

C6200-Biochemické metody

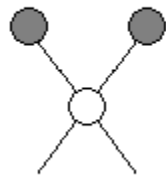
10A1_IR spektroskopie

Petr Zbořil

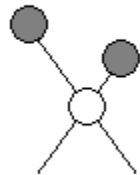
IR spektroskopie

Excitace vibračních a rotačních přechodů

Stretching vibrations

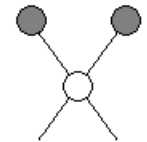


Symmetric

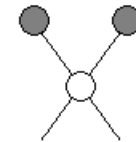


Asymmetric

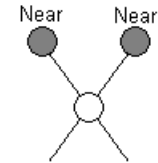
Bending vibrations



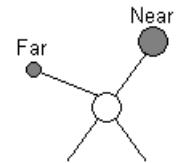
In-plane rocking



In-plane scissoring



Out-of-plane wagging



Out-of-plane twisting

Valenční vibrace

ν

Deformační vibrace

δ

IR spektroskopie

N atomů = $3N$ stupňů volnosti

Vibrační modus: molekulární pohyb, ve kterém atomy vibrují ve fázi se stejnou frekvencí

Lineární molekuly: $3N - 5$ modů (odečet rotace)

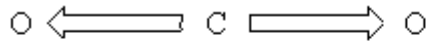
Nelineární molekuly $3N - 6$ modů

IR spektroskopie

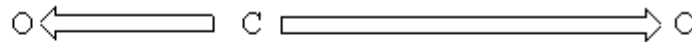
Podmínka viditelnosti absorpce v IR spektru – vibrace musí být provázena změnou dipólového momentu

(např. asymetrické vibrace)

(Elmg. záření je oscilující dipolový moment)



no change in dipole



change in dipole

Podmínky viditelnosti IR

Absorpce záření jen u molekul s dipolmomentem, který se mění absorbcí kvant

Vektor el. pole vibrující molekuly se periodicky mění – absorpce záření s nímž je v resonanci:

- $\nu = 1/2\pi \cdot \sqrt{k/\mu}$ Hookův zákon

silová konstanta / redukovaná hmotnost

$k = f(\text{typu vazby})$ C-C ... 0,5 kNm⁻¹, C=C ... 0,95, C≡C ... 1,5

$\mu = m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$

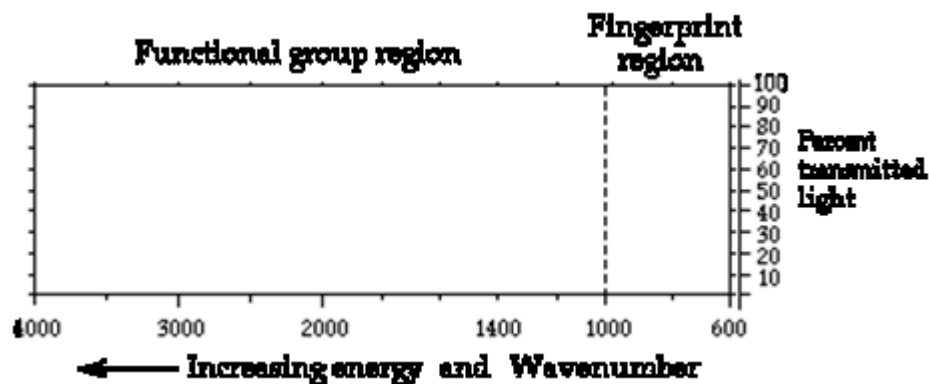
- $E_v = k/2 (r-r_0)^2 = (v + 1/2) \cdot h \nu_0$ (aplik. Sch. rovnice)
- $E_{v+1} = k/2 (r_1-r_0)^2 = (v + 1/2) \cdot h \nu_0$
- $\Delta E = h \nu = E_{v+1} - E_v = h \nu_0$

Neaktivní

- Neaktivní molekuly – jednoatomové
- symetrické nepolární (H₂, N₂, O₂ ...)
- mající symetrické valenční vibrace (CO₂)

Podmínky viditelnosti IR

- Oblasti spektra
 - fingerprint – 900 – 1300 cm^{-1}
 - charakteristické pásy vazeb – 1300 – 3700



- Vlivy
 - skupenství – $\nu_g > \nu_l > \nu_s$ (s – vhodné na určení struktury, ne změny)
 - vodíkové vazby – rostou dipolární interakce
 - konjugace – menší ν
 - isotopová záměna $\nu = f(1/\mu)$ – D za H apod.

IR spektroskopie

$$E = h\nu$$

$$\text{Vlnočet} = \text{cm}^{-1}$$

Blízká	0.78 - 2.5 μm	12800 – 4000 cm^{-1}
Střední	2.5 – 50 μm	4000 – 200 cm^{-1}
Vzdálená	50 -1000 μm	200 – 10 cm^{-1}

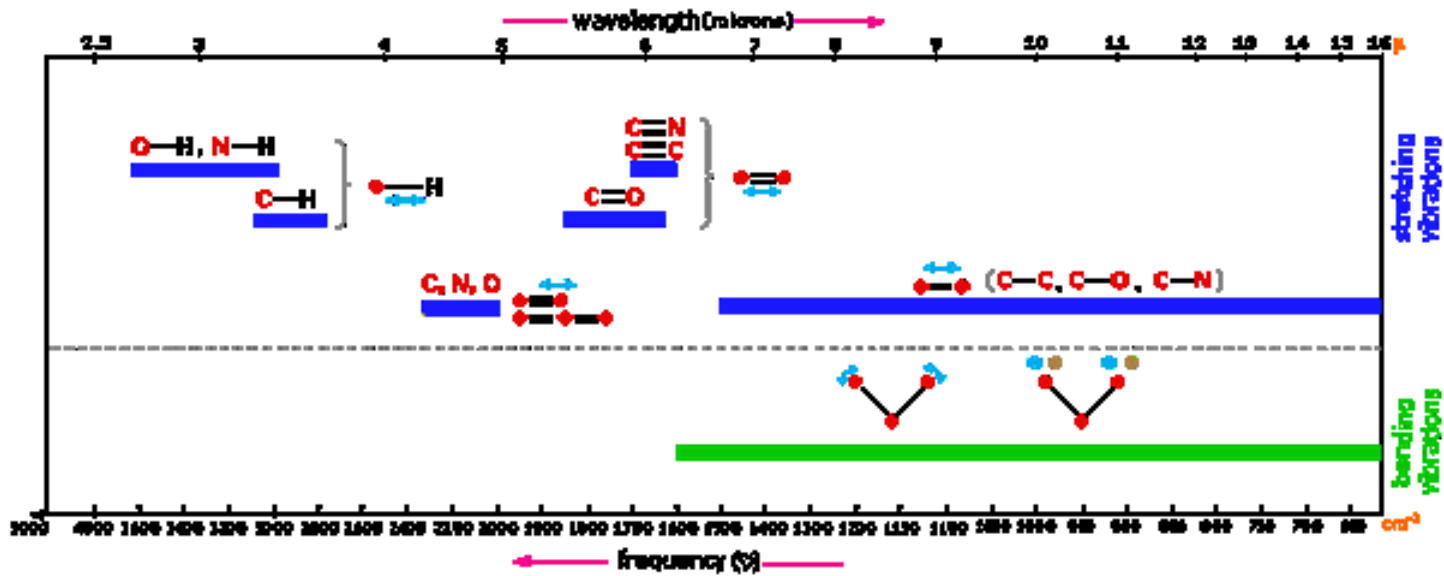
X – H	3600 – 2700
X=Y	2700 – 1900
X=O	1900 – 1500
X-Y	1500 - 500



