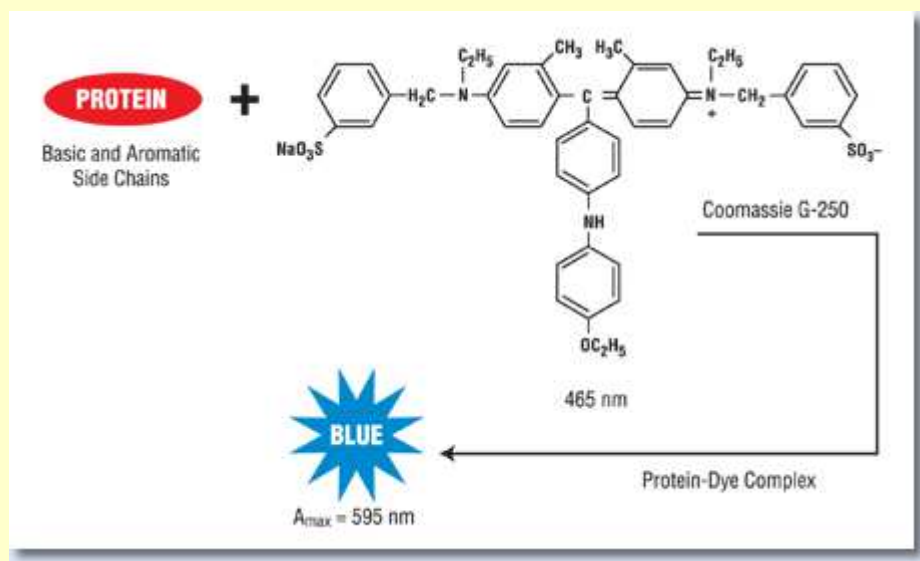


# Repetitorium chemie IX.

## (2016)

### Moderní metody analýzy organických látek



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



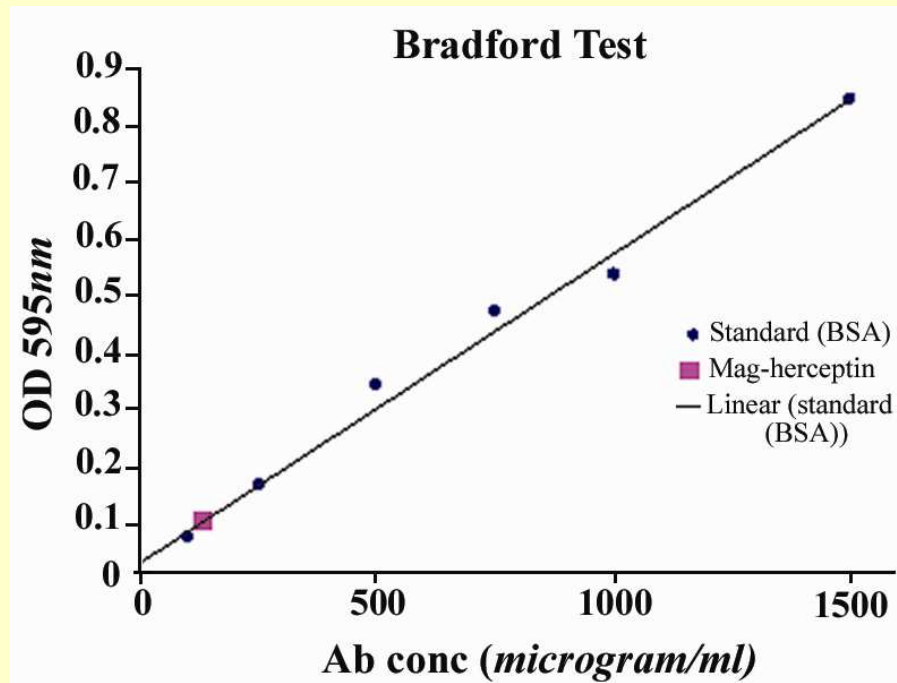
# Odhalení tajemství:

## Protein Concentration Determination by the **Bradford Assay**

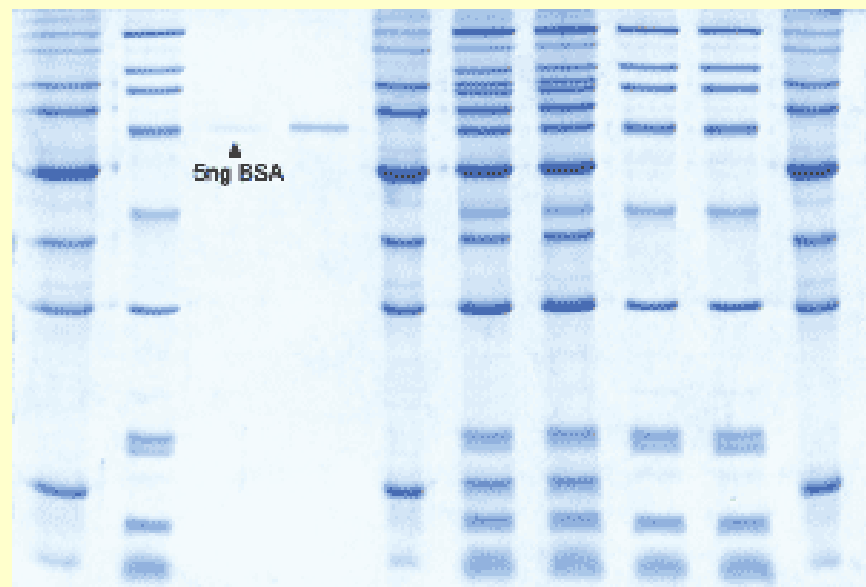
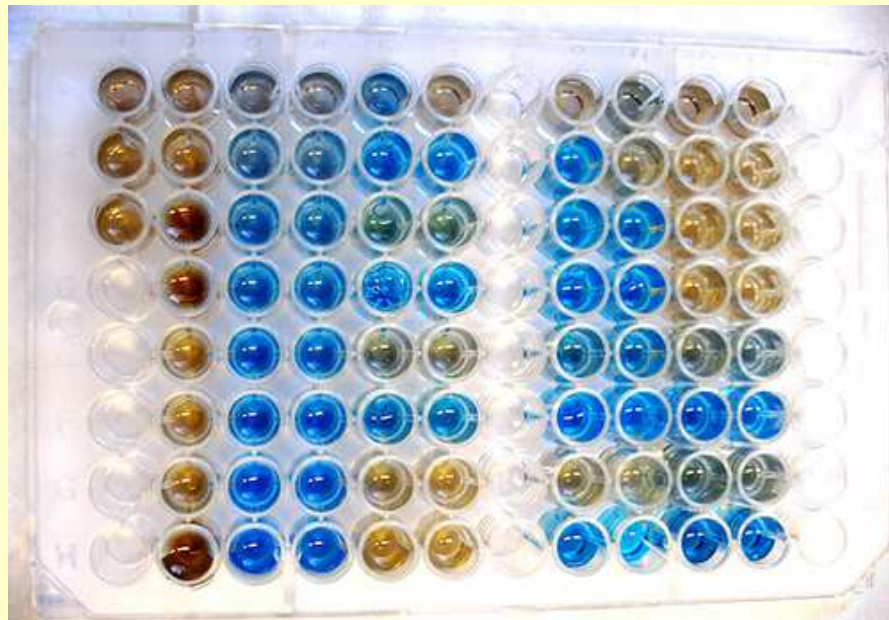
The Bradford assay relies on the binding of the dye **Coomassie Blue G-250** to protein.

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.

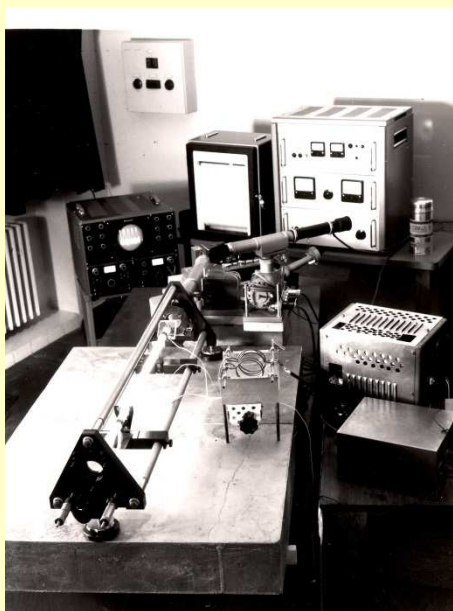
Thus, the quantity of protein can be estimated by determining the amount of dye in the blue ionic form. This is usually achieved by measuring the absorbance of the solution at 595 nm.



## CBB assay: UV/VIS, Elfo gel



# Analýza organických látek



První československý plynový laser 1963



Infračervený spektrofotometr 1965

# Analýza organických látek



První československý elektronový mikroskop 1950

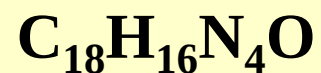


Experimentální prozařovací elektronový mikroskop –  
100 kV (L. Zobač, V. Drahoš, J. Speciální a sedící  
A. Delong) 1954

