží zajímavé vlastnosti molekuly, jako jsou jednotlivé složky polarizovatelnosti, které by bylo obtížné zjistit jinými metodami.

I tak byla experimentální ROA spektra NO<sub>2</sub> zatížena velkým šumem. První úvahy naznačovaly, že podobný výsledek nemůžeme očekávat u diamagnetických molekul.



Obr. 3. Schéma postupu při rozkladu experimentálních spekter do teoretických. Ve výpočetním modelu se snažíme pokrýt celý prostor vybraných souřadnic, následná analýza pak poskytne oblasti s největší pravděpodobností výskytu molekuly, podle cit.<sup>41</sup>



Obr. 4. Měření v magnetickém poli a ROA spektra plynného  $\text{NO}_2$ , experiment (modře) a simulace (černě, s vyznačenými jednotlivými přechody), podle cit.<sup>23</sup>

Vždyť jejich magnetický moment je zhruba 2000krát menší než u paramagnetických. Proto bylo překvapením, že diamagnetické plynné halogeny ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$ ) za stejných podmínek vykazovaly podobně silné ROA pásy<sup>43</sup>. Vysvětlením bylo to, že u Ramanova rozptylu v rezonanci se silně uplatňují i excitované elektronové stavy molekul, a ty už u halogenů paramagnetické jsou. Ony „virtuální“ energetické hladiny, které se kreslí v učebních textech ozřejmujících Ramanův rozptyl, jsou v tomto případě velmi hmatatelné.

### 5. Chirální rozptyl v kombinaci s povrchovým Ramanovým zesílením

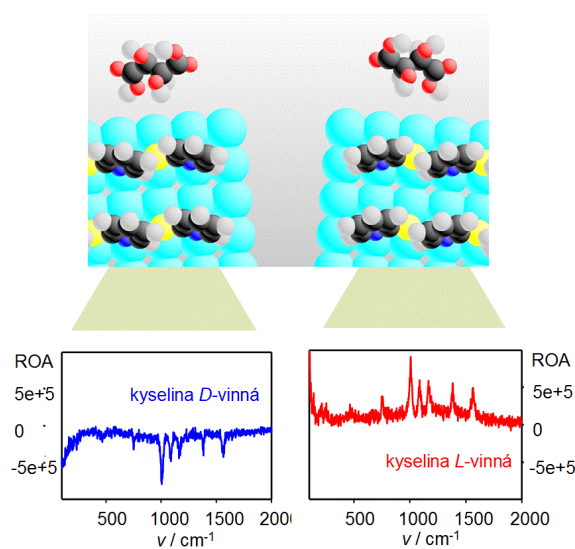
Ramanův signál molekul v blízkosti povrchů kovů (nejčastěji Ag, Au, Cu) a jiných materiálů může vzrůst až o několik řádů. Standardní zesílení se udávají v rozsahu  $10^4$ – $10^7$ , některé prameny oznamují zesílení až  $\sim 10^{12}$ , kdy lze údajně zaznamenat signál jediné molekuly<sup>44</sup>. Proto se mnoho pracovišť včetně naší laboratoře pokusilo prozkoumat podmínky, za kterých by se dala měřit i povrchově-zesílená ROA (SEROA, surface-enhanced ROA). Podle našeho teoretického modelu by to bylo možné<sup>45</sup>, některé práce to však vylučují<sup>46</sup>. Je pravda, že experimentální práce v tomto směru jsou často podezřelé, autoři se nenamáhají s ověřením pomocí měření s opačnými enantiomery nebo s vysvětlením naměřeného signálu. Odstrašujícím příkladem je SEROA „spektrum“ nechirálního adeninu<sup>47</sup>.

Přesto jsme reprodukovatelné SEROA spektra získali, díky principu „velitel a vojáci“ (sergeant and soldiers). Chirální vinná kyselina sama poskytuje velice slabý povrchově-zesílený Ramanův signál. Pokud se ale na stříbrný povrch naváže merkaptopyridin, molekula se silným signálem, vinná kyselina ovlivní jejich orientaci, což vede k měřitelnému ROA signálu (obr. 5, cit.<sup>21</sup>). Enantiomery dávají opačné signály a metoda funguje pro různé „velitele“ (vinná kyselina, alanin, arginin) a „vojáky“ (2-merkaptopyridin, 4-merkaptopyridin).

