

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta  
Fyzikální ústav UK

## DISERTAČNÍ PRÁCE



**Mgr. Josef Kapitán**

### **Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako metody studia biomolekul ve vodném prostředí**

Theoretical and Experimental Development of Raman Optical Activity  
as a Stereochemical Probe for Aqueous Environment

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

Konzultant: RNDr. Petr Bouř, CSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR

Studijní program: Fyzika, obor: Biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika

Praha 2006

## Poděkování

Především bych chtěl poděkovat Vladimíru Baumrukovi a Petrovi Bouřovi za velmi podnětné vedení. Bez jejich cenných rad a podpory by nebylo možné tuto práci vytvořit. Bylo velkým potěšením s nimi pracovat. Vladimíru Baumrukovi bych chtěl poděkovat zvláště za to, že mě uvedl do světa Ramanovy optické aktivity a také že jako jediný nikdy nepochyboval, že se podaří náročnou přestavbu spektrometru dokončit. Petru Bouřovovi děkuji, za seznámení se světem kvantově-chemických simulací. Bylo radostí být přítomen vytváření jeho modelů popisujících reálné biomolekulární systémy. Také většina programů používaných na simulaci spekter je jeho dílem.

Dále bych rád poděkoval Petru Maloňovi, Jaroslavu Šebestíkovi, Petru Niederhafnerovi a Haně Hulačové za syntézu a poskytnutí vzorků hinde peptidu a jeho analogů.

Můj velký dík také patří mistru Miloši Richterovi za výrobu celé řady mechanických držáků, teplotní cely a dalších komponent nutných pro přebudování aparatury. Bez jeho velké dovednosti a nevyčerpatelných zkušeností by přestavba byla mnohem složitější.

Děkuji také Jirímu Bokovi za podporu při psaní ovládacího programu ROA spektrometru a za napsání knihovny pro kalibraci spekter. Také velmi děkuji Petru Prausovi za konzultace a veškerou pomoc při opravách elektronických částí aparatury.

Kolektivu Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu UK děkuji za vytvoření velmi přátelského, tvůrčího a inspirujícího prostředí pro práci.

Grantové agentuře UK děkuji za podporu poskytnutou v roce 2005.

V neposlední řadě bych chtěl velmi poděkovat snoubence Pavle a své rodině za všelikou podporu, bez níž by tato práce také nemohla vzniknout.

# Obsah

Seznam použitých zkratek .....	4
Úvod .....	5
<b>1. Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Ramanova optická aktivita - přehled současného stavu .....</b>	<b>10</b>
2.1 Experimentální přístupy k měření ROA .....	11
2.2 Molekulární systémy studované pomocí ROA .....	14
<b>3. Simulace spekter – Teorie Ramanovy optické aktivity .....</b>	<b>23</b>
3.1 Born-Oppenheimerova aproximace a separace stupňů volnosti .....	23
3.2 Harmonická aproximace a zavedení normálních vibračních módů .....	25
3.3 Teorie Ramanovy optické aktivity .....	26
3.4 <i>Ab initio</i> metody výpočtu ROA intenzit .....	31
3.5 Teorie elektronové hustoty (DFT) .....	34
3.6 Modely rozpouštědla .....	39
3.7 Optimalizace geometrie .....	41
3.8 Přenos tenzorů molekulárních vlastností .....	43
3.9 Použití molekulární dynamiky při studiu reálných systémů .....	45
<b>4. Experimentální uspořádání, metodika měření a zpracování ROA spekter .....</b>	<b>48</b>
4.1 Popis ROA spektrometru .....	48
4.2 ROA experiment .....	53
4.2.1 Sestavování aparatury .....	53
4.2.2 Programové vybavení ROA spektrometru .....	63
4.2.3 Měření ROA spekter .....	66
4.2.4 Kalibrace spekter .....	67
4.2.5 Příprava vzorků (obecné zásady) .....	68
4.3 Zpracování spekter .....	69
4.3.1 Fourierova transformace a její využití při zpracování dat .....	71
4.3.2 Standardizovaný postup zpracování spekter .....	81
<b>5. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>84</b>
5.1 Vliv konformační flexibility na rozšíření pásů v Ramanových a ROA spektrech alaninu .....	85
Příloha 1: J. Kapitán et al., J. Phys. Chem. A (v recenzním řízení)	
5.2 Studium dynamiky prolinového kruhu a interakce s rozpouštědlem .....	88
Příloha 2: J. Kapitán et al., rukopis článku pro J. Phys. Chem. A (přípraveno k odeslání)	
5.3 Studium konformace prolinového kruhu v poly(L-prolinu) .....	92
Příloha 3: J. Kapitán et al., J. Am. Chem. Soc. 2006 (přijato k publikaci)	
5.4 Ramanova optická aktivita hinge peptidu a jeho analogů .....	94
Příloha 4: J. Kapitán et al., Collect. Czech. Chem. Commun. 70 (2005) 403-409	
Příloha 5: J. Kapitán et al., Vibrational Spectroscopy 2006 (přijato k publikaci)	
<b>Závěr .....</b>	<b>96</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>98</b>

## Seznam použitých zkratek

2D	dvojměrné
CCD	charge coupled device
CD	cirkulární dichroismus
DCP	duální kruhová polarizace (dual circular polarization)
DFT	teorie elektronové hustoty (density functional theory)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECD	elektronový cirkulární dichroismus
EOM	elektrooptický modulátor
FF	silové pole (force field)
FT	Fourierova transformace
FFT	rychlá Fourierova transformace (fast Fourier transform)
ICP	kruhová polarizace budícího záření (incident circular polarization)
IČ	infračervený
LCP	levotočivě kruhově polarizované záření
MD	molekulární dynamika
MP2	Møllerova-Plessetova poruchová metoda v druhém řádu
NMR	nukleární magnetická rezonance
PC	počítač (personal computer)
PCA	analýza hlavní komponenty (principal component analysis)
PLP	poly(L-prolin)
PPII	levotočivý polyprolin II helix
RCP	pravotočivě kruhově polarizované záření
RNA	ribonukleová kyselina
ROA	Ramanova optická aktivita
SCP	kruhová polarizace rozptýleného záření (scattered circular polarization)
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
vac	vakuum
VCD	vibrační cirkulární dichroismus
VOA	vibrační optická aktivita

Není-li uvedeno jinak, označují písmena řecké abecedy složky kartézských tenzorů. V textu je používána Einsteinova sumační konvence, tj. opakují-li se řecká písmena v jednom výrazu dvakrát, sčítá se přes všechny tři kartézské souřadnice.

Poznámka k číslování stránek: číslovány jsou pouze stránky textu dizertační práce, nikoliv stránky vložených publikací, u kterých je ponecháno jejich vlastní číslování.

## Úvod

Jednou ze základních aplikací spektroskopických technik je výzkum struktury biologických molekul, neboť objasnění vztahu mezi strukturou a funkcí patří k hlavním úkolům biofyziky a molekulární biologie. Mezi základní metody strukturní biologie, s nimiž je možno studovat systémy s atomovým rozlišením, patří rentgenová difrakce a nukleární magnetická rezonance (NMR). První z nich je však možno používat jen na určení struktury monokrystalických vzorků, naopak u NMR existuje jisté omezení dané velikostí studovaných systémů. V oblastech, kde výše zmíněné metody nemohou poskytnout hledanou informaci anebo je třeba ji určitým způsobem doplnit, nacházejí široké uplatnění metody vibrační spektroskopie: infračervená (IČ) spektroskopie a Ramanův rozptyl. Jejich hlavními výhodami jsou nedestruktivnost a možnost studovat molekuly v jejich přirozeném prostředí, tj. ve vodných roztocích a v závislosti na fyzikálních parametrech (pH, teplota, přítomnost iontů apod.). Navíc tyto metody umožňují studovat dynamiku strukturních přechodů (doba vibračních přechodů  $10^{-13}$  až  $10^{-14}$  s je řádově kratší než doba odpovídající nejrychlejším konformačním přechodům).

Obě metody vibrační spektroskopie se liší jak fyzikálními jevy při jejich vzniku a tedy i metodami měření, tak i různými výhodami a omezeními. IČ absorpce umožňuje poměrně snadná měření s malými nároky na množství vzorku. Velkou výhodou Ramanova rozptylu je, že voda má sama o sobě v Ramanově spektru velmi slabý signál a představuje tedy ideální rozpouštědlo.

Opticky aktivní (chirální) molekuly se vyskytují ve dvou chemicky totožných ale strukturně odlišných formách, které se vůči sobě mají jako zrcadlové obrazy. Ačkoliv různé izomerní formy jedné molekuly hrají v biologických systémech naprosto odlišnou roli (např. proteiny se skládají pouze z L-aminokyselin a v nukleových kyselinách se vyskytují pouze D-cukry), není možné je pomocí běžných metod vibrační spektroskopie rozlišit. Velký přínos proto představují metody vibrační optické aktivity (VOA) přinášející do vibrační spektroskopie enantiomerní selektivitu. Vibrační optická aktivita stejně jako vibrační spektroskopie sestává ze dvou komplementárních metod – vibračního cirkulárního dichroismu (VCD) a Ramanovy optické aktivity (ROA), které díky tomu, že spojují stereochemickou citlivost konvenční (elektronové) optické aktivity s vyšším spektrálním rozlišením a tudíž i bohatším strukturním obsahem vibrační spektroskopie, mají zvýšenou citlivost k lokálnímu prostorovému uspořádání atomů a k jejich dynamice. VOA sonduje stereochemii molekulárního skeletu přímo, zatímco

elektronová optická aktivita sonduje stereochemii pouze nepřímo prostřednictvím chromoforu. Hlavní výhodou VOA oproti elektronovému cirkulárnímu dichroismu (ECD) je enormní nárůst stereochemické informace obsažené ve spektru, naopak nevýhodou je nízká rotační síla vibračních přechodů ve srovnání s přechody elektronovými. Pro studium biomolekul má ROA výrazně vyšší aplikační potenciál. Pomocí Ramanovy (a tedy i ROA) spektroskopie lze v jednom experimentu snadno zaznamenat vibrační spektra látek rozpuštěných ve vodě v celém rozsahu fundamentálních vlnočtů, což je velká výhoda oproti použití infračervených technik. Další výhodou ROA je, že do značné míry snižuje složitost vibračních spekter biopolymerů, neboť nejintenzivnější ROA signál odpovídá vibračním souřadnicím *nejrigidnějších* a *chirálních* částí struktury, což v případě proteinů znamená především vibrace peptidové páteře molekuly, zatímco základní informace o postranních řetězcích je obsažena v odpovídajícím Ramanově spektru. Další výhodou představuje krátkodosahovost interakcí odpovědných za generaci ROA signálu, takže pomocí ROA lze studovat na rozdíl od ECD i lokální struktury.

Přes svůj nesporný potenciál není ROA příliš rozšířenou technikou. V impaktovaných časopisech lze v současnosti nalézt pouze práce z laboratoří v Glasgow, Zürichu a z naší laboratoře, a to i přes to, že od roku 2002 je ROA spektrometr komerčně dostupný. Většímu rozšíření metody brání především značná náročnost experimentu i výpočetních postupů. Pomocí ROA spektroskopie byla studována na jedné straně celá řada jednoduchých molekul (chirální organické látky, cukry, aminokyseliny), jejichž spektra byla interpretována na základě *ab initio* výpočtů. Na druhé straně pro složité biomolekuly jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a viry je strukturní interpretace spekter založena na čistě empirické korelaci mezi spektrálními rysy a známými strukturními motivy.

Hlavním cílem předkládané disertační práce, kromě nezbytného výrazného přebudování ROA spektrometru na Fyzikálním ústavu UK a s tím spojeným rozvojem a standardizací měřících postupů i metod zpracování experimentálních dat, proto byla snaha o vyplnění mezery mezi studiem jednoduchých molekul a složitých biomolekul ve vodných roztocích a o hlubší pochopení jevů ovlivňujících generaci ROA signálu.

Předkládaná dizertační práce je členěna do pěti kapitol. V první kapitole jsou zformulovány cíle dizertační práce. Druhá kapitola podává stručný přehled současného stavu Ramanovy optické aktivity a jejích aplikací s důrazem na studium biomolekul, ve třetí kapitole jsou shrnuty základy teorie ROA a metody používané při simulacích ROA spekter. Ve čtvrté kapitole je podrobně popsán ROA spektrometr vybudovaný v rámci řešení dizertační práce na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy, postupy při ladění aparatury, přípravě vzorků i vlastním měření a metody zpracování experimentálních dat (spekter). V páté kapitole jsou

uvedeny výsledky studia vybraných molekulárních systémů pomocí ROA. Většina dosažených výsledků byla publikována, byla přijata nebo nabídnuta k publikaci v impaktovaných zahraničních časopisech. Reprinty nebo rukopisy těchto prací jsou zařazeny do jednotlivých podkapitol za krátký úvodní text a jsou jejich nedílnou součástí. V závěru jsou shrnuty dosažené výsledky a naznačena perspektiva jejich dalšího využití.

# 1. Cíle práce

Cíle, které si předkládaná práce kladla, lze rozdělit do tří základních okruhů. První okruh tvoří veškeré problémy spojené s výstavbou ROA spektrometru nové generace na Fyzikálním ústavu UK a s metodickým rozvojem, který by umožnil více méně rutinní měření spekter biologicky významných molekul ve vodném roztoku, zejména aminokyselin, peptidů a proteinů. Druhý okruh souvisí s budováním výpočetního aparátu pro simulaci Ramanových a ROA spekter flexibilních polárních látek rozpuštěných ve vodě. Třetí okruh potom na vybraných aplikacích demonstruje použitelnost jak vybudované experimentální základny tak i vyvinutých výpočetních metod pro řešení konkrétních problémů.

Ramanova optická aktivita dosud nepatří mezi rutinní a rozšířené spektrální techniky. V době zadání práce nebyl na trhu komerční spektrometr. Přístupy využívané pro simulace spekter nebyly na takové úrovni, aby pro aminokyseliny či jednoduché peptidy dokázaly uspokojivě interpretovat spektra změřená v roztoku a přispět tak nejen k hlubší než fenomenologické interpretaci spekter složitějších systémů, ale také k pochopení mechanismů vzniku ROA signálu v komplexních systémech a k objasnění jeho strukturní citlivosti.

Hlavní cíle disertační práce je tedy možné shrnout do následujících bodů:

1. Vybudovat ROA spektrometr nové generace, pokrývající dostatečně široký spektrální obor včetně oblasti nízkých vlnočtů (nižších než  $600\text{ cm}^{-1}$ ), a získat tak nové strukturně citlivé spektrální okno zahrnující oblast torzních a deformačních vibrací molekulárního skeletu. Vytvořit měřicí program přátelský k uživateli zabezpečující všechny potřebné funkce spektrometru a základní zpracování změřených spekter. Provést ověřovací experimenty a vypracovat standardní měřicí postupy.
2. Pro komplexní interpretaci Ramanových a ROA spekter využít pokročilý výpočetní aparát kvantové mechaniky včetně metod umožňujících zahrnout do výpočtů realistické modely rozpouštědla. Snažit se postihnout dynamické aspekty chování studovaných molekul v roztoku a v simulacích je zohlednit s cílem dosáhnout nejen výrazně lepší shody simulovaných spekter s experimentálními daty, ale také odhalit a vysvětlit spektrální projevy konformační flexibility. Rozvíjet metody simulování spekter složitějších struktur založených na přenosu tenzorů molekulárních vlastností vypočtených pro vhodně zvolené fragmenty a otestovat jejich použitelnost.



3. Změřit ROA spektra vybraných aminokyselin, peptidů a polypeptidů a na základě provedených výpočtů je detailně interpretovat.

Výše formulované cíle orientovaly dizertační práci v souladu s cíli výzkumného záměru MSM 113200001 „Fyzika biologických systémů a syntetických makromolekulárních struktur“, který byl řešen v letech 1999 až 2004, a výzkumného záměru MSM0021620835 „Fyzika molekulárních, makromolekulárních a biologických systémů“ řešeného od roku 2005. V letech 2001-2003 byl tento výzkum také podporován grantovým projektem GA203/01/0031 „Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako stereochemické sondy pro vodné prostředí“ (řešitel Petr Bouř, spoluřešitel Vladimír Baumruk). V roce 2005 byla tato dizertační práce podpořena projektem GAUK 221/2005 „Ramanova optická aktivita peptidů a proteinů“ (řešitel Josef Kapitán).

## 2. Ramanova optická aktivita - přehled současného stavu

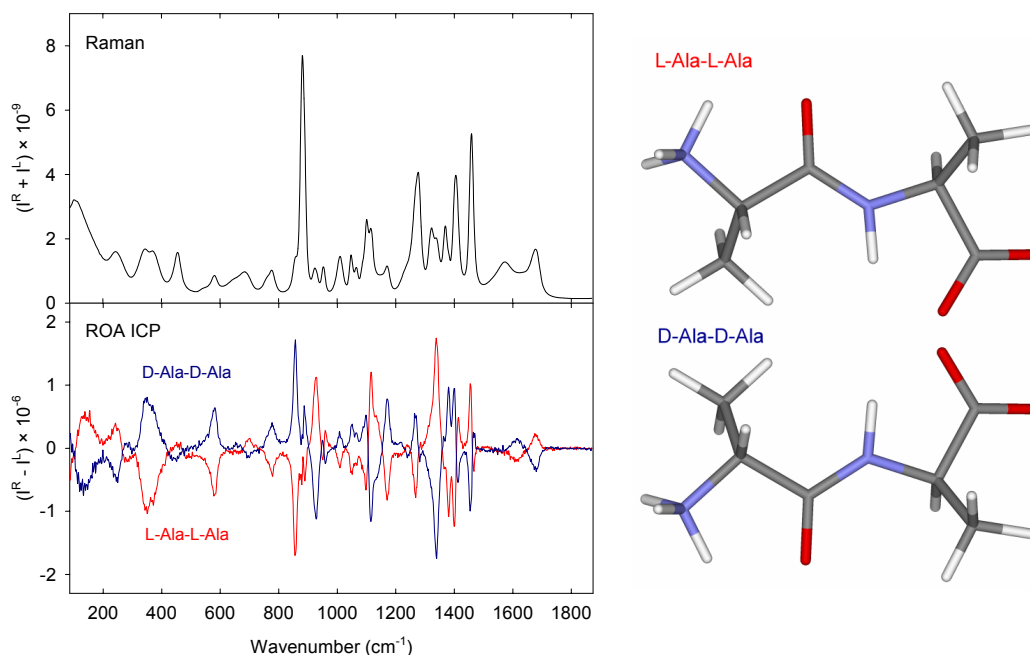
Ramanův rozptyl je neelastický rozptyl záření a tedy ze své podstaty dvoufotonový proces, který se vyznačuje navíc poměrně malým účinným průřezem (z  $10^6$  rozptýlených fotonů je přibližně jen jeden rozptýlen neelasticky). Ramanova optická aktivita spočívá v měření rozdílu mezi Ramanovými spektry spojenými s odpovídajícím pravo- (RCP) nebo levotočivě kruhově polarizovaným zářením (LCP) (ať už jde o záření budící nebo rozptýlené). Tento rozdíl je však o 3 až 5 řádů menší než součet Ramanových spekter, z čehož vyplývá nutnost velmi přesné modulace mezi oběma kruhově polarizovanými stavy. Výsledkem měření jsou vždy dvě spektra – vlastní ROA, tedy diferenční spektrum  $I(RCP) - I(LCP)$  a zdrojové Ramanovo spektrum  $I(RCP) + I(LCP)$ . RCP i LCP záření stejně jako oba enantiomery chirální molekuly vykazují vzhledem ke svým protějškům zrcadlovou symetrii. Jestliže je pro enantiomer (+) definována optická aktivita jako  $\Delta I(+) = I_R(+) - I_L(+)$ , ze zrcadlové symetrie plyne, že opačné spektrum optické aktivity získáme, použijeme-li opačný enantiomer (-), tedy  $\Delta I(-) = -\Delta I(+) = I_R(-) - I_L(-)$ . Právě citlivost optické aktivity k zrcadlově symetrickým vztahům mezi enantiomery chirálních molekul je zdrojem její pozoruhodné schopnosti specifikovat absolutní stereochemické vlastnosti chirálních molekul v roztoku (viz obr. 2.1).

Vibrační spektrum  $N$ -atomové nelineární molekuly obsahuje  $3N - 6$  fundamentálních pásů, z nichž každý je spjat s jedním normálním vibračním módem a každý nese informaci o konformaci a absolutní konfiguraci té části struktury, která se dané normální vibrace účastní.

Vibrační optická aktivita sonduje stereochemii molekulárního skeletu přímo, zatímco elektronová optická aktivita sonduje stereochemii pouze nepřímo prostřednictvím chromoforu. Enormní nárůst stereochemické informace obsažené ve spektru vibrační optické aktivity tak představuje jeho hlavní výhodu ve srovnání se spektrem elektronového cirkulárního dichroismu (ECD).

Pomocí Ramanovy i ROA spektroskopie lze snadno zachytit vibrační spektra látek rozpuštěných ve vodě v celém rozsahu fundamentálních vlnočtů, což je velká výhoda oproti infračerveným absorpčním technikám. Na rozdíl od VCD, které je zpravidla pro biologické vzorky rozpuštěné ve vodě omezeno na relativně úzký spektrální obor (např. oblast amidu I a II tj.  $1450-1750 \text{ cm}^{-1}$  u peptidů a proteinů), v případě ROA není problém změřit v jednom

experimentu celý široký spektrální obor (v našem případě  $100\text{-}2350\text{ cm}^{-1}$ ). Přírodným objektem zájmu ROA jsou téměř všechny flexibilní, biologicky významné molekuly.

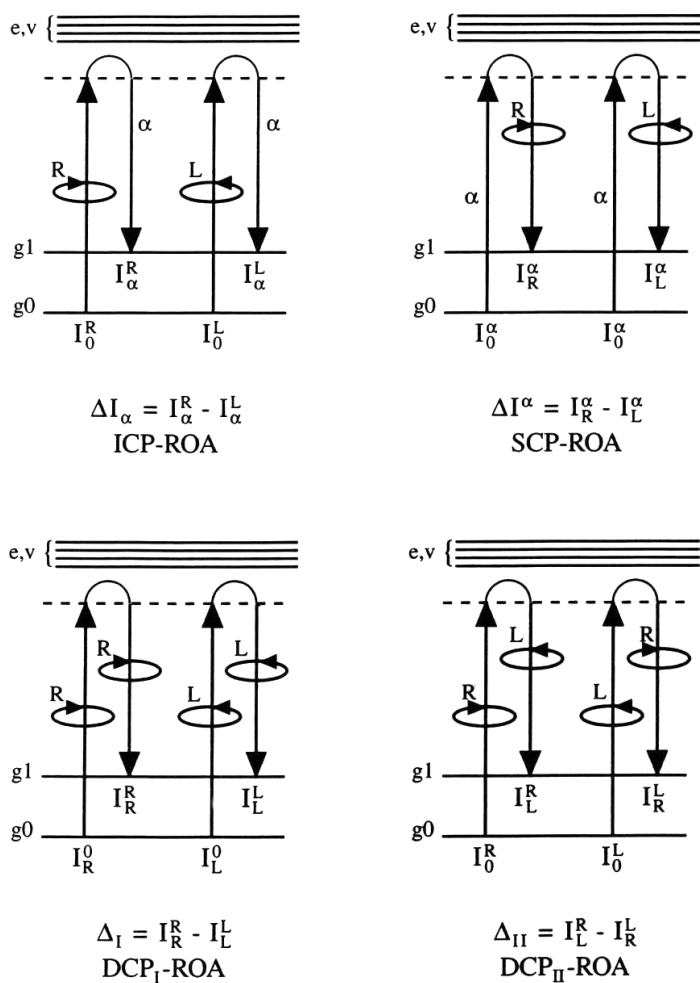


**Obr. 2.1:** Zrcadlová symetrie dvou enantiometrů alanyl-alaninu a jejich spojitost k zrcadlové symetrii ROA spekter.

## 2.1 Experimentální přístupy k měření ROA

Ramanova optická aktivita je spojena s kvantovým přechodem mezi stejnou dvojicí stavů jako při vibračním cirkulárním dichroismu, což umožňuje přímé srovnání VCD a ROA spekter měřených ve stejném spektrálním oboru. Ramanův rozptyl je však dvoufotonový proces, a proto je ROA ve srovnání s VCD komplikovanější, jak teoreticky, tak experimentálně.<sup>1</sup>

Při praktickém experimentálním uspořádání je tak možno volit geometrii rozptylu a modulační schéma, to jest polarizaci dopadajícího a rozptýleného záření. Geometrie rozptylu je charakterizována úhlem mezi dopadajícím a rozptýleným zářením; zpravidla měříme přímý ( $0^\circ$ ), pravoúhlý (nejčastěji užívaný v normální Ramanově spektroskopii,  $90^\circ$ ) anebo zpětný ( $180^\circ$ ) rozptyl. Pokud jde o modulační schéma, můžeme volit z několika přístupů k měření spekter ROA podle toho, do které fáze rozptylového procesu vstupuje kruhová polarizace (viz obr. 2.2).



**Obr. 2.2:** Diagram energetických hladin molekuly a polarizačních stavů dopadajícího a rozptýleného záření u čtyř základních modulačních schémat používaných v ROA. Stokesův proces je znázorněn pro přechody mezi vibračními stavy  $g_0$  a  $g_1$  základního elektronového stavu s virtuálním vibronickým stavem označeným přerušovanou čarou. Podle přijaté konvence se horní index vztahuje k polarizaci budícího záření a dolní index k polarizaci rozptýleného záření.

Principiálně nejjednodušší formou ROA je metoda ICP (incident circular polarization), která je založena na modulaci polarizace budícího záření. V tomto případě potom detekujeme buď polarizované nebo depolarizované případně veškeré rozptýlené záření.

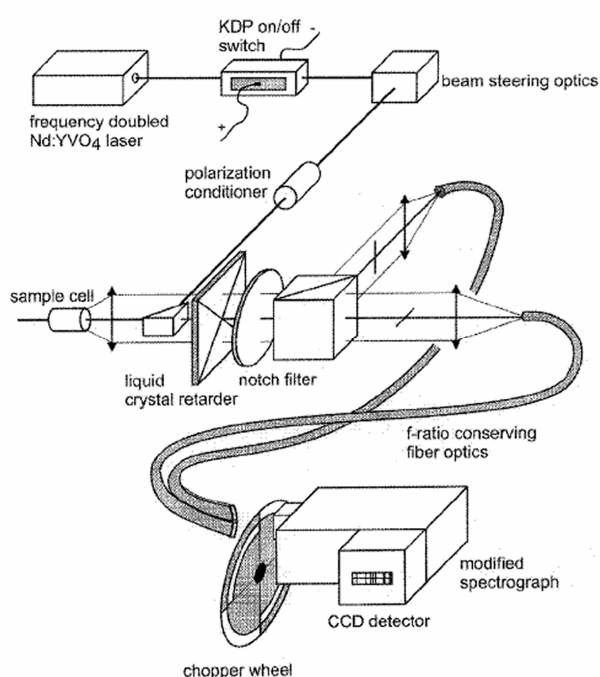
Další formou ROA je metoda SCP (scattered circular polarization) u níž je rozptyl buzen lineárně polarizovaným zářením a detekuje se přítomnost pravo- a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření. U metod DCP<sub>I</sub> a DCP<sub>II</sub> (dual circular polarization) je kruhově polarizované zářením budící a v rozptýleném záření detekujeme přítomnost kruhově polarizované složky se shodným (DCP<sub>I</sub>) respektive opačným (DCP<sub>II</sub>) smyslem kruhové polarizace.

Vibrační optická aktivita byla teoreticky předpovězena na konci 60. let.<sup>2</sup> První úspěšná měření ROA byla provedena v roce 1972 L.D. Barronem<sup>3</sup> na zařízení používajícím pravoúhlou geometrii, modulaci budícího záření (ICP) a skenovací spektrometr.

Z teorie ROA vyplývá, že geometrie zpětného rozptylu je z hlediska získaného poměru signál/šum nejpříznivější. Až do roku 1999 se zdálo, že nejvýhodnější je i ICP modulace, na níž byly založeny spektrometry vybudované na Univerzitě v Glasgow ve skupině profesora Barrona.<sup>4,5</sup> Tyto spektrometry umožňují měření širokého spektra látek od jednoduchých až po komplexní systémy jako jsou např. viry. Podle tohoto zařízení byl v letech 1995-97 vybudován spektrometr na Fyzikálním ústavu MFF UK.<sup>6</sup> Na odlišné strategii byla založena aparatura na Univerzitě v Syracusách,<sup>7,8</sup> kde bylo využito pro nastavení polarizačních stavů jedné nebo dvou čtvrtvlnových destiček. Z experimentálního hlediska je mnohem flexibilnější, neboť umožňuje měření v geometrii přímého, pravoúhlého i zpětného rozptylu všechny formy ROA (ICP, SCP, DCP<sub>I</sub> a DCP<sub>II</sub>). Toto zařízení bylo podrobně popsáno v práci<sup>7</sup> pro pravoúhlé SCP uspořádání a další vylepšené zařízení využívající zpětného rozptylu a DCP<sub>I</sub> je popsáno např. v práci.<sup>9</sup> ROA signál je pro DCP<sub>I</sub> a ICP stejný, zatímco odpovídající Ramanova spektra jsou rozdílná, neboť zatímco v ICP měříme totální rozptyl, v DCP<sub>I</sub> měříme pouze anizotropní rozptyl a v Ramanově spektru tedy chybí polarizované pásy. Z toho vyplývá i výhoda DCP<sub>I</sub> strategie, protože příslušná ROA spektra nejsou tolik náchylná ke vzniku polarizačních artefaktů projevujících se především pro silně polarizované pásy. Díky jistým experimentálním omezením však toto zařízení poskytuje asi o řád slabší ROA signál než aparatura zbudovaná v Glasgow a v minulosti byla použita pouze pro studium chirálních kapalin, aminokyselin a jednoduchých peptidů, které je možno připravit vysoce koncentrované vzorky.

K převratu v designu ROA experimentu došlo v roce 1999 publikováním originální konstrukce Dr. Huga<sup>10</sup> (viz obr. 2.3) umožňujícím měřit v SCP nebo DCP modulaci. Spektrometr je navržen tak, aby bylo možno zaznamenávat současně pravo- a levotočivě kruhově polarizovanou složku v rozptýleném záření. Tím je automaticky odečtena šumová složka vznikající tepelnými fluktuacemi ve vzorku, malým residuálním kolísáním stability laseru (způsobeným např. průchodem prachové částice laserovým svazkem) apod., tzv. "flicker noise". Šum je v tomto případě jen čistě statistické povahy a je možno ho vyhlazovacími procedurami (např. Savitzky-Golayovým algoritmem) minimalizovat. To představuje obrovskou výhodu oproti ROA spektrometrům měřícím obě odečítané komponenty v různých časech, neboť zde má šum jinou charakteristiku a není možno jej odstranit bez ztráty kvality spekter (o tomto problému bude podrobněji pojednáno ve 4. kapitole). I přes to, že se jedná o zařízení velice složité, byla v roce 2002 firmou BioTools Inc. uvedena na trh jeho komerční

verze, spektrometr ChiralRAMAN. Přístroj také využívá pokročilé techniky na potlačování artefaktů založené na vytváření "virtuálních enantiomerů".<sup>11</sup> Toto otevírá použití této dosud mimořádně experimentálně náročné spektroskopické metody širokému spektru uživatelů. Vysoce kvalitní spektra proteinů o objemu vzorku ~30  $\mu$ l, koncentraci ~30 mg/ml a výkonu laseru na vzorku ~500 mW je možno na tomto zařízení získat během cca 2 až 5 hodin<sup>12</sup> (což je zhruba desetkrát kratší čas než u našeho ICP přístroje či ROA spektrometru v Glasgow). Je však třeba poznamenat, že měření není patrně rutinní záležitostí ani na těchto spektrometrech neboť od uvedení přístroje na trh dosud nebyly publikovány žádné výsledky z jiných skupin než z Glasgow.<sup>12</sup>



**Obr. 2.3:** Schéma ROA přístroje umožňující současné měření pravo- i levotočivě kruhově polarizované složky rozptýleného záření. Dělené kolo (chopper wheel) na vstupu spektrografu je použito pouze u DCP varianty experimentu (není třeba u SCP). Převzato z práce.<sup>10</sup>

## 2.2 Molekulární systémy studované pomocí ROA

Soubor normálních vibračních módů s příspěvkem vibračních souřadnic postranních řetězců i hlavního řetězce molekuly může být velice komplikovaný. Velkou výhodou ROA metody je, že je schopna proniknout složitost vibračních spekter, neboť nejsilnější ROA signály jsou často spojeny s vibracemi nejpevnějších a zároveň chirálních částí struktury, které určují danou konformaci molekuly (na rozdíl od konvenčního Ramanova rozptylu, kdy např. u proteinů dominují příspěvky od postranních řetězců). Základními aplikacemi ROA spektroskopie jsou: 1. určování absolutní konfigurace opticky aktivních molekul v roztoku, 2. měření enantiomerní

čistoty (analytická aplikace velmi zajímavá pro farmaceutický průmysl), 3. studium struktury biomolekul v roztoku.

### Jednoduché a organické molekuly

Velké množství jednoduchých chirálních látek bylo měřeno v počátcích ROA, a to buď ve formě čistých chirálních kapalin nebo koncentrovaných roztoků. Nejznámější jsou patrně studie terpenových organických kapalin *trans*-pinanu a  $\alpha$ -pinenu<sup>13-16</sup>. Tyto látky byly od počátku používány pro kalibraci a ladění ROA aparatury díky velkému ROA signálu. Skupina dr. Huga se složitými organickými látkami zabývá i v současnosti a pokouší se na nich testovat fundamentální aspekty chiralitě molekul a různé výpočetní aspekty ROA. Jmenujme např. studie (-)-(*M*)- $\sigma$ -[4]Helicenu<sup>17</sup>, (*4S*)-Galaxolidu<sup>18</sup>, (*4S*)-4-methylisochromanu a (*4S*)-izomeru Galaxolidu<sup>19</sup> a zvláště (*R*)-[H-2(1), H-2(2), H-2(3)]-neopentanu.<sup>20</sup>

Výzkum těchto "jednoduchých" (bench mark) systémů je tedy stále aktuální a spektra řady z nich nebyla doposud uspokojivě interpretována. Za všechny uvedme jen jeden příklad a to kyselinu vinnou<sup>21</sup> jako prototypu jednoduchých avšak flexibilních systémů.

Stručně zmiňme ještě jednu velkou skupinu látek, která se v současnosti opět dostává do centra pozornosti. Jde o sacharidy, které jsou pro ROA ideálními systémy, neboť poskytují informativní vibrační pásy v celém rozsahu fundamentálních vlnočtů. Pomocí ROA byla studována celá řada monosacharidů,<sup>22-24</sup> která poskytla základní databázi jejich rysů v ROA spektrech. Byla studována i řada di- a polysacharidů, u nichž je pro celkovou konfiguraci molekuly určující konformace glykosidické vazby C-O-C.<sup>25, 26</sup>

### Aminokyseliny

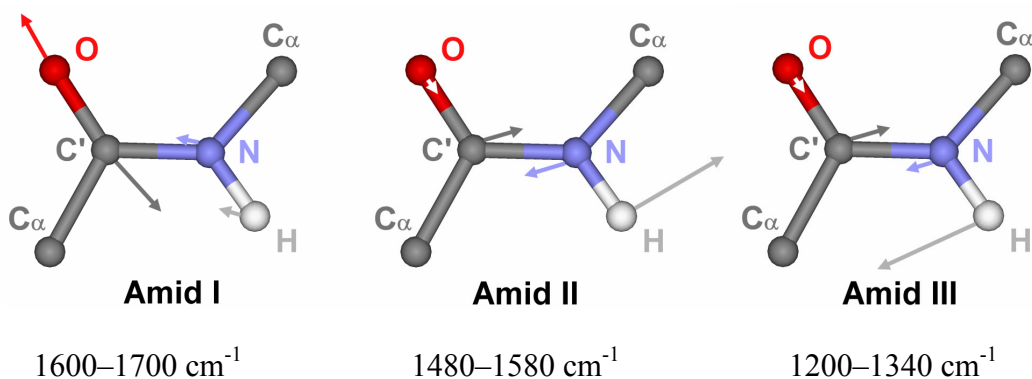
Bílkoviny živých organismů se skládají z 20 aminokyselin. Všechny kromě glycinu, který není chirální, se v přirozených bílkovinách vyskytují v L- formě. Aminokyseliny, vyskytující se ve vodných roztocích zpravidla ve formě podvojného iontu, obsahují dvě nabitě funkční skupiny: aminoskupinu ( $-\text{NH}_3^+$ ) a karboxylovou skupinu ( $-\text{COO}^-$ ), takže představují ideální modelový systém pro studium interakcí nabitých částí molekuly s rozpouštědlem.

Nejjednodušší chirální aminokyselina, L-alanin, je současně i nejčastěji se vyskytujícím zbytkem v proteinových řetězcích. Pro svoji jednoduchost a velmi dobrou rozpustnost ve vodě představuje alanin vhodný objekt jak pro ROA spektroskopii,<sup>27-29</sup> tak i pro modelování spekter

pomocí počítačových simulací.<sup>30-32</sup> Výzkumu alaninu se částečně věnována i tato práce. V literatuře lze nalézt ICP ROA spektra i jiných aminokyselin, jako L-serinu, L-systeinu, L-valinu, L-threoninu a L-isoleucinu.<sup>33</sup> Poněkud překvapivě dosud nebylo publikováno ROA spektrum L-prolinu.

## Peptidy a polypeptidy

Základním strukturním prvkem peptidů a proteinů je peptidová vazba. Jedná se o vazbu (C-N) mezi amidovou a karboxylovou skupinou dvou sousedních aminokyselin. Při spojení více aminokyselin tímto způsobem vzniká peptidový řetězec. Všechny šest atomů peptidové vazby (viz. obr. 2.4) leží přibližně v jedné rovině. Změna konformace hlavního řetězce je umožněna rotací rovin sousedních peptidových vazeb (se společným  $C_{\alpha}$ ) kolem vazeb C– $C_{\alpha}$  (úhel  $\psi$ ) a  $C_{\alpha}$ –N (úhel  $\phi$ ). Peptidové řetězce mohou vytvářet různé typy sekundárních struktur, jak je uvedeno v tab. 2.1.



**Obr. 2.4:** Schematické znázornění tvaru tří základních vibračních módů peptidové vazby, které hrají prvořadou roli při určování konformace proteinového řetězce metodami vibrační spektroskopie.

