

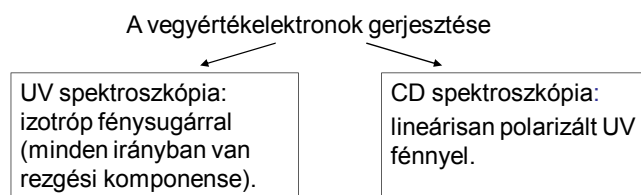
KIROPTIKAI SPEKTROSKÓPIA

optikailag aktív anyagok vizsgálata

CD: cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

ORD: optikai rotációs diszperzió

A **e-CD spektroszkópia** az UV spektroszkópia egyik speciális formája, kiroptikai változata.



Az **Optikai Rotációs Diszperzió** az optikai forgatóképesség változása a hullámhossz függvényében $\alpha = f(\lambda)$. Amennyiben az optikai forgatást a teljes UV ill. látható hullámhossz tartományban meghatározzuk, akkor az optikai rotációs diszperzió spektrumot nyerjük.

Optikailag aktív anyag

Az **optikai aktivitás** makroszkópikus anyagi sajátosság. Optikailag aktív anyagon lineárisan polarizált fényt átbocsátva a minta a polarizált fény síkját elforgatja.

Az **optikai forgatóképesség** a molekulák térszerkezetével, valamint kiralitásával kapcsolatos.

Kiralitás a molekulák jellemzője. Királis molekulák: nem hozhatók fedésbe tükörképi párjukkal. Nem rendelkeznek sem szimmetriasíkkal (jele: σ), sem szimmetriacentrummal (i). Forgási szimmetria (C_n) megengedett.

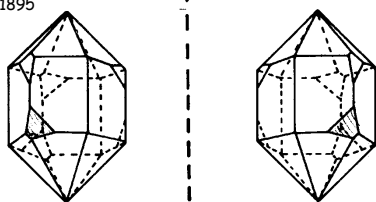
Enantiomerek: azonos energiájú (?) tükörképi párok (biológiai aktivitásuk különböző lehet).

Az enantiomereket forgatóképességük irányával különböztethetjük meg, amit a vegyület neve elé zárójelbe tett (+) vagy (-) előjellel fejezünk ki. A jobbra forgató vegyületek (+), balra forgatóak (-) előjelet kaptak.

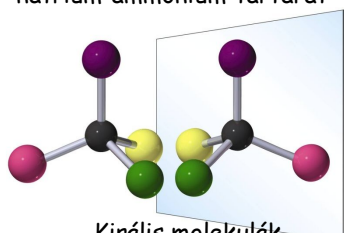
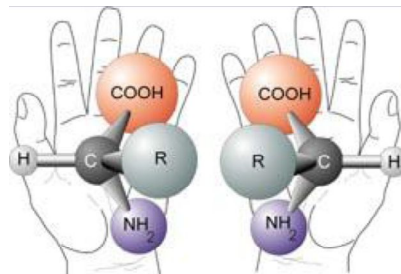


L. Pasteur
1822-1895

Kiralitás

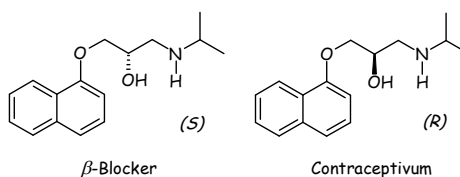


Enantiomorf kristályok
nátrium-ammonium-tartarát



Királis molekulák

Propanolol



(enantiomerek, kiralitás centrum)

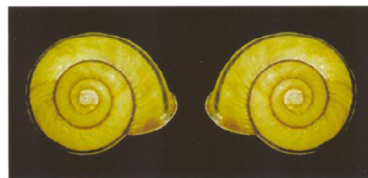
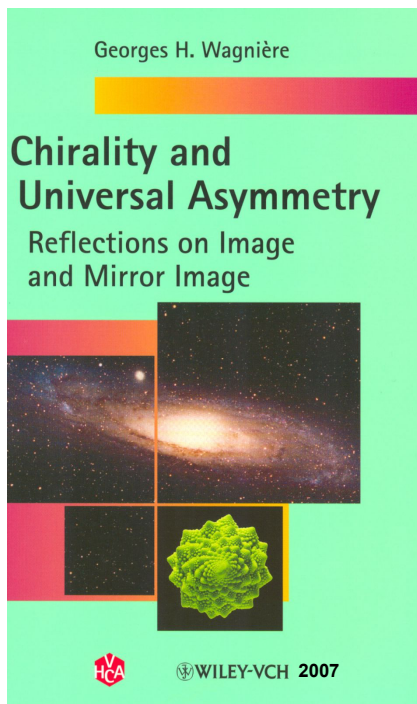
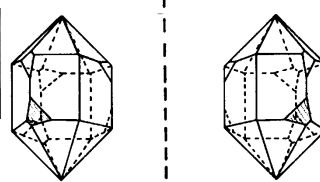


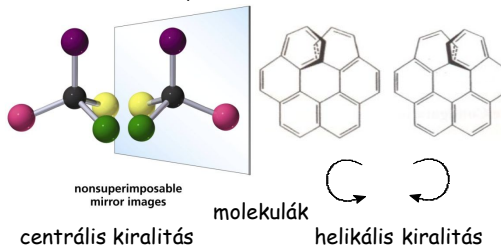
Fig. 10.6. Enantiomorphous forms of the shell of the land snail Euhadra



L. Pasteur
1822-1895



Enantiomorf kristályok: nátrium-ammonium-tartarát



nonsuperimposable
mirror images

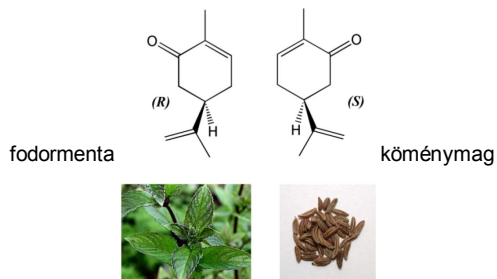
molekulák

centrális kiralitás

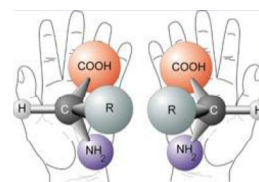
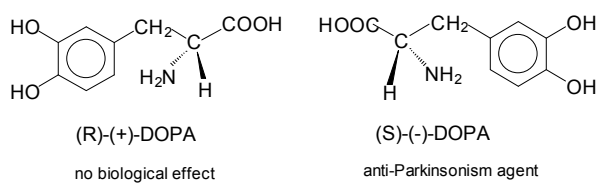
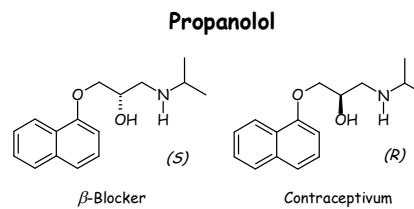
helikális kiralitás

Enantiomerek eltérő biológiai hatása

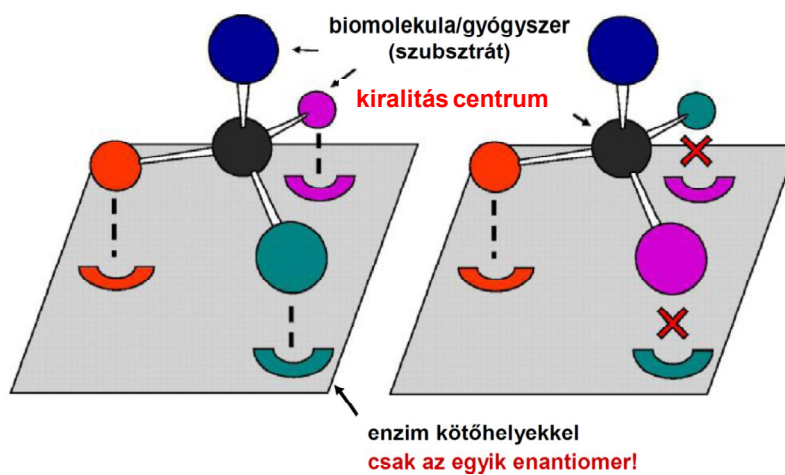
Különböző illat: karvon



Különböző biológiai hatás:

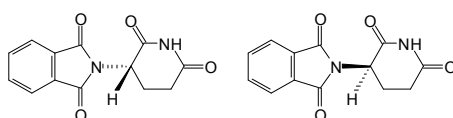


Királis felismerés



Contergan botrány

Az 1950-es évek végén számtalan édesanya szedte az 1957-ben forgalomba hozott szert, hogy enyhítse a terhessége első hónapjaiban jelentkező reggeli rosszulléteket. Mintegy 10 ezer gyermek jött világra fejlődési rendellenességgel, eltorzult, számos esetben ki sem alakult végtagokkal. A születési rendellenesség eredetét csak jóval később vezették vissza a nyugtatószer szedésére. 50 évvel később az Aberdeeni Egyetem kutatócsoportja (Neil Vargesson) oldotta meg a talányt, megállapítva, hogy a **Contergan** tableta (Grünenthal GmbH) hatóanyaga (**Thalidomide: α -ftálimido-glutárimid**) megakadályozta új erek növekedését a fejlődő magzatban. Kimutatták, hogy a nyugtatót a nők terhességük korai szakaszában - főleg az ötödik és kilencedik hét között - szedték a rosszulléteik enyhítésére. Ez az időszak különösen fontos, mivel ekkor fejlődnek ki a magzat végtagjai.



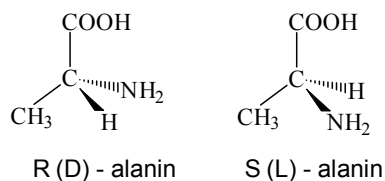
S teratogén R hatékony sedatívé
 α -ftálimido-glutárimid



Centrális királitás

A molekulák királisak, ha **egy centrális atomhoz kapcsolódó szubsztituensek kapcsolódási sorrendje eltérő**. Az enantiomerek közötti fedő állapot csak a kötések felhasításával, pl. két szubsztituens felcserélésével valósítható meg

Centrális királitás esetén a molekulák nevét R (a latin rectus = jobb – jobbra forgató), ill. S (sinister = bal) jellel egészítjük ki. A régebbi irodalom D és L előtagot használt.

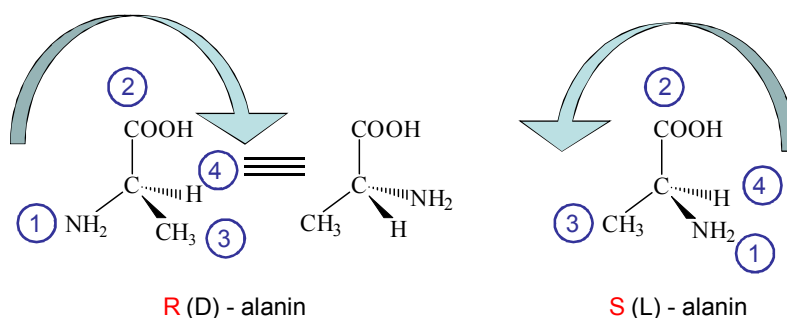


Helikális királitás

A jobbcavarodású azaz jobbmenetes molekulák R-, míg a balcsavarodású molekulák S-konfigurációjúak.

