

## Tentamen Chemische Analysemethoden

3 november 2010

Naam:

Student nummer (Leiden):

**Geef uw antwoord op dit papier. U mag uw tekstboek, aantekeningen en een rekenmachine gebruiken.**

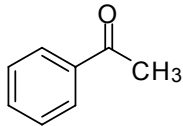
1) Ruime ervaring met diverse metingen leert dat de concentratie van ijzer in een zeker monster **0.137 wt %** is. Een nieuwe analysemethode geeft de volgende uitkomsten: **0.129, 0.133, 0.136, 0.130, 0.128** en **0.131 wt %**. Komen deze resultaten overeen met de bekende waarde (95% betrouwbaarheidsniveau)? Licht je antwoord toe. (*From different measuring techniques, the concentration of iron from a specific sample is 0.137 wt %. A new analytical method gives the following results: 0.129, 0.133, 0.136, 0.130, 0.128 and 0.131 wt %. Do the results agree with the known value within 95% confidence? Justify your answer.*)

2) Vind tenminste drie fouten in de volgende paragraaf en verklaar waarom het genoemde fout is. (*Find at least three errors in the following paragraph and explain what is wrong with each of the erroneous statements.*)

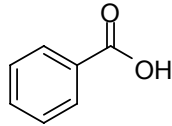
Een eiwitkristallograaf probeert een structuur op te lossen middels 'molecular replacement'. Na dataverwerking, geeft de kristallografische data aan dat het kristal in de orthorhombische ruimtegroep  $P22_1$  is. De kristallograaf vindt een R-factor van 60% en meent dat 'molecular replacement' de juiste oplossing heeft gevonden. Aangezien zijn kristallen seleno-methionine gelabeld eiwit bevat, besluit hij het fase probleem tevens op te lossen door gebruik te maken van de SAD methode en het feit dat Bijvoet paren (te weten  $|F_+|$  en  $|F_-|$ ) dezelfde meting geven bij de piek golflengte. (*A protein crystallographer is attempting to solve a structure by molecular replacement. After processing the data, it was determined that the crystal is in the orthorhombic spacegroup  $P22_1$ . After obtaining an R-factor of 60%, the crystallographer believes he has found the correct solution from molecular replacement. . Nonetheless, given his crystals contain seleno-methionine labeled protein, he decides to also solve the phase problem using the SAD method and the fact that Bijvoet pairs (i.e.  $|F_+|$  and  $|F_-|$ ) provide equal measurements for this crystal at the peak wavelength.*)

3) De capaciteitsfactoren van drie verbindingen gescheiden op een C<sub>8</sub> reversed phase kolom zijn samengevat in de tabel. Er werd met een mengsel van MeOH/water geelueerd bij twee verschillende pH waarden. (*The retention factor from three different compounds separated on a C<sub>8</sub> reversed phase column is summarized in the table. The eluent was a mixture of methanol and water buffered at 2 pH values.*)

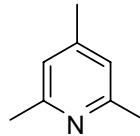
Analyt	pH 3	pH 7
<b>Acetophenon</b>	4.21	4.37
<b>Benzoëzuur</b>	3.23	0.81
<b>Collidine</b>	0.00	3.11



Acetophenon



Benzoëzuur  
pK<sub>a</sub> = 4.19



Collidine  
pK<sub>a</sub> = 7.43

a) Verklaar het chromatografische gedrag van de gegeven stoffen. (*Explain the behaviour of the retention factors.*)

b) Zou bij gebruik van een silica kolom het elutie gedrag veranderen? Waarom wel of niet? (*Would the elution behaviour change if a bare silica column was used? Why or why not?*)

**(4)** Je probeert een eiwit te zuiveren met een molecuulgewicht van 40 kDa en een pI van 7. Het bindt middels hydrophobe interacties aan een ander eiwit. Verder is het eiwit zowel in waterige buffers met een pH rond de 7 en organische oplosmiddelen oplosbaar. Er zit geen histidine tag op het eiwit. *(You are trying to purify a 40kDa protein which has a pI of 7 and that binds via hydrophobic interactions to another protein. Your protein is soluble in both water based buffers at a pH of 7 and organic solvents. Please note that there is no histidine tag on the protein.)*

