

Odhalení tajemství:

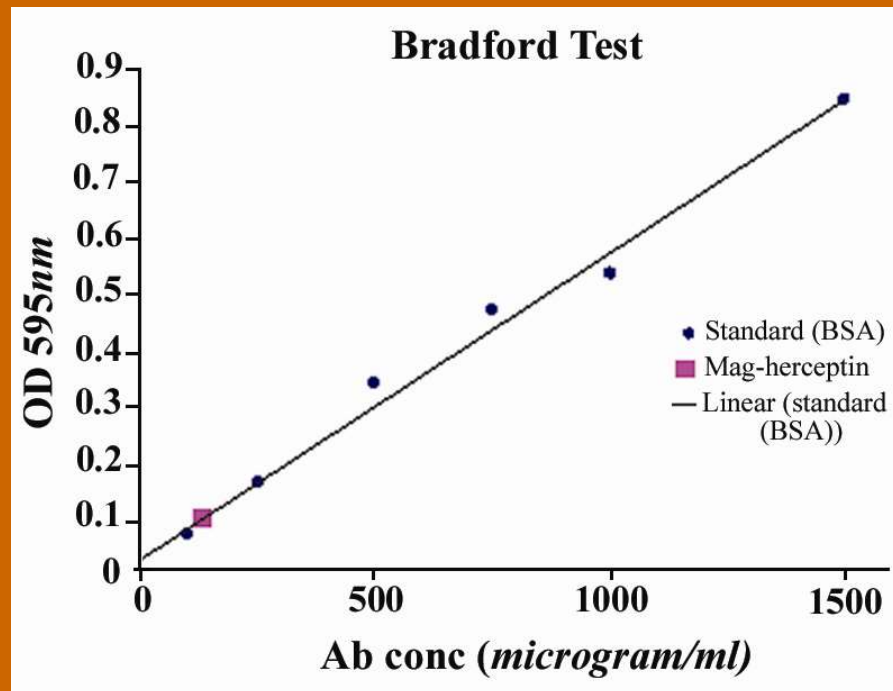
Protein Concentration Determination by the Bradford Assay

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

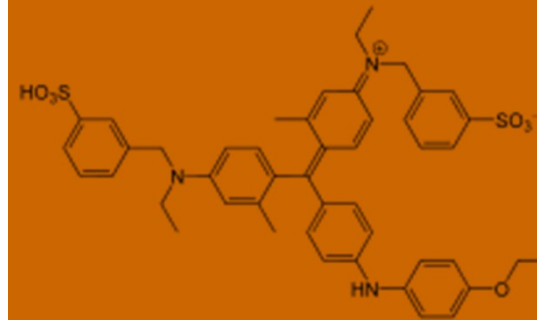
Detailed studies indicate that the free dye can exist in four different ionic forms for which the pKa values are 1.15, 1.82, and 12.4. Of the three charged forms of the dye that predominate in the acidic assay reagent solution, the more cationic red and green forms have absorbance maxima at 470 nm and 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**.

*Marion Bradford (*1946)*



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



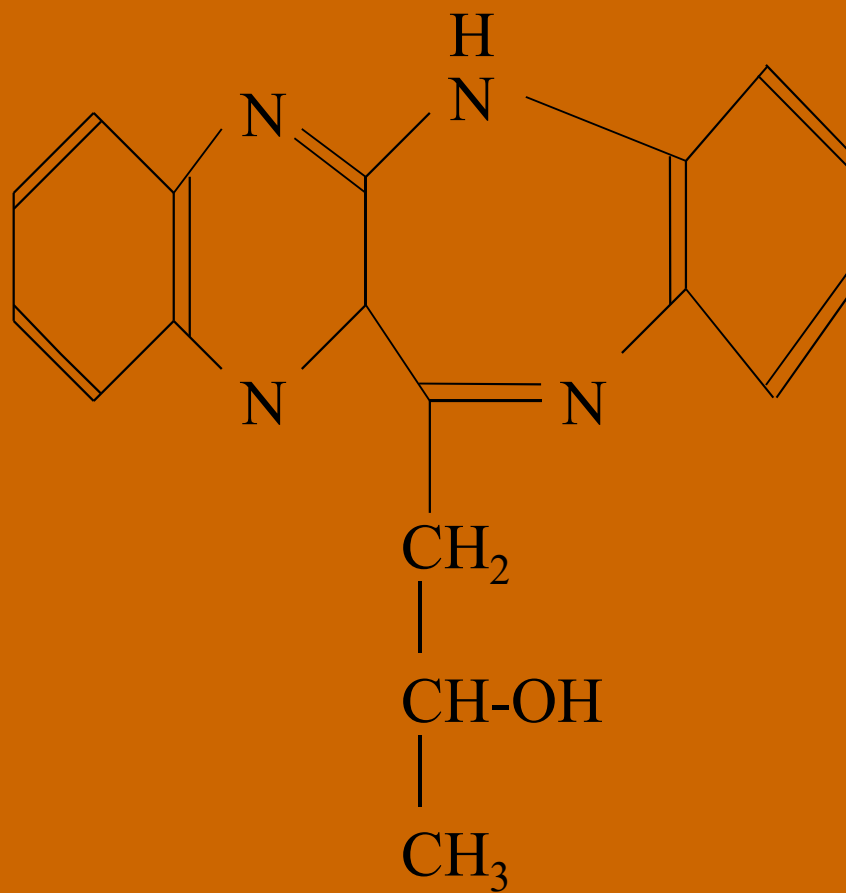
Experimentální prozařovací elektronový mikroskop
– 100 kV (L. Zobač, V. Drahoš, J. Speciální a sedící
A. Delong) 1954

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 ze spekter se nyní bezpečně a standardně odvozuje struktura molekuly organické látky

Strukturní vzorec



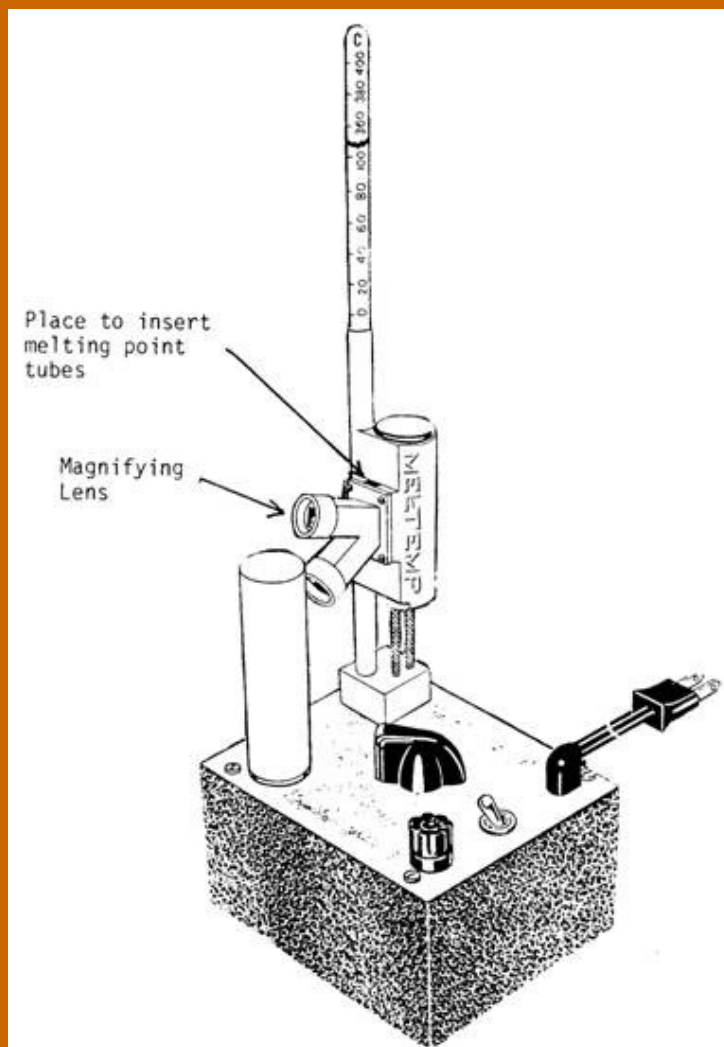
Sumární vzorec a název



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

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

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

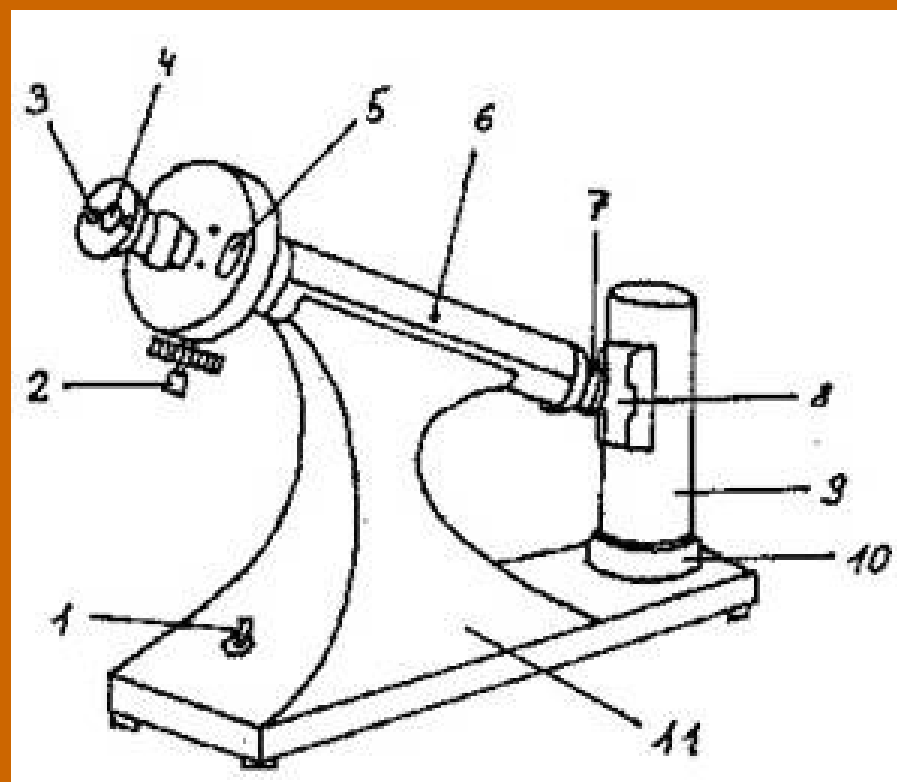
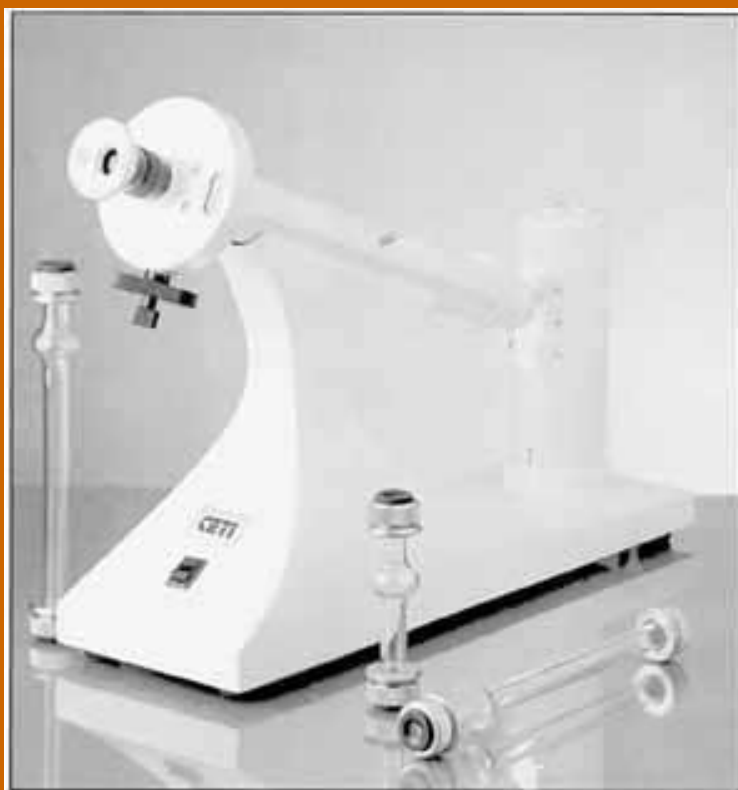
Látky vykazující pravotočivost (tj. stáčí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček) se označují (+). Levotočivé se označují (–). Obvykle se uvažuje lineárně polarizované světlo; rovina polarizace se po průchodu chirální látkou změní o úhel, který je úměrný délce dráhy, kterou světlo v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

Optická aktivita

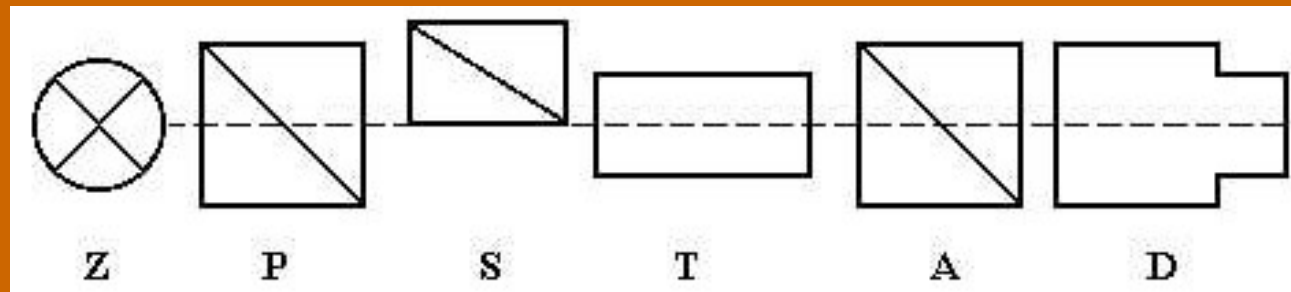
$$c = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \sigma_{20}}$$

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

Optická aktivita



Optická aktivita



Optické uspořádání polarimetru.

