

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

NAJBAUER ESZTER ÉVA

**A cisztein konformációs eloszlásának vizsgálata IR
lézerbesugárzással kombinált mátrixizolációs technikával**

Témavezető:
Dr. Tarczay György, docens
ELTE TTK Kémiai Intézet

Kémia BSc III.



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2012 ———

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés és célkitűzések	4
2. Irodalmi háttér, kísérleti előzmények	5
3. Az alkalmazott kísérleti és elméleti módszerek	8
3.1. A mátrixizolációs spektroszkópia története, alkalmazásai.....	8
3.2. Lézerek működése és a lézerek alkalmazása a mátrixizolációs spektroszkópiában .	11
3.2.1. A lézerek működése	11
3.2.2. Lézerek alkalmazása a mátrixizolációs spektroszkópiában	13
3.3. Kvantumkémiai számítások	15
4. A vizsgálataimhoz használt műszerek, a mérések gyakorlata	18
4.1. A mátrixizolációs berendezés.....	18
4.2. A mérésekhez használt IR spektrométer	19
4.3. A mérésekhez használt lézerek	19
5. Kísérleti eredmények	21
5.1. Közeli infravörös (NIR) spektrum felvétele.....	21
5.2. A 3. konformer azonosítása.....	24
5.3. Az 5. konformer azonosítása	29
5.4. A HB-konformerek vizsgálata	31
5.5. További besugárzási kísérletek	35
5.6. Összevetés a glicinnel, további lehetőségek új konformerek azonosítására	36
6. Összefoglalás	39
7. Köszönetnyilvánítás.....	41
8. Irodalomjegyzék	42

Rövidítésjegyzék

DFT:	sűrűségfunktional-elmélet (Density functional theory)
HB-konformer:	hidrogénkötött, O–H···N hidrogénkötésű konformer
IR:	infravörös
MI:	mátrixizoláció
MIR:	középső infravörös
NHB-konformer:	nem hidrogénkötött, gyenge N–H···O=Chidrogénkötésű konformer
NIR:	közeli infravörös
OPO:	Optikai Parametrikus Oszcillátor
SQM:	skálázott kvantummechanikai (Scaled Quantum Mechanical)
VCD:	rezgési cirkuláris dikroizmus

1. Bevezetés és célkitűzések

Tudományos diákköri munkám során a ciszteint vizsgáltam mátrixizolációs infravörös spektroszkópia segítségével. Munkám célja az volt, hogy infravörös lézer használatával kiegészített mátrixizolációs IR spektroszkópiai technikával azonosítsam a cisztein konformereit. Kísérleteim során szelektív lézeres besugárzást alkalmaztam, amelynek hatására bekövetkező konformerarány-változás lehetőséget ad arra, hogy ilyen bonyolult esetben is el tudjuk választani a különféle konformerekhez tartozó spektrumvonalakat, be tudjuk azonosítani a molekula mátrixban jelenlevő konformereit.

A vizsgálatok jelentőségét az adja, hogy sok esetben- így több aminosavnál is - azt tapasztalták, hogy nem minden olyan konformer mutatható ki kísérletileg, amelynek a kvantumkémiai számítások szerint elvileg kimutatható mennyiségben kellene előfordulnia. Reményeim szerint munkám egy kis molekula, a cisztein, esetében segít feltérképezni a kísérletileg észlelhető konformereloszlást, ami értékes információt nyújt az elmélet és a kísérlet közötti esetleges eltérések további vizsgálatához. Biológiai érdekesebb nagyobb rendszereken (pl. peptidek, fehérjék) végzett vizsgálatokat is csak akkor érthetünk meg alaposan, ha a kismolekulákra (például a nagy biomolekulák építőköveire) vonatkozó eredményeket már tökéletesen meg tudjuk magyarázni.

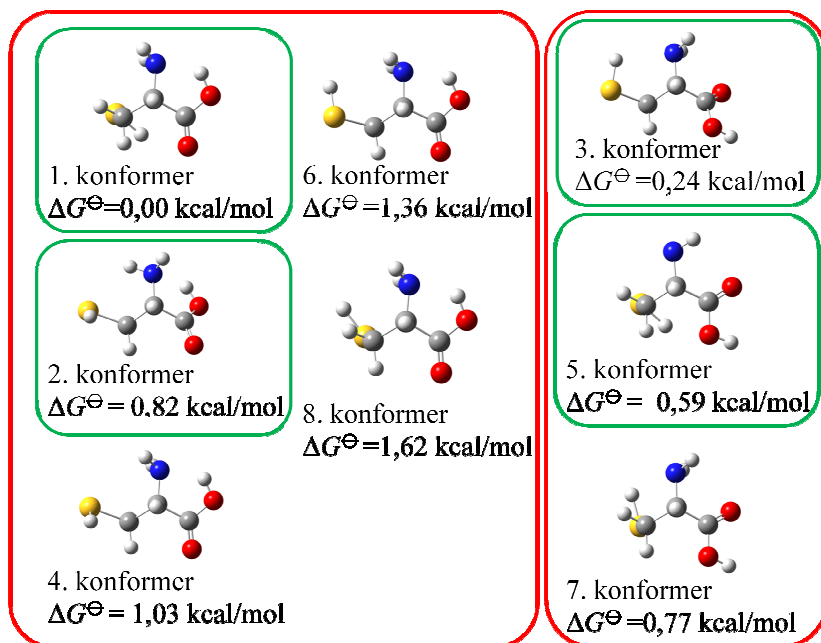
Kísérleteimet az ELTE Molekulaspektroszkópiai Laboratóriumában végeztem, a tavaly megnyílt lézerlaboratóriumban. Kvantumkémiai számításaimhoz a laboratórium számítógépes klaszterét használtam.

Dolgozatom szerkezete a következő: először áttekintem a cisztein konformereire irányuló eddigi vizsgálatokat, röviden bemutatom az eddig elért eredményeket, ismertetem a módszer elméleti alapjait, majd a kísérletek során használt berendezéseket: a mátrixizolációs berendezést, az alkalmazott lézert, és a méréshez használt műszereket. Ezután mutatom be a munkám során elért számítási és kísérleti eredményeket. Végül röviden összefoglalom dolgozatom tartalmát.

2. Irodalmi háttér, kísérleti előzmények

A fehérjék építőköveiként az aminosavak mind elméletileg, mind kísérletileg a legtöbbet tanulmányozott molekulák közé tartoznak. Az irodalomban számos vizsgálati módszerre láthatunk példát. A konformációs viszonyok tanulmányozásában, ezen belül az aminosavak konformereinek meghatározása területén is, egy igen hatékony technika a mátrixizoláció. Ezzel a technikával eddig tizennégy aminosavat vizsgáltak meg. Ilyen például az alanin [1], [2], az izoleucin [3], a fenilalanin [4], a prolin [5], a szerin [6], [7], [8], a cisztein [9] és természetesen a legegyszerűbb aminosav, a glicin [10],[11].

A cisztein mátrixizolációs vizsgálatára vonatkozóan egyetlen cikk található az irodalomban: 2007-ben jelent meg Dobrowolski és munkatársai cikke [9], mely mindmáig az egyetlen. Kísérleteiket mind Ar-, mind N₂-mátrixban elvégezték. Kvantumkémiai számításokat B3LYP/aug-cc-pVDZ szinten végeztek. A számítás eredményei alapján nyolc olyan konformert találtak, amelyek relatív gyakorisága a mátrixban még megfigyelhető 1% felett várható. Ezeket a konformereket az 1. ábrán mutatom be.



1. ábra: A cisztein konformerei relatív energiájukkal együtt. Az ábrán baloldalt a HB, jobboldalt az NHB konformerek szerepelnek. A szabadentalpia-értékek Dobrowolski és munkatársai cikkéből [9] valók, a százalékok az adott konformer mátrixban való elméleti szabadentalpiákból számított százalékos előfordulását jelölik, ha feltételezzük, hogy csak ezek a konformerek vannak jelen. A szerzők két csoportra osztották a konformereket, HB- és NHB- konformerekre (pirossal karikázva), és azt tudták megállapítani, hogy mindkét csoportból van jelen konformer a mátrixban. A zölddel karikázott konformereket Sanz és munkatársai mikrohullámú spektroszkópiával [12] azonosították.

A mátrixizolációs IR (MI-IR) spektrumok azonban meglehetősen bonyolult mintázatot adtak, mindössze annyit sikerült megállapítani, hogy minimum három, de akár hat vagy több konformer is jelen lehet a mátrixban, és ezek között van hidrogén-kötött (HB-) és nem hidrogén-kötött (NHB-) konformer is. (Az NHB-konformerek is tartalmaznak egy gyengébb $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ hidrogénkötést, de az egyszerűség kedvéért ezeket nem hidrogénkötött konformereknek nevezem a továbbiakban.) Egyértelműen csak a HB- és a NHB-konformereket tudták elkülöníteni egymástól, ezen belül alaposabban nem sikerült konformereket azonosítani (lásd 1. ábra). A konformereket megvizsgálva megtalálhatjuk ennek okát is. Látható, hogy a legalacsonyabb energiájú nyolc konformer felépíthető mindössze három alapváz alapján. (Alapváznak nevezem azt, ahol a COOH- és az NH_2 -csoportok relatív térállása megegyezik.) Ezen három csoport a következő konformereket tartalmazza: 1. csoport - 1,4,6,8; 2. csoport - 3,5,7; 3. csoport - 2. konformer. Látható, hogy az egyes konformer-csoportokon belül csupán kis különbségek vannak: például az 5. és 7. konformer között vagy az 4., 6. és 8. konformerek között az egyetlen különbség az SH-csoport térállása. További kis különbség lehet még a CH_2 -csoport térállása (például 3. és 5. konformerek között). Mivel ilyen kicsik a különbségek az egyes konformerek között, várhatóan rezgési színeképük is nagyon hasonló lesz: az IR spektrumban a sávok egybeolvadnak, így a konformereket nem lehet külön-külön beazonosítani még mátrixizolációs mérésekkel sem.

További számítások alapján mátrixizolációs rezgési cirkuláris dikroizmus (VCD) méréseket javasoltak a konformerek asszignálásához. Még abban az évben ugyanez a kutatócsoport külön számításos cikket [13] is közölt a cisztein konformereiről.

A fent említett cikken kívül még Sanz és munkatársai 2008-ban megjelent kísérleti cikke [4] szól a cisztein konformereinek vizsgálatáról. Ebben a munkában jet-es (adiabatikusan hűtött molekulaszugár) mintabeeresztést használtak, a konformációs analízist forgási spektroszkópia segítségével végezték. Két hidrogénkötésű (HB-) konformert (1. és 2., lásd 1. ábra), továbbá két nem hidrogénkötésű (NHB-) konformert (3. és 5., lásd 1. ábra) azonosítottak. Ezen kívül észleltek két olyan magasabb energiájú konformert is, amely a mátrixizolációs mérésekben megfigyelt HB- és NHB-konformerekhez képest egy újabb, negyedik típusú alapvázhoz tartozik. Az ennek megfelelő analóg glicin konformer csak nagyon kis, alig észrevehető mennyiségben fordul elő Ar-mátrixban, de szelektív lézeres besugárzással megnövelhető a koncentrációja [10].

Dobrowolski és munkatársai cikkén kívül [13] több kvantumkémiai cikk is foglalkozik a cisztein konformációs problémájával:[14], [15], [16]. A legpontosabb számítási adatokat Wilke és munkatársai 2009-ben megjelent cikke [17] közli a cisztein konformereire. Egy szisztematikus kereséssel 71 egyedi konformert azonosítottak másodrendű Møller-Plesset perturbációszámítással, az (MP2) (FC)/cc-pVTZ számítási szinten. Ezek közül a 11 legalacsonyabb energiájúra még pontosabb számításokat végeztek az elektronkorreláció CCSD(T) („Coupled-Cluster” egyszeres (S), kétszeres (D) és perturbatív háromszoros gerjesztések) szinten való kezelésével. A cisztein konformereinek ezen kívül számos más, spektroszkópiai szempontból fontos paraméterét is meghatározták, például a forgási állandókat, rezgési frekvenciákat és a dipólusmomentumokat.

A többi aminosavra kitekintve a legtöbb cikk természetesen a legegyszerűbb aminosavval, a glicinnel kapcsolatban született. A glicin MI-IR spektrumát mostanra már teljes mértékben sikerült asszignálni, sőt lézeres besugárzással sikerült egy, mátrixban eredetileg nem megfigyelhető, magasabb energiájú konformerét is előállítani [10]. Ez a cikk abban a laboratóriumban született, ahol később én is végeztem a kísérleteimet. A pontos asszignálást és a magasabb energiájú konformer előállítását ugyanazzal a technikával végezték, amit én is használtam: mátrixizoláció szelektív infravörös lézeres besugárzásokkal kiegészítve. A módszer a glicinnél rendkívül hatékonynak bizonyult, ezért kézenfekvőnek látszott a cisztein vizsgálatát is ugyanevvel a technikával végezni.