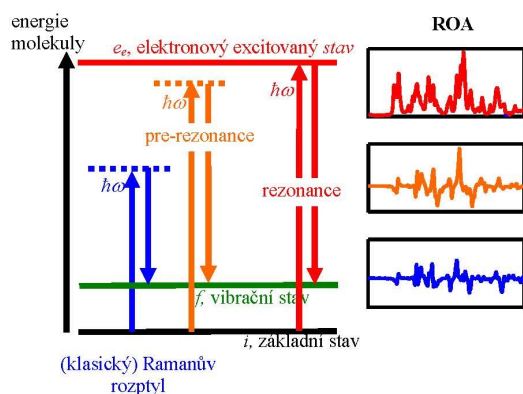
Naměřený SEROA signál tak jasně zachycuje molekulární chiralitu, ale je často jen úměrný Ramanovu spektru. To poněkud snižuje množství informace, která se z něj dá vyčíst. Také původ ROA intenzit není jasný, může se jednat o rezonanční ROA (koloidy silně absorbují laserové záření) nebo efekt pramenící v elektronovém cirkulárním dichroismu vzorku.

### 6. Rezonanční ROA a interference s cirkulárním dichroismem

Mimo zesílení na kovových površích Ramanův signál také neobyčejně vzroste za podmínek tzv. rezonance. Znamená to, že vzorek absorbuje excitační záření, energie fotonu záření je blízká nebo rovná rozdílu energií nějakých stavů v molekule. Pro excitační délku 532 nm zhruba uprostřed viditelného spektra k tomu zpravidla dochází u barevných vzorků. K zesílení ale může dojít i v tzv. prerezonančním případě, kdy se v blízkosti excitační frekvence nachází nějaký elektronový přechod (absorpční pás). Hranice mezi rezonancí a prerezonancí není nijak



Obr. 5. SEROA spektra 2-merkaptopyrimidinu na stříbrných koloidech za přítomnosti D- a L-vinné kyseliny, podle cit.<sup>21</sup>



Obr. 6. Zjednodušené schéma ROA experimentů. V případě prerezonance je signál větší, v rezonančním případě často převládá jedno znaménko.  $h\omega$  je excitační energie laseru

dána, intenzita Ramanova signálu může vzrůst jen o trochu, nebo až  $1000\times$  (obr. 6).

Ještě zajímavější je, že také CID, poměr ROA a Ramanových intenzit, se zpravidla v rezonanci zvětší. Můžeme si to představit tak, že onen elektronový rezonující stav „předá“ svoji chiralitu (elektrický a magnetický moment) molekulové polarizovatelnosti, na které ROA intenzita závisí. V případě tzv. limitní rezonance s jedním elektronovým stavem (single electronic state, SES)<sup>48</sup> dokonce často dochází k tomu, že CID je úměrný poměru elektronového cirkulárního dichroismu a absorpce pro vlnovou délku excitačního záření. Tvary ROA a Ramanových spekter jsou pak až na eventuelní opačné znaménko identické.