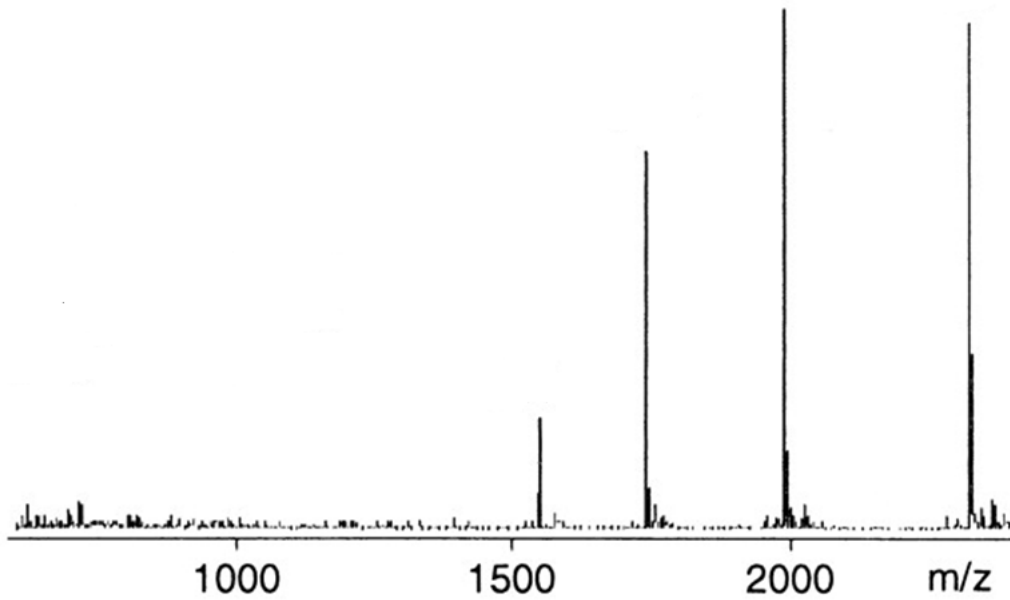
(a) Welke kolom zou je gebruiken om dit eiwit te zuiveren uit het cel lysaat en waarom? Hoe kan je bepalen wanneer je eiwit van de kolom elueert? *(What column would you use to purify this protein from the cell lysate and why? How would you know when your protein would elute from this column?)*

(b) Met welke chromatofische methode kun je bepalen of je eiwit in monomere of multimere vorm is en waarom? *(What chromatographic method would you use to determine if your protein is monomeric or multimeric and why?)*

5) **0.267 g** van een verbinding met moleculair gewicht **337.69** werd opgelost in **100 mL** ethanol. Een **2.00 mL** aliquot werd genomen en aangevuld tot **100 mL**. Deze oplossing werd geplaatst in een UV-VIS spectrofotometer (2 cm cuvet) en gaf een absorbantie van **0.728** bij 438 nm. Bereken de molaire extinctiecoëfficiënt ( $\epsilon$ ,  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

De absorbantie van een oplossing van dezelfde verbinding (**0.267 g**) in **50 mL** ethanol, gemeten in 1 cm cuvet, was **3.41**. Geef een verklaring. (*0.267 g of a compound with molecular weight of 337.69 was dissolved in 100 mL ethanol. A 2.00 mL aliquot was taken and diluted to 100 mL. This solution gave absorbance of 0.728 (2 cm cuvet) at 438 nm. Calculate the molar absorptivity of the compound ( $\epsilon$ ,  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The absorbance of a solution of 0.267 g of the same compound in 50 mL ethanol was 3.41 if measured in 1 cm cuvet. Explain this observation. )*

6) Een “*electrospray*” massaspectrum van een eiwit opgenomen met behulp van een “*transmission quadrupole mass spectrometer*” bevat 4 pieken (zie Figuur). Geef een schatting van de moleculaire massa van het eiwit. Licht je antwoord toe, laat alle relevante formules en berekeningen zien. (Geen toelichting = 0 punten). (*An electrospray mass spectrum of a protein recorded on a transmission quadrupole mass spectrometer exhibits the following 4 major peaks. Estimate the molecular mass of the protein. Explain how you have obtained the molecular weight of the protein from the spectrum showing all relevant calculations (No explanation = no points).*)



## Tentamen Chemische Analysemethoden

3 november 2010

Naam:

Student nummer (Leiden):

**Geef uw antwoord op dit papier. U mag uw tekstboek, aantekeningen en een rekenmachine gebruiken.**

1) Ruime ervaring met diverse metingen leert dat de concentratie van ijzer in een zeker monster **0.137 wt %** is. Een nieuwe analysemethode geeft de volgende uitkomsten: **0.129, 0.133, 0.136, 0.130, 0.128** en **0.131 wt %**. Komen deze resultaten overeen met de bekende waarde (95% betrouwbaarheidsniveau)? Licht je antwoord toe. (*From different measuring techniques, the concentration of iron from a specific sample is 0.137 wt %. A new analytical method gives the following results: 0.129, 0.133, 0.136, 0.130, 0.128 and 0.131 wt %. Do the results agree with the known value within 95% confidence? Justify your answer.*)

Answer: calculate the mean and variance and determine the t value for 95% confidence and degree of freedom (n - 1) 5. From this, calculate the confidence interval and see if 0.137 is within it. If it is, then we will know whether the result agrees with the known value.

Please note that this is different to calculating whether two experimentele results agree with each other (i.e. using  $s_{\text{pooled}}$ , etc.).