3. Az alkalmazott kísérleti és elméleti módszerek

3.1. A mátrixizolációs spektroszkópia története, alkalmazásai [18]

A gázok cseppfolyósításának egyszerű módjait már a XIX. század végén felfedezték, ami lehetővé tette anyagok, reakciók alacsony hőmérsékleten történő tanulmányozását. Akkoriban az alacsony hőmérsékletet molekulák foszforeszcenciájának tanulmányozására használták, ugyanis megfigyelték, hogy számos szerves molekula, amely szobahőmérsékleten nem foszforeszkál, a folyékony N_2 hőmérsékletén (77 K) foszforeszcenciát mutat. A kísérletek során a vizsgálandó anyagot egyszerűen feloldották folyékony nitrogénben vagy levegőben. Valójában ezek a kísérletek voltak a mátrixizoláció első alkalmazásai.

A XX. század első három évtizedében az alacsony hőmérsékletű fotokémiai és fotofizikai reakciókat még mindig csupán emisszióval tudták tanulmányozni, ugyanis a megfagyott mátrixok nagyon rossz optikai tulajdonságokkal rendelkeztek. Ilyen alacsony hőmérsékleten a fagyott „oldat” átlátszatlanná vált, amitől a fényszórás nagy mértékben megnőtt, lehetetlenné téve az abszorpció mérését. Ehhez képest jelentős előrelépés volt olyan oldószerkeverékek felfedezése, amelyek teljesen átlátszóan fagytak meg, lehetővé téve az abszorpciós méréseket is. Ilyen volt például az EPA (dietyl-éter, izopentán és etanol elegye), melyet még ma is használnak.

1954-ben jelent meg George Pimentel (lásd 2. ábra) cikke a Journal of Chemical Physics-ben, mely lefektette a modern mátrixizoláció alapjait [19]. Pimentel alapötlete az volt, hogy a molekulákat nemesgázokba fagyasztotta be, amelynek az addig alkalmazott mátrixokhoz képest számos előnye volt. A nemesgázok optikailag tiszta, üvegszerű mátrixot képeznek, amely mátrix a teljes infravörös, látható és UV tartományban átlátszó, így lehetővé válik a csapdázott molekulák vizsgálata különböző spektroszkópiai módszerekkel.



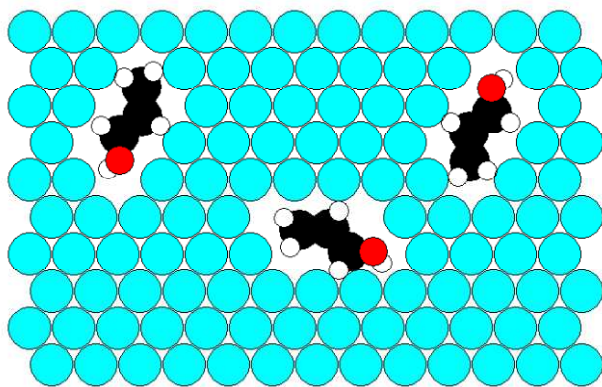
2. ábra: George Pimentel,
a mátrixizoláció atyja

További előnyként a mátrix nagyfokú inertsége miatt reaktív specieszek tanulmányozására is alkalmassá vált a technika. Pimentel laboratóriumában kezdetben még nem tudtak jó minőségű mátrixokat előállítani, mivel a hűtés csak 66 K-ig volt megoldott. Ez csupán xenon-mátrixok kifagyasztásához volt elég, de a viszonylag magas hőmérséklet miatt

még ezek is túl lágyak voltak a csapdázott molekulák kellő izolálásához. Ma a jó minőségű kriosztátok lehetővé teszik para-H₂-, neon-, argon- és kripton-mátrixok elterjedt alkalmazását is (olcsósága miatt leggyakoribb az argon), de ezek előállítása az 1950-es években még szóba sem jöhetett. A nagy ötlet azonban megvolt, így ma is ezt az évet tartjuk a mátrixizoláció kezdetének. A 3. ábra a molekulák nemesgázmátrixban való elhelyezkedését szemlélteti.

A mátrixizolációs technikát ma a kémia több területén használják. Alkalmazzák új, reaktív specieszek előállítására és tanulmányozására, az előállított reaktív részecskék szerkezetének meghatározására, reakció-intermedierek megfigyelésére, molekuláris komplexek és specieszek közötti gyenge kölcsönhatások tanulmányozására, valamint konformációs analízisre. Az utóbbi alkalmazás lehetőségét az adja, hogy a molekulákat nagyon hirtelen fagyasztjuk ki, a (legalább 5 kJ mol⁻¹ konformációs gáttal elválasztott) konformereknek általában nincs idejük átalakulni, az alkalmazott alacsony hőmérsékleten pedig nincs elég termikus energia a konformerek átfordulásához. Ennek következtében a mátrixban gyakorlatilag a beeresztési hőmérséklethez tartozó konformerarányt figyelhetjük meg.

További előny az is, hogy a mátrixban a szomszédos molekulákkal való kölcsönhatás nagyon lecsökken, így a gázfázishoz hasonló állapotot érhetünk el. Ez lehetővé teszi a mérési és a kvantumkémiail számításokkal kapott eredmények összehasonlítását. Továbbá, az elhanyagolható intermolekuláris kölcsönhatások miatt a spektrumvonalak szélessége lecsökken, így az egyes konformerek sávjai meglehetősen jól elkülönülnek. Ezzel szemben a konformereloszlás meghatározására vonatkozó mérések oldatfázisban sokszor nem vezetnek eredményre, mivel a környezettel való jelentős kölcsönhatások miatt az egyes konformerek sávjai szét sem válnak a spektrumban.



3. ábra: Molekulák mátrixba fagyva. Az ábrán jól látszik, hogy az egyes molekulákat nemesgáz veszi körül, elzárva őket a többi molekulától.

A mátrixok előállításakor számos szempontot kell figyelembe vennünk. A legfontosabb, hogy a molekulák valóban izoláltak legyenek. Ehhez a mintának és a mátrixalkotó gáznak hozzávetőleg 1:1000 mólarányú elegyét kell a hidegablakra kifagyasztani. Ebben az esetben – ha a molekulák mérete összemérhető az Ar-atom méretével – a molekulák ~ 98,8 %-a helyezkedik el izoláltan. Ha a fent említetttnél kisebb mólarányt használunk, a molekuláknak jelentős százaléka fog dimereket alkotni, melyek átmenetei megjelennek a spektrumban, nehezítve a kiértékelést.

Ha a mérendő anyag szobahőmérsékleten gáz halmazállapotú, vagy meglehetősen illékony, a keverés történhet gázfázisban, ha azonban ezek a feltételek nem teljesülnek, a mintát egy erre a célra kialakított melegíthető mintabeeresztőbe helyezzük. Azon elpárologtatási hőmérsékletet, amelyen a minta és a mátrixalkotó gáz ideális arányban keverednek, valamint a minta sem bomlik (vagy csak elhanyagolható mértékben), empirikusan kell optimálni.

Szintén fontos szempont a mátrix kialakításánál a megfelelő kifagyasztási hőmérséklet megválasztása. Ha a mátrixot nagyon hirtelen fagyasztjuk ki, a vizsgált molekuláknak nincs idejük a mátrixban a számukra legmegfelelőbb térállásba beállni. Ilyenkor ún. *site*-ok jönnek létre, mely azonos molekulának (konformernek) a mátrixban való különböző térállását jelenti. A *site*-ok különböző molekulaként vagy konformerként viselkednek, a két *site* sávjai máshol jelennek meg a spektrumban, megnehezítve a kiértékelést. Ezen vagy magasabb kifagyasztási hőmérséklet alkalmazásával segíthetünk, vagy a kifagyasztás után a mátrix enyhe megmelegítésével, melyet *annealing*-nek (hőkezelésnek) nevezünk. A kedvezőtlenebb energiájú *site*-ok ilyenkor átbillennek az adott molekulához, konformerhez tartozó legmélyebb energiájú térállásba. Ugyanakkor figyelembe kell venni azt is, hogy egy alacsonyabb energiájú konformertől kis gáttal elválasztott konformer koncentrációja is lecsökkenhet ekkor a mátrixban.

3.2. Lézerek működése és a lézerek alkalmazása a mátrixizolációs spektroszkópiában [20]

3.2.1. A lézerek működése

A lézer szó, angolul laser, a Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation kifejezésből származik, mely remekül összefoglalja a lézerek működésének alapelvét. Ennek megértéséhez vizsgáljuk meg először a fény-anyag kölcsönhatást! Az elektromágneses sugárzás és az anyag kölcsönhatásakor három folyamat lehetséges:

-indukált (stimulált) abszorpció, amikor egy foton elnyelődik, és a kölcsönható

rendszer gerjesztett állapotba kerül, sebessége: $W = B_{n \rightarrow m} \rho$

-stimulált emisszió, amikor egy foton kölcsönhat egy gerjesztett állapotú rendszerrel, mely egy fotont bocsát ki, ami azonos hullámhosszú, ill. irányú az emissziót indukáló fotonnal, és a rendszer így egy alacsonyabb energiaszintre kerül, sebessége: $W = B_{m \rightarrow n} \rho$

-spontán emisszió, amikor a gerjesztett állapotban levő rendszer minden külső hatás nélkül egy fotont bocsát ki, így alacsonyabb energiaszintre kerül, sebessége:

$$W = A_{m \rightarrow n} \text{ ahol } A = \frac{8\pi h \nu^3}{c^2} B.$$

Ezen folyamatok sebességét tehát az ún. Einstein-koefficiensek segítségével írhatjuk le: stimulált abszorpció esetén ez $B_{n \rightarrow m}$, egy másodrendű sebességi állandó, stimulált emisszióra $B_{m \rightarrow n}$, ugyancsak másodrendű sebességi állandó, spontán emisszió esetén pedig $A_{m \rightarrow n}$, egy elsőrendű sebességi állandó, ahol n és m a kezdeti, ill. a végső energiaszintet jelölik.

A koefficiensekről ismert, hogy $B_{n \rightarrow m} = B_{m \rightarrow n}$, így az, hogy a fény-anyag kölcsönhatáskor stimulált abszorpció vagy stimulált emisszió történik, az energiaszintek N_n és N_m populációjától függ.

Tudjuk, hogy $h\nu_{mn} = E_m - E_n$.

Az egyes folyamatok sebességére ismertett összefüggésekből következik, hogy:

$$\frac{dN_m}{dt} = N_n \rho(\nu_{mn}, T) B_{n \rightarrow m}, \text{ és } \frac{dN_m}{dt} = -N_m \rho(\nu_{mn}, T) B_{m \rightarrow n}.$$

A változási sebességet a következő kifejezés adja meg: $\frac{dN_m}{dt} = (N_n - N_m) \rho(\nu_{mn}, T) B_{n \rightarrow m}$

Ha $N_n > N_m$, az abszorpció meghaladja a stimulált emissziót, fényerősítés nem léphet fel. Ez az eset olyan rendszerekre érvényes, melyek termikus egyensúlyban, vagy annak közelében vannak.

Ha $N_n < N_m$, a stimulált emisszió meghaladja az abszorpciót. Ez azonban csak egyensúlytól távoli rendszerekre lehet érvényes. Ezen állapotot populációinverzióknak, a rendszert pedig aktív közegnek nevezzük. Populációinverzió csak valamilyen energiapumpálás segítségével érhető el.

Lézerhatás eléréséhez három elem szükséges: legyen jelen egy megfelelő energiaszintekkel rendelkező aktív közeg, a populáció inverzió legyen pumpálással megvalósítható, valamint legyen jelen egy rezonáns optikai üreg. Vizsgáljuk meg e három elemet külön-külön!

-Aktív közeg: A kvantummechanika eredményeit is felhasználva sikerült néhány, bonyolult energiaszint-struktúrával rendelkező rendszert felfedezni, melyeknek néhány energiaszintje segítségével a lézerhatás megvalósítható. Az energiaszintek száma szerint beszélhetünk 2-,3- vagy 4-állapotú rendszerekről. 2-állapotú rendszerekben a lézerhatás csak nagyon ritkán valósítható meg, ugyanis ezek a rendszerek $N_1 = N_2$, azaz azonos populációk esetén válnak telítetté. Ilyen 2-állapotú rendszerrel írhatók le a diódalézerek.

Lézerhatást általában 3- és 4-állapotú rendszerekkel érünk el, e rendszerek köztes állapotai segítségével. 3-állapotú rendszer esetén az 1. legalsó szintről a legfelső, 2. szintre pumpáljuk a rendszert. Innen az gyorsan, sugárzásmentesen relaxálódik a köztes, 3. szintre. a $3 \rightarrow 1$. átmenet tiltott, csak lassan, sugárzásos átmenet során kerül vissza rendszer az 1. szintre. A populáció-inverzió tehát a 1. és 3. szintek között jön létre, ez a lézerhatás alapja.

4-állapotú rendszerekben a rendszert a legalsó, 1. szintről a legfelső, 2. szintre pumpáljuk. A 2. szintről a rendszer gyorsan, sugárzásmentesen relaxálódik, az eggyel mélyebb, 3. energiaszintre. A populáció-inverzió a 3. és 4. energiaszint között jön létre, a $3 \rightarrow 4$. átmenet tiltott, a rendszer sugárzással relaxálódik a 3.-ról a 4. szintre. A populáció-inverzió létrejöttét az is segíti, hogy a $4 \rightarrow 1$. átmenet gyors és sugárzásmentes, így még nagyobb lesz a 3. és 4. energiaszint populációjának különbsége, ami a lézerhatás alapja.

