

C6200 – Biochemické metody

OŠC_ELEKTRONOVÁ
SPEKTRA MOLEKUL

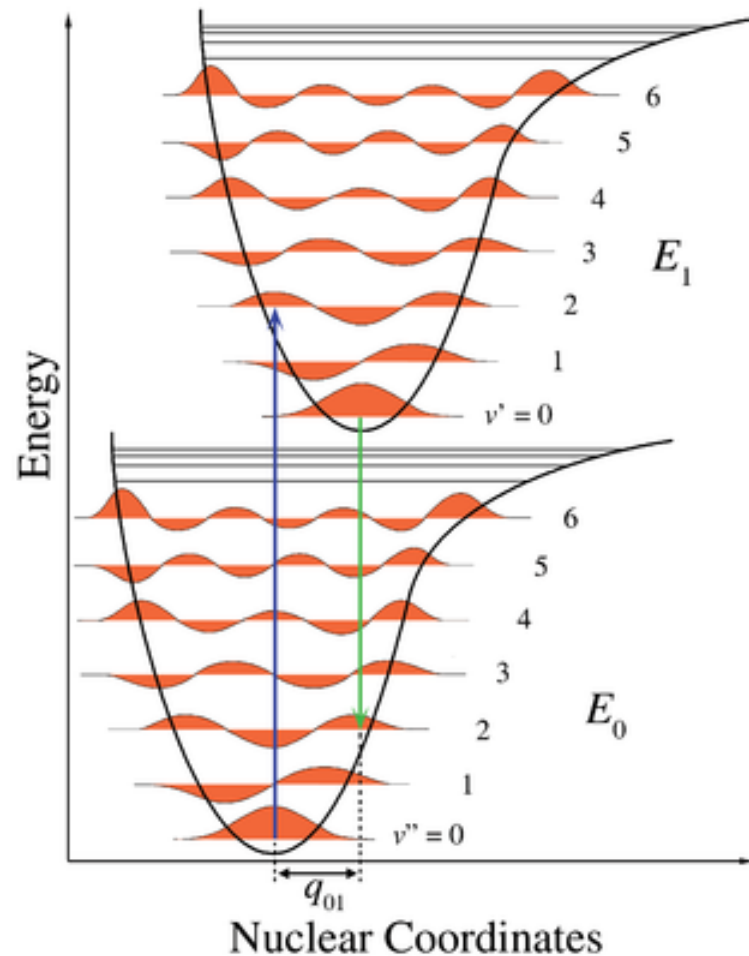
Petr Zbořil

Elektronová spektra molekul

Velké množství
možných přechodů

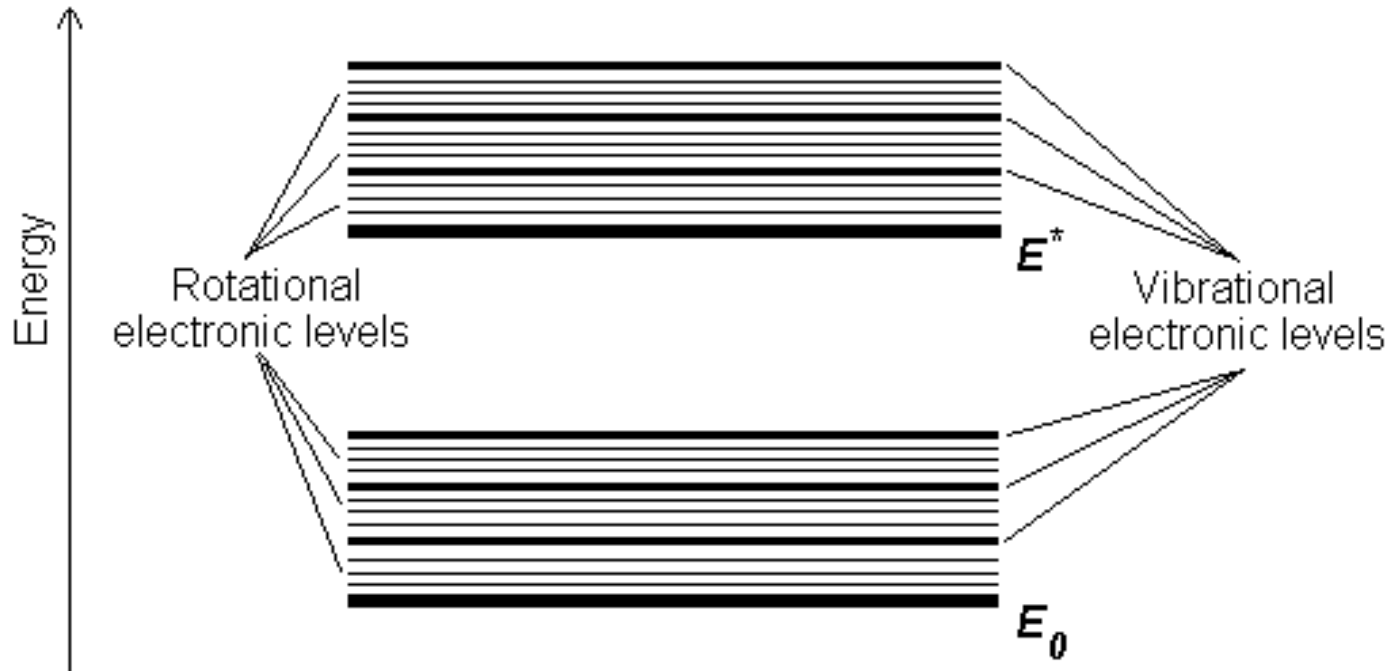
Franck-Condonův
princip

= elektronové přechody
rychlé
= hmotné jádro, pomalé
Nemění se geometrie



Jablonskiho diagramy

Příspěvky vibrací a rotací v molekule

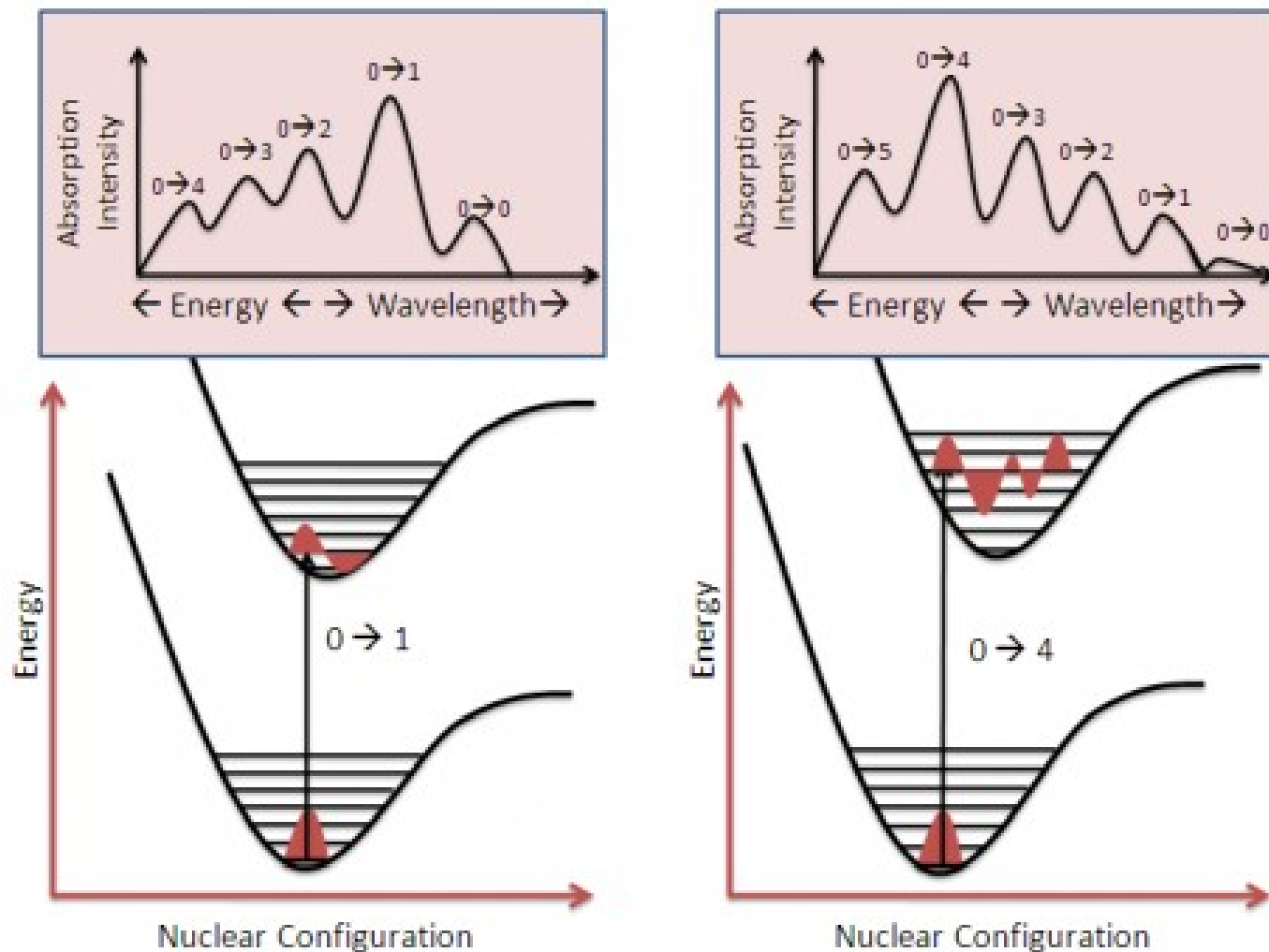


Resonanční podmínka $\Delta E = h\nu$

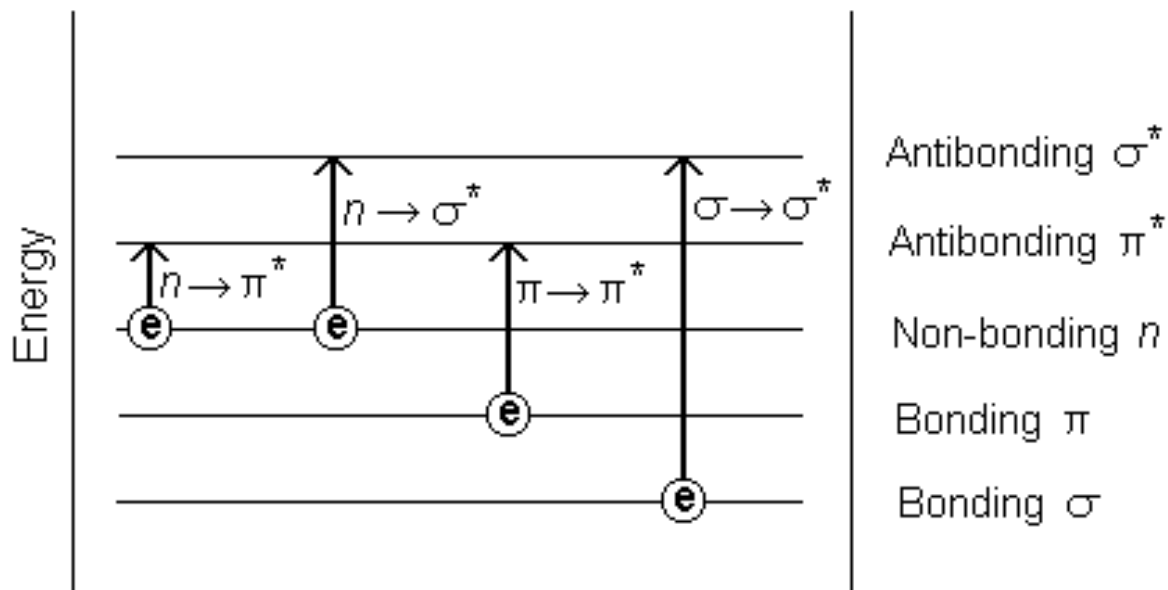
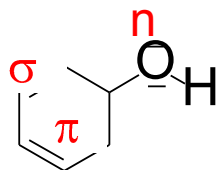
$\Delta E = \Delta E_{\text{el}} + \Delta E_{\text{vib}} + \Delta E_{\text{rot}}$ – velké množství možností

Poloha pásu – $\lambda = f(\Delta E)$, výška – pravděpodobnost přechodu

Pásová spektra molekul

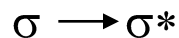


Typy přechodů

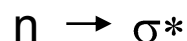


Posice pásu – $\Delta E = hc/\lambda$

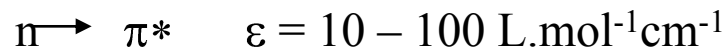
Energie přechodů



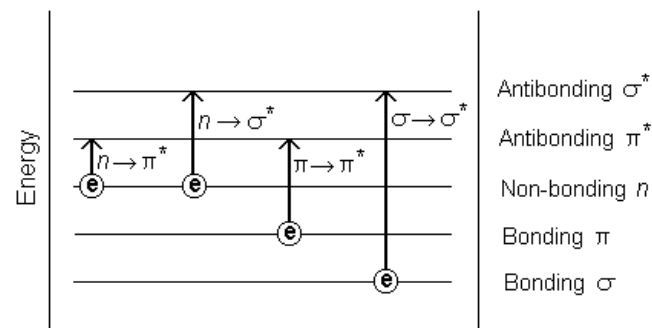
příklad C-H: vysoké energie, odpovídá 125 nm



méně časté, energie odpovídá 150 – 250 nm

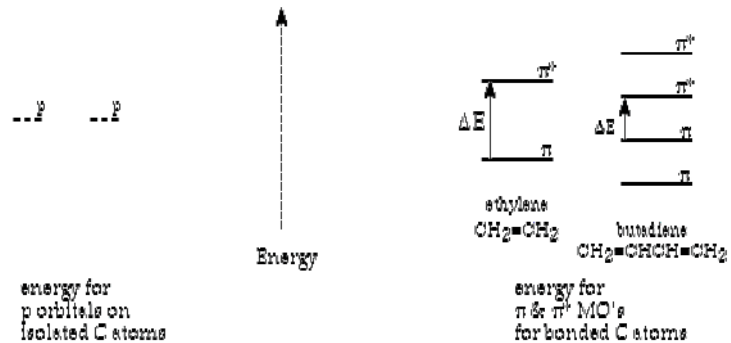
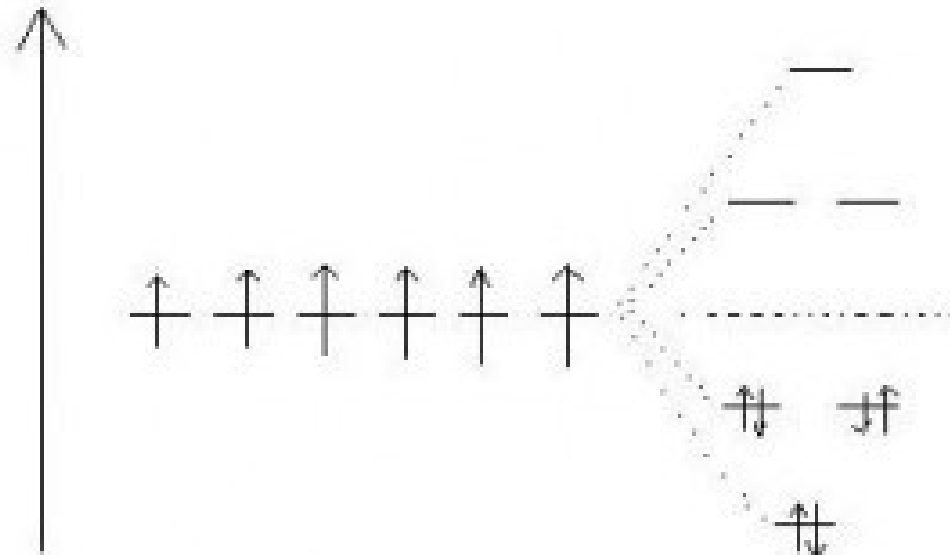


nejobvyklejší případ, energie odpovídá 200 – 700 nm



Charge transfer přechody – anorganické komplexy, interakce mezi elektron. donorem a akceptorem – vysoký mol. abs. koeficient