Abszolút konfiguráció meghatározása

1. A kiralitás centrumhoz kapcsolódó atomokat rendszámuk szerint rangsoroljuk (a legnagyobb rendszámú kapja az 1-es sorszámot), az azonos rendszámú atomok közül a nagyobb atomtömegű izotóp kapja a kisebb sorszámot. $^1\text{H} < ^2\text{H} < \text{T} < \text{Li} < \text{C} < \text{N} < \text{O} < \text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{J}$.
2. Amennyiben azonos rendszámú atomok kapcsolódnak a kiralitás centrumhoz, akkor a hozzájuk kapcsolódó atomok rendszáma a meghatározó.
3. A ligandumok koordinációs számát mindig négyre egészítjük ki. Ezt a kettős és a hármas kötésekben résztvevő atomok megkétszerezésével, ill. háromszorozásával érhetjük el. pl. a $-\text{CH}_2\text{OH} < -\text{CHO} < -\text{COOH}$
4. Ha a centrális atomot a legkisebb rangú ligandummal összekapcsoló kötés irányában nézzük úgy, hogy ez utóbbi legyen tőlünk a legtávolabb, akkor a kapcsolódó atomok sorszáma R-konfiguráció esetén az óramutató járásának megfelelően növekszik, S-konfigurációnál a növekedési sorrend az óramutató járásával ellentétes.



Mit szólnak ehhez a fizikusok (2008 fizikai Nobel-díj) ?



Fizikai Nobel-díj érme

Fizikai Nobel-díj 2008

Joichiro Nambu
(E. Fermi Inst)

„a szubatomi fizika
spontán szimmet-
riasértésének
felfedezéséért”

Makoto Kobayashi
(KEK, Tsukuba)

„a sérült szimmetria felfedezéséért,
mely legalább három kvarkcsalád
létezését jósolja”

Toshihide Masakawa
(Kyoto University)

Szimmetriasértés (Parity Violation)

Ismeretes, hogy a fundamentális, azaz **elemi részecskék** töltésszimmetrikusak, s ilyen értelemben királisak, ugyanis léteznek az **anti-részecskék** is, melyek tömege azonos,

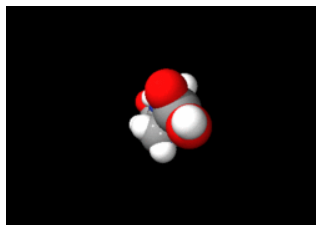
de töltésük ellentétes:
 proton p^+ - **anti-proton** p^-
 elektron e^- - **pozitron** e^+
 semlegesek
 neutron - **anti-neutron**
 3 kvark 3 anti-kvark
 stb. ...

Az **anti-részecskék** alkotják az **anti-anyag** világát, de ma azt még nem sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy ez valóban létezik vagy sem.

A **fotonok** a részecske/anti-részecske szempontjából nem különböznek, azonban két cirkulárisan polarizált komponensre bonthatóak, így ezek is **királisak**.

Az eddigiekből következik, hogy az elemi részecskékből felépülő molekula szükségszerűen királis! Mindez azt jelenti, hogy minden molekula még a CH_4 is királis.

A mi világunkban „igazi” enantiomerek nem léteznek!

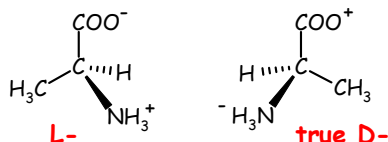


L- és D-alanin nem enantiomerek, hanem diasztereomerek, azaz energetikailag eltérőek! (pseudo-enantiomer)

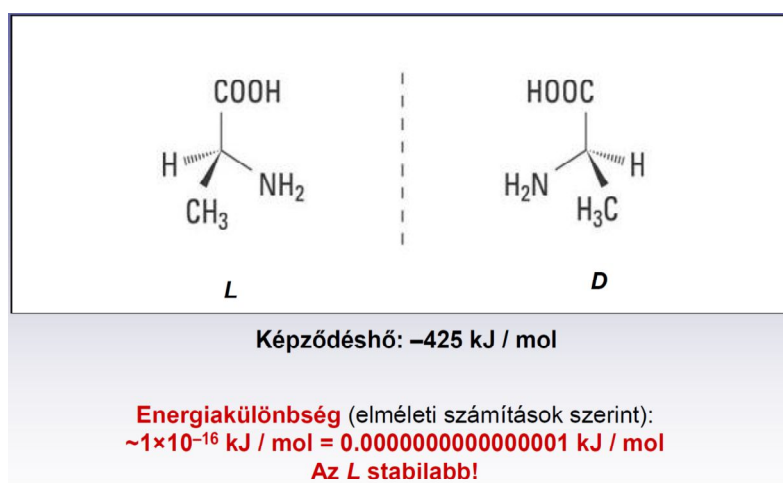
Az igazi D-alanin enantiomer *anti-proton*, *anti-neutron* és *pozitron*ból

részecskékből épül fel!

Ez azt eredményezi, hogy a karboxil- pozitív az ammonium pedig negatív töltésű!!!



Energiakülönbség a paritásértés miatt

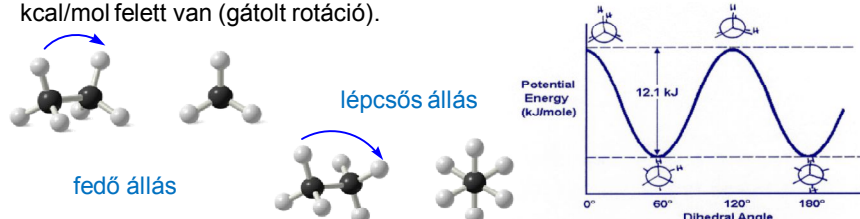


Parity Violation Energy Difference (PVED) értéke a mai mérés határ alatt!

Konfiguráció, konformáció és térszerkezet

Konfiguráció: egy atomhoz közvetlenül kapcsolódó atomok vagy atomcsoportok relatív helyzete. Azonos konstitúciójú, de különböző konfigurációjú molekulák egymásba nem vihetők át, az ilyen molekulák *szétválaszthatók*.

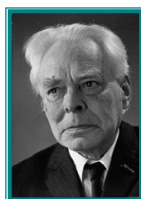
Konformáció: közvetlenül nem kapcsolódó atomok vagy atomcsoportok relatív helyzete a molekulában. A konformerek az egyes kötések mentén történő elfordulás során alakulnak ki (energiaminimumok), egyszeres kötések körüli forgással egymásba átalakulhatnak. Az egyes konformerek csak abban a *speciális esetben választhatók szét*, ha a köztük lévő potenciál gát nagysága 25 kcal/mol felett van (gátolt rotáció).



Térszerkezet: a molekulák térszerkezetét azok konfigurációja és konformációja együttesen szabják meg. A térszerkezet leírásakor figyelembe kell vennünk azt is, hogy az adott állapotban mennyi ideig marad a molekula, vagyis a molekulák dinamikáját is vizsgálni kell.

Absz. konfiguráció meghatározásának módszerei:

1. Anomalous x-ray diffraction (Resonant Scattering)



Bijvoet híres közleménye:
Nature 1951, 168, 271-272

Johannes Martin Bijvoet
(* 1892 Amsterdam; † 1980 Winterwijk)

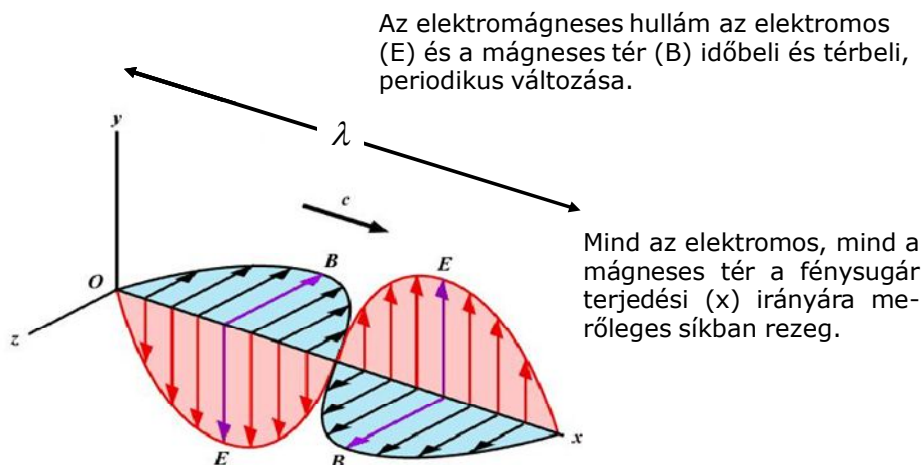
DETERMINATION OF THE
ABSOLUTE CONFIGURATION OF
OPTICALLY ACTIVE COMPOUNDS
BY MEANS OF X-RAYS
By Prof. J. M. BIJVOET, A. F. PEERDEMAN
AND
A. J. van BOMMEL
van 't Hoff Laboratory, University of Utrecht

Vajon miért nem kapott Nobel Díjat ?



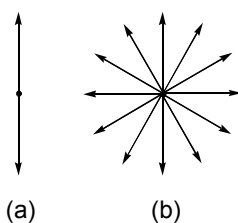
2. Kiroptikai spektroszkópiai módszerek: ORD, e-CD, v-CD, ROA

Elektromágneses hullám

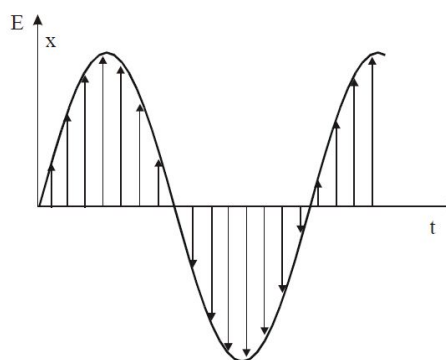


Lineárisan polarizált fény

A fény elektromágneses sugárzás, mely terjedése során az elektromos és a mágneses térerősség egymásra merőlegesen, hullámszerűen oszcillál. A **kiroptikai spektroszkópia tárgyalásánál csak az elektromos térerősséggel (E) foglalkozunk.**

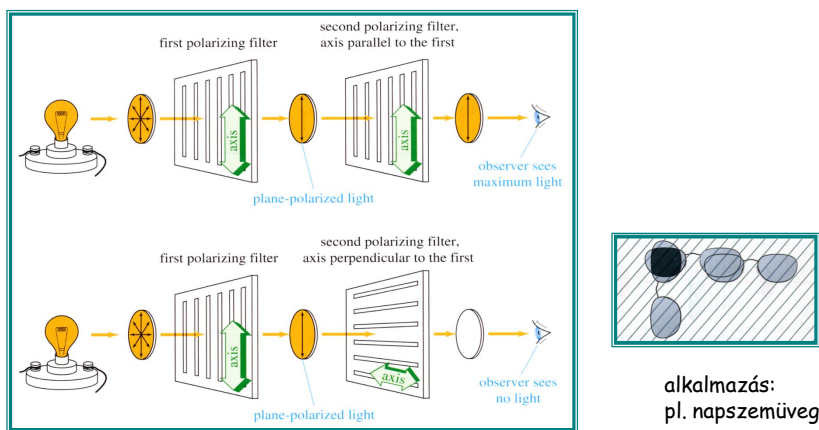


A lineárisan polarizált fénynek (a) csak egy síkban van rezgési komponense, szemben az UV spektroszkópiában használt fényvel, amely minden irányban rezeg (b)



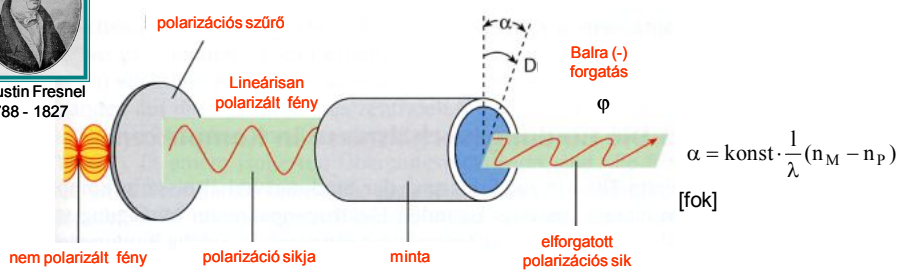
A lineárisan polarizált fény elektromos térerősségének (E) változása egy adott helyen az idő (t) függvényében (x : amplitúdó).

lineárisan polarizált fény előállítása



Augustin Fresnel
1788 - 1827

Optikai forgatás mérése: polariméter

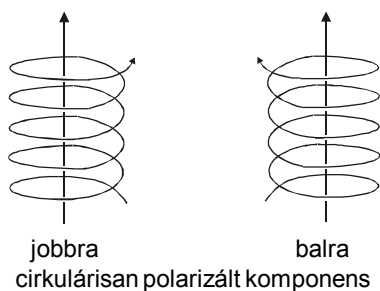


Fajlagos forgatás (Biot's law 1812)
$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad [10^{-1} \text{ fok} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}]$$
 l: küvetta hossza [dm]
c: koncentráció [g/ml]

Moláris forgatás
$$[\Phi]_{\lambda}^T = \frac{[\alpha]_{\lambda}^T M}{100} \quad [10 \cdot \text{fok} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$$

A borhamisítás (cukrozás) kimutatható pl. a fajlagos forgatás mérése alapján, elég figyelembe venni vízben 20°C-on a nátrium D-vonalán (589 nm) mért fajlagos forgatási értékeket :
 α -D-glukóz : +112.2°, β -D-glukóz: +17.5°, D-glukóz (mutarotációs egyensúlyban): +52.7°,
 répacukor (szacharoz): +66.4°

Lineárisan polarizált fény két (egy jobbra és egy balra forgó) körkülárisan polarizált komponensre bontható.

