

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA OPTIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Použití Ramanovy optické aktivity k
prozkoumání konformace kyseliny askorbové
(vitaminu C) a její interakce s
rozpouštědlem



Vypracovala:	Bc. Ivana Hnízdová
Studijní program:	Fyzika
Studijní obor:	Digitální a přístrojová optika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí diplomové práce:	RNDr. Josef Kapitán, Ph.D.
Konzultant diplomové práce:	RNDr. Jana Hudecová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Josefa Kapitána, Ph.D. a RNDr. Jany Hudecové, Ph.D. a že jsem použila zdroje, které cituji a uvádím v seznamu použitých pramenů.

V Olomouci dne 3. května 2022

.....
Bc. Ivana Hnízdová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Josefu Kapitánovi, Ph.D. za odborné vedení, předané znalosti a veškeré rady, které mi poskytl nejen při psaní této diplomové práce, ale i během celého studia.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Hudecové, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnovala a trpělivost, kterou se mnou měla po celou dobu řešení této diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Ivana Hnízdovalá
Název práce	Použití Ramanovy optické aktivity k prozkoumání konformace kyseliny askorbové (vitaminu C) a její interakce s rozpouštědlem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra optiky
Vedoucí práce	RNDr. Josef Kapitán, Ph.D.
Konzultant práce	RNDr. Jana Hudecová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Tato diplomová práce se zabývá studiem kyseliny askorbové, známé jako vitamin C. Kyselina askorbová se v závislosti na pH vyskytuje ve třech protonovaných formách, což bylo v této práci potvrzeno titrací a statistickým zpracováním naměřených Ramanových spekter pomocí faktorové analýzy. V této práci byla pozornost věnována dvěma protonovaným formám, a to kyselině askorbové a askorbátu sodnému. K prozkoumání konformačního prostoru molekuly byly využity výpočty povrchu potenciální energie podle vybraných torzních úhlů. Preferovaná konformace molekuly může být ovlivněna molekulami rozpouštědla, které mohou přímo interagovat se studovanou molekulou. Tento vliv byl simulován <i>ab initio</i> výpočty mnoha klastrů s vodou, jejichž geometrie byly získány z molekulárně dynamických simulací a bylo dosaženo mnohem lepší shody s naměřenými spektry. U askorbátu sodného byla pozornost věnována nejprve konfiguraci, která byla nejčastěji uváděna v literatuře. Porovnání vypočtených a naměřených spekter nebylo uspokojivé, proto jsme výpočty rozšířili o další dvě konfigurace lišící se polohou OH skupin na pětičlenném kruhu, přičemž z Ramanových a ROA spekter vyplývá, že jedna z nich by mohla být v roztoku nezanedbatelně populovaná.
Klíčová slova	Ramanova optická aktivita, Ramanův rozptyl, vitamin C, kyselina askorbová, askorbát sodný, ...
Počet stran	70
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Ivana Hnízdová
Title	Utilization of Raman optical activity to investigate the conformation of ascorbic acid and its interaction with solvent
Type of thesis	Master
Department	Department of Optics
Supervisor	RNDr. Josef Kapitán, Ph.D.
Co-supervisor	RNDr. Jana Hudecová, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>This diploma thesis deals with the study of ascorbic acid, known as vitamin C. Ascorbic acid occurs in three protonated forms, depending on pH, which was confirmed in this work by titration and statistical processing of measured Raman spectra using factor analysis. In this work, attention was paid to two differently protonated forms, namely, ascorbic acid and sodium ascorbate. To investigate the conformational space of the molecule, calculations of the potential energy surface according to the selected torsional angles were used. The preferred conformation of the molecule can be influenced by the solvent molecules, which can interact directly with the molecule under study. This effect was simulated by <i>ab initio</i> calculations of many water clusters whose geometries were obtained from molecular dynamics simulations and a much better match with the measured spectra was achieved. For sodium ascorbate, attention was first paid to the form, which was reported most frequently in the literature. The comparison of the calculated and measured spectra was not satisfactory, so we extended the calculations to two more forms, differing in the position of the OH groups on the five-member ring, while the Raman and ROA spectra indicate that one of them could be significantly populated in solution.</p>
Keywords	Raman optical activity, Raman scattering, vitamin C, ascorbic acid, sodium ascorbate, ...
Number of pages	70
Language	czech

Obsah

Úvod	8
1 Teorie simulací spekter ROA	9
1.1 Ramanův rozptyl	9
1.2 Ramanova optická aktivita	9
1.3 Teorie Ramanovy optické aktivity	10
1.4 Základy kvantové chemie	12
1.4.1 Schrödingerova rovnice	12
1.4.2 Born-Oppenheimerova aproximace	12
1.4.3 Harmonická aproximace a normální vibrační módy	13
1.5 <i>Ab initio</i> výpočetní metody	15
1.5.1 Teorie elektronové hustoty	15
1.5.2 Modely rozpouštědla	15
1.5.3 Molekulová dynamika	16
1.6 Základní postup výpočtu	16
1.6.1 Optimalizace	17
1.6.2 Výpočet silového pole	17
1.6.3 Výpočet intenzit	17
2 ROA spektrometr	19
3 Kyselina askorbová	21
3.1 Konformace	21
3.2 Protonované formy	22
3.3 Rozpustnost v různých rozpouštědlech	22
3.4 Ramanova spektra	23
4 Cíle práce	25
5 Metodika	26
5.1 Metodika simulací spekter	26
5.2 Realizace experimentu	28
5.3 Titrační měření	29
5.4 Rozklad spekter	31
6 Výsledky a diskuze	32
6.1 Titrační měření	32
6.2 Kyselina askorbová	36
6.2.1 Analýza torzních úhlů	36
6.2.2 Molekulárně dynamické simulace ve vodě	42

6.2.3	Různé úrovně výpočtu	49
6.2.4	Polarizovaná Ramanova spektra	51
6.2.5	Měření v různých rozpouštědlech	52
6.2.6	Porovnání simulovaných a naměřených spekter ve vodě a v metanolu	53
6.3	Askorbát sodný	54
6.3.1	Různé formy askorbátu sodného	54
6.3.2	Analýza torzních úhlů	54
6.3.3	Molekulárně dynamické simulace	58
6.3.4	Porovnání simulovaných a naměřených spekter	61
6.3.5	Rozklad spekter	64
6.3.6	Porovnání simulovaných a naměřených spekter ve vodě v metanolu	66
	Závěr	67
	Literatura	68

Úvod

Ramanova optická aktivita (ROA) je perspektivní analytická technika, která poskytuje informace o prostorovém uspořádání a dynamickém chování chirálních látek v roztoku. Důležitá je především pro farmaceutický průmysl, protože u většiny chirálních látek má léčivé účinky pouze jeden z enantiomerů. ROA byla využita ke studiu různých biomolekul jako jsou například proteiny, peptidy, cukry, nukleové kyseliny nebo viry. Jejich spektra byla interpretována na základě empirických zkušeností i *ab initio* výpočtů.

Do *ab initio* výpočtů je často nutné zahrnout model rozpouštědla, čímž se výpočet přibližuje reálné situaci. Působením rozpouštědla na zkoumanou molekulu může dojít ke změně konformace molekuly, což se promítne do výsledných Ramanových a ROA spekter. Jsou na výběr dva modely rozpouštědla - implicitní a explicitní. Implicitní modely nejsou tak časově náročné jako explicitní, pro složitější molekuly ale nemusí dávat přesné výsledky.

Kyselina askorbová neboli vitamin C je z biologického hlediska velmi důležitá molekula. Lidský organismus si vitamin C nedokáže sám syntetizovat, získává se z potravy. Je to významný antioxidant, přispívá k normální činnosti nervové soustavy, imunitního systému a podílí se na tvorbě hormonů nebo kolagenu. Kyselina askorbová se vyskytuje při nízkém pH. Při fyziologickém (neutrálním) pH se vyskytuje častěji sodná sůl kyseliny askorbové.

Hlavním cílem této diplomové práce je studium konformace kyseliny askorbové (vitaminu C) a její sodné soli a interakce s rozpouštědlem. Kyselina askorbová byla již s pomocí Ramanovy spektroskopie zkoumána, avšak nebylo dosaženo uspokojivé shody teorie s experimentem. V této práci je rozšířeno studium pomocí Ramanovy spektroskopie o její chiroptickou variantu - Ramanovu optickou aktivitu, která může přinést dodatečné cenné informace.

Tato diplomová práce je rozdělena do šesti kapitol. V první kapitole je popsána teorie Ramanovy optické aktivity, základy kvantové chemie a *ab initio* výpočetní metody, které se využívají pro simulace Ramanových a ROA spekter. Ve druhé kapitole je popsána experimentální sestava ROA spektrometru. Třetí kapitola je věnována kyselině askorbové. Ve čtvrté kapitole jsou uvedeny cíle této práce. Poté následuje kapitola o metodice. Jsou v ní popsány výpočty Ramanových a ROA spekter, realizace experimentu a popsané titrační měření. Šestá kapitola je věnována výsledkům této diplomové práce. Je rozdělena na tři části, zvlášť jsou uvedeny výsledky titračního měření, výsledky pro kyselinu askorbovou a askorbát sodný. V podkapitolách věnovaných kyselině askorbové a askorbátu sodnému je uvedena analýza torzních úhlů a porovnání naměřených a vypočtených spekter ve vodě a v metanolu. Je uvedeno i přiřazení vibrací jednotlivým spektrálním pásům. V závěru jsou shrnuty dosažené výsledky.

Kapitola 1

Teorie simulací spekter ROA

1.1 Ramanův rozptyl

Po dopadu elektromagnetického záření o vlnové délce λ_0 na vzorek může dojít kromě průchodu, absorpce a odrazu záření také k jeho rozptylu. U Rayleighova rozptylu nedochází ke změně vlnové délky, jedná se o elastický rozptyl. U Ramanova rozptylu, který je neelastický, se vlnové délky dopadajícího a rozptýleného záření liší. Podle toho, zda je vlnová délka rozptýleného záření delší, resp. kratší jako původní, mluvíme o Stokesově, respektive anti-Stokesově přechodu. Výraz 1.1 vyjadřuje rozdíl převrácených hodnot vlnových délek dopadajícího a rozptýleného záření, tedy rozdíl vlnočtů, který se označuje jako Ramanův posuv.

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_{sc} = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_{sc}} \quad (1.1)$$

Ramanův posuv odpovídá vibrační frekvenci molekuly. Díky tomu lze popsat a identifikovat molekulu ve zkoumaném vzorku.

Přibližně 1/1000 intenzity dopadajícího záření se rozptýlí, přičemž 1/1000 z tohoto rozptýleného záření je rozptýlena nepružně. Z tohoto důvodu je vhodné pro měření Ramanových spekter využít jako zdroj záření laser, který může dosahovat vysokých výkonů. [1, 2]

1.2 Ramanova optická aktivita

Ramanova optická aktivita, zkráceně ROA, patří stejně jako Ramanův rozptyl k technikám vibrační spektroskopie. Byla teoreticky předpovězena v roce 1969 prof. Atkinsem a Barronem [3]. Těm se pomocí výpočtů na základě polarizačních vlastností Rayleighova a Ramanova rozptylu podařilo ukázat, že ve světle rozptýleném chirálními molekulami je obsažena malá složka s kruhovou polarizací. ROA je definována jako rozdíl intenzity Ramanova rozptylu mezi pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaným dopadajícím nebo rozptýleným zářením.

Chirální molekuly jsou opticky aktivní, mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Z hlediska prvků symetrie tyto molekuly nemají střed symetrie, rovinu zrcadlení ani rotačně-reflexní osu. Chirální molekula se vyskytuje ve dvou prostorových formách, kdy jedna je zrcadlovým obrazem druhé, ale nelze molekulu s jejím zrcadlovým obrazem ztotožnit. Molekula a její zrcadlový obraz se pak nazývají enantiomery. Přestože jsou oba enantiomery tvořeny stejnými prvky, mohou mít odlišné chemické a optické vlastnosti. Pokud je chemický vzorek složen z obou enantiomerů ve stejném poměru,

nazývá se tato směs racemická. Pokud je ale složen z pouze jednoho enantiomeru, mluvíme o enantiomericky (opticky) čisté směsi.

Výsledkem měření ROA jsou dvě spektra - Ramanovo (sumární) spektrum, které je dáno součtem intenzit Ramanova rozptylu a ROA (diferenční) spektrum, které je dáno rozdílem intenzit Ramanova rozptylu pro I(R) a I(L). Poměr těchto signálů se označuje jako diferenční cirkulární intezita

$$\Delta = \frac{I(R) - I(L)}{I(R) + I(L)}, \quad (1.2)$$

kde I(R), resp. I(L) je intezita Ramanova rozptylu pro pravotočivě, resp. levotočivě kruhově polarizované záření. Tento poměr nabývá hodnot 10^{-3} - 10^{-6} . Ramanova optická aktivita je tedy ještě mnohem slabší jev než Ramanův rozptyl. [4, 5]

1.3 Teorie Ramanovy optické aktivity

Pokud je energie dopadajícího záření dostatečně vzdálená od energie absorpčních přechodů, lze využít pro popis intenzit Ramanova rozptylu tzv. nerezonanční aproximaci. V této aproximaci jsou tenzory polarizovatelnosti $\alpha_{\alpha\beta}$ a elektrické kvadrupólové tenzory $A_{\alpha,\beta\gamma}$ reálné, magnetický dipólový tenzor optické aktivity $G'_{\alpha\beta}$ ryze imaginární. Lze je zapsat ve tvaru

$$\alpha_{\alpha\beta} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \text{Re}(\langle n | \tilde{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \tilde{\mu}_\beta | n \rangle), \quad (1.3)$$

$$A_{\alpha,\beta\gamma} = \frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_{jn}}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \text{Re}(\langle n | \tilde{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \tilde{\theta}_{\beta\gamma} | n \rangle), \quad (1.4)$$

$$G'_{\alpha\beta} = -\frac{2}{\hbar} \sum_{j \neq n} \frac{\omega_0}{\omega_{jn}^2 - \omega_0^2} \text{Im}(\langle n | \tilde{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \tilde{m}_\beta | n \rangle), \quad (1.5)$$

kde $\omega_{jn} = \omega_j - \omega_n$ je úhlová frekvence odpovídající přechodu mezi počátečním stavem j a koncovým stavem n , ω_0 úhlová frekvence dopadajícího záření a \hbar redukovaná Planckova konstanta.

Operátory elektrického dipólového momentu $\tilde{\mu}_\alpha$, magnetického dipólového momentu \tilde{m}_α a elektrického kvadrupólového momentu $\tilde{\theta}_{\beta\gamma}$ jsou definovány jako

$$\tilde{\mu}_\alpha = \sum_k e_k r_{k\alpha}, \quad (1.6)$$

$$\tilde{m}_\alpha = \frac{1}{2} \sum_k \frac{e_k}{m_k} \varepsilon_{\alpha\beta\gamma} r_{k\beta} p_{k\gamma}, \quad (1.7)$$

$$\tilde{\theta}_{\beta\gamma} = \frac{1}{2} \sum_k e_k (3r_{k\alpha} r_{k\beta} - r_k^2 \delta_{\alpha\beta}), \quad (1.8)$$

kde r je polohový vektor, p moment hybnosti, e náboj částice a m její hmotnost.

V nerezonanční aproximaci platí následující tenzorové invarianty

$$\beta(\alpha)^2 = \frac{1}{2}(3\alpha_{\alpha\beta}\alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}\alpha_{\beta\beta}), \quad (1.9)$$

$$\beta(G')^2 = \frac{1}{2}(3\alpha_{\alpha\beta}G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}G'_{\beta\beta}), \quad (1.10)$$

$$\beta(A)^2 = \frac{1}{2}\omega_0\alpha_{\alpha\beta}\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}A_{\gamma,\delta\beta}, \quad (1.11)$$

$$\alpha = \frac{1}{3}\alpha_{\alpha\alpha}, \quad (1.12)$$

$$G' = \frac{1}{3}G'_{\alpha\alpha}. \quad (1.13)$$

Intenzitu pro Ramanův rozptyl a ROA lze pomocí těchto invariantů vyjádřit jako

$$I(R) + I(L) = 4K [D_1\alpha^2 + D_2\beta(\alpha)^2], \quad (1.14)$$

$$I(R) - I(L) = \frac{8K}{c} [D_3\alpha G' + D_4\beta(G')^2 + D_5\beta(A)^2], \quad (1.15)$$

kde K je konstanta, c rychlost světla a $D_1 - D_5$ souvisí s geometrií a modulačním schématem experimentu. Modulační schéma experimentu může být např. ICP, SCP, DCP_I nebo DCP_{II}. V modulačním schématu ICP (incident circular polarization) je dopadající záření kruhově polarizované. Modulační schéma SCP (scattered circular polarization) zaznamenává intenzitu pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované složky v rozptýleném záření současně. V tomto modulačním schématu je dopadající záření nejčastěji nepolarizované. Dalším modulačním schématem je DCP (dual circular polarization), kdy je dopadající záření kruhově polarizované a v rozptýleném záření zaznamenáváme složku s kruhovou polarizací se stejným (DCP_I), respektive opačným (DCP_{II}) smyslem kruhové polarizace. [4]

Hodnoty koeficientů $D_1 - D_5$ pro geometrii zpětného rozptylu a výše zmíněná modulační schémata jsou uvedeny v tabulce č. 1.1 a vychází z článku [6].

Tabulka 1.1: Hodnoty koeficientů $D_1 - D_5$ v rovnicích 1.14 a 1.15 pro geometrii zpětného rozptylu a různá modulační schémata. Index 'u' u modulačních schémat ICP a DCP znamená nepolarizované dopadající záření.

Modulační schéma	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5
ICP _u	45	7	0	12	4
SCP _u	45	7	0	12	4
DCP _I	0	6	0	12	4
DCP _{II}	45	1	0	0	0

Z tabulky č. 1.1 vyplývá, že modulační schémata ICP_u a SCP_u dávají stejný Ramanův signál, zatímco DCP_I a DCP_{II} poskytují rozdílná Ramanova spektra a jejich součet je roven Ramanovu spektru pro SCP_u/ICP_u. Tato dvě modulační schémata spolu s DCP_I dávají stejný ROA signál, zatímco u DCP_{II} je ROA signál teoreticky nulový. [7]

1.4 Základy kvantové chemie

1.4.1 Schrödingerova rovnice

Pro výpočty Ramanových a ROA spekter se využívají *ab initio* metody, které numericky řeší stacionární Schrödingerovu rovnici

$$\hat{H}\psi = E\psi, \quad (1.16)$$

kde \hat{H} je operátor energie Hamiltonián, E energie a ψ vlnová funkce. Hamiltonián obsahuje silové interakce mezi elektrony a jádry a má následující tvar

$$\hat{H} = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{NN} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee}, \quad (1.17)$$

kde první člen představuje operátor kinetické energie jader

$$\hat{T}_N = \sum_J -\frac{\hbar^2}{2M_J} \Delta_J, \quad (1.18)$$

druhý je operátor kinetické energie elektronů

$$\hat{T}_e = \sum_i -\frac{\hbar^2}{2m_e} \Delta_i, \quad (1.19)$$

třetí člen představuje coulombovské odpuzování mezi jádry

$$\hat{V}_{NN} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_J \sum_{J' > J} \frac{Z_J Z_{J'} e^2}{|R_J - R_{J'}|}, \quad (1.20)$$

čtvrtý coulombovské přitahování mezi jádry a elektrony

$$\hat{V}_{Ne} = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_J \sum_i \frac{Z_J e^2}{|R_J - r_i|}, \quad (1.21)$$

a poslední coulombovské odpuzování mezi elektrony

$$\hat{V}_{ee} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_i \sum_{i' > i} \frac{e^2}{|r_i - r_{i'}|}. \quad (1.22)$$

Ve výše uvedených vzorcích je Δ Laplaceův operátor, J čísluje jádro, i elektron, R_J polohový vektor pro jádro, r_i polohový vektor pro elektron, Z_J protonové číslo jádra, \hbar redukovaná Planckova konstanta, ϵ_0 permitivita vakua, e elementární náboj, m_e hmotnost elektronu a M_J hmotnost jádra. [8, 9]

1.4.2 Born-Oppenheimerova aproximace

Podstatou Born-Oppenheimerovy aproximace je oddělení pohybu atomových jader od pohybu elektronů. Hmotnost atomových jader je přibližně 1800krát větší než hmotnost elektronů, čímž je způsoben také výrazně pomalejší pohyb jader oproti elektronům. Při splnění podmínky $m_e \ll M_J$ lze pohyb jader zanedbat a dále řešit elektronovou Schrödingerovu rovnici

$$\hat{H}_{el}\psi_{el} = E_{el}\psi_{el}, \quad (1.23)$$

ve které vystupuje elektronová vlnová funkce ψ_{el} , elektronová energie E_{el} a elektronový Hamiltonián

$$\hat{H}_{el} = \hat{T}_e + \hat{V}_{NN} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee}. \quad (1.24)$$

V Hamiltoniánu již nevystupuje operátor kinetické energie jader. Neznamená to ale, že by Schrödingerova rovnice 1.23 na jádrech vůbec nezávisela. Výsledek je závislý na jejich prostorovém uspořádání, závislost je tedy parametrická. Ze Schrödingerovy rovnice 1.23 se pro dané geometrické uspořádání atomových jader vypočítá elektronová energie E_{el} , se kterou se elektrony v molekule s daným uspořádáním jader pohybují.

Závislost elektronové energie E_{el} na parametru, který souvisí s geometrickým uspořádáním atomových jader, např. na vazebném úhlu, se pro dvouatomové molekuly nazývá křivka potenciální energie, pro víceatomové molekuly plocha potenciální energie (PES). Tato křivka nám dává informaci o tom, jaká hodnota daného parametru (např. vazebná délka, vazebný nebo torzní úhel) je pro molekulu nejvýhodnější a zároveň nejpravděpodobnější. Je to hodnota v okolí lokálního minima potenciální energie. Získáme tím představu o možných konformacích molekuly. [8, 9]

1.4.3 Harmonická aproximace a normální vibrační módy

Atomová jádra mohou vykonávat různé typy pohybu - translaci, rotaci a vibraci. Pro spektroskopii je zajímavý především vibrační pohyb. S využitím Born-Oppenheimerovy aproximace lze zapsat Schrödingerovu rovnici pro atomová jádra jako

$$(\hat{T}_N + E_{el})\chi_N = E\chi_N, \quad (1.25)$$

kde χ_N je vlnová funkce pro N-té atomové jádro, která popisuje translační, rotační a vibrační pohyb molekuly. Pomocí Taylorova rozvoje lze vyjádřit závislost elektronové energie E_{el} na vzdálenosti mezi jádry jako

$$E_{el} \approx E_{el}(R_e) + \left(\frac{dE_{el}}{dr}\right)(r - R_e) + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2E_{el}}{dr^2}\right)(r - R_e)^2, \quad (1.26)$$

kde R_e je rovnovážná mezijaderná vzdálenost. Pokud zvolíme elektronovou energii v rovnovážné poloze $E_{el}(R_e)$ rovnu nule, bude i druhý člen rozvoje (derivace elektronové energie podle souřadnic), který se nazývá gradient, nulový a zůstane nám pouze kvadratický člen. S využitím substitucí

$$k = \left(\frac{d^2E_{el}}{dr^2}\right), \quad (1.27)$$

$$x = r - R_e, \quad (1.28)$$

lze poslední (kvadratický) člen Taylorova rozvoje 1.26 zapsat jako

$$E_{el} \approx \frac{1}{2} \left(\frac{d^2E_{el}}{dr^2}\right)(r - R_e)^2 = \frac{1}{2}kx^2. \quad (1.29)$$

Molekula s N atomovými jádry je popsána 3N kartézskými souřadnicemi ($x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N$). Pro vibrační pohyb zbývá 3N-6 souřadnic (pro lineární molekuly 3N-5), protože 3 souřadnice se využijí na popis translace a další 3 na popis rotace. S využitím Taylorova rozvoje lze zapsat potenciální energii v okolí minima jako

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\partial^2 E_{el}}{\partial x_i \partial x_j} x_i x_j = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{2} H_{ij} x_i x_j, \quad (1.30)$$

kde matice druhých derivací

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 E_{el}}{\partial x_i \partial x_j} \quad (1.31)$$

se nazývá Hessova matice, Hessián nebo harmonické silové pole. V energetickém minimu musí být Hessián pozitivně definitní, tzn. že jeho vlastní čísla musí být nezáporná. Pokud nahradíme kartézské souřadnice $(x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N)$ tzv. normálními módy $(q_1, q_2, \dots, q_{3N-6})$ lze potenciální energii v harmonické aproximaci zapsat jako

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{\partial^2 E_{el}}{\partial q_i^2} q_i^2. \quad (1.32)$$

Hessián má tedy v normálních módech tvar

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 E_{el}}{\partial q_i^2}. \quad (1.33)$$

Hamiltonián pro vibrace pak bude mít v normálních módech tvar

$$\hat{H}_{vib} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{\partial^2}{\partial q_i^2} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{\partial^2 E_{el}}{\partial q_i^2} q_i^2 = \sum_{i=1}^{3N-6} \hat{h}_i(q_i). \quad (1.34)$$

Ze vztahu 1.34 lze vidět, že celkový Hamiltonián se dá získat jako součet Hamiltoniánů pro jednotlivé normální módy. Zavedením normálních módů se zjednoduší výpočet harmonických frekvencí, které lze získat diagonalizací Hessiánu.

Schrödingerova rovnice se tak bude moci řešit zvlášť pro jednotlivé normální módy

$$\hat{h}_i \psi_i(q_i) = E_{vibr,i} \psi_i(q_i), \quad (1.35)$$

a celková energie bude dána součtem energií těchto normálních módů, které jsou rovny energiím harmonického oscilátoru

$$E_{vibr,i} = \left(n_i + \frac{1}{2} \right) h\nu_i, \quad (1.36)$$

kde ν_i je frekvence i -té vibrace

$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\partial^2 E_{el}}{\partial q_i^2}}. \quad (1.37)$$

Nevýhodou harmonické aproximace je, že uvažuje ekvidistantní vibrační hladiny a nepředpokládá rozštěpení chemických vazeb v molekule. Pro přesnější popis by se dal použít anharmonický Morseho oscilátor, kde se k sobě jednotlivé vibrační hladiny přibližují a při dosažení disociační energie se molekula rozštěpí. [8, 9]

1.5 *Ab initio* výpočetní metody

Ab initio výpočetní metody jsou kvantově-chemické výpočty, které numericky řeší Schrödingerovu rovnici. Název *ab initio* (z latinského „od počátku“) mají tyto metody proto, že k výpočtům je potřeba znát pouze základní fyzikální konstanty. Schrödingerova rovnice je řešena s využitím různých aproximací, kdy mezi nejznámější patří metoda Hartree-Fockova (HF) nebo metody založené na teorii elektronové hustoty (DFT). [4, 8]

1.5.1 Teorie elektronové hustoty

V dnešní době se většina kvantově-chemických výpočtů provádí s využitím metod založených na teorii elektronové hustoty. Co se týče výpočetní náročnosti, je tato metoda srovnatelná s Hartree-Fockovou metodou, výpočty jsou ale mnohem přesnější. Přesnost výpočtů je způsobená zahrnutím korelační (výměnné) energie. Tato energie je kvantovým jevem, vysvětluje se jako vzájemná korelace (ovlivňování) pohybu elektronů. DFT nepracuje s vlnovou funkcí, ale s elektronovou hustotou (hustotou elektrostatického náboje)

$$\psi(x_1, y_1, z_1, \sigma_1, x_2, \dots, z_N, \sigma_N) = \rho(x, y, z). \quad (1.38)$$

Vlnová funkce je komplexní a závislá na všech souřadnicích a spinech částic v molekule, zatímco elektronová hustota je závislá pouze na třech prostorových souřadnicích, z matematického hlediska je to tedy mnohem jednodušší objekt.