# 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*

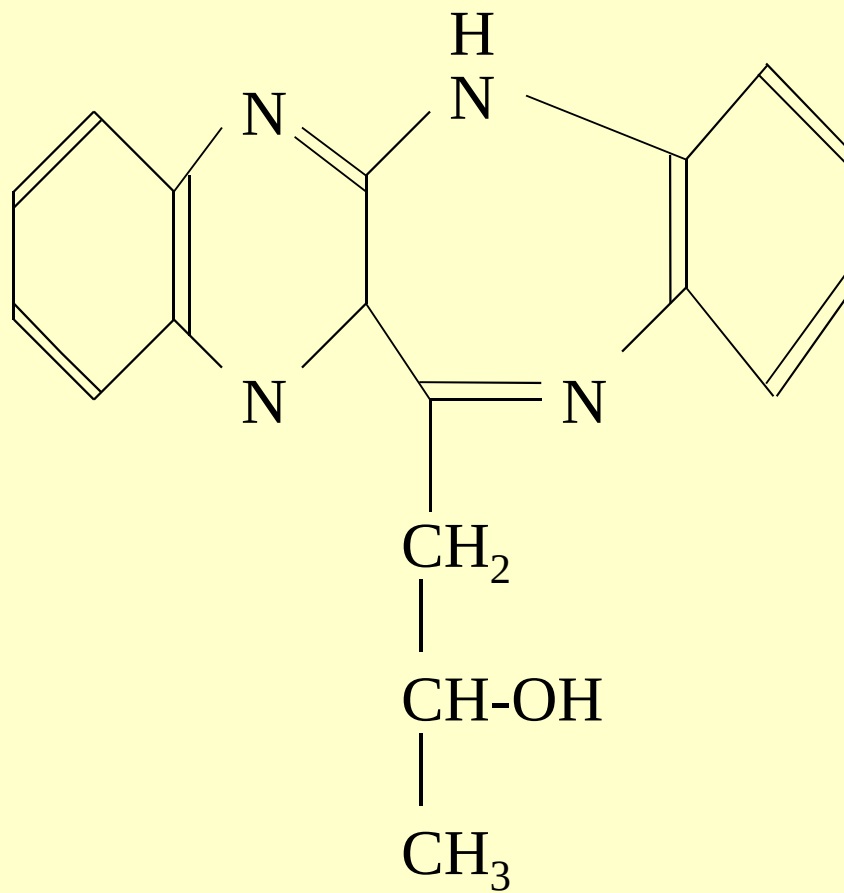
## Sumární vzorec a název



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

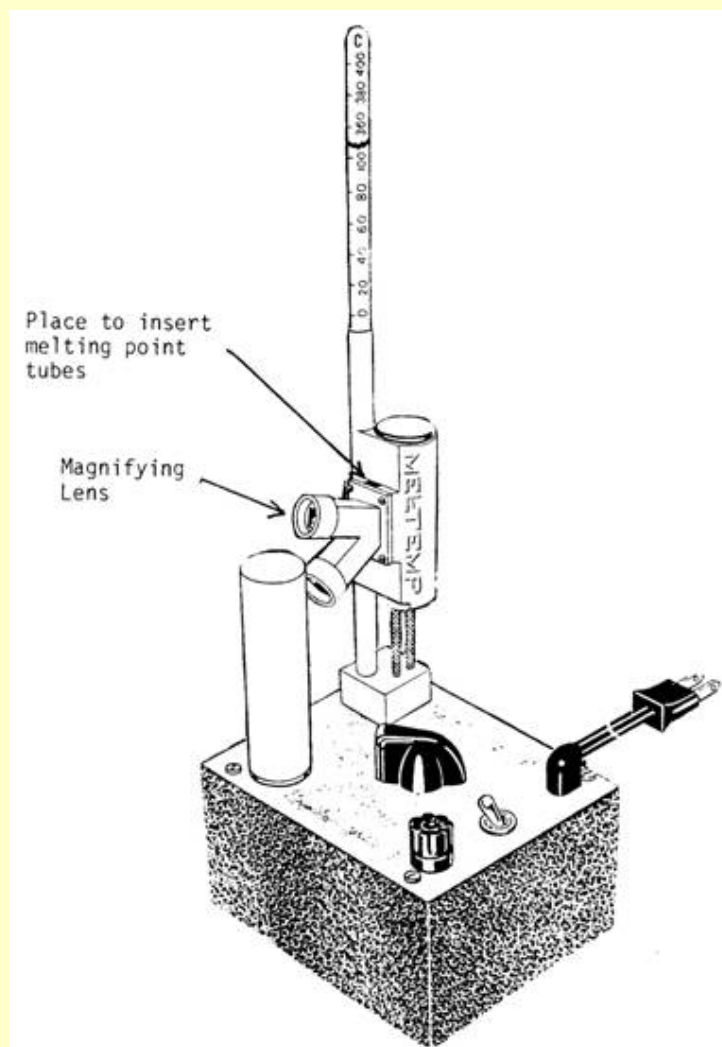
6-(2-hydroxypropyl)-13*H*-benzodiazepino[2,3-*b*]quinoxaline

# Strukturní vzorec





# Bod tání / bod varu / tvar / rozpustnost



Bodotávek (prastarý, 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

# Optická aktivita

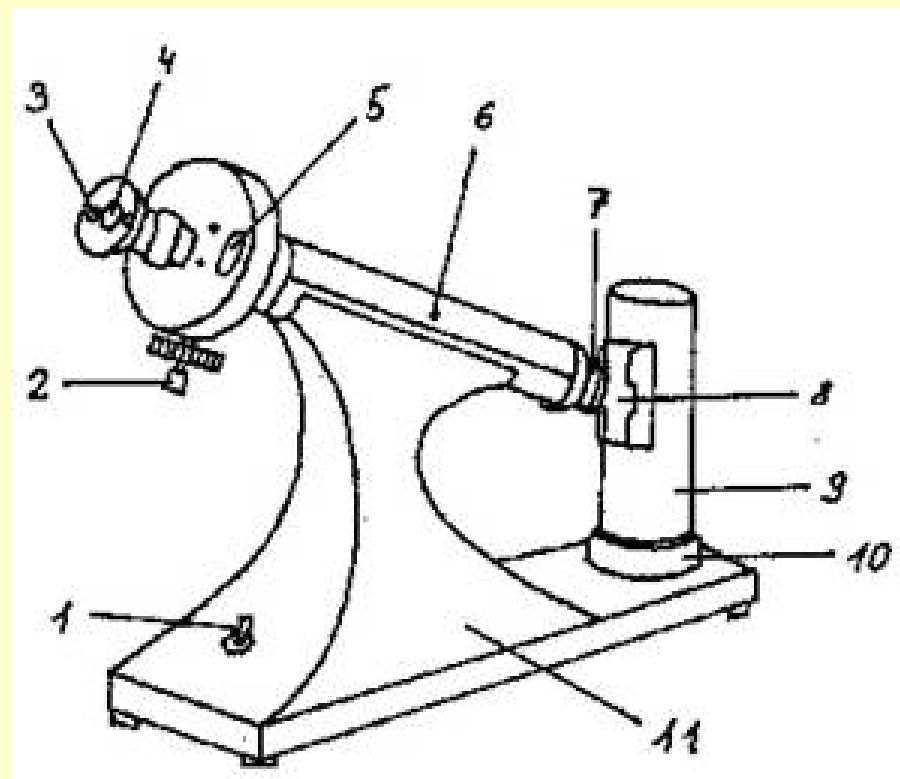
Látky vykazující pravotočivost (tj. stáčejí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček) se označují (+). Levotočivé se označují (–). Obvykle se uvažuje lineárně polarizované světlo; rovina polarizace se po průchodu chirální látkou změní o úhel, který je úměrný délce dráhy, kterou světlo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

# Optická aktivita

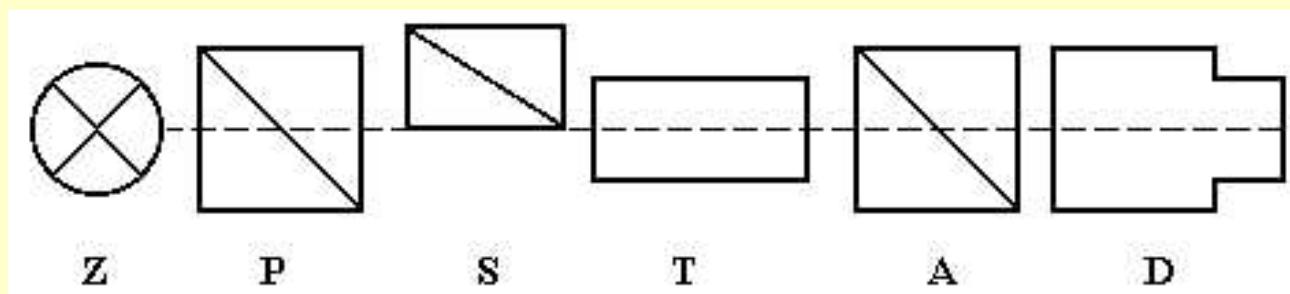
$$c = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \sigma_{20}}$$

kde  $c$  je koncentrace v procentech,  $\alpha$  úhel otočení ve stupních při  $(20 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ ,  $l$  délka polarimetrické trubice v decimetrech,  $\sigma$  hustota při  $20^\circ\text{C}$  v  $\text{g/cm}^3$ .

# Optická aktivita



# Optická aktivita



*Optické uspořádání polarimetru.*

*Z ... zdroj monochromatického záření (sodíková výbojka)*

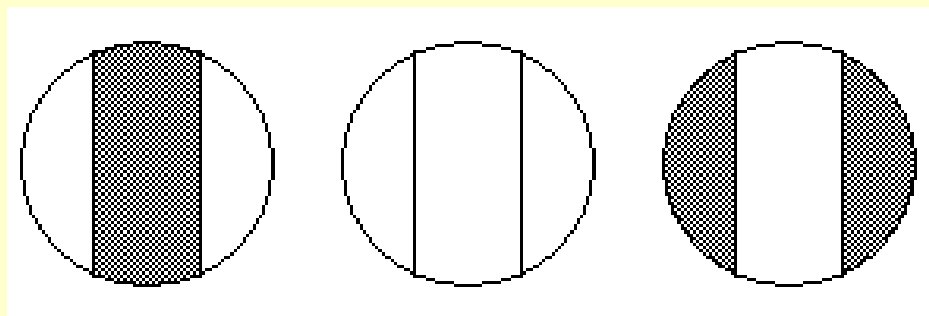
*P ... polarizátor*

*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
- 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*



# 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 $\lambda$ (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 jejích UV/VIS spekter s UV/VIS spektrem standardu.

