

Separáčn metody v biofyzikáln chemii

Mgr. Markéta Procházková, Ph. D.

C5855 Metody biofyzikální chemie



Osnova


- Základní analytické pojmy
- Analytické metody v BFCH
- Separční metody v BFCH



Základní analytické pojmy



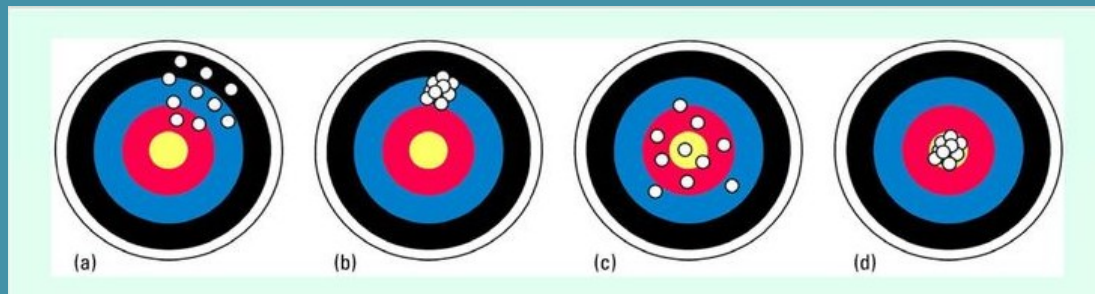
Analytická chemie

- Vyvíjí a aplikuje metody a postupy k získání informace o složení a povaze analytu.
- **Chemická analýza**
 - Určování druhu a struktury látek, jejich složení a jejich součástí (iontů, prvků, skupin prvků - funkčních skupin nebo celých sloučenin), a dále stanovení jejich relativního množství.
- **Kvalitativní analýza** (důkaz)
 - Zjišťování druhu přítomných složek.
 - Rozdělení podle zaměření:
 - elementární analýza** (důkaz prvků či skupin)  **strukturní analýza** (určování struktury analyzovaného materiálu)
- **Kvantitativní analýza** (stanovování)
 - Zjišťování a číselné vyjadřování obsahu složek ve vzorku, určení obsahu analytu.

Základní analytické pojmy



Chyby analytických metod
Náhodné Soustavné Hrubé
Přesnost a správnost výsledku



Reprodukovatelnost, opakovatelnost metody.
Principy a pravidla validace metod.

Základní analytické pojmy



Metrologické pojmy

Preciznost (precision) (dříve správnost)

Vyjadřuje, jak moc se výsledky liší navzájem, jaký je jejich rozptyl. Závisí na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah ke skutečné hodnotě. Obvykle se uvádí ve formě směrodatné odchylky.

Opakovatelnost (repeatability) - Preciznost za podmínek opakovatelnosti.

Vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu, provedených stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku!

Reprodukovatelnost (reproducibility) - Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti.

Vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (pracovník, přístroj, místo, podmínky, čas, avšak stejná metoda) - ať už v rámci jedné laboratoře nebo mezi různými laboratořemi.

Základní analytické pojmy



Metrologické pojmy

Přesnost (accuracy)

Těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a „pravou“ („skutečnou“, konvenční skutečnou, očekávanou, zjištěnou analyzováním vhodného referenčního materiálu) hodnotou měřené veličiny.

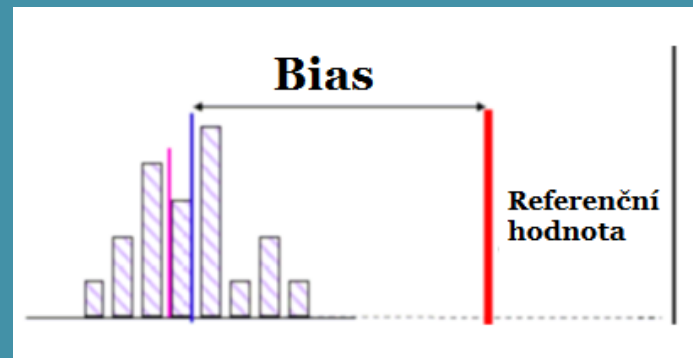
Přesnost metody kombinuje preciznost a pravdivost, tj. vlivy náhodných a systematických faktorů.

Pravdivost (trueness)

Těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a dohodnutou referenční hodnotou (skutečnou, konvenční skutečnou hodnotou,..). Mírou pravdivosti (skutečnosti) je vychýlení (bias).

Pravdivý výsledek je zatížen zanedbatelnou systematickou chybou.

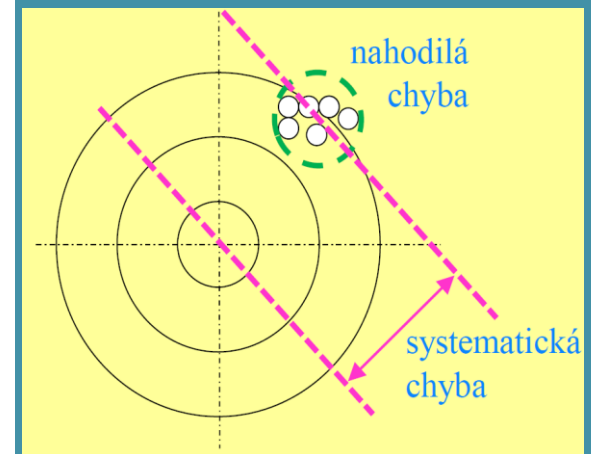
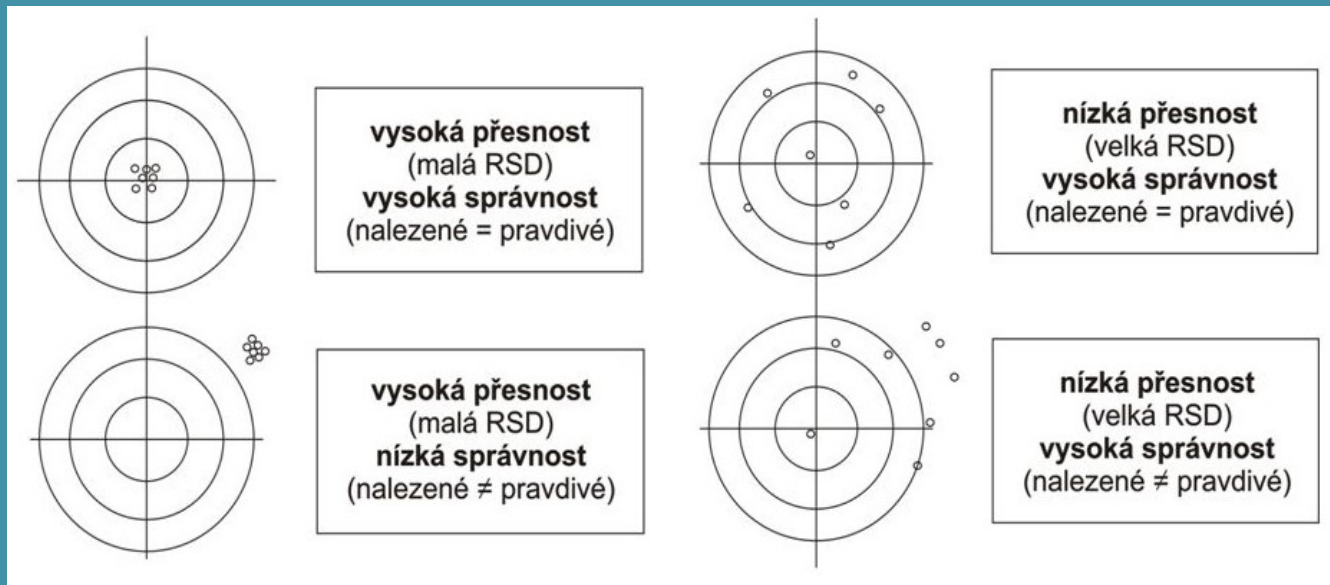
Vychýlení představuje kvantifikaci systematické chyby měření.



Základní analytické pojmy



Přesnost a správnost měření

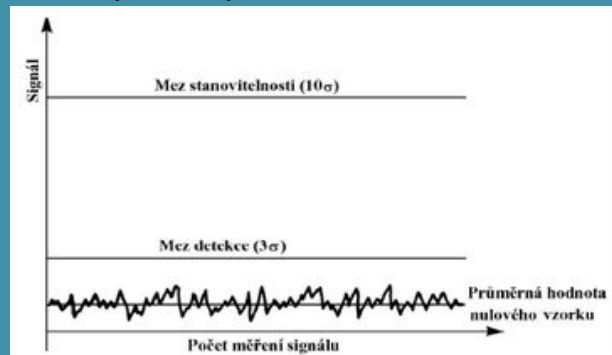


Základní analytické pojmy



Charakteristiky stanovení

1. Citlivost analytické metody – směrnice kalibrační křivky.
2. Charakteristická koncentrace.
3. Charakteristická hmotnost.
4. Pracovní rozsah a lineární dynamický rozsah metody (LDR).
5. Opakovatelnost (% , RSD) a reprodukovatelnost (10%).
6. **Mez detekce (3σ)** – SD signálu blanku.
90 – 99,9% pravděpodobnost přítomnosti analytu ve vzorku.
7. **Mez stanovitelnosti (10σ)**.