Vibrace atomů peptidové vazby odrážejí silové poměry a geometrii uspořádání hlavního řetězce a hrají tedy při určování konformace proteinového řetězce metodami vibrační spektroskopie prvořadou roli.<sup>34-37</sup> Schematické znázornění tří nejdůležitějších vibračních módů peptidové vazby, jejichž frekvence jsou citlivé ke struktuře hlavního polypeptidového řetězce bez ohledu na postranní řetězce, je znázorněn na obr. 2.4. Vibrace amidu II není v nerezonančních Ramanových spektrech pozorovatelná. Oblast amidu III se konvenčně udávala až do  $1300\text{ cm}^{-1}$ , studie skupiny prof. Barrona však ukazuje, že vlnčet těchto vibračních módů sahá až k  $1340\text{ cm}^{-1}$ .<sup>35, 36, 38</sup>



**Tab. 2.1:** Základní typy sekundárních struktur.<sup>39</sup>

Typ sekundární struktury	Torzní úhel (°)			Počet jednotek na jednu obrátku	Stoupání na aminokyselinovou jednotku [Å]
	$\phi$	$\psi$	$\omega$		
antiparalelní $\beta$	-139	135	-178	2.0	3.4
paralelní $\beta$	-119	113	180	2.0	3.2
$\alpha$ -helix	-57	-47	180	3.6	1.5
$3_{10}$ -helix	-49	-26	180	3.0	2.0
$\pi$ -helix	-57	-70	180	4.4	1.15
polyprolin I helix	-83	158	0	3.33	1.9
polyprolin II helix	-78	149	180	3.0	3.12

Studium peptidů přirozeně představuje nezbytný mezikrok k pochopení struktury bílkovin. Pomocí ROA byly studovány především jednoduché dipeptidy, u nichž bylo možné provádět *ab initio* simulace. Byly provedeny studie modelových látek jako *N*-acetyl-*N'*-methyl-L-alaninamid,<sup>40-42</sup> L-alanyl-L-alaninu<sup>31, 43-45</sup> a dalších látek, např. cyclo(L-Pro-L-Pro).<sup>46</sup>

Dále byla pomocí ROA studována závislost konformace alaninových oligopeptidů na délce řetězce (Ala<sub>2</sub> až Ala<sub>5</sub>), která ukázala, že s rostoucí délkou řetězce vzrůstá tendence k tvorbě levotočivého polyprolin II helixu (PPII).<sup>47</sup> Je známo, že homopolypeptidy poly(L-lysin) a poly(L-glutamová kyselina) mění svoji sekundární strukturu v závislosti na pH roztoku a teplotě. Slouží proto jako velmi vhodné modely základních typů sekundární struktury –  $\alpha$ -šroubovice,  $\beta$ -skládaného listu a náhodného klubka (random coil).<sup>34, 48-50</sup>

## Proteiny

Jak již bylo uvedeno, výhodou ROA je, že se do značné míry snižuje složitost vibračních spekter biopolymerů, neboť nejintenzivnější ROA signál odpovídá vibračním souřadnicím nejrigidnějších a chirálních částí struktury, což v případě proteinů znamená především vibrace peptidové páteře molekuly. Základní informace o postranních řetězcích je přitom obsažena v odpovídajícím Ramanově spektru. Další výhodou představuje krátkodosahovost interakcí odpovědných za generaci ROA signálu, takže pomocí ROA lze studovat (na rozdíl od ECD) i lokální struktury (vlásky,  $\beta$ -smyčky, krátké úseky šroubovic apod.).

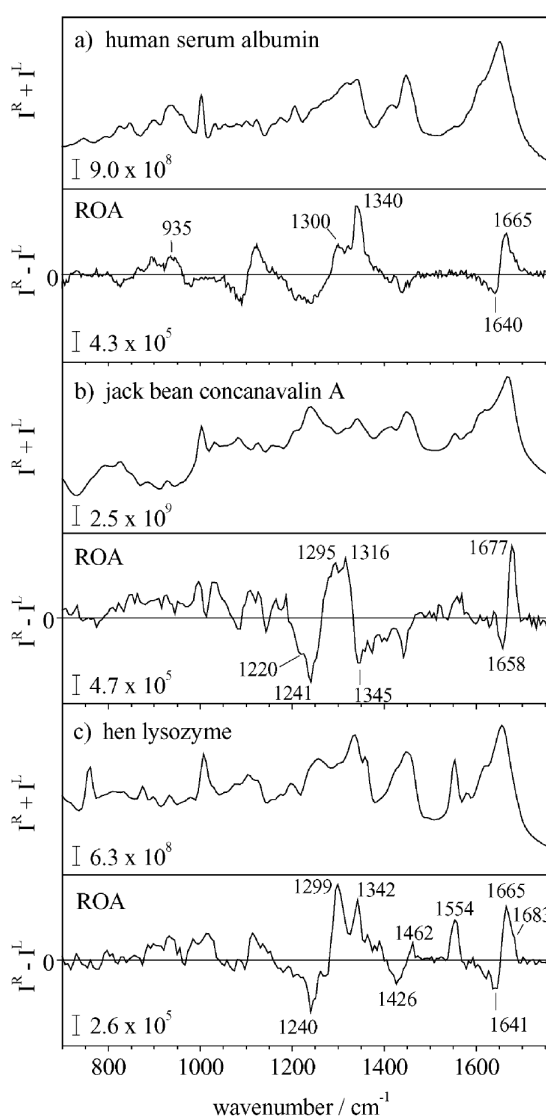
Vibrace hlavního peptidového řetězce molekuly je možno nalézt ve třech základních oblastech Ramanova spektra<sup>51, 52</sup>: (a) oblast valenčních vibrací páteře molekuly  $\sim 870$ – $1150\text{ cm}^{-1}$  pocházející převážně od valenčních vibračních souřadnic  $C_{\alpha}$ -C,  $C_{\alpha}$ -C $_{\beta}$  a  $C_{\alpha}$ -N,

(b) rozšířená oblast amidu III  $\sim 1230\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$  –  $C_{\alpha}\text{--N}$  a  $C_{\alpha}\text{--C}$  valenční vibrace kombinované s rovinnými deformačními vibracemi N–H a  $C_{\alpha}\text{--H}$  a (c) oblast amidu I  $\sim 1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  – převážně C=O valenční vibrace, viz. též obr. 2.4). Ukazuje se, že právě rozšířená oblast amidu III je pro určování struktury obzvláště důležitá, neboť díky interakcím mezi N–H a  $C_{\alpha}\text{--H}$  deformačními vibracemi zde pozorujeme řadu ROA pásů velmi citlivě odrážejících geometrii polypeptidového řetězce.

Na obr. 2.5a je uvedeno charakteristické Ramanovo a ROA spektrum albuminu z lidského séra jako typického zástupce proteinů s vysokým obsahem  $\alpha$ -helixu. Intenzivní kladný ROA pás  $1340\text{ cm}^{-1}$  je připisován hydratované formě  $\alpha$ -helixu, zatímco méně intenzivní kladný pás  $1300\text{ cm}^{-1}$   $\alpha$ -helixu v převážně hydrofobním prostředí.<sup>36</sup> Stejně pásy byly pozorovány i u jiných  $\alpha$ -helikálních polypeptidů a globulárních proteinů<sup>34, 53, 54</sup> a u proteinů obálky neporušených filamentárních bakteriofágů<sup>55</sup>. Relativní intenzita těchto pásů vypovídá o tom, nakolik je daný protein exponován do rozpouštědla. Dalším charakteristickým znakem  $\alpha$ -helixu je negativní  $1640\text{ cm}^{-1}$  a pozitivní  $1665\text{ cm}^{-1}$  ROA dublet v oblasti amidu I a dále pozitivní pásy v oblasti  $870\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ .

Na obr. 2.5b jsou uvedena spektra konkanavalinu A jako typického zástupce proteinu s vysokým obsahem  $\beta$ -struktury a minimálním obsahem  $\alpha$ -helixu (podle PDB krystalové struktury 2CNA 43,5%  $\beta$  skládaný list, 1,7%  $\alpha$ -helix, 1,3%  $3_{10}$ -helix, zbytek vlásenkové struktury a smyčky).  $\beta$ -strukturu lze přiřadit ostrý záporný pás  $1241\text{ cm}^{-1}$ , podobné pásy byly pozorovány i v ROA spektrech jiných proteinů s vysokým obsahem  $\beta$ -struktury,<sup>34, 36, 54</sup> ve kterých se občas vyskytuje jiný záporný pás  $1220\text{ cm}^{-1}$ , který je pravděpodobně dalším otiskem této struktury, s největší pravděpodobností hydratované. Pozitivní pás  $1295\text{ cm}^{-1}$  je možno u konkanavalinu A připsat vibracím  $\beta$ -smyček. Negativní-pozitivní ROA dublet amidu I  $1658\text{--}1677\text{ cm}^{-1}$  je také charakteristickým rysem  $\beta$ -struktur a lze jej snadno rozpoznat od pásů odpovídajících  $\alpha$ -helixu, které mají vlnočetu nižší o přibližně  $5\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ . Proteiny obsahující významnou část  $\beta$ -skládaného listu obsahují většinou také charakteristické pásy smyček a ohybů. Negativní pásy v oblasti  $1340\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$  odpovídají právě ohybům u  $\beta$ -vláseček. Tato oblast dovoluje rozlišit paralelní a antiparalelními  $\beta$ -skládané listy, neboť pouze antiparalelní většinou obsahují vlásenkové struktury (paralelní bývají spojeny převážně  $\alpha$ -helikálními strukturami). Mnoho proteinů obsahujících  $\beta$ -strukturu jeví v ROA spektrech silný pozitivní pás v oblasti  $1314\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$  stejně jako neuspořádané formy poly(L-lysinu) a poly(L-glutamové kyseliny)<sup>34, 49</sup>, a lze je přiřadit strukturu polyprolinu II.

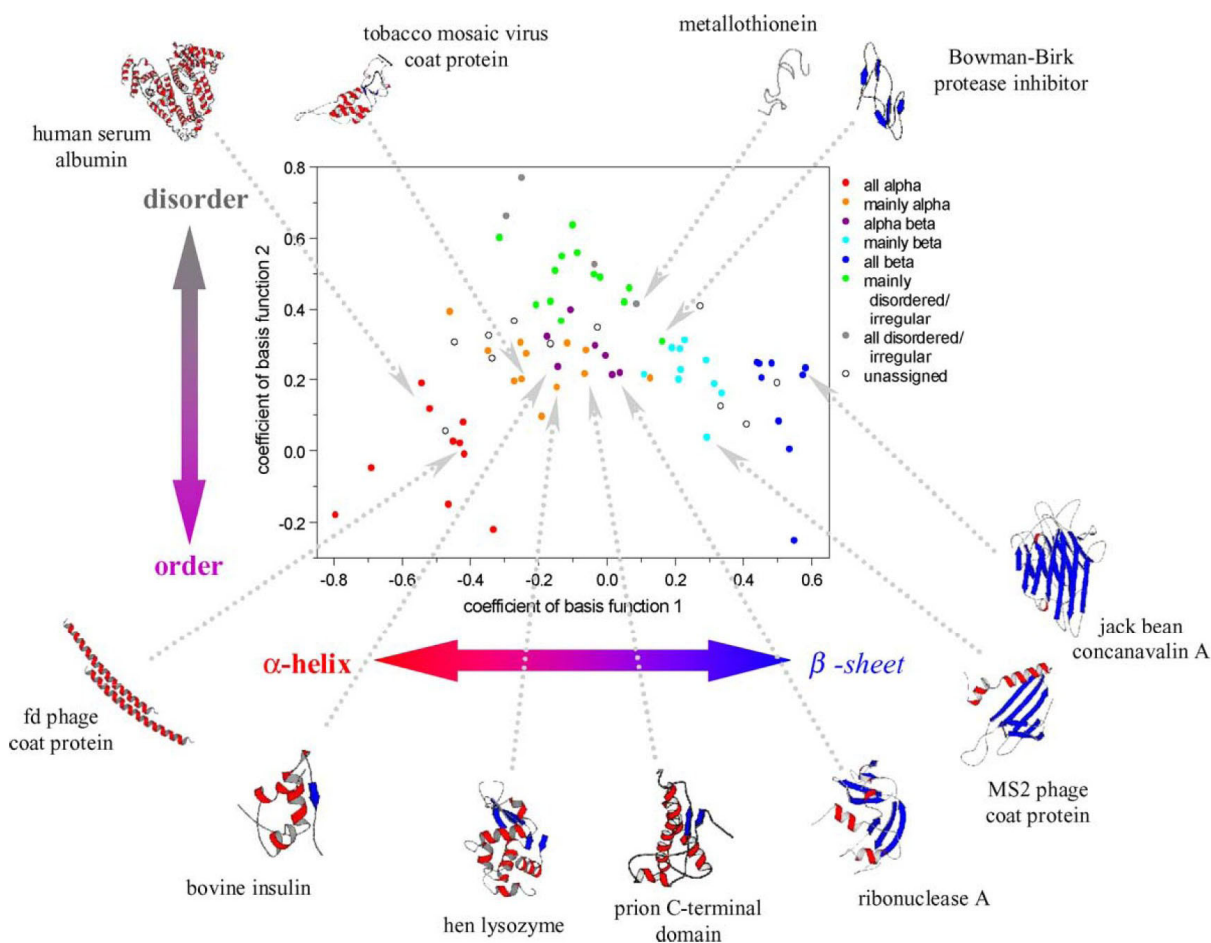
Na obr. 2.5c je uvedeno Ramanovo a ROA spektrum slepičího lysozymu jako typického  $\alpha\beta$  proteinu (podle PDB krystalové struktury 1lse 28,7%  $\beta$  skládaný list, 6,2%  $\alpha$ -helix, 10,9%  $3_{10}$ -helix) a spektrum také obsahuje charakteristické rysy obou těchto hlavních struktur. Do oblasti pásů 1297–1300  $\text{cm}^{-1}$  přispívají významnou měrou také vibrace  $3_{10}$ -helixu a pravděpodobně také pásy z jiných zdrojů, jejichž dekonvoluci se doposud nepodařilo provést.<sup>36</sup> Silný pozitivní pás 1554  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá vibračnímu módu W3 indolového kruhu tryptofanu, jehož poloha v Ramanových spektrech odráží velikost torzního úhlu  $|\chi^{2,1}|$  popisujícího orientaci tryptofanového postranního řetězce vzhledem k hlavnímu řetězci.<sup>56</sup> ROA k tomu přidává ještě možnost určit znaménko torzního úhlu a tedy získat o tomto postranním řetězci kompletní stereochemickou informaci<sup>57</sup> dostupnou jinak pouze pomocí metod s atomárním rozlišením.



**Obr. 2.5:** Typická Ramanova a ROA spektra základních proteinových struktur. (a) albumin z lidského séra: převážně  $\alpha$ -šroubovice, (b) konkanavalin A z fazole:  $\beta$ -barelní a (c) slepičí lysozym: zastoupeny  $\alpha$  i  $\beta$  struktury. Převzato z publikace.<sup>58</sup>

Skupina prof. Barrona dále publikovala celou řadu prací zabývajících se neuspořádanými strukturami a rolí levotočivého polyprolin II helixu při misfoldingu. Toto téma je velice aktuální při studiu příčin vzniku degenerativních chorob zapříčiněných tvorbou plaků apod.<sup>36, 50, 53, 59-61</sup>

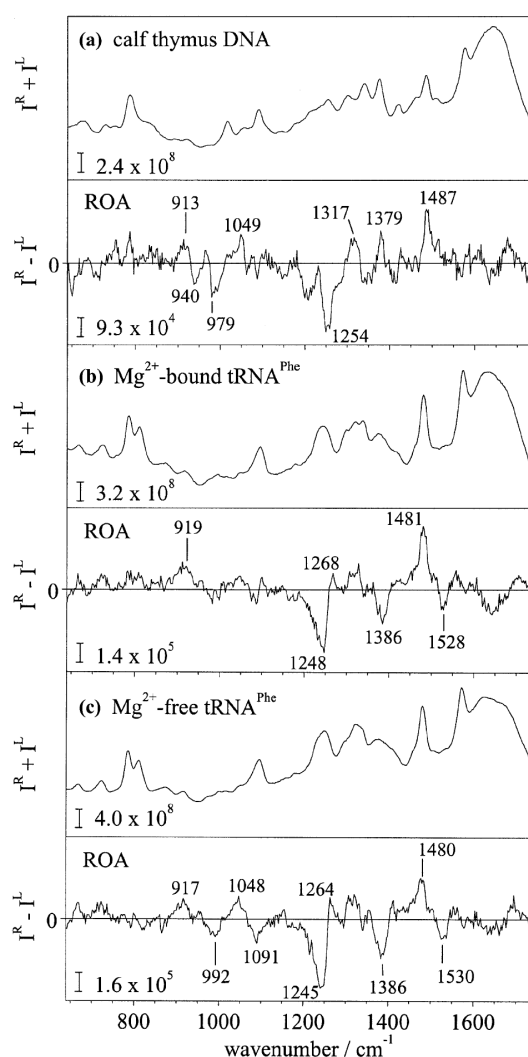
Na soubor naměřených ROA spekter je také možno aplikovat vhodné statistické metody jako např. analýzu hlavní komponenty<sup>12</sup> (principal component analysis, PCA), které umožňují rozpoznat hlavní společné a rozdílné strukturální vztahy ve zpracovaných spektrech (obr. 2.6).



**Obr. 2.6:** Zobrazení závislosti prvních dvou nejvýznamnějších koeficientů z analýzy hlavní komponenty (PCA) souboru 75 ROA spekter polypeptidů, proteinů a virů. Z obrázku se zřejmá jasná separace jednotlivých typů sekundárních struktur respektive shlukování strukturálně blízkých proteinů. Koeficient 1 dobře popisuje přechod od vysokého obsahu  $\alpha$ -šroubovice (vlevo) k vysokému obsahu  $\beta$ -skládaného listu (vpravo), koeficient 2 zase přechod od silně uspořádaných struktur (dole) k silně neuspořádaným (nahore). Převzato z práce.<sup>58</sup>

## Nukleové kyseliny

Řešení struktury a funkce nukleových kyselin je jedním z centrálních témat molekulární biologie. Studium nukleových kyselin pomocí ROA je v současnosti stále v počátcích. Z doposud provedených měření se ukazuje, že ROA je citlivá tři různé zdroje v chirálním uspořádání nukleových kyselin: (a) chirální stohování jinak nechirálních párů bází, (b) chirální povaha glykosidické vazby C-N mezi bází a cukrem a (c) vnitřní chiralita cukerných cyklů.<sup>62-66</sup>



**Obr. 2.7:** Typická Ramanova a ROA spektra vybraných nukleových kyselin. (a) dvoušroubovice DNA typu B: konformace cukrů C2'-endo, (b) tRNA v přítomnosti iontů Mg<sup>2+</sup> zaujímá kompaktní terciární strukturu tvaru písmene L: širší rozsah konformace cukrů, (c) tRNA bez přítomnosti iontů zaujímá volnou strukturu jetelového listu s převažující konformací cukrů C3'-endo. Převzato z práce.<sup>36</sup>

ROA pásy v oblasti ~900–1150 cm<sup>-1</sup> pocházejí od vibrací cukerných řetězců a fosfátové skupiny. Do oblasti ~1200–1550 cm<sup>-1</sup> přispívají vibrace cukrů i bází a nakonec oblast ~1550–

1750  $\text{cm}^{-1}$  obsahuje charakteristické pásy bazí odpovídající specifickému stohování (stacking). Typická spektra nukleových kyselin jsou uvedena na obr. 2.7. Spektra DNA (z telecího brzlíku) a obou RNA (tRNA<sup>Phe</sup>, phenylalanin specific transfer RNA, v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  iontů a bez nich) se liší nejvíce v oblasti cukerných řetězců, neboť DNA zaujímá dvoušroubovici typu B (konformace cukerného kruhu C2'-endo), zatímco tRNA dvojšroubovici typu A (konformace cukerného kruhu C3'-endo). Mezi ROA spektra obou RNA je rozdíl menší, liší ale také v oblasti vibrací cukr-fosfátového řetězce  $\sim 900\text{--}1150 \text{ cm}^{-1}$ . To lze vysvětlit tím, že tRNA v přítomnosti iontů  $\text{Mg}^{2+}$  zaujímá terciární strukturu tvaru písmene L a cukerné cykly zaujímají širší rozsah konformací (výsledný ROA signál je nízký), zatímco bez  $\text{Mg}^{2+}$  se vytváří otevřený útvar podobný jetelovému listu<sup>67</sup> s převažující C3'-endo konformací cukrů poskytující výrazný charakteristický ROA signál v oblasti vibrací cukr-fosfátového řetězce (negativní pás 992  $\text{cm}^{-1}$ , pozitivní 1048  $\text{cm}^{-1}$  a negativní 1091  $\text{cm}^{-1}$ ).

## Viry

Znalost struktury virů na molekulární úrovni je nesmírně důležitá pro pochopení mechanismu jejich působení. Konvenční Ramanova spektroskopie představuje velmi užitečnou metodu studia intaktních virů na molekulární úrovni, neboť může současně vyšetřovat jak proteinovou obálku tak i jádro obsahující nukleovou kyselinu.<sup>52</sup> ROA, jež může být použita pro zkoumání virů nejrůznějších typů včetně vláknitých, helikálních, tyčinkových a ikosahedrálních, potom svojí schopností proniknout složitostí zkoumané struktury jenom zvyšuje význam Ramanovy spektroskopie pro strukturní virologii. Dosud publikovaná ROA spektra různých virů, například vláknitého bakteriofágu fd, viru tabákové mozaiky, bakteriofágu MS2 a dalších<sup>55, 68, 69</sup> jenom potvrzují, že ROA jako velmi citlivá konformační sonda nejen poskytuje poměrně detailní strukturní informaci, jinými metodami pro vzorky v roztoku obtížně zjistitelnou, ale může být využita i pro srovnávací studie.<sup>68</sup> V ROA spektrech dominují pásy z proteinových obálek virů a pomocí statistických metod (PCA) je možno určit sekundární strukturu hlavních podjednotek,<sup>70</sup> rozsah hydratace  $\alpha$ -helixů, případně v příznivém případě i konformaci postranních řetězců tryptofanu (např. u bakteriofágu fd<sup>57</sup>) v obálkách virů. U mozaikového viru vigny (CPMV, cowpea mosaic virus) se odečtením ROA spektra prázdné kapsidy viru od spektra celého viru (což je přístup, který můžeme nazvat diferenční ROA) podařilo určit konformaci RNA jako jednovláknový A-typ<sup>70</sup>, což byla velmi cenná informace, kterou z rtg. krystalové struktury není možno získat.

### 3. Simulace spekter – Teorie Ramanovy optické aktivity

Metody citlivé na chiralitu molekul hrají důležitou roli v mnoha oblastech. Díky rozvoji *ab initio* výpočetních metod a počítačové techniky se však ukazuje, že na základě srovnání experimentálních dat VOA (u nichž je bohatý strukturní obsah vibrační spektroskopie ještě rozšířen o stereochemickou citlivost optické aktivity) s výsledky získanými pomocí teoretických simulací je možno určit absolutní konfiguraci molekuly v roztoku.<sup>71</sup>

Vždy je třeba mít na zřeteli, že v kvantově-chemických výpočtech existují omezení, která jednoznačné určení konformace (konformací) dané látky znesnadňují. Jde například o použití konečného souboru básových funkcí,<sup>72</sup> zanedbání anharmonických efektů a specifické interakce s rozpouštědlem.

V této kapitole jsou zmíněny metody používané při simulaci ROA spekter a řešení konformačně dynamických problémů u studovaných systémů.

#### 3.1 Born-Oppenheimerova aproximace a separace stupňů volnosti

Schrödingerovu rovnici pro vlnovou funkci molekuly v nerelativistickém přiblížení lze napsat jako

$$\hat{\mathbf{H}}^{TOT} \Psi_{N,n} = E_{N,n} \Psi_{N,n} , \quad (3.1)$$

v níž je celkový Hamiltonián  $\hat{\mathbf{H}}^{TOT}$  definován jako

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{H}}^{TOT} &= \hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{R}}^{nuc} + \hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{r}}^{el} + V(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \\ \hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{R}}^{nuc} &= -\frac{\hbar^2}{2} \sum_A \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 , \quad \hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{r}}^{el} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 , \\ V(\mathbf{r}, \mathbf{R}) &= \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B e^2}{R_{AB}} - \sum_A \sum_i \frac{Z_A e^2}{r_{Ai}} + \sum_j \sum_{i>j} \frac{e^2}{r_{ij}} \end{aligned} \quad (3.2)$$

kde  $\mathbf{R}$  je poloha jader,  $\mathbf{r}$  poloha elektronů, indexy  $A$  a  $B$  číslovají jádra,  $i$  a  $j$  elektrony,  $\hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{R}}^{nuc}$  je operátor kinetické energie jader,  $\hat{\mathbf{T}}_{\mathbf{r}}^{el}$  operátor kinetické energie elektronů a  $V(\mathbf{r}, \mathbf{R})$  je potenciální energie zahrnující interakci mezi jádry  $A$  a  $B$  s atomovými čísly  $Z_A$  a  $Z_B$ , mezi jádry a elektrony a mezi elektrony navzájem. Předpokládejme, že je možno celkovou vlnovou funkci rozdělit na součin vlnové funkce jader a elektronů:

$$\Psi_{N,n}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \chi_N^{nuc}(\mathbf{R})\psi_n^{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (3.3)$$

kde  $n$  a  $N$  jsou kvantová čísla pro jádra a elektrony a poloha jader. Elektrony jsou mnohem lehčí než jádra (v případě vodíku 1822×) a v (3.1) je tedy možno zanedbat člen

$$\sum_A \frac{1}{M_A} [\nabla_A^2 \psi_n^{el} + 2(\nabla_A \psi_n^{el}) \cdot (\nabla_A \chi_N^{nuc})], \quad (3.4)$$

což je podstatou Born-Oppenheimerovy aproximace. Potom můžeme Schrödingerovu rovnici separovat na jadernou a elektronovou část. V elektronové části Schrödingerovy rovnice pak vystupuje poloha jader  $\mathbf{R}$  pouze jako parametr:

$$[\hat{\mathbf{T}}_r^{el} + V(\mathbf{r}, \mathbf{R})]\psi_n^{el} = \varepsilon_n(\mathbf{R})\psi_n^{el}. \quad (3.5)$$

Je-li elektronový problém vyřešen, Schrödingerovu rovnici pro jadernou část  $\chi_N^{nuc}(\mathbf{R})$  je možno napsat jako

$$[\hat{\mathbf{T}}_R^{nuc} + \varepsilon_n(\mathbf{R})]\chi_N^{nuc}(\mathbf{R}) = E_{n,N}\chi_N^{nuc}(\mathbf{R}), \quad (3.6)$$

v níž se elektronová energie  $\varepsilon_n(\mathbf{R})$ , která už v sobě zahrnuje repulzi jader, stává potenciálem pro pohyb jader.

Pro  $N$  jader zahrnuje Schrödingerova rovnice pro jádra (3.6)  $3N$  stupňů volnosti, které můžeme pro nelineární molekuly (na které se dále omezíme) rozdělit na 3 translační, 3 rotační a  $3N - 6$  vibračních. Při řešení problému jader je dále vhodné translační, rotační a vibrační stupně volnosti oddělit. Separaci translačního pohybu je možno udělat jednoduše, neboť  $\hat{\mathbf{H}}^{TOT}$  je translačně invariantní, transformací počátku do těžiště molekuly je možno z celkové kinetické energie oddělit translační pohyb molekuly jako celku. Separace rotačního pohybu je možná jen přibližně (např. díky Coriolisovým silám). Pro velké molekuly s velkým momentem hybnosti, jako jsou biologické molekuly, je to však dostatečně dobré přiblížení.<sup>73</sup>

Souřadnou soustavu svázanou s molekulou zpravidla volíme pomocí Eckartových podmínek. První a druhá Eckartova podmínka specifikuje, že při pohybu jader nevzniká celkový translační nebo rotační pohyb:

$$\sum_{A=1}^N m_A \Delta \mathbf{R}_A = 0, \quad \sum_{A=1}^N m_A \mathbf{R}_A^0 \times \Delta \mathbf{R}_A = 0, \quad (3.7)$$

kde  $\mathbf{R}_A^0$  je rovnovážná poloha jádra  $A$  a  $\Delta \mathbf{R}_A$  jeho vibrační odchylka. Podrobnou diskuzi o separaci vibračního a rotačního pohybu lze nalézt např. v monografii.<sup>73</sup>



### 3.2 Harmonická aproximace a zavedení normálních vibračních módů

Potenciál pro pohyb jader  $\varepsilon_n(\mathbf{R})$  v rovnici (3.6) je možno rozvinout do Taylorovy řady:

$$\begin{aligned} \varepsilon_n(\mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_N) = & \varepsilon(\mathbf{R}_1^0, \dots, \mathbf{R}_N^0) + \sum_{\alpha=x,y,z} \sum_{J=1}^N \frac{\partial \varepsilon}{\partial R_{J,\alpha}} (R_{J,\alpha} - R_{J,\alpha}^0) + \\ & + \frac{1}{2} \sum_{\alpha,\beta=x,y,z} \sum_{J,K=1}^N \frac{\partial^2 \varepsilon}{\partial R_{J,\alpha} \partial R_{K,\beta}} (R_{J,\alpha} - R_{J,\alpha}^0)(R_{K,\beta} - R_{K,\beta}^0) + \dots \end{aligned} \quad (3.8)$$

První člen je možno položit rovno nule, pro rovnovážnou polohu jader je i  $\partial \varepsilon / \partial R$  rovno nule, první nenulový člen je až kvadratický. V harmonické aproximaci zanedbáváme všechny další členy, takže je možno vibrační část Schrödingerovy rovnici jader napsat jako

$$\hat{\mathbf{H}}_{\text{VIB}} \phi_n(\mathbf{R}) = \left[ -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{3N} \frac{1}{M_i} \frac{\partial^2}{\partial X_i^2} + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} f_{ij}^n \Delta X_i \Delta X_j \right] \phi_n(\mathbf{R}) = E_n \phi_n(\mathbf{R}), \quad (3.9)$$

kde

$$f_{ij}^n = \frac{\partial^2 \varepsilon_n}{\partial X_i \partial X_j} \quad (3.10)$$

je kartézská silová konstanta, prvek v matici silového pole (FF - Hessián). Rovnici (3.9) je možno vyřešit transformací kartézských souřadnic do normálních módů  $Q_k$ :

$$Q_k = \sum_{j=1}^{3N} S_{kj}^{-1} \Delta X_j, \quad k = 1, 2, \dots, 3N, \quad (3.11)$$

takže

$$\sum_{i,j=1}^{3N} f_{ij}^n \cdot \Delta X_i \Delta X_j = \sum_{k=1}^{3N} \omega_k^2 Q_k^2 \quad \text{a} \quad \sum_{i=1}^{3N} \frac{1}{m_i} \frac{\partial^2}{\partial X_i^2} = \sum_{k=1}^{3N} \frac{\partial^2}{\partial Q_k^2} \quad (3.12)$$

a vibrační hamiltonián v rovnici (3.9) bude možno napsat jako

$$\hat{\mathbf{H}}_{\text{VIB}} = \sum_{j=1}^{3N} \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2}{\partial Q_j^2} + \omega_j^2 Q_j^2 \right) = \sum_{j=1}^{3N} \hat{\mathbf{H}}_j \quad (3.13)$$

Rovnice (3.11) definuje  $3N$  normálních módů  $Q$ , zatímco vibračních stupňů volnosti je pouze  $3N - 6$ . Pro módy odpovídajících translacím a rotacím je však  $\omega_k = 0$ . Celkovou vlnovou funkci z rovnice (3.6) je možno vyjádřit jako součin vlnových funkcí závislých na jedné normální vibrační souřadnici

$$\psi_n = \prod_{j=1}^{3N-6} \phi_j(Q_j) \quad (3.14)$$

a jednotlivé rovnice, na něž se Schrödingerova rovnice rozpadne budou:

$$\hat{\mathbf{H}}_j \varphi_j = \left( \frac{1}{2} + n_j \right) \hbar \omega_j \varphi_j. \quad (3.15)$$

S-matici definovanou v rovnici (3.11) obdržíme tak, že spočteme matici silového pole (3.10) a tu pak diagonalizujeme, takže S-matici lze vypočíst ze vztahů (3.11) a (3.12).

### 3.3 Teorie Ramanovy optické aktivity

V tomto oddíle budou uvedeny výrazy nutné pro popis různých forem ROA. Na počátku je nutno uvést výraz pro intenzitu  $I$  Ramanova rozptylu souboru molekul, jejichž referenční poloha pro roztok je zprůměrována přes všechny možné orientace vzhledem k laboratorní soustavě. Polarizační vektory budícího a rozptýleného záření se vztahují k laboratorní soustavě a označme je  $\mathbf{e}^i$  a  $\mathbf{e}^d$ . Potom je

$$I(\tilde{\mathbf{e}}^d, \tilde{\mathbf{e}}^i) = 90K \left\langle \left| \tilde{\mathbf{e}}_\alpha^{d*} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{\mathbf{e}}_\beta^i \right|^2 \right\rangle, \quad (3.16)$$

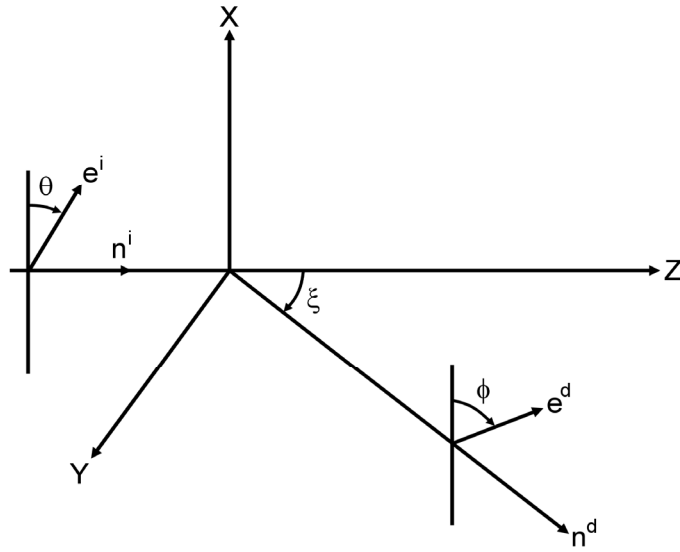
kde dolní indexy označují kartézské složky tenzorů (používáme Einsteinovu sumační konvenci, vlnovka značí komplexní číslo). Lomené závorky značí středování přes rotace molekuly, konstanta  $K$  je

$$K = \frac{1}{90} \left( \frac{\omega^2 \mu_0 \tilde{E}^{(0)}}{4\pi R} \right)^2, \quad (3.17)$$

kde  $\omega$  je úhlová frekvence rozptýleného světla,  $\mu_0$  je magnetická permeabilita,  $\tilde{E}^{(0)}$  je velikost vektoru elektrického pole budícího záření a  $R$  je vzdálenost od bodu rozptylu k detektoru. Měřit absolutní hodnotu intenzity Ramanova rozptylu je ale velmi obtížné, proto se často místo faktoru  $K$  používá jiná vhodná konstanta. Ve výrazu (3.16) je uvedena komplexně sdružená hodnota polarizačního vektoru rozptýleného fotonu, neboť reprezentuje emisi a nikoliv absorpci. Obecný výraz pro komplexní Ramanovův rozptylový tenzor  $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$  se skládá z tenzoru elektrické dipólové polarizovatelnosti a dále pak tenzorů Ramanovy optické aktivity (kvadrupólová a magnetická polarizovatelnost):<sup>74</sup>

$$\tilde{\alpha}_{\alpha\beta} = \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} + \frac{1}{c} \left[ \varepsilon_{\gamma\delta\beta} n_\delta^i \tilde{\mathcal{G}}_{\alpha\gamma} + \varepsilon_{\gamma\delta\alpha} n_\delta^d \tilde{\mathcal{G}}_{\gamma\beta} + \frac{1}{3} (\omega_0 n_\gamma^i \tilde{\mathcal{A}}_{\alpha,\gamma\beta} - \omega n_\gamma^d \tilde{\mathcal{A}}_{\beta,\gamma\alpha}) \right], \quad (3.18)$$

kde  $\varepsilon_{\gamma\delta\alpha}$  je Levi-Civitův jednotkový antisymetrický tenzor třetího řádu,  $\omega_0$  je úhlová frekvence budícího záření a  $\mathbf{n}^i$  a  $\mathbf{n}^d$  jsou vektory šíření budícího, resp. rozptýleného záření. Zde uvedený obecný výraz rozlišuje roli vstupujícího a rozptýleného fotonu a je ho tedy možno použít i v případě rezonančního a prerezonančního Ramanova rozptylu.<sup>1</sup>



**Obr. 3.1:** Diagram geometrie rozptylu, kde  $\xi$  je úhel rozptylu (měřeno od směru šíření dopadajícího svazku), úhly  $\theta$  a  $\phi$  jsou úhly polarizace (hlavní osy polarizační elipsy) pro dopadající a rozptýlené záření.

Tenzory uvedené v rovnici (3.18) jsou tedy: tenzory elektrické dipolové polarizovatelnosti ( $\alpha$ ), magnetické dipólové-elektrické dipólové optické aktivity ( $\tilde{G}_{\alpha\beta}, \tilde{\mathcal{G}}_{\alpha\beta}$ ), elektrické dipólové-elektrické kvadrupólové polarizovatelnosti ( $\tilde{A}_{\alpha,\beta\gamma}, \tilde{\mathcal{A}}_{\alpha\beta}$ ):

$$\alpha_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[ \frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right] \quad (3.19a)$$

$$\tilde{G}_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[ \frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{m}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{m}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right] \quad (3.19b)$$

$$\tilde{\mathcal{G}}_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[ \frac{\langle m | \hat{m}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{m}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right] \quad (3.19c)$$

$$\tilde{A}_{\alpha,\beta\gamma} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[ \frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right] \quad (3.19d)$$

$$\tilde{\mathcal{A}}_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[ \frac{\langle m | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right] \quad (3.19e)$$

kde  $\omega_{jn} = \omega_j - \omega_n$  a  $\omega_{jm} = \omega_j - \omega_m$  jsou úhlové přechodové frekvence mezi stavy  $j$  a  $n$  nebo  $m$ .  $\Gamma_j$  je šířka elektronové hladiny  $j$  a je nepřímo úměrná jeho době života. Počáteční stav je  $n$  a konečný  $m$ , takže  $\omega_{mn} = \omega_m - \omega_n$  značí změnu úhlové frekvence (Ramanův posuv). Operátory

elektrického dipólového, magnetického dipólového a elektrického kvadrupólového momentu jsou definovány jako:

$$\hat{\mu}_\alpha = \sum_k e_k r_{k\alpha}, \quad (3.20a)$$

$$\hat{m}_\alpha = \frac{1}{2} \sum_k \frac{e_k}{m_k} \epsilon_{\alpha\beta\gamma} r_{k\beta} p_{k\gamma}, \quad (3.20b)$$

$$\hat{\Theta}_{\alpha\beta} = \frac{1}{2} \sum_k e_k (3r_{k\alpha} r_{k\beta} - r_k^2 \delta_{\alpha\beta}), \quad (3.20c)$$

kde  $\delta_{\alpha\beta}$  je Kroneckerovo delta, sčítá se přes všechny částice v molekule, které mají náboj  $e_k$ , hmotnost  $m_k$ , polohový vektor  $\mathbf{r}_k$  a moment hybnosti  $\mathbf{p}_k$ . Označíme-li kartézské složky vektorů v laboratorní soustavě velkými římskými písmeny a složky v soustavě spojené s molekulou řeckými písmeny, pak je výraz pro výslednou intenzitu středovanou přes všechny možné orientace molekul v molekulární souřadné soustavě dán jako

$$I(\tilde{e}^{d*}, e^i) = 90K \left( \begin{array}{l} \text{Re}[\tilde{e}_A^{d*} \tilde{e}_B^i \tilde{e}_C^d \tilde{e}_D^{i*} \alpha_{\alpha\beta} \alpha_{\gamma\delta}^* \langle l_{A\alpha} l_{B\beta} l_{C\gamma} l_{D\delta} \rangle] + \\ + \frac{2}{c} \text{Im} \left\{ \tilde{e}_A^{d*} \tilde{e}_B^i \tilde{e}_C^d \tilde{e}_D^{i*} \alpha_{\alpha\beta} \left[ \begin{array}{l} n_D^i \left( i\epsilon_{\rho\delta\epsilon} \tilde{G}_{\gamma\rho}^* + \frac{1}{3} \omega_0 \tilde{A}_{\gamma,\delta\epsilon}^* \right) + \\ + n_D^d \left( i\epsilon_{\rho\delta\gamma} \tilde{G}_{\rho\epsilon}^* - \frac{1}{3} \omega \tilde{A}_{\epsilon,\gamma\delta}^* \right) \end{array} \right] \langle l_{A\alpha} l_{B\beta} l_{C\gamma} l_{D\delta} l_{E\epsilon} \rangle \right\} \end{array} \right) \quad (3.21)$$

kde symbol  $l_{A\alpha}$  je směrový kosinus mezi laboratorní souřadnicí  $A$  a souřadnicí v molekulové soustavě  $\alpha$ .

