

Einführung in die Spektroskopie für Studenten der Biologie

Jörg H. Kleinschmidt

<http://www.biologie.uni-konstanz.de/folding/home.html>

Literatur

Banwell, C. N. , Elaine M. McCash, Molekülspektroskopie. Ein Grundkurs.
Taschenbuch - Oldenbourg Verlag, 1999. ISBN: 3486245074

Werner Schmidt, Optische Spektroskopie. Eine Einführung. 2.Auflage
Taschenbuch - 372 Seiten - Wiley/VCH, Weinh. 2000

Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR- Spektroskopie. Eine Einführung. von Horst Friebolin
Taschenbuch - Wiley/VCH, Weinh. 1999, 3., veränd. Aufl. ISBN: 3527295143

Atkins/de Paula, Physikalische Chemie, Wiley/VCH, 2006 (Spektroskopie-Kapitel)

Galla, H.J., Spektroskopische Methoden in Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Übungsaufgaben

<http://www.biologie.uni-konstanz.de/folding/Teaching-2008.html>

Spektroskopie — warum ist das eine wichtige Methode in der Biologie?

Um Struktur und Funktion biologischer Systeme zu untersuchen werden Werkzeuge, Methoden, und Hilfsmittel benötigt.

Beispiel Mikroskopie: mit weißem Licht lassen sich lebende Strukturen bis zu einer minimalen Größe von ca. 300 nm untersuchen, sofern diese lichtdurchlässig sind.

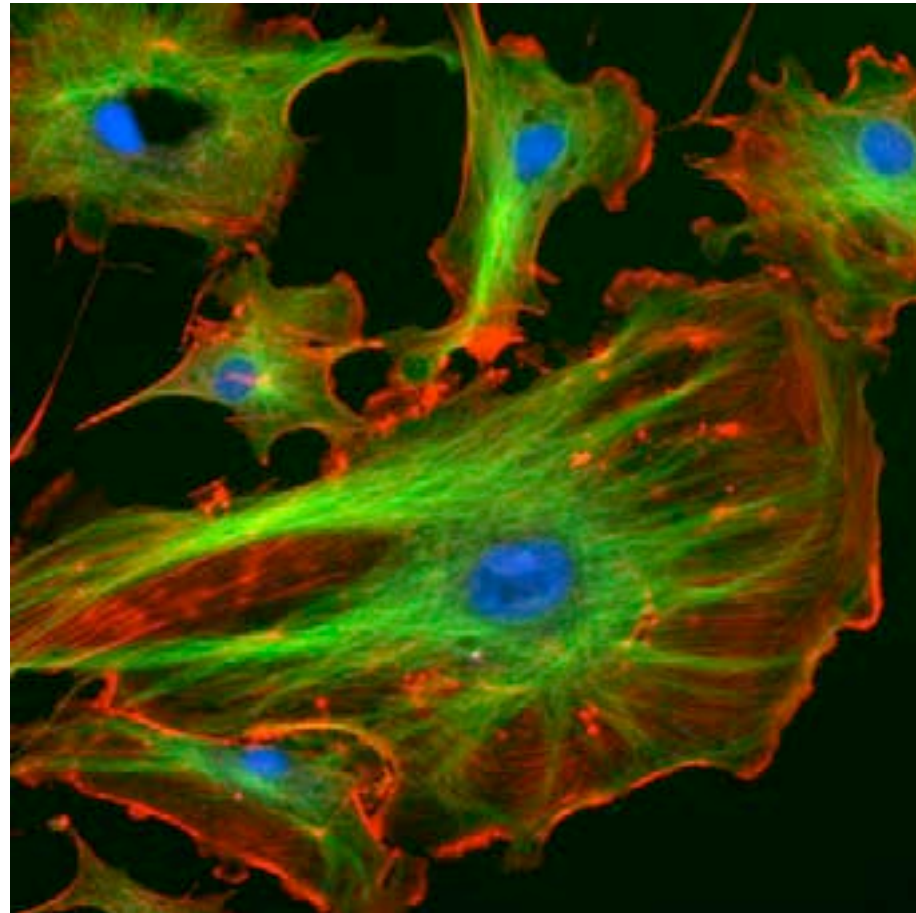
Höhere Auflösungen sind möglich, z.B. Elektronenmikroskopie. Die jeweiligen Verfahren stellen jedoch spezielle Anforderungen an die Probe, z.B. Trocknung. Die hohe Energie der Elektronen schädigt zudem das Objekt.

Es ist also notwendig, dass Methodenspektrum der instrumentellen Analyse zu erweitern, um Informationen zur Struktur biologischer Systeme und zur Dynamik biologischer Prozesse insbesondere auf molekularer Ebene zu erhalten.

Es ist insbesondere eine Herausforderung, besser zu verstehen wie biologische Moleküle, insbesondere Proteine und Nucleinsäuren, funktionieren, die die wesentlichen Aufgaben eines Organismus übernehmen. Biologische Makromoleküle sind aber meist kleiner als 20 nm.

