

Spektroskopia w podczerwieni w zastosowaniu do badań związków organicznych i makromolekuł biologicznych

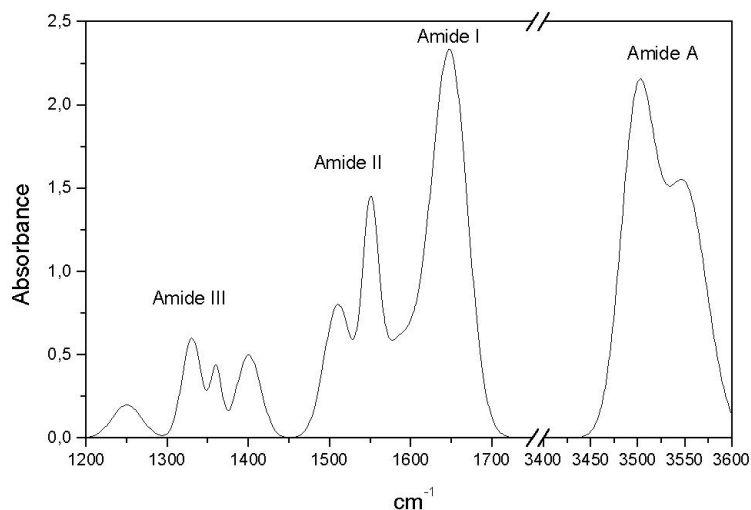
Spektroskopia w podczerwieni jest jedną z technik badawczych umożliwiających określenie składu i struktury prostych cząsteczek chemicznych, organicznych i dużych biomolekuł, w szczególności umożliwia określenie struktury drugorzędowej białek i jej zmian pod wpływem różnych czynników fizycznych lub chemicznych, takich jak temperatura czy pH. Metodą tą można badać próbki znajdujące się w fazie gazowej, ciekłej lub stałej.

W klasycznych spektrometrach IR widma otrzymuje się badając absorpcję promieniowania przez próbkę w funkcji długości fali (lub liczby falowej) zmieniając krokowo jej długość za pomocą elementu dyspersyjnego (pryzmat, siatka dyfrakcyjna). We współczesnych aparatach FTIR stosuje się szybszą metodę polegającą na jednoczesnym oświetleniu próbki wiązką promieniowania o długościach fali z całego badanego zakresu. Następnie doprowadza się do jej interferencji z wiązką fali z tego samego źródła, która nie przeszła przez próbkę, a widmo otrzymuje się stosując transformację Fouriera zarejestrowanego obrazu interferencyjnego.

W zakresie podczerwieni widmo absorpcji analizowanej próbki jest związane ze wzbudzeniem oscylacji grup funkcyjnych w molekułach (w fazie gazowej widoczne są dodatkowo rotacje molekuł). Pomiarzy umożliwiają określenie jakie grupy występują w cząsteczkach organicznych, a następnie identyfikację cząsteczek. Przeprowadza się je w badaniach naukowych i przemyśle w celu m.in. identyfikacji substancji, obserwacji zmian tautomerycznych, wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu, wykrywania zanieczyszczeń, czy śledzenia przebiegu reakcji. Spektroskopia IR znajduje także coraz szersze zastosowanie w pomiarach cech cząsteczek biologicznych, w szczególności struktur drugorzędowych białek.

W widmach białek obecne są charakterystyczne t.zw. pasma amidowe (Rys.1), z których trzy mają największe znaczenie w analizie struktury drugorzędowej białek. Są to:

