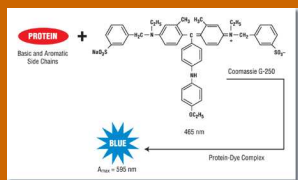


Repetitorium chemie VIII. (2014)

Moderní metody analýzy organických látek



se zastávkou u Lambert-Beerova zákona
a odhalení tajemství Bradforda/Bradfordové



Odhalení tajemství:

Protein Concentration Determination by the Bradford Assay

The Bradford assay relies on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein. Detailed studies indicate that the free dye can exist in four different ionic forms for which the pKa values are 1.15, 1.82, and 12.4. Of the three charged forms of the dye that predominate in the acidic assay reagent solution, the more cationic red and green forms have absorbance maxima at 470 nm and 650 nm, respectively. In contrast, the more anionic blue form of the dye, which binds to protein, has an absorbance maximum at 590 nm.

Thus, the quantity of protein can be estimated by determining the amount of dye in the blue ionic form. This is usually achieved by measuring the absorbance of the solution at 595 nm.

Analýza organických látek



První československý plynový laser 1963



Infračervený spektrofotometr 1965

Analýza organických látek



První československý elektronový mikroskop 1950



Experimentální prozařovací elektronový mikroskop – 100 kV (L. Zobač, V. Drahoš, J. Speciální a sedící A. Delong) 1954

Každá nová organická látka se charakterisuje

- Názvem dle názvoslovných pravidel (eventuálně triviálním názvem)
- Sumárním vzorcem
- Strukturním vzorcem
- Tvarem, bodem tání (varu, sublimace), rozpustností
- Optickou otáčivostí (v případě potřeby)
- Charakteristikami spekter:
UV/VIS, IR, NMR a MS
jsou nejdůležitější, neboť z nich se odvozuje struktura molekuly

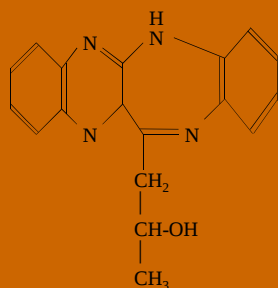
Sumární vzorec a název



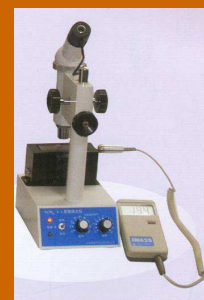
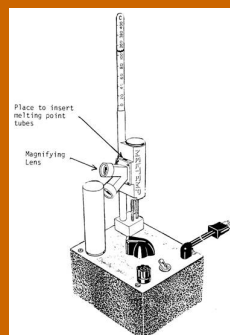
6-(2-hydroxypropyl)-13H-benzodiazepino[2,3-b]chinoxalin

6-(2-hydroxypropyl)-13H-benzodiazepino[2,3-b]quinoxaline

Strukturní vzorec



Bod tání / bod varu / tvar / rozpustnost



Bodotávek (prastárý, klasický)

Bod tání / bod varu / tvar / rozpustnost



Bodotávek (digitální)

Bod tání / bod varu / tvar / rozpustnost

Yellow needles, m.p. 205°C (decomp.)

soluble in ethanol, methanol

10/41

Optická aktivita

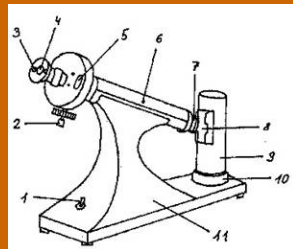
Látky vykazující pravotočivost (tj. stáčí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček) se označují (+). Levotočivé se označují (-). Obvykle se uvažuje lineárně polarizované světlo; rovina polarizace se po průchodu chirální látkou změní o úhel, který je úměrný délce dráhy, kterou světlo v látce urazilo. Optická otáčivost závisí na vlnové délce (označuje se jako disperze optické otáčivosti), teplotě a koncentraci. Pro měření je běžně používáno světlo (D-linie) ze sodíkové výbojky o vlnové délce cca 589,25 nm.