Z ... zdroj monochromatického záření (sodíková výbojka)

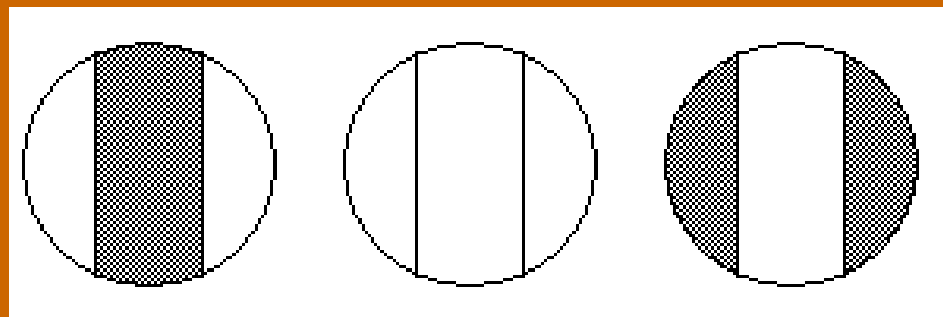
P ... polarizátor

S ... polostínové zařízení

T ... polarimetrická trubice (kyveta)

A ... analyzátor

D ... dalekohled



Každá nová organická látka se charakterisuje

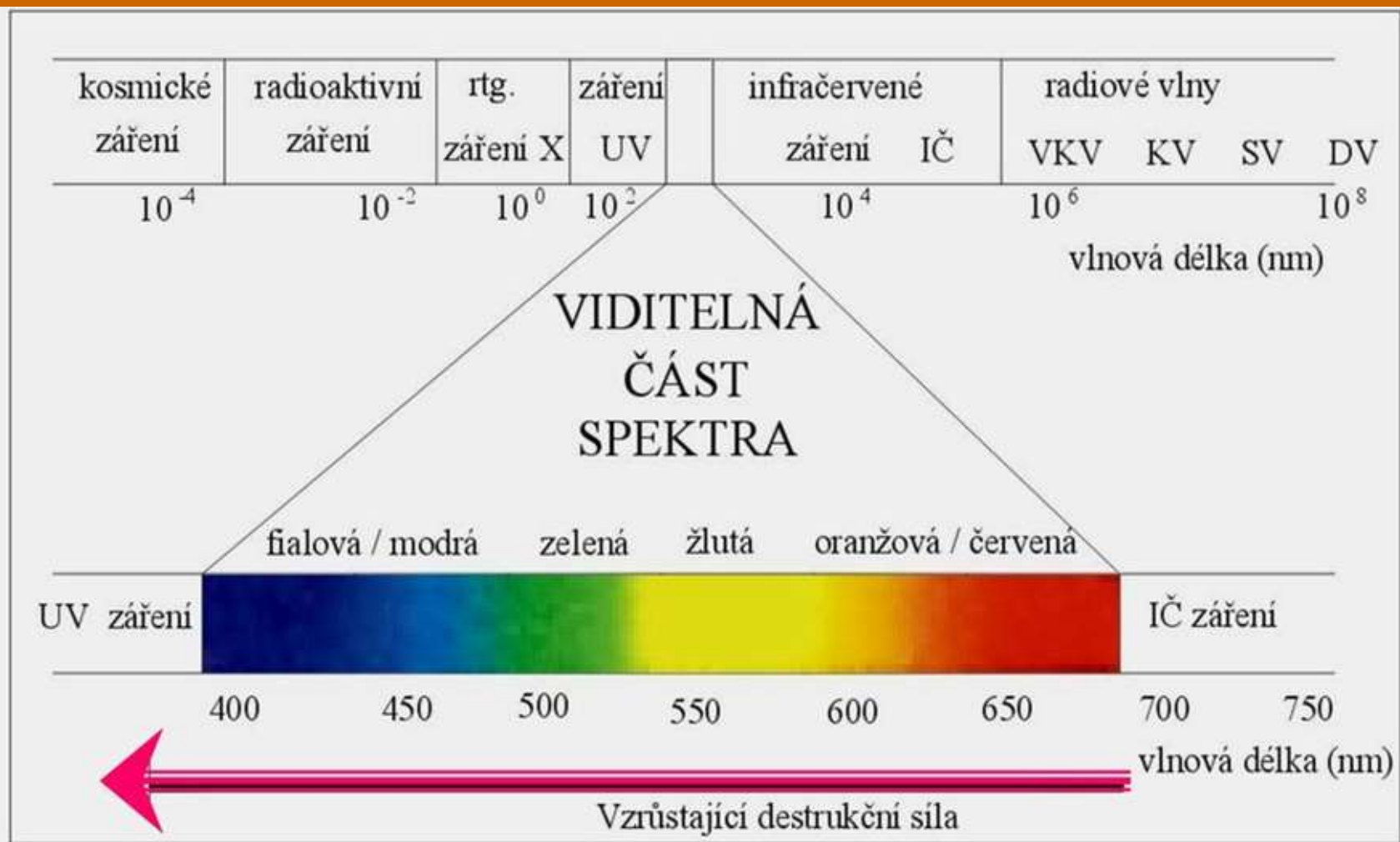
- Názvem dle názvoslovných pravidel
(eventuálně triviálním názvem)
- Sumárním vzorcem
- Strukturním vzorcem
- Tvarem, bodem tání (varu, sublimace), rozpustností
- Optickou otáčivostí (v případě potřeby)
- Charakteristikami spekter:**
UV/VIS, IR, NMR a MS
*jsou nejdůležitější, neboť z nich se odvozuje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



Oblast zájmu „UV-VIS“ - tedy vlnové délky jsou v nanometrech

Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

A = absorbance, hodnota zjištěná na displeji přístroje

ε_{λ} = tzv. lineární molární extinkční koeficient, platný pro danou vlnovou délku a konkrétní látku

c = molární koncentrace látky (tj. molarita)

l = délka optické dráhy (kyvety) v cm, tj. obvykle „jedna“

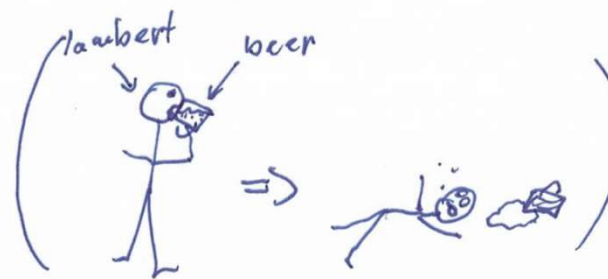
Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

16. Napište rovnici Lambert-Beerova zákona a vysvětlete význam jednotlivých symbolů.
(2 body)

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A ... absorpance
 c ... koncentrace absorbující látky
 l ... délka absorbující vrstvy (prostoru) květy
 ε ... molární absorpční koeficient



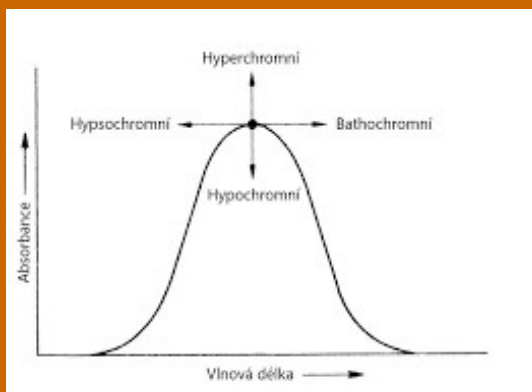
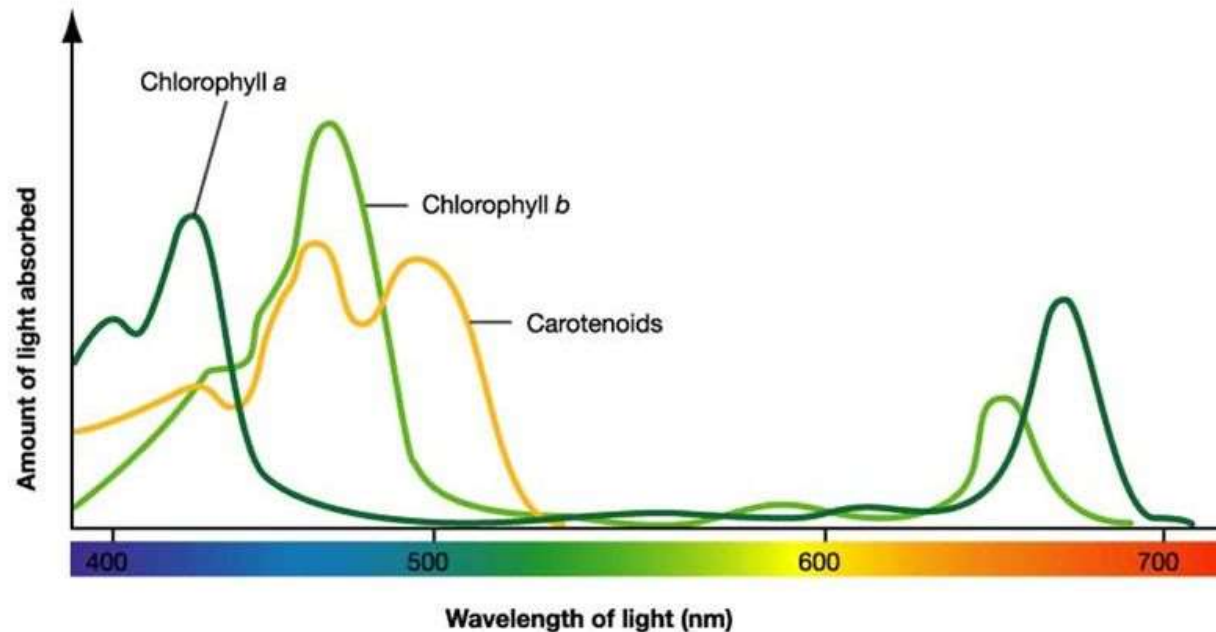
UV/VIS spektrofotometrie

Příklady chromoforových skupin

skupina	λ (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.

