



L9

INFRAČERVENÁ A RAMANOVA SPEKTROSKOPIE – CO NÁM MOHOU VIBRACE ŘÍCI O (BIO)MOLEKULÁCH

V. Baumruk

Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2

Objasnění struktury biologických makromolekul a vztahu mezi jejich strukturou a funkcí patří mezi jeden z hlavních úkolů biofyziky a molekulární biologie. Na monokrystalické vzorky lze aplikovat metody rentgenové strukturní analýzy, zatímco pro řešení struktury v roztoku (s určitým omezením daným velikostí studované molekuly) metody nukleární magnetické rezonance (NMR). Avšak pro pochopení mechanismů na molekulární úrovni je nutná rovněž detailní znalost mezimolekulárních interakcí (například systému vodíkových vazeb, nábojového rozložení atp.), kterou v řadě případů nelze jednoznačně odvodit ze známé třidimenzionální struktury biopolymerů. Proto pro řešení mnoha problémů vztahu struktury a funkce nutně potřebujeme další experimentální metody poskytující jedinečnou a komplementární informaci o zkoumaném systému. Právě v této oblasti nacházejí široké uplatnění metody vibrační spektroskopie: infračervená (IČ) spektroskopie a Ramanův rozptyl. Jsou založeny na dvou fyzikálně rozdílných jevech (absorpci respektive rozptylu), obě však umožňují studovat přechody mezi vibračními stavy molekul v základním elektronovém stavu. Jejich společným rysem je nedestruktivnost, hlavním přínosem potom možnost získání poměrně detailní strukturní informace, která je často jinými metodami obtížně zjistitelná. Tyto metody lze použít na vzorky plynné, kapalné i pevné; mohou to být roztoky, suspenze, gely, tenké vrstvy, vlákna a monokrystalické, práškové či amorfní vzorky. Data získaná na vzorku v daném morfologickém stavu jsou přenositelná na stejný vzorek v jiném morfologickém stavu.

Metody vibrační spektroskopie umožňují studovat biologické látky v jejich přirozeném prostředí, tedy ve vodných roztocích, sledovat nejen změny struktury vyvolané změnou fyzikálně-chemických parametrů (například změnou pH, iontové síly, teploty, vlhkosti ...), ale i dynamiku strukturních přechodů. Ve srovnání s fluorescencí ($\sim 10^{-9}$ s) a nukleární magnetickou rezonancí ($\sim 10^{-6}$ s) probíhají jak Ramanův rozptyl tak i IČ absorpce ve velmi krátké časové škále ($\sim 10^{-15}$ s). Vibrační spektroskopie je tedy vhodnou metodou studia dynamiky biologických procesů. V případě konformačně flexibilních molekul může vibrační spektroskopie rozlišit konformace, jež jsou stabilní z hlediska časové škály vibračních pohybů. Na rozdíl od NMR, kde díky pomalejší časové škále (v porovnání s konformační konverzí) může ve spektru dojít k vyrušení strukturních rysů, je vibrační spektrum váženým průměrem spekter jednotlivých konformerů.

Pokud jde o výběrová pravidla, vibrace indukující změnu dipólového momentu molekuly se projeví v IČ spektrech, zatímco vibrace indukující změnu polarizovatelnosti molekuly se projeví v Ramanových spektrech. Díky rozdílným výběrovým pravidlům jsou Ramanova a IČ

spektroskopie do jisté míry komplementární – některé vibrace mohou být aktivní v obou těchto metodách, některé jen v jedné z nich a některé mohou být v obou neaktivní. Plná komplementarita nastává u středově symetrických molekul, kdy vibrace symetrické vůči středu inverze jsou aktivní v Ramanových a vibrace antisymetrické vůči středu inverze jsou aktivní v IČ spektrech.