-Pumpálás: Számos módon lehet pumpálással energiát közölni a rendszerrel úgy, hogy az az alapállapotból egy stabil gerjesztett állapotba kerüljön. A populáció-inverzió elérésének két leggyakoribb módja az optikai és az elektromos pumpálás. Optikai

pumpáláshoz használhatunk egy másik lézert vagy villanófénylámpákat (impulzusüzemmódú lézerekhez). Elektromos pumpálást gáz- és félvezető-lézerekhez alkalmazunk.

-Rezonáns optikai üreg: A lézerfény felerősítése egy rezonáns optikai üreg segítségével történik, melynek két végén tükrök vannak. Az üreg egyik végén a tükör nagyon kis százalékban áteresztő, erre távozik a lézerfény. A fény az üregben tehát ide-oda reflektálódik. Az üregben azon frekvenciák erősödnek fel nagy mértékben, melyekre teljesül: $\nu = \frac{nc}{d}$, ahol n egész szám, c a fénysebesség, d az üreg hossza. Az üreget úgy állítjuk be, hogy ezek egyben a lézerhatásért felelős frekvenciák legyenek.

Kísérleteim során a cisztein konformáció-analízisének elvégzéséhez közeli infravörös lézersugárzást használtam, ezért szeretnék egy rövid áttekintést nyújtani a lézerek mátrixizolációs spektroszkópiában történő használatáról.

3.2.2. Lézerek alkalmazása a mátrixizolációs spektroszkópiában

A lézerek 1950-es években való felfedezésük óta széleskörű alkalmazást nyertek. A lézer fényforrások legfontosabb jellemzői közé tartozik, hogy monokromatikusak, a sugárnyalábok azonos fázisúak, a lézersugár jól irányítható és távolra ható, valamint, hogy nagy intenzitású fény kibocsátására képesek. A lézerfény monokromatikusságát és nagy intenzitását a mátrixizolációs kísérletek során is jól használhatjuk. Elsődleges alkalmazásuk fotokémiai reakciók, fotolízis előidézésében van. Megfelelő hullámhosszú látható vagy UV-lézerrel kötéseket hasíthatunk el, vagy éppen egy reakció gátját legyőzve újabb molekulákat, reaktív specieszeket hozhatunk létre. Csoportunkban vizsgálták már különböző molekulák bomlását, és jelenleg is vizsgálják például a glicin fotolízisének termékeit. Räsänen és munkatársai a megfelelő nemesgázmátrixba fagyasztott prekursor molekula lézerfényvel való besugárzásával számos nemesgázvegyületet, például HXeOBr molekulát [21] állítottak már elő. A fény nagy intenzitása elősegíti a reakció minél nagyobb mértékben való lejátszódását.

A lézerek egy molekula konformereinek meghatározásánál is nagy segítséget nyújthatnak. Mielőtt kutatócsoportunk megkezdte volna az ilyen irányú kísérleteket, más kutatócsoportok több hasonló vizsgálatot is végeztek már, például Fausto és munkatársai egy nukleobázis, a citozin két rotamerét alakították egymásba szelektív lézeres besugárzással [22].

Munkám során infravörös lézert alkalmaztam a konformerek egymásba alakításához, a konformerarányok megváltoztatásához. A molekula (egy kiválasztott konformerének) egy rezgési felhangjához tartozó átmenetet besugározva – esetünkben a közeli infravörös (NIR) tartományba eső fénnel – a közölt energiát a molekula (kiválasztott konformere) elnyeli. Ez az energia sok esetben elegendő egy másik konformerbe való átforduláshoz. Ekkor a NIR sugárzást elnyelő, majd más formába átalakuló konformer sávjainak intenzitása egyszerre és azonos mértékben csökken. Ezzel párhuzamosan a besugárzás során keletkező konformer sávjai pedig azonos mértékben nőnek. Ha egyszerre több konformert sugárzunk be, például a két konformer sávjainak átfedése miatt, vagy egy besugárzás hatására több konformer is keletkezik, akkor is különbséget tudunk köztük tenni, mivel adott konformációhoz tartozó sávok azonos mértékben csökkennek, illetve nőnek.

A lézerek nagy előnye a besugárzásnál az, hogy a monokromatikus sugárzásuk miatt jó esélyünk van arra, hogy egyszerre egy konformert sugározzunk be. Ez valójában egy idealizált eset, de a glicin vizsgálatokor ehhez nagyon hasonlót tapasztaltak. Sajnos azonban mind a mátrix, mind a lézer felbontása véges. (Például az általunk használt sugárzás félértékszélessége $5\text{--}7\text{ cm}^{-1}$, és a mátrix felbontása is néhány cm^{-1} .) Sok-konformeres molekulák esetében (így a ciszteinnél is) ehhez hozzáadódik még az is, hogy egyes konformerek rezgési átmenetei is közel eshetnek egymáshoz, így a konformerek sávjai nem válnak el a MI-IR spektrumban, átfedhetnek, ezért gyakran lehetetlen csupán egyetlen konformert besugározni, általában valamely más konformer is átalakul (kisebb mértékben) a besugárzás során.

Lézerek alkalmasak lehetnek újabb, nagy energiájú konformerek előállítására is. Előfordulhat, hogy egy, a mátrixban jelenlevő konformer besugárzásakor az átalakulás egy olyan konformerbe történik, mely a mátrixban addig nem volt jelen. A spektrumban ekkor olyan sávok jelennek meg, amelyek eredetileg nem látszóttak. Ha a konformer nagyon rövid élettartamú és hamar átalakul egy stabilabb, alacsonyabb energiájú konformerré, akkor is van lehetőség az azonosításra, ugyanis megfelelő szűrők alkalmazásával lézeres besugárzás közben is mérhetjük az IR spektrumot. A lézer kikapcsolása után pedig a konformerhez tartozó spektrumvonalak intenzitásának csökkenéséből meghatározhatjuk a konformer felezési idejét. Ez is egy kiváló lehetőség a mérési eredmények és a kvantumkémiai számításokkal kapottak összehasonlítására.

3.3. Kvantumkémiai számítások

A kvantumkémiai számítások ma már lehetővé teszik meglehetősen pontos rezgési spektrumok számítását, ami elengedhetetlen segítséget nyújt a kísérleti spektrumok kiértékelésénél, a konformerek azonosításánál.

A Born-Oppenheimer közelítést alkalmazva a kvantumkémiai számításokat két csoportra oszthatjuk: elektronszerkezet- valamint magmozgás-számításokra. Vizsgáljuk meg először az elektronszerkezet-számítás néhány módszerét! A legegyszerűbb mód, amellyel elektronszerkezetet számíthatunk, a Hartree-Fock módszer. Ennek lényege, hogy a hullámfüggvényt egyelektronos hullámfüggvények (molekulapályák) szorzatából építjük fel. Ahhoz, hogy a hullámfüggvény eleget tegyen a Pauli-elvnek, szükség van annak antiszimmetrizálására, szorzatból determináns alakra térünk át. A legalacsonyabb energiához tartozó molekulapályákat variációs elv segítségével keressük. A gyakorlatban atomi pályákat helyettesítő egyszerűbb Gauss-függvények lineáris kombinációjával állítjuk elő a molekulapályákat.

A Hartree-Fock módszerrel számoltnál sokkal megbízhatóbb eredményeket kapunk az ún. post Hartree-Fock-módszerek alkalmazásával. Ezek közül a legismertebbek: Many Body Perturbation Theory (MBPT), Configuration Interaction (CI), valamint a Coupled Cluster (CC) módszerek. Az MBPT módszer perturbációszámításon, a CI módszer variációs elven alapul, a CC pedig egy speciális iteratív módszer. Az eddig említett módszerek mind az *ab initio* számítások csoportjába tartoznak, azaz nem használnak fel empirikus adatokat. Sok esetben azonban nagyon jó eredményekhez juthatunk, még hozzá nagyságrendileg kisebb számítási igénnyel, ha empirikus faktorokat is beépítünk a számításokba.

A ma használt szemiempirikus módszerek közül az egyik legelterjedtebb a sűrűségfunkcionál-elmélet (DFT).[23]. A módszer alapja az a felismerés, hogy az energia az alapállapotú elektronsűrűség egzakt funkcionálja: keressük tehát variációs eljárásban az „optimális” hullámfüggvény helyett az „optimális” elektronsűrűséget. Ily módon elvben az egzakt megoldás is előállítható, a DFT ilyen értelemben nem szemiempirikus. Mivel azonban a funkcionál konkrét alakja nem ismert, ez gyakorlatilag nem kivitelezhető. Ezért használjuk a Kohn-Sham módszert, mely megtartja a Hartree-Fock módszer elvét, de túllép rajta annyiban, hogy a Hamilton-operátort kiegészíti egy kicserélődési korrelációs potenciál taggal (melybe gyakran empirikus faktorokat is beépítenek), figyelembe véve ezzel az

elektronkorrelációt. A módszert különösen nagyobb rendszerek esetében használják, mivel viszonylag kis számítási igény mellett is elfogadható pontosságú eredményeket ad.

Térjünk rá ezután a magmozgás-számításra, hiszen egy molekula rezgési frekvenciáinak kiszámításához erre van szükség. Itt a legegyszerűbb és egyben leggyakrabban használt eset, amikor a molekula rezgési potenciálját harmonikusnak tekintjük. Nyilván ehhez a számításhoz tartozik a legkisebb számítási igény, azonban ez meglehetősen pontatlan eredményeket ad. Mivel a számításból adódó hibák jórészt szisztematikusak, eredményeink pontosságán a számított rezgési frekvenciák skálázásával javíthatunk. Ez történhet egységes skálafaktorok alkalmazásával (ekkor az összes számított frekvenciát megszorozzuk egy konstanssal), de használhatunk kifinomultabb módszereket is, ilyen például a Pulay-féle Scaled Quantum Mechanical (SQM) módszer[24]. Az SQM módszer lényege, hogy nem a frekvenciákat, hanem a belső koordinátákban kifejezett nem diagonális erőállandó mátrix elemeit skálázzuk. Így például az OH-nyújtásokhoz, az NH-nyújtásokhoz, a COH-hajlításokhoz mind külön skálafaktorok tartoznak. A csatolt rezgéseknél használt skálafaktor pedig a csatolódott rezgések skálafaktorainak mértani közepe.

Nézzünk egy példát! Az erőállandó mátrix OH-nyújtáshoz tartozó elemét jelölje f_{ii} , az NH-nyújtáshoz tartozó elemét f_{jj} . Az OH-nyújtáshoz tartozó skálafaktor legyen s_i , az NH-nyújtáshoz tartozó skálafaktor legyen s_j . A két rezgés csatolódásához tartozó erőállandó mátrixelem f_{ij} , míg a hozzá tartozó skálafaktort $\sqrt{s_i \cdot s_j}$ adja meg.

Az SQM módszerrel az alacsonyabb szintű számítás háromféle hibáját is tudjuk korrigálni. Ezek közül az első az elektronszerkezet-számítás hibája, ugyanis kisebb számítási szinteken már a számított harmonikus potenciál sem elegendően pontos. Figyelembe vesszük ezen kívül a potenciál anharmonicitását is. Végül, mivel esetemben a skálafaktorok értékét Ar-mátrixos mérések során optimálták, figyelembe vesszük az Ar-mátrix hatását is. A munkánk során használt skálafaktorokat laboratóriumunkban határozták meg: több molekula Ar-mátrixban mért és számított rezgési frekvencia adatainak összevetésével, legkisebb négyzetes illesztéssel optimálták a skálafaktorokat. A próbamolekulákra végzett számítások átlagos hibája 10 cm^{-1} [25]. A mért és a számított frekvenciák között nagyobb eltérést csupán a hidrogénkötött konformerek esetén az OH-nyújtásokhoz tartozó frekvenciáknál kapunk, mivel az általunk használt számítások nem tudják ezt a kölcsönhatást elég pontosan figyelembe venni.