Základní analytické pojmy



Důležité limity

Mez detekce (LOD - limit of detection)

Koncentrace analytu, pro kterou je analytický signál statisticky významný od šumu.

Podle uzance se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie (S/N=3).

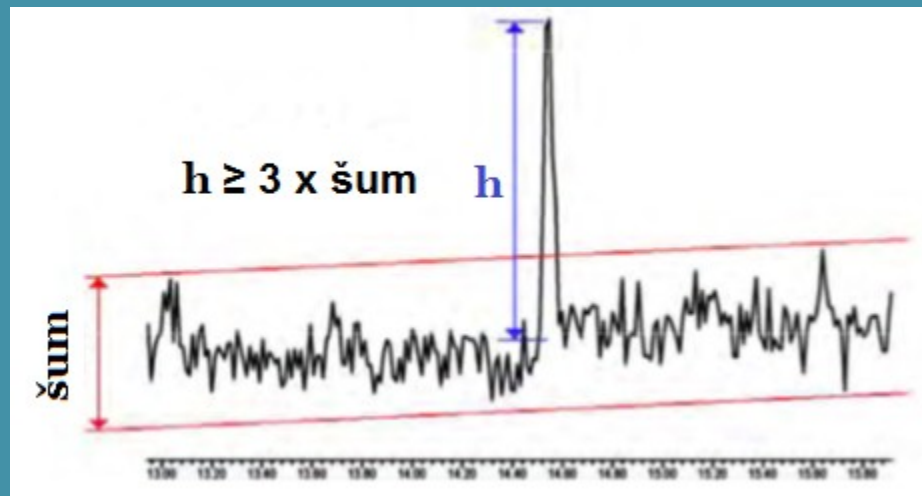
$$LOD = X_0 + 3 * \sigma_0$$

Mez stanovitelnosti (LOQ - limit of quantification)

Odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

Podle uzance se mez stanovitelnosti vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie (S/N=10). \geq

$$LOQ = X_0 + 10 * \sigma_0$$



Základní analytické pojmy



Lineární dynamický rozsah metody LDR, LoL

➤ Odezva detektoru

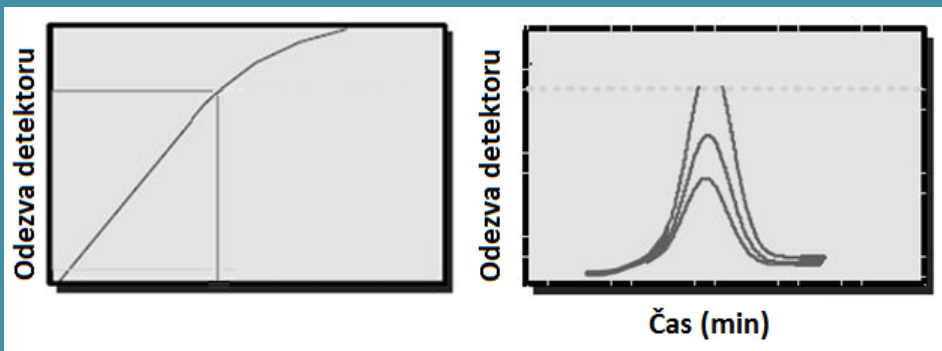
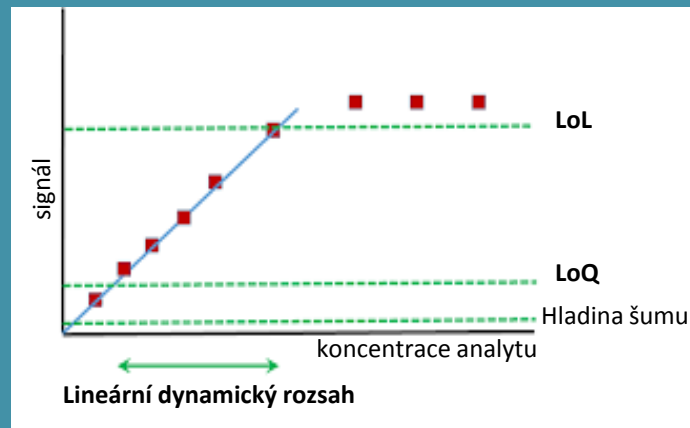
Rozdíl v odezvě různých koncentrací látek je proporcionální – přímá linie naměřených dat v kalibrační křivce.

➤ Lineární dynamický rozsah detektoru

Maximum lineární odezvy: šum detektoru.

➤ Nelinearita detektoru

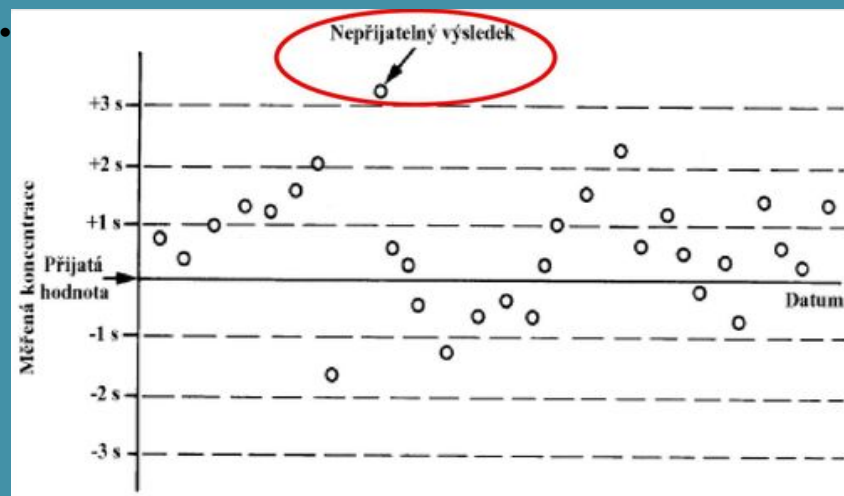
Detekce signálu je nelineární při vysokých koncentracích – chyby v kvantifikaci.



Zpracování dat chemické analýzy

Chemometrické postupy:

- Statistické nástroje pro opakovaná měření a jejich vyhodnocení.
- Statistické testování, statistické modely, neuronové sítě.
- Analýza rozptylu, testy odlehlých hodnot.
- Kalibrace, regresní a korelační metody.
- Plánování experimentů.
- Multivariantní analýza.
- Statistické řízení jakosti.
- Regulační diagramy.



Analytické metody



Optické metody

- **Spektrální** - metody molekulové (IČ, Raman, UV-Vis) a atomové (AAS, OES, AFS) spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, NMR, EPR.
- **Nespektrální** - Refraktometrie, Polarimetrie, Nefelometrie a Turbidimetrie.

Separační metody

- GC, HPLC, IEC, TLC
- elektromigrační metody - kapilární a plošná elektroforéza, izoelektrická fokusace, izotachoforéza.

Elektroanalytické metody

- Potenciometrie, Konduktometrie, Voltametrie (Polarografie), Coulometrie, Amperometrie

Radiometrické metody

Hmotnostní spektrometrie

Ostatní analytické metody

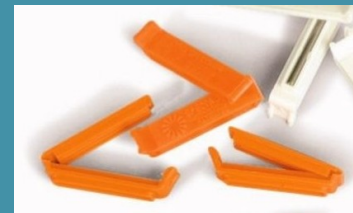
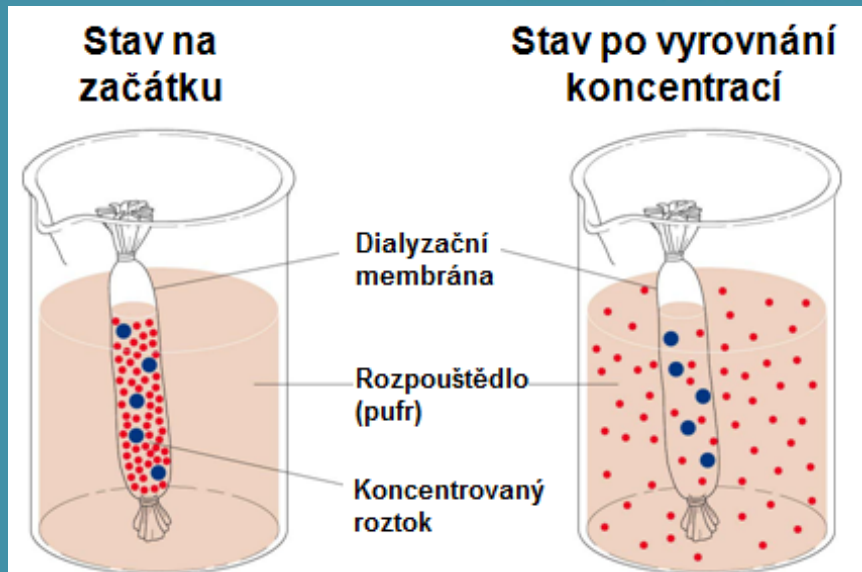
Separáčn  metody v BFCH



Dialýza

Separace zalo en na velikosti molekul.