Optická aktivita

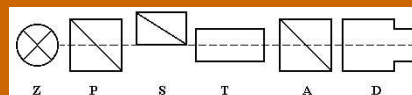
$$c = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \sigma_{20}}$$

kde c je koncentrace v procentech, α úhel otočení ve stupních při (20±0,5) °C, l délka polarimetrické trubice v decimetrech, σ hustota při 20 °C v g/cm³.

Optická aktivita



Optická aktivita



Optické uspořádání polarimetru.

Z ... zdroj monochromatického záření (sodíková výbojka)

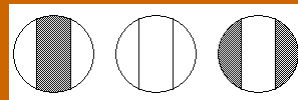
P ... polarizátor

S ... polostínové zařízení

T ... polarimetrická trubice (kyveta)

A ... analyzátor

D ... dalekohled



Každá nová organická látka se charakterisuje

- Názvem dle názvoslovných pravidel (eventuálně triviálním názvem)
- Sumárním vzorcem
- Strukturálním vzorcem
- Tvarem, bodem tání (varu, sublimace), rozpustností
- Optickou otáčivostí (v případě potřeby)
- Charakteristikami spekter:
UV/VIS, IR, NMR a MS
jsou nejdůležitější, neboť z nich se odvozuje struktura molekuly

UV/VIS spektrofotometrie

Princip: při absorpci UV a VIS záření dochází k přechodům valenčních elektronů ze základního do excitovaného stavu.

UV/VIS Spektrum: závislost A na λ (200-800 nm)

- Z UV/VIS spektra lze odvodit informace o alifatickém či aromatickém charakteru látky a o přítomnosti dvojných vazeb.
- Identitu látky je možné ověřit srovnáním jejich UV/VIS spekter s UV/VIS spektrem standardu.

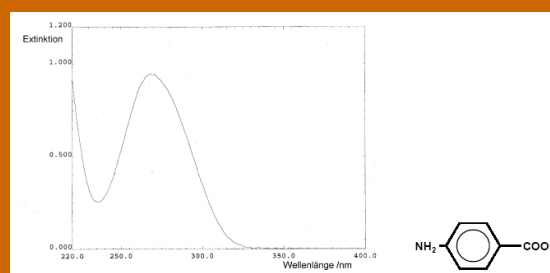
UV/VIS spektrofotometrie

Příklady chromoforových skupin

skupina	λ (nm)
>C=O	280
>C=N-	300
-N=N-	350
>C=S	500
>N=O	650

Aromatické látky vždy vykazují absorpční maximum při 210 nm a 254 ($\pm$) nm.

UV/VIS spektrum



UV/VIS spektrum

(20°C, ethanol) 356 nm (3,55), 291 nm (3,46),
270 nm (3,65), 238 nm (3,69), 218 nm (3,89)

Uvádí se rozpouštědlo, teplota, ve zkrácené formě
pouze vlnová délka maxima (v závorce hodnota ϵ)

Infračervená spektrofotometrie (IR)

IC („infrared“) spektrofotometrie je založena na interakci elektromagnetického záření o vlnočtu (ν), 10 až 10 000 cm^{-1} s měřeným vzorkem.

Záření o této vlnové délce ($\lambda = 1/\nu$), tj. tepelné záření, je absorbováno molekulami látky, přičemž dochází k vibracím resp. rotacím molekul.

Mluvíme o vibračně-rotacích molekulových spektrech.

20/41

Infračervená spektrofotometrie (IR)

Vibrace se dělí do dvou základních skupin:

- Valenční – mění se vzdálenost mezi atomy, ale valenční úhly zůstávají zachovány
- Deformační – mění se valenční úhly, ale vzdálenost mezi atomy zůstává zachována

Měření těchto spekter je náročnější, než je měření UV-VIS spekter. Naproti tomu lze IR spektra měřit u látek všech skupenství (g,l,s).

