

# Polarizované světlo v optické spektroskopii

## Dichroické metody optické spektroskopie

- dichroické metody sledují rozdílné spektrální odezvy na různě polarizované záření; podle typů polarizace se rozlišují metody dichroismu lineárního a cirkulárního

### 1. Lineární dichroismus

- závislost absorpance na směru polarizace záření; používá se pouze u vzorků s orientovanými molekulami, při vyhodnocování se vychází ze vztahu pro pravděpodobnost přechodu v dipólovém přiblížení

$$\frac{d P_{12}(t)}{d t} \approx (\vec{e} \cdot \vec{D}_{12})^2$$

### 2. Cirkulární dichroismus

- závislost absorpance na orientaci kruhově polarizovaného záření, tedy měří se rozdíl mezi absorpancemi pro pravo- a levotočivé záření; při výpočtu rozdílu pravděpodobností přechodů v dipólové aproximaci je tento rozdíl nulový → nutné vzít v úvahu i první členy rozvoje v aproximaci dlouhých vln, dostáváme pak

$$\begin{aligned} \vec{e} \cdot \left\langle \psi_2 \left| \sum_n \frac{Q_n e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}_n} \vec{\nabla}_n}{m_n} \right| \psi_1 \right\rangle &\approx \vec{e} \cdot \left\langle \psi_2 \left| \sum_n \frac{Q_n (1 - i\vec{k} \cdot \vec{r}_n) \nabla_n}{m_n} \right| \psi_1 \right\rangle = \\ &= \frac{\omega_{12}}{\hbar} \vec{e} \cdot \vec{D}_{12} + \frac{i}{6\hbar^2} \sum_{\alpha\beta} [e_\alpha k_\beta (\vec{Q}_{12})_{\alpha\beta}] - \frac{1}{\mu_0 \hbar} \vec{e} \cdot (\vec{k} \times \vec{M}_{12}) \end{aligned}$$

(pozn. dvě šipky značí tenzor – OpenOffice neumí speciální značku s dvojšipkou ⊙)

tenzor  $(\vec{Q}_{12})_{\alpha\beta}$  značí kvadrupólový moment přechodu, tenzor  $\vec{M}_{12}$  magnetický dipólový moment přechodu

→ z tohoto výrazu počítáme kvadrát → nejnižší členy, kde se objeví nenulový rozdíl, kombinují člen elektrického a magnetického momentu přechodu:

$$\frac{d P_{12}^L}{d t} - \frac{d P_{12}^P}{d t} \approx \vec{D}_{12} \cdot \vec{M}_{12} \quad ,$$

$$\text{kde } \vec{M}_{12} = \frac{\mu_0}{2} \left\langle \psi_2 \left| \sum_n \frac{Q_n}{m_n} (\vec{r}_n \times \hat{p}_n) \right| \psi_1 \right\rangle .$$

Rozdíl absorpací (velikost cirkulárního dichroismu) nezávisí na orientaci molekul vůči dopadajícímu záření – je tedy možné provádět měření i v systémech, kde molekuly nejsou orientované (roztoky, skla).

Výběrová pravidla: současně musí být nenulové oba dipólové momenty přechodu a nesmí být vzájemně kolmé

→ → 1. zůstávají v platnosti výběrová pravidla pro fundamentální vibrační přechody a spinový zákaz pro elektronové přechody

2. symetrické zákazy pro všechny přechody se zpříšňují tak, že není možné dostat nenulový cirkulární dichroismus u žádných přechodů, pokud má molekula alespoň jednu z

těchto vlastností – střed symetrie, rovina symetrie, trojčetná nebo vyšší rotační osa symetrie.  
Molekuly bez těchto symetrií nazýváme chirálními.  
Symetrii lze narušit asymetrickou interakcí molekuly s okolím (indukovaný cirkulární dichroismus).

#### Aparatura

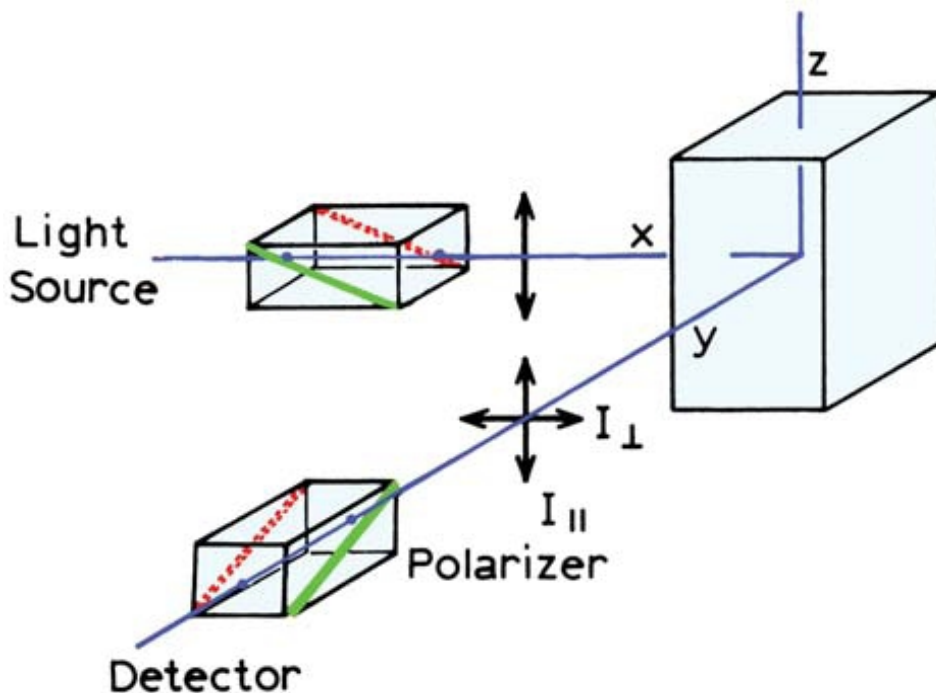
absorpční spektrometr; po výstupu z monochromátoru optické prvky vytvářející kruhově polarizované záření – lineární polarizátor a fotoelastický modulátor, na který je aplikováno střídavě opačné napětí, které vyvolává optickou anizotropii odpovídající čtvrtvlnové destičce s proměnnou polohou optické osy

Aplikace – stanovení sekundárních struktur proteinů, oligopeptidů, ...

