

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Chiroptické jevy v biochemii
Bakalářská práce

2022

Kateřina Shejbalová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Shejbalová**
Osobní číslo: **C19196**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Chiroptické jevy v biochemii**
Téma práce anglicky: **Chiroptical Phenomena In Biochemistry**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na dané téma s důrazem na posouzení vlivu enantiomerů v biochemii.
2. Seznámení se s experimentálními metodami umožňujícími enantiomery identifikovat, speciálně pak s metodami používajícími polarizované světlo, tedy metodami založenými na chiroptických jevech: cirkulárním dichroismu a optické rotační disperzi.
3. Proměření a interpretace optické rotační disperze vybrané opticky aktivní látky v závislosti na vlnové délce světla. Posoudit různé metody měření, například pomocí polarimetru, případně ellipsometru.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: Dr. Mgr. Jan Mistrík, Ph.D.
Ústav aplikované fyziky a matematiky

Datum zadání bakalářské práce: 18. prosince 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 1. července 2022

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Chiroptické jevy v biochemii jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28.6. 2022

Kateřina Shejbalová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla hlavně poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Dr. Mgr. Janu Mistríkovi Ph.D. za jeho cenné rady, vřelý lidský přístup, ochotu a pomoc při psaní této práce. Chtěla bych také poděkovat Centru materiálů a nanotechnologií Univerzity Pardubice za poskytnuté experimentální zázemí. Na závěr bych chtěla moc poděkovat své rodině a příteli Ondřejovi za jejich velikou podporu během celého studia.

ANOTACE

Úvodní část této bakalářské práce jsou představují enantiomery objevující se v biochemických procesech. Zároveň jsou zde stručně zmíněny metody pro jejich studium.

Dále se práce věnuje chiroptickým jevům, optické rotační disperzi a cirkulárnímu dichroismu. Bakalářská práce obsahuje experimentální část, ve které se zabývá spektroskopickou elipsometrií a jejímu možnému využití při studiu chiroptických jevů. Výsledky z elipsometrie jsou porovnávány s hodnotami naměřenými polarimetrem.

KLÍČOVÁ SLOVA

enantiomery, chiralita, polarizace světla, chiroptické jevy, optická rotační disperze, cirkulární dichroismus, elipsometrie

TITLE

Chiroptical phenomena in biochemistry

ANOTATION

At the beginning of this bachelor thesis, enantiomers appearing in biochemical processes are introduced. At the same time, the methods for their study are briefly mentioned here.

The work also deals with chiroptical phenomena, optical rotational dispersion and circular dichroism. The bachelor thesis contains an experimental part in which it deals with spectroscopic ellipsometry and its relation to chiroptical phenomena. The ellipsometry results are compared with the values measured by a polarimeter.

KEYWORDS

enantiomers, chirality, light polarization, chiroptical phenomena, optical rotatory dispersion, circular dichroism, ellipsometry

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 ENANTIOMERY V BIOCHEMII	16
1.1.1 Značení enantiomerů	17
1.1.2 Význam enantiomerů	19
1.2 CHIROPTICKÉ JEVY JAKO NÁSTROJ ROZLIŠENÍ ENANTIOMERŮ	21
1.2.1 Polarizace světla	21
1.2.2 Opticky aktivní látky	23
1.2.3 Optická rotační disperze (ORD).....	24
1.2.4 Cirkulární dichroismus (CD).....	25
1.2.5 Souvislost ORD a CD.....	26
1.3 DALŠÍ METODY PRO STUDIUM ENANTIOMERŮ	27
1.3.1 Polarimetrie	28
1.3.2 Rentgenová strukturní analýza	28
1.3.3 Ramanova optická aktivita (RAO).....	28
1.3.4 Spektroskopická elipsometrie	28
2 CÍL PRÁCE	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 STUDOVANÉ VZORKY	31
3.2 POUŽITÉ METODY	32
3.2.1 Spektroskopická elipsometrie	32
3.2.1.1 Elipsometrické veličiny	33
3.2.1.2 Spektroskopický elipsometr	34
3.2.2 Polarimetrie	35
3.2.2.1 Polarimetr	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1 URČENÍ SPEKTRÁLNÍ OBLASTI PRO MĚŘENÍ	38
4.2 STANOVENÍ PARAMETRŮ (Ψ, Δ) A (α, Θ) ELIPSOMETRIÍ.....	39

4.3	STANOVENÍ PARAMETRŮ (α, Θ) POLARIMETRIÍ	41
4.4	SROVNÁNÍ ELIPSOMETRIE A POLARIMETRIE	43
5	ZÁVĚR	45
6	DODATEK – ETYMOLOGICKÝ SLOVNÍK.....	46
7	POUŽITÉ ZDROJE	47

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.1.1: Asymetrický uhlík.....	16
Obrázek 1.1.2: Schematické rozdělení izomerů	17
Obrázek 1.1.3: Enantiomery alaninu	18
Obrázek 1.1.4: Enantiomery glycerinaldehydu	18
Obrázek 1.2.1: Elektromagnetická vlna.....	21
Obrázek 1.2.2: Druhy polarizace	23
Obrázek 1.2.3: Představa lineárně polarizovaného světla	24
Obrázek 1.2.4: Zakreslení úhlů.....	27
Obrázek 3.1.1: Skleněné kyvety naplněné cukerným roztokem.....	31
Obrázek 3.2.1: Zobrazení polarizované s-vlny a p-vlny.....	32
Obrázek 3.2.2: Geometrický význam elipsometrických veličin (Ψ , Δ).....	33
Obrázek 3.2.3: Schéma spektroskopického elipsometru s rotujícím analyzátozem	34
Obrázek 3.2.4: Spektroskopický elipsometr VASE (Woolam Ltd.).....	35
Obrázek 3.2.5: Spektroskopický elipsometr VASE (Woolam Ltd.).....	35
Obrázek 3.2.6: Polarimetr PAX1000 (THORLABS)	36
Obrázek 4.1.1: Zobrazení závislosti vlnové délky na optické propustnosti	38
Obrázek 4.2.1: Proměření elipsometrických veličin pro nasycený roztok cukru	39
Obrázek 4.2.2: Zobrazení přepočítaných závislostí úhlů azimutu α a elipticity Θ	39

Obrázek 4.2.3: Zobrazení spekter ORD a CD	40
Obrázek 4.3.1: Znázornění baseline	41
Obrázek 4.3.2: Polarimetrické měření v oblasti modrého spektra.....	42
Obrázek 4.3.3: Polarimetrické měření v oblasti zeleného spektra.....	42
Obrázek 4.3.4: Polarimetrické měření v oblasti červeného spektra	42
Obrázek 4.4.1: Souhrnný graf pro ORD	43
Obrázek 4.4.2: Souhrnný graf pro CD z pohledu elipsometrie	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání jednotlivých chirálních metod.....29

Tabulka 2: Experimentální hodnoty α a Θ pro obě kyvety v různých oblastech spektra43

SEZNAM ZKRATEK

CD	Cirkulární dichroismus
ORD	Optická rotační disperze
RAO	Ramanova optická aktivita
UV	z angl. <i>Ultraviolet</i> ; Ultrafialová
VIS	z angl. <i>Visible</i> ; Viditelná
NIR	z angl. Near infrared; Blízká infračervená

ÚVOD

Pojetí symetrie fascinovalo lidstvo celá staletí. Symetrie okolního světa přitahovala nejen umělce, spisovatele a filozofy, ale i vědce. Je známo, že ve druhé polovině 18. století se povaze prostoru a symetrii jako první vážně věnoval německý filozof Immanuel Kant (1724–1804). Immanuel Kant se zabýval prostorovými shodami a neshodami lidského těla. Jako nanejvýš zřejmý příklad asymetrie lidského těla označil končetiny, konkrétně ruce. Popisoval, že ač jsou ruce velikostí a strukturou stejné, nejsou identické a nelze je překrývat, protože jsou k sobě zrcadlově otočené[1].

Na počátku 19. století, francouzský fyzik Étienne-Louis Malus (1775–1810) pochopil a popsal jednoduchý experiment, který ukazoval, že světlo má vlastnost zvanou polarizace. Zjistil, že se polarizace může měnit při interakci světla s materiálem. V první polovině 19. století se také objevily první elipsometry, přístroje k definování a pro analýzu polarizovaného světla. Nelze přesně zodpovědět, kdo elipsometrii vynalezl, nicméně pruský fyzik Heinrich Wilhelm Dove (1803–1879) sestavil v roce 1835 přístroj, který lze považovat za první elipsometr, protože obsahoval všechny potřebné komponenty pro studium polarizace⁷ světla. Elipsometrie hrála důležitou roli při řešení otázky, co je to světlo [3].

Kantovo vysvětlení, vztahující se k rukám, bylo klíčové pro zavedení pojmu chiralita¹, označující vlastnost asymetrie. Slovo chiralita vzniklo z řeckého *kheir*, což v překladu znamená ruka. To, že se chiralita projevuje nejen v makroskopických objektech, ale i na molekulární úrovni objevil francouzský chemik a biolog Louis Pasteur (1822–1895). Pro objev molekulární chiralitě měla velký význam práce francouzského fyzika Jeana-Baptiste Biot (1774–1882), který zjistil, že řada přírodních sloučenin, jako je sacharóza, terpentýnový olej, kyselina vinná nebo kafr, otáčí rovinu lineárně polarizovaného světla šířícího se v roztoku. Tedy, že se jedná o látky opticky aktivní. Biot položil základy polarimetrie [5],[13].

Začátkem roku 1848 zahájil Louis Pasteur výzkum v oblasti krystalografie přírodní kyseliny vinné a některých jejích solí (vinany). Chemická struktura kyseliny vinné v té době ještě známá nebyla, bylo pouze známo, že je opticky aktivní. Během studií Pasteur zkoumal také izomer známý jako kyselina parovinná, o které se vědělo, že je opticky neaktivní. Pasteur nejprve zjistil, že krystaly soli kyseliny vinné jsou hemiedrické, což znamenalo, že když si prohlížel krystaly konzistentním způsobem podle libovolné konvence, dvě hemiedrické fasety (zkosené plochy krystalu) se vyskytovaly pouze na levé straně vinnanových krystalů.

Když však zkoumal krystaly paravinanu, zjistil, že sůl krystalizuje jako směs dvou typů krystalů (tzv. racemát). Jeden z krystalů byl identický ke krystalu kyseliny vinné, druhý vykazoval také hemiedrické vlastnosti, ale v opačném směru. Tyto dvě krystalové formy si byly zrcadlovými obrazy (enantiomery⁶), které poté Pasteur od sebe oddělil a následně odděleně rozpustil, aby změřil jejich optickou aktivitu. Velikost otáčivosti byla u obou forem stejná, ale lišily se ve směru otáčení. Právě tyto poznatky Pasteura přivedly na myšlenku, že molekuly kyseliny vinné jsou chirální. Pasteurův objev umožnil další rozvoj v oblasti chemie, krystalografie a optiky.

V roce 1886 bylo zjištěno, že enantiomery mohou mít rozdílné vlastnosti. Italský chemik Arnaldo Piutti (1857–1928) vyizoloval z rostlin čistý D-asparagin, který měl intenzivně sladkou chuť na rozdíl, od již známého L-asparaginu, který byl bez chuti. Rozdíl v chuti enantiomerů aminokyseliny asparaginu byl milníkem prvního pozorování enantioselektivity na biologickém receptoru. Kolem roku 1900 se přišlo na to, že chirální molekuly jsou složkami velké části léčiv, vitamínů a drog přírodního původu. Mezi takové molekuly se řadily například tetrahydrokarabinol, digoxin, kokain nebo atropin. Chirální léčiva měla velký význam ve vývoji farmakoterapie.

Na přelomu 19. a 20. století bylo, díky rozvoji organické chemie, plno chemických struktur objasněno. Tento vývoj vedl ke zvyšující dostupnosti obou enantiomerních forem mnoha chirálních látek, což poté umožnilo provést studie, které porovnávaly jednotlivé enantiomery podle biochemického nebo farmakologického působení. Byly také nalezeny příklady enantioselektivní toxicity. V 60. letech 20. století se pro léčbu Parkinsonovy choroby při klinické zkoušce použila racemická směs. Brzy se však ukázalo, že je D-enantiomer léčiva 3,4-dihydroxyfenylalaninu (D-DOPA) toxický, a proto byl lék vyvinut jen v jedné formě enantiomeru L-DOPA [4],[5].