Základem teorie DFT je Hohenberg-Kohnův teorém, který říká, že vnější potenciál (potenciál vyjadřující v jakém vnějším poli se elektrony pohybují) je určen elektronovou hustotou. Ze znalosti potenciálu lze dopočítat Hamiltonián, vlnovou funkci a energii. Ty jsou jednoznačně určeny pouze elektronovou hustotou. Z toho plyne, že elektronová energie je jednoznačným funkcí elektronové hustoty. Tvar funkcionálu popisují Kohn-Shamovy rovnice.

Pro výpočty je na výběr velká škála DFT funkcionálů, které se liší přesností a výpočetní náročností. Mezi nejznámější patří hybridní funkcionál B3LYP (Becke, Lee, Yang, Paar), B3PW91 nebo čistý funkcionál BPW91 (Becke, Perdew, Wang).

Pro výpočty je také zapotřebí zadat bázi atomových orbitalů, která popisuje rozložení elektronů kolem molekuly. Gaussovské orbitály patří mezi nejrozšířenější. Jsou to Slaterovy orbitály (orbitály vodíkového typu) aproximované několika gaussovskými funkcemi. Minimální báze je STO-3G, jedná se o orbital Slaterova typu, který je aproximován třemi gaussovskými funkcemi. Báze 6-311++G** je vhodná pro výpočty elektromagnetických vlastností molekul, např. ROA a Ramanových spekter. Je doplněna polarizačními funkcemi (označené *) a difúzními funkcemi (označené +) jak pro těžké atomy, tak i vodík. [8, 9]

1.5.2 Modely rozpouštědla

Do výpočtu je důležité zahrnout i rozpouštědlo, protože působením molekul rozpouštědla na zkoumanou molekulu může dojít ke změně konformace molekuly, což se promítne do výsledných Ramanových a ROA spekter. Rozpouštědlo je možné zahrnout implicitně nebo explicitně, případně kombinací obojího.

V implicitním modelu se rozpouštědlo aproximuje kontinuem, zpravidla dielektrikem, které je definováno permitivitou. Prvním takovým modelem byl Onsagerův

model, kde byla molekula nahrazena bodovým dipólem a uzavřena do kulové dutiny. Rozpouštědlo, charakterizované permitivitou, se nacházelo vně této dutiny. Přesnější modely uvažují vzájemné působení rozpouštědla a studované molekuly. Studovaná molekula polarizuje obklopující rozpouštědlo, to na něj zpětně působí a vzniká tzv. reakční pole. V těchto modelech se navíc přesněji modeluje tvar kavity, ve které je molekula uzavřena. Pro výpočet reakčního pole se kavita rozdělí na malé plošky, na které jsou umístěny povrchové náboje. Tyto modely se nazývají PCM (polarizable continuum models). V COSMO modelu (conductor-like continuum solvent model) není rozpouštědlo aproximováno dielektrikem, ale dokonalým vodičem. Jeho implementací na model PCM vznikl CPCM model (conductor-like PCM).

V explicitním modelu je studovaná molekula obalena několika molekulami rozpouštědla. S takto zahrnutým rozpouštědlem jsou výpočty časově náročnější, zato přesnější. Může se zde projevit změna prostorového uspořádání molekuly vlivem přímého působení molekul rozpouštědla nebo dokonce vznik vodíkové vazby.

Oba dva způsoby zahrnutí rozpouštědla se dají kombinovat tak, že se studovaná molekula obalená několika molekulami rozpouštědla uzavře do dielektrické dutiny. [8, 9, 10]

1.5.3 Molekulová dynamika

K prozkoumání konformačního prostoru v čase se využívá klasická molekulová dynamika (MD), která je založena na numerickém řešení Newtonových pohybových rovnic

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad (1.39)$$

pro každou částici i v systému. Síla F_i , která působí na i -tou částici, se spočte jako derivace potenciální energie, kterou lze zapsat jako

$$E = \sum_{\text{vazby}} \frac{1}{2} k_i^{\text{bond}} (r_i - r_0)^2 + \sum_{\text{uhly}} \frac{1}{2} k_i^{\text{ang}} (\Theta_i - \Theta_0)^2 + \sum_{\text{torze}} \frac{1}{2} A_i^{\text{dih}} [1 + \cos(n_i \phi_i + \delta_i)] + \\ + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_i q_j}{R_{ij}} + \sum_i \sum_{j \neq i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{oopl}} k_i^{\text{oop}} s_i^2, \quad (1.40)$$

kde první dva členy představují harmonický potenciál, který popisuje změny energie při změně délek vazeb a deformaci vazebných úhlů, třetí popisuje změny energie spojené se změnou torzního (dihedrálního) úhlu, čtvrtý člen představuje Coulombovskou interakci, pátý Lennard-Jonesův potenciál (obsahuje odpudivou a přitažlivou sílu mezi atomy) a poslední je potenciál pro odchylky od roviny.

Parametry silového pole lze získat *ab initio* výpočty nebo z programů, které umožňují provádět MD simulace, jako je např. TINKER nebo AMBER. [7, 8, 9]

1.6 Základní postup výpočtu

Výpočty probíhají v několika krocích. Je potřeba zoptimalizovat geometrii molekuly, vypočítat silové pole, vibrační frekvence a spektrální intenzity.

1.6.1 Optimalizace

Prvním krokem při výpočtech Ramanových a ROA spekter je optimalizace geometrie dané molekuly. Při optimalizaci geometrie je hledáno lokální minimum na potenciální energetické ploše (PES). Potenciální energie molekuly se mění v závislosti na změnách struktury molekuly (např. při změně vazebné délky, vazebného či torzního úhlu). V minimu energie je gradient energie nulový a Hessián (1.31, 1.33) pozitivně definitní. Při minimalizaci energie je důležitá volba souřadného systému. Ukázalo se, že kartézský souřadný systém pro výpočty není většinou příliš vhodný a vhodnější je kvantově chemické výpočty provádět za využití redundantních vnitřních souřadnic. [11, 12] Optimalizace geometrie za využití vnitřních redundantních souřadnic je implementována v programu Gaussian 16. Je vhodná především pro systémy s kovalentní vazbou. Pro slabě vázané skupiny molekuly je konvergence optimalizace špatná kvůli numerickým nestabilitám, které jsou způsobeny velkým počtem násobení matic při přechodu mezi kartézskými a redundantními souřadnicemi. Pro tyto systémy je vhodnou volbou optimalizace v normálních módech, která je implementovaná v programu QGRAD [13]. Nízkofrekvenční módy odpovídající torzním pohybům molekuly a případně interakci s molekulami rozpouštědla jsou fixovány, zatímco spektroskopicky důležité módy (stretching a bending) mohou relaxovat. Podrobnější popis této metody a její výhody lze nalézt např. v článku [14]. Optimalizace v normálních módech byla využita pro klastry kyseliny askorbové a askorbátu sodného s explicitními molekulami vody. [7]

1.6.2 Výpočet silového pole

Silové pole je matice druhých derivací energie podle souřadnic atomových jader. Vztah pro její výpočet je uveden v kapitole č. 1.4.3 (rovnice č.1.31 a 1.33). Výpočet silového pole musí být proveden na stejné výpočetní úrovni jako optimalizace geometrie. V programu Gaussian 16 se výpočet silového pole provádí analyticky. Vibrační frekvence jsou vypočteny diagonalizací Hessiánu v normálních módech.

1.6.3 Výpočet intenzit

Výpočet intenzit Ramanových a ROA spekter může být proveden na nižší výpočetní úrovni než předcházející optimalizace a výpočet vibračních frekvencí. Příkladem je báze rDPS [15], která pro ROA spektra často dává dobré výsledky. Aby bylo možné aplikovat vztahy 1.3, 1.4 a 1.5 uvedené v kapitole č. 1.3 na Ramanův rozptyl a ROA, je potřeba vyjádřit jejich variaci v závislosti na pohybu jader, tzn. aspoň první derivaci podle normálních vibračních souřadnic. V případě fundamentálních přechodů $|0\rangle \rightarrow |1p\rangle$ chceme zjistit maticové elementy $\langle 0|\alpha|1\rangle$. K tomu se využívá Placzekova aproximace [16]. V této aproximaci je vlnová vibrační funkce aproximována vlnovou funkcí harmonického oscilátoru. Zároveň jsou v rozvoji podle vibrační souřadnice zanedbány členy s vyšší mocninou, než je jedna. Výsledné vztahy pro Ramanovu a ROA intenzitu jsou

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle\langle 1_p|\alpha_{\alpha\beta}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left(\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial q_p} \right) \left(\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial q_p} \right), \quad (1.41)$$

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle\langle 1_p|G'_{\alpha\beta}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left(\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial q_p} \right) \left(\frac{\partial G'_{\alpha\beta}}{\partial q_p} \right), \quad (1.42)$$

$$\langle 0|\alpha_{\alpha\beta}|1_p\rangle\langle 1_p|\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}A_{\alpha,\beta\gamma}|0\rangle = \frac{1}{2\omega_p} \left(\frac{\partial\alpha_{\alpha\beta}}{\partial q_p} \right) \varepsilon_{\alpha\gamma\delta} \left(\frac{\partial A_{\alpha,\beta\gamma}}{\partial q_p} \right), \quad (1.43)$$

kde q_p je normální vibrační souřadnice pro p -tý vibrační mód. [7]

Vypočtené Ramanovo a ROA spektrum je čárové. Toto spektrum se prokládá Lorentzovými křivkami o zadaných pološířkách.

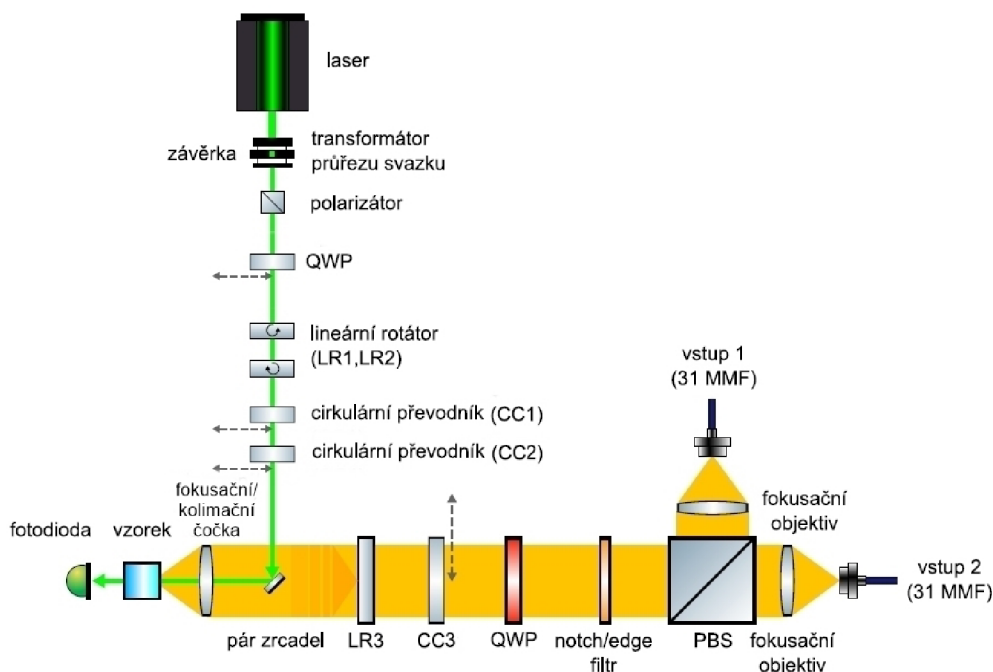
Kapitola 2

ROA spektrometr

Všechna měření v této diplomové práci byla provedena na Ramanově spektrometru, který byl postaven na katedře optiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jeho spektrální rozsah je $40 - 4500 \text{ cm}^{-1}$, schéma je zobrazeno na obrázku č. 2.1.

Během jednoho měření můžeme získat spektra pro modulační schémata SCP, DCP_I , DCP_{II} a ICP. Nevýhodou měření v ICP schématu je, že se intenzita rozptylu zaznamenává pro každý typ kruhové polarizace v jiný časový okamžik. Výhodou SCP je potlačení složky šumu, která se nazývá flicker noise, což přispívá ke zlepšení poměru signál-šum.

Geometrie experimentu je dána úhlem mezi dopadajícím a rozptýleným zářením. V současné době se nejvíce využívá geometrie zpětného rozptylu (180°), protože se ukázalo, že je při této geometrii intenzita ROA signálu nejvyšší. Spektrometr, na kterém bylo provedeno měření, využívá geometrii zpětného rozptylu. [4]



Obrázek 2.1: Schéma spektrometru pro měření ROA aktivity. Převzato a upraveno z [17].

Základem Ramanova spektrometru je zdroj monochromatického záření, kterým je laser o vlnové délce 532 nm. Záření prochází sestavou optických prvků upravující jeho polarizační stav. Po dopadu excitačního záření na vzorek dochází k jeho rozptylu a rozptýlené Ramanovo záření poté prochází optickou sestavou do spektrografu. K modulaci polarizačního stavu dopadajícího monochromatického záření na vzorek i k úpravě rozptýleného polychromatického záření ze vzorku se využívá celá řada optických komponent. Část spektrometru, která slouží k přenosu monochromatického záření ze zdroje na vzorek, je tvořena závěrkou, transformátorem průřezu svazku, lineárním polarizátorem, čtvrtvlnnou destičkou, dvojicí protiběžných lineárních rotátorů (dvě půlvlnné destičky), dvěma cirkulárními převodníky (půlvlnné destičky), dvojicí zrcadel a fokusačním objektivem, který záření fokusuje do vzorku. Část spektrometru, která slouží k přenosu rozptýleného záření ze vzorku na vstup spektrografu, je tvořena objektivem, který kolimuje rozptýlené záření, lineárním rotátorem, cirkulárním převodníkem, retardační deskou, notch/edge filtrem, polarizačním děličem svazku a v každé větvi polarizačního děliče fokusačním objektivem a vstupem optických vláken, které rozptýlené záření převedou do spektrografu.

Některé optické prvky v ROA spektrometru mohou být do optické dráhy zasunuty podle potřeby. Takovým prvkem je např. čtvrtvlnná destička, která je do optické dráhy excitačního záření zasunuta, pokud je potřeba mít kruhově polarizované záření, tedy při měření v modulačním schématu DCP. Podobně je tomu u dvou cirkulárních převodníků, které jsou také do optické dráhy zasouvány podle potřeby při měření v modulačním schématu DCP.

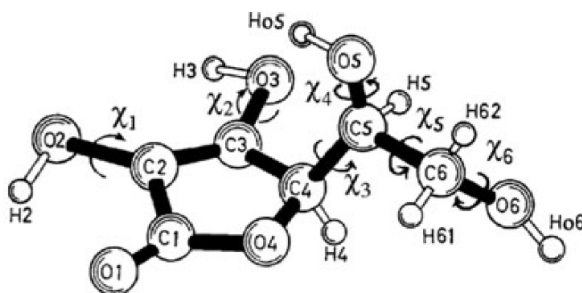
Kapitola 3

Kyselina askorbová

Kyselina L-askorbová neboli vitamin C je organická sloučenina dobře rozpustná ve vodě, ve které tvoří slabě kyselý roztok. Její sumární vzorec je $C_6H_8O_6$ a její molární hmotnost 176,12 g/mol. Vyskytuje se ve formě bílého krystalického prášku. Patří mezi deriváty glukózy. Rada zvířat je schopna si vitamin C sama syntetizovat. U lidí tomu tak není a je potřeba přijímat vitamin C ze stravy. Přispívá k normální činnosti nervové soustavy, ke správné funkci imunitního systému, podílí se na tvorbě kolagenu, hormonů a snižuje hladinu cholesterolu. Nedostatek vitamínu C se projevuje nemocí zvanou kurděje. Vitamin C je významný antioxidant. Toho se využívá v potravinářském průmyslu, kdy se využívá k prodloužení trvanlivosti potravin, kde zabráňuje oxidaci tuků nebo slouží jako konzervant a napomáhá k zachování barvy.

3.1 Konformace

Kyselina askorbová je chirální molekula, která má dvě chirální centra. Prvním z nich je uhlík C4, který má konfiguraci R. Druhým z nich je uhlík C5, který má konfiguraci S. Na obrázku č. 3.1 je schéma kyseliny askorbové s očíslovanými atomy a vyznačenými torzními úhly. V tabulce č. 3.1 jsou zdefinované torzní úhly vyznačené na obrázku č. 3.1.



Obrázek 3.1: Kyselina askorbová s vyznačenými torzními úhly a očíslovanými atomy. Převzato z [18].

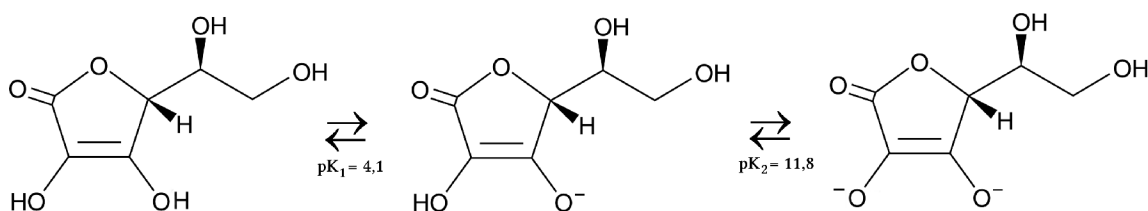
Tabulka 3.1: Zadefinované torzní úhly vyznačené na obrázku č. 3.1 podle článku [18].

χ_1	C1-C2-O2-H2
χ_2	C2-C3-O3-H3
χ_3	C3-C4-C5-O5
χ_4	C4-C5-O5-H _{O5}
χ_5	C4-C5-C6-O6
χ_6	C5-C6-O6-H _{O6}

Výchozí konformace, která byla modelována v MCM95, byla vytvořena podle hodnot vazebných délek, vazebných a torzních úhlů podle článku [18].

3.2 Protonované formy

Kyselina askorbová (AH_2) je dvojsytná kyselina. Má dvě disociační konstanty pK_1 v rozmezí 4,1 - 4,25 a pK_2 v rozmezí 11,5 - 11,79. (obrázek č. 3.2). [18] V roztocích o fyziologických hodnotách pH se vyskytuje převážně jako anion (AH^-), známý jako sodná sůl kyseliny askorbové, askorbát sodný nebo askorban sodný. V této diplomové práci bylo používáno označení askorbát sodný. V literatuře [18] se uvádí, že u nejstabilnější formy askorbátu sodného při deprotonaci dochází k odštěpení H3. V silně zásaditých roztocích se vyskytuje jako dianion (A^{2-}). U této formy dochází k deprotonaci u kyslíků O3 a O2.



Obrázek 3.2: Různě protonované formy kyseliny askorbové.

3.3 Rozpustnost v různých rozpouštědlech

Rozpouštědla pro měření se vybírala podle maximální rozpustnosti, která byla studována pro kyselinu askorbovou podle článku [21] a pro askorbát sodný podle článku [22]. Mezi rozpouštědla, pro které má kyselina askorbová nejvyšší rozpustnost patří voda, metanol, etanol a propan-2-ol. Pro askorbát sodný voda a metanol.

Rozpustnost x je definována jako

$$x = \frac{n_0}{n_0 + n_s} = \frac{\frac{m_0}{M_0}}{\frac{m_0}{M_0} + \frac{m_s}{M_s}}, \quad (3.1)$$

kde n představuje látkové množství, m hmotnost, M molární hmotnost, index 0 označuje kyselinu askorbovou, případně askorbát sodný a index s označuje rozpouštědlo.

Rozpustnost x závisí na teplotě podle vzorce

$$\ln x = A + B(T/K), \quad (3.2)$$

kde A a B jsou konstanty, které se liší pro jednotlivá rozpouštědla a T/K teplota v Kelvinech. Rozpustnost pro jednotlivá rozpouštědla je uvedena v tabulce č. 3.2, kde byla dopočítána maximální dosažitelná koncentrace.

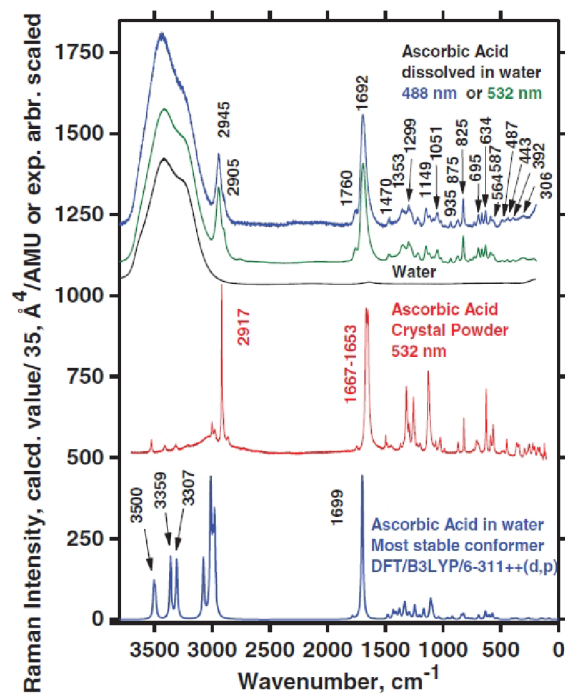
Tabulka 3.2: Rozpustnost pro kyselinu askorbovou a askorbát sodný v jednotlivých rozpouštědlech pro teplotu 25°C (298 K).

	Rozpouštědlo	A	B	Rozpustnost	Koncentrace [M]
Kyselina askorbová	voda	-11,698	0,0278	$32,92 \cdot 10^{-3}$	1,92
Kyselina askorbová	metanol	-10,033	0,0204	$19,18 \cdot 10^{-3}$	0,62
Kyselina askorbová	etanol	-14,588	0,0323	$6,99 \cdot 10^{-3}$	0,15
Kyselina askorbová	propan-2-ol	-20,152	0,0469	$2,08 \cdot 10^{-3}$	0,03
Askorbát sodný	voda	-	-	$64 \cdot 10^{-3}$	3,83
Askorbát sodný	metanol	-	-	$0,43 \cdot 10^{-3}$	0,01

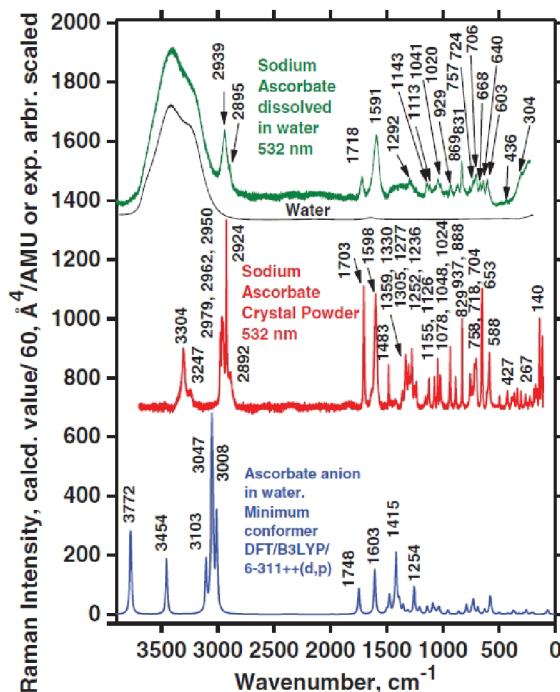
3.4 Ramanova spektra

V této kapitole jsou ukázána Ramanova spektra z článku [18]. Tento článek shrnuje a dále rozšiřuje dřívější publikace, např. [19] nebo [20]. V tomto článku byla pozornost věnována pouze Ramanovým spektrům, ROA spektra nebyla naměřena. Ramanova spektra byla navíc počítána pro nalezení preferované konformace bez využití molekulové dynamiky. Ramanova spektra z článku [18] pro kyselinu askorbovou jsou zobrazena na obrázku č. 3.3 a pro askorbát sodný na obrázku č. 3.4.

V obou případech není shoda s experimentálním spektrem příliš uspokojivá, jsou patrné odlišnosti ve tvarech, ale i intenzitách jednotlivých pásů. U kyseliny askorbové je v experimentálním spektru výrazný pás okolo 825 cm^{-1} , který ve vypočteném spektru není zdaleka tak výrazný. Totéž platí pro pás u askorbátu sodného, který je v naměřeném spektru okolo 831 cm^{-1} . Ve vypočteném spektru pro askorbát sodný je oproti experimentálnímu spektru navíc výrazný pás 1415 cm^{-1} .



Obrázek 3.3: Ramanova spektra pro kyselinu askorbovou uvedená v článku [18]. Nejdříve jsou zobrazena Ramanova spektra získaná z měření kyseliny askorbové rozpuštěné ve vodě s využitím dvou různých excitačních délek 488 a 532 nm a spektrum pro vodu. Uprostřed je zobrazeno spektrum z měření, kdy byla měřena kyselina askorbová v prášku. Nakonec je zobrazeno vypočtené Ramanovo spektrum pro nejstabilnější a nejvíce pravděpodobný konformer.



Obrázek 3.4: Ramanova spektra pro askorbát sodný uvedená v článku [18]. Nejdříve je zobrazeno Ramanovo spektrum získané z měření askorbátu sodného rozpuštěného ve vodě s využitím excitační délky 532 nm a spektrum vody. Uprostřed je zobrazeno spektrum z měření, kdy byla měřena askorbát sodný v prášku. Nakonec je zobrazeno vypočtené Ramanovo spektrum.

Kapitola 4

Cíle práce

V následujících bodech jsou shrnuty cíle této diplomové práce:

- Provést měření Ramanových spekter kyseliny askorbové v závislosti na pH a spektra statisticky zpracovat, vyhodnotit procentuální zastoupení různě protonovaných složek v závislosti na pH
- Provést měření Ramanových spekter a spekter Ramanovy optické aktivity kyseliny askorbové při nízkém a při neutrálním pH (sodná sůl kyseliny askorbové)
- Provést *ab initio* simulace spekter, provést prozkoumání konformačního prostoru, případně i za využití molekulární dynamiky a srovnat spektra s experimentem
- Provést syntézu získaných dat a vyhodnotit informace o konformačním chování molekuly

Kapitola 5

Metodika

5.1 Metodika simulací spekter

V této práci byly počítány dvě formy v závislosti na pH, kyselina askorbová a askorbát sodný. Postup je podrobněji popsán pro kyselinu askorbovou, pro askorbát sodný byl obdobný.