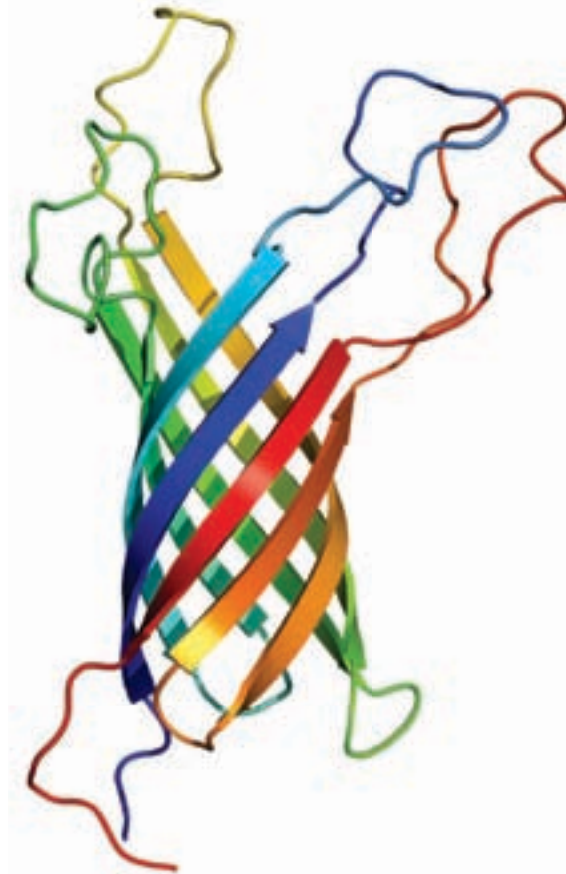
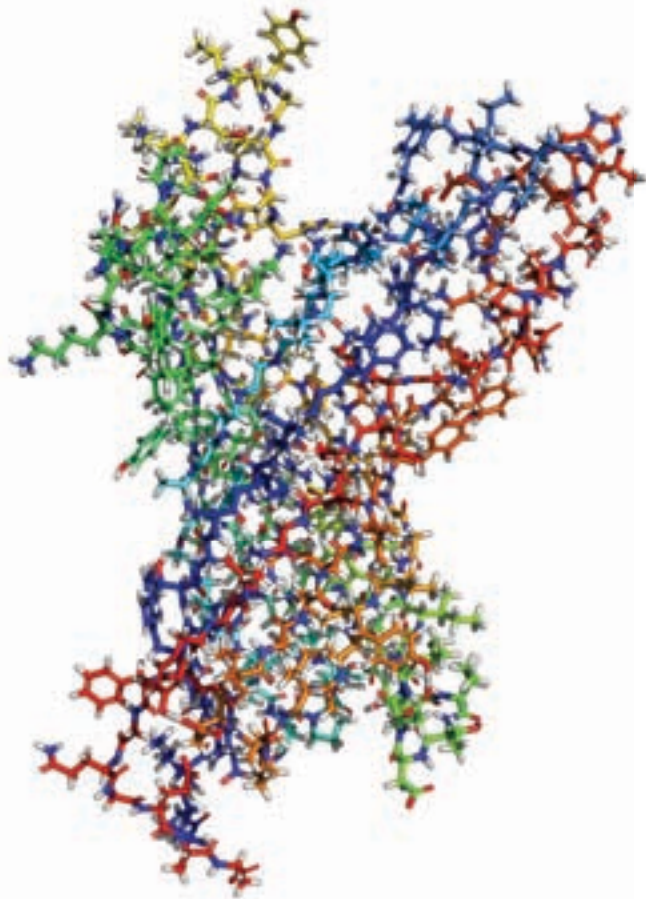
In der Praxis werden dazu als wichtige Werkzeuge eine Vielzahl spektroskopischer Methoden eingesetzt, die auf den Wechselwirkungen von Strahlung und Materie basieren und es erlauben, Vorgänge auf molekularer und intramolekularer Ebene zu untersuchen. Sehr leistungsfähig sind auch Verfahren, die auf der Kombination von spektroskopischen und mikroskopischen Methoden beruhen.

Beispiel: Sichtbarmachung und Lokalisierung der Cytoskelett-Komponenten in Endothelzellen durch Fluoreszenz-Markierung



Endothelzellen unter dem Mikroskop. Die Zellkerne sind mit DAPI Farbstoff (DNA-Bindefarbstoff) blau markiert. Die Mikrotubuli wurden über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper grün markiert. Mit rot fluoreszierendem Phalloidin wurden die Aktinfilamente markiert.

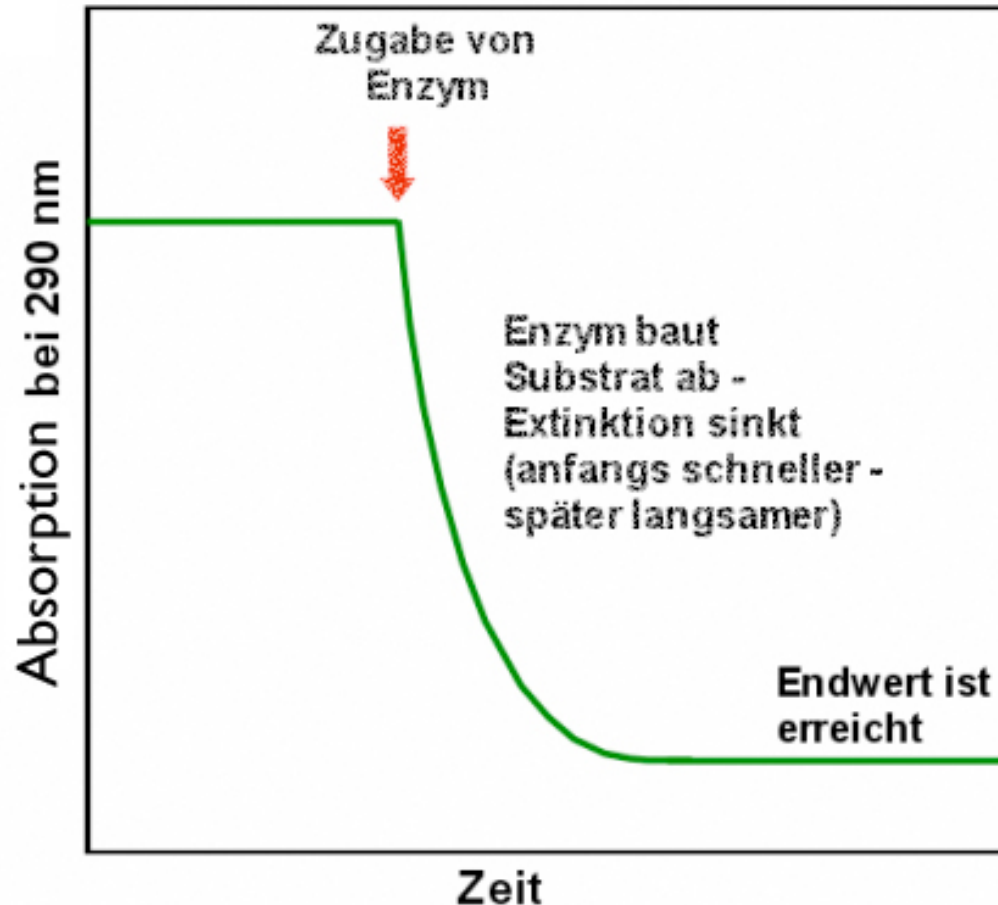
Beispiel: Struktur Biologischer Makromoleküle durch NMR-Spektroskopie