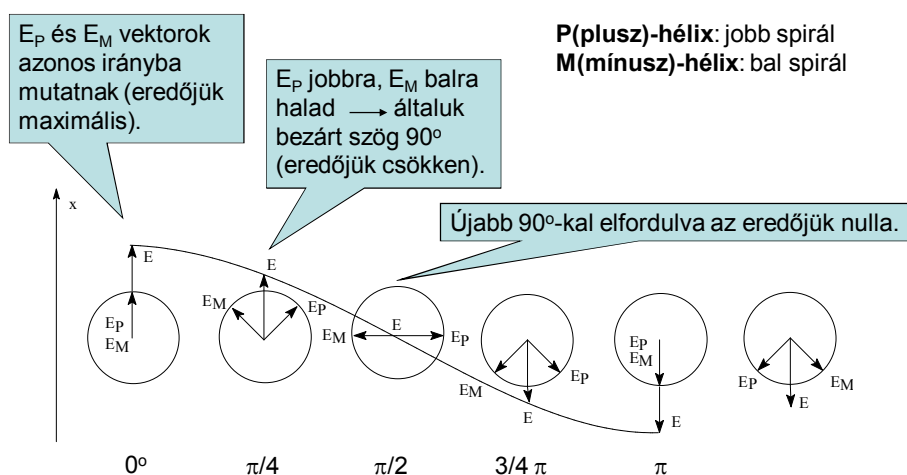


A körkülárisan polarizált fény „dugóhúzószerűen” spirális pálya mentén halad, iránya folyamatosan változik, rezgési amplitúdója azonban állandó. A helikális elmozdulás során forgás és egyenes mentén történő előrehaladás egyszerre történik.

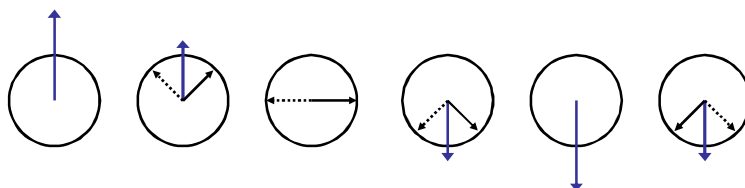
P(plusz)-hélix: jobb spirál, az óramutató járásával megegyező és távolodó lineáris elmozdulás.

M(mínusz)-hélix: bal spirál, az óramutató járásával ellentétes és távolodó körküláris pálya.

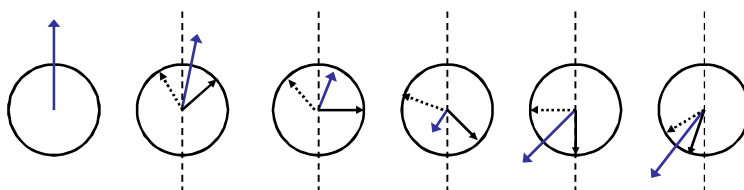
Lineárisan polarizált fény áthaladása izotróp közegben



Lineárisan polarizált fény áthaladása izotróp közegen



és anizotróp közegen



A különböző áthaladási sebesség forgatást (az eredő vektor irányának megváltozását) eredményezi.

Optikai forgatás

Optikailag aktív közegbe kerülve a lineárisan polarizált fény síkja elfordul. Ennek oka, hogy a **jobbra és a balra forgó fény különböző sebességgel halad** az optikailag aktív közegben, miután a fény és az anyag közt diasztereomer jellegű kölcsönhatás lép fel.

$$c_{\text{jobb}} \neq c_{\text{bal}}$$

Törésmutató a vákuumban és valamely más közegben mért fény sebességének az aránya.

$$n = \frac{c_{\text{vákuum}}}{c_{\text{közeg}}}$$

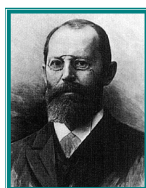
→ törésmutatójuk is különböző

$$n_{\text{jobb}} \neq n_{\text{bal}}$$

$c_{\text{bal}} < c_{\text{jobb}} \rightarrow n_{\text{bal}} > n_{\text{jobb}} \rightarrow \Delta n > 0$ Polarizációs irány az óramutató járásával megegyező irányba fordul el.
Az anyag jobbra forgat.

$c_{\text{bal}} > c_{\text{jobb}} \rightarrow n_{\text{bal}} < n_{\text{jobb}} \rightarrow \Delta n < 0$ Polarizációs irány az óramutató járásával ellenkező irányba fordul el.
Az anyag balra forgat.

A kiralitás változása a forgatás irányának megfordulásával jár együtt, így az enantiomerek megkülönböztethetők az optikai forgatásuk alapján, de nincs egyszerű, egyértelmű kapcsolat az optikai forgatás és az abszolút konfiguráció közt.



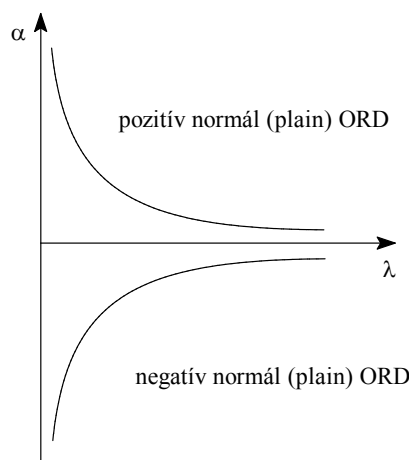
Emil Fischer feltételezte, hogy a jobbra forgató (Dextrorotatory) (+)-glicerinaldehid R konfigurációju. Ezzel ez a molekula vált a sztereokémia és kiralitás meghatározás kiindulópontjának. Később ezt a feltételezés kísérletileg is igazolták. (1852-1919, Berlin, Nobel díj 1902.)

Optikai rotációs diszperzió

Az optikai forgatóképesség változása a hullámhossz függvényében $\alpha = f(\lambda)$.

Amennyiben az optikai forgatást a teljes UV ill. látható hullámhossz tartományban meghatározzuk, akkor az ORD, azaz optikai rotációs diszperzió spektrumot nyerjük.

Az ORD görbe sima (plain) szakasza pozitív vagy negatív lefutású lehet a molekulaszervezet függvényében a spektrumok abszorpciós maximumától távoli λ -tartományban.



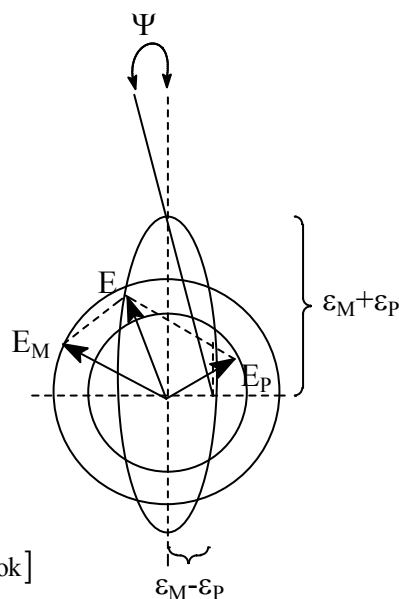
Cirkuláris dikroizmus

Az abszorpciós sáv λ_{\max} értékhez közeli hullámhosszknál a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált fényt különböző mértékben abszorbeálja az optikailag aktív közeg: $\Delta A = A_{\text{bal}} - A_{\text{jobb}}$, az ebből számítható megfelelő moláris mennyiség a $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$.

ΔA és $\Delta\varepsilon$ előjele pozitív és negatív is lehet; értéke nulla, ha az anyag akirális vagy racemát.

A két fény sugar vektorának nagysága eltérő, eredőjük a kiindulási síktól elfordul (Ψ) és egy ellipszist ír le. A Ψ ellipticitás és a $\Delta\varepsilon$ összefüggését az alábbi egyenlet adja meg:

$$\Psi = \text{konst} \cdot c \cdot l \cdot \Delta\varepsilon = \arctg \frac{\varepsilon_M - \varepsilon_P}{\varepsilon_M + \varepsilon_P} \quad [\text{fok}]$$



ORD- és CD-spektrumok

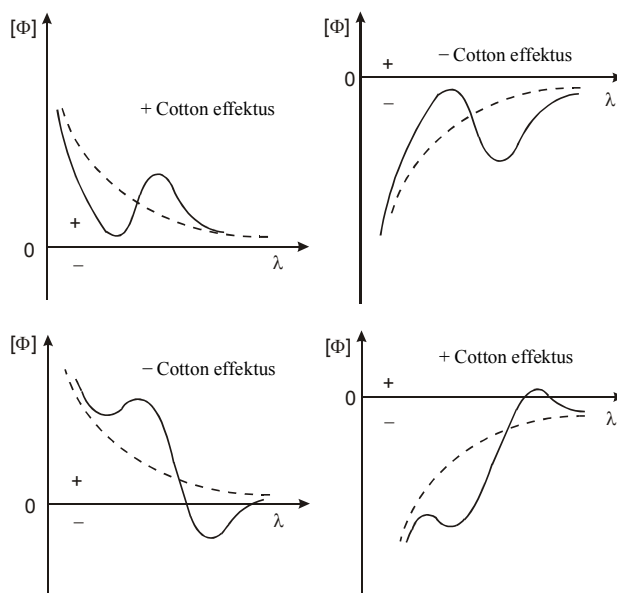
Az ORD- és CD-jelenség egymástól elkülönülten kezelhető, mivel λ_{\max} környezetében a forgatás (α) elhanyagolható, míg λ_{\max} -nál nagyobb és kisebb hullámhosszknál $\Delta\varepsilon$ hanyagolható el.

CD-spektrum: UV-VIS görbéhez hasonló alakú, de (+) és (-) is lehet, mivel a CD differenciaspektrum ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$).

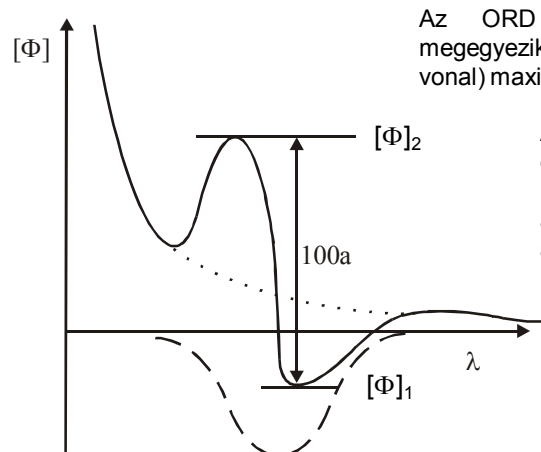
ORD-spektrum: λ_{\max} -tól távol „sima” hiperbolikus lefutású, (+) vagy (-). A vizsgált anyag UV maximumának közelében az eredeti görbére völgy/csúcs vagy csúcs/völgy görbe szuperponálódik. A cirkuláris dikroizmus és az optikai forgatás ilyen lefutását együttesen **Cotton-effektus**nak nevezzük.