V roce 1960 nastal rozvoj v oblasti metod používajících polarizaci světla. Tyto metody jsou založeny na chiroptických² jevech, jako jsou optická rotační disperze⁸ (ORD) a cirkulární dichroismus⁹ (CD). ORD byla objevena již v 19. století, kdy francouzský fyzik Augustin-Jean Fresnel (1788–1827) a výše zmíněný Biot nezávisle na sobě uvedli, že se rotační síla opticky aktivní látky zvyšuje s klesající vlnovou délkou dopadajícího světla.

Měření optické rotační disperze byla provedena na několika vlnových délkách, avšak s vynálezem Bunsenova hořáku v roce 1866, se použití ORD v organické chemii pozastavilo. Plamen Bunsenova hořáku vytvářel totiž vhodný, téměř monochromatický, zdroj světla.

Po třiceti letech, zásluhou zejména anglického fyzikálního chemika Martina Lowryho (1874–1936), se vrátil zájem o vývoj a použití optické rotační disperze v organické chemii. Jev cirkulárního dichroismu byl popsán přibližně třicet let po objevení optické rotační disperze. Rakouský fyzik Wilhelm Karl von Haidinger (1795–1871) jako první rozpoznal rozdíl v absorpci dvou kruhových složek lineárně polarizovaného světla, na čemž je právě CD založený. Postupem let se zdokonalilo přístrojové vybavení, což mělo za následek četné aplikace technik ORD a CD pro řešení strukturních, konformačních a konfiguračních problémů v organické chemii, biochemii či medicíně [2].

V dnešní době se rozvíjí metody chiroptické spektroskopie, konkrétně vibrační cirkulární dichroismus, elektronový cirkulární dichroismus, fluorescenčně detekovaný cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita. Zmíněné metody poskytují unikátní strukturní informace o chirálních molekulách a molekulárních systémech, včetně reálných biotekutin, jako je krevní plazma a sérum. Zaměřují se hlavně na vývoj nových metod pro klinickou diagnostiku závažných neurodegenerativních (Alzheimerova nemoc), nádorových (karcinom slinivky břišní, jater, tlustého střeva) a metabolických onemocnění (diabetes typu I a II) na základě analýzy krevní plazmy či tkáňových vzorků [18].

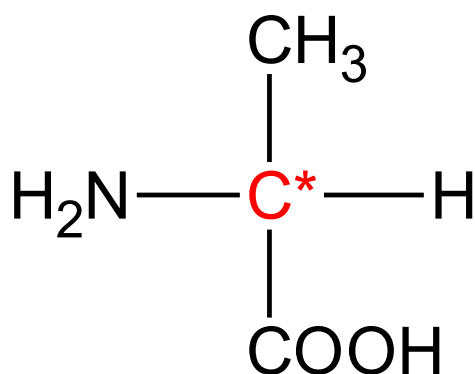
Chiralita, enantiomery, i s nimi spjaté metody, jsou dodnes zásadní v oblastech organické chemie, biochemie, medicíny, farmakologie, biologie nebo toxikologie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ENANTIOMERY V BIOCHEMII

Pro studium organických sloučenin živých soustav (biochemických molekul), jako jsou například aminokyseliny, z aminokyselin vzniklé proteiny, sacharidy či třeba nukleové kyseliny, je důležité znát nejen jejich funkce v živých organismech, ale i jejich strukturu. Ze struktury obvykle plyne i biochemický účinek dané sloučeniny.

Strukturálně se sloučeniny rozdělují na různé izomery³, což znamená, že mají stejný počet stejných atomů, ale liší se uspořádáním v molekule. Jedním z charakteristických znaků při rozpoznání, o jaký typ strukturního izomeru se jedná, je přítomnost asymetrického uhlíku. Asymetrický uhlík (Obrázek 1.1.1) je uhlík obvykle značený hvězdičkou, který má k sobě navázané 4 různé funkční skupiny. Říká se mu též asymetrické nebo chirální centrum, a může se jich na molekule vyskytovat více než jeden.

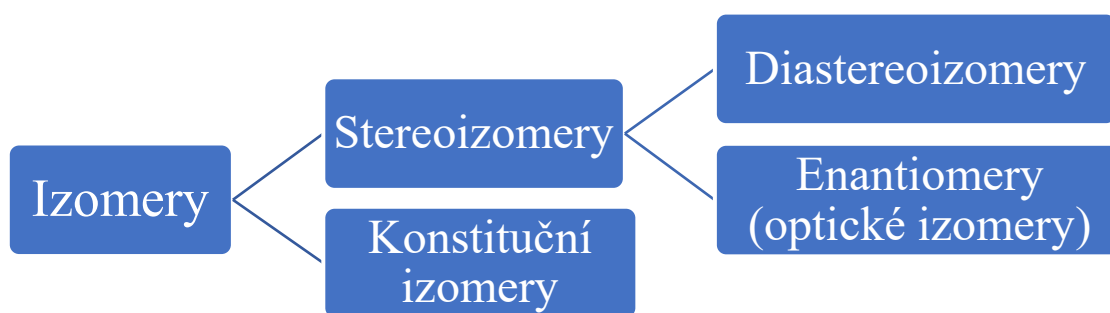


Obrázek 1.1.1: Asymetrický uhlík – červeně znázorněno centrum chiraloty, konkrétně strukturní vzorec aminokyseliny L-alaninu

Izomery se dále dělí na konstituční izomery a prostorové stereoizomery. Stereoizomery se poté ještě rozlišují na diastereoizomery⁵ a enantiomery. Diastereoizomery mají od sebe odlišné fyzikální vlastnosti, jako je například teplota tání, teplota varu nebo rozpustnost. Kdežto sloučeniny, které jsou si navzájem enantiomery mají stejnou teplotu varu, teplotu tání, index lomu, rozpustnost, reaktivitu, ale liší se svým biochemickým účinkem v organismu nebo třeba sensorickými vlastnostmi. Hlavním rozdílem ale je, že diastereoizomery se od sebe liší konfigurací na jednom nebo několika asymetrických centrech.

Stereoizomery, které se odlišují konfigurací na všech asymetrických centrech, jsou právě enantiomery. Přehledné rozdělení izomerů znázorňuje následující schéma (viz *Obrázek 1.1.2*).

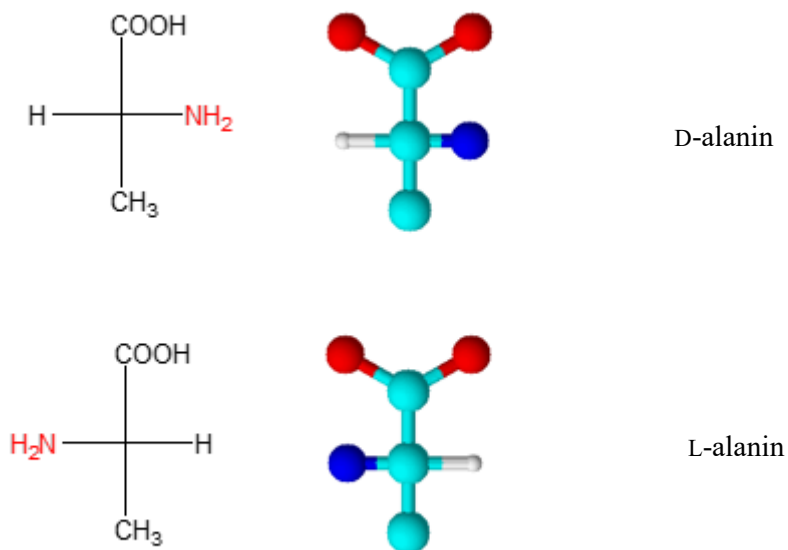
Enantiomery, též optické izomery, mají sumární i strukturální vzorec stejný, ale jsou si zrcadlovými obrazy. Jejich významnou fyzikální vlastností je, že dokážou stáčet rovinu polarizovaného světla doleva a doprava. Stáčí-li jeden enantiomer rovinu polarizovaného světla doleva, druhý enantiomer stáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel doprava. Důležitými enantiomery v biochemii jsou kupříkladu aminokyseliny, bílkoviny, sacharidy nebo vitamíny. Mezi enantiomery patří i zmíněná léčiva [6], [19].



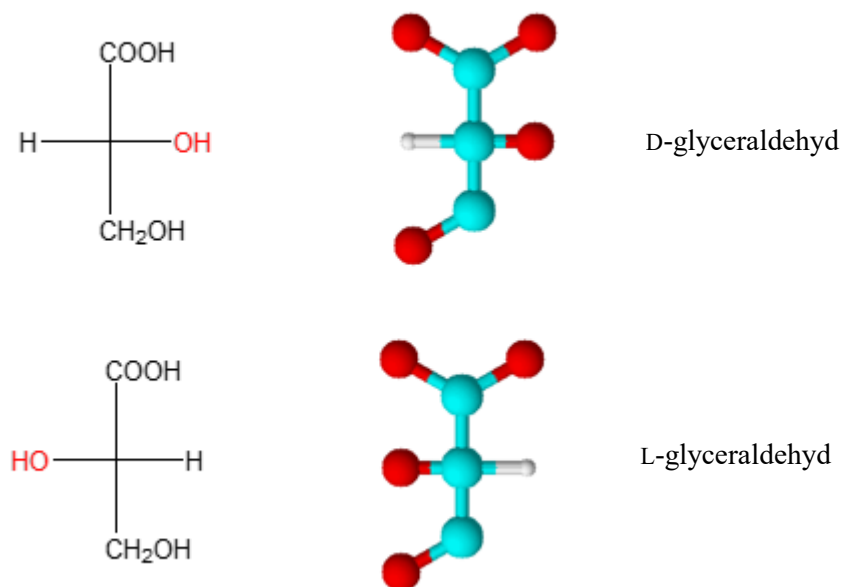
Obrázek 1.1.2: Schematické rozdělení izomerů

1.1.1 Značení enantiomerů

K popisu konfigurace hlavně aminokyselin, sacharidů nebo vitamínů, se v biochemii používá označení L (z latiny *laevus*, levý) a D (z latiny *dexter*, pravý) psané písmem zvaným kapitálka. Důvodem je, že ve Fischerově projekci se aminová skupina ($-NH_2$) L-aminokyselin vyskytuje vlevo, a u D-aminokyselin je aminoskupina vpravo, což je patrné i na obrázku (*Obrázek 1.1.3*). U sacharidů je to identické, akorát se sleduje orientace hydroxylové skupiny ($-OH$) na posledním chirálním centru (viz *Obrázek 1.1.4*). Fischerova projekce je způsob pro znázornění izomerie, kdy každé chirální centrum se značí jako průsečík dvou úseček (vazeb), přičemž vazby jdoucí vodorovně směřují před nákresnu, vazby jdoucí svisle směřují za nákresnu [6],[8]. Ve starší literatuře bývá uvedeno, že označení L/D indikuje směr otočení polarizovaného světla, ale není tomu tak. Například některé L-aminokyseliny jsou pravotočivé nebo D-fruktóza je levotočivá.



Obrázek 1.1.3: Enantiomery alaninu – na levé straně je znázornění Fischerovou projekcí s červeně zvýrazněnou aminovou skupinou určující orientaci aminokyseliny, na pravé straně je prostorové vyobrazení dané molekuly



Obrázek 1.1.4: Enantiomery glyceraldehydu – na levé straně je znázornění Fischerovou projekcí s červeně zvýrazněnou hydroxylovou skupinou určující orientaci monosacharidu, na pravé straně je prostorové vyobrazení dané molekuly

V roce 1969 byl zaveden další systém na rozlišení enantiomerů, tzv. systém R/S pro popsání absolutní konfigurace na asymetrickém uhlíku. Zavedli jej R. S. Cahn (1899-1981), Ch. K. Ingold (1893-1970) a V. Prelog (1906-1998). V první řadě se musela určit posloupnost důležitosti substituentů, které byly navázány na asymetrickém centru. Pořadí priority souvisí s atomovými čísly prvků navázaných na asymetrickém centru, čím vyšší atomové číslo, tím vyšší prioritita. Pokud jsou atomová čísla stejná, berou se v úvahu atomová čísla dalších prvků na navázaných substituentech. V dalším kroku je třeba nalézt nejdůležitější navázaný substituent a určit, kterým směrem je třeba otočit molekulu kolem vazby mezi asymetrickým uhlíkem a atomem vodíku od tohoto substituentu k druhému nejdůležitějšímu substituentu. Je-li to doprava, tedy ve směru hodinových ručiček, jedná se o R-enantiomer (z latinského *rectus*, přímo, používá se i překlad vpravo). Pokud je směr otočení, proti směru hodinových ručiček, je to S-enantiomer (z latinského *sinister*, vlevo). Označení R/S taktéž nesouvisí s otáčením roviny polarizovaného světla [6], [9].

