

UV-VIS absorpční a luminiscenční metody,

Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)

Jan Novotný
novotnyjan@mail.muni.cz

17. října 2016

Spektroskopické metody - kontext

Doplňte údaje v přiložené tabulce:

Spektrální oblast	Pozorovaný děj	Příklad metody
X-rays		
UV-VIS		
IR		
MW		
RW		

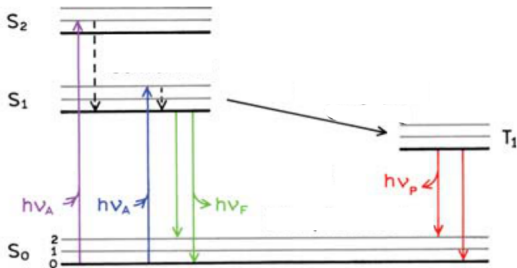
Spektroskopické metody - kontext

Doplňte údaje v přiložené tabulce:

Spektrální oblast	Pozorovaný děj	Příklad metody
X-rays	přechody vnitřních e^-	absorpce, difrakce, SAXS
UV-VIS	valenční e^-	absorpce, CD, luminiscence
IR	molekulární vibrace	IČ spektroskopie, Ramanův rozptyl
MW	přechody e^- spinu, molekulární rotace	EPR, rotační spektroskopie
RW	přechody jaderného spinu	NMR

Energetický digram

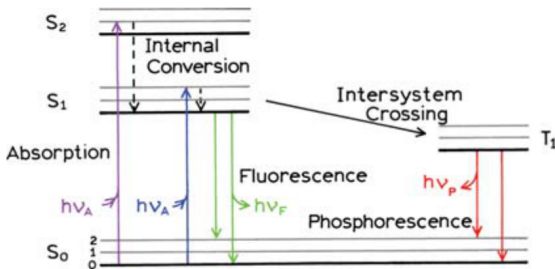
Doplňte diagram a srovnejte děje podle parametrů v příložené tabulce:



Děj	časová škála	k vs. k_{vib}	pořadí λ_{max}
Absorpce			
Fluorescence			
Fosforescence			

Energetický digram

Doplňte diagram a srovnejte děje podle parametrů v příložené tabulce:



Děj	časová škála	k vs. k_{vib}	pořadí λ_{max}
Absorpce	$10^{-15}s$	$>$	1
Fluorescence	$10^{-9}s$	$<$	2
Fosforescence	10^0s	$<$	3

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 6 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 6 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 7 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 6 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 7 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 8 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

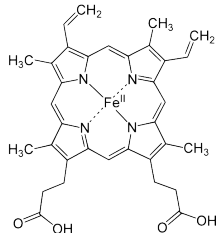
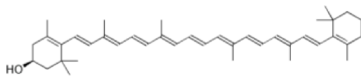
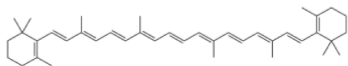
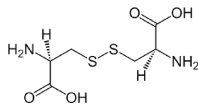
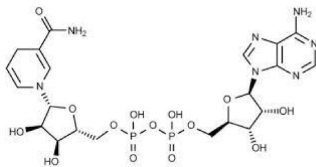
- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 6 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 7 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 8 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 9 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou pro centrosymetrické molekuly zakázané.
- 4 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 5 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 6 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 7 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 8 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 9 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.
- 10 Doba života fluorescence závisí nepřímo úměrně na sumě rychlostních konstant zářivých i nezářivých dějů.