Außenmembranprotein A von *E. coli*

Arora et al., 2001
Nat. Struct. Biol. 8, 334-338

Beispiel: Abbau von Harnsäure im Blut bzw. Serum durch Uricase

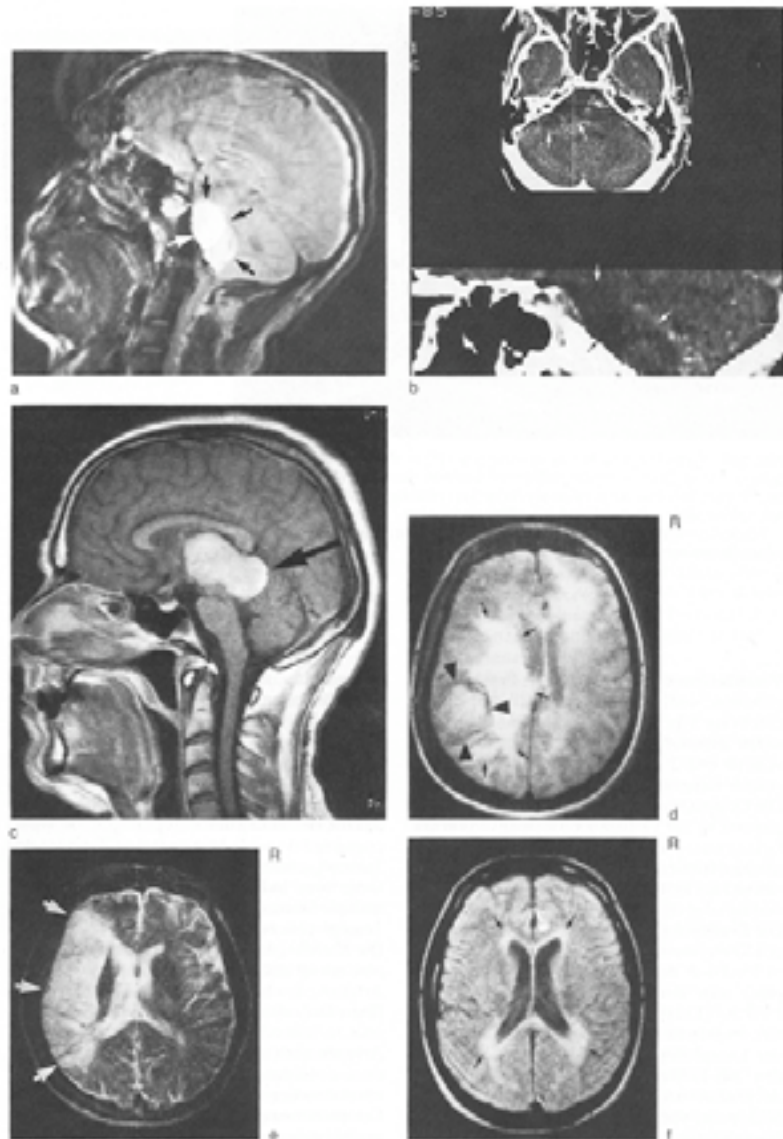


Der Abbau von Harnsäure im Blut durch Uricase.

Harnsäure absorbiert ultraviolette Strahlung (290 nm). Die Abbauprodukte absorbieren nicht oder nur geringfügig.

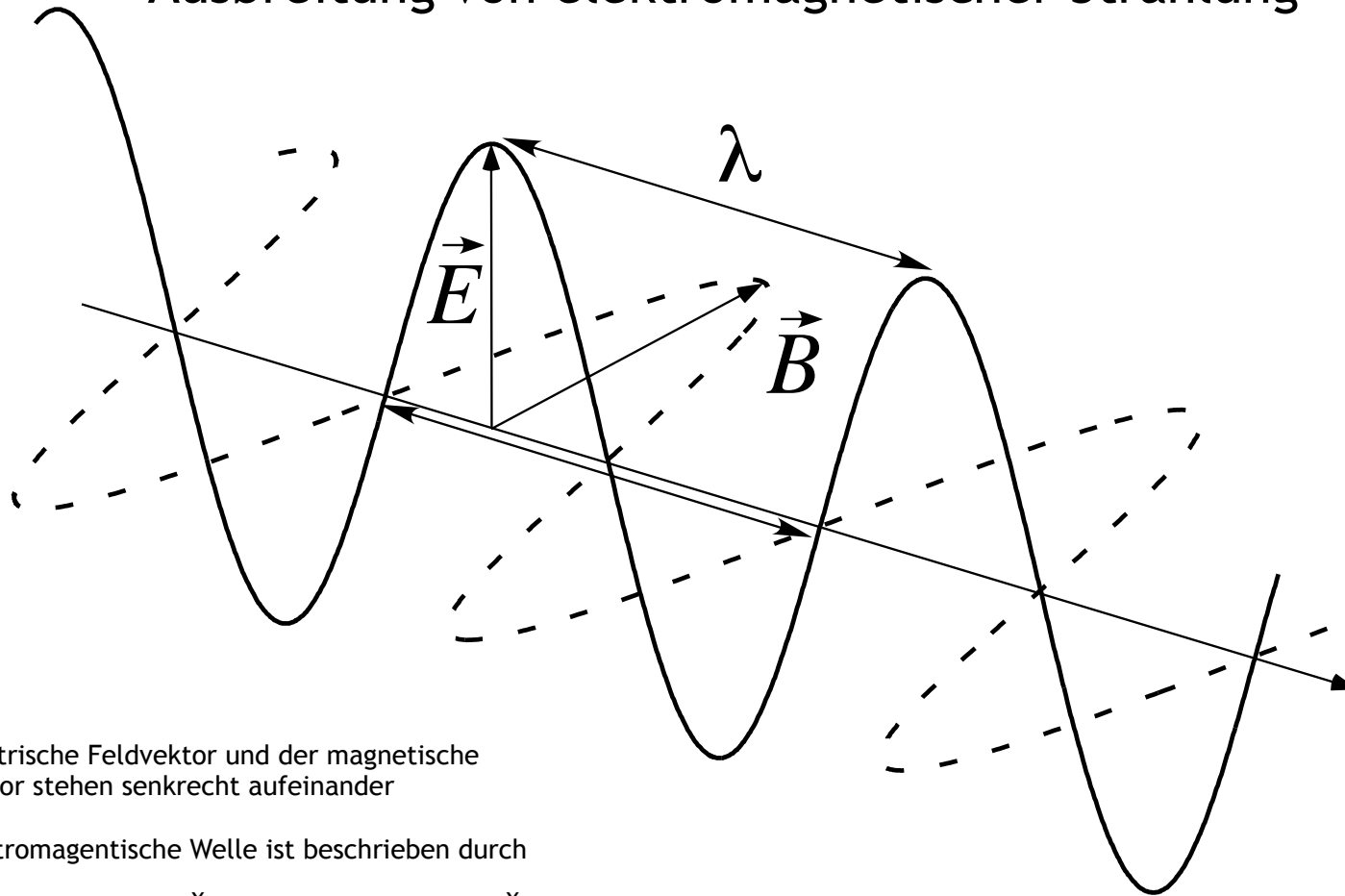
Die Geschwindigkeit des Abbaus von Harnsäure lässt sich mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie verfolgen.