Pásky ve vibračním spektru lze v přeneseném slova smyslu chápat jako jakýsi unikátní "otisk" molekuly (právě proto patří vibrační spektroskopie mezi široce využívané analytické metody). Pro malé až střední molekuly lze provést přiřazení spektrálních pásek normálním vibracím na základě modelových výpočtů spekter a už na fenomenologické (řešení inverzního vibračního problému) či *ab initio* úrovni. Při dobré shodě vypočteného spektra s experimentálními daty potom získáváme základní informaci o rovnovážné konfiguraci jader a o silových polích. U složitých molekul však takové přímé přiřazení není proveditelné a tudíž ani není možná přímá strukturní interpretace vibračního spektra. Strukturní interpretace vibračních spekter biomolekul je založena na tzv. konformačních markerech, to jest spektrálních pásech, které jsou jednoznačně přiřazeny určité molekulární struktuře stanovené nezávislou metodou. Zdrojem referenční strukturní informace pro stanovení korelace mezi spektrálními a strukturními rysy jsou zpravidla krystalografická či NMR data. Protože každý pás ve vibračním spektru odpovídá vibracím určité skupiny atomů (tzv. normální vibraci) s dobře definovanými geometrickými charakteristikami (délka vazeb, úhly vazeb, ...), může správně přiřazený pás sloužit jako jednoznačný indikátor odpovídajícího strukturního rysu. Interpretace vibračních spekter biopolymerů by samozřejmě nebyla možná bez detailní interpretace spekter jejich složek.

Vibrační optická aktivita (VOA, vibrační spektroskopie pracující s kruhově polarizovaným světlem) v sobě spojuje stereochemickou citlivost konvenční (UV-VIS čili elektronové) optické aktivity s vyšším rozlišením a tudíž i bohatším strukturním obsahem a konformační citlivostí vibrační spektroskopie. Podobně jako vibrační spektroskopie, zahrnuje i vibrační optická aktivita dvě samostatné a do značné míry komplementární metody – vibrační cirkulární dichroismus (VCD) a Ramanovu optickou aktivitu (ROA). Je to ve své podstatě technika diferenční spektroskopie, kdy měříme rozdíl v odezvě **chirální** molekuly vůči **levo- a pravotočivě kruhově polarizovanému záření**. Výsledkem měření VOA jsou vždy dvě spektra – vlastní VOA (tedy diferenční) spektrum a zdrojové vibrační spektrum. Citlivost vibrační optické aktivity k zrcadlově symetrickým vztahům mezi enantiomery chirálních molekul je zdrojem její pozoruhodné schopnosti specifikovat

absolutní stereochemické vlastnosti chirálních molekul *v roztoku*.

Jak infračervená spektroskopie tak i Ramanův rozptyl mají své přednosti i nedostatky, ale kombinace obou dává

experimentátorovi do rukou dostatečně mocný nástroj pomáhající řešit úkoly stojící před molekulární biologií, biofyzikou a biochemií.

L10

NMR KRYSTALOGRAFIE: STUDIUM STRUKTURY MATERIÁLŮ POMOCÍ MODERNÍCH NMR METOD

J. Brus

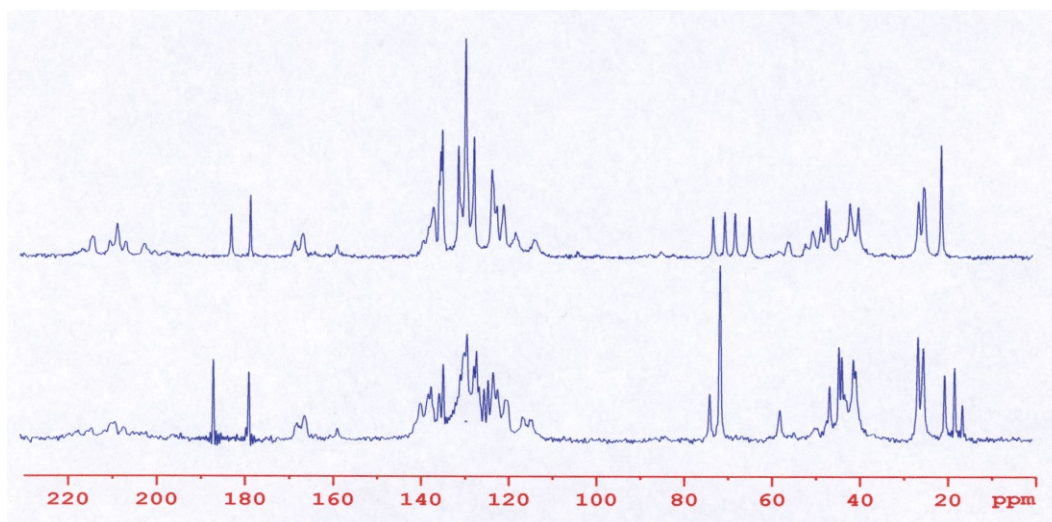
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6 – Petřiny