1.1.2 Význam enantiomerů

Jak už bylo uvedeno, enantiomery se od sebe liší tím, že jsou si navzájem zrcadlové obrazy. Tento jev může způsobovat jejich odlišný biochemický účinek nebo například různou vůni, některé z forem enantiomerů mohou být pro člověka dokonce až život ohrožující. V biologických systémech je důležité, aby se tvar dané biomolekuly přizpůsobil tvaru molekulám jiným, aby k sobě byly jako zámek a klíč. Taková shoda je důležitá hlavně pro enzymaticky řízené reakce, genovou regulaci či buněčnou komunikaci. Jeden optický izomer (enantiomer) může usnadnit biochemickou reakci, druhý třeba nebude mít žádný účinek nebo může mít účinek úplně jiný [19].

V lidském těle se vyskytují jak L-aminokyseliny, tak i D-aminokyseliny. Většinou z L-aminokyselin se skládají proteiny, D-aminokyseliny souvisí s neurotransmisí. Přítomnost D-aminokyselin v lidském těle je spojena s některými nemocemi, jako je zejména schizofrenie, ateroskleróza nebo amyotrofická laterální skleróza. Na druhé straně, plno důkazů podporuje roli D-aminokyselin ve vývoji, patofyziologii a léčbě rakoviny [20].

Pokud se jedná o sacharidy, tak D-sacharidy jsou v přírodě běžnější než L-sacharidy. Některé klinické studie popisují D-sacharidy jako kalorické, stojící za vznikem zubního kazu, na rozdíl od L-sacharidů. Některé studie tvrdí, že L-sacharidy by mohly být využity jako náhražka sacharózy, protože mají taky sladkou chuť [15].

Příklady enantiomerů s odlišnými vlastnostmi jsou L-askorbová kyselina (vitamin C) je pro tělo důležitý antioxidant, D-askorbová kyselina je biologicky neúčinná. *S*-limonen voní jako citron, *R*-limonen jako pomeranč [6].

Veliký důraz na rozdíl forem enantiomerů se klade ve farmaceutickém průmyslu při studiu léčiv. U mnoha léků závisí jejich prospěšný účinek právě na shodě mezi tvarem molekuly léčiva a cílové molekuly na povrchu buňky v lidském organismu. U léčiv může nastat velký problém při špatném určení formy enantiomeru, jeden enantiomer může být účinný, druhý nikoliv, jeho účinek může být v horším případě škodlivý. Použitím škodlivého enantiomeru léčiva je známá tzv. Thalidomidová aféra z konce 50. let minulého století. Thalidomid byl volně dostupný lék, který měl mírnit ranní nevolnosti těhotných žen. Později se však zjistilo, že vinou farmaceutického omylu, byl ženám podáván teratogenní enantiomer léčiva, což způsobilo, že narozené děti neměly prsty, nebo se rodily bez celých končetin, s deformací vnitřních orgánů. Nebylo zřejmé, jestli se v těle nekonvertuje enantiomer s prospěšným účinkem na enantiomer škodlivý, proto byl lék zakázán. Dnes musí farmaceutické společnosti testovat oba enantiomery před jejich uvedením na trh [5], [6].

1.2 CHIROPTICKÉ JEVY JAKO NÁSTROJ ROZLIŠENÍ ENANTIOMERŮ

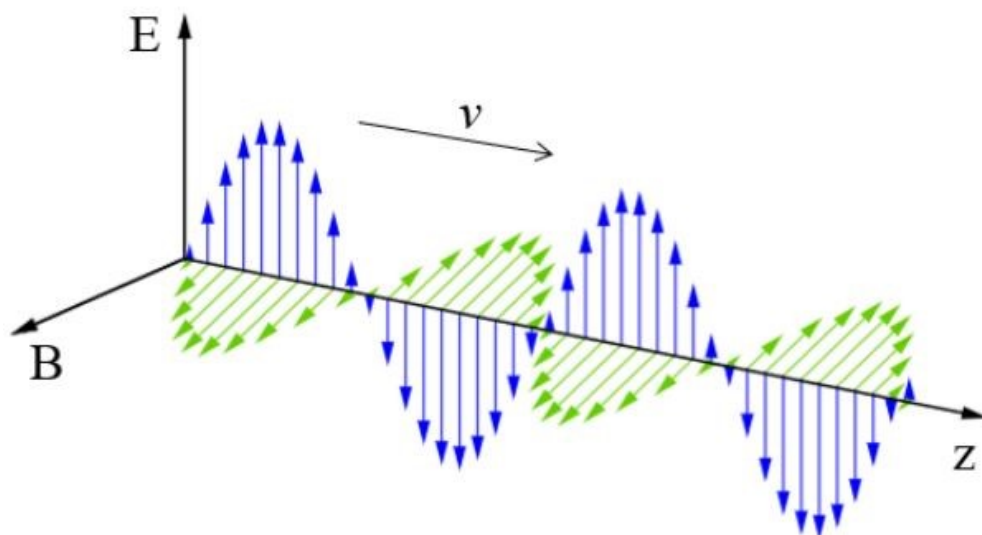
Chiroptické jevy jsou optické vlastnosti, které se mohou studovat u opticky aktivních látek v přítomnosti polarizovaného světla. Mezi často studované chiroptické jevy se řadí optická rotační disperze (ORD) a cirkulární dichroismus (CD).

Pro snazší představu a rychlejší pochopení je tedy třeba začít vysvětlením základních pojmů, jako jsou polarizace světla a opticky aktivní látky.

1.2.1 Polarizace světla

Jedním z největších objevů v celé historii optiky byl poznatek, že světlo je elektromagnetické vlnění. V roce 1865 anglický fyzik James Clerk Maxwell (1831–1879) zformuloval rovnice popisující elektrické a magnetické jevy. Ukázal, že z nich plyne existence elektromagnetických vln a navrhl, že k nim patří i světlo. Tvrdil, že měnící se elektrické pole, vyvolává magnetické pole a naopak.

Německý fyzik Heinrich Hertz (1857–1894) provedl experimentální prokázání elektromagnetických vln a jejich vlastností shodných s vlastnostmi světla. Potvrdil tím vlnovou teorii světla. Světelné záření je tedy elektromagnetické vlnění určené vektorem intenzity elektrického pole \vec{E} a vektorem magnetické indukce \vec{B} (viz Obrázek 1.2.1) [7], [13].

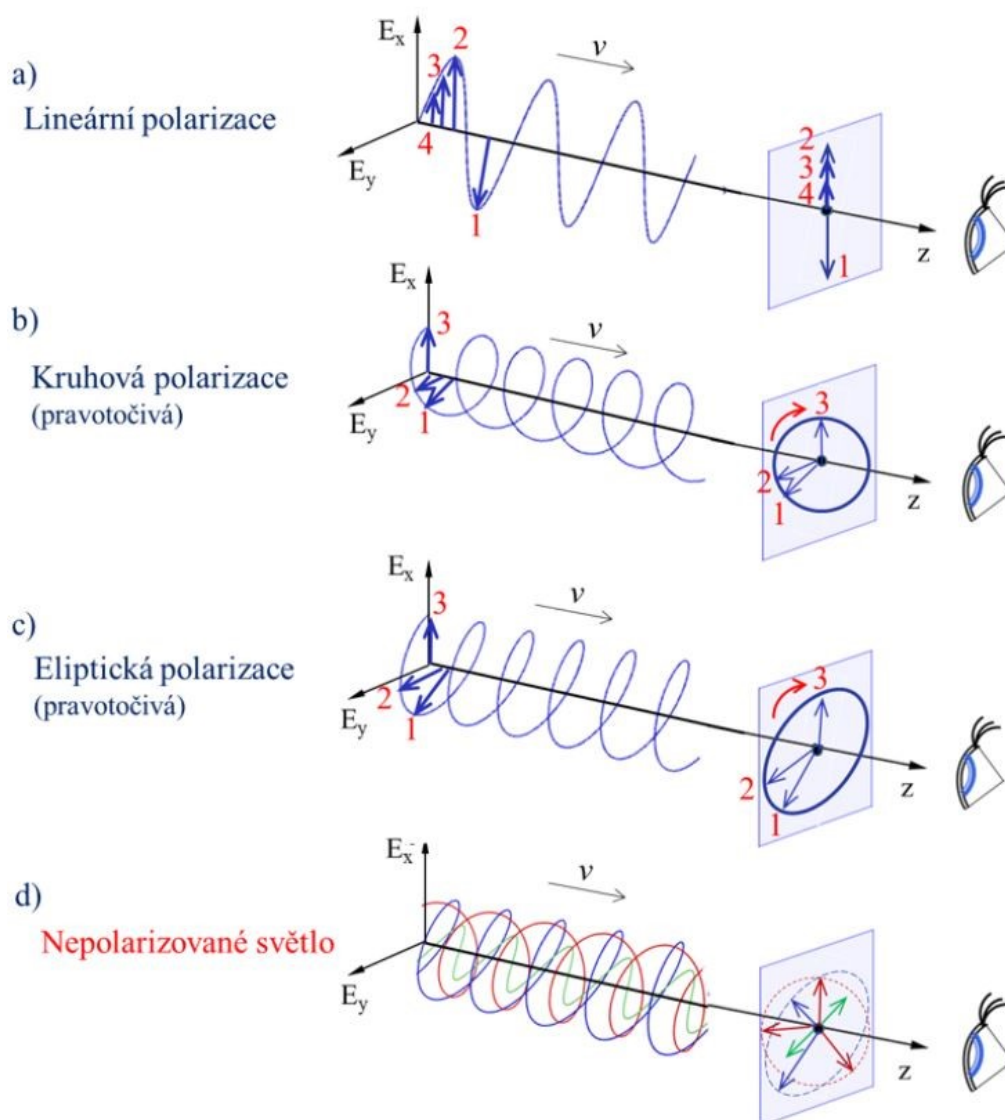


Obrázek 1.2.1: Elektromagnetická vlna – rozložení magnetického a elektrického pole podél směru šíření vlny, vektory elektrické intenzity \vec{E} (modrá část) a magnetické indukce \vec{B} (zelená část) jsou v každém bodě kolmé na směr šíření vlny. Převzato z [7].

Většinou se pro popis chování světla uvažuje elektrická složka elektromagnetické vlny. Vektor magnetického pole lze vypočítat pomocí Maxwellových rovnic, a navíc také při zkoumání světelných interakcí s látkou v optických frekvencích hraje magnetické pole méně důležitou roli.

Přirozené světlo je příčné vlnění, u kterého kmity polních veličin mění velmi rychle a nepravidelně svůj směr, říká se mu též světlo nepolarizované. Na rozdíl tomu pravidelné označení kmitů se označuje jako polarizace. Polarizaci světla objevil v roce 1808 francouzský fyzik Étienne-Louis Malus (1775–1810). Polarizační stav se při interakci s látkou může změnit, umíme-li tuto změnu určit, můžeme danou látku lépe popsat. To je základem některých optických charakterizačních metod, jako je polarimetrie, elipsometrie nebo cirkulární dichroismus.

Existují různé druhy polarizace světla, mezi základní patří lineární, kruhová a eliptická polarizace (viz *Obrázek 1.2.2*). Prochází-li lineárně polarizovaná elektromagnetická vlna pomyslnou pozorovací rovinou (umístěnou kolmo na směr šíření), koncový bod vektoru elektrické intenzity \vec{E} v této rovině kmitá v jedné linii a nemění svůj směr. Opisuje-li koncový bod vektoru elektrické intenzity \vec{E} spirálu, v pozorovací rovině se průchodem světelné vlny zobrazí kružnice. Takové světelné vlně se říká kruhově polarizovaná. Posledním zmíněným druhem je eliptická polarizace, která je blízká té kruhové. Akorát zde platí, že koncový bod vektoru elektrické intenzity \vec{E} opisuje v pozorovací rovině elipsu, jejíž natočení a velikost poloos může být libovolné [7], [11], [14], [16], [17].



Obrázek 1.2.2: Druhy polarizace – a) lineárně polarizovaná světelná vlna – kmitů vektoru \vec{E} se realizují pouze v jedné rovině procházející paprskem světla; b) kruhově polarizovaná světelná vlna – vektor \vec{E} se otáčí směrem šíření vlny a každým cyklem vlny opisuje kruh; c) elipticky polarizovaná světelná vlna – koncový bod vektoru \vec{E} opisuje elipsu; d) nepolarizované světlo – nevykazuje žádnou pravidelnost v prostorovém rozložení kmitů vektorů elektrického pole. Převzato z [7].