Konjugované systémy – štěpení hladin

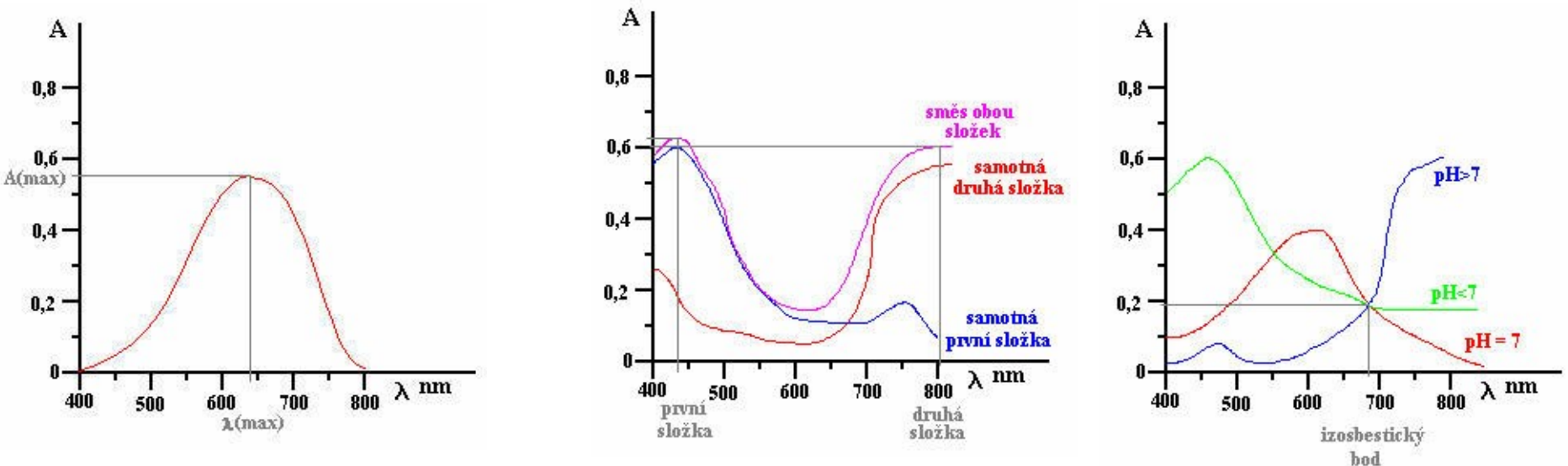


Compound name	Condensed formula	Wavelength absorbed
Ethene, ethylene	$\text{CH}_2::\text{CH}_2$	171 nm
1,3-butadiene	$\text{CH}_2::\text{CHCH}::\text{CH}_2$	217 nm
Trans 1,3,5-hexatriene	$\text{CH}_2::\text{CHCH}::\text{CH}$ $\text{CH}::\text{CH}_2$	274 nm
β -carotene	see structure below	425 nm

Gaussovský tvar absorbční křivky

Četnost přechodů – velikost absorpce \approx pravděpodobnost

Aditivita – různé chromofory (formy) ve vzorku



Chromofory

- Skupiny odpovědné za absorpci záření
 - Přítomné elektrony – orbitaly – přechody
 - Poloha (λ) a výška maxima absorpčního pásu
- Relativita pojmu
 - Více chromoforů v molekule
 - Makromolekuly – bílkoviny mají více možností
- Další vlivy – auxochromy
 - Skupiny ovlivňující polohu (λ) a výšku maxima absorpčního pásu

Auxochromy

- Skupiny posouvající λ maxima
 - Bathochromní efekt – tzv. „červený posun“
 - Hypsochromní efekt – tzv. „modrý posun“
- Skupiny posouvající výšku maximální absorpce
 - Hyperchromní efekt – zvýšení maxima
 - Hypsochromní efekt – snížení maxima
- Analogické názvy pro efekty vyvolené změnami prostředí apod.

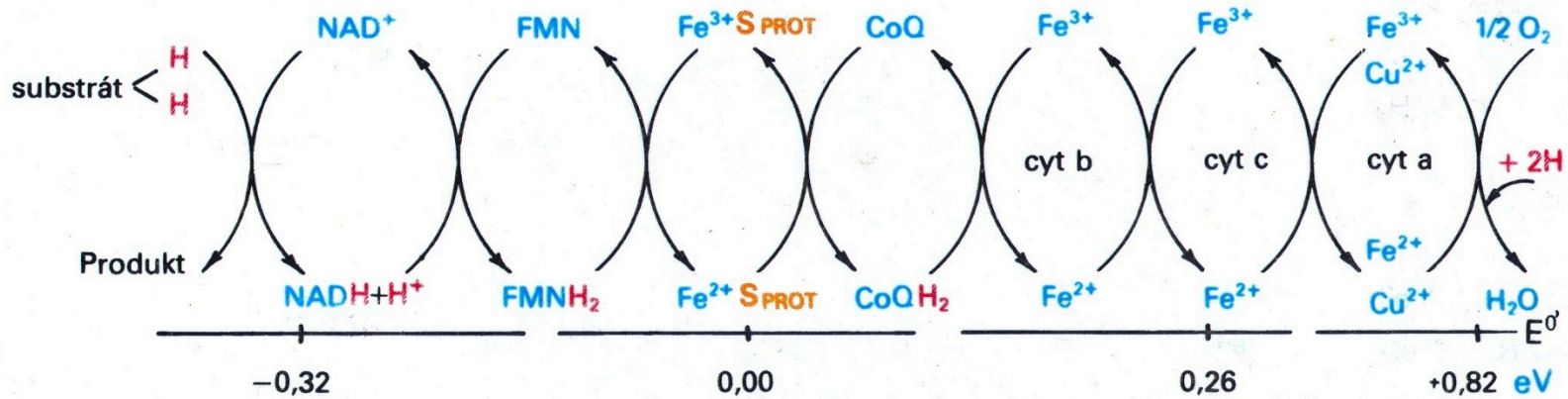
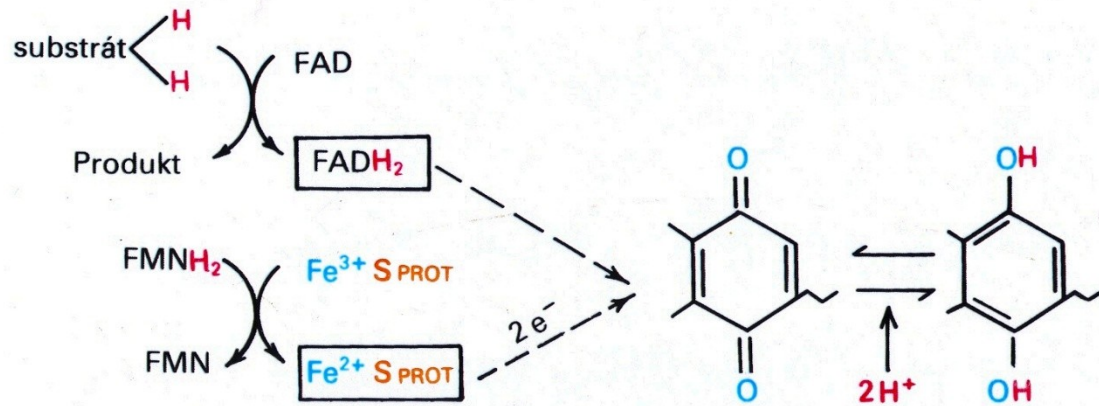
Biochemicky významné chromofory

Významné chromofory v biochemii

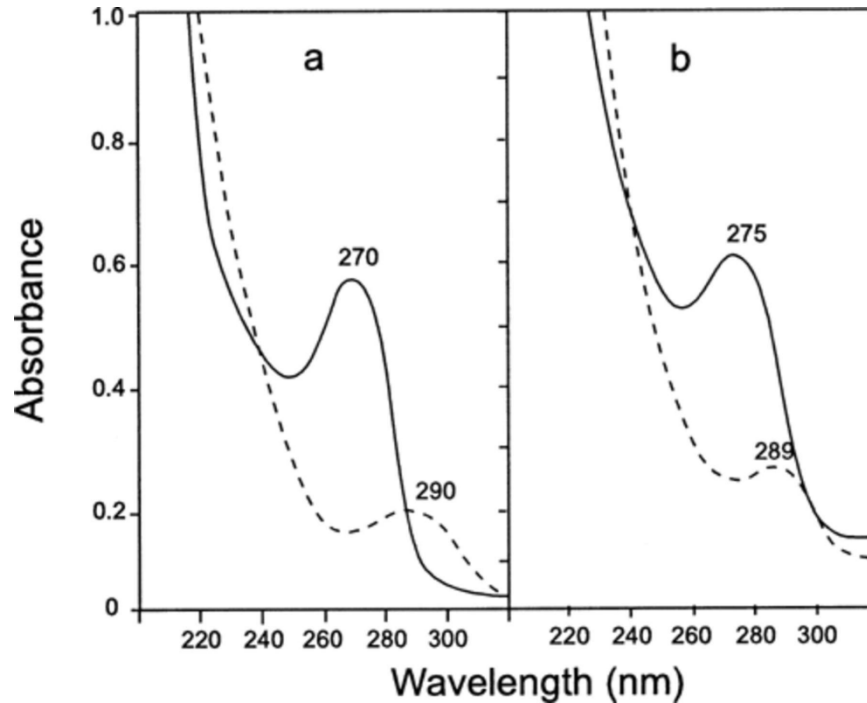
	Amax (nm)	mol.abs koef. (l/mol.cm)
-CONH-	225	400
-S ⁻	235	3280
-S-S-	250	500
-fenyl	206 261	8000 220
-hydroxyfenyl	222 270	8000 1450
-hydroxyfenolát	235 287	9300 2600
Indol	220 280	3400 5500
Imidazol	211	6000
Guanin	256	12200
Adenin	260	14900
Cytosin	267	6100
Thymin	265	7900
NADH	340	6220
Hem	410	12000
Retinyl	453	50000
FAD	450	14000
Cytochromy	500-600	
Chlorofyly	630-650	

Ovlivnění spekter

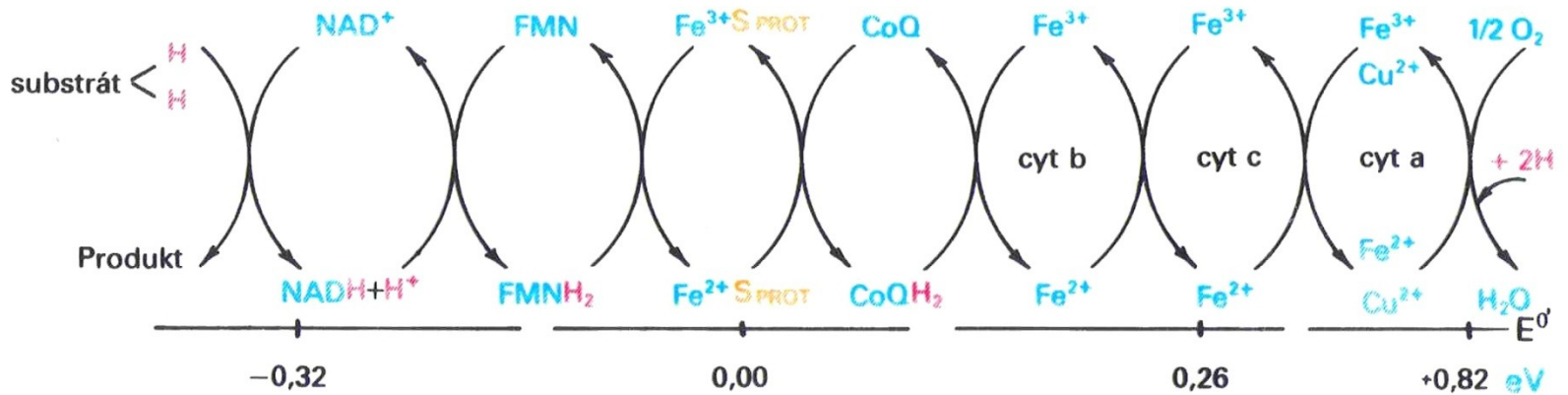
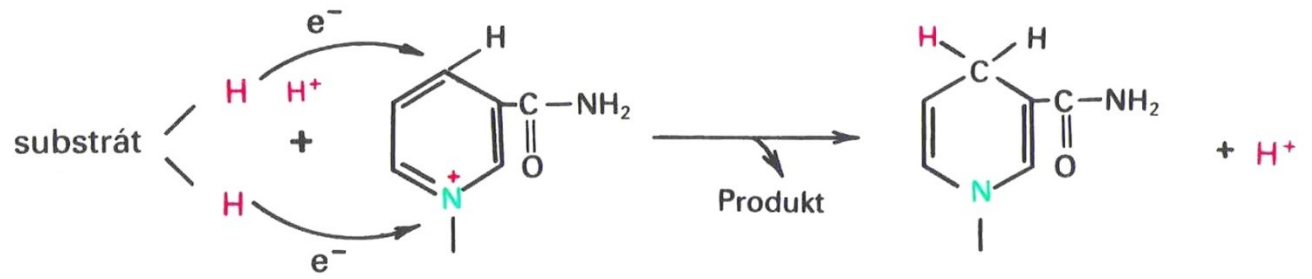
- Vnitřní vlivy – elektronová struktura
 - Oxidoredukce
 - Acidobazické děje
- Vnější vlivy
 - Interakce s prostředím – polarita, ionty

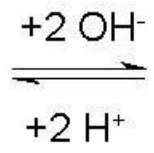
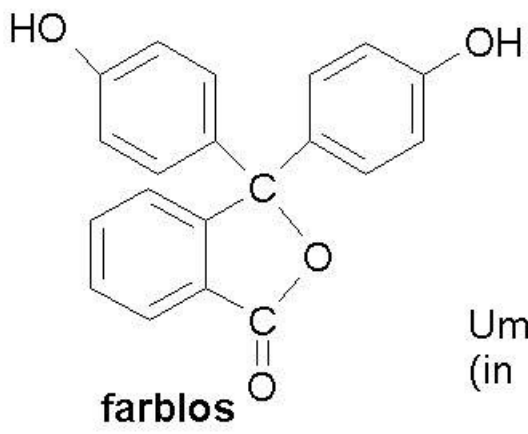


Spektra UQ



Ultraviolet absorption spectra of (a) 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone and (b) ubiquinone in ethanol, before and after reduction with sodium borohydride. Solid line, quinone; broken line, quinol





Umschlagpunkt: 8,2-10
(in pH-Einheiten)