$$\nu_{\text{bar}} = 1/2\pi (k_{\text{AB}}/\mu_{\text{AB}})^{1/2} \text{ kde } \mu_{\text{AB}} = M_{\text{A}}M_{\text{B}}/(M_{\text{A}} + M_{\text{B}})$$

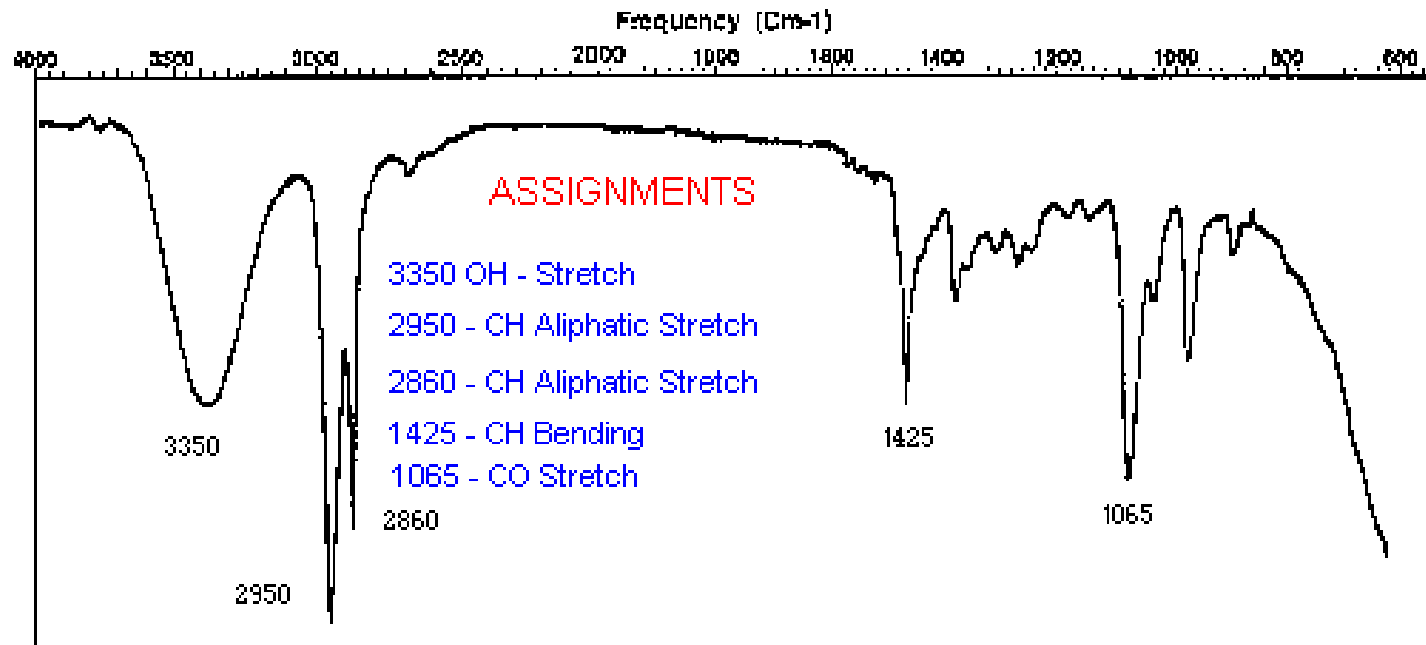
Kde k je silová konstanta, M_{A} , M_{B} hmotnosti atomů, ν vlnočet

IR spektroskopie



IR spektroskopie

Typické IR spektrum



Příklady vibrací

cm⁻¹

ν OH (alkohol)	3300-3700
ν NH ₂ (amin)	3200-3500
ν SH (thioly)	2500-2600
δ HOH (voda)	1550-1650

Polohy abs. pásu podle typu vazeb

biopolymery

ν SH (cystein)	2600-2700	X -H	3600 – 2700
ν NH ₂ (amidy)	3200-3400	X=Y	2700 – 1900
ν C=O (Asp, Glu)	1710-1720	X≡Y	1900 – 1500
ν COO-	1410-1570	X-Y	1500 - 500
ν C-N	1625		
ν NH ₃ ⁺	1670		
δ jádro (Tyr)	1515		
ν NH (Trp)	3400		
ν O-PO (fosfát)	900		
δ jádro (nukl. báze)	1520-1570		
ν CO, δNH (pep. vazba)	1620-1670		
δCN, δNH	1500-1550		

IR spektroskopie

IR spektra proteinů

Amid I - 1655 cm^{-1} ν N-CO

Amid II – 1550 cm^{-1} δ NH CN

Závislost spektra peptidové vazby na typu struktury

Amid I (D_2O)