1.2.2 Opticky aktivní látky

Předměty, které se neztotožňují se svým zrcadlovým odrazem se nazývají chirální. Pojem chiralita je někdy chápán jako synonymum pro optickou aktivitu. Chiralita je však znak strukturní symetrie molekuly a optická aktivita je jejím projevem.

Většina biologických molekul či systémů jsou opticky aktivní. Znamená to, že stáčí rovinu polarizovaného světla. Otáčí-li se rovina polarizovaného světla po směru hodinových ručiček, nazývá se pravotočivá. Pokud se stáčí proti směru hodinových ručiček, je levotočivá.

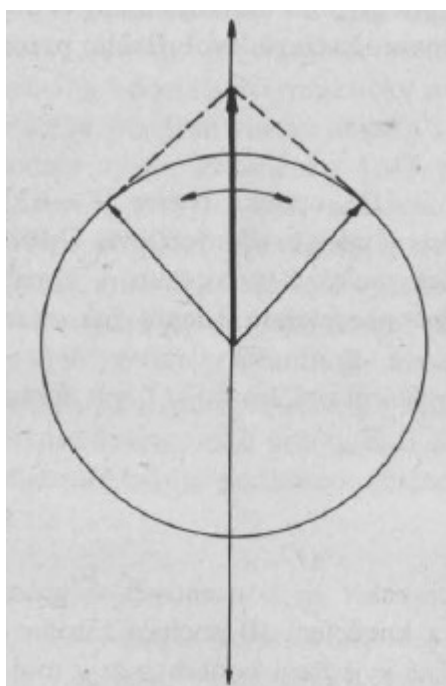
Směs stejného množství pravotočivé a levotočivé látky se nazývá racemát, což je látka opticky neaktivní, tudíž nestáčí polarizační rovinu světla.

Optická aktivita je pozorována v průhledných chirálních materiálech. Jak se médiem šíří světlo, působí stočení směru lineární polarizace. Mezi opticky aktivní látky v biochemii se řadí sacharidy, proteiny, aminokyseliny, vitamíny, léčiva a další [12], [14], [16].

1.2.3 Optická rotační disperze (ORD)

Pro lepší orientaci v problematice chiroptických jevů, je třeba uvést základní myšlenky, které budou užitečné pro experimentální část. Klíčové je, představit si, že lineárně polarizované světlo se skládá ze dvou kruhově polarizovaných světelných vln, které reprezentují stejně velké, ale opačně orientované vektory. V achirálním prostředí (na vzduchu) se oba vektory skládají v jediný, který leží v původní rovině (viz

Obrázek 1.2.3).



Obrázek 1.2.3: Představa lineárně polarizovaného světla, jako složení dvou kruhově polarizovaných světelných vln, které jsou opačně orientované. Převzato z [25].

Při průchodu chirálním prostředím (např. roztok glukózy) bude rotace vektorů vykazovat vzájemný fázový posun vzhledem k rozdílnému indexu lomu, a tedy rozdílné rychlosti šíření pro pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované světlo.

Vlivem tohoto fázového rozdílu dochází k otáčení polarizační roviny. Na výstupu ze vzorku je polarizační rovina stočená o určitý úhel α .

Matematicky lze ORD vyjádřit pomocí rovnice:

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda_0} \cdot (n_L - n_R) = \frac{\pi}{\lambda_0} \cdot \Delta n \quad (1)$$

kdy α je velikost úhlu stočení roviny polarizovaného světla [*rad*], λ_0 je vlnová délka lineárně polarizovaného světla [*nm*], $n_{L,R}$ je index lomu pro levotočivé nebo pravotočivé kruhově polarizované světlo.

Měření úhlu α je založeno na principu polarimetrie, co se běžně provádí v laboratoři. Světlo ze zdroje prochází monochromátorem, polarizátorem, vzorkem, analyzátozem a dopadá na fotonásobič, kde dochází k detekci periodického fotoelektrického signálu. Křivka optické rotační disperze je záznamem úhlu stočení roviny polarizovaného světla α po průchodu opticky aktivní látkou v závislosti na vlnové délce tohoto světla. Úhel stočení α je označován jako pozitivní (negativní), je-li rovina polarizace stočena ve směru (proti směru) hodinových ručiček, pokud je pozorován efekt proti směru šíření světla dané vlnové délky.

Protože optická rotační disperze vzniká rozdílem indexů lomů jednotlivých kruhově polarizovaných vln, je také označována jako cirkulární dvojlom (birefringence¹⁰). Cirkulární dvojlom je tedy příčinou optické rotace, a je pozorovatelný při libovolné vlnové délce polarizovaného světla [22],[24],[25].

1.2.4 Cirkulární dichroismus (CD)

Tato metoda je založena na rozdílných absorpčních vlastnostech chirální molekuly vzhledem k pravotočivému či levotočivému kruhově polarizovanému záření. Při přesnějším pozorování se zjistilo, že se opačně orientované vektory kruhově polarizovaného světla absorpcí nesterjně zmenšují. Svým složením neposkytnou přesné lineárně polarizované světlo, ale elipticky polarizované světlo, jehož úhel Θ (elipticita) závisí na rozdílné absorpci, respektive rozdílu extinkčních koeficientů ϵ pravotočivého či levotočivého kruhově polarizovaného světla.

Cirkulární dichroismus je poté definovaný pomocí rovnic:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R. \quad (2)$$

Pokud není známa molekulová hmotnost nebo optická čistota studované látky, vyjadřuje se CD spektrum pomocí rozdílové absorbance

$$\Delta A = A_L - A_R. \quad (3)$$

Z rozdílové absorpance tedy platí, že

$$\Delta A = A_L - A_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l \quad (4)$$

kdy ΔA je rozdíl absorpancí, $A_{L,R}$ jsou absorpance levotočivého nebo pravotočivého cirkulárně polarizovaného záření, $\varepsilon_{L,R}$ jsou příslušné molární absorpční koeficienty [$dm^3/mol \cdot cm$], c je molární koncentrace látky [mol/dm^3] a l je délka optické dráhy v roztoku [cm].

CD se standardně měří pomocí dichrometru, kdy se levotočivý kruhově polarizovaný paprsek a pravotočivý kruhově polarizovaný paprsek, periodicky připravený fotoelastickým modulátorem, nechá procházet studovaným prostředím. Z detekovaného signálu potom lze určit rozdíl absorpancí příslušný levotočivému cirkulárně polarizovanému paprsku světla a pravotočivému cirkulárně polarizovanému paprsku světla, tedy lze určit CD.

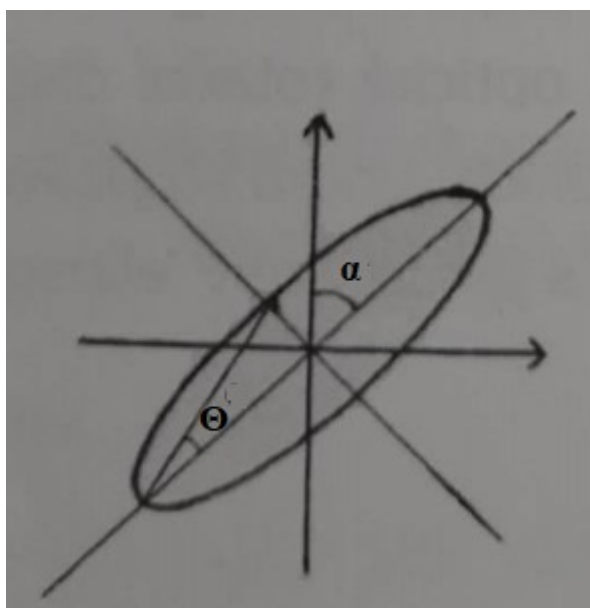
Měření cirkulárního dichroismu je univerzální metodou pro studium struktur biologických molekul. Analýza CD spektra ve vzdálené UV oblasti (180–240 nm) podává například informace o sekundární struktuře proteinů, jako je α -helix a β -skládaný list. CD spektrum v blízké UV oblasti charakterizuje postranní řetězce aromatických kyselin, tudíž dokáže podávat informace o terciární struktuře proteinů [10],[22],[23],[24],[25].

1.2.5 Souvislost ORD a CD

U těchto chiroptických jevů platí, že pokud projde původně lineárně polarizované světlo opticky aktivním prostředím, jeho polarizační stav se na výstupu obecně změní na elipticky polarizované, jak tuto představu reprezentuje *Obrázek 1.2.4*. Změna polarizace se charakterizuje pomocí dvou úhlů – elipticity Θ u CD a azimutu α u ORD.

Sleduje-li se současně závislost velikosti CD a ORD na vlnové délce měrného záření, je pozorován v prvním případě uvnitř oblasti absorpce studované chirální molekuly pozitivní nebo negativní rozdíl absorpancí vlevo a vpravo kruhově polarizovaného světla. V druhém případě je pozorován mimo oblast absorpce pozitivní (negativní) monotónně klesající (rostoucí) hodnoty úhlu stočení roviny lineárně polarizovaného světla. Tyto jevy se společně nazývají Cottonův efekt. Oba chiroptické jevy se mohou spojit i matematicky prostřednictvím Kramers- Kronigových relací, které v optice ukazují například vztah mezi reálnou a imaginární složkou indexu lomu, jejichž explicitní tvar lze nalézt kupříkladu zde [22].

Při aplikacích v biochemii bývá optická rotační disperze, co do absolutní hodnoty, až řádově větší v porovnání s cirkulárním dichroismem. Aplikace ORD vyplývají z nedostatků CD spektroskopie, monotónní část křivky optické rotační disperze může být pozorována v libovolném intervalu vlnových délek. Z ORD lze získat informaci o znaménku Cottonových efektů, které jsou z přístrojových důvodů nepřístupné pro CD. Cirkulární dichroismus je však výrazně spektrálně lokalizován, a tím pádem i snadněji interpretován. Právě proto se v praxi používá především CD [22],[23],[24],[25].



Obrázek 1.2.4: Zakreslení úhlů – elipticita v CD (Θ) a azimut v ORD (α). Převzato z [23] a upraveno.

1.3 DALŠÍ METODY PRO STUDIUM ENANTIOMERŮ

Mezi metody, které jsou schopné rozlišit zmíněnou symetrii enantiomerů v biochemii (tzv. chirální metody) patří polarimetrie, rentgenová strukturní analýza, Ramanova optická aktivita (ROA), spektroskopická elipsometrie, optická rotační disperze (ORD), cirkulární dichroismus (CD). Metodám ORD a CD jsou věnovány samostatné kapitoly. Srovnání jednotlivých chirálních metod je zaznamenáno v tabulce (*Tabulka 1*).

Chirální látky lze studovat i metodami achirálními, jako jsou transientní absorpční spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a separační metody. Achirální metody nedokáží určit jednotlivé enantiomery ani stanovit jejich absolutní konfiguraci, proto nebudou v této práci dále rozebírány.

1.3.1 Polarimetrie

Tato metoda je založena na měření úhlu otočení roviny lineárně polarizovaného světla při průchodu transparentním roztokem vzorku. Velikost rotace je lineárně závislá na délce kyvety, koncentraci roztoku a tzv. specifické otáčivosti. Specifická otáčivost je konstantou pro každou opticky aktivní látku při dané teplotě a vlnové délce elektromagnetického záření. U chirálních látek vlivem rozdílných indexů lomů polarizovaného světla dochází k fázovému posunu a na výstupu ze vzorku je polarizační rovina stočená o určitý úhel [10].

1.3.2 Rentgenová strukturní analýza

V krystalické fázi má zásadní postavení při určení molekulární struktury právě rentgenová strukturní analýza. Spektra enantiomerně spřažených krystalických fází dvou enantiomerů chirální molekuly jsou ovšem totožná. Výsledný difrakční obrazec vzniklý interferencí difraktovaných vln rentgenového záření na atomech v krystalické mřížce závisí pouze na vzdálenosti těchto atomů. Jednotlivé enantiomery jsou izometrické, proto nedochází k rozdílné difrakci na krystalech [10].

1.3.3 Ramanova optická aktivita (RAO)

Ramanova optická aktivita je technikou diferenční spektroskopie, která při rozptýlu světla měří rozdíl v odezvě chirální molekuly vůči pravotočivě nebo levotočivě kruhově polarizovanému záření. Rozptýlené světlo obsahuje velmi slabou složku s kruhovou polarizací. Jedná se o významnou spektroskopickou techniku použitelnou u chirálních vzorků od jednoduchých molekul až po viry. RAO slouží také ke sledování čistoty enantiomerů, což může být významné pro farmaceutický průmysl [21].