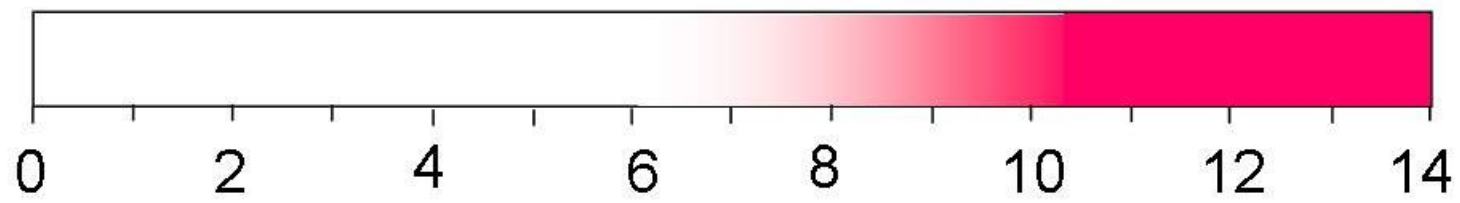
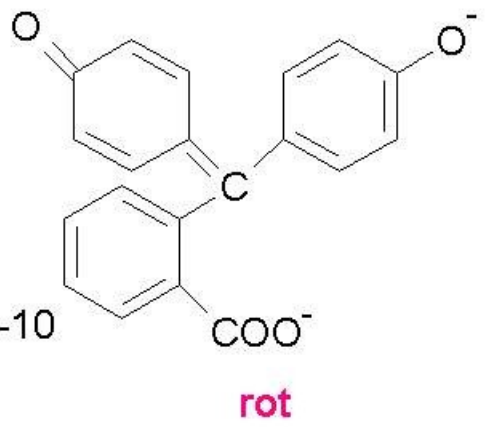
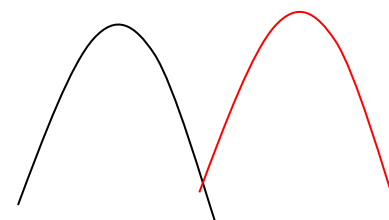


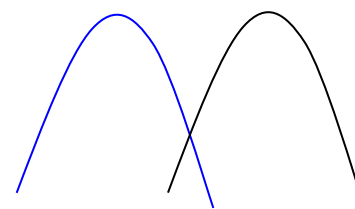
Abb.: Dissoziation von Phenolphthalein (pKs 9,4)

Vliv polarity na absorpční maximum

$\pi \rightarrow \pi^*$ červený posun v polárním prostředí
Zvýšená solvatace excitovaného stavu
snižuje jeho energii



$n \rightarrow \pi^*$ modrý posun v polárním prostředí
Zvýšená solvatace n páru snižuje
energii n orbitalu



Význam spektrofotometrie

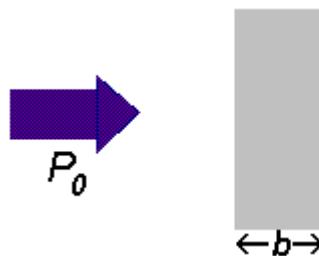
- Stanovení koncentrace látek
- Stanovení změn koncentrace v čase
- Kvantifikace

Φ – světelný tok

Φ a Φ_0 - prošlé a přicházející světlo
též I a I_0

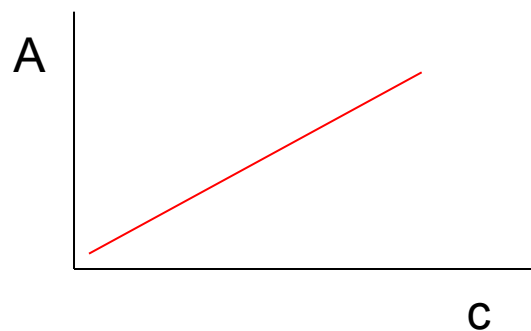
Lamber-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$



Využití pro kvantitativní analýzu:

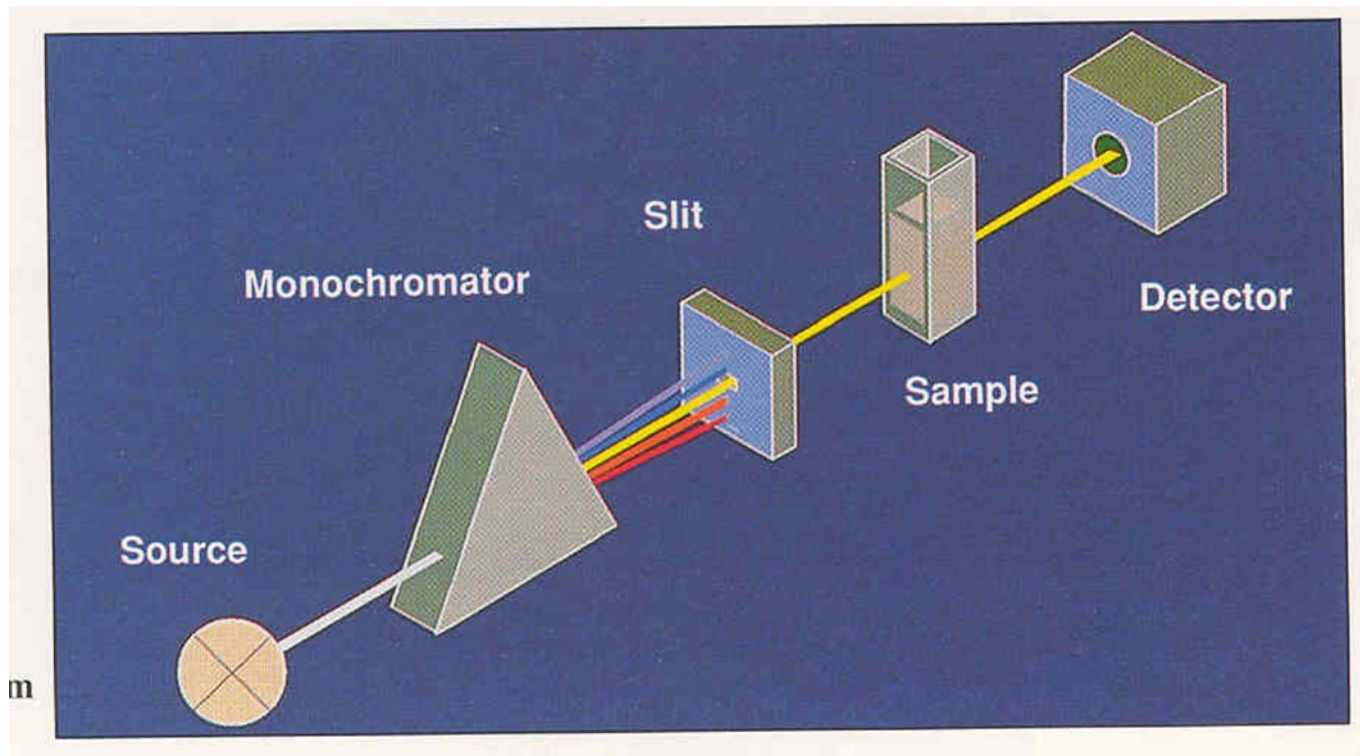
- 1) Při znalosti ε : $c = A/\varepsilon \cdot d$
- 2) Kalibrační přímka



Kvantitativní parametry

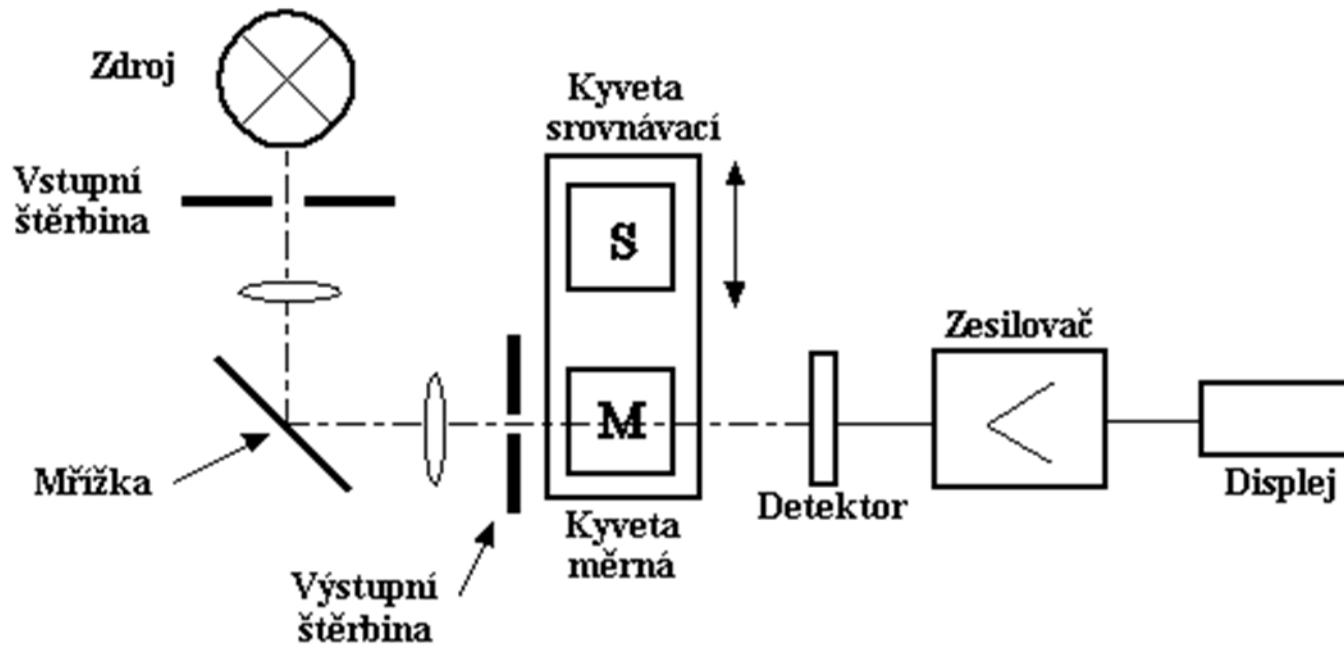
- I_0 a I - paprsek prošlý referenčním vzorkem (blankem) a vzorkem měrným
- $100 \cdot I/I_0 = T$ (%), transmittance
- $A = -\log T = \log I_0/I$
- Pro 50% T , $I_0/I = 2$
- $A = 0,3$ – nejpřesnější
- Spolehlivý rozsah A – $0,2$ – $0,7$

Instrumentace



- Hlavní součásti jednoduchého přístroje

Instrumentace



- Blokové schéma spektrofotometru

Instrumentace

- Obecné použití
 - Víceúčelové
 - Speciální varianty v jednotlivých částech obecného schématu – viz dále
- Speciální užití
 - Jednoúčelové – denzitometry, scanery apod.
 - Detektory – součásti jiných zařízení
 - Variace na obecné schéma

Instrumentace

- Přístroje jednodušší
 - Kolorimetry, fotometry
 - Filtry, detektory - vizuální
- Kvalitnější – spektrofotometry
 - Monochromátory složitější
 - Světlovodná vlákna – citlivost, eliminace rozptylu
 - Parametry kvality – viz dále
 - Speciální vybavení a konstrukce (seriová měření – průtokové kyvety, destičky apod.)