NMR spektroskopie pevného stavu je v současné době rychle se vyvíjející oblast strukturní analýzy. Nedávný rozvoj nových metodik a základních elektronických součástí NMR spektrometrů vedl k tomu, že dosažené rozlišení a selektivita NMR experimentů v pevné fázi umožňuje velmi přesně popisovat strukturu a vnitřní pohyblivost širokého spektra látek a systémů (od velice tvrdých a rigidních skel, organických i anorganických krystalů, přes syntetické polymery až po velice měkké a pohyblivé gely polypeptidů či proteinů). Díky tomu je možné popsat strukturu a tří-dimenzionální uspořádání i u takových látek, které jen velmi neochotně poskytují krystaly vhodné k rtg. difrakci. Navíc je řada NMR parametrů citlivá na rychlost a amplitudu vnitřních pohybů, a tak právě NMR spektroskopie pevného stavu podává komplexní informace o vnitřní struktuře a uspořádání hmoty. Proto můžeme NMR spektroskopii pevného stavu směle považovat za metodu komplementární k rentgenové difrakci. Cílem NMR spektroskopiků, ale není zcela nahradit difrakční techniky, ale především doplnit chybějící údaje k úplnému popisu struktury a dynamiky krystalických a vysoce organizovaných systémů. Přestože NMR spektroskopie pevného stavu tedy není alternativou difrakčním technikám při určování úplné třídimenzionální struktury a uspořádání molekul v krystalických materiálech, poskytuje tato

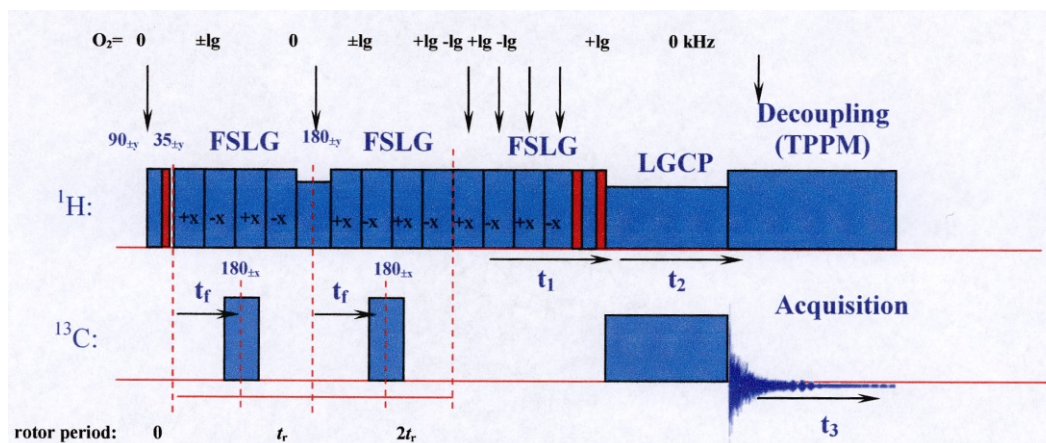


Obr. 1. NMR magnet.

metoda významné krystalografické informace. Nejen díky tomu se tak NMR spektroskopie pevného stavu stala významnou součástí charakterizace farmaceuticky aktivních substancí a od roku 1997 je doporučována i



Obr. 2. ^{13}C CP/MAS NMR spektra dvou krystalových forem identické sloučeniny.



Obr. 3. 3D pulzní sekvence pro měření ^1H - ^{13}C meziatomových vzdáleností.