α -helix 1651 -1657

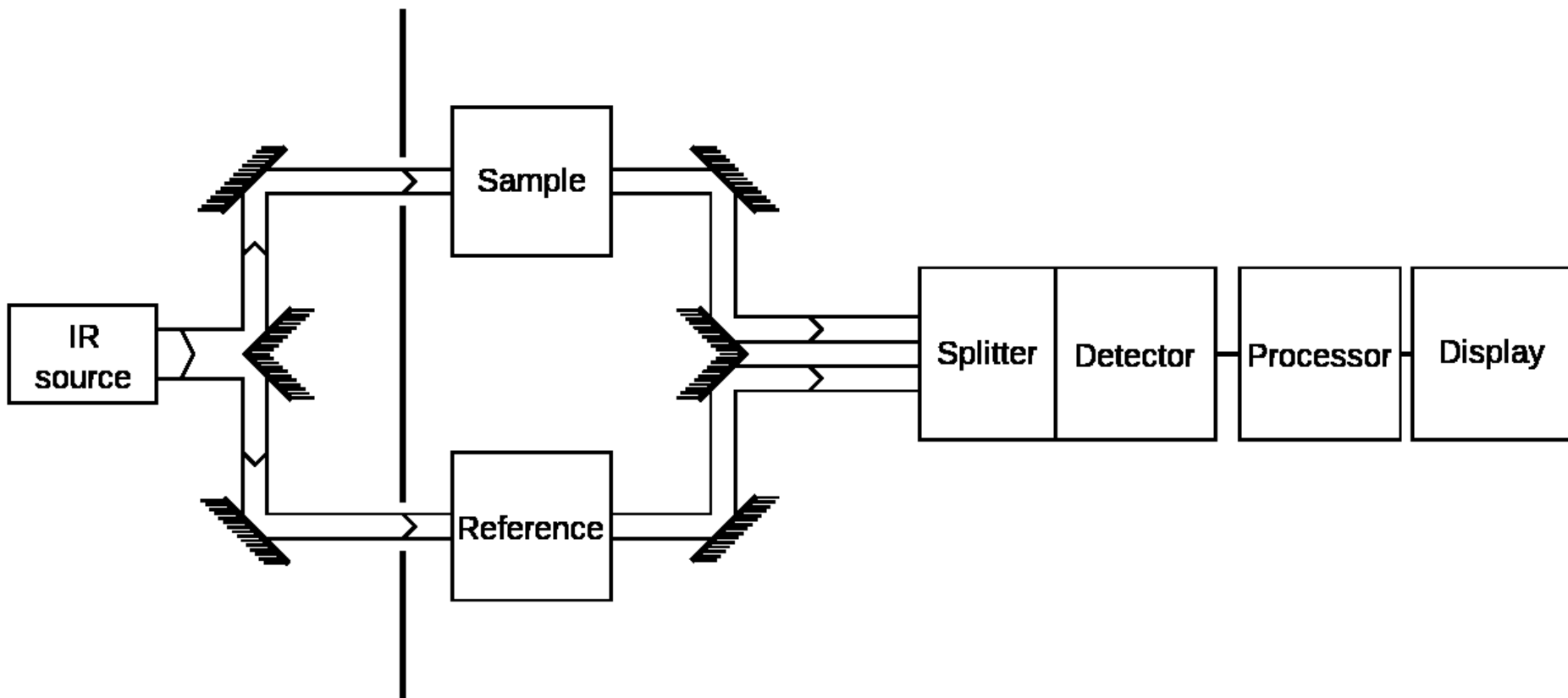
β - struktura 1620 -1640

1670 -1680

RC 1640 -1648

IR spektroskopie

Schema přístroje



IR spektroskopie

- Zdroj – žhavené materiály (slitiny kovů, keramika)
 - vlákna, tyčinky (nichromový zdroj, Nernstova tyčinka, globar)
- Monochromátor
 - mřížka – jiná hustota vrypů
 - Michelsonův interferometr – za vzorkem
- Detektor
 - fotoelektrický
 - tepelný

IR spektroskopie

FT-IR spektroskopie

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i(2\pi)\nu t} dt \quad \text{and} \quad f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} 2\pi F(\nu) e^{i(2\pi)\nu t} d\nu$$

Michelsonův interferometr

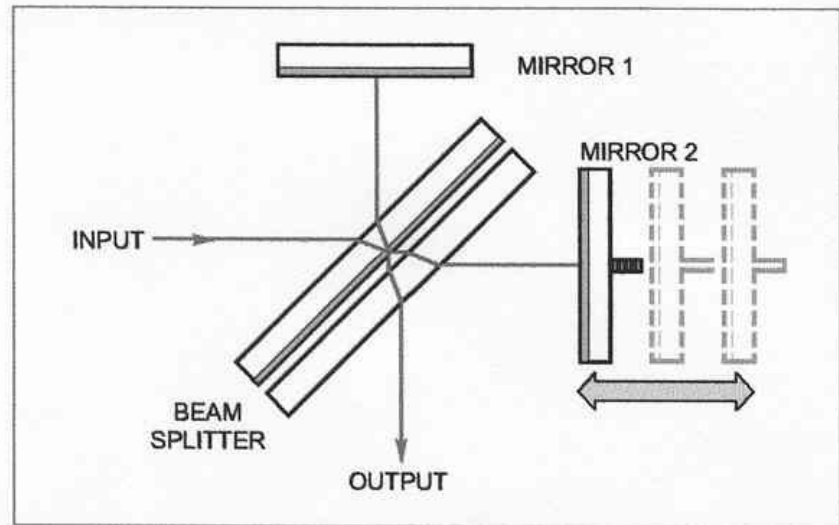
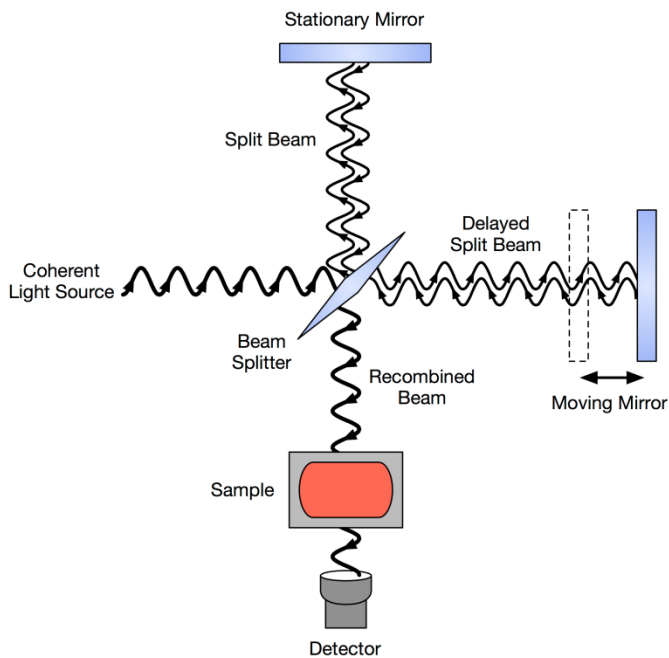


Fig. 1 A Schematic of a generic Michelson Interferometer.