Ramanův rozptyl je dvoufotonový proces, intenzita Ramanova rozptylu  $I$  je tedy určena polarizačními stavy dopadajícího a rozptýleného fotonu (horní indexy  $i$  resp.  $j$ ). Pro elipticky (nebo lineárně) polarizované záření je úhel mezi hlavní polarizační osou a vertikálním směrem reprezentován úhlem  $\theta$  pro dopadající záření a úhlem  $\phi$  pro záření rozptýlené, úhel rozptylu je pak  $\xi$ , jak je znázorněno na obr. 3.1.

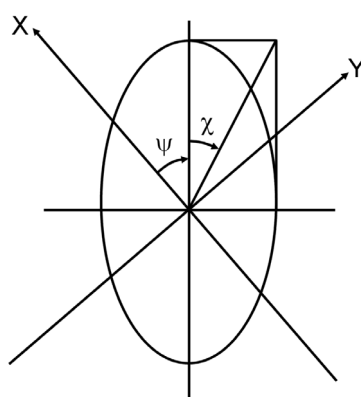
Intenzitu rozptýleného záření je pro danou geometrii a polarizační stavy záření možno vyjádřit několika různými způsoby. Dále je stručně nastíněn formalismus využívající Muellerovy matice. Intenzitu rozptýleného záření je dána jako:

$$I_d^i(\theta, \phi, \xi) = \frac{K}{2} \left( (\mathbf{S}^d)^T \cdot \mathbf{M} \cdot \mathbf{S}^i \right) = \frac{K}{2} \sum_{I,J=0}^3 S_I^d M_{IJ} S_J^i, \quad (3.22)$$

kde  $\mathbf{S}$  je Stokesův vektor a  $\mathbf{M}$  je Ramanova/ROA Muellerova matice. Čtyři komponenty Stokesova vektoru jsou dány jako

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ P \cos 2\chi \cos 2\psi \\ P \cos 2\chi \sin 2\psi \\ P \sin 2\chi \sin 2\psi \end{pmatrix}, \quad (3.23)$$

kde  $S_0$  je celková intenzita světelného svazku,  $P$  je stupeň polarizace od 0 do 1 a úhly  $\psi$  a  $\chi$  značí azimut a elipticitu podle definice na obr. 3.2.  $S_1$  reprezentuje rozdíl v intenzitě mezi vertikálně a horizontálně polarizovaným zářením,  $S_2$  reprezentuje rozdíl mezi zářením polarizovaným podél úhlů  $\pm 45^\circ$  a konečně  $S_3$  je rozdíl v intenzitě mezi pravo- a levotočivě kruhově polarizovaným zářením.



**Obr. 3.2:** Polarizační elipsa pro záření pohybující se ve směru osy Z. Úhel  $\psi$  je azimut a  $\chi$  elipticita.

Muellerova matice je matice  $4 \times 4$ , jejíž jednotlivé komponenty jsou složité výrazy a obsahují invarianty tenzorů polarizovatelnosti a optické aktivity (veličiny standardně používané v teorii Ramanova rozptylu<sup>74</sup>) a je možno je nalézt v literatuře<sup>1</sup>. V Muellerově matici dále vystupuje úhel rozptylu  $\xi$ .

Pro ICP ROA strategii realizovanou bez polarizace rozptýleného záření (označováno někdy jako "unpolarized" nebo "total" ICP) jsou Stokesovy vektory dány jako<sup>1</sup>:

$$S^i = (1 \ 0 \ 0 \ \pm 1)^T \quad S^d = (2 \ 0 \ 0 \ 0)^T \quad (3.24)$$

a příslušná intenzita Ramanova rozptýleného záření:

$$I_u^{R,L}(\xi) = \frac{K}{2} (M_{00} \pm M_{03}), \quad (3.25)$$

kde  $M_{00}$  a  $M_{03}$  jsou prvky Mullerovy matice. Odpovídající součet cirkulárních intenzit (CIS) a jejich rozdíl (CID) je tedy možno vyjádřit jako

$$I_u^R(\xi) - I_u^L(\xi) = \frac{4K}{c} (2I_1 + 2I_2 \cos \xi - I_3 \sin^2 \xi), \quad (3.26a)$$

$$I_u^R(\xi) + I_u^L(\xi) = 2K(2R_1 - R_3 \sin^2 \xi), \quad (3.26b)$$

kde konstanty jsou složité kombinace tenzorových invariantů a je možno je nalézt v literatuře,<sup>1</sup> stejně tak jako intenzity Ramanova rozptylu pro jiné stavy polarizace záření.

### Nerezonanční aproximace

Pro energie dopadajícího záření dostatečně vzdálené od energie absorpčních přechodů, tj. v tzv. nerezonanční aproximaci, se uvedené vztahy pro intenzitu Ramanova rozptylu podstatně zjednoduší. V tomto přiblížení obecně komplexní tenzory polarizovatelnosti a oba elektrické kvadrupólové tenzory optické aktivity budou mít jen reálnou složku, zatímco magnetický dipólový tenzor optické aktivity bude čistě imaginární. Komplexní tenzory lze separovat na reálnou a imaginární část jako:

$$\tilde{T} = T - iT'. \quad (3.27)$$

Pro Stokesův rozptyl máme tedy

$$\alpha_{\alpha\beta} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle) = \alpha_{\beta\alpha} \quad (3.28a)$$

$$G'_{\alpha\beta} = -\frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_0}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Im}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{m}_\beta | n \rangle) \quad (3.28b)$$

$$A_{\alpha,\beta\gamma} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re}(\langle n | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle) = A_{\alpha,\gamma\beta} \quad (3.28c)$$

a v nerezonančním přiblížení zůstávají tyto tenzorové invarianty

$$\beta(\alpha)^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta} \alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha} \alpha_{\beta\beta}) \quad (3.29a)$$

$$\beta(G')^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta} G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha} G'_{\beta\beta}) \quad (3.29b)$$

$$\beta(A)^2 = \frac{1}{2} \omega_0 \alpha_{\alpha\beta} \epsilon_{\alpha\gamma\delta} A_{\gamma,\delta\beta} \quad (3.29c)$$

$$\alpha = \frac{1}{3} \alpha_{\alpha\alpha} \quad \text{a} \quad G' = \frac{1}{3} G'_{\alpha\alpha}. \quad (3.29d)$$

Hledané výrazy pro CIS a CID jsou pak rovny:

$$I(R) + I(L) = 4K(D_1 \alpha^2 + D_2 \beta(\alpha)^2) \quad (3.30a)$$

$$I(R) - I(L) = \frac{8K}{c} (D_3 \alpha G' + D_4 \beta(G')^2 + D_5 \beta(A)^2) \quad (3.30b)$$

kde koeficienty  $D_1$ - $D_5$  závisí na zvoleném experimentálním uspořádání a jsou uvedeny v tabulce 3.1.

**Tab. 3.1:** Hodnoty koeficientů  $D_1$ - $D_5$  v rovnicích (3.30) popisujících CID a CIS intenzity. Indexy u typů modulace značí u-nepolarizovaný, p-paralelní polarizace, d-kolmá polarizace, \*-polarizace pod magickým úhlem.

$\xi$	Typ	$D_1$	$D_2$	$D_3$	$D_4$	$D_5$
$0^\circ$	ICP <sub>u</sub>	45	7	90	2	-2
	SCP <sub>u</sub>	45	7	90	2	-2
	DCP <sub>I</sub>	45	1	90	2	-2
	DCP <sub>II</sub>	0	6	0	0	0
$90^\circ$	ICP <sub>p</sub>	45/2	7/2	45/2	7/2	1/2
	ICP <sub>d</sub>	0	3	0	3	-1
	ICP*	45/3	10/3	45/3	10/3	0
	SCP <sub>p</sub>	45/2	7/2	45/2	7/2	1/2
	SCP <sub>d</sub>	0	3	0	3	-1
	SCP*	45/3	10/3	45/3	10/3	0
	DCP <sub>I</sub>	45/4	13/4	45/2	13/2	-1/2
	DCP <sub>II</sub>	45/4	13/4	0	0	0
$180^\circ$	ICP <sub>u</sub>	45	7	0	12	4
	SCP <sub>u</sub>	45	7	0	12	4
	DCP <sub>I</sub>	0	6	0	12	4
	DCP <sub>II</sub>	45	1	0	0	0

Pro zjednodušený model polarizace vazeb<sup>75</sup> se uvedené vztahy v případě idealizovaných osově symetrických vazeb ještě dále zjednoduší (neboť v tomto případě  $\beta(G')^2 = \beta(A)^2$  a  $\alpha G' = 0$ ) a pro metodu ICP dává uspořádání ve zpětném rozptylu oproti pravoúhlému uspořádání čtyřikrát větší CID signál. Poměr signál/šum je v případě zpětného rozptylu  $2\sqrt{2}$  krát větší. Dobu měření nutnou na získání stejně kvalitních spekter je tak oproti pravoúhlému uspořádání možno zkrátit až osmkrát.<sup>75</sup>

Z uvedených vztahů také vyplývá, že v geometrii zpětného rozptylu dávají všechny tři metody ICP<sub>u</sub>, SCP<sub>u</sub> a DCP<sub>I</sub> stejný CID signál, první dvě jmenované dávají navíc i stejný CIS signál. V kapitole 2 jsou porovnány experimentální aspekty jednotlivých metod.

### 3.4 *Ab initio* metody výpočtu ROA intenzit

Interpretace ROA spekter byla v centru pozornosti už od doby, kdy byla naměřena první spektra. Byly vyvinuto několik zjednodušujících modelů, z nichž nejznámější je

pravděpodobně "dvojskupinový" model polarizace vazeb.<sup>76</sup> Obecně je však teorie ROA velmi komplexní a příklady umožňující jednoduchou kvalitativní interpretaci intenzit ROA pásů jsou vzácné. V současnosti však pokroky ve výpočtech molekulárních vlastností pomocí *ab initio* metod dovolují přímý výpočet pozorovatelných veličin ROA pro relativně velké molekuly.

Vztahy pro tenzory uvedené v předchozí sekci lze použít pro Ramanův i Rayleighův rozptyl. Pro Ramanův a ROA rozptyl je nutno navíc vyjádřit jejich variaci v závislosti na pohybu jader, tj. alespoň první derivaci podle normálních vibračních souřadnic. Pro fundamentální přechody, to jest přechody ze základního stavu  $|0\rangle$  do prvního excitovaného vibračního stavu  $|1_p\rangle$  (kde  $p$  je  $p$ -tý vibrační mód), se zajímáme o maticové elementy  $\langle 0|\alpha|1\rangle$ . Pro vyjádření těchto veličin obvykle používá Placzekova aproximace,<sup>77</sup> ve které se vibrační vlnová funkce aproximuje vlnovou funkcí harmonického oscilátoru

$$\langle m_v|\alpha_{\alpha\beta}(Q)|n_v\rangle = (\alpha_{\alpha\beta})_0 \delta_{m_v,n_v} + \sum_P \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_P} \right)_0 \langle m_v|Q_P|n_v\rangle + \dots \quad (3.31)$$

a v rozvoji podle vibrační souřadnice zanedbáme členy s vyšší než první mocninou vibrační souřadnice. První člen ve vztahu (3.31) popisuje Rayleighův rozptyl, druhý vibrační Ramanův rozptyl v harmonické aproximaci (s výběrovým pravidlem  $m_v - n_v = \pm 1$ ). Pro fundamentální přechody  $0 \rightarrow 1_p$  spojené s normální vibrační souřadnicí  $Q_p$  jsou pak tenzory nutné pro výpočet CID invariantů dány jako:

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle \langle 1_p|\alpha_{\alpha\beta}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_p} \right) \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_p} \right) \quad (3.32a)$$

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle \langle 1_p|G'_{\alpha\beta}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_p} \right) \left( \frac{\partial G'_{\alpha\beta}}{\partial Q_p} \right) \quad (3.32b)$$

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle \langle 1_p|\epsilon_{\alpha\gamma\delta} A_{\gamma\delta\beta}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_p} \right) \epsilon_{\alpha\gamma\delta} \left( \frac{\partial A_{\gamma\delta\beta}}{\partial Q_p} \right) \quad (3.32c)$$

Nahradíme-li těmito výrazy hodnoty uvedené ve vztazích (3.28-30), dostaneme konečné vztahy pro intenzitu Ramanova rozptylu a ROA. Derivace tenzorů je samozřejmě možno provádět i podle kartézských souřadnic a ty pak přímou lineární transformací převést na derivace podle normálních vibračních módů.

$$\left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial Q_j} \right)_0 = \sum_i \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial X_i} \right)_0 \left( \frac{\partial X_i}{\partial Q_j} \right)_0 = \sum_i \left( \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial X_i} \right)_0 S_{ij} \quad (3.33)$$



To pak prakticky umožňuje počítat silové pole (3.10) (a tedy i normální souřadnice) na jiné úrovni než derivace polarizovatelností a tenzorů optické aktivity (3.32).

Derivace tenzorů  $\mathbf{A}$  a  $\mathbf{G}'$  jsou závislé na počátku souřadnic

$$\frac{\partial G'_{\alpha\beta}}{\partial X_{\varepsilon}^j} (COM) = \frac{\partial G'_{\alpha\beta}}{\partial X_{\varepsilon}^j} (DOG) - \frac{\omega}{2} \varepsilon_{\beta\gamma\delta} R_{\gamma}^j \frac{\partial \alpha_{\alpha\delta}}{\partial X_{\varepsilon}^j} \quad (3.34a)$$

$$\frac{\partial A_{\alpha,\beta\gamma}}{\partial X_{\varepsilon}^j} (COM) = \frac{\partial A_{\alpha,\beta\gamma}}{\partial X_{\varepsilon}^j} (DOG) + \frac{3}{2} \left( R_{\beta}^j \frac{\partial \alpha_{\alpha\gamma}}{\partial X_{\varepsilon}^j} + R_{\gamma}^j \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}}{\partial X_{\varepsilon}^j} \right) - R_{\delta}^j \frac{\partial \alpha_{\alpha\delta}}{\partial X_{\varepsilon}^j} \delta_{\beta\gamma}, \quad (3.34b)$$

kde (COM) značí společný a (DOG) distribuovaný počátek souřadnic (typicky v jádře  $j$  s pozičním vektorem  $\mathbf{R}^j$ ). Hodnoty v DOG můžeme chápat jako vnitřní "chiralitu" atomů, kterou nelze redukovat změnou počátku souřadnic. Zanedbání těchto hodnot je podstatou tzv. **polarizačního modelu**, u něhož dostaneme derivaci tenzorů ve společném počátku pouze z derivace polarizovatelnosti  $\alpha$ .<sup>15</sup>

Tenzory polarizovatelnosti a optické aktivity mimo rovnic (3.28) je možno vypočítat i pomocí závislosti molekulových orbitalů na vnějším elektrickém ( $\mathbf{F}$ ) a magnetickém poli ( $\mathbf{B}$ )

(field-perturbed molecular orbitals,  $\phi'_k(F_{\beta}) = \frac{\partial \phi_k}{\partial F_{\beta}}$  apod.). Tenzory je pak možno vyjádřit jako<sup>1</sup>

$$\alpha_{\alpha\beta} = 4 \sum_k \langle \phi_k^0 | \hat{\mu}_{\alpha} | \phi'_k(F_{\beta}) \rangle \quad (3.35a)$$

$$G'_{\alpha\beta} = -4\hbar\omega_0 \sum_k \text{Im} \langle \phi'_k(F_{\alpha}) | \phi'_k(F_{\beta}) \rangle \quad (3.35b)$$

$$A_{\alpha,\beta\gamma} = 4 \sum_k \langle \phi_k^0 | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | \phi'_k(F_{\alpha}) \rangle. \quad (3.35c)$$

Praktické výpočty tenzorů optické aktivity byly po dlouhou dobu prováděny programem DALTON<sup>78</sup> a CADPAC, ve kterých byla pro uvedené výpočty implementována pouze HF metoda. Nová verze programu DALTON<sup>79</sup> z roku 2005 obsahuje také DFT metody, ta ale v této práci nebyla použita. Většina provedených simulací tenzorů optické aktivity byla spočtena pomocí programu Gaussian 03,<sup>80</sup> ve kterém jsou derivace zmiňovaných tenzorů implementovány od roku 2004 na HF i DFT úrovni.

Při konečném výpočtu spekter je nutno vzít ještě do úvahy populaci stavů účastnících se přechodů.<sup>81</sup> Pro daný vibrační mód  $j$  pak dostaneme:

$$I_d^i \propto \frac{1}{\nu_j} \frac{(\nu_0 - \nu_j)^4}{1 - \exp\left(-\frac{h\nu_j}{kT}\right)} I_d^i \quad (3.36)$$

Při zobrazování simulovaných spekter bylo použito Lorentzovské rozšíření čar, takže vzorec pro celkovou intenzitu v každém bodě simulovaného spektra je dán jako:

$$I(\nu) = \sum_{j=1}^{3N-6} \frac{1}{4\left(\frac{\nu - \nu_j}{\sigma}\right)^2 + 1} I_d^i \quad (3.37)$$

kde  $\nu_j$  je vypočtená vibrační frekvence daného módu a  $\sigma$  pološířka pásů.

### 3.5 Teorie elektronové hustoty (DFT)

Elektronová vlnová funkce popisující  $n$ -elektronovou molekulu je závislá na  $3n$  prostorových a  $n$  spinových souřadnicích. Schrödingerova rovnice pro elektrony (3.5) obsahuje pouze jedno- a dvouelektronové prostorové výrazy, takže celkovou energii je možno v nejjednodušším případě (HF) vyjádřit pomocí integrálů, které obsahují šest prostorových souřadnic. Z tohoto úhlu pohledu se zdá, že vlnová funkce obsahuje jistou nadbytečnou informaci bez přímé fyzikální interpretace. To povzbudilo hledání funkce, která by obsahovala méně proměnných než vlnová funkce, ale kterou by bylo přesto možno použít na výpočet energie a dalších vlastností molekul, tj. přejít od vlnové funkce k elektronové hustotě.

$$\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n) \rightarrow \rho(\mathbf{r}) \quad (3.38)$$

V roce 1964 Hohenberg a Kohn ukázali, že u molekul s nedegenerovaným základním stavem je možno popsat energii základního stavu, vlnovou funkci a všechny další vlastnosti molekul pomocí jednoznačně určené elektronové hustoty  $\rho_0(x,y,z)$  jako funkce pouze tří souřadnic, tj. energie základního stavu je funkcí elektronové hustoty  $E_0 = E_0[\rho_0]$ . To je podstatou **Hohenbergova-Kohnova teorému**<sup>82</sup>

Pomocí rovnice (3.5) můžeme  $E_0$  rozepsat jako:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{Ne}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (3.39)$$

Operátor potenciální energie elektronů a jader je

$$\hat{V}_{Ne} = \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i), \text{ kde } v(\mathbf{r}_i) = -\sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}}, \quad (3.40)$$

takže

$$\bar{V}_{Ne} = \left\langle \psi_0 \left| \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) \right| \psi_0 \right\rangle = \int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (3.41)$$

a energii základního stavu je možno napsat jako

$$E_0 = E_v[\rho_0] = T[\rho_0] + \int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \bar{V}_{ee}[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + F[\rho_0], \quad (3.42)$$

kde funkcionál  $F$  není závislý na vnějším potenciálu (potenciálu jader). Tvar tohoto funkcionálu není dosud znám, takže rovnici (3.42) není možno přímo použít.

Hohenberg a Kohn navíc ukázali pro nedegenerované základní stavy molekul, že pro každou funkci splňující podmínku

$$\int \rho_{zk}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = n \text{ a } \rho_{zk}(\mathbf{r}) \geq 0 \text{ pro všechna } \mathbf{r} \quad (3.43)$$

platí nerovnost  $E_0 \leq E_v[\rho_{zk}]$ , jinými slovy elektronovou hustotu základního stavu je možno nalézt variací energie podle funkce elektronové hustoty

$$\frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho} = 0. \quad (3.44)$$

Levy rozšířil tento teorém i na degenerované stavy molekul.<sup>83</sup>

Přímý výpočet hustoty  $\rho$  z (3.42) je ovšem velice nepřesný. Kohn a Sham ukázali, jak je možné nalézt přesnější  $\rho_0$  když zavedeme umělou vlnovou funkci ve tvaru Slaterova determinantu (respektujeme nejjednodušším možným způsobem požadavek antisymetrie vlnové funkce), kde  $\varphi_i(\mathbf{r})$  jsou prostorové části jednoelektronových vlnových funkcí

$$\psi(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \sum_P (-1)^P P \{ \varphi_1(\mathbf{r}_1) \sigma_1 \dots \varphi_n(\mathbf{r}_n) \sigma_n \} \quad (3.45)$$

kde  $\sigma_i$  označuje spinovou část jednoelektronové vlnové funkce, sčítá se přes všechny možné permutace  $P$ . Jednoelektronová hustota je pak dána vtahem

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^n |\varphi_j(\mathbf{r})|^2, \quad (3.46)$$

celkovou energii je pak možno napsat jako

$$E_{KS} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{k=1}^n \langle \varphi_k | \nabla_k^2 | \varphi_k \rangle + \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' + E_{XC}[\rho] \quad (3.47)$$

kde první člen je kinetická energie elektronů  $T_s[\rho(\mathbf{r})]$ , druhý potenciální energie jader a elektronů, třetí potenciální energie elektronů. Problematický je čtvrtý člen – tzv. výměnná energie  $E_{XC}$ . Z adiabatického teorému plyne, že v principu existuje funkcionál  $E_{XC}[\rho]$  takový, že KS energie může být rovna energii dané exaktním řešením Schrödingerovy rovnice. Funkce

$E_{XC}[\rho]$  však není známa a neexistuje ani postup, jak ji systematicky zlepšovat – to je hlavní úloha současné teorie DFT.

Provedeme-li variaci

$$\frac{\delta E_{KS}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} = \frac{\delta T_s[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + \frac{\delta E_{XC}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})}, \quad (3.48)$$

z podmínky extrému pak dostáváme Kohn-Shamovy rovnice

$$\hat{H}_{KS} \varphi_i = \left( -\frac{\Delta_i}{2} + v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{XC}(\mathbf{r}) \right) \varphi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \varphi_i, \quad i = 1, \dots, n, \quad (3.49)$$

které se řeší běžnou iterační metodou.  $v_{XC}(\mathbf{r})$  je lokální potenciál definovaný rovnicí

$$v_{XC}(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{XC}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})}. \quad (3.50)$$

Připomeňme ještě, že v "pravé" DFT by se mělo pracovat s funkcí elektronové hustoty (závislé na třech souřadnicích) a ne s molekulovými orbitaly a minimalizovat  $E[\rho]$ . Protože ale tento funkcionál není znám, řeší se Kohn-Shamovy rovnice pro jednotlivé elektrony. Tyto rovnice tedy představují určitý kompromis v původní myšlence DFT.

Podobně jako u HF teorie je možno KS orbitaly vyjádřit jako lineární kombinaci atomových orbitalů (LCAO). Tato formulace DFT se ukázala jako velice užitečná a bylo vyvinuto několik stovek funkcionálů  $E_{XC}$  s cílem přiblížit se realitě. Z praktického hlediska dávají moderní funkcionály lepší výsledky než HF metoda. V některých případech může být výpočet DFT dokonce rychlejší než HF.

Výměnná korelační energie  $E_{XC}$  v sobě zahrnuje několik komponent: kinetickou korelační energii, výměnnou energii  $E_X$ , Coulombovu korelační energii  $E_C$ . Často je tedy výhodné ji rozdělit a hledat funkcionály odděleně.

$$E_{XC}[\rho(\mathbf{r})] = E_X[\rho(\mathbf{r})] + E_C[\rho(\mathbf{r})]. \quad (3.51)$$

V rámci "čisté" (pure) DFT je  $E_{XC}$  je funkcí hustoty nebo jejich derivací  $E_{XC}(\rho, \nabla \rho, \Delta \rho)$ . Čisté funkcionály se dělí na **lokální** (local) závislé jen na hustotě v daném bodě  $E_{XC}(\rho)$ , mezi něž patří např. **aproximace lokální hustoty** (local density approximation LDA, v případě otevřených slupek je to **spinová aproximace lokální hustoty** – local spin density approximation LSDA). Hohenberg a Kohn ukázali, že pokud se  $\rho$  mění pomalu se souřadnicí, je možno funkcionál  $E_{XC}$  lze vyjádřit ve tvaru

$$E_{XC}^{LDA}[\rho(\mathbf{r})] = \int \varepsilon_{XC}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (3.52)$$

kde  $\varepsilon_{XC}(\mathbf{r})$  je lokální potenciál zahrnující výměnné a korelační efekty. Výměnná a korelační část funkcionálu je uvedena v tabulce 3.2.

Výměnnou korelační energii  $E_{XC}$  je možno hledat také ve formě, kdy obsahuje gradient elektronové hustoty, což je podstatou **zobecněné gradientové aproximace** (GGA generalized-gradient approximation), občas také nazývané jako **ne-lokální** (nonlocal)

$$E_{XC}^{GGA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int f(\rho^\alpha(\mathbf{r}), \rho^\beta(\mathbf{r}), \nabla\rho^\alpha(\mathbf{r}), \nabla\rho^\beta(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (3.53)$$

kde  $\alpha$  a  $\beta$  označují funkce elektronové hustoty pro elektrony s různým spinem.

**Tab. 3.2:** Výměnné funkcionály implementované v programu Gaussian03<sup>80</sup>:

Název	Popis	Zkratka		Ref.
		Samostatně	V kombinaci	
Slater	$\rho^{4/3}$ , výměnná část LSDA	HFS	S	82, 84, 85
	$X\alpha\rho^{4/3}$	Xalpha	XA	82, 84, 85
Becke 88	obsahuje Slaterův výměnný funkcionál s korekcemi obsahujícími gradient hustoty	HFB	B	86
PW91	Perdew-Wang 91	–	PW91	87-90
modifikovaný PW91	Baroneho modifikace	–	MPW	91
Gill 96		–	G96	92
PBE	Perdew, Burke, Ernzerhof	–	PBE	93, 94
OPTX	Handyho modifikace Beckeho funkcionálu	–	O	95

**Tab. 3.3:** Korelační funkcionály

Název	Popis	Ref.
VWN	Vosko, Wilk, Nusair korelační funkcionál III splňující RPA řešení rovnoměrného elektronového plynu. Často nazýván jako LSD korelační funkcionál	96
VWN5	Jako předchozí ale splňující Ceperly-Alderovo řešení rovnoměrného elektronového plynu (funkcionál V).	96
LYP	Lee, Yang, Parr, obsahuje lokální i nelokální členy	97, 98
PL	Perdew, lokální funkcionál	99
P86	Perdew 86, PL doplněný o gradientové korekce	100
PW91	Perdew, Wang 91, gradientové korekce	87-90
B95	Beckeho $\tau$ -závislý nelokální funkcionál (definován pro hybridní funkcionály)	101
PBE	Nelokální funkcionál Perdew, Burke, Ernzerhof	93, 94

**Tab. 3.4:** Ostatní funkcionály používané samostatně

Název	Popis	Ref
VSXC	Voorhis, Scuseria, $\tau$ -závislý nelokální korelační funkcionál	102
HCTH	Handyho funkcionály zobecněné gradientové aproximace: HCTH93, HCTH147, HCTH407	103-105

Nahrazení HF výměnné energie nějakou jednoduchou analytickou funkcí hustoty se však často ukazuje málo přesné, proto jsou konstruovány **hybridní** (hybrid) funkcionály, jejichž částí je i HF výměnná energie:

$$E_X^{HF} = -\frac{1}{4} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \varphi_i^{KS}(1) \varphi_j^{KS}(2) | 1/r_{12} | \varphi_j^{KS}(1) \varphi_i^{KS}(2) \rangle, \quad (3.54)$$

doba výpočtu v takovém případě ovšem nemůže být kratší než HF výpočet.

Neznámější jsou asi **tříparametrové Beckeho hybridní funkcionály**, které se uvádějí ve formě<sup>106</sup>:

$$E_{XC} = aE_X^{Slater} + (1-a)E_X^{HF} + bE_X^{Becke} + E_C^{VWN} + cE_C^{non-local} \quad (3.55)$$

a dále existují tři verze s různým nelokálním korelačním funkcionálem (první tři funkcionály v následující tabulce):

**Tab. 3.5:** Hybridní funkcionály

B3LYP	Tříparametrový Beckeho hybridní funkcionál (3.55): $cE_C^{non-local} = cE_C^{LYP} + (1-c)E_C^{VWN}$	106
B3P86	Tříparametrový Beckeho hybridní funkcionál (3.55): $E_C^{non-local} = E_C^{P86}$	106
B3PW91	Tříparametrový Beckeho hybridní funkcionál (3.55): $E_C^{non-local} = E_C^{PW91}$	106
B1B95	Beckeho jednoparametrový hybridní funkcionál	101
B1LYP	Modifikace B1B95 s korelačním funkcionálem LYP	101, 107
MPW1PW91	Modifikace B1B95 používající modifikovaný Perdew-Wangův výměnný a Perdew-Wangův 91 korelační funkcionál	91
B98	Beckeho revize z roku 1998 funkcionálu B97	108, 109
PBE1PBE	Hybridní funkcionál Perdew, Burke Ernzerhof 1997. Používá vážení 25% výměnný a 75% korelační funkcionál	93
BHandH	$0,5E_X^{HF} + 0,5E_X^{LSDA} + E_C^{LYP}$	80
BHandHLYP	$0,5E_X^{HF} + 0,5E_X^{LSDA} + 0,5E_X^{Becke88} + E_C^{LYP}$	80

Empirické parametry umožňují vlastnosti jednotlivých funkcionalů vhodně "nastavit" podle systému, pro který jsou určeny. Mnoho autorů proto nepovažuje tyto metody za *ab initio*, i když je třeba uvést, že počet volených parametrů je poměrně malý (obvykle 1–3) a jsou stejné pro všechny typy atomů. Parametry volí zpravidla podle experimentální slučovacích tepel dvouatomových molekul nebo podle ionizačních energií vzácných plynů.

Matematické výrazy vyskytující se v DFT potenciálech jsou často příliš složité na to, aby je bylo možné spočítat analyticky, např. v bázi Gaussových funkcí. Proto se integrály vyskytující se při řešení KS rovnic počítají numericky, zpravidla pomocí integrace na mříži (gridu) uspořádané sféricky podle atomových jader. Výsledek výpočtu je pak ovlivněn kvalitou této numerické integrace a závisí na implementaci v konkrétním programu. Většina programů umožňuje měnit kvalitu mříže, např. počet radiálních bodů (radial grid), hustotu bodů na koulích centrovaných okolo jednotlivých atomů (spherical grid) apod.

### 3.6 Modely rozpouštědla

Ukazuje se, že zahrnutí modelu rozpouštědla do kvantově chemických simulací je naprosto nezbytné, a to zvláště u biologických molekul, u nichž voda jako velmi polární rozpouštědlo hraje klíčovou roli. K problematice zahrnutí rozpouštědla je možno přistupovat dvěma rozdílnými způsoby. Přímocharé je explicitní zahrnutí molekul vody do výpočtu. To však sebou nese různé komplikace, např. uvážíme-li, že výpočetní náročnost kvantově-chemických simulací roste velmi rychle s velikostí systému. Navíc jednotlivé molekuly vody mohou specificky ovlivnit studovanou molekulu (konformačně, změnou silového pole), takže je často nutno simulovat mnoho různých konfigurací vody a délka výpočtu se tak prodlužuje. Aby bylo možno vyhnout se uvedeným obtížím, byly konstruovány kontinuální modely rozpouštědla, které budou rozebrány v následující sekci. Uveďme ještě, že v této práci byly na simulaci spekter použity a následně porovnány oba přístupy, jak explicitní zahrnutí molekul rozpouštědla, tak i kontinuální modely rozpouštědla.

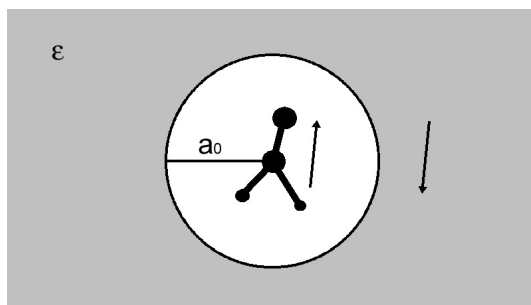
#### Onsagerův model

Onsagerův model je historicky nejstarším modelem rozpouštědla.<sup>110-112</sup> Molekuly rozpouštědla jsou reprezentovány spojitým médiem charakterizovaným dielektrickou konstantou  $\epsilon$ . Molekula je umístěna do sférické dutiny o zvoleném poloměru  $a_0$  (obr. 3.3). Dipólový moment

molekuly indukuje dipólový moment v kontinuu a jeho elektrické pole pak zpětně interaguje s molekulou. Elektrostatický efekt rozpouštědla je reprezentován poruchovým členem, který přičteme k Hamiltoniánu molekuly ve vakuu  $H_0$ . Celkový Hamiltonián potom bude mít tvar

$$\hat{H} = \hat{H}_0 - \frac{1}{2} \hat{\mu} \cdot \hat{E}_R \quad (3.56)$$

kde  $\hat{\mu}$  je operátor dipólového momentu molekuly a  $\hat{E}_R$  je reakční pole dutiny v dielektriku.



**Obr. 3.3:** Onsagerův model rozpouštědla se sférickou dutinou.

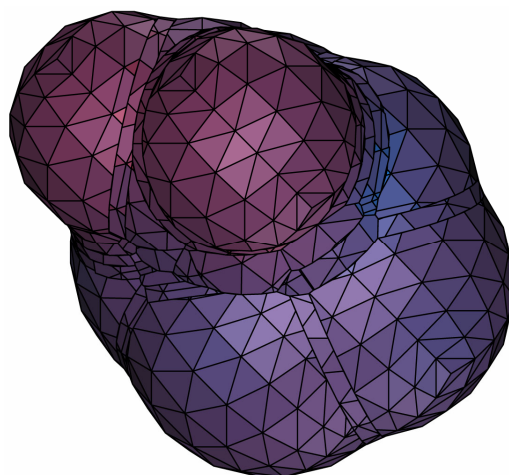
Základním omezením Onsagerova modelu je, že pro molekuly s nulovým dipólovým momentem je poruchový člen nulový a nepopisuje tedy žádnou interakci s rozpouštědlem, navíc nezohledňuje obecně složitý tvar molekuly.

### COSMO model

Základní myšlenkou kontinuálního COSMO modelu (conductor like continuum solvent model)<sup>113, 114</sup> je, že vlastnosti rozpouštědla se podobají vlastnostem dokonalého vodiče. Prakticky je vliv rozpouštědla je simulován pomocí stínících nábojů indukovaných na ploškách konečné velikosti okolo molekuly tvořících hranici kontinua. Tento stínící náboj je třeba počítat numericky a iterativně tak, že se vhodně zvolený povrch dutiny rozdělí na velký počet malých plošek (segmentů). Poté se spočte náboj indukovaný na těchto segmentech a v celkovém Hamiltoniánu systému pak vystupují ještě členy zahrnující interakci segment-segment a molekula-segment.<sup>115</sup>

V programu Gaussian 03<sup>80</sup> se dutina vytváří zpravidla tak, že se kolem každého těžkého atomu vytvoří koule (vodíkové atomy jsou umístěny dovnitř sféry náležející atomu, ke kterému jsou navázány, přičemž poloměr sféry se odpovídajícím způsobem zvětší). Povrch koule je pak rozdělen na trojúhelníkové segmenty, jejichž počet (stejně jako počet a poloměr koulí) je pro dané rozpouštědlo optimalizován, ale v případě nutnosti je ho možno změnit.





**Obr. 3.4:** Dutina u COSMO modelu vytvořená kolem molekuly obojetného iontu L-prolinu. Podrobný popis konstrukce povrchu dutiny je popsán v literatuře<sup>116</sup>.

Je známo, že COSMO dobře popisuje solvatační energie molekul.<sup>117</sup> Oproti Onsagerovu modelu má navíc tu výhodu, že tvar dutiny odráží skutečný tvar molekuly. Elektrická permitivita rozpouštědla a velikost dutiny zde vystupují jako parametry. Relativní jednoduchost modelu nám navíc dovoluje spočítat energie a gradienty analyticky dostatečně přesně a bez enormního nárůstu výpočetního času. Na mnoha studovaných systémech,<sup>44, 118</sup> včetně systémů prezentovaných v této práci, se potvrzuje, že pro kvalitativně přesné simulace je nutno efekt hydratace zahrnout do výpočtů biomolekul ve vodném prostředí.

### 3.7 Optimalizace geometrie

Optimalizace geometrie molekuly byla od počátku v centru pozornosti kvantové chemie. Nejvíce se osvědčily metody založené na kvadratické aproximaci povrchu potenciální energie,<sup>119</sup> ale existují i jiné přístupy.<sup>120</sup> U kvadratických metod je Hessián (matice druhých derivací energie (3.10)) odhadnuta pro každý optimalizační krok nebo je aktualizována v průběhu optimalizace. Druhý postup je preferován, neboť výpočet gradientu je u *ab initio* metod mnohem méně náročný než výpočet Hessiánu. Za všechny metody uvedme aktualizaci gradientu pomocí Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shannova (BFGS) algoritmu.<sup>121</sup>

Výběr vhodného souřadného systému hraje prvořadou roli v optimalizaci molekulárních struktur. Gradient energie a Hessián jsou v kvantově chemických programech často počítány v kartézských souřadnicích, které ovšem pro optimalizaci geometrie nejsou většinou příliš vhodné. Pulay ukázal, že pro systémy vázané kovalentními vazbami je nejlépe optimalizaci provádět v redundantních vnitřních souřadnicích.<sup>122, 123</sup>

Na optimalizaci využívající redundantní vnitřní souřadnice je založena i základní optimalizační procedura v programu Gaussian 03<sup>80</sup> využívající Bernyho algoritmu.<sup>124</sup> Tuto proceduru umožňuje také vyhledávání přechodových stavů (sedlových bodů) mezi zadanými lokálními minimy. Toto bylo použito při prozkoumávání konformačního prostoru L-prolinu – kapitola 5.3. Bernyho algoritmus je možno použít také s vnitřními souřadnicemi.<sup>125</sup>

Redundantní vnitřní souřadnice však nejsou v některých případech (zvláště pro slabě vázané skupiny molekuly) příliš vhodnou volbou, neboť optimalizace konverguje velmi špatně. To je způsobeno numerickými nestabilitami způsobenými velkým počtem násobení matic přechodu mezi kartézskými a redundantními souřadnicemi.<sup>121</sup>

Optimalizace geometrie podle normálních vibračních módů je již osvědčenou technikou,<sup>121</sup> pomocí které je možno se zmiňovaným problémům vyhnout a navíc lze přímo kontrolovat vibrační pohyb. Ukazuje se, že je numericky stabilnější než optimalizace v redundantních vnitřních souřadnicích, zvláště pro flexibilní a slabě vázané (vodíkovými vazbami) systémy. Základní metoda byla dále rozšířena o možnosti fixovat různé geometrické parametry jako vzdálenosti, úhly nebo torzní úhly, navíc také umožňuje optimalizovat geometrii tak, aby polohy jader byly udržovány na konstantním elektrostatickém potenciálu.<sup>126</sup>

### Optimalizace pomocí normálních vibračních módů

Procedura je založena na obvyklé kvadratické aproximaci. Je třeba vypočítat gradient podle normálního vibračního módu  $\mathbf{g}^{(i)}$ , druhou derivaci energie (Hessián), normální vibrační módy  $\mathbf{Q}^{(i)}$  v kroku  $i$ . Optimalizační krok směrem k energetickému minimu je dán Newton-Raphsonovým vztahem modifikovaným metodou obecné racionální optimalizace funkcí (rational function optimization – RFO).<sup>127, 128</sup> Optimalizační proceduru pomocí normálních vibračních souřadnic je možno rozdělit do několika kroků:

1. Počáteční odhad Hessiánu  $\mathbf{f}^{(i)}$  a z něj výpočet  $\mathbf{S}$  matice (definice viz. vztah 3.11).
2. Výpočet gradientu  $\mathbf{g}_C^{(i)}$  podle kartézských souřadnic.
3. Je-li dostupný předchozí krok, provede se aktualizace Hessiánu  $\mathbf{f}$  pomocí BFGS algoritmu<sup>121</sup>

$$\mathbf{f}^{(i+1)} = \mathbf{f}^{(i)} - \left( \frac{(\Delta \mathbf{g}^{(i)})^T \Delta \mathbf{g}^{(i)}}{\mathbf{d}\mathbf{x}^{(i)} \cdot \Delta \mathbf{g}^{(i)}} + \frac{(\mathbf{f}^{(i)} \cdot \mathbf{d}\mathbf{x}^{(i)})^T \mathbf{d}\mathbf{x}^{(i)} \cdot \mathbf{f}^{(i)}}{\mathbf{d}\mathbf{x}^{(i)} \cdot \mathbf{f}^{(i)} \cdot \mathbf{d}\mathbf{x}^{(i)}} \right) \quad (3.57)$$

kde  $\mathbf{dx}^{(i)} = \mathbf{x}^{(i)} - \mathbf{x}^{(i-1)}$  je rozdíl v kartézských souřadnicích a  $\Delta\mathbf{g}^{(i)} = \mathbf{g}_C^{(i)} - \mathbf{g}_C^{(i-1)}$  je rozdíl v gradientech. Vypočte se nová  $\mathbf{S}$  matice.