Anomális ORD görbék

Pozitív Cotton-effektus esetén a növekvő hullámhosszak irányában előbb a völgy, majd a csúcs lép fel, **negatív Cotton-effektusnál** viszont a völgy található a nagyobb hullámhossznál.



ORD- és CD-spektrum viszonya



Az ORD görbe inflexiós pontja megegyezik a CD csúcs (szaggatott vonal) maximumának hullámhosszával.

Az ORD görbe maximuma és minimuma közötti különbség 1/100-ad része az a , a Cotton-effektus amplitúdója:

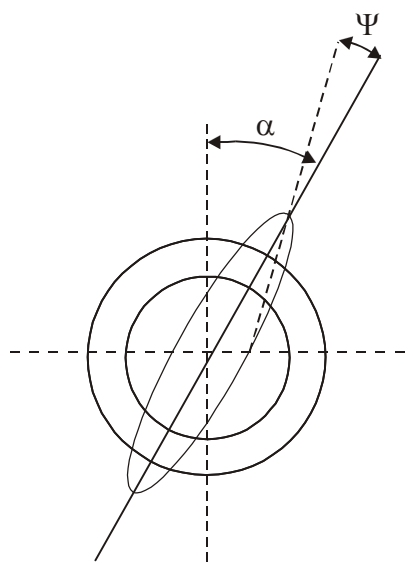
$$a = \frac{[\Phi_2] - [\Phi_1]}{100} \approx \Delta \epsilon_{\max}$$

Az ORD- és CD- spektrum egymásba átszámítható, az egyik a másik ismeretében megszerkeszthető.

Elliptikusan polarizált fény

A valóságban az abszorpciós sáv λ_{\max} értékéhez közeli hullámhosszaknál a jobbra és a balra forgó cirkulárisan polarizált fény különböző sebességgel halad és eltérő mértékben abszorbeálódik az optikailag aktív közegben. Ennek eredményeként a fény síkje elfordul és egyúttal elliptikusan polározottá válik.

A CD és az ORD-jelenséget együttesen szintén Cotton-effektusnak nevezik.



Rotátor erő

Adott elektronátmenet optikai aktivitásának (CD „megengedettségének”) mértéke az ún. rotátorerővel (R) jellemezhető:

(Rosenfeld egyenlet)
$$R = \vec{\mu} \cdot \vec{m} = |\mu||m| \cos(\mu m)$$

Ha a tömeggel és töltéssel rendelkező elektron gerjesztés hatására helikális pályán mozdul el, elektromos dipólus momentumot hoz létre. A helikális pályán haladó elektron mágneses momentummal is rendelkezik. Királis molekulában a helikális elektronátmenetet a két ellentétes irányban cirkulárisan polarizált fény nem azonos mértékben tudja kiváltani.

Ha $|\mu|$ vagy $|m|$ nulla, vagy ha a két vektor merőleges egymásra, akkor R értéke nulla.

Ha a két vektor által bezárt szög $0^\circ < (\mu m) < 90^\circ$ a Cotton-effektus pozitív, ha $90^\circ < (\mu m) < 180^\circ$ a Cotton-effektus negatív.

A CD sávnak a hullámhosszal redukált területe arányos a rotátorerővel:

$$R = \text{konst} \int \frac{\Delta \epsilon}{\lambda} d\lambda$$

Emlékeztető: összevetés az UV spektrummal (oszillátor erősség)

Abszorpció mértéke: **Integrált intenzitás** (jel alatti terület)

$$L = \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon_{\nu} d\nu \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$$

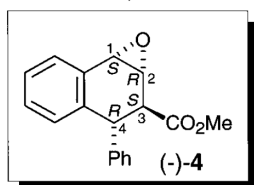
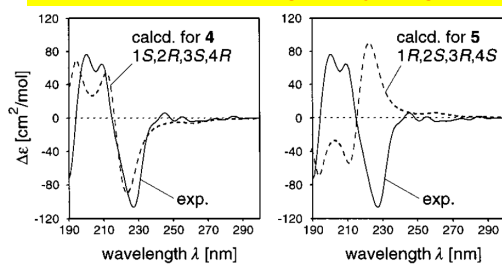
Elektrongerjesztés valószínűségének mértéke: **Oszillátor erősség**

↓ átmeneti elektromos dipólus momentum

$$f = \mu_{el}^2 = 3.3 \cdot 10^{-9} L = 3.3 \cdot 10^{-9} \int \epsilon_{\nu} d\nu$$

Elektronátmenet akkor megengedett, ha az átmeneti momentum (dipólerősség) nem nulla az adott átmenetre.

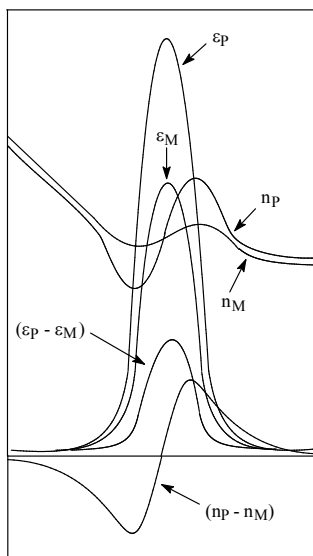
Molekuláris modellezéssel a molekula elektromos és mágneses momentuma szemiempirikus módszerekkel számítható, s ez alapján a térszerkezet ismeretében a CD görbe megszerkeszthető. A mért és számított CD spektrumokat összehasonlítva a molekula abszolút konfigurációja meghatározható!



the absolute configuration of the side product (-)-4

G. Tóth, A. Simon, T. Linker, F. Rebien, J. Kraus, G. Bringmann: Elucidation of the conformations and absolute configurations of enantiomerically pure tetralin derivatives, *Magn. Reson. Chem.* **37**, 53-59 (1999)

A jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény abszorpció és törésmutató különbsége izolált elektronátmenet idealizált esetére



Az UV-ben átfedő sávok itt jobban elkülönülnek, élesebbek és a rezgési finomszerkezet jobban megfigyelhető. A CD és az ORD spektrum egymásba átszámítható, az egyik a másik ismeretében megszerkeszthető. Az átszámítás a *Kronig-Kramers* egyenlet alapján oldható meg:

$$[\Phi_K(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} [\Theta_K(\lambda')] \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda'$$

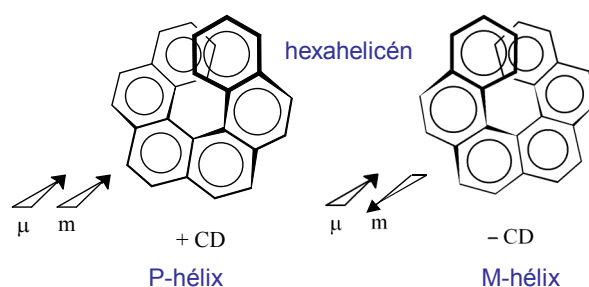
Illetve:

$$[\Theta_K(\lambda)] = \frac{2}{\pi\lambda} \int_0^{\infty} [\Phi_K(\lambda')] \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda'$$

Az ORD spektrum egy maximum-minimumos vagy egy minimum-maximumos görbe. Elvileg kétszer annyi maximumot és minimumot tartalmaz, mint egy CD spektrum, ezek azonban a valóságban gyakran összeolvadnak, ezért nehezebben értelmezhető, mint egy CD felvétel. Inflexió pontja megegyezik λ_{\max} értékével. A görbe elnevezése a második ág előjele szerint történik.

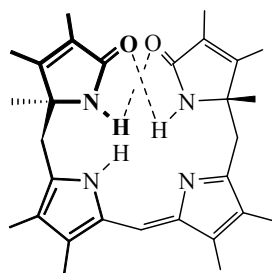
Elektronátmenet optikai aktivitásának molekulaszervezeti feltételei

1. Önmagában királis kromofór



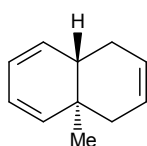
A szélső gyűrűhöz kapcsolódó hidrogén atomok térigénye miatt nem lehet planáris, hanem jobb vagy bal csavarodottsággal fordul elő. Gerjesztéskor az elektron a hexahelicén spiráljának irányába jobb- vagy balmenetes pályán halad.

Az önmagában királis kromofórokra az a jellemző, hogy igen nagy a rotátorerő, azaz $\Delta\epsilon \sim 10 - 100$.

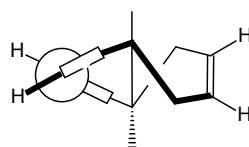


Urobilin (M-hélix)

Hasonlóan értelmezhető az epesavak egyes sztereoizomerjeinél detektált optikai aktivitás is.

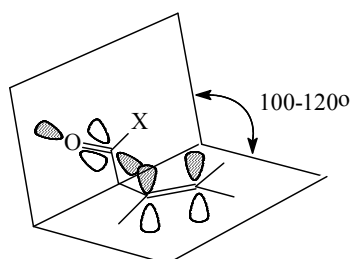


P helicitású konjugált dién kromofór, $\pi \rightarrow \pi^*$,
 $\lambda_{\max} \sim 270 \text{ nm}$, $a = +350$.



Konjugált diének, α, β -telítetlen ketonok és diszulfidok is rendelkezhetnek kétféle helicitással, ha ez egy molekulában rögzítve fordul elő királis vegyületek keletkeznek.

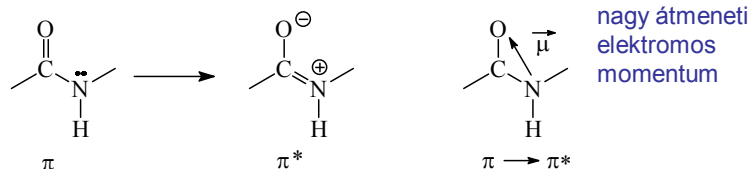
Egy karbonil-csoport és egy kettős kötés egymástól sp^3 hibridállapotú szénatommal elválasztva szintén eredményezhet kétféle kiralitású terméket. Ha a karbonil-csoport és a kettős kötés síkja egymással $100-120^\circ$ -ot zár be, attól függően, hogy a sík melyik irányba „nyílik” eltérő – pozitív vagy negatív – CD spektrumot kapunk $\lambda \approx 300 \text{ nm}$ körül.



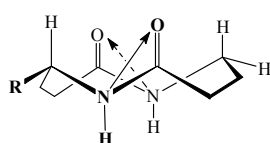
Karbonil-csoport és a kettős kötés síkjának viszonya

2. Királis molekulában két vagy több akirális kromofór

Optikai aktivitás akkor is fellép, ha két vagy több önmagában akirális kromofór királis molekulán belül egymáshoz képest királisan (nem egy síkban) van rögzítve. → **Ellentétes előjelű sávpár (couplet) jelenik meg a CD spektrumban.**

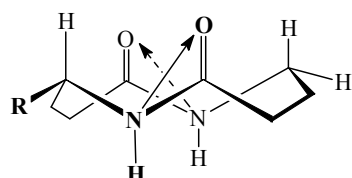


nagy átmeneti
elektromos
momentum



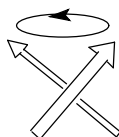
ciklikus diamid molekula

Ha a két kromofór elég közel van egymáshoz, akkor elektronjaik a gerjesztés hatására kapcsolt rezgéseket (dinamikus csatolás) végeznek: vagy azonos fázisban, vagy ellentétes fázisban rezegnek. A két rezgési módhoz eltérő energia tartozik, s ezért a $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronátmenet felhasad. A két kromofór együttes, kapcsolt rezgéseinek azonban már nemcsak elektromos, hanem mágneses momentuma is van.