A magmozgás számításánál végezhetünk olyan számításokat is, amelyek során a rezgési potenciált anharmonikusnak tekintjük. Ezek azonban jóval drágábbak az általunk

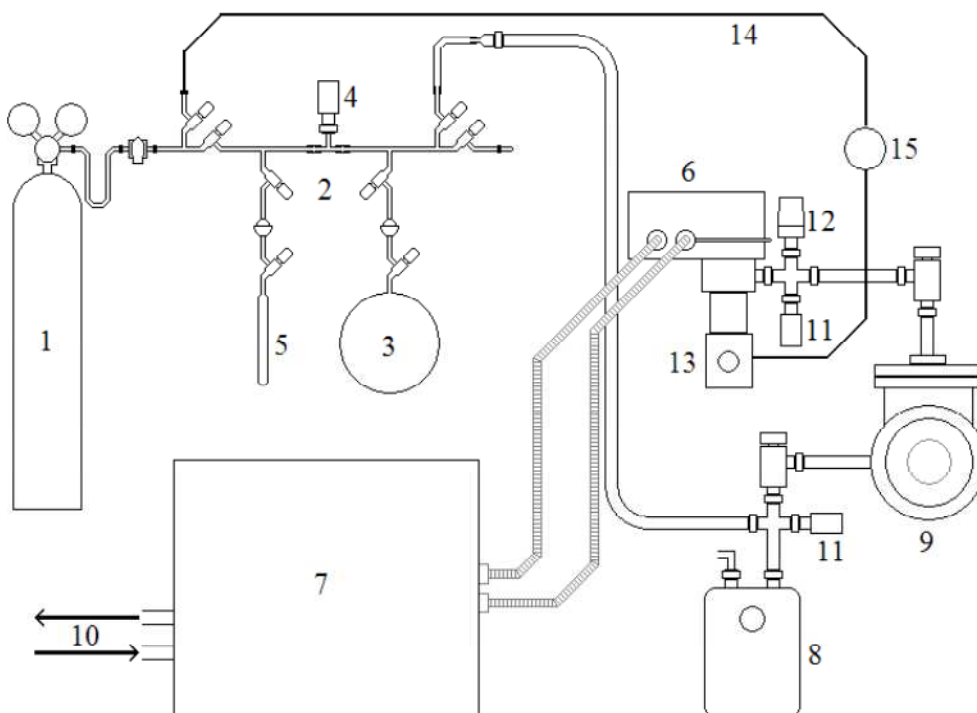
használt harmonikus számításoknál, és mivel ezek a számítások gázfázisra történnek, nem veszik figyelembe az Ar-mátrix hatását. Ehhez a számítási szinthez pedig már nem állnak rendelkezésre skálafaktorok.

A geometriaoptimaláláshoz, valamint az IR spektrumok számításához a Parallel Quantum Solutions (PQS) [26] programot használtam. A számításokat DFT módszerrel, B3LYP funkcionállal végeztem. Bázisként 6-31++G**-ot használtam, a rezgési frekvenciák skálázásakor az SQM módszert használtam. Azért választottam a használt számítási szintet, mivel ehhez rendelkezésre állnak empirikus skálafaktorok Ar-mátrixos mérésekhez[25]. Alapul véve az eddig már megjelent cikkeket, eddig csak a nyolc legalacsonyabb energiájú konformerre végeztem számításokat.

A glicinnel végzett kísérletekből az már nyilvánvaló volt, hogy az infravörös lézerrel az első rezgési felhangon való besugárzás elegendő energiát biztosít az OH-, ill. az NH₂-csoport átfordulásához, az azonban nem volt nyilvánvaló, hogy az SH-rezgés első rezgési felhangjának energiája hogyan viszonyul az SH-csoporton a H átfordulásának gátjához. Ennek meghatározásához is számításokat kellett végezni. Az SH-csoport rotációs gátjának számításáról az 5.5 fejezetben lesz szó.

4. A vizsgálataimhoz használt műszerek, a mérések gyakorlata

4.1. A mátrixizolációs berendezés



4.ábra: A mátrixizolációs berendezés vázlatos rajza

A mátrixizolációs berendezés felépítését a 4. ábrán mutatom be. (1) számmal jelöltem a gázpalackot, mely a mátrixalkotó nemesgázt tartalmazza, jelen esetben ez Ar. Ehhez csatlakozik az ún. „vákuum-line”, mely valójában egy mintaelőkészítő rendszert jelent (2). A (3) egy $\sim 1 \text{ dm}^3$ térfogatú gömbloblik, mely egy pufferalack szerepét látja el. A mérés elején ezt feltöltjük nemesgázzal, majd elzárva az összeköttetést a gázpalack felé, a (4) piezo nyomásmérő segítségével nyomon tudjuk követni a beáramlott gáz mennyiségét. Ha nem illékony a vizsgált minta, nem lehet előre összekeverni a nemesgázzal a (3) palackban. Ez az eset a ciszteinnél is. Mintánkat ilyenkor az (5) szilárd mintabeeresztőbe tesszük, mely egy pár száz °C-ig szabályozottan fűthető kis mintatartó. A „vákuum-line” csapjai a megfelelő zárás érdekében teflonból készültek. Mintánk a (14) hajlékony fémcsövön át jut a (13) mérőfejre, a beáramlás sebességét a (15) áramlásszabályozóval határozhatjuk meg. A mérőfej esetünkben egy fémlemez két közé szorított CsI-ablak, mely a beáramlás irányához képest 45°-kal van elforgatva annak érdekében, hogy a beáramló mintának megfelelő mennyisége lecsapódjon

rajta, de a beáramlás irányára merőleges fényúttal elhelyezett IR-spektrométerrel is vizsgálni lehessen. Ahhoz, hogy a mérőfejre kifagyjon az Ar-mátrix, nagyon alacsony, 10 K körüli hőmérsékletet kell biztosítani rajta, ezért a mérőfejet hideg ablaknak is szokás nevezni. Ilyen alacsony hőmérsékletre való lehűtés egy zárt körös hélium-kriosztáttal történik (6), melynek kompresszorát a (7), hűtővizének be- és kiáramlását a (10) szám jelöli. A rendszerben nagyvákuum uralkodik, melynek kettős feladata van: egyrészt a hőszigetelésről gondoskodik, másfelől a mérőfejről távol tartja az idegen anyagokat, pl. levegő, olajgőz. A 10^{-5} mbar körüli nagyvákuumot két, egymás után kapcsolt szivattyú használatával érjük el: a (8) rotációs szivattyúval, mely $\sim 10^{-3}$ mbar elővákuumot biztosít, valamint a (9) turbomolekuláris szivattyúval, mely a nagyvákuumot állítja elő. A vákuumot a (11) Penning-, illetve (12) Pirani-nyomásmérőkkel ellenőrizhetjük.

4.2. A mérésekhez használt IR spektrométer

Az IR mérésekhez egy Bruker IFS 55 Fourier-transzformációs IR spektrométert használtunk. A mérések során használt felbontás minden esetben 1 cm^{-1} volt. A scanek száma más volt a NIR spektrum és a MIR spektrum felvételekor. Mivel a NIR méréseknél a jelek jóval gyengébbek, mint a MIR spektrumban, ezért a háttérrel 2000 scan átlagából nyertük, a spektrumot pedig 500 scan átlagából kaptuk. A MIR spektrumok felvételekor a háttérrel 1024 scanból nyertük, a közölt spektrumokat pedig 256 scan átlagából kaptuk. A leválasztás és a lézeres besugárzás közben tájékozódásként felvettünk 64 scanból kapott spektrumokat, de ezeket a dolgozatban nem közöltem. A NIR és a MIR mérések során eltérő fényforrásokat alkalmaztunk. A NIR-spektrumok felvételekor a forrás volfrám-izzólámpa volt, míg a MIR méréseknél SiC (globár) lámpát használtunk. A mérések során félvezető MCT (Mercury-Cadmium-Tellurium) - detektort használtunk.

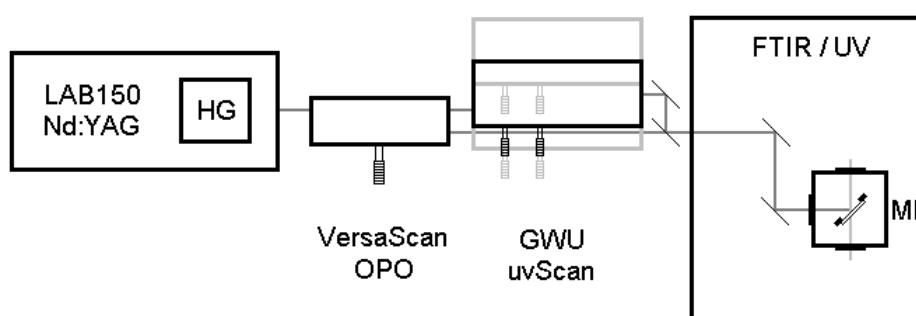
4.3. A mérésekhez használt lézerek

Kísérleteimhez a laboratóriumban található Spectra Physics Quanta Ray LAB 150-10 Nd:YAG (azaz neodímium-ittrium-alumínium-gránát) lézert használtam. Ez egy szilárd fázisú lézer, pumpálása optikai úton, villanófénylámpával történik. A lézer impulzus üzemi, ún. Q-kapcsolt üzemmódban használjuk. A Q-kapcsoló egy optikai kapcsoló, amely a lézer

rezonátorüregében helyezkedik el. Ez a kapcsoló akkor nyitja meg az optikai fényutat, ha a populáció-inverzió már elérte a maximális értékét, biztosítva ezzel a lézerimpulzusok minél nagyobb teljesítményét. A lézer 1064 nm-es sugárzást bocsát ki, amelyet nemlineáris optikai kristályokkal 532, 355 és 266 nm-es sugárzássá alakíthatunk át. Teljesítménye ezeken a hullámhosszakon rendre 650, 300, 270 és 180 mJ/impulzus. [27] A lézert a mérések során 355 nm-en üzemeltettük, amellyel egy GWU-Spectra Physics Versa Scan MB-ULD 240 típusú optikai parametrikus oszcillátort (a továbbiakban: OPO) pumpáltunk.

A kibocsátott lézerefény hullámhosszát nemlineáris optikai elemekkel modulálhatjuk, ilyen az OPO [28] is. Az OPO fő része a nemlineáris optikai tulajdonságokkal rendelkező kristály, esetünkben β -bárium-borát. A kristály helyzetét, amely meghatározza a kibocsátott fény hullámhosszát, mikrométer-csavarral lehet állítani. A kristály a beeső 355 nm-es lézerefény egy fotonját két fotonra bontja, melyek energiájának összege megegyezik a beeső foton energiájával, és energiájuk aránya egy tartományon belül tetszőlegesen változtatható. Kísérleteimben a beeső lézerefényt egy látható- és egy közeli infravörös-fotonra bontottuk, ez utóbbit használtuk a besugárzáshoz. A fényimpulzusok energiája kb. 10–15 mJ volt. Bár ezt kísérleteim során még nem használtam, a laboratóriumban az UV-fotolízishez rendelkezésre áll egy UV-scan is, mely az OPO-ból kijövő látható fény két fotonjából ugyancsak nemlineáris optikai elemek segítségével egy kétszeres frekvenciájú UV-fotont állít elő.

A NIR lézer besugárzásos MI-IR mérésekhez használt kísérleti összeállítást az 5. ábra mutatja.



5. ábra: A kísérletek során használt mérési összeállítás. Az MI a mátrixizolációs készülék mérőfejét, az FT-IR/UV a spektrométert (esetünkben FT-IR-t) jelöli.

5. Kísérleti eredmények

5.1. Közeli infravörös (NIR) spektrum felvétele

Ahogy azt már röviden ismertettem, a cisztein konformer-arányának meghatározásához alkalmazott módszer lényege az, hogy a molekulát egy kiválasztott rezgésének első felhangján közeli infravörös fénnel besugározva megváltoztatjuk a konformerek eloszlását. A besugárzás előtt és után is felvéve a molekula IR-spektrumát, a sávok intenzitásának megváltozásából, valamint ezen sávok hullámszámaikat kvantumkémiai számításokkal összehasonlítva következtethetünk arra, hogy mely konformerek alakultak át: melyek keletkeztek és melyek fogytak. A besugárzáshoz azért alkalmazunk a molekula első rezgési felhangjának megfelelő NIR sugárzást, mivel ha elnyeli a molekula ezt a sugárzást, akkor ez az energiatöbblet már elegendő a legtöbb konformációs gát legyőzéséhez.

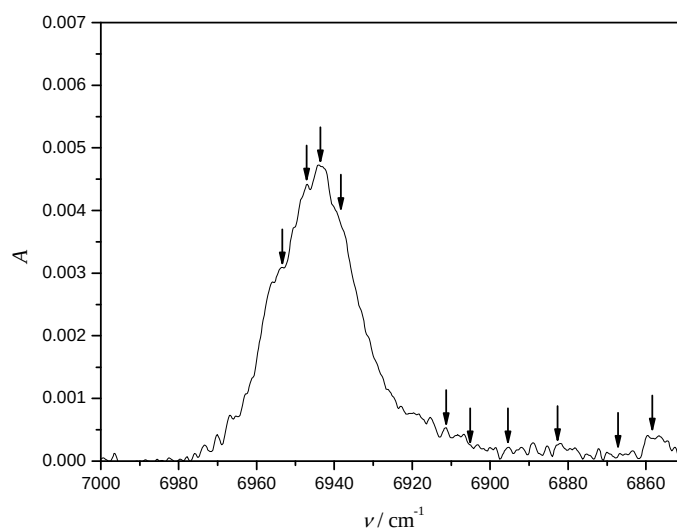
A harmonikus modellben felharmonikus rezgés, vagyis a besugárzáshoz használandó NIR-fény hullámszáma pontosan kétszerese az adott rezgés középső IR (MIR) tartományban mért hullámszámának. Valójában a harmonikus modell csak közelítés. A molekula rezgése során a potenciál anharmonikus, a használandó hullámszám valamivel kisebb, mint a MIR spektrumban mért hullámszám kétszerese. A pontos hullámszám ismeretéhez fel kell vennünk a molekula NIR spektrumát, és az abban található sávok alapján kell kiválasztani a besugárzáshoz használt frekvenciákat.