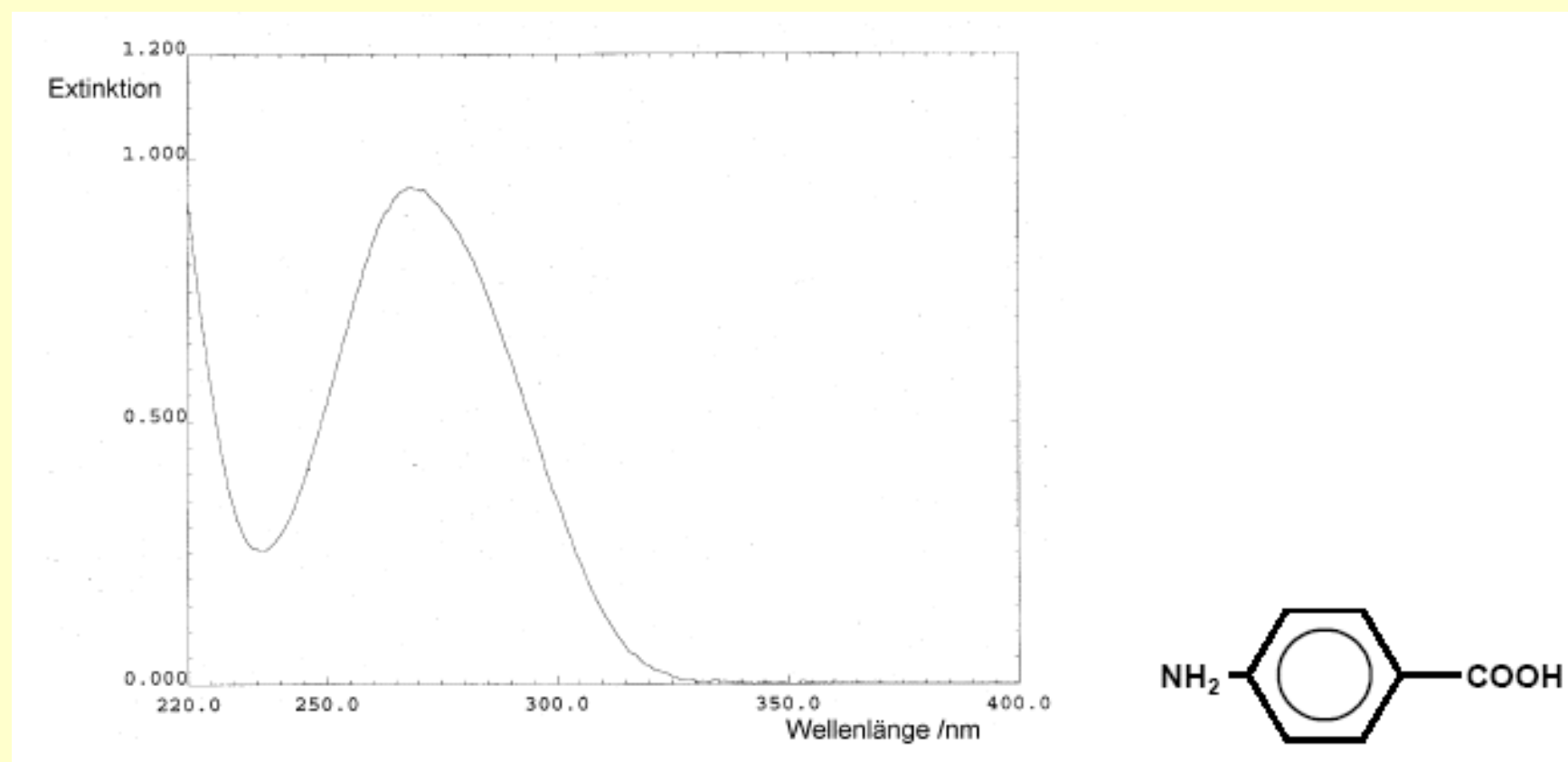
# UV/VIS spektrofotometrie

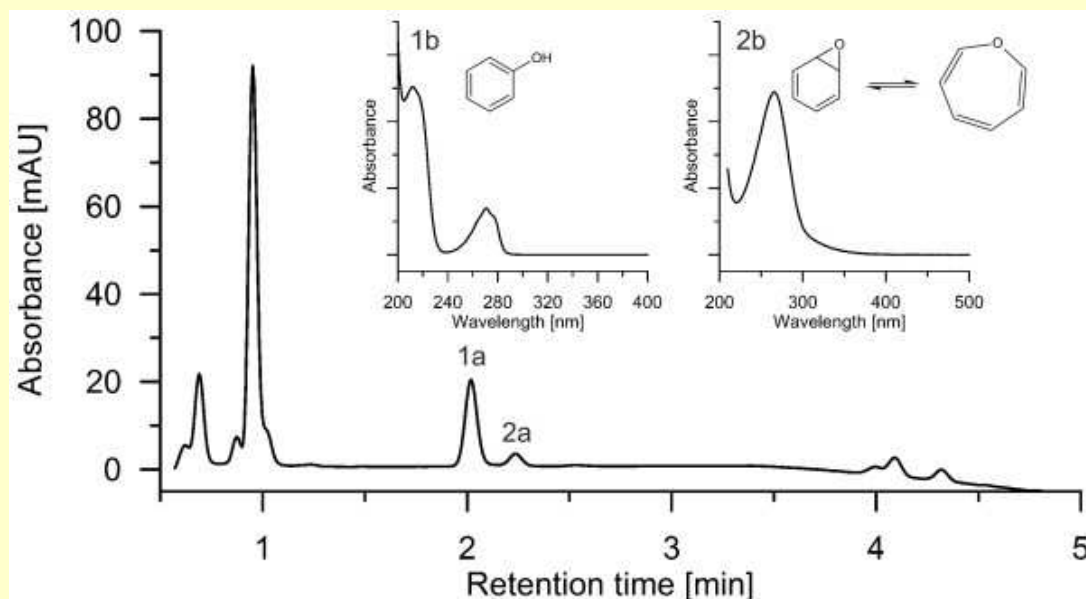
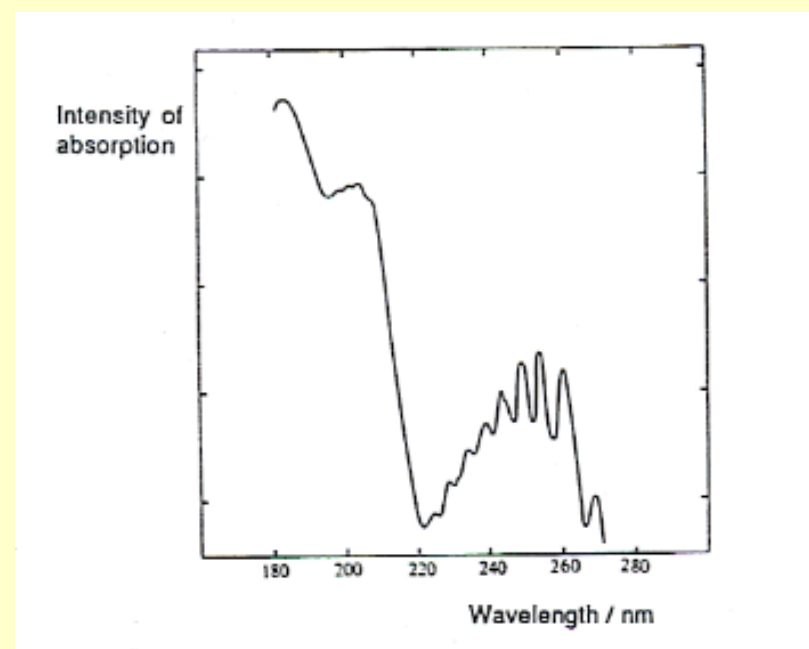
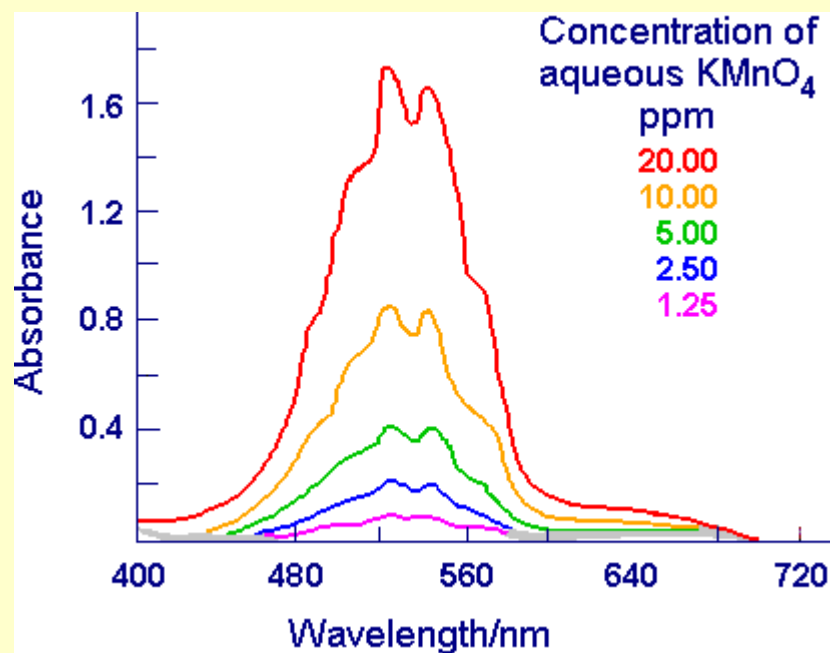
## Příklady chromoforových skupin

| skupina               | $\lambda$ (nm) |
|-----------------------|----------------|
| $>\text{C}=\text{O}$  | 280            |
| $>\text{C}=\text{N}-$ | 300            |
| $-\text{N}=\text{N}-$ | 350            |
| $>\text{C}=\text{S}$  | 500            |
| $>\text{N}=\text{O}$  | 650            |

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

# UV/VIS spektrum





**UV/VIS**  
**spektrofotometrie:**  
 použití samostatné  
 (UV/VIS) spektra,  
 nebo jako detektor  
 (DAD) v (HPLC)  
 chromatografii

# 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  $\epsilon$ )

# Infračervená spektrofotometrie (IR)

IČ („*infrared*“) spektrofotometrie je založena na interakci elektromagnetického záření o vlnočtu ( $\nu$ ), 10 až 10 000  $\text{cm}^{-1}$  s měřeným vzorkem.

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

Mluvíme o vibračně-rotačních molekulových spektrech.

# Infračervená spektrofotometrie (IR)

Vibrace se dělí do dvou základních skupin:

- a) Valenční – mění se vzdálenost mezi atomy, ale valenční úhly zůstávají zachovány
- b) 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)

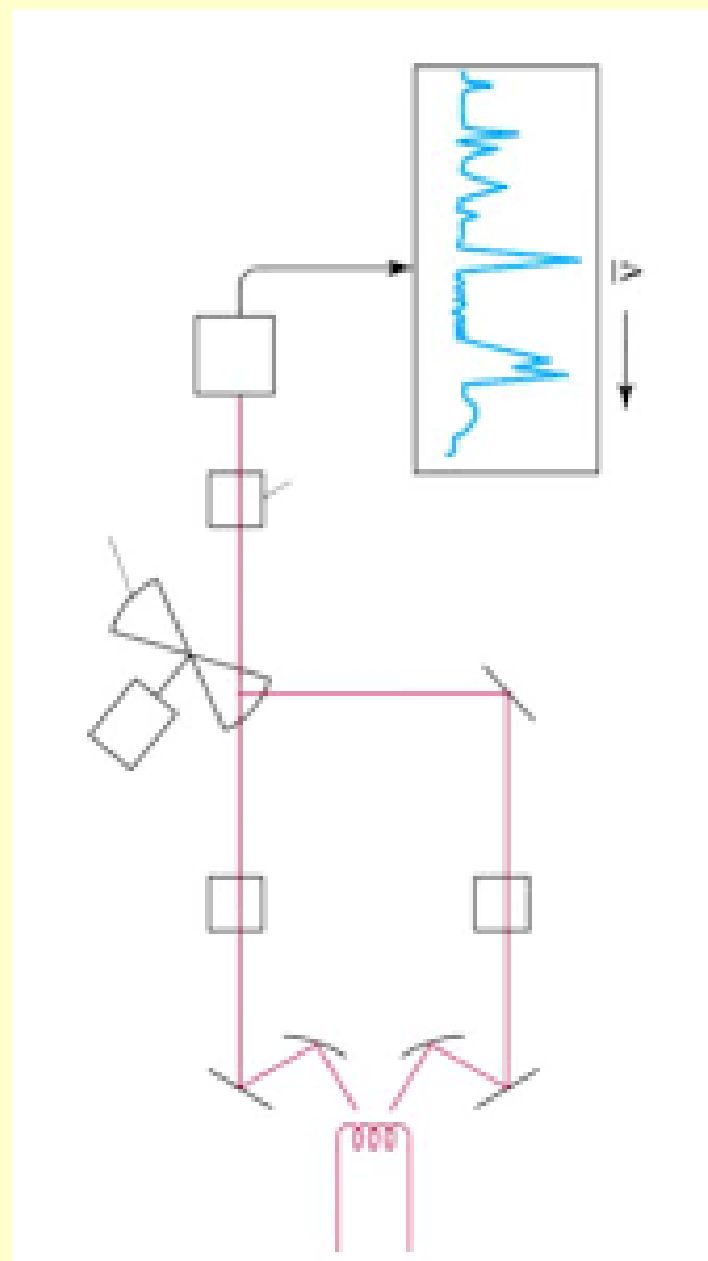
## Základní instrumentace

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

Měrná kyveta: okénka z NaCl (kapaliny, roztoky v  $\text{CHCl}_3$  nebo nujolu)  
slisovaná tableta KBr (pevné látky)

Detektor: termočlánek





# Infračervená spektrofotometrie (IR)

IR spektrum je závislost transmittance (T, %) na vlnočtu ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )

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

# Infračervená spektrofotometrie (IR)

(Reálně se měří v oblasti  $400 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ )

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

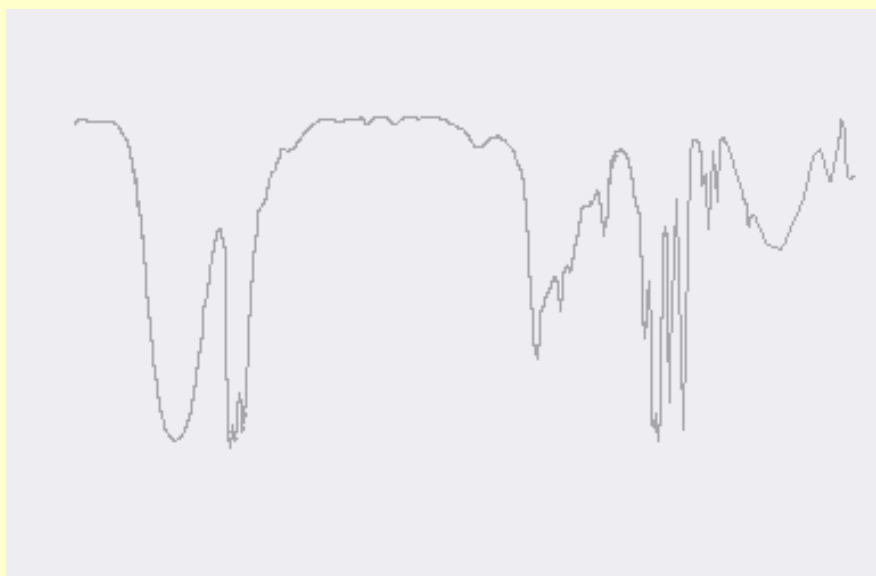
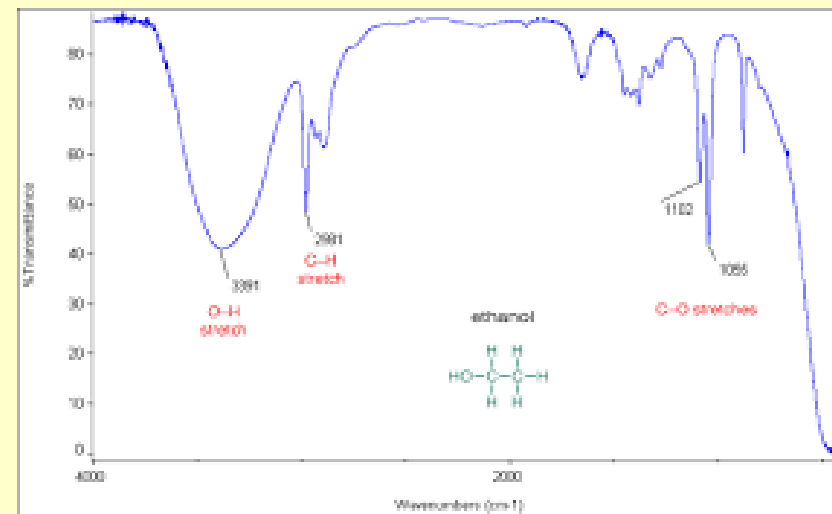
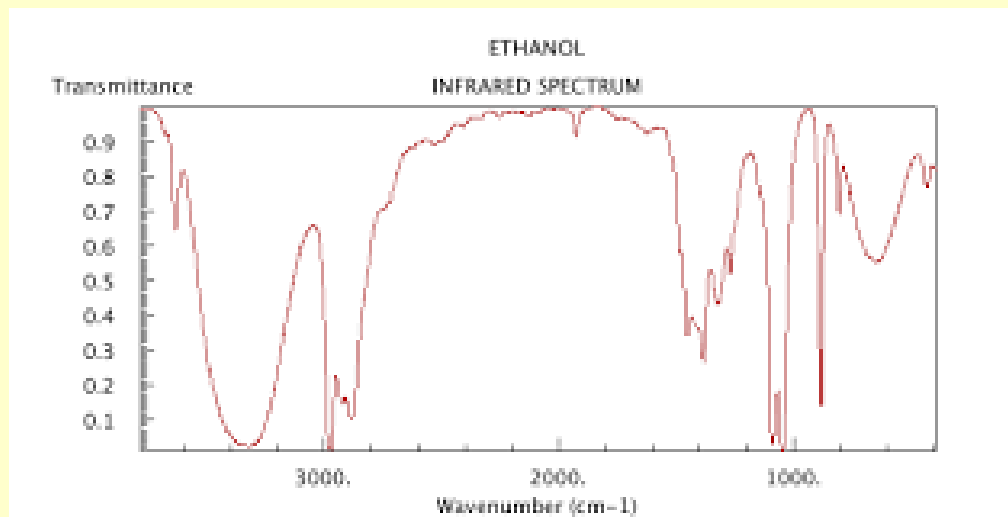
Oblast mezi  $1000$  a  $1350\text{ cm}^{-1}$  : valenční a deformační vibrace C-C, C-N  
a C-O vazeb (oblast otisku prstu)