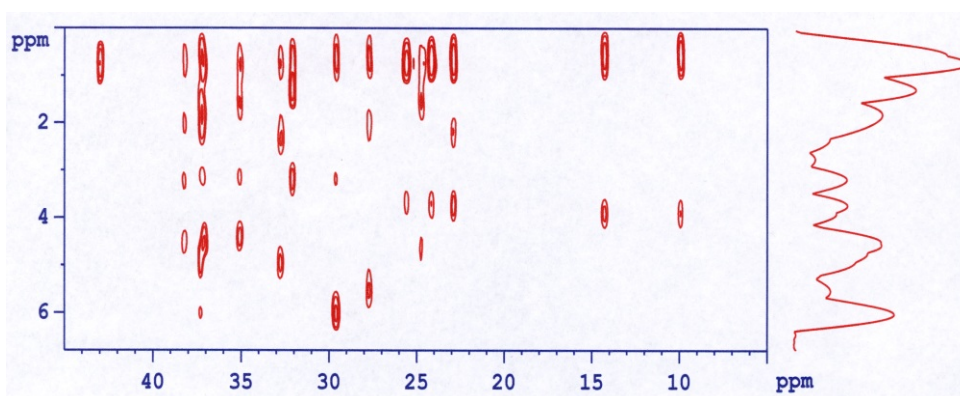
hlavním regulátorem trhu - FDA (Food and Drug Administration) [1].

Aplikovatelnost této metody ve farmacii je však podmíněna možností poskytovat požadované informace v relativně krátkém čase a možností analyzovat látky v přirozeném izotopickém zastoupení. Z toho plyne, že základním nositelem strukturních informací je především chemický posun. Ten velice citlivě reaguje i na nepatrné změny v rozložení hustoty elektronů v okolí detekovaných jader. Proto je prvním krokem při určování strukturních parametrů měření chemického posunu rozličných jader (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P) a nalezení základních vztahů a zákonitostí mezi tímto parametrem a strukturou hmoty. V tom nejjednodušším přiblížení NMR chemický posun slouží k rozlišení a identifikaci jednotlivých polymorfů, solvatomorfů, či hydrátů. Zajímavou možností je také schopnost identifikace nestechiometrických hydrátů a lokalizace molekul vody v krystalových kanálech. Měření anizotropie chemického posunu (CSA) pak může podat cenné informace o koordinaci některých těžkých atomů. V neposlední řadě pak analýza NMR spekter krystalických látek může vést k získání takových parametrů jako je určení krystalografické asymetrické jednotky nebo prostorové grupy. Tyto informace spolu s pochopením povahy vodíkových vazeb poutající molekuly do třídímní struktury a lokalizace odpovídajícího vodíkového atomu následně umožní získat významná geometrická omezení. Na rozdíl od difrakčních technik dokáže NMR spektroskopie velmi přesně lokalizovat pozici vodíkových atomů.

To potom vede k podstatně snadnější interpretaci především rtg. práškových dat a rekonstrukci a optimalizaci úplné 3D struktury. NMR spektroskopie také významně přispívá k rozlišení a výzkumu statického či dynamického neuspořádání krystalové struktury a nedávno rozvinuté techniky umožňují poměrně přesně popsat geometrii nebo amplitudu lokálních segmentálních pohybů, jejichž korelační čas je kratší než 40 ps.

NMR spektroskopie pevného stavu se v současné době ale již stala natolik výkonnou sondou do elektronového okolí daného jádra, že její jedinečná selektivita, umožňuje za jistých podmínek přesně stanovit mezijaderné vzdálenosti až do 5 Å. Faktem ale je, že v přirozeném izotopickém zastoupení můžeme měřit pouze takové meziatomové vzdálenosti, kdy alespoň jedním z partnerů je izotop s vysokým přírodním zastoupením. To jsou především jádra ^1H , ^{19}F nebo ^{31}P . A tak nejčastěji měříme meziatomové vzdálenosti ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N , ^{31}P - ^{13}C atp. Podstatou použitých experimentálních postupů je přesné měření vybraných jaderných dipolárních interakcí, ve kterých jsou hledané strukturní informace uloženy. To vyžaduje nalezení speciálních podmínek a provedení více-dimenzionálních experimentů (tři až čtyři-dimenzionálních, viz. Obr. 3), které umožní selektivní detekci dipolárních spekter pro jednotlivé efektivně „izolované“ spinové páry.