Zdroje

Rozsah a intenzita emitovaného záření
vyzařovací charakteristika
volba zdroje

Rtuťová výbojka – UV spektrum

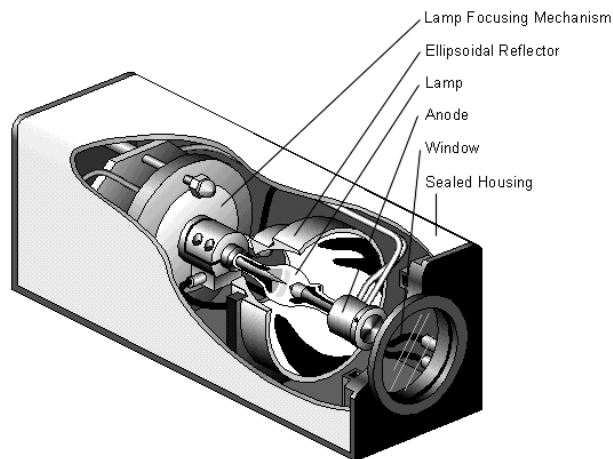
Halogenová žárovka – viditelné spektrum

Laser – monochromatické

LED

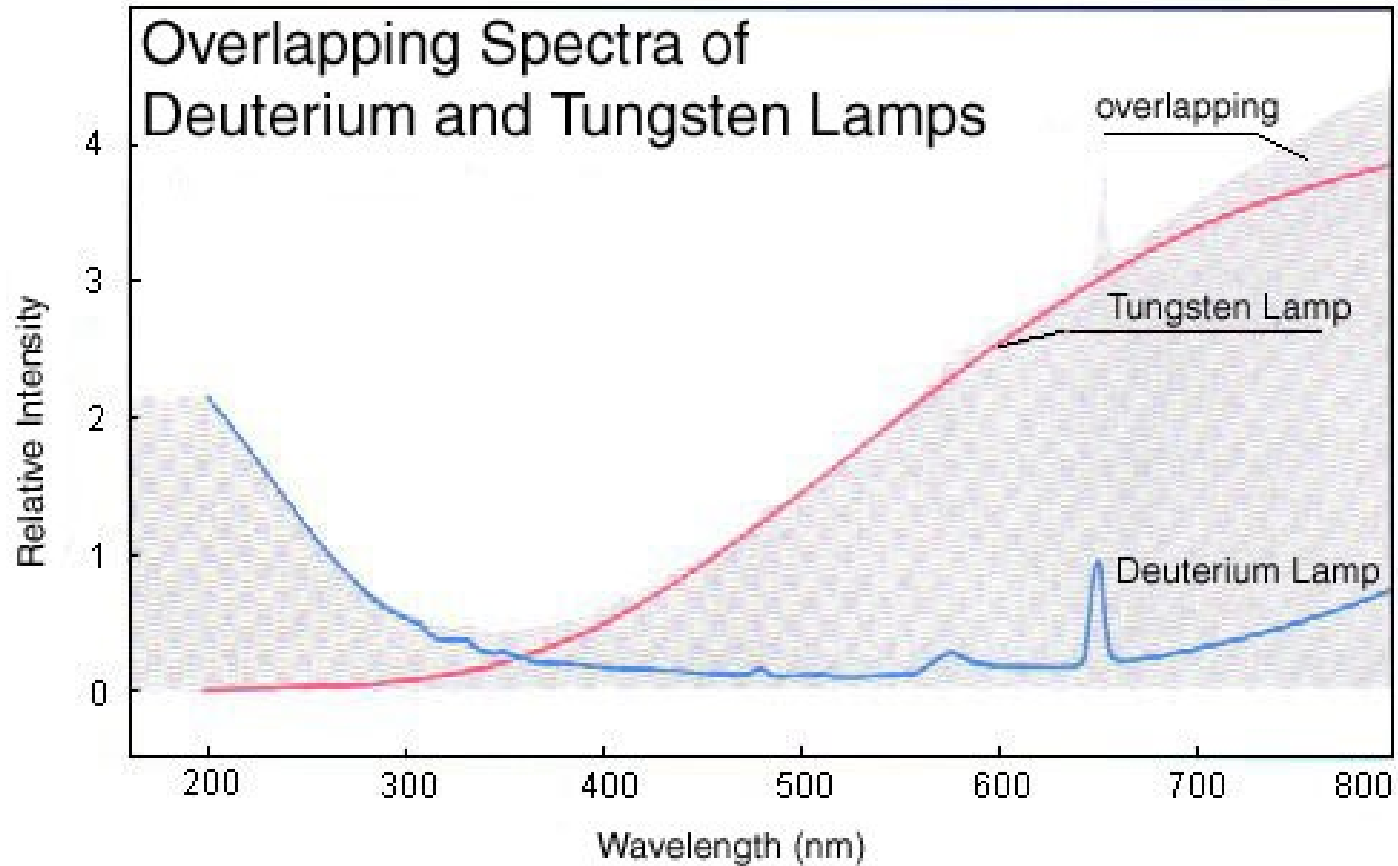


Deuteriová lampa – UV spektrum

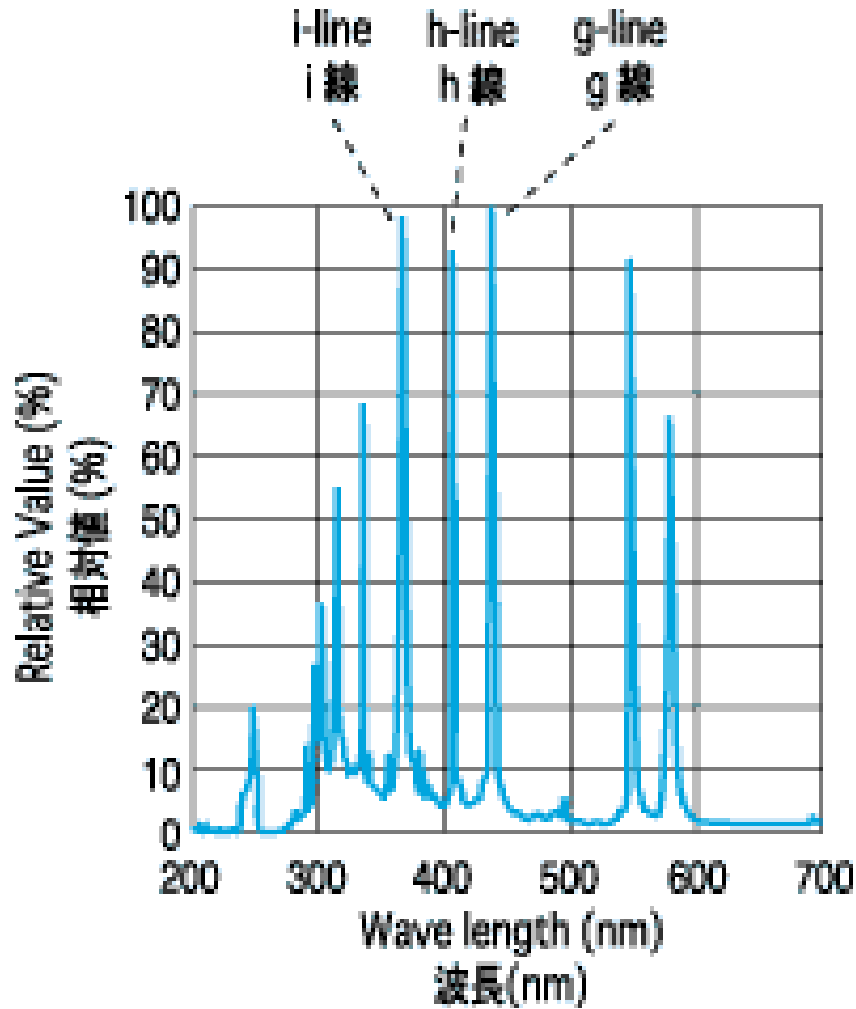


Xenonová výbojka – UV + viditelné spektrum

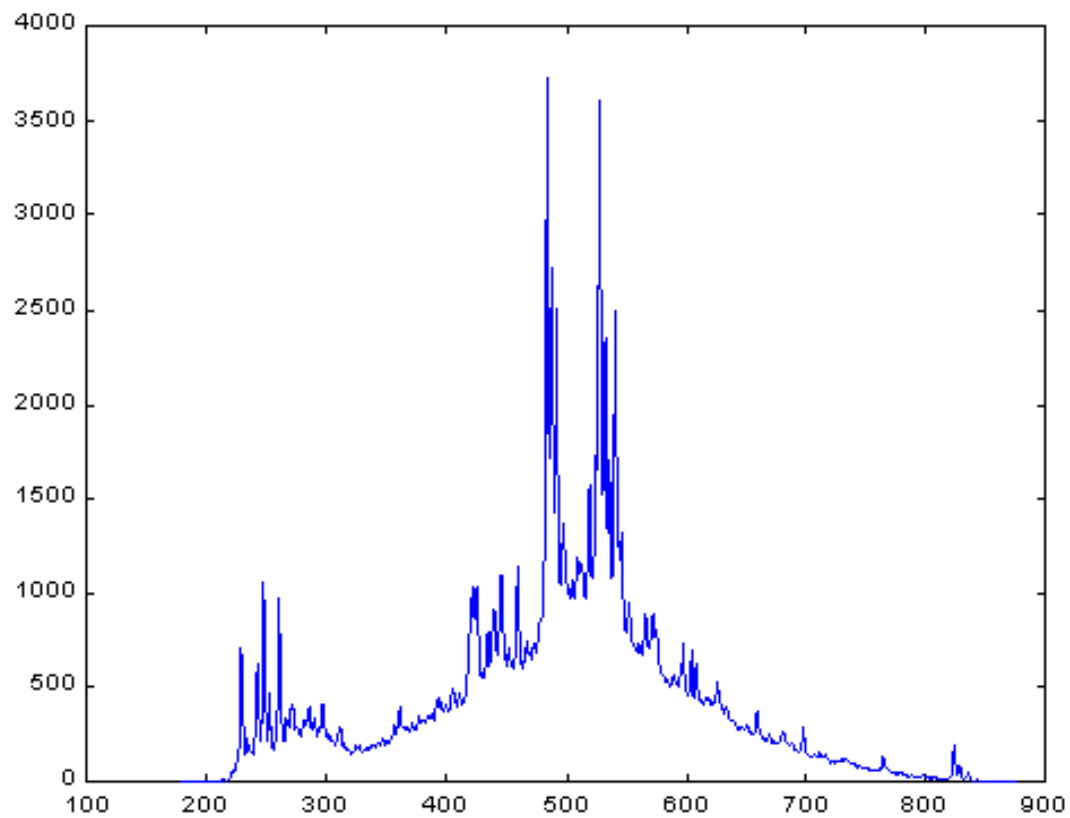
Overlapping Spectra of Deuterium and Tungsten Lamps



Rtuťová výbojka

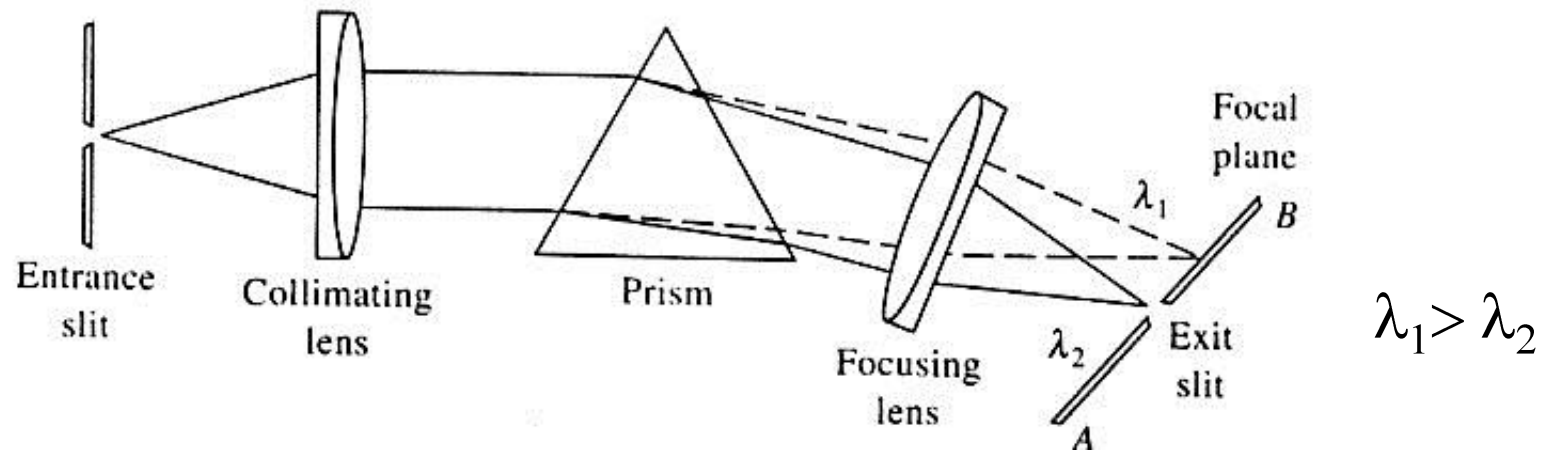


Xenonová výbojka



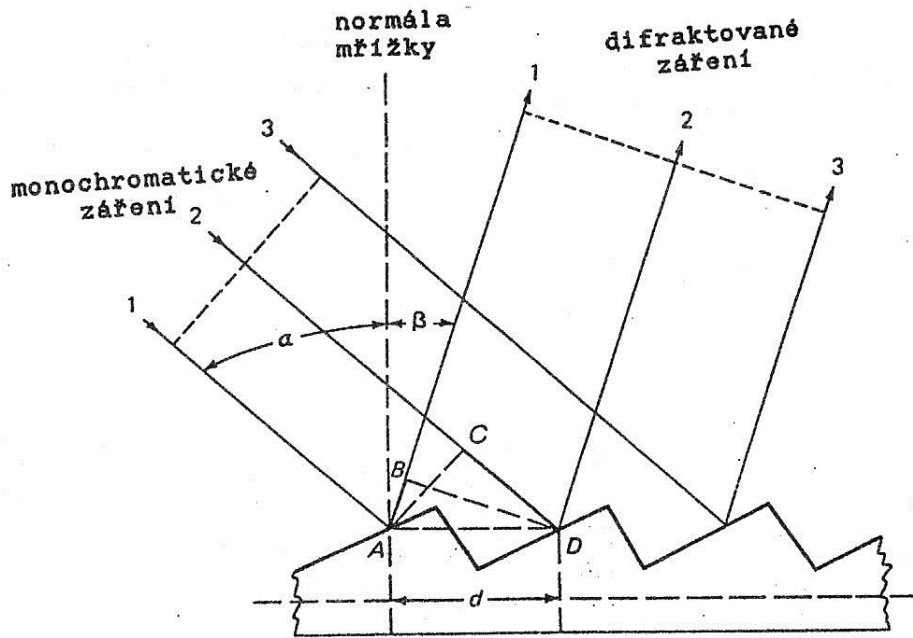
Monochromátory

- Filtry – kvalita (barevné x interferenční)
- Hranol – lom světla



Monochromátory

- Mřížka – disperze



$$n\lambda = CD - AB$$

$$n\lambda = d(\sin\alpha - \sin\beta)$$

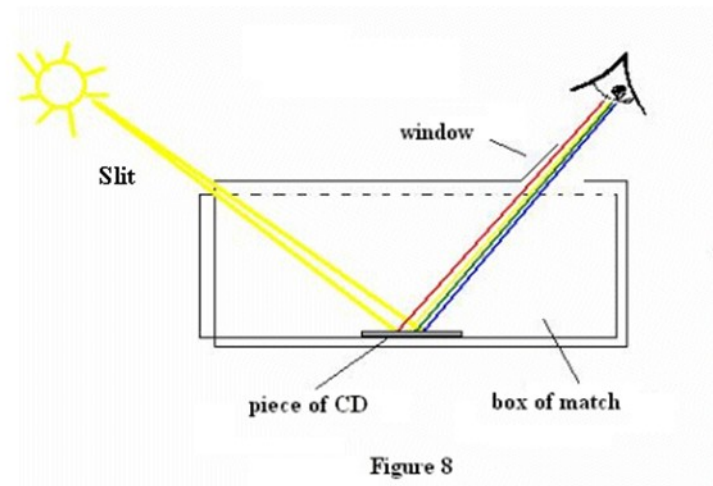
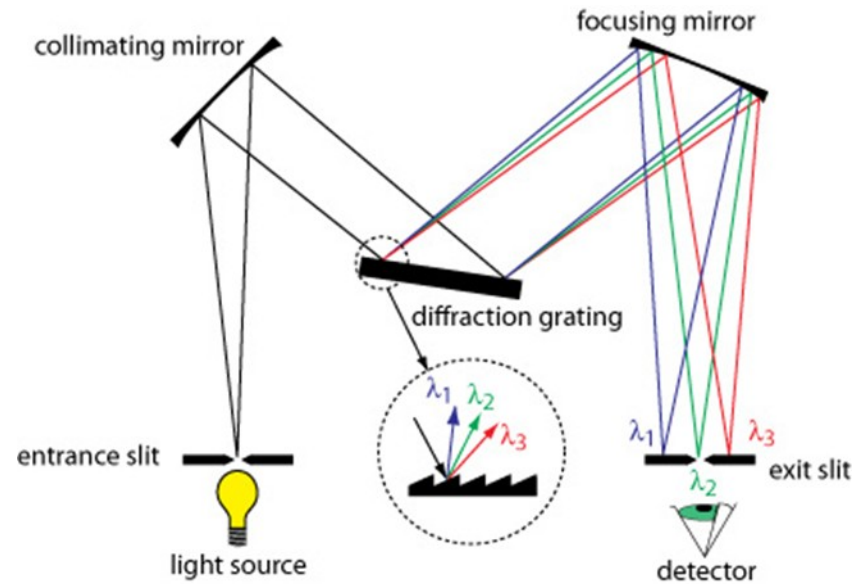
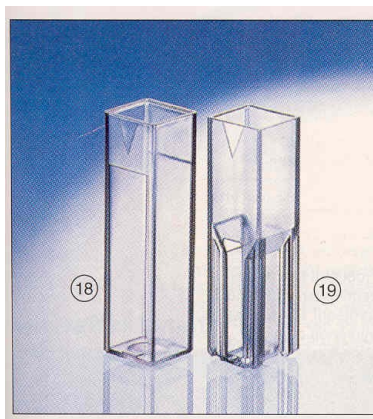
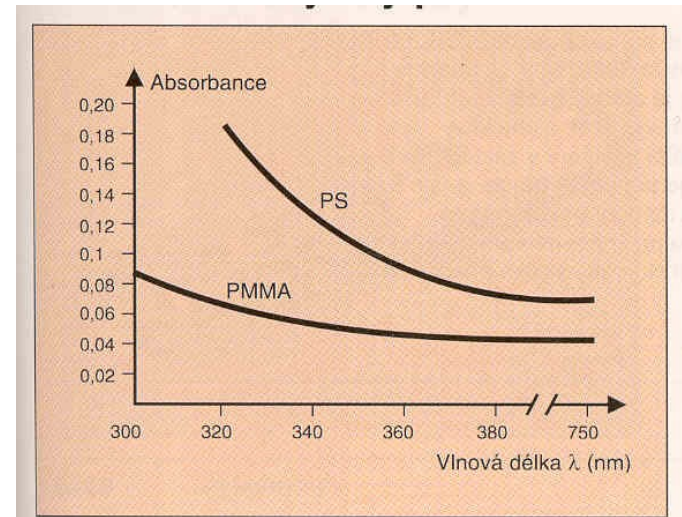
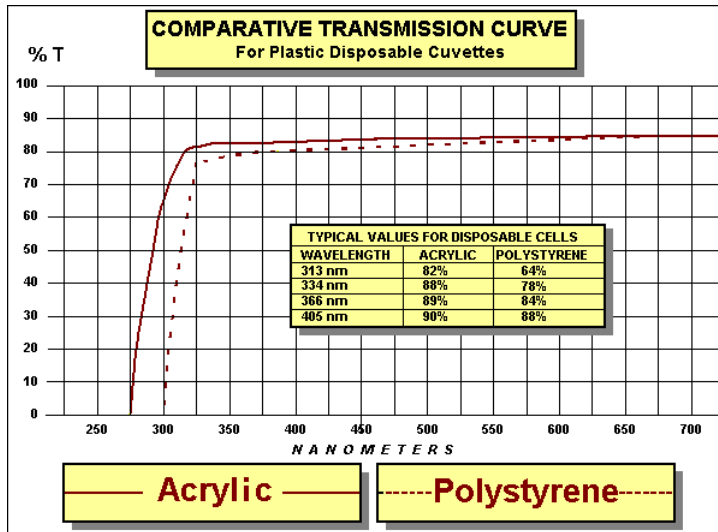