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

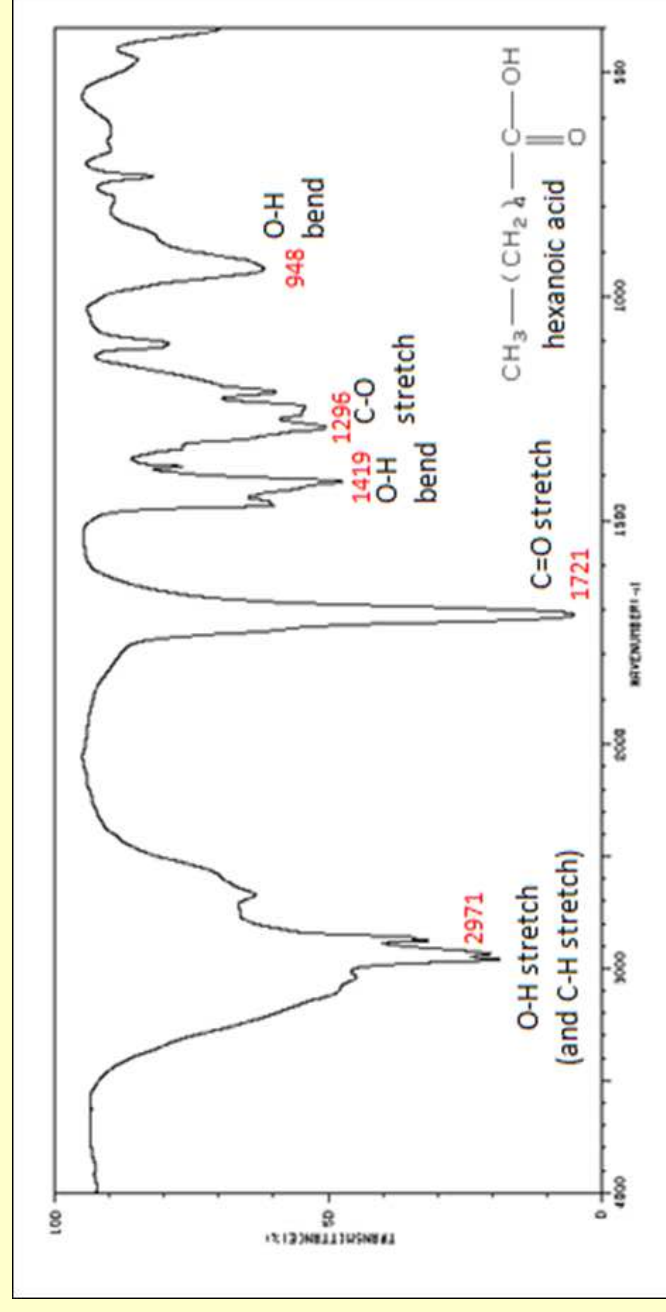
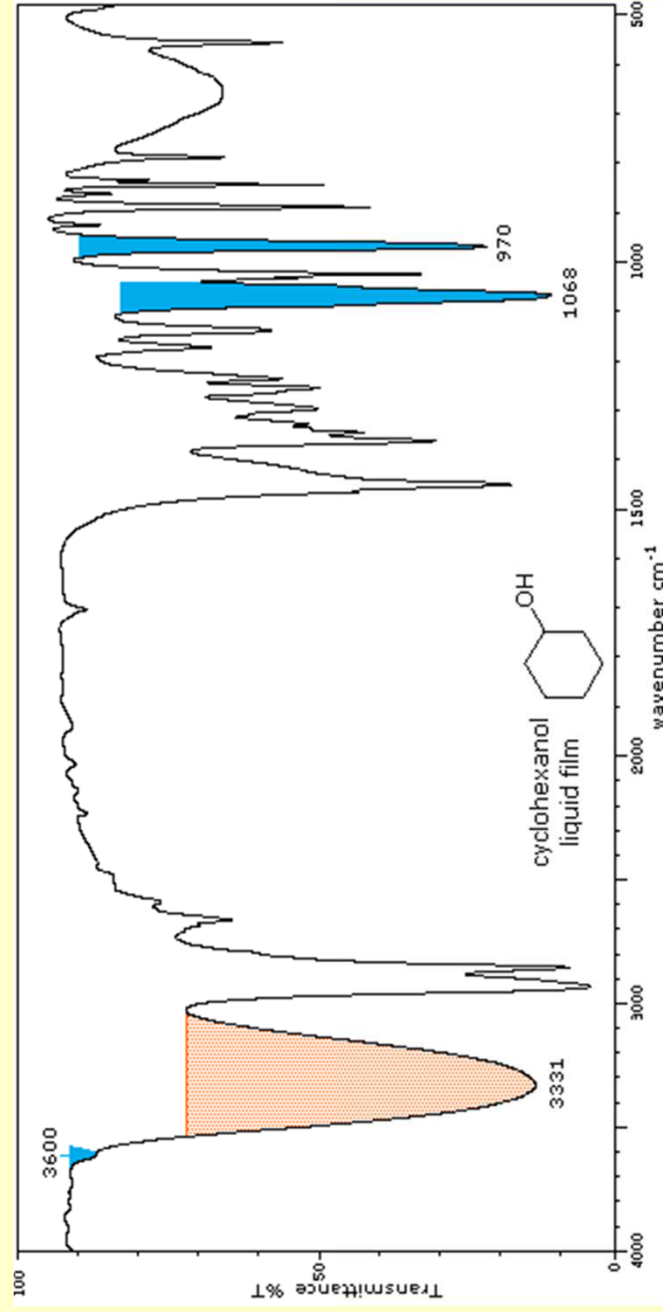
# Infračervená spektrofotometrie (IR)

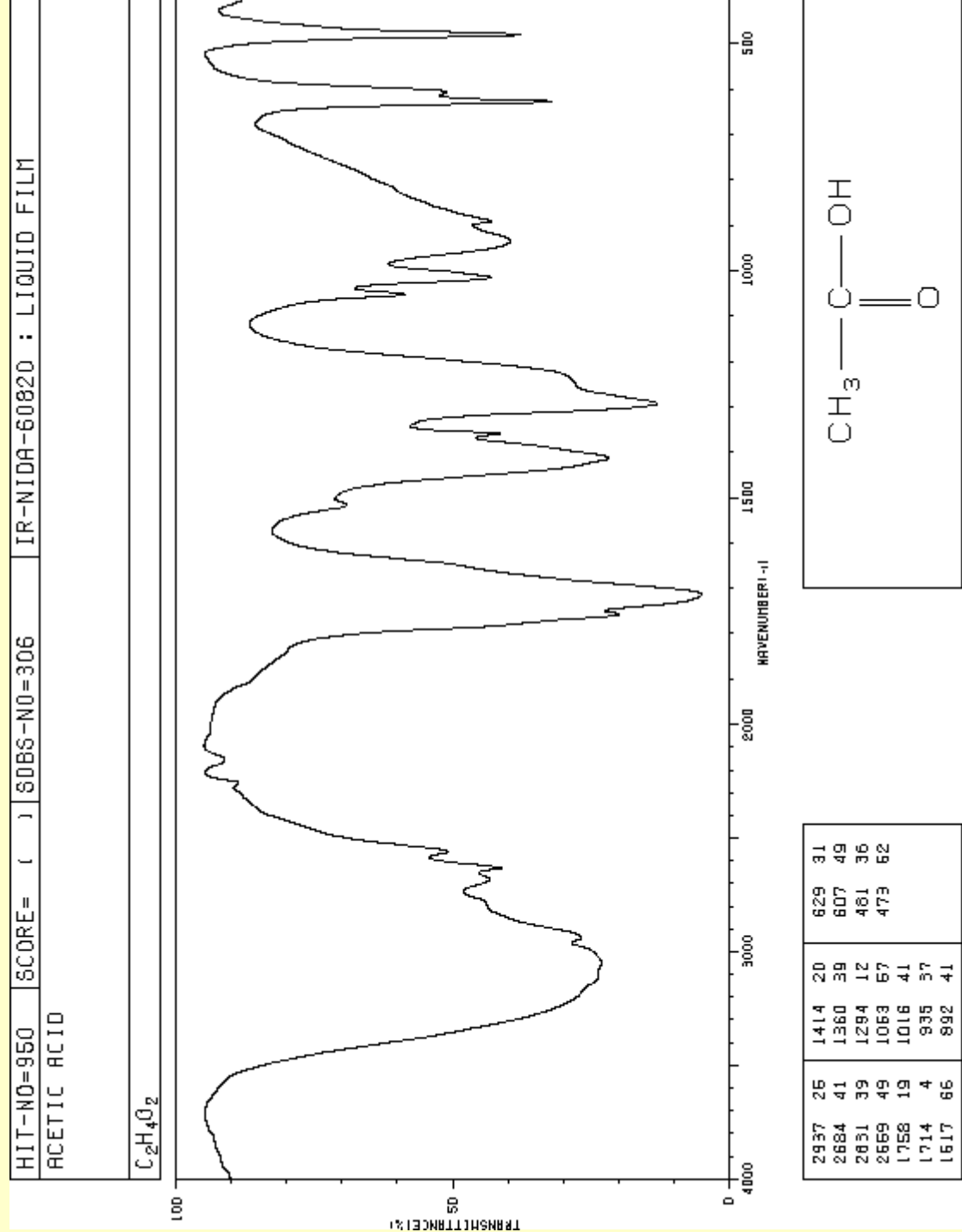
Příklady charakteristických pásů v IR spektrech:

| Skupina          | $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ |
|------------------|--------------------------|
| -OH              | 3600-3650                |
| -NH <sub>2</sub> | 3370-3420                |
| -H aromat.       | 3000-3080                |
| -SH              | 2580                     |
| C=O              | 1700-1770                |
| -NH <sub>2</sub> | 1590-1650                |
| C=S              | 1100                     |
| C-Cl             | 600-800                  |