- Koncentrační gradient částic s povrchovým nábojem.
- Propustnost membrány pro rozpuštěné látky.
- Velikost povrchu membrány.
- Pohyb částic < 1 000 Da, < 10 000 Da, < 30 000 Da.



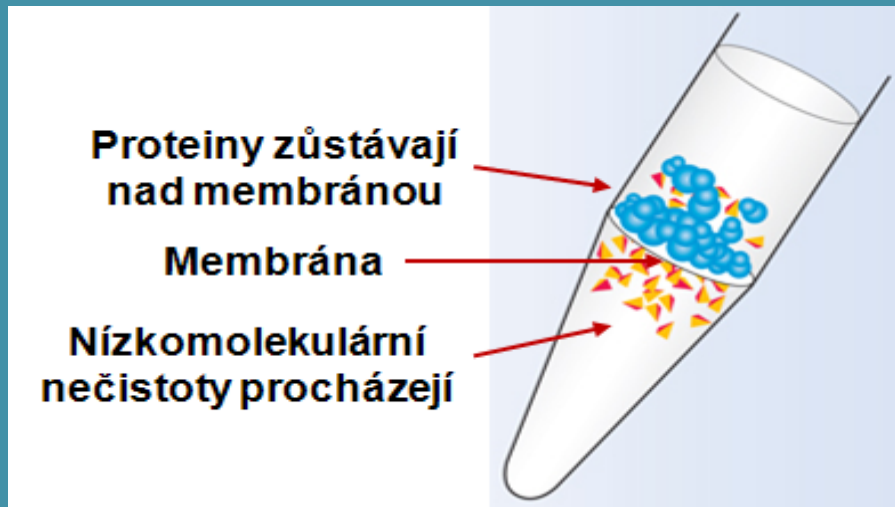
Separáčn  metody v BFCH



Ultrafiltrace

Separace založená na velikosti molekul.

- Separace na základě propustnosti přes membránu.
- Šetrná technika – Minimální denaturace bílkovin.
- Velikost povrchu membrány.
- Centrifugace za použití vysokých otáček.
- Po centrifugaci jsou proteiny oddělené od nečistot a zakoncentrovány.
- Oddělení částic < 1000 Da, < 10 000 Da, < 30 000 Da.



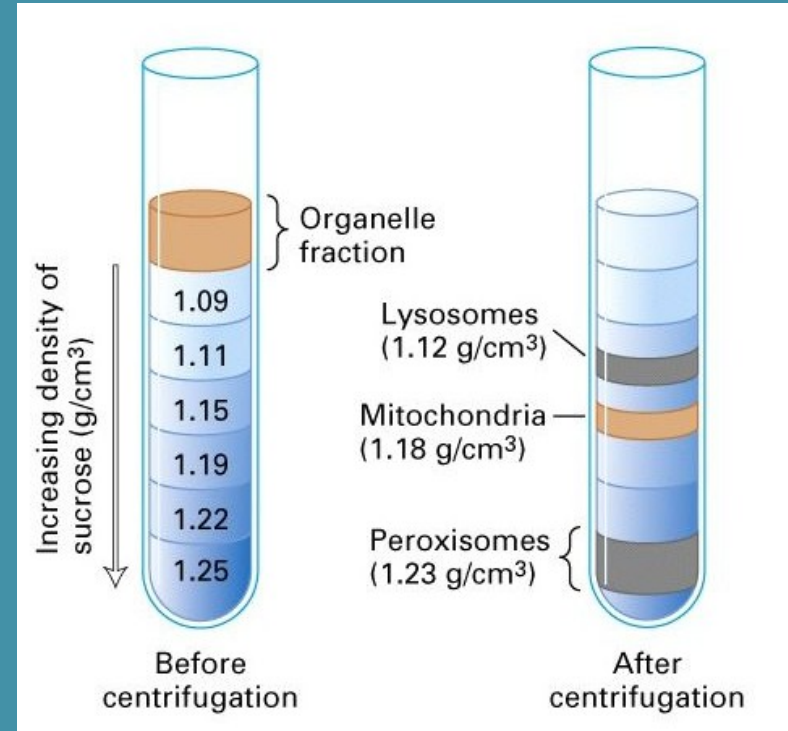
Separáčn  metody v BFCH



Centrifugace v hustotním gradientu

Separace zalo en na velikosti molekul.

- Lineární hustotn  gradient (sacharóza, CsCl).
- Centrifugace při vysokých otáčkách (150 000g).
- Sedimentace proteinů určitou rychlostí podle velikosti, hustoty, tvaru molekul (je dosažena rovnvha mezi hustotou roztoku a astic ).
- Po centrifugaci jsou proteiny v gradientu rozděleny zahuštěny.

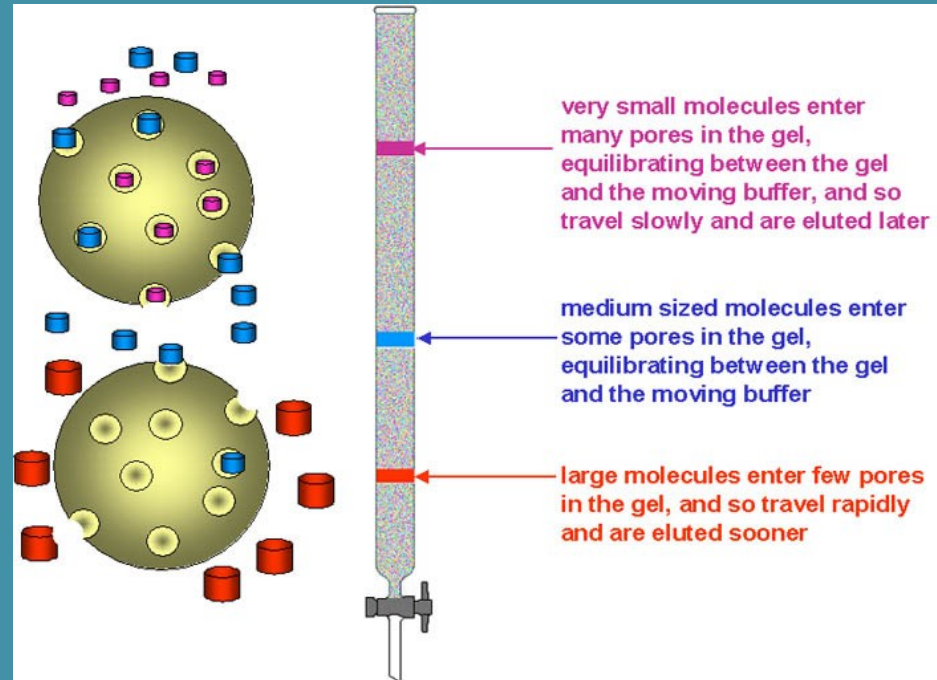


Separáčn  metody v BFCH

Gelov filtrační chromatografie (molekulov vylučovací chromatografie)

Separace založen na velikosti molekul.

- Hydrofilní gelov částice (polymer).
- Uvnitř každ částice jsou pory.
- Látky se rozdělují podle velikosti (molekulov hmotnosti)

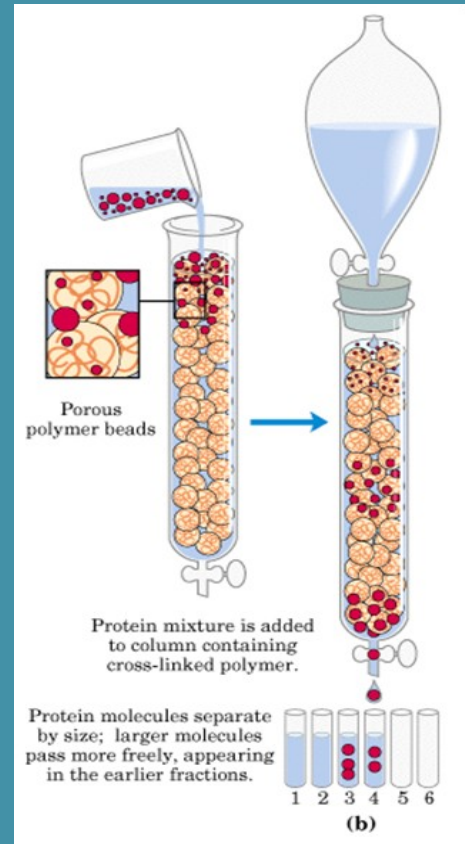


Separáčn  metody v BFCH

Gelov filtrační chromatografie (molekulov vylučovací chromatografie)

Optimln gel pro gelovou filtraci :

- Inertní matrice gelu pro dlen složky i pro eluční roztoky.
- Chemicky stabiln gel během několika kroků, při rznm pH a při rzn teplotě.
- Mechanicky stabiln gel, aby se při vtším tlaku nedeformoval.
- Velikost gelových častic nesmí být ani pili mal (rozdělení je pesnji, ale pomalji) ani pili velk (rozdělení je rychleji, ale může být nepřesn). Na rychlou chromatografii tedy použijeme gel s hrubi zrn. Na vysok stupeň rozlien použijeme gel s malými zrn.