Figure 8

Vzorek

- Obecné – standartní kyvety
 - Variace – Thunbergovy, Dewarovy apod.
- Speciální
 - Průtokové kyvety
 - Destičky – vícekanálové
 - Štěrbiny – mikroobjemy

Spektrofotometrické kyvety



Spektrofotometrické kyvety



- A



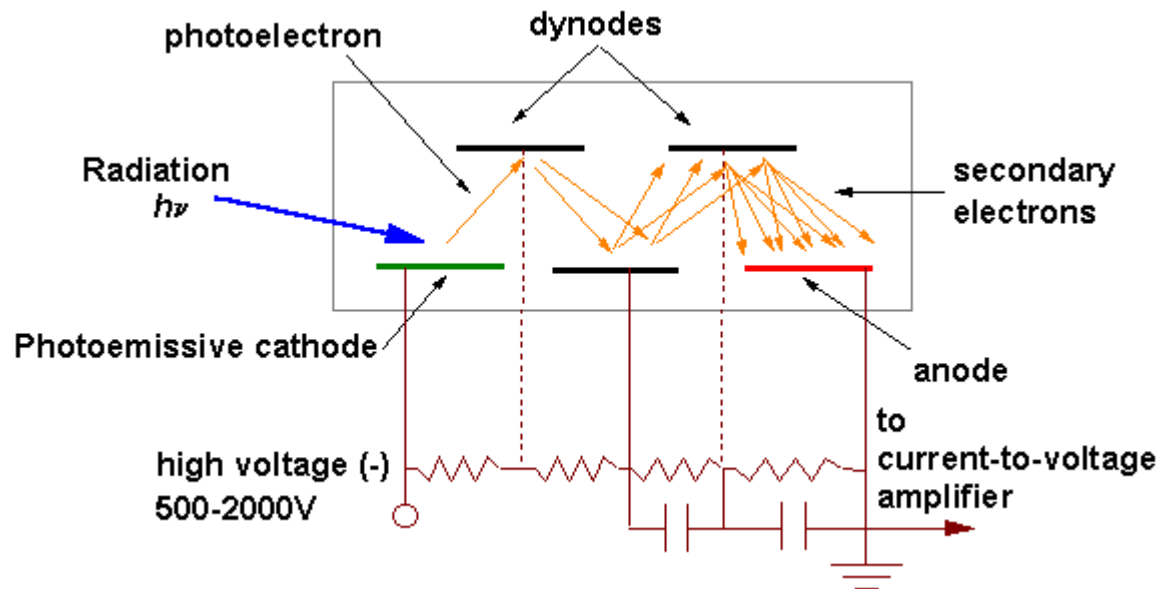
Rozpouštědla

Použitelnost rozpouštědel v UV oblasti

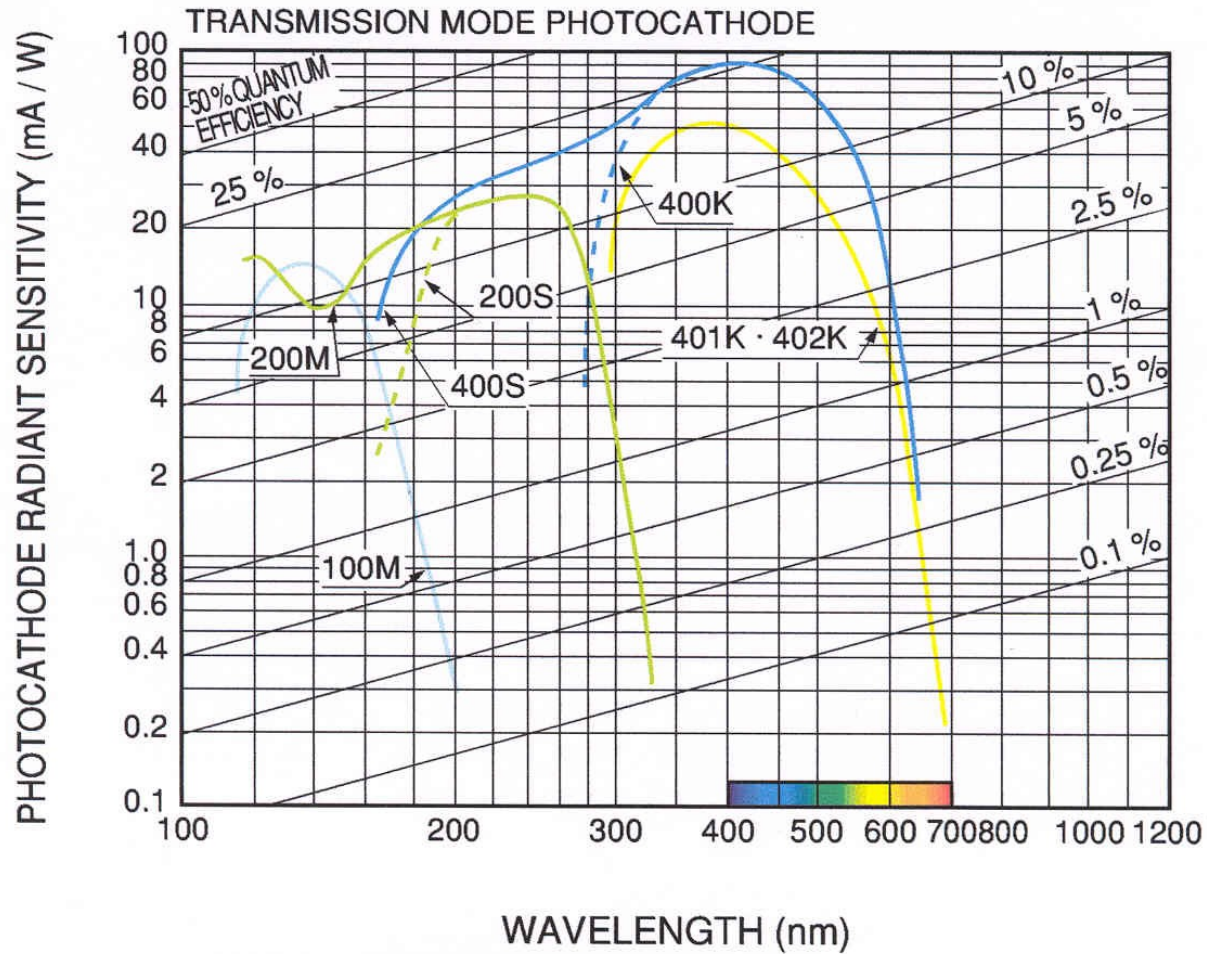
Voda	> 185 nm
EtOH	>195 nm
Diethyléter	>205 nm
Dioxan	>220 nm
CHCl ₃	>245 nm
CCl ₄	>262 nm
Benzen	>280 nm
Aceton	>330 nm

Detektory

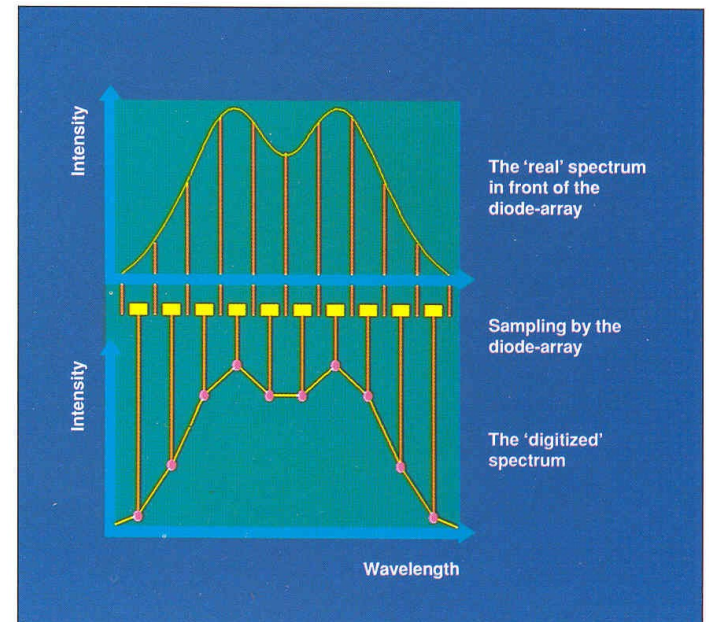
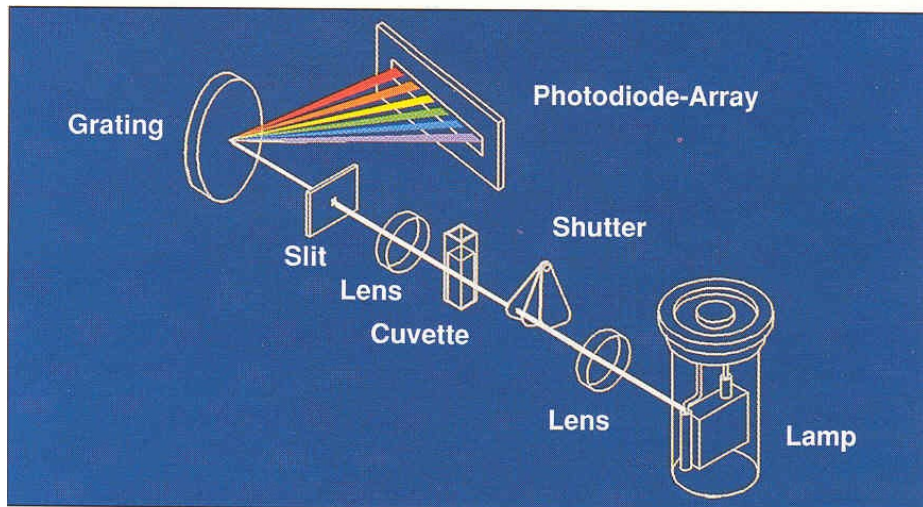
Fotonásobič



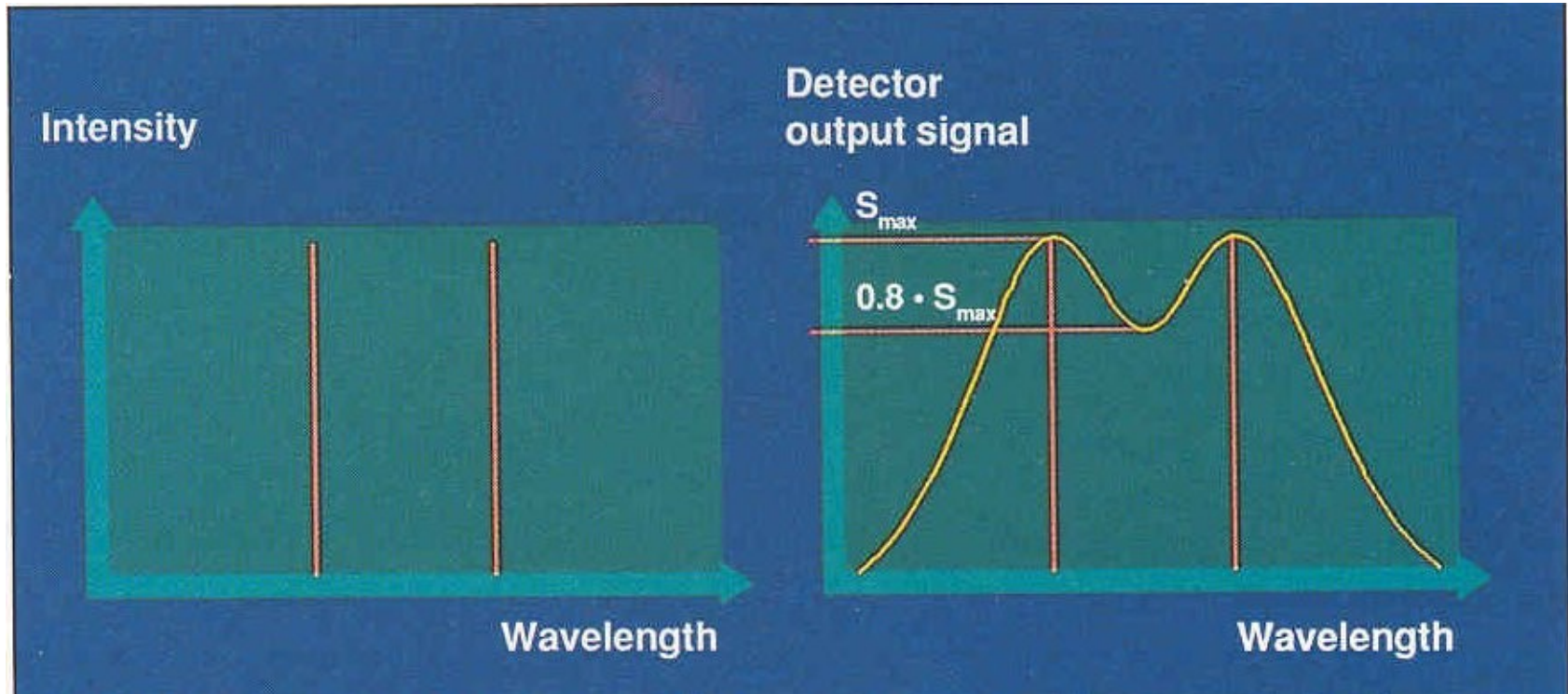
SEMITRANSSPARENT PHOTOCATHODE SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTICS



Fotometr s diodovým polem



Charakteristiky přístroje



Spektrální rozlišení – schopnost rozlišit dvě těsně přilehlé vlnové délky

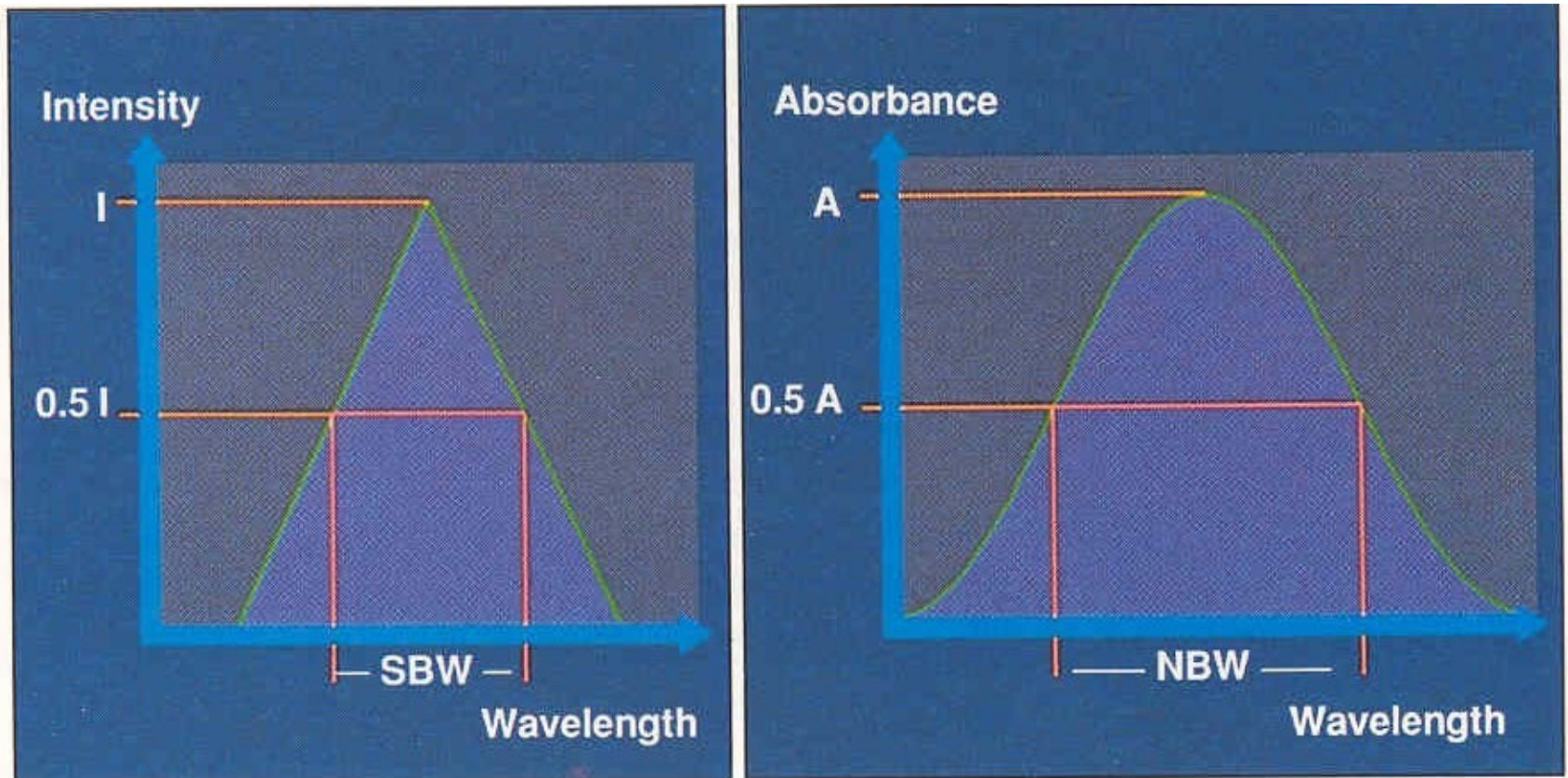
Rozlišení \times rozlišovací schopnost – nepřímé

$S = 0,8 \times S_{max}$ – pro určitou $\Delta\lambda =$ rozlišení

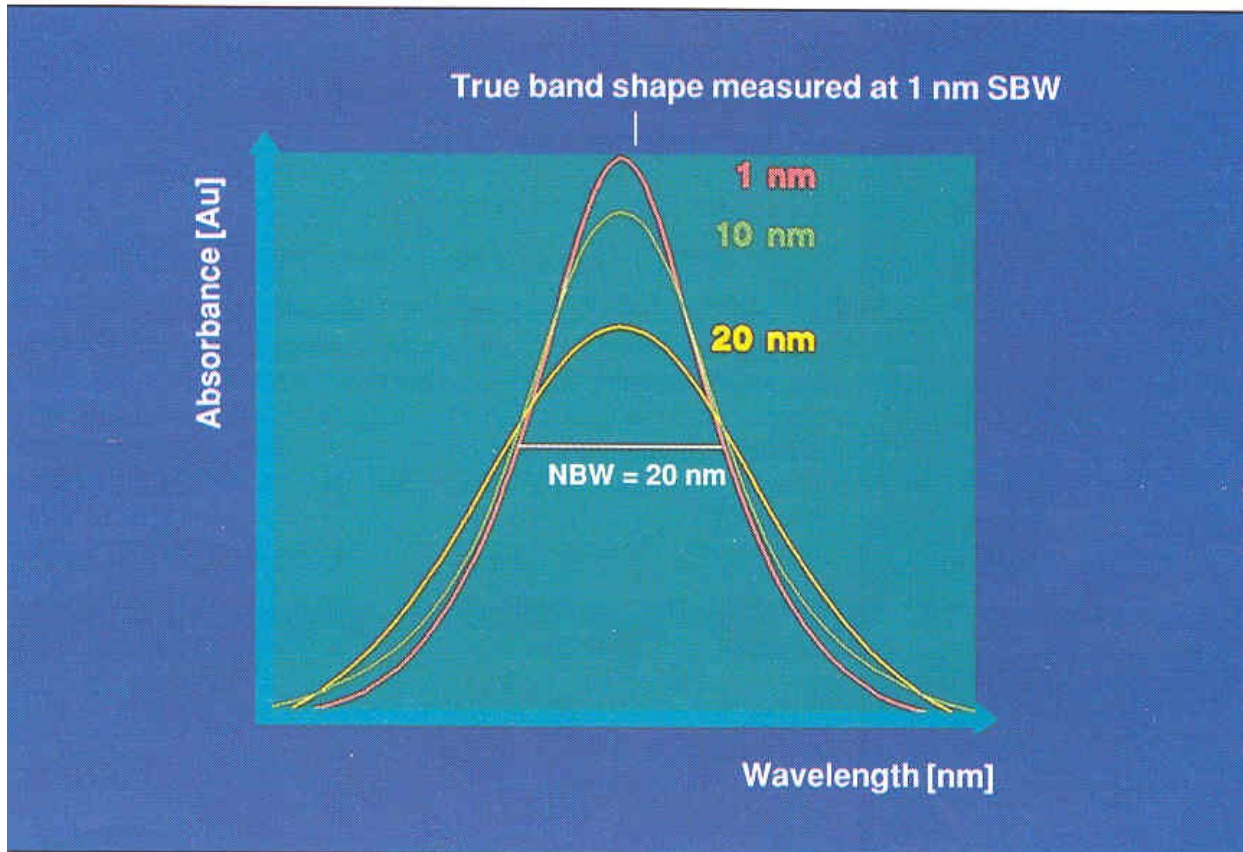
Charakteristiky přístroje

Spektrální šířka přístroje – šířka pásu světla opouštějícího monochromátor měřená v polovině výšky píku (SBW), závisí na šířce štěrbin a disperzi mřížky, Obvykle $< 2 \text{ nm}$

Přirozená šířka pásu vzorku - šířka absorpčního pásu vzorku měřená v polovině výšky píku (NBW) – ovlivněno SBW – monochromaticknost

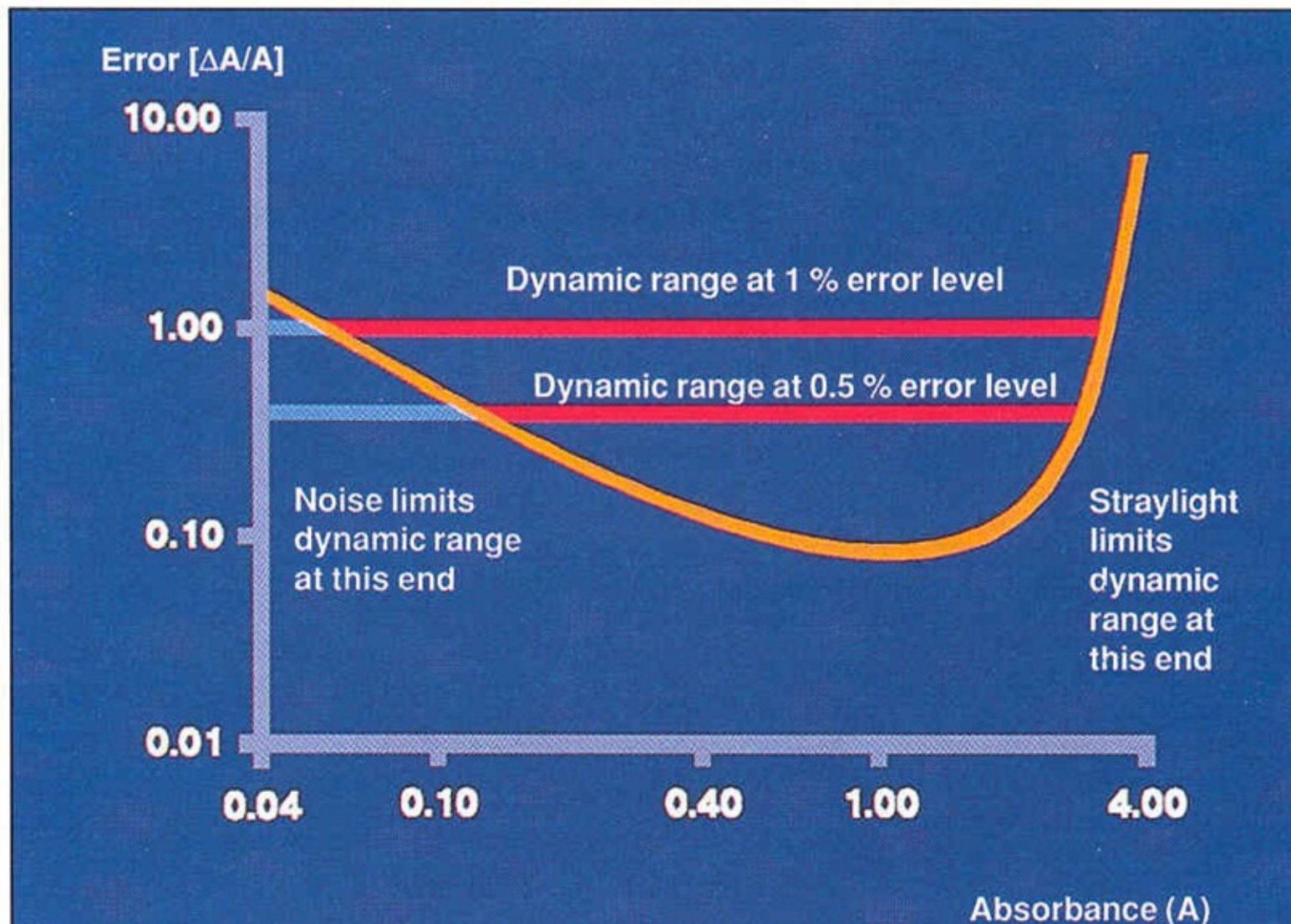


Charakteristiky přístroje



Přesnost měření závisí na poměru $SBW/NBW = 0.1$ a menší (přesnost 99.5%)
SBW 2 nm postačuje pro NBW 20 nm

Chyba měření



- Chyba $\Delta A/A$ – limit šumu a rozptylu

Praktické aplikace

- Stanovení koncentrací látek
 - Obecně – bílkoviny, NK
 - Speciálně – Hb, cytochromy
- Stanovení forem látek
 - Ox-red – titrace, E_m , disociační stavy - pK_a
- Určení změny koncentrace
 - Rychlost reakcí – enzymové (NAD^+ , umělé)
- Detektor pro jiné metody – spřažené

Stanovení bílkovin

Absorpce v UV oblasti (Tyr, Try) – 280 nm

Citlivost 50 μg

Velmi rychlá metoda, nedestruktivní

Interference: ruší NK, zákal

$$C \text{ (mg/ml)} = f(A_{280})$$

$$C \text{ (mg/ml)} = A_{280}/\varepsilon$$

$$C \text{ (mg/ml)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 A_{260}$$

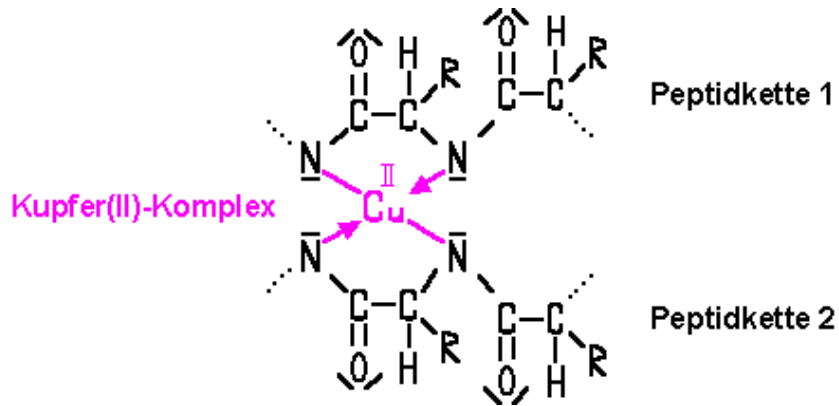
ε (ml/mg)

BSA = 0,63

Ig = 1,38

Ovalbumin = 0,70

Stanovení bílkovin



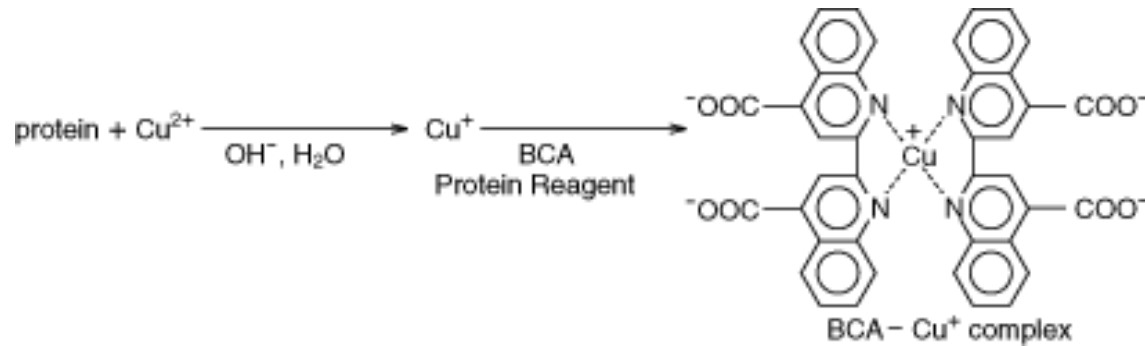
Biuretová metoda

Citlivost 1-20 mg
Interference: některé aminokyseliny,
zwiterionty

Lowryho metoda (595 nm)

Citlivost 10 μg
Zdlouhavost (2kroky)
Interference: ruší sulfát amonný, glycin,
SH reagenty, EDTA > 0.1 mM

