

# DOPLNĚNÍ K TEORII

## 1. Chromatografické metody – HPLC a GC

Úlohy: č.1 – Analýza směsi methylxantinů pomocí kapalinové chromatografie

č.4 – Stanovení acetonu pomocí plynové chromatografie

Volba samotného výpočtu chromatografických parametrů - počtu efektivních teoretických pater  $N_{ef}$  a rozlišení  $R$  - závisí na získaném chromatografickém záznamu.

*Je-li eluční křivka chromatogramu souběžná se základnou* (tedy rovná a bez vzrůstající tendence) využívá se pro výpočet šířky píku při základně, podle níže uvedených vzorců.

Hodnota rozlišení  $R$ , představující míru separace dvou chromatografických píků je vypočtena:

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})^2}{w_1 + w_2}$$

kde:  $t_R$  je retenční čas příslušného analytu

$w$  je délka základny příslušného píku

Pro počet efektivních (vztaženo k inertnímu analytu) teoretických pater  $N_{ef}$ , které udává míru účinnosti separační kolony, použijeme následující vzorec:

$$N_{ef} = 16 \cdot \left( \frac{t_R - t_M}{w} \right)^2$$

kde:  $t_R$  je retenční čas příslušného analytu

$t_M$  je mrtvý čas

$w$  je délka základny příslušného píku

*Má-li však eluční křivka tendenci růstu a není její profil souběžný s časovou osou (základnou), bylo by v tomto případě využití šířky píku při základně nesprávné, provádíme výpočty závisle proměnných parametrů ze šířky píku v polovině jeho výšky. Tato metoda stejně jako u inflexní metody (ve výšce 60,7 % pro normální Gaussův pík) není ovlivněna asymetrií píku.*

Následují příslušné vzorce pro výpočet rozlišení  $R$  a počet efektivních teoretických pater  $N_{ef}$

$$R_{1,2} = \frac{1,177 \cdot (t_{R2} - t_{R1})^2}{(w_{0,5})_1 + (w_{0,5})_2}$$

$$N_{ef} = 5,545 \cdot \left( \frac{t_R - t_M}{w_{0,5}} \right)^2$$

## 2. Elektromigrační separační metoda - ITP

Úlohy: č.2 – Stanovení kyseliny glutamové pomocí metod kapilární izotachografie a tenkovrstvé chromatografie

Doplnění kvantitativního vyhodnocení *Metodou přidavku standardu*.

Podle počtu přidavků standardu rozlišujeme:

### A. Přídavek jednoho standardu ke vzorku, kdy celkový objem je či není konstantní

Tyto metody se využívají pro početní výpočet koncentrace neznámého vzorku.

aa) V případě přidavku standardu ke vzorku, kdy celkový objem **není** konstantní, počítáme koncentraci tohoto vzorku podle rovnice:

$$c_i = \frac{V_S}{V_i} \cdot \frac{c_S}{\frac{A_{i+S}}{A_i} \cdot \frac{(V_i + V_S)}{V_i} - 1}$$

neboli

$$c_i = \frac{c_S \cdot V_S \cdot A_i}{(V_i + V_S) \cdot A_{i+S} - V_i \cdot A_i}$$

kde:  $c_i$  je koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku,  $c_S$  je koncentrace standardu,  $V_i$  je objem stanovovaného vzorku,  $V_S$  je objem přidaného standardu,  $A_i$  je hodnota kvantitativního parametru stanovovaného vzorku a  $A_{i+S}$  je hodnota kvantitativního parametru obohaceného vzorku (neznámý vzorek a přídavek standardu).

Algoritmus měření:

1. měření signálu  $A_i$  ve vzorku o objemu  $V_i$
2. přídavek  $V_S$  standardu o koncentraci  $c_S$  ke vzorku o objemu  $V_i$
3. měření signálu  $A_{i+S}$

ab) Je-li přídavek standardu ke vzorku a celkový objem **je** konstantní (vzorku i vzorku s přídavkem), počítáme koncentraci vzorku podle rovnice:

$$c_i = \frac{c_S \cdot V_S \cdot A_i'}{V_i \cdot (A_{i+S}' - A_i')}$$

$$A_i' = A_i \cdot \frac{V_i}{V_R}; \quad A_{i+S}' = A_{i+S} \cdot \left( \frac{V_i + V_S}{V_R} \right)$$