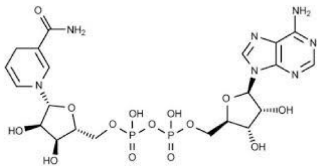
Úloha 1

Ke strukturám uvedených látek přiřaďte název, biochemickou úlohu a typ elektronového přechodu:

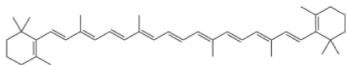


Úloha 1

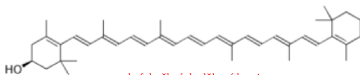
Ke strukturám uvedených látek přiřaďte název, biochemickou úlohu a typ elektronového přechodu:



NADH - redoxní kofaktor, absorpce při 340 nm
 $\pi - \pi^*$

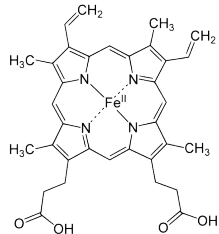
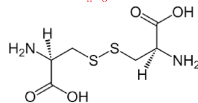


karoten - oranžové doplňkové barvivo
 $\pi - \pi^*$



xanthofyl - žluté doplňkové barvivo
 $\pi - \pi^*$

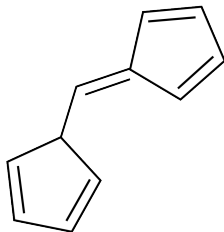
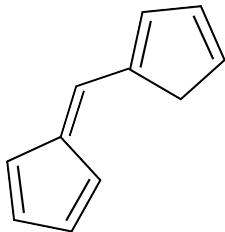
cystin - stabilizace terciárních struktur proteinů
 $n - \sigma^*$



hem - hemoglobin, myoglobin
 $d-d^*$

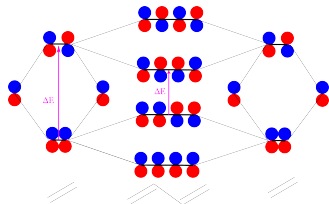
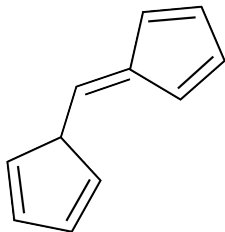
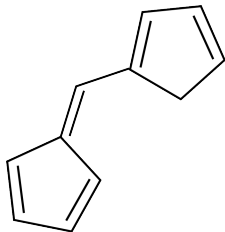
Úloha 2: Konjugace

Která z uvedených sloučenin bude absorbovat při vyšší vlnové délce a proč?



Úloha 2: Konjugace

Která z uvedených sloučenin bude absorbovat při vyšší vlnové délce a proč?



S délkou konjugovaného systému klesá HOMO-LUMO gap a narůstá λ_{max} .

Úloha 3: Vliv pH na absorpční spektrum

Pokuste se přiřadit velikost extinkčního koeficientu a absorpčního maxima pro tyrosin při $\text{pH} < \text{p}K_a$ a $\text{pH} > \text{p}K_a$. Své tvrzení zdůvodněte.

$$A_1, \varepsilon_1 = 270\text{nm}, 1450$$

$$A_2, \varepsilon_2 = 287\text{nm}, 2600$$

Úloha 3: Vliv pH na absorpční spektrum

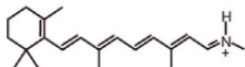
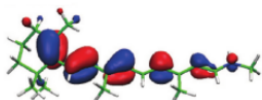
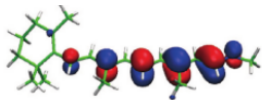
Pokuste se přiřadit velikost extinkčního koeficientu a absorpčního maxima pro tyrosin při $\text{pH} < \text{pK}_a$ a $\text{pH} > \text{pK}_a$. Své tvrzení zdůvodněte.

$$A_1, \varepsilon_1 = 270\text{nm}, 1450 \text{ -OH} \Rightarrow \text{pH} < \text{pK}_a$$

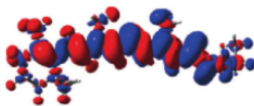
$$A_2, \varepsilon_2 = 287\text{nm}, 2600 \text{ -O}^- \Rightarrow \text{pH} > \text{pK}_a$$

Úloha 4: Retinal

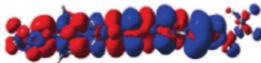
Na obrázku je znázorněna struktura zrakového pigmentu retinalu. Identifikujte HOMO a LUMO orbitály (levý sloupec). Pokuste se odhadnout jaký efekt má vazba kvartérního dusíku na hodnotu λ_{max} . Na základě analýzy diferenční elektronové hustoty (pravý sloupec) ukažte orientaci tranzitního dipólového momentu.