Ukázka UV/VIS spekter pro barevné látky

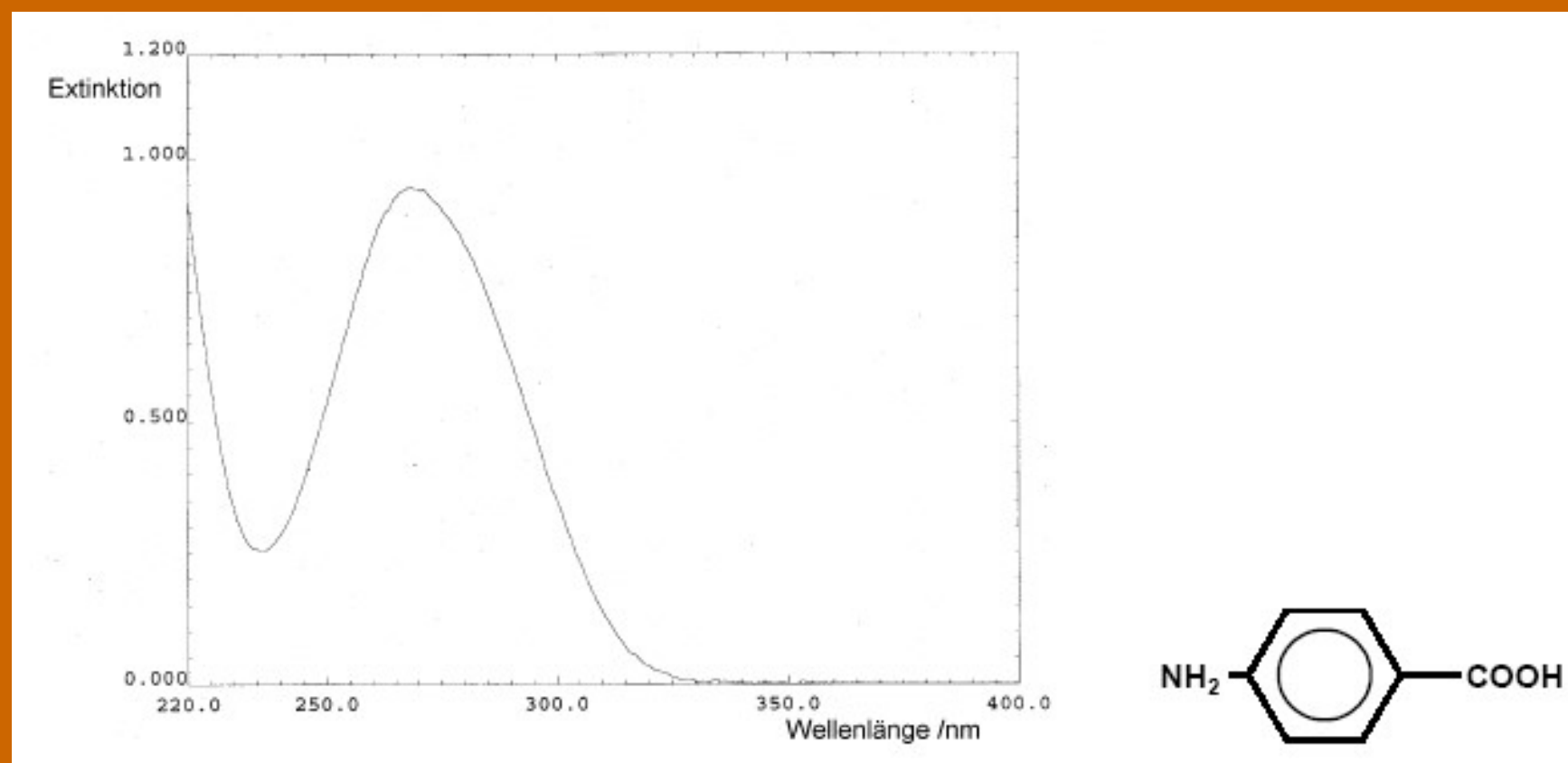


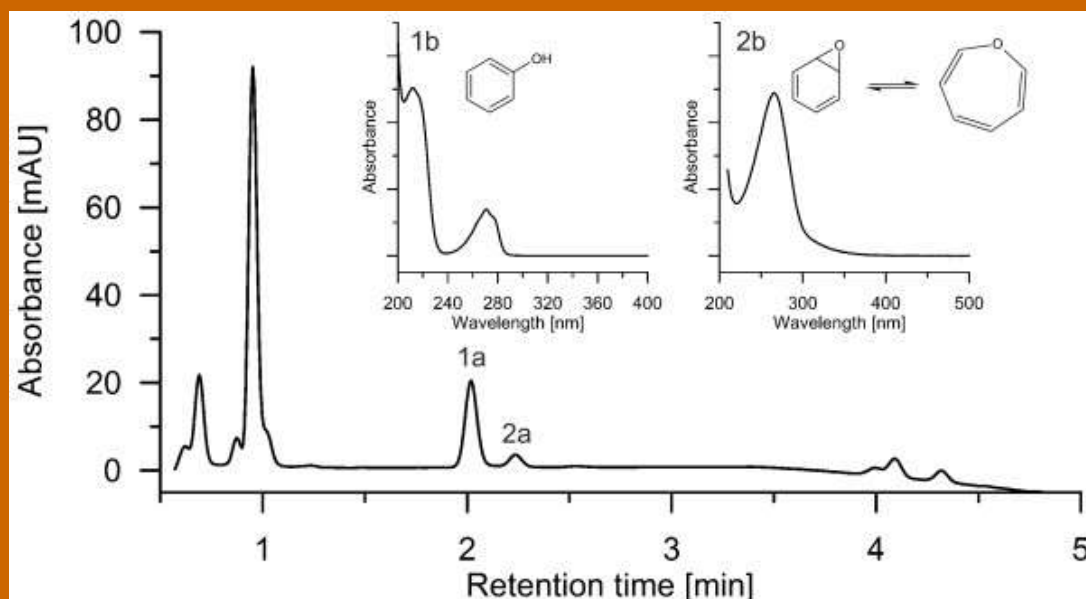
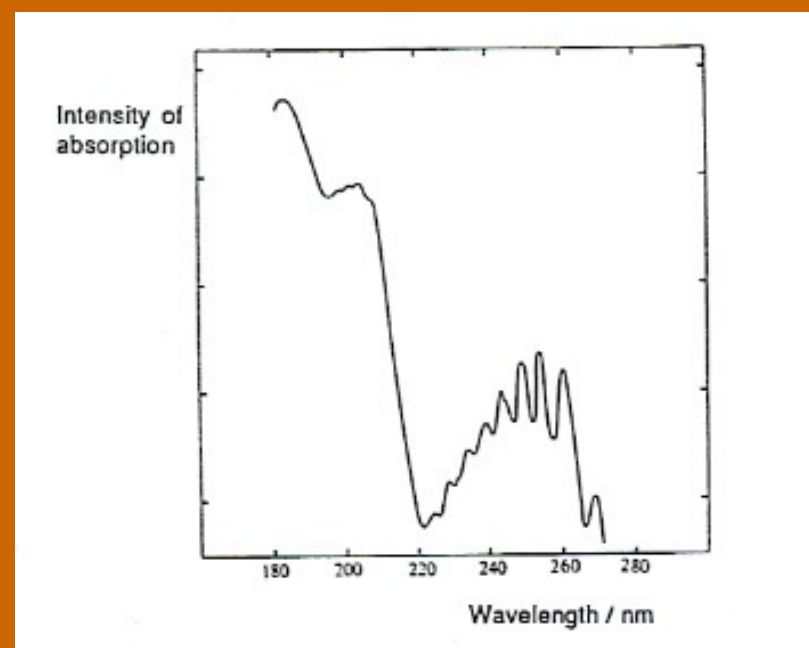
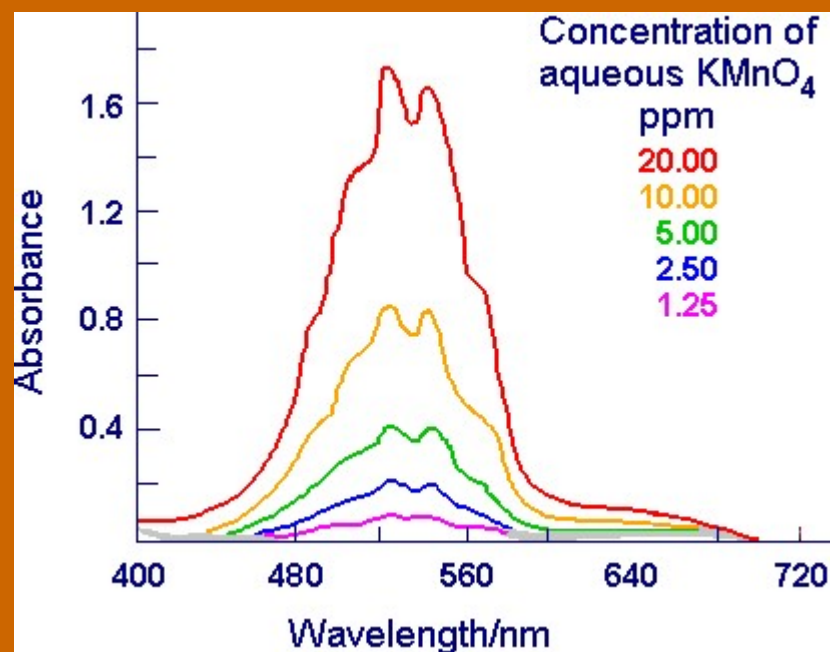
Vlevo terminologie pozorovaných posunů maxima vlnové délky od očekávaného.

Vlnová délka = charakteristika kvality (co to je)

Integrál plochy pod píkem = kolik toho je

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 ϵ)

Infračervená spektrofotometrie (IR)

IČ („*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 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 CHCl_3 nebo nujolu)
slisovaná tableta KBr (pevné látky)

Detektor: termočlánek

Infračervená spektrofotometrie (IR)

IR spektrum je závislost transmitance (T, %) na vlnočtu (ν , 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 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

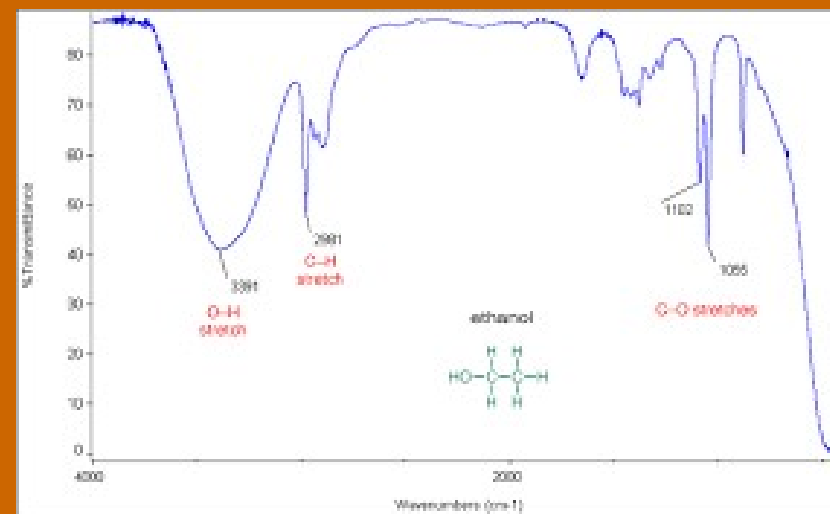
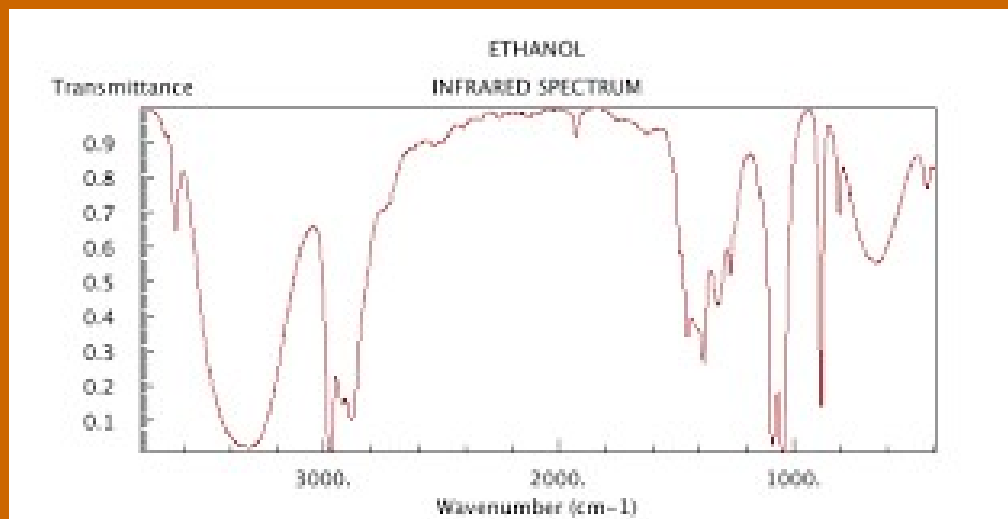
Infračervená spektrofotometrie (IR)

- 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.