Molekula kyseliny askorbové byla modelována v programu MCM95 [23]. Vazebné délky, úhly a torze byly nastaveny podle struktury, která byla uvedena v článku [18] jako jejich nejlepší. Geometrie molekuly byla optimalizována s využitím funkcionálu BPW91 a báze 6-31++G** v programu Gaussian 16 [24]. Vliv vody byl zahrnut prostřednictvím implicitního modelu CPCM. Výpočet vibračních frekvencí byl proveden na stejné výpočetní úrovni.

Pro 6 vybraných torzních úhlů byl proveden PES sken plochy potenciální energie, pro dva z nich i 2D sken. Každý torzní úhel byl měněn v intervalu 0 - 360° s krokem 5°. V tabulce č. 5.1 jsou uvedeny hodnoty jednotlivých torzních úhlů pro výchozí strukturu molekuly kyseliny askorbové a v tabulce č. 5.2 pro askorbát sodný. Výchozí struktura molekuly kyseliny askorbové byla nastavena podle článku [18]. Hodnoty v tabulce č. 5.1 jsou uvedeny po přeoptimalizaci na námi zvolené výpočetní úrovni BPW91/CPCM/6-31++G**.

Tabulka 5.1: Torzní úhly pro výchozí strukturu molekuly kyseliny askorbové, ze které byly provedeny jednotlivé PES skeny.

χ_1 [°]	χ_2 [°]	χ_3 [°]	χ_4 [°]	χ_5 [°]	χ_6 [°]
0	0	50	92	-80	68

PES sken byl proveden proto, aby byla mohla být identifikována všechna možná PES minima, která odpovídají možným stabilním konformerům, které je potřeba zahrnout při simulacích spekter. Z vybraných geometrií s relativní energií menší jak 2,5 kcal/mol generovaných při 2D skenu (χ_1 , χ_2) byla spočtena Ramanova a ROA spektra. Spektra byla počítána jako Boltzmannovský průměr s využitím vztahu

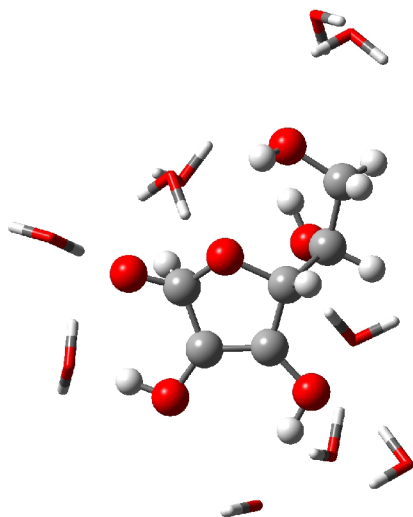
$$\exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right), \quad (5.1)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T termodynamická teplota a ΔE rozdíl energií daného konformeru a energie konformeru s nejnižší energií. Podrobnější popis s

výslednými průběhy energií pro jednotlivé torzní úhly i výslednými spektry je v kapitole č. 6.2.1.

S využitím molekulové dynamiky byly do výpočtů zahrnuty explicitní molekuly rozpouštědla - vody. Byla využita molekulová dynamika programu AMBER 14 [25] a bylo použito silové pole GAFF a TIP3P pro molekuly vody. Chybějící parametry byly dopočítány pomocí pop=MK a vygenerovány pomocí skriptu antechamber v programu AMBER 14. Nejdříve proběhla minimalizace samotné molekuly kyseliny askorbové, poté byl vytvořen kubický box o délce strany 20 Å, což odpovídá 267 molekulám vody při hustotě 1000 kg/m³. Tento počet byl snížen na 262, protože část objemu boxu je vyplněna molekulou kyseliny askorbové. Potom proběhla minimalizace boxu. Na jeho okrajích byly zajištěny periodické okrajové podmínky a nechal se vyvíjet jako kanonický (tzn. o konstantní teplotě a objemu, značí se NVT). Při minimalizaci boxu byla molekula kyseliny askorbové částečně fixována, aby se zamezilo nežádoucí změně geometrie molekuly. K tomu byla využita dodatečná síla, tzv. restraint, o velikosti 5 kcal mol⁻¹ Å⁻². Poté následovala ekvilibrace. Opět byla molekula kyseliny askorbové částečně fixována, tentokrát silou 2 kcal mol⁻¹ Å⁻². Box s molekulou kyseliny askorbové byl ekvilibrován při teplotě 300 K po dobu 10 ns (10 000 000 kroků po 1 fs). Nakonec následoval produkční běh při teplotě 300 K po dobu 100 ns (100 000 000 kroků po 1 fs). V této fázi již molekula nebyla fixována. Z produkčního běhu molekulové dynamiky bylo uloženo 100 000 geometrií.

Z tohoto počtu geometrií bylo vybráno ekvidistantně 400 geometrií, které byly použity k výpočtu spekter. Pomocí programu Xshell [26] byl okolo molekuly kyseliny askorbové vytvořen výřez první solvatační sféry, zahrnuty byly všechny molekuly vody ve vzdálenosti menší než 3,6 Å. Průměrný počet vod okolo molekuly kyseliny askorbové byl 10, příklad klastru je na obrázku č. 5.1.



Obrázek 5.1: Klastr kyseliny askorbové s 10 explicitními molekulami vody.

Klastry byly optimalizovány metodou částečné optimalizace v normálních módech. Pro každý klastr byl nejdříve proveden výpočet vibračních frekvencí na nižší úrovni HF/CPCM/6-31G*. Poté bylo na stejné úrovni vypočteno silové pole a proběhla optimalizace v normálních módech na této nižší úrovni z důvodu urychlení výpočtu. Až byla dosažena konvergence (pro zadané parametry: glimit = 0,01, qmax = 0,4), tak byl proveden opět výpočet silového pole a optimalizace v normálních módech, ale již na vyšší úrovni (BPW91/CPCM/6-31++G**) a následně na stejné úrovni vypočteny

vibrační frekvence a spektrální intenzity pro ROA a Ramanův rozptyl pro excitační vlnovou délku 532 nm. Výsledné spektrum bylo vypočteno jako aritmetický průměr všech 400 spekter pro jednotlivé geometrie (klastry).

Výpočet molekulové dynamiky byl proveden rovněž pro kyselinu askorbovou v metanolu. Byl vytvořen box o straně 20 Å, což při hustotě 791 kg/m³ odpovídá 118 molekulám metanolu. Tento počet byl upraven na 113 kvůli následnému přidání molekuly kyseliny askorbové. Postup při výpočtu MD byl stejný jako u vody. Ze 100 000 geometrií získaných z produkčního běhu molekulové dynamiky bylo vybráno ekvidistantně 100 geometrií, pro které byla vypočtena spektra. Byly vytvořeny klastry s metanolem, tedy byly přidány všechny molekuly metanolu ve vzdálenosti menší než 2,7 Å. Průměrný počet molekul metanolu okolo molekuly kyseliny askorbové byl 5.

Při generování spekter byl využit Lorentzovský profil spektrální čáry. Šířka v polovině maxima (FWHM) byla nastavena na 10 cm⁻¹. Teplota byla zvolena 300 K.

Pro askorbát sodný byl postup při výpočtech identický. V tabulce č. 5.2 jsou uvedeny hodnoty jednotlivých torzních úhlů pro výchozí strukturu askorbátu sodného, ze kterého byly provedeny jednotlivé PES skeny.

Při výpočtech MD byl vytvořený box neutralizován přidáním atomem sodíku.

Tabulka 5.2: Torzní úhly pro výchozí strukturu molekuly askorbátu sodného, ze které byly provedeny jednotlivé PES skeny.

χ_1 [°]	χ_3 [°]	χ_4 [°]	χ_5 [°]	χ_6 [°]
-1	-58	38	-173	45

5.2 Realizace experimentu

Vzorek kyseliny askorbové (L-Ascorbic acid A92902-25G) i askorbátu sodného ((+)-Sodium L-ascorbate 11140-50G) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Kyselina askorbová i askorbát sodný byly rozpuštěny v různých rozpouštědlech a byla změřena jejich Ramanova spektra. Při přípravě vzorků bylo zvoleno množství vzorku odpovídající maximální rozpustnosti (tabulka č. 3.2). Ne vždy se ale veškerý vzorek rozpustil, proto není známá přesná koncentrace.

V tabulce č. 5.3 jsou uvedena rozpouštědla, ve kterých byla rozpuštěna kyselina askorbová. Dále je v této tabulce uvedena hustota rozpouštědla, koncentrace vzorku a výkon laseru. Pro askorbát sodný jsou tyto informace uvedeny v tabulce č. 5.4.

K vážení byly využity analytické váhy (Adam Equipment), které umožňují vážení s přesností 0,1 mg. Vzorky byly měřeny v křemenné tenkostěnné kyvetě (Starna Scientific, Ltd.) o rozměrech 3x4 mm a o vnitřním objemu přibližně 100 μ l, která byla při měření umístěna v teplotní cele.

Pro měření Ramanových spekter pro případy, uvedené ve dvou výše uvedených tabulkách, stačilo přibližně 10 minut. Výjimkou byl 0,01M askorbát sodný, který byl měřen přes noc.

Pro kyselinu askorbovou a askorbát sodný rozpuštěné ve vodě byla proměřena i ROA spektra, která vyžadovala výrazně delší čas měření než Ramanova spektra. V tabulce č. 5.5 jsou uvedeny koncentrace vzorků, výkon laseru a expoziční doba pro tato měření.

Tabulka 5.3: Rozpouštědla, ve kterých byl rozpuštěn vzorek kyseliny askorbové a jejich hustoty. Dále je uvedena koncentrace vzorku a výkon laseru při měření Ramanových spekter.

Rozpouštědlo	Hustota rozpouštědla [kg/m ³]	Koncentrace [M]	Výkon [mW]
Voda	1	1,92	500
Metanol	0,792	< 0,62	900
Etanol	0,789	< 0,15	500
Propan-2-ol	0,786	< 0,03	500

Tabulka 5.4: Rozpouštědla, ve kterých byl rozpuštěn vzorek askorbátu sodného a jejich hustoty. Dále je uvedena koncentrace vzorku a výkon laseru při měření Ramanových spekter.

Rozpouštědlo	Hustota rozpouštědla [kg/m ³]	Koncentrace [M]	Výkon [mW]
Voda	1	3,83	500
Metanol	0,792	< 0,01	900

Tabulka 5.5: Koncentrace vzorků, výkon laseru a expoziční doba pro měření ROA spekter kyseliny askorbové a askorbátu sodného rozpuštěných ve vodě.

	Koncentrace [M]	Výkon [mW]	Celková expoziční doba [hod]
Kyselina askorbová	0,5	700	5,84
Askorbát sodný	0,5	700	5,297

Intenzitní kalibrace byla provedena pomocí wolframové halogenové lampy, kalibrace vlnočtů pomocí neonové výbojky. Naměřená spektra byla upravena Savitzky-Golayovým pětibodovým vyhlazením 3. řádu kvůli potlačení šumu.

Naměřená Ramanova spektra bylo potřeba upravit. Především bylo nutné odečíst spektrum rozpouštědla a poté provést korekci pozadí (baseline). Jednou z možností korekce pozadí je vlastní výběr nulových bodů a proložení polynomem 5. řádu. Další možností je metoda ALSS (Assymetric Least Squares Smoothing algorithm). [27]

5.3 Titrační měření

Cílem titračního měření Ramanových spekter kyseliny askorbové rozpuštěné ve vodě v závislosti na pH bylo ověření toho, že při zvyšování pH lze získat její různě protonované formy (AH_2 , AH^- a A^{2-}).

Změřená spektra pro jednotlivé vzorky o různém pH jsou superpozicí spekter různě protonovaných forem. Ke zpracování dat byla využita faktorová analýza, což je statistická metoda, která umožňuje redukovat dimenzi studovaného problému. Konkrétně

byl využit algoritmus SVD (singular value decomposition) [28]

$$Y_i(\nu_k) = \sum_{j=1}^N W_j V_{ij} S_j(\nu_k). \quad (5.2)$$

Jednotlivá naměřená spektra $Y_i(\nu_k)$, kterých je celkem N , tvoří matici Y . Tato matice je pomocí SVD rozkladu rozložena do normalizovaných spektrálních profilů označovaných jako subspektra. Tato subspektra $S_j(\nu_k)$ tvoří matici S . Prvky V_{ij} matice V vyjadřují obsah jednotlivých subspekter v naměřeném spektru. Matice W je diagonální a určuje statistickou váhu jednotlivých subspekter, její prvky W_j jsou označovány jako singulární hodnoty. Z výsledku SVD lze získat hlavní informace omezením se na $M < N$ prvních členů. Hodnota M se nazývá faktorová dimenze analyzovaných dat a bývá volena podle počtu nezávislých složek studovaného systému. V případě kyseliny askorbové byla $M = 3$, protože kyselina askorbová má tři různé složky (AH_2 , AH , A^{2-}). Lze ji také zjistit např. ze singulární hodnoty W_j , která vyjadřuje relativní váhu subspektra vůči ostatním subspektrům. Pokud je váha dané singulární hodnoty oproti předchozím malá, dané spektrum není potřeba uvažovat, protože by nepřineslo žádnou novou informaci. Další možností, jak zjistit faktorovou dimenzi je využití směrodatné odchylky

$$E = \sqrt{\frac{\sum_{j=M+1}^N W_j^2}{K(N-M)}}, \quad (5.3)$$

kde K označuje počet bodů spektra. Směrodatná odchylka vyjadřuje rozdíl mezi naměřeným spektrem a spektrem, které bylo získáno z určitého počtu subspekter. Pokud je její hodnota malá, dané spektrum není potřeba uvažovat. [29, 30]

Naměřená spektra lze přepsat jako superpozice spekter čistých forem $Z_n(\nu_k)$

$$Y_i(\nu_k) = \sum_{n=1}^M \gamma_{in} Z_n(\nu_k), \quad (5.4)$$

kde M je faktorová dimenze a γ_{in} molární koncentrace n -té formy v i -tém spektru.

Spektra čistých forem jsou lineární kombinací subspekter $S_j(\nu_k)$

$$Z_n(\nu_k) = \sum_{j=1}^M C_{nj} S_j(\nu_k). \quad (5.5)$$

Koeficienty C_{nj} lze vypočítat ze vztahu

$$\sum_{j=1}^M \gamma_{in} C_{nj} = W_j V_{ij}. \quad (5.6)$$

Dosazením koeficientů C_{nj} do rovnice 5.5 lze získat spektra čistých forem $Z_n(\nu_k)$.

Disociační konstanty pK lze vypočítat s využitím Henderson-Hasselbachovy rovnice, která provazuje různě protonované formy

$$pH = pK + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right), \quad (5.7)$$

kde $[A^-]$ označuje koncentraci disociované formy a $[HA]$ koncentraci protonované formy. [29, 30]

5.4 Rozklad spekter

Experimentálního spektra askorbátu sodného bylo rozloženo do spekter vypočtených pro jeho tři různé uvažované formy. Před samotným rozkladem jsou frekvence vypočtených spekter naškálována tak, aby lépe odpovídala frekvencím experimentálního spektra. Často bývá využíváno lineární škálování. My zvolili přístup, kdy jsme přiřadili zjevně si odpovídající pásy z experimentu a výpočtu, zadefinovali přiřazovací tabulku (tabulka č. 5.6) a frekvence vypočtených spekter byly neekvidistantně posunuty.

Tabulka 5.6: Přiřazovací tabulka využitá při rozkladu experimentálního spektra askorbátu sodného do vypočtených spekter.

Experimentální spektrum	Vypočtené spektrum
1719	1708
1295	1263
1141	1104
1043	1016
931	903
831	792
604	563
307	310

Rozklad experimentálního spektra do i vypočtených spekter lze zapsat jako

$$S_{exp}(\omega) = \sum_i c_i S_i(\omega), \quad (5.8)$$

kde S_{exp} značí experimentální spektrum, S_i i -té vypočtené spektrum a c_i koeficienty. Pro koeficienty c_i platí, že jsou nezáporné a jejich součet je roven jedné. Tyto koeficienty lze získat minimalizací funkce

$$\delta = \int_{\omega_{min}}^{\omega_{max}} d\omega [S_{exp}(\omega) - c_i S_i(\omega)]^2, \quad (5.9)$$

kde $(\omega_{min}, \omega_{max})$ je použití spektrální rozsah. My zvolili rozsah 200 - 1800 cm^{-1} . [31, 32]

Kapitola 6

Výsledky a diskuze

6.1 Titrační měření

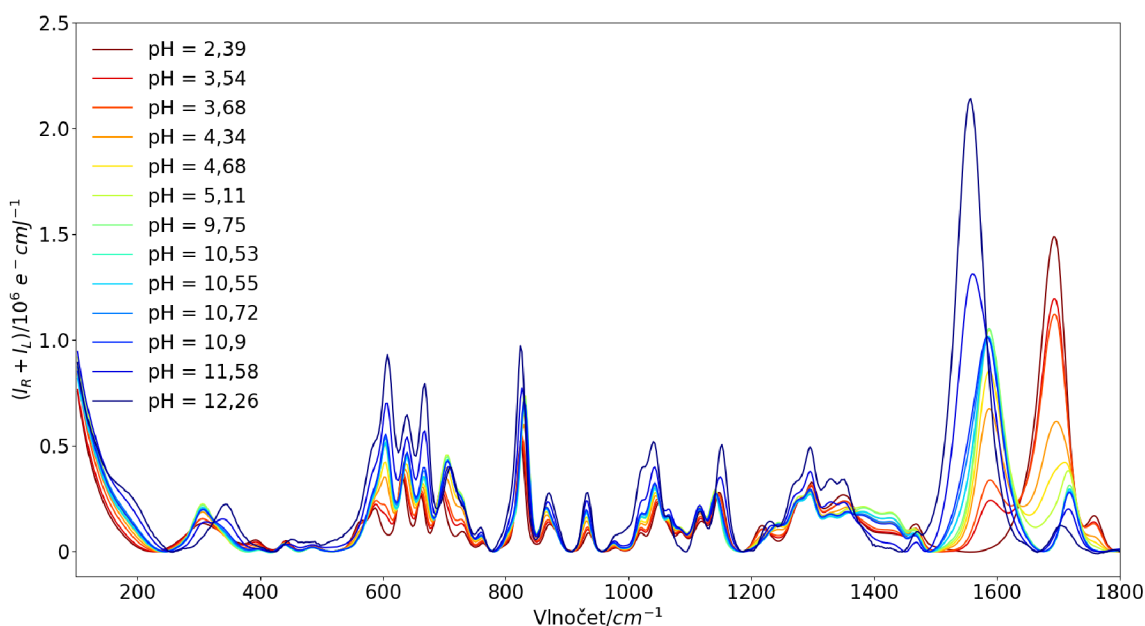
Cílem titračního měření Ramanových spekter kyseliny askorbové rozpuštěné ve vodě v závislosti na pH bylo ověření toho, že při zvyšování pH lze získat její různě protonované formy (AH_2 , AH^- a A^{2-}).

Vzorky pro měření byly připravovány tak, že byly tvořeny 100 μl 0,5M kyseliny askorbové ve vodě. Poté se přidal 100 μl roztok vody a 1M hydroxidu sodného v různých poměrech, čímž se docílilo různých pH vzorků, které jsou uvedeny v tabulce č. 6.1. Vzorky o vyšším pH (okolo 12), které odpovídají složce A^{2-} byly nestabilní a žlutly. Hodnoty pH byly měřeny pomocí pH metru (Thermo Scientific™ Orion™ PerpHecT™ ROSS™ 8220BNWP) s mikroelektrodou.

Tabulka 6.1: Jednotlivé vzorky o různém pH tvořené 100 μl 0,5M kyseliny askorbové rozpuštěné ve vodě, které byly ředěny 100 μl roztokem vody a 1M hydroxidu sodného.

Číslo vzorku	V(H_2O) [μl]	V(NaOH) [μl]	pH vzorku
1	100	0	2,39
2	90	10	3,54
3	80	20	3,68
4	70	30	4,34
5	60	40	4,68
6	50	50	5,11
7	51	49	9,75
8	49	51	10,55
9	47,5	52,5	10,53
10	45	55	10,72
11	40	60	10,9
12	20	80	11,58
13	0	100	12,26

Na obrázku č. 6.1 jsou zobrazena naměřená Ramanova spektra pro vzorky z tabulky č. 6.1. Z tohoto obrázku je patrné, že se změnou pH dochází k posunu jednotlivých pásů a rovněž ke změně jejich intenzit.



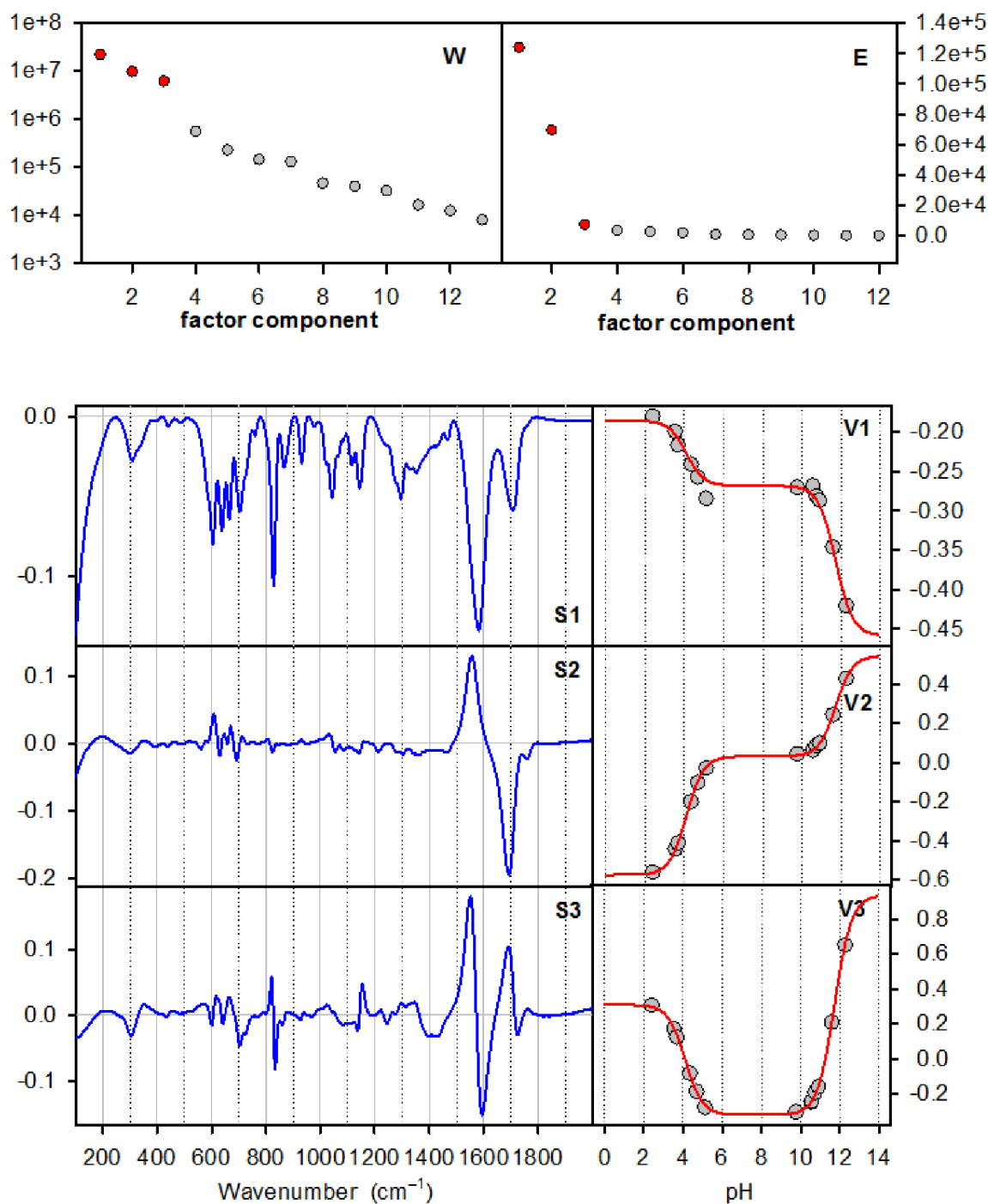
Obrázek 6.1: Ramanova spektra pro jednotlivé vzorky z tabulky č. 6.1.

Na obrázku č. 6.2 jsou zobrazeny výsledky faktorové analýzy pro 13 naměřených vzorků o různém pH. Vlevo nahoře je zobrazena statistická váha W jednotlivých subspekter v závislosti na pořadovém čísle subspektra. Vpravo nahoře je průběh směrodatné odchylky E v závislosti na počtu subspekter. Vlevo dole jsou zobrazena první tři subspektra ($S_1 - S_3$) a vpravo dole normalizované koeficienty V_{ij} ($V_1 - V_3$) v závislosti na pH. Z průběhu směrodatné odchylky i statistické váhy lze ověřit, že faktorová dimenze je opravdu $M = 3$, což bylo předpokládáno ze znalosti toho, že kyselina askorbová má tři různě protonované formy.

Z faktorové analýzy získáno relativní zastoupení různě protonovaných forem kyseliny askorbové v závislosti na pH včetně disociačních konstant, což lze vidět na obrázku č. 6.3. Jejich vypočtené hodnoty jsou $pK_1 = 4,11$ a $pK_2 = 11,72$. Tyto hodnoty jsou konzistentní s literaturou [18], ve které se uvádí pK_1 mezi 4,1 a 4,25 a pK_2 mezi 11,5 a 11,79.

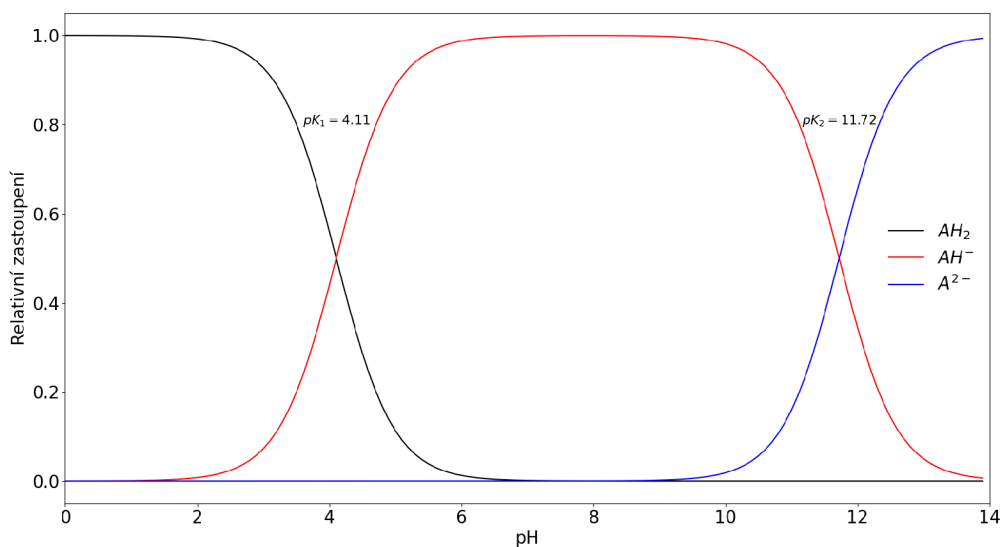
Z faktorové analýzy byla rovněž získána spektra pro jednotlivé čisté formy kyseliny askorbové (AH_2 , AH^- , A^{2-}), která jsou zobrazena na obrázku č. 6.4. U jednotlivých spekter je patrné, že se odlišují posunem vlnocetů a také intenzitou pásů. V této práci byla věnována pozornost kyselině askorbové (AH_2) a askorbátu sodnému (AH^-). V oblasti $550 - 800 \text{ cm}^{-1}$ je patrná změna u prvního z pásů, kdy u spektra pro AH_2 je tento pás široký, tvořený dvěma pásy o podobné intenzitě, kdežto u spektra pro AH^- je tento pás jeden a o přibližně dvakrát vyšší intenzitě. U spektra pro AH^- je okolo 706 cm^{-1} širší pás, který je tvořen dvěma pásy, u spektra pro AH_2 je již tento pás rozdělen na dva. Okolo 1066 cm^{-1} má AH^- pás, který se nevyskytuje u AH_2 . V oblasti $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ jsou dva širší pásy u sebe. V případě AH^- je druhý z pásů dvakrát až třikrát širší než v případě AH_2 . V oblasti $1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ jsou dva pásy, kdy první z nich má vyšší intenzitu. U AH^- jsou tyto dva pásy oddělené, u AH_2 spojené.