Top view



Side view



M. Mohseni, Y. Omar, G. S. Engel, M. B. Plenio: Quantum effects in biology

Úloha 5: Lambert-Beerův zákon

Molární extinkční koeficient roztoku při 540 nm je $268 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Při průchodu světla o uvedené vlnové délce roztokem o optické délce 7.5 mm došlo k absorpci 52.3% intenzity. Jaká byla koncentrace rozpuštěné látky?

Úloha 5: Lambert-Beerův zákon

Molární extinkční koeficient roztoku při 540 nm je $268 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Při průchodu světla o uvedené vlnové délce roztokem o optické délce 7.5 mm došlo k absorpci 52.3% intenzity. Jaká byla koncentrace rozpuštěné látky?

Řešení

$$A = \log \frac{I_{in}}{I_{out}}, \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

$$c = \frac{\log \frac{1}{0.477}}{\varepsilon \cdot l} = \frac{0.321}{298,0.75} = \mathbf{1.6 \text{ mM}}$$

Úloha 6: Výpočet tranzitního momentu

Uvažme konjugovaný systém π -elektronů popsaný vlnovou funkcí částice v jednorozměrné potenciálové jámě. **A) Ukažte, jak se energie excitace mění s délkou jámy. B) Odvoďte analyticky i graficky, že pravděpodobnost přechodu $n = 1 \rightarrow 2$ je nenulová na rozdíl od $n = 1 \rightarrow 3$. Nápověda: Vlastní stacionární funkce elektronu v potenciálové jámě o délce L má tvar $\psi_n = A \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x$**

Úloha 6: Výpočet tranzitního momentu

Uvažme konjugovaný systém π -elektronů popsaný vlnovou funkcí částice v jednorozměrné potenciálové jámě. A) Ukažte, jak se energie excitace mění s délkou jámy. B) Odvoďte analyticky i graficky, že pravděpodobnost přechodu $n = 1 \rightarrow 2$ je nenulová na rozdíl od $n = 1 \rightarrow 3$. Náповěda: Vlastní stacionární funkce elektronu v potenciálové jámě o délce L má tvar $\psi_n = A \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x$

Řešení

$$A = \sqrt{1 / \int_0^L \sin^2 \frac{\pi \cdot n}{L} x dx} = \sqrt{\frac{2}{L}}$$

$$E_n = A^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x \left(-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x dx =$$

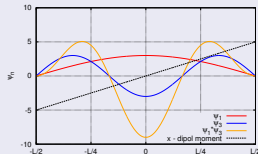
$$\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\pi^2 n^2}{L^2} \int_0^L A^2 \sin^2 \frac{\pi \cdot n}{L} x dx = \frac{\hbar^2}{2m} \frac{\pi^2 n^2}{L^2}$$

$$\mu_{1 \rightarrow 2} = e A^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot 1}{L} x \cdot x \cdot \sin \frac{\pi \cdot 2}{L} x dx = 1 \text{ g}^* u^* u = g$$

$$\mu_{1 \rightarrow 3} = e A^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot 1}{L} x \cdot x \cdot \sin \frac{\pi \cdot 3}{L} x dx = 0 \text{ g}^* u^* u = 0$$

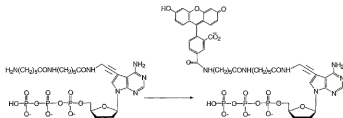
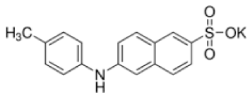
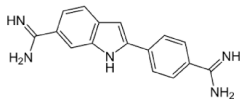
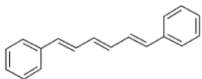
$$\sin \alpha \cdot \sin \beta = \frac{1}{2} [\cos(\alpha - \beta) - \cos(\alpha + \beta)]$$

$$\int x \cdot \cos ax = \frac{x}{a} \sin ax + \frac{1}{a^2} \cos ax$$



Úloha 7

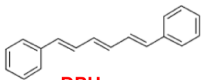
Ke strukturám uvedených fluorescenčních sond přiřaďte zkratky a biochemickou aplikaci