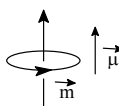


Két amid-csoport kiralitása M (mínusz), mert a hátsó az elülsőhöz képest az óramutató járásával ellentétes irányban van elfordulva.

fázisban



Az **eredő elektromos momentum** az azonos fázisban történő rezgésnél **felfelé** mutat.

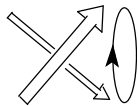


A két vektorpárnak az eredő elektromos momentum irányára merőlegesen is van összetevője: az első esetben a közelebbi vektor balról jobbra, a távolabbi jobbról balra mutat, ami az **elektromos momentummal megegyező irányú mágneses momentum** fellépését (pozitív *Cotton*-effektus) eredményezi.

+ CD

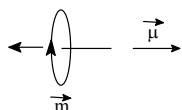
Azonos fázisban történő csatolt rezgés **+CD-t** eredményez.

ellenkezőleg



Az eredő elektromos momentum az ellentétes fázisban történő rezgésnél balról jobbra mutat.

Az ellentétes fázisú rezgésnél a közelebbi vektornak felfelé, a távolabbinak lefelé mutat az eredő elektromos momentumra merőleges irányú összetevője, ami az elektromos momentummal ellenkező irányú mágneses momentum fellépését (negatív Cotton-effektus) okozza.



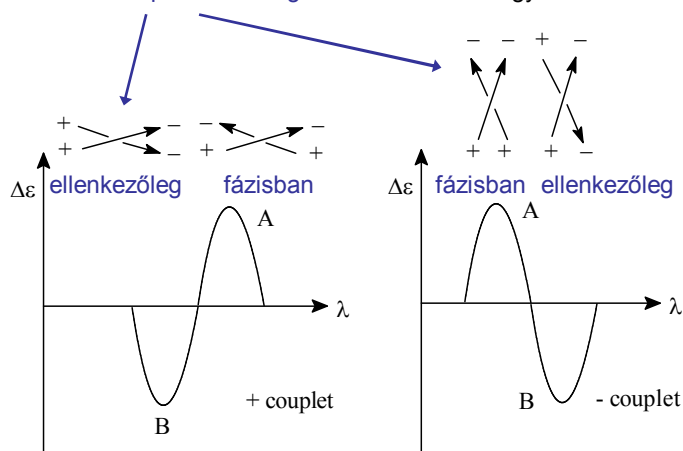
- CD

Ellentétes fázisban történő csatolt rezgés -CD-t eredményez.

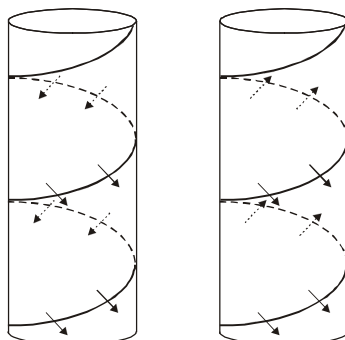
A CD-ben két ellentétes előjelű és ideális esetben azonos intenzitású sáv-pár (couplet) jelenik meg. A CD sávok előjele a két kromofór kiralitásától függ.

A két rezgésmód viszonylagos energiája, vagyis a megfelelő sávok hullámhossza – a kiralitástól függetlenül – a két kromofór relatív helyzetétől függ (pl. az általuk bezárt szög nagysága).

Az a rezgésmód igényli a nagyobb energiát, amelyben az átmeneti dipólusok azonos polaritású végei közelebb esnek egymáshoz.

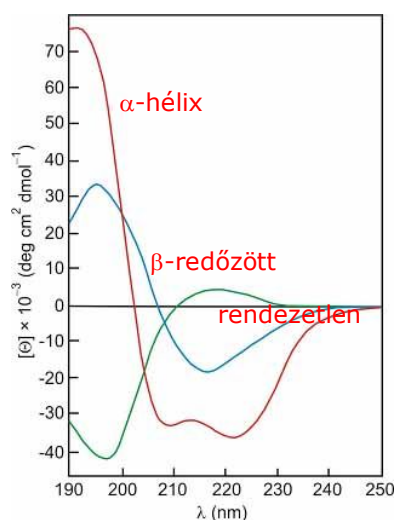
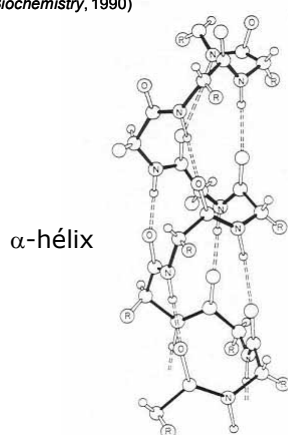


A fehérjék α -hélix konformációjában az amid-csoportok szabályos geometria szerint helyezkednek el a hélix mentén. Gerjesztéskor az amid kromofórok nagy elektromos momentummal járó $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronátmenete felhasad. Két rezgési mód lehetséges: vagy minden amid-kromofór fázisban rezeg vagy páronként ellenkező fázisban. Az L-aminosavakból felépülő jobb csavarodású hélixben a hélix tengelyével párhuzamosan polarizált rezgésmódnak negatív, míg a tengelyre merőlegesnek pozitív Cotton-effektusa van. Az előbbinek kisebb az energiája, így az α -hélix CD spektrumában intenzív negatív couplet jelentkezik.



α -hélix, β -redőzött réteg és rendezetlen konformáció CD spektruma

(Mathews, van Holde, *Biochemistry*, 1990)



α -hélix (poli-L-lizin vizes oldatban); β -redőzött réteg (poli-L-lizin nátrium-dodecilszulfát oldatban); ρ -rendezetlen gombolyag (poli-L-szerin 8M lítium-klorid oldatban)

Fehérjék vizsgálata

Circuláris dikroizmus egyik legfontosabb felhasználási területe

Fehérjék másodlagos szerkezetének analízise, harmadlagos szerkezettípusok meghatározása

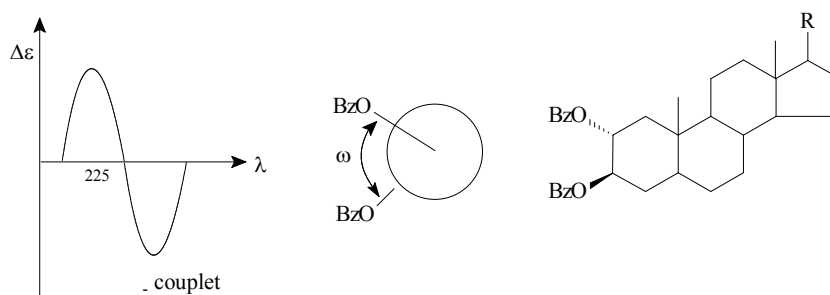
Különböző forrásokból kapott fehérjék szerkezetének összehasonlítása vagy ugyanazon fehérje esetén a különböző mutánsok összehasonlítása.

Oldatbeli konformációk vizsgálata

Fehérje konformáció stabilitásának tanulmányozása stressz hatására – termikus stabilitás, pH stabilitás, denaturációval szembeni stabilitás – hogy változik a stabilitás a puffer összetétel függvényében vagy stabilizátor hozzáadására
Oldószer kiválasztás, kísérleti körülmények optimalizálása

Fehérje-fehérje vagy fehérje-nukleinsav kölcsönhatások vizsgálata a fehérje konformációjának függvényében
Konformáció változás különböző receptor/ligandum komplex kialakulásának hatására

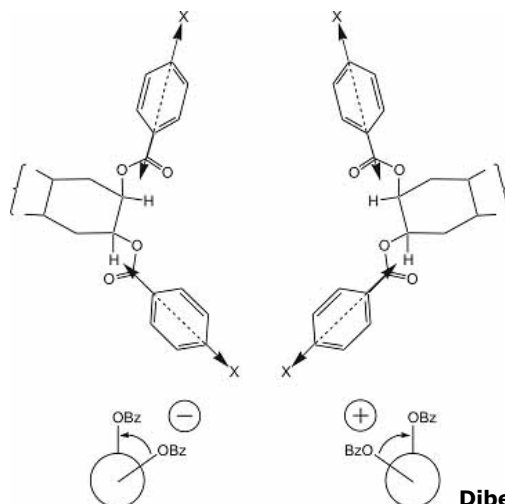
Hasonlóan csatolt rendszerek lépnek fel pl. a vicinális dibenzoil-szteroidok esetén:



A csatolás térkémi feltételei

Couplet amplitúdója fordítottan arányos a kromofórok közötti távolság négyzetével.

Előnyös, ha a kromofórok térben közel vannak egymáshoz, de nem kell, hogy szomszédos helyzetűek legyenek.



A couplet amplitúdója a dibenzoát rendszerénél akkor a legnagyobb, ha torziós szög $\sim 70^\circ$.

Az amplitudó nulla, ha a torziós szög 0° vagy 180° . (Parallel dipólus-elrendeződés nem eredményez cirkuláris töltés-elmozdulást, azaz a gerjesztés során mágneses momentum nem indukálódik.)

Dibenzoát-észterek

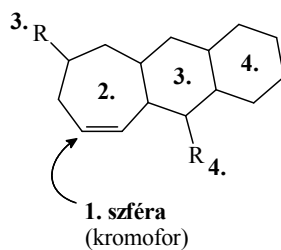
3. Királisan zavart (perturbált) akirális kromofórok

A legtöbb kromofór csoport önmagában akirális. Az akirális kromofórok elektronátmenetei nem lehetnek optikailag aktívak. **Akirális kromofór gerjesztődése esetén** az elektromos és a mágneses átmeneti momentumnak nem lehet azonos irányú komponense. A $|\mu||m| \cos(\mu m)$ szorzat, azaz a rotátorerő mindig zérus.

Az akirális kromofórok tartalmazó vegyületek is mutathatnak azonban mérhető CD-spektrumot, mert egyrészt a molekulának vannak **nem teljesen szimmetrikus rezgései és forgásai**, másrészt a **kromofór királis környezete** úgy perturbálhatja a kromofór elektronátmeneteit, hogy a hiányzó átmeneti momentum is létrejöjjön.

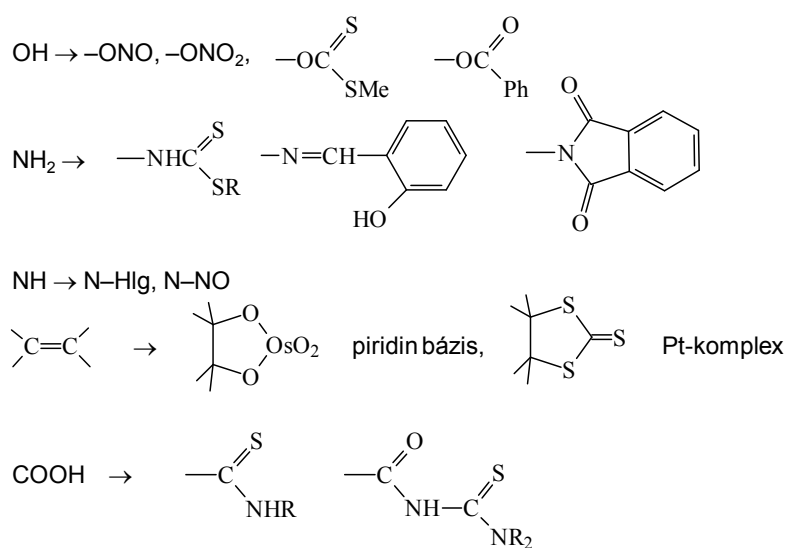
A királisan perturbált akirális elektronátmenet tehát elektromos és mágneses átmeneti momentummal jár, s ezért fellép a cirkuláris dikroizmus, illetve az optikai aktivitás. Ennek **mértéke** azonban **nagyságrendekkel kisebb**, mint a királis kromofóroknál észlelhető hatás.