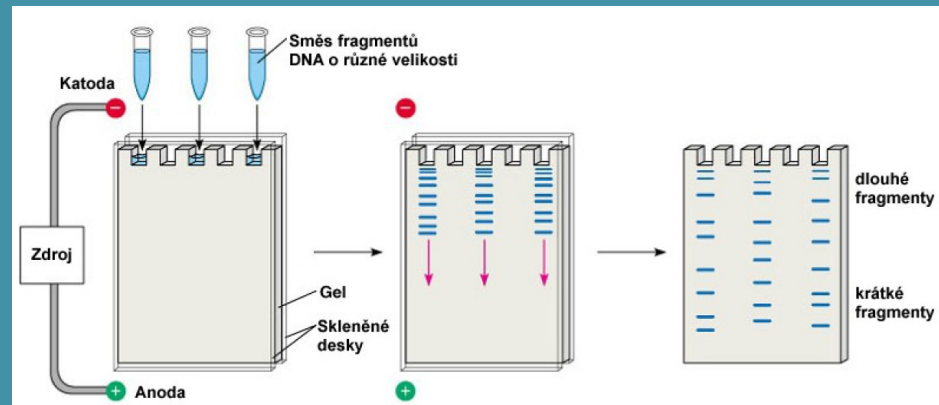
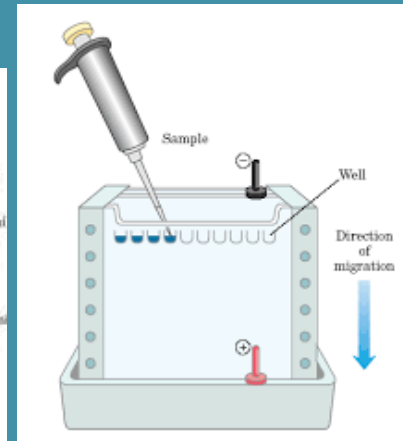
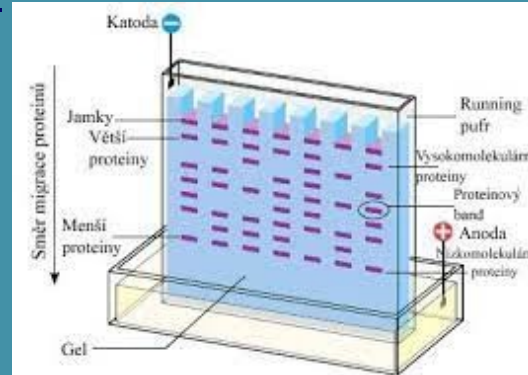
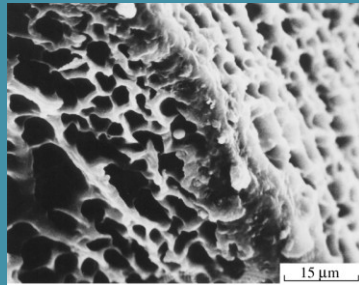
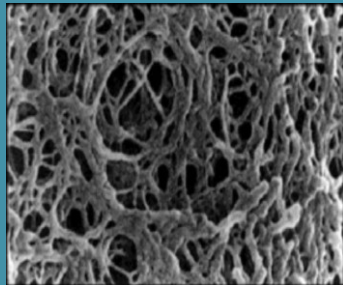


Separáčn  metody v BFCH



Gelov  elektroforéza (ELFO)

- Gel z polyakrylamidu (s SDS) a nebo agarózy - složit  s t polymerních molekul s p ry – „síto“, kter m molekuly putují ve stejnosm rn m el. poli.
- Velikost pórů gelu lze ovlivnit složen m a koncentrací polymeru.
- Molekuly se dělí na základě své velikosti → mal  se pohybují rychleji, velk  pomaleji.

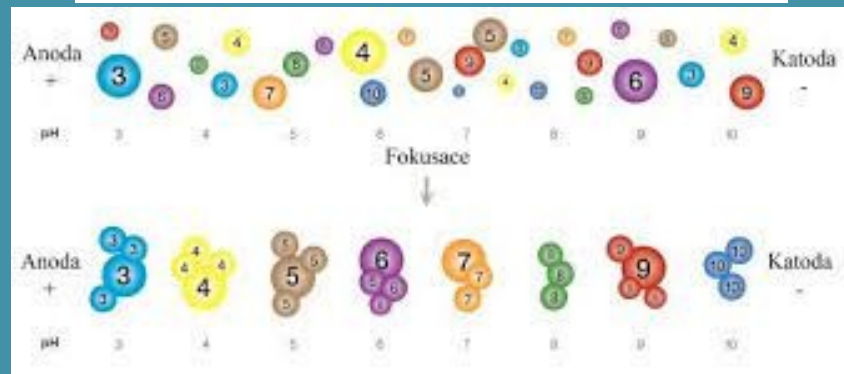
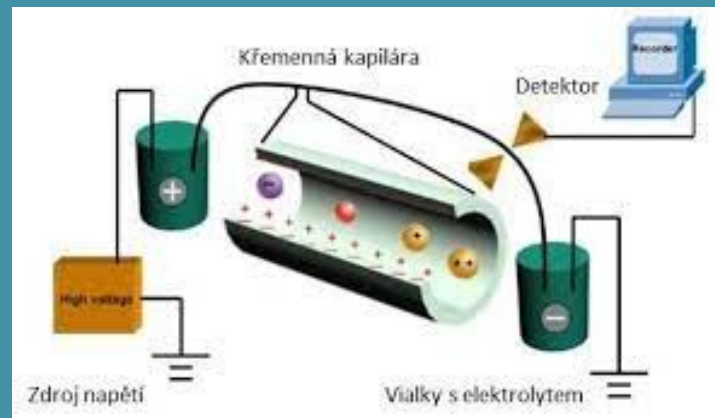


Separáčn  metody v BFCH



Izoelektrick  fokusace (IEF)

- IEF se obvykle provádí v 3-4% polyakrylamidových gelech nebo v agarose.
- Do roztoku pro p rpravu gelu se p rd vaj  amfolyty v koncentraci 2 – 2,5%.
- Jedná se o směs nízkomolekulárních oligoamino-oligokarboxylov ch kyselin, kter  mají rozd ln  pI hodnoty.
- Gradienty se tvo r  nejčastěji v rozmezí pH 3-10, nebo v u  m rozsahu.



Separáčn metody v BFCH



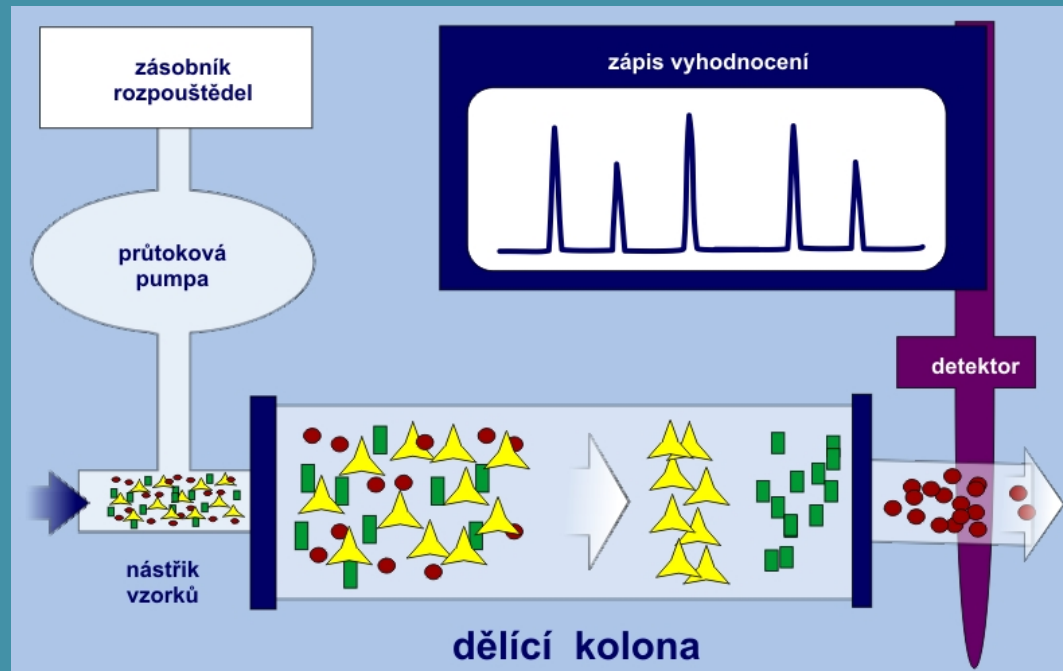
Kapalinov chromatografie

Princip LC:

Rozdln distribuce dlench látek mezi dvě rzn **nemsiteln fze** (SF a MF).