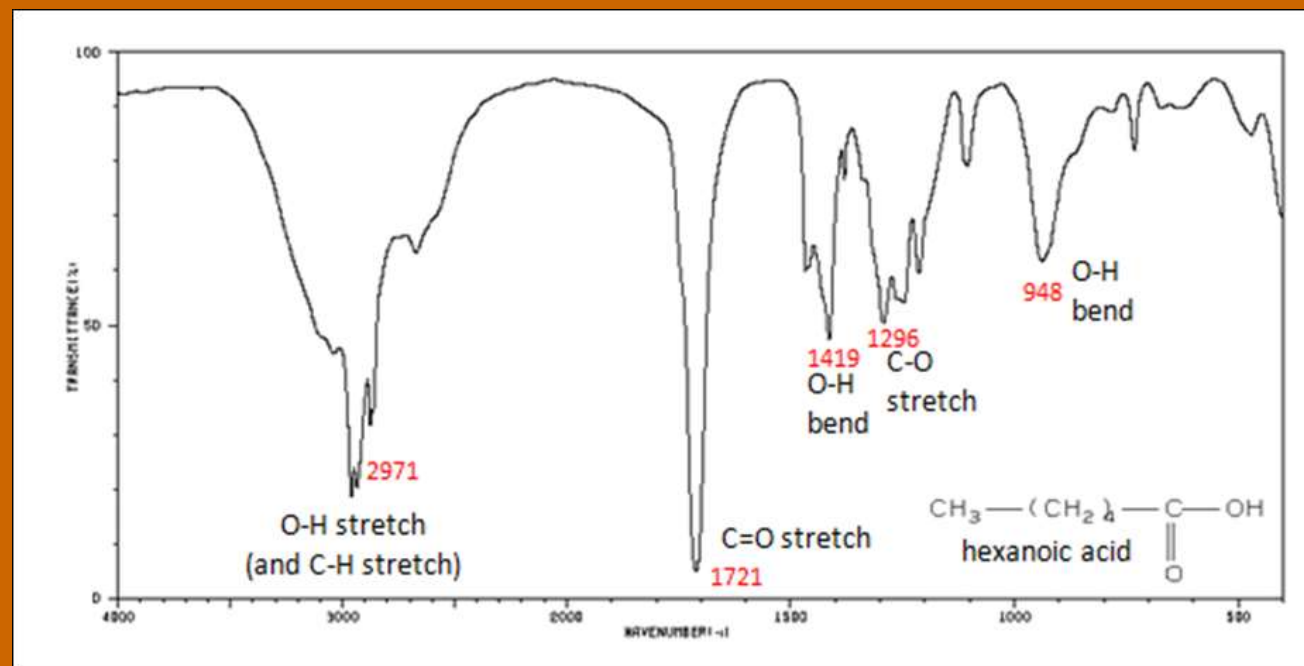
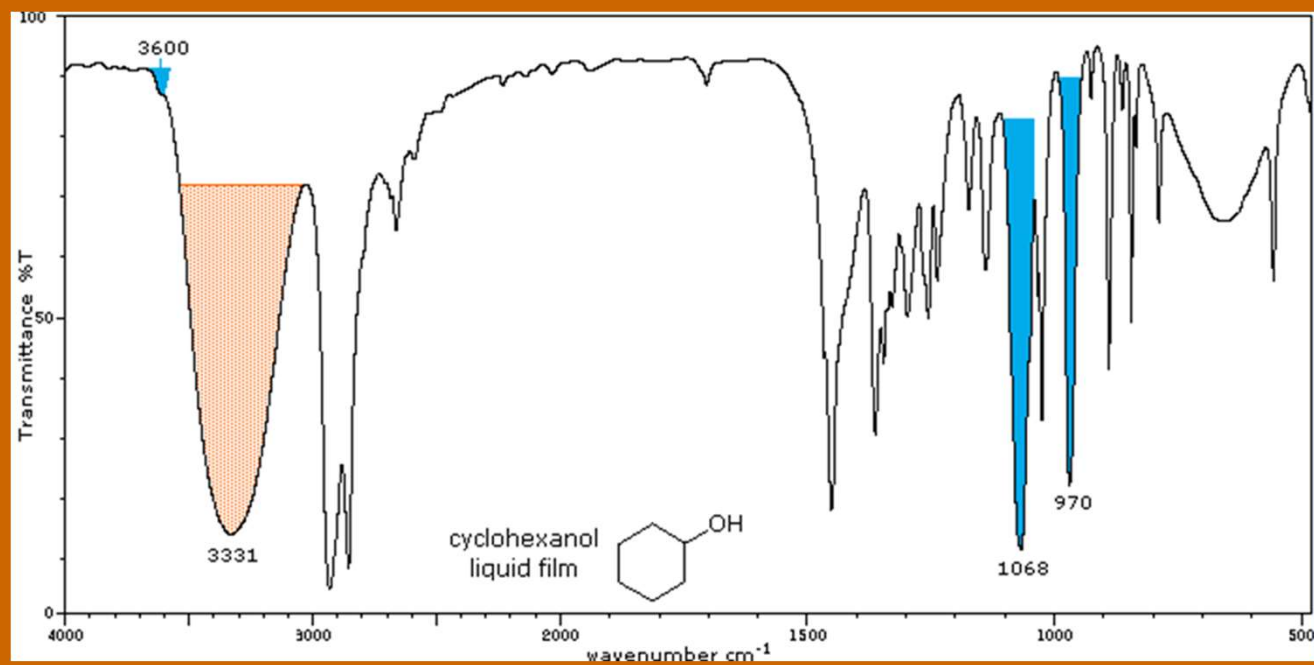


Laboratorní infračervený spektrograf

1969



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



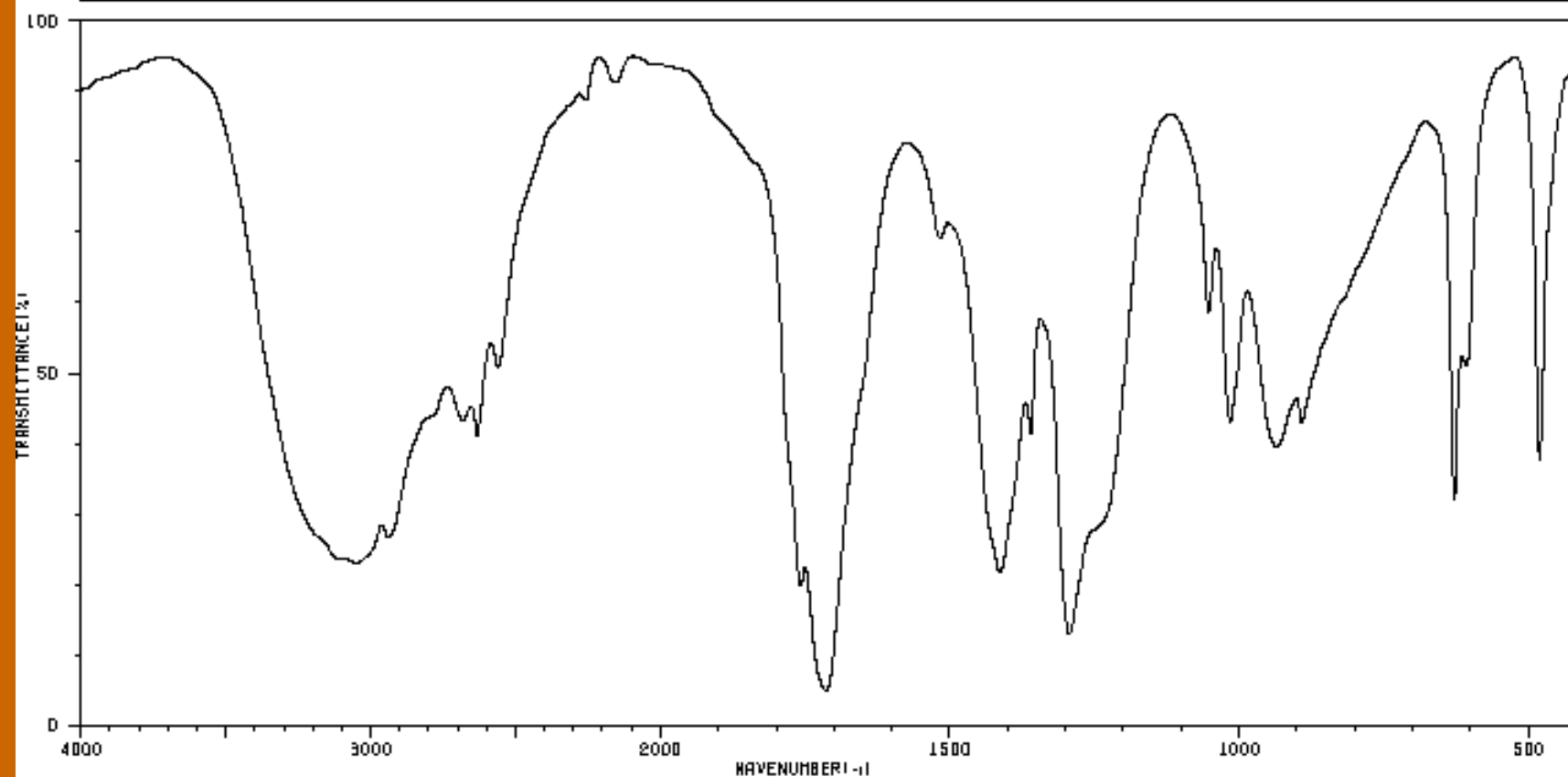
HIT-NO=950

SCORE= ()

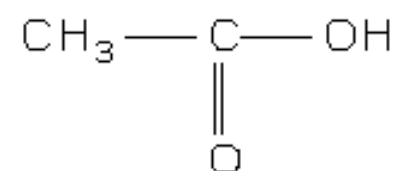
SDBS-NO=306

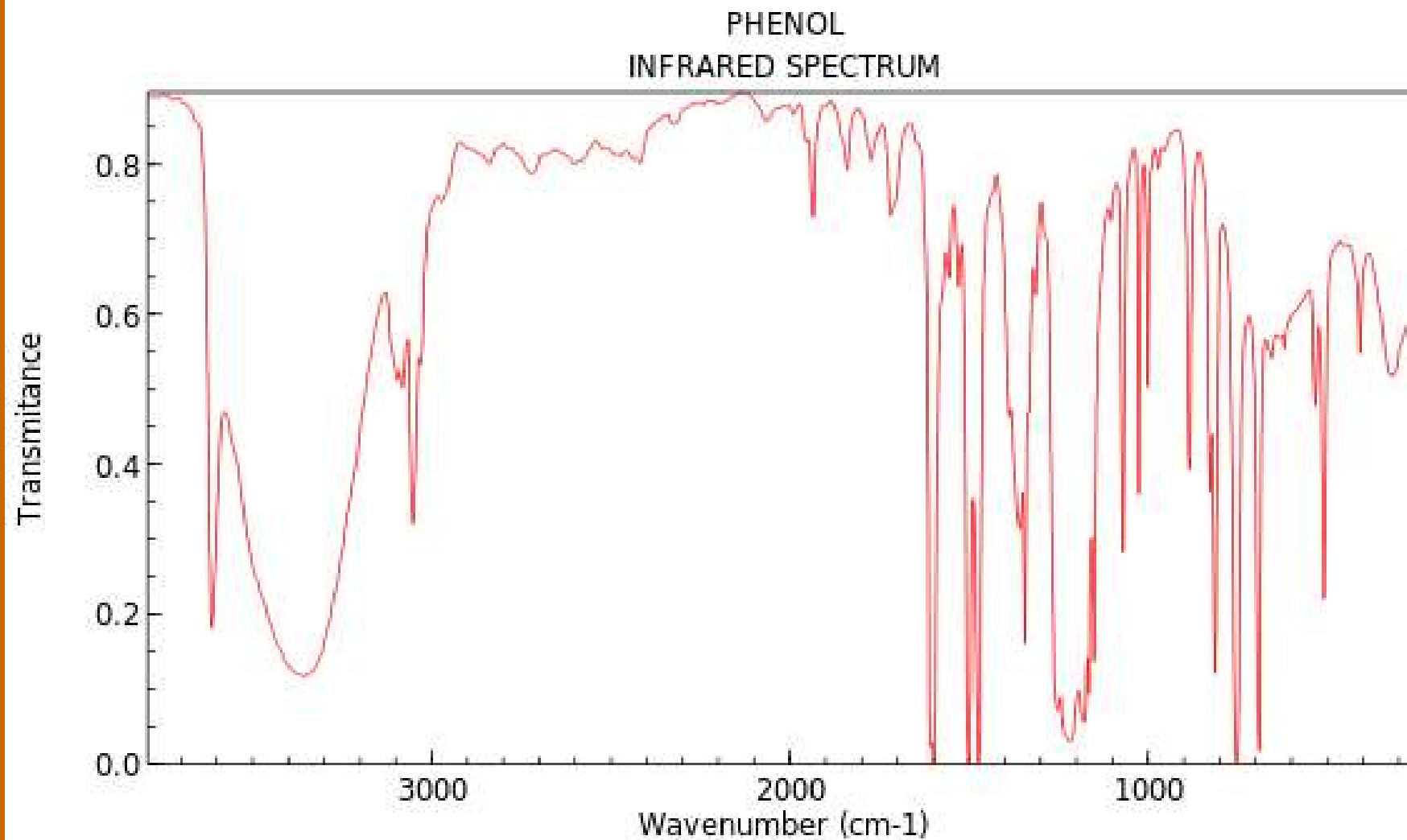
IR-NIDA-60820 : LIQUID FILM

ACETIC ACID

 $C_2H_4O_2$ 

2937	26	1414	20	629	31
2684	41	1360	39	607	49
2831	39	1294	12	481	36
2569	49	1063	67	473	62
1758	19	1016	41		
1714	4	935	37		
1617	66	892	41		





NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

C-H (AROMAT) ... signál je na vlnočtu menším než 3000 cm-1

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.

