

ESPEKTROSKOPIA BIBRAZIONALA – ARIKETAK

1. *Hidrogeno eta deuterioaren arteko elkartrukeak, amida taldearen hidrogenoaren esposaketari (disolbatzailera) buruzko informazioa ematen digu. Kasu honetan, rodopsinaren deuterazio maila aztertu zen. 1. irudian, 24 orduz ur deuteratutako proteinaren espektroa (lerro beltza) eta ur deuteratutako desnaturalizatutako proteinaren (marradun lerroa) espektroak agertzen dira.*

a) Nola interpretatuko zenituzke espektroak taulako datuekin?

Alde batetik, bi balditzetan mantentzen diren bandak daude, hau da, proteina desnaturalizatuta zein desnaturalizatu gabe egon, banda hauen intentsitatea berdina da. Hau gertatzen da esaterako 1736 eta 1515 cm^{-1} banden kasuan. Lehena fosfodiesterreko karboniloaren luzapenarekin erlazionaturik dago; bigarrena aldiz, tirosinaren banda da.

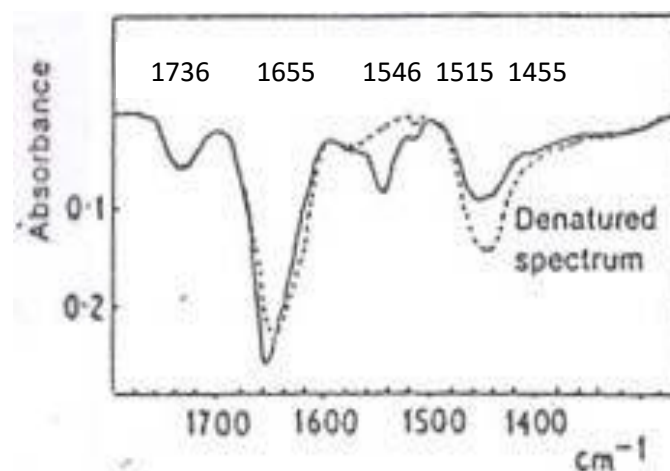
Bestetik, 1655 cm^{-1} -tan oso banda handia dago, amida I bandari dagokiona (α -helize egitura dueneko). Hau lotura peptidikoko C=O loturaren luzapena dela eta sortzen da. Hortaz, honek proteinaren α helizeen kantitatea handia dela adierazten digula esan daiteke. Desnaturalizatutako proteinak α helize egitura zati bat mantendu duela pentsa daiteke (bandaren intentsitatea jaitsi da, baina ez da desagertu), ez da guztiz desnaturalizatu.

1455 eta 1546 cm^{-1} -tako banden itxura asko aldatzen da proteina desnaturalizatuta edo desnaturalizatu gabe egon. 1455 cm^{-1} -eko banda, N-D dugunean sortutako amida II bandari dagokio eta egoera desnaturalizatuan intentsitate handiagokoa da, izan ere, desnaturalizatzean elkar-truke osoa izaten da eta horregatik amida I bandaren (1643 cm^{-1} -tan) desplazamendu bat ematen da. 1646 cm^{-1} -eko bada, amida II-ri dagokio (N-H makurdura eta C-N loturaren luzapena).

b) Nola jarraitu daiteke deuterioaren elkar-trukatzearen prozesua denboran?

Aldatzen diren bandak behatuz deuterizazio maila zein den ondorioztatu genezake. Horretarako, 1546 cm^{-1} -tako amida II-ren bandaren (desagertzen dena), edo 1455 cm^{-1} -eko amida II bandaren bilakaera (agertzen dena) jarraitu daiteke.