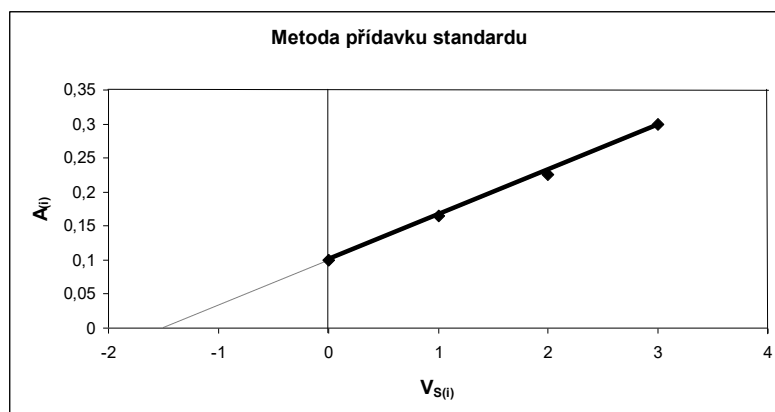
kde:  $c_i$  je koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku,  $c_S$  je koncentrace původního standardu (né po naředění do výsledného objemu),  $V_i$  je objem stanovovaného vzorku,  $V_S$  je objem přidaného standardu,  $V_R$  je objem celého připraveného roztoku ( $V_i + V_S +$  rozpouštědlo),  $A_i$  a  $A_i'$  je hodnota a korigovaná hodnota kvantitativního parametru stanovovaného vzorku na objem,  $A_{i+S}$  a  $A_{i+S}'$  je hodnota a korigovaná hodnota kvantitativního parametru obohaceného vzorku (neznámý vzorek a přídavek standardu) na objem.

U takto vypočtené koncentrace se již do výpočtu nezohledňuje použité ředění vzorku.

## B. Přídavek více standardů ke vzorku – zpracování lineární regresi

Algoritmus měření:

1. odměření objemu vzorku  $V_{(i)}$  do (i) odměrných baněk
2. přídavek  $V_{S(i)}$  standardu o koncentraci  $c_S$  do všech odměrných baněk (přídavek standardu do první banky  $V_{S(1)} = 0$ )
3. doplnění všech baněk na stejný konečný objem!
4. měření signálu  $A_{(i)}$
5. lineární regrese (obrázek 1)



Obr. 1. Zobrazení metody přídavku standardu do vzorku

Rovnice měření:

$$c_{vz} = \frac{c_S}{V_{vz}} \cdot \frac{a}{b}$$

kde:  $c_{vz}$  je koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku,  $c_S$  je koncentrace standardu,  $V_{vz}$  je objem stanovovaného vzorku,  $a$  je úsek a  $b$  směrnice kalibrační rovnice.

Standardní nejistota objemu při  $y_c = 0$ :

$$u_v = \frac{s_{yx}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b^2 Q_{xx}}}$$

Kde  $y_c = 0$  a  $Q_{xx} = \sum \cdot (x_i - \bar{x})^2$

Standardní nejistota vypočtené koncentrace  $u_c$ :

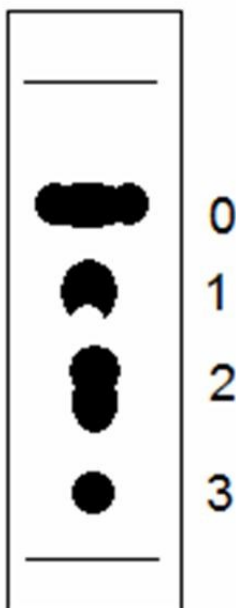
$$u_c = \frac{b c_{vz} u_v}{a}$$

### 3. Vyhodnocení dat - TLC

Úlohy: č.2 – Stanovení kyseliny glutamové pomocí metod kapilární izotachoforézy a tenkovrstvé chromatografie

č.3 – Analýza syntetických a rostlinných barviv pomocí tenkovrstvé chromatografie

Separace ve zvoleném chromatografickém systému probíhá na základě afinity analytu (hydrofobicita, funkční skupiny, atd.) k ukotvené stacionární fázi na vhodném nosiči. Eluční profil získaných zón, představující za vhodně zvolených podmínek stanovovaný separovaný analyt, může nabývat různých forem/tvarů. Ne vždy získáme symetrický kruhovitý profil zóny po eluci analytu v systému. Profil zóny se nejčastěji vyskytuje jako ovál, příp. chvostuje, nebo se rozpívá do stran (obrázek 2).