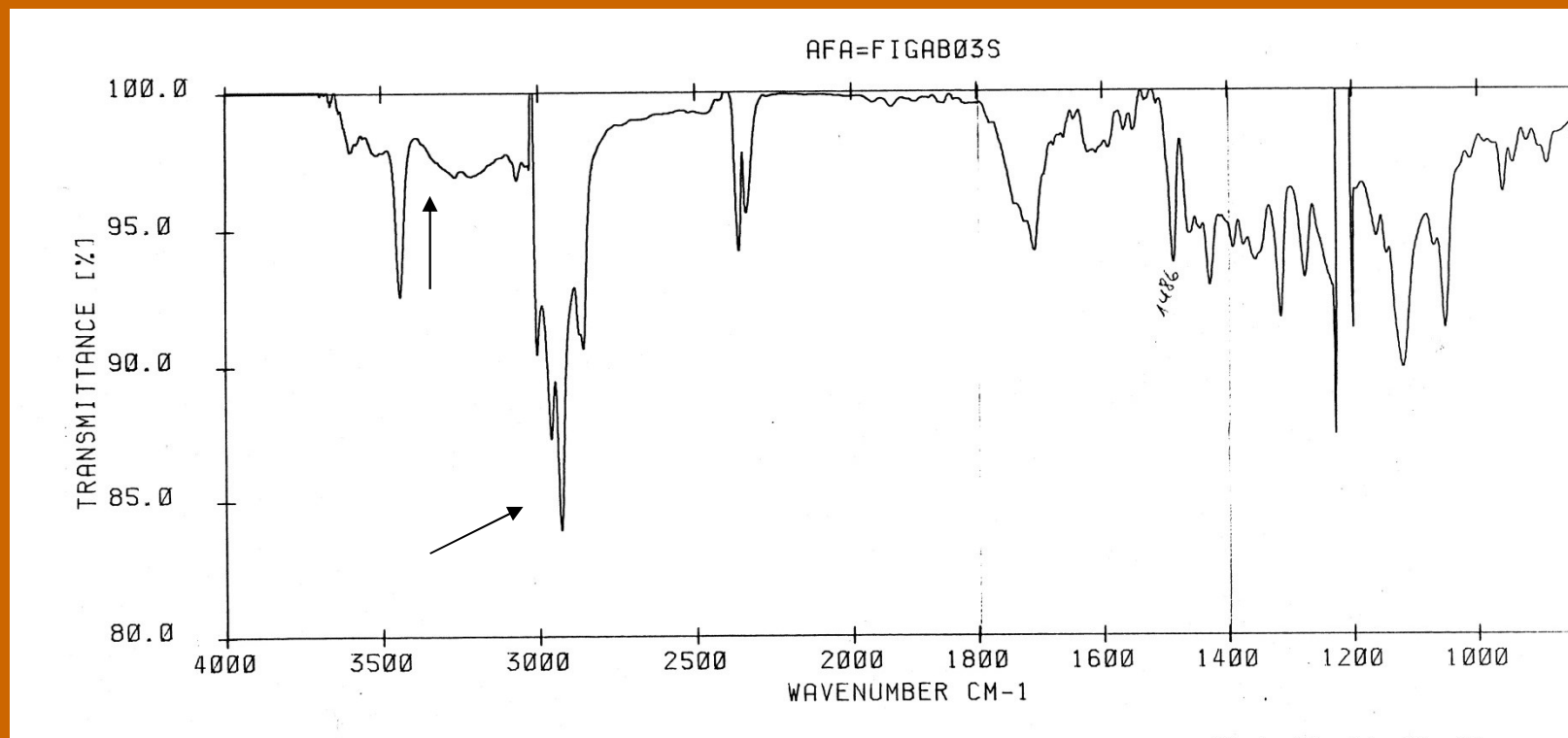


Laboratorní infračervený spektrograf

1969

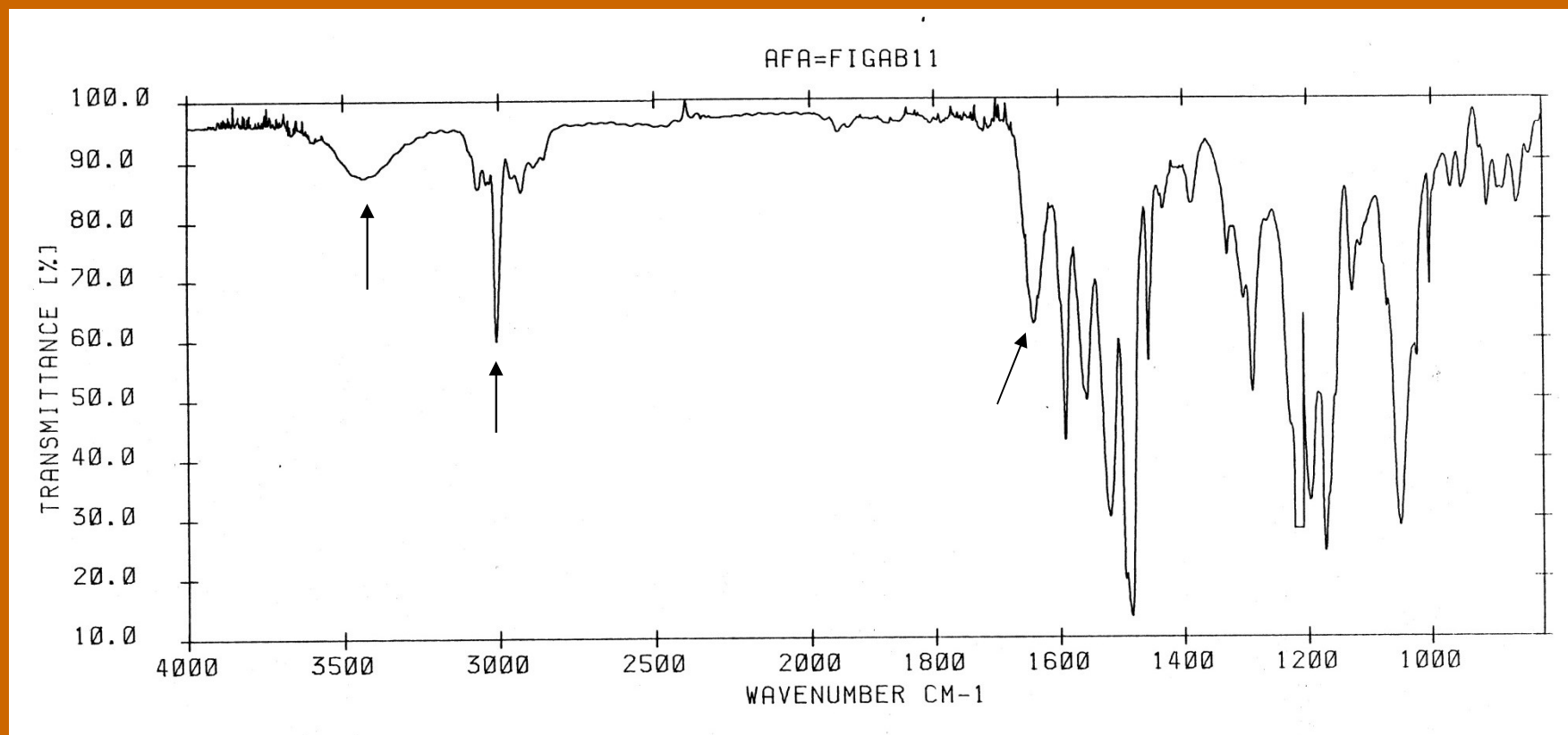
Infračervená spektrofotometrie (IR)

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 ^{13}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 odstiňují vnější pole, je menší o hodnotu tzv. stínění.

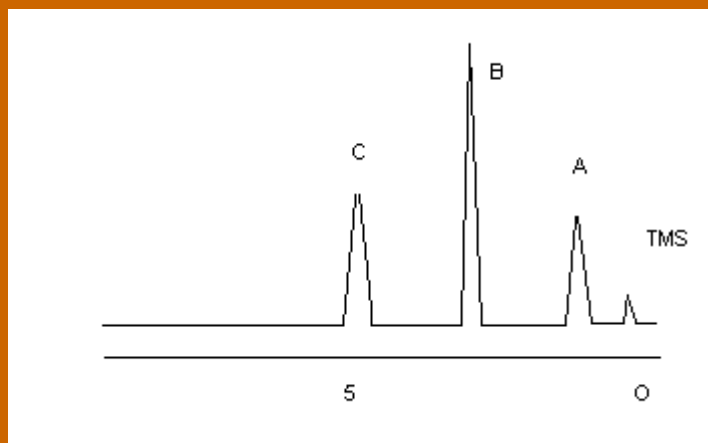
Jádra mají podle způsobu vazby ve svém okolí rozdílně uspořádané elektrony a jsou podle toho různě stíněna. Tím je rezonance dosaženo při různých hodnotách B_0 , což se projevuje signály (absorpčními maximy) v různých částech spektra.

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

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

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

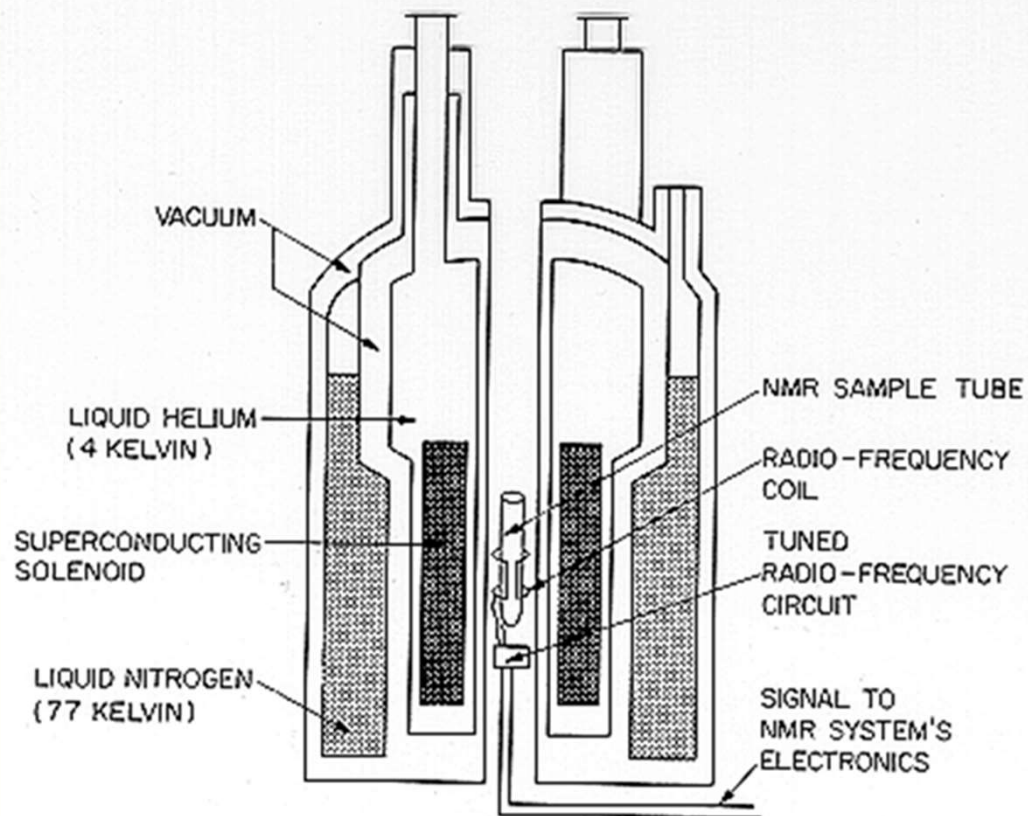
(A) (C) (B)