Z analýzy a simulace dipolárních spekter (viz. Obr. 4) pak lze získat požadované strukturní parametry a z těch nakonec určit konformaci a strukturu systémů s vysokým stupněm uspořádání. Přesnost měření meziatomových



Obr. 4. 2D ^1H - ^{13}C korelační dipolární spektrum indikující jednotlivé atomové páry.

L11

Jiří Kulda

modes, the optical methods (Raman and infrared spectroscopy), although easily accessible in a laboratory, are limited to the investigations of the immediate vicinity of the origin of reciprocal space because of the tiny photon momentum and hence do not provide direct insight into the space correlation aspects. Moreover, they are subject to rather restrictive selection rules, *a priori* excluding the studies of certain excitation modes. The X-ray inelastic scattering, developed in the last decade at the third generation synchrotron radiation sources, provides, similarly to neutron scattering, the information on excitation spectra at any location throughout the whole Brillouin zone. The comparison between the two techniques follows the general pattern of complementary use and competition between neutron and X-ray scattering techniques, whose most important element is the existence of neutron magnetic scattering, which does not have a direct equivalent with X-rays in this context.



L12

A NEW APPROACH TO X-RAY HOLOGRAPHY WITH ATOMIC RESOLUTION

M. Kopecký¹, J. Fábry¹, J. Kub¹, E. Busetto², and A. Lausi²

¹*Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic*

²*Sincrotrone Trieste, S. S. 14 – km 163.5 in Area Science Park, 34012 Basovizza – Trieste, Italy*

One of promising tools for studies of samples with perturbed translational periodicity or even without it (like “bad” crystals, small clusters of atoms and molecules, or even single viruses, proteins etc.) is a method of x-ray fluorescence holography (XFH) with atomic resolution [1-3], which allows direct imaging of close [neighbourhood](#) of a selected atom. However, mostly demonstration holography experiments on known and very simple inorganic samples have been carried out so far because of practical difficulties [3] of this technique.

Therefore, we have proposed the method of x-ray diffuse scattering holography (XDSH) [4,5], which overcomes most problems inherent to XFH. Namely, we have shown that anomalous x-ray diffuse scattering pattern (Fig. 1) is, in fact, a hologram providing full information on local environment of an anomalous scatterer (Fig. 2). Compared to standard x-ray fluorescence holography, these holograms provide following crucial advantages: (i) The anomalous signal (and hologram) intensity of 1-10% with respect to the background can be achieved by choosing a suitable pair of energies close to the absorption edge. It means improvement by more than one order of magnitude compared to the signal of XFH. (ii) The problem of virtual atoms does not exist in the case of centrosymmetric structures. Virtual images of atoms in non-centrosymmetric structures can be removed by recording an additional diffuse scattering pattern using the reverse direction of the incident beam. (iii) Measured holograms of crystalline

samples are not overlapped by numerous Kossel lines. (iv) The experiment is very simple and fast. Diffuse scattering patterns can be collected on a large position-sensitive detector in short exposures.

- [1] A. Szöke in *Short Wavelength Coherent Radiation: Generation and Application*, edited by Attwood, D. T. & Boker, J. (American Institute of Physics, New York, 1986). p. 361.
- [2] M. Tegze & G. Faigel, *Nature*, 380 (1996) 49.
- [3] G. Faigel & M. Tegze, *Rep. Prog. Phys.*, 62 (1999) 355 and references therein. [4] M. Kopecký, *J. Appl. Cryst.*, 37 (2004) 711.
- [5] M. Kopecký, J. Fábry, J. Kub, E. Busetto & A. Lausi, *Appl. Phys. Lett.* (submitted).