Stanovení bílkovin



562 nm

Bicinchoninát

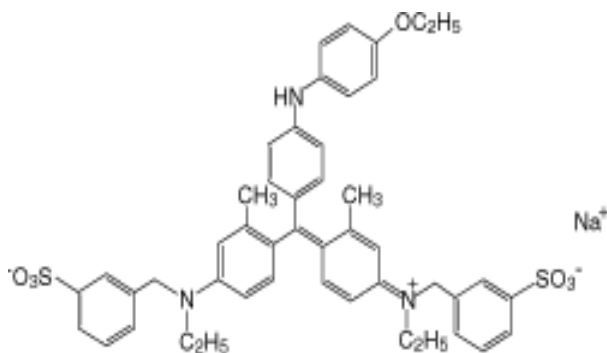
Redukce Cu²⁺, pak komplex

Citlivost vysoká 1 ug

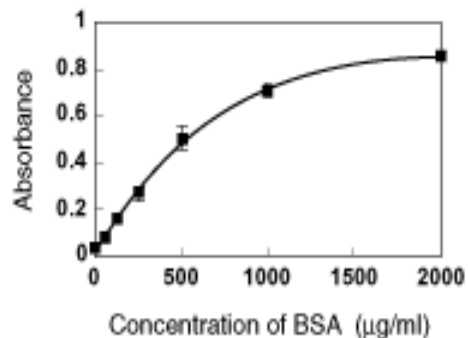
Pracná metoda – 2 kroky

Interference: ruší EDTA, SH reagenty

Stanovení bílkovin



Coomassie Brilliant Blue G



BSA standard solutionで作成した検量線の例

Posun maxima
Ze 465 na 595 nm

Metoda podle Brafordové

Citlivost vysoká 1 ug

Rychlá metoda (náročná na pečlivost)

Interference: ruší Triton X-100, SDS,

Silně bazické pufrы

Enzymové reakce

- Přírozené chromofory
 - Především oxidoredukce - NAD^+ , cytochromy
- Umělé chromofory
 - Oxidoreduktasy – barviva (PMS, tetrazolia)
 - Hydrolasy – estery, amidy
- Derivatizace produktů
 - Ketokyseliny + dinitrofenylhydrazin

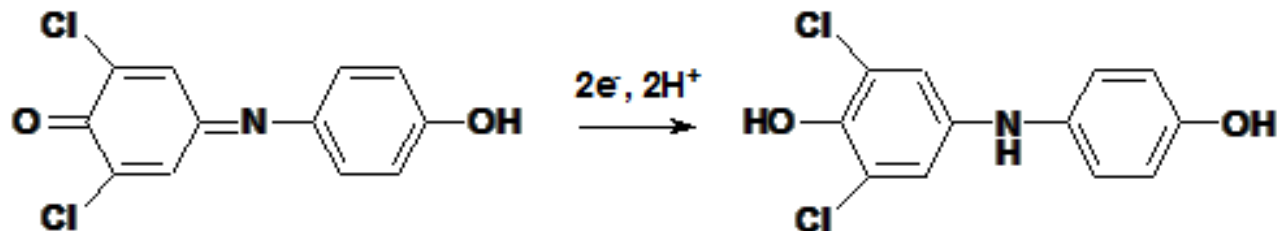
Oxidoreduktasy

- PMS – DCIP

PMS:

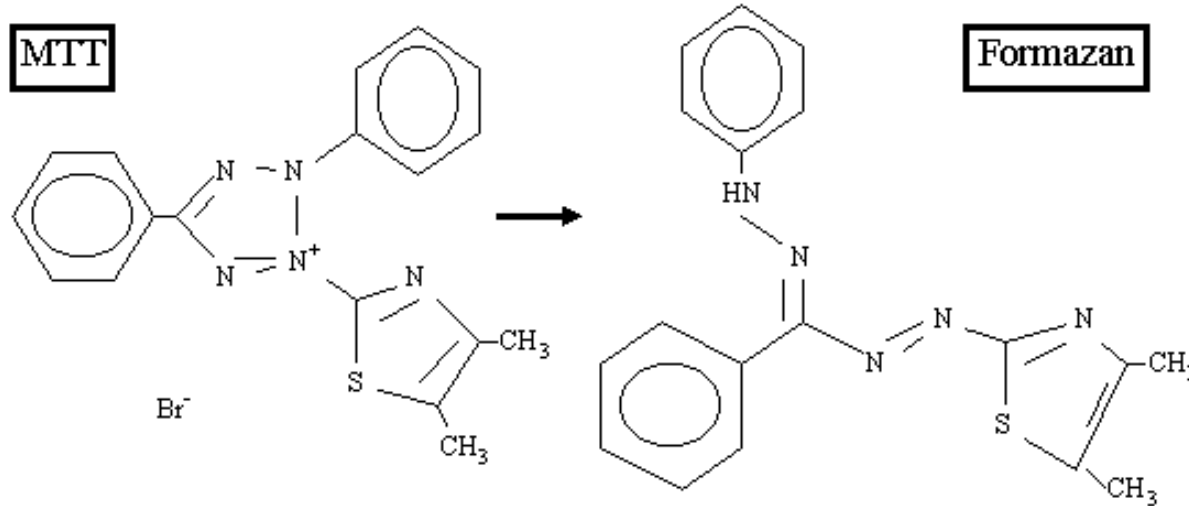


DCIP:



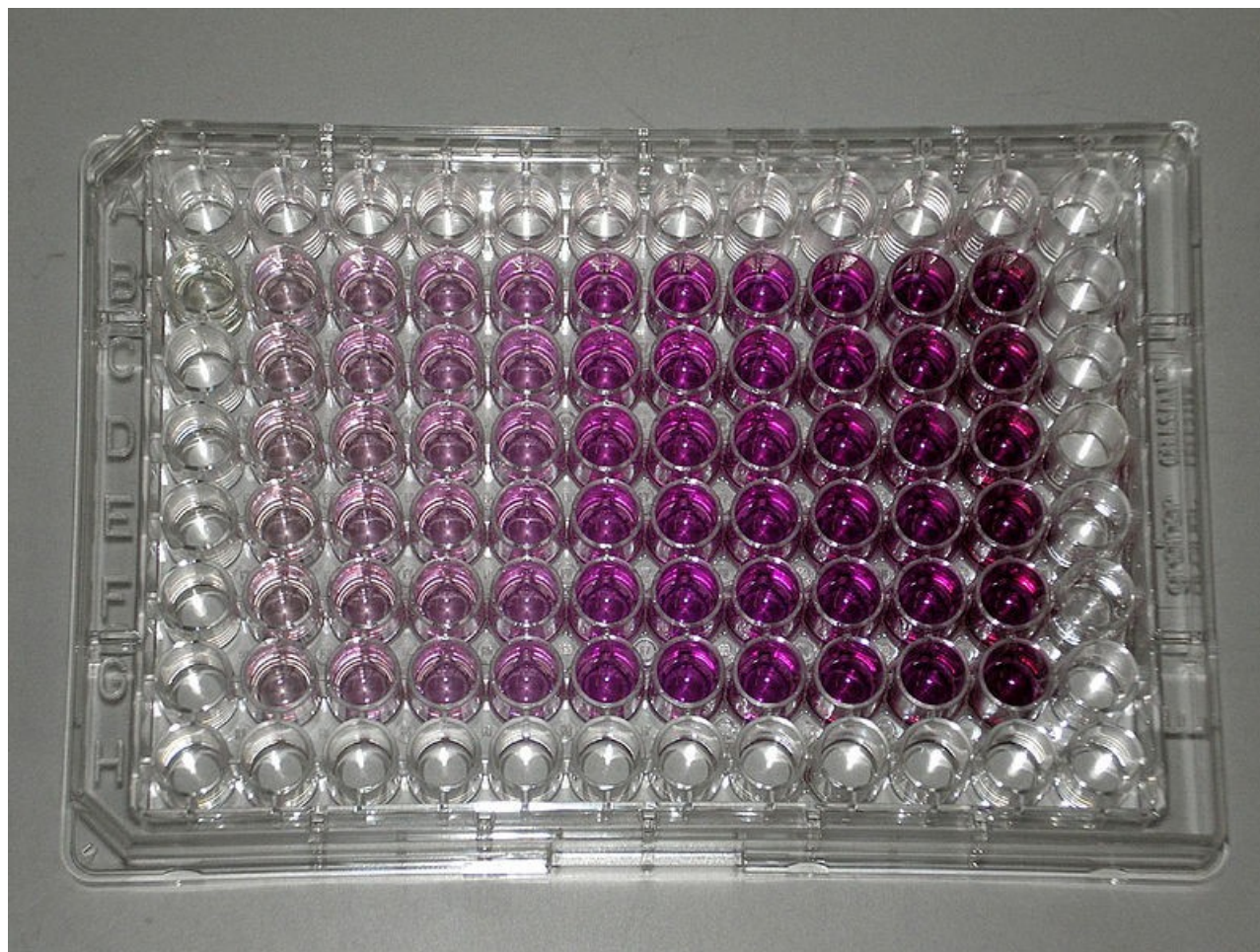
Oxidoreduktasy

- MTT test
 - Viabilita a metabolická aktivita buněk
 - Produkt redukce cytosolickým NAD(P)H



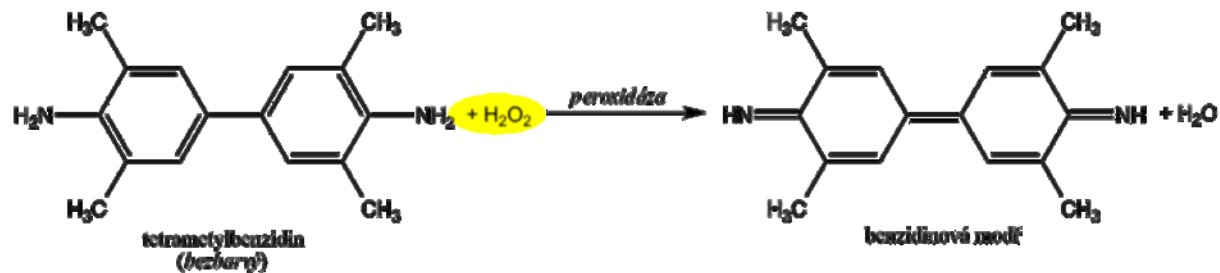
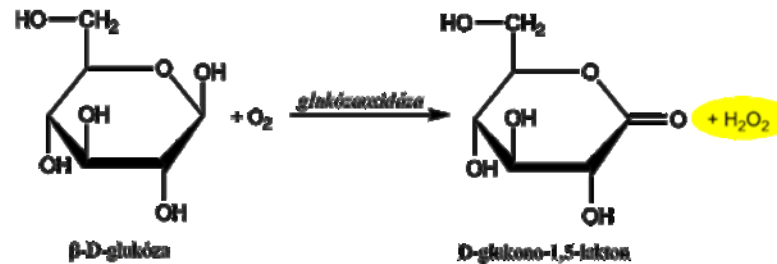
MTT test

- Mikrotitrační destička



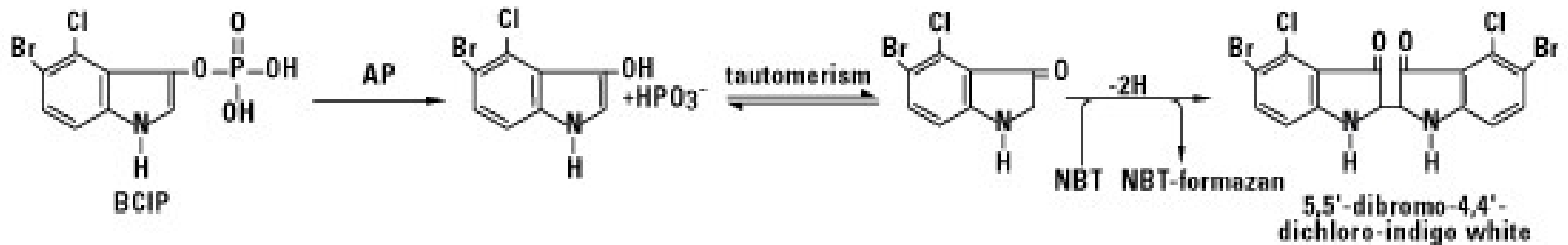
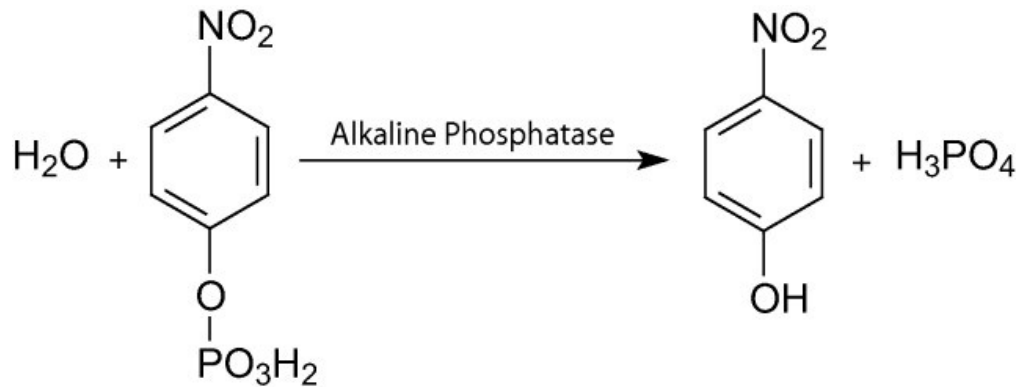
Oxidoreduktasy

- Indikační reakce



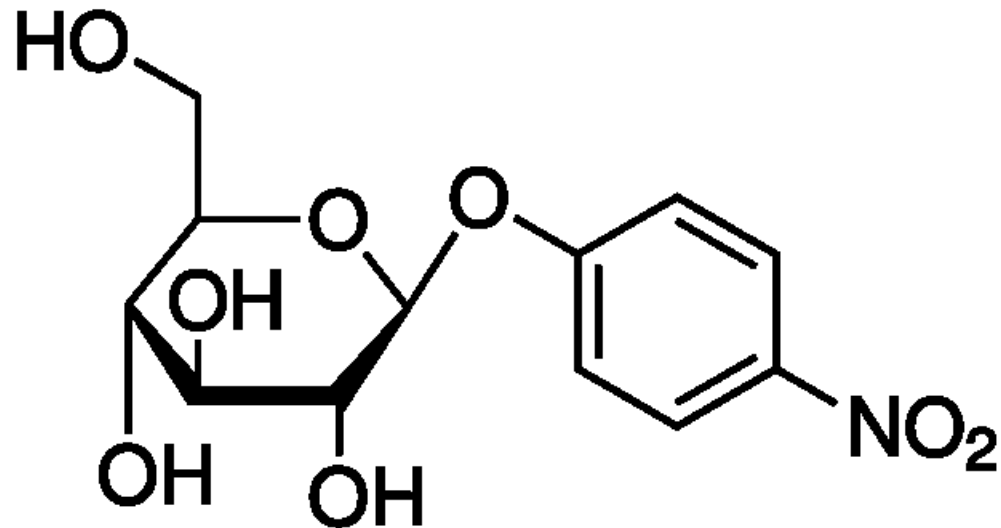
Chromogenní substráty

- Fosfatasy

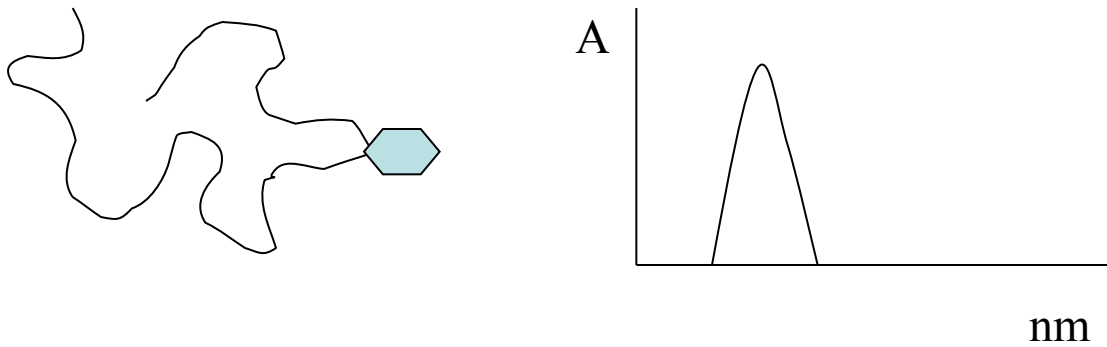


Chromogenní substráty

- Glykosidasy



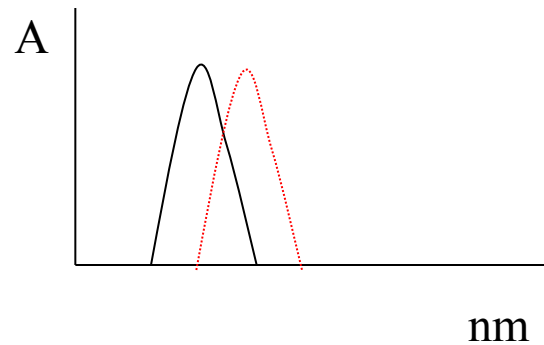
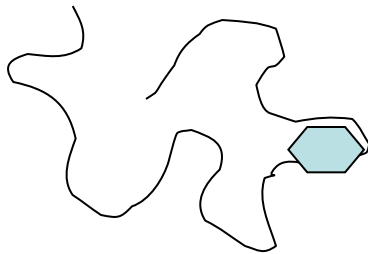
Použití spektroskopie pro studium konformace bílkovin