1.3.4 Spektroskopická elipsometrie

Tato optická metoda je založená na měření změny polarizace světla při jeho interakci s látkou (při odrazu od povrchu, případně průchodu vzorkem). Nelze ji přímo použít pro rozlišení jednotlivých enantiomerů, ale může se aplikovat při studiu výše zmíněných chiroptických jevů – optické rotační disperze (ORD) a cirkulárního dichroismu (CD). Standardně se tato metoda používá pro charakterizaci bulkových a nanostrukturovaných pevných látek [23].

Tabulka 1: Srovnání jednotlivých chirálních metod

METODA	VÝHODY	NEVÝHODY
Polarimetrie	specifická, jednoduché měření, rychlá, levná	nízká citlivost a tolerance vůči nečistotám, velký objem vzorku
Rentgenová strukturní analýza	možný zisk kompletní 3D struktury, změnou rozpuštědla možná jiná forma krystalizace	pouze pro krystalizující analyty, nemožné zkoumání chování molekul v roztoku, nelze sledovat pohyb, nelze přímo určit sekundární struktury
Ramanova optická aktivita	vysoká citlivost pro 3D strukturu, jednoduché měření, neomezená velikost biomolekul	nutnost vysoce koncentrovaných roztoků, dlouhá doba měření, vysoké náklady
Spektroskopická elipsometrie	vysoká přesnost, rychlé nedestruktivní měření, široká oblast použití	komplikovaná analýza dat, nízké prostorové rozlišení, nezbytnost optického modelu při analýze dat

2 CÍL PRÁCE

Záměrem této práce je vysvětlit, co jsou to enantiomery v biochemii a zdůvodnit, proč studium jejich forem je pro člověka, potažmo živé organismy důležité. Stručně řečeno, tato bakalářská práce se snaží ukázat spojení biochemické komunity s tou optickou. Dále se tato bakalářská práce věnuje poznatkům v oblasti chiroptických jevů, posuzuje, zda metoda elipsometrie, běžně využívaná pro charakterizaci nanomateriálů, může být použita i pro studium chiroptických jevů – optické rotační disperze a cirkulárního dichroismu. Tento segment je blíže popsán v experimentální části s použitím nasyceného roztoku sacharózy.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 STUDOVANÉ VZORKY

Pro tento experiment byl použit cukerný roztok, což je nejdostupnější opticky aktivní prostředí, díky kterému se spolehlivě stáčí rovina polarizovaného světla, což je pro tento experiment podstatné. Dále je výhodou, že se vzorek nemusí dále upravovat.

Rozpuštěním běžného krystalového cukru v destilované vodě jsem si připravila nasycený roztok. Roztokem jsem naplnila dvě vyčištěné skleněné kyvety, jednu o délce 20 cm a druhou dlouhou 10 cm. Cukerný roztok v kyvetách byl nejprve proměřen na spektroskopickém elipsometru, a poté na polarimetru.



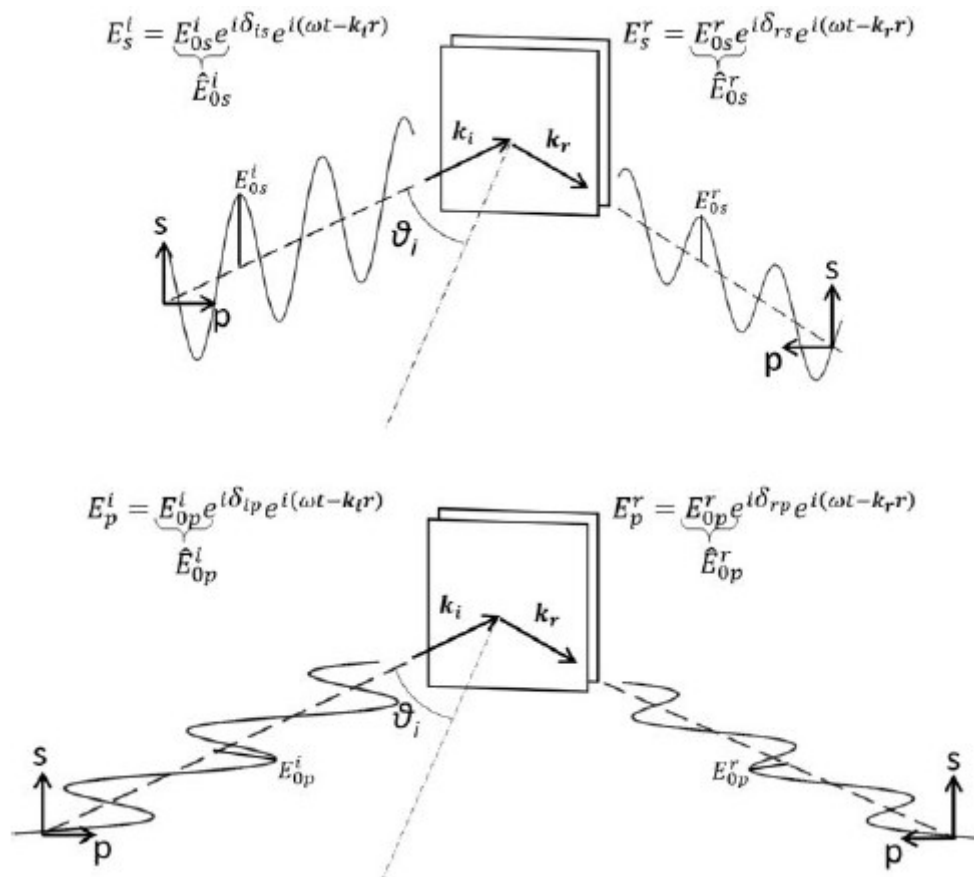
Obrázek 3.1.1: Skleněné kyvety naplněné cukerným roztokem

3.2 POUŽITÉ METODY

3.2.1 Spektroskopická elipsometrie

Elipsometrie je optická metoda, která měří parametry elipticky polarizovaného světla odraženého od vzorku. Na vzorek dopadá lineárně polarizované světlo, které je po odrazu obecně elipticky polarizované. Změnu polarizace lze pomocí adekvátních modelů svázat s optickými a geometrickými vlastnostmi studovaného vzorku. Z hlediska optiky je změna polarizace podle definice vyjádřena poměrem koeficientů odrazu. Při šikmém dopadu se rozlišují reflexní nebo transmisní koeficienty odrazu r_s a r_p pro s-vlnu a p-vlnu. S-vlna je lineárně polarizovaná s kolmým vektorem elektrického pole \vec{E} na rovinu dopadu. P-vlna je lineárně polarizovaná vlna s vektorem elektrického pole \vec{E} rovnoběžným s rovinou dopadu.

Když se s-vlna a p-vlna odrazí od opticky izotropního vzorku, zůstanou zvlášť polarizované, ale jejich amplituda a fáze se změní v důsledku interakce světla se vzorkem, což znázorňuje Obrázek 3.2.1.



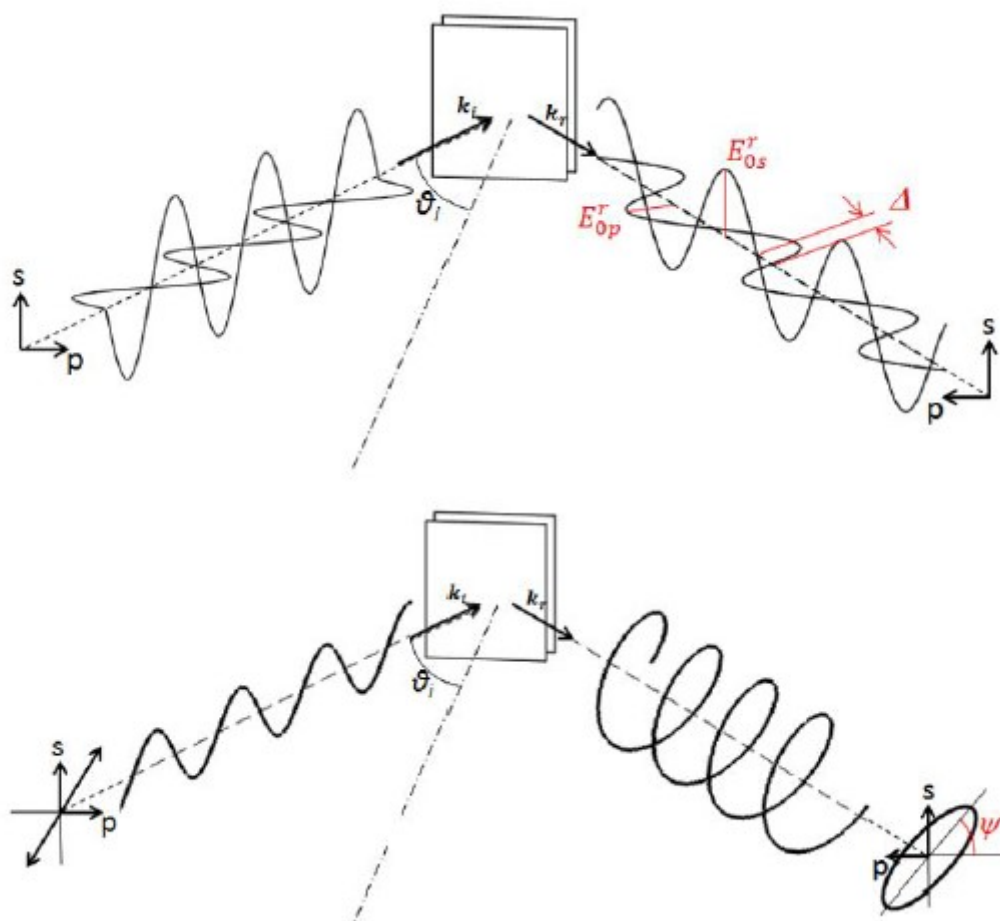
Obrázek 3.2.1: Zobrazení polarizované s-vlny a p-vlny při odrazu od opticky izotropního vzorku. Převzato z [26].

3.2.1.1 Elipsometrické veličiny

Z hlediska geometrie se pro popis elipsometrie také volí dva úhly (Δ, Ψ), které jsou definovány přes poměr výše zmíněných reflexních nebo transmisních koeficientů r_s a r_p . Tento jev lze také vyjádřit vztahem

$$\frac{r_p}{r_s} = \operatorname{tg} \Psi \cdot e^{i\Delta} \quad (5)$$

kdy r_s a r_p jsou koeficienty odrazu. V případě transmisního měření ve vztahu (6) vystupují místo koeficientů odrazu, koeficienty propustnosti. Potom Ψ [°] je úhel udávající poměr amplitud kmitů komponent v rovině prošlé vlny a Δ [°] je úhel roven jejich fázovému zpoždění.



Obrázek 3.2.2: Geometrický význam elipsometrických veličin (Ψ, Δ). Převzato z [26].

Jak poukazuje *Obrázek 3.2.2*, odrazí-li se světlo od povrchu vzorku s- a p-komponenty se změni ve svých amplitudách a fázích. Výsledkem je, jak už bylo zmíněno, že odražená vlna se všeobecně elipticky polarizuje. Podobná situace je i v případě prošlé vlny.

Výše zmíněné koeficienty odrazu ovlivňuje samotná vnitřní struktura vzorku do hloubky, které světlo dosahuje průnikem pod jeho povrch, a také optické vlastnosti materiálů, které se na dané interakci podílejí. Proto experimentálně stanovené elipsometrické parametry mohou poskytovat informace o geometrii vzorku a jeho optických vlastnostech v daném spektrálním rozsahu. V případě transmise je světlo ovlivněno celým objemem studovaného vzorku [23], [26].

3.2.1.2 Spektroskopický elipsometr

Elipsometr je přístroj měřící změnu polarizačního stavu světla, která nastává při jeho interakci se vzorkem a následně určí jeho optické vlastnosti. S tím souvisí i to, že v určitém spektrálním rozmezí lze proměřit nejen optickou propustnost materiálu, ale i elipsometrické parametry (Ψ a Δ), a tím pádem určit i geometrické vlastnosti vzorku.