Separáčn (dělící) a současne i **analytick** metoda, poskytuje **kvalitativn** a **kvantitativn** informace o vzorku.

Dlen látky obsaen (rozputen) v mobilní fázi mají různou afinitu ke stacionární fázi a jsou různou mrou ve svém pohybu zadrzovny → vykazují různou **retenci**.



Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie

Teorie LC

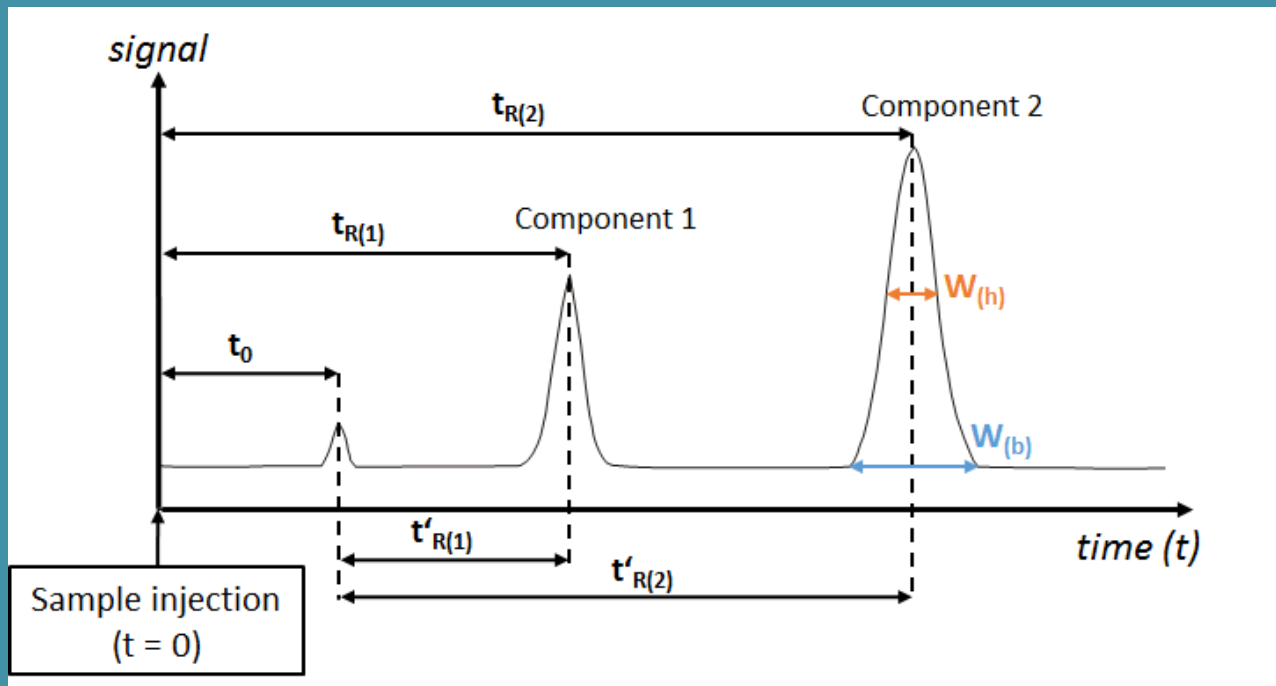
t_0 Mrtv  czas = retenční czas
látky, kter  neni zadr zov na
SF.

t_R Retenční czas

t'_R Redukovan  retenční
czas ($t_R - t_0$)

$W_{(b)}$ Š rka p ku při základní

$W_{(h)}$ Š rka p ku v polovině výšky



Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie

Teorie LC

V_o Mrtv  objem = eluční objem látky kter  neni zadr zov na SF

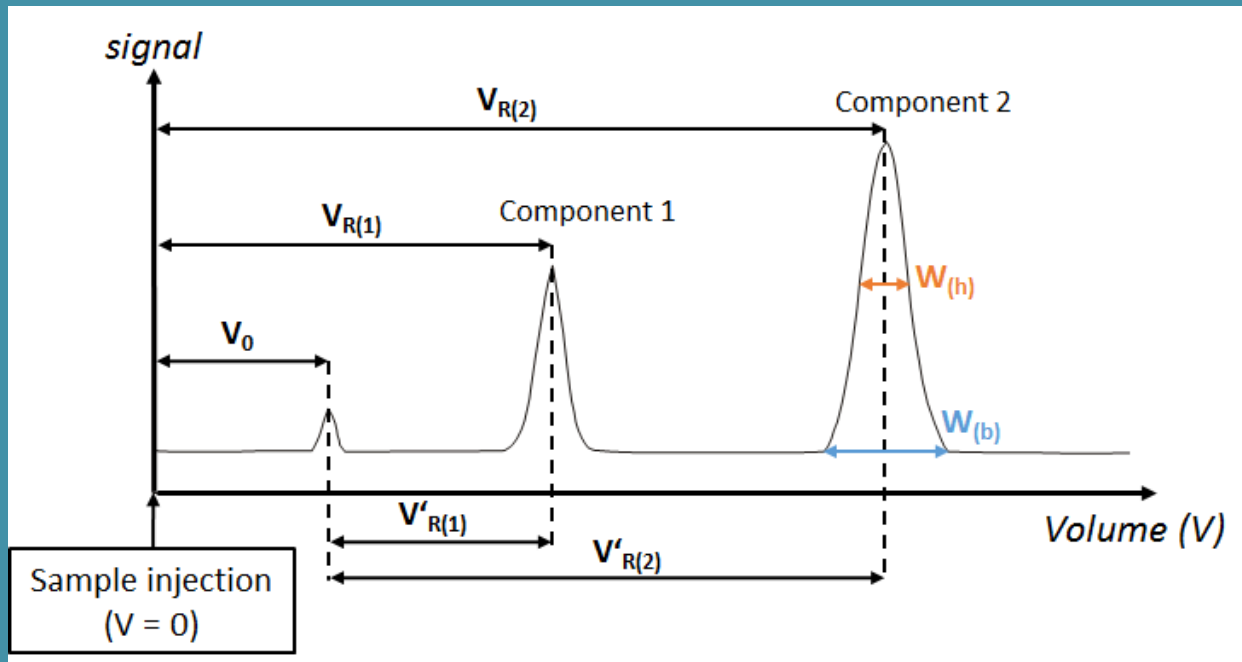
V_R Retenční objem

V'_R Redukovan  retenční objem ($V'_R - V_o$)

$W_{(b)}$ Š rka p ku při základní

$W_{(h)}$ Š rka p ku v polovině výšky

$$t_R = \frac{V_R}{F}$$



Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie

Teorie LC, činnost separace

Kapacitn  faktor (k')

Kapacitn  faktor – srovnání výsledků ziskn ch z různých systémů.

Je nezm visl  na délce kolony a průtoku.

k' závisí na s le interakce analytu mezi mobilní a stacionární fázi, ustaven  rovnováhy!

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V'_R}{V_M}$$

$$k' = \frac{\text{moles } A_{\text{stationary}}}{\text{moles } A_{\text{mobile}}} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m}$$

$k' \approx 1.0$, separace  patn 

$k' > 30$, separace pomal 

$k' = 2-10$, separace optim ln 

Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie

Teorie LC, roz lovac  izoterma

Roz lovac  koeficient = zavislost koncentrace látky ve stacionární fázi na koncentraci látky v mobilní fázi (platí pro konstantn  teplotu)

Roz lovac  koeficient K se:

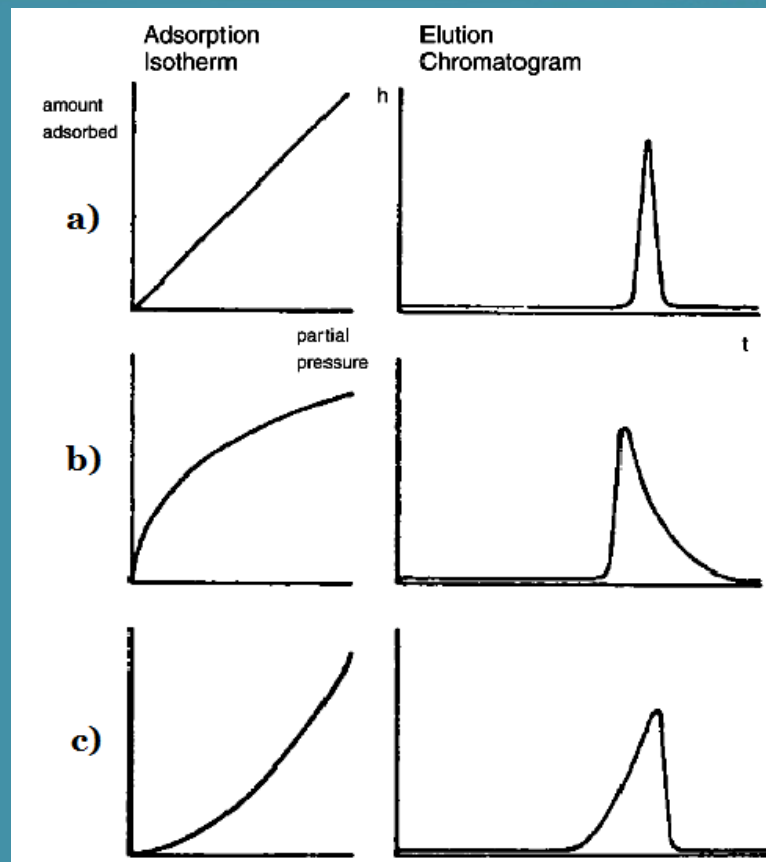
1. Nem n  s koncentrací

a) Izoterma je line rn , eluční p k je symetrick 

2. M n  s koncentrací → eluční p ky nejsou symetrick  a izoterma je zakr ven :

b) Konk vn 

c) Konvexní



Separáčn  metody v BFCH

Kapalinov chromatografie

Teorie LC, činnost chromatografick kolony

Charakterizuje, jak moc se zony separovaných látek na koloně rozšiřují.