#### Měření anizotropie fluorescence

pokud dochází k excitaci světlem polarizovaným v jedné rovině, emise fluorescence se často stává polarizovanou, úroveň polarizace emise je popsána veličinou **anizotropie** (nestejnorodost); co to způsobuje?

– fotoselekce – pokud je roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným světlem, budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního dipólového momentu přechodu do směru polarizace budícího záření



excitace vertikálně polarizovaným zářením (ve směru rovnoběžným s osou z), intenzity  $I_{\parallel}$  -  $I_{\perp}$  viz obr. →

anizotropie definována:  $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$

veličina podobná – polarizace – definována:  $p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$

používána anizotropie (normována  $(I_{\parallel} + 2I_{\perp})$ ), což je celková fluorescence vyzařována do plného

úhlu  $4\pi$  → aditivita anizotropie složek o intenzitách  $f_i$ , pak střední anizotropie  $\bar{r} = \sum_i f_i r_i$ ,

kdežto pro polarizaci by platilo  $\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3}\right)^{-1} = \sum_i \frac{f_i}{\frac{1}{p_i} - \frac{1}{3}}$

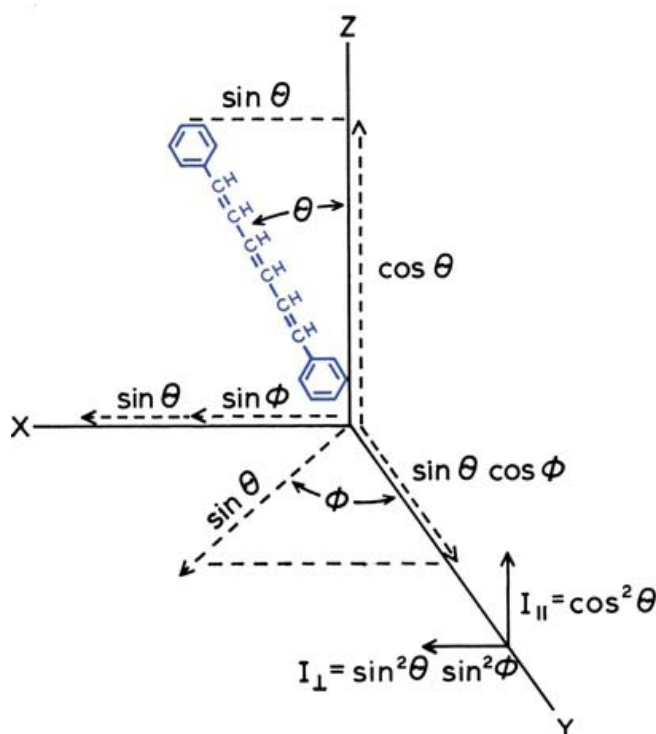
změna anizotropie v čase:  $r(t) = r_0 e^{-\frac{t}{\Phi}}$ , kde  $\Phi$  je rotační korelační čas (čím  $\downarrow \Phi$ , tím rychleji molekuly rotují, tj. menší molekuly) → aplikace – určování pohybů makromolekul

– některé fluorofory je možno aproximovat vyzařováním dipólů, pokud je absorpční dipol. moment přechodu kolmý na emisní dipol. moment přechodu a svírají úhel  $\theta$  s osou z, platí (viz obrázek)  $I_{\parallel} = \cos^2\theta$ ;  $I_{\perp} = \sin^2\theta \cos^2\phi$ ; středování  $\langle \cos^2\theta \rangle = 1/2 \rightarrow$

$I_{\parallel} = \cos^2\theta$ ;  $I_{\perp} = 1/2 \sin^2\theta \rightarrow r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) = (3 \langle \cos^2\theta \rangle - 1) / 2 = \dots$  (v integraci středování  $\cos^2\theta$  navíc si  $\sin\theta$  z objem. elementu  $d\theta \rightarrow \langle \cos^2\theta \rangle = 3/5$ )  $\rightarrow r = 0,4$  (při  $\parallel$  dipol. momentů – platí např. pro zředěné zmrzlé roztoky)

pokud nejsou dipol. momenty  $\parallel$ , ale svírají úhel  $\alpha$  (časově závislé), platí vztah

$$r_0 = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right)$$



maximální a minimální hodnoty anizotropie:

$\alpha$ [°]	$r_0$
0	0,4
45	0,1
54,7 (magic)	0
90	-0,2

Aplikace měření anizotropie ustálené fluorescence: sledování vazby makromolekul, interakce protein-DNA, vytváření dimerů, rozplétání DNA

časově rozlišená anizotropie – více informací, měření časově závislých složek intenzity  $I_{\parallel}(t)$  a  $I_{\perp}(t)$

Aplikace časově rozlišeného měření anizotropie: interakce protein-DNA, ligand-receptor, flexibilita biopolymerů, fluidita membrán, proteolýza, kontrakce svalů, aktivita proteinkináz