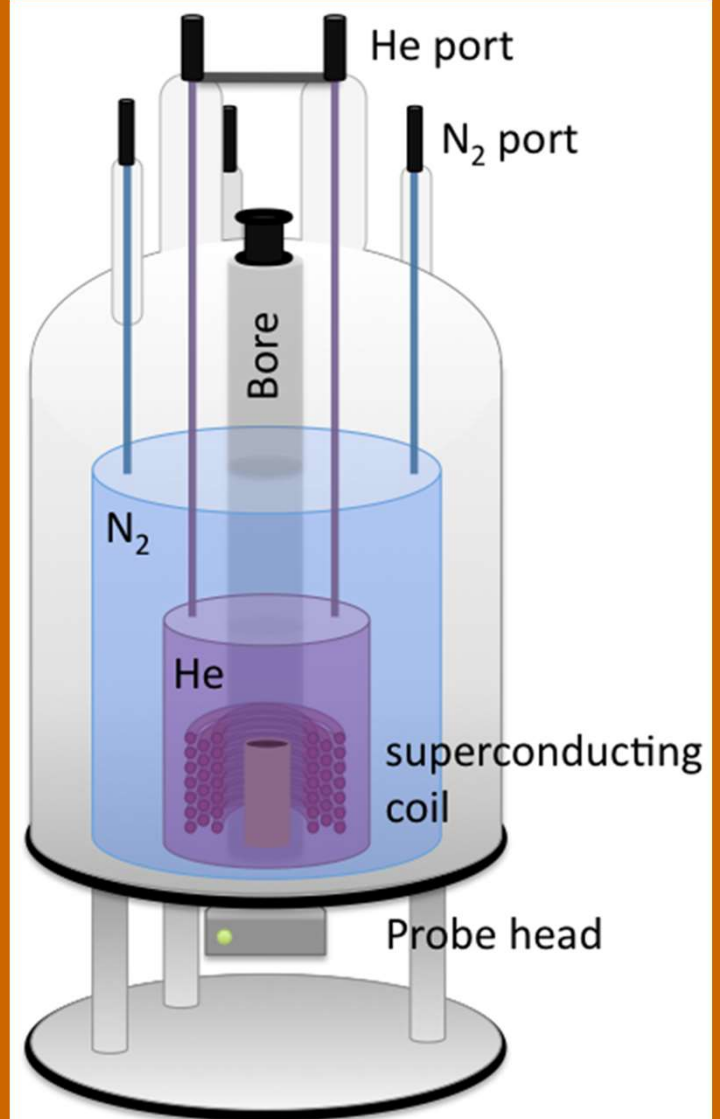
Informace o umístění protonů v molekule (včetně konformace)

Informace o umístění uhlíkových atomů v molekule (včetně konformace)

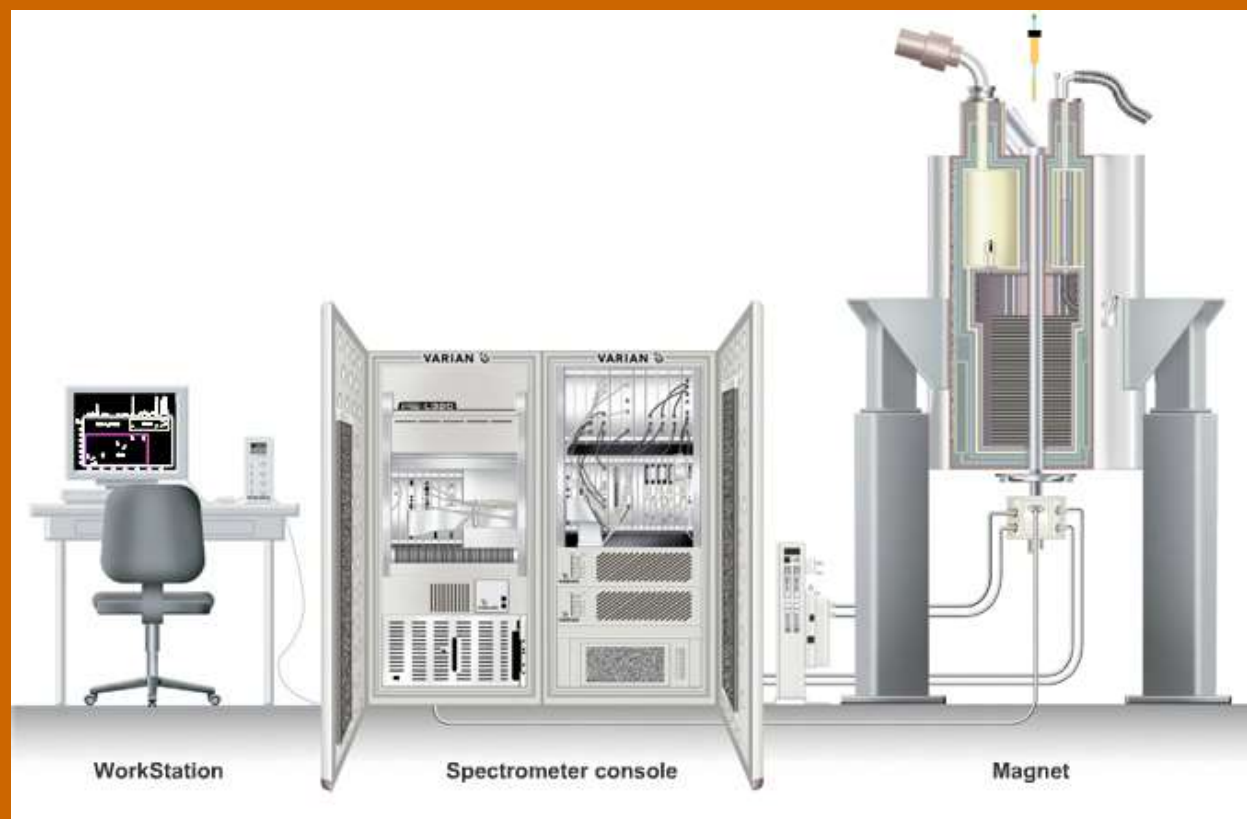
Informace o přítomnosti a počtu funkčních skupin

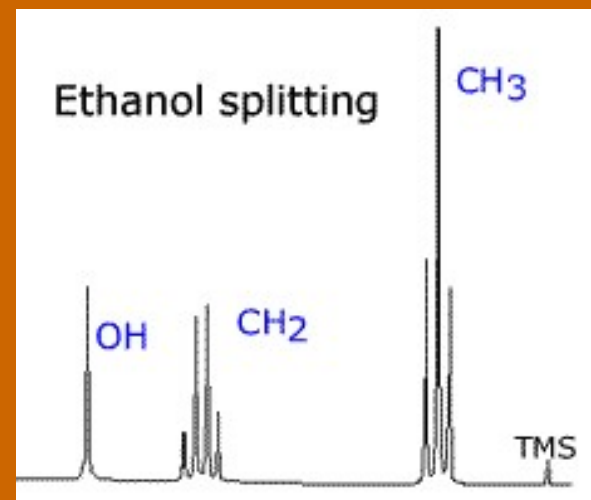
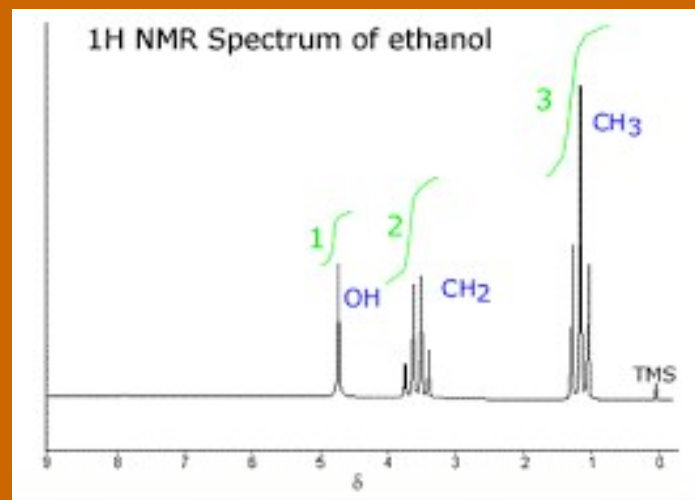


Cross-section of a superconducting magnet for NMR spectroscopy. The magnet and sample tube are not drawn on the same scale. The diameter of the magnet assembly is approximately 70 cm, while that of the sample tube is approximately 1 cm.

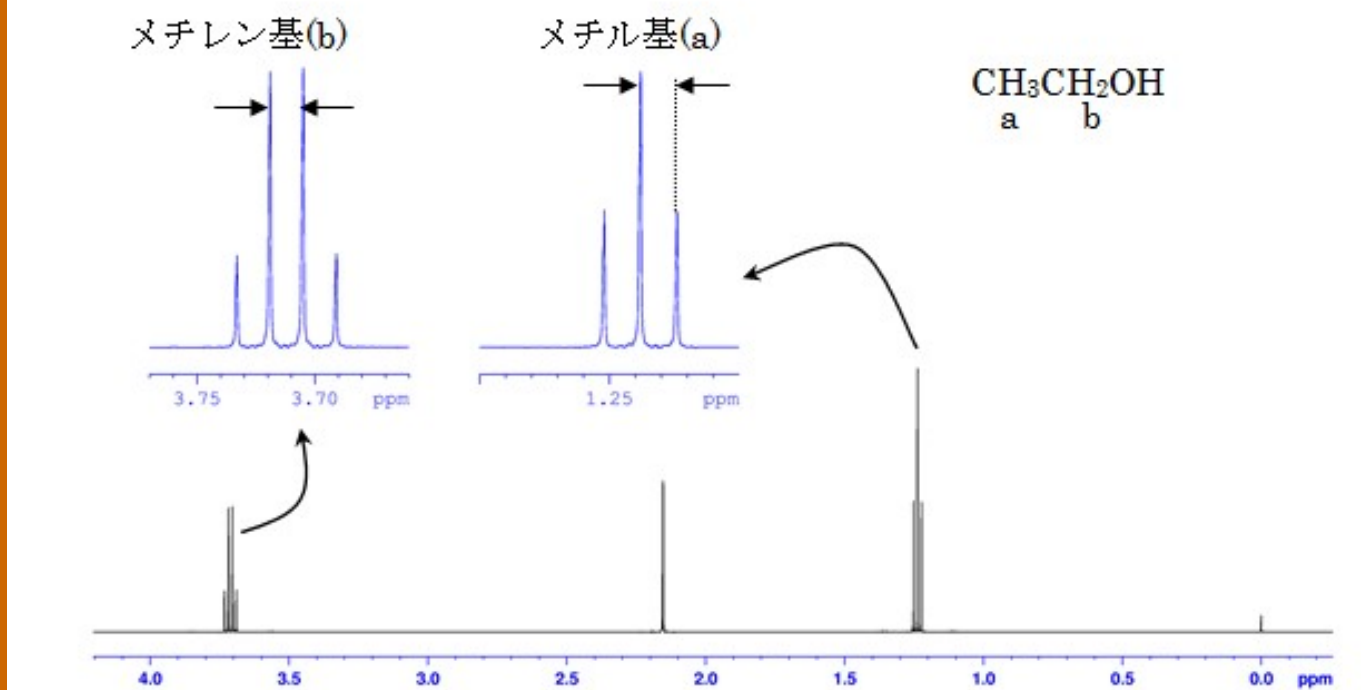


Nukleární magnetická rezonance (NMR)





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, μ -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.