Mrou činnosti chromatografick kolony je:

a) **počet teoretických pater** dan kolony N (n)

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = 5,545 \times \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2$$

b) **vskov ekvivalent teoretického patra H**

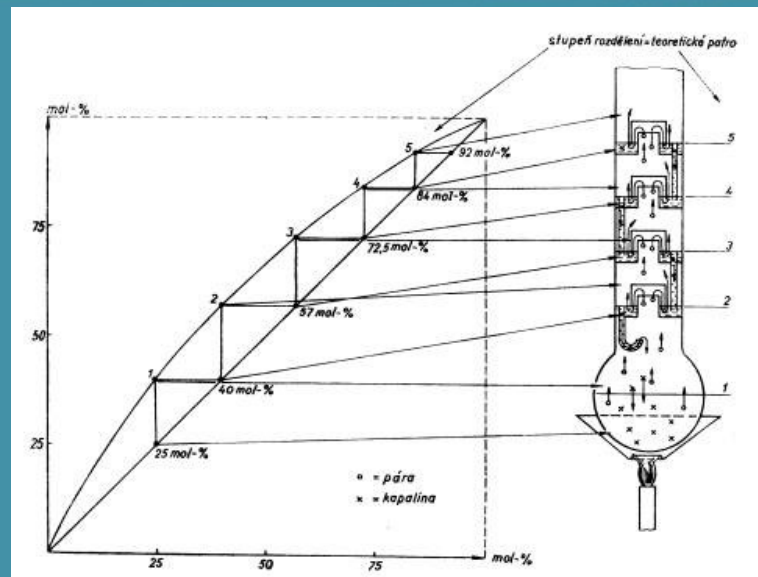
HETP (porovnávání kolon rzn delky)

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \times \left(\frac{w}{t_R}\right)^2 = \frac{L}{5,545} \times \left(\frac{w_{1/2}}{t_R}\right)^2$$

Při srovnávání počtu pater na různých kolonách je nutné znát podmínky za kterých byla měření prováděna.

Počet pater je funkcí teploty, linern viskozity, složení eluentu a vzorku.

Všší N kolony → lepší separace 2 látek s malým rozdílem v retenci
 N nezávisí na retenci látky a závisí na delce kolony.



H , počet teoretických pater: Složky vzorku unšen tokem mobilní fáze vstupují do 1. patra kolony nerozdlen. Zde se ustavuje rovnováha mezi stacionární fází a mobilní fází. Po ustaven rovnováhy se zmn koncentrace složek v mobilní fází a roztok delench látek v mobilní fází vstupuje do 2. patra, kde se opět ustavuje rovnováha mezi fázemi. Cly proces se mnohonsobn opakuje. Na počtu pater kolony je závisl ** innost separace**.

Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov chromatografie

Teorie LC, p r chy rozšiřování chromatografických zón

1. Vřiv difuze

- Rzn molekuly musí urazit rzn vzdálenosti.

2. Podln molekulrn difuze

- Molekuly putují z msta o vy  koncentraci do msta o ničí koncentraci.

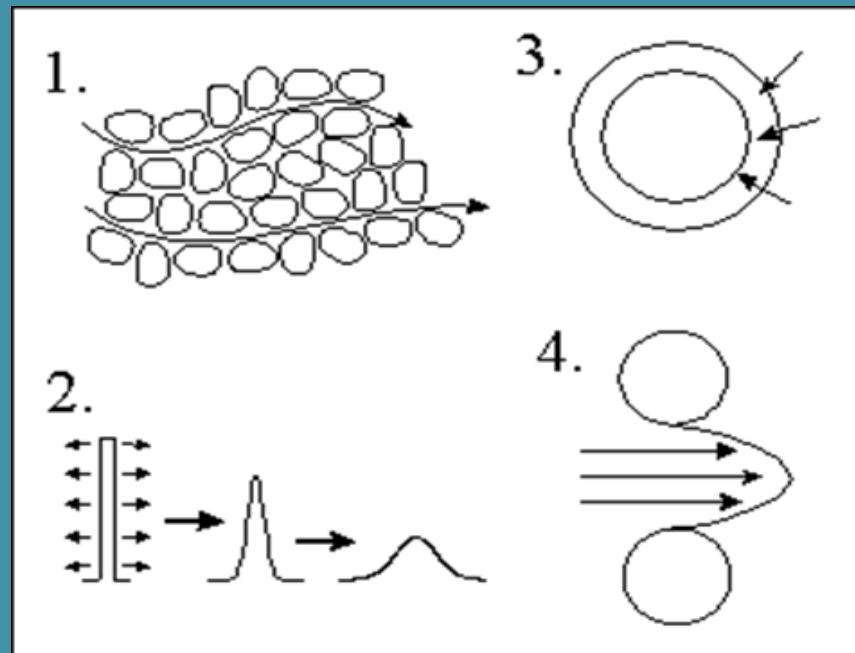
3. Odpor proti p renosu hmoty ve stacionární fázi

- Rzn molekuly difundují rzn hluboko do stacionární fáze..

4. Odpor proti p renosu hmoty v mobilní fázi

- Rychlostní profil mobilní fáze uvnitř kanálku je parabolick.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) u = A + \frac{B}{u} + C u$$



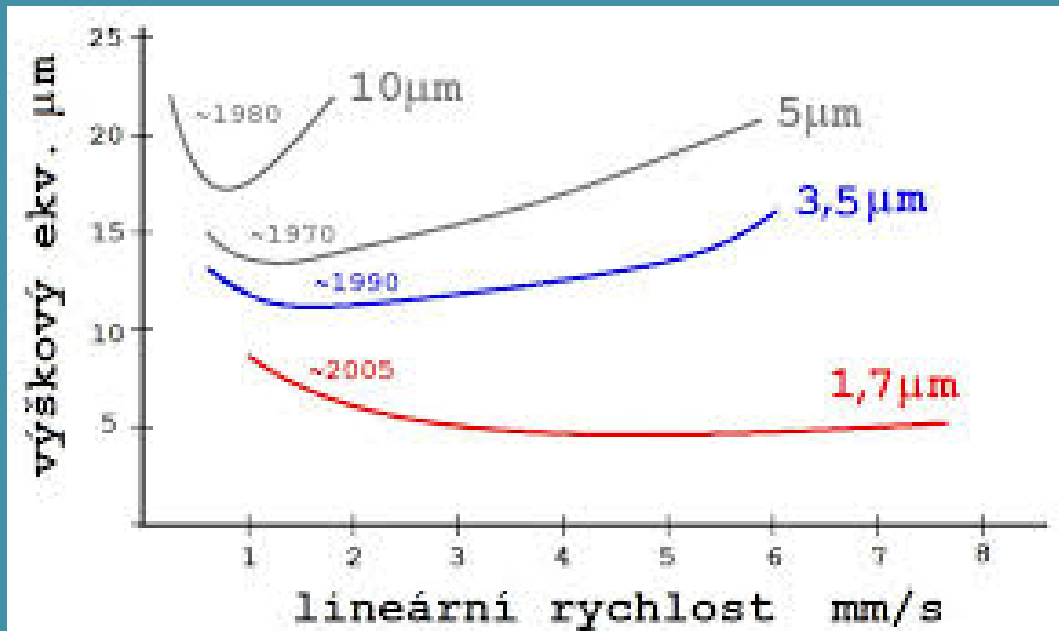
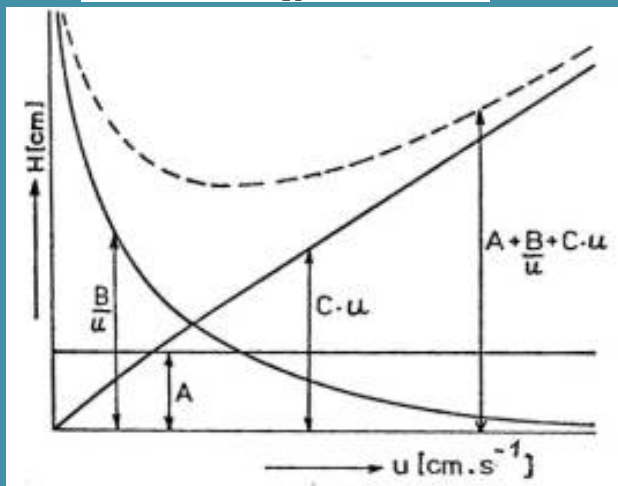
Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie

Teorie LC, Van Deemterova rovnice

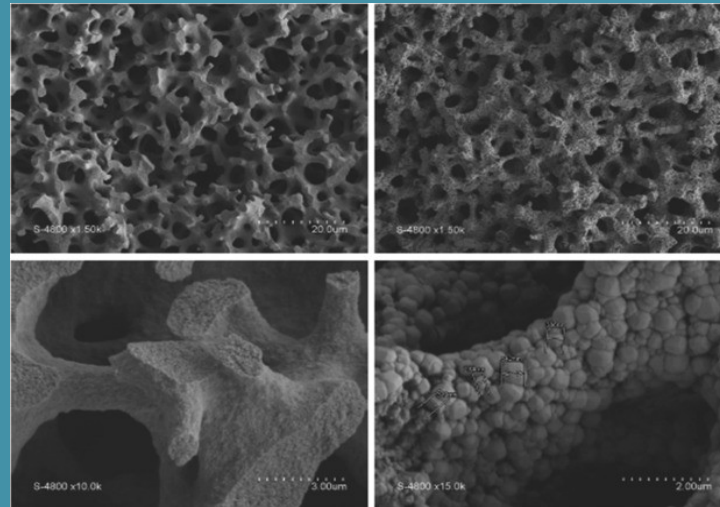
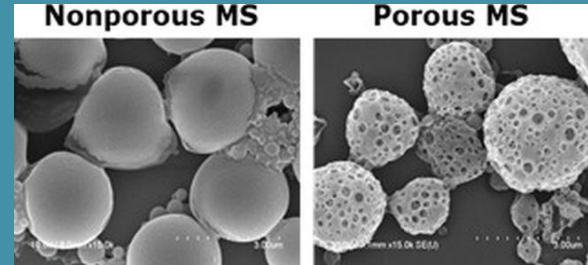
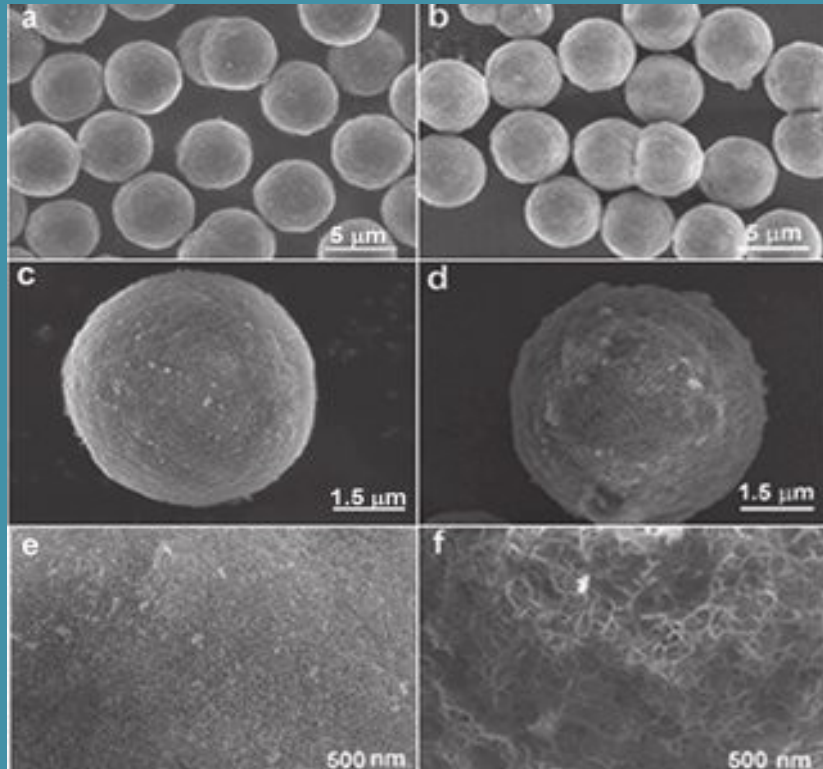
$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u$$



Minimum křivky odpov d  optim ln  pr tokov  rychlosti, při které dan  kolona vykazuje největší činnost a tedy minim ln  rozš ruje zóny analytů – rozš rov n  píků.

Separáčn  metody v BFCH

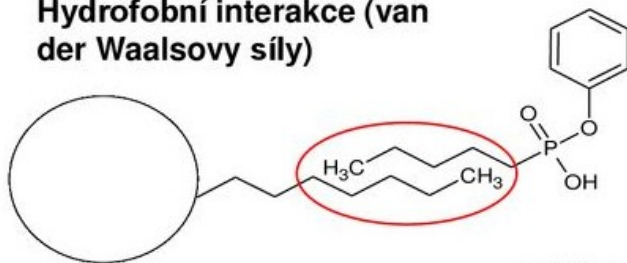
Kapalinov chromatografie, Teorie LC, Kolony



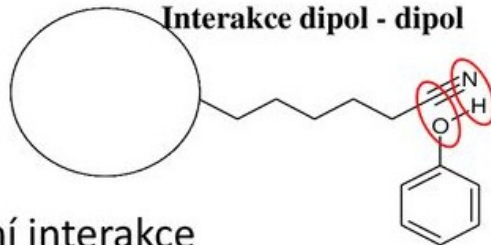
Separáčnı metody v BFCH

Kapalinov chromatografie, hlavní typy interakcí v LC

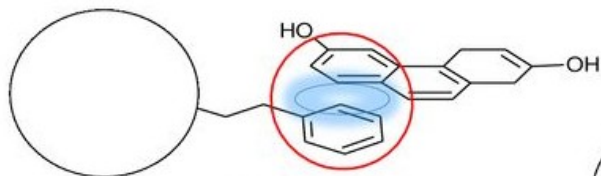
Hydrofobnı interakce (van der Waalsovy síly)



Interakce dipol - dipol

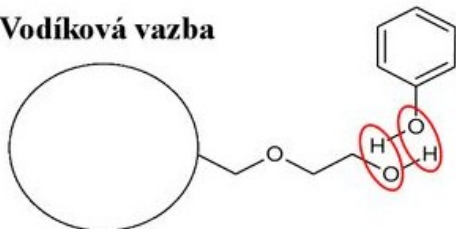


Polrnı interakce



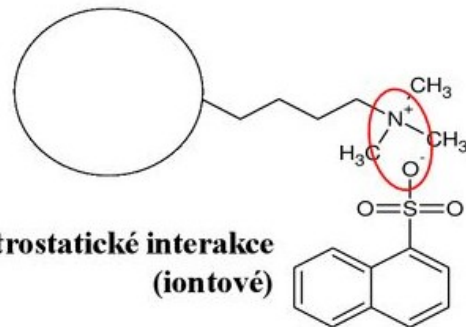
π - π interakce

Vodıkov vazba



Polrnı interakce

Elektrostatick interakce (iontov)



Separáčn  metody v BFCH

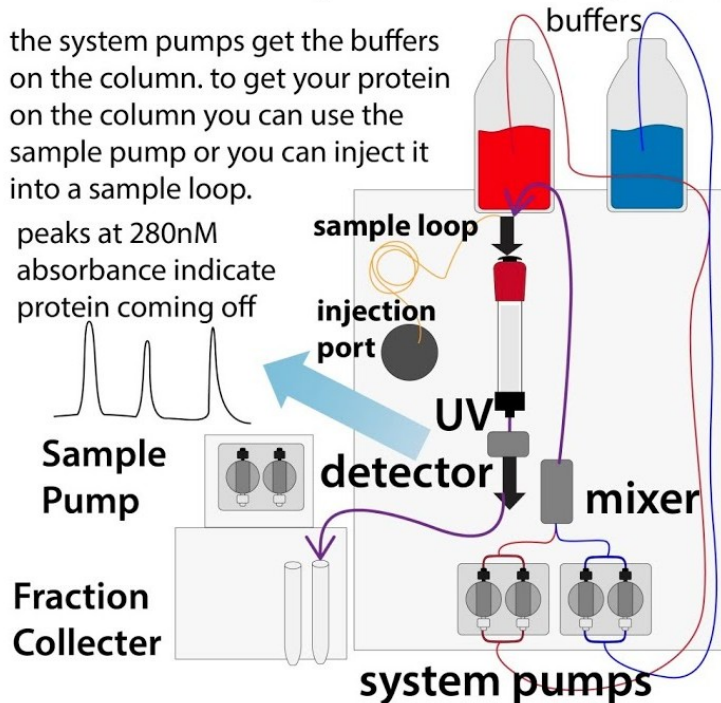
FPLC Rychl  proteinov  kapalinov  chromatografie

- Kapalinov  chromatografie pro separaci a čištění proteinů z komplexních směsí.
- Běţně se používá za niţších teplot (15-20 C).
- Dle typu kolony:
 - Iontově v měnn  chromatografie
 - Afinitn  chromatografie (His-tag)
 - Chromatografie na reverzn  f zi
 - Chromatografie na norm ln  f zi (hydrofobn  interakce)
 - Chir ln  chromatografie

Fast Protein Liquid Chromatography

the system pumps get the buffers on the column. to get your protein on the column you can use the sample pump or you can inject it into a sample loop.