Fluorescence Try, Tyr – 280 nm

Závislost spektra na polaritě prostředí – zde polární

Použití spektroskopie pro studium konformace bílkovin



Fluorescence Try, Tyr – 280 nm

Závislost spektra na polaritě prostředí (červený posun v nepolárním prostředí)

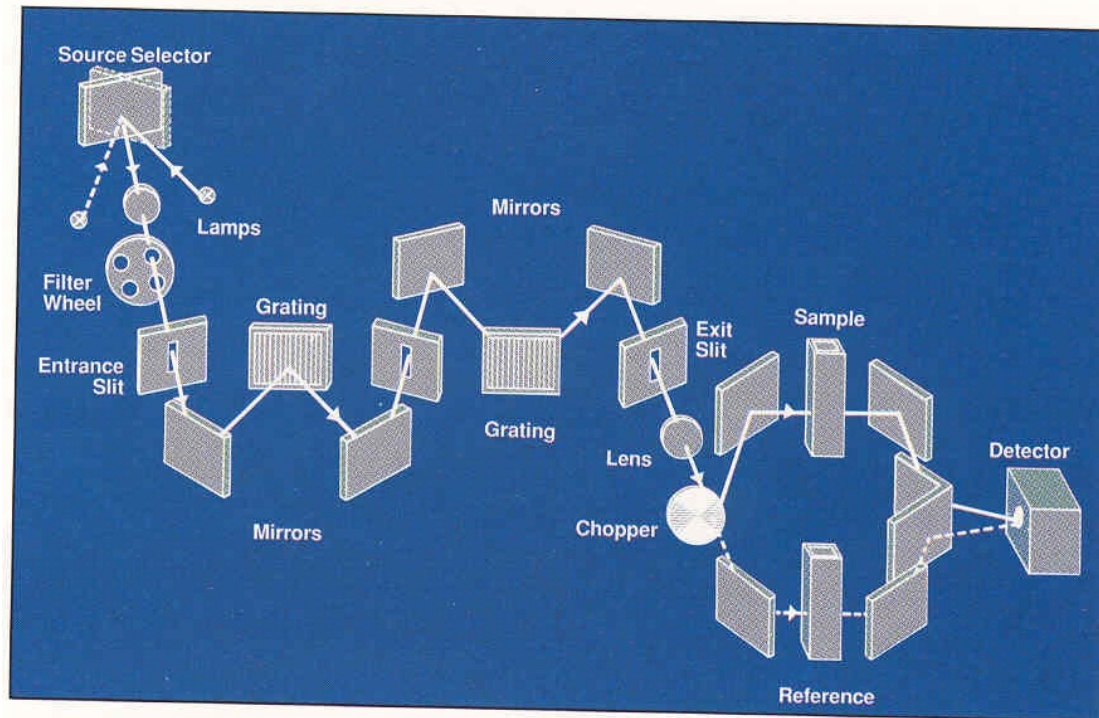
Perturbační spektra

Problém rozlišení malých změn na silném pozadí

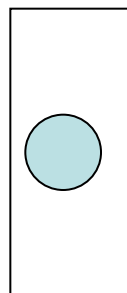
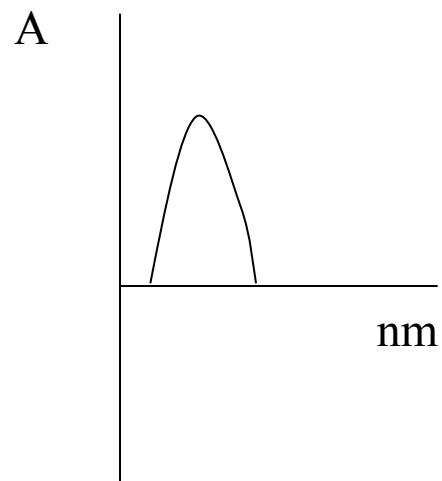
Dvoupaprsková fotometrie (double-beam)

- Problém koherentního paprsku
- Štěpení časové – prostorové
- Současné měření referentního a měrného paprsku
 - Možnost porovnání – difference
- Náhrada počítačovým zpracováním
- Dual-wavelength
 - dva monochromátory
 - jeden vzorek

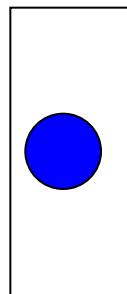
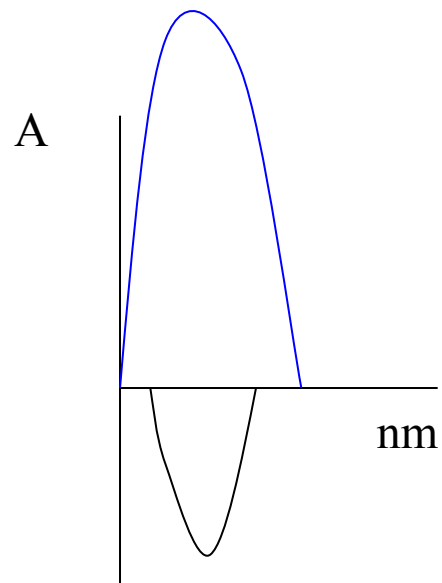
Dvoupaprskový fotometr (double-beam)



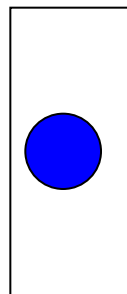
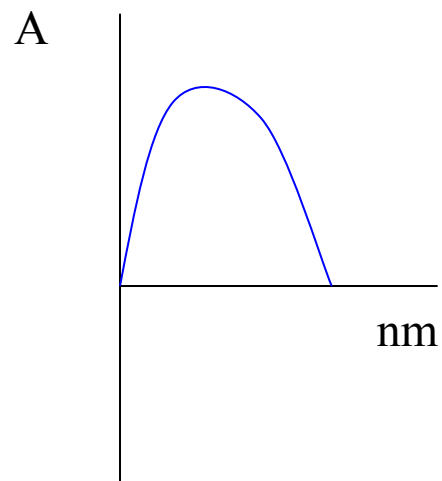
Diferenční spektroskopie



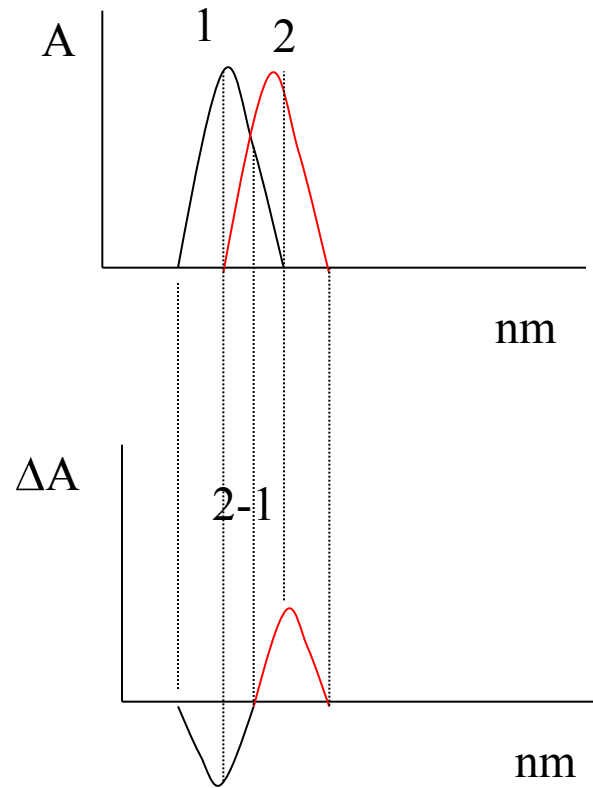
Diferenční spektroskopie



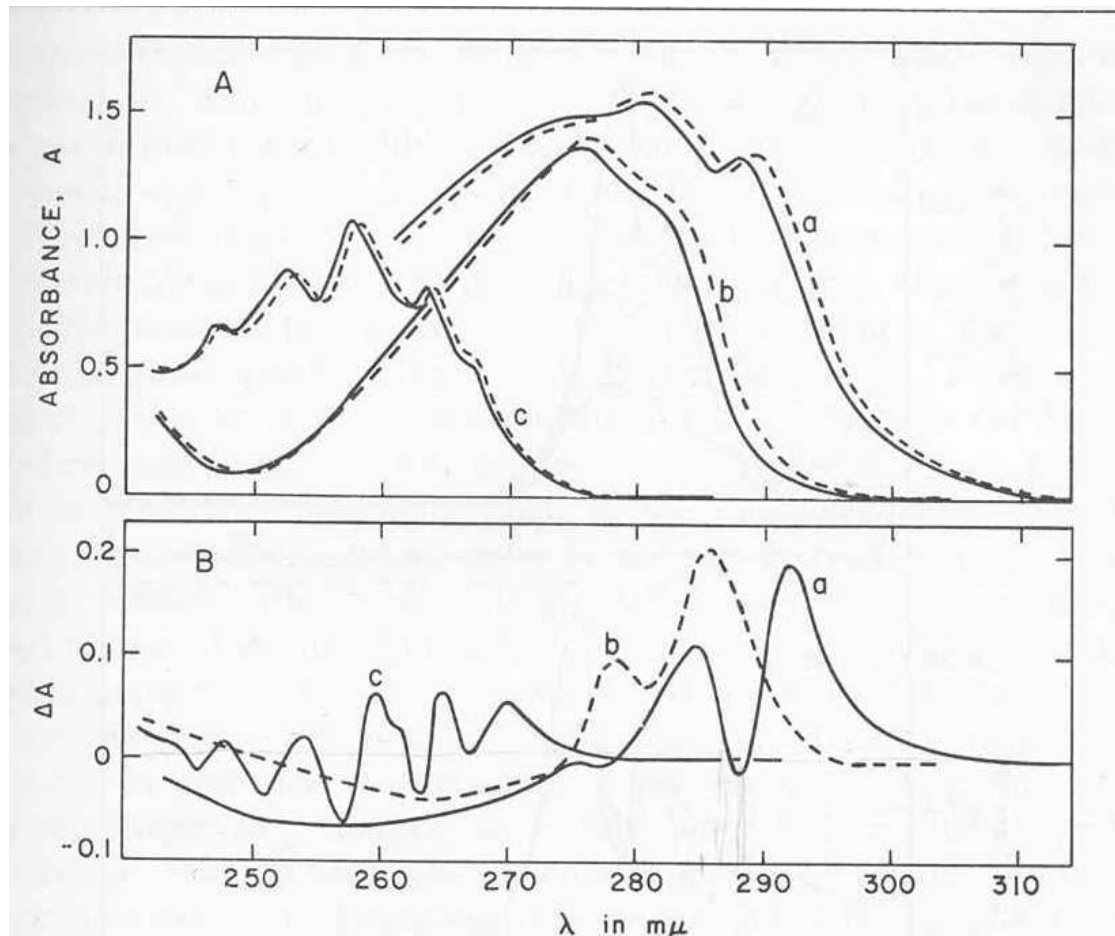
Diferenční spektroskopie



Diferenční spektrum



Použití spektroskopie pro studium konformace bílkovin



a – Try — voda
b – Tyr - - - DMSO
c - Phe

A – Absorpční spektrum

B – diferenční spektrum

Derivace spekter

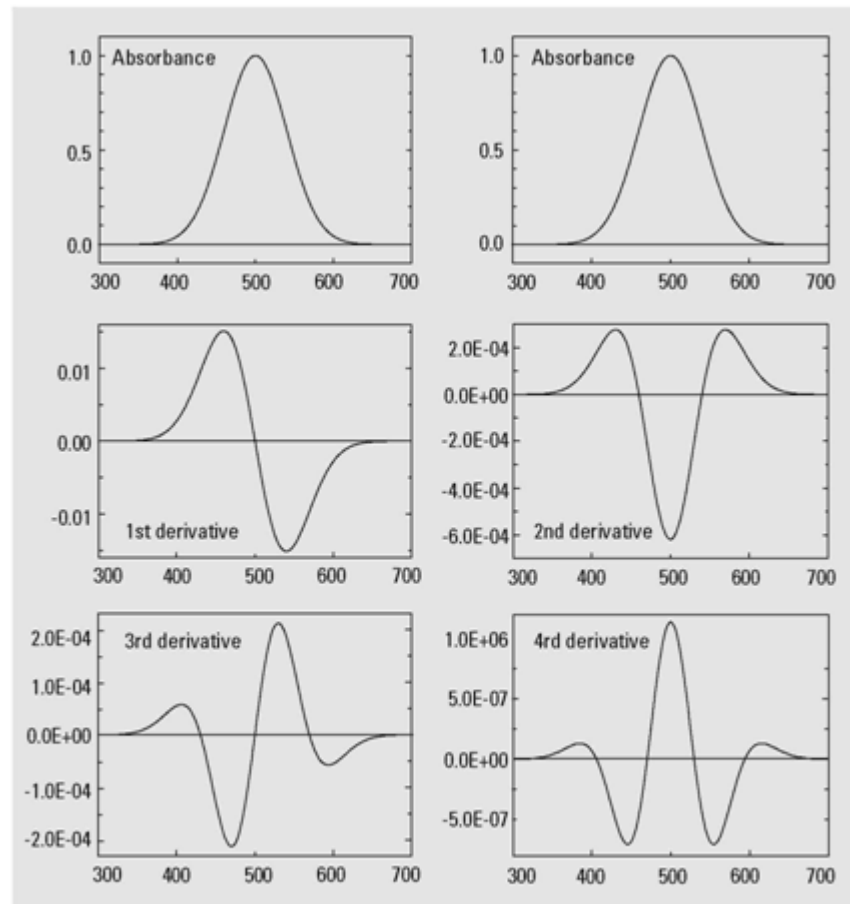


Figure 1
Absorbance and derivative spectra of a Gaussian band

Multikomponentní analýza

- Překryv pásů – aditivní charakter A
- Obálka jemných linií $A = A(\lambda_1) - A(\lambda_2)$