Obr.2. Nejčastější příklady profilů zón vzorku po chromatografické separaci. Zóna difunduje do strany (0), chvostuje (1), rozmývá se podélně do oválného tvaru (2), má symetrický kulovitý tvar (3).

Existují různé způsoby jak zobrazenou zónu vyhodnotit a získat tím příslušnou vzdálenost její migrace v separačním systému:

- i) ve středu zóny
- ii) v těžišti zóny
- iii) proložením ve vrcholu zóny

Zvolenou metodu pro výpočet retenčního faktoru, je třeba v každém případě pro celé vyhodnocení záznamu sjednotit!

#### 4. Vyhodnocení dat - PAGE

Úlohy: č.6 – Stanovení vaječných proteinů pomocí gelové elektroforézy

Separace vaječných proteinů probíhá při této úloze v nativním prostředí, tedy bez přítomnosti denaturujícího činidla a denaturace samotných proteinů.

Nativní nebo také nedenaturující elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je metoda, která se používá pro separaci látek (biologicky aktivních proteinů). V nativní gelové elektroforéze mobilita závisí na tvaru/velikosti, ale i na náboji látek, důležitými parametry tedy jsou pH elektroforetického pufru a pI separovaných látek. Hodnota pH pufru ovlivňuje nejen náboj molekuly, ale i její velikost a rychlost pohybu v gelu. Jeho volbou se upřednostňuje kvalita separace a její rychlost.

Po ukončení separace za použití vhodné vodící barvičky se vyhodnocuje získaný elektroforegram. Vodící barvičku, která se přidává k vzorku při jeho přípravě, volíme podle typu separace – katodická nebo anodická. Elektroforéza může tedy být prováděna vždy pouze v jednom směru a v této podobě poté i vyhodnocena (katodická separace = migrace kladně nabitých proteinů ke katodě, anodická separace naopak).

Při praktickém provedení se setkáváme s jevem, kdy lysozym ve vaječném bílku při separaci na komerčním Sebia gelu jako jediný migruje ke katodě. Samozřejmě jedním z faktorů je pH pufru prostředí, ale také samotné chování lysozymu vzhledem jeho pI hodnotě. Lysozym při vyšších hodnotách pH putuje lépe ke katodě. Uplatňuje se zde vyšší náboj. Naopak při nižších pH hodnotách, kdy se uplatňuje menší náboj, putuje ke katodě hůře. Za těchto podmínek (použití bromfenolové modři jako vodící barvičky, která pouze zaznamenává celou migrační dráhu proteinů; použitého elektroforetického pufru) nemůže být separace vyhodnocena podle postupu, který je uvedený ve skriptech u návodu úlohy.

#### ŘEŠENÍ:

Pro uniformní separaci proteinů v GE lze využít zvláštní typ nativní gelové elektroforézy tzv. modrou nativní gelovou elektroforézu (BN-GE).

#### **BN-GE**

Tato GE využívá CNN G-250, který se často přidává ke vzorku krátce před elektroforézou a také se anion této barvičky vyskytuje v pufru. CBB G-250 stejně jako dodecylsírán sodný (u denaturující GE; avšak na jiném mechanismu) udělí proteinům záporný náboj a proteiny migrují k anodě. Přirozený tvar, vnitřní náboj, ale i vaznost CBB G-250 na protein ovlivňuje chování proteinů při elektroforéze. CBB není detergentem, používá se v minimálním množství a poměr vázání CBB/protein a náboj/molekulová hmotnost není u BN-GE stálý. Hodnota pH použitého elektroforetického pufru bývá 7,5. Za těchto podmínek můžeme aplikovat kalibrační závislost pro vyhodnocení molekulové hmotnosti proteinů pro:

- i) proteiny s  $pI < 8,6$ , které váží CBB G-250
- ii) proteiny s  $pI \leq 5,4$ , které neváží CBB G-250

#### Reference:

Tracy McLellan, Electrophoresis Buffers for Polyacrylamide Gels at Various pH, *Analytical Biochemistry*, 1982, 126, 94-99

F. Krause, Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes, *Electrophoresis*, 2006, 27, 2759-2781

## 5. Vzorce pro vyhodnocení LOD a LOQ

**Mez detekce (limit detekce, LOD)** – je definována jako nejnižší relevantní detekovatelné (danou metodou) množství analytu. LOD lze vypočítat různými způsoby, kdy samotná volba výpočtu vychází i z použité analytické metody. Pravidlem pro vyhodnocení LOD, LOQ je sjednocení výpočtu pro veškeré experimenty v daném souboru, kdy k výpočtu se použije ten vzorec, který nám poskytne nejnižší hodnotu tohoto limitu.