Beispiel: Kernspinresonanz (NMR) -Tomographie



Kernspinresonanz als
diagnostisches Werkzeug in
der Biomedizin

Ausbreitung von elektromagnetischer Strahlung



Der elektrische Feldvektor und der magnetische Feldvektor stehen senkrecht aufeinander

Die elektromagnetische Welle ist beschrieben durch

$$E = E_0 \sin(2\pi\nu t - \frac{x}{v}) \text{ bzw. } B = B_0 \sin(2\pi\nu t - \frac{x}{v}),$$

ν : Frequenz: die Anzahl Wellenlängen die die Strahlung in 1 s zurücklegt.

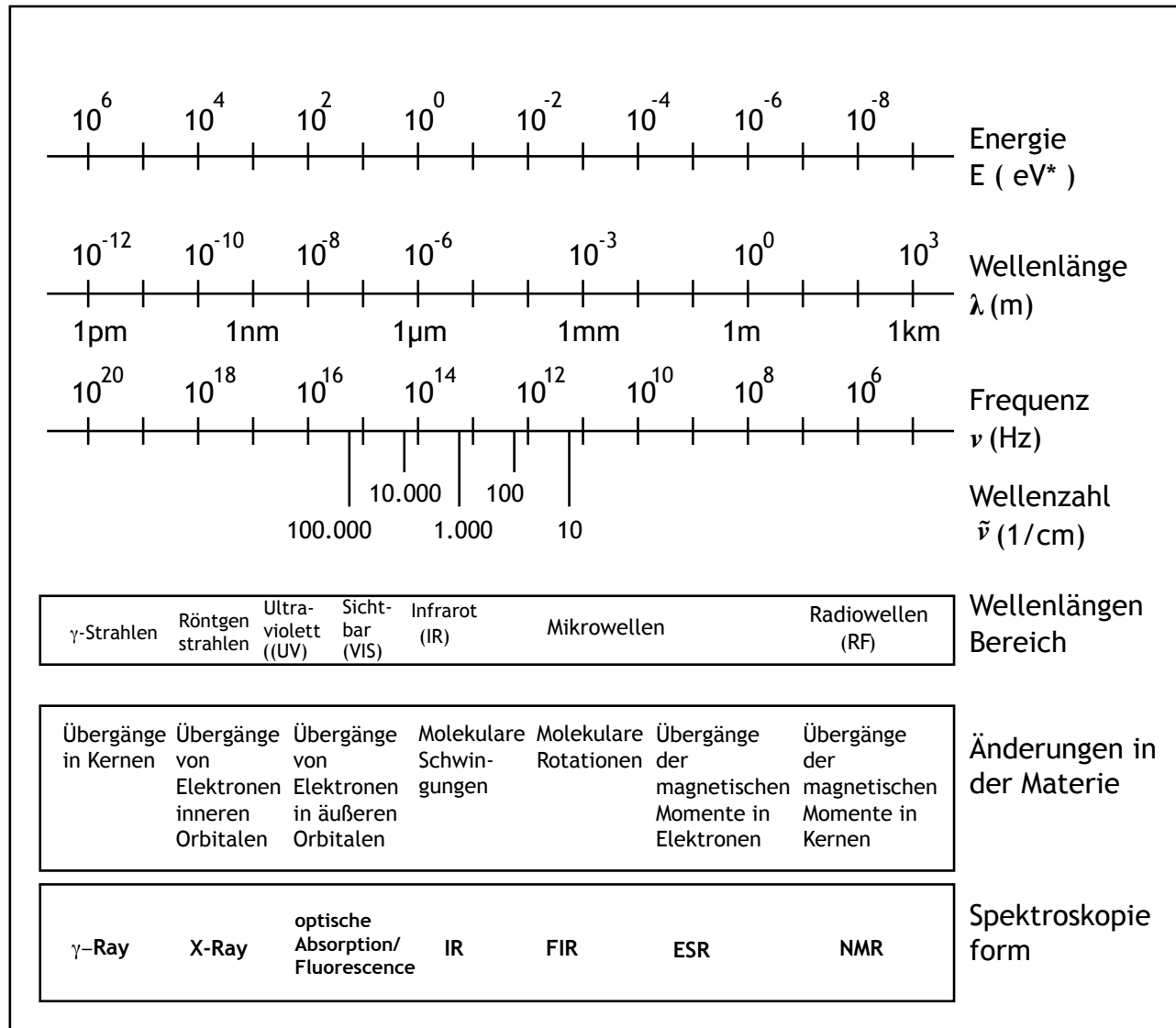
t : Zeit

x : Ort an dem E und B beobachtet werden

v : Ausbreitungsgeschwindigkeit

E_0, B_0 : Amplitude

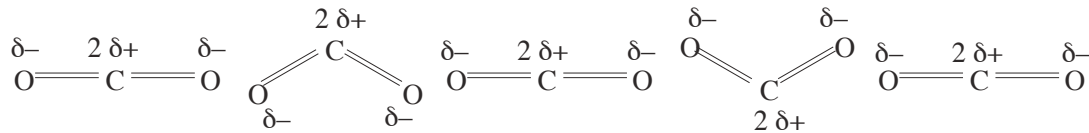
Spektroskopiearten und die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie



*) 1 eV = 1.602×10^{-19} J = 3.83×10^{-20} cal

Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch Moleküle steht in Relation zur zeitlichen Änderung der Ladungsverteilung im Molekül.