IR spektroskopie

FT-IR spektra proteinů, změna konformace

CaF₂, D₂O, 60 mg/ml, 10 μl

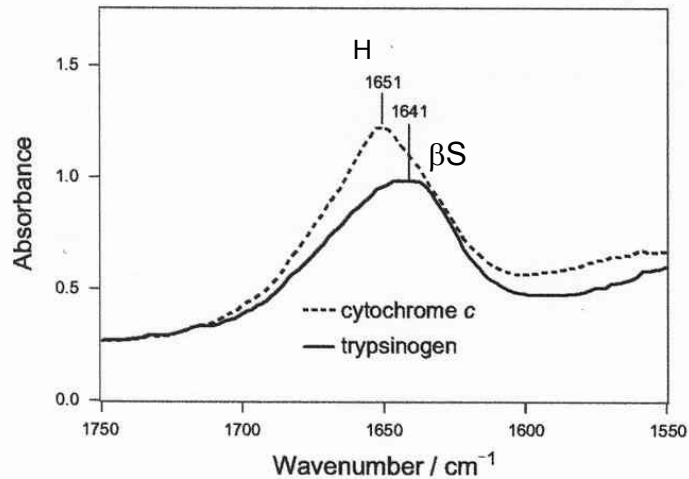


Figure 1. Absorption spectra of ~60 mg/mL solutions of cytochrome c and trypsinogen dissolved in D₂O. Ten microliters of each protein sample was placed between calcium fluoride windows separated by a 15-μm spacer. The data were recorded at 4-cm⁻¹ resolution, and each spectrum is the result of 50 scans.

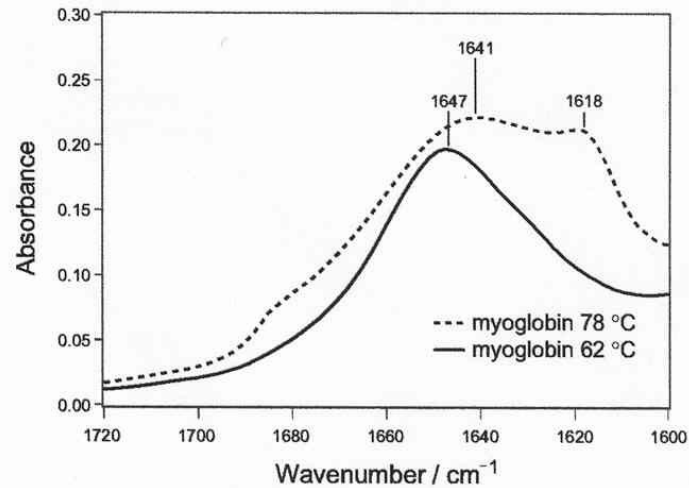


Figure 2. Absorption spectra of ~60 mg/mL myoglobin solutions in D₂O preincubated at 62 and 78 °C for 15 min. Spectral conditions are identical to those described in Figure 1.

Ramanova spektroskopie

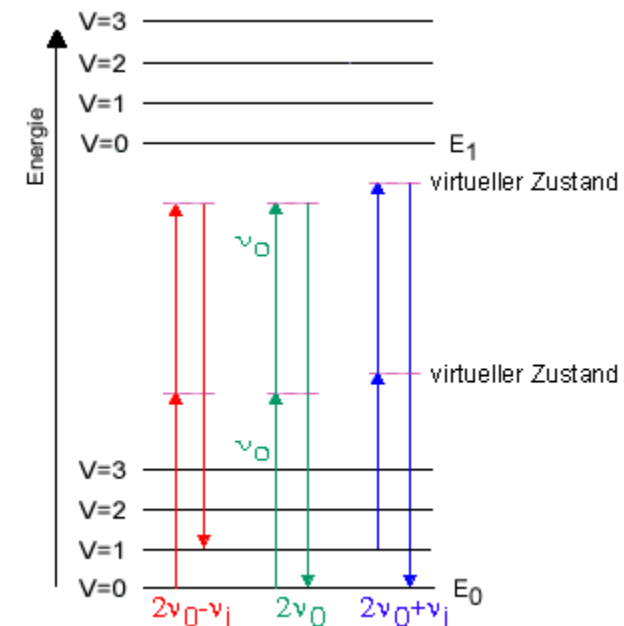
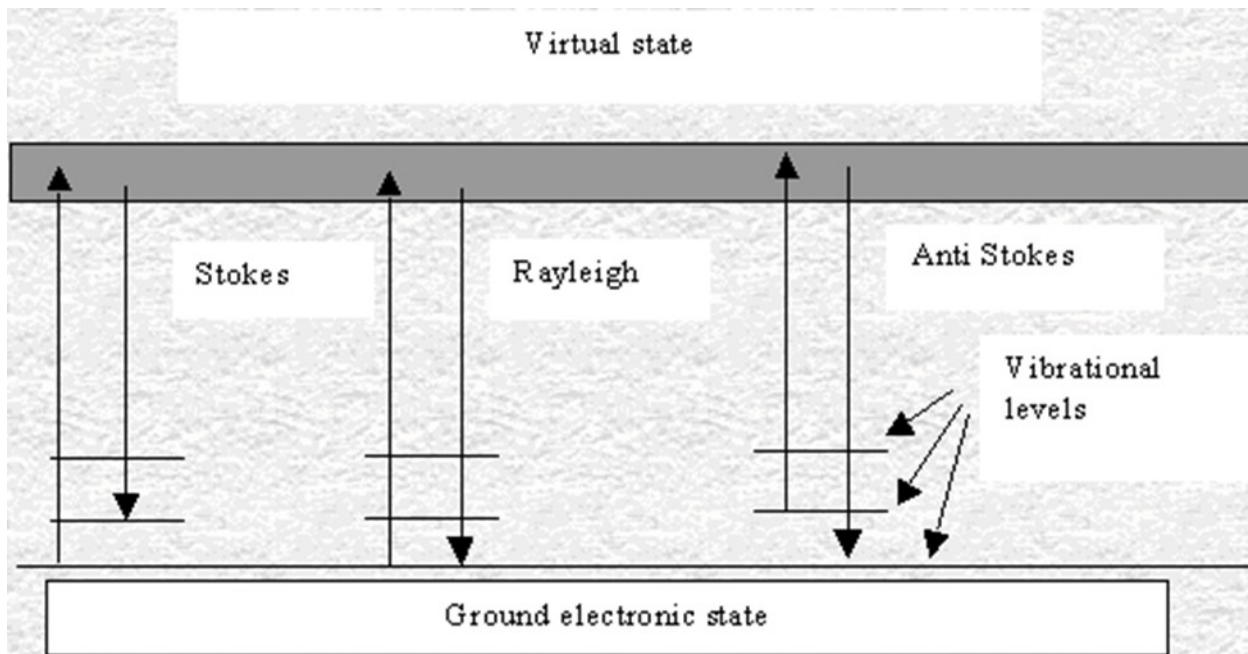
- NC 1930
- Neelastický rozptyl
 - srážky fotonů s částicí
- Není absorpční
- Měříme vyzářené světlo