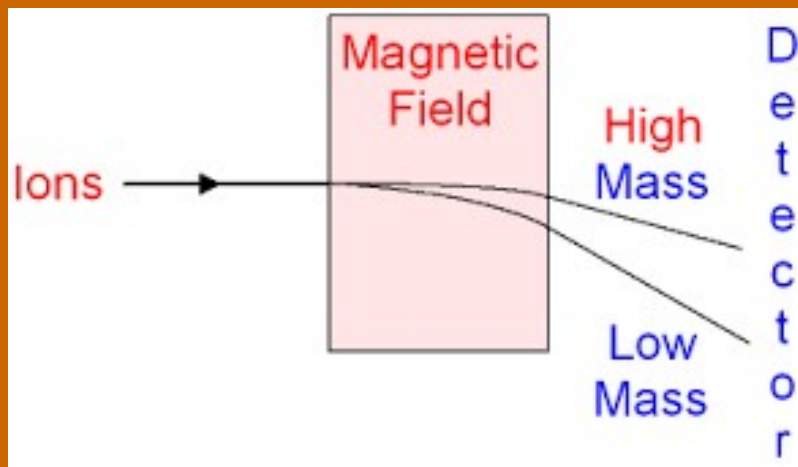
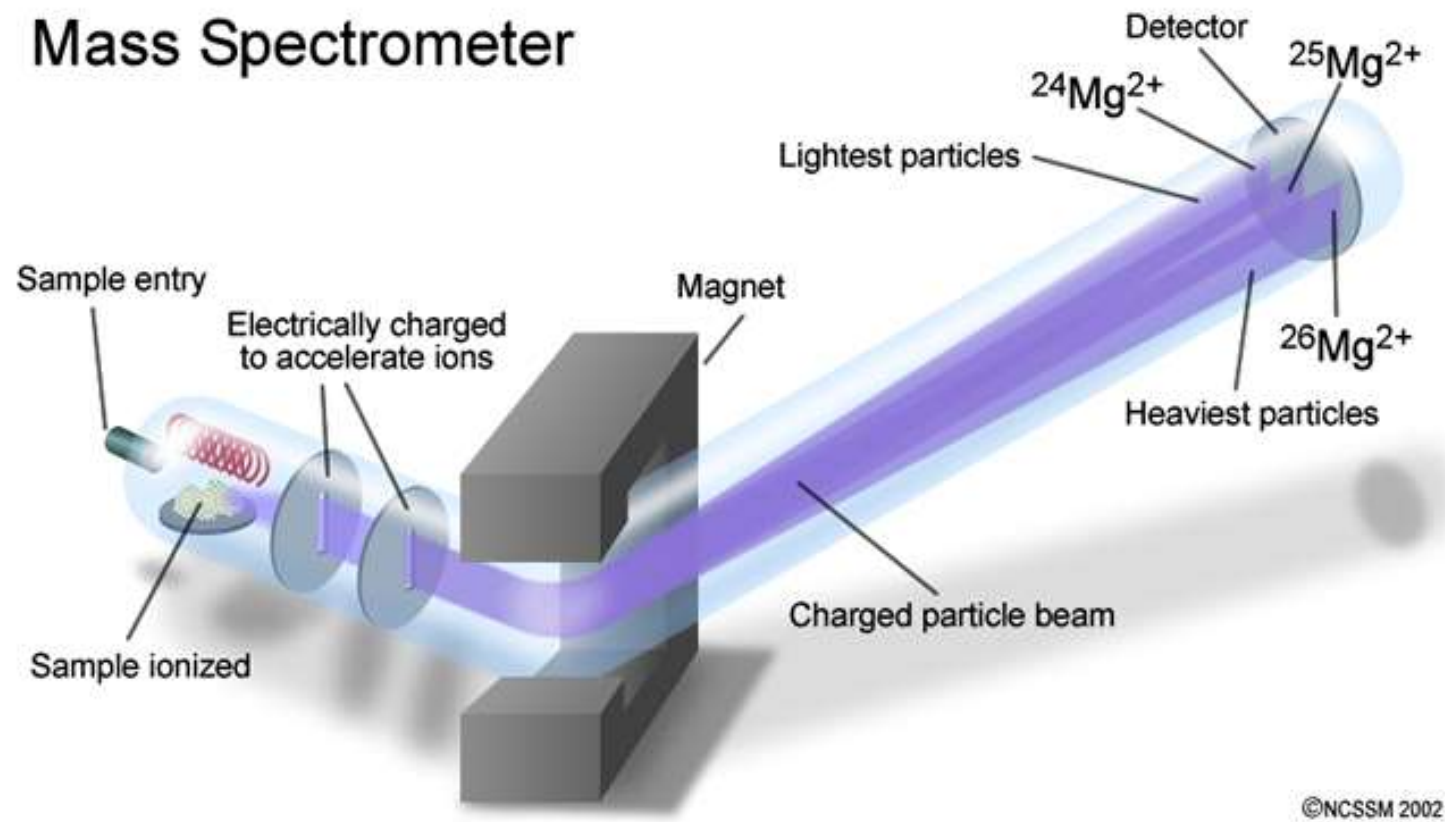
Nejdůležitější je molekulový ion – $[M]^+$ při ionizaci elektrony
– $[M+1]^+$ při chemické ionizaci

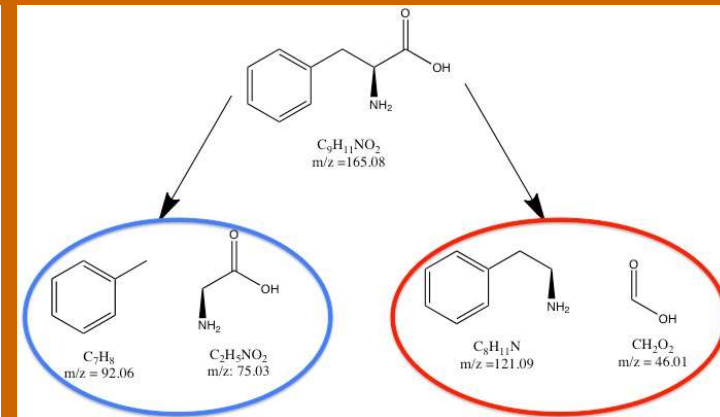
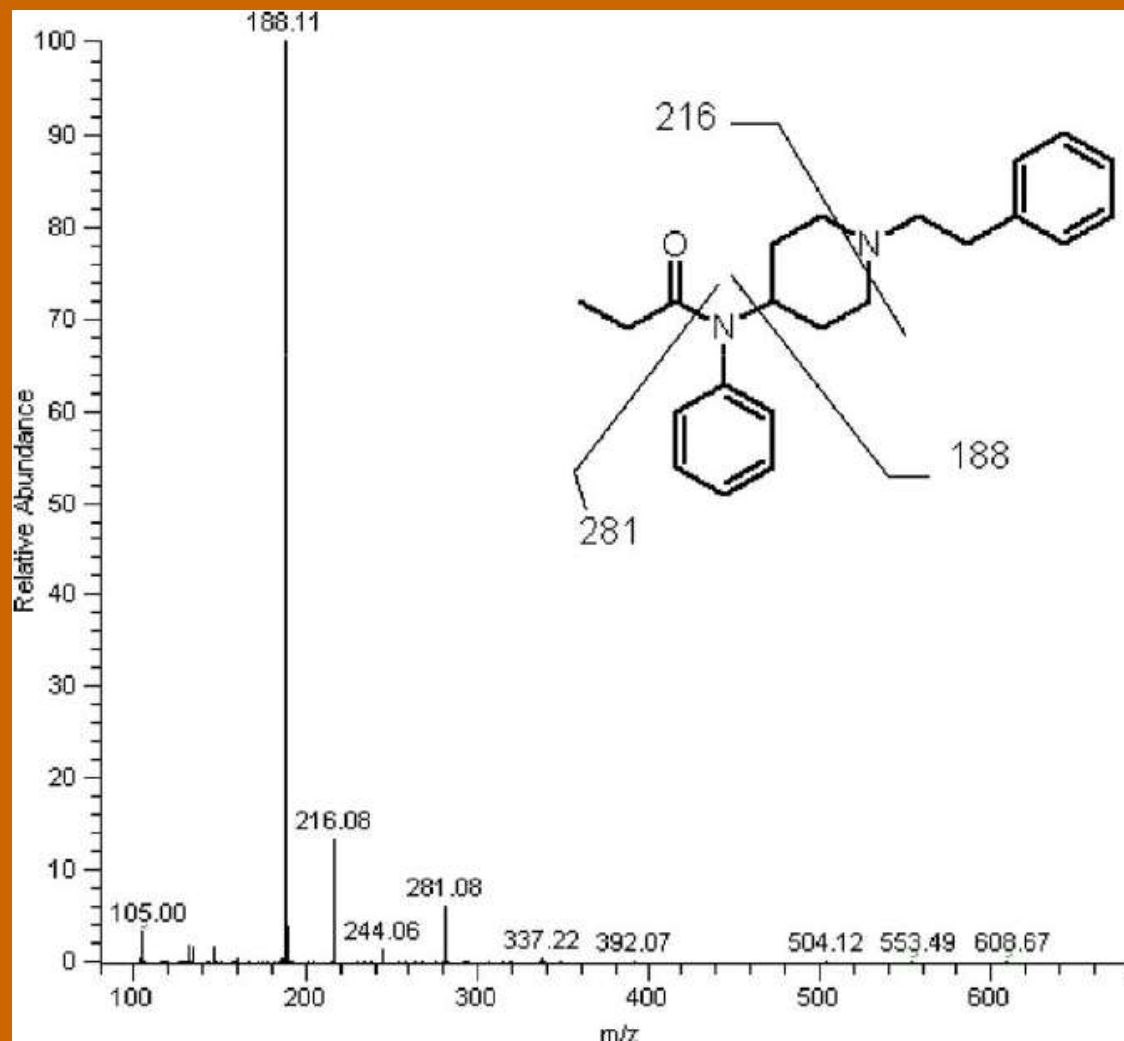
Intenzita molekulového iontu nebývá nijak velká, protože tento ion obvykle podléhá dalším reakcím (rozpadu, rekombinaci).

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

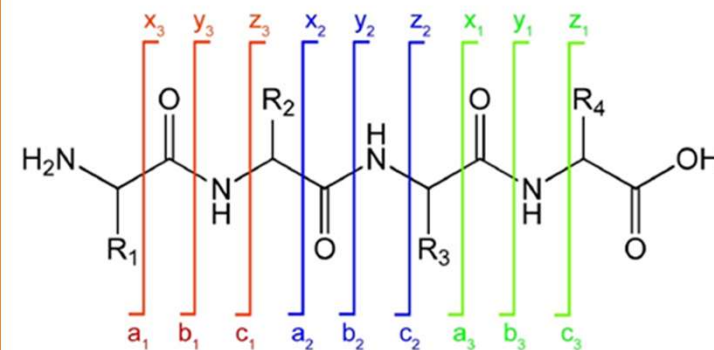
Ze struktury a poměrného zastoupení iontů lze odvodit strukturní vzorec.