Spektrum pro první vzorek s nejnižším pH (2,39), zobrazené na obrázku č. 6.1, je v dobré shodě se spektrem pro AH_2 z obrázku č. 6.4. To samé lze říci o spektru pro poslední vzorek o nejvyšším pH (12,26), který je v dobré shodě se spektrem pro A^{2-} . Změřená spektra na rozdíl od spekter čistých forem z obrázku č. 6.4 neobsahují pouze jednu formu. První vzorek o pH 2,39 kromě formy AH_2 obsahuje i formu AH^- . Podobně

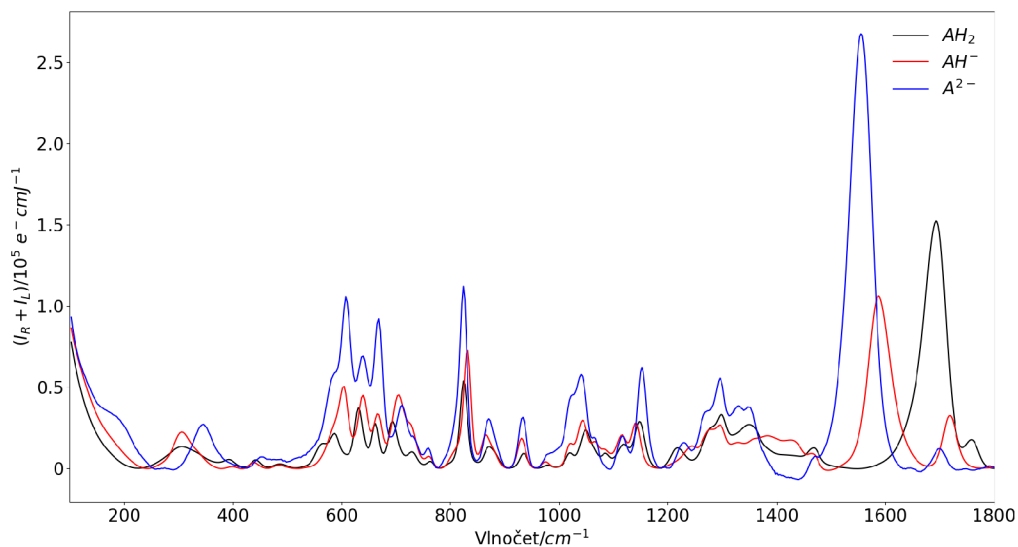


Obrázek 6.2: Výsledky faktorové analýzy pro 13 naměřených vzorků o různém pH. Vlevo nahoře je zobrazena statistická váha W jednotlivých subspekter v závislosti na pořadovém čísle subspektra. Vpravo nahoře je průběh směrodatné odchylky E v závislosti na počtu subspekter. Vlevo dole jsou zobrazena první tři subspektra ($S_1 - S_3$) a vpravo dole normalizované koeficienty V_{ij} ($V_1 - V_3$) v závislosti na pH.

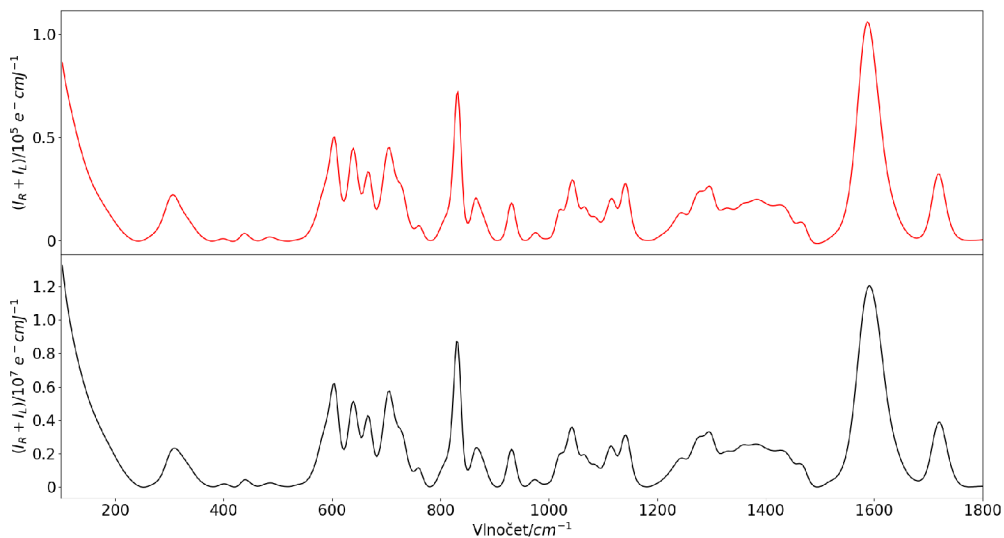
je tomu u posledního vzorku o pH 12,26, který kromě formy A^{2-} obsahuje i formu AH^- . Na obrázku č. 6.5 je červeně zobrazeno spektrum pro formu AH^- z obrázku č. 6.4, tedy spektrum pro askorbát sodný získané titrací, ve srovnání se změřeným spektrem pro askorbát sodný ve vodě. Tato spektra jsou ve výborném souladu.



Obrázek 6.3: Relativní zastoupení tautomerů kyseliny askorbové v závislosti na pH.



Obrázek 6.4: Ramanova spektra pro tři čisté formy kyseliny askorbové.



Obrázek 6.5: Porovnání Ramanova spektra pro čistou formu AH^- získanou titrací (červené spektrum) a spektra pro askorbát sodný rozpuštěný ve vodě.

6.2 Kyselina askorbová

Na úvod byl prozkoumán konformační prostor molekuly kyseliny askorbové pomocí skenů potenciální energie, aby byla nalezena lokální minima. Dále byla k prozkoumání konformačního prostoru využita molekulová dynamika s explicitními molekulami vody a také metanolu.

6.2.1 Analýza torzních úhlů

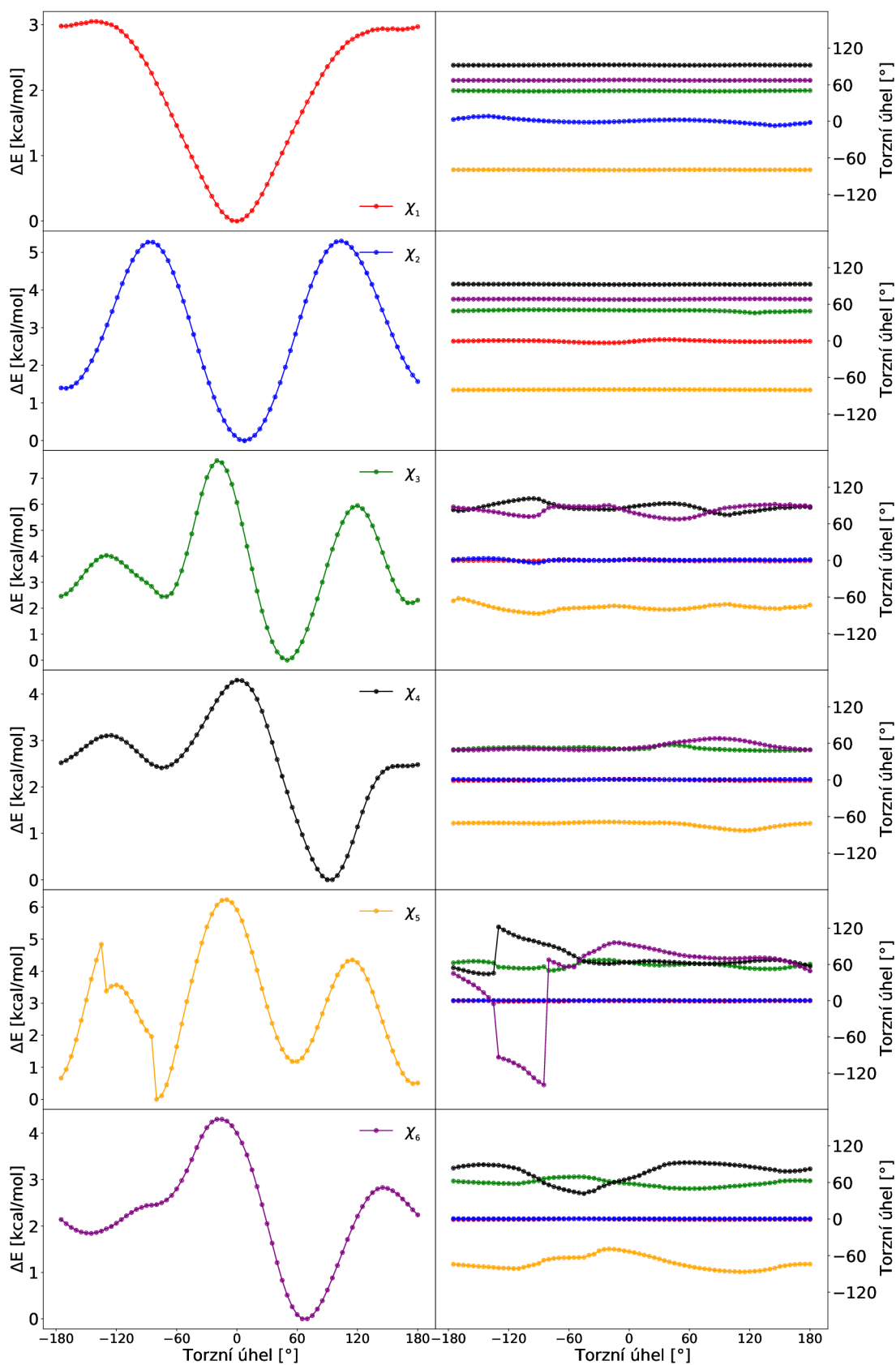
Pro 6 torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$, zobrazených na obrázku č. 3.1, byl proveden sken plochy potenciální energie. Na obrázku č. 6.6 jsou zobrazeny jednotlivé průběhy energie v závislosti na skenovaném torzním úhlu spolu s hodnotami ostatních torzních úhlů. Při jednotlivých skenech torzních úhlů ostatní úhly ani vzdálenosti nebyly fixovány. Větší změnou např. některého z dalších torzních úhlů dojde k výraznější změně konformace, což se projeví v hodnotě energie.

Z vybraných torzních úhlů byla největší pozornost věnována těm, které souvisí s orientací OH skupin na kruhu, tedy χ_1 a χ_2 . Průběh energie pro torzní úhel χ_1 má jedno výrazné minimum v oblasti okolo 0° , průběh energie pro χ_2 má minima dvě. Pro χ_2 okolo 0° je hodnota energie nižší, proto se dá předpokládat, že bude pravděpodobnější konformace s touto hodnotou, nedá se ale vyloučit ani oblast okolo 180° , kde je sedlový bod a energetický rozdíl je $1,5$ kcal/mol. U průběhů energie pro χ_3 , χ_4 a χ_6 jsou minima celkem tři. U každého z těchto průběhů je ale jedno výraznější minimum, dá se proto předpokládat, že hodnota torzního úhlu v tomto minimu bude pro molekulu energeticky nejvýhodnější. Pro torzní úhel χ_5 lze okolo -135° a -80° pozorovat skokovou změnu v energii. Pro χ_5 okolo -135° došlo ke změně torzního úhlu χ_4 , který se změnil přibližně o 80° a ke změně torzního úhlu χ_6 , který se změnil přibližně o 90° . Pro χ_5 okolo -80° došlo ke změně torzního úhlu χ_6 , který se změnil přibližně o 150° .

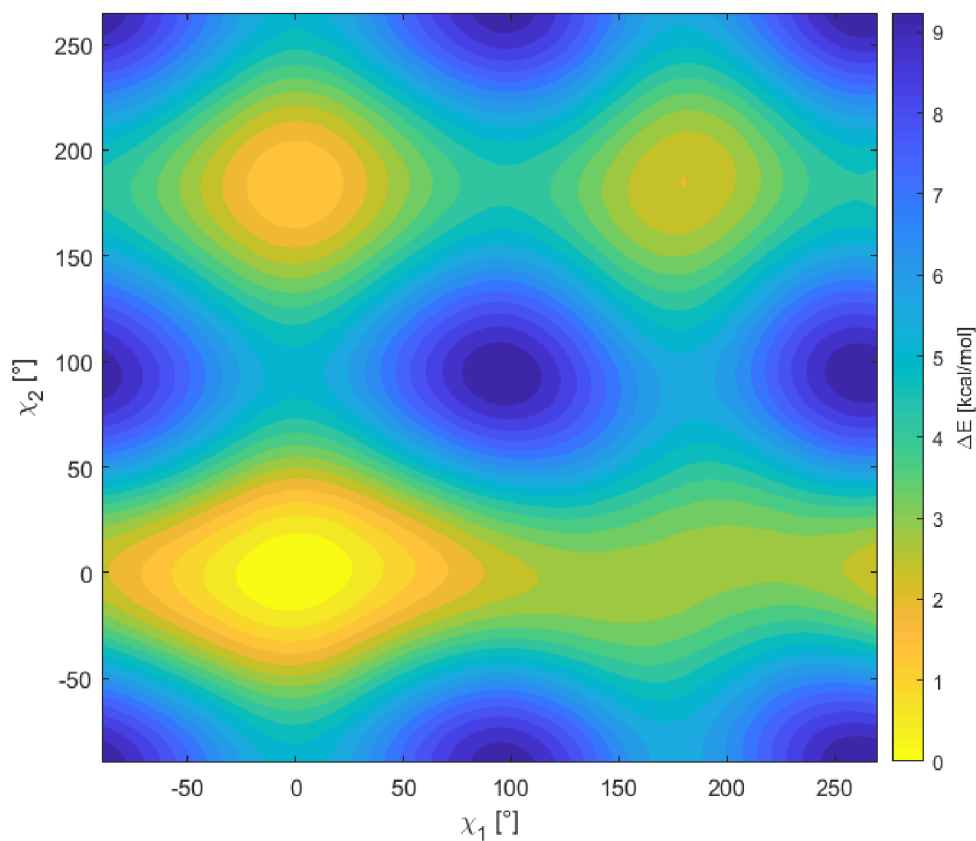
Pro torzní úhly χ_1 a χ_2 byl proveden rovněž 2D sken, který je na obrázku č. 6.7. Při 2D skenu torzních úhlů χ_1 a χ_2 mohly zbylé torzní úhly volně relaxovat, ale jejich změny byly minimální.

Z 2D skenu (χ_1 , χ_2) lze vidět, že nejhlubší minimum energie nastává pokud jsou oba torzní úhly rovny přibližně 0° . Kromě tohoto minima lze ve 2D scanu vidět další dvě, které odpovídají konformacím s $\chi_1 = 0^\circ$ a $\chi_2 = 180^\circ$ nebo s $\chi_1 = 180^\circ$ a $\chi_2 = 180^\circ$. Kombinace torzních úhlů $\chi_1 = 180^\circ$ a $\chi_2 = 0^\circ$ odpovídá spíše sedlovému bodu vzhledem k tomu, že $\chi_1 = 180^\circ$ byl sedlovým bodem při 1D skenu. Z celkem 5256 generovaných konformací, optimalizovaných na úrovni BPW91/6-31++G** bylo vybráno 157 s relativní energií pod $2,5$ kcal/mol. Pro tyto struktury byla vypočtena Ramanova a ROA spektra. Při výpočtech spekter byl využit implicitní model rozpouštědla CPCM. Z celkového počtu 157 konformací odpovídalo 109 z nich situaci, kdy jsou oba torzní úhly rovny 0° , 40 konformací, kdy je torzní úhel χ_1 roven 0° a χ_2 roven 180° a 8 konformací, kdy jsou oba torzní úhly rovny 180° . Žádná ze 157 vybraných konformací neměla torzní úhel χ_1 roven 180° a χ_2 roven 0° . Energie pro tuto kombinaci torzních úhlů je přibližně 3 kcal/mol.

Na obrázku č. 6.8 jsou zobrazeny konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D a 2D PES skenů. V tabulce č. 6.2 jsou pro tyto konformace uvedené hodnoty torzních úhlů. Konformace č. 1 odpovídá globálnímu minimu.



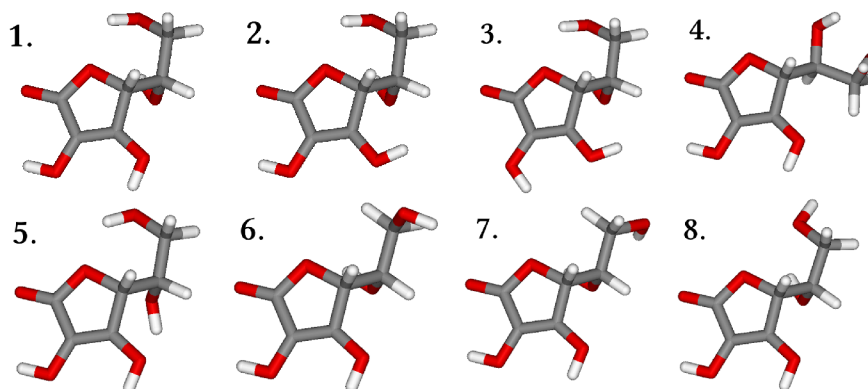
Obrázek 6.6: Vlevo: Průběhy jednotlivých torzních úhlů kyseliny askorbové. Vpravo: Průběhy hodnot ostatních pěti torzních úhlů při 1D PES skenu daného torzního úhlu. Jednotlivé torzní úhly jsou barevně odlišeny.



Obrázek 6.7: 2D sken torzních úhlů χ_1 a χ_2 kyseliny askorbové.

Tabulka 6.2: Torzní úhly $\chi_1 - \chi_6$ pro konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D ($\chi_1 - \chi_6$) a 2D (χ_1, χ_2) PES skenů. Tyto konformace jsou zobrazeny na obrázku č. 6.8.

Číslo konformace	Energie [kcal/mol]	χ_1 [°]	χ_2 [°]	χ_3 [°]	χ_4 [°]	χ_5 [°]	χ_6 [°]
1	0	0	0	50	92	-80	68
2	1,4	0	180	49	93	-81	68
3	2,3	180	180	48	93	-80	68
4	2,2	0	0	170	88	-76	90
5	2,4	0	0	52	-75	-71	51
6	1,2	0	0	60	63	55	75
7	0,5	0	0	59	59	175	53
8	1,8	0	0	59	89	-78	-145



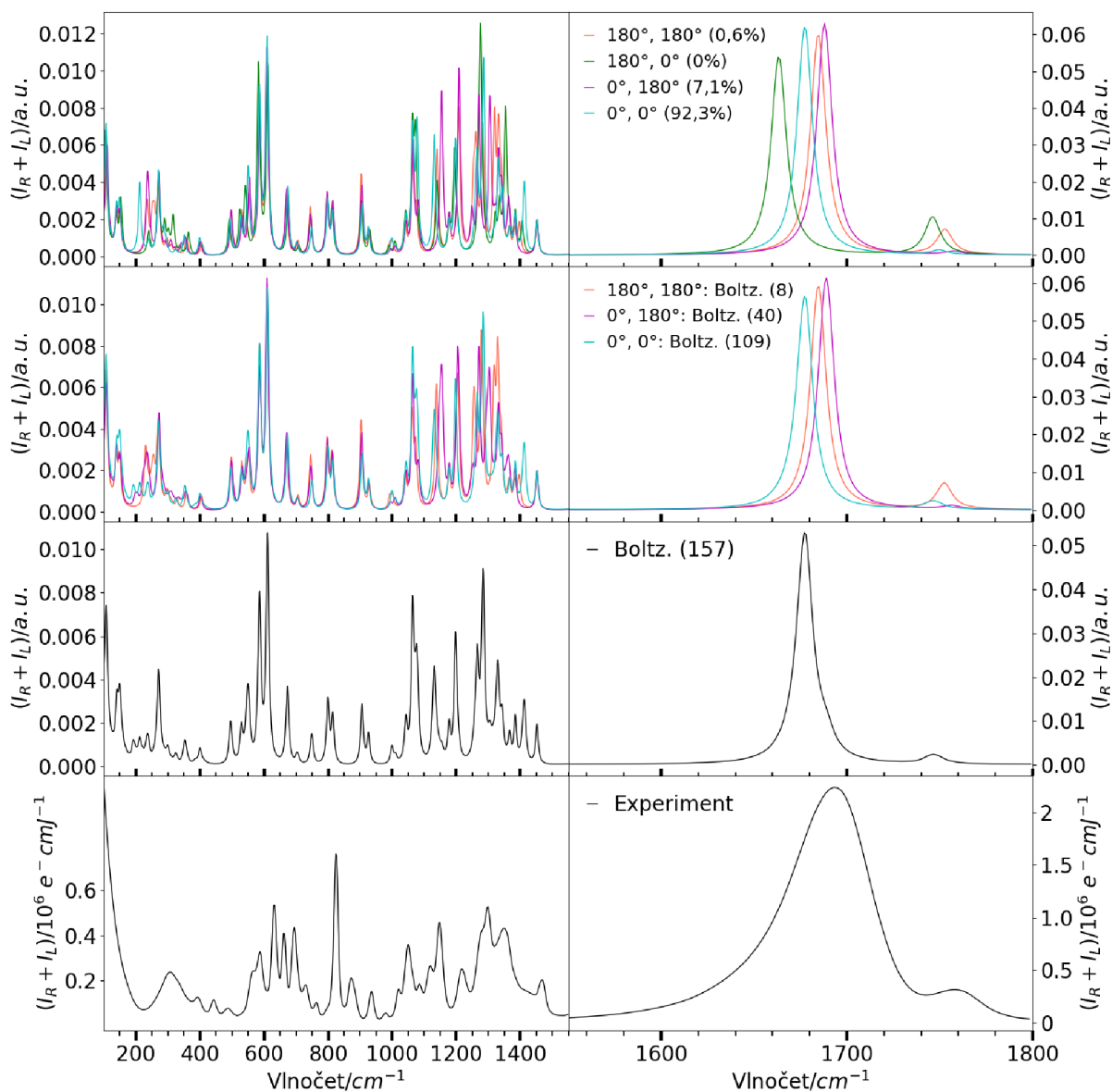
Obrázek 6.8: Konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D PES skenů zobrazených na obrázku č. 6.6. Hodnoty torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ jsou uvedeny v tabulce č. 6.2.

Na obrázku č. 6.9, resp. obrázku č. 6.10 jsou zobrazena Ramanova, resp. ROA spektra nejprve pro tři vybrané konformace, které odpovídají třem minimům z 2D skenu. Poté jsou zobrazena spektra, která odpovídají Boltzmannovskému průměru struktur v blízkosti daného lokálního minima a spektrum, které je Boltzmannovským průměrem všech 157 spekter. Nakonec je zobrazeno experimentální spektrum pro kyselinu askorbovou ve vodě.

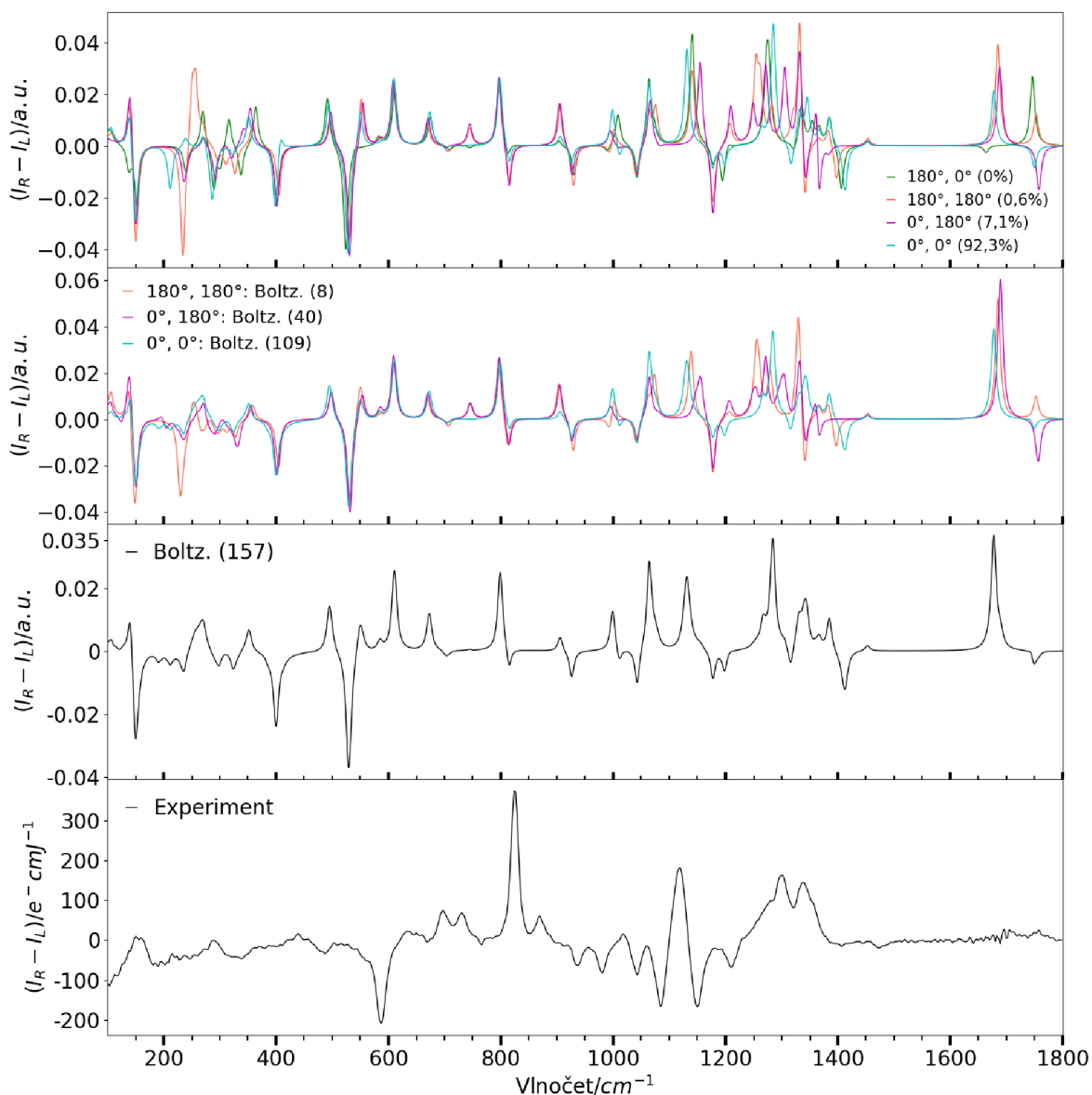
Na obrázku č. 6.9 lze vidět, že Ramanova spektra pro konformace s různými kombinacemi torzních úhlů χ_1 a χ_2 se liší nejvíce v oblasti $1000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$. Je zde patrný především posun pásů a jejich rozdílné intenzity. Spektrum pro konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=180^\circ$ má v oblasti 1305 cm^{-1} pás, který se nevyskytuje ve spektrech pro ostatní konformace ani v naměřeném spektru. Konformace s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$ má na rozdíl od ostatních konformací výrazný pás v oblasti 1410 cm^{-1} . Pás v oblasti 1750 cm^{-1} je pro konformace s $\chi_1=180^\circ$ silnější než pro konformace s $\chi_1=0^\circ$. Nejvíce experimentálnímu spektru odpovídá spektrum pro konformaci oběma torzními úhly rovnými 0° . Na tomto obrázku lze také vidět, z jaké části konformace s různými kombinacemi torzních úhlů χ_1 a χ_2 přispívají do výsledného Boltzmannovského spektra.