Sir C. V. Raman

Ramanova spektroskopie

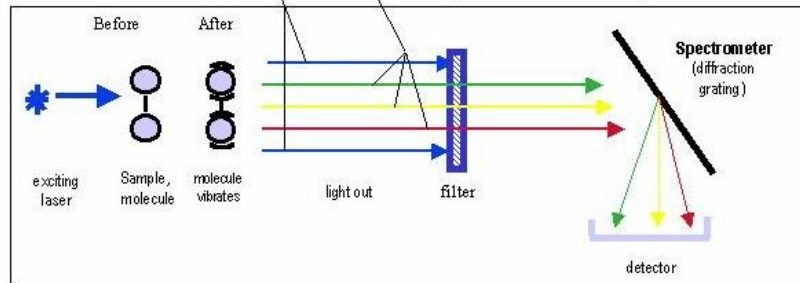
- Rozptyl, měření vyzářeného světla
 - Virtuální stav – excitace



Ramanova spektroskopie

The Principle of Raman Spectroscopy

- The sample is excited with laser light
- elastically scattered light (Rayleigh)
- inelastically scattered light (Raman)
- Filter eliminates intense Rayleigh scattering (typically 10^8 times stronger than the Raman scattering)
- Grating disperses the light onto a detector to generate a spectrum

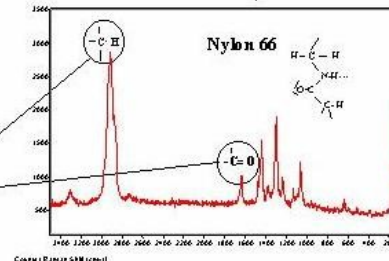


Light loses energy to the molecule vibration

Raman shift:

$$\nu_{\text{laser}} - \nu_{\text{scattered}} = \Delta\nu_{\text{Raman}}$$

The Spectrum gives informations about molecule bondings



Raman spectroscopy combined with a **conventional optical microscope** opens the possibility of Raman microstructural investigations on the μm scale.

Ramanova spektroskopie

$$\nu_R = \nu_o - \nu_{\text{vibr}}$$

$$\begin{aligned}\Delta\nu &= \nu_o - \nu_R \\ &= \nu_o - (\nu_o - \nu_{\text{vibr}})\end{aligned}$$