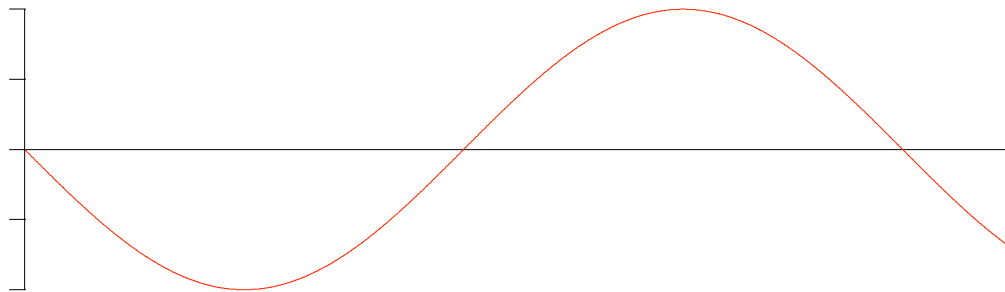
Biegeschwingung



Dipolmoment



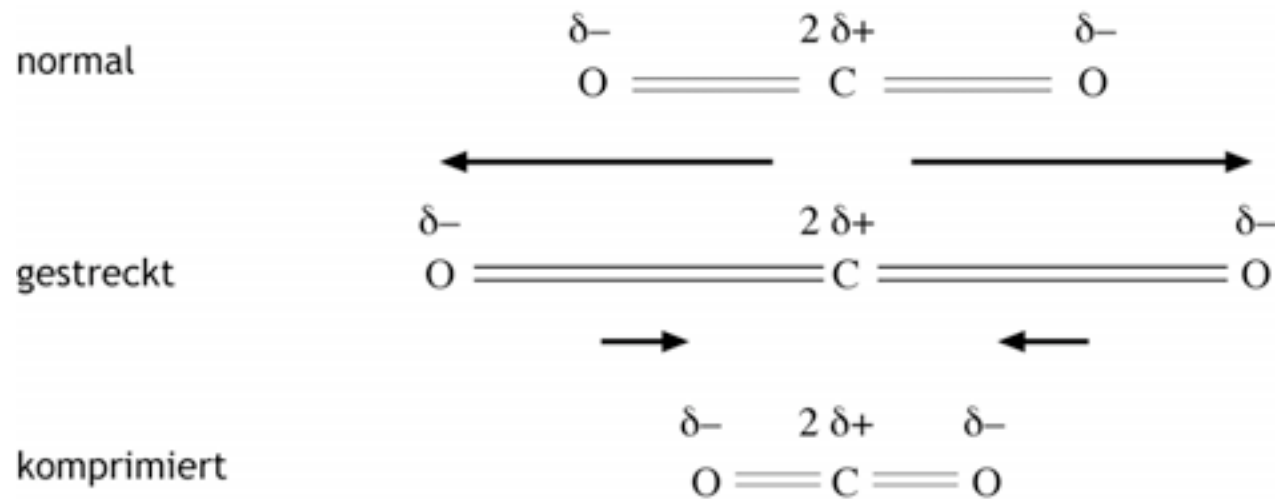
Änderung des Dipolmomentes im Verlauf der Biegeschwingung



Absorption tritt ein, wenn die Schwingungsfrequenz im Molekül und die Frequenz der eingestrahlten Strahlung übereinstimmen

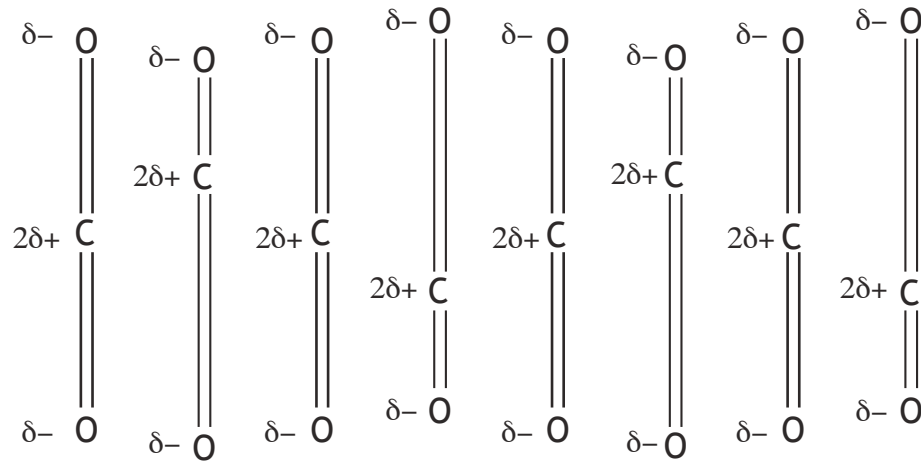
Biege-Schwingung des Kohlendioxidmoleküls und Schwingung des Dipolmomentes.

Bei der symmetrischen Streckschwingung des CO₂ erfolgt keine Änderung des Dipolmoments. Deshalb ist die Schwingung IR-inaktiv.