I pro ROA spektra (obrázek č. 6.10) jsou pro tyto konformace největší rozdíly v oblasti $1000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$. Okolo 1060 cm^{-1} má spektrum pro konformaci s oběma torzními úhly rovnými 180° dva kladné pásy u sebe, kdežto spektra zbylých konformací pouze jeden. Spektrum pro tutéž konformaci má v oblasti 1250 cm^{-1} dva kladné pásy, přičemž první má vyšší intenzitu, spektra pro konformace s $\chi_1=0^\circ$ mají intenzivnější druhý pás a spektrum pro konformaci s $\chi_1=180^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$ pás pouze jeden. Okolo 1180 cm^{-1} má spektrum pro konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$ dva záporné pásy o podobné intenzitě, spektrum pro konformaci s $\chi_1=180^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$ rovněž dva záporné pásy, ale s rozdílnými intenzitami. Spektra pro konformace s $\chi_2=180^\circ$ mají v této oblasti výrazný záporný pás a poté pás kladný. Spektrum pro konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=180^\circ$ má podobně jako v Ramanově spektru v oblasti 1305 cm^{-1} kladný pás, který se nevyskytuje ve spektrech pro ostatní konformace. Okolo 745 cm^{-1} mají spektra pro konformace s $\chi_2=180^\circ$ kladný pás, spektra pro konformace s $\chi_2=0^\circ$ ne. Zároveň tento kladný pás není ani v experimentálním spektru. V oblasti $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ mají spektra pro všechny čtyři konformace dva pásy, které se ve změřeném spektru nevyskytují.

Pro lepší vystižení reálné situace byly s využitím molekulové dynamiky do výpočtů zahrnuty molekuly vody explicitně. Výsledky jsou uvedeny v následující kapitole č. 6.2.2.



Obrázek 6.9: Ramanova spektra (výpočetní úroveň: BPW91/CPCM/6-31++G**) pro čtyři konformace kyseliny askorbové s různými kombinacemi torzních úhlů χ_1 a χ_2 . V závorce je uvedené Boltzmannovské zastoupení. Poté jsou zobrazena spektra, která odpovídají Boltzmannovskému průměru (Boltz.) spekter v blízkosti daného lokálního minima. V závorce je uveden počet konformací, ze kterých byl Boltzmannovský průměr počítán. Dále je zobrazeno spektrum, které je Boltzmannovským průměrem všech 157 spekter a nakonec spektrum získané z měření.



Obrázek 6.10: ROA spektra (výpočetní úroveň: BPW91/CPCM/6-31++G**) pro čtyři konformace kyseliny askorbové s různými kombinacemi torzních úhlů χ_1 a χ_2 . V závorce je uvedené Boltzmannské zastoupení. Poté jsou zobrazena spektra, která odpovídají Boltzmannovskému průměru (Boltz.) spekter v blízkosti daného lokálního minima. V závorce je uveden počet konformací, ze kterých byl Boltzmannovský průměr počítán. Dále je zobrazeno spektrum, které je Boltzmannovským průměrem všech 157 spekter a nakonec spektrum získané z měření.

6.2.2 Molekulárně dynamické simulace ve vodě

Pro lepší vystižení reálné situace byly s využitím molekulové dynamiky do výpočtů zahrnuty explicitní vody. Z produkčního běhu MD bylo vybráno 400 klastrů s molekulami vody z 1. solvatační vrstvy, které byly částečně zoptimalizovány v normálních modech a byla pro ně vypočtena Ramanova a ROA spektra, z nichž bylo spočteno spektrum průměrné. Podrobnější postup je v kapitole č. 5.1.

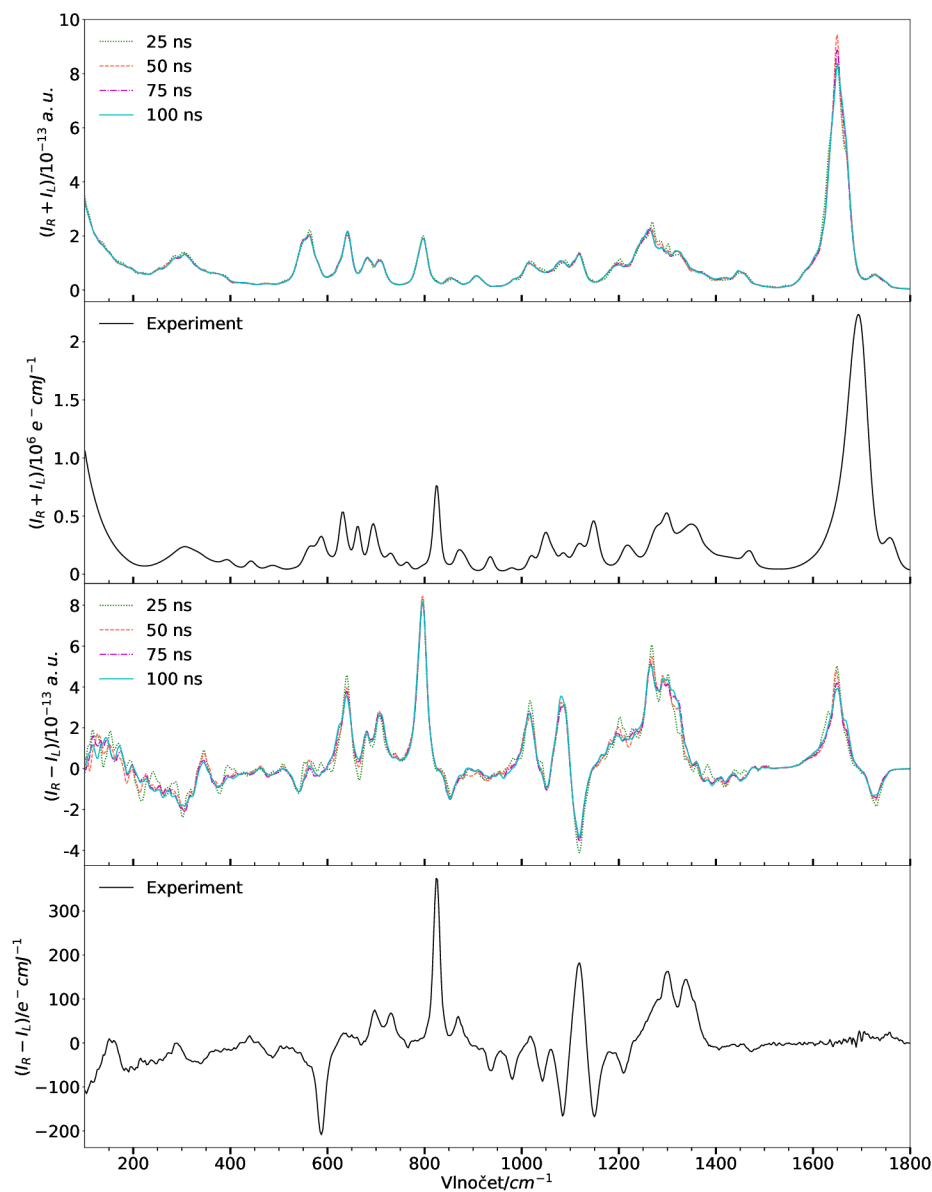
Pro molekulovou dynamiku byly jako počáteční konformace využity dvě konformace, která měly v Boltzmannovském průměru z 2D skenu (χ_1, χ_2) dvě největší zastoupení. Jedná se tedy o konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$ a o konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=180^\circ$. Z produkčního běhu bylo uloženo 100 000 geometrií, které jsem rozdělili na základě hodnot úhlů χ_1 a χ_2 do 4 základních skupin odpovídajícím preferovaným konformacím z 2D skenu (χ_1, χ_2). Procentuální zastoupení pro tyto čtyři skupiny jsou uvedena v tabulce č. 6.3.

Tabulka 6.3: Procentuální zastoupení konformací s různými kombinacemi torzních úhlů χ_1 a χ_2 získaných z MD pro výchozí konformace kyseliny askorbové, které odpovídají dvěma nejhlubším minimům z 2D PES skenu zobrazeném na obrázku č. 6.7.

Konformace		$\chi_1=0^\circ, \chi_2=0^\circ$	$\chi_1=0^\circ, \chi_2=180^\circ$
χ_1 [°]	χ_2 [°]	Procentuální zastoupení	Procentuální zastoupení
0	0	75,5	61,5
0	180	4,8	11,8
180	0	14,4	16,7
180	180	5,3	10,0

Výsledná procentuální zastoupení jsou lehce závislá na počáteční konformaci, což poukazuje na možnou nedostatečnou délku simulace. Z obou variant ale vyplývá, že nejvíce zastoupenou konformací je konformace s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$. Druhá nejvíce zastoupená konformace má torzní úhly $\chi_1=180^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$, což je zajímavé, protože podle 2D skenu do Boltzmannovského průměru tato oblast prakticky nepřispívá (energie > 3 kcal/mol). Do výpočtů MD byly ale zahrnuty explicitní vody, které s největší pravděpodobností zvýšily možnou pravděpodobnost pro zaujmutí torzního úhlu $\chi_1 = 0^\circ$. Výběr 400 klastrů, ze kterých byla počítána Ramanova a ROA spektra, byl proveden z MD pro konformaci s $\chi_1=0^\circ$ a $\chi_2=0^\circ$. Je to jednak konformace, která se uvádí v literatuře, např. v článku [18] a také konformace, která z 1D i 2D skenu plochy potenciální energie vychází jako nejpravděpodobnější.

Na obrázku č. 6.11 jsou zobrazena Ramanova a ROA spektra odpovídající různým délkám MD simulace v porovnání se spektrem experimentálním. Klastry byly vygenerovány ekvidistantně po 0,25 ns. ROA spektra jsou mnohem citlivější než Ramanova spektra. Je pozorovatelná konvergence spektrálního profilu mezi spektry pro délky simulace 75 ns (300 spekter) a 100 ns (400 spekter). S ohledem na složitost molekuly kyseliny askorbové byla zvolena délka simulace 100 ns a počet struktur 400 jako dostatečná.

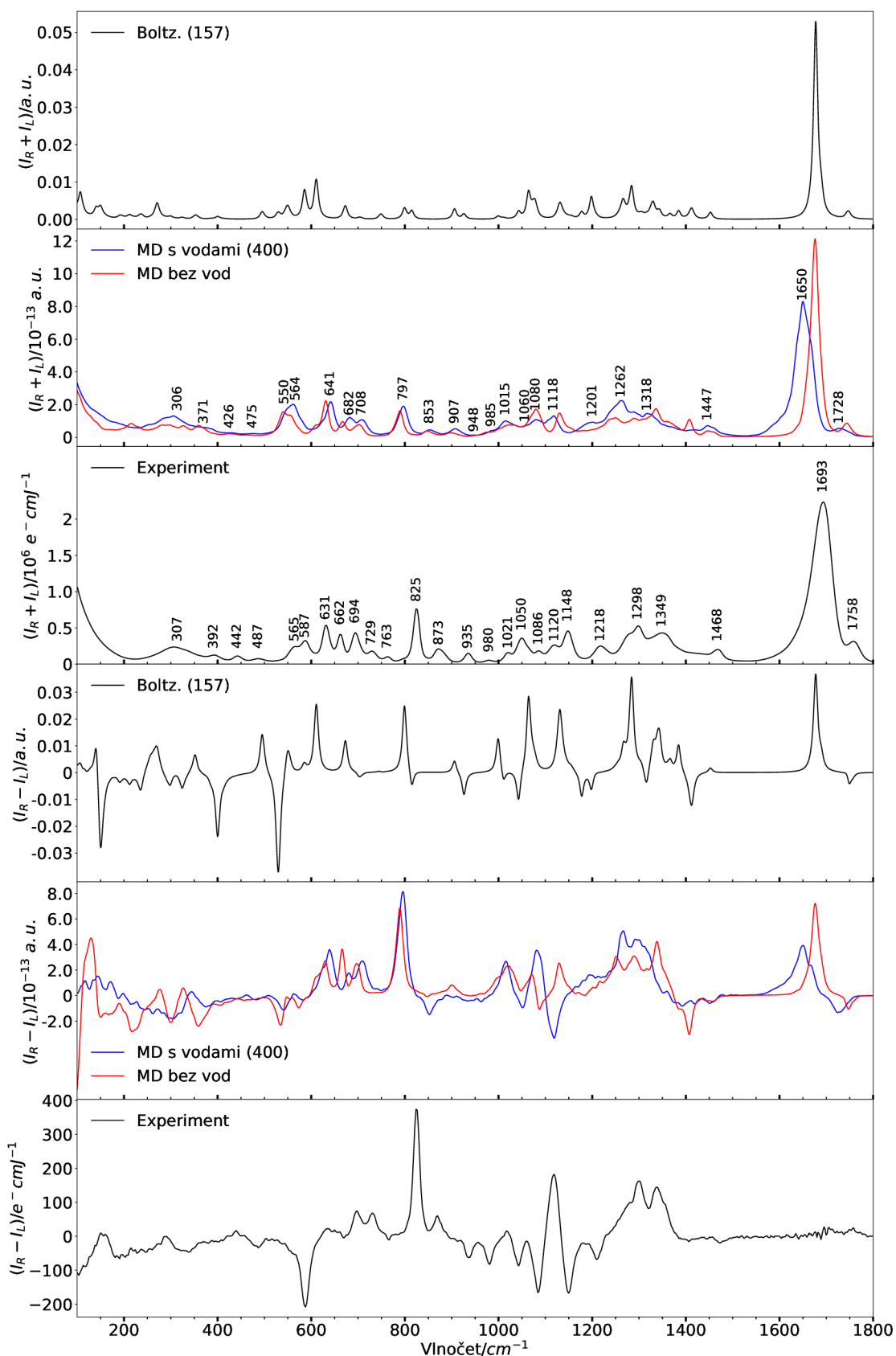


Obrázek 6.11: Ramanova a ROA spektra (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) pro kyselinu askorbovou pro různé délky délky MD simulace (klastry byly vygenerovány po 0,25 ns) v porovnání se spektrem z experimentu.

Na obrázku č. 6.12 je nejprve zobrazen Boltzmannovský průměr Ramanových a ROA spekter vybraných z 2D PES skenu torzních úhlů χ_1 a χ_2 (z kapitoly č. 6.2.1). Poté jsou zobrazena dvě spektra vypočtená na základě molekulové dynamiky, kdy v jednom případě byly vybrány pouze struktury samotné molekuly kyseliny askorbové a ve druhém ponechány molekuly vody z 1. solvatační vrstvy. Následně je zobrazeno spektrum získané z měření.

Spektra vypočtená s využitím molekulové dynamiky se blíží experimentálním více než spektra vypočtená z 2D PES skenu (χ_1 , χ_2). U spekter spočtených z MD se změnil tvar pásů a také došlo ke změně intenzit některých pásů. Příkladem je např. pás okolo 800 cm^{-1} , který je výrazný jak v experimentu, tak ve spektru z MD. Ve spektru z 2D PES skenu jsou v této oblasti pásy dva, ale s malou intenzitou.

První ze spekter vypočtených z MD (červené) odpovídá situaci, kdy kolem molekuly kyseliny askorbové nebyly ponechány žádné explicitní vody. Druhé (modré) je pro



Obrázek 6.12: Nahoře jsou zobrazena Ramanova spektra, dole ROA spektra. Nejprve je zobrazen boltzmannovský průměr spekter vybraných z 2D PES skenu torzních úhlů χ_1 a χ_2 (BPW91/CPCM/6-31++G**), poté spektrum vypočtené s využitím molekulové dynamiky bez a s explicitními molekulami vody z 1. solvatační vrstvy (BPW91/CPCM/6-31++G**) a následně spektrum získané z měření.

případ, kdy je kyselina askorbová obklopena molekulami vody z 1. solvatační vrstvy. Největší rozdíl je patrný v oblasti 1150 - 1500 cm^{-1} , kde díky explicitním vodám má vypočtené Ramanovo spektrum obdobné tendence jako spektrum experimentální, tzn. je zde patrný kladný širší pás okolo 1260 cm^{-1} a poté další širší kladný pás okolo 1320 cm^{-1} , ale s nižší intenzitou. Další oblastí, která se díky zahrnutí explicitních molekul vody přiblížila experimentálnímu spektru, je oblast 950 - 1150 cm^{-1} . V této oblasti je stejně jako u experimentálního spektra pět kladných pásů. Vlivem explicitních vod došlo také k rozšíření pásu okolo 1650 cm^{-1} .

I u ROA spekter je díky zahrnutí explicitních vod patrné vylepšení oblasti 1150 - 1500 cm^{-1} , kdy jsou výrazné dva kladné pásy okolo 1265 a 1295 cm^{-1} a došlo k vyrušení silného záporného pásu okolo 1405 cm^{-1} . V oblasti 950 - 1150 cm^{-1} díky explicitním vodám došlo k vyrušení kladného pásu okolo 1125 cm^{-1} , který v experimentálním spektru není patrný. V oblasti 1650 - 1800 cm^{-1} je ve výpočtu silný kladný a záporný signál, zatímco v experimentu žádný silný signál není.

Na základě tohoto porovnání byly další výpočty prováděny s využitím MD s explicitními molekulami vody z 1. solvatační vrstvy. Přesto shoda vypočteného a experimentálního ROA spektra není úplně stoprocentní.

V naměřeném ROA spektru je okolo 590 cm^{-1} výrazný záporný pás. Lze jej pozorovat i ve vypočteném spektru z MD, nemá ale tak velkou intenzitu. V oblasti 600 - 755 cm^{-1} lze ve vypočteném spektru pozorovat tři kladné pásy, v experimentálním spektru jeden širší pás a poté dva kladné. V této oblasti jsou ale navíc rozdílné i intenzity těchto pásů. V oblasti 850 cm^{-1} je u vypočteného spektra výrazný záporný pás, zatímco v experimentálním spektru je okolo 873 cm^{-1} pás kladný. Dále jsou v naměřeném spektru dva záporné pásy okolo 935 a 980 cm^{-1} , které ve vypočteném spektru nejsou. Další dva záporné pásy jsou okolo 1080 a 1150 cm^{-1} . Ve spektru získaném z měření mají tyto pásy stejnou intenzitu, ve vypočteném spektru je druhý pás výraznější. Záporný pás okolo 1205 cm^{-1} v naměřeném spektru nelze pozorovat ve vypočteném spektru. V oblasti 1080 - 1150 cm^{-1} jsou ve vypočteném spektru dva pásy (kladný a záporný), které v experimentálním spektru nejsou.

V tabulce č. 6.4 jsou pro jednotlivé ramanovské pásy kyseliny askorbové přiřazeny typy vibrací. V oblasti nižších vlnočtů je převládající vibrací kývavá vibrace (wagging), která se týká OH skupin. V oblasti od přibližně 700 cm^{-1} do 1100 cm^{-1} se vyskytuje vibrace kolébavá (rocking), která se týká skupiny CH_2 . Dále se v této oblasti objevuje kývavá vibrace OH skupin nebo valenční vibrace (stretching) mezi uhlíky nebo mezi uhlíkem a kyslíkem. V oblasti 1100 - 1400 cm^{-1} u skupiny CH_2 buď vibrace kývavá nebo kroutící (twisting), u skupiny CH kývavá a deformační (bending) C-O-H. Okolo 1450 cm^{-1} se objevuje nůžková (scissoring) vibrace. Pro dva pásy v oblasti okolo 1700 cm^{-1} se jedná o valenční vibrace C=O a C=C. Téměř všude se vyskytuje deformace kruhu (ring def), která je výrazná především v oblasti nižších vlnočtů.

Tabulka 6.4: Přiřazení typu vibrace naměřeným a vypočteným ramanovským pásům (uvedeny v cm^{-1}) pro kyselinu askorbovou rozpuštěnou ve vodě. Vysvětlivky: v, very; w, weak; m, medium; s, strong; sh, shoulder; bend, bending; wag, wagging; def, deformation; str, stretching; sci, scissoring, tw; twisting.

Experiment	Výpočet	Typ vibrace
307 w	306 w	ring def, O-H wag
392 vw	371 w	ring def, O-H wag
442 vw	426 vw	ring def, O-H wag
487 vw	475 vw	CH ₂ rock, ring def
565 sh, m	550 sh, m	ring def
587 m	561 m	ring def, O-H wag
631 m	641 m	ring def, O-H wag
662 m	641 m	ring def, O-H wag
694 m	682 m	ring def, O-H wag
729 w	708 m	CH ₂ rock, ring def
763 w	-	-
825 s	797 m	ring def
873 w	853 w	CH ₂ rock, ring def, C-C str
935 w	907 w	CH ₂ rock, ring def, O-H wag
980 vw	948 vw	O-H wag
1021 w	985 vw	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1050 m	1015 m	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1086 w	1060 m	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1120 w	1080 m	ring def, C-O-H bend
1148 m	1118 m	C-H wag, ring def, C-O-H bend
1218 w	1201 w	C-H wag, CH ₂ wag, ring def, C-O-H bend
1298 m	1262 m	C-H wag, CH ₂ twi, ring def, C-O-H bend
1349 m	1318 m	C-H wag, CH ₂ wag, ring def, C-O-H bend
1468 w	1447 w	CH ₂ sci
1693 vs	1650 vs	C=C str, C=O str
1758 m	1728 m	C=C str, C=O str

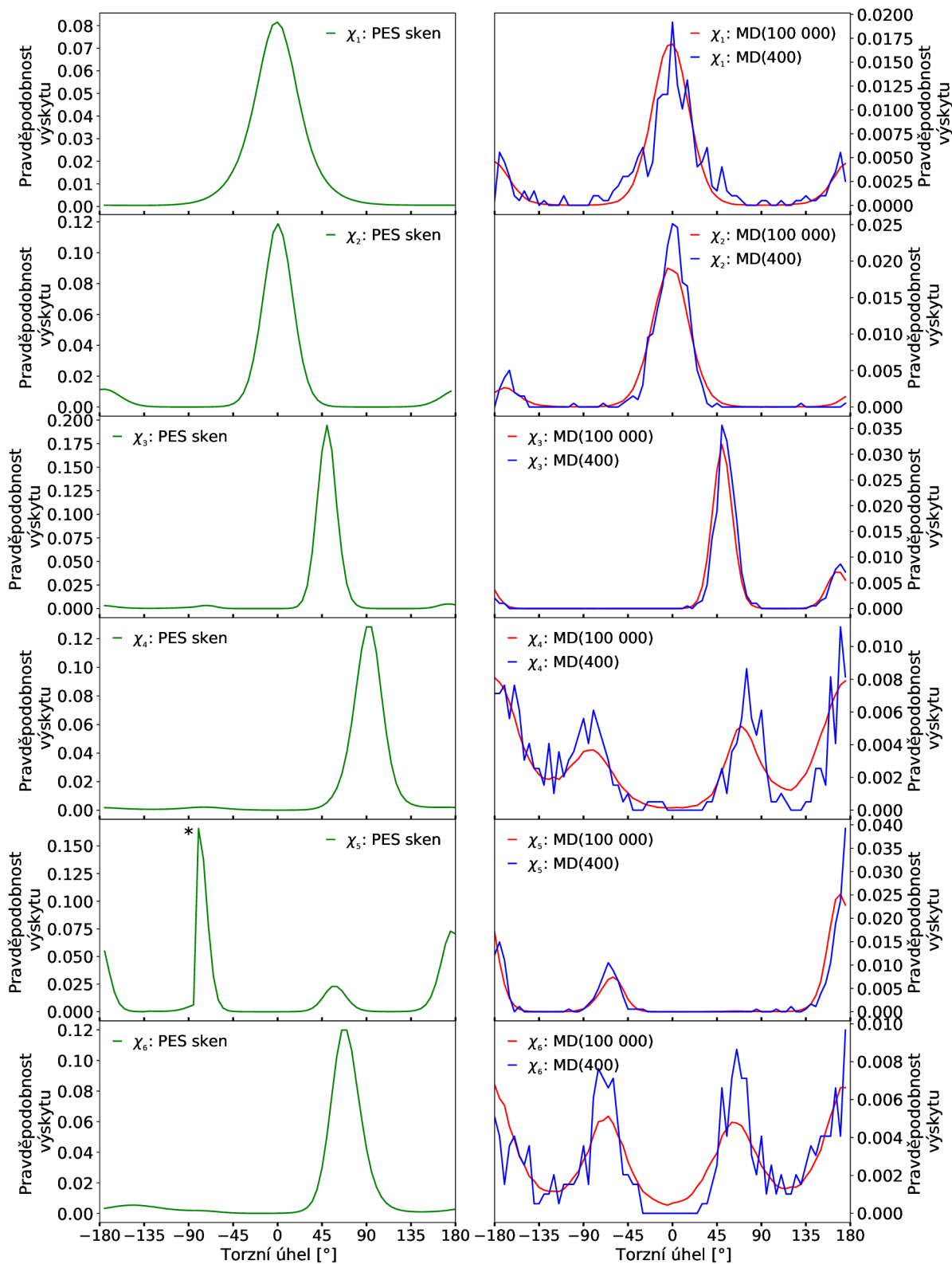
Dále nás zajímal průměrný počet vod. V tabulce č. 6.5 je uveden průměrný počet vod okolo OH skupin a kyslíků očíslovaných na obrázku č. 3.1. Tento počet byl zjišťován s využitím programu Xshell, kdy byla nastavena vzdálenost od kyslíku, resp. vodíku na 2,5 Å, což odpovídá limitu pro vodíkovou vazbu. Některé molekuly vody byly sdíleny pro více OH skupin nebo kyslíků. Z hodnot uvedených v tabulce č. 6.5 lze říci, že solvatace molekuly kyseliny askorbové byla dostačující.