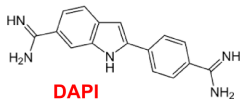
DAPI, ddATP-Dye, DPH, TNS

Úloha 7

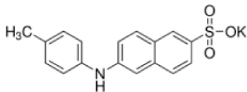
Ke strukturám uvedených fluorescenčních sond přiřaďte zkratky a biochemickou aplikaci



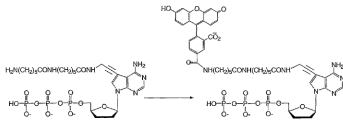
DPH
biomembrány



DAPI
vazba DNA



TNS
proteiny



ddATP-dye
sekvenování

DAPI, ddATP-Dye, DPH, TNS

Úloha 8: Fluorescenční metody

Přiřaďte vhodnou strategii využívající fluorescenční spektroskopie k následujícím úlohám:

- A) Měření hydrodynamického poloměru proteinu.
- B) DNA hybridizace.
- C) Lokalizace Trp residua (na povrchu či v nitru proteinu).
- D) Zastoupení nenasycených mastných kyselin v biomembráně.
- E) Určení asociační konstanty dimerizace eosinu.

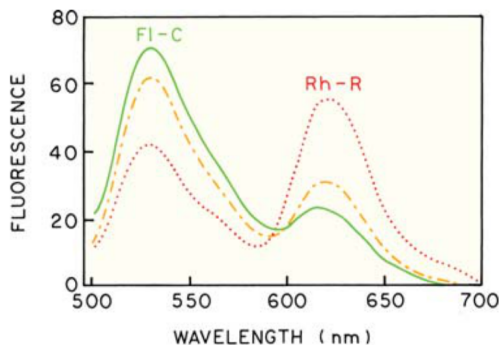
Úloha 8: Fluorescenční metody

Přiřaďte vhodnou strategii využívající fluorescenční spektroskopie k následujícím úlohám:

- A) Měření hydrodynamického poloměru proteinu. **anizotropie značky-korelační čas**
- B) DNA hybridizace. **FRET**
- C) Lokalizace Trp residua (na povrchu či v nitru proteinu). **zhášení, Stokesův posun**
- D) Zastoupení nenasycených mastných kyselin v biomembráně. **viskozita-anizotropie DPH**
- E) Určení asociační konstanty dimerizace eosinu. **emise excimeru**

Úloha 9: FRET

Pokuste se interpretovat fluorescenční experiment provedený na komplexu proteinkinázy, tvořené dvěma katalytickými (C) a dvěma receptorovými jednotkami (R). Obě jednotky jsou označeny fluorescenčními značkami: jednotka C fluoresceinem (Fl) a jednotka R rhodaminem (Rh). V nativní formě R_2C_2 lze detekovat FRET. Určete směr přenosu a vysvětlete vliv přídavku cAMP a inhibitoru PKI na podobu spektra.



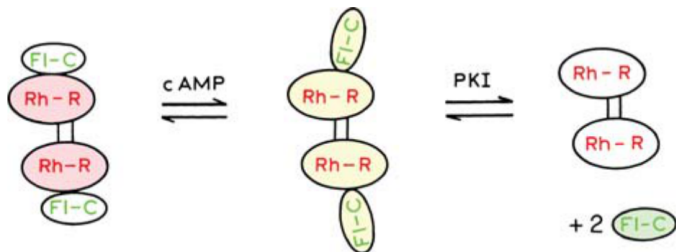
R_2C_2

$R_2C_2 + \text{cAMP}$

$R_2C_2 + \text{PKI}$

Úloha 9: FRET

Pokuste se interpretovat fluorescenční experiment provedený na komplexu proteinkinázy, tvořené dvěma katalytickými (C) a dvěma receptorovými jednotkami (R). Obě jednotky jsou označeny fluorescenčními značkami: jednotka C fluoresceinem (FI) a jednotka R rhodaminem (Rh). V nativní formě R_2C_2 lze detekovat FRET. Určete směr přenosu a vysvětlete vliv přídavku cAMP a inhibitoru PKI na podobu spektra.