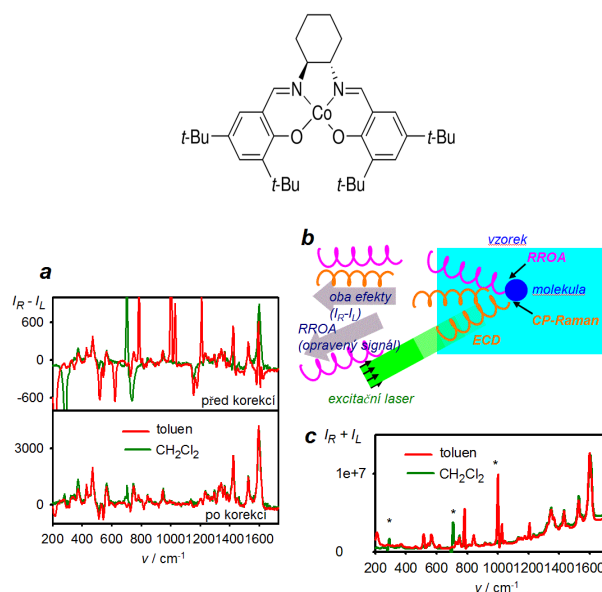
Jednoznaménková ROA, opačná než ECD, se často považuje za indikátor rezonance. Není to úplně přesné, ale např. v tzv. ROA indukované agregací (AIROA, aggregation induced ROA) to u karotenoidů a odvozených barviv funguje velice dobře. Molekuly karotenoidů jsou přibližně symetrické, a tedy nepřiliš chirální, a jejich ROA spektra v roztoku jsou až neměřitelně slabá. Za jistých podmínek, např. když vzroste polarita rozpouštědla, agregují, jejich absorpční pás se posune „do rezonance“ s excitačním zářením, a objeví se silný jednoznaménkový ROA signál<sup>49</sup>.

Mnoho experimentátorů se nicméně absorbujícím vzorkům raději vyhnulo. Vzorky se mohou neúměrně zahřívát, rozkládat, a fluorescence může přehlušit Ramanův a tedy i ROA signál. Neméně nepříjemné bylo to, že se při zaznamenávání ROA spekter často objevovaly zvláštní jevy. V roce 2019 jsme s prof. Y. Xu (Edmonton) publikovali studii, kde u roztoků barevného niklového komplexu byly vidět i ROA pásy nechirálních rozpouštědel<sup>50</sup>. Tento „nevysvětlitelný“ úkaz jsme přičklí tomu, že komplex polarizuje rozpouštědla ve svém okolí a předává jim tak svou chiralitu.

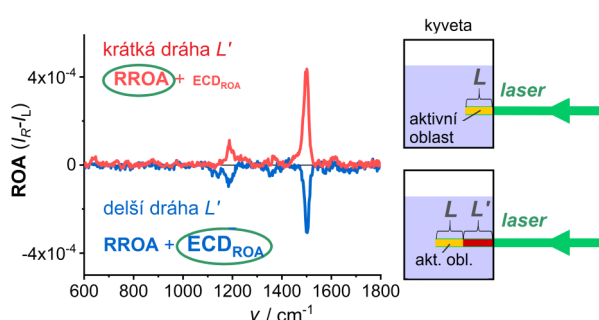
Tato teorie se sice ukázala jako v mnohém nesprávná, ale již po roce nás přivedla ke skutečné příčině: cirkulárnímu dichroismu<sup>31</sup>. ECD, rozdílná absorpce levo- a pravoto-

čivě polarizovaného světla, u absorbujících vzorků způsobí, že excitující laserové záření je mírně kruhově polarizované. To se účastní Ramanova rozptylu. Přitom se jeho polarizace mění, ale obecně zůstává nenulová. Rozptýlený Ramanův paprsek je také modifikován, pokud vzorek vykazuje cirkulární dichroismus i pro příslušné vlnové délky. Výsledné ROA spektrum, rozdíl intenzit pravo- a levotočivé polarizace, obsahuje tedy dvě složky: „skutečnou“ rezonanční vibrační ROA chirální molekuly a signál pramenící z kombinace ECD a polarizovaného Ramanova rozptylu („ECD-Raman“). Dobrou zprávou ale je, že při znalosti ECD a absorpčních spekter se dají obě složky separovat (obr. 7, cit.<sup>51</sup>). Tím se otevírá možnost měřit „skutečnou“ molekulární ROA v rezonanci.