Infračervená spektrofotometrie (IR)

Základní instrumentace

Zdroj záření: tuhé zářiče z polovodičů (karbid křemíku) + mřížka

Měrná květa: okénka z NaCl (kapaliny, roztoky v CHCl_3 nebo nujolu)
slisovaná tableta KBr (pevné látky)

Detektor: termočlánek

Infračervená spektrofotometrie (IR)

IR spektrum je závislost transmittance (T, %) na vlnočtu (ν , cm^{-1})

Základem kvalitativní IR spektrofotometrie je přiřazení jednotlivých absorpčních pásů charakteristickým vibracím molekul.

Infračervená spektrofotometrie (IR)

(Reálně se měří v oblasti 400 – 4 000 cm^{-1})

Oblast mezi 400 a 1000 cm^{-1} : valenční vibrace těžších atomů (C-X)
a deformační vibrace C-H vazeb

Oblast mezi 1000 a 1350 cm^{-1} : valenční a deformační vibrace C-C, C-N
a C-O vazeb (oblast otisku prstu)

Oblast mezi 1350 a 4000 cm^{-1} : valenční vibrace vodíku (Y-H)

Infračervená spektrofotometrie (IR)

Příklady charakteristických pásů v IR spektrech:

Skupina	ν , cm^{-1}
-OH	3600-3650
-NH ₂	3370-3420
-H aromat.	3000-3080
-SH	2580
C=O	1700-1770
-NH ₂	1590-1650
C=S	1100
C-Cl	600-800

Infračervená spektrofotometrie (IR)

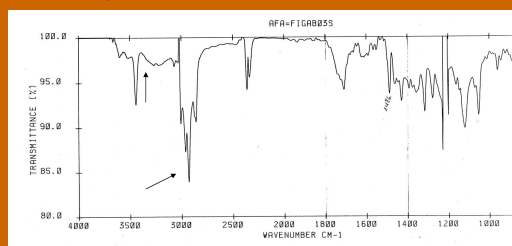
- IR spektra dají informace o přítomnosti funkčních skupin.
- Lze je využít i pro identifikaci látky porovnáním jejich spekter se spektry standardu.
- Pro kvantitativní účely lze využít Lambert-Beerův zákon.



Laboratorní infračervený spektrograf 1969

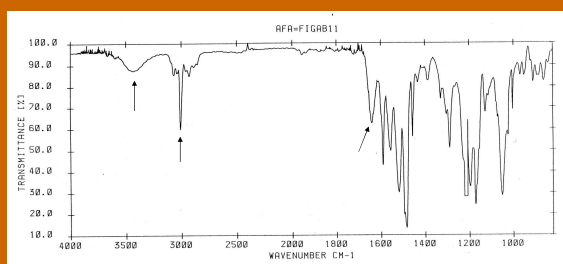
Infračervená spektrofotometrie (IR)

IR (CHCl₃, cm^{-1}): 3441, 2930, 1589, 1486, 1429, 1121, 1052.



Infračervená spektrofotometrie (IR)

Jiný příklad (H₃) (OH, CH, C=O)



Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Metoda NMR je založena na interakci záření v oblasti krátkých radiových vln s jádry měřené látky ve vnějším magnetickém poli.

Lze ji použít pro měření látek s atomovými jádry s lichým hmotnostním nebo atomovým číslem.

Nejběžnější a největší význam pro strukturní analýzu mají ¹H a ¹³C.



Spektrometr NMR, ÚPT-TESLA

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Při interakci způsobuje absorbovaná energie přechody nenulových magnetických momentů na vyšší energetické stavy.

Energie potřebná k excitaci jádra souvisí s frekvencí elektromagnetického záření (intenzitou magnetického pole).

Při měření se mění intenzita magnetického pole (B_0) a zaznamenávají se změny na budících nebo detekčních cívkách.

Při rezonanci dojde k poklesu napětí na budících cívkách (spotřeba energie na excitaci) nebo ke zvýšení napětí na detekčních cívkách (uvolnění energie při deexcitaci).

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Jádra vázaná v molekulách jsou ovlivněna elektrony okolních jader a proto nejsou v magnetickém poli rovnocenná.

V místě jádra tedy není magnetické pole B_0 , ale protože elektrony chemických vazeb odlišují vnější pole, je menší o hodnotu tzv. stínění.