IR spektrum ethanolu (nahore)  
a 1-propanolu (dole); dobre  
Jsou viditelne pasy na 3600 cm-1  
(OH- ) skupina a 3000 cm-1  
(C-H) vazba





# 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.



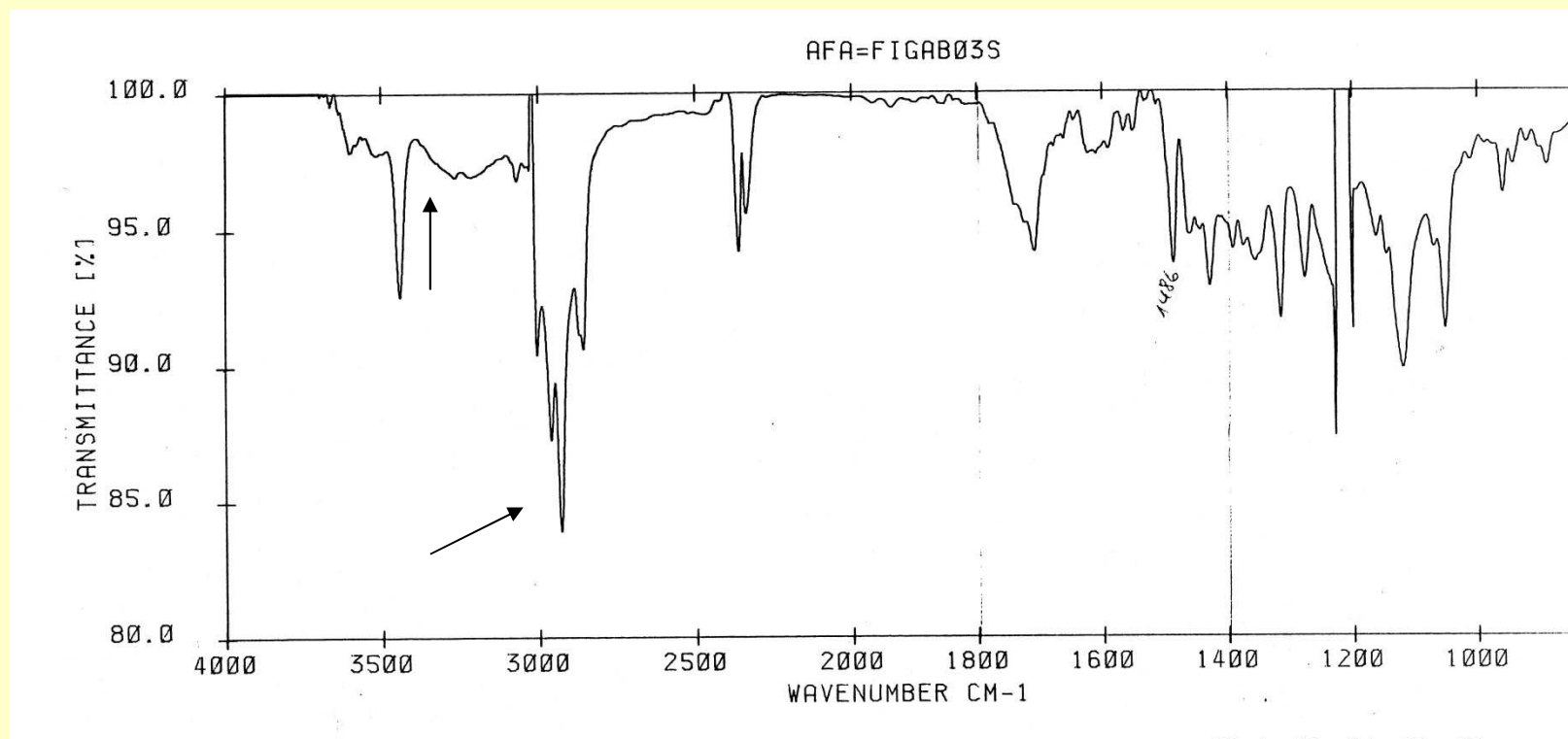


Laboratorní infračervený spektrograf

1969

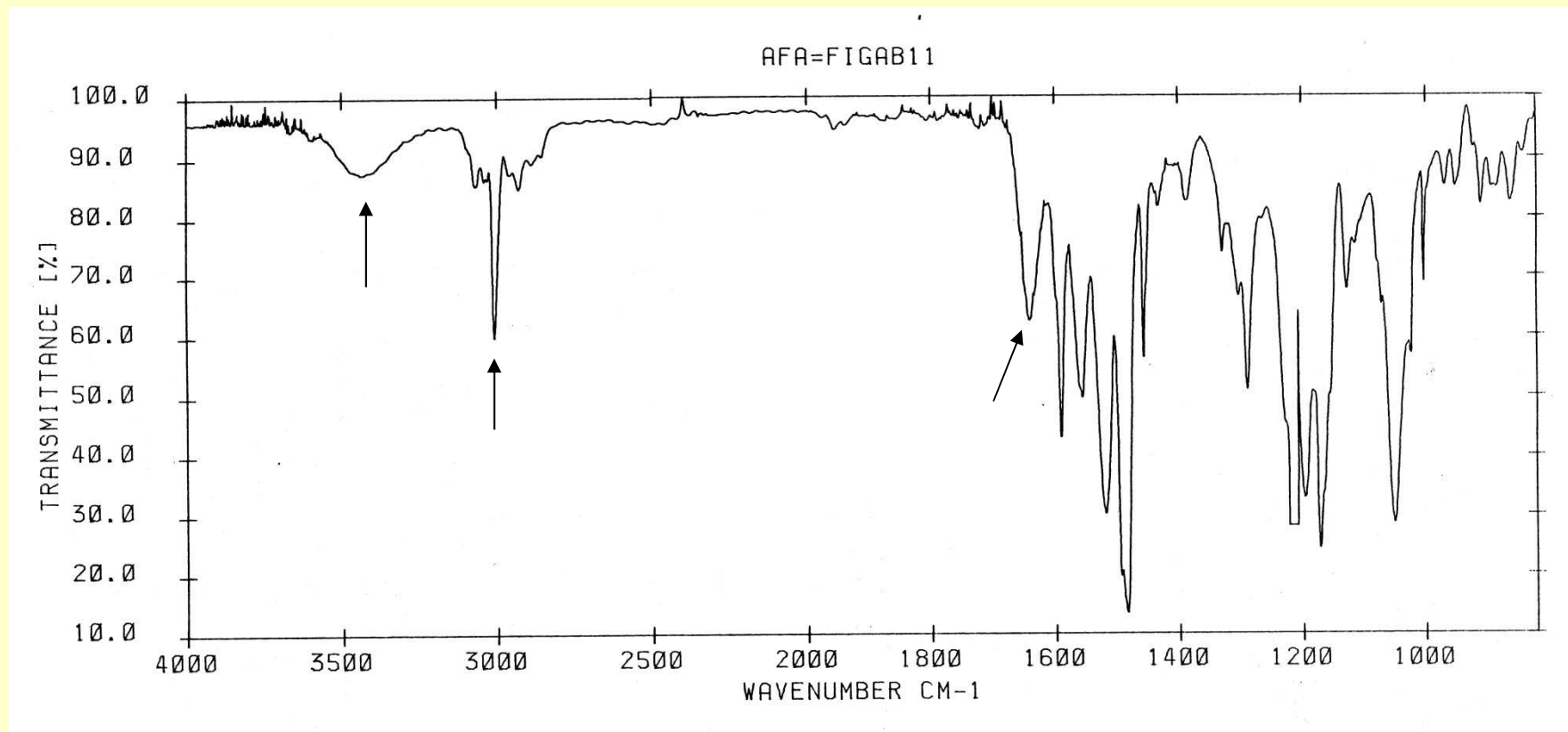
# Infračervená spektrofotometrie (IR)

**IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 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  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ .



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).



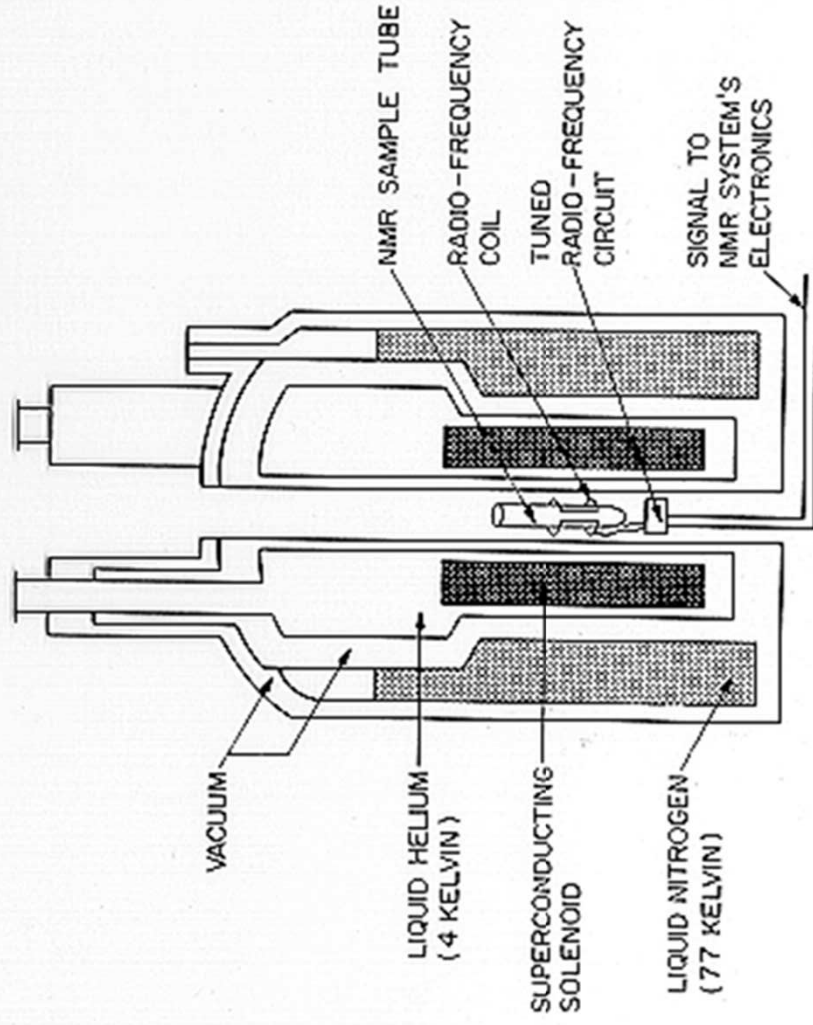
# Nukleární magnetická rezonance (NMR)

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

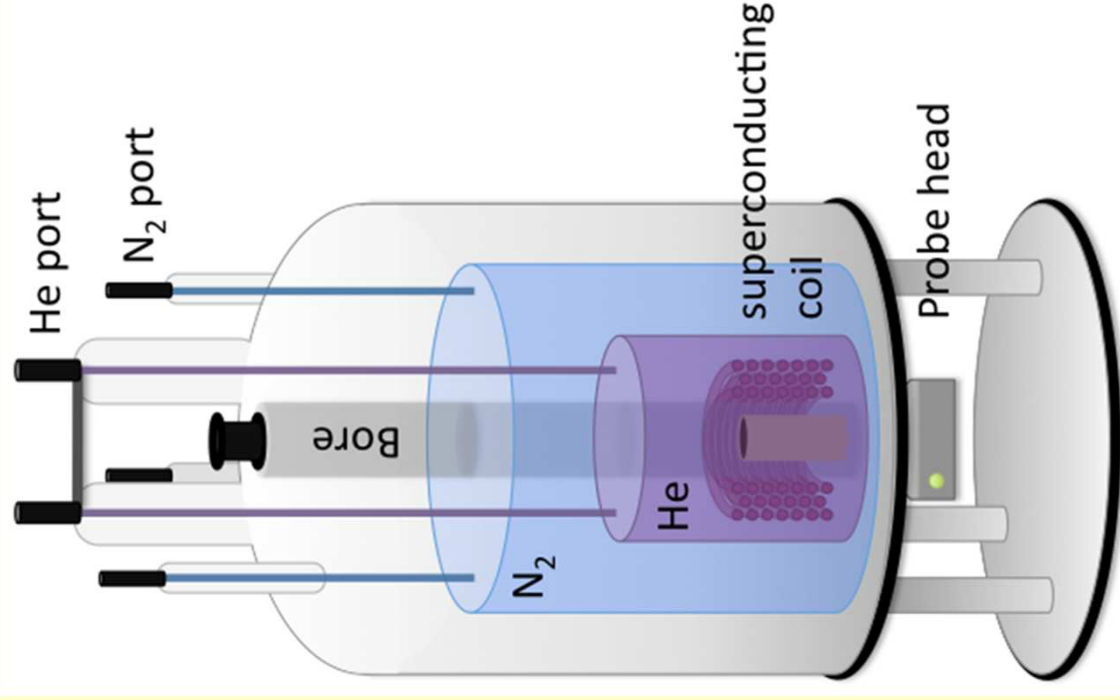
V místě jádra tedy není magnetické pole  $B_0$ , ale protože elektrony chemických vazeb odstíňují vnější pole, je menší o hodnotu tzv. stínění.