Úloha 10: Kinetické parametry fluorescence

Eosinový flouorfor je charakterizován kvantovým výtěžkem 0.65 a dobou života fluorescence 3.1 ns. Vypočtete rychlostní konstantu zářivého, nezářivého přechodu a vlastní dobu života fluorescence.

Úloha 10: Kinetické parametry fluorescence

Eosinový flouorfor je charakterizován kvantovým výtěžkem 0.65 a dobou života fluorescence 3.1 ns. Vypočtete rychlostní konstantu zářivého, nezářivého přechodu a vlastní dobu života fluorescence.

Řešení

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad \tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \rightarrow \Gamma = \frac{\Phi}{\tau}$$

Rychlostní konstanty:

$$\Gamma = \frac{0.65}{3.1} = 0.21 \text{ ns}^{-1}, \quad k_{nr} = \frac{1}{\tau} - \Gamma = \frac{1}{3.1} - 0.21 = 0.11 \text{ ns}^{-1}$$

Úloha 11: Perrinova rovnice

Za předpokladu exponenciálního poklesu intenzity $I(t)$ a anizotropie $r(t)$ fluorescenčního signálu odvoďte vztah mezi anizotropií r , dobou života τ a rotačním korelačním časem θ . Při výpočtu vyjděte z definice časově váženého průměru anizotropie r :

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t)I(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt}$$

Úloha 11: Perrinova rovnice

Za předpokladu exponenciálního poklesu intenzity $I(t)$ a anizotropie $r(t)$ fluorescenčního signálu odvoďte vztah mezi anizotropií r , dobou života τ a rotačním korelačním časem θ . Při výpočtu vyjděte z definice časově váženého průměru anizotropie r :

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t)I(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt}$$

Řešení

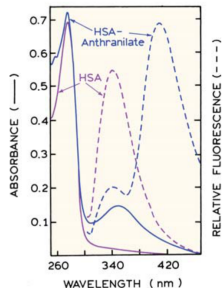
$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad r = r_0 e^{-\frac{t}{\theta}}$$

$$r = \frac{I_0 r_0 \int_0^{\infty} e^{-t\left(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\theta}\right)} dt}{I_0 \int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt} = \frac{r_0 \left(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\theta}\right)^{-1}}{\tau} = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}}$$

Úloha 12: FRET

Lidský sérový albumin obsahuje jediné Trp residuum na pozici 214. Vzorek byl kovalentně označen na Cys 34 athranilovým fluoroforem. Försterova vzdálenost R_0 pro FRET přenos z Trp na anthranoyl je 30.3Å. Za použití emisního spektra vypočtete vzdálenost mezi oběma aminokyselinami v molekule.

$$k_{RET} = \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 .$$

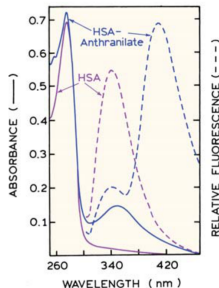


Úloha 12: FRET

Lidský sérový albumin obsahuje jediné Trp residuum na pozici 214. Vzorek byl kovalentně označen na Cys 34 anthranilovým fluoroforem. Försterova vzdálenost R_0 pro FRET přenos z Trp na anthranoyl je 30.3Å. Za použití emisního spektra vypočtete vzdálenost mezi oběma aminokyselinami v molekule.