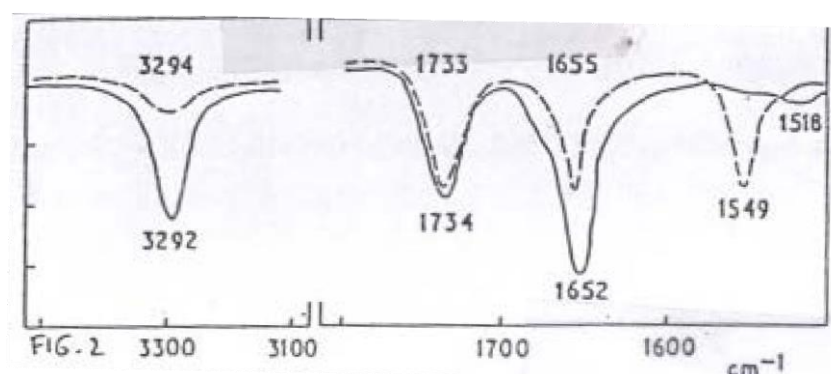
1. Irudia



Beraz, ondoriozta daiteke desnaturalizaturiko proteinak bere egitura galdu eta horregatik, deuterioarekin elkarrekintza gehiago dituela.

Band Position	Assignment
1736 cm^{-1}	Phospholipid ester carbonyl stretching
1652 cm^{-1}	Amide I ($\text{C}=\text{O}$ stretching of peptide bond) α -helical form
1643 cm^{-1}	Amide I (random-coil form)
1632 cm^{-1}	Amide I (β -sheet form)
1515 cm^{-1}	Tyrosine band
1546 cm^{-1}	Amide II ($\text{N}-\text{H}$ bending and $\text{C}-\text{N}$ stretching)
1430/55	Amide II band when N-D

2. Irudian poli-g-benzil-L-glutamikoaren film baten IR espektroa azaltzen da. Lagina, filma tenkatuz orientatu zen. Espektro marraduna zuntzarekiko perpendikularra den erradiazio polarizatua erabiltu lortu zen, eta marra jarraiduna, paraleloa den erradiazioa erabiltu. Zein da polipeptidoari buruz atera dezakezun informazioa?



vibration	Direction of oscillation of transition dipole	Hydrogen-bonded Forms			
		α Helix Frequency (cm^{-1})	Dichroism relative to long axis	β -Sheet Frequency (cm^{-1})	Dichroism
N-H (stretch)	\longleftrightarrow	3290 - 3300		3280 - 3300	\perp
Amide I ($\text{C}=\text{O}$ stretch)	\longleftrightarrow	1650 - 1660		1630	\perp
Amide II $\begin{array}{c} \text{C}-\text{N} \text{ (C-N stretch)} \\ \text{ (N-H bend)} \\ \text{H} \end{array}$	\nwarrow	1540 - 1550	\perp	1520 - 1525	

Taula 2

1733 cm⁻¹-banda izan ezik, fosfodiester luzapen karboniloarekin erlazionaturik dagoena, gainerako banda guztiak aldatu egiten dira. Aipaturiko pikoan ez da aldaketarik ematen, paraleloki edo perpedikularki polarizatutako argia berdin xurgatzen duelako, ez da dikroismorik ematen. Ez du dikroismorik momentu dipolarra anulatzen delako. Bestalde, gerta liteke taldeak zuntzean ordenatu gabe kokatzea, eta ondorioz, paraleloki edo perpendikularki polarizatutako argi kantitate bera xurgatzea.

3294 cm⁻¹-tako banda erradiazio perpendikularrarekin argizatzean asko jaisten da. N-H luzapenari dagokion bandaren intentsitatea da, erradiazio perpendikularra erabiltzen denean (β orri gutxiago dagoenaren adierazle).

1549 cm⁻¹-banda argi polarizatua perpendikularra denean handitzen da (α helizearekin erlazionatua).

Hau horrela, proteinak nagusiki α -helize egitura duela ondorioztatu daiteke, proteinan β -orriak egitura duten eskualdeak ere aurkituko ditugularik (baina proportzio txikiagoan).