$$\Delta\nu = \nu_{\text{vibr}}$$

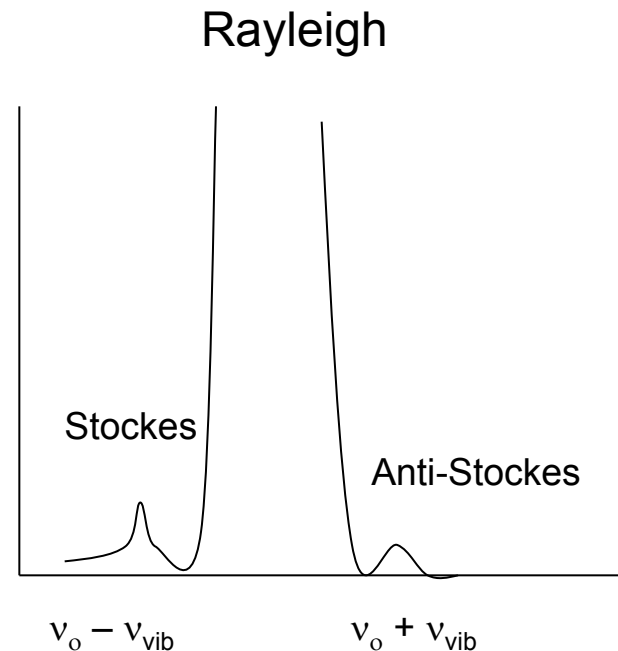
$$\lambda_o = 555 \text{ nm}$$

$$\nu_o = 18\,000 \text{ cm}^{-1}$$

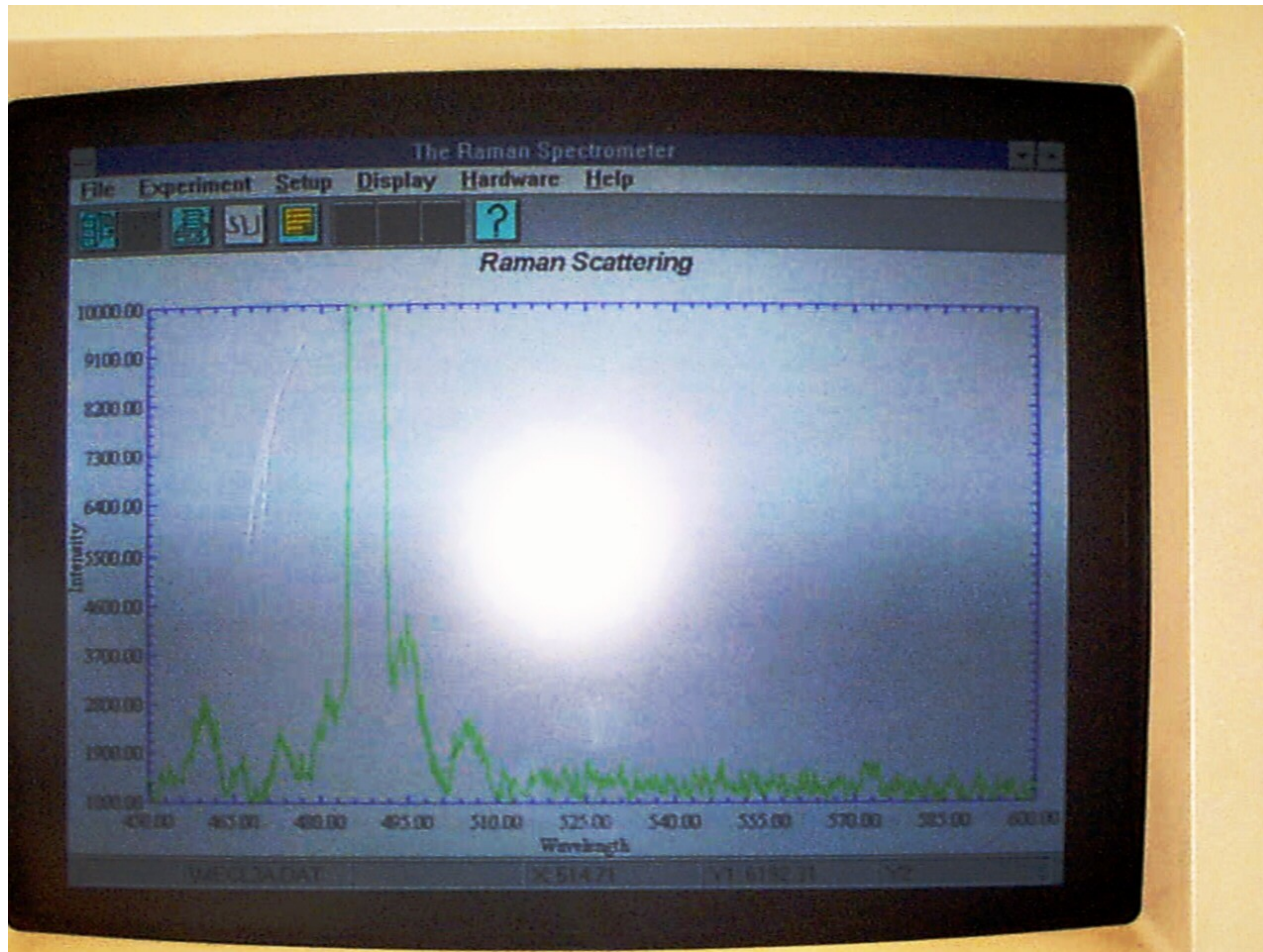
$$\text{Pokud } \nu_{\text{vibr}} = 1600 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu_R = 18\,000 - 1\,600 = 16\,400 \text{ cm}^{-1}$$

$$\lambda_R = 610 \text{ nm}$$



Ramanova spektroskopie

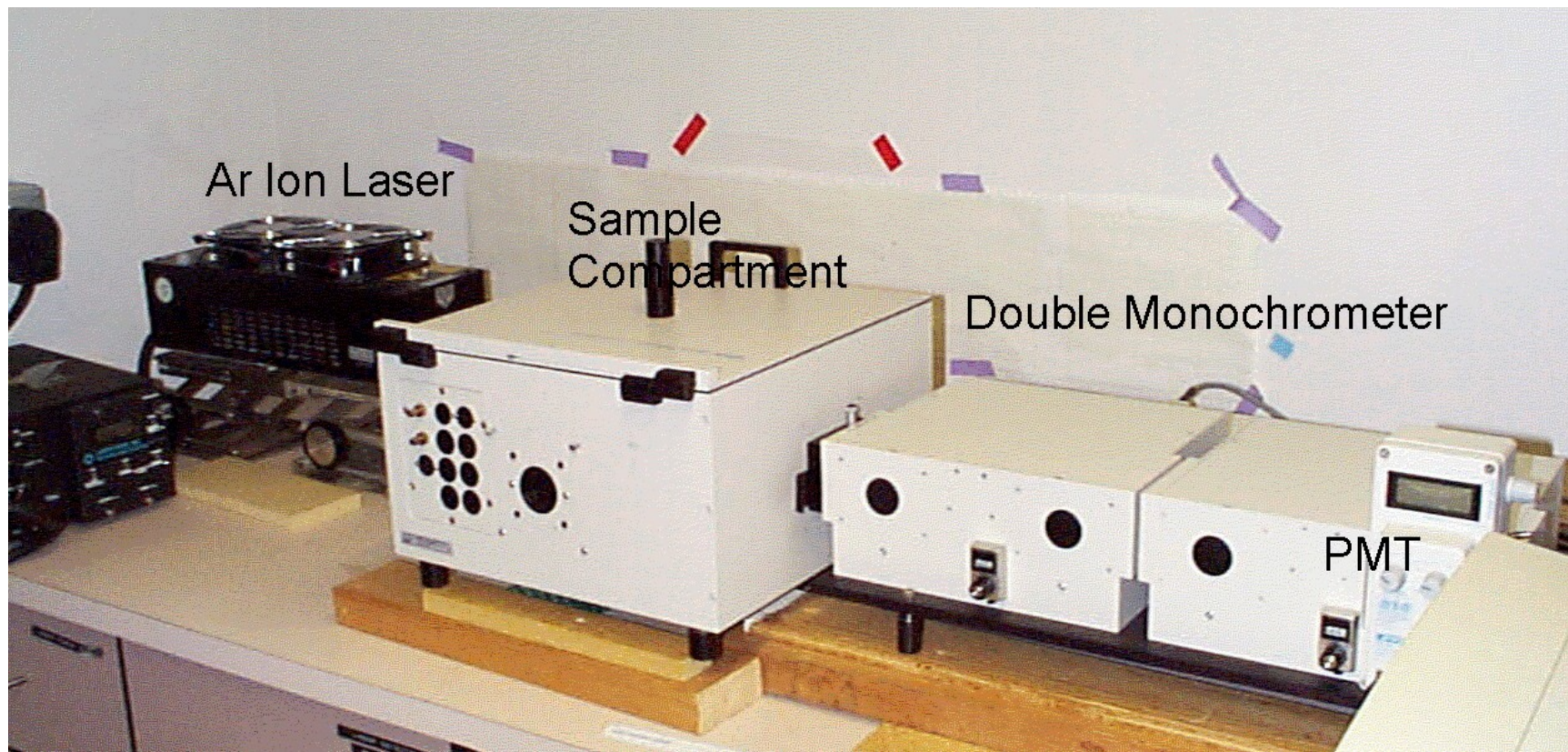


Zdroje: lasery

He-Ne – 633 nm

Ar 488 nm

Ramanova spektroskopie



Ramanova spektroskopie

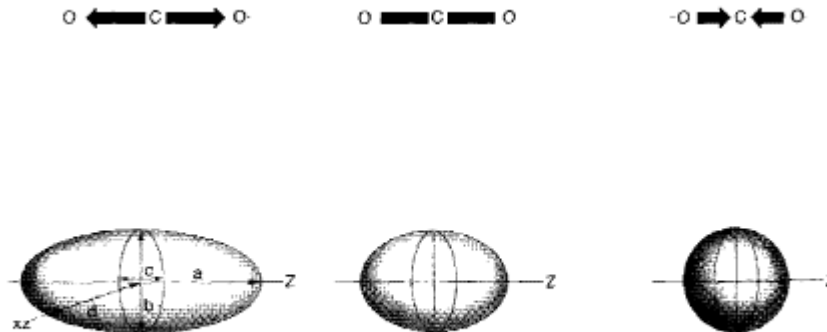
Polarizovatelnost molekuly a vibrační mody