Jádra mají podle způsobu vazby ve svém okolí rozdílně uspořádané elektrony a jsou podle toho různě stíněna. Tím je rezonance dosaženo při různých hodnotách B_0 , což se projevuje signály (absorpčními maximy) v různých částech spektra.

Největší stínění protonů bylo změřeno u tetrametylsilanu (TMS), neboť má 12 protonů v molekule.

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

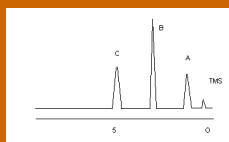


NMR spektrometr Varian Unity Inova 400MHz

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

$\text{CH}_3\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$ NMR záznam protonů ethylacetátu

(A) (C) (B)



Informace o umístění protonů v molekule (včetně konformace)

Informace o umístění uhlíkových atomů v molekule (včetně konformace)

Informace o přítomnosti a počtu funkčních skupin

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Princip: z elektroneutrálních molekul se v ionizační komoře vytvoří molekulární ionty, které se mohou dále při přebytku energie rozpadat. Směs fragmentů je v silném elektrickém poli urychlena a je dále vedena do homogenního magnetického pole. V něm dochází k zakřivení drah jednotlivých částic podle svých efektivních hmotností (m/e)

m hmotnost částice e elementární náboj

Částice dopadají na detektory, intenzita signálu je úměrná počtu dopadlých částic.

MS spektrum: intenzita signálu (%) vs. m/e

Hmotnostní spektrometrie (MS)



Finnigan MAT 95 (ESI, μ -ESI, APCI, FAB, EI, CI, DCI, FD, FI) BRUKER APEX-Q-MTMS

37/41

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Způsoby ionizace:

- nárazem elektronů (EI)
- ionizace elektrostatickým polem
- chemická ionizace (CI)

Chemická ionizace je založena na interakci molekul měřené látky s kladně nabitými částicemi (např. amoniak)

Fragmenty vznikají jednak primární (vlastní ionizací), jednak sekundární rozpadem, přesmyky a rekombinací primárních fragmentů.

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrum je čárové.

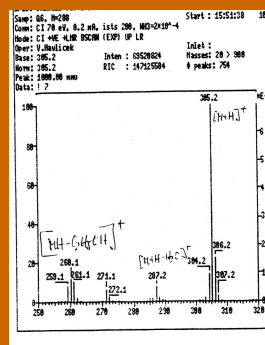
Nejdůležitější je molekulový ion – $[M]^+$ při ionizaci elektrony
– $[M+1]^+$ při chemické ionizaci

Intenzita molekulového iontu nebývá nijak velká, protože tento ion obvykle podléhá dalším reakcím (rozpadu, rekombinaci).

Pro každou hodnotu m/e lze vypočítat složení $C_xH_yO_zN_w\dots$

Ze struktury a poměrného zastoupení iontů lze odvodit strukturní vzorec.

Hmotnostní spektrometrie (MS)

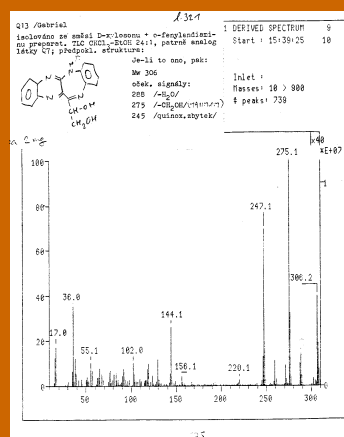


Příklad spektra (Q6), MW 304

Molekulový ion (M+H) 305

Molekulový ion – H_2O
 $305-18 = 287$

Molekulový ion – CH_3CH_2OH
 $305-46 = 259$



Hmotnostní spektrometrie (MS)

Předpověď fragmentace strukturně příbuzné látky

Tento materiál je určen pouze pro výuku studentů.

This presentation has been scheduled for educational purposes only.

Pokud má někdo dojem, že použité obrázky (jiné než moje vlastní) jsou kryty copyrightem, necht' mi dá vědět.

If somebody believes, that pictures or figures in this presentation are covered by copyright, please let me know.

Jiří Gabriel (gabriel@biomed.cas.cz)