4. Vypočte se gradient v normálních módech

$$\mathbf{g}^{(i)} = \mathbf{S}^T \cdot \mathbf{g}_C^{(i)} \quad (3.58)$$

a pokud je menší než zadané kritérium, struktura se považuje za optimalizovanou.

5. Vypočte se nový krok a využitím kvadratické závislosti a RFO (viz dříve)

$$\mathbf{dq}^{(i+1)} = -\frac{2\mathbf{g}^{(i)}}{\mathbf{Q}_{ii} + \sqrt{\mathbf{Q}_{ii}^2 + 4(\mathbf{g}^{(i)})^2}}. \quad (3.59)$$

6. Vypočtou se nové kartézské souřadnice

$$\mathbf{x}^{(i+1)} = \mathbf{x}^{(i)} - \mathbf{S} \cdot \mathbf{dq}^{(i+1)}. \quad (5.60)$$

7. Zvýší se  $i$  o 1 a přejde se ke kroku 2.

Optimalizace v normálních módech je implementována v programu QGRAD,<sup>121, 126</sup> jehož vstupem jsou energie, gradienty a druhé derivace z výstupu *ab initio* výpočtu (pomocí programu Gaussian 03, s kterým je QGRAD propojen) a vypočte změněné souřadnice. QGRAD také zajišťuje výpočet normálních vibračních souřadnic (diagonalizací silového pole) a transformaci souřadnic.

Na závěr poznamenejme, že neexistuje univerzální optimalizační metoda vhodná pro všechny molekulární systémy. Pro většinu obvyklých systémů je optimalizace v redundantních vnitřních souřadnicích nejvýhodnější (z hlediska rychlosti výpočtu a pohodlnosti při zadávání). Pro simulace vibračních spekter hraje optimalizace geometrie v normálních módech nezastupitelnou roli.

### 3.8 Přenos tenzorů molekulárních vlastností

Stejně tak jako výpočet silových polí (FF, Hessián), tak i výpočet tenzorů popisujících vlastnosti molekul (např. derivace tenzorů polarizovatelnosti a optické aktivity) pomocí *ab initio* metod je limitován velikostí molekul a výkonem počítačů. I přes to, že výpočetní možnosti jsou neustále posouvány kupředu, výpočet realistických silových polí biologických molekulárních systémů na *ab initio* úrovni zůstává stále hlavním problémem.

Jednou z možností, jak zmiňovaný problém obejít, je rozdělit studovaný systém na několik částí, pro ně spočítat hledané tenzory, a ty pak přenést na cílovou molekulu. Ukazuje se, že tento přenos je výhodné provádět v kartézských souřadnicích<sup>129</sup>.

Výpočet silového pole velké molekuly je založen na chemické i topologické podobnosti mezi částí  $F$  velké molekuly  $XXXFXXX$  a částí  $f$  malé molekuly  $xfx$ . Přenos tenzoru silového pole lze rozdělit do několika kroků

1. Nalezení kartézských souřadnic velké molekuly. Může být použita struktura z PDB databáze apod. nebo je velká molekula navržena podle požadovaných kritérií (v tomto případě je spektrální analýza jedním z testů správnosti navrženého modelu).
2. Vypočte se silové pole malých fragmentů (molekul) na *ab initio* úrovni.
3. Klíčový krok představuje nalezení správného překryvu mezi fragmenty  $f$  a  $F$  pro každý pár atomů  $\lambda$  a  $\mu$ , které jsou částí daného fragmentu. Nejdříve se vyberou dvě identické odpovídající soustavy  $m$  atomů ve fragmentech  $f$  a  $F$ , které obsahují nebo jsou spojeny s atomy  $\lambda$  a  $\mu$ . Poté je orientace části  $f$  z molekuly  $xfx$  hledána tak, aby byl maximalizován překryv s fragmentem  $F$  v molekule  $XXXFXXX$ . To se provádí minimalizací výrazu daného metodou nejmenších čtverců

$$\delta(U) = \sum_{i=1}^m (\mathbf{r}^i(F) - \mathbf{U} \cdot \mathbf{r}^i(f))^2, \quad (3.61)$$

kde  $\mathbf{r}^i(F)$  a  $\mathbf{r}^i(f)$  označují souřadnice atomů ve fragmentech  $f$  a  $F$  vzhledem k jejich geometrickým středům  $T$  a  $T'$ . Pokud jsou geometrie  $f$  a  $F$  identické, rotace souřadného systému postačuje k provedení přenosu silového pro tento fragment v jediném kroku.

4. Unitární transformace  $\mathbf{U}$  je dána Eulerovými úhly rotace a pomocí ní je možno pomocí lineární transformace spočítat přenos kartézských silových konstant z  $f$  na  $F$  pro pár atomů  $\lambda$  a  $\mu$ :

$$\frac{\partial E}{\partial \mathbf{r}_\alpha^\lambda \partial \mathbf{r}_\beta^\mu}(F) = \mathbf{U}_{\alpha\gamma} \mathbf{U}_{\beta\delta} \frac{\partial E}{\partial \mathbf{r}_\gamma^\lambda \partial \mathbf{r}_\delta^\mu}(f) \quad (3.62)$$

Obsahuje-li malá molekula několik fragmentů  $f$ , silové konstanty získané přenosem z každého z nich mohou být průměrovány nebo váženy podle vzdálenosti atomů  $\lambda$  a  $\mu$  od fragmentu  $f$  apod. Například pro velkou molekulu  $XXXFXXX$  a malou  $xfxf'xf''x$ , kde  $f = f' = f'' = F$ , je možno provést tři překryvy a nepřesnější silové pole může být získáno průměrem ze všech tří přenosů.

Některé dlouhodobé interakce nemusí být přenosem tenzorů dobře postihnuty. Při vhodně zvoleném postupu jsou však tyto interakce zanedbatelné a je možno je zanedbat. Druhou možností je spočítat velkou molekulu na nižší úrovni teorie.

Derivace tenzorů polarizovatelnosti a optické aktivity je možno přenést pomocí matice  $\mathbf{U}$  podobně jako u silových konstant. U  $\mathbf{G}'$  a  $\mathbf{A}$  tenzorů je však třeba dát pozor na to, že jsou závislé na počátku souřadnic, a používat lokální systém souřadnic (distributed origin gauge), kde jsou derivace vyjádřeny v systémech s počátky na pohybujících se atomech

$$\frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}(\lambda)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} = \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} \quad (3.63)$$

$$\frac{\partial G'_{\alpha\beta}(\lambda)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} = \frac{\partial G'_{\alpha\beta}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} + \frac{\omega}{2} \varepsilon_{\beta\gamma\delta} R_\gamma^\lambda \frac{\partial \alpha_{\alpha\delta}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} \quad (3.64)$$

$$\frac{\partial A_{\alpha,\beta\gamma}(\lambda)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} = \frac{\partial A_{\alpha,\beta\gamma}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} - \frac{3}{2} \left( R_\beta^\lambda \frac{\partial \alpha_{\alpha\gamma}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} + R_\gamma^\lambda \frac{\partial \alpha_{\alpha\beta}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} \right) + R_\delta^\lambda \frac{\partial \alpha_{\alpha\delta}(0)}{\partial x_\varepsilon^\lambda} \delta_{\beta\gamma} \quad (3.65)$$

Metodu přenosu tenzorů je možno použít také na přenos tenzorů vyšších derivací (např. pro anharmonické korekce apod.).

### 3.9 Použití molekulární dynamiky při studiu reálných systémů.

Molekulární dynamika (MD) se ukazuje být v mnoha případech velice užitečným nástrojem při modelování reálných systémů. Je možné ji použít na velké systémy čítající tisíce atomů s explicitním zahrnutím molekul rozpouštědla. Přehledné základy teorie molekulové dynamiky je možno nalézt v mnoha biografiích, za všechny uveďme alespoň dvě.<sup>130, 131</sup>

Molekulárně dynamické simulace spočívají v numerickém řešení klasických pohybových rovnic, které je možno napsat jako

$$m_i \mathbf{r}_i = \mathbf{F}_i \quad (3.66)$$

kde sílu  $\mathbf{F}_i$  působící na částici  $i$  je možno vypočítat z potenciální energie systému

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (3.67)$$

Uvedené rovnice představují pro  $N$  částic soustavu  $3N$  rovnic. Potenciální energii je možno rozdělit na interakce mezi nevázanými atomy a atomy spojenými chemickými vazbami. První část potenciální energie je možno rozdělit na jednočásticové, dvoučásticové, tříčásticové a další výrazy

$$U_{non-bonded} = \sum_i u(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \dots \quad (3.68)$$

kde jednočasticový potenciál  $u(\mathbf{r}_i)$  může reprezentovat vliv vnějšího pole na systém nebo efekt působení stěn systému apod. Dále je obvyklé zanedbávat tříčasticové a vyšší členy a párový potenciál vyjádřit ve tvaru

$$v(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) = v(r_{ij}) \quad (3.69)$$

Pro systémy tekutin se velmi osvědčil Lenard-Jonesův potenciál obsahující v sobě přitažlivý i repulzní člen

$$v^{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (3.70)$$

s dvěma empirickými parametry:  $\sigma$  určuje šířku a  $\varepsilon$  hloubku potenciálu. Jsou-li v systému přítomny náboje (atomů), je nutno použít také odpovídající Coulombický potenciál

$$v^C(r) = \frac{q_1 q_2}{4\pi\varepsilon_0 r} \quad (3.71)$$

kde  $q_1$  a  $q_2$  jsou dané náboje a  $\varepsilon_0$  permitivita vakua.

Potenciál atomů spojených vazbami je možno rozdělit do několika výrazů

$$U_{bonded} = \sum_{vazby,i} k_i (d_i - d_{0i})^2 + \sum_{\text{úhly},i} k_{\alpha} (\alpha_i - \alpha_{0i})^2 + \sum_{torzní\ \text{úhly},i} [A_{1i} \cos(\tau_i) + A_{2i} \cos(2\tau_i) + A_{3i} \cos(3\tau_i)] + \sum_{oop,i} k_{oop,i} s_i^2 \quad (3.72)$$

kteřé popisují postupně vazbu mezi atomy, vazebné úhly, torzní úhly a nakonec mimorovinné (oop – out of plane) souřadnice. Uvedená rovnice obsahuje celou řadu empirických parametrů, které je možno získat například na základě *ab initio* výpočtů. V minulosti byly publikovány stovky různých souborů těchto parametrů pro různé skupiny molekul, zpravidla nazývaných "silová pole". Mezi nejznámější patří Amber94,<sup>132</sup> Amber99,<sup>133</sup> Amber03,<sup>134</sup> Charmm27.<sup>135</sup> V námi prováděných simulacích byly použity programové balíky AMBER8<sup>136</sup> a TINKER.<sup>137, 138</sup> Pro simulaci ve vodném prostředí existuje opět celá řada silových polí pro vodu, nejznámější je asi TIP3P,<sup>139</sup> který byl několikrát použit i v této práci. V rámci řešení disertační práce jsem provedl srovnání vlivu různých silových polí na tvar plochu potenciální energie pro molekulu L-alanyl-L-alaninu. Výsledky byly porovnány jak s *ab initio* výpočty tak i s NMR daty (chemické posuvy a nepřímá spin-spinová interakce).<sup>140</sup>

Jednou z aplikací na něž byla molekulární dynamika použita je prohledávání konformačního prostoru velkých molekul, u nichž není možné kvůli velikosti systému použít *ab initio* metody. V ideálním případě je možno tyto výsledky přímo srovnat s experimentálními

daty, což je ukázáno v kapitole 5.4, která se týká určování konformace hinge peptidu a jeho analogů.

Výslednou geometrii získanou pomocí MD simulací lze také použít pro přenos tenzorů molekulárních vlastností z menších fragmentů získaných na *ab initio* úrovni. Příkladem tohoto přístupu je naše práce,<sup>141</sup> která vznikla v průběhu ročního pobytu na University of Illinois at Chicago. Mým příspěvkem bylo provedení simulací homo-tetrapeptidu (H-[(*S*)-Bin]<sub>4</sub>-OMe) se složitým postranním řetězcem. Nejprve byl pomocí MD simulací prohledán konformační prostor celé molekuly a na vybrané konfigurace byly přeneseny tenzory spočtené pro kostru molekuly a postranní řetězce. Srovnáním s experimentálními VCD spektry bylo ukázáno, že převládající konformací molekuly rozpuštěné v CDCl<sub>3</sub> je 3<sub>10</sub>-helix.

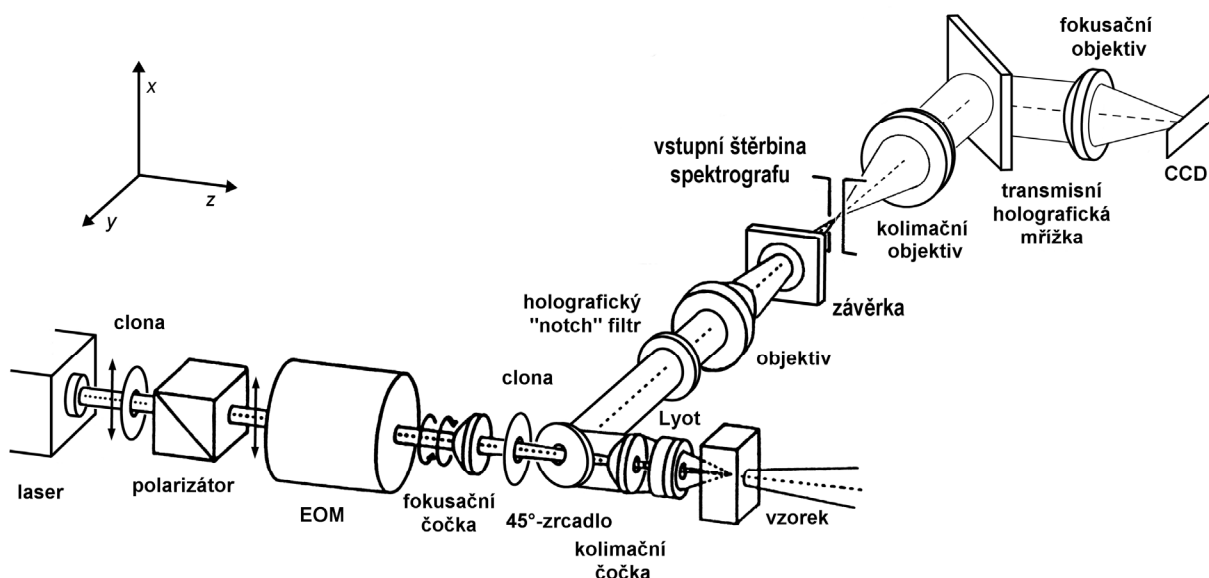
MD simulace je také možno využívat na zkoumání dynamických vlastností molekul rozpouštědla v okolí rozpuštěné látky. Z atomových konfigurací zaznamenávaných v daných časových intervalech je např. možné vhodně vybrat nejbližší solvatační vrstvy kolem molekuly a ty pak použít jako počáteční geometrii pro *ab initio* simulace. Tento přístup byl využit např. u studia aminokyseliny L-prolinu, jak je uvedeno v kapitole 5.2.

Kombinovaný MD a *ab initio* přístup je možno ještě rozšířit a využít elektrický potenciál tvořený molekulami rozpouštědla v okolí studované molekuly. Ten jsme použili pro empirické korekce vibračních frekvencí a intenzit. Např. u molekuly N-methylacetamidu se tímto přístupem podařilo dosáhnout realistického tvaru absorpčních pásů v oblastech frekvencí odpovídajících vibracím amidu I, II a III.<sup>142</sup>

## 4. Experimentální uspořádání, metodika měření a zpracování ROA spekter

### 4.1 Popis ROA spektrometru

Aparatura vybudovaná na Fyzikálním ústavu UK je založena na modulaci polarizace budícího záření (ICP) v geometrii zpětného rozptylu. Při její konstrukci byla použita strategie skupiny Laurence D. Barrona.<sup>5</sup>



Obr. 4.1: Optické schéma spektrometru pro měření Ramanovy optické aktivity.

Optické schéma spektrometru je znázorněno na obr. 4.1. Zdrojem záření je kontinuální argonový iontový laser (Coherent Innova 305). Interferenční filtr nebylo třeba instalovat, neboť plazmové záření laserové trubice nebylo v měřených spektrech pozorovatelné. Za výstupem laseru je umístěn Glan-Taylorův polarizátor (GT 10, Leysop) zvyšující stupeň lineární polarizace budícího záření. Svazek lineárně polarizovaného záření vstupuje do elektrooptického modulátoru (EOM) (Leysop EM 565), který generuje pravo- a levotočivě kruhově polarizované záření. EOM je podélná Pockelsova cela, jejímž základem je krystal dideuterofosforečnanu draselného (KD\*P). Aby se zabránilo dvojlomným posuvům v důsledku teplotních změn, je krystal umístěn v teplotně stabilizovaném pouzdře, jehož teplota je stabilizována pomocí kontrolní jednotky (CAL 3200) na 28 °C s přesností  $\pm 0,1$  °C.



Modulovaný paprsek je fokusován do vzorku plosko-vypuklou křemennou čočkou (Melles Griot 01LQP013,  $f=150$  mm, průměr 25 mm). Díky tomu, že aparatura využívá uspořádání zpětného rozptylu, bylo nutno mezi fokusující čočku a vzorek umístit vrtané prvky: 45°-zrcadlo, kolimující čočku a Lyotův depolarizátor. Budící svazek prochází otvory o průměru 2,5 mm vyvrtanými ve středu těchto optických prvků a vstupuje do kyvety se vzorkem.

Pro měření se nejlépe osvědčily křemenné fluorescenční kyvety 5×5 mm (Hellma 111.057, vnější rozměr 7,5×7,5 mm, Quartz SUPRASIL), které jsou umístěny v kombinovaném mechanickém držáku (Melles Griot, Vývojové dílny MFF UK) umožňujícím posuv ve směru os  $x$ ,  $y$  a  $z$ . Minimální potřebný objem vzorku je přibližně 90  $\mu\text{m}$ , pro objemy 120  $\mu\text{m}$  a více je měření velmi pohodlné. Rozptýlené záření je sbíráno pod úhlem 180° vzhledem ke směru šíření budícího záření a následně depolarizováno Lyotovým depolarizátorem (Leysop), který zamezuje vzniku polarizačních artefaktů při odrazu na 45°-zrcadle. Sestává ze dvou destiček z krystalu kalcitu o tloušťkách 3,5 a 7 mm, které jsou slepeny optickým cementem a jejichž optické osy jsou vůči sobě otočeny o úhel  $45,0 \pm 0,2^\circ$ . Velmi důležité je, aby byla silnější část Lyotova depolarizátoru otočena směrem ke vzorku, což zajišťuje lepší depolarizaci záření a tedy nižší úroveň artefaktů (tento fakt byl experimentálně ověřen, jev je velmi výrazný i pro oblast vibrací s nízkým vlnočtem). Depolarizátor je umístěn společně s kolimující dvojevypuklou křemennou čočkou ( $f = 25$  mm, průměr 25 mm, zacloněna na cca  $f/1,2$ , Optická a sklářská dílna MFF UK) v držáku s mikrometrickými posuvy  $x$  a  $y$ , a navíc je vložen do mikrometrického otočného držáku (Melles-Griot), který umožňuje jeho samostatnou rotaci kolem osy  $z$ . Všechny zmiňované optické elementy jsou ze vstupní i výstupní strany pokryty antireflexní vrstvou.

Depolarizovaný a kolimovaný svazek je rovinným zrcadlem eliptického tvaru o rozměrech 30 × 42 mm (Optická sklářská dílna MFF UK) svírajícím s dopadajícím paprskem úhel 45° odkloněn o 90° od původního směru (do směru osy  $-y$ ). Povrch zrcadla je pokryt stříbrem s ochrannou vrstvou  $\text{SiO}_2$  (Vývojová optická dílna AV ČR), které má vyšší odrazivost (až 93%) než vrstva hliníková a dále pak menší rozdíl v odrazivosti pro  $s$  a  $p$  polarizaci dopadajícího záření. Zrcadlo je umístěno na speciálním držáku umožňujícím jeho jemné naklápění kolem horizontální a vertikální osy (Vývojové dílny MFF UK) a dále na  $x$ ,  $y$ ,  $z$  posuvech (Melles Griot) dovolujících jeho přesné polohování.

K potlačení Rayleighova rozptylu je do kolimovaného svazku umístěn holografický SuperNotch-Plus filtr o průměru 2" (Kaiser Optical Systems, Inc., 514,5 nm, optická hustota  $>6.0$ , spektrální hrana  $< 150 \text{ cm}^{-1}$ ). Před "notch" filtr je vhodné vložit do osy svazku

nepropustný kruhový terčik o průměru cca 12 mm, který odstraňuje "málo depolarizované" záření, tj. záření v blízkosti středu svazku, jež prošlo depolarizátorem pod malým úhlem. Lyotův depolarizátor totiž pracuje neefektivněji v silně rozbíhavých svazcích. Dojde tak sice ke ztrátě přibližně 20-30% signálu, která je ale bohatě kompenzována zvýšením kvality spekter díky potlačení artefaktů.

Prošlé záření je fokusováno světelným fotografickým objektivem AF Nikkor 50 mm f/1.4D (Nikon) na vstupní štěrbinu spektrografu. Mezi objektivem a štěrbinou je ještě umístěna elektronická závěrka ovládaná přímo z kontrolní jednotky CCD detektoru.

K dosažení co nejlepšího poměru signál/šum je použit vysoce světelný stigmatický jednomřížkový (single-stage) spektrograf (Kaiser Optical Systems, model HoloSpec f/1.4) v osové (in-axis) uspořádání. Šířka vstupní štěrbinu není nastavitelná, ale štěrbinu je možno vyměňovat. Pro většinu experimentů byla použita štěrbinu o šířce 50  $\mu\text{m}$ , která poskytuje při budícím záření 514,5 nm spektrální rozlišení přibližně  $6,5 \text{ cm}^{-1}$  (k dispozici je také štěrbinu 83  $\mu\text{m}/10 \text{ cm}^{-1}$ ). Výška štěrbinu je vždy 8 mm. Uvnitř spektrografu je záření kolimováno fotografickým objektivem Nikkor 85 mm f/1.4 (Nikon), difraktováno holografickou transmisní mřížkou (HSG-514.5-LF) a nakonec fokusováno objektivem Nikkor 85 mm f/1.4 na zpětně osvětlovaný (back-illuminated) CCD detektor (LN-CCD-1340/100-EB/1, Roper Scientific) s kvantovou účinností v používané spektrální oblasti až 80%. CCD čip je umístěn do fokální roviny výstupního objektivu, která má šířku 25 mm. Vstupní matice kapalným dusíkem chlazeného detektoru obsahuje  $1340 \times 100$  detekčních elementů (pixelů) na ploše  $26,8 \times 2,0$  mm. Velikost jednoho pixelu je tedy  $20 \times 20 \mu\text{m}$ . Posuvný registr detektoru je umístěn podél delší osy detektoru. Kontrolní jednotka ST-133 je opatřena 16-ti bitovým A/D převodníkem s výrobcem garantovanou linearitou  $> 98\%$ . Kapalným dusíkem vydrží v dobře vyčerpané Dewarově nádobě u detektoru až 40 hodin. Čerpání nádoby je třeba provádět alespoň jednou za rok. Pracovní teplota detektoru byla nastavena na  $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Klíčovým elementem aparatury je vysoce světelný spektrograf s novou transmisní mřížkou založenou na "volume-phase" technologii.<sup>143</sup> Mezi kolimačním a fokusačním objektivem prochází kolimovaný svazek záření, které je transmisní mřížkou o účinnosti pro nepolarizované záření až  $80\%$ <sup>144</sup> odkloněno o  $90^\circ$ . V kombinaci s dobře korigovanou optikou použitých fotografických objektivů je možno dosáhnout rovinného zobrazení (stigmatický spektrograf) až na úrovni difrakční limity. Použitá mřížka má disperzi  $2.6 \text{ cm}^{-1}/\text{pixel}$  ( $3.0 \text{ nm}/\text{mm}$ ) a na CCD detektoru je tak možno zaznamenat oblast od cca  $-200$  do  $2400 \text{ cm}^{-1}$  (při excitaci 514,5 nm).

## **Další provedené úpravy spektrometru**

Před dokončením disertační práce byla na ROA spektrometru provedeno ještě několik úprav, které bude v budoucnu ještě třeba dostatečně otestovat. Všechna měření uvedená v této práci byla provedena ještě bez následujících vylepšení.

Za EOM byla umístěna rotující půlvlnová destička (Zero Order Crystalline Quartz Retardation Plate, Standa, model WPZO.2-1@532) umožňující v průběhu experimentu vystředovat zbytkovou elipticitu záření vycházejícího z EOM.<sup>35</sup> Půlvlnová destička je usazena v rotující motorizovaná jednotce (Standa, model 8MR150-30) řízené z PC. Rychlost otáčení je možno volit, optimální je např. 10°/s. Je třeba si ještě uvědomit, že umístěním tohoto prvku do optické dráhy dojde ke změně smyslu kruhové polarizace záření dopadajícího na vzorek, to znamená, že při výpočtu rozdílu akumulací dvou signálů je třeba zaměnit menšence a menšitele.

Jedním z omezení při použití ROA jsou poměrně velké nároky na množství vzorku. Jednou z cest k odstranění tohoto problému je redukce objemu vzorku. Byl vyroben držák na speciální kyvety (Starna, 21/SHORT/4X4/10B/AR, ztenčené stěny, antireflexní pokrytí MgF<sub>2</sub>) o vnitřním rozměru 4×4 mm, které umožňují zmenšit objem vzorku až na 60 μm, dále byly poměrně úspěšně testovány také kyvety 3×3 mm (Hellma, 101.015-QS) s použitelným objemem 30 μm, u nichž už ale dochází ke značné ztrátě signálu (30%) a začíná se projevovat výrazný signál skla (tato kyveta nemá ztenčené stěny).

Velké rozšíření možností ROA spektrometru představuje měření vzorků za různých dobře definovaných teplot. Byla navržena a vyrobena teplotní cela (mechanická dílna FÚ UK), připojená k cirkulačnímu termostatu Neslab RTE111, dovolující měření při teplotách vzorku v rozmezí od cca 5 do 90 °C. Teplotní cela byla navržena tak, aby do ní bylo možné umístit různé typy kyvet.

Excitační Ar<sup>+</sup> laser byl nahrazen laserovým systémem Verdi (Coherent), diodami čerpaný Nd:YAG laser s generací druhé harmonické s vlnovou délkou 532 nm a maximální výstupní výkonem 2 W, což sice přineslo nákladnou výměnu SuperNotch Plus filtru a holografické mřížky spektrometru (za HSG-532-LF, pokrytí -20 až 2350 cm<sup>-1</sup>, disperze 2,4 cm<sup>-1</sup>/pixel (3,0 nm/mm), Kaiser Optical Systems, Inc.), na druhou stranu však znamená výrazně nižší náklady na provoz a údržbu excitačního laseru a snížení hladiny hluku v laboratoři.

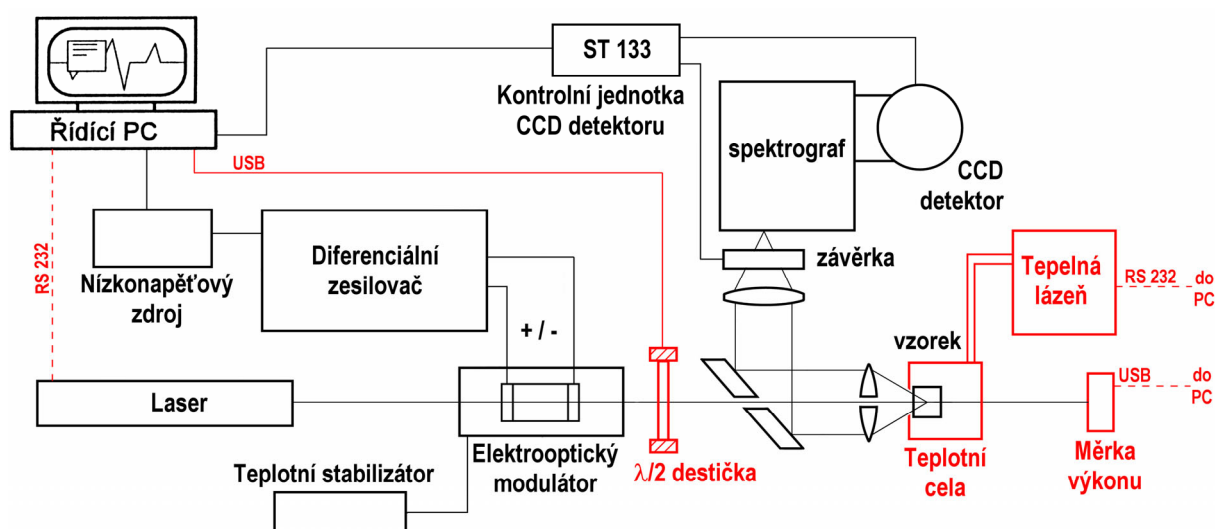
## **Řídící část ROA spektrometru**

Blokové schéma spektrometru je znázorněno na obr. 4.2. Experiment je řízen pomocí PC (Pentium II/400 MHz, 128MB RAM), kterým je ovládáno spínání napětí přiváděného na

elektrooptický modulátor pro generování pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného budícího záření a sběr dat z CCD detekčního systému.

Napětí přiváděné na EOM je  $1000\times$  zesílené výstupní napětí stabilizovaného nízkonapětového zdroje (NNZ). Zesílení je dosaženo diferenciálním zesilovačem (Leysop, model 5000) s maximálním vstupním napětím  $\pm 2,5$  V.

NNZ je řízen dvěma TTL signály generovanými paralelním PIO12 interfacem řídicího počítače, jedním pro kladné a druhým pro záporné vstupní napětí. Úroveň stabilizovaného výstupního napětí je možné měnit pomocí přesného potenciometru v rozmezí 0–2,5 V s citlivostí 2,5 mV.



**Obr. 4.2:** Blokové schéma ROA spektrometru. Červeně jsou označeny prvky, které byly do aparatury zabudovány, ale je třeba je otestovat. Čárkovaně jsou naznačena elektronická spojení, která nejsou sice pro chod experimentu bezpodmínečně nutná, ale mohou být použita pro automatizaci.

CCD detektor je ovládán pomocí kontrolní jednotky ST133 (Princeton Instruments). Základem řídicího softwaru je programový balík Winspec/32 (verze 2.5.4.4) a knihovny Macro Record Option, které umožňují ovládat Winspec z prostředí programu Visual Basic 6. V tomto jazyku bylo také vyvinuto prostředí pro ovládání, komunikaci s jednotlivými prvky aparatury a ukládání dat. Podrobný popis a použití programového prostředí je uveden v kapitole 4.2.2.

Přes USB je napojen a ovládán krokový motor zajišťující rotaci půlvlnové destičky umístěné za EOM (Standa, 8SMC1-USBh - Microstep Driver (USB Interface)).

Stávající řízení spektrometru bude možno v budoucnu ještě doplnit a umožnit tak např. automatickou ochranu vzorku před zničením apod. Jde především o napojení měrky výkonu (FieldMax-TO, Coherent, part number 1058846, hlava OP-2 VIS part number 1061323 s atenuátorem 1:1000 part number 33-1298-000 s velmi rychlou odezvou – cca 100 ms) přes

USB a zaznamenávání výkonu procházejícího záření za vzorkem v průběhu měření. To by umožnilo při dlouhodobých měřeních (bez přítomnosti obsluhy) kontrolu, zda nedochází ke změnám (agregaci, rozptylu) ve vzorku. Kontrolní jednotka laseru může být také napojena na řídicí PC přes RS 232 a v případě potřeby by laser mohl být vypnut (přepnutím do režimu STANDBY), čímž by bylo možné zabránit zničení drahého nebo nenahraditelného vzorku.

Přes RS 232 je také možné ovládat z PC teplotní lázeň.

## **4.2 ROA Experiment**

### **4.2.1 Sestavování aparatury**

Stavba a ladění aparatury je náročný proces, při dodržení správného pořadí kroků je však možné ho zvládnout bez větších potíží během několika dní.

Aparatura je umístěna na aluminiové desce 60×90 cm se sítí otvorů 25×25 mm (Melles Griot), která umožňuje snadnou a reprodukovatelnou montáž. Držáky jsou připevňovány přímo k desce, vůle před utažením šroubů dovoluje dostatečné naklápění k nastavení kolmosti optických elementů na osu procházejícího svazku.

Nastavení aparatury je možno rozdělit do několika kroků:

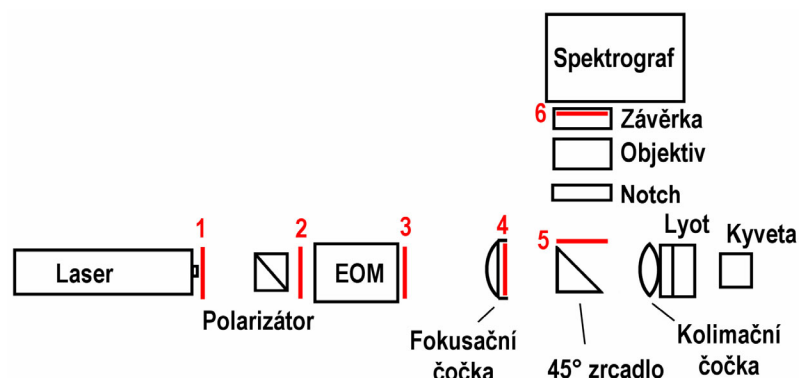
#### **I. Definování optických os**

1. Nastavení polohy laseru. Provádí se pomocí nastavovacích clonek (jedna na začátku, druhá na konci stolu, případně jedna hned za výstupem z laseru), případně podle značky na zdi.
2. Nastavení polohy spektrografu. Není-li to už provedeno, je třeba dobře definovat optickou dráhu záření vstupujícího do spektrografu. Na základní desku se umístí pomocné kolejnice a clony, kolmo na budící svazek se nastaví svazek vycházející z pomocného He-Ne laseru (svazek musí být vodorovný). Podle nastaveného svazku pomocného laseru se najde správná poloha spektrografu: ze spektrografu se vyjme mřížka, místo ní se vloží nastavovací kolík, podle procházejícího svazku se nastaví správná výška a orientace spektrografu.

#### **II. Sestavení optické části systému a maximalizace Ramanova signálu**

3. Nastavení polohy EOM. Proveďte se pomocí posuvů podél os  $x$  a  $y$  tak, aby svazek procházel středem krystalu uvnitř EOM. Orientace krystalu (rotace kolem os  $x$  a  $y$ ) se nastavuje podle

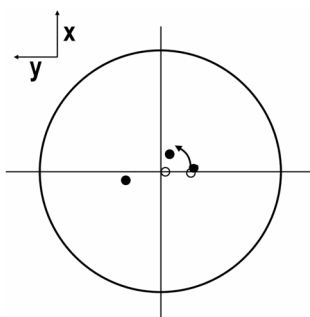
reflexí na cloně za výstupem laseru (clona 1, obr. 4.4). Rotace kolem osy  $z$  se provede jen orientačně, přesněji bude nastavena později.



**Obr. 4.3:** Optická část aparatury a poloha clon (označeny červeně a očíslovány) používaných pro nastavování aparatury.

4. Nastavení kolmosti polarizátoru na vstupní svazek. Polarizátor se umístí před EOM kolmo na procházející svazek záření. Jeho orientaci je třeba nastavit tak, aby střed kruhu tvořeném stopou od zpětné reflexe při rotaci polarizátoru na cloně 1 souhlasil se středem clony. Vzdálenost zpětných reflexí od středu clony 1 by neměla překročit cca 1-2 mm.

5. Nastavení orientace polarizátoru. Měřka výkonu se umístí za EOM, rotací polarizátoru kolem osy  $z$  se nastaví pro maximální hodnotu výkonu procházejícího záření.

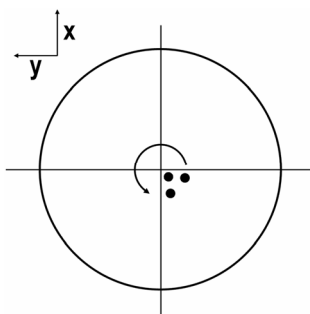


**Obr. 4.4:** Poloha zpětných odrazů z EOM na cloně 1 (plné body) a polarizátoru (prázdné body) v ideálním případě. Při rotaci polarizátoru (i EOM) kolem osy  $z$  by měly zpětné reflexe rotovat kolem středu clony.

6. Nastavení polohy Lyotova depolarizátoru kolmo na rovinu svazku (fokusační čočka ještě není v držáku připevněna!). Pokud by nebyl depolarizátor nastaven kolmo na procházející svazek, docházelo by při jeho rotaci k odklánění rozptýleného svazku a k pohybu zobrazované stopy v rovině štěrbiny spektrografu. Následkem toho by docházelo k velkým změnám

intenzity detekovaného Ramanova záření a správnou polohu depolarizátoru (rotace kolem osy  $z$ ) při ladění ROA signálu by pak nebylo možno nalézt.

Na počátku nastavování je nutno snížit výkon laseru, Lyotův depolarizátor se posune ve směru osy  $x$  nebo  $y$  tak, aby jím procházel laserový svazek (při měření tato situace samozřejmě nenastává). Zpětná reflexe na cloně 3 (viz obr. 4.5) za EOM slouží jako velmi dobrý ukazatel, zda je depolarizátor nastaven kolmo na procházející záření. Cílem je minimalizovat průměr kruhu, po kterém se reflexe pohybují při rotaci depolarizátoru a umístit jeho střed na střed clony. Toho lze dosáhnout podkládáním tenkých hliníkových plíšků pod některý ze tří šroubů na držáku depolarizátoru, případně naklopením nebo podložním celého držáku depolarizátoru a kolimační čočky.