A Cotton-effektus előjelét és nagyrészt a nagyságát is a kromofórhoz legközelebbi királis szféra határozza meg.



A molekulákat különböző szférákra oszthatjuk. Maga a kromofór az első szféra; a gyűrű, amely a kromofórt magába foglalja, a második szféra; a második szférához kapcsolódó gyűrűk vagy csoportok alkotják a harmadik szférát és így tovább.

Kémiai átalakítások révén a következő funkciós csoportok is vizsgálható kromofórrá tehetők:



Oktánszabály

Keton-kromofór átmenetei: $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$.

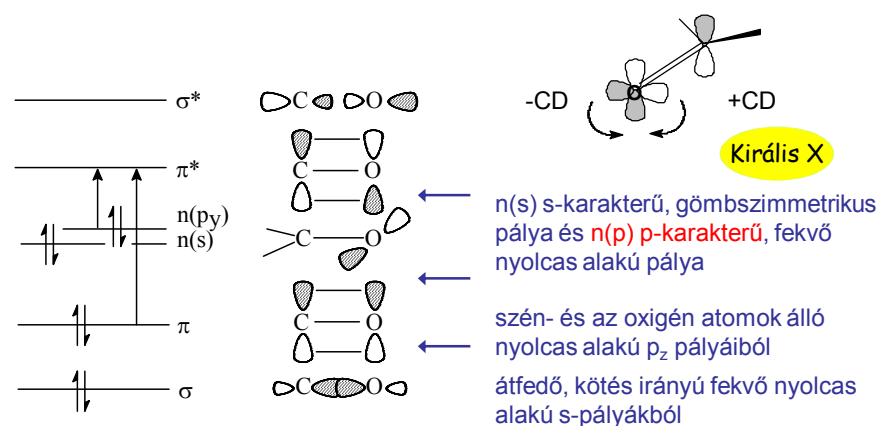
$n \rightarrow \pi^*$ átmenet: az n pálya az oxigén atomra lokalizált p_y -pálya, a π^* -pálya pedig az oxigén és a szén p_x pályáiból jön létre, mely az oxigén és a szén atom között helyezkedik el. Az átmenetnek nagy mágneses momentuma van ($m > 0$), de nincs elektromos momentuma ($\mu = 0$). Ez a sáv kb. 300 nm-nél jelentkezik, de az abszorpció nagyon gyenge ($\epsilon \cong 20$).

$\pi \rightarrow \pi^*$ átmenet: a π -pályán a két p_z -pálya előjelei azonosak, a π^* -pályán ellentétesek. Az elektromos momentum nagy ($\mu > 0$), mágneses momentum azonban nem jön létre ($m = 0$), mert az átmenet során cirkuláris töltésmozdulás nem jön létre ($\lambda_{\max} \approx 190$ nm).

$n \rightarrow \sigma^*$ átmenet: mind elektromos, mind mágneses momentum fellép. Az átmenethez tartozó abszorpciós sáv 120 nm körül figyelhető meg, $\epsilon \cong 10^3$. Bár az átmenet során átmeneti elektromos és mágneses momentum egyaránt létrejön, CD mégsem lép fel, mert a két vektor merőleges egymásra, és ezért $\cos(\mu, m) = \cos 90^\circ = 0$.

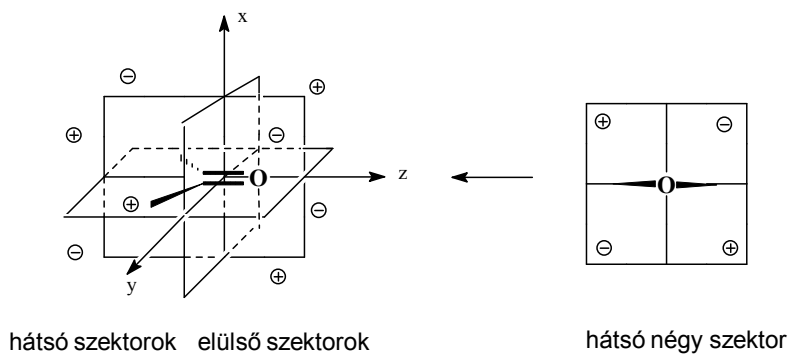
Karbonil kromofór

Az UV besugárzás során a legmagasabb betöltött $n(p_y)$ nemkötő pályán lévő elektronok kerülnek a π^* lazító pályára. Az $n \rightarrow \pi^*$ átmenet az egymásra merőleges (ortogonális) pályák között csak kis valószínűséggel mehet végbe (tiltott átmenet). A $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenet megengedett, mivel mind a π , mind a π^* orbitálok azonos síkban vannak.

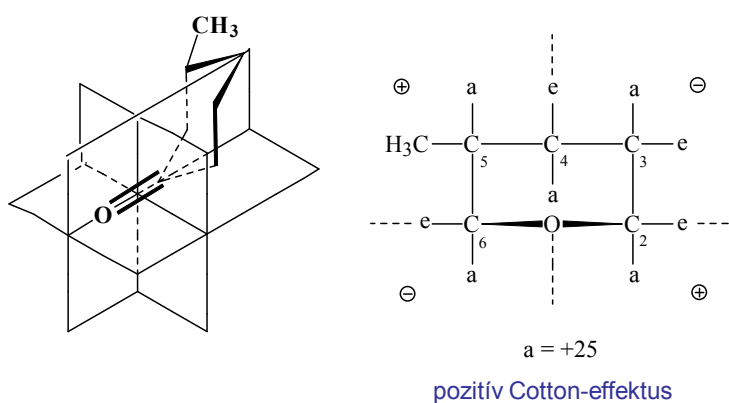


Ha $\mu = 0$ és/vagy $m = 0$, akkor nincs UV és CD, de királis környezetben sérül a szimmetria, s a különböző átmenetek keveredhetnek (egy elektron modell). Mivel az $n \rightarrow \pi^*$ átmenetnek nagy mágneses momentuma van, de nincs elektromos momentuma, a $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenettől „lopja el” a hiányzó elektromos momentumot.

Az **oktáns-szabály** alapján megjósolható, hogy az így kialakuló elektromos és mágneses momentumok alapján milyen előjelű CD spektrumot kaphatunk.

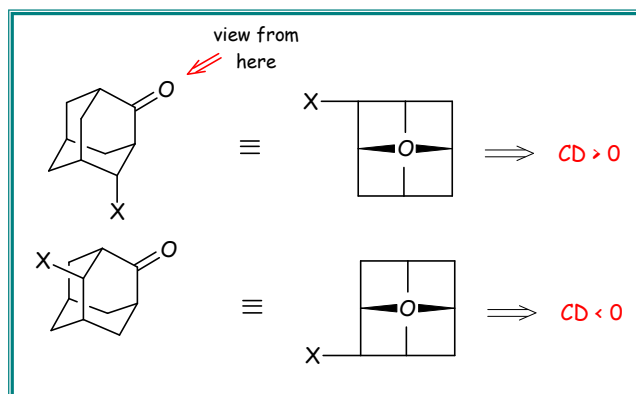


R konfigurációjú (+)-3-metil-ciklohexanon



A pozitív Cotton-effektus arra utal, hogy a molekula domináns konformációjában az a szék konformer lép fel, melyben a metil-csoport ekvatoriális helyzetű. Amennyiben a domináns konformer pl. az NMR vizsgálat alapján ismert, akkor a CD alapján a konfiguráció határozható meg

Empirikus szabály CD becslésére
(**oktáns szabály** az n, π^* átmenetre $C=O$ csoportnál)



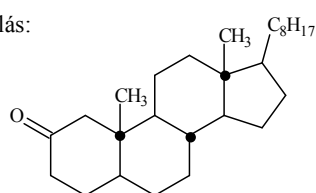
Enantiomer β -szubsztituált adamantanonok

A $\Delta \epsilon$ értékéhez csak azon atomok adnak hozzájárulást, melyek nem a két szimmetria síkon helyezkednek el, és melyeknek nincs valamelyik szimmetria sík szemközti oldalán egy megfelelő párja.

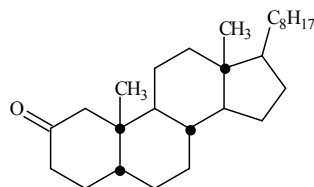
A hozzájárulás előjelét az szabja meg, hogy az illető atom melyik oktánsban foglal helyet, s hatásának nagysága arányos azzal, hogy milyen közel helyezkedik el a kromofórhoz.

Az oktáns szabály különösen jól alkalmazható pl. a ketoszteroidok körében.

Sík ábrázolás:

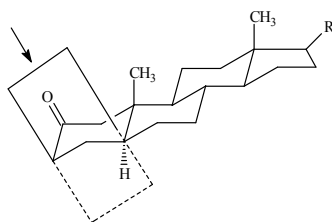


2-keto-5 α -kolesztán

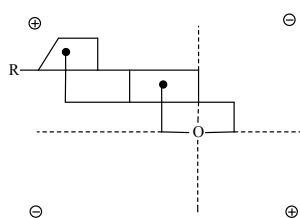


2-keto-5 β -kolesztán

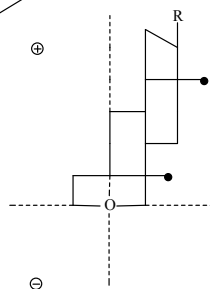
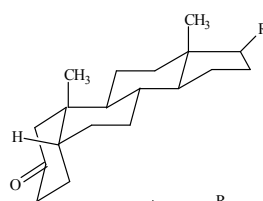
Tér ábrázolás:



CD ábrázolás:



$$\Delta\epsilon = 3.0$$

 $n \rightarrow \pi^* \quad \lambda \sim 300 \text{ nm}$


$$\Delta\epsilon = -0.8$$

 $\lambda \sim 300 \text{ nm}$

Spectral Assignments and Reference Data

Received: 13 October 2009 Revised: 26 January 2010 Accepted: 27 January 2010 Published online in Wiley InterScience: 4 March 2010
 (www.interscience.com) DOI 10.1002/mrc.2381

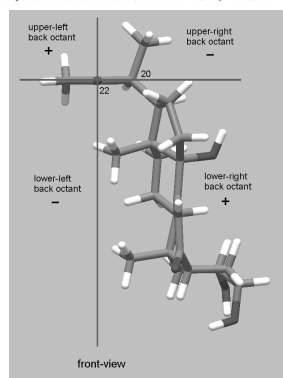
Magnetic Resonance in Chemistry

Structure and stereochemistry of novel ecdysteroids from the roots of *Serratula wolffii*[†]

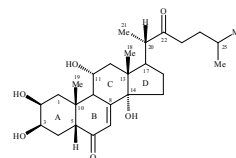
Mária Takács,^{a*} András Simon,^b Erika Liktor-Busa,^c Mária Báthori,^c Ferenc Zsila,^d Zsolt Bikádi,^e Péter Horváth,^a Gábor Veress,^f András Gergely^a and Gábor Tóth^{b*}

Three new natural ecdysteroids viz. 22-dehydro-20-deoxy-ajugasterone C (1), 1-hydroxy-22-deoxy-20,21-didehydro-ecdysone (2) and 22-deoxy-20,21-didehydro-ecdysone (3) were isolated from the methanol extract of the roots of *Serratula wolffii*. The structures of compounds 1–3 were established by various spectroscopic techniques including one- and two-dimensional NMR, circular dichroism and mass spectroscopic methods. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

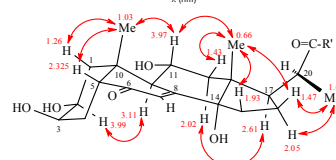
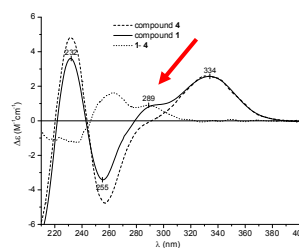
Keywords: ¹H NMR; ¹³C NMR; CD; stereo structure; ecdysteroids; *Serratula wolffii*



Oktáns szabály alkalmazása a C-22 keto-csoportra:
 + CD sáv



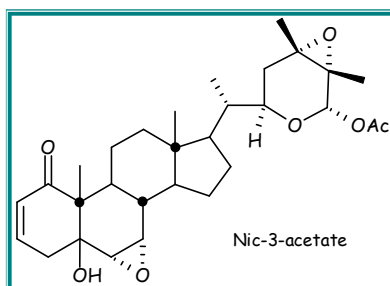
22-dehydro-20-deoxy-ajugasterone C



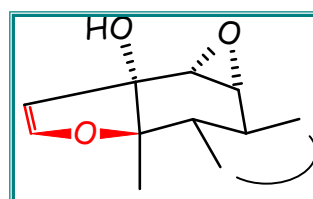
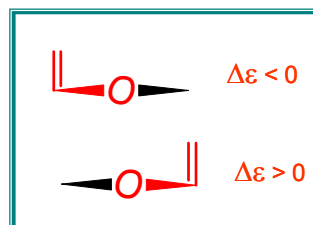
Steric structure. Arrows indicate the NOE steric proximities in the preferred conformation.