A NIR spektrumban a sávok meglehetősen kis intenzitásúak, mivel (harmonikus közelítésben) a rezgési alapállapotból a rezgési felhangra való gerjesztés tiltott. Ahhoz, hogy a spektrumok értékelhetőek legyenek, vastagabb, esetleg kicsit töményebb, de ezzel együtt optikailag jó minőségű (a fényt kevésbé szóró) mátrixra van szükség. Ilyen mátrixot, mint a később tárgyalt középső IR (MIR) tartománybeli mérésekhez előállított (vékonyabb és hígabb) mátrixhoz képest csak lassabban, kisebb gázelegy-beeresztési sebességet alkalmazva lehet növesztetni. Korábbi tapasztalatok alapján $0,55 \text{ cm}^3/\text{min}$ -es gázelegy-beeresztési sebességet használtam, a ciszteint tartalmazó mintatartót pedig $155 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottam. Ezt a hőmérsékletet a NIR spektrum felvételét megelőző mérések során optimáltam. Fokozatosan növeltem a mintabeeresztő hőmérsékletét, miközben IR spektrumok felvételével vizsgáltam, hogy melyik az a hőmérséklet, amelyen már jól észrevehető mértékben kezd párologni a cisztein. A minta kifagyasztása 10 K -en történt.

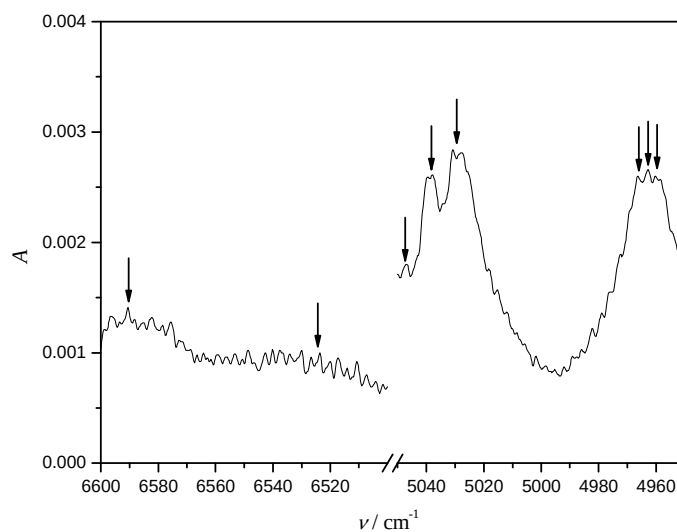
A besugárzáshoz használt frekvenciákat az 1. táblázatban gyűjtöttem össze, valamint a 6. és 7. ábrákon szemléltetett spektrumokon is megjelöltem.

1. táblázat: NIR-besugárzások hullámszámai

rezgési felhang	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$
NHB OH-nyújtás	6953,5
	6947,1
	6943,6
	6938,4
	6911,2
	6905,2
	6895,2
	6883,2
	6867,1
NH-nyújtás	6867,7
	6857,1
HB OH-nyújtás	6588,0
	6524,0
SH-nyújtás	5047,9
	5038,4
	5029,4
	4966,5
	4962,8
	4960,2



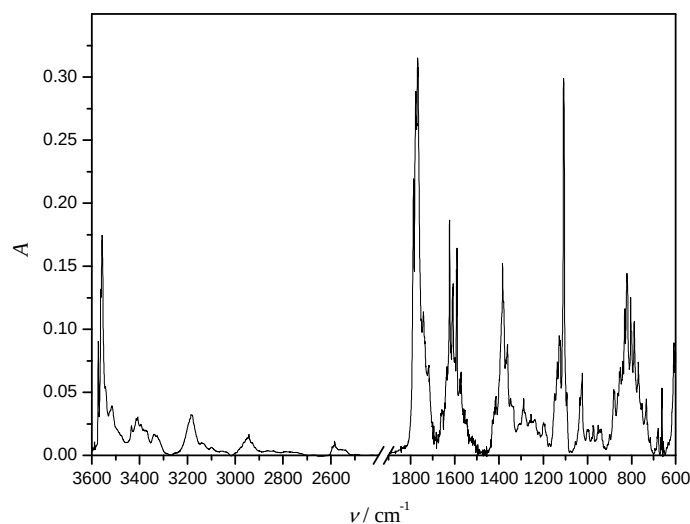
6. ábra: A cisztein NIR spektrumának részlete. Nyilakkal jelöltem a kísérleteim során alkalmazott NIR-besugárzásokat az NHB-konformerek OH-nyújtási felhangján.



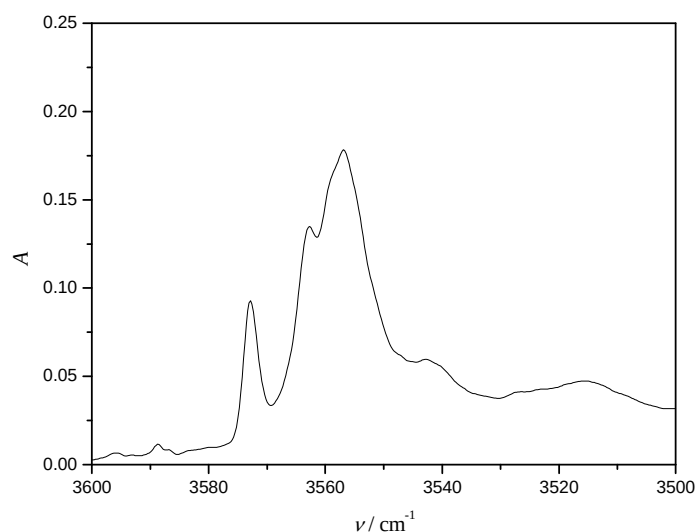
7. ábra: A cisztein NIR spektrumának részlete. Nyilakkal jelöltem a kísérleteim során alkalmazott NIR-besugárzásokat a HB-konformerek OH-nyújtási felhangján, valamint a HB- és NHB-konformerek SH-nyújtási felhangján.

5.2. A 3. konformer azonosítása

A konformerek azonosítását középső (MIR, 500–4000 cm^{-1}) IR spektrumuk elemzésével végeztük. Ehhez a mátrixot 1,05 cm^3/min áramlási sebesség mellett, a cisztein 155 °C-on való elpárologtatásával választottam le 10 K hőmérsékleten. Azért alkalmaztunk nagyobb áramlási sebességet a MIR mérésekhez, mint a NIR vizsgálatokhoz, mert ebben a tartományban a rosszabb minőségű mátrix is kevésbé szórja az fényt. A leválasztás után felvett spektrum a 8. ábrán, az NHB-konformerek OH-nyújtási rezgéséhez tartozó IR-sávjai a 9. ábrán láthatóak. (A többi HB-konformer OH-rezgései a H-kötés gyengítő hatása miatt kisebb hullámszámnál találhatók.)



8. ábra: A mátrix leválasztása után kapott teljes MIR spektrum.



9. ábra: A mátrix leválasztása után felvett IR spektrum OH-nyújtási tartománya

A 3573 cm^{-1} -nél látható sáv valószínűleg valamilyen bomlástermékhez tartozik, mivel Dobrowolski és munkatársai cikkében közölt spektrumban [9] ez a sáv nem látszik. Ennek az lehet az oka, hogy az általuk használt szilárd mintabeeresztő berendezés más volt: egy cső alakú kemence, melyen átáramlik a mátrixalkotó gáz. Ilyen berendezéssel nekik már $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ körül párologott megfelelő mértékben a cisztein. Az általunk használt mintabeeresztő egy kis fűtött cső, ahol az argon a cső felett áramlik. A mintabeeresztő ilyen elrendezésénél általában magasabb (esetünkben $155\text{ }^{\circ}\text{C}$) párologtatási hőmérsékletekre van szükség, de ezen a hőmérsékleten a cisztein már bomlani kezd. Ezt támasztja alá az is, hogy a minta cseréjénél a cisztein kissé megbarnult, és illékony kénvegyületek kellemetlen szaga érződött. A kisebb hullámszámnál (például: 3542 cm^{-1} -nél) jelentkező sávok pedig valószínűleg vagy dimerekhez vagy kisebb mennyiségben jelenlevő konformer(ek)hez tartozhatnak.

A NIR-lézeres kísérleteinket az NHB-konformerek első felharmonikus OH-nyújtási rezgéseinek besugárzásával kezdtük. Mivel a glicinnél is ennek a rezgésnek a besugárzása volt a leghatékonyabb, ezért várható volt, hogy a ciszteinnél is nagymértékű változásokat fogunk tapasztalni.

A spektrumon (lásd 6. ábra) is látható, hogy a konformerek OH-felharmonikus sávjai nagyon közel vannak egymáshoz, átfednek. Továbbá az általunk használt lézersugárzás félértékszélessége, $\sim 5\text{--}7\text{ cm}^{-1}$ – sem elhanyagolható tényező. Ezért várhatóan egy besugárzással egyszerre több konformer is átalakul. Ez előrevetíti azt, hogy a cisztein-konformereknek ezzel a technikával történő azonosítása jóval komplexebb feladat, mint a

glicin konformerek hasonló módon történő azonosítása, amelyet csoportunkban már korábban sikerrel megtettek [10].

A konformerek azonosításához többféle hullámhosszú lézeres besugárzást alkalmaztunk, ezek helyét a 6. és a 7. ábra mutatja. A fent leírt nehézségek (azaz az összeolvadó sávok és a lézer véges félértékszélessége) miatt a legértékkelhetőbb eredményt akkor kaptuk, amikor a NHB-konformererek összeolvadó OH-felharmonikus sávjának két szélén mért hullámhosszértékre ($6953,5\text{ cm}^{-1}$ és $6938,4\text{ cm}^{-1}$) hangoltuk a lézert, majd sugároztuk be a mátrixot. E két besugárzás után, illetve előtt mért spektrumok különbségét mutatja a 10. ábra. A csökkenő sávok tehát a besugárzás során fogyó, a növekvő sávok pedig a besugárzás során keletkező konformerekhez tartoznak. Ekkor a két besugárzás hullámszáma már olyan távol van egymástól, hogy nagy valószínűséggel lesz olyan konformer, amelyet nem, vagy csak nagyon kismértékben érint az egyik vagy másik besugárzás. Ekkor feltételezhető, hogy azok a sávok, amelyek intenzitása csak az egyik különbség-spektrumban csökken, egy konformerhez tartoznak. A 2. táblázatban gyűjtöttem össze azokat a sávokat, amelyek csak a $6953,5\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fényrel történő besugárzásnál csökkentek.

A konformerek azonosítása során felvetődik a kérdés, hogy miről lehet egy konformert meglehetősen bizonyossággal azonosítani? Bár az általunk használt skálázás empirikusan korrigálja a rezgés anharmonicitását és részben a mátrix hatását is, a számított és mért hullámszám-értékek átlagos hibája kb. 10 cm^{-1} [25], a hidrogénkötésben levő OH-csoportok nyújtási rezgését még nagyobb hibával becsli a számítás. Elmondható az is, ha csak néhány cm^{-1} két sáv között a különbség, akkor azok számított értéke könnyen lehet, hogy rossz sorrendben adódik, felcserélődik. Az azonban kijelenthető, hogy a legalább $8\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ -ben eltérő sávok relatív sorrendje általában helyes. Jó támpontot adhatnak az intenzitások is, bár nem teljesen pontosak, de a számítások szerint nagyságrendben különböző intenzitású sávok nem cserélhetők fel az asszignáció során.