ECD-Raman složku v totálním signálu měřeném na ROA spektrometru můžeme považovat za nežádoucí artefakt, ale i za způsob, jak alternativně zaznamenat cirkulární dichroismus molekul. Druhou možností se např. zabývala studie věnovaná komplexačním vlastnostem a přenosu chiralitu u komplexu vanadu<sup>52</sup>. Pro praktické použití je dobré uvědomit si, že u ECD-Ramanova efektu je poměr CID (na rozdíl od pravé ROA nebo RROA) závislý na koncentraci a délce kyvety, resp. optické dráze excitačního a rozptýleného paprsku. Zaostríme-li laser na přední stěnu kyvety (při zpětném rozptylu), tj. minimalizujeme-li optickou dráhu, ECD-Ramanova složka téměř vymizí, atd. Při studiu kobaltaminů, derivátů vitamínu B<sub>12</sub>, některé látky dokonce vykazovaly opačné znaménka ROA a ECD-



Obr. 7. Měření chirálního kobaltového komplexu<sup>51</sup>. a) ROA získaná ve dvou rozpouštědlech, před a po korekci na ECD. Nekorigovaná spektra obsahují pásy rozpouštědel, po korekci získáme vibrační ROA vlastního komplexu. b) kombinace ECD, RROA a Ramanova rozptylu kruhově polarizovaného záření při měření barevných vzorků, c) Ramanova spektra



Obr. 8. ROA spektrum derivátu kobaltaminu závislé na poloze kyvety, podle cit.<sup>53</sup>. Optickou dráhu můžeme zhruba rozdělit na část odkud se sbírá Ramanův signál ( $L$ ) a část, kde dochází k cirkulárnímu dichroismu ( $L'$ )<sup>53</sup>

Ramanových pásů. Výsledné znaménko se pak dalo ladit posouváním vzorku (obr. 8)<sup>53</sup>.

## 7. Cirkulárně polarizovaná luminiscence

Pokud tedy přijmeme myšlenku, že každý signál získaný na ROA spektrometru nemusí nutně souviset s molekulární vibrační ROA, nepřekvapí nás, že tak můžeme měřit i cirkulárně-polarizovanou luminiscenci (CPL) molekul. Z praktického hlediska se měření CPL na ROA nebo konvenčním CPL spektrometru liší. ROA spektrometr poskytuje silnější excitační záření, a tak je možné zaznamenat slabé luminiscenční signály, jinak neměřitelné. Také díky propracované detekci kruhově-polarizovaných složek záření je možné zaznamenat CPL s velmi malým CID poměrem. Na druhé straně, interval vlnových délek detegovaných na ROA spektrometrech je omezený a excitační frekvence je fixní. U spektrometru firmy Biotoools s excitační délkou 532 nm je rozsah Ramanových frekvencí zhruba 200–2400  $\text{cm}^{-1}$ , což odpovídá 507–610 nm.

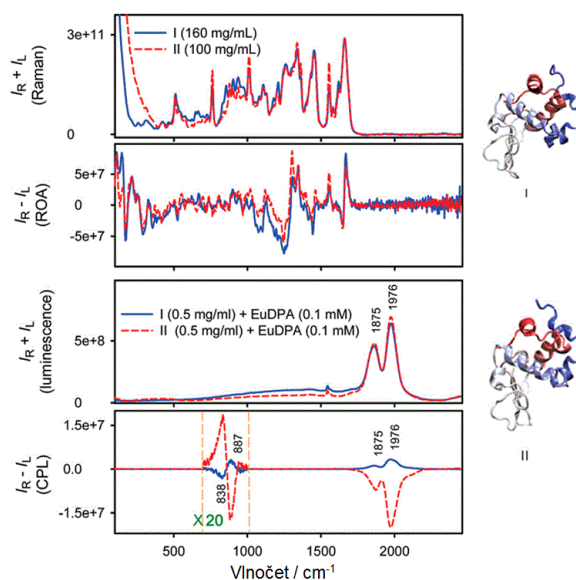
Podobně jako u ECD-Ramanova efektu, v prvotních studiích byly CPL a (skutečné) ROA pásy zaměřovány. Typickým příkladem jsou lanthanové komplexy, např. obsahující europium. U těch se totiž předpokládalo, že dojde k rezonančnímu zesílení, a tak luminiscence, která je zpravidla silnější než Ramanova intenzita, nezbudila podezření<sup>54</sup>. CPL a ROA pásy však lze ve spektru celkem dobře odlišit. Pokud je možné získat alespoň Ramanova spektra při různých excitačních vlnových délkách, pravé Ramanovy a ROA pásy „zůstanou na místě“, tj. jejich Ramanův posun odpovídající vibračním frekvencím se v Ramanově spektru nemění. CPL pásy zase „zůstanou na místě“ pokud jde o absolutní vlnovou délku, ale rozdíly vzhledem k různým excitačním délkám budou jiné, a tedy dojde k jejich posunu v Ramanově spektru. Jinou možností je měření tzv. stupně cirkularity (degree of circularity, DOC), který zjednodušeně řečeno říká, jak moc si molekula pamatuje polarizaci budícího záření. Měření je velmi