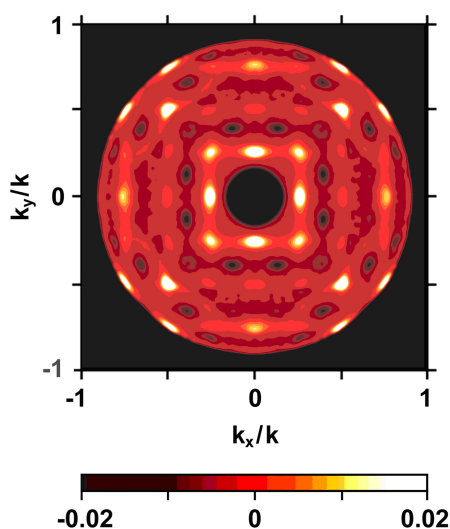


Fig. 1 The hologram obtained as a difference of diffuse scattering patterns recorded at energies of 15.060 keV and 15.120 keV.

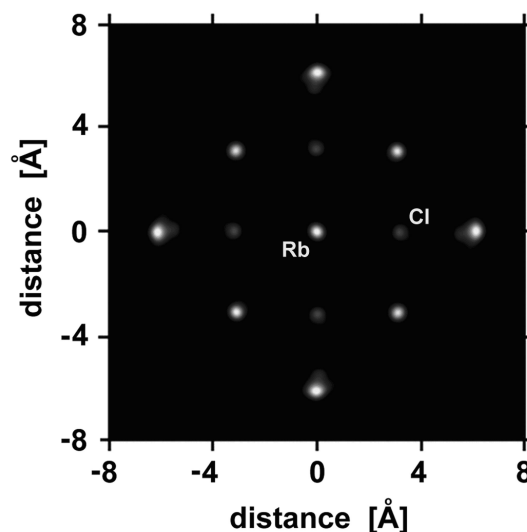


Fig. 2. Holographic reconstruction of Rb and Cl atoms in the plane parallel to the (001) crystallographic plane at $z = 0$.

L13

DIFRAKČNÍ ZOBRAZENÍ JEDNÉ ČÁSTICE

R. Kužel

Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2

V poslední době se začínají velké naděje vkládat do zobrazení pomocí difrakce na jedné částici - single-particle diffraction (soubor referencí viz. [1]). Idea 3D zobrazení molekul a částic je fascinující.

Z hlediska optiky stojí vše na rozdílu difrakčního obrazu periodické struktury tvořené ostrými braggovskými maximy a difrakčního obrazu jedné částice, kde cenná informace je i v oblasti mezi maximy. V takovém případě můžeme obraz převzorkovat (oversampling), naměřit v intervalu jemnějším než je tzv. Nyquistova frekvence (převrácená hodnota velikosti částice). Odpovídá to vlastně tomu, že kromě vlastní částice uvažujeme oblast větší, i když s nulovou hustotou. Tím způsobem pak překonáme známý fázový problém. Převzorkování by mělo být větší než 2. Nutnou podmínkou je také použití koherentního záření.

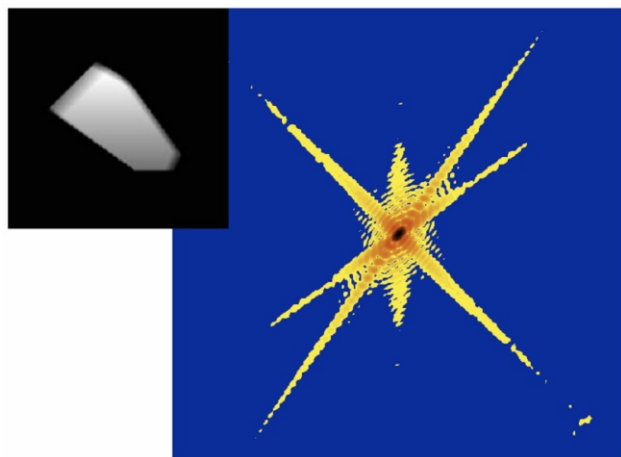
Fázový problém pak můžeme řešit iteračně. Změřené intenzity kombinujeme s nahodilým výběrem fází, provedeme inverzní Fourierovu transformaci, dostaneme elektronovou hustotu, zahrneme oblast s nulovou hustotou, spočteme v další iteraci obraz, atd. Na simulovaných datech většinou stačí pro dobrou rekonstrukci obrazu kolem 400 iterací. Pro složitější objekty (makromolekuly) pak několik tisíc iterací.