Enone Rule

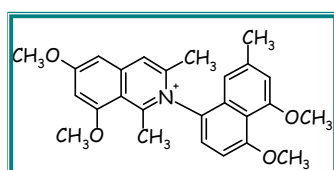
α,β -telítetlen ketonok



mért érték: $\Delta\epsilon < 0$

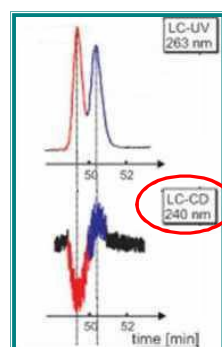


LC-CD coupling



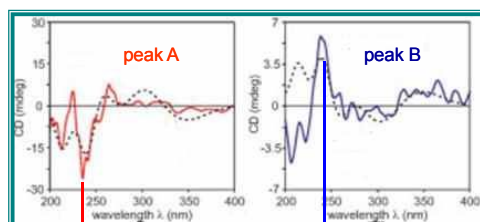
(±)-Ancisheyne

separated on *Chiralcel OD-H* (immobilized polysaccharide) and *n*-hexane/isopropanol (97.5/2.5) as the eluent at elevated temperatures (55°C)

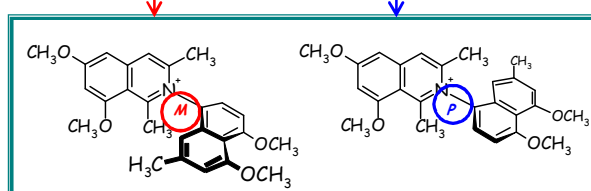


Bringmann *et al.*, *Chirality* 2008.

Napjainkban computer programokkal számítjuk (Gaussian) a spektrumokat:



Dotted curves calculated by DFT:
red for M-, blue for P-configuration



Bringmann *et al.*, *Chirality* 2008.

Vibrációs optikai aktivitás: v-CD és ROA



Vibrációs Cirkuláris Dikroizmus (v-CD)

Cotton Effektus (CD) detektálása a rezgési spektrum (infravörös, IR) tartományban

Az elmélet hasonló mint az e-CD estén

Előnyök:

Az IR spektrumban általában több sáv van (tartomány 1800 – 1000 cm^{-1} ; finger-print)

A sávok élesebbek, jobb a diszperzió, kevés az sávátfedés

Artifaktok ritkán fordulnak elő

Raman Optikai Aktivitás (ROA): Raman spektroszkópia királis változata

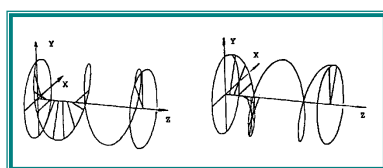
ELTE Kémiai Intézet



e-CD készülék (látható és UV)

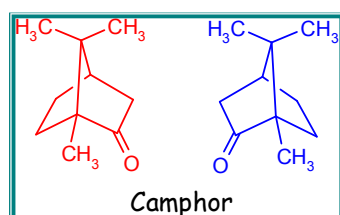
v-CD készülék (infravörös tartomány)
Bruker Equinox55/PMA37 FTIR/VCD
2003

Vibrational Circular Dichroism

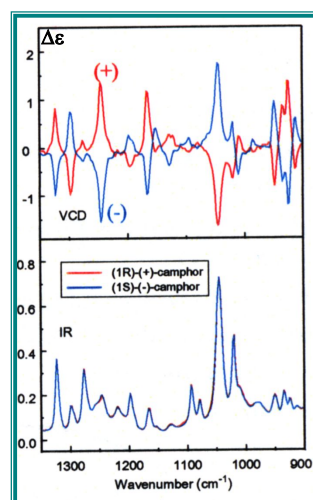


Balra és jobbra cirkulárisan polarizált fény

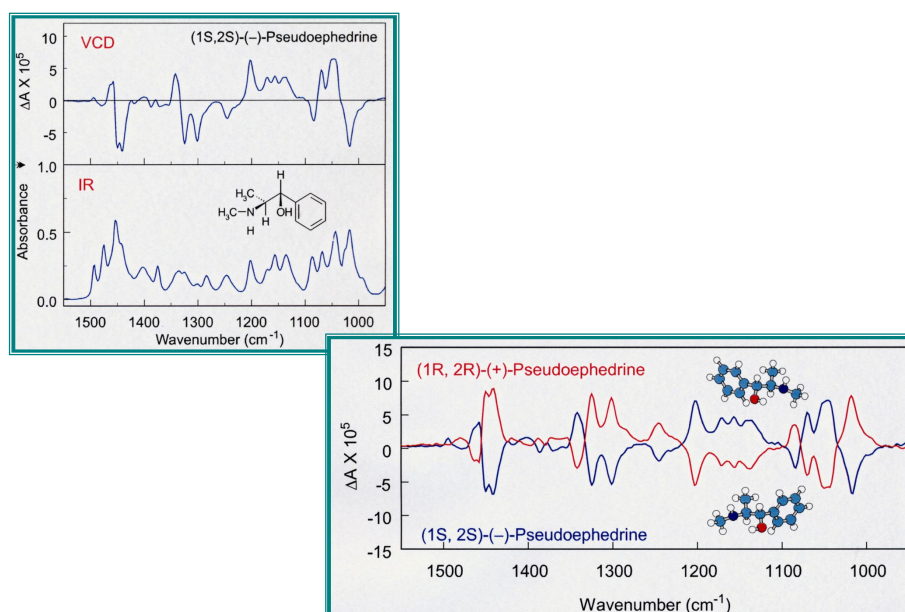
$$\Delta\epsilon = \epsilon_+ - \epsilon_-$$



Vibrational CD



Vibrational Circular Dichroism



Vibrational Circular Dichroism

Mi a teendő, ha megakarjuk határozni az absz. konfigurációt?

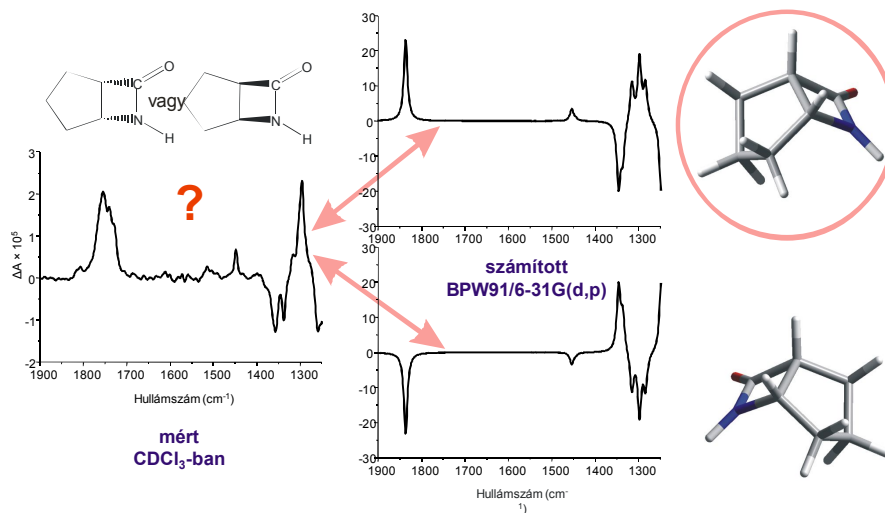
Szerkesszük meg az egyik enantiomer DFT-szintű kvantumkémiai számításokon alapuló térszerkezetét.

Ezt követi a v-CD spektrum *Ab-initio* számolása: DFT/B3LYP/6-31G* vagy magasabb szinten

Nagyon fontos: MM/MD módszerrel meg kell határozni az összes lehetséges konformert, s ezek szerkezetét *Ab initio* (DFT) szinten finomítani kell, majd az energiákat meghatározni. Ezután következik minden lehetséges konformerre a v-CD spektrum kiszámolása, a konformerek részarányának meghatározása a konformációs egyensúlyban, végül az alapvető konformerek Boltzmann-súlyozott v-CD spektrumai összegének megfelelő eredő v-CD spektrum kiszámítása.

Megjegyzés: A v-CD spektrum számolására szolgáló algoritmus beépített része a kereskedelmi forgalomban lévő Gaussian 98 / Gaussian 03 kvantumkémiai program csomagnak

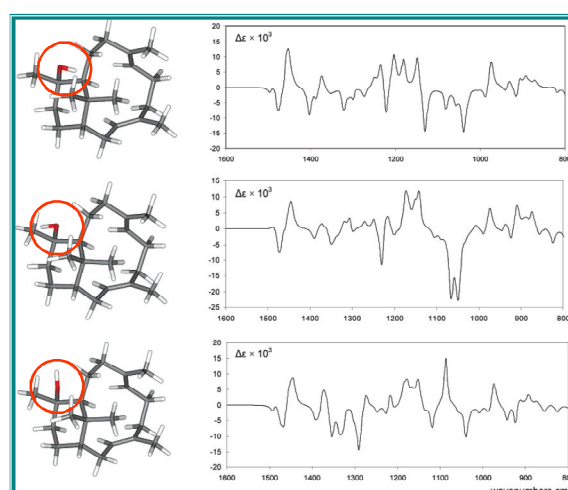
Abszolút konfiguráció meghatározása VCD-spektroszkópiával



Vass, E.; Hollósi, M.; Forró, E.; Fülöp, F. *Chirality* **2006**, *18*, 733.

Vibrational Circular Dichroism

Figyeljük meg a számított v-CD spektrumok nagymértékű eltérését, amit az -OH csoport forgásával kapott konformerek eredményeztek!



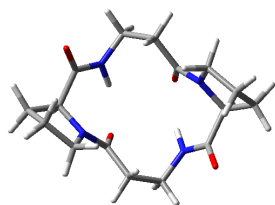
Cerda-García-Rojas, Joseph-Nathan *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2007**.