rychlé, srovnatelné s měřením Ramanova spektra. Zatímco pro molekulární ROA je DOC řádově jedna, pro CPL je DOC rovné nule.

Na možnost měření CPL pomocí ROA spektrometru jsme upozornili v případě komplexu obsahujícího cesium a europium<sup>30</sup>. Ten byl zajímavý ještě neobyčejně vysokým poměrem CID, blízkým jedné. Molekula tak velice efektivně konvertuje jakékoliv záření do kruhově polarizovaného. I u jiných případů jsou hodnoty CID u CPL zpravidla vyšší než u ROA, což je dáno rozdílnou fyzikální podstatou obou jevů. Naplno se výhoda měření CPL na ROA spektrometru projevila v případě indukované chiralidy lanthanových komplexů. Ty v rozsahu měřitelných vlností poskytují mnoho luminiscenčních pásů, na rozdíl od běžnějších organických luminoforů dobře rozlišitelných, s malou šířkou. Indukovaná CPL spektra jsou také neobyčejně citlivá<sup>55,56</sup> na okolí, čehož lze využít k detekci molekul, jako jsou cukry nebo nukleové kyseliny. Srovnání ROA/Ramanových spekter dvou proteinů a CPL/luminiscenčních signálů komplexu  $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]^{3-}$  v jejich přítomnosti je na obr. 9 (DPA je kyselina dipikolinová, pyridin-2,6-dikarboxylová). Ačkoliv se oba proteiny příliš neliší, rozdíly jsou patrné ve všech spektrech a nejvíce v indukované CPL.

## 8. Závěr

Ramanova optická aktivita je velice flexibilní metoda, poskytující unikátní informace o studovaných molekulách. Interpretace spekter je z velké části založená na



Obr. 9. Ramanova a ROA spektra lidského (I) a slepičího (II) lysozymu, a luminiscenční a CPL spektra komplexu  $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]^{3-}$  měřená za jejich přítomnosti, vpravo struktura obou bílkovin, podle cit.<sup>57</sup>



kvantově-chemických simulacích. Jak jsme se pokusili ukázat na uvedených příkladech, ROA je zpravidla používána ke konformačním studiím transparentních roztoků chirálních látek. V poslední době se také objevilo několik variací této techniky, každá přináší mnohé obtíže, ale také nové možnosti umožňující nám lépe pochopit svět molekul a jejich interakce se světlem.

## Seznam zkratek

CPL	circular polarized luminescence, cirkulárně polarizované luminiscence
CID	circular intensity difference, poměr ROA a Ramanova signálu
DOC	degree of circularity, stupeň cirkularity
DPA	dipikolinová kyselina
ECD/VCD/MCD	elektronový/vibrační-magnetický cirkulární dichroismus
ICP/SCP/DCP	incident/scattered/dual circular polarization, cirkulární polarizace na vstupu/výstupu/duální
MD	molekulová dynamika
NMR	nukleární magnetická rezonance
ORD	optická rotační disperze
ROA	Ramanova optická aktivita
AIROA	aggregation-induced ROA, ROA indukovaná agregací
RROA	rezonanční ROA
SEROA	surface-enhanced ROA, povrchově zesílená ROA
VOA	vibrační optická aktivita