3. IRa, karboxilo taldearen ionizazioa aztertzeko erabilgarria izan daiteke. Ionizatutako hondarrek banda bat azaltzen dute 1570 cm⁻¹-ean (C=O tentsioa), 1710 cm⁻¹-tara aldatzen dena protonatzen direnean. Proteinetan, banda hauek, amida I bandaren sorbalda bat bezala azaltzen dira. Arazo hau, IR espektroskopia diferentziala erabiliz konpondu daiteke. 4. Irudian espektro zuzenak eta 5. Irudian espektro diferentzialak azaltzen dira. Erreferentzia modura lizozima pD 4,4, ur deuteratutan erabili da.

a) Zergatik ez da amida II banda azaltzen 1546 cm⁻¹-etara?

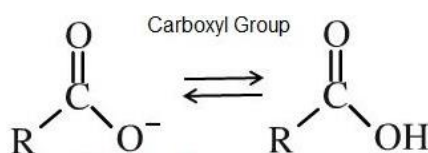
Amida II banda N-H loturarekin dago erlazionatuta. Kasu honetan, pHa altua denez (protoi kontzentrazio baxua) ingurunean ez da hidrogenorik egongo eta nitrogenoak ezingo du N-H lotura hori osatu. Beraz, ez da 1546 cm⁻¹-tako bandarik agertuko.

b) Nola determinatuko zenuke ionizagarriak diren karboxilo taldeen pK eta nola azaldu ditzakezu lortutako emaitzak?

pKa-ren arabera, pH-a aldatu ahala, banda batzuk handitu eta beste batzuk txikitu egiten dira. pH desberdinetan banden intentsitatea neurtuz gero, pK balioak kalkulatu daitezke. Hau ez da erraza izaten, azido talde bat baino gehiago izaten baitira normalean.

c) Zein talderi dagokio 1565 eta 1707 cm⁻¹-tara agertzen diren bandak?

pHaren arabera:



Kasu honetan H-ren ordez D (deuterioa) izan beharko litzateke.

[H⁺] baxua (1570) [H⁺] altua (1710)

pH baxua denean (protoi kontzentrazio altua), sorbaldaren esleipena COOD (deuterioa)-rena izango da, 1710 cm^{-1} -eko banda.

pH altua denean, marra zuzenean beste banda bat azaltzen da, hau kasu honetan COO^- egoeran egongo gara eta talde horri dagokion banda 1570 cm^{-1} -ekoa da.

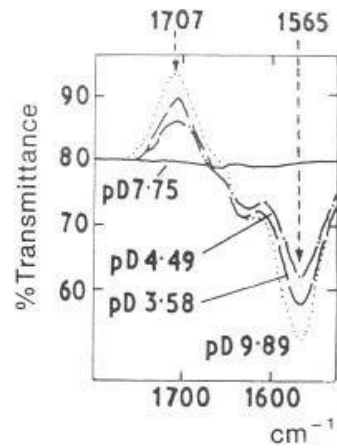
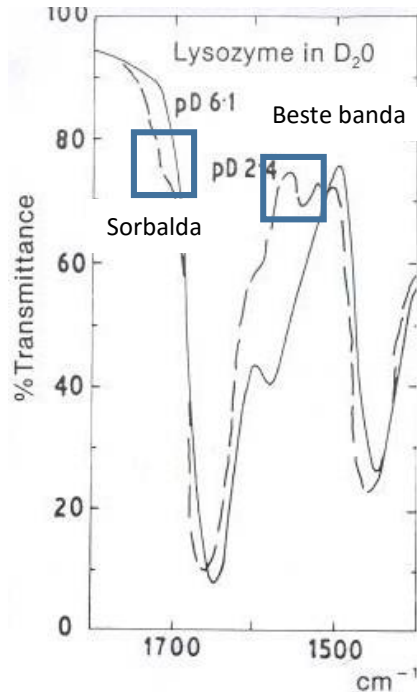


Figura 5

ionizados 1570 cm^{-1} (C=O tensión), protonados 1710 cm^{-1}