**Obr. 4.5:** Zpětné reflexe od Lyotova depolarizátoru na cloně 3. Cílem je minimalizovat kruh, který opisují reflexe při otáčení depolarizátoru a nastavit střed kruhu na střed clony.

Nakonec se  $x$  a  $y$  poloha Lyotova depolarizátoru nastaví opět tak, aby budící záření procházelo středem vyvrtaného otvoru.

7. Nastavení polohy fokusační čočky ( $f = 150$  mm). Plochá strana čočky je orientována směrem ke vzorku (to zaručuje ideální zobrazení, ve skutečnosti ale orientace čočky nemá na celkový výsledek příliš velký vliv). Nastavuje se poloha ( $xy$ -posuv v držáku čočky), vertikální (naklopení celého držáku kolem svislé osy) a horizontální (podkládáním aluminiovými plíšky) naklápění podle odrazů na cloně 3 a procházejícím záření v místě značky na zdi. Všechny reflexe se musí jevit středově symetrické. Nakonec je třeba zkontrolovat polohu clonky 4 přilepené přímo na držáku čočky, tak aby laserový svazek procházel jejím středem.

8. Vzorková část. Je třeba nastavit kolmost kyvety podle reflexe na cloně 3. Správnou polohu je možno nastavit podkládáním plíšků mezi držák kyvety a redukci. Celý systém se pak umístí na vertikální posuv. Tento postup je shodný i pro kyvety umístěné v teplotní cele.

Kyvety 5×5 mm nemají antireflexní pokrytí a tak docházelo u Ar<sup>+</sup> laseru k rezonanci se stabilizační diodou laseru, což způsobovalo velké nestability výstupního výkonu laseru. Tento problém bylo možno vyřešit tím, že se kyveta před měřením mírně naklopila (opět kontrola dle reflexe na cloně 3). Tento problém by u Nd:YAG laseru neměl nastávat.

9. Nastavení kolimační čočky ( $f = 25$  mm). Čočka se vloží zpět do společného držáku s Lyotovým depolarizátorem. Je nutno snížit výkon laseru na cca 10 mW. Do vzorkového prostoru se zasune testovací lepená kyveta s bílou difuzní (papírovou) stěnou (zůstává tam i u kroků 10 a 11 nastavovací procedury). Nastavuje se  $x$  a  $y$  poloha celého držáku kolimační čočky a depolarizátoru tak, že sledujeme umístění stop rozptýleného záření na clonách 3 a 4. Stopy musí být symetrické, stejně tak jako útvary tvořené při zavírání clony 4. Je-li kolmost Lyotova depolarizátoru dobře nastavena, stopa zpětné reflexe se při jeho rotaci nepohybuje. To je umožněno také tím, že kolimační čočka je upevněna odděleně od depolarizátoru a při jeho rotaci se neotáčí.

10. Nastavení 45°-zrcadla. Vyjme se notch filtr, objektiv a závěrka. Vloží se clony 5 (těsně za zrcadlo) a 6 (těsně před spektrograf). Pomocí kolimovaného rozptýleného záření procházejícího clonami se nastaví poloha i naklopení zrcadla. Při nastavování je třeba také kontrolovat, aby laserový svazek procházel středem otvoru v zrcadle (vyjme se papírová kyveta a zvýší se výkon laseru až na pracovní hodnotu, zkontroluje se průchod svazku středem otvoru v zrcadle posuvem ve směrech  $x$  a  $y$ , sníží se výkon laseru a vrátí zpět papírová kyveta pro doladění správného naklopení 90°-zrcadla). Nakonec se clony 5 a 6 odstraní.

11. Do pracovní polohy se vrátí závěrka a notch-filtr, jejich poloha se nastaví tak, aby kolimovaný svazek procházel jejich středem. Nakonec se do bajonetového držáku umístí fokusační objektiv Nikkor 50/1.4.

12. Ostření objektivu uvnitř spektrografu, nastavení CCD do zobrazovací roviny spektrografu (naklopení CCD kolem horizontální a vertikální osy). Provádí se pomocí záření neonové výbojky (Oriel, model 6032 Neon). Na notch filtr se ze strany otočené k objektivu položí bílé papírové stínítko, které se rovnoměrně osvětlí neonovou výbojkou. Správné horizontální naklopení detektoru (pomocí šroubu HT na spektrografu) zajistí, aby byla současně v ohnisku levá i pravá část detektoru. Obraz štěrbiny je na detektoru zakřiven a má tvar paraboly.<sup>145</sup> Pomocí vertikálního naklopení (šroubu VT na spektrografu) se zajistí, aby střed paraboly



souhlasil se středem detektoru. Správný sklon detektoru se nastaví v kroku 14. Zakřivení obrazu štěrbinu je důležitý fakt, který je třeba při měření zohlednit.

13. Nastavení polohy objektivu a držáku vzorku. Oba tyto elementy je nutno nastavovat současně, neboť jejich poloha je vzájemně závislá. Do držáku vzorku se vloží kyveta o tloušťce 5 mm naplněná dostatečným množstvím toluenu. Nejdříve se nastaví poloha objektivu Nikkor 50mm tak, aby byla stopa strávně zobrazována na štěrbinu ( $z$ -posuv pro posun kolmo na štěrbinu a  $x$ -posuv pro umístění středu stopy na střed štěrbinu). Závislost signálu na  $z$ -posuvu vzorku a  $y$ -posuvu objektivu je vzájemně závislá a je třeba hledat optimum signálu v závislosti na těchto dvou parametrech současně. V průběhu nastavení je třeba občas zkontrolovat, zda stopa prochází středem štěrbinu ( $z$ -posuv objektivu)

14. Nastavení správného sklonu detektoru. Spektrum toluenu se zobrazí v obrazovém (image) módu a zkontroluje se, zda stopa maximálního signálu prochází středem detektoru (maximální intenzita pásu ve svislém směru na stejném  $y$ -pixelu (podél svislé osy) pro pásy na levé i pravé straně detektoru). Mírným opatrným naklopením a podložením CCD je třeba provést korekce.

15. Nastavení  $z$ -polohy fokusační čočky 15 cm. Zkušenost ukazuje, že optimálního signálu je dosaženo v případě, že ohnisko leží několik mm před středem kyvety.

Kroky 12. – 15. je třeba provádět iterativně (pro jemnější doladění je opakovat ještě alespoň jednou).

16. Před notch filtr se vloží kruhový terčík o průměru 12 mm. Nastaví se do středu svazku (jeho správná poloha by měla odpovídat středu notch filtru). Dále je dobré ještě jemněji nastavit polohu vzorku a objektivu pro optimální signál (krok 13). Tento terčík blokuje málo depolarizované záření ve středu svazku (Lyotův depolarizátor pracuje nejlépe v silně divergentním svazku, paprsky procházející blízko středu optické dráhy jsou depolarizovány nejméně a při odrazu na  $45^\circ$ -zrcadlem mohou způsobovat největší artefakty).

### **Kontrola čistoty optických prvků**

Ukazuje se, že na optických elementech, kterými prochází intenzivní svazek laserového záření, dochází ve zvýšené míře k zachytávání mikroskopických prachových částic a následkem toho v lepším případě ke ztrátě výkonu záření ve vzorku, v horším případě ke ztrátě kvality záření (polarizačním artefaktům). Je tedy vhodné alespoň jednou za dva měsíce zkontrolovat hodnoty

ztrát výkonu procházejícího záření a pokud se tyto hodnoty výrazně zhorší oproti údajům uvedeným v tabulce 4.1, je nutno prvky standardní procedurou vyčistit. Například ztráta na fokusační čočce se za dva měsíce provozu zvýšila až o 3%, na elektrooptickém modulátoru činila tato ztráta po několikaletém používání až 35%!

**Tab. 4.1:** Hodnoty útlumu procházejícího záření na jednotlivých elementech.

<b>Optický prvek</b>	<b>ztráta výkonu (% dopadajícího záření)</b>
polarizátor	12
EOM	16
fokusační čočka (f=150 mm)	8

### **III. Generace kruhově polarizovaného záření – nastavení elektrooptického modulátoru**

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících úspěšné měření ROA spekter je generace co nejlepší kruhové polarizace budícího záření, která je zajišťována elektrooptickým modulátorem.

Elektrooptický modulátor použitý v ROA aparatuře je založen na Pockelsově jevu, který je lineárním elektrooptickým jevem. Elektrické napětí přiložené rovnoběžně se směrem procházejícího záření indukují v krystalu modulátoru dvojosou anizotropii (v nepřítomnosti elektrického pole je krystal jednoosý).

Pro elektromagnetické záření procházející jednoosými krystaly ve směru optické osy existuje pouze jedna hodnota indexu lomu. Průmět indexového elipsoidu popisujícího rozložení indexu lomu krystalu má v rovině kolmé k procházejícímu svazku tvar kružnice, je tedy stejný pro všechny orientace polarizačních rovin. Přiložením napětí na krystal modulátoru ve směru rovnoběžném s procházejícím paprskem se z rotačního elipsoidu stane elipsoid trojosý, což znamená, že kolmý průmět elipsoidu má nyní tvar elipsy s poloosami  $a$  a  $b$  ( $a \neq b$ ), viz obr. 4.6. Velikost poloos  $a$  a  $b$  je nepřímo úměrná indexům lomu  $n_o$  a  $n_e$  určujícím rychlost šíření paprsků s danou orientací polarizační roviny.

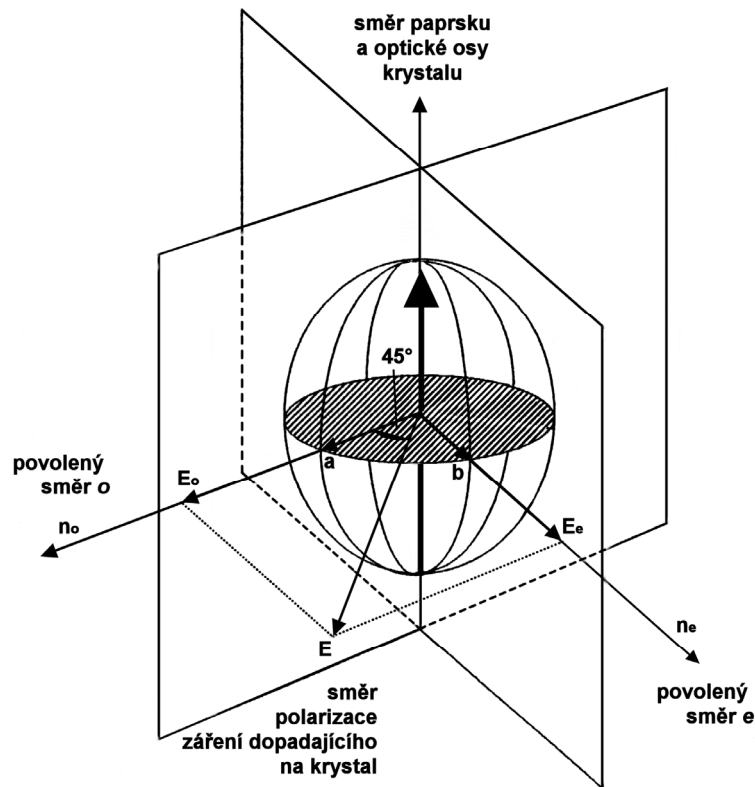
Podle teorie šíření elektromagnetického záření může anizotropním krystalem procházet pouze záření lineárně polarizované ve směru jedné ze dvou poloos kolmého průřezu elipsoidu indexu lomu <sup>146</sup>. Paprsek procházející krystalem modulátoru je proto v daném případě složen ze dvou ortogonálních složek určených povolenými směry v anizotropním krystalu. Lineárně polarizované ortogonální složky procházejícího paprsku jsou navzájem zpožděny o fázový o fázový rozdíl  $\delta$ :

$$\delta = \frac{2\pi d}{\lambda} |n_o - n_e| \quad (4.1)$$

kde  $d$  je délka krystalu a  $\lambda$  je vlnová délka procházejícího záření. Fázový rozdíl  $\delta$  je tedy lineárně závislý na délce krystalu  $d$  a na indukovaném rozdílu indexů lomu. Při Pockelsově jevu je změna indexu lomu anizotropního prostředí úměrná velikosti přiloženého napětí a její závislosti pro námi použitý krystal má tvar <sup>147</sup>:

$$n_x = n_o \pm \frac{1}{2} n_o^3 r_{63} \frac{U}{d} \quad (4.2)$$

kde  $n_x$  je index lomu v povoleném směru anizotropního stavu,  $n_o$  je index lomu v izotropním stavu,  $U$  je velikost podélně přiloženého napětí a  $r_{63}$  je elektrooptický koeficient.



Obr. 4.6: Elipsoid indexu lomu.

Z rozdílu indexů lomu dvou složek procházejícího paprsku plyne vztah pro fázový rozdíl

$$\delta = \frac{\pi n_o^3 r_{63} U}{\lambda} \quad (4.3)$$

Fázový rozdíl je tedy přímo úměrný velikosti přiloženého napětí, veličiny  $r_{63}$ ,  $n_o$  a vlnová délka  $\lambda$  jsou pro daný experiment konstantní. V případě nulového napětí přiloženého na krystal vystupuje z EOM nemodulovaný lineárně polarizovaný svazek, zatímco v případě přiloženého

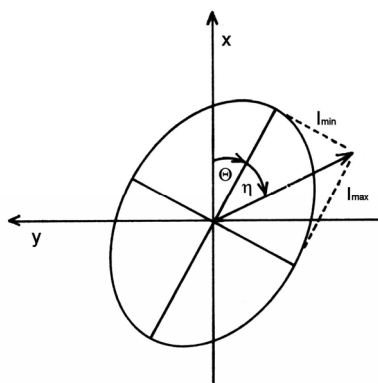
nenulového napětí vystupuje z EOM obecně elipticky polarizované záření. Hodnota fázového rozdílu  $\delta$  bude rovna  $\pi/4$  pro tzv. čtvrtvlnové napětí; v tom případě z EOM vystupuje v závislosti na polaritě přiloženého napětí pravo- nebo levotočivě kruhově polarizovaný svazek záření.

Je důležité si uvědomit, že procházející paprsek je součtem ortogonálních složek polarizovaných ve směrech  $n_o$  a  $n_e$ . Výše uvedená úvaha o generaci kruhové polarizace může tedy platit jen tehdy, mají-li tyto složky stejnou velikost. Prakticky to znamená, že kruhově polarizované záření lze generovat pouze v případě, že směry  $n_o$  a  $n_e$  budou s polarizační rovinou vstupujícího lineárně polarizovaného záření svírat přesně úhel  $45^\circ$ .

Pockelsova cela použitá v naší aparatuře obsahuje krystal dideuterofosforečnanu draselného (KD\*P), který pro generování kruhově polarizovaného záření vyžaduje čtvrtvlnové napětí  $\sim 1,5$  kV. Podle firemní charakteristiky by měla propustnost krystalu ve viditelné oblasti dosahovat přibližně 89%.

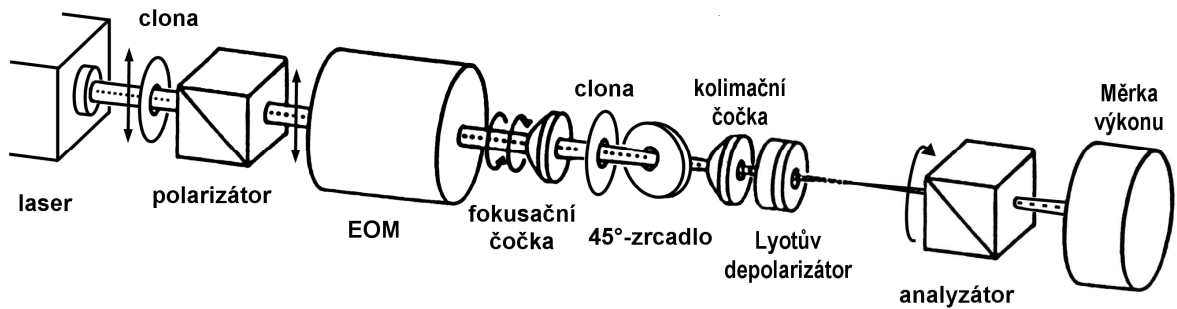
Elektrooptický modulátor je optický prvek, jehož funkce je závislá na orientaci vůči procházejícímu záření a je tedy nutné nalézt experimentálně jeho optimální orientaci a příslušná elektrická napětí, která jsou na něj přikládána, což činí celkem sedm stupňů volnosti. Příčná poloha ( $x$ ,  $y$  posuv) a úhel vůči dopadajícímu paprsku (naklápění kolem os  $x$  a  $y$ ) je možno nastavit už při sestavování optického systému (krok 3), zbývá tedy nastavit orientaci vůči polarizační rovině dopadajícího paprsku (rotace kolem osy  $z$ ) a dvě čtvrtvlnová napětí (pro oba smysly kruhové polarizace vystupujícího záření). Tyto tři stupně volnosti jsou na sobě navzájem závislé a je třeba je nastavovat současně.

Elektrooptický modulátor je nutno nastavit tak, aby se po přiložení čtvrtvlnového napětí lineární polarizace paprsku vstupujícího do modulátoru změnila na kruhovou polarizaci. K popisu kvality kruhové polarizace záření lze použít reziduální elipticitu  $\eta$ , která je zavedena na obr. 4.7.



**Obr. 4.7:** Charakterizace eliptické polarizace procházejícího paprsku.

Nastavení EOM se provádí v uspořádání uvedeném na obr. 4.8 s využitím procedury navrženém Diemem.<sup>148</sup> Úprava spočívá v umístění EOM mezi dva lineární polarizátory, přičemž analyzátor (polarizátor umístěný za EOM) je uchycen v držáku umožňujícím jeho otáčení kolem osy svazku. Paprsek vystupující z EOM dopadá po průchodu polarizátorem na měрку výkonu.



**Obr. 4.8:** Uspořádání aparatury pro nastavení EOM.

Sledujeme intenzitu  $I$  svazku dopadajícího na měрку výkonu v závislosti na úhlu  $\phi$  vzájemné orientace obou polarizátorů. Pokud je napětí na EOM nulové, vystupující záření je lineárně polarizované a závislost má tvar

$$I = I_0 \cos^2 \phi \quad (4.4)$$

kde  $I_0$  je intenzita záření dopadajícího na analyzátor při  $\phi = 0$ . Platí, že pokud se hodnota přiloženého napětí blíží hodnotě čtvrtvlnového napětí a polarizace záření vystupujícího z EOM se blíží kruhové polarizaci, závislost  $I(\phi)$  je charakterizována přiblížením minim a maxim k hodnotě  $I_0/2$  tak, že v případě ideální kruhové polarizace je  $I(\phi) = I_0/2$ .

V průběhu nastavování sledujeme hodnotu reziduální elipticity určené vztahem

$$\eta = \arctg \frac{I_{\min}}{I_{\max}} \quad (4.5)$$

Cílem je dosáhnout hodnoty  $\eta$  co nejbližší k  $45^\circ$ .

17. Nastavení čtvrtvlnových napětí a správné orientace krystalu v EOM. Nastavení je nutno provádět v několika krocích:

- a. nastavení výstupního napětí nízkonapětového zdroje
- b. nastavení správné orientace krystalu (rotace kolem osy  $z$ )
- c. jemné doladění napětí na vysokonapětovém zesilovači

Díky tomu, že použitý krystal v EOM není zcela ideální, čtvrtvlnová napětí generující pravo- a levotočivě kruhově polarizované záření mají v reálném případě různou absolutní hodnotu. Jejich nezávislé nastavení (při stejné absolutní hodnotě vstupního napětí) je možné pomocí kontrolních limitů diferenciálního zesilovače (POSITIVE LIMIT, NEGATIVE LIMIT). Citlivost celého procesu umožňuje nastavit čtvrtvlnová napětí přikládaná na EOM s dostatečnou přesností  $\pm 2,5$  V.

Kroky b. a c. (nastavení POSITIVE LIMIT i NEGATIVE LIMIT) je třeba provádět v součinnosti a iterativně, zaznamenávat dosažené hodnoty elipticity, údajů na zesilovači i úhlu natočení EOM kolem podélné osy tak, aby bylo možné systematické zlepšování parametrů nastavení aparatury.

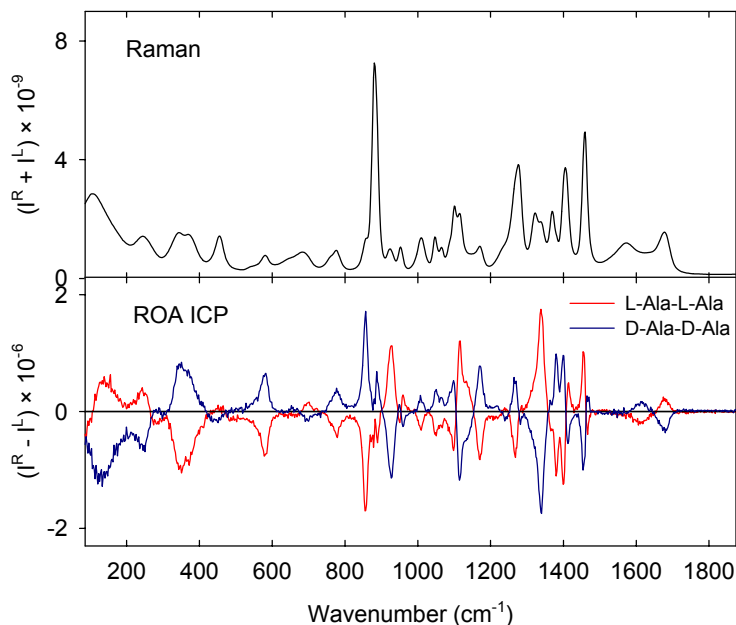
V případě velkých změn v natočení EOM kolem osy  $z$  je třeba ještě provést kontrolu podle bodu 11.

Aparatura je velice stabilní v řádu několika týdnů, občas je však vhodné zkontrolovat a případně jemně donastavit čtvrtvlnová napětí. Zkušenost ukazuje, že hodnota reziduální elipticity nutná pro měření ROA spekter s minimální úrovní artefaktů by měla být lepší než  $44^\circ$  a to pro obě točivosti. Ukazuje se, že běžně je možné dosáhnout hodnoty až  $44,3^\circ$ .

#### **IV. Optimalizace ROA signálu – ladění aparatury**

Poslední fází ladění aparatury je optimalizace ROA signálu. Tato procedura spočívá ve sledování závislosti ROA signálu na orientaci Lyotova depolarizátoru, jehož správnou orientaci je nutno nalézt experimentálně. V minulosti byly pro testování užívány kapalné chirální látky (enantiomery  $\alpha$ -pinenu nebo *trans*-pinanu). V současnosti to však není příliš vhodné, neboť tyto kapaliny poskytují intenzivní Ramanův rozptyl a expoziční doba jednotlivých akumulací musí tedy být extrémně krátká (řádově 0,1 s), aby nedošlo k přesycení detektoru. Doba odečtu signálu z CCD detektoru je však relativně dlouhá (v obrazovém módu až 2 s, ve spektrálním módu  $\sim 1$  s) a měření je tak velmi neefektivní. Druhým důvodem je, že optimální poloha Lyotova filtru se většinou mírně liší pro čisté organické kapaliny a vodné roztoky, které jsou většinou na aparatuře studovány. Velmi dobře se osvědčilo použití koncentrovaných roztoků (2 M) obou enantiomerů dialaninu (L-alanyl-L-alaninu a D-alanyl-D-alaninu), u nichž je možné dosáhnout velmi dobrého poměru signál šum už za cca 10-20 minut (akumulační doba kolem 1.5 s při výkonu laseru na vzorku cca 500 mW). Spektrum obsahuje pásy jak silně polarizované ( $\rho \rightarrow 0$ ) tak i depolarizované ( $\rho \rightarrow 3/4$ ), pro které mohou být v ROA spektrech pozorovány silné polarizační artefakty.<sup>10</sup>

Nejdříve je vhodné proměřit závislosti ROA signálu na poloze Lyotova depolarizátoru v rozsahu  $0 - 360^\circ$  s krokem  $20^\circ$ , vybrat nejlepší polohu, doladit z-polohu objektivu a pak proměřit závislost ROA signálu v okolí této polohy s krokem  $1^\circ$  v rozsahu alespoň  $\pm 15^\circ$ . Tento proces je nejvíce časově náročný a zabere většinou jeden až dva dny. Dobrým indikátorem kvality spekter dialaninu je oblast silně polarizovaného pásu  $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ , dále pak dublet kolem  $\sim 1390 \text{ cm}^{-1}$ , správný tvar pásu v oblasti vibrací amidu I a oblast nízkých vlnočtů (obr. 4.9).

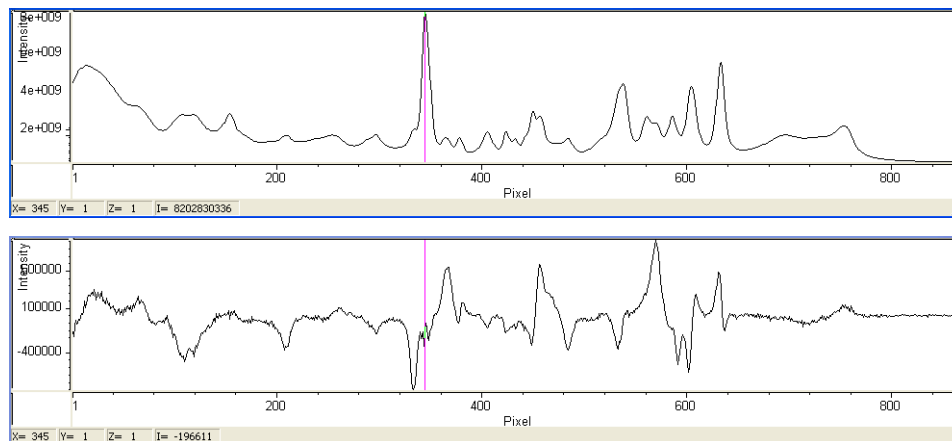


**Obr. 4.9:** Ramanovo a ROA spektrum obou enantiomerů alanyl-alaninu. Koncentrace obou vzorků  $c=2 \text{ M}$ , spektrální rozlišení  $6,5 \text{ cm}^{-1}$ , doba akumulace 6 hod, výkon na vzorku 434 mW. Pozadí spekter nebylo korigováno.

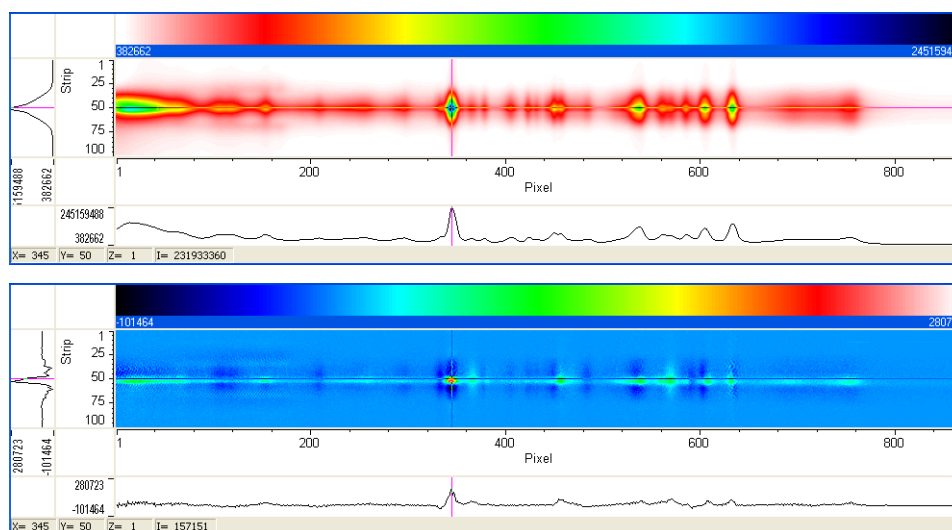
#### 4.2.2 Programové vybavení ROA spektrometru

Pro záznam spekter Ramanovy optické aktivity bylo nutné vyvinout řídicí program, který ovládá přepínání napětí na elektrooptickém modulátoru, načítá spektra odpovídající oběma kruhovým polarizacím budícího záření, ukládá součtové (Ramanovo) a rozdílové (ROA) spektrum a zahrnuje co největší rozsah funkcí používaných při ladění aparatury i vlastním měření ROA spekter. Jedním z důležitých cílů bylo také zabezpečit ukládání (a následně vyvolávání) všech vstupních parametrů a hodnot nastavení i údajů o měřeném vzorku. Tyto údaje jsou ukládány ve formě textových souborů a ke každému provedenému experimentu je tak uložen jednoznačně identifikovatelný a snadno čitelný záznam.

Program byl vyvinut v prostředí Visual Basic 6.0 s použitím knihoven WinXOption pro program WinSpec/32 ovládající CCD detektor. Program obsahuje grafické rozhraní pro Windows, pomocí něhož je možno zadávat veškeré experimentální parametry.



**Obr. 4.10a:** Záznam CIS a CID L-alanyl-L-alaninu ve spektrálním módu.



**Obr. 4.10b:** Záznam ROA spektra L-alanyl-L-alaninu v obrazovém módu.

Oproti konvenčnímu záznamu ROA spekter v jednodimenzionální podobě (intenzita oproti pořadovému číslu pixelu na disperzní ose) umožňuje program také pracovat se spektry v obrazovém (image) módu, kdy se pracuje s hodnotami intenzit jednotlivých pixelů detektoru, tedy ve dvojdimenzionální podobě.

Tento způsob záznamu spekter otevřel nové možnosti pro odhalování a určování zdrojů artefaktů ve spektrech. Obrazový mód je také standardně používán při sestavování a ladění aparatury.



Tab. 4.2: Stručný přehled funkcí programového vybavení ROA aparatury

menu	funkce	popis
<b>Experimental Setup</b>	Main	Základní parametry experimentu – expoziční doba, počet akumulací, počet framů a kořenové jméno souborů, do kterých budou spektra ukládána
	ROI (Region of Interest)	Specifikuje využívanou oblast detektoru (menší oblast znamená rychlejší odečet). Umožňuje softwarové seskupování jednotlivých pixelů do tzv. superpixelů, čímž se sice snižuje efektivní rozlišení, ale zlepšuje se poměr signál/šum
	Optional	Zadáva se výkon laseru, dosažená elipticita budícího záření (tato funkce se využívá i při ladění EOM), nastavení spektrografu, informace o použité kyvetě a vzorku.
	Hardware	Nastavení optických elementů aparatury (polohy mikrometrických posuvů apod.).
<b>Tools</b>	EOM Voltage	Přepíná polaritu napětí přikládaného na EOM
	Raman Focus	Důležitý nástroj umožňující současné zobrazení měření ve spektrálním i obrazovém módu. Používá se při nastavování aparatury a zjišťování optimální expoziční doby před každým měřením.
	ROA Focus	Jednoduchý záznam ROA spekter bez nutnosti ukládání experimentálních parametrů. Pro krátká měření ROA spekter a ladění aparatury.
<b>Calibration</b>	Measure Spectrum	Měření kalibračního spektra neonové výbojky.
<b>Calibrate</b>	Polynomial Regression	Ze změřeného spektra neonové výbojky spočte polynom pro převod pixelové škály na vlnočtovou.
	Input/Interpolation /Output	Provede převod pixelové škály na vlnočtovou zvolenou metodou interpolace. Vstupem je *.spe spektrum, výstupem je ASCII XY *.prn soubor.
<b>Processing</b>	Append	Sčítá vybrané framy z jednoho měření do jednoho výsledného souboru.
	Binning	Převod z obrazového módu do spektrálního (sčítají se pixely ve vertikálním směru, pro zvýšení poměru signál/šum je možné seskupovat také horizontální pixely).
	Resize	Obecnější procedura než Binning. Výstupem může být také záznam v obrazovém módu.
	Spectral Math	Základní operace se soubory v pixelové škále. Požívá se pro snadná sčítání výsledků z různých měření, odečtení signálu rozpouštědla apod. Je nutno dbát na to, aby používaná spektra byla zaznamenána přibližně ve stejnou dobu a měla tedy stejnou kalibraci (není-li to splněno, je nutno spektra nejprve zkalibrovat a manipulovat s nimi až ve vlnočtové škále).
	Fourier Transform	Fourierova filtrace naměřených spekter. Používá se převážně pro odstranění periodických artefaktů v oblasti nízkých vlnočtů u CID spekter.
	Clean Field	Umožňuje vymazat falešný signál v obrazovém módu. Vhodné pro odstraňování signálů z kosmického záření a jiných zdrojů mimo vzorek.

Součástí vyvinutého programu jsou také základní manipulace se spektry s plnou podporou obrazového módu, která dosud v dostupných komerčních programech nebyla používána.

### 4.2.3 Měření ROA spekter

Měřicí cyklus začíná přiložením kladného napětí na EOM. Ramanovo spektrum je akumulováno a uloženo do *pole1*. Poté je na EOM přiloženo záporné napětí a akumulovaný signál je uložen do *pole2*. Po ukončení jednoho cyklu jsou tato pole dat sečtena a odečtena, čímž dostaneme součet intenzit  $I^R + I^L$  (CIS, circular intensity sum) a jejich rozdíl  $I^R - I^L$  (CID, circular intensity difference), kde  $I^R$  a  $I^L$  jsou intenzity rozptýleného záření odpovídající budícímu pravo- a levotočivě kruhově polarizovanému záření. Spektra CIS a CID jsou ukládána do polí *poleCIS* a *poleCID* a následně je zobrazeno spektrum jak Ramanovo (CIS) tak i ROA (CID). Měření se opakuje tak dlouho, dokud není dosaženo požadovaného počtu cyklů. Data naměřená v každém cyklu jsou přičítána do odpovídajících polí. Ramanovo a ROA spektrum je na obrazovce po každém cyklu aktualizováno. Tento krok je možno v případě dlouhých akumulací (které probíhají bez přítomnosti obsluhy) vypnout a výrazně tak ušetřit čas nutný k záznamu spekter.

Pro dosažení dostatečného poměru signál/šum (S/N) je potřeba relativně dlouhá doba akumulace. Proto není vhodné ukládat naměřená data do jednoho souboru, ale rozdělit celkovou dobu akumulace do několika tzv. framů a tyto jednotlivě ukládat do datových souborů. Doba akumulace jednoho framu může být 10, 15 nebo 30 minut v závislosti na kvalitě vzorku (přítomnost prachových částic, sklon k precipitaci apod.) a délce jednotlivých expozičních dob (pro krátké expozice je dobré volit kratší interval pro ukládání framů).

Hlavním limitujícím faktorem je poměrně dlouhá odečítací doba detektoru (řádově kolem 2s). Pro velice krátké akumulace nutné pro měření neředěných organických látek (zlomky vteřiny) tvoří pak "mrtvá" (nevyužitá) doba podstatnou část celkové doby akumulace. Čím delší akumulační doba, tím je poměr mezi využitým a "mrtvým" časem příznivější. Pro většinu vzorků je hlavním limitujícím faktorem intenzita vibračních pásů vody a to od deformační vibrace v oblasti  $1650\text{ cm}^{-1}$  a dále pak intenzivní signál vibrační klastřů vody v oblasti nízkých vlnočtů. Při měření spekter v oblasti nad  $300\text{ cm}^{-1}$ , je možné volit expozice až 10s. Pro zaznamenávání oblasti nižších vlnočtů (která je doposud velmi málo prozkoumaná, nicméně je mimořádně zajímavá) jsou nejdelší možné akumulační doby cca 5 až 6 s. V oblasti pod

150 cm<sup>-1</sup> se začíná projevovat útlumová hrana notch filtru, s jistou dávkou opatrnosti je však možno měřit až do oblasti kolem 70 cm<sup>-1</sup>.<sup>149</sup>

#### 4.2.4 Kalibrace spekter

Ramanova a ROA spektra jsou standardně uváděna v relativních vlnočtech. Kalibrační proces aproximuje vztah mezi pořadovým číslem detekčního elementu (pixelu) a relativním vlnočtem polynomem třetího nebo čtvrtého stupně. Jako kalibračního standard používáme neonovou výbojku, která v používané spektrální oblasti poskytuje dostatečný počet dobře rozlišených úzkých pásů.

Významnou částí programu je kalibrační procedura (převod pixelové škály na vlnočtovou). Hlavní částí procedury je knihovna KalibraceCCD.dll vytvořená J. Bokem. Vstupem pro tuto knihovnu je naměřené jednodimenzionální spektrum neonu, typ použité mřížky a volba řádu polynomu, který je používán pro fit (používá se buď polynom třetího nebo čtvrtého stupně). Výstupem jsou pak koeficienty polynomu. Kalibrační procedura následně provede i linearizaci vlnočtové škály (po kalibraci nejsou spektrální body vyjádřené ve vlnočtech ekvidistantní; linearizace znamená jejich přepočítání na ekvidistantní body se zvoleným krokem, zpravidla 1 cm<sup>-1</sup>) zvolenou metodou interpolace a výpis dat ve formátu ASCII\_XY. Přesnost použité kalibrační procedury je lepší než 1 cm<sup>-1</sup>.

Záznam spektra neonové výbojky: Ze strany obrácené k fokusačnímu objektivu se na notch filtr položí bílá rozptylující papírová maska, která se rovnoměrně osvětlí neonovou výbojkou. Optimální doba akumulace a vzdálenost lampy od bílé masky se nastaví v režimu Focus. Zaznamenávání spekter se provádí výhradně v obrazovém módu, což přináší několik výhod: Je možno jednoduše zkontrolovat správné zaostření detektoru, polohu detektoru vzhledem k ideální zobrazovací rovině (tvar obrazů štěrbin by měl být zhruba parabolický) a správné naklopení detektoru (podle sklonu spektrálních čar), tak jak je to uvedeno v části o sestavování aparatury.

Je-li dobře nastavena expoziční doba (aby nedocházelo k nasycení detektoru), zvolí se počet akumulací tak, aby celková doba akumulace byla cca 1 minuta. Tím je v kalibračním spektru zaručen dostatečně dobrý poměr signál/šum. Dále je třeba provést převod do spektrálního módu pomocí tzv. binningu. Jelikož při snímání spekter je štěrbina osvětlena rovnoměrně v celé své výšce (na rozdíl od měření Ramanových spekter, kdy je podstatná část celkového signálu soustředěna ve střední části detektoru kolem vertikálního pixelu 50),

používáme při binningu pouze střední část obrazu, a to vertikální pixely 31-70, aby v důsledku mírného zakřivení obrazu šterbiny na detektoru nedošlo k přílišnému rozšíření neonových čar a k zavedení nezanedbatelné systematické chyby kalibrace.

Aparatura je při stálé laboratorní teplotě (při experimentech by v laboratoři měla být zapnutá klimatizace) vysoce stabilní a zkušenost ukazuje, že zaznamenávání kalibračních spekter jednou za den je více než dostačující.

#### **4.2.5 Příprava vzorků (obecné zásady)**

Stručně se zmiňme ještě o přípravě a zacházení se vzorky, které je pro měření ROA spekter také velmi důležité. První a hlavní zásadou je, že se vzorky je třeba zacházet tak, aby nebyly kontaminovány prachem a dalšími nečistotami.

Mikroskopické nečistoty pocházející přímo z obdrženého vzorku je možno s úspěchem odstranit přefiltrováním připraveného roztoku přes mikrofiltry Millipore o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (u vzorků s velkou molekulovou vahou je možno použít i filtr 0,44  $\mu\text{m}$ ). Složitější je zabránit tomu, aby byl vzorek kontaminován prachovými částicemi z okolního prostředí při manipulaci a přenášení do kyvety. Především je nutno dbát na to, aby byla kyveta po vyčištění a sušení skladována vždy dnem vzhůru, např. na tenké aluminiové fólii. Prachové částice je v některých případech možno odstranit pomocí stlačeného vzduchu (pozor na spreje obsahující místo vzduchu stlačenou kapalinu s nízkým bodem varu, která může kyvetu při neopatrné manipulaci znečistit). Také je třeba kontrolovat plastové centrifugační mikrozkušavky obsahující mikrofiltry (ty mohou před naplněním ve své dolní části obsahovat prachové částice). Všechny používané nádobky (a pipetovací špičky) je také vhodné skladovat odděleně od ostatního vybavení, aby nedošlo jejich kontaminaci.