## LITERATURA

- Raman C. V.: *Indian J. Phys.* 2, 387 (1928).
- Raman C. V.: *Nature* 121, 619 (1928).
- Bhagavantam S., Venkateswaran S.: *Nature* 125, 237 (1930).
- Kastler A.: *Comp. Rend.* 191, 565 (1930).
- Perrin F.: *J. Chem. Phys.* 10, 415 (1942).
- Atkins P. W., Barron L. D.: *Mol. Phys.* 16, 453 (1969).
- Barron L. D., Buckingham A. D.: *Mol. Phys.* 20, 1111 (1971).
- Bosnich B., Moskovits M., Ozin G. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4750 (1971).
- Diem M., Fry J. L., Burrow D. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 253 (1973).
- Barron L. D., Bogaard M. P., Buckingham A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 603 (1973).
- Barron L. D., Hecht L., McColl I. H., Blanch E. W.: *Mol. Phys.* 102, 731 (2004).
- Nafie L.: *Vibrational optical activity: Principles and applications*. Wiley, Chichester 2011.
- Hecht L., Barron L. D., Gargaro A. R., Wen Z. Q., Hug W.: *J. Raman Spectrosc.* 23, 401 (1992).
- Bouř P., Baumruk V., Hanzlíková J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 1384 (1997).
- Tatarkovič M., Synytsya A., Šťovíčková L., Bunganič B., Miškovcová M., Petruželka L., Setnička V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1335 (2014).
- Buděšínský M., Daněček P., Bednářová L., Kapitán J., Baumruk V., Bouř P.: *J. Phys. Chem. A* 112, 8633 (2008).
- Michal P., Čelechovský R., Dudka M., Kapitán J., Vůjtek M., Berešová M., Šebestík J., Thangavel K., Bouř P.: *J. Phys. Chem. B* 123, 2147 (2019).
- Polavarapu P. L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4544 (2002).
- Haesler J., Schindelholz I., Riguet E., Bochet C. G., Hug W.: *Nature* 446, 526 (2007).
- Osinska K., Pecul M., Kudelski A.: *Chem. Phys. Lett.* 496, 86 (2010).
- Das M., Gangopadhyay D., Šebestík J., Habartová L., Michal P., Kapitán J., Bouř P.: *Chem. Commun.* 57, 6388 (2021).
- Zajac G., Kaczor A., Zazo A. P., Mlynarski J., Dudek M., Baranska M.: *J. Phys. Chem. B* 120, 4028 (2016).
- Šebestík J., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 9236 (2014).
- Šebestík J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 498 (2011).
- Merten C., Li H., Nafie L. A.: *J. Phys. Chem. A* 116, 7329 (2012).
- Kapitán J., Barron L. D., Hecht L.: *J. Raman Spectrosc.* 46, 392 (2015).
- Fujisawa T., Leverenz R. L., Nagamine M., Kerfeld C. A., Unno M.: *J. Am. Chem. Soc.* 139, 10456 (2017).
- Michal P., Hudecová J., Čelechovský R., Vůjtek M., Dudka M., Kapitán J.: *Symmetry* 14, 990 (2022).
- Habartová L., Bunganič B., Tatarkovič M., Zavoral M., Vondroušová J., Syslová K., Setnička V.: *Chirality* 30, 581 (2018).
- Wu T., Kapitán J., Mašek V., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 14933 (2015).
- Wu T., Li G., Kapitán J., Kessler J., Xu Y., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 21895 (2020).
- Ashton L., Barron L. D., Hecht L., Hyde J., Blanch E. W.: *Analyst* 132, 468 (2007).
- Helgaker T., Ruud K., Bak K. L., Joergensen P., Olsen J.: *Faraday Discuss.* 99, 165 (1994).
- Ruud K., Helgaker T., Bouř P.: *J. Phys. Chem. A* 106, 7448 (2002).
- Kessler J., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 3314 (2015).
- Keiderling T. A.: *Chem. Rev.* 120, 3381 (2020).
- Frisch M. a 73 spoluautorů, *Gaussian16*, Wallingford, CT 2016.
- Yamamoto S., Watarai H., Bouř P.: *ChemPhysChem* 12, 1509 (2011).
- Bouř P., Sopková J., Bednářová L., Maloň P., Keiderling T. A.: *J. Comput. Chem.* 18, 646 (1997).