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.

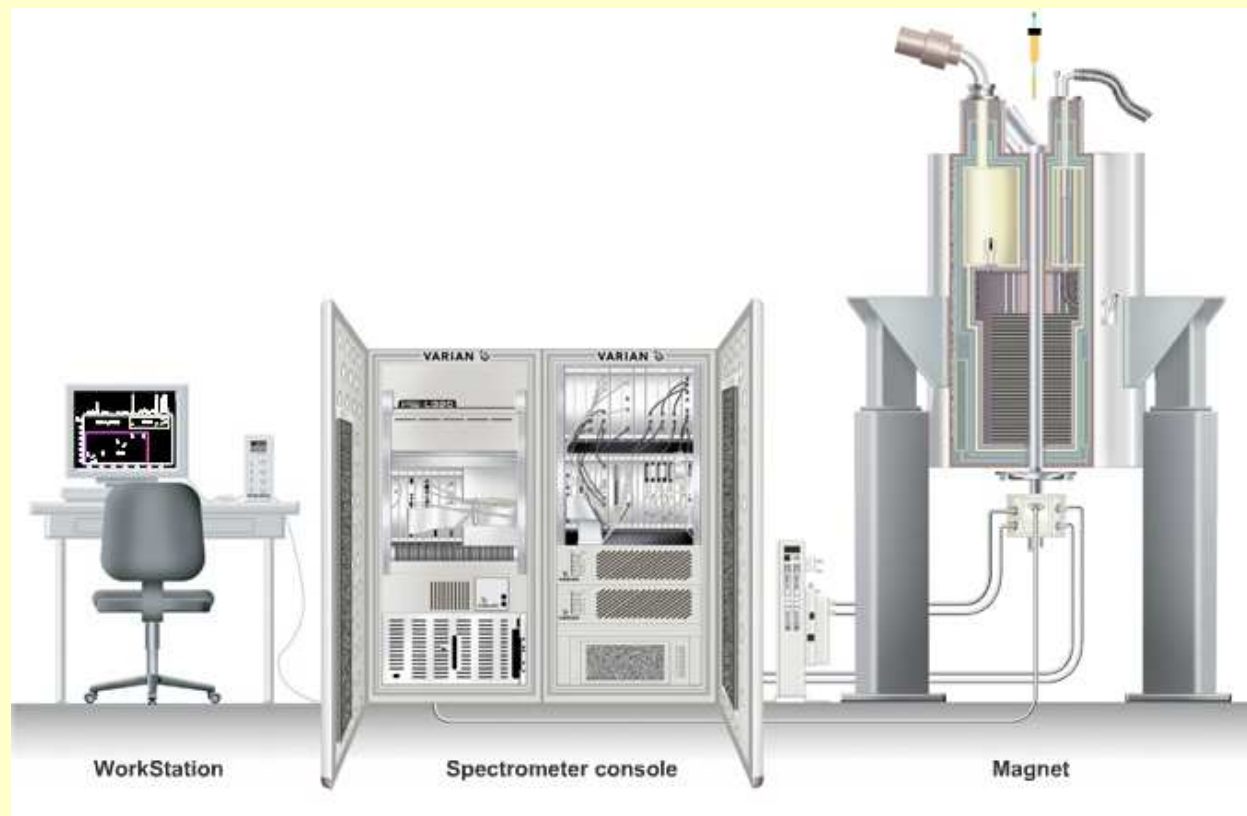


Cross-section of a superconducting magnet for NMR spectroscopy. The magnet and sample tube are not drawn on the same scale. The diameter of the magnet assembly is approximately 70 cm, while that of the sample tube is approximately 1 cm.





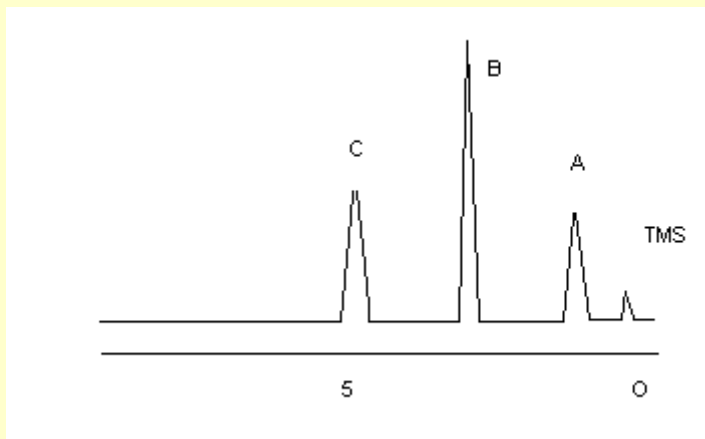
# Nukleární magnetická rezonance (NMR)



# Nukleární magnetická rezonance (NMR)

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

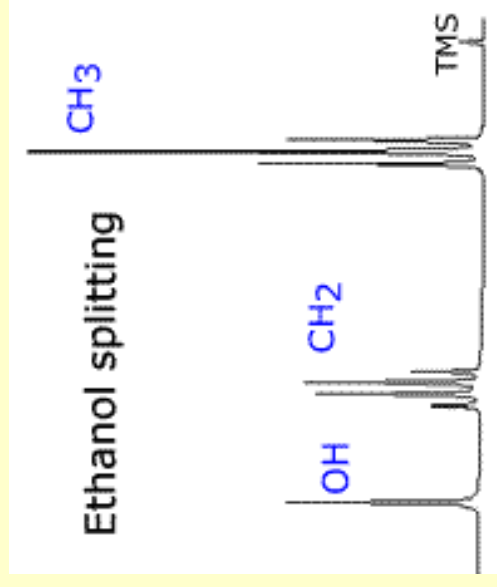
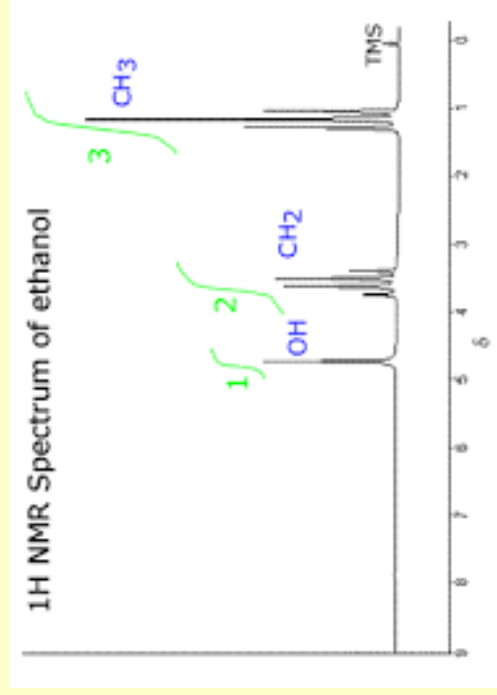
(A) (C) (B)



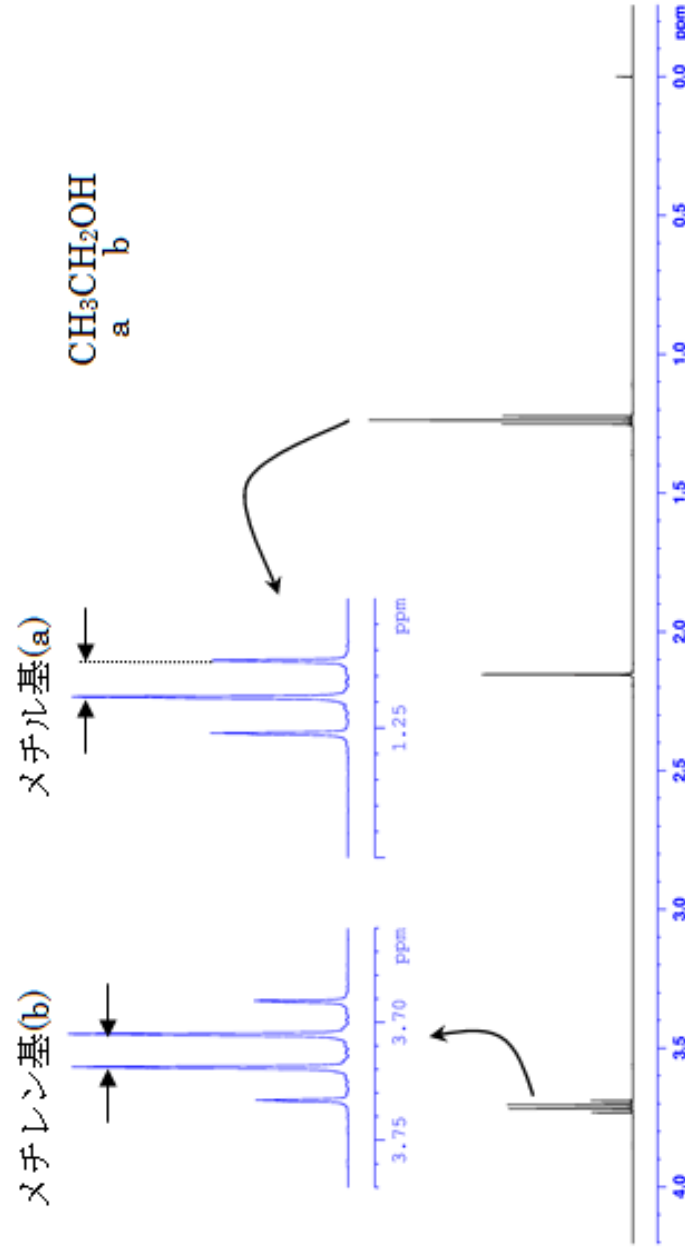
Informace o umístění protonů v molekule (včetně konformace)

Informace o umístění uhlíkových atomů v molekule (včetně konformace)

Informace o přítomnosti a počtu funkčních skupin



スピン結合定数 (7.1 Hz、矢印間)



# 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 ( $m/e$ )

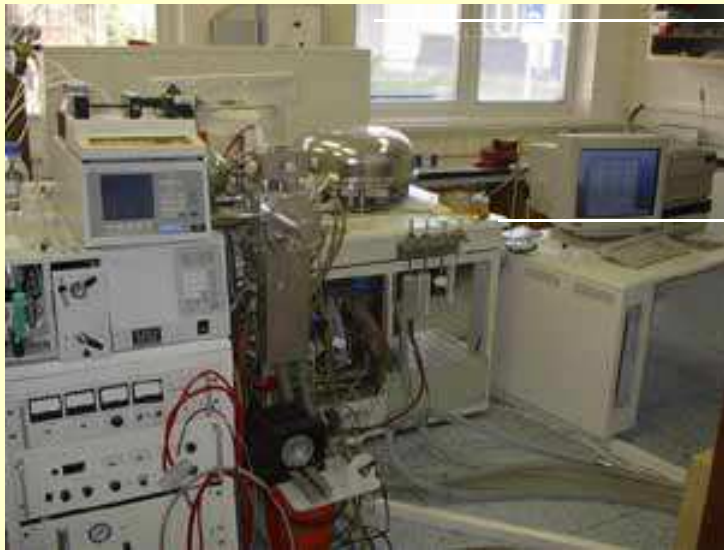
$m$  hmotnost částice

$e$  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,  $\mu$ -ESI, APCI, FAB, EI, CI, DCI, FD, FI)