Egy konformer azonosítása során tehát két támpontunk van: vagy olyan sávokat kell keresnünk, amelyek sokkal nagyobb intenzitásúak, mint a környező sávok, vagy olyanokat, melyek jól elválnak a szomszédjaiktól. A 3. konformer azonosítása során is így jártam el. Külön spektrumon ábrázolva a három NHB-konformer számított hullámszám értékeit, mindhárom konformerre a fenti feltételeknek megfelelő sávokat kerestem. Ilyen sávokat az NHB-konformerek között csupán a 3. konformerre találtam (melynek okát a későbbiekben írom le), ezért azokat kigyűjtve, megvizsgáltam, megfeleltethetőek-e a csak a $6953,5\text{ cm}^{-1}$ vagy a $6938,4\text{ cm}^{-1}$ -es besugárzás hatására csökkenő sávoknak. Azt találtam, hogy a csak $6953,5\text{ cm}^{-1}$ -es besugárzásnál csökkenő sávok jól hozzárendelhetők az elméleti spektrumból

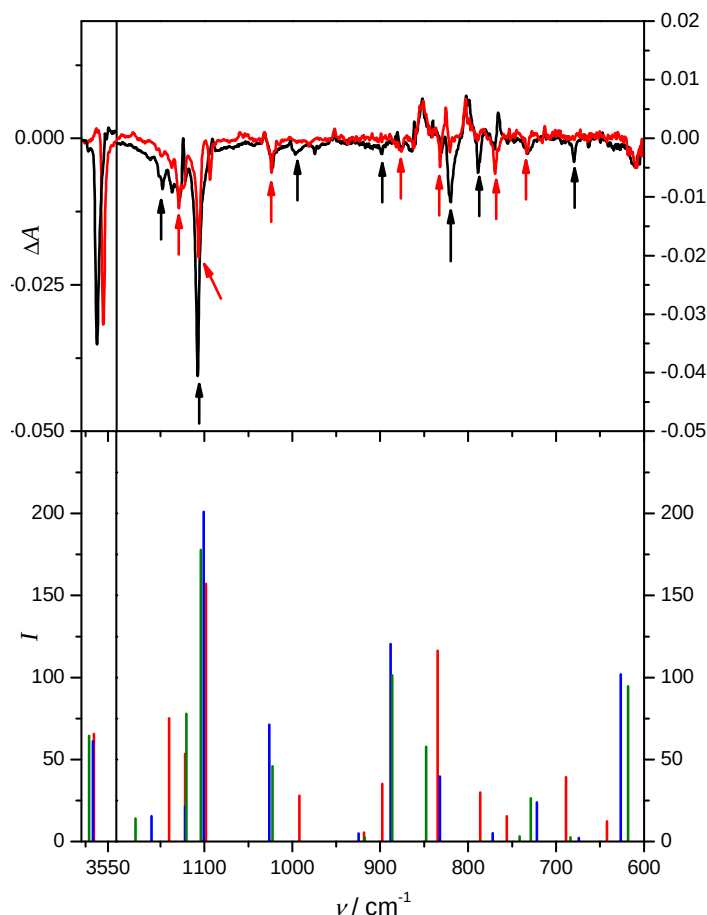
kigyűjtött sávokhoz. Még egy fontos kérdés a spektrum értékelésénél, hogy mely tartomány hordozza a legtöbb információt a probléma szempontjából. Esetünkben ez az ujjlenyomat-tartomány, mivel a magasabb hullámszámoknál található csoportfrekvenciáknál (OH-, SH-, karbonil-nyújtás, stb.) a konformerek sávjai túl közel vannak, hasonló intenzitásúak, így számunkra ezek a tartományok nem hordoznak sok információt.

2. táblázat: A 3. konformer beazonosítása elváló és nagy intenzitású sávok alapján

$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$		
kísérleti	számított	Megjegyzés ^a
680	689	elválik
788	786	elválik
820	835	+
898	898	elválik
996	991	elválik
1107	1098	+
1147	1141	elválik, +
1235	1225	elválik

^a +: A 3-as konformer sávja jelentősen nagyobb intenzitású a másik két konformer sávjainál

Az elváló vagy nagy intenzitású sávok számított és kísérleti frekvenciáit a 2. táblázatban tüntettem fel. A táblázatban a megjegyzés rovatban tüntettem fel, hogy az adott sáv jelentősen elválik a többtől, vagy jelentősen nagyobb intenzitású a másik két konformer sávjaihoz képest (ezt +-szal jelöltem), esetleg mindkettő. A 10. ábrán a különbségi spektrumok olyan részletét mutatom be, amelyen jól elváló sávokat (pl. 788 cm^{-1}), valamint a többi konformer közeli sávjaihoz képest nagy intenzitású sávokat (pl. 820 cm^{-1}) is láthatunk.



10. ábra: A cisztein Ar-mátrixban mért különbségi spektrumai, valamint az ehhez a tartományhoz tartozó számított spektrumok. A 6953,5 cm^{-1} -es lézertérnyel történő besugárzáshoz tartozik a feketével jelölt különbségi spektrum, a 6938,4 cm^{-1} -hez pedig a pirossal. Fekete nyilakkal jelöltem a 3. konformerhez, piros nyilakkal az 5. konformerhez tartozó sávokat a spektrum ábrázolt tartományában. A számított spektrumban a 3. konformer sávjait piros, az 5. konformer sávjait kék, a 7. konformer sávjait zöld szín jelöli.

A csak 6953,5 cm^{-1} -es hullámszámú fénnel történő besugárzásnál csökkenő sávok 3. konformerhez való rendelésének helyességét azzal is alátámaszthatjuk, hogy a másik két alacsony energiájú NHB-konformerhez rendeljük a sávokat, majd kiszámítjuk az átlagos négyzetes hibát. Látható, hogy a 3. konformer esetében számított hiba megfelel az SQM módszertől várt pontosságnak, míg ha a kísérletben észlelt csökkenő sávokat az 5. vagy a 7. konformerhez rendeljük, akkor kétszer akkora átlagos négyzetes hibát kapunk, ezzel is alátámasztva a 3. konformer azonosítását. A hozzárendelésnél minden, csak a 6953,5 cm^{-1} -es hullámszámú fénnel történő besugárzásnál csökkenő sávot figyelembe vettem. A hozzárendelés eredményét a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A 3. konformer sávjainak asszignálása és beazonosítása

kísérleti	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$		
	számított		
	3. konformer	5. konformer	7. konformer
663	642	626	618
680	689	722	728
788	786	772	741
820	835	832	848
898	898	888	886
996	992	1026	1022
1107	1098	1101	1104
1147	1140	1160	1178
1235	1225	1272	1265
1335	1320	1337	1329
1769	1752	1760	1761
2598	2588	2592	2596
3405	3424	3418	3420
3562	3566	3567	3571
átlagos eltérés ^b :	11,5	20,7	26,3

b: átlagos eltérés alatt a négyzetes közepes eltérés értendő

5.3. Az 5. konformer azonosítása

Az előbbi két besugárzás során kapott különbségspektrumokban olyan sávokat is látunk, amelyek csak a $6938,4 \text{ cm}^{-1}$ -es hullámhosszú fénnel történő besugárzás hatására sokkal nagyobb mértékben csökkentek, mint amikor $6953,5 \text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel sugároztuk be a mátrixot. Ezek a sávok további NHB-konformerhez vagy -konformerekhez rendelhetőek. Ha megbízunk a kvantumkémiai számításokban, a leválasztott mátrixban az NHB-konformerek közül számottevő mennyiségben az 5. és 7. konformerek lehetnek jelen. Közelebbről megvizsgálva az 5. és 7. konformer szerkezetét, látható, hogy ez a két konformer nagyon hasonlít egymásra. Míg a 3. konformerben az egész $\text{CH}_2\text{-SH}$ -csoport térállása különbözik az 5. és 7. konformerétől, addig az 5. és 7. konformer közötti különbség mindössze annyi, hogy az SH-csoporton eltérő a H-atom térállása. Nagyon hasonló

szerkezetükből adódik a hasonló spektrum is. Az 5. és 7. konformer számított spektrumát összehasonlítva még az ujjlenyomat tartományban sem találunk egymástól jól elváló vonalakat, vagy nagy intenzitásbeli különbségeket. Emiatt az 5. és 7. konformert különösen nehéz egymástól elkülöníteni, a sávokat egy-egy konformerhez asszignálni. A kiértékelést tovább nehezíti az is, hogy ennek a két konformernek a (feltételezett) OH-nyújtási felhangjai olyan közel esnek egymáshoz, hogy egyrészt átfednek, másrészt a lézerfény sávszélessége is nagyobb annál, hogy egyszerre csupán egyiket tudnánk besugározni.

Ezeknek a konformereknek a vizsgálatához először azt szükséges eldönteni, hogy mindkét konformer jelen van-e a mátrixban. Ehhez egy harmadik, az előbb említett kettő közötti, $6947,3\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel való besugárzás során nyert különbségspektrumot használtam fel. Ha feltételezzük, hogy a mátrixban mindkét konformer jelen van, akkor a $6938,4\text{ cm}^{-1}$ -es és a $6947,3\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel való besugárzáskor is mind az 5., mind a 7. konformert is besugározzuk. (A mátrix $6947,3\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel történő besugárzása során a már beazonosított 3. konformer sávjai is megjelennek a különbségspektrumban. Ezek azonban már nem zavaróak, ugyanis az ehhez a konformerhez tartozó sávokat már az előzőekben azonosítottuk.) A két különböző hullámszám használatakor az 5. és a 7. konformert különböző arányban sugároznánk be. Ennek alapján a két különbségspektrumban olyan dupla sávokat kellene találnunk, melyek ágai a besugárzás hullámhosszától függően különböző arányban csökkennek. A spektrumokat megvizsgálva ilyen sávokat egyáltalán nem találunk, az tehát kizárható, hogy mindkettő jelen legyen az 5. és a 7. konformerek közül.

A következőkben azokat a sávokat vizsgáltam meg, amelyek csak a $6938,4\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel történő besugárzás hatására csökkentek, illetve sokkal intenzívebben csökkentek a $6938,4\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel való besugárzás hatására, mint amikor $6953,5\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel sugároztuk be a mátrixot. Ezeket a sávokat a 10. ábrán piros nyilakkal jelöltem. Mivel az előzőekben beláttuk, hogy csupán egy konformer van jelen az 5. és a 7. közül a mátrixban, ezért ezeket a sávokat megpróbálhatjuk az elméleti értékekhez hozzárendelni. Akárcsak a 3. konformer azonosításánál, megvizsgálva, hogy melyik konformer esetén legkisebb a négyzetes közepes eltérés a kísérleti és a számított értékek között, következtethetünk arra, hogy mely konformer van jelen a mátrixban. Az előbb említett feltételeknek megfelelő sávokat, valamint az elméleti értékek hozzárendeléseit a 4. táblázat tartalmazza. Viszonyításképpen elvégeztem a hozzárendelést a 3. konformerre is.

4. táblázat: Az 5. konformer sávjainak asszignálása és beazonosítása

$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$			
kísérleti	számított		
	3. konformer	5. konformer	7. konformer
618	642	626	618
734	756	722	728
770	786	772	741
832	835	832	848
876	898	888	886
1024	992	1026	1022
1106	1098	1101	1104
1129	1122	1122	1120
1149	1140	1160	1178
1766	1752	1760	1761
2583	2588	2592	2596
3555	3566	3567	3571
átlagos eltérés ^b :	16,8	8,2	14,8

b: átlagos eltérés alatt a négyzetes közepes eltérés értendő

A kapott négyzetes közepes eltérésekből látható, hogy az 5. konformer esetén a hiba jóval kisebb, mint a másik két konformer esetén. Ezen felül meggyőző még, hogy így az 5. konformer mindegyik intenzív sávját megtaláltuk. Így nagy valószínűséggel az 5. konformert is sikerült azonosítani.

5.4. A HB-konformerek vizsgálata

A HB-konformerek vizsgálata az NHB-konformerek vizsgálatánál bonyolultabbnak bizonyult. Az NHB-konformerek besugárzásával viszonylag jó minőségű különbségspektrumokat nyertünk. Annak ellenére, hogy ezekben a különbségspektrumokban gyakorlatilag nem tapasztalunk sávintenzitás-növekedést az NHB-OH-tartományban, és így megállapíthatjuk, hogy az éppen besugárzott NHB-konformer a besugárzás hatására HB-konformerré alakult át, ezek segítségével azonban lehetetlen azonosítani a HB-konformereket. A besugárzott NHB-konformer(ek)ből ugyanis egyszerre több HB-konformer is keletkezhet. Azt, hogy a besugárzáskor egy vagy több konformer keletkezett, a különbségspektrum HB-OH-tartományának vizsgálatából nem tudjuk megállapítani, mivel az OH-nyújtási sávok az intramolekuláris hidrogénkötés miatt szétkenődnek, a növekedés sokszor éppen a

tartományban egyáltalán nem, vagy csak egy széles sáv formájában látszik. Ha a HB-konformerek OH-felhangjának besugárzásával akarjuk megkülönböztetni az HB-konformereket, akkor szintén nehézségekbe ütközünk. Először is nehéz meghatározni a besugárzáshoz használandó frekvenciákat, mivel a HB-OH-sávok (így a rezgési felhangok jelei is) az intramolekuláris hidrogénkötés miatt szétkenődnek, alig észrevehető, kis intenzitású sávokként jelentkeznek a NIR spektrumban. Ráadásul azoknak a HB-konformereknek, amelyek csak az oldallánc geometriájában különböznek és a hidrogénkötés környékén hasonló a geometriájuk, az OH-nyújtási felhang sávjai szintén átfednek. Ebben az esetben szintén gyakorlatilag lehetetlen egyszerre egyetlen konformert besugározni az OH-nyújtási felhangon. Elmondható tehát, hogy a NHB-konformerek azonosítása a HB-konformerek és az NHB-konformerek OH-nyújtási rezgés felharmonikusának besugárzásával sem oldható meg egyszerűen.

Méréseim során eddig két frekvencián sugároztam be a HB-konformerek OH-nyújtási felharmonikusának tartományában (lásd 7. ábra). Ezek közül az egyik, a $6867,1\text{ cm}^{-1}$ -es besugárzás bizonyult hatékonynak. Az észlelt konformerek meghatározásához kigyűjtöttem mind a növekvő, mind a csökkenő sávokat a különbségspektrumból. Ezeket a sávokat az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: $6867,1\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámú fénnel való besugárzás hatására változó sávok

$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	
csökkenő sávok	növekvő sávok
677	734
701	770
743	1094
783	1129
1312	
1347	
1360	
1389	

A besugárzás során növekvő sávok között megtalálhatjuk a már beazonosított 5. konformer néhány intenzívebb sávját: ezek a 734 cm^{-1} , 770 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} , és 1766 cm^{-1} -nél található sávok. Annak igazolására, hogy ezek a sávok tényleg az 5. konformerhez tartoznak, megvizsgáljuk azt a különbségspektrumot, ahol az 5. konformert sugároztuk be.