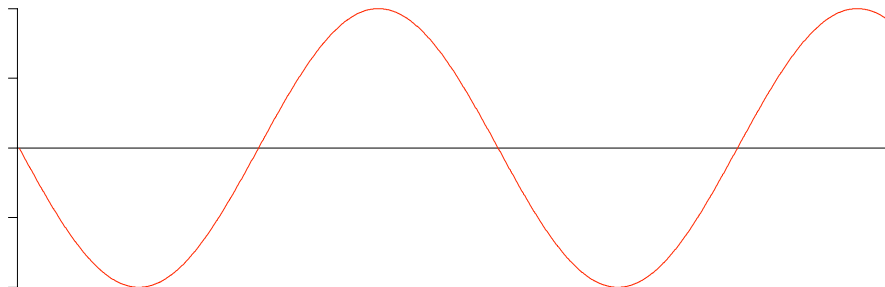


Die symmetrische Streckschwingung des Kohlendioxids: Das Dipolmoment ändert sich nicht.

Asymmetrische Streckschwinung des CO₂

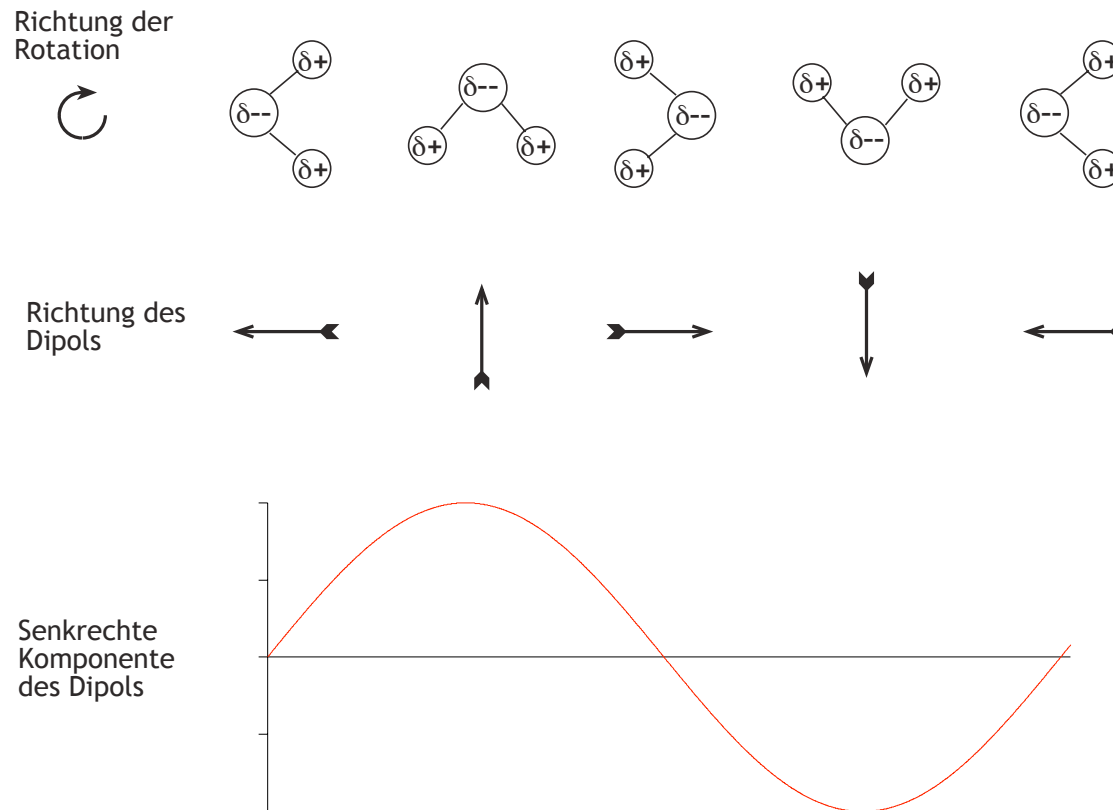


Dipolmoment

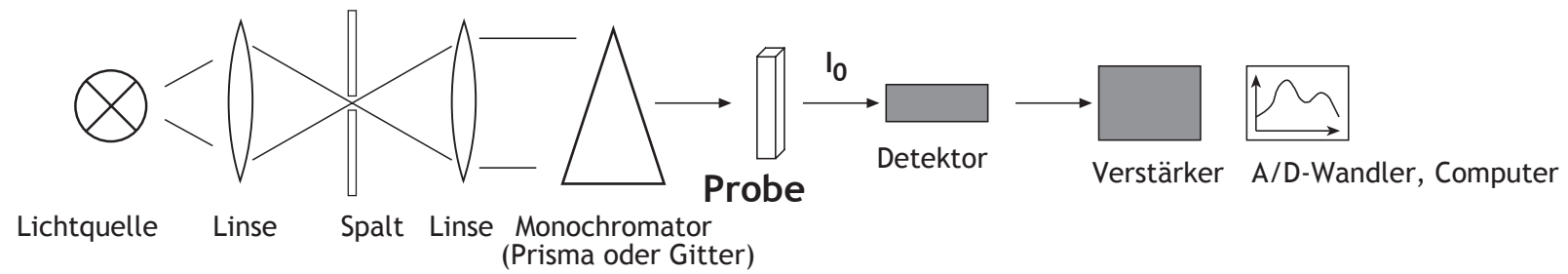


Die asymmetrische Streckschwinung des Kohlendioxidmoleküls. Das Dipolmoment hängt von der Asymmetrie ab und oszilliert in der Richtung des linearen Moleküls