**BRUKER APEX-Q-MTMS**

# 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.

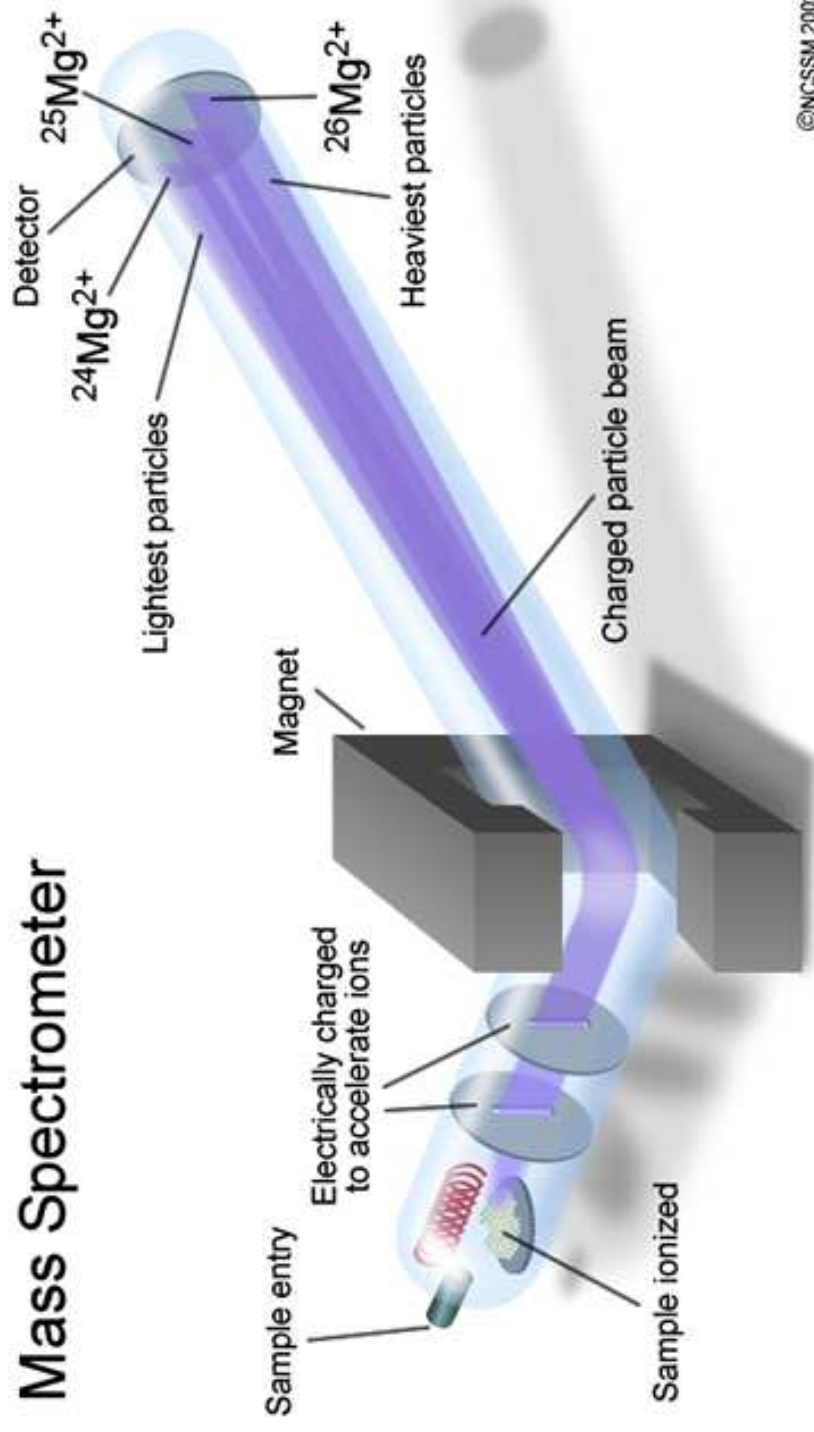
Nejdůležitější je molekulový ion –  $[M]^+$  při ionizaci elektrony  
–  $[M+1]^+$  při chemické ionizaci

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

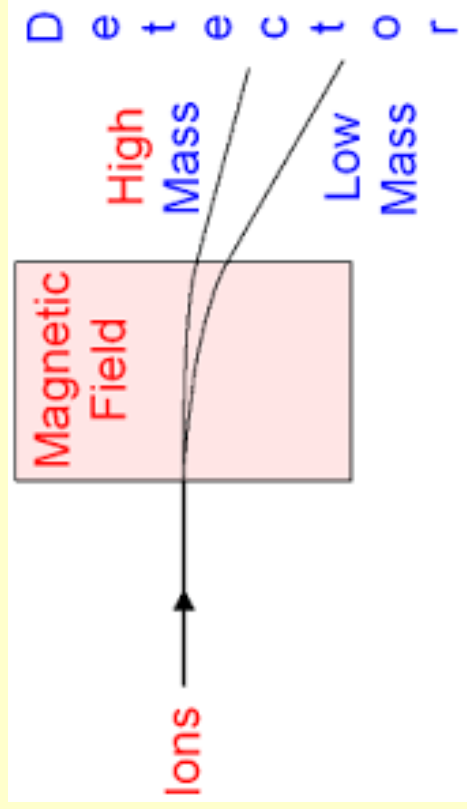
Pro každou hodnotu  $m/e$  lze vypočítat složení  $C_xH_yO_zN_w\dots$

Ze struktury a poměrného zastoupení iontů lze odvodit strukturní vzorec.

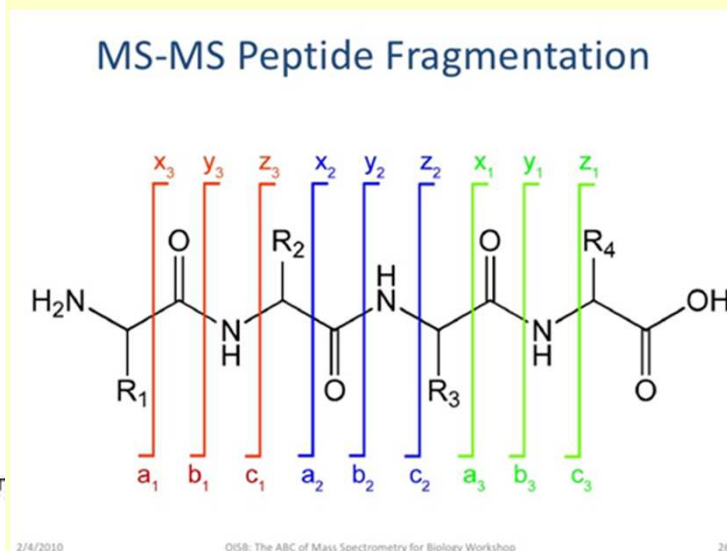
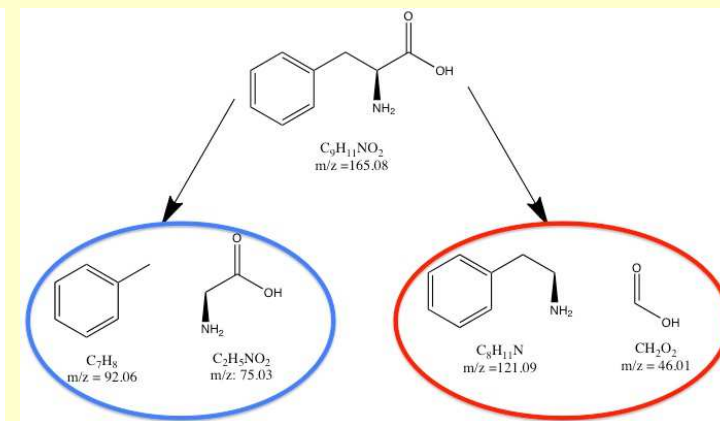
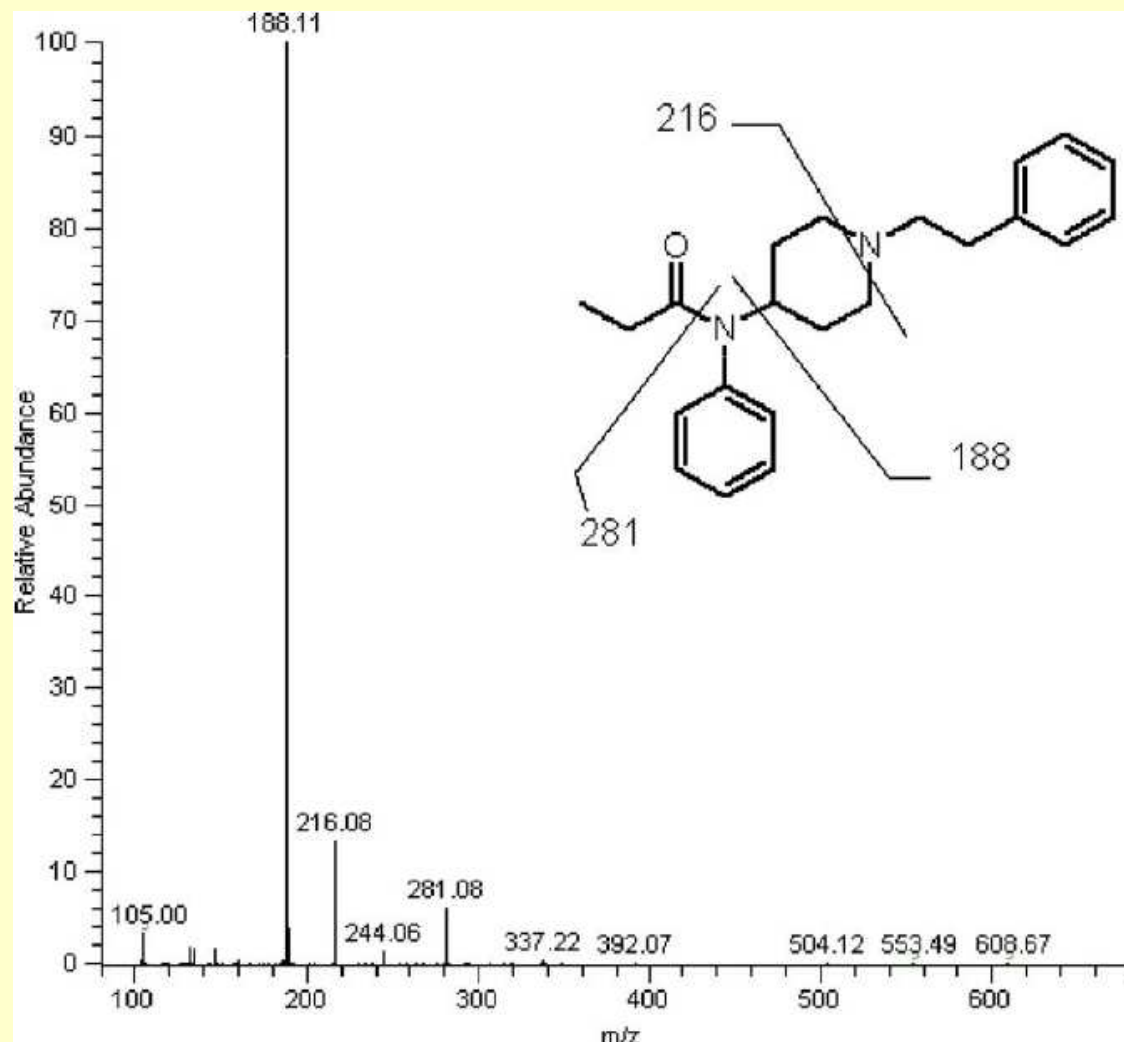
# Mass Spectrometer



©NCSSM 2002







Příklady fragmentace malých molekul a makromolekul; MS technikou lze detekovat molekuly až o velikosti 1 milionu  $m/z$  (např. dokonce celé virové částice)