Po naplnění je často nutné vyčistit stěny kyvety standardní procedurou (pomocí ethanolu), je však nutno dát pozor na přílišné ochlazování vzorku, ke kterému může odpařováním ethanolu docházet. Pro měření v teplotní cele, u vzorků interagujících se vzduchem apod. je ještě vhodné napipetovat do kyvety na hladinu dostatečné množství inertního silikonového oleje.

Pokud se před měřením ukáže, že je v roztoku přítomna prachová částice (podle rozptylu světla), je nutno vzorek vyjmout z kyvety, přefiltrovat a znovu naplnit do vyčištěné kyvety. Neprovede-li se to, několikahodinové měření je v lepším případě znehodnoceno (průlet prachové částice ve vzorku vyvolá velkou změnu v rozptýleném záření), v horším případě dojde k tepelnému zničení vzorku (některé vzorky jsou k tomu velmi náchylné).

Některé vzorky vykazují velké fluorescenční pozadí. V praxi se osvědčilo ponechat vzorek v laserovém svazku po dobu několika hodin (přes noc), čímž dojde v mnoha případech k dostatečnému potlačení fluorescence. Kyvety s takto „znečistěným“ vzorkem není samozřejmě nutno vkládat do obvyklého vzorkového prostoru, ale je možné je umístit do svazku záření těsně před měrku výkonu (obr. 4.2) a zároveň měřit jiný vzorek (vyhne se tak „neužitečně“ ztracenému experimentálnímu času).

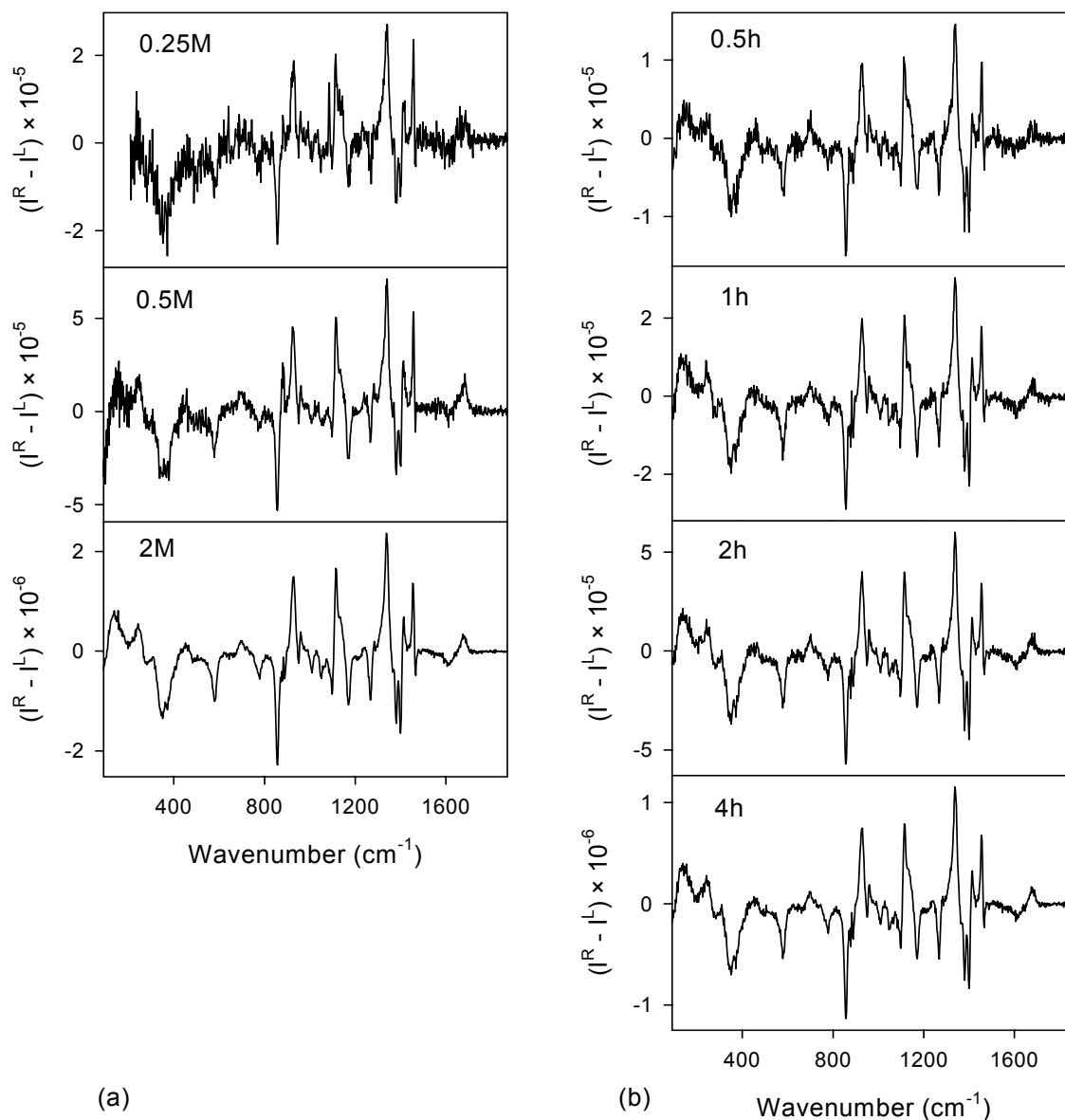
### 4.3 Zpracování spekter

Základní procedury při zpracování spekter jsou uvedeny v tab. 4.2. V této části se proto zaměříme pouze na metody zlepšování poměru signál/šum, a to pomocí spojování pixelů (tzv. binning) a Fourierovy filtrace.

Již bylo uvedeno, že zaznamenávání spekter ROA je komplikované díky tomu, že od sebe odečítáme dva soubory přibližně stejně velkých čísel. Z hlediska charakteristiky šumu je také velmi podstatné to, že v ICP strategii jsou obě zdrojová Ramanova spektra zaznamenávána v různých časech a jsou tedy (každé jinak) ovlivněna nežádoucími fluktuacemi (průlety prachových částic laserovým svazkem, fluktuace ve vzorku apod.), které se mohou velmi výrazně projevit v rozdílovém (CID) spektru. Charakteristika šumu je v tomto případě velmi nepříznivá, neboť zaujímá všechny prostorové frekvence a jen v omezené míře je možno ji eliminovat pomocí Fourierovy filtrace nebo Savitzky-Golayova vyhlazování. Tato nevýhoda odpadá v SCP strategii, kdy jsou obě zdrojová spektra zaznamenávána současně a vyhlazovací procedury je pak možno s úspěchem použít.

Nepříznivý charakter šumu u ROA spekter v ICP strategii je ukázán na obr. 4.11. Srovnáme-li například spektrum 0,5 M roztoku L-Ala-L-Ala s akumulací dobou 8 h se spektrem 2 M roztoku s akumulací dobou 1 hod, vidíme, že ačkoliv je velikost signálu u prvního spektra zhruba 2× vyšší (což také proporcionálně odpovídá vyššímu násobku akumulací doba × koncentrace), je vizuální velikost šumu u obou spekter zhruba stejná! Zde také můžeme nalézt důvod poměrně vysokých nároků ROA spektroskopie na koncentraci vzorků. Tím pádem je také výhodnější omezovat objem vzorku při zachování co nejvyšší dosažitelné koncentrace než používat větší objem vzorku s nižší koncentrací (to je ovšem velká nevýhoda u peptidových vzorků, u nichž je zpravidla obtížné dosáhnout vysokých koncentrací). Naštěstí se ale ukazuje, že aparatura je velmi stabilní a tudíž je možné provádět velmi dlouhé

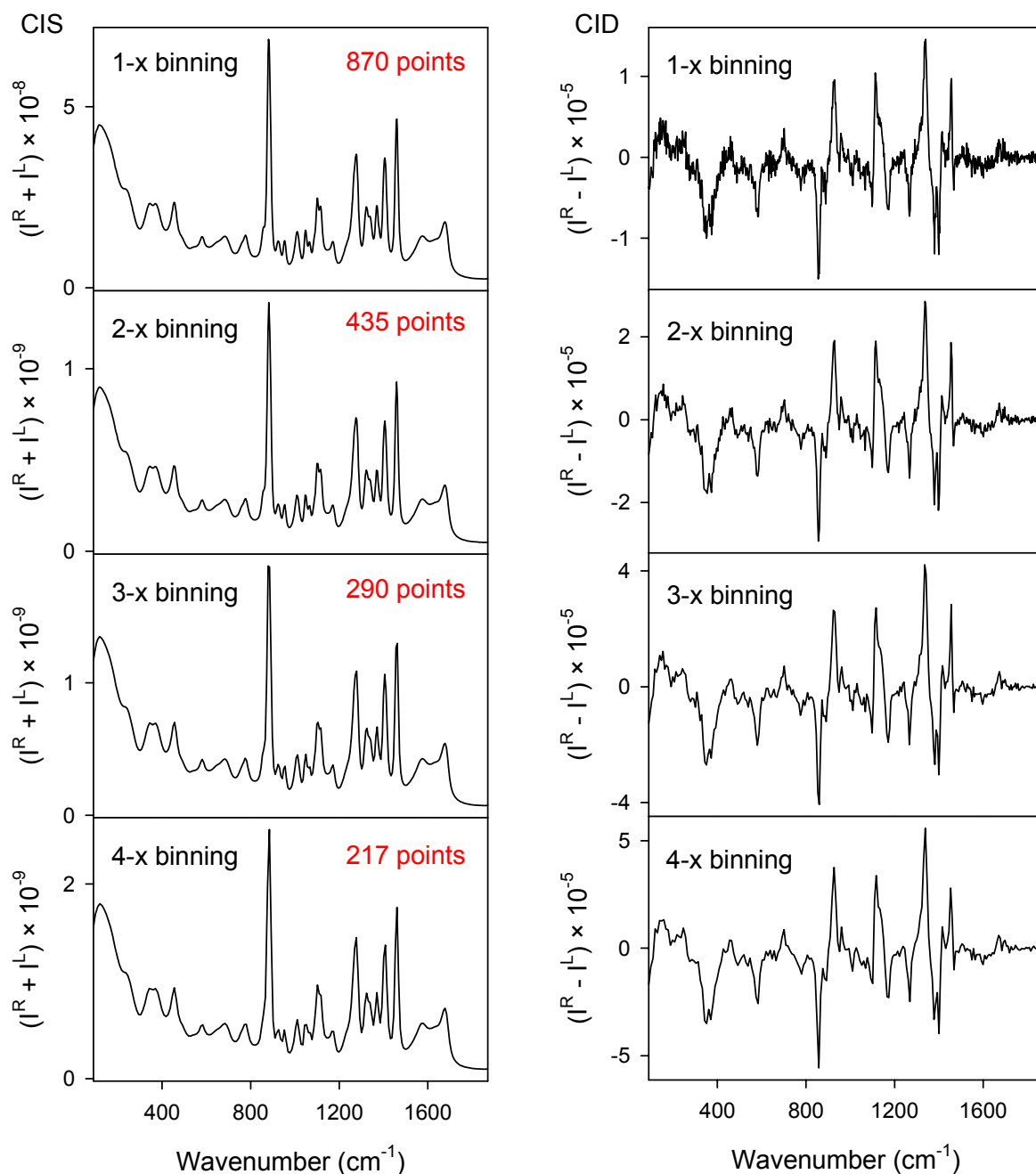
akumulace signálu. Např. při měření spekter hinge peptidu (viz kapitola 5.4) činila celková akumulační doba až 90 hodin.



**Obr. 4.11:** (a) Závislost ROA signálu na koncentraci roztoku L-Ala-L-Ala, doba akumulace 8 hodin. (b) Závislost ROA signálu 2M roztoku L-Ala-L-Ala na době akumulace.

Závislost vzhledu spektra na počtu seskupovaných horizontálních pixelů je znázorněna na obr. 4.12. Ačkoliv by se na první pohled mohlo zdát, že se úroveň šumu výrazně snižuje, při podrobnějším pohledu je jasné, že část šumu ve spektrech setrvává a navíc se snižuje efektivní spektrální rozlišení. V původních spektrech je také možno lépe vizuálně rozeznat pásy s nízkou intenzitou. Z těchto důvodů jsme se rozhodli seskupování horizontálních pixelů nepoužívat a

využívat tak výhod, které pražský spektrometr poskytuje (vyšší spektrální rozlišení než u spekter naměřených v jiných laboratořích).



**Obr. 4.12:** Závislost CIS a CID spekter na počtu horizontálních pixelů seskupených do superpixelu. Jako zdrojové spektrum byla použita 0,5 hod akumulace 2 M roztoku L-Ala-L-Ala.

### 4.3.1 Fourierova transformace a její využití při zpracování dat

Fourierova transformace představuje velmi efektivní nástroj pro zpracování experimentálních dat. Fyzikální proces může být popsán např. v časovém oboru pomocí funkce  $h(t)$  závislé na

čase  $t$  nebo ve frekvenčním oboru jako obecně komplexní funkce frekvence  $H(f)$  kde  $-\infty < f < \infty$ . (místo času  $t$  je možno – podobně jako v našem případě – brát prostorovou souřadnici  $x$  a místo frekvence  $f$  prostorovou frekvenci  $f_x$ ). Funkce  $h(t)$  a  $H(f)$  lze chápat jako dvě reprezentace téže funkce, mezi nimiž je možno přecházet pomocí Fourierovy transformace

$$H(f) = \int_{-\infty}^{\infty} h(t)e^{2\pi ift} dt \quad (4.6a)$$

$$h(t) = \int_{-\infty}^{\infty} H(f)e^{-2\pi ift} df \quad (4.6b)$$

Pár funkcí  $h$  a  $H$  mezi nimiž je možno přejít pomocí Fourierovy transformace označíme jako  $h(t) \Leftrightarrow H(f)$ . Je-li  $t$  měřeno v sekundách, jednotka  $f$  je v cyklech za sekundu (nebo je-li  $t$  v metrech, pak je  $f$  v cyklech na metr). Máme-li dvě funkce  $h(t)$  a  $g(t)$  a jejich odpovídající Fourierovy obrazy  $H(f)$  a  $G(f)$ , je konvoluce funkcí označovaná jako  $g * h$  definována jako

$$g * h = \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau)h(t - \tau) d\tau \quad (4.7)$$

Dle konvolučního teorému je Fourierovou transformací konvolučního páru jednoduchý součin Fourierových transformací jednotlivých funkcí

$$g * h \Leftrightarrow G(f)H(f) \quad (4.8)$$

Ve většině praktických situací je funkce  $h(t)$  vzorkována (zaznamenávána) v ekvidistantních bodech

$$h_n = h(n\Delta) \quad n = \dots, -1, 0, 1, 2, 3, \dots \quad (4.9)$$

kde  $\Delta$  je časový/prostorový interval (krok, v našem případě 1 pixel) a jeho reciproký obraz je označován jako vzorkovací interval (např. počet vzorků za sekundu, pixelů na metr apod.). Pro každý vzorkovací interval  $\Delta$  existuje speciální frekvence nazývaná *Nyquistova kritická frekvence* definovaná jako

$$f_c = \frac{1}{2\Delta} \quad (4.10)$$

Ze *vzorkovacího teorému* vyplývá, že je-li spojitá funkce vzorkována po intervalech  $\Delta$ , je šířka pásma ve frekvenčním oboru omezena na frekvence v absolutní hodnotě menší než  $f_c$ , tj. je-li  $H(f) = 0$  pro všechny  $|f| \geq f_c$ , pak je funkce  $h(t)$  kompletně popsána diskrétními body  $h_n$ . Z teorému také vyplývá, že je-li vzorkována funkce, jejíž šířka pásma není menší než Nyquistova kritická frekvence, je spektrální hustota obrazu ležící mimo rozsah  $-f_c < f < f_c$  nesprávně přesunuta do tohoto oboru. Tento jev se nazývá *aliasing*.



Předpokládejme, že funkci vzorkujeme pomocí  $N$  následných bodů

$$h_k \equiv h(t_k), \quad t_k \equiv k\Delta, \quad k = 0, 1, 2, \dots, N-1 \quad (4.11)$$

a že  $N$  je sudé. V diskrétním Fourierově obrazu se  $f$  se bude měnit v rozmezí od  $-f_c$  do  $f_c$  a bude také obsahovat také  $N$  bodů

$$f_n = \frac{n}{N\Delta}, \quad n = -\frac{N}{2}, \dots, \frac{N}{2} \quad (4.12)$$

V uvedené rovnici je sice  $N + 1$  bodů (a ne  $N$  bodů), nicméně oba krajní body jsou stejné (a rovny Nyquistově kritické frekvenci). Diskrétní Fourierovu transformaci je pak možno psát jako

$$H_n = \sum_{k=0}^{N-1} h_k e^{2\pi i k n / N} \quad (4.13a)$$

a zpětnou Fourierovu transformaci jako

$$h_k = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} H_n e^{-2\pi i k n / N} \quad (4.13b)$$

Přechod k dvojdimenzionální diskretní funkci (v našem případě to je obraz na CCD detektoru) je pak už přímočarý

$$H(n_1, n_2) = \sum_{k_2=0}^{N_2-1} \sum_{k_1=0}^{N_1-1} h(k_1, k_2) \exp(2\pi i k_2 n_2 / N_2) \exp(2\pi i k_1 n_1 / N_1) \quad (4.14a)$$

$$h(k_1, k_2) = \frac{1}{N_1 N_2} \sum_{n_2=0}^{N_2-1} \sum_{n_1=0}^{N_1-1} H(n_1, n_2) \exp(-2\pi i k_2 n_2 / N_2) \exp(-2\pi i k_1 n_1 / N_1) \quad (4.14b)$$

Provádí-li se Fourierova transformace přímo, zahrnuje  $N^2$  násobení, je to tedy  $O(N^2)$  proces. Pro velikost pole  $1340 \times 100$  pixelů by tato operace trvala desítky minut (2,4GHz procesor). Je-li však použit algoritmus rychlé Fourierovy transformace (Fast Fourier Transform, FFT), je možno ji spočítat jako  $O(N \log_2 N)$  proces<sup>120</sup> (transformaci uvedeného pole je tak možno provést za méně než jednu sekundu). Tento algoritmus je také používán v programu používaném na zpracování ROA spekter. FFT přináší jen jedno malé omezení, tj. počet bodů v každé dimenzi musí být roven mocnině čísla 2. To však prakticky nepřináší žádné omezení, neboť naměřenou matici je možno vždy rozšířit na požadovanou velikost, doplníme-li chybějící elementy nulami.

Pro úplnost připomeňme ještě uveďme vztah pro konvoluci v diskretním případě

$$(r * s)_j \equiv \sum_{k=-(M/2)+1}^{M/2} s_{j-k} r_k \quad (4.15)$$

kde  $s$  může být např. funkce signálu a  $r$  funkce odezvy přístroje. Diskrétní konvoluční teorém pak zní takto: je-li signál  $s_j$  periodický s periodou  $N$ , takže je plně popsán pomocí  $N$  hodnot  $s_0, \dots, s_{N-1}$ , pak jeho konvoluce s funkcí odezvy  $r$  o konečné délce  $N$  je Fourierovým párem k prostému součinu  $SR$

$$\sum_{k=-N/2+1}^{N/2} s_{j-k} r_k \Leftrightarrow S_n R_n \quad (4.16)$$

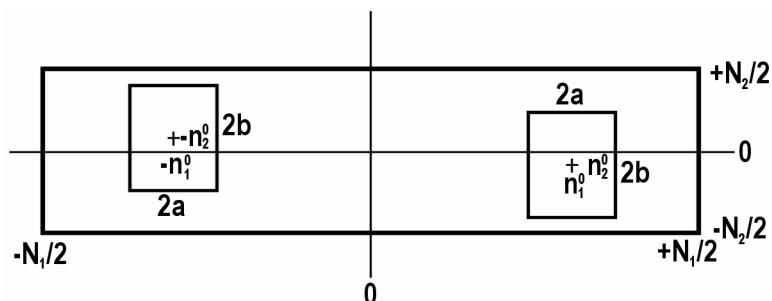
kde  $S$  je diskrétní Fourierova transformace  $s$  a  $R$  diskrétní Fourierova transformace  $r$ .

Nyní se konečně dostáváme k cíli – použití Fourierovy transformace pro filtraci experimentálních dat. Fourierovu transformaci totiž můžeme násobit zvolenou filtrovací funkcí  $\Phi(n_1, n_2)$  tak, abychom po zpětné Fourierově transformaci dostali funkci s potlačenými zvolenými (prostorovými) frekvencemi.

Jsou-li naměřená data reálná, musí filtrovací funkce splňovat podmínku  $\Phi(-n_1, -n_2) = \Phi^*(n_1, n_2)$ , která je nejjednodušším způsobem splněna tehdy, pokud je  $\Phi(n_1, n_2)$  reálná a sudá (symetrická vzhledem k počátku).

Fourierovu filtraci je možno v našem případě používat několikerým způsobem – jako pásmovou propust (band pass filtr, lze ho používat i na odstraňování šumu z dat) nebo pro potlačení určitých prostorových frekvencí (notch filtr). Zaměříme se nejprve na první velmi důležitou oblast, a to na filtrování šumu z naměřených dat.

Nejjednoduššími filtry na odstraňování šumu jsou pásmové propusti, u nichž se využívá toho, že signál se nachází pouze v určité části prostorového spektra a cílem je tedy zbylé části potlačit (jde o velmi zjednodušený předpoklad, neboť do oblastí prostorových frekvencí signálu zasahuje také šum, jednoduché filtry jsou zde uvedeny především pro srovnání s dokonalejšími filtrovacími metodami).



**Obr. 4.13:** Obecný případ obdélníkového filtru. Pro potlačení vysokých frekvencí samozřejmě platí  $n_1^0 = n_2^0 = 0$ , konstanta  $2a$  určuje šířku a  $2b$  výšku propusti.

Obdélníkový filtr je definován jako:

$$\Phi(n_1, n_2) = 1 \text{ uvnitř obdélníku} \quad (4.17)$$

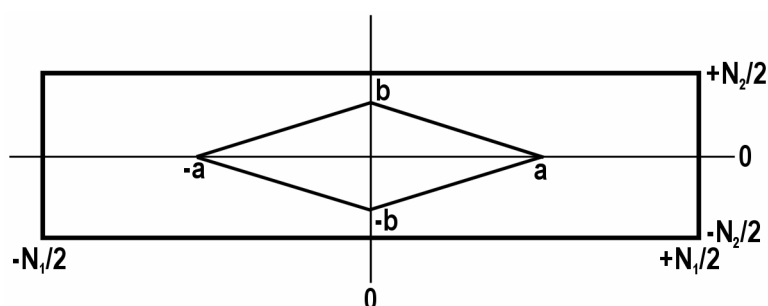
$$\Phi(n_1, n_2) = 0 \text{ vně obdélníku}$$

Obecnější filtr může být popsán rovnicí:

$$\text{když } \left| \frac{n_1}{a} \right|^c + \left| \frac{n_2}{b} \right|^d \leq 1 \Rightarrow \Phi(n_1, n_2) = 1 \quad (4.18)$$

$$\text{jinak } \Phi(n_1, n_2) = 0$$

kde konstanty  $c$  a  $d$  udávají tvar filtru. Pokud je  $c = d = 1$ , jde o kosodélník (obr. 4.14), pro  $c = d = 2$  je to elipsa a nakonec pokud  $c, d < 1$ , jde o „hvězdicovitý“ tvar filtru. Filtr přechází na již uvedený obdélníkový filtr pro  $c, d \rightarrow \infty$ .



Obr. 4.14: Kosodélníkový filtr popsáný rovnicí (4.18)

Pro úplnost ještě uvedme rovnici pro filtry měnící se spojitě v zadaném intervalu:

$$\Phi(n_1, n_2) = \max \left( 1 - \left| \frac{n_1}{a} \right|^c - \left| \frac{n_2}{b} \right|^d, 0 \right) \quad (4.19)$$

Nyní se pokusíme nalézt **optimální filtr**<sup>120</sup> pro odstraňování šumu. Označme  $u(t)$  jako ideální signál neovlivněný měřicím přístrojem. Měřicí proces samozřejmě není ideální, naměřenou funkci označíme jako  $c(t)$ . Naměřený signál lze rozdělit na šumovou komponentu  $n(t)$  a signál  $s(t)$  ovlivněný přístrojem, tj. konvoluci ideálního signálu  $u(t)$  s přístrojovou funkcí  $r(t)$

$$c(t) = s(t) + n(t) \quad (4.20)$$

$$s(t) = r * u \equiv \int_{-\infty}^{\infty} r(t-\tau)u(\tau) d\tau \quad \text{nebo} \quad S(f) = R(f)U(f) \quad (4.21)$$

kde  $S$ ,  $R$  a  $U$  jsou Fourierovy transformace  $s$ ,  $r$  a  $u$ . Není-li v naměřených datech přítomen šum, stačí na provedení dekonvoluce přístrojové funkce  $r$  vydělit naměřený signál  $C(f)$  přístrojovou funkcí  $R(f)$ . Je-li v naměřených datech přítomen šum, snažíme se najít optimální filtr  $\phi(t)$  nebo

$\Phi(f)$  tak, abychom jeho aplikací na měřený signál  $c(t)$  nebo  $c(f)$  dekonvoluovaný přístrojovou funkcí  $r(t)$  nebo  $R(f)$  dostali signál  $\tilde{u}(t)$  nebo  $\tilde{U}(f)$ , který je co nejbližší původnímu ideálnímu signálu  $u(t)$  nebo  $U(f)$ . Funkci  $\tilde{U}(f)$  předpokládejme ve tvaru:

$$\tilde{U}(f) = \frac{C(f)\Phi(f)}{R(f)} \quad (4.22)$$

Minimální rozdíl mezi  $U$  a  $\tilde{U}$  budeme chápat ve smyslu metody nejmenších čtverců, tj.

$$\int_{-\infty}^{\infty} |\tilde{u}(t) - u(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{\infty} |\tilde{U}(f) - U(f)|^2 df \quad \text{je minimalizován} \quad (4.23)$$

Dosadíme-li do výrazu (4.23) vztahy (4.20) a (4.21), dostaneme

$$\begin{aligned} & \int_{-\infty}^{\infty} \left| \frac{[S(f) + N(f)]\Phi(f)}{R(f)} - \frac{S(f)}{R(f)} \right|^2 df \\ & = \int_{-\infty}^{\infty} |R(f)|^{-2} \left[ |S(f)|^2 |1 - \Phi(f)|^2 + |N(f)|^2 |\Phi(f)|^2 \right] df \end{aligned} \quad (4.24)$$

neboť signál  $S$  a šum  $N$  nejsou korelovány a tedy integrál jejich součinu přes všechny frekvence je roven nule. Integrál (4.24) je minimální pokud je integrand minimalizován vzhledem k  $\Phi(f)$  pro každé  $f$ . Provedeme-li derivaci integrandu vzhledem k  $\Phi$  a položíme-li ji rovnu nule, dostaneme

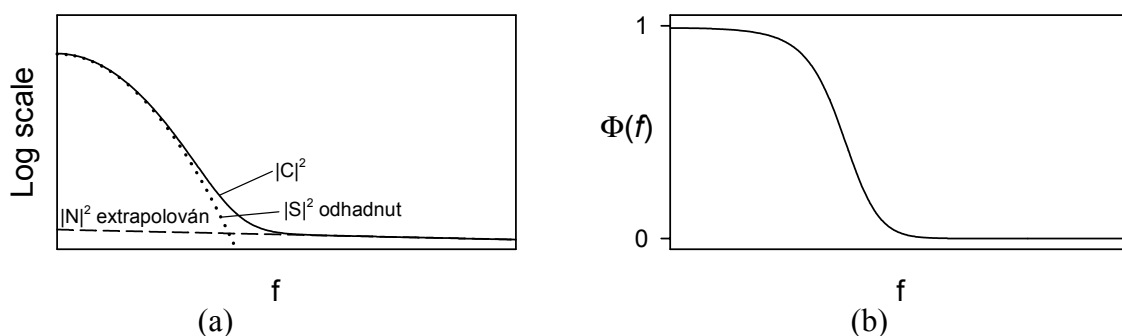
$$\Phi(f) = \frac{|S(f)|^2}{|S(f)|^2 + |N(f)|^2} \quad (4.25)$$

Díky tomu, že rovnice (4.25) neobsahuje ideální signál  $U(f)$ , je možno ideální filtr nalézt nezávisle na dekonvoluci funkce  $S$ . Nyní potřebujeme určit odděleně  $|S|^2$  a  $|N|^2$ , což není bez dodatečného předpokladu nebo informace možné. Tuto informaci naštěstí obdržíme poměrně snadno, zobrazíme-li hodnotu spektrální hustoty naměřených dat  $|C(f)|^2$  oproti frekvenci  $f$ . Tato hodnota je totiž úměrná součtu  $|S|^2 + |N|^2$ :

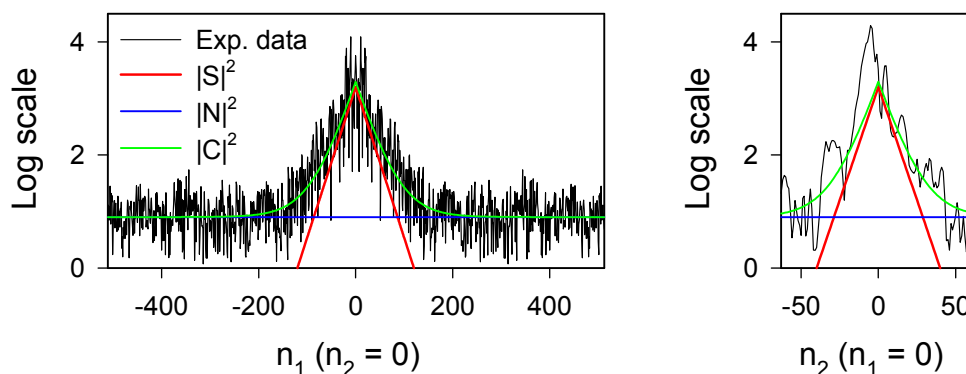
$$|S(f)|^2 + |N(f)|^2 \approx |C(f)|^2 \quad (4.26)$$

Výsledný graf je uveden na obr. 4.15. Téměř vždy v něm lze rozlišit složku pocházející od signálu  $S$  a šumu  $N$ . Naměřenými daty proložíme křivku odpovídající šumu  $N(f)$  (tu je nutno extrapolovat v oblasti signálu), dále proložíme hladkou křivku celkovým signálem  $C(f)$  a nakonec hledanou funkci signálu dostaneme jejich odečtením (v praxi je možno zvolit i opačnou proceduru, tj. odhadneme funkce  $N$  a  $S$  co nejlépe tak, abychom dostali celkový signál  $C$ ). Připomeňme ještě, že výsledný filtr musí splňovat rovnici  $\Phi(f) = \Phi(-f)$ . Jak je vidět i na obr. 4.15b, je hodnota optimálního filtru blízká jedničce v oblastech, kde je šum zanedbatelný a

blízká nule tam, kde hraje šum dominantní roli. Použité vztahy jsou samozřejmě platné také v dvojdimenzionálním diskretním případě (nahradíme-li  $f \rightarrow n_1, n_2$ ).



**Obr. 4.15:** (a) Konstrukce optimálního filtru (b) Optimální filtr dle rovnice (4.25).



**Obr. 4.16:** Určení parametrů pro optimální fit (4.25), (4.27):  $\ln(S_{\max}^2) = 3,2$ ,  $\ln(N_{\text{const}}^2) = 0,9$ ,  $a = 120$ ,  $b = 40$ .

Aplikujme nyní tuto metodu filtrování na reálná data uvedená na obr. 4.11 – 0,5 h akumulace 2 M roztoku L-Ala-L-Ala. Spektrum v obrazovém módu (obr. 4.17e) má rozměry  $870 \times 100$  pixelů, rozšíříme ho proto doplněním o nuly na  $1024 \times 128$  pixelů, tak abychom mohli používat rychlou Fourierovu transformaci. Fourierův obraz naměřeného spektra v logaritmicke škále je znázorněn na obr. 4.17f. Nejprve použijeme obdélníkový filtr (4.17), filtr dle rovnice (4.18) a nakonec optimální filtr pro odstranění šumu (4.25). U optimálního filtru aproximujeme signál  $S$  a šum  $N$  rovnicemi

$$\ln(|S(n_1, n_2)|^2) \approx \ln(S_{\max}^2) \left( 1 - \left| \frac{n_1}{a} \right| - \left| \frac{n_2}{b} \right| \right) \quad (4.27a)$$

$$\ln(|N(n_1, n_2)|^2) \approx \ln(N_{\text{const}}^2) \quad (4.27b)$$

v nichž konstanty  $\ln(S_{\max}^2)$ ,  $\ln(N_{\text{const}}^2)$  a  $a$  získáme fitováním řezu dvojdimenzionálního obrazu pro  $n_2 = 0$  a zbývající konstantu  $b$  fitem řezu pro  $n_1 = 0$  (obr. 4.16).

Optimální filtr umožňuje bohužel jen v malé míře eliminovat nepříznivou charakteristiku šumu u ICP strategie měření ROA. Na obr. 4.17 je uvedeno srovnání spekter 8 hod akumulace 0,5 M roztoku a 1 hod akumulace 2 M roztoku L-Ala-L-Ala po aplikaci optimálního filtru (naměřená data viz obr. 4.11). Připomeňme, že obě spektra měla vizuálně přibližně stejnou hladinu šumu, zatímco úroveň signálu je odlišná. Parametry pro prvně jmenované spektrum byly odečteny jako  $\ln(S_{\max}^2) = 5,0$ ,  $\ln(N_{\text{const}}^2) = 1,8$ ,  $a = 180$ ,  $b = 50$ , pro druhé spektrum  $\ln(S_{\max}^2) = 4,2$ ,  $\ln(N_{\text{const}}^2) = 1,2$ ,  $a = 150$ ,  $b = 50$  (parametry získány stejnou metodou jako na obr. 4.16).

Ze srovnání obou spekter vyplývá, že spektrum (a) 0.5 M roztoku má stále téměř stejnou kvalitu jako 2M spektrum (b).

Fourierovu filtraci můžeme použít ještě jiným způsobem: na odfiltrování určitých prostorových frekvencí ve Fourierově obrazu (notch filtr). Jak ukážeme na následujícím příkladu, jde pravděpodobně o ještě užitečnější proceduru, než je odstraňování šumu.

Nejčastěji se používá obdélníkový filtr uvedený na obr. 4.13, ale s opačnou podmínkou:

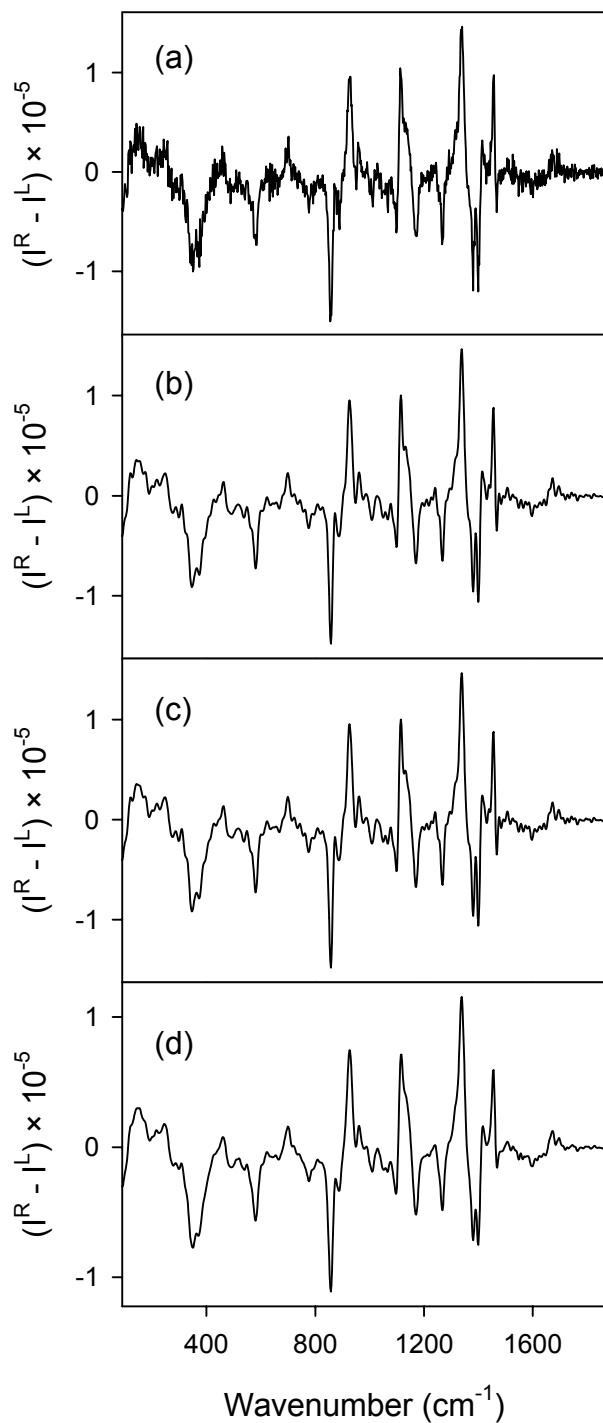
$$\Phi(n_1, n_2) = 0 \text{ uvnitř obdélníku} \quad (4.29)$$

$$\Phi(n_1, n_2) = 1 \text{ vně obdélníku}$$

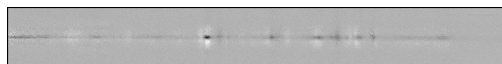
Postup ilustrujeme na zpracování spekter roztoku mutantu Arc Repressoru F10H (koncentrace 37 mg/ml, spektrální rozlišení  $6,5 \text{ cm}^{-1}$ , výkon na vzorku 660 mW a celková doba akumulace 37,5 hod). Na obr. 4.19 je znázorněno naměřené spektrum v obrazovém módu a jeho Fourierův obraz, na němž jsou dobře viditelné artefakty mající původ ve velkém signálu vibrační klastrů vody (oblast pod  $600 \text{ cm}^{-1}$ ).

Obdélníkový filtr byl použit 2×, použité parametry jsou (obr. 4.13):  $n_1^0 = 168$ ,  $n_2^0 = 0$ ,  $a = 10$ ,  $b = 64$  a  $n_1^0 = 348$ ,  $n_2^0 = 0$ ,  $a = 20$ ,  $b = 64$ .

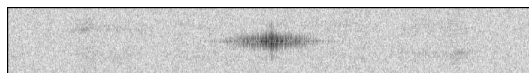
Ze srovnání původního a filtrovaného spektra vyplývá velká výhoda tohoto postupu – dochází ke specifickému odfiltrování artefaktů způsobených rozpouštědlem zatímco zbytek spektra zůstává v podstatě neovlivněn.