Viditelnost vibrace v Ramanově spektru vyžaduje změnu

polarizovatelnosti vazby

Doplňkové k IR

Symetrické vibrace CO₂



Ramanova spektroskopie

Indukce dipólu P v elektrickém poli E_i

$$P = \alpha \cdot E_i \quad \alpha - \text{polarizovatelnost}$$

$$E_i = E_o \cos(2\pi\nu_i t) \quad \nu_i \text{ vlnčet záření}$$
$$\alpha = \alpha_o + \alpha_v \cos(2\pi\nu_v t) \quad \nu_v \text{ vibr. frekvence molekuly}$$

$$p = E_o \alpha_o \cos(2\pi\nu_i t) + E_o \alpha_v \cos(2\pi\nu_i t) \cdot \cos(2\pi\nu_v t)$$
$$+ E_o \alpha_v [\cos 2\pi t(\nu_i + \nu_v) + \cos 2\pi t(\nu_i - \nu_v)]$$

Poměr intenzit Stokesových a anti-Stokesových linií

$$I_A/I_S = \frac{(\nu_i - \nu_v)^4}{(\nu_i + \nu_v)^4} \cdot e^{(-h\nu_v/kT)}$$

Anti-Stokesovy linie jsou mnohem slabší

Ramanova spektroskopie

	Infrared	Raman
Fyzikální efekt	Absorpce Změna diplového momentu (silné, iontové vazby jako O-H, N-H)	Rozptyl Změna polarizovatelnosti (silné: kovalentní vazby jako C=C, C-S, <u>S-S</u>)
Příprava vzorku	Optimální tloušťka (transmission mode) kontakt vzorku nutný	Bez kontaktu, destrukce jednoduchý příprava voda nebo sklo neruší měření
Komplikace	Silná absorpce skla, vody, CO ₂	Fluorescece
Materiály	Zejména organické látky	Neomezeno
Frekvenční rozsah	4000 - 700 cm ⁻¹	4000 - 50 cm ⁻¹ (Stokes and Antistokes)

Ramanova spektroskopie

Běžná Ramanova spektroskopie

Excitace světlem $E \leq \Delta E = E_{\text{ex}} - E_z$

Např.

λ chromoforu 220 nm, λ světla 488 nm

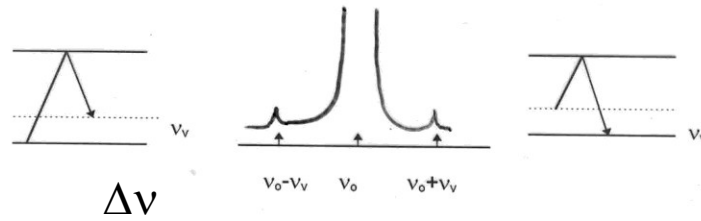
Rezonanční Ramanova spektroskopie

Elektronové a vibrační přechody – excitace světlem $E \geq \Delta E = E_{\text{ex}} - E_z$

λ světla je kratší než λ odpovídajícího el. přechodu

(λ chromoforu 550 nm, λ světla 500 - 400 nm, laditelný laser)

Rezonanční Ramanův efekt – zesílení určitých linií



skupina	ν (cm ⁻¹)	skupina	ν (cm ⁻¹)
C-C	800-860	C-N	880-930
C=C	1600-1650	C=N	1650
C=C	2100-2250	C=N	2150
C-O	820 - 880	C-H _{alif}	2930
C=O	1710-1750	C-H _{ar}	3050

Ramanova spektra bílkovin

peptidová vazba

ν C-N, δ N-H
 1235 (β skládaný list)
 1275 (α šroubovice)
 1235 -1245 široký pás RC