*U kvantitativních separačních metod, jejichž výstupem z detektoru je pík (elektromigrační, chromatografické metody) a můžeme odečíst jeho výšku, se postupuje následovně:*

– ze záznamu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie ( $h_{\max}$ ) v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

– pro odezvu detekovaného množství analytu pak platí:

$$LOD = 3 \cdot \frac{h_{\max}}{b}$$

a to pouze v případě je-li směrnice kalibrační přímky z koncentrační závislosti  $y = bx$ .

kde:  $y$  je výška píku analytu,  $h_{\max}$  je maximální kolísání základní linie a  $b$  je směrnice kalibrační přímky.

*U ostatních kvantitativních metod, kde hodnotíme závislost intenzity (plochy) na vzrůstající koncentraci, se postupuje následovně:*

– koncentrační závislost je ve formě  $y = bx$ , limit detekce vypočteme podle vzorce:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{y,x}}{b}$$

– koncentrační závislost je ve formě  $y = bx + a$ , tedy rozdíl mezi 0 a  $a$  je statisticky významný, pote se limit detekce vypočte:

$$LOD = \frac{(a + 3 \cdot s_a)}{b}$$

kde:  $s_a$  je směrodatná odchylka koeficientu  $a$ ,  $s_{y,x}$  je residuální směrodatná odchylka,  $a$  je úsek a  $b$  směrnice kalibrační přímky (závislost plochy na koncentraci). Pozor!  $LOD$  nezávisí na velikosti  $a$ ! Je to jen formální zápis, který vyjadřuje, že i při nulové koncentraci naměříme signál o střední velikosti  $a$ .  $LOD$  závisí na šumu (vyjádřeném jako  $s_a$ ) a na směrnici kalibrační závislosti v blízkosti nulového signálu.

– další možností určení meze detekce je metoda postupného zředování, viz Statistické vyhodnocení analytických výsledků a metod - kapitola 3. Analytická charakterizace výsledků relativních metod.

**Mez stanovitelnosti (limit kvantifikace, LOQ)** – je definována jako nejnižší množství analytu, které je možné danou metodou nejen detekovat, ale i stanovit. Na rozdíl od LOD se LOQ počítá jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

## 6. Nefelometrie – úprava údajů

Úloha: č.11 – Stanovení chloridů pomocí nefelometrie

Obsah chloridů je důležitý hlavně z hlediska enviromentálního; jejich nejvyšší přístupný obsah v pitných i užitkových vodách je regulován řadou norem a vyhlášek:

- i) pitná a balená voda – MH 100 mg.l<sup>-1</sup>, NMH 250 mg.l<sup>-1</sup>
- ii) balená přírodní minerální voda – MH 500 mg.l<sup>-1</sup>
- iii) balená kojenecká voda – MH 100 mg.l<sup>-1</sup>
- iv) umělá koupaliště – MH 200 mg.l<sup>-1</sup>
- v) plnicí voda pro umělá koupaliště – MH 50 mg.l<sup>-1</sup>

*kde:* MH je mezní hodnota a NMH je nejvyšší mezní hodnota.

Vyhlášky:

Vyhláška MZe ČR č. 376/2000 Sb., kterou se stanoví požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost její kontroly. Sbírka zákonů 2000, částka 103, str. 4879.

Vyhláška Mze ČR č. 292/1997, kterou se stanoví požadavky na zdravotní nezávadnost balených vod a způsobu jejich úpravy. Sbírka zákonů 1997, částka 98, str. 5410.

Vyhláška Mze ČR č. 464/2000, kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity venkovních hracích ploch. Sbírka zákonů 2000, částka 132, str. 7214.

Samotné překročení NMH chloridů nepředstavuje zdravotní riziko, pouze dochází k ovlivnění organoleptických senzorů (jako chutě) nebo u různých materiálů (např. potrubí) může způsobit jejich korozi.

Samotné minerální prvky, obsažené ve vodě a následně sladu, se podílí na výstavbě tělesných tkání, přenosu nervových vzruchů, udržení acidobazické rovnováhy a osmotického tlaku, a jsou součástí bílkovin, hormonů a enzymů. Podle skladby a jejich obsahu můžeme uvést, že 1L piva denně představuje doporučenou denní dávku stopových prvků a minerálů :o)