Na obrázku č. 6.13 jsou porovnány distribuce torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ získané z 1D PES skenů a z molekulové dynamiky. V případě MD jsou zobrazeny zároveň distribuce pro všech 100 000 konformací uložených z produkčního běhu a distribuce pro vybraných 400 klastrů. Pro torzní úhel χ_1 je v obou případech nejpravděpodobnější hodnota 0°. V distribucích z MD je na rozdíl od distribucí z PES skenu další možnou hodnotou 180°. Pro torzní úhel χ_2 je nejpravděpodobnější hodnota rovněž 0° a dále 180°, což plyne jak z distribuce z PES skenu, tak i z distribuce z MD. Hodnoty torzních úhlů χ_1 a χ_2 korespondují s procentuálním zastoupením konformací uvedeným v tabulce č. 6.3. U torzního úhlu χ_3 je nepravděpodobnější hodnota 50°, další možná hodnota je 170°. U zbylých tří

Tabulka 6.5: Průměrný počet vod okolo molekuly kyseliny askorbové nebo jejich určitých OH skupin nebo kyslíků, které jsou vyznačeny na obrázku č. 3.1.

	Průměrný počet vod
celá molekula	9,9
kruh	5,4
O1	1,7
O4	0,4
O2 - H2	2,2
O3 - H3	1,9
O5 - H _O 5	2,2
O6 - H _O 6	2,4

torzních úhlů jsou rozdíly v distribucích z PES skenů a MD větší. Jak lze vidět v distribucích z MD, pro χ_4 jsou tři možné hodnoty. Nejpravděpodobnější je hodnota 180° , potom 70° a nakonec -85° . U distribuce z PES skenu byla nejpravděpodobnější hodnota 92° a poté -80° . Distribuce z PES skenu pro torzní úhel χ_5 je ovlivněna skokovou změnou okolo -80° . Z distribuce z PES skenu je tato hodnota nejpravděpodobnější, poté následuje 180° a 60° . Z distribuce z MD lze říci, že nejpravděpodobnější hodnotou je 180° a další možnou hodnotou -60° , zatímco hodnota χ_5 okolo 60° se vůbec neobjevila. Torzní úhel χ_6 má podle distribuce z MD tři možné hodnoty, kdy nejpravděpodobnější je 180° , poté -65° a nakonec 60° . Podle distribuce z PES skenu je nejpravděpodobnější hodnota 70° a poté -150° . U molekulové dynamiky je možných více konformací a to díky působení explicitních vod. V případě MD bylo objeveno více možných konformací kyseliny askorbové než pomocí 1D skenů. Jedinou výjimkou je úhel χ_5 okolo 60° , což by si zasloužilo bližší zkoumání. Dále lze z distribucí říci, že torzní úhly, které se nacházejí dále od kruhu (χ_4 a χ_6), jsou explicitními vodami více ovlivňovány a tudíž je pro ně více možných hodnot.



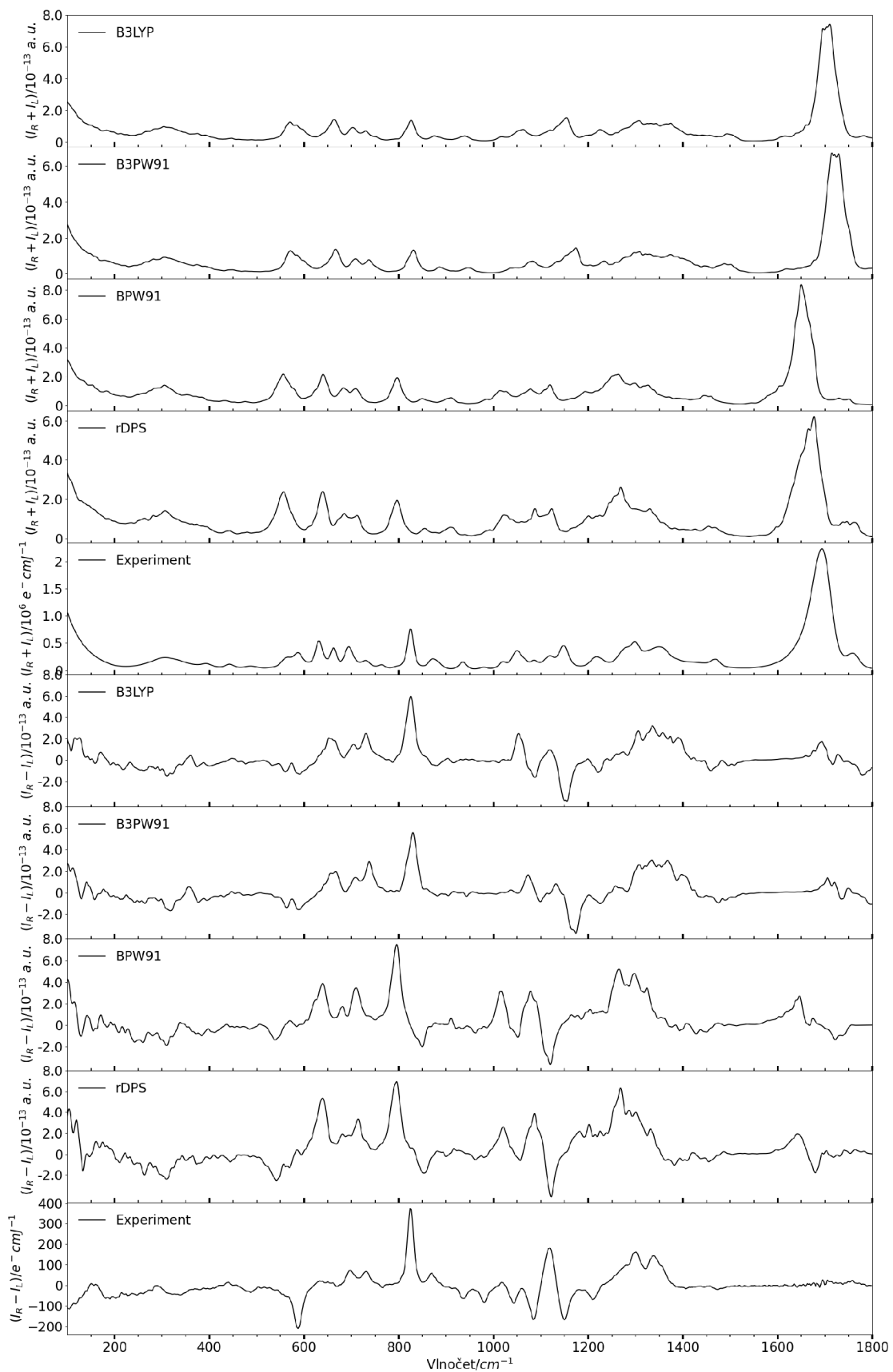
Obrázek 6.13: Distribuce torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ z PES skenu a z molekulové dynamiky. V případě MD jsou zobrazeny zároveň distribuce pro všech 100 000 konformací z produkčního běhu a distribuce pro vybraných 400 klastrů. Označení * znamená, že v daném místě v PES skenu došlo ke skokové změně v energii.

6.2.3 Různé úrovně výpočtu

Pro ověření závislosti tvaru spekter na použitém DFT funkcionálu byl proveden výpočet pro 100 klastrů vybraných ekvidistantně z 100 ns i s využitím jiných funkcionálů, konkrétně B3LYP a B3PW91. Byl také proveden výpočet v bázevém setu rDPS v kombinaci s funkcionálem BPW91. Výsledná Ramanova a ROA spektra jsou zobrazena na obrázku č. 6.14.

Z obrázku č. 6.14 lze říci, že nejvhodnějším funkcionálem je BPW91. U funkcionálu B3LYP lze sice v oblasti $500 - 750 \text{ cm}^{-1}$ pozorovat sedmý z pásů, ale např. oblast $1150 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ je lépe vystižena u funkcionálu BPW91. Ani u funkcionálu B3PW91 není oblast $1150 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ vystižena lépe než u funkcionálu BPW91. U funkcionálů B3LYP a B3PW91 je pás okolo 1700 cm^{-1} více rozštěpen. Spektrum pro bázevý set rDPS v kombinaci s funkcionálem BPW91 s experimentálním spektrem koresponduje nejméně, což lze vidět zejména v oblasti $950 - 1150 \text{ cm}^{-1}$.

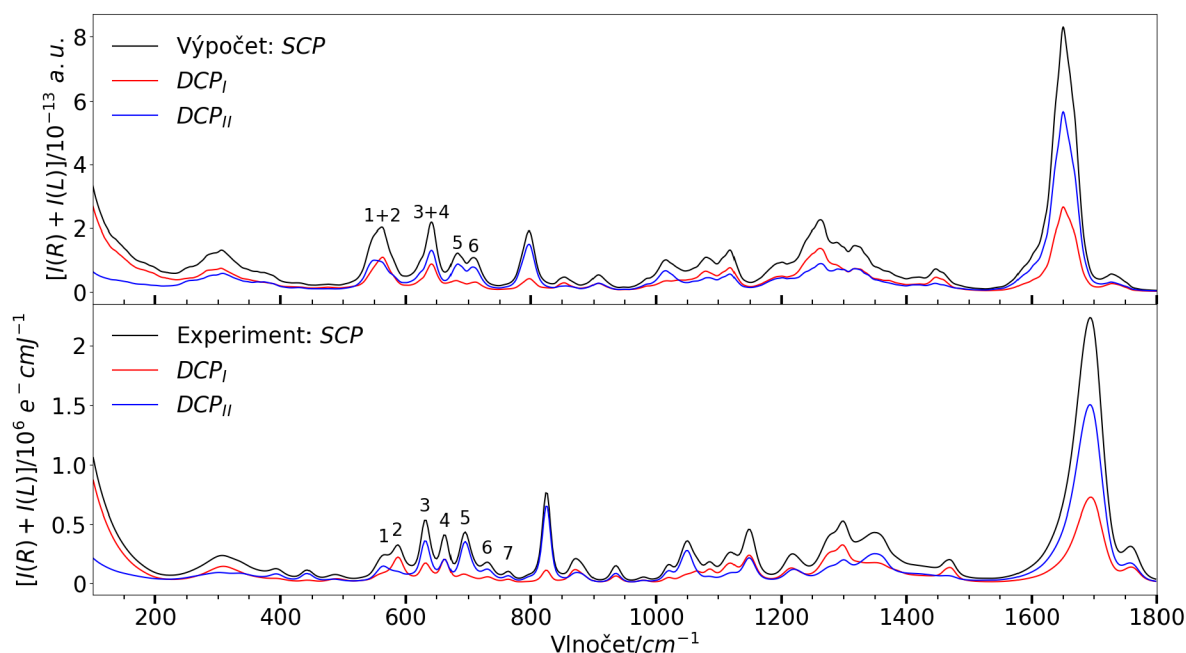
I z ROA spekter plyne, že BPW91 je vhodně zvoleným funkcionálem. Opět je zde větší shoda s experimentem pro oblast $1150 - 1500 \text{ cm}^{-1}$. Záporný pás okolo 550 cm^{-1} je u spektra pro BPW91 výraznější než pro spektra spočtená s využitím funkcionálů B3LYP nebo B3PW91. U výpočtu s využitím bázevého setu rDPS v kombinaci s funkcionálem BPW91 je záporný pás okolo 550 cm^{-1} výrazný, ale oblast $1150 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ není příliš uspokojivá.



Obrázek 6.14: Ramanova a ROA spektra spočtená z MD pro 100 klastrů s využitím funkcionalů B3LYP, B3PW91 a BPW91 a spektrum spočtené s využitím základního setu BPW91/rDPS ve srovnání se spektrem z experimentu. Ve všech případech byl využit implicitní model rozpouštědla CPCM a báze 6-31++G**.

6.2.4 Polarizovaná Ramanova spektra

Na obrázku č. 6.15 jsou k dosud ukazovaným Ramanovým spektrům pro SCP modulační schéma přidána Ramanova spektra pro DCP_I a DCP_{II} modulační schémata.



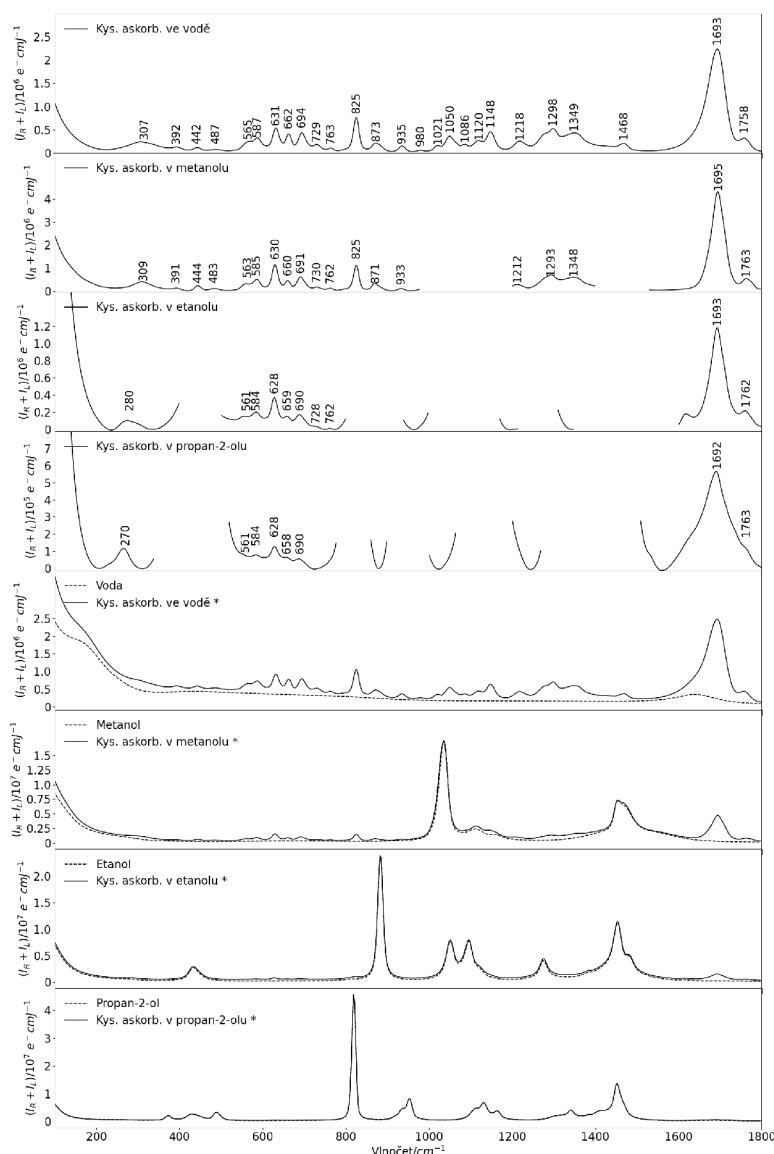
Obrázek 6.15: Vypočtená Ramanova spektra (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) a experimentální Ramanova spektra pro modulační schémata SCP, DCP_I a DCP_{II} .

Vzájemná podobnost vypočtených a naměřených Ramanových spekter pro modulační schéma SCP je velmi dobrá. Největší rozdíl lze pozorovat v oblasti $500 - 750 \text{ cm}^{-1}$. V experimentálním spektru je v této oblasti 7 pásů, které mají obdobný typ vibrace (O-H wag, ring def). První dva tvoří jeden širší pás, poté následuje pás, který je z těchto sedmi nejvíce intenzivní, dále dva pásy o podobné intenzitě, kdy první z nich má intenzitu nižší a nakonec dva nejméně intenzivní pásy. Ve vypočteném spektru lze pozorovat první širší pás, ale rozdíl je v intenzitě, která je na rozdíl od experimentálního spektra srovnatelná s dalším pásem, který je z těchto sedmi pásů nejvíce intenzivní. Dále lze pozorovat pouze jeden kladný pás, kdežto v experimentálním spektru dva. K tomu, že tento pás z výpočtu odpovídá dvěma z experimentu jsme přišli s využitím škálování vypočtených frekvencí tak, aby lépe odpovídaly experimentu. Předpokládá se lineární posun frekvencí. Další odlišení je u pátého a šestého pásu. V experimentálním spektru mají tyto pásy větší rozdíl v intenzitě, ve vypočteném spektru mají intenzitu podobnou. Ve vypočteném spektru nelze pozorovat poslední z těchto sedmi pásů. Při zvolení šířky v polovině maxima (FWHM) 5 cm^{-1} bylo možné tento pás pozorovat, avšak s velmi malou intenzitou. V oblasti $950 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ je stejně jako u experimentálního spektra pět kladných pásů s tím rozdílem, že třetí z nich je u vypočteného spektra málo viditelný, lze pozorovat pouze náznak (mírné zvýšení intenzity) v oblasti, ve které by měl být. V oblasti $1150 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ lze v experimentu pozorovat dva širší pásy, z nichž druhý má nižší intenzitu. Ve vypočteném spektru jsou v oblasti tohoto druhého pásu o nižší intenzitě pásy dva.

Polarizovaná Ramanova spektra získaná výpočtem a měřením jsou také ve velmi dobré shodě. Rozdíl je v oblasti 1318 cm^{-1} , kdy v naměřeném spektru převládá intenzita pro DCP_{II} , kdežto ve vypočteném spektru jsou intenzity pro DCP_I a DCP_{II} stejné.

6.2.5 Měření v různých rozpouštědlech

Na obrázku č. 6.16 jsou zobrazena Ramanova spektra pro kyselinu askorbovou rozpuštěnou v rozpouštědlech, které jsou uvedeny v tabulce č. 5.3. Nejprve jsou zobrazena Ramanova spektra po odečtu rozpouštědla, úpravě linie pozadí a s vynechanými oblastmi, ve kterých jsou silné pásy rozpouštědla, které se nepodařilo odečíst, poté jsou ukázána spektra bez těchto úprav spolu se spektry pro samotná rozpouštědla. Spektrum pro kyselinu askorbovou ve vodě byly věnovány kapitoly č. 6.2.2 a 6.2.4. Spektrum v metanolu je věnována kapitola č. 6.2.6. U vody a metanolu je soulad mezi jednotlivými pásy, akorát s mírným posunem vlnočtů. Etanol a propan-2-ol mají více silných pásů v oblastech, ve kterých se vyskytují pásy kyseliny askorbové, takže pro měření nejsou příliš vhodné.



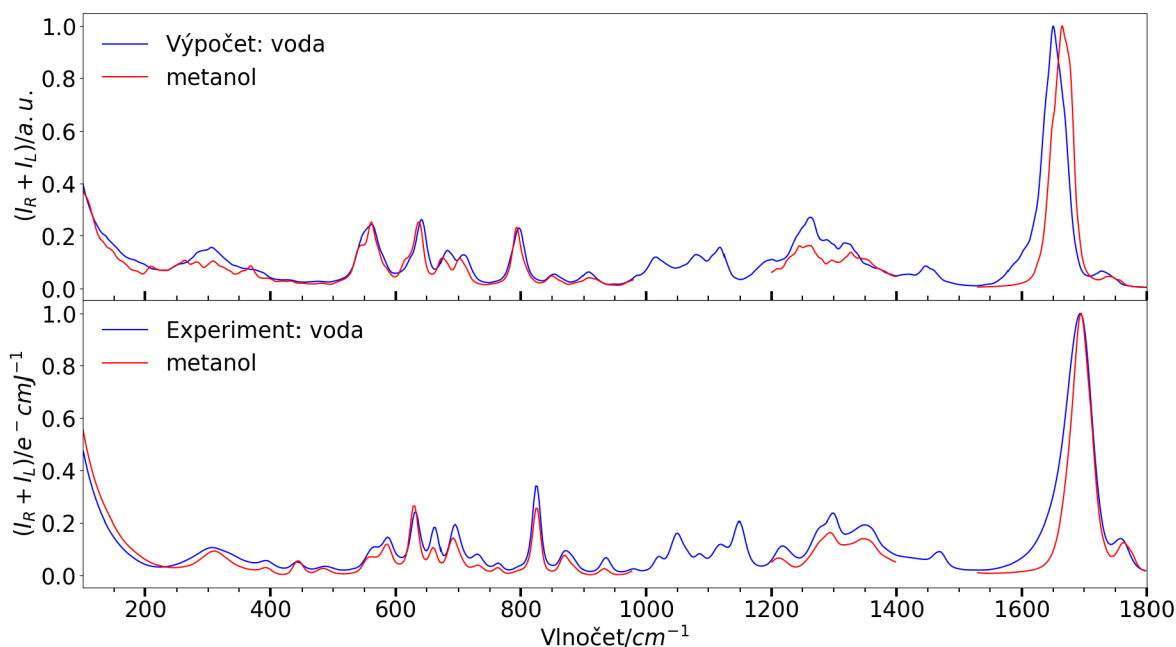
Obrázek 6.16: Nahoře: Ramanova spektra pro kyselinu askorbovou rozpuštěnou v rozpouštědlech uvedených v tabulce č. 5.3. Dole: Ramanova spektra pro kyselinu askorbovou rozpuštěnou v rozpouštědlech uvedených v tabulce č. 5.3 bez odečtení spektra rozpouštědla a srovnání linie pozadí (označení *). Zároveň jsou zobrazena spektra pro daná rozpouštědla.

6.2.6 Porovnání simulovaných a naměřených spekter ve vodě a v metanolu

Dalším rozpouštědlem, pro které byly provedeny výpočty Ramanových a ROA spekter, byl metanol. Na obrázku č. 6.17 je zobrazeno vypočtené a naměřené Ramanovo spektrum pro kyselinu askorbovou v metanolu zároveň s Ramanovými spektry pro kyselinu askorbovou ve vodě. U spekter pro metanol jsou vynechané oblasti, ve kterých jsou silné pásy metanolu, které se nepovedlo dobře odečíst, tedy oblast $980 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ a oblast $1400 - 1530 \text{ cm}^{-1}$. Spektra byla normalizována tak, že nejvyšší pás je normován na 1, protože v případě měření kyseliny askorbové v metanolu neznáme její přesnou koncentraci. Spektra není možné přenormovat na koncentraci, protože u některých vzorků se nerozpustilo úplně vše, takže reálná koncentrace není známa.

U změřených i vypočtených spekter pro kyselinu askorbovou v metanolu lze pozorovat stejné pásy jako u kyseliny askorbové ve vodě, akorát s mírným posunem pásů ke kratším vlnotům. Pás okolo 800 cm^{-1} má pro vypočtená spektra pro metanol a vodu stejnou intenzitu, v naměřených spektrech je v případě vody tento pás o něco intenzivnější. Pás okolo 1650 cm^{-1} je v případě vypočtených spekter přibližně stejně široký jak pro vodu, tak metanol. Ve spektrech získaných z měření je tento pás pro metanol užší.

Z Ramanových spekter zobrazených na obrázku č. 6.17 lze vidět, že v případě metanolu je pás okolo 550 cm^{-1} v lepším souladu s experimentem než je tomu v případě vody. V případě výpočtů pro metanol lze rozeznat, že je tento pás tvořen dvěma kladnými pásy, kde první z nich má nižší intenzitu. Podobně je tomu u pásu okolo 640 cm^{-1} , který, jak bylo zjištěno v kapitole č. 6.2.4, odpovídá dvěma pásům v experimentu. V případě metanolu je u tohoto pásu náznak toho, že by mohl být tvořen dvěma pásy.



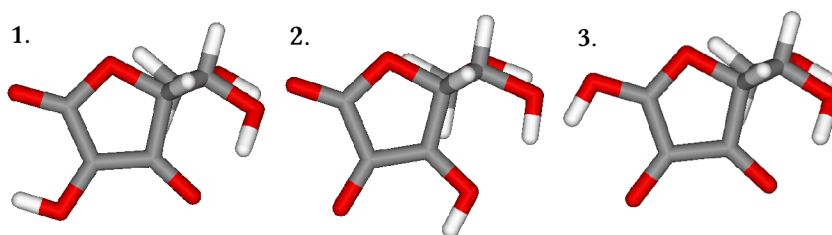
Obrázek 6.17: Vypočtené (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) a naměřené Ramanovo spektrum pro kyselinu askorbovou ve vodě a v metanolu. Spektra jsou normalizovaná.

6.3 Askorbát sodný

U askorbátu sodného byl postup obdobný jako u kyseliny askorbové. Na úvod byl prozkoumán konformační prostor pomocí skenů potenciální energie, aby byla nalezena lokální minima. Dále byla k prozkoumání využita molekulová dynamika s explicitními molekulami vody, případně metanolu. U askorbátu sodného byly výpočty provedeny pro jeho tři různé formy.

6.3.1 Různé formy askorbátu sodného

Vycházeli jsme ze struktury, která se uvádí v literatuře, např. v článku [18]. Po porovnání vypočteného Ramanova a ROA spektra se spektra z experimentu nebylo dosaženo uspokojivé shody. Proto byly výpočty provedeny i pro další dvě struktury, které by pro deprotonovanou formu AH^- mohly přicházet do úvahy. Tyto struktury jsou zobrazeny na obrázku č. 6.18. Jejich Ramanova a ROA spektra jsou zobrazena později v kapitole č. 6.3.4. Z těchto dvou přidaných forem byla vyloučena forma č. 3, jejíž spektrum nebylo ve shodě se spektrem z experimentu. Dále jsme se tedy zabývali formou č. 1, která je uváděna v literatuře a poté formou č. 2.