(e) Naměřená data (870×100):



(f) FT (1024×128):



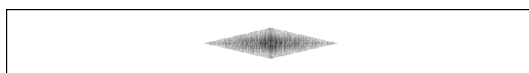
(g) Obdélníkové okno



dle (4.17):

$$n_1^0 = n_2^0 = 0, a = 140, b = 30$$

(h) Kosodélníkové okno



dle (4.18):

$$a = 140, b = 30, c = d = 1$$

(i) Optimální filtr

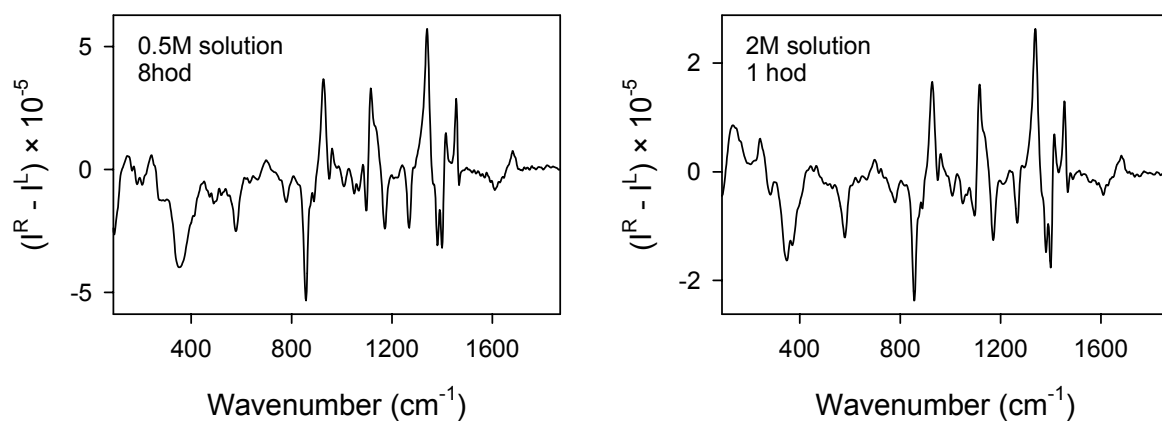


dle (4.25), (4.27):

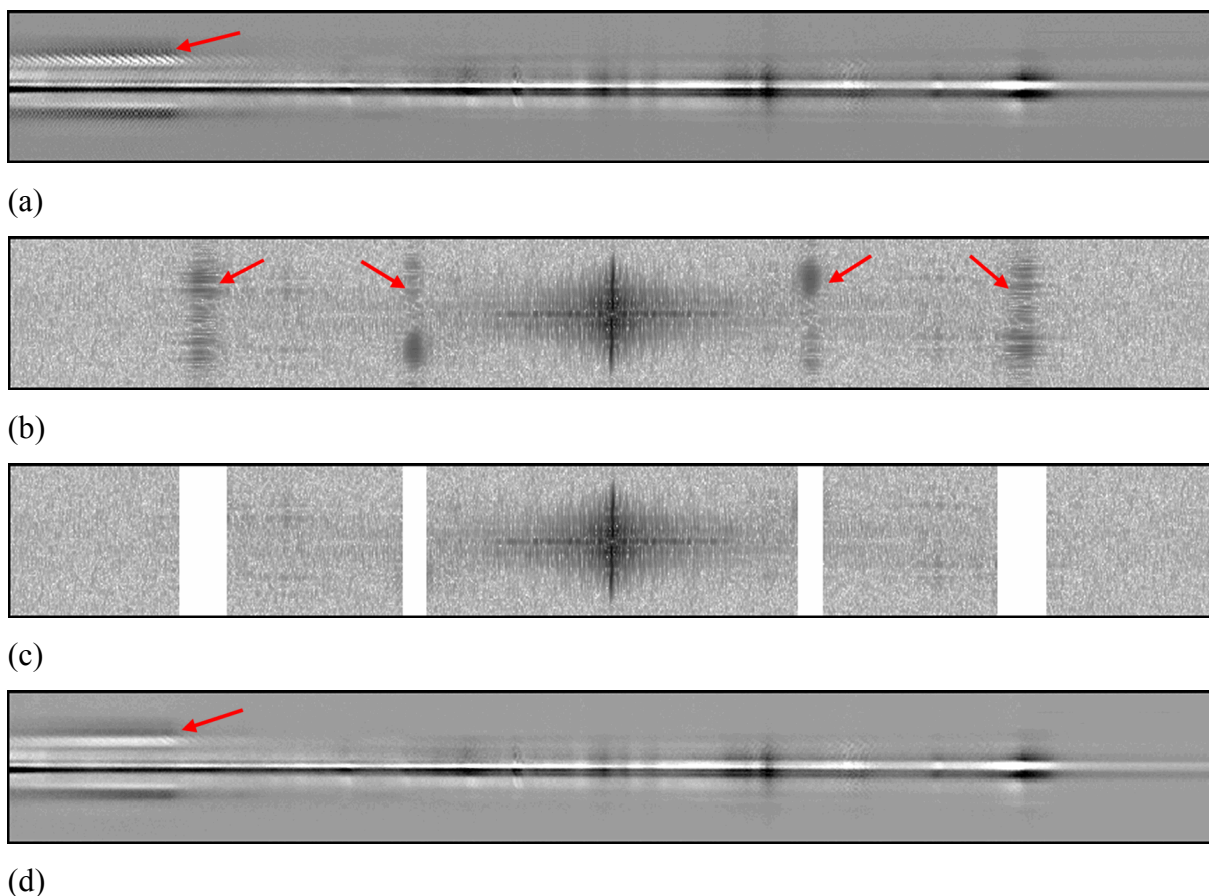
$$\ln(S_{\max}^2) = 3,2, \ln(N_{\text{const}}^2) = 0,9,$$

$$a = 120, b = 40.$$

**Obr. 4.17:** Použití filtrace v oblasti prostorových frekvencí na odstraňování šumu ze spekter.

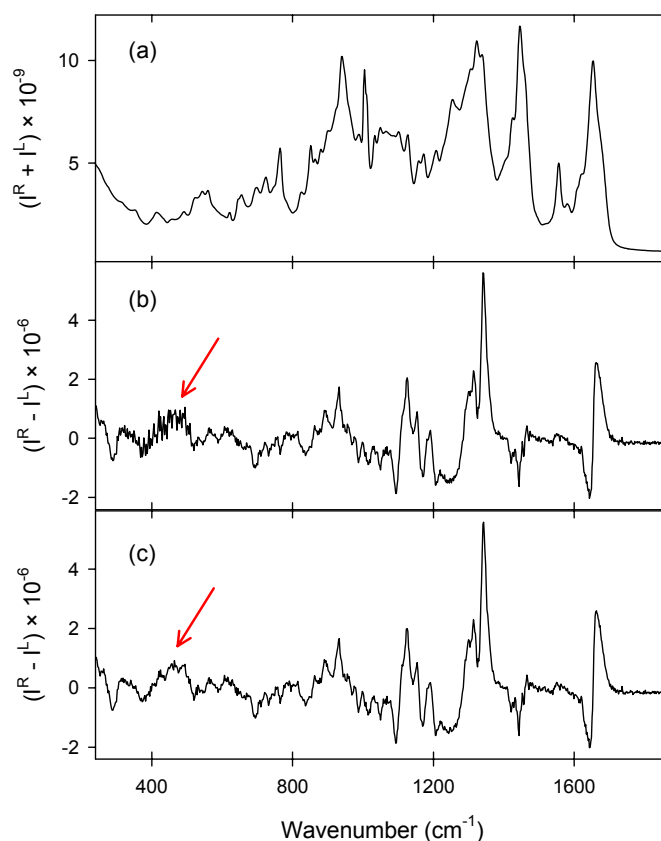


**Obr. 4.18:** Srovnání ROA spekter roztoků L-Ala-L-Ala zaznamenaných za rozdílných experimentálních podmínek po aplikaci optimálního filtru.



**Obr. 4.19:** (a) Naměřená data v obrazovém módu, (b) Fourierův obraz naměřených dat, (c) Fourierův obraz vynásobený dvěma obdélníkovými filtry, (d) Data po zpětné Fourierově transformaci. Šipkou je označena oblast, v které se vyskytují periodické artefakty.





**Obr. 4.20:** Použití pásmového filtru na odstranění artefaktů ve spektrech. (a) Ramanovo spektrum mutantu F10H Arc Repressoru (b) ROA spektrum, (c) ROA spektrum po úpravě pomocí Fourierovy filtrace. Spektra odpovídají datům uvedeným v obrazovém módu na obr. 4.19.

Další zpracování (odečet signálu rozpouštědla respektive korekci pozadí v CIS a CID spektrech) je výhodné provádět až po kalibraci a převodu do vlnčtové škály s užitím komerčního software pro zpracování spekter (Grams/AI, Thermo Electron Corporation).

### 4.3.2 Standardizovaný postup zpracování spekter

U řady publikovaných spekter není zcela jasné, zda jsou to neupravená experimentální data či jakým postupem byla upravena do prezentovaného tvaru. V případě měření ve vodném roztoku v oblasti nad  $600\text{ cm}^{-1}$  v řadě případů není třeba ani Ramanova ani ROA spektra upravovat, byť by odečet signálu rozpouštědla v Ramanových spektrech usnadnil identifikaci málo intenzivních pásů.

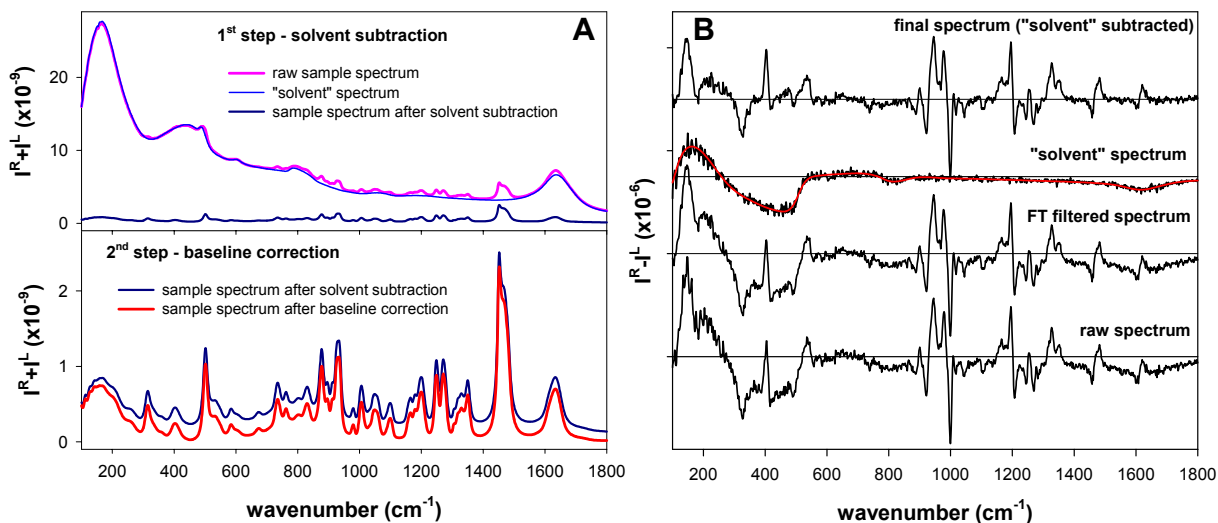
Data měřená na našem spektrometru však začínají již v oblasti kolem  $100\text{ cm}^{-1}$  a obsahují v sobě jak signál rozpouštědla (zpravidla vody) tak i signál pocházející od čelní stěny kyvety, kterého se ani při ideálním nastavení nelze při práci s malými objemy vzorků v geometrii

zpětného rozptylu zcela zbavit (signál stejného původu je snadno rozpoznatelný i v Ramanových spektrech měřených na komerčním spektrometru ChiralRAMAN a publikovaných Laurencem Barronem,<sup>12</sup> jeho možné projevy v ROA spektrech však nejsou zmiňovány). Odečet signálu rozpouštědla a následná korekce pozadí (úprava tzv. baseline) je v případě Ramanových spekter procedura zcela standardní a není třeba ji blíže komentovat. Úpravy ROA spekter však dosud nejsou ani běžné natož standardní a v publikacích se o nich zpravidla taktně mlčí. Proto zde ve stručnosti popíšeme postup, který jsme vypracovali, ověřili a nyní pro zpracování ROA spekter standardně používáme.<sup>149</sup>

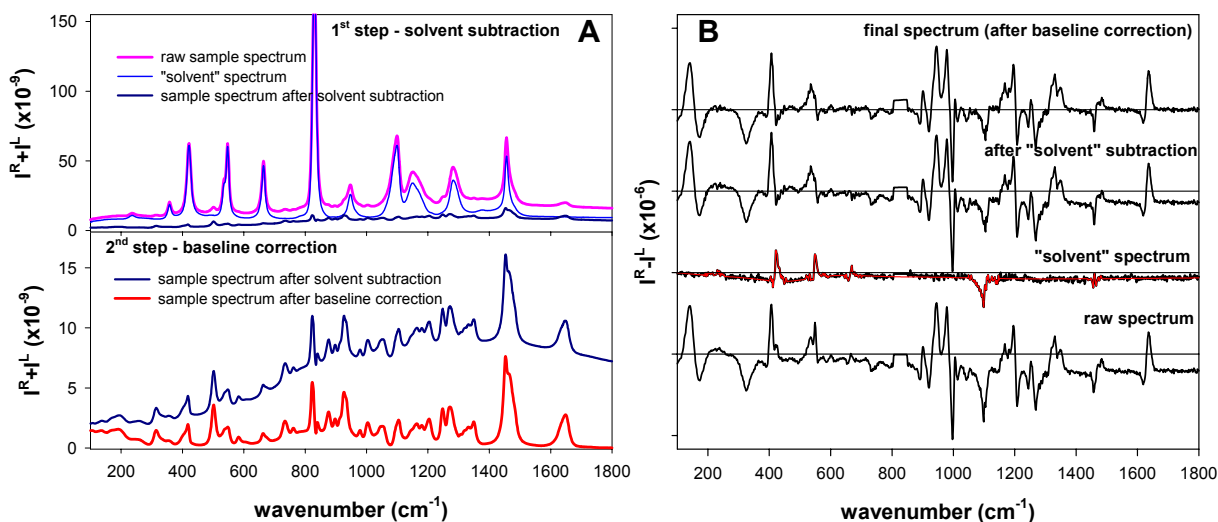
V ideálním případě by v ROA spektrech neměl být přítomen žádný signál ani od rozpouštědla ani od kyvety. Ve skutečnosti však v oblasti pod  $600\text{ cm}^{-1}$  pozorujeme příspěvek falešného signálu, který výrazným způsobem deformuje pozadí (v ideálním případě nulovou úroveň signálu) v ROA spektrech. Nejprve bylo snahou odstranit tento signál prokládáním funkce modelující průběh pozadí vybranými body (tedy analogickým způsobem, jakým se korekce pozadí provádí u Ramanových spekter), což se však ukázalo ne zcela konzistentní pro rozdílné vzorky. Proto jsme se rozhodli změřit za standardních experimentálních podmínek „ROA spektrum“ kyvety naplněné rozpouštědlem (na obr. 4.21 označené jako „solvent spectrum“) a toto spektrum jsme potom při korekci pozadí odečetli podobným způsobem, jakým v Ramanových spektrech odečítáme signál rozpouštědla. S ohledem na možné zhoršení poměru signál/šum v korigovaném spektru v důsledku ne zcela náhodnému charakteru šumu přítomného ve spektrech jsme odečítané spektrum nejprve vyhladili pomocí kubických splinů (viz obr. 4.21B, druhé spektrum od shora).

Drtivá většina dosud publikovaných ROA spekter byla měřena na vodných roztocích (na rozdíl od VCD, kde je měření v organických rozpouštědlech více méně běžné), proto naše měření v TFE představuje určitý průlom. Jak je zřejmé z obr. 4.22A, v Ramanově spektru jsou při použité koncentraci dominantní pásy rozpouštědla a pásy od poly(L-prolinu) mají minimálně o řád nižší intenzitu. I přes tento velmi nepříznivý poměr mezi intenzitou signálu od zkoumané látky a rozpouštědla, bylo měření ROA roztoku poly(L-prolinu) v TFE úspěšné. Výše popsany postup zpracování ROA spekter se osvědčil i v tomto případě. V ROA spektru kyvety s rozpouštědlem však byly navíc v místech některých Ramanových pásů TFE pozorovány drobné artefakty, jež však bylo možno bez větších problémů odečíst, neboť jejich velikost je ve srovnání se signálem studovaného vzorku znatelně nižší. ROA signál od poly(L-prolinu) jsme nezměřili pouze v úzké oblasti kolem nejintenzivnějšího pásu TFE ( $\sim 830\text{ cm}^{-1}$ ), neboť doba akumulace byla zvolena tak, že v této oblasti byl detektor nasycen signálem. Tyto metodické výsledky ukazují, že měření ROA spekter v organických rozpouštědlech je reálné,

což je mimořádně dobrá zpráva například pro oblast studia vlivu interakce s rozpouštědlem na strukturu peptidů.



**Obr. 4.21:** Ilustrace standardního postupu při zpracování spekter měřených ve vodě. **(A)** Ramanovo spektrum poly(L-prolinu) v H<sub>2</sub>O. V horní části je proveden odečet signálu rozpouštědla, ve spodní části je ukázána korekce pozadí. Výsledné spektrum je znázorněno červeně. **(B)** Odpovídající ROA spektrum v různých fázích zpracování, zdola nahoru: změřené nezpracované (raw) spektrum, spektrum po Fourierově filtraci, změřené spektrum „rozpuštědla“ překryté vyhlazenou křivkou (červená) a finální spektrum po korekci vyhlazeným spektrem „rozpuštědla“. Všechna uvedená ROA spektra mají společnou intenzitní škálu; vodorovné přímky představují nulovou úroveň signálu pro každé spektrum.



**Obr. 4.22:** Ilustrace standardního postupu při zpracování spekter měřených v TFE. **(A)** Ramanovo spektrum poly(L-prolinu) v TFE. V horní části je proveden odečet signálu rozpouštědla, ve spodní části je ukázána korekce pozadí. Výsledné spektrum je znázorněno červeně. **(B)** Odpovídající ROA spektrum v různých fázích zpracování, zdola nahoru: změřené nezpracované (raw) spektrum, změřené spektrum „rozpuštědla“ překryté vyhlazenou křivkou (červená), spektrum po korekci spektrem „rozpuštědla“ a výsledné spektrum po provedení korekce pozadí. Všechna uvedená ROA spektra mají společnou intenzitní škálu; vodorovné přímky představují nulovou úroveň signálu pro každé spektrum.

## 5. Výsledky a diskuze

Výsledky prezentované v této kapitole odpovídají bodu 3 cílů práce (změřit ROA spektra vybraných aminokyselin, peptidů a polypeptidů a na základě provedených výpočtů je detailně interpretovat). Veškerá experimentální data byla změřena na ROA spektrometru popsaném podrobně v kapitole 4, která odpovídá a naplňuje bod 1 cílů práce. Výpočetní postupy vedoucí k prezentovaným simulovaným spektrům využívaly metody a přístupy detailně popsané v kapitole 3, která odpovídá a naplňuje bod 2 cílů práce.

Pro ilustraci využití vyvinutých výpočetních postupů byly jako modelové systémy zvoleny dvě aminokyseliny, L-alanin a L-prolin. Tato volba nebyla náhodná. Alanin je z pohledu Ramanovy a ROA spektroskopie nejvíce studovanou aminokyselinou, na které se dá dobře ilustrovat jak originalita tak i přínos námi zvoleného přístupu k simulaci spekter, který do výpočtu zahrnuje dynamické aspekty struktury molekul v roztoku a který lze asi nejlépe vyjádřit termínem konformační středování.

Prolin byl pro nás zajímavý z řady důvodů. Ten první a nejpřirozenější je, že ROA spektrum prolinu nebylo dosud ani publikováno ani simulováno. Prolin je jako cyklická molekula zajímavý i strukturně a z výpočetního pohledu představuje zajímavý modelový systém.

Bylo vcelku přirozené navázat na velmi zevrubnou analýzu konformační flexibility prolinu v roztoku a interpretaci jeho Ramanových a ROA spekter studiem jiného zajímavého systému – homopolypeptidu tvořeného pouze prolinovými zbytky. Poly(L-prolin) rovněž představuje pro ROA mimořádně zajímavý systém. Je to ideální model levotočivého PPII helixu, kterému je v posledních letech věnována značná pozornost. Prolinový zbytek v peptidovém řetězci jako terciární amid nemá N-H skupinu a v Ramanových a ROA spektrech tedy chybí pásy odpovídající amidu III, strukturně velmi citlivému vibračnímu módu. Pomocí ROA nebyl dosud studován, a tudíž pro něj ani nebyly nalezeny charakteristické strukturní markery. Navíc jsme mohli plně využít výsledky studia jeho základní stavební jednotky.

Výzkum hinge peptidu představuje logické završení prováděných studií. Je to peptid, odpovídající dvouvláknovému fragmentu nacházející se v centrální části lidského imunoglobulinu IgG1, který je stabilizovaný dvěma S-S můstky, jež samy o sobě představují strukturní motiv pomocí ROA dosud neprozkoumaný. Z pohledu návaznosti na námi

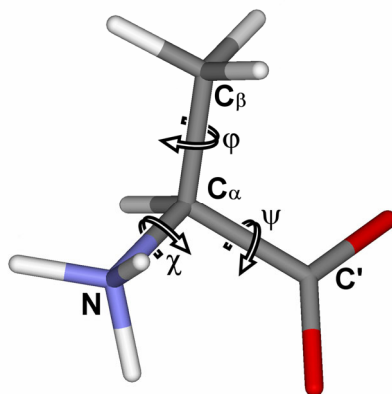
studované systémy je zajímavý bohatým obsahem prolinových zbytků (polovina všech zbytků, 4 v každém vlákne) a dosud ne zcela jednoznačně stanovenou strukturou v roztoku.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tato kapitola má strukturu poněkud odlišnou od předchozích kapitol. Každá podkapitola je věnována řešení jednoho z výše zmíněných problémů a je tvořena stručným textem shrnujícím použité přístupy a dosažené výsledky, za kterým bezprostředně následuje příslušná publikace (rukopis, preprint nebo reprint). V některých případech jsou pro lepší orientaci čtenáře do úvodního textu vkládány také odkazy na obrázky v příslušné publikaci. U přiložených publikací je zachováno vlastní číslování stránek.

## 5.1 Vliv konformační flexibility na tvar pásů v Ramanových a ROA spektrech alaninu

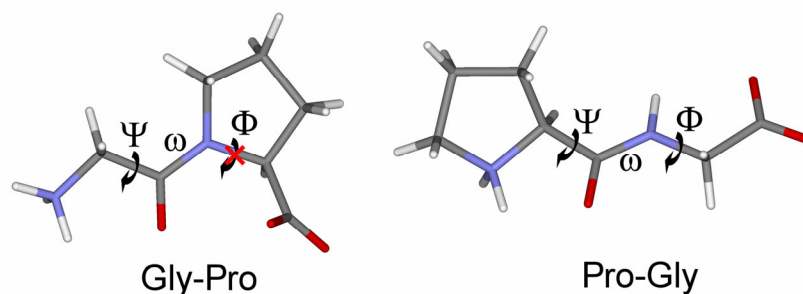
L-alanin je nejjednodušší chirální aminokyselina a představuje tedy velmi vhodný modelový systém pro hledání a optimalizaci takových výpočetních postupů, které vedou k dosažení ideální shody s naměřenými daty. L-alanin se v neutrálním prostředí vyskytuje ve formě obojetného iontu, což klade velké nároky především na volbu vhodného modelu rozpouštědla.

ROA spektra L-alaninu, jeho různých izotopicky zaměněných<sup>29</sup> či protonovaných forem<sup>27, 28</sup> byla již v minulosti publikována, nicméně pouze v oblasti nad  $600\text{ cm}^{-1}$ . Oblast nízkoenergetických vibrací, která je, jak se ukazuje, pro interpretaci spekter neméně důležitá, tak zůstala opominuta. Spektra alaninu také byla již dříve simulována pomocí *ab initio* metod, ale dynamika postranních skupin byla doposud považována pouze za vedlejší produkt tvorby klastrů s molekulami vody.<sup>31, 32</sup>



**Obr. 5.1:** Obojetný ion L-alaninu s naznačenými možnými rotacemi postranních skupin.

Detailní analýza Ramanových a ROA spekter obojetného iontu L-alaninu prokázala, že tvar spektrálních pásů je do značné míry ovlivněn rotací skupin  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CO}_2^-$  a  $\text{CH}_3$  (obr. 5.1). Spektra L-alaninu ve vodném roztoku byla měřena již od  $100\text{ cm}^{-1}$  a porovnána s komplexními simulačními *ab initio* (B3LYP/COSMO/6-31++G\*\*) výpočty molekulárních energií a spektrálních parametrů. Spektrální pásy ve změřených spektrech projevují různou citlivost k rotačnímu pohybu skupin (viz obr. 5 na straně 20 přílohy 1); pásy citlivé k rotaci jsou v Ramanových spektrech zřetelně širší a naopak v ROA spektrech málo intenzivní. Jestliže při výpočtech vezmeme tyto dynamické aspekty v úvahu a provedeme Boltzmannovo středování příspěvků od jednotlivých konformérů, dosáhneme nejen lepšího souhlasu simulovaných spekter s experimentem (viz obr. 6 na straně 21 přílohy 1), ale můžeme odhadnout i tvar a výšku rotačních bariér (viz obr. 2 na straně 17 přílohy 1). Vliv molekulární flexibility lze také velmi dobře potvrdit na základě porovnání šířky pásů v Ramanových spektrech L-alaninu ve vodném roztoku, v práškovém (polykrystalickém) vzorku a v amorfní struktuře vzniklé odpařením vody z kapky roztoku deponované na hydrofobním substrátu (tzv. Drop Coating Deposition Raman<sup>150-152</sup> – DCDR metoda) sestávajícím z vyleštěné ocelové destičky pokryté tenkou vrstvou teflonu (destičky SpectRIM<sup>TM</sup> od Tienta Sciences), viz obr. 7 na straně 22 přílohy 1.



**Obr. 5.2:** Příklad rigidní (Gly-Pro) a flexibilní (Pro-Gly) molekuly s naznačenými hlavními stupni volnosti. Rigidita Gly-Pro je dána tím, že pokud je prolin na C-konci dipeptidu, rotace kolem vazby  $\text{C}_\alpha\text{-N}$  (torzní úhel  $\Phi$ ) bude pětičlenným kruhem výrazně omezena. Pro-Gly je ve srovnání s Gly-Pro flexibilnější, neboť prolin se v tomto případě nachází na N-konci dipeptidu a rotace kolem torzního úhlu  $\Phi$  je v tomto případě volná.

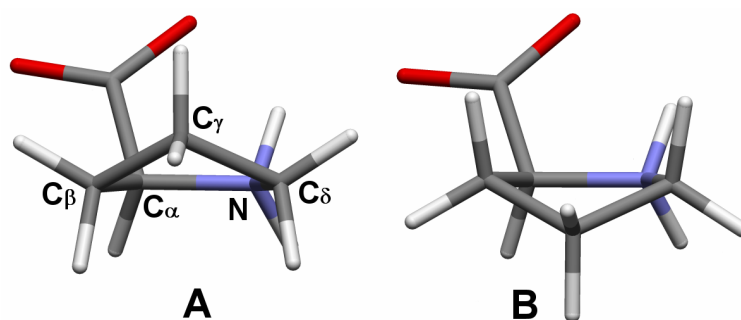
Tato práce se také snaží poukázat na fakt, že u ROA spekter může v důsledku molekulární flexibility dojít dokonce k vyrušení některých pásů, neboť rotace kolem jednoduché vazby v řadě případů nejen posouvá polohu maxima pásu v Ramanově spektru, ale vede i ke změně znaménka odpovídajícího pásu v ROA spektru. Právě to je příčinou zvýšené citlivosti ROA k dynamickým aspektům struktury molekul. To lze velmi názorně ilustrovat na spektrech dipeptidů skládajících se z prolinu a glycínu nebo prolinu a alaninu. Pro flexibilních systémy (například Pro-Gly) pozorujeme nejen širší pásy v Ramanových i v ROA spektrech,

ale v ROA spektrech krom toho zpravidla pozorujeme i méně pásů a celé spektrum se jeví jakoby „zjednodušené“, neboť některé pásy v důsledku konformačního středování prakticky vymizely. Rozšíření spektrálních čar a „složitost“ či naopak výrazná „jednoduchost“ ROA spekter tedy může sloužit jako velmi dobrý indikátor rigidity respektive flexibility daného systému (viz obr. 8 na straně 23 přílohy 1).

## 5.2 Studium dynamiky prolinového kruhu a interakce s rozpouštědlem

Prolin představuje důležitý stavební kámen většiny peptidů a proteinů, který zásadním způsobem ovlivňuje jejich strukturu a biologickou funkci,<sup>153</sup> zvyšuje například sklon k tvorbě ohybů u  $\beta$ -skládaného listu,<sup>154</sup> dále je také známo, že toxicita některých peptidů je závislá na jeho konformaci.<sup>155</sup>

Prolin je jedinou aminokyselinou vyskytující se v biologických systémech, která obsahuje sekundární amid. Je to také velmi zajímavý modelový systém, který lze studovat náročnými teoretickými technikami. Molekulu prolinu je možné popsat pomocí tří hlavních stupňů volnosti: rotace skupiny  $\text{COO}^-$  a dvou pseudorotačních parametrů popisujících konformaci prolinového kruhu – amplitudy a fáze.<sup>156</sup>



**Obr. 5.3:** Dvě konformace L-prolinu s nejnižší energií, energie obou konformerů je téměř stejná (viz tab. 1 na straně 10 přílohy 2)

Ramanova a ROA spektra roztoků L- a D-prolinu ve formě obojetného iontu v  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{D}_2\text{O}$  byla změřena v oblasti  $100 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  a byla analyzována s ohledem na konformační vlastnosti pětičlenného prolinového kruhu. Byl zkoumán vliv omezené konformační flexibility prolinu a interakce s rozpouštědlem na nehomogenní rozšíření spektrálních pásů. Interpretace spekter je založena na *ab initio* výpočtech zahrnující implicitní (kontinuální) i explicitní modely rozpouštědla. Aby bylo možné modelovat vliv konformační středování na spektra, byla vypočtena dvojdimenzionální plocha potenciální energie popisující zkrabacení pětičlenného kruhu (viz obr. 2 na straně 15 přílohy 2) a na jejím základě bylo možné vysvětlit pozorované selektivní rozšíření spektrálních pásů. Spektra v roztoku odpovídají přibližně rovnoměrnému zastoupení dvou energeticky blízkých rovnovážných konformací prolinového kruhu A a B (viz obr. 5 na straně 18 přílohy 2), zatímco spektra práškového vzorku (v tomto případě pouze Ramanova spektra) svými úzkými spektrálními pásy a jejich polohami potvrzují ve shodě s výpočty dominantní přítomnost konformace A.



Tyto výsledky potvrzují, že experimentální data nemohou být do všech podrobností vysvětlena a interpretována, pokud do výpočtu nezahrneme konformační rovnováhu, molekulární flexibilitu a vliv rozpouštědla. Jejich důležitost je pro různé pásy různá; některé nejsou ke změnám geometrie molekuly či prostředí příliš citlivé, některé jsou citlivější k molekulárním pohybům a jiné naopak k interakci s normálními vibračními módy rozpouštědla. I nadále však existují určité odchylky mezi experimentálními a simulovanými daty, například v intenzitách některých pásů a v ojedinělých případech i ve znaménku ROA. Proto zatím není možné odhadnout relativní zastoupení obou konformerů v roztoku s vyšší přesností než je uváděný přibližný poměr 1:1.

Pro alanin a prolin byl také zkoumán vliv použitého DFT funkcionálu na přesnost výpočtu harmonických frekvencí. Intenzita Ramanových a ROA pásů nebyla do statistického zpracování promítnuta, byla však využívána při detailním přiřazení pásů. Při statistickém zpracování byl hledán parametr  $a$  v lineární závislosti

$$C_i = a E_i \quad (5.1)$$

kde  $C_i$  a  $E_i$  jsou vypočtené respektive experimentální frekvence vibračních pásů ve spektrální oblasti 200–1700  $\text{cm}^{-1}$ . Parametr  $a$  byl hledán metodou nejmenších čtverců, tj.

$$\sum_i (C_i - a E_i)^2 = \min \quad (5.2)$$

Položíme-li derivaci uvedeného členu rovnu nule, dostaneme pro hledaný koeficient  $a$  vztah:

$$a = \frac{\sum_i C_i E_i}{\sum_i E_i^2} \quad (5.3)$$

V ideálním případě by mělo platit, že  $a = 1$ . V takovém případě hledáme střední kvadratickou odchylku vypočtených hodnot ve vztahu

$$C_i = E_i, \quad (5.4)$$

která činí

$$\Delta(C - E) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - E_i)^2}{n}}. \quad (5.5)$$

Střední kvadratická odchylka pro vztah (5.1) se pak vypočte podobně jako:

$$\delta(C - aE) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - aE_i)^2}{n}} \quad (5.5)$$

Hodnoty uvedených statistických parametrů pro výpočet vibračních frekvencí jsou uvedeny v tabulce 5.1 (pro L-alanin) a v tabulce 5.2 (pro L-prolin). Nejlepší výsledky (ve smyslu nejnižší dosažené odchylky) jsou v tabulkách označeny hvězdičkou (\*), funkcionály dávající nejlepší výsledky jsou zvýrazněny barevně. Ve všech případech jde o hybridní funkcionály B3P86, B3PW91 a B3LYP (viz též tab. 3.5).

**Tab. 5.1:** Statistické srovnání přesnosti výpočtu vibračních frekvencí L-alaninu v oblasti 200–1700 cm<sup>-1</sup> pro různé DFT funkcionály (a také pro HF a MP2 výpočty). Standardní odchylky jsou uvedeny v cm<sup>-1</sup>.

<b>funkcionál/metoda</b>	<i>a</i>	$\Delta(C - E)$	$\delta(C - aE)$
<b>HF</b>	1.0879	104	28
<b>BhandHLYP</b>	1.0419	53	23
<b>MP2</b>	1.0181	32	24
<b>MPW91PW91</b>	1.0061	17	16*
<b>B1LYP</b>	1.0039	24	24
<b>PBE1PBE</b>	1.0038	15*	15*
<b>B3P86</b>	0.9994*	16*	16*
<b>B3PW91</b>	0.9985*	17	17
<b>B98</b>	0.9975	21	20
<b>B3LYP</b>	0.9968	21	21
<b>HCTH</b>	0.9828	27	18
<b>HCTH147</b>	0.9779	32	20
<b>VSXC</b>	0.9766	37	26
<b>LSDA</b>	0.9757	43	33
<b>OLYP</b>	0.9741	36	21
<b>SVWN5</b>	0.9722	45	31
<b>BPW91</b>	0.9650	45	20
<b>PW91PW91</b>	0.9640	45	18
<b>G96LYP</b>	0.9634	49	25
<b>PB86</b>	0.9606	49	19
<b>BLYP</b>	0.9603	52	26
<b>PW91LYP</b>	0.9598	51	23
<b>PBELYP</b>	0.9581	53	24

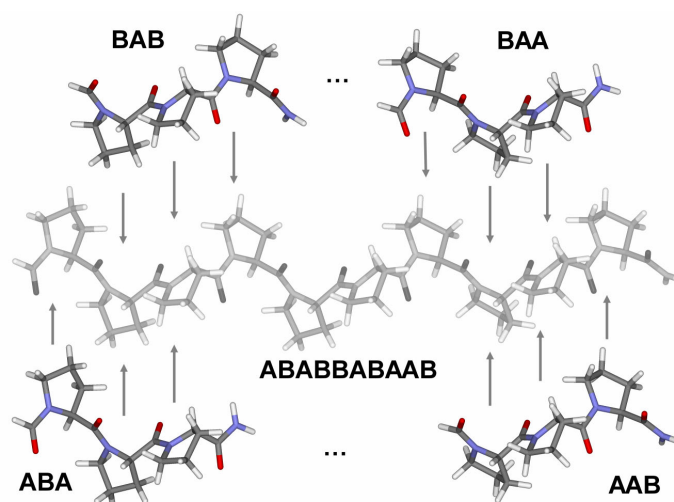
**Tab. 5.2:** Statistické srovnání přesnosti výpočtu vibračních frekvencí L-prolinu v oblasti 200–1700 cm<sup>-1</sup> pro různé DFT funkcionály (a také pro HF a MP2 výpočty). Standardní odchylky jsou uvedeny v cm<sup>-1</sup>.

prolin v H <sub>2</sub> O				prolin v D <sub>2</sub> O			
funkcionál/metoda	a	$\Delta(C - E)$	$\delta(C - aE)$	funkcionál/metoda	a	$\Delta(C - E)$	$\delta(C - aE)$
HF	1.0918	101	19	HF	1.0890	96	22
BHandHLYP	1.0458	51	14*	BHandHLYP	1.0428	48	18
MP2	1.0209	27	16	MP2	1.0178	27	20
MPW1PW91	1.0118	19	14*	MPW1PW91	1.0087	19	17
B1LYP	1.0075	17	15	PBE1PBE	1.0039	22	22
B3P86	1.0055	15*	14*	B1LYP	1.0037	20	19
B3PW91	1.0048	15*	14*	B3P86	1.0022*	17*	17*
PBE1PBE	1.0023*	19	19	B3PW91	1.0010*	17*	17*
B98	1.0015*	16	16	B98	0.9978*	19	19
B3LYP	1.0011*	15*	15	B3LYP	0.9973*	19	19
HCTH	0.9887	19	15	HCTH	0.9938	19	18
HCTH147	0.9835	24	15	HCTH147	0.9793	29	19
VSXC	0.9802	26	15	OLYP	0.9759	32	20
OLYP	0.9796	28	17	VSXC	0.9752	32	19
LSDA	0.9748	37	25	LSDA	0.9713	38	23
BPW91	0.9710	35	15	SVWN5	0.9678	40	22
SVWN5	0.9709	40	24	BPW91	0.9668	40	19
PW91PW91	0.9703	35	14	PW91PW91	0.9664	39	18
G96LYP	0.9682	39	19	G96LYP	0.9635	45	23
BLYP	0.9646	42	19	BP86	0.9624	43	18
BP86	0.9640	45	22	BLYP	0.9598	48	23
PW91LYP	0.9637	43	17	PW91LYP	0.9593	48	22
PBELYP	0.9631	43	17	PBELYP	0.9581	49	22

### 5.3 Studium konformace prolinového kruhu v poly(L-prolinu)

Konformace polyprolin II (PPII) označuje levotočivou šroubovici s třemi aminokyselinovými zbytky na závit ( $3_1$ -helix), která není stabilizována intramolekulárními vodíkovými vazbami a která původně byla považována pouze za jednu z možných konformací poly(L-prolinu) v roztoku. Ukazuje se však, že tuto konformaci mohou zaujímat i peptidové sekvence neobsahující prolin.<sup>157, 158</sup> Konformace PPII je v poslední době v centru pozornosti neboť hraje důležitou roli v neuspořádaných polypeptidech a v tzv. misfoldingu proteinů.<sup>159</sup>

Ačkoli peptidové sekvence neprolinových zbytků v konformaci PPII již byly pomocí ROA studovány, spektra samotného poly(L-prolinu) doposud nebyla publikována. Naše práce se snaží tuto mezeru vyplnit. Navíc se ukazuje, že ROA spektra přinášejí také velmi cennou informaci o konformaci postranních řetězců, jejichž vliv na charakter ROA spekter proteinů dosud nebyl (snad s výjimkou kromě tryptofanu<sup>57</sup>) studován.



**Obr. 5.4:** Schematické znázornění přenosu tenzorů z prolinového tripeptidu na decapeptid.

Ramanova a ROA spektra poly(L-prolinu) byla změřena v širokém spektrálním rozsahu a analyzována s ohledem na konformaci postranního prolinového řetězce. Analýza byla založena na srovnání spekter s *ab initio* simulacemi poloh a intenzit spektrálních pásů. Byl prokázán výskyt obou konformerů pětičlenného kruhu (viz obr. 1 na straně 4 přílohy 3) s přibližně stejným zastoupením.