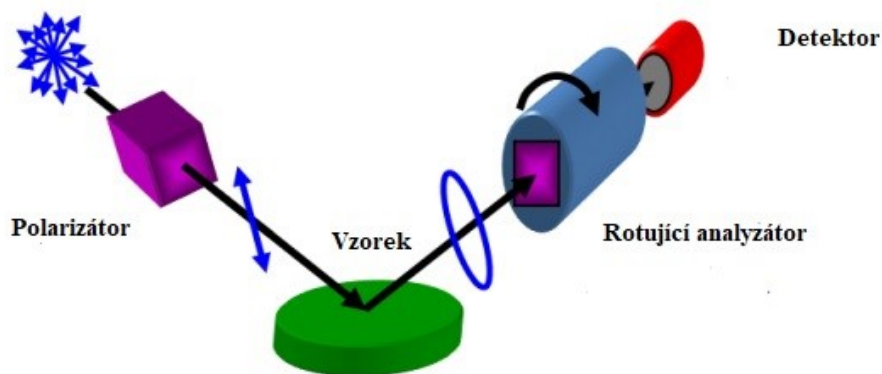
Principiálně lze spektroskopický elipsometr použít i pro studium chiroptických jevů (ORD a CD). Podrobným rozbořem zavedených úhlů pro popis chiroptických jevů (α , Θ) a úhlů v elipsometrii (Ψ , Δ) lze odvodit následující převodní relace [22].

$$\operatorname{tg} 2\alpha = \operatorname{tg} 2\Psi \cdot \cos \Delta \quad (7)$$

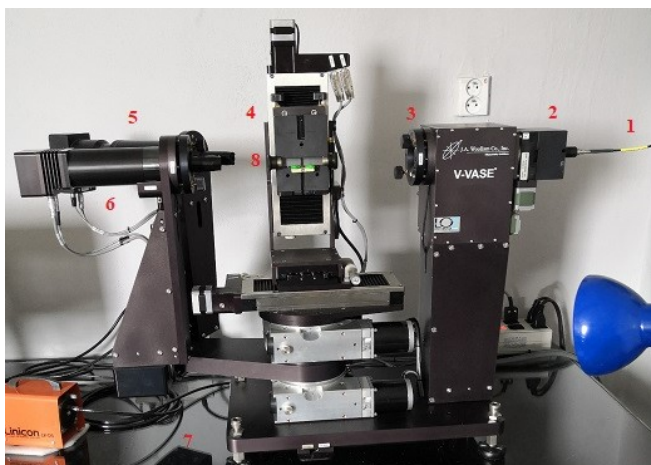
$$\operatorname{tg} 2\theta = \sin 2\Psi \cdot \sin \Delta \quad (8)$$

V tomto případě se proměřily elipsometrické úhly Ψ a Δ , které se podle výše uvedených vztahů přepočítali na azimut α pro ORD a elipticitu Θ pro CD.

V této práci byl použit spektroskopický elipsometr VASE (Woolam, CO. Ltd), založený na metodě rotujícího analyzátoru (viz *Obrázek 3.2.3*, *Obrázek 3.2.4* a *Obrázek 3.2.5*).



Obrázek 3.2.3: Schéma spektroskopického elipsometru s rotujícím analyzátořem. Převzato z [27] a upraveno.



Obrázek 3.2.5: Spektroskopický elipsometr VASE (Woolam Ltd.) – 1-optické vlákno, 2-kompenzátor, 3-4 zónový detektor, 4-držák vzorků, 5- fotonásobič, 6-detektor, 7-goniometr, 8-kyveta s cukerným roztokem



Obrázek 3.2.4: Spektroskopický elipsometr VASE (Woolam Ltd.) – 9-monochromátor, 10-řídící jednotka

Jako zdroj světla se u tohoto elipsometru používá xenonová výbojka, z které vychází polychromatické světlo soustředěné na vstupní šterbinu monochromátoru. Spektrálně rozložený svazek je navázaný do optického vlákna a následně navedený do vstupní jednotky, která obsahuje kompenzátor a polarizátor. Díky těmto komponentám se může nastavit požadovaný polarizační stav světla zaostřeného na zkoumaný vzorek. Do detekční jednotky, která zahrnuje rotující analyzátor a detektor, vstupuje odražený svazek. Aby elipsometr byl schopen proměřit široké spektrální rozmezí, je vybavený třemi detektory, a to fotonásobičem pro oblast UV, Si-diodou pro oblast VIS a detektorem InGaAs pro oblast NIR. Pro uchycení vzorku slouží vertikální stůl, který je umístěn na přímém motorizovaném goniometru. Ovládání elipsometru se shromažďováním dat je plně automatizované. Pro vyhodnocení naměřených dat je k dispozici komerční software WVASE32 [23], [26].

3.2.2 Polarimetrie

V této práci je použita metoda polarimetrie pro srovnání s elipsometrií ve vztahu k chiroptickým jevům. Polarimetrie je nejstarší a nejrozšířenější metoda pro stanovení čistoty enantiomerů. Jedná se o kvalitativní a kvantitativní optickou metodu, která je založená na měření úhlu otočení roviny polarizovaného světla. Dochází k tomu při průchodu světla přes polarizátor u roztoků chemických sloučenin, které obsahují asymetrický uhlík. Polarimetrie se tedy využívá ke studiu opticky aktivních látek. V praxi například ke kontrole čistoty směsí různých chemických agens, stanovení koncentrace sacharidů v cukrovarnictví, v medicíně ke stanovení cukru v moči a v biochemii třeba ke stanovení bílkovin a vitamínů.

3.2.2.1 Polarimetr

Pro studium stočení roviny kmitů lineárně polarizovaného světla procházejícího roztokem opticky aktivní látky se používá přístroj zvaný polarimetr. V této práci byl použit polarimetr PAX1000 (THORLABS) viz *Obrázek 3.2.6*.



Obrázek 3.2.6: Polarimetr PAX1000 (THORLABS) – 1-optická deska, 2-laserová dioda, 3-Glan-Thompsonův polarizátor, 4-kyveta s cukerným roztokem, 5-analyzátor

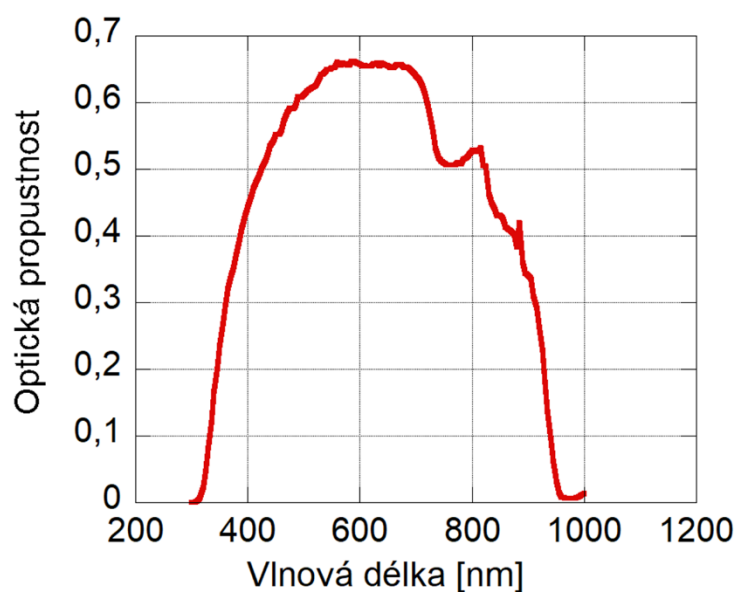
Celá souprava je upevněna na optické desce, kde jsou na kolejnicích připevněny jednotlivé segmenty. Jako zdroje světla byly použity laserové diody, a to modrá (s vlnovou délkou 405 nm), zelená (s vlnovou délkou 535 nm) a červená (s vlnovou délkou 650 nm). Svazek světla vstupuje do dvojlomného Glan-Thompsonova polarizátoru, který způsobí, že vystupující vlna je lineárně polarizovaná s kmitů vektoru \vec{E} v určité rovině. Průchodem světla kyvetou s cukerným roztokem se rovina kmitů stočí o určitý úhel α . Pomocí analyzátoru se rozpozná, o jaký polarizační stav světla se jedná. Pro vyhodnocení naměřených dat je k dispozici software Thorlabs PAX1000.

Další schopností této polarimetrické soupravy je určení azimutu a elipticity, což jsou vlastnosti charakteristické pro chiroptické jevy, a proto je tato metoda použitelná k jejich posouzení a následnému srovnání se spektroskopickou elipsometrií.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 URČENÍ SPEKTRÁLNÍ OBLASTI PRO MĚŘENÍ

Standardní spektrální rozmezí spektroskopického elipsometru je velmi široké, od cca 240–2500 nm, proto je nutné vybrat pouze část spektra, ve které bude měření co nejvíc citlivé. Z toho důvodu byla elipsometrem změřena optická propustnost (transmitance) skleněné kyvety s cukerným roztokem v závislosti na vlnové délce.

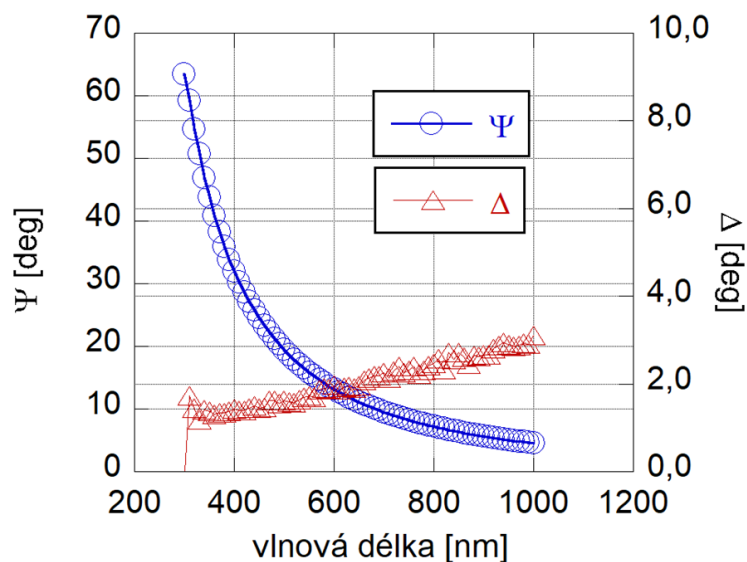


Obrázek 4.1.1: Zobrazení závislosti vlnové délky na optické propustnosti – pro vymezení studované oblasti spektra

Jak ukazuje *Obrázek 4.1.1*, studovaná oblast je v rozmezí cca 300–1000 nm, což má logické vysvětlení. Okénka kyvety jsou ze skla, které je schopné absorbovat světlo při vlnové délce kolem 300 nm, jinými slovy, mezní vlnová délka pro sklo je kolem 300 nm. A dále, kyveta je naplněna cukerným roztokem, který vznikl rozpuštěním cukru ve vodě. Právě voda určuje druhou hraniční hodnotu sledované oblasti, tedy mezní vlnová délka vody je asi 1000 nm.

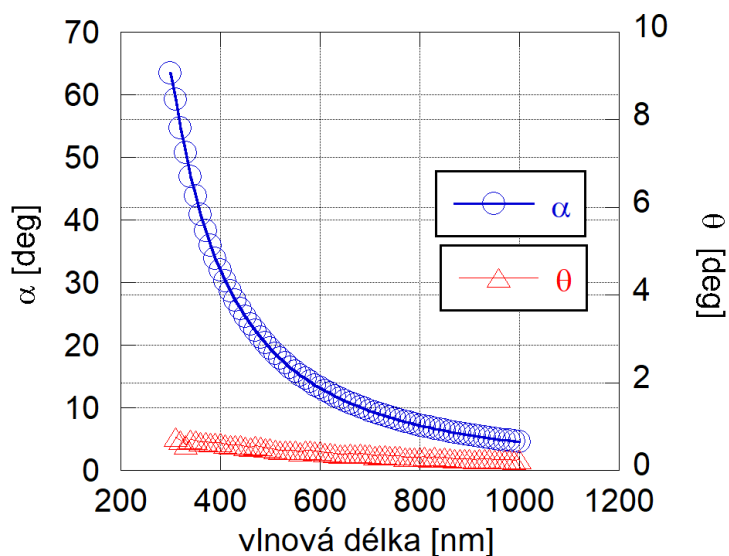
4.2 STANOVENÍ PARAMETRŮ (Ψ , Δ) A (α , Θ) ELIPSOMETRIÍ

Obě skleněné kyvety s cukerným roztokem byly elipsometrem proměřeny, vyobrazena jsou pouze spektra pro krátkou kyvetu s cukerným roztokem, s hodnotami pro roztok cukru v dlouhé kyvetě se pracovalo obdobně. Změřená spektra elipsometrických veličin Ψ a Δ nasyceného roztoku cukru znázorňuje *Obrázek 4.2.1*.