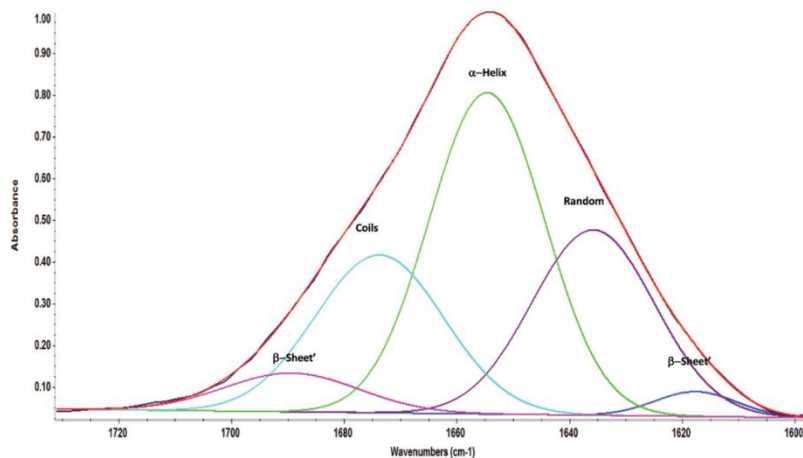
- 1) pasmo amidowe I odpowiadające głównie drganiom rozciągającym wiązania C=O ($1700\text{ cm}^{-1} - 1600\text{ cm}^{-1}$)
- 2) pasmo amidowe II odpowiadające drganiom zginającym wiązania N-H i rozciągającym wiązania C-N ($1600\text{ cm}^{-1} - 1500\text{ cm}^{-1}$)
- 3) pasmo amidowe III – odpowiadające głównie drganiom rozciągającym wiązania C-N i drganiom zginającym wiązania N-H (ok. $1340\text{ cm}^{-1} - 1200\text{ cm}^{-1}$).



Rysunek 1. Pasma amidowe widoczne w widmach IR białek

(http://jena.lib.leibniz-fti.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html).

Na podstawie pomiarów doświadczalnych i obliczeń teoretycznych przypisano pasmom pojawiającym się w widmie absorpcji białek charakterystyczne elementy struktur drugorzędowych białek (Rys. 2).



Rysunek 2. Dekonwolucja widma pasma amidowego I uzyskanego w pomiarach FTIR dla białka - albuminy wołowej

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2F%2FAssets%2FMSD%2FApplication-Notes%2FAN52985-protein-secondary-structure-elucidation-using-ftir-spectroscopy.pdf&imgref=safe&img_src=Vw0DXedED0fwYKYpSMkPHe&ust=1618934558458000&source=images&cd=vfe&ved=0CA0QjhsqFwoTC1j54bXivACFQAAAAAdAAAAABAD

Widmo oscylacyjne możemy mierzyć za pomocą dwóch technik: transmisyjnej lub odbiciowej. W technice transmisyjnej mierzymy intensywność promieniowania przechodzącego przez próbkę w stosunku do intensywności promieniowania padającego.

Miarą absorpcji promieniowania w funkcji liczby falowej ($\tilde{\nu}$), świadczącej o wzbudzeniu stanów oscylacyjnych grup funkcyjnych jest transmitancja $T(\tilde{\nu}) = \frac{I}{I_0}$ lub absorbcja

$A(\tilde{\nu}) = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$. Absorbancja w zakresie liniowości prawa Lamberta-Beera jest wprost proporcjonalna do stężenia absorbujących cząsteczek.

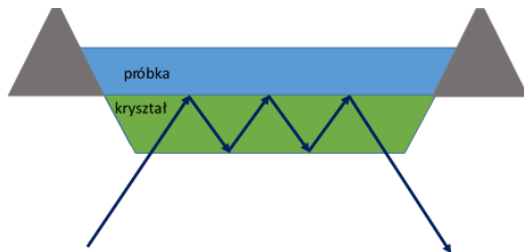
W pomiarach transmisyjnych widm oscylacyjnych cząsteczek biologicznych należy zwrócić uwagę na stosowane rozpuszczalniki. Woda, która jest naturalnym środowiskiem dla tych obiektów charakteryzuje się intensywną absorpcją w zakresie pasm amidowych, uniemożliwiając śledzenie subtelných zmian zachodzących w strukturze białek pod wpływem różnych czynników i ich analizę ilościową. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie ciężkiej wody, D₂O. Zastąpienie wodoru deuterem powoduje przesunięcie maksimum drgania nożycowego H-O-H (1630 cm⁻¹) w stronę mniejszych liczb falowych, odsłaniając widma białek i umożliwiając ich analizę.

Na ominiecie problemu absorpcji wody pozwala druga z wymienionych technik podczerwieni – odbiciowa, w szczególności nowoczesna technika wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR, ang. *Attenuated Total Reflectance*).