Simulace byly prováděny na 20-meru (L-Pro)<sub>20</sub>. Přenosem tenzorů molekulárních vlastností (kapitola 3.8) z triprolinových fragmentů způsobem naznačeným na obr. 5.4 byla

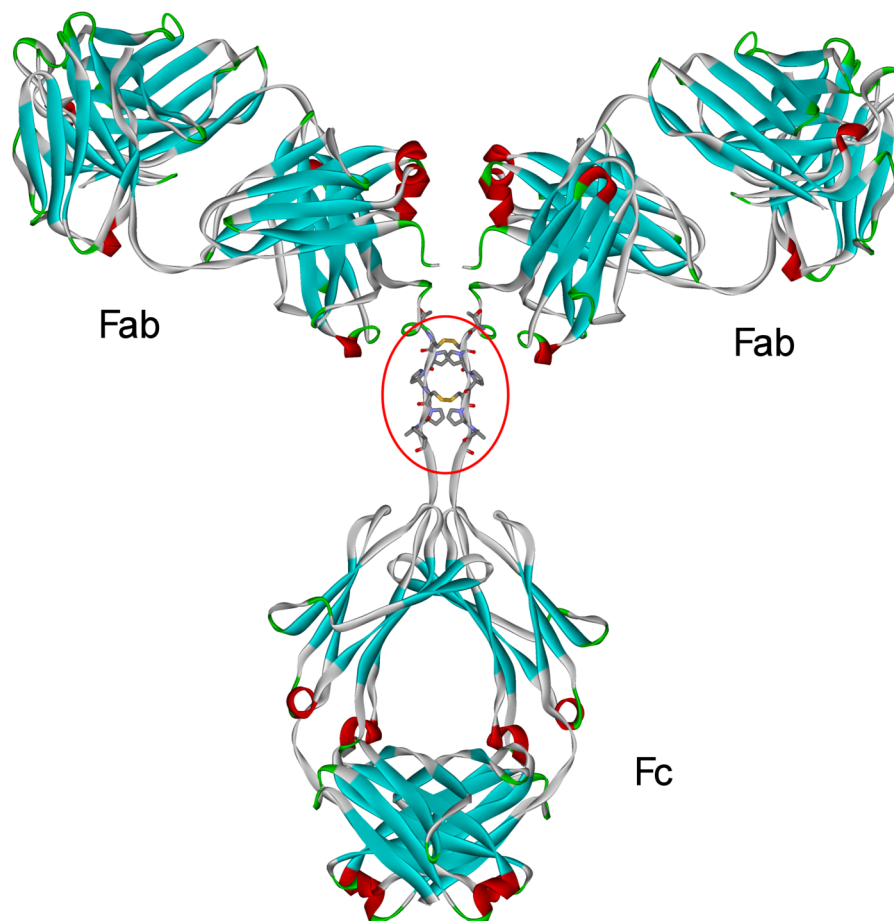
zkonstruována spektra různě dlouhých oligomerů v konformaci PPII jako modelů dlouhého řetězce poly(L-prolinu).

Na základě získaných výsledků bylo možno usoudit, že obě hlavní konformace prolinového kruhu (obr. 5.3) jsou v polypeptidovém řetězci zastoupeny přibližně stejně (viz obr. 4 na straně 12 přílohy 3). Změřená spektra navíc potvrzují, že polypeptid zaujímá PPII helikální strukturu ve vodě i v TFE (viz obr. 3 na straně 9 přílohy 3). Struktura v roztoku není rigidní, ale je porušována fluktuacemi, které ovlivňují spřažení vibračních módů prolinových kruhů a způsobují rozšíření ROA pásů. Navíc se ukazuje, že příspěvek postranních řetězců a hlavního řetězce k intenzitě ROA pásů je přibližně stejný, proto je porozumění původu obou těchto zdrojů signálu pro určování struktury peptidů pomocí ROA velmi důležité. Peptidová vazba v poly(L-prolinu) vytváří terciální amid, takže v Ramanových a ROA spektrech se nevyskytují pásy odpovídající vibraci amid III, které v případě jiných polypeptidů a proteinů slouží jako velmi citlivý indikátor sekundární struktury (v případě PPII struktury je takovým indikátorem pozitivní ROA pás  $1320\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>50</sup>

Poloha a intenzity pásů poly(L-prolinu) jsou pro obě použítá rozpouštědla s výjimkou pásu amidu I nápadně shodná (viz obr. 3 na straně 9 přílohy 3). Pás amidu I (převážně C=O valenční vibrace,  $1648\text{ cm}^{-1}$  v TFE,  $1633\text{ cm}^{-1}$  v  $\text{H}_2\text{O}$ ) je nejvíce ovlivněn formováním vodíkových vazeb a polaritou rozpouštědla. Tvar (a znaménko pásů) ROA spektra poly(L-prolinu) v oblasti  $900\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$  (+-+-) a  $1164\text{-}1207\text{ cm}^{-1}$  (++-) se zdá být charakteristický pro PPII konformaci a může sloužit jako spolehlivý indikátor přítomnosti této konformace v peptidech bohatých na prolin (viz též kapitola 5.4).

## 5.4. Ramanova optická aktivita hinge peptidu a jeho analogů

Hinge peptid představuje dvouvláknový fragment nacházející se v centrální části lidského imunoglobulinu IgG1<sup>160</sup>, jež na jedné straně spojuje dva páry těžkých řetězců (Fab, Fc) a na druhé straně představuje místo, kolem kterého se tyto řetězce mohou otáčet ("hinge" = závěs, pant, obr. 5.6).



**Obr. 5.6:** Model molekuly lidského imunoglobulinu IgG1 s vyznačenou částí odpovídající hinge peptidu.<sup>160</sup>

Hinge peptid je paralelní dimer oktapeptidu H-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-OH spojený dvěma disulfidovými můstky. Jedná o poměrně pevnou strukturu jednak díky oběma disulfidovým můstkům a také díky tomu, že je to sekvence velmi bohatá na prolin. Hinge peptid je zajímavý tím, že může sloužit jako nosič aktivních sekvencí (sám o sobě je imunologicky neutrální a obsahuje šest nezávislých koncových skupin: -NH a -OH na threoninovém postranním řetězci a na C-terminálním karboxylu). Z hlediska ROA spektroskopie a jejího využití pro studium struktury a dynamiky peptidů a proteinů v roztoku představuje hinge peptid velmi zajímavý systém, neboť je to poměrně rigidní peptid střední

velikosti, je bohatý na prolin a obsahuje disulfidové můstky, které dosud nebyly pomocí ROA zkoumány.

Bylo studována ROA spektra samotného hinge peptidu, jeho jednovláknového analogu H-Thr-Met-Pro-Pro-Met-Pro-Ala-Pro-OH, jeho centrální části (Boc-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-NHCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a modelového tetrapeptidu (H-Gly-Cys-OH)<sub>2</sub> (v obou posledních případech spojených disulfidovými můstky), viz obr. 1 na straně 15 přílohy 5. U hinge peptidu a jeho jednovláknového analogu byla také provedena molekulárně dynamická studie.

ROA spektra potvrzují PPII jako převažující konformaci u hinge peptidu, odchylky od čisté PPII konformace lze s největší pravděpodobností připsat geometrickým omezením v důsledku formování paralelního duplexu, zatímco jeho jednovláknový analog se vyskytuje výhradně v PPII (ve shodě s provedenými MD simulacemi). Diagnostický pozitivní pás 1320 cm<sup>-1</sup> přisuzovaný PPII struktuře<sup>35, 59</sup> je přítomný také ve studovaných na prolin bohatých peptidech a může být hodnocen jako velmi spolehlivý PPII marker. Navíc se také potvrzuje, že tvar ROA spekter v oblastech 900-1010 cm<sup>-1</sup> (+---) a 1164-1207 cm<sup>-1</sup> (++) pocházející od poly(L-prolinu) (kapitola 5.3) může sloužit jako spolehlivý indikátor přítomnosti této konformace v peptidech bohatých na prolin (viz spektra na obr. 3 na straně 16 přílohy 5 a spektrum na obr. 2 na straně 407 přílohy 4).

ROA pásy odpovídající valenčním C-S vibracím byly ve spektrech spolehlivě identifikovány, zatímco přítomnost význačného ROA pásu pocházejícího od valenční S-S vibrace zůstává nadále nejistá (obr. 3 na straně 16 přílohy 5). Objasnění příčin tohoto faktu vyžaduje hlubší prozkoumání s využitím vhodně připravených systémů modelujících různé konformace C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-S-S'-C'<sub>β</sub>-C'<sub>α</sub> řetězce, které však již přesahuje rámec této dizertace.

## Závěr

Ramanova optická aktivita představuje unikátní techniku pro studium struktury biologicky zajímavých molekul v roztoku, avšak experimentální ani výpočetní aspekty této metody nejsou dosud připraveny k rutinnímu použití. Tato práce se pokouší doplnit posud publikovaná data a rozšířit aplikační potenciál metody z několika hledisek. Při vypracování této práce byla provedena úspěšná přestavba ROA spektrometru, naměřena spektra vybraných látek a tato spektra byla úspěšně simulována. Při simulaci spekter byly použity nové teoretické postupy vedoucí nejen k dosažení lepší shody mezi vypočtenými a naměřenými daty, ale také k jejich zpřesněné interpretaci.

Dosažené výsledky lze stručně shrnout takto:

1. Byla provedená úspěšná přestavba ROA spektrometru včetně vytvoření obslužného softwaru na její ovládání a základní zpracování naměřených dat. Přebudování spektrometru vedlo k téměř třicetinasobnému zkrácení doby potřebné k dosažení potřebného poměru signál/šum v ROA spektrech, navíc se podařilo vybudovat aparaturu, která je schopna zaznamenávat spektra v širokém rozsahu fundamentálních vlnočtů ( $100\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ ), je dlouhodobě stabilní a umožňuje tedy provádět i velmi dlouhé akumulace (100 h). Přestože od roku 2002 jsou ROA spektrometry dostupné i komerčně, vybudovaný přístroj je ve svém oboru stále ojedinělý (jediný v oblasti střední a východní Evropy). Přestože byl optimalizován pro výzkum biomolekul ve vodném roztoku, poskytuje výbornou experimentální základnu pro studium širokého spektra opticky aktivních látek a případně i vývoj analytických aplikací.
2. Byly vyvinuty nové přístupy k simulaci spekter. Bylo prokázáno, že konformační flexibilita molekul výrazným způsobem ovlivňuje Ramanova a ROA spektra a její projevy mohou poskytnout dobrou představu o flexibilitě respektive rigiditě zkoumaného systému.
3. Byly provedeny simulace naměřených ROA spekter pro obojetné ionty alaninu a prolinu, které ukázaly, že konformační středování hraje při interpretaci spekter klíčovou roli a tedy že samotné zlepšování výpočetních metod (DFT funkcionálu, báze apod.) bez započtení vlivu různých konformací přítomných v roztoku nemůže vést k dobré shodě



s experimentálními daty. Na těchto "jednoduchých" systémech byly také testovány explicitní a implicitní modely rozpouštědla.

4. Výsledky získané na L-prolinu byly použity při studiu vlivu konformace pětičlenného prolinového kruhu na Ramanovo a ROA spektrum poly(L-prolinu). Ve změřených spektrech byly identifikovány charakteristické rysy odpovídající poly(L-prolinu) v konformaci polyprolin II a ty byly následně identifikovány i v peptidech bohatých na prolin. Bylo prokázáno, že k celkovému signálu v ROA spektrech poly(L-prolinu) přispívají stejnou měrou vibrace od hlavního řetězce i prolinového kruhu a pomocí simulovaných řetězců s různým zastoupením obou hlavních konformací prolinového jsme určili, že obě konformace mají přibližně stejné zastoupení.
5. Práce byla završena studiem hinge peptidu a jeho analogů, což jsou peptidy s bohatým obsahem prolinu. Pomocí molekulárně-dynamických simulací a srovnání s naměřenými a simulovanými spektry poly(L-prolinu) bylo dokázáno, že PPII je převažující konformace u hinge peptidu a výhradní konformace u jeho jednovláknového analogu. Hinge peptid je také ideálním modelovým systémem pro studium disulfidové vazby, která doposud nebyla pomocí ROA zkoumána. Otisk valenční vibrace  $\nu(\text{S-S})$  v ROA spektrech se zatím nepodařilo spolehlivě identifikovat, neboť v dané oblasti dochází k překryvu s jinými výraznými pásy. Na druhou stranu se ale podařilo identifikovat v ROA spektrech charakteristickou odezvu od valenčních C–S vibrací.

Vybudovaná experimentální základna i metody simulace spekter budou využívány a dále rozvíjeny v navazujících výzkumných projektech, které přitom nemusí být orientovány pouze na výzkum biomolekul. Řada výsledků metodického charakteru či způsobu zpracování spekter by mohla najít uplatnění i v jiných laboratořích. Například námi vypracovaný postup korekce ROA spekter vyvolal ohlas u recenzentů, kteří oceňovali nejen postup jako takový, ale především dosud ne zcela obvyklou korektnost, s jakou ROA data prezentujeme. Dosažené výsledky byly a nebo vbrzku budou publikovány a mohou zcela jistě najít uplatnění při interpretaci ROA spekter peptidů a proteinů.

## Literatura

1. Nafie, L. A.; Che, D., Theory and Measurement of Raman Optical Activity. In *Modern Nonlinear Optics, Part 3*, Evans, M.; Kielich, S., 'Eds.' Wiley: New York, 1994; 'Vol.' 85, pp 105-149.
2. Atkins, P. W.; Barron, L. D., Rayleigh Scattering of Polarized Photons by Molecules. *Mol. Phys.* **1969**, *16*, 453-466.
3. Barron, L. D.; Bogaard, M. P.; Buckingham, A. D., Raman Scattering of Circularly Polarized Light by Optically Active Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *241*, (2), 603-605.
4. Hecht, L.; Barron, L. D.; Gargaro, A. R.; Wen, Z. Q.; Hug, W., Raman optical activity instrument for biochemical studies. *J. Raman Spectrosc.* **1992**, *23*, (7), 401-411.
5. Hecht, L.; Barron, L. D.; Blanch, E. W.; Bell, A. F.; Day, L. A., Raman optical activity instrument for studies of biopolymer structure and dynamics. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, (9), 815-825.
6. Hanzlíková, J.; Praus, P.; Baumruk, V., Raman optical activity spectrometer for peptide studies. *J. Mol. Struct.* **1999**, *481*, 431-435.
7. Hecht, L.; Che, D.; Nafie, L. A., A New Scattered Circular Polarization Raman Optical Activity Instrument Equipped with a Charge-Coupled-Device Detector. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, (1), 18-25.
8. Che, D.; Hecht, L.; Nafie, L. A., Dual and incident circular polarization Raman optical activity backscattering of (-)-trans-pinane. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *180*, (3), 182-190.
9. Vargek, M.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Improved backscattering dual circular polarization Raman optical activity spectrometer with enhanced performance for biomolecular applications. *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28*, (8), 627-633.
10. Hug, W.; Hangartner, G., A novel high-throughput Raman spectrometer for polarization difference measurements. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, (9), 841-852.
11. Hug, W., Virtual Enantiomers as the solution of Optical Activity's Deterministic Offset Problem. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, (1), 1-13.
12. Zhu, F. J.; Isaacs, N. W.; Hecht, L.; Barron, L. D., Raman optical activity: A tool for protein structure analysis. *Structure* **2005**, *13*, (10), 1409-1419.
13. Hecht, L.; Che, D.; Nafie, L. A., Experimental comparison of scattered and incident circular polarization Raman optical activity in pinanes and pinenes. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, (11), 4266-4270.
14. Qu, X. H.; Lee, E. A.; Yu, G. S.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Quantitative comparison of experimental infrared and Raman optical activity spectra. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, (5), 649-657.
15. Bouř, P.; Baumruk, V.; Hanzlíková, J., Measurement and calculation of the Raman optical activity of alpha-pinene and trans-pinane. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, (9), 1384-1395.

16. Nafie, L. A.; Qu, X. H.; Lee, E. N.; Yu, G. S.; Freedman, T. B., Comparison of Fourier-transform vibrational circular dichroism and multichannel-detected Raman optical activity. *Microchim. Acta* **1997**, *14*, 807-808.
17. Hug, W.; Zuber, G.; Meijere, A.; Khlebnikov, A. F.; Hansen, H.-J., Raman Optical Activity of a Purely sigma-Bonded Helical Chromophore: (-)-(M)-sigma-[4]Helicene. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, (1), 1-21.
18. Zuber, G.; Goldsmith, M. R.; Beratan, D. N.; Wipf, P., Towards Raman optical activity calculations of large molecules. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, (4), 595-597.
19. Zuber, G.; Hug, W., Computational interpretation of vibrational optical activity: The ROA spectra of (4S)-4-methylisochromane and the (4S)-isomers of Galaxolide((R)). *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, (9), 2208-2234.
20. Hug, W.; Haesler, J., Is the vibrational optical activity of (R)-[H-2(1), H-2(2), H-2(3)]-neopentane measurable? *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *104*, (5), 695-715.
21. Barron, L. D.; Gargaro, A. R.; Hecht, L.; Polavarapu, P. L.; Sugeta, H., Experimental and ab initio theoretical vibrational Raman optical activity of tartaric acid. *Spectrochim. Acta A* **1992**, *48*, (8), 1051-1066.
22. Wen, Z. Q.; Barron, L. D.; Hecht, L., Vibrational Raman Optical Activity of Monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 285-292.
23. Bell, A. F.; Barron, L. D.; Hecht, L., Vibrational Raman Optical-Activity Study of D-Glucose. *Carbohydr. Res.* **1994**, *257*, (1), 11-24.
24. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman Optical-Activity of Ketose Monosaccharides. *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51*, (8), 1367-1378.
25. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Disaccharide Solution Stereochemistry from Vibrational Raman Optical-Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, (12), 5155-5161.
26. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Polysaccharide vibrational Raman optical activity: Laminarin and pullulan. *J. Raman Spectrosc.* **1995**, *26*, (12), 1071-1074.
27. Barron, L. D.; Gargaro, A. R.; Hecht, L.; Polavarapu, P. L., Experimental and Ab Initio Theoretical Vibrational Raman Optical-Activity of Alanine. *Spectrochim. Acta A* **1991**, *47*, (8), 1001-1016.
28. Barron, L. D.; Gargaro, A. R.; Hecht, L.; Polavarapu, P. L., Vibrational Raman Optical-Activity of Alanine as a Function of pH. *Spectrochim. Acta A* **1992**, *48*, (2), 261-263.
29. Yu, G. S.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A.; Deng, Z. Y.; Polavarapu, P. L., Experimental measurement and ab initio calculation of Raman optical activity of L-alanine and its deuterated isotopomers. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, (2), 835-843.
30. Jalkanen, K. J.; Nieminen, R. M.; Frimand, K.; Bohr, J.; Bohr, H.; Wade, R. C.; Tajkhorshid, E.; Suhai, S., A comparison of aqueous solvent models used in the calculation of the Raman and ROA spectra of L-alanine. *Chem. Phys.* **2001**, *265*, (2), 125-151.
31. Jalkanen, K. J.; Elstner, M.; Suhai, S., Amino acids and small peptides as building blocks for proteins: comparative theoretical and spectroscopic studies. *J. Mol. Struct.-Theochem* **2004**, *675*, (1-3), 61-77.
32. Abdali, S.; Jalkanen, K. J.; Bohr, H.; Suhai, S.; Nieminen, R. M., The VA and VCD spectra of various isotopomers of L-alanine in aqueous solution. *Chem. Phys.* **2002**, *282*, (2), 219-235.

33. Gargaro, A. R.; Barron, L. D.; Hecht, L., Vibrational Raman Optical-Activity of Simple Amino-Acids. *J. Raman Spectrosc.* **1993**, *24*, (2), 91-96.
34. Barron, L. D.; Hecht, L.; Blanch, E. W.; Bell, A. F., Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73*, (1), 1-49.
35. Barron, L. D.; Hecht, L.; McColl, I. H.; Blanch, E. W., Raman optical activity comes of age. *Mol. Phys.* **2004**, *102*, (8), 731-744.
36. Blanch, E. W.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity of proteins, nucleic acids, and viruses. *Methods* **2003**, *29*, (2), 196-209.
37. Keiderling, T. A., Peptide and protein conformational studies with vibrational circular dichroism and related spectroscopies. In *Circular Dichroism: Principles and Applications, Second Edition*, Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W., 'Eds.' John Wiley & Sons, Inc.: 2000; pp 621-666.
38. Barron, L. D.; Blanch, E. W.; McColl, I. H.; Syme, C. D.; Hecht, L.; Nielsen, K., Structure and behaviour of proteins, nucleic acids and viruses from vibrational Raman optical activity. *Spectr.-Int. J.* **2003**, *17*, (2-3), 101-126.
39. Creighton, T. E., *Proteins*. New York, 1984.
40. Deng, Z.; Polavarapu, P. L.; Ford, S. J.; Hecht, L.; Barron, L. D.; Ewig, C. S.; Jalkanen, K. J., Solution-phase conformations of N-acetyl-N'-methyl-L-alaninamide from vibrational Raman optical activity. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, (6), 2025-2034.
41. Han, W. G.; Jalkanen, K. J.; Elstner, M.; Suhai, S., Theoretical study of aqueous N-acetyl-L-alanine N'-methylamide: Structures and Raman, VCD, and ROA spectra. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, (14), 2587-2602.
42. Bohr, H. G.; Frimand, K.; Jalkanen, K. J.; Nieminen, R. M.; Suhai, S., Neural-network analysis of the vibrational spectra of N-acetyl L-alanyl N'-methyl amide conformational states. *Phys. Rev. E* **2001**, *64*, (2), 021905 1-13.
43. Yu, G. S.; Che, D. P.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A., Raman Optical-Activity of Simple Alanyl Peptides - Backscattering In-Phase Dual Circular-Polarization Measurements in Aqueous-Solution. *Biospectroscopy* **1995**, *1*, (2), 113-123.
44. Bouř, P.; Kapitán, J.; Baumruk, V., Simulation of the Raman optical activity of L-alanyl-L-alanine. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, (26), 6362-6368.
45. Jalkanen, K. J.; Nieminen, R. M.; Knapp-Mohammady, M.; Suhai, S., Vibrational analysis of various isotopomers of L-alanyl-L-alanine in aqueous solution: Vibrational absorption, vibrational circular dichroism, Raman, and Raman optical activity spectra. *Int. J. Quantum Chem.* **2003**, *92*, (2), 239-259.
46. Bouř, P.; Sychrovský, V.; Maloň, P.; Hanzlíková, J.; Baumruk, V.; Pospíšek, J.; Buděšínský, M., Conformation of the dipeptide cyclo(L-Pro-L-Pro) monitored by the nuclear magnetic resonance and Raman optical activity spectra. Experimental and ab initio computational study. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, (32), 7321-7327.
47. McColl, I. H.; Blanch, E. W.; Hecht, L.; Kallenbach, N. R.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity characterization of poly(L-proline) II helix in alanine oligopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, (16), 5076-5077.
48. McColl, I. H.; Blanch, E. W.; Gill, A. C.; Rhie, A. G. O.; Ritchie, M. A.; Hecht, L.; Nielsen, K.; Barron, L. D., A new perspective on beta-sheet structures using vibrational Raman

- optical activity: From poly(L-lysine) to the prion protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, (33), 10019-10026.
49. Wilson, G.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity of alpha-helical and unordered poly(L-lysine). *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* **1996**, *92*, (9), 1503-1509.
  50. Barron, L. D.; Blanch, E. W.; Hecht, L., Unfolded proteins studied by raman optical activity. *Adv. Protein Chem.* **2002**, *62*, 51-90.
  51. Diem, M., *Modern Vibrational Spectroscopy*. Wiley: New York, 1993.
  52. Miura, T.; Thomas, G. J., Subcellular Biochemistry Proteins: Structure Function and Engineering, 24. In Biswas, B. B.; Roy, S., 'Eds.' Plenum Press: New York, 1995; pp 55-99.
  53. Blanch, E. W.; Morozova-Roche, L. A.; Hecht, L.; Noppe, W.; Barron, L. D., Raman optical activity characterization of native and molten globule states of equine lysozyme: Comparison with hen lysozyme and bovine alpha-lactalbumin. *Biopolymers* **2000**, *57*, (4), 235-248.
  54. Barron, L. D.; Blanch, E. W.; Bell, A. F.; Syme, C. D.; Hecht, L.; Day, L. A., In *Chirality: Physical Chemistry. ACS Symposium Series*, Hicks, J. M., 'Ed.'; American Chemical Society: Washington DC, 2002; 'Vol.' 810, pp 34-49.
  55. Blanch, E. W.; Bell, A. F.; Hecht, L.; Day, L. A.; Barron, L. D., Raman optical activity of filamentous bacteriophages: Hydration of alpha-helices. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, (1), 1-7.
  56. Miura, T.; Takeuchi, H.; Harada, I., Tryptophan Raman bands sensitive to hydrogen bonding and side-chain conformation. *J. Raman Spectrosc.* **1989**, *20*, (10), 667-671.
  57. Blanch, E. W.; Hecht, L.; Day, L. A.; Pederson, D. M.; Barron, L. D., Tryptophan absolute stereochemistry in viral coat proteins from Raman optical activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, (20), 4863-4864.
  58. Blanch, E. W.; McColl, I. H.; Hecht, L.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Structural characterization of proteins and viruses using Raman optical activity. *Vib. Spectrosc.* **2004**, *35*, (1-2), 87-92.
  59. Blanch, E. W.; Gill, A. C.; Rhie, A. G. O.; Hope, J.; Hecht, L.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Raman optical activity demonstrates poly(L-proline) II helix in the N-terminal region of the ovine prion protein: Implications for function and malfunction. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, (2), 467-476.
  60. Blanch, E. W.; Hecht, L.; Barron, L. D., New insight into the pH-dependent conformational changes in bovine beta-lactoglobulin from Raman optical activity. *Protein Sci.* **1999**, *8*, (6), 1362-1367.
  61. Blanch, E. W.; Morozova-Roche, L. A.; Cochran, D. A. E.; Doig, A. J.; Hecht, L.; Barron, L. D., Is polyproline II helix the killer conformation? A Raman optical activity study of the amyloidogenic prefibrillar intermediate of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, (2), 553-563.
  62. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity of pyrimidine nucleosides. *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* **1997**, *93*, (4), 553-562.
  63. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity as a probe of polyribonucleotide solution stereochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, (26), 6006-6013.

64. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Evidence for global mobility in the premelting of a polynucleotide from temperature-dependent Raman optical activity. *Biospectroscopy* **1998**, *4*, (2), 107-111.
65. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Evidence for a new transition in polyribonucleotides from Raman optical activity. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, (8), 651-656.
66. Bell, A. F.; Hecht, L.; Barron, L. D., Vibrational Raman optical activity of DNA and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, (23), 5820-5821.
67. Saenger, W., *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer: New York, 1984.
68. Blanch, E. W.; Robinson, D. J.; Hecht, L.; Barron, L. D., A comparison of the solution structures of tobacco rattle and tobacco mosaic viruses from Raman optical activity. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 1499-1502.
69. Blanch, E. W.; Robinson, D. J.; Hecht, L.; Syme, C. D.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Solution structures of potato virus X and narcissus mosaic virus from Raman optical activity. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 241-246.
70. Blanch, E. W.; Hecht, L.; Syme, C. D.; Volpetti, V.; Lomonosoff, G. P.; Nielsen, K.; Barron, L. D., Molecular structures of viruses from Raman optical activity. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 2593-2600.
71. Pecul, M.; Ruud, K., Ab Initio Calculation of Vibrational Raman Optical Activity. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *104*, 816-829.
72. Reiher, M.; Liegeois, V.; Ruud, K., Basis set and density functional dependence of vibrational Raman optical activity calculations. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, (33), 7567-7574.
73. Papoušek, D.; Aliev, M. R., *Molecular Vibrational/Rotational Spectra*. Academia: Prague, 1982.
74. Barron, L. D., *Molecular Light Scattering and Optical Activity, Second Edition*. Cambridge University Press: Cambridge, 2004.
75. Barron, L. D.; Hecht, L., Vibrational Raman Optical Activity: From Fundamentals to Biochemical Applications. In *Circular Dichroism, Principles and Applications*, Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. W., 'Eds.' VCH Publishers, Inc.: New York, 1994.
76. Barron, L. D.; Buckingham, A. D., A Simple Two-Group Model for Rayleigh and Raman Optical Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 4769-4773.
77. Placzek, G., In *Handbuch der Radiologie*, Marx, E., 'Ed.'; Akademische Verlagsgesellschaft: Leipzig, 1934; 'Vol.' 6, pp 205-.
78. DALTON, a molecular electronic structure program, Release 1.2.1, 2001.
79. DALTON, a molecular electronic structure program, Release 2.0, 2005.
80. *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2004.
81. Pecul, M.; Rizzo, A., Linear Response Coupled Cluster Calculation of Raman Scattering Cross Section. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, (4), 1259-1268.
82. Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogenous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, (3B), B864-B871.
83. Parr, R. G.; Yang, W., *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press: 1989.

84. Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, (4A), A1133-A1138.
85. Slater, J. C., *Quantum Theory of Molecular and Solids. Vol. 4: The Self-Consistent Field for Molecular and Solids*. McGraw-Hill: New York, 1974.
86. Becke, A. D., Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, (6), 3098-3100.
87. Perdew, J. P., In *Electronic Structure of Solids*, Ziesche, P.; Eschrig, H., 'Eds.' Akademie Verlag: Berlin, 1991.
88. Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Singh, D. J.; Fiolhais, C., Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys. Rev. B* **1992**, *46*, (11), 6671-6687.
89. Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Singh, D. J.; Fiolhais, C., Erratum: Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys. Rev. B* **1993**, *48*, (7), 4978-4978.
90. Perdew, J. P.; Burke, K.; Wang, Y., Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, (23), 16533-16539.
91. Adamo, C.; Barone, V., Exchange functionals with improved long-range behavior and adiabatic connection methods without adjustable parameters: The mPW and mPW1PW models. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, (2), 664-675.
92. Gill, P. M. W., A new gradient-corrected exchange functional. *Mol. Phys.* **1996**, *89*, (2), 433-445.
93. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, (18), 3865-3868.
94. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Erratum: Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, (7), 1396-1396.
95. Handy, N. C.; Cohen, A. J., Left-right correlation energy. *Mol. Phys.* **2001**, *99*, (5), 403-412.
96. Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M., Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin-Density Calculations - A Critical Analysis. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, (8), 1200-1211.
97. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, (2), 785-789.
98. Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H., Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, (3), 200-206.
99. Perdew, J. P.; Zunger, A., Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. *Phys. Rev. B* **1981**, *23*, (10), 5048-5079.
100. Perdew, J. P., Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, (12), 8822-8824.

101. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. 4. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, (3), 1040-1046.
102. Van Voorhis, T.; Scuseria, G. E., A new form for the exchange-correlation energy functional. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, (2), 400-410.
103. Hamprecht, F. A.; Cohen, A. J.; Tozer, D. J.; Handy, N. C., Development and assessment of new exchange-correlation functionals. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, (15), 6264-6271.
104. Boese, A. D.; Doltsinis, N. L.; Handy, N. C.; Sprik, M., New generalized gradient approximation functionals. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, (4), 1670-1678.
105. Boese, A. D.; Handy, N. C., A new parametrization of exchange-correlation generalized gradient approximation functionals. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, (13), 5497-5503.
106. Becke, A. D., Density Functional Thermochemistry. 3. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, (7), 5648-5652.
107. Adamo, C.; Barone, V., Toward reliable adiabatic connection models free from adjustable parameters. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, (1-3), 242-250.
108. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. 5. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, (20), 8554-8560.
109. Schmider, H. L.; Becke, A. D., Optimized density functionals from the extended G2 test set. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, (23), 9624-9631.
110. Onsager, L., Electric Moments of Molecules in Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486-1493.
111. Wong, M. W.; Frisch, M. J.; Wiberg, K. B., Solvent effects. 1. The mediation of electrostatic effects by solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, (13), 4776-4782.
112. Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. J., Solvent effects. 2. Medium effect on the structure, energy, charge density, and vibrational frequencies of sulfamic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, (2), 523-529.
113. Barone, V.; Cossi, M., Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, (11), 1995-2001.
114. Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V., Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, (6), 669-681.
115. Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J., Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, (4), 404-417.
116. Pomelli, C. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Barone, V., Effective generation of molecular cavities in polarizable continuum model by DefPol procedure. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, (16), 1693-1701.
117. Goncalves, P. F. B.; Vivotto, P. R., Optimization of molecular cavities in the PCM of neutral molecules using charge dependent atomic radii: applications to the semi-empirical AM1 and MNDO/PM3 methods. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *304*, (5-6), 438-444.
118. Bohr, H. G.; Jalkanen, K. J.; Elstner, M.; Frimand, K.; Suhai, S., A comparative study of MP2, B3LYP, RHF and SCC-DFTB force fields in predicting the vibrational spectra of N-acetyl-L-alanine-N'-methyl amide: VA and VCD spectra. *Chem. Phys.* **1999**, *246*, (1-3), 13-36.



119. Schlegel, H. B., In *Modern Electronic Structure Theory*, Yarkony, D. R., 'Ed.'; World Scientific: Singapore, 1995; pp 459-500.
120. Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T., *Numerical Recipes in Fortran 77. The Art of Scientific Computing. Second Edition.* Cambridge University Press: 1997.
121. Bouř, P.; Keiderling, T. A., Partial optimization of molecular geometry in normal coordinates and use as a tool for simulation of vibrational spectra. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, (9), 4126-4132.
122. Pulay, P.; Fogarasi, G.; Pang, F.; Boggs, J. E., Systematic ab initio gradient calculation of molecular geometries, force constants, and dipole moment derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, (10), 2550-2560.
123. Pulay, P.; Fogarasi, G., Geometry Optimization in Redundant Internal Coordinates. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, (4), 2856-2860.
124. Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J., Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, (1), 49-56.
125. Schlegel, H. B., Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, (2), 214-218.
126. Bouř, P., Convergence Properties of the Normal Mode Optimization and its Combination with Molecular Geometry Constraints. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2005**, *70*, 1315-1340.
127. Banerjee, A.; Adams, N.; Simons, J.; Shepard, R., Search for Stationary-Points on Surface. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, (1), 52-57.
128. Simons, J.; Nichols, J., Strategies for Walking on Potential-Energy Surfaces Using Local Quadratic Approximations. *Int. J. Quantum Chem.* **1990**, *24*, 263-276.
129. Bouř, P.; Sopková, J.; Bednářová, L.; Maloň, P.; Keiderling, T. A., Transfer of molecular property tensors in Cartesian coordinates: A new algorithm for simulation of vibrational spectra. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, (5), 646-659.
130. Nezbeda, I.; Kolafa, J.; Kotrla, M., *Úvod do počítačových simulací metody Monte Carlo a molekulární dynamiky.* Karolinum: Praha, 1998.
131. Allen, M. P., Introduction to Molecular Dynamics Simulation. In *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Attig, N.; Binder, K.; Grubmüller, H.; Kremer, K., 'Eds.' NIC-Directors: Jülich, 2004; 'Vol.' 23, pp 1-27.
132. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, (19), 5179-5197.
133. Wang, J. M.; Cieplak, P.; Kollman, P. A., How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, (12), 1049-1074.
134. Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J. M.; Kollman, P., A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, (16), 1999-2012.

135. Foloppe, N.; MacKerell, A. D., All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, (2), 86-104.
136. Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham, T. E.; Debolt, S.; Ferguson, D. M.; Seibel, G.; Kollman, P. A., AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* **1995**, *91*, (1-3), 1-41.
137. *Tinker Version 3.8*, Washington University School of Medicine: Saint Louis, 2000.
138. Ren, P.; Ponder, J. W., Polarizable Atomic Multipole Water Model for Molecular Mechanics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, (24), 5933-5947.
139. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, (2), 926-935.
140. Bouř, P.; Buděšínský, M.; Špirko, V.; Kapitán, J.; Šebestík, J.; Sychrovský, V., A complete set of NMR chemical shifts and spin-spin coupling constants for L-alanyl-L-alanine zwitterion and analysis of its conformational behavior. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, (48), 17079-17089.
141. Mazaleyrat, J. P.; Wright, K.; Gaucher, A.; Wakselman, M.; Oancea, S.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Setnička, V.; Kapitán, J.; Keiderling, T. A., Synthesis and conformational study of homo-peptides based on (S)-Bin, a C-2-symmetric binaphthyl-derived C-alpha,C-alpha-disubstituted glycine with only axial chirality. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, (13), 1879-1893.
142. Bouř, P.; Michalík, D.; Kapitán, J., Empirical solvent correction for multiple amide group vibrational modes. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, (14), 144501-9.
143. Tedesco, J. M.; Owen, H.; Pallister, D. M.; Morris, M. D., Principles and Spectroscopic Applications of Volume Holographic Optics. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, (9), A441-A449.
144. Battey, D. E.; Slater, J. B.; Wludyka, R.; Owen, H.; Pallister, D. M.; Morris, M. D., Axial Transmissive F/1.8 Imaging Raman Spectrograph With Volume-Phase Holographic Filter And Grating. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, (11), 1913-1919.
145. James, J. F.; Sternburg, R. S., *The Design of Optical Spectrometers*. Chapman and Hall Ltd.: London, 1969.
146. Hecht, E., *Optics, 4th edition*. Addison Wesley: San Francisco, 2002.
147. Vrbová, M., *Lasery a moderní optika*. Prometheus: Praha, 1994.
148. Gunnia, U.; Davies, M. A.; Diem, M., Methods for the Automatic-Determination of Laser Beam Polarization and Intensity Parameters for the Measurement of Raman Optical Activity. *J. Raman Spectrosc.* **1987**, *18*, (6), 399-403.
149. Kapitán, J.; Baumruk, V.; Hulačová, H.; Maloň, P., Raman Optical Activity of the Hinge Peptide. *submitted to Vib. Spectrosc.* **2005**.
150. Deegan, R. D.; Bakajin, O.; Dupont, T. F.; Huber, G.; Nagel, S. R.; Witten, T. A., Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **1997**, *389*, (6653), 827-829.

151. Zhang, D. M.; Xie, Y.; Mrozek, M. F.; Ortiz, C.; Davisson, V. J.; Ben-Amotz, D., Raman detection of proteomic analytes. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, (21), 5703-5709.
152. Zhang, D. M.; Mrozek, M. F.; Xie, Y.; Ben-Amotz, D., Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition. *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58*, (8), 929-933.
153. Feng, Y. Q.; Klein, B. K.; Vu, L.; Aykent, S.; McWherter, C. A., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N NMR resonance assignments, secondary structure, and backbone topology of a variant of human interleukin-3. *Biochemistry* **1995**, *34*, 6540-6551.
154. Yao, J.; Dyson, H. J.; Wright, P. E., Three-Dimensional Structure of a Type VI Turn in a Linear Peptide in Water Solution - Evidence For Stacking of Aromatic Rings As a Major Stabilizing Factor. *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, (4), 754-766.
155. Falk, M.; Sidhu, P.; Walter, J. A., Conformation of kainic acid in solution from molecular modelling and NMR spectra. *Nat. Toxins* **1998**, *6*, 159-171.
156. Altona, C.; Sundaralingam, M., Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides. A New Description Using the Concept of Pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, (23), 8205-8212.
157. Adzhubei, A. A.; Sternberg, J. E., Left-handed Polyproline II Helices Commonly Occur in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, (2), 472-493.
158. Stapley, B. J.; Creamer, T. P., A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci.* **1999**, *8*, (3), 587-595.
159. Shi, Z. S.; Woody, R. W.; Kallenbach, N. R., Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins? *Adv. Protein Chem.* **2002**, *62*, 163-240.
160. Padlan, E. A., Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **1994**, *31*, (3), 169-217.