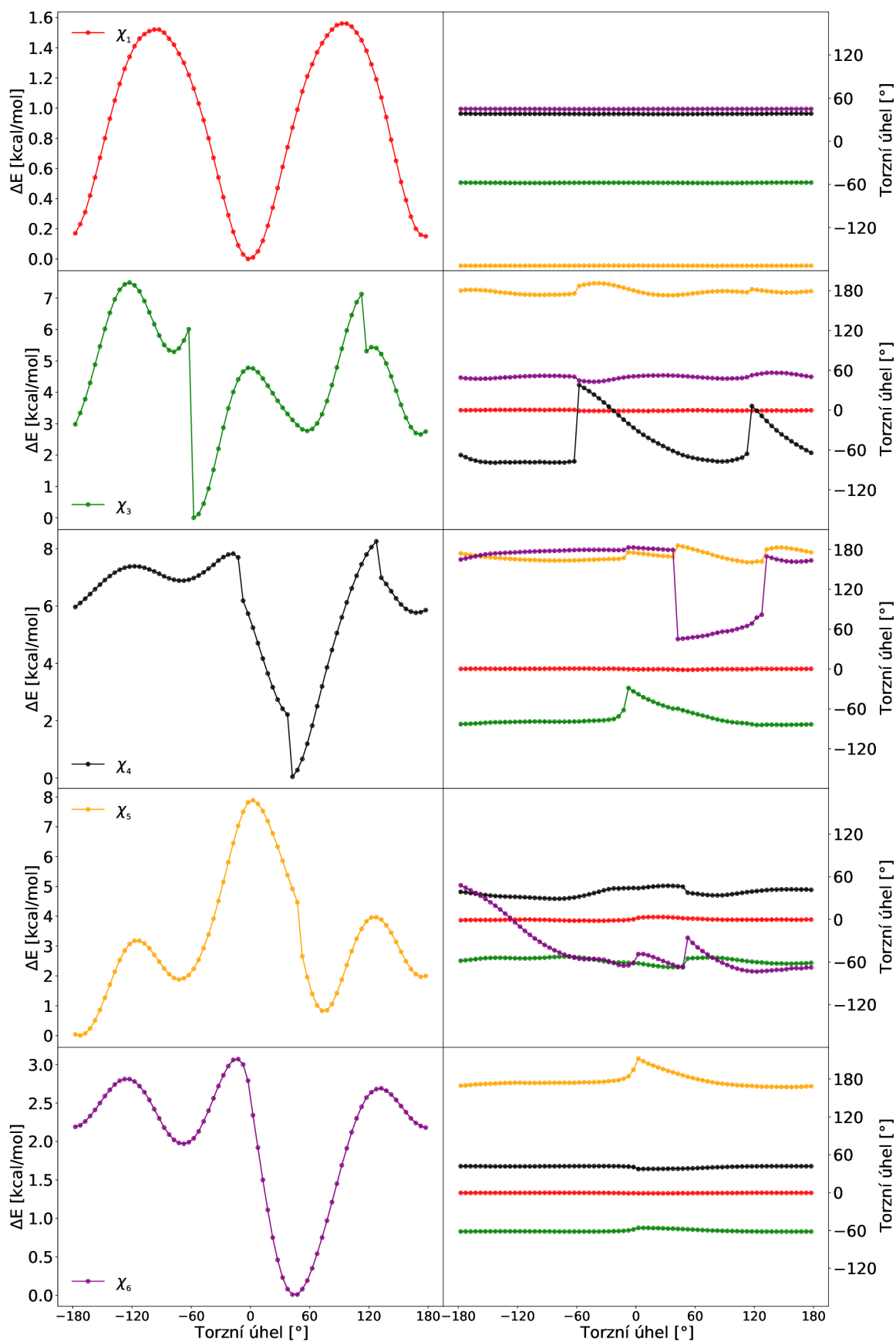


Obrázek 6.18: Tři různé formy askorbátu sodného.

6.3.2 Analýza torzních úhlů

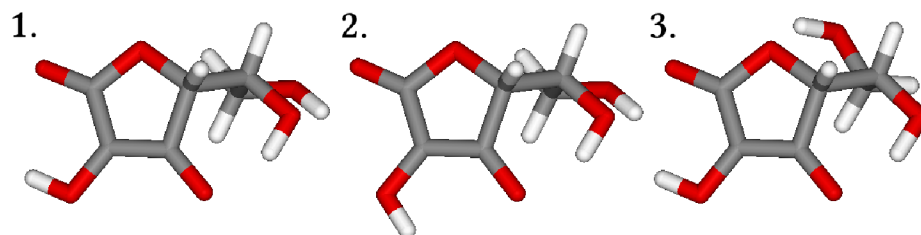
Pro první formu askorbátu sodného byl proveden PES sken pro stejné torzní úhly jako u kyseliny askorbové, které jsou vyznačeny na obrázku č. 3.1, akorát s tím rozdílem, že u askorbátu sodného kvůli absenci jednoho z vodíků není definovaný torzní úhel χ_2 . Na obrázku č. 6.19 jsou zobrazeny jednotlivé průběhy energie v závislosti na skenovaném torzním úhlu spolu s hodnotami ostatních torzních úhlů.

Průběh energie pro torzní úhel χ_1 má dvě výrazná minima v oblasti 0° a 180° . Jejich energetický rozdíl je $0,5$ kcal/mol. Pro torzní úhel χ_3 je nejhlubší minimum okolo -60° . V této oblasti a také v oblasti okolo 115° lze pozorovat skokovou změnu v energii. V obou případech došlo ke změně hodnoty torzního úhlu χ_4 . Průběh energie pro torzní úhel χ_4 má nejhlubší minimum pro přibližně 40° . Pro tento průběh energie jsou tři oblasti, ve kterých došlo ke skokové změně v energii, a to -10° , 40° a 125° . V oblasti -10° došlo ke změně torzního úhlu χ_3 , v oblasti 40° a 125° ke změně torzního úhlu χ_6 . Průběh energie pro torzní úhel χ_5 má tři minima. Nejhlubší minimum je okolo 180° , další výrazné minimum okolo 70° a nakonec poslední minimum okolo -75° . I v tomto průběhu lze nalézt oblasti, ve kterých došlo ke skokové změně v energii, a to 50° a 180° . V těchto oblastech došlo ke větší změně torzního úhlu χ_6 . Průběh energie pro torzní úhel χ_6 má nejhlubší minimum okolo 45° a poté další dvě minima okolo 180° a -70° .



Obrázek 6.19: Vlevo: Průběhy jednotlivých torzních úhlů askorbátu sodného. Vpravo: Průběhy hodnot ostatních čtyř torzních úhlů při 1D PES skenu daného torzního úhlu. Jednotlivé torzní úhly jsou barevně odlišeny.

Na obrázku č. 6.20 jsou zobrazeny konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D skenů. V tabulce č. 6.6 jsou pro tyto konformace uvedené hodnoty torzních úhlů. Konformace č. 1 odpovídá globálnímu minimu.

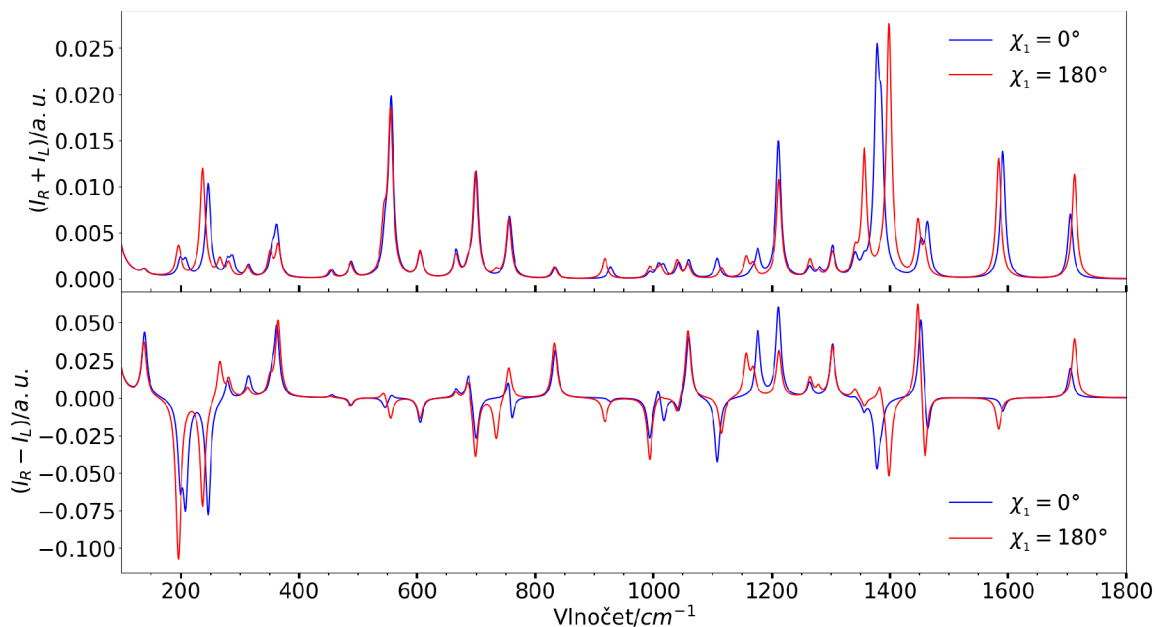


Obrázek 6.20: Konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D PES skenů zobrazených na obrázku č. 6.6. Hodnoty torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ jsou uvedeny v tabulce č. 6.2.

Tabulka 6.6: Torzní úhly $\chi_1 - \chi_6$ pro konformace, které odpovídají lokálním minimům z 1D PES skenů. Tyto konformace jsou zobrazeny na obrázku č. 6.8.

Číslo konformace	Energie [kcal/mol]	χ_1 [°]	χ_3 [°]	χ_4 [°]	χ_5 [°]	χ_6 [°]
1	0	0	-58	38	-173	45
2	0,15	180	-58	38	-173	45
3	0,81	0	-55	31	-107	-22

Na obrázku č. 6.21 jsou zobrazena Ramanova a ROA spektra pro askorbát sodný, pokud je torzní úhel χ_1 roven 0° nebo 180° . Kromě posunu pásů a změn v jejich intenzitách si lze všimnout dalších odlišností. V Ramanově spektru okolo 350 cm^{-1} je pro konformaci s $\chi_1=0^\circ$ jeden pás, pro konformaci s $\chi_1=180^\circ$ dva pásy. Pro případ 180° je okolo 740 cm^{-1} pás, který ve spektru není, pokud je χ_1 roven 0° . V oblasti $1150 - 1200\text{ cm}^{-1}$ došlo pro 180° k rozdělení pásu. Největší změna je v oblasti $1350 - 1425\text{ cm}^{-1}$, kde místo jednoho silného pásu jsou pro 180° dva pásy.



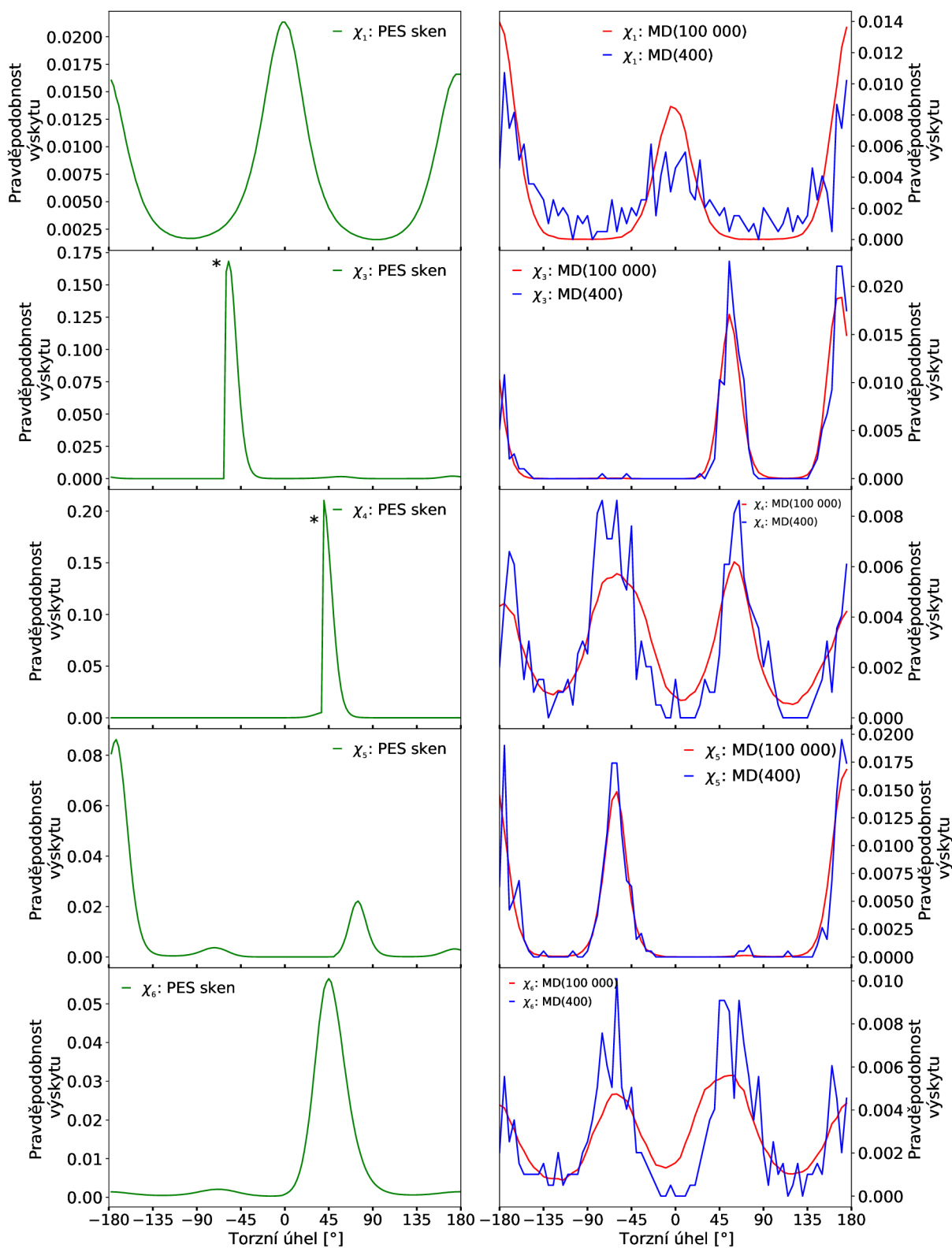
Obrázek 6.21: Ramanova a ROA spektra (BPW91/CPCM/6-31++G**) pro askorbát sodný s dvěma různými hodnotami pro torzní úhel χ_1 .

6.3.3 Molekulárně dynamické simulace

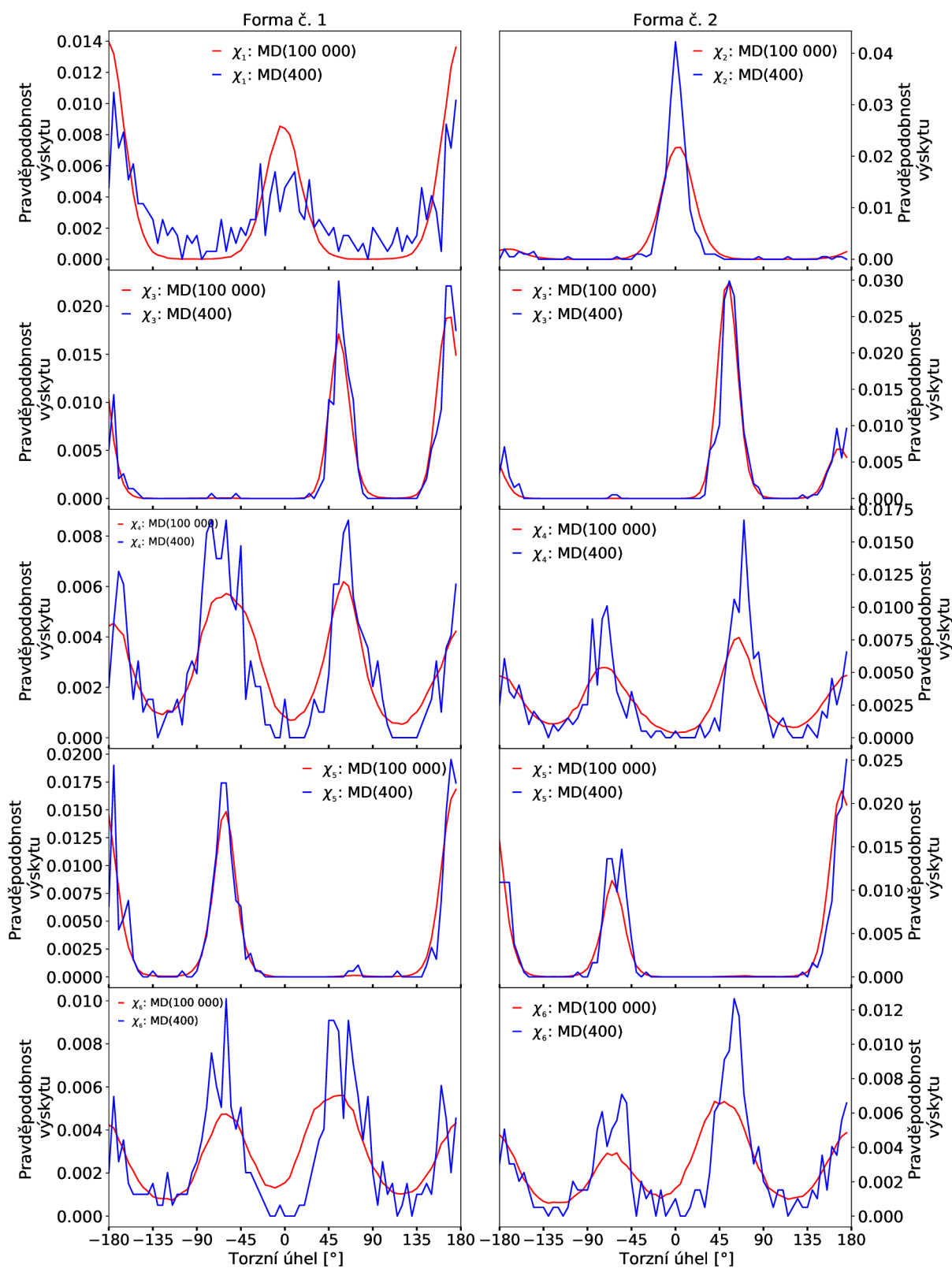
Stejně jako tomu bylo u kyseliny askorbové, byla k výpočtu spekter, které by více odpovídaly reálné situaci, využita MD s explicitními molekulami vody z 1. solvatační vrstvy. Z produkční části MD (100 ns) se vybralo ekvidistantně 400 klastrů. Ty byly zoptimalizovány metodou částečné optimalizace v normálních módech.

Na obrázku č. 6.22 jsou zobrazeny distribuce získané z PES skenů a z molekulové dynamiky pro první strukturu z obrázku č. 6.18. Distribuce z PES skenu byly získány přepočtením na pravděpodobnosti na základě energií na obrázku č. 6.19. V případě MD jsou zobrazeny zároveň distribuce pro všech 100 000 konformací z produkčního běhu a distribuce pro vybraných 400 klastrů. Co se týče torzního úhlu χ_1 , pro něj jsou dvě preferované hodnoty 0° a 180° . V případě PES skenu je mírně pravděpodobnější hodnota 0° , v případě MD 180° . Distribuce z PES skenu pro torzní úhel χ_3 je ovlivněna skokovou změnou v energii okolo -60° . Tato hodnota je z distribuce z PES skenu nepravděpodobnější. Z distribuce z MD jsou pravděpodobné dvě hodnoty, a to 55° a 167° , zatímco -60° má minimální zastoupení. Distribuce z PES skenu pro torzní úhel χ_4 je rovněž ovlivněna výskytem skokové změny v energii. Z této distribuce je nejčastější hodnotou 40° . U distribuce získané z MD jsou pro χ_4 tři preferované hodnoty, a to -80° , 60° a 180° . Z distribuce z PES skenu pro torzní úhel χ_5 je jako nejčastější hodnota 180° , poté 70° a -75° . Z distribuce z MD mezi nejčastější hodnoty patří 180° a -60° . Torzní úhel χ_6 má v případě distribuce z PES skenu nejpravděpodobnější hodnotu 45° a poté ještě -60° . U distribuce z MD jsou pravděpodobné tři hodnoty, a to 45° , 180° a -60° . Mezi distribucemi z PES skenu a z MD jsou patrné velké rozdíly. Přesnější by měly být distribuce z molekulové dynamiky kvůli zahrnutí explicitních vod, které působí na molekulu askorbátu sodného. Některé konformace z PES skenů se ale v MD neobjevily, což by si zasloužilo bližší zkoumání. Jedná se o -60° u χ_3 a o 70° u χ_5 .

Na obrázku č. 6.23 jsou srovnány distribuce z MD pro první dvě formy askorbátu sodného, které jsou zobrazené na obrázku č. 6.18. Jak už bylo zmíněno u obrázku č. 6.22, pro první formu jsou pro torzní úhel χ_1 preferované dvě hodnoty 0° a 180° s tím, že hodnota 180° je více preferovaná. U druhé formy není definován úhel χ_1 , ale χ_2 . Ten má preferovanou hodnotu 0° . Torzní úhel χ_3 má u obou forem preferované hodnoty 55° a 167° s tím rozdílem, že u první formy jsou obě hodnoty téměř stejně preferované, u druhé formy je preferovanější hodnota 55° . Pro torzní úhel χ_4 jsou u obou forem preferované tři hodnoty, a to -60° , 60° a 180° . U torzního úhlu χ_5 jsou preferovanými hodnotami 180° a -60° . U první formy je pravděpodobnost těchto dvou hodnot v podstatě stejná, u druhé formy je preferována hodnota 180° . U torzního úhlu χ_6 jsou podobně jako u torzního úhlu χ_4 tři preferované hodnoty -60° , 45° a 180° , u obou forem je o něco častější 45° . U obou forem askorbátu sodného jsou pro jednotlivé torzní úhly preferované stejné hodnoty, liší se akorát to, která je pro danou formu upřednostňovaná.



Obrázek 6.22: Distribuce torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ z PES skenu a z molekulové dynamiky pro první formu askorbátu sodného. V případě MD jsou zobrazeny zároveň distribuce pro všech 100 000 konformací z produkčního běhu a distribuce pro vybraných 400 klastrů. Označení * znamená, že v daném místě v PES skenu došlo ke skokové změně v energii.



Obrázek 6.23: Distribuce torzních úhlů $\chi_1 - \chi_6$ z molekulové dynamiky pro první dvě formy sodné soli kyseliny askorbové. Jsou zobrazeny zároveň distribuce pro všech 100 000 konformací z produkčního běhu a distribuce pro vybraných 400 klastrů. Označení * znamená, že v daném místě v PES skenu došlo ke skokové změně v energii.

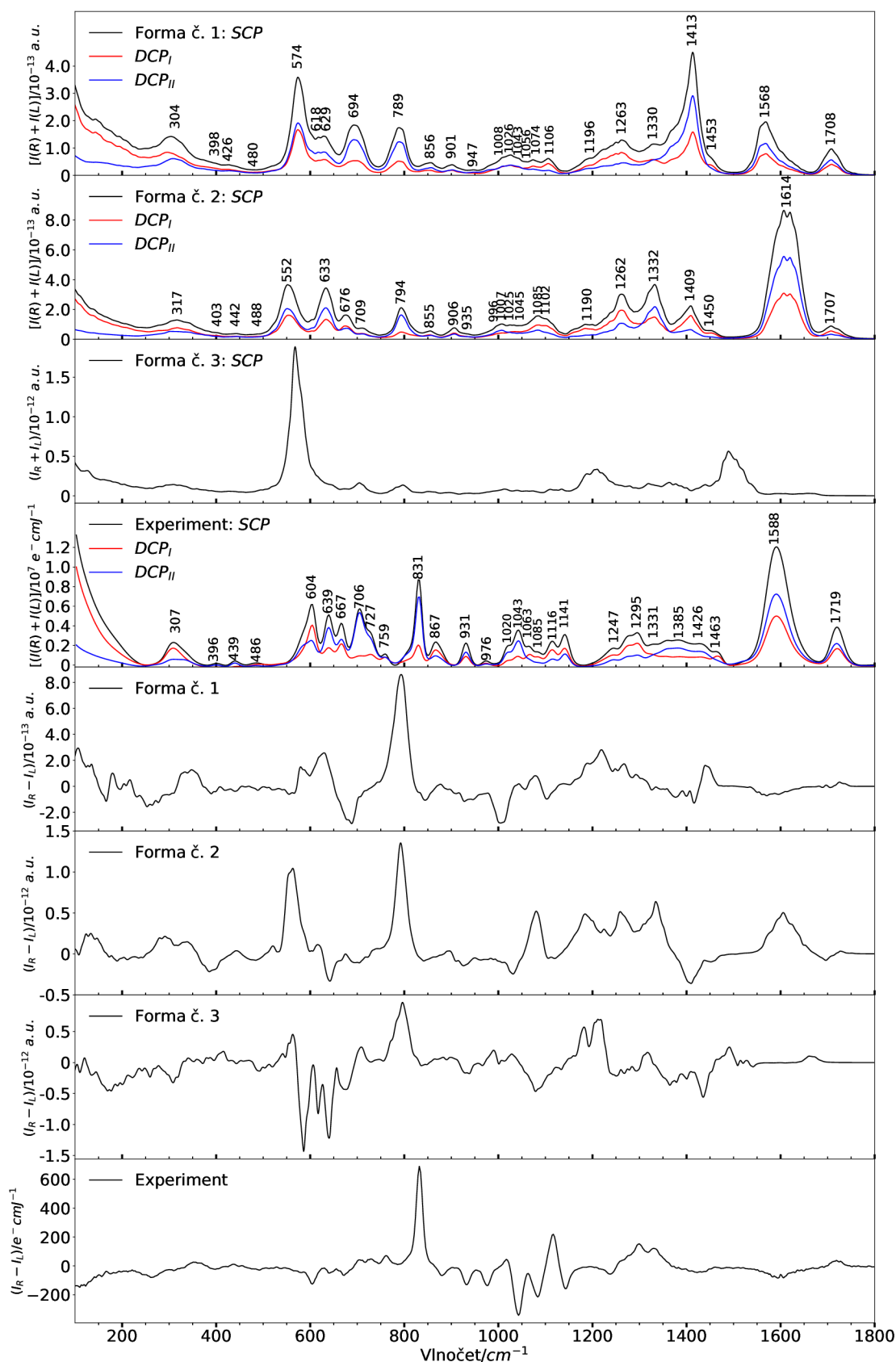
6.3.4 Porovnání simulovaných a naměřených spekter

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, celkově byla počítána MD pro tři různé formy askorbátu sodného, které jsou zobrazeny na obrázku č. 6.18. Nejprve bylo vypočteno spektrum pro první formu, která se uvádí v literatuře. Především kvůli silnému pásu okolo 1410 cm^{-1} , který se nevyskytuje v experimentálním spektru a odlišnému počtu pásů v oblasti nižších vlnočtů ($550 - 800\text{ cm}^{-1}$) byl výpočet proveden pro další dvě formy. U spektra pro druhou formu se sice nevytěpila oblast nižších vlnočtů, ale okolo 1410 cm^{-1} zmizel silný pás, který byl ve spektru pro první formu. Spektrum pro třetí formu má odlišné tendence jako naměřené spektrum, proto tato forma byla vyloučena a dále se s ní nepracovalo. Na obrázku č. 6.24 jsou zobrazena vypočtená spektra pro všechny tyto tři formy. Pro první dvě formy jsou zobrazena spektra pro modulační schémata SCP, DCP_I a DCP_{II}, která byla vypočtena ze 400 klastrů. Spektrum pro třetí formu bylo vypočteno ze 100 klastrů a vygenerováno pouze pro modulační schéma SCP. Jelikož toto spektrum neodpovídalo experimentálnímu, nebylo dopočítáno více klastrů či spektra pro další modulační schémata. Rovněž jsou zobrazena experimentální spektra.