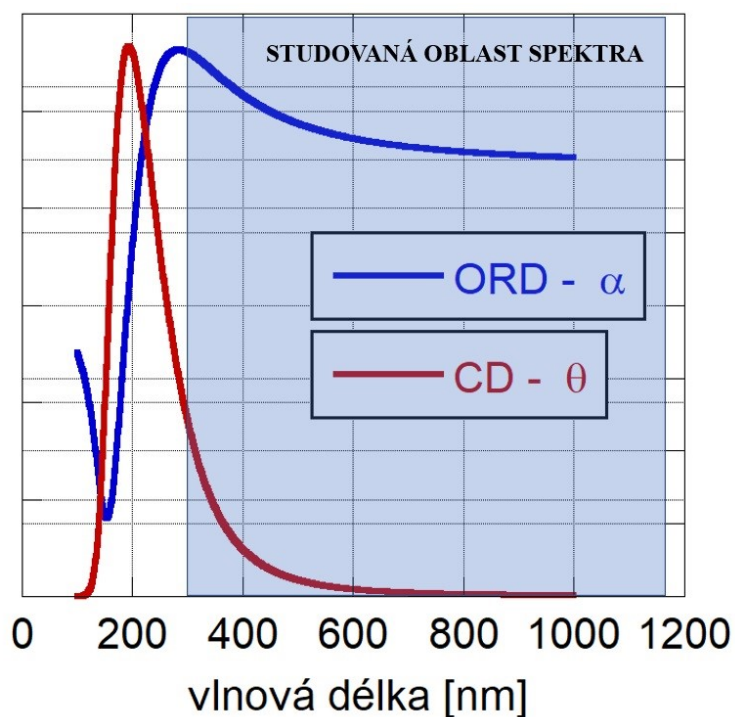
Obrázek 4.2.1: Proměření elipsometrických veličin pro nasycený roztok cukru

Pomocí vztahů (9) a (10) se z naměřených parametrů Ψ a Δ přepočítají závislosti úhlů pro azimut α a elipticitu Θ , což zobrazuje *Obrázek 4.2.2*.



Obrázek 4.2.2: Zobrazení přepočítaných závislostí úhlů azimutu α a elipticity

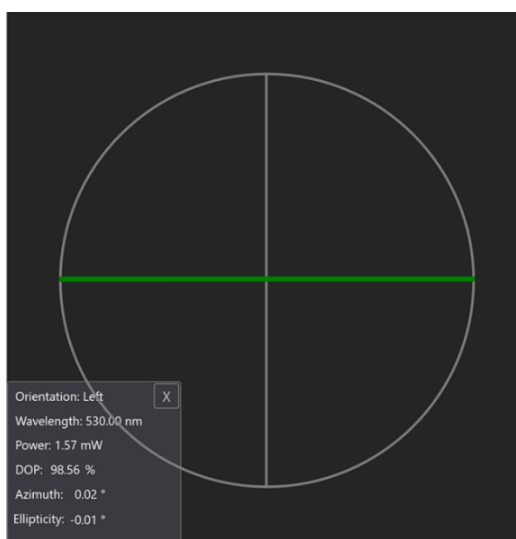
Jak je výše zmíněno, úhly α a Θ , respektive Ψ a Δ jsou svázány Kramers-Krönigovými relacemi. V případě roztoku cukru očekáváme maximum CD v UV oblasti, která je však mimo námi dostupný spektrální obor, tak jak je naznačeno na obrázku (Obrázek 4.2.3). Získaná spektra ORD a CD kvalitativně odpovídají predikovaným závislostem. V celém studovaném spektrálním rozsahu roste ORD monotónně směrem k nižším vlnovým délkám. Zatímco CD na se pohybuje v okolí 0.



Obrázek 4.2.3: Zobrazení spekter ORD a CD – znázornění oblasti, ve které je elipsometr citlivý

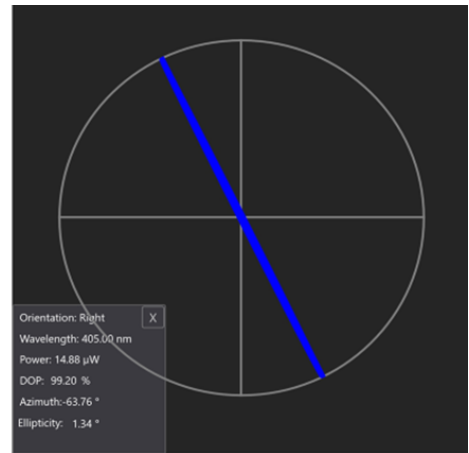
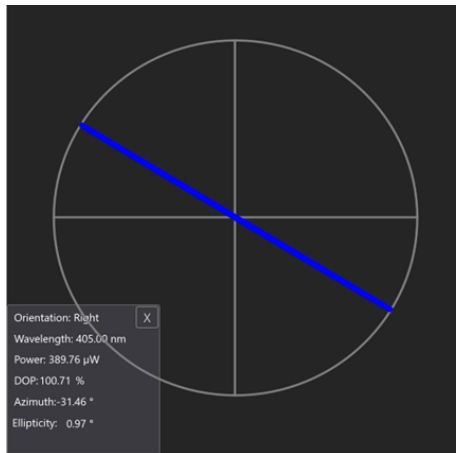
4.3 STANOVENÍ PARAMETRŮ α , Θ POLARIMETRIÍ

Před měřením se přesně nastavilo, aby svazek světla z laserové diody směřoval přímo do analyzátoru a světelná stopa byla co nejintenzivnější. Musela se najít taková poloha paprsku, aby naměřené úhly α a Θ byly nulové, jak zobrazuje *Obrázek 4.3.1*. K tomu stačilo, aby mezi polarizátorem a analyzátozem byl vzduch, což je opticky izotropní¹¹ prostředí, ve kterém se během šíření světla nemění jeho polarizační stav. Tím se zjistila baseline, ke které byla vztahována další měření.

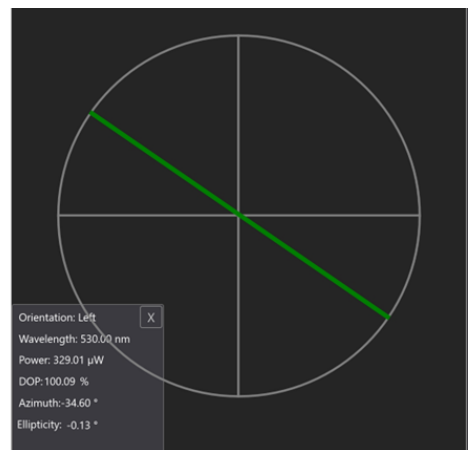
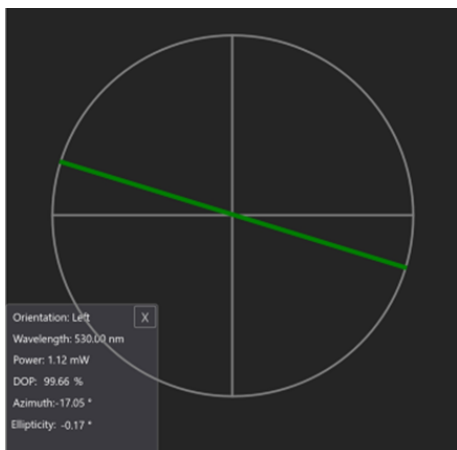


Obrázek 4.3.1: Znárodnění baseline – průchod světla opticky izotropním prostředím (vzduch)

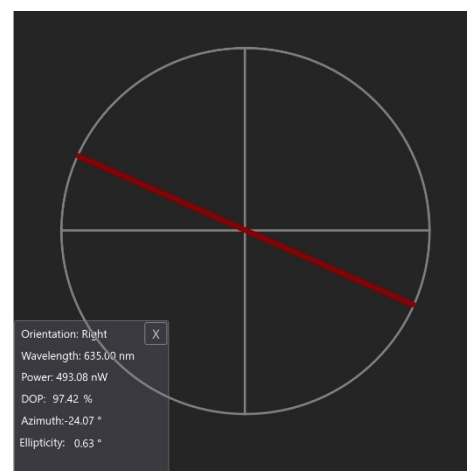
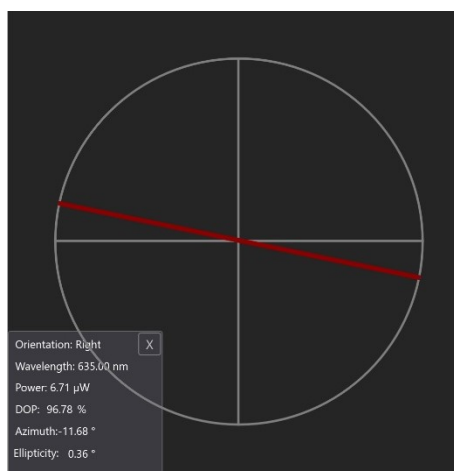
Vložení kyvety s cukerným roztokem (opticky aktivní prostředí), se změnil polarizační stav světla, kdy došlo ke stočení roviny polarizovaného světla o určitý úhel α (azimut), a zároveň byl změřen úhel Θ (elipticita). Obě kyvety s cukerným roztokem byly proměřeny celkem třikrát v závislosti na použitých laserových diodách, a to v oblasti spektra pro modré světlo (405 nm), zelené světlo (530 nm) a červené světlo (635 nm), jak zobrazují *Obrázek 4.3.2*, *Obrázek 4.3.3* a *Obrázek 4.3.4* na následující straně. Vlevo je výsledek měření pro krátkou kyvetu, vpravo pro dlouhou kyvetu. Pro lepší orientaci jsou výsledky jednotlivých měření zaznamenány v tabulce (*Tabulka 2*).



Obrázek 4.3.2: Polarimetrické měření v oblasti modrého spektra – na levé straně je změřena krátká kvjeta s nasyceným cukerným roztokem, vpravo je znázorněno měření dlouhé kvjeta.



Obrázek 4.3.3: Polarimetrické měření v oblasti zeleného spektra – na levé straně je změřena krátká kvjeta s nasyceným cukerným roztokem, vpravo je znázorněno měření dlouhé kvjeta.



Obrázek 4.3.4: Polarimetrické měření v oblasti červeného spektra – na levé straně je změřena krátká kvjeta s nasyceným cukerným roztokem, vpravo je znázorněno měření dlouhé kvjeta.

Tabulka 2: Experimentální hodnoty α a Θ pro obě kyvety v různých oblastech spektra

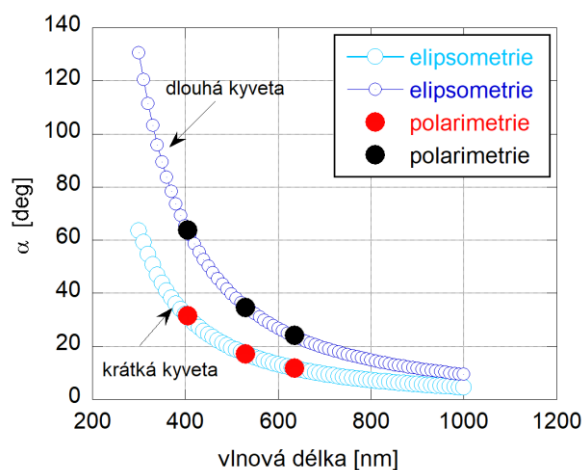
	KRÁTKÁ KYVETA		DLOUHÁ KYVETA	
oblast modrého spektra (405 nm)	α [°]	θ [°]	α [°]	θ [°]
	31,46	0,97	63,76	1,34
oblast zeleného spektra (530 nm)	α [°]	θ [°]	α [°]	θ [°]
	17,05	0,17	34,6	0,13
oblast červeného spektra (635 nm)	α [°]	θ [°]	α [°]	θ [°]
	11,68	0,36	24,07	0,63

Z naměřených hodnot úhlu α , který charakterizuje optickou rotační disperzi, je patrná závislost na délce kyvety. Dlouhá kyveta je 2x delší než krátká kyveta, a tomu také odpovídají i změřené úhly v jednotlivých oblastech spektra, jejich hodnoty jsou zhruba 2x větší. Dále je vidět, že úhel α s rostoucí vlnovou délkou klesá, což bylo již zmíněno na předchozích stranách.

Na druhou stranu, úhel Θ charakterizující cirkulární dichroismus, nezobrazuje žádnou závislost. Bylo očekáváno, že různá délka kyvety a různá vlnová délka nějak měření ovlivní. Hodnoty úhlů Θ však nevykazují očekávané trendy. Důvodem by mohlo být, že cukr nebyl dostatečně rozpuštěn, a tudíž nebyl roztok v kyvetách homogenní. S tím souvisí i fakt, že roztok nemusel být dostatečně promíchán, a nerozpuštěný cukr se mohl usadit na stranu kyvety, kterou procházel paprsek světla, a tím způsobit nesrovnalosti. Stojí za zmínění, že hodnoty CD se měnily při otáčení kyvety, což by mohlo částečně potvrdit zmíněnou interpretaci.