Pro rychlostní konstantu rezonančního přenosu platí

$$k_{RET} = \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6.$$



Řešení

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{RET}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6} = \frac{r^6}{R_0^6 + r^6}$$

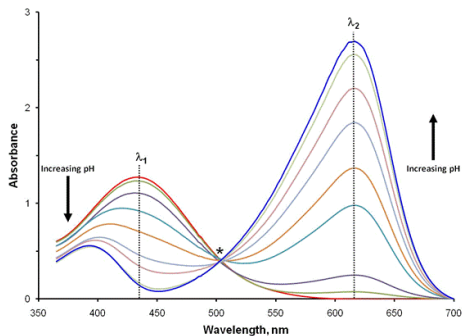
Kvantový výtěžek Φ pro vlnovou délku 340 nm: emise albuminu s akceptorem/emise volného albuminu=0.2/0.55

$$\Phi = 0.364 = \frac{r^6}{30.3^6 + r^6} \Rightarrow r = \frac{30.3}{1.75^{\frac{1}{6}}} = 28\text{Å}$$

Úloha 14: Monitorování konverze pomocí UV-VIS spektra

Na obrázku je záznam VIS-spektra bromthymolové modři v závislosti na měnícím se pH.

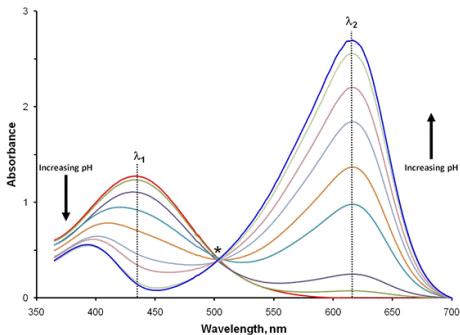
- Jak se nazývá bod ve spektru označený hvězdičkou a jakou vlastností se vyznačuje?
- K absorpčním maximům přiřaďte entity $HInd$ a Ind^- .
- Vyjádřete poměr konjugované kyseliny a báze pomocí aktuálních hodnot absorbancí $A(\lambda_1)$, $A(\lambda_2)$ a jejich limitních hodnot $A(\lambda_1)_{max}$ a $A(\lambda_2)_{max}$.



Úloha 14: Monitorování konverze pomocí UV-VIS spektra

Na obrázku je záznam VIS-spektra bromthymolové modři v závislosti na měnícím se pH.

- Jak se nazývá bod ve spektru označený hvězdičkou a jakou vlastností se vyznačuje?
- K absorpčním maximům přiřaďte entity $HInd$ a Ind^- .
- Vyjádřete poměr konjugované kyseliny a báze pomocí aktuálních hodnot absorbancí $A(\lambda_1)$, $A(\lambda_2)$ a jejich limitních hodnot $A(\lambda_1)_{max}$ a $A(\lambda_2)_{max}$.



Řešení

- isosbestický bod: $\varepsilon(HInd)_{\lambda^*} = \varepsilon(Ind^-)_{\lambda^*}$
- $HInd$ $\lambda_1 = 430\text{nm}$, Ind^- $\lambda_2 = 620\text{nm}$
- $$\frac{[HInd]}{[Ind^-]} = \frac{A(\lambda_1) \cdot A(\lambda_2)_{max}}{A(\lambda_2) \cdot A(\lambda_1)_{max}}$$

Úloha 13: Frank-Condonův faktor

Základní stav hypotetické molekuly je popsán vibrační vlnovou funkcí $N_0 \cdot e^{-a(x-x_0)^2}$. **Vypočítejte Franck-Condonův faktor** pro přechod do stavu $N_1 \cdot e^{-a(x-x_1)^2}$.

Franz-Xaver Schmid: **Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry**

M. Mohseni, Y. Omar, G. S. Engel, M. B. Plenio: **Quantum effects in biology**

Joseph R. Lakowicz: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**

P. Atkins, J. de Paula: **Physical Chemistry**

<http://www.cyut.edu.tw/~wjchien/BiopolymerSpect/text/absorption.pdf>

Příště: M. Novák-NMR spektroskopie