aromatické AK

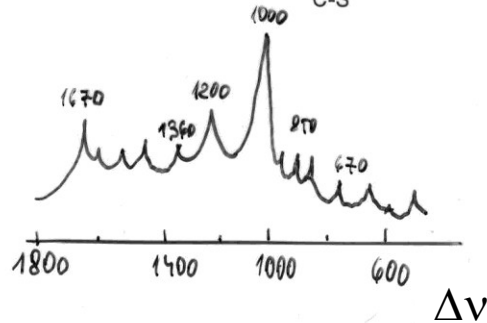
Phe (kruh) dýchání 1000
 δ C-H 1203

ν C=O

1635 (α šroubovice)
 1670 (β skládaný list)
 1665 široký pás RC

Tyr δ C-H 1210
 830,850
 I_{850}/I_{830} 0,5 skrytý
 1,4 v roztoku

Try (kruh) 1361
 -S-S- 510, 525, 540
 C-S 630, 670, 700



Ramanova spektroskopie

194

L. Rivas et al. / Journal of Molecular Structure 565–566 (2001) 193–196

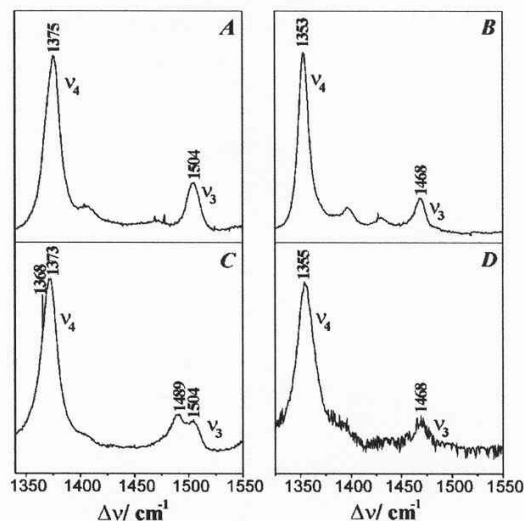
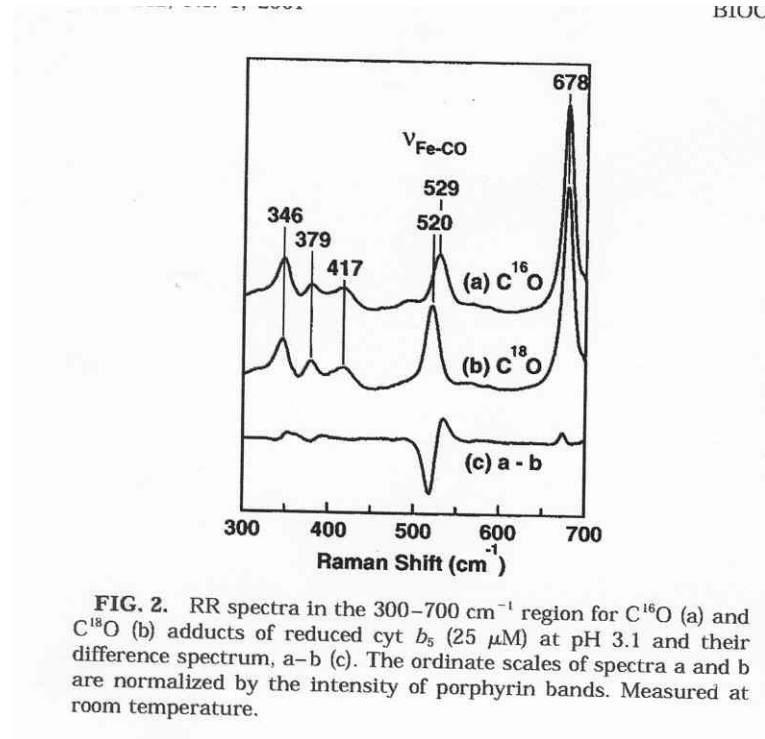


Fig. 1. RR and SERR spectra of Cyt-*c*^{II} in the marker band region excited at 413 nm. The SERR measurements were carried out after adsorption of the protein at 0.0 V. (A) RR spectra of Cyt-*c*^{II}(ox) in solution; (B) RR spectra of Cyt-*c*^{II}(red) in solution; (C) SERR spectra of Cyt-*c*^{II}(ox) measured at 0.0 V; and (D) SERR spectra of Cyt-*c*^{II}(red) measured at -0.7 V.

Resonanční Ramanova spektra cyt c: 1340 – 1550 cm⁻¹: oxidační a vazebný stav hemového Fe. 1375 a 1504 cm⁻¹ – oxidovaný stav, bis-His hemu (6cLS konfigurace). Redukovaný stav: 1353 – 1468 cm⁻¹ (5cHS konfigurace)

Ramanova spektroskopie



Vazba izotopů CO na cytochrom b5.

Ramanova spektroskopie

112

JONES, PATEL, AI

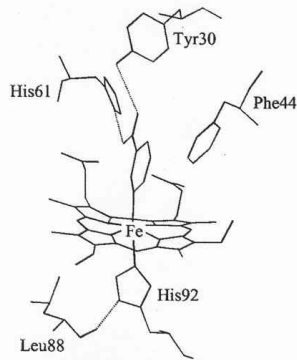


FIG. 1. The active site of the nicotinate derivative of ferric soybean leghemoglobin *a* (22). Hydrogen bonds are indicated with dashed lines.

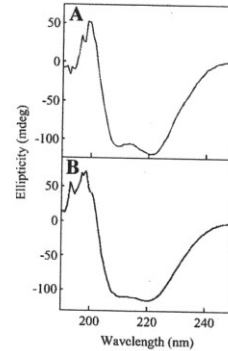


FIG. 3. Circular dichroism spectra of (A) rLb and (B) Leu88Asp in the far-UV region. Conditions: sodium phosphate, pH 7.0, $\mu = 0.10$ M, 25.0°C.

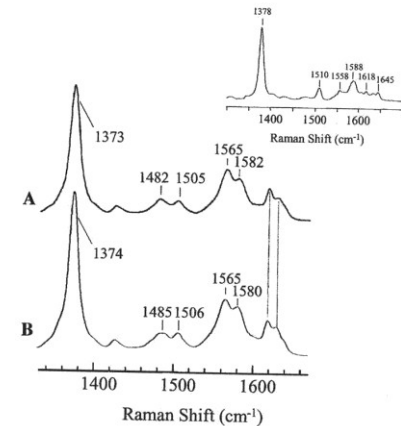


FIG. 4. Room temperature resonance Raman spectra of (A) ferric rLb and (B) Leu88Asp recorded using 413-nm excitation. Inset: Low-temperature (90 K) resonance Raman spectra of ferric Leu88Asp recorded using 413-nm excitation. Conditions: sodium phosphate, pH 7.0, $\mu = 0.10$ M.

Analýza mutantů Leu88Asp

Prakticky totožná CD spektra

RR: 1482, 1565 – 6 koordinační Fe, s vysokým spinem

1505, 1582 – 6 koordinační, nízký spin

divoký kmen a mutant prakticky totožné

Ramanova spektroskopie

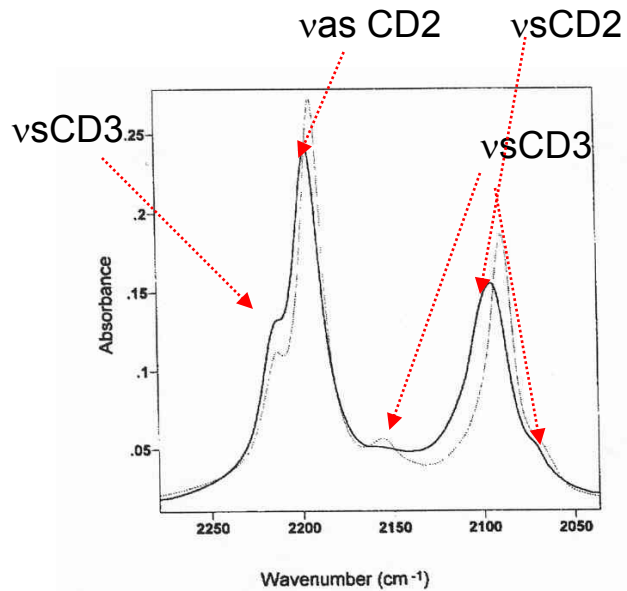


Fig. 1. Infrared spectra of DPPC-d₆₂ at 22°C (···) and 55°C (—) in aqueous dispersion.

Spektrum deuterovaného DPPC