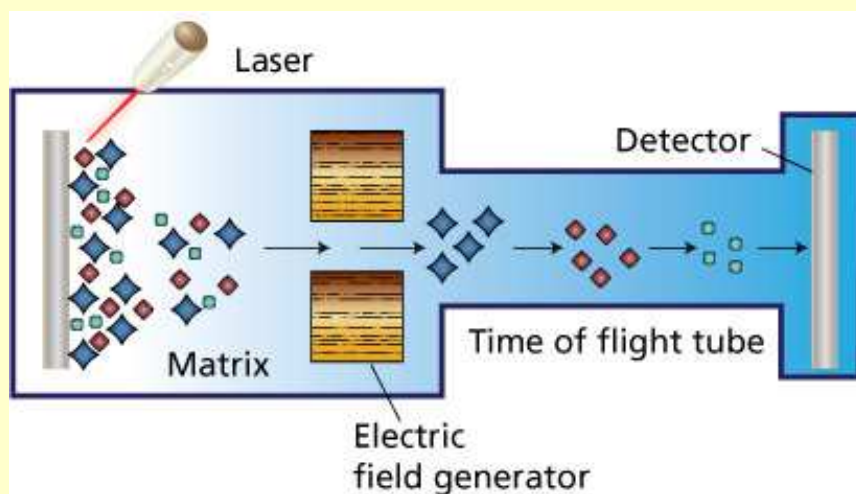
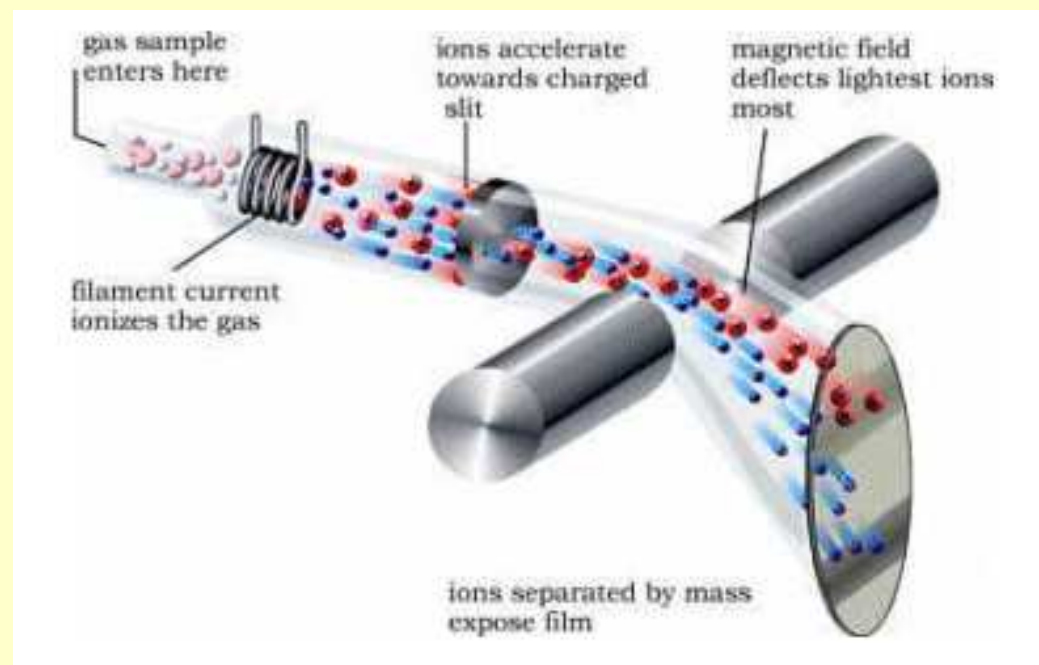
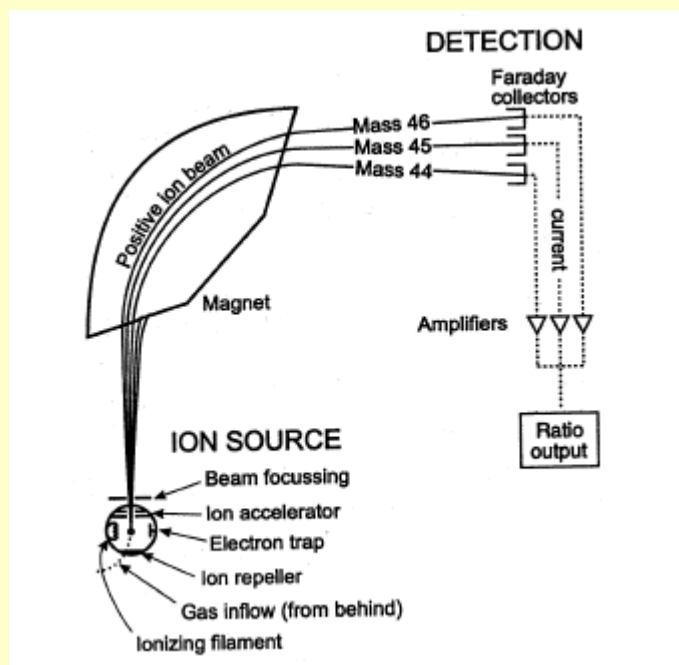
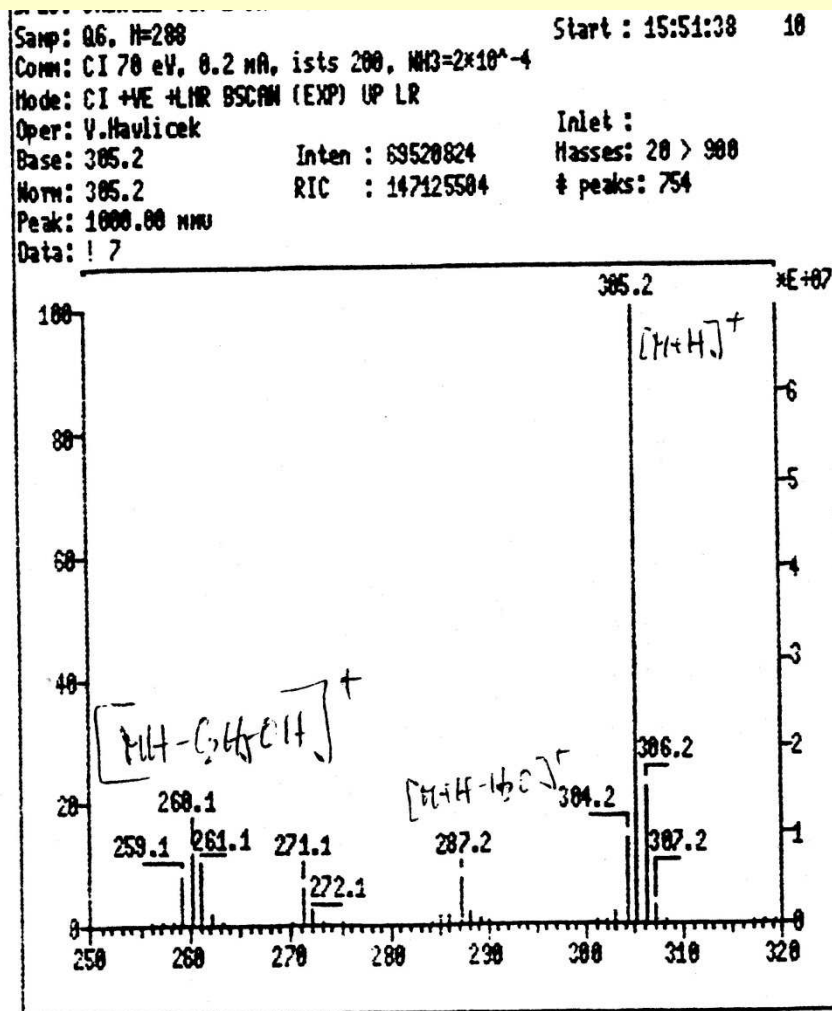


Schéma klasického MS spektrometru (nahore) a MS spektrometru „MALDI-TOF“ (dole vlevo)

Pro proteiny: matrice obsahuje kyselinu skořicovou

# Hmotnostní spektrometrie (MS)



Příklad spektra (Q6), MW 304

Molekulový ion (M+H) 305

Molekulový ion – H<sub>2</sub>O

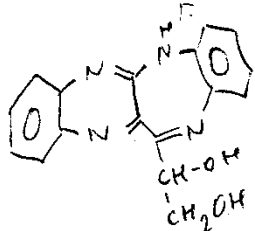
$$305 - 18 = 287$$

Molekulový ion – CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH

$$305 - 46 = 259$$

Q13 /Gabriel

isolováno ze směsi D-xylosonu + o-fenylendiami-  
nu preparat. TLC CHCl<sub>3</sub>-EtOH 24:1, patrně analog  
látky Q7; předpokl. struktura:



Je-li to ono, pak:

Mw 306

oček. signály:

288 /-H<sub>2</sub>O/

275 /-CH<sub>2</sub>OH/ (7444444)

245 /quinox.zbytek/

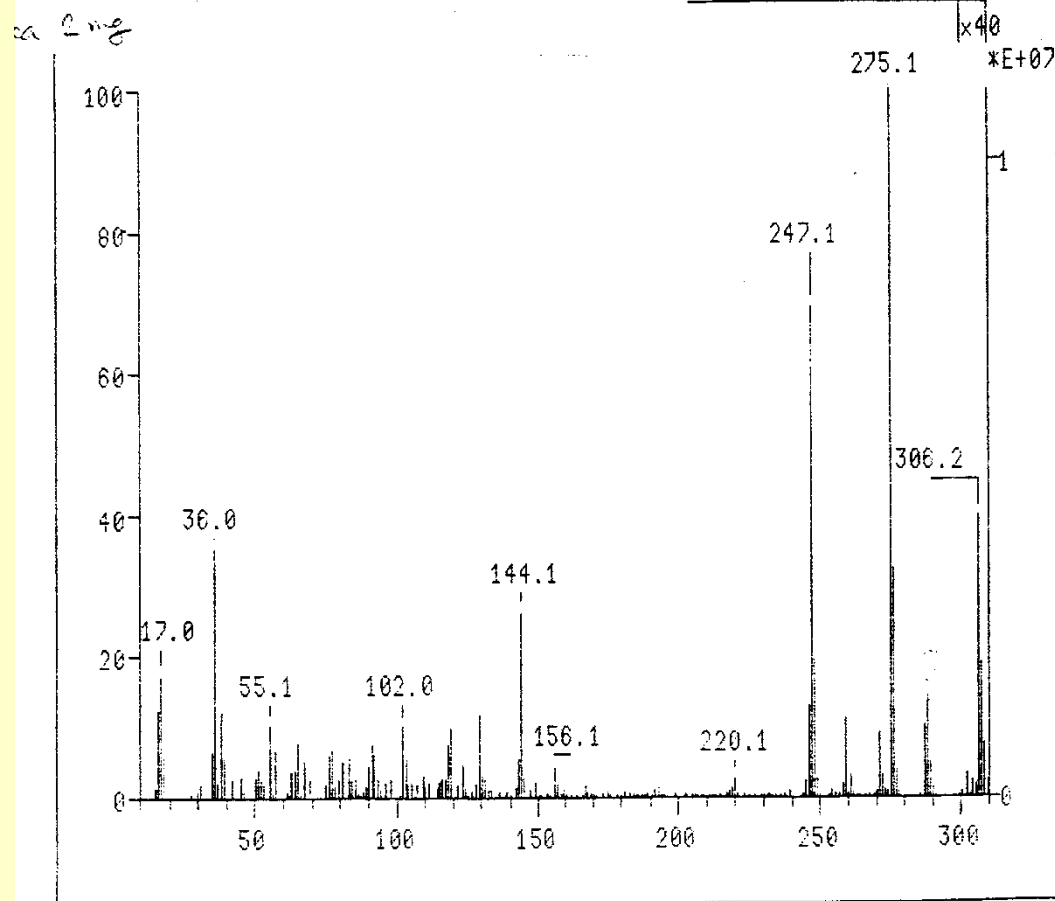
1 DERIVED SPECTRUM 9

Start : 15:39:25 10

Inlet :

Masses: 10 > 900

# peaks: 739



# 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)