Azt tapasztaljuk, hogy az 5. konformer besugárzásánál ($6938,4\text{ cm}^{-1}$ -es hullámhosszú fénnnyel történő besugárzás) ezek a sávok valóban csökkentek.

Ezek után érdemes geometriai megfontolásokat is végezni. Az 5. konformer oldallánc-szerkezete nagyon hasonlít az 1. konformeréhez, besugárzás hatására a két konformer könnyen átalakulhat egymásba hidrogén-vándorlással. Annak eldöntésére, hogy az 1. konformer jelen van-e a mátrixban, megpróbáltam hozzárendelni az 1. konformer elméleti hullámszámait a spektrumban csökkenő sávokhoz. A besorolásnál törekedtem arra is, hogy a kísérleti és számított relatív intenzitások is összhangban legyenek. Ismerve azt, hogy a karbonil-sávok intenzitása néhány $100\text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$, a többi megfigyelt sáv intenzitására is következtethetünk, és ezeket összehasonlíthatjuk a számított értékekkel. Mivel a besugárzással kapott különbségspektrum meglehetősen zajos volt, ezért csak a néhány $10\text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$ elméleti intenzitás körüli, vagy annál nagyobb intenzitású sávokat figyelhetjük meg. Az 1. konformerhez rendelhető, megfigyelt nagyobb intenzitású sávokat a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: Az 1. konformerhez rendelhető, a spektrumban észlelt nagy intenzitású sávok

$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	
kísérleti	számított
743	743
1312	1309
1389	1386

A csökkenő sávok között azonban még maradtak az 1. konformerhez hozzá nem rendelhető sávok. Az intenzitásokat is figyelembe véve ezek egyetlen sáv kivételével egyértelműen a 2. konformerhez rendelhetőek. A hozzárendelést a 7. táblázat tartalmazza, melyből jól látszik, hogy a keresett sávok környékén a többi konformer esetén vagy nem található sáv, vagy csak sokkal kisebb intenzitású annál, mint amit még láthatnánk. A táblázatban feltüntettem a megfigyelt és a számított intenzitást is mind a 2., mind a magasabb energiájú HB-konformerekre. A spektrum egy részletét a 11. ábrán mutatom be.

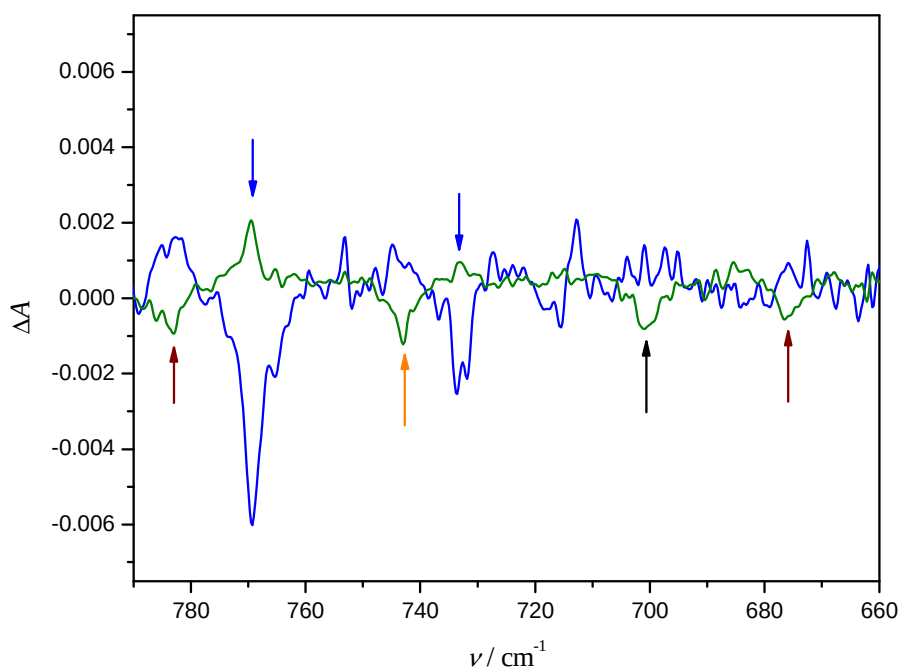
7. táblázat: A 2. konformer beazonosítása

kísérleti ^c	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$			
	számított ^d			
	2. konformer	4. konformer	6. konformer	8. konformer
677 (+)	660 (11)	686 (10)	696 (11)	686 (1)
783 (+)	761 (16)	785 (1)	778 (0,5)	750 (11)
1347 (+)	1345 (36)	1310 (4)	1305 (5)	1301 (34)
1360 (++)	1378 (400)	1369 (5)	1372 (5)	1367 (20)

c: A kísérleti spektrumban észlelt sávok intenzitását zárójelben + jelöli, ha intenzitásukat néhány

10 $\text{km} \cdot \text{mol}^{-1}$ -nek várjuk. ++ jelöli az intenzitást, ha néhány száz $\text{km} \cdot \text{mol}^{-1}$ -nek várjuk.

d: A számított hullámszámok melletti zárójeles érték a számított intenzitást jelöli $\text{km} \cdot \text{mol}^{-1}$ egységben.



11. ábra: 6867,1 cm^{-1} -es hullámszámú fénnnyel való besugárzás hatására változó sávok.

Kékkel az 5. konformerhez, narancssárgával az 1., bordóval a 2., feketével egy nem azonosított HB-konformerhez rendelhető sávokat jelöltem.

A hozzárendeléseket elvégezve azt tapasztaljuk, hogy mind a növekvő (1094 cm^{-1}), mind a csökkenő sávok között (701 cm^{-1}) találunk olyat, melyet egyetlen konformerhez sem rendeltünk hozzá. A növekvő sávot nem tudjuk egyik beazonosított NHB-konformerhez sem hozzárendelni. Feltehetően ez egy magasabb energiájú, esetleg másik alapvázal rendelkező konformerhez tartozik. A csökkenő sávot (mely egy HB-konformerhez tartozik) vagy a 4. vagy a 6. konformerhez tudjuk hozzárendelni, a többi, mátrixban várt HB-konformer közül egyik sem ad abban a tartományban jelet. A 6. konformert azonban a következő alfejezetben

részletezett okok miatt nem várjuk, hogy jelen legyen a mátrixban. Így ez a sáv valószínűleg a 4. konformerhez tartozik, de ez még feltétlenül további vizsgálatokat igényel.

Ahhoz, hogy rendre azonosíthassuk a HB-konformereket, szükség lesz további mérésekre. Jobb minőségű különbségi spektrumok is segíthetik a konformerek azonosítását. Mivel a széles OH-nyújtási felhang sávok miatt a HB-konformereknél kisebb a besugárzás hatékonysága, ezért ehhez vastagabb mátrixot kellene növesztetni, és a fent leírt kísérletekhez használt 2 óra helyett hosszabb ideig kellene besugározni. Ezen kívül érdemes lenne végigpásztázni a HB-OH-felhang tartományt, több frekvencián is besugározva a mátrixot.

5.5. További besugárzási kísérletek

Mivel csak az oldallánc térszerkezetében eltérő konformerek OH-nyújtási felharmonikus sávjai nem válnak szét eléggé ahhoz, hogy szelektíven sugározzunk be egy konformert, ezért az ebben az esetben jobban elváló felharmonikus sávok besugárzásával, például az SH-nyújtás felharmonikusának besugárzásával is próbálkoztam. Ezek a besugárzások azonban nem vezettek eredményre; a besugárzás hatására semmilyen változást nem tapasztaltunk, a konformerarány hosszú, több órás besugárzás hatására sem változott meg kimutatható mértékben. Ennek okát számítással igyekeztem megkeresni.

Azt várjuk, hogy ha az SH-nyújtásba pumpált energia nem oszlik el gyorsan a molekula távolabbi csoportjain lokalizált rezgéseken a csatolások miatt, akkor ez a besugárzás elsősorban az SH-csoport térállását változtathatja meg. Ennek azonban az az előfeltétele, hogy az SH-csoport térállásában különböző konformerek között kisebb legyen a gátmagasság, mint a besugárzott energia, ezért ezt a gátat (az SH-csoport rotációját) számítottam. Az SH-csoport átfordulási gátjának megbecsléséhez két olyan konformer (4. és 6.) között számítottam ki a gátmagasságot, amelyek csupán az SH-csoport hidrogénjének térállásában különböznek. A számítást a Gaussian03 program [29] segítségével, B3LYP módszerrel 6-31++G** bázison végeztem. Ezt a szintet használtam a geometriaoptimaláshoz és a frekvenciaszámításhoz is. Az átmeneti állapot számításához az STQN (Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton) módszert használtam.

A számítások alapján a 4. konformer és a nyeregpont energiakülönbségre $1048,3\text{ cm}^{-1}$, a 6. konformer oldaláról a gátmagasság pedig $939,8\text{ cm}^{-1}$. A besugárzásokhoz használt SH-nyújtás felhangja 5000 cm^{-1} körüli érték. A besugárzáshoz így majdnem akkora energiát használtunk, mint a gátmagasság ötszöröse. A számítási eredmények alapján tehát a

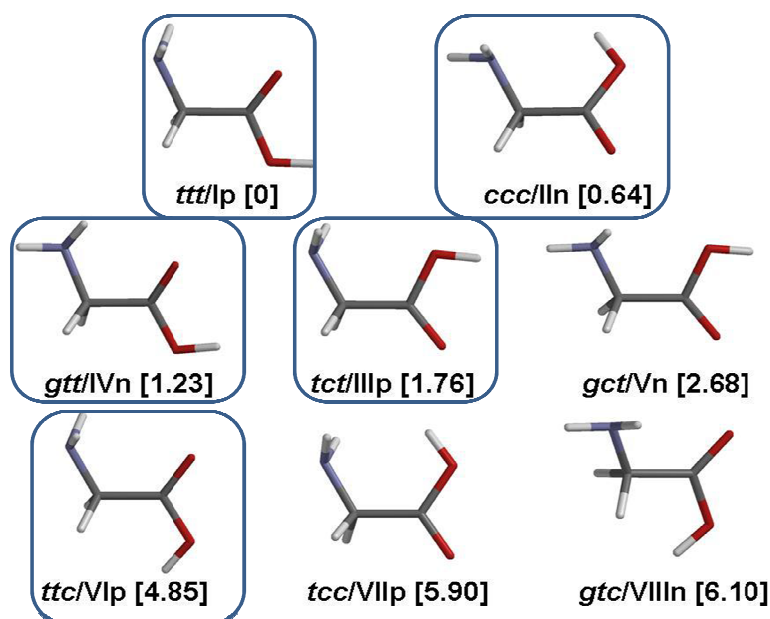
besugárzott energia képes lehet az SH-csoportok térállását átbillenteni. Ugyanakkor a gát elég magas ahhoz, hogy ilyen alacsony hőmérsékleten a besugárzás során keletkezett nagyobb energiájú konformer (a gát fölött, klasszikus úton) ne tudjon visszaalakulni az alacsonyabb energiájú konformerbe.

A negatív kísérleti eredménynek tehát nem a túl magas SH átfordulási gát a magyarázata. Elképzelhető, hogy az SH-nyújtási felhang túl kicsi moláris elnyelése, és a lézerünk kisebb teljesítménye az $\sim 5000\text{ cm}^{-1}$ körüli tartományban együtt eredményezi azt, hogy túl kicsi a konverzió hatásfoka. Nem zárható ki az sem, hogy a molekulába pumpált energia gyorsabban disszipálódik (nyelődik el) a mátrixban, mint ahogy konformációváltozást okozhatna. Végül, talán legvalószínűbb ok az, hogy ugyan létre jön az SH-csoport átfordulása a besugárzás hatására, de alagúthatás miatt a keletkezett konformer gyorsabban visszaalakul az alacsonyabb energiájú konformerbe, mint ahogy azt észlelhetnénk. Ilyen gyors, de még éppen kísérletileg mérhető alagúthatással történő átalakulást mértek csoportunkban a glicin két – OH-csoport állásában különböző – konformere között [11]. Az SH-csoport alagúthatással való átalakulását támasztja az is alá, hogy a 7. konformer, mely az 5. konformernél magasabb energiájú, és tőle csak az SH-csoport térállásában különbözik, nem figyelhető meg a mátrixban. Ez utóbbi feltételezés valószínű, de azt további számításokkal, esetleg kísérletekkel alá kell támasztanunk. Ha feltételezzük, hogy ez a hipotézis helyes, akkor viszont megállapíthatjuk azt, hogy a 6. és 8. konformer nem lehet jelen a mátrixban, mivel ezek a hideg mátrixban gyors „alagutazással” átalakulnak a 4., illetve az 1. konformerbe.

5.6 Összevetés a glicinnel, további lehetőségek új konformerek azonosítására

Tanulságos a cisztein számításokból várt és a mátrixban észlelt konformereinek összevetése a glicinre kapott eredményekkel. Az összehasonlítás segíthet megjósolni például azt, hogy mely további, esetleg rövid(ebb) élettartamú konformerek előállítására van nagyobb esély lézeres besugárzással.