Mass Spectrometer





MS-MS Peptide Fragmentation



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

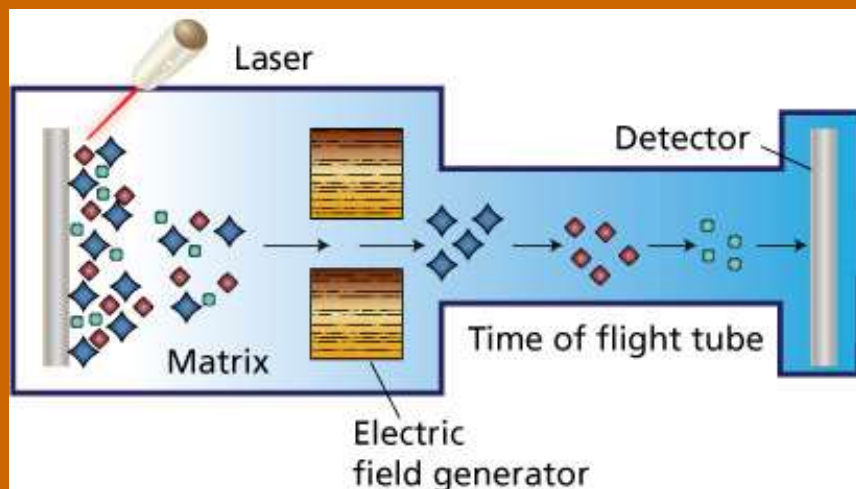
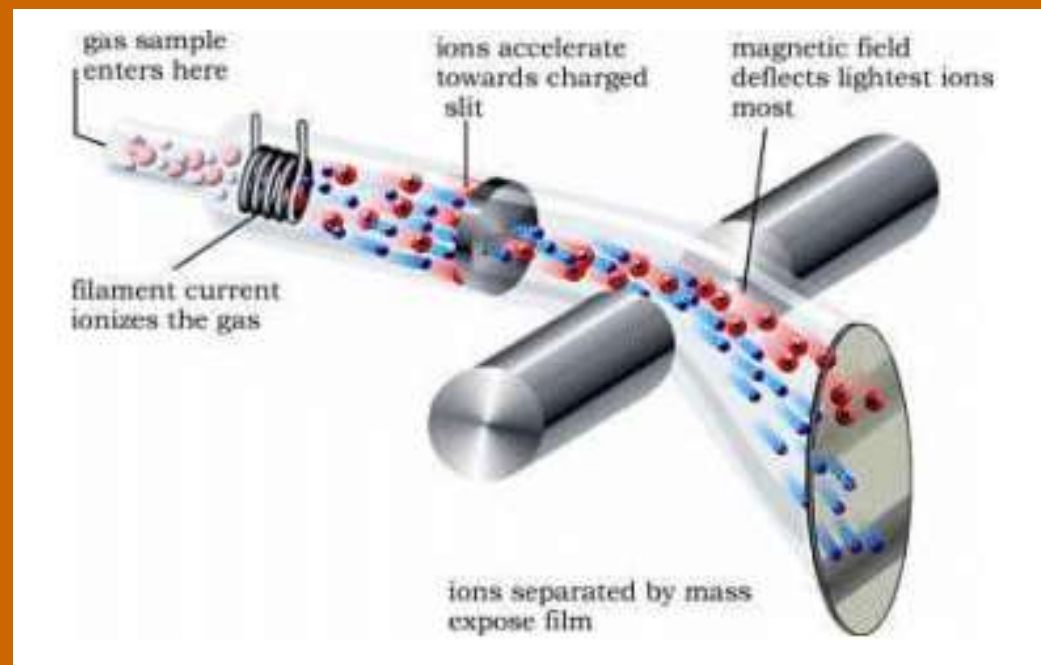
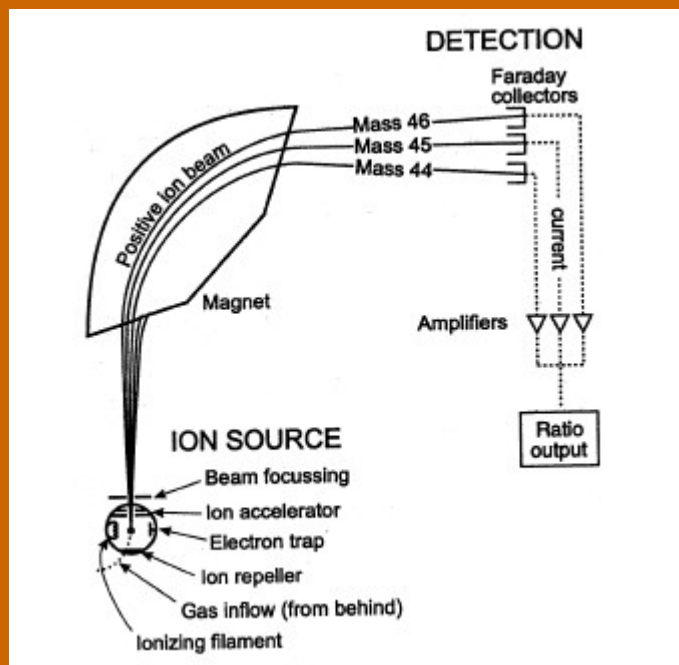
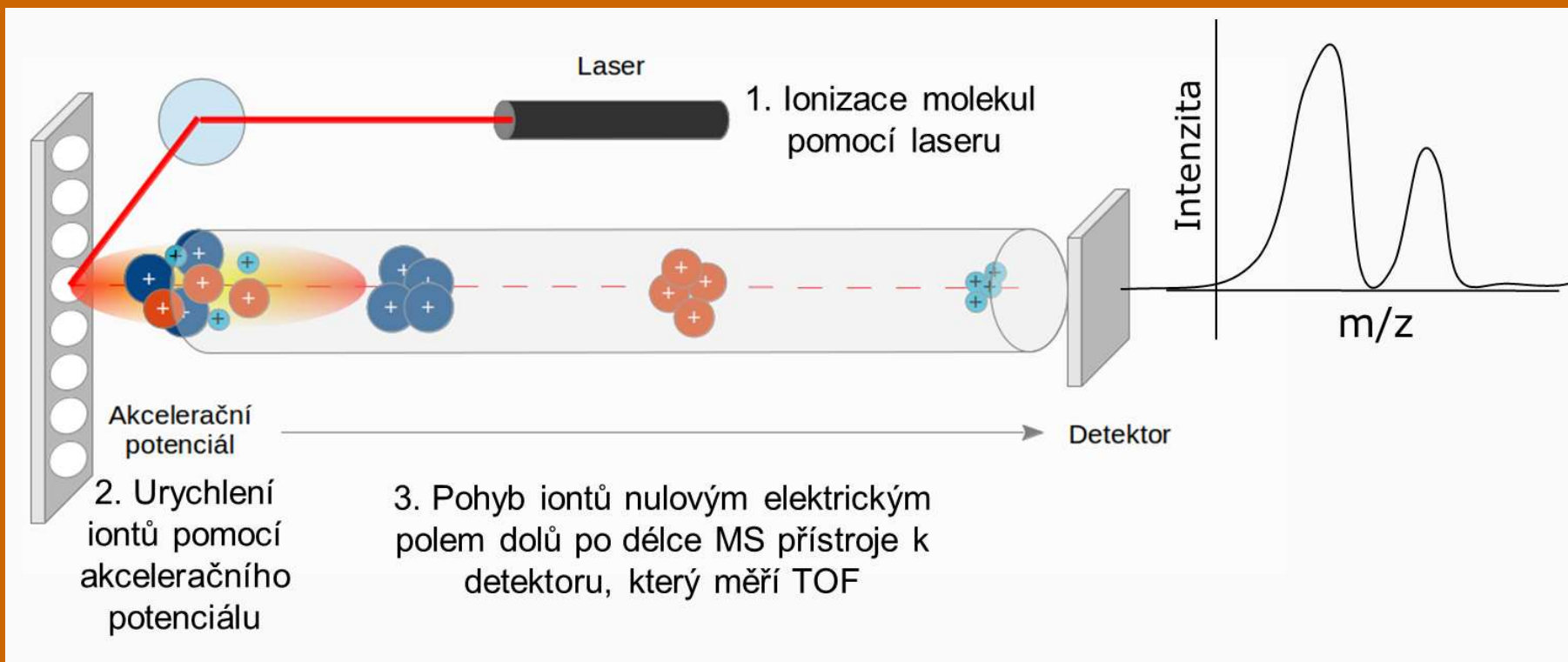


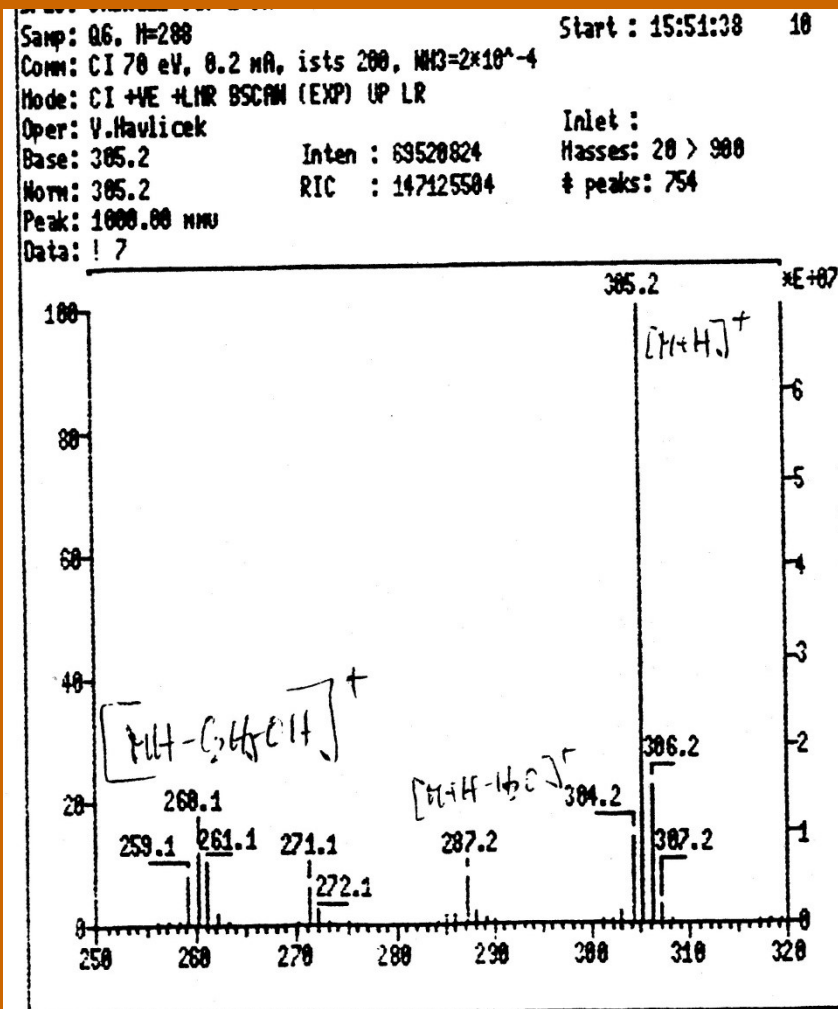
Schéma klasického MS spektrometru (nahore) a MS spektrometru „MALDI-TOF“ (dole vlevo)

Pro proteiny: matrice obsahuje kyselinu skořicovou



Hmotnostní spektroskopie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, což umožňuje měření složitějších směsí, zanedbatelný je i vliv pozadí.

Hmotnostní spektrometrie (MS)



Příklad spektra (Q6), MW 304

Molekulový ion (M+H) 305

Molekulový ion – H₂O

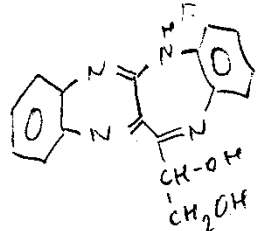
$$305 - 18 = 287$$

Molekulový ion – CH₃CH₂OH

$$305 - 46 = 259$$

Q13 /Gabriel

isolováno ze směsi D-xylosonu + o-fenylendiami-
nu preparat. TLC CHCl₃-EtOH 24:1, patrně analog
látky Q7; předpokl. struktura:



Je-li to ono, pak:

Mw 306

oček. signály:

288 /-H₂O/

275 /-CH₂OH/ (7444444)

245 /quinox.zbytek/

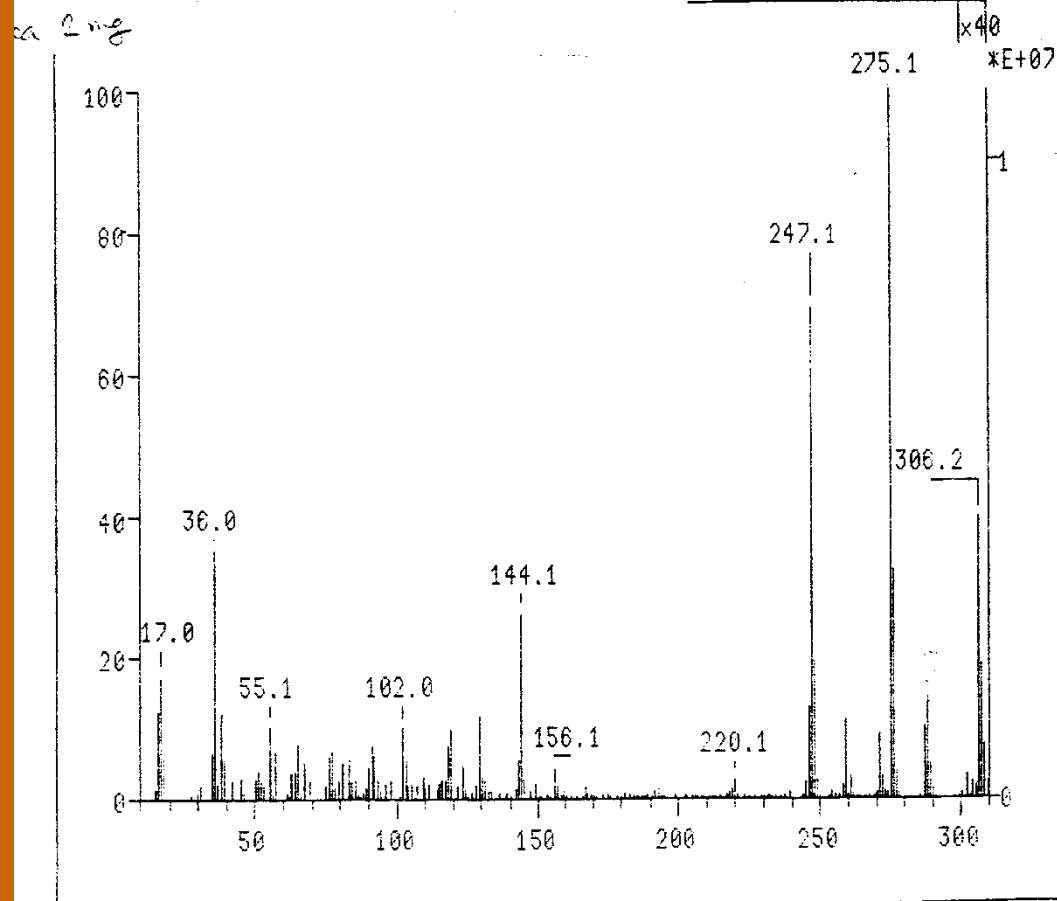
1 DERIVED SPECTRUM 9

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)