Dosud se pozornost soustřeďuje zejména na studium nanočástic, magnetických domén a makromolekul. Studovány byly obrazy zlatých nanočástic [2, 3] a zobrazení bakterie *Escherichia coli* [4]. Zobrazení makromolekul je zatím ve fázi simulací. Zásadním problémem je radiační destrukce molekul. Obraz je třeba získat dříve než k dojde k totálnímu zničení. Simulace ukazují, že je třeba řádu jednotek femtosekund, tzn. extrémně silných a krátkých pulsů koherentního záření. Takové by měl být schopen generovat laser na volných elektronech (free-electron laser).

Odhaduje se, že první 3D obrazy molekul by mohly být získány kolem roku 2008 [5, 6].

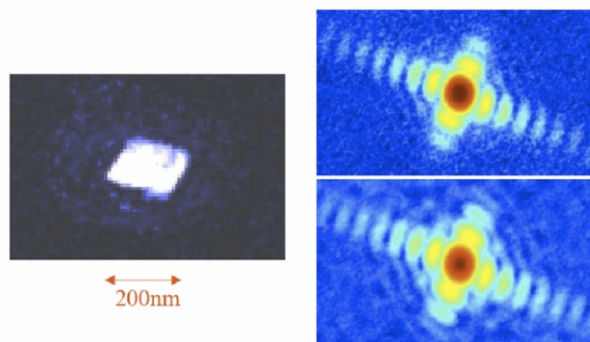
Metodě single-particle diffraction je na nadcházejícím světovém kongresu IUCr ve Florencii věnována nejen plenární přednáška, ale i celá sekce.

1. R. Kužel: Modern X-ray imaging techniques and their use in biology, *Materials Structure*, **12** (2005), 4-7.
2. I. K. Robinson, I. A. Vartanyants, G. J. Williams, M. A. Pflüger, & J. A. Pitney, *Phys. Rev. Lett.* **87** (2001) 195505.
3. Ian K. Robinson, F. Pfeiffer, I. A. Vartanyants, Yugang Sun and Younan Xia, Enhancement of coherent X-ray diffraction from nanocrystals by introduction of X-ray optics, *Optics Express*, **11**, (2003) No. 19, 2329.
4. J. Miao, K. O. Hodgson, Tetsuya Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros and Yoshinori Nishino, Imaging whole *Escherichia coli* bacteria by using single-particle x-ray diffraction, *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100** (2003), no. 1, 110-112.
5. J. Miao, H. N. Chapman, J. Kirz, D. Sayre, and K. O. Hodgson, TAKING X-RAY DIFFRACTION TO THE LIMIT: Macromolecular Structures from Femtosecond X-Ray Pulses and Diffraction Microscopy of Cells with Synchrotron Radiation, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** (2004) 157-76.
6. S. Marchesini, H. N. Chapman, S. P. Hau-Riege, R. A. London, A. Szoke, H. He, M. R. Howells, H. Padmore, R. Rosen, J. C. H. Spence, U. Weierstall, Coherent X-ray diffractive imaging: applications and limitations, *Optics Express*, **11**, (2003) No. 19, 2344.



Obr. 1. Nanočástice Au a její difrakční obraz. Převzato od autorů [2, 3].

Reconstruction of Ag Nanocrystal



Obr. 2. Rekonstrukce nanočástice Ag (vlevo) z difrakčních obrazů (vpravo). Převzato od autorů [2, 3].



L4

THE USE OF 3D STEREOSCOPIC TECHNIQUES FOR STRUCTURAL DATA VISUALIZATION

M. Hušák, J. Rohlíček

Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, CZ 166 28 Prague

The use of different 3D stereoscopic methods for visualization data from structural-biology area was already discussed in following article [1]. The same methods are suitable for better understanding of structure of small organic and inorganic molecules as well.