A 12. ábra a glicin mátrixban várt konformereit mutatja. A konformerek ábrája alatt relatív energiájukat láthatjuk kJ/mol-ban.



12. ábra: A glicin konformerei a két gyakran használt jelöléssel. Szögletes zárójelben találjuk az egyes konformerek relatív energiáját kcal·mol⁻¹ egységben. A kísérletileg már észlelt konformereket bekarikázással jelöltem. Ezek közül a gtt/IVn konformert alacsony hőmérsékletű mátrixban még nem észlelték, csak gázfázisban. A laboratóriumunkban előállított magas energiájú konformer a ttc/VIp. [10]

Megvizsgálva a kísérletileg észlelt glicin és cisztein alapvázakat (COOH- és NH₂-csoportok relatív helyzetét), azt tapasztaljuk, hogy egy kivétellel az összes cisztein alapváz besorolható az Ip és IIn glicin alapvázhoz. Az egy kivétel a cisztein 2. konformere, mely egyik glicin alapvázhoz sem sorolható be. Ennek oka a ciszteinben kialakuló gyenge –N-H---S-H hidrogénkötés lehet, amely stabilizálja ezt a konformációt. Ilyen stabilizáló hatás a glicinnél nincsen.

Látjuk, hogy a stabil IIp és az észlelt rövid élettartamú VIp glicin konformer váza nem található meg egyetlen cisztein konformernél sem. A glicin esetében a nagyobb energiájú, de 10 K-en hosszú élettartamú IIp konformer előállítható az Ip konformer besugárzásával[11]. Ezért elképzelhető, hogy a cisztein esetében is az NHB-konformerek besugárzásával létrehozható ilyen nagyenergiájú, a mátrixban eredetileg jelen nem levő IIp gerinckonformációjú konformer, illetve lehetséges, hogy ilyen alapvázú konformer kis mennyiségben jelen is van. Ezt igazolni látszik az NHB-konformerek OH-nyújtási tartományában 3542,5 cm⁻¹-nél jelentkező sáv, melyet a Dobrowolski és munkatársai által közölt spektrumban nem találunk. Ennek oka lehet, hogy ők a mátrix leválasztását 15 K-en végezték, melyen ez a konformer az alacsony gát miatt már a glicin esetében is átalakult egy

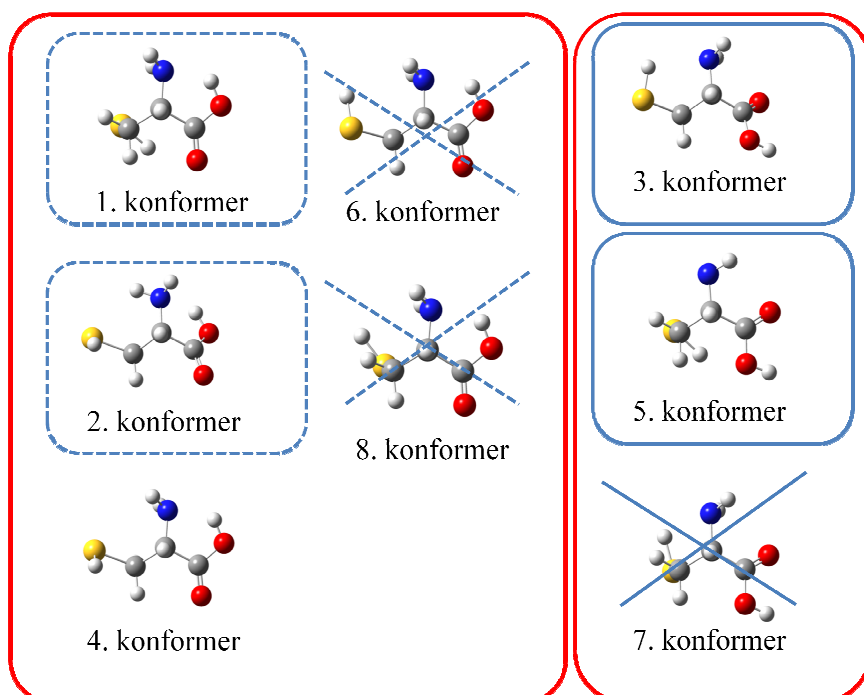
alacsonyabb energiájú konformerré. A leválasztást én 10 K-en végeztem, így számíthatunk arra, hogy kis mennyiségben ez a konformer is kifagyhat. Ennek a konformernek a jelenlétére utal továbbá, hogy a glicinhez hasonlóan, amikor a legnagyobb energiájú fénnel történő besugárzást végeztük, nagyon kis intenzitással növekedni kezdett egy sáv $3542,5\text{ cm}^{-1}$ -nél. A glicin esetén az Ip konformer OH-nyújtási sávjának nagyobb hullámszámú oldalát besugározva jelentősen meg lehetett növelni a IIIp konformer mennyiségét. Ezt többek között a IIIp konformer OH-nyújtási sávjának növekedése jelezte, amely az Ip konformer OH-nyújtási sávjához képest kicsit kisebb hullámszám értéknél található. Az ilyen alapvázú konformerek keresésére további számításokat és kísérleteket tervezünk.

Eddigi besugárzási kísérleteim során nem észleltem olyan rövid élettartamú konformert, mint amilyen a glicin VIp konformere. Ennek egy lehetséges oka, hogy a cisztein ilyen gerinckonformációjú konformere gyorsabban alakul át alagúthatással Ip gerinckonformációjú konformerbe, mint a glicin VIp konformere. Megjegyzendő, hogy laboratóriumunk publikálatlan eredményei szerint – valószínűleg rövid élettartama miatt – a fenilalanin megfelelő gerinckonformációjú konformere sem mutatható ki.

6. Összefoglalás

Tudományos diákköri dolgozatomban a cisztein konformációit vizsgáltam IR lézerbesugárzással kombinált mátrixizolációs technikával. Bár a cisztein kis molekula, flexibilitása miatt mégis számos konformere lehetséges. Korábbi mátrixizolációs vizsgálatokban a cisztein Ar-mátrixban megfigyelt konformereit csak két csoportra tudták osztani: hidrogénkötött és nem-hidrogénkötött konformerekre. A két csoporton belül azonban a mátrixizolációs IR spektrum bonyolult szerkezete miatt a konformerek konkrét azonosítását nem lehetett elvégezni.

Kísérleteink során szelektív NIR lézeres besugárzást végezve sikerült egyértelműen azonosítanunk a három nem hidrogénkötött konformer közül a cisztein 3. és 5. konformerét, valamint megmutatni, hogy a 7. konformer nincs jelen a mátrixban. A hidrogénkötött izomerek közül nagy valószínűséggel sikerült megállapítanunk, hogy mind az 1., mind a 2. konformer jelen van a mátrixban. Továbbá számítási eredményeink és hipotézisünk alapján – amely szerint az SH-csoport térállásában különböző konformerek alagúthatással is át tudnak alakulni egymásba – elmondható az is, hogy a 6. és 8. konformer valószínűleg nem lehet jelen a mátrixban. A korábban azonosított konformer-csoportok és a dolgozatban bemutatott munka által azonosított konformereket a 13. ábra összegzi.



13. ábra: A cisztein megtalált konformerei. Piros karikázással jelöltem a mátrixizoláció segítségével a korábbi szerzők által azonosított két konformer-csoportot. A kísérleteimből levont egyértelmű következtetéseket folytonos, a valószínűsített eredményeket szaggatott vonallal jelöltem.

Az azonosított konformerek jó összhangban vannak korábbi mikrohullámú spektroszkópiai vizsgálatok eredményével[12]. Ezekben a kísérletekben azonban egy olyan alapvázhoz tartozó két konformert is észleltek, amelyiket a jelenlegi munkában még nem vizsgáltam. Besugárzásos kísérleteim analízise arra is rámutatott, hogy vannak még olyan sávok a leválasztás után mért (besugározatlan) spektrumokban is, amelyek intenzitása egyik eddigi besugárzási kísérletemben sem változott. Jelen kell tehát lennie még azonosítatlan konformer(ek)nek is. Ezért további terveim közé tartozik ezek azonosítása és asszignálása további besugárzásos kísérletek alapján. Szintén tervezem irodalmi javaslatok alapján [9] olyan jó minőségű mátrixizolációs VCD-spektrumok felvételét is, amelyek kiegészítő információval szolgálhatnak a konformációs vizsgálatokhoz.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Tarczay Györgynek, hogy izgalmas és kihívásokkal teli témát adott, melynek vizsgálata során számos új kísérleti módszert is megismertem, valamint betekintheztem a kvantumkémiai számításokba. Köszönöm neki a dolgozat sokszori és alapos átolvasását.

Hálásan köszönöm Bazsó Gábornak a rengeteg segítséget és türelmet, mind a spektrumok felvételekor, mind a kiértékeléskor.

Köszönöm Góbi Sándornak a kvantumkémiai számításokban nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Fogarasi Géza professzor úrnak a dolgozat átolvasásáért és a hasznos tanácsokért. Végül köszönöm családomnak és barátaimnak a dolgozat megírása során nyújtott biztatást és támogatást.

8. Irodalomjegyzék

- [1] S. G. Stepanian, I. D. Reva, E. D. Radchenko és L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.*, 102, 4623-4629, **1998**.
- [2] R. R. G. M. B. Lambie, *Spectrochimica Acta*, 59, 1387-1397, **2003**.
- [3] B. Boeckx, W. Nelissen és G. Maes, *J. Phys. Chem A*, 116, 3247-3258, **2012**.
- [4] A. Kaczor, I. D. Reva, L. M. Proniewicz és R. Fausto, *J. Phys. Chem.*, 110, 2360-2370, **2006**.
- [5] S. G. Stepanian, I. D. Reva, E. D. Radchenko és L. Adamowicz, *J. Phys. Chem.*, 105, 10664-10672, **2001**.
- [6] B. Lambie, R. Ramaekers és G. Maes, *J. Phys. Chem.*, 108, 10426-10433, **2004**.
- [7] S. Jarmelo, L. Lapinski, M. J. Nowak, P. R. Carey és R. Fausto, *J. Phys. Chem.*, 109, 5689-5707, **2005**.
- [8] S. Jarmelo és R. Fausto, *Journal of Molecular Structure*, 786, 175-181, **2006**.
- [9] J. C. Dobrowolski, M. H. Jamróz, R. Kołos, J. E. Rode és J. Sadlej, *ChemPhysChem*, 8, 1085-1094, **2007**.
- [10] G. Bazsó, G. Magyarfalvi és G. Tarczay, *J. Mol. Struct.*, 33, 1025, **2012**.
- [11] G. Bazsó, G. Magyarfalvi és G. Tarczay, *J. Phys. Chem A*, 116, 10539-47, **2012**.
- [12] M. E. Sanz, S. Blanco, J. C. López és J. L. Alonso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 6216-6220, **2008**.
- [13] J. C. Dobrowolski, J. E. Rode és J. Sadlej, *Theochem*, 810, 129-134, **2007**.
- [14] P. R. Laurence és C. Thomson, *Theor. Chim. Acta*, 58, 121-124, **1981**.
- [15] L. Schäfer, S. Q. Kulpnewton, K. Siam és V. J. Klimkowski, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 68, 373-385, **1990**.
- [16] S. Gronert és R. A. J. O'Hair, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2071-2081, **1995**.
- [17] J. J. Wilke, M. C. Lind, H. F. Schaefer, A. G. Császár és W. D. Allen, *J. Chem. Theory Comput.*, 5, 1511-1523, **2009**.
- [18] I. R. Dunkin, *Matrix-Isolation Techniques: A Practical Approach*, New York: Oxford University Press, **1998**.
- [19] E. Whittle, D. A. Dows és G. C. Pimentel, *J. Chem. Phys.*, 22, 1943, **1954**.

- [20] A. Császár, Szerkezetmeghatározó módszerek.
- [21] L. Khriachtchev, S. Tapio, A. V. Domanskaya, M. Räsänen, K. Isokoski és J. Lundell, *J. Chem. Phys.*, 134, 124307, **2011**.
- [22] L. Lapinski, M. J. Nowak, I. Reva, H. Rostkowska és R. Fausto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 9615–9618, **2010**.
- [23] F. Jensen: Introduction to Computational Chemistry, Chichester, Wiley, **2007**.
- [24] P. Pulay, G. Fogarasi, F. Pang és J. E. Boggs, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 2550-2560, **1979**.
- [25] C. Fábri, T. Szidarovszky, G. Magyarfalvi és G. Tarczay, *J. Phys. Chem.*, 115, 4640, **2011**.
- [26] *PQS version 3.3, Parallel Quantum Solutions*, 2013 Green Acres Road, Fayetteville, Arkansas 72703.
- [27] G. Bazsó, S. Góbi, G. Magyarfalvi, G. Zügner, A. Demeter, T. Turányi, S. Dóbé és G. Tarczay, *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2012**.
- [28] K. K. K. Gerald R. Van Hecke, *A Guide to Lasers in Chemistry*, London: Jones and Bartlett Publishers International, **1998**.
- [29] *Gaussian 03, Revision D.01*,
M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.