40. Jungwirth J., Šebestík J., Šafařík M., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. B* 121, 8956 (2017).
41. Schrenková V., Para Kkadan M. S., Kessler J., Kapitán J., Bouř P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 25, 8198 (2023).
42. Crawford T. D., Ruud K.: *ChemPhysChem* 12, 3442 (2011).
43. Šebestík J., Kapitán J., Pačes O., Bouř P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 3504 (2016).
44. Le Ru F. C., Etchegoin P. G.: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63, 65 (2012).
45. Novák V., Šebestík J., Bouř P.: *J. Chem. Theory Comput.* 8, 1714 (2012).
46. Etchegoin P. G., Galloway C., Le Ru E. C.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8, 2624 (2006).
47. Kneipp H., Kneipp J., Kneipp K.: *Anal. Chem.* 78, 1363 (2006).
48. Nafie L. A.: *Chem. Phys.* 205, 309 (1996).
49. Dudek M., Zajac G., Kaczor A., Baranska M.: *J. Phys. Chem. B* 120, 7807 (2016).
50. Li G., Kessler J., Cheramy J., Wu T., Poopari M. R., Bouř P., Xu Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 16495 (2019).
51. Wu T., Kapitán J., Bouř P.: *J. Phys. Chem. Lett.* 13, 3873 (2022).
52. Machalska E., Hachlica N., Zajac G., Carraro D., Baranska M., Licini G., Bouř P., Zonta C., Kaczor A.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23, 23336 (2021).
53. Machalska E., Zajac G., Wierzba A. J., Kapitán J., Andruniów T., Spiegel M., Gryko D., Bouř P., Baranska M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 21205 (2021).
54. Merten C., Li H., Lu X., Hartwiga A., Nafie L. A.: *J. Raman Spectrosc.* 41, 1563 (2010).
55. Wu T., Průša J., Kessler J., Dračínský M., Valenta J., Bouř P.: *Anal. Chem.* 88, 8878 (2016).
56. Wu T., Bouř P., Andrushchenko V.: *Sci. Rep.* 9, 1068 (2019).
57. Wu T., Kessler J., Bouř P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 23803 (2016).
58. Lombardi R. A., Nafie L. A.: *Chirality* 21, E277 (2009).
59. Holzwarth G., Hsu E. C., Mosher H. S., Faulkner T. R., Moscowitz A.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, 251 (1974).
60. Hug W., Hangartner G.: *J. Raman Spectrosc.* 30, 841 (1999).
61. Devine T. R., Keiderling T. A.: *J. Phys. Chem.* 88, 390 (1984).
62. Keiderling T. A., Bouř P.: *Phys. Rev. Lett.* 121, 073201 (2018).
63. Barron L. D., Vrbancich J.: *J. Raman Spectrosc.* 14, 118 (1983).
64. Barron L. D.: *Nature* 257, 372 (1975).

**P. Bouř** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Variability of the Raman Optical Activity Spectroscopy**

Spectroscopy of Raman optical activity (ROA) is rather rare because of its experimental demands and difficult interpretation of the spectra. Yet it is further developing and in the last decade we witnessed significant improvement of the experimental and theoretical methods. This brought about new knowledge regarding structure and behavior of molecules, and their interactions with light. We give a brief summary of the experience we and others obtained with this method. It appears that ROA spectroscopy gives unique information about molecules, suitable for determination of the absolute configurations, but also for studies of conformations and electronic structure.

**Keywords:** Raman optical activity, resonance, circularly-polarized luminescence, spectra simulations



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.