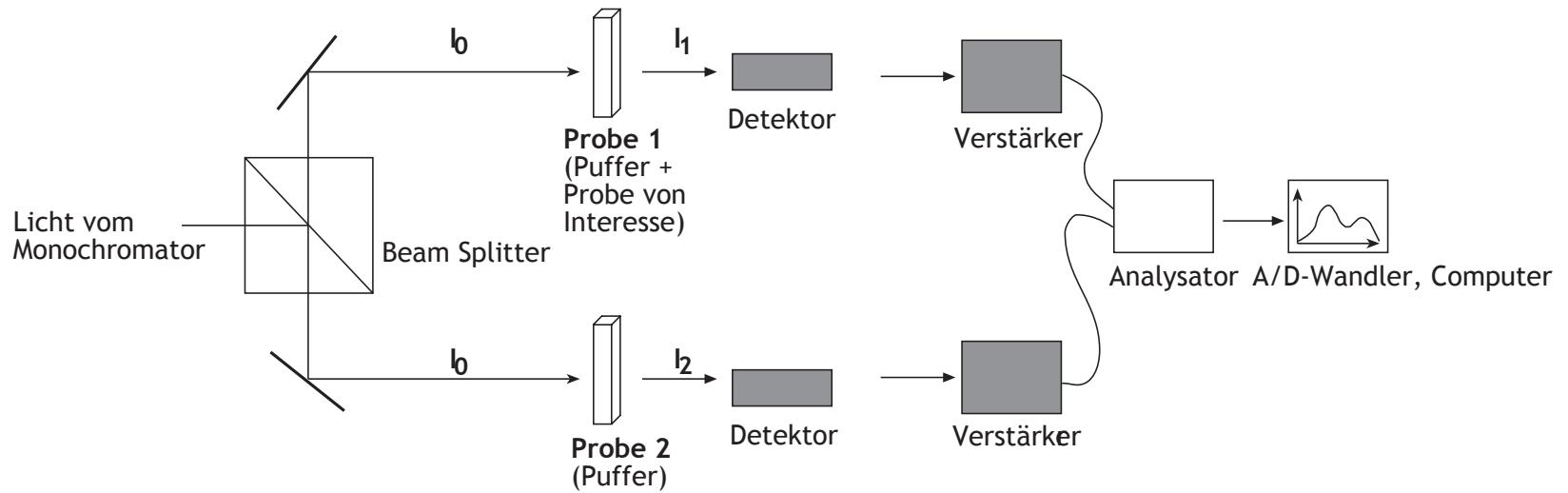
Bei der Rotation eines Moleküls mit permanentem Dipolmoment ändert sich die Komponente entlang einer Vorzugsrichtung im Raum. Deshalb kann auch Energie zur Anregung von Rotation absorbiert werden.



Die Rotation des Wassermoleküls hat eine Änderung des Dipolmoments entlang einer bestimmten Richtung zur Folge



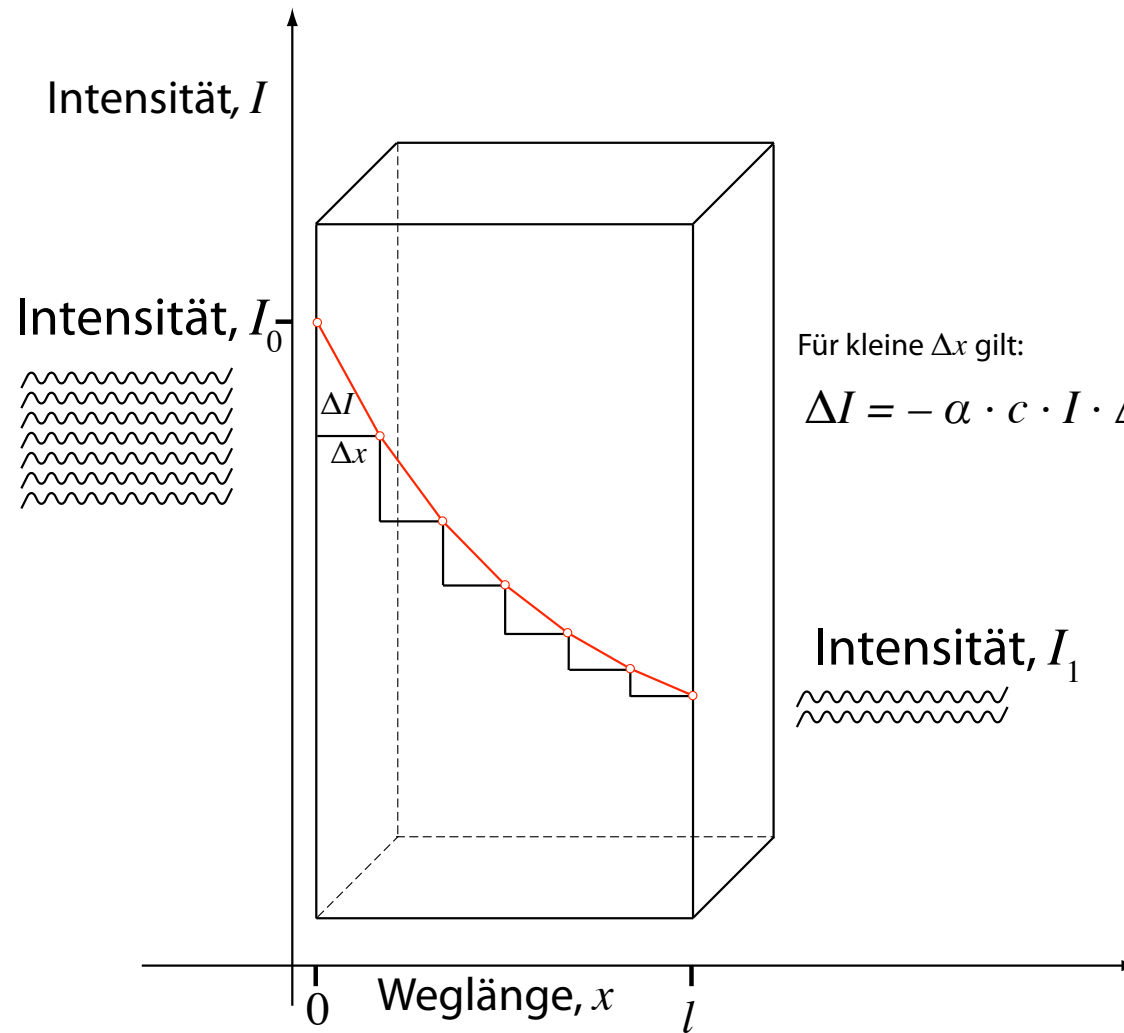
a Aufzeichnung der Lichtabsorption



b Aufzeichnung von Differenzspektren

Schematisches Diagramm eines einfachen Absorptionsspektrometers

Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung führt zu einem Intensitätsverlust, der von der Konzentration der Probe, von der Wegstrecke des Lichtes durch die Probe und von der Ausgangsintensität abhängt.