Jest to technika wykorzystująca zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła. W zjawisku tym wiązka promieniowania jest wprowadzana do przezroczystego dla podczerwieni materiału, o dużym współczynniku załamania światła i pada na jego wewnętrzną powierzchnię. Do zewnętrznej strony tej powierzchni w miejscu odbicia przylega badana próbka. Promieniowanie ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu, gdy kąt pod jakim pada wiązka światła (IR) jest większy niż kąt graniczny.

W wyniku interferencji fali padającej oraz fali odbitej tworzy się fala stojąca, która rozchodzi się w kierunku prostopadłym do granicy ośrodków. Amplituda tej fali (tzw. fali zanikającej) maleje wykładniczo z głębokością z po stronie ośrodka o mniejszej gęstości optycznej zgodnie z zależnością: $I(z) = I(0) \cdot e^{-\frac{2z}{dp}}$, gdzie dp – głębokość penetracji. Jeżeli ten ośrodek jest substancją absorbującą, natężenie fali zanikającej ulega dodatkowemu osłabieniu w wyniku absorpcji.

Aby zwiększyć natężenie sygnału wykorzystuje się długie kryształy (np. z selenku cynku, lub germanu) i doprowadza się do wielokrotnego odbicia promienia na granicy ośrodków (Rys. 3).



Rysunek 3. Wielokrotne całkowite wewnętrzne odbicie promienia na granicy kryształ-próbka.

Po wyprowadzeniu wiązki promieniowania z ośrodka, w którym nastąpiło wielokrotne całkowite wewnętrzne odbicie mierzy się jej intensywność w funkcji liczby falowej, nanosi korektę tła związaną z zależnością głębokości penetracji wiązki (a więc i intensywnością wiązki wychodzącej) od długości fali promieniowania padającego. Najważniejszą zaletą techniki tłumionego wewnętrznego odbicia jest możliwość uzyskania widm roztworów, których składniki (przede wszystkim woda) posiadają bardzo silne absorpcyjne pasma własne, uniemożliwiające uzyskanie widma samego białka metodą transmisyjną.

FTIR-ATR dostarcza informacji o strukturze i oddziaływaniach międzycząsteczkowych, ujawnia zmiany strukturalne wywołane zewnętrznym zaburzeniem (np. temperaturą lub pH) Spektroskopia FTIR w połączeniu z techniką ATR umożliwia rejestrację widm substancji w stanie ciekłym, stałym lub o konsystencji żelu. Jest odpowiednia dla próbek o niskim stężeniu ($\leq 0,3$ mg/ml), znajdujących się w rozpuszczalniku wodnym lub organicznym, w zawiesinie lub w środowisku błony lipidowej.

Przygotowanie próbki do badań metoda ATR polega na rozprowadzeniu cienkiej warstwy roztworu na kryształ. Następnie próbka jest osuszana do momentu gdy widmo przestanie się zmieniać, tworząc cienką błonę na jego powierzchni.

Do analizy widm otrzymanych w podczerwieni wykorzystuje się metody numeryczne. Najpierw oblicza się II pochodną, a następnie wykonuje dekonwolucję widma, rozkładając widmo białka na sumę funkcji Lorentza lub Gaussa. Następnie dla każdej struktury oblicza się wkład procentowy do całego widma pasma amidowego.

Celem zaproponowanego ćwiczenia będzie zapoznanie studentów z nowoczesną fourierowską techniką spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR/FTIR), interpretacją widm wybranych materiałów istotnych dla biologii/medycyny/kryminalistyki/ochrony środowiska (molekuły organiczne, tworzywa sztuczne, makromolekuły biologiczne), sprawdzenie jak na strukturę białka wpływa czynnik denaturujący – temperatura (z zastosowaniem przystawki HATR z funkcją grzania).