2) Vind tenminste drie fouten in de volgende paragraaf en verklaar waarom het genoemde fout is. (*Find at least three errors in the following paragraph and explain what is wrong with each of the erroneous statements.*)

Een eiwitkristallograaf probeert een structuur op te lossen middels 'molecular replacement'. Na dataverwerking, geeft de kristallografische data aan dat het kristal in de orthorhombische ruimtegroep  $P22_1$  is. De kristallograaf vindt een R-factor van 60% en meent dat 'molecular replacement' de juiste oplossing heeft gevonden. Aangezien zijn kristallen seleno-methionine gelabeld eiwit bevat, besluit hij het fase probleem tevens op te lossen door gebruik te maken van de SAD methode en het feit dat Bijvoet paren (te weten  $|F_+|$  en  $|F_-|$ ) dezelfde meting geven bij de piek golflengte. (*A protein crystallographer is attempting to solve a structure by molecular replacement. After processing the data, it was determined that the crystal is in the orthorhombic spacegroup  $P22_1$ . After obtaining an R-factor of 60%, the crystallographer believes he has found the correct solution from molecular replacement. . Nonetheless, given his crystals contain seleno-methionine labeled protein, he decides to also solve the phase problem using the SAD method and the fact that Bijvoet pairs (i.e.  $|F_+|$  and  $|F_-|$ ) provide equal measurements for this crystal at the peak wavelength.*)

Answer:

Spacegroup  $P22_1$  does not exist (two orthogonal two folds/screws generates a third)

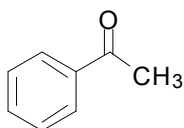
60% R-factor is very high and indicates that a solution has not been found from molecular replacement.

A SAD experiment with an anomalous scatterer will lead to Bijvoet pairs being different (i.e.  $|F_+|$  and  $|F_-|$  will not give equal measurements)

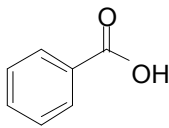


3) De capaciteitsfactoren van drie verbindingen gescheiden op een C<sub>8</sub> reversed phase kolom zijn samengevat in de tabel. Er werd met een mengsel van MeOH/water geelueerd bij twee verschillende pH waarden. (*The retention factor from three different compounds separated on a C<sub>8</sub> reversed phase column is summarized in the table. The eluent was a mixture of methanol and water buffered at 2 pH values.*)

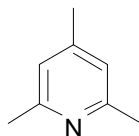
Analyt	pH 3	pH 7
<b>Acetophenon</b>	4.21	4.37
<b>Benzoëzuur</b>	3.23	0.81
<b>Collidine</b>	0.00	3.11



Acetophenon



Benzoëzuur  
pK<sub>a</sub> = 4.19



Collidine  
pK<sub>a</sub> = 7.43

a) Verklaar het chromatografische gedrag van de gegeven stoffen. (*Explain the behaviour of the retention factors.*)

The charge of acetophenon will not change by varying the pH and the retention factor will be high because it is more non-polar than the others. At pH 7, benzoëzuur will be charged and hence it will be repulsed by the column. At pH 3, it will not be charged and hence more non-polar and will be retained/held by the column. On the other hand, at pH 3, collidine will be charged, and hence repelled by the column and elute out quickly. But, at pH 7, it will be (mainly) neutral and hence attractive to the non-polar column.

b) Zou bij gebruik van een silica kolom het elutie gedrag veranderen? Waarom wel of niet? (*Would the elution behaviour change if a bare silica column was used? Why or why not?*)

The elution factor will be different by changing to a polar and negatively charged column. For example, acetophenone will not be attracted to it. The positively charged collidine at pH 3 will be attracted to it (the most), but this will disappear at pH 7. For benzoic acid, there will be electrostatic repulsion at pH 7 (both the molecule and column will be negatively charged), but not at pH 3.

**(4)** Je probeert een eiwit te zuiveren met een molecuulgewicht van 40 kDa en een pI van 7. Het bindt middels hydrophobe interacties aan een ander eiwit. Verder is het eiwit zowel in waterige buffers met een pH rond de 7 en organische oplosmiddelen oplosbaar. Er zit geen histidine tag op het eiwit. (*You are trying to purify a 40kDa protein which has a pI of 7 and that binds via hydrophobic interactions to another protein. Your protein is soluble in both water based buffers at a pH of 7 and organic solvents. Please note that there is no histidine tag on the protein.*)

(a) Welke kolom zou je gebruiken om dit eiwit te zuiveren uit het cel lysaat en waarom? Hoe kan je bepalen wanneer je eiwit van de kolom elueert? (*What column would you use to purify this protein from the cell lysate and why? How would you know when your protein would elute from this column?*)

Many answers are possible, but I would choose a hydrophobic interaction column (HIC). This is because the protein has a hydrophobic pocket, since it interacts with another protein through it. Since it would bind strongly to the HIC column, it will elute later than most proteins. The interaction will not be specific, so the chromatogram won't be that clear, but options are limited.

(b) Met welke chromatofische methode kun je bepalen of je eiwit in monomere of multimere vorm is en waarom? (*What chromatographic method would you use to determine if your protein is monomeric or multimetric and why?*)

Size exclusion chromatography elutes based on size (if we assume all proteins are roughly the same shape). Thus, by comparing with a standard, we can get a rough idea of the size of the protein: if it comes out at the same time as a 40 kDa standard, we know it must be monomeric. If it comes out at the same time as a 80 kDa, then it must be dimeric (and so on...) Please note that other answers are possible, but this is the optimal approach, in my opinion.