Stereoscopic visualization can generally help with following tasks: better manual interpretation of electron-density maps, better understanding of structure-activity relations or it can serve as attractive form of data and results presentation.

The key principle of 3D stereoscopic visualization is to show to different human eye different image. In such situation the observer will see the object rely in 3D space, not as a flat 2D object. There exist several technical methods suitable for this purpose: active stereoscopic visualization based on CRT or DLP devices and so cooled shutter glasses, projection based on polarized light or visualization based on a special monitor emitting different view in different direction. Illustrative description of the mentioned methods could be found here [2].

In addition to a special HW, it is necessary to have software supporting some of the mentioned stereoscopic visu-

alization. Such support I usually done through standard OpenGL stereoscopic commands giving automatically output for different visualization methods mentioned above. From commercial codes the stereo support is build in DS Viewer Pro [3]. The code supports visualization of both big biologically interesting molecules, small organic molecules or inorganic structures. MCE code (developed by us) is an example of freely available program with full stereoscopic output support [4]. The latest MCE version can show by stereoscopic methods not only molecules, but also the bigger part of the crystals generated by symmetry operations, electron density maps as well as other force field maps.

1. M. Hušák, *Materials Structure*, 12 (2005) 16.
2. GALI-3D company www: <http://www.gali-3d.com/en/techno/techno.php>
3. Accelrys company www: <http://www.accelrys.com/>
4. M. Hušák, B. Kratochvíl, *J. Appl. Crys.*, 36 (2003) 1104.

L15

STUDIUM TLUSTÝCH TENKÝCH VRSTEV

Milan Dopita

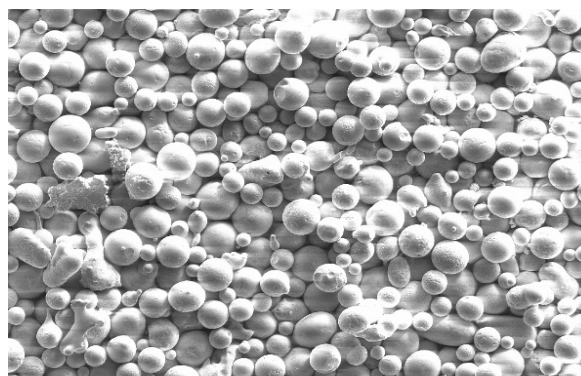
Katedra fyziky elektronových struktur, Matematicko-fyzikální fakulta UK, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2

Polykrystalické vrstvy v dnešní době hrají zásadní roli v celé řadě technických a průmyslových aplikací. Mezi jejich na první pohled evidentní benefity zejména patří možnost kombinace daného substrátu s vhodnou tenkou vrstvou, tak aby došlo k vylepšení požadovaných vlastností výrobku (například kombinace vysoce tvrdých vrstev s pevným a houževnatým substrátem – v případě rozličných řezných a obráběcích nástrojů, kombinace klasických materiálů (například železa) s chemicky odolnými vrstvami), veliké ekonomické úspory vzniklé mnohem vyšší životností takových výrobků, a jasné úspory plynoucí z faktu, že požadované vlastnosti má daný výrobek i v případě, že vrstva je velmi tenká (v porovnání s případem, kdy by celý výrobek byl vyroben z materiálu této tenké vrstvy).

Za zmínku také stojí možná „laditelnost“ vlastností tenké vrstvy v závislosti na fyzikálních a chemických parametrech přípravy této vrstvy.

Obsahem této práce je studium, optimalizace a vývoj korozivně odolných „tlustých tenkých“ vrstev (tlouš ka

vrstev jsou řádově stovky mikrometrů) – tzn. vrstev neměnicích svoje vlastnosti (a chránících materiál substrátu) v rozličných korozivních prostředích (zejména vrstev odolných vůči KCl, K₂SO₄, ZnSO₄, PbCl₂, ZnCl₂). Ideální materiály pro vrstvy těchto vlastností jsou vrstvy vytvořené ze sloučenin niklu. Nikl krystalizuje v kubické



Obr. 1. SEM obrázek výchozího materiálu.