Wymagania przy kolokwium wstępnym

1. Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym i pomiarami spektroskopowymi:
 - długość fali, częstość drgań, liczba falowa
 - intensywność promieniowania, gęstość promieniowania
 - molowy współczynnik absorpcji, integralny współczynnik absorpcji
 - stan podstawowy, stan wzbudzony, moment przejścia, siła oscylatora, radiacyjny i rzeczywisty czas życia
2. Formy energii molekuł:
 - rodzaje energii
 - kwantowanie energii
 - rozkład obsadzeń w stanie równowagi termicznej
 - degeneracja poziomów energetycznych
3. Oscylacje molekuł
 - oscylator harmoniczny i anharmoniczny
 - rodzaje drgań cząsteczek
 - częstości grupowe
4. Pomiary transmisyjne/absorpcyjne widm oscylacyjnych
 - co rozumiemy pod pojęciami „widmo absorpcyjne/transmisyjne”?
 - schematyczne przedstawienie zasady pomiarów absorpcji/transmisji
 - ilościowy opis absorpcji/transmisji (parametry pasma spektralnego)
 - czynniki determinujące kształt i szerokość konturu pasma
 - problemy materiałowe (przepuszczanie podczerwieni, obecność pary wodnej i dwutlenku węgla w atmosferze),
 - spektrofotometri IR klasyczne i z transformatą Fouriera (FT)
5. Zjawisko wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia
 - podstawy fizyczne
 - fala zanikająca, zależność głębokości penetracji próbki od długości fali światła padającego i kąta padania, korekcja widm ATR
 - schematyczne przedstawienie zasady pomiarów ATR
6. Absorpcyjne widmo oscylacyjne cząsteczek:
 - co to jest widmo oscylacyjne?
 - w jakim zakresie promieniowania obserwuje się pasma oscylacyjne?
 - schemat poziomów energetycznych i przejść energetycznych dozwolonych przez reguły wyboru
 - wygląd widma oscylacyjnego cząsteczek chemicznych, związek ze strukturą i obsadzeniem poziomów energetycznych
 - wykorzystanie widm oscylacyjnych w badaniu prostych molekuł
7. Spektroskopia IR w badaniu białek
 - struktura drugorzędowa białek,
 - pasma amidowe
 - problem rozpuszczalnika
8. Prawo Lamberta-Beera:
 - wyprowadzenie
 - zastosowania
 - możliwe przyczyny odstępstw od prawa Lamberta-Beera

Przebieg ćwiczenia

Po zapoznaniu się z przyrządem, zasadami pomiarów w podczerwieni, zasadami pracy z kuwetami z materiałów higroskopijnych i z przystawką ATR oraz zbadaniem transmisyjnego widma powietrza i odbiciowego widma oscylacyjnego wody studenci przystępują do właściwego ćwiczenia.

W pierwszej części ćwiczenia mierzone zostaną widma serii prostych związków organicznych (np. izopropanol, aceton, glikol polietylenowy, celuloza) oraz wybranych tworzyw sztucznych (np. polistyren, parafilm) metodą transmisyjną lub odbiciową. Na podstawie biblioteki widm studenci przypiszą poszczególne pasma widm drganiom odpowiednich grup funkcyjnych, a następnie zidentyfikują związki. Dodatkowo zidentyfikują i rozróżnią substancje spożywcze (olej/oliwa lub miód/miód sztuczny/cukier)

W drugiej części ćwiczenia studenci wykonają pomiary widm białek metodą transmisyjną i odbiciową by przekonać się o zaletach metody ATR. Następnie porównają widma białka w formie aktywnej biologicznie i zdenaturowanej poprzez stopniowe podgrzewanie, dokonają analizy widm i ocenią skład próbek białek pod kątem zawartości struktur drugorzędowych.

Bibliografia

1. Z Kęcki. *Podstawy spektroskopii molekularnej*
2. G Barrow. *Wstęp do spektroskopii molekularnej*
3. *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych* – praca zbiorowa pod redakcją Wojciecha Zielińskiego i Andrzeja Rajcy
4. LA Kazicyna, NB Kupletska. *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych*
5. H Yang, S Yang, J Kong, A Dong, S Yu. *Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy*. Nat Protoc. 2015 Mar;10(3):382-96.
6. A Barth. *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta 1767, 2007, 1073–1101.
7. ME Goldberg, AF Chaffotte. *Undistorted Structural Analysis of Soluble Proteins by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy*. Protein Sci. 14, 2005, 2781–2792.
8. E Goormaghtigh, V Raussens, JM Ruyschaert. *Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes*. BBA 1422, 1999, 105–185.

Rezultaty ćwiczenia

- praktyczne wykorzystanie wiedzy dotyczącej zastosowania spektroskopii w podczerwieni
- zapoznanie się z technikami pomiarów w podczerwieni
- nabranie praktyki w metodach identyfikacji związków chemicznych
- uzyskanie umiejętności badania białek metodą ATR-FTIR