Spektrum pro první formu se od experimentálního liší především tím, že má okolo 1410 cm^{-1} silný pás, který se nevyskytuje v experimentálním spektru. V této oblasti se vyskytuje kývavá vibrace C-H a CH₂, deformace kruhu a ohýbavá vibrace C-O-H. V oblasti nižších vlnočtů ($550 - 800\text{ cm}^{-1}$) se vyskytují vibrace stejného typu - deformace kruhu a kývavá vibrace O-H. V experimentálním spektru se v této oblasti vyskytuje 6 pásů. První tři se vyskytují rovněž ve spektru pro první formu, akorát s tím rozdílem, že druhý a třetí pás (618 a 629 cm^{-1}) jsou téměř slité a mají přibližně poloviční intenzitu oproti prvnímu z pásů. V experimentálním spektru mají tyto pásy rovněž nižší intenzitu, ale intenzita prvního z pásů není oproti nim tak vysoká. Čtvrtému a pátému pásu z experimentu (706 a 727 cm^{-1}), které jsou téměř slité, odpovídá jeden širší pás okolo 694 cm^{-1} . Poslední ze 6 pásů z experimentu nelze pozorovat. V oblasti $1000 - 1150\text{ cm}^{-1}$ mají pásy ve vypočteném spektru přibližně podobnou intenzitu na rozdíl od experimentu, kde jsou jednotlivé pásy intenzitně lépe rozlišitelné. Oblast $1150 - 1500\text{ cm}^{-1}$ se liší výskytem silného pásu okolo 1410 cm^{-1} ve výpočtu. Pás okolo 1568 cm^{-1} ve výpočtu není tak silný, jak by se dalo očekávat na základě spektra z experimentu.

U spektra vypočteného pro druhou formu, podobně jako u první formy, úplně neodpovídá počet pásů v oblasti $550 - 800\text{ cm}^{-1}$. Druhému a třetímu pásu z experimentu (639 a 667 cm^{-1}) odpovídá jeden ve vypočteném spektru. Čtvrtý a pátý pás (676 a 709 cm^{-1}) jsou ve výpočtu oproti prvnímu z pásů slabé, ve spektru z experimentu je jejich intenzita podobná. Poslední z šesti pásů nelze pozorovat. V oblasti $1000 - 1150\text{ cm}^{-1}$, podobně jako je tomu u první formy, mají vypočtené pásy přibližně podobnou intenzitu a nejsou příliš výrazně oddělené. V oblasti $1150 - 1500\text{ cm}^{-1}$ ve vypočteném spektru jsou tři pásy. Ve spektru z měření je v této oblasti několik pásů, které jsou téměř slité a tvoří dva širší pásy. V oblasti $1550 - 1800\text{ cm}^{-1}$ jsou dva pásy, které intenzitně odpovídají experimentu mnohem lépe, než je tomu u spektra pro první formu.

U Ramanových spekter pro modulační schéma DCP_I a DCP_{II} u první formy je odlišnost u pásu 574 cm^{-1} , pro který je ve výpočtu lehce výraznější pás pro modulační schéma DCP_{II}, kdežto v experimentu je výraznější pás pro modulační schéma DCP_I. Další odlišnost je u pásu 856 cm^{-1} , kdy je ve výpočtu výraznější pás pro modulační schéma DCP_{II}, kdežto v experimentu je výraznější pás pro modulační schéma DCP_I. Pro pás 901 cm^{-1} ve výpočtu mají pásy pro dvě různá DCP schémata přibližně stejnou intenzitu, v experimentu je silnější pás pro modulační schéma DCP_{II}. Pro pásy v oblasti



Obrázek 6.24: Ramanova a ROA spektra pro formy askorbátu sodného (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) zobrazené na obrázku č. 6.18 ve srovnání se spektrem z experimentu. Ramanova spektra pro první dvě formy jsou zobrazena pro modulační schémata SCP, DCP_I a DCP_{II} , Ramanovo spektrum pro třetí formu pro modulační schéma SCP.

1000 - 1056 cm^{-1} ve výpočteném spektru jsou intenzity pro dvě různá DCP schémata stejné, u experimentálního spektra mají pásy při modulačním schématu DCP_{II} vyšší intenzitu.

U polarizovaných Ramanových spekter pro druhou formu jsou odlišnosti v přibližně stejných oblastech. Je tu odlišnost u pásu 552 cm^{-1} , pro který je ve výpočtu lehce výraznější pás pro modulační schéma DCP_{II}, kdežto v experimentu je výraznější pás pro modulační schéma DCP_I. U pásu 855 cm^{-1} jsou ve výpočtu intenzity pro obě modulační schémata DCP obdobné, kdežto v experimentu je výraznější pás pro modulační schéma DCP_I. Pro pás 906 cm^{-1} ve výpočtu mají pásy pro dvě různá DCP schémata přibližně stejnou intenzitu, v experimentu je silnější pás pro modulační schéma DCP_{II}. Pás 1707 cm^{-1} ve výpočtu má výraznější intenzitu pro modulační schéma DCP_I, ale v experimentálním spektru je tomu naopak.

U ROA spekter není příliš dobrá shoda ani u jedné ze dvou počítaných forem askorbátu sodného. Více naměřenému ROA spektru odpovídá spektrum pro první formu. Lze u ní pozorovat silný záporný pás okolo 1000 cm^{-1} , který je v experimentálním spektru okolo 1050 cm^{-1} . V oblasti 1150 - 1800 cm^{-1} , na rozdíl od spektra pro druhou formu, nemá kladný a záporný pás, což souhlasí s experimentem. Obě formy mají v oblasti 550 - 800 cm^{-1} výrazné pásy, zatímco experimentální signál je mnohem slabší.

V tabulce č. 6.7 jsou jednotlivým Ramanovským pásům přiřazené typy vibrací. V oblasti nižších vlnočtů je převládající vibrací kývavá vibrace (wagging), která se týká OH skupin. Od přibližně 800 cm^{-1} se začíná objevovat kývavá vibrace, která se týká skupiny CH₂ a valenční vibrace C-O nebo C-C. V oblasti 1295 - 1426 cm^{-1} je ohýbavá vibrace C-O-H, kývavá vibrace C-H a u skupiny CH₂ buď vibrace kroutící nebo kývavá. Okolo 1460 cm^{-1} se objevuje nůžková (scissoring) vibrace. Pro dva nejvyšší pásy se jedná o valenční vibrace C=O a C=C. Téměř všude se vyskytuje deformace kruhu (ring def) je výrazná především v oblasti nižších vlnočtů.

Tabulka 6.7: Přiřazení typu vibrace vypočteným a naměřeným ramanovským pásům (uvedeny v cm^{-1}) pro askorbát sodný rozpuštěnou ve vodě. Vysvětlivky: v, very; w, weak; m, medium; s, strong; sh, shoulder; bend, bending; wag, wagging; def, deformation; str, stretching; sci, scissoring; tw; twisting.

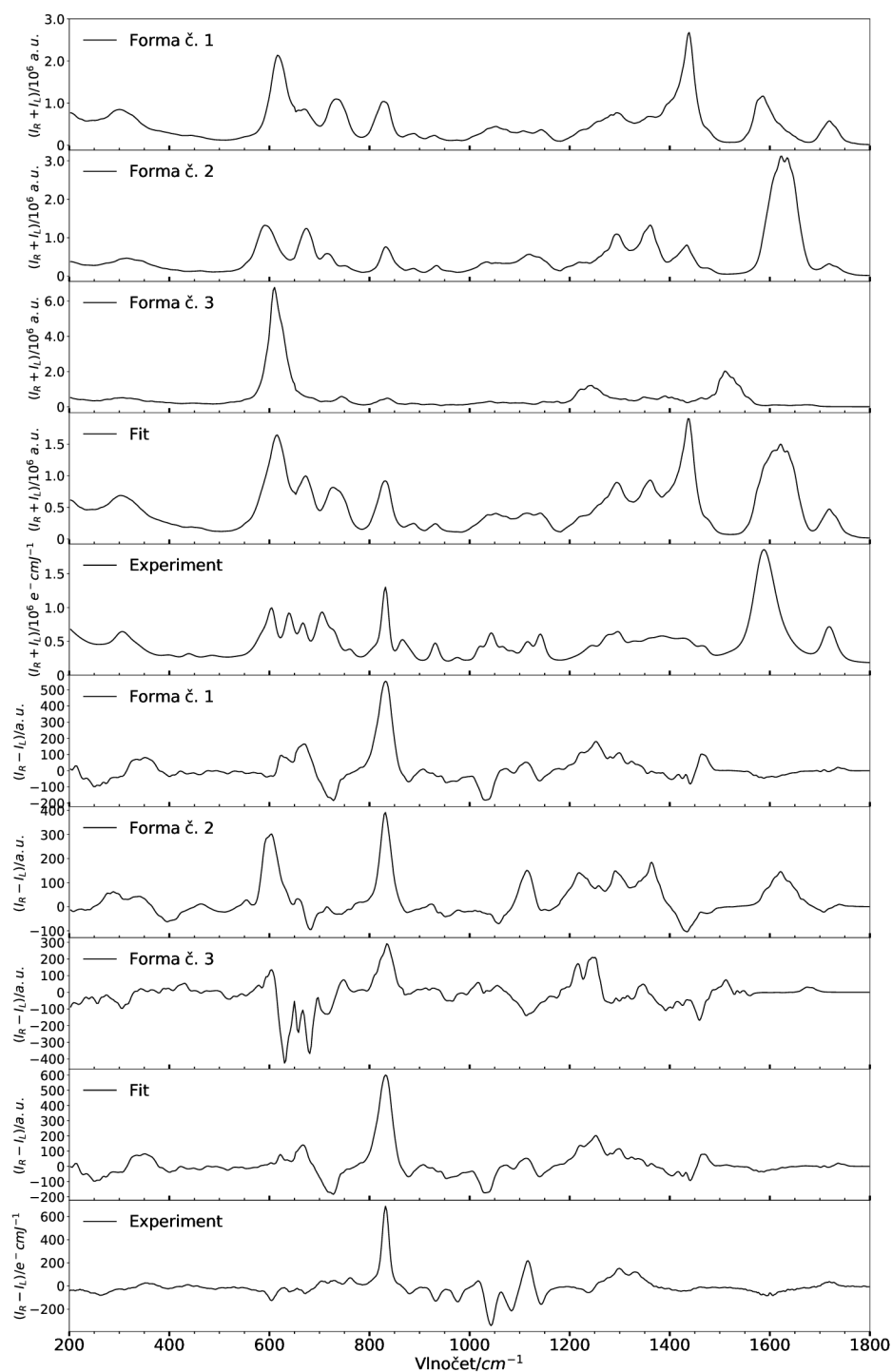
Experiment	Forma č. 1	Forma č. 2	Typ vibrace
307 w	304 w	317 w	ring def, O-H wag
396 vw	398 vw	403 sh, vw	ring def, O-H wag
439 vw	426 vw	442 vw	ring def, O-H wag
486 vw	480 vw	488 vw	ring def, O-H wag
604 m	574 m	552 m	ring def
639 m	618 w	633 m	ring def, O-H wag
667 m	629 w	633 m	ring def, O-H wag
706 m	694 m	676 w	ring def, O-H wag
727 sh, m	694 m	709 w	ring def, O-H wag
759 w	-	-	
831 s	789 m	794 w	ring def, O-H wag
867 w	856 vw	855 vw	CH ₂ rock, ring def
931 w	901 vw	906 vw	CH ₂ rock, ring def, C-C str
976 vw	947 vw	935 vw	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1020 sh, w	1008 w	996 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1043 m	1026 w	1007 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str, C-C str
1063 w	1043 w	1025 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str, C-C str
1085 w	1056 w	1045 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str, C-C str
1116 w	1074 w	1085 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1141 m	1106 w	1102 w	CH ₂ rock, ring def, C-O str
1247 w	1196 w	1190 w	C-H wag, ring def, C-O-H bend
1295 w	1263 w	1262 m	C-H wag, CH ₂ twi, ring def, C-O-H bend
1331 w	1330 w	1332 m	C-H wag, CH ₂ twi, ring def, C-O-H bend
1385 w	1413 vs	1409 w	C-H wag, CH ₂ wag, ring def, C-O-H bend
1426 w	1413 vs	1409 w	C-H wag, CH ₂ wag, ring def, C-O-H bend
1463 w	1453 sh, w	1450 sh, vw	CH ₂ sci
1588 vs	1568 m	1614 s	C=C str, C=O str
1719 m	1708 m	1707 w	C=C str, C=O str

6.3.5 Rozklad spekter

Provedli jsme rozklad experimentálních SCP Ramanových a ROA spekter do spekter vypočítaných pro tři uvažované formy askorbátu sodného. Ramanova a ROA spektra pro tyto formy s naškálovanou x osou, jejich fit a spektrum z experimentu je zobrazeno na obrázku č. 6.25. V tabulce č. 6.8 jsou uvedeny výsledky rozkladu. Z výsledků vyplývá, že do experimentálního Ramanova i ROA spektra nejvíce přispívá první forma. Třetí forma do Ramanového spektra nepřispívá vůbec. Do ROA spektra přispívá z naprosté většiny (95%) první forma, další dvě formy po 5%.

Tabulka 6.8: Výsledky rozkladu experimentálního spektra do spekter vypočtených pro tři uvažované formy askorbátu sodného.

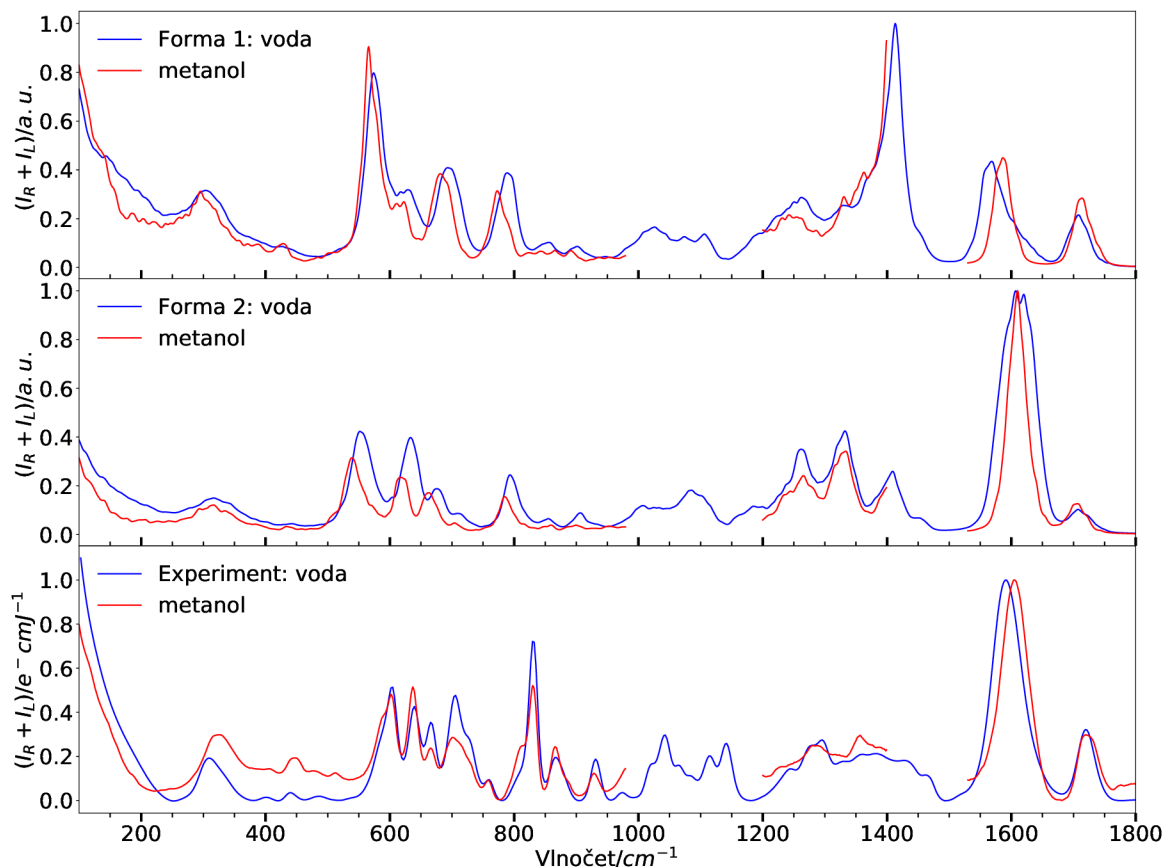
	Forma č. 1 [%]	Forma č. 2 [%]	Forma č. 3 [%]
Raman	72	28	0
ROA	95	5	5



Obrázek 6.25: Naškálovaná Ramanova a ROA spektra pro tři různé formy askorbátu sodného (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) zobrazené na obrázku č. 6.18 ve srovnání s jejich fitem a se spektrem z experimentu.

6.3.6 Porovnání simulovaných a naměřených spekter ve vodě v metanolu

Dalším rozpouštědlem, pro které byly provedeny výpočty Ramanových a ROA spekter, byl metanol. Výpočet byl opět proveden pro první dvě formy askorbátu sodného. Na obrázku č. 6.26 je zobrazeno vypočtené a naměřené Ramanovo spektrum pro askorbát sodný v metanolu zároveň s Ramanovými spektry pro askorbát sodný ve vodě. Stejně jako v případě kyseliny askorbové jsou u spekter pro metanol vynechané oblasti, ve kterých jsou intenzivní pásy metanolu, které se nepovedlo dobře odečíst, tedy oblast $980 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ a oblast $1400 - 1530 \text{ cm}^{-1}$ a zároveň jsou spektra normalizovaná.



Obrázek 6.26: Ramanova spektra pro první dvě formy askorbátu sodného ve vodě a v metanolu (MD, BPW91/CPCM/6-31++G**) zobrazené na obrázku č. 6.18 ve srovnání se spektry z experimentu. Spektra jsou normalizovaná.

U vypočtených spekter v metanolu lze pozorovat obdobné pásy jako v případě vody. V oblasti nižších vlnočtů lze pozorovat v případě metanolu posun k nižším vlnočtům, v oblasti vyšších vlnočtů posun k vyšším vlnočtům. Pás, který je okolo 425 cm^{-1} , je pro případ metanolu výraznější než v případě vody, což odpovídá spektrům z experimentu. V oblastech nižších intenzit u vypočtených spekter (např. $300 - 550 \text{ cm}^{-1}$ nebo $800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) lze pozorovat více pásů vedle sebe.

U experimentálního spektra pro metanol lze u dvou pásů okolo 640 a 670 cm^{-1} pozorovat změnu v intenzitě oproti spektru pro vodu. U spektra pro vodu mají tyto pásy přibližně stejnou intenzitu, u metanolu má druhý pás výrazně nižší intenzitu.

Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo interpretovat Ramanova a ROA spektra kyseliny askorbové a askorbátu sodného. K tomu bylo nutné prozkoumat konformační prostor těchto molekul a najít konformace, které do výsledných spekter nejvíce přispívají.

Pomocí Ramanových spekter kyseliny askorbové ve vodě měřených v závislosti na pH a následném zpracování pomocí faktorové analýzy byly vypočteny disociační konstanty kyseliny askorbové - $pK_1 = 4,11$ a $pK_2 = 11,72$. Dále bylo získáno zastoupení různě protonovaných složek a jim odpovídající Ramanova spektra. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou.

Pro dvě různě protonované formy: kyselinu askorbovou a askorbát sodný byla změřena Ramanova a ROA spektra v různých rozpouštědlech. Nejvhodnějším rozpouštědlem je voda, která je zároveň díky svému slabému signálu velmi vhodným rozpouštědlem pro Ramanovu spektroskopii. Tato rozpouštědla mají několik vlastních intenzivních Ramanových pásů a v jejich místě je obtížné získat spektrum studované látky. Věřohodná spektra ve většině spektrálního rozsahu se podařilo získat ještě pro metanol. Ramanova spektra pro kyselinu askorbovou ve vodě a v metanolu se liší pouze mírně. Pomocí simulací se podařilo dobře interpretovat pozorované rozdíly ve spektrech.

Pro kyselinu askorbovou se nejprve provedly výpočty plochy potenciální energie ke zjištění konformací, které jsou lokálními minimy. Podařilo se zjistit také minimum globální. Výsledné spektrum získané jako Boltzmannovský průměr ale nepřinesl uspokojivou shodu s experimentálním spektrem, proto byla k dalšímu prozkoumání konformačního prostoru použita molekulová dynamika, ze které jsme získali klastry molekuly kyseliny askorbové s vodami z první solvatační vrstvy. Byly porovnány distribuce torzních úhlů získané z PES skenů a z molekulové dynamiky. Ukázalo se, že přidání explicitních molekul rozpouštědla má zásadní a příznivý vliv na výsledná spektra. U Ramanových spekter bylo dosaženo velmi dobré shody. U ROA spekter je shoda také dobrá, výjimkou je oblast $1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, ve které jsou ve vypočteném spektru dva silné pásy - kladný a záporný, přičemž v experimentálním spektru žádný silný signál v této oblasti není.

Také u askorbátu sodného byl rovněž nejprve proveden výpočet plochy potenciální energie, aby byla zjištěna možná lokální minima. Poté se provedly simulace s využitím molekulové dynamiky opět jak pro askorbát sodný ve vodě, tak v metanolu. Výpočet molekulové dynamiky byl proveden i pro další dvě uvažované formy askorbátu sodného, protože pro výchozí formu nebyla shoda s experimentem příliš dobrá. Tyto dvě formy se liší umístěním OH skupiny na pětičlenném kruhu. Byl proveden rozklad experimentálního spektra do spekter tří uvažovaných forem. Z výsledků lze usoudit, že do výsledného spektra přispívá kromě formy, která je běžně uváděná v literatuře, i forma druhá, která nemá zanedbatelnou populaci. U ROA spekter vychází překvapivě populace výrazně nižší a v budoucnu je tedy třeba ještě přítomnost neobvyklé formy askorbátu sodného ověřit další nezávislou technikou.

Literatura

- [1] LONG, Derek A. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [2] HARRIS, Daniel C.; BERTOLUCCI, Michael D. *Symmetry and spectroscopy : an introduction to vibrational and electronic spectroscopy*. New York: Dover Publications, 1989.
- [3] BARRON, L. D; BOGGARD, M. P.; BUCKINGHAM, A. D. *Differential Raman-scattering of right and left circularly polarized-light by asymmetric molecules*. Nature 1973, (241), 113-114.
- [4] KOPECKÝ Jr., Vladimír; BAUMRUK Vladimír. *Kam kráčí Ramanova optická aktivita aneb ohlédnutí za uplynulými 40 lety*. Chemické listy. 2011, (105), 162-169.
- [5] POLAVARAPU, Prasad L. *Chiroptical spectroscopy: fundamentals and applications*. Boca Raton, 2017.
- [6] NAFIE, A.; HONGGANG L. *Simultaneous acquisition of all four forms of circular polarization Raman optical activity: results for α -pinene and lysozyme*. J. Raman Spectrosc. 2012, (43), 89–94.
- [7] KAPITÁN, J. *Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako metody studia biomolekul ve vodném prostředí*. Dizertační práce, Univerzita Karlova: Praha, 2006.
- [8] SLAVÍČEK, Petr; MUCHOVÁ Eva. *Kvantová chemie: první čtení*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.
- [9] BOUŘ, Petr. *Základy kvantových výpočtů vlastností molekul*. Skripta, VŠCHT: Praha, 2003.
- [10] COSSI, M.; REGA N.; SCALMANI G.; BARONE V. *Energies, Structures, and Electronic Properties of Molecules in Solution with the C-PCM Solvation Model*. J. Comput. Chem. 2003, (24), 669–681.
- [11] PULAY, P.; FOGARASI, G.; PANG, F.; BOGGS, J. E. *Systematic ab initio gradient calculation of molecular geometries, force constants, and dipole moment derivatives*. J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, (10), 2550-2560.
- [12] PULAY, P.; FOGARASI, G. *Geometry Optimization in Redundant Internal Coordinates*. J. Chem. Phys. 1992, 96, (4), 2856-2860.
- [13] BOUŘ, Petr., *Qgrad*, The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences: Prague, 2006.

- [14] BOUŘ, Petr.; KEIDERLING T. A. *Partial optimization of molecular geometry in normal coordinates and use as a tool for simulation of vibrational spectra*, J. Comput. Chem. 2002, (117), 4126-4132.
- [15] ZUBER, G.; HUG, W. *Rarefied Basis Sets for the Calculation of Optical Tensors. 1. The Importance of Gradients on Hydrogen Atoms for the Raman Scattering Tensor*, J. Phys. Chem., A 2004, 108, 11, 2108-2118.
- [16] PLACZEK G. *Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt*, In Handbuch der Radiologie, Marx, E., 'Ed.', Akademische Verlagsgesellschaft: Leipzig, 1934; 'Vol.' 6, pp 205-.
- [17] MICHAL, P. *Použití Ramanovy optické aktivity ke studiu interakce rozpuštěné látky s rozpouštědlem*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2017.
- [18] BERG, Rolf W. *Investigation of L(+)-Ascorbic acid with Raman spectroscopy in visible and UV light*. Applied Spectroscopy Reviews, 2015, 50:3, 193-239.
- [19] YADAV, R.A., RANI, P., KUMAR, M., SINGH, R., SINGH, P., and SINGH, N.P. *Experimental IR and Raman spectra and quantum chemical studies of molecular structures, conformers and vibrational characteristics of L-ascorbic acid and its anion and cation radical*. Spectrochim. Acta 2011, A84 (1): 6–21.
- [20] SINGH, P., SINGH N.P., and YADAV, R.A. *Study of the optimized molecular structures and vibrational characteristics of neutral L-ascorbic acid and its anion and cation radical using density functional theory*. J. Chem. Pharm. Res. 2010, 2 (5): 656–681
- [21] SHALMASHI, A; ELIASSI, A. *Solubility of L-(+)-Ascorbic Acid in Water, Ethanol, Methanol, Propan-2-ol, Acetone, Acetonitrile, Ethyl Acetate, and Tetrahydrofuran from (293 to 323) K*. J. Chem. Eng. Data 2008, (53), 1332-1334.
- [22] ZHANG, H; LIU, Z; HUANG, X; ZHANG, Q. *Determination, Correlation, and Application of Sodium L-Ascorbate Solubility in Nine Pure Solvents and Two Binary Solvents at Temperatures from 278.15 to 323.15 K*. J. Chem. Eng. Data 2018, (63), 233-245.
- [23] BOUŘ P.; MALOŇ, P. *MCM 95*, The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences: Prague, 2014.
- [24] *Gaussian 16*, Revision C. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [25] *AMBER 14*, University of California, San Francisco, 2014.
- [26] BOUŘ, Petr. *Xshell*, The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences: Prague, 2016.
- [27] EILERS, P. H. C; BOELEN H. F. M. *Baseline correction with asymmetric least squares smoothing*. Leiden University Medical Centre report, 2005.
- [28] PALACKÝ, J.; MOJZEŠ, P.; BOK J. *SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations*. . Journal of Raman spectroscopy 2011, Volume 42, Issue 7, 1528-1539.

- [29] MALINOWSKI, E. R. *Factor analysis in chemistry*. New York: J. Wiley, 1991.
- [30] ANDĚL, J. *Matematická statistika*, SNTL, Praha, 1985.
- [31] JUNGWIRTH, J.; ŠEBESTÍK, J.; ŠAFAŘÍK M.; KAPITÁN J. and BOUŘ, P. *Quantitative Determination of Ala-Ala Conformer Ratios in Solution by Decomposition of Raman Optical Activity Spectra*. J. Phys. Chem. B 2017, (121), 8956-8964.
- [32] PARCHAŇSKÝ, V.; KAPITÁN, J.; KAMINSKÝ, J.; ŠEBESTÍK J. and BOUŘ, P. (2013). *Ramachandran Plot for Alanine Dipeptide as Determined from Raman Optical Activity*. J. Phys. Chem. Lett. 2013, (4), 2763-2768.