Für kleine Δx gilt:

$$\Delta I = -\alpha \cdot c \cdot I \cdot \Delta x$$

Da I nach jeder neuen (und konstanten) Wegstrecke Δx immer etwas kleiner ist, wird auch ΔI fortschreitend kleiner.

Herleitung des Bouguer-Lambert-Beer Gesetzes

Für sehr kleine Wegstrecken: $\Delta I = -\alpha \cdot c_M \cdot I \cdot \Delta x$ also $\frac{\Delta I}{I} = -\alpha \cdot c_M \cdot \Delta x$

Für $\Delta x \rightarrow 0$ d.h. dx wird dann aufsummiert bzw. integriert:

$$\int_{I_0}^{I_1} \frac{dI}{I} = \int_0^l -\alpha \cdot c_M \cdot dx$$
$$\Rightarrow \ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = -\alpha \cdot c_M \cdot l \quad I_1 = I_0 \exp(-\alpha \cdot c_M \cdot l)$$

Umgeformt als Exponentialfunktion zur Basis 10:

$$e^{\alpha \cdot x} = 10^{\log(e^{\alpha x})} = 10^{\alpha x \cdot \log(e)} = 10^{\alpha \cdot \log(e) \cdot x} = 10^{\varepsilon \cdot x}$$

$$I_1 = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c_M \cdot l}$$

Mit der Definition der Absorption als

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right) \quad \text{folgt} \quad A = \varepsilon \cdot c_M \cdot l$$

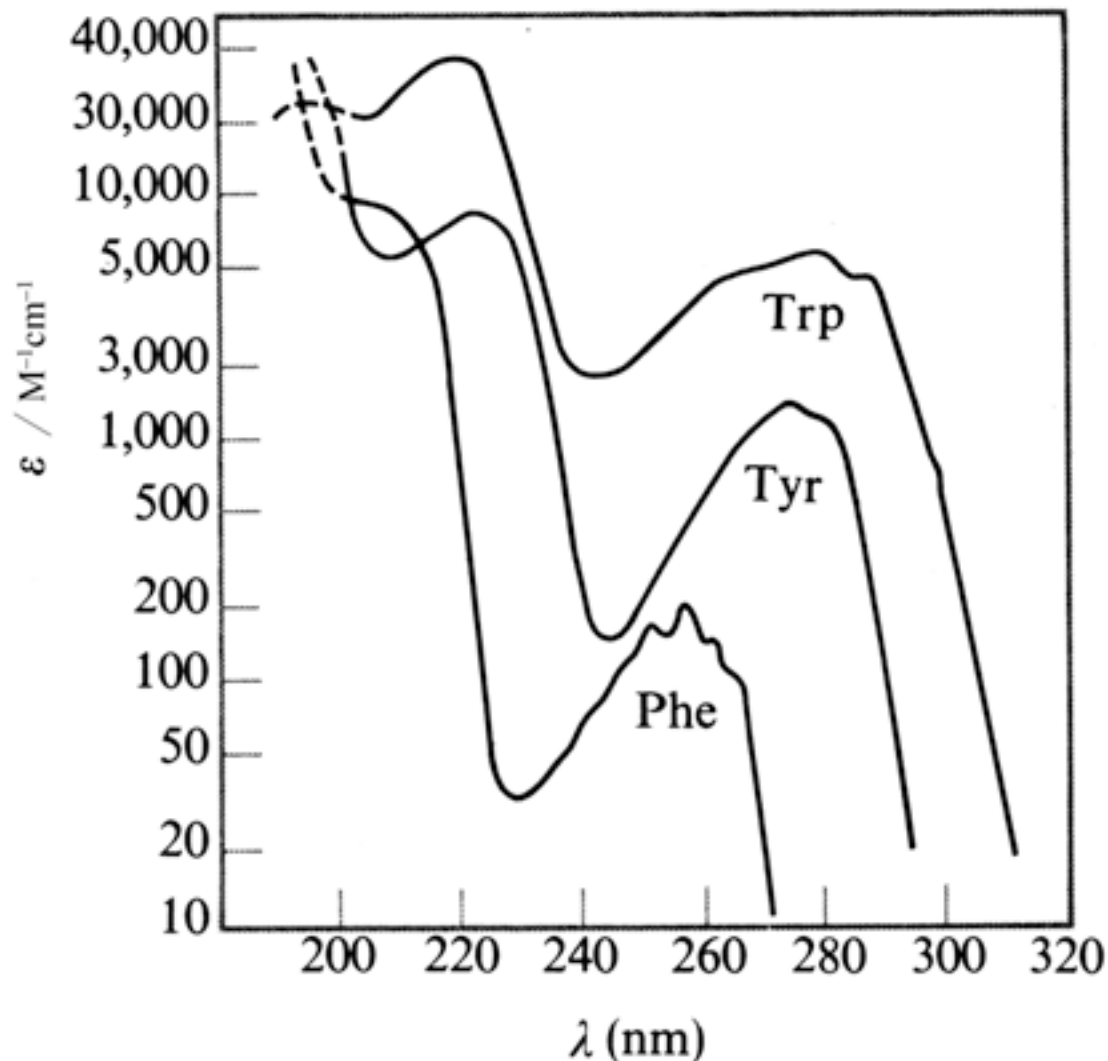
Die Größe $T = \frac{I_1}{I_0}$ bezeichnet man auch als Transmission, d.h.

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

Die Absorption wird in älterer Literatur auch als Extinktion oder optische Dichte (OD) bezeichnet. Im englischen Sprachraum findet man vorwiegend "absorption" and "optical density".

UV-Absorptionsspektren aromatischer Aminosäuren

Absorption $A(\lambda)$ bzw. Absorptionskoeffizient $\epsilon(\lambda)$ sind Wellenlängen-abhängig



Aufgetragen ist der Absorptionskoeffizient ϵ , als Funktion der Wellenlänge.

Die Aminosäuren absorbieren im ultravioletten Bereich und die Absorption als Funktion der Wellenlänge ist charakteristisch für die absorbierende Substanz.

Wie kommt es zu dieser Wellenlängenabhängigkeit der Absorption (bzw. des Absorptionskoeffizienten) ?