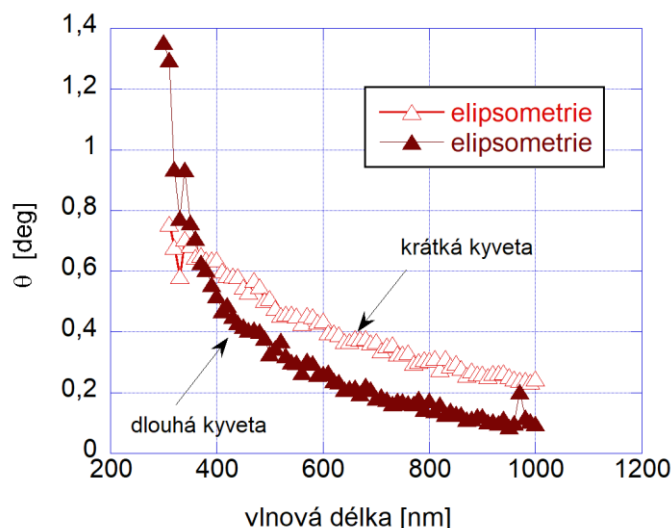
4.4 SROVNÁNÍ ELIPSOMETRIE A POLARIMETRIE

Ze všech naměřených hodnot byly vytvořeny grafy (viz Obrázek 4.4.1, Obrázek 4.4.2) porovnávající optickou rotační disperzi a cirkulární dichroismus prostřednictvím závislosti úhlů α , Θ na vlnové délce, použité metodě a délce kyvety.



Obrázek 4.4.1: Souhrnný graf pro ORD

Graf (Obrázek 4.4.1) na předešlé stránce potvrzuje vše, co bylo zde už jednou zmíněno. V celém spektrálním rozsahu ORD roste směrem k nižším vlnovým délkám. Pro cukerný roztok v dlouhé kyvetě vyšly hodnoty úhlu α 2x vyšší než u krátké kyvety, což odpovídá, dlouhá kyveta je také 2x delší než kyveta krátká. Dále je vidět, že obě metody, elipsometrie a polarimetrie, podávají téměř shodné výsledky pro studium ORD.



Obrázek 4.4.2: Souhrnný graf pro CD z pohledu elipsometrie

Pro CD byl také vytvořen graf (Obrázek 4.4.2), z výše popsaných důvodů nejsou v grafu zobrazeny údaje z polarimetrie. Závislostí vyplývající z grafu je, že CD roste směrem k nižším vlnovým délkám v celém rozsahu spektra. Předpokládaná souvislost délky kyvety s hodnotami úhlů prokázána nebyla. Pravděpodobnou příčinou je úskalí, kdy elipsometr měří na hraně své přesnosti. Případně pak nebyla optimálně nastavena procedura měření anizotropních vzorků na elipsometru. Vhodnější se nyní zdá proměření prvků Muellerovy matice. Toto bude předmětem dalšího studia.

5 ZÁVĚR

Práce poukazuje na možnost použití spektroskopické elipsometrie a polarimetrie pro měření chiroptických jevů – optické rotační disperze a cirkulárního dichroismu pro nasycený roztok cukru.

Pro sledování optické rotační disperze lze použít obě metody, spektroskopickou elipsometrii i polarimetrii. Obě metody jsou dostatečně citlivé pro studium ORD a podávají uspokojivé výsledky.

Měření cirkulárního dichroismu přineslo hned několik úskalí. Kvůli skleněným okénkám a vodnému roztoku cukru v kyvetě, bylo spektrum omezené pouze na 300–1000 nm. Použití kyvety z jiného materiálu (např. suprasilová kyveta) by nemuselo tolik omezit sledované spektrum. Cirkulární dichroismus v této části spektra vykazuje velmi nízké hodnoty, což je pro spektroskopický elipsometr VASE obtížné zachytit. Zároveň musí elipsometr měřit na hranici své přesnosti. Metoda polarimetrie pro cirkulární dichroismus také nevyšla podle představ. Naměřené hodnoty jsou nahodilé bez nějaké souvislosti. Citlivý polarimetr PAX1000 byl schopen zachytit nedokonale rozpuštěný cukr v kyvetě, což ovlivnilo další měření. Pro zamezení těchto nesnází by bylo lepší použít jinou opticky aktivní látku, například roztok bílkovin. Protože se cirkulární dichroismus pro takové studium moc nepoužívá, nebyly k dispozici žádné tabelované hodnoty, se kterými by se naměřené hodnoty polarimetrem a elipsometrem mohly srovnat.

Z hlediska použitelnosti uvedených metod pro charakteristiku chiroptických jevů lze říci, že spektroskopická elipsometrie a polarimetrie se velmi hodí pro studium optické rotační disperze. Co se týká cirkulárního dichroismu, spektroskopická elipsometrie kvůli zmíněným důvodům není pro jeho studium vhodná, případně vyžaduje změnu metodiky měření. U polarimetrie nastává otázka, zda by metoda s dobře rozpuštěným vzorkem cukru poskytovala souvislé hodnoty, nebo by bylo lepší použít jinou lépe prostudovanou opticky aktivní látku s referenčními hodnotami CD a ORD v celém studovaném spektru.

6 DODATEK – ETYMOLOGICKÝ SLOVNÍK

POJEM	PŮVOD SLOVA
1. Chiralita, chirální	z řeckého <i>kheir</i> (ruka)
2. Chiroptika, chiroptické	z řeckého <i>kheir</i> (ruka) + z latinského <i>opticus</i> (týkající se zraku)
3. Izomer	z řeckého <i>isos</i> (stejný) + <i>méros</i> (část)
4. Stereoizomer	z řeckého <i>stereós</i> (prostorový) + <i>isos</i> (stejný) + <i>méros</i> (část)
5. Diastereoizomer	z řeckého <i>dia</i> (přes) + <i>stereós</i> (prostorový) + <i>isos</i> (stejný) + <i>méros</i> (část)
6. Enantiomer	z řeckého <i>enantios</i> (opačný) + <i>méros</i> (část)
7. Polarizace	z latinského <i>polaris</i> (týkající se pólů)
8. Disperze	z latinského <i>dis</i> (jiným směrem) + <i>sparsus</i> (rozptýlený)
9. Dichroismus	z řeckého <i>dikhroos</i> (dvojbarevný)
10. Birefringence	z latinského <i>bi</i> (dvojí) + <i>refringere</i> (lámat)
11. Izotropní	z řeckého <i>isos</i> (stejný) + <i>tropos</i> (týkající se otočení)

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] WOELERT, Peter. Kant's hands, spatial orientation, and the Copernican turn. *Continental Philosophy Review* [online]. 2007, 40(2), 139-150 [cit. 2022-06-11]. ISSN 1387-2842. Dostupné z: doi:10.1007/s11007-007-9055-4
- [2] SANTOS, John Joseph. *Alpha-arylisoborneols: an investigation of the ORD and CD and a study of the ritter reaction* [online]. University of New Hampshire, 1967 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <https://scholars.unh.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1858&context=dissertation>. Disertační práce. University of New Hampshire, Department of Chemistry. Vedoucí práce Dr. Gloria G. Lyle.
- [3] ROSSOW, Uwe. A Brief History of Ellipsometry. *Physica status solidi (b)* [online]. 2018, 256(2), 1-6 [cit. 2022-06-11]. ISSN 0370-1972. Dostupné z: doi:10.1002/pssb.201800307
- [4] BLACKMOND, D. G. The Origin of Biological Homochirality. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, 2(5), a002147-a002147 [cit. 2022-06-11]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a002147
- [5] GAL, Joseph. Molecular Chirality in Chemistry and Biology: Historical Milestones. *Helvetica Chimica Acta* [online]. 2013, 96(9), 1617-1657 [cit. 2022-06-11]. ISSN 0018019X. Dostupné z: doi:10.1002/hlca.201300300
- [6] Chirální katalýza [online]. Univerzita Pardubice, Ústav organické chemie a technologie [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uocht/spektrum/chiralkatal.pdf
- [7] SAJDLOVÁ Světlana a MISTRÍK, Jan. FYZIKA: Návody k laboratorním cvičením a příklady [online]. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020 [cit. 2022-06-11]. ISBN 978-80-7560-315-9. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/10195/76004>
- [8] ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. Monosacharidy. *Obecná biochemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, prosinec 2020, s. 47-51. ISBN 978-80-7560-342-5.
- [9] ČERVINKA, Otakar. Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické listy* [online]. Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, 1999, (93), 294-305 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_05_294-305.pdf

[10] SLANINA, Tomáš. *Fotolabilní chirální pomocné skupiny*. Brno, 2010. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Prof. RNDr. Petr Klán, Ph.D.

[11] Kruhově polarizované světlo. *Encyklopedie fyziky* [online]. Praha: Jaroslav Reichl and Martin Všeticka, 2022 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1672-kruhove-polarizovane-svetlo>

[12] *Chiroptické metody* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C5060/Taborsky_chiropticke.pdf

[13] MALÝ, Petr. *Optika: Úvod*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2008, s. 11-14. ISBN 978-80-246-1342-0.

[14] FOX, Mark. Optical chirality. *Optical properties of solids*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2010, s. 55-56. Oxford master series in condensed matter physics. ISBN 978-0-19-957337-0.

[15] SRKALOVÁ, Simona. *Optimalizace HPLC metody pro separaci enantiomerů aminokyselin obsažených v BCAA doplňcích pro sportovce*. Praha, 2008. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Přírodovědecká fakulta Katedra fyzikální a makromolekulární chemie. Vedoucí práce Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

[16] Stereochemistry and Chirality. *Biophysics*. Pangbourne: Alpha Science, 2002, s. 11-12. ISBN 1-84265-089-0.

[17] Polarizace světla. *Encyklopedie fyziky* [online]. Praha: Jaroslav Reichl and Martin Všeticka, 2022 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/462-polarizace-svetla>

[18] *Skupina chiroptických metod* [online]. Praha: Ústav analytické chemie VŠCHT Praha, 2022 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <https://uanlch.vscht.cz/veda-a-vyzkum/chiropticke>

[19] BROWN, T. L., H. E. LEMAY, Jr., and B. E. BURSTEN. Enantiomer. *Chemistry The Central Science: Pearson Education* [online]. 2006, 2006, 10, 1038-1043, 1091-1092 [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <https://www2.nau.edu/~gaud/bio301/content/ennt.htm>

[20] BASTINGS, Jacco J.A.J., Hans M. VAN EIJK, Steven W. OLDE DAMINK a Sander S. RENSEN. D-amino Acids in Health and Disease: A Focus on Cancer. *Nutrients* [online]. 2019, 11(9), 1-18 [cit. 2022-06-11]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11092205

[21] BAUMRUK, Vladimír. *Ramanova optická aktivita – proč a nač* [online]. Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK [cit. 2022-06-12]. Dostupné z: <http://fu.mff.cuni.cz/biomolecules/media/img/problems/roa.pdf>

[22] PROSSER, Václav. *Chiroptické metody. Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989, s. 365-382. ISBN 80-200-0059-3.

[23] NAZMUTDINOVA, Anastasiia a Jan MISTRÍK. *Studentská vědecká odborná činnost: Posouzení možnosti studia chiroptických jevů spektroskopickým elipsometrem*. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2017. ISBN 978-80-7560-084-4.

[24] VOLKENŠTEJN, Michail Vladimirovič. *Struktura a fyzikální vlastnosti molekul: Optické vlastnosti molekul*. Praha: Československá akademie věd, 1962, s. 359-361.

[25] EXNER, Otto. *Struktura a fyzikální vlastnosti organických sloučenin: Optické jevy vyvolané polarizovaným světlem*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, s. 189-199.

[26] HUSÁROVÁ, Kristína. *Optické konstanty ftalocyanínu v úlohe fotodynamické terapie*. Pardubice, 2020. Bakalářská práce, Fakulta chemicko-technologická. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Jan Mistrík.

[27] Ellipsometry measurements. *J. A. Woollam Ellipsometry Solutions* [online]. Lincoln, Spojené státy: J. A. Woolam Co., 2022 [cit. 2022-06-25]. Dostupné z: <https://www.jawoollam.com/resources/ellipsometry-tutorial/ellipsometry-measurements>