Nehézségek a V-CD alkalmazása során

- Csekély analitikai érzékenység → viszonylag magas koncentrációjú oldat kell, a csekély S/N (jel/zaj) viszony miatt sokszor 6-8 óra akkumulálás szükséges a megfelelő S/N eléréséhez.
- A méréshez megfelelő oldószerekben sokszor alacsony a minta oldékonysága, továbbá az alkalmas IR sávok területén az oldószerek nem lehet saját elnyelése.
- A magas koncentráció intermolekuláris kölcsönhatásokkal járhat együtt, aggregáció is felléphet, mikoris a spektrum már nem lesz jellemző a kölcsönhatásoktól mentes egyedi molekulákra → gyenge lesz az egyezés a mért és a számított spektrumok közt → ezért olyan alacsony koncentrációt célszerű alkalmazni, ami csak lehetséges
- A műszernél ez alapvonal problémákkal járhat együtt.
- Szilárd fázisú méréseknél artifaktok léphetnek fel, ami megnehezíti a spektrumok értékelését, ezért a folyadék ill. oldat fázisú mérések az ajánlatosak.
- Nincsenek megbízható empirikus szabályok jelenleg az abszolút konfiguráció meghatározására, ezért a V-CD spektrum értékelése csak számítások révén lehetséges.
- A számítások jelenleg még csak a közepes méretű molekulákra korlátozódnak (a molekula méret a számítógépes háttér teljesítményétől függ).
- Nagy konformációs mobilitású molekuláknál a számítások nehezek és időigényesek.
- A V-CD technika hatékony az enantiomerek azonosításában de a diaszte-reomerek esetén kevésbé hatékony.

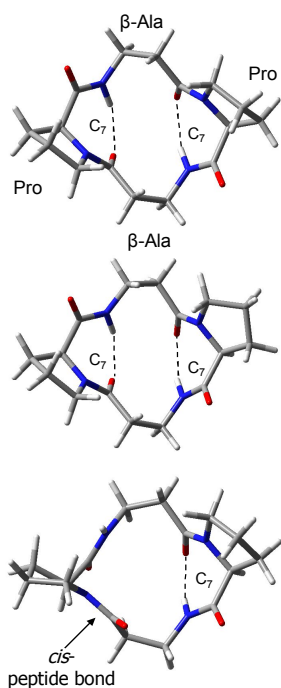
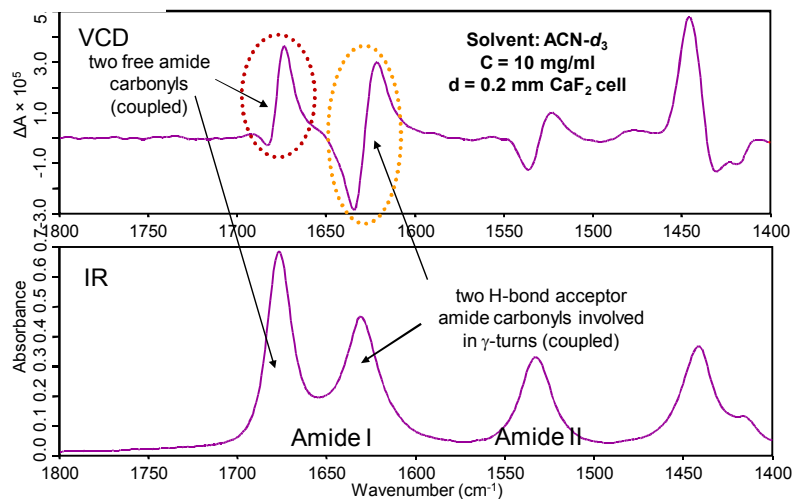
Előnyök a V-CD alkalmazása során

- Nincs szükség kristályos mintára; folyadék, oldat vagy akár gáz fázisú minta is vizsgálható → igazi alternatíva az egykristály x-ray mellett
- V-CD spektrum pontosabban számítható mint az e-CD (csak az elektromos állapotokat kell figyelembe venni), sokkal részletgazdagabb és egyszerűbben is interpretálható
- Egyidejűleg nyújthat információt a konfiguráció és konformáció vonatkozásában
- A V-CD spektrum számolására szolgáló algoritmus beépített része a kereskedelmi forgalomban lévő Gaussian 98 / Gaussian 03 kvantumkémiai program csomagnak



Peptidek konformációjának vizsgálata VCD-spektroszkópiával Cyclo(β-Ala-Pro-β-Ala-Pro)

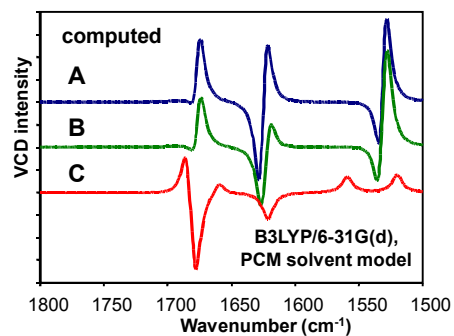
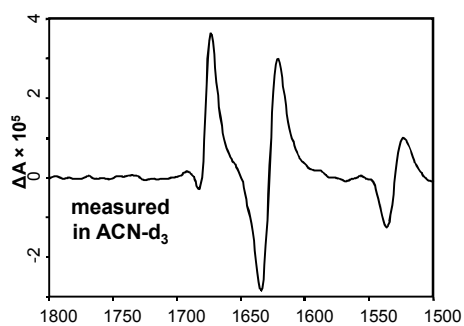
Vass, E.; Kóhalmi, K.; Majer, Zs.; Hollósi, M. *Chirality* 2010, 22, 762.



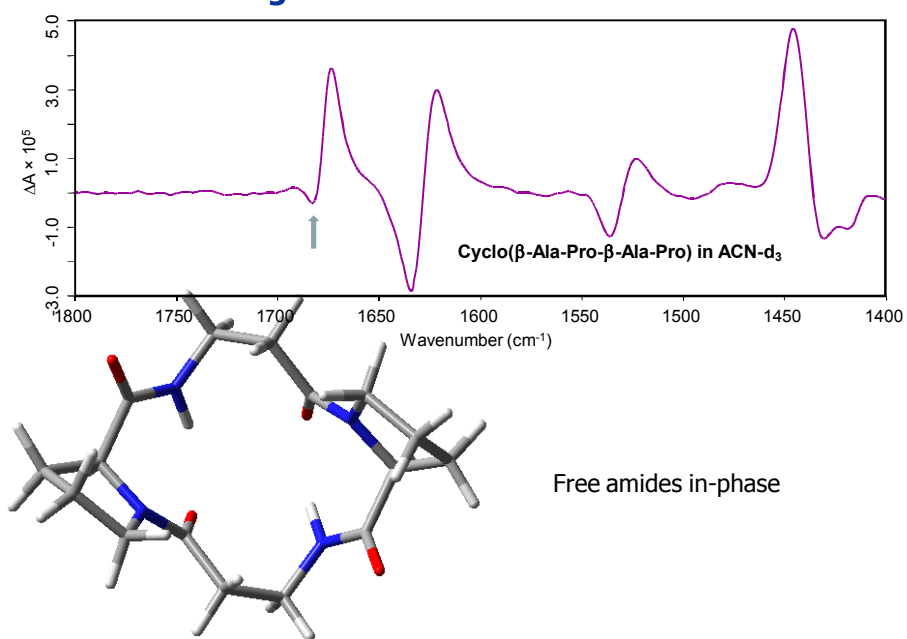
A
 $\Delta E = 0$ kcal/mol
> 99.9%

B
 $\Delta E = 4.4$ kcal/mol
< 0.1%

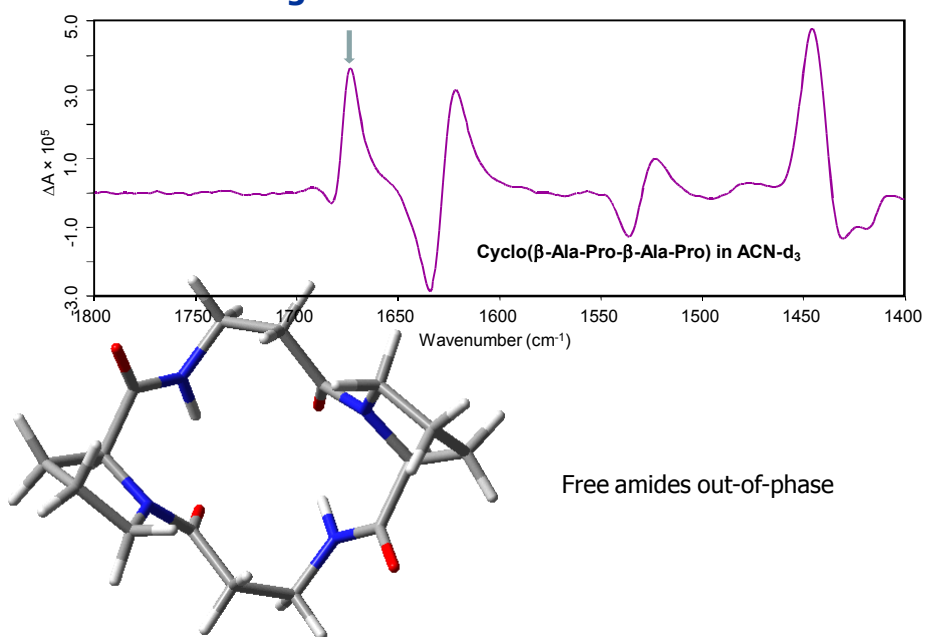
C
 $\Delta E = 6.7$ kcal/mol



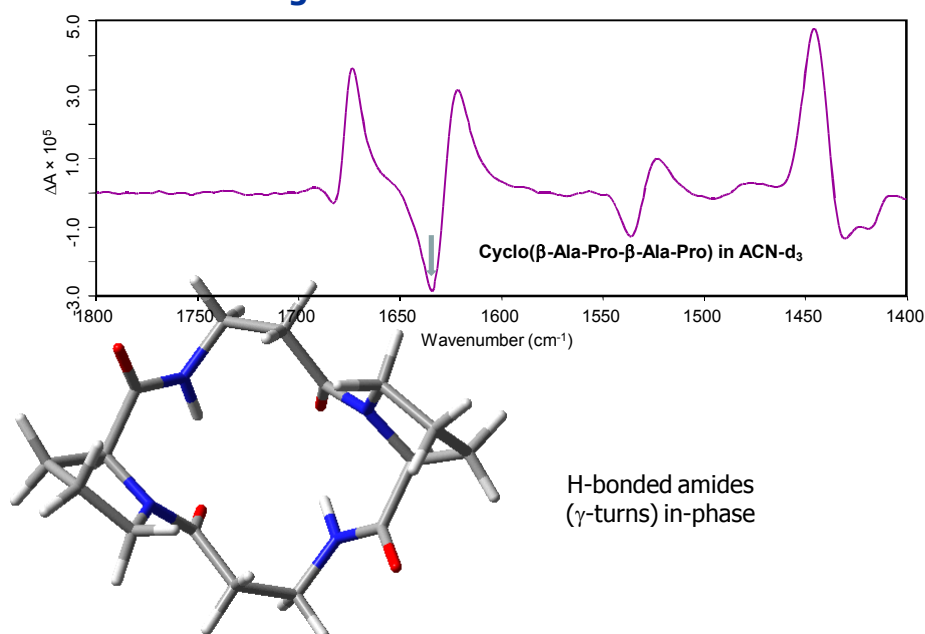
Assignment of Amide I VCD bands



Assignment of Amide I VCD bands



Assignment of Amide I VCD bands



Vibrational Circular Dichroism

Nagyon fontos:

MM/MD módszerrel meg kell határozni az összes lehetséges konformert, s ezek szerkezetét *Ab initio* (DFT) szinten finomítani kell, majd az energiákat meghatározni.

Ezután következik minden lehetséges konformerre a v-CD spektrum kiszámolása, a konformerek részarányának meghatározása a konformációs egyensúlyban, végül

az alapvető konformerek Boltzmann-súlyozott v-CD spektrumai összegének megfelelő eredő v-CD spektrum kiszámítása.