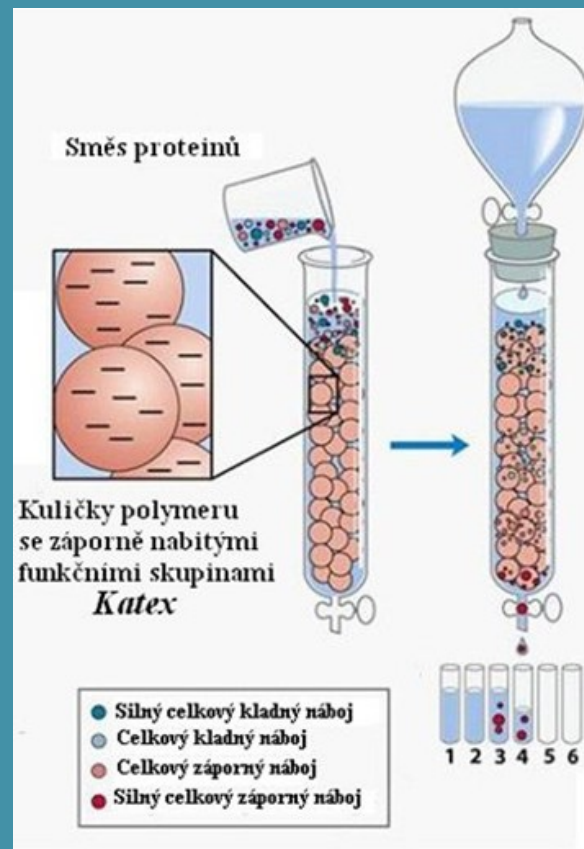
peaks at 280nm absorbance indicate protein coming off



Separáčnı metody v BFCH

Iontov  v m nn  chromatografie

- Proteiny se pohybuj  kolonou rychlost , které je d na jejich celkov mi n boji v roztoku o dan m pH.
- Vazba protein  díky elektrostatick m silám, pH a obsah solí mobilní fáze, kter  obklopuje molekuly proteinů ovlivní jejich ionizaci.
- Syntetick  polymer (např. pryskyřice) obsahuje nabit  funkční skupiny:
 - Z porn  nabit  kuličky – katexy (COOH, vazba kationtů).
 - Kladn  nabit  kuličky – anexy (NH₂, vazba aniot ).
- Nav zan  proteiny se z vazby uvolní změnou iontov  síly nebo změnou pH roztoku protékajících chromatografickou kolonou.

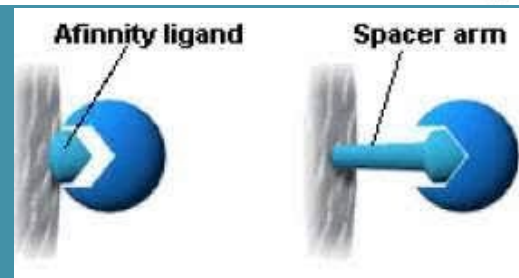
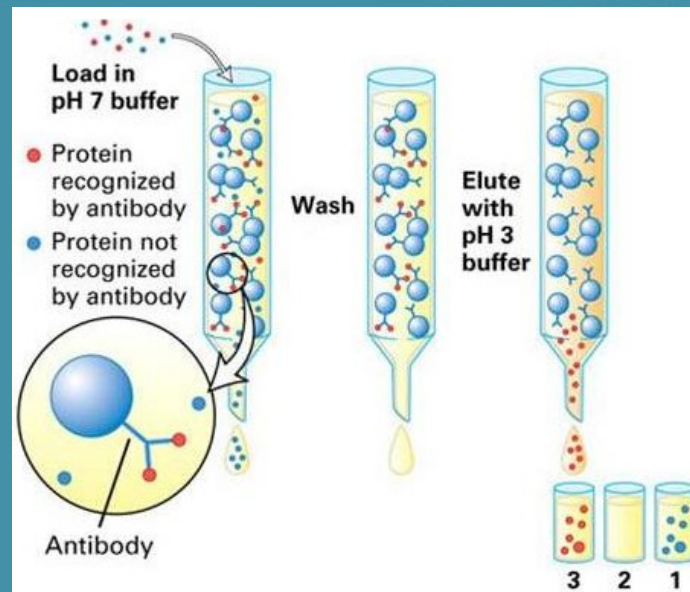


Separáčn  metody v BFCH



Afinitní chromatografie

- Založena na specifick  interakci mezi izolovan m biopolymerem (proteinem, nukleovou kyselinou) a ligandem.
- Ligand je kovalentn  vázán na povrchu stacionární fáze (afinantu).
- Specifick  typ adsorp n  chromatografie.
- P r prava SF zahrnuje výběr vhodného nosiče, afinantu a také nalezen  vhodného zpusobu vazby afinantu na nosič.
- Např. soustavy: Antigen-protilátka, enzym-substrát, receptor-hormon.

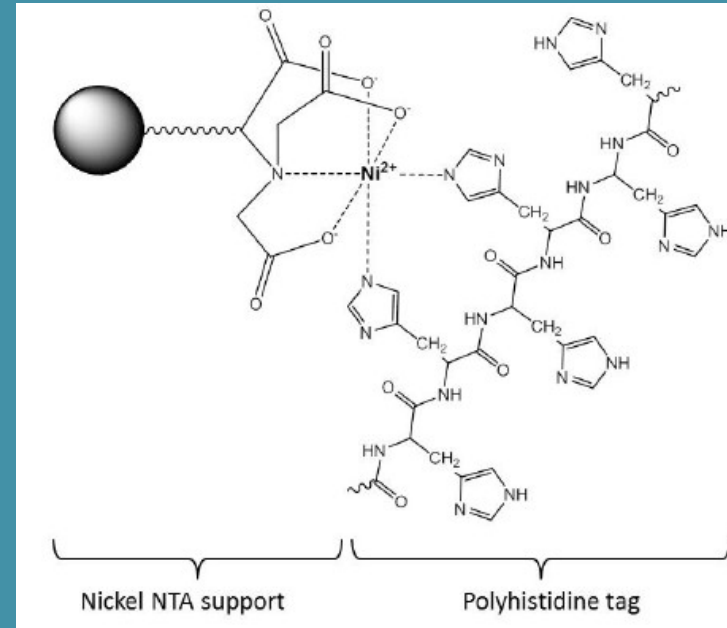
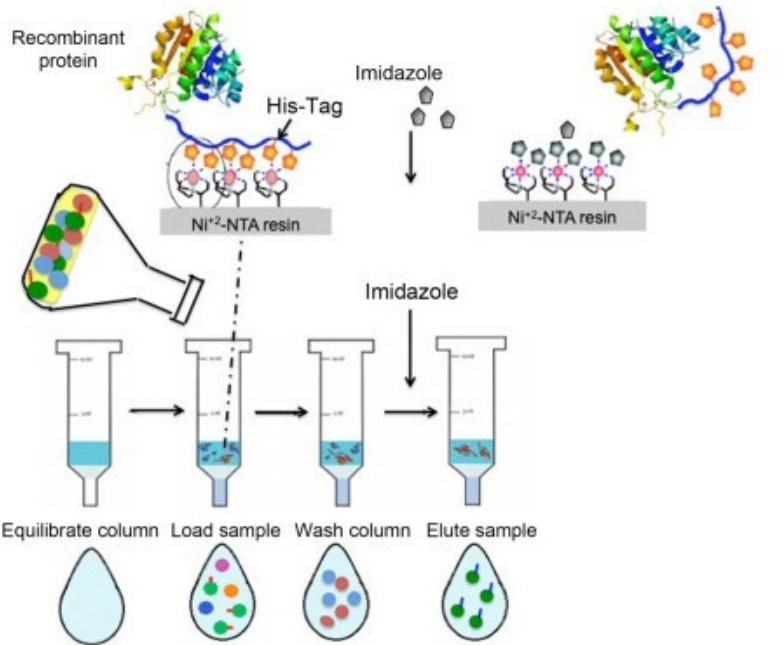


Separáčn  metody v BFCH



Metalo-afinitn  chromatografie

- Založena na specifick  interakci mezi His-Tag zna en m proteinem a p echodn m iontem kovu.
- P echodn  kov je kovalentn  v az an na povrchu stacionární f aze (afinantu).



Separáčn  metody v BFCH



Kapalinov  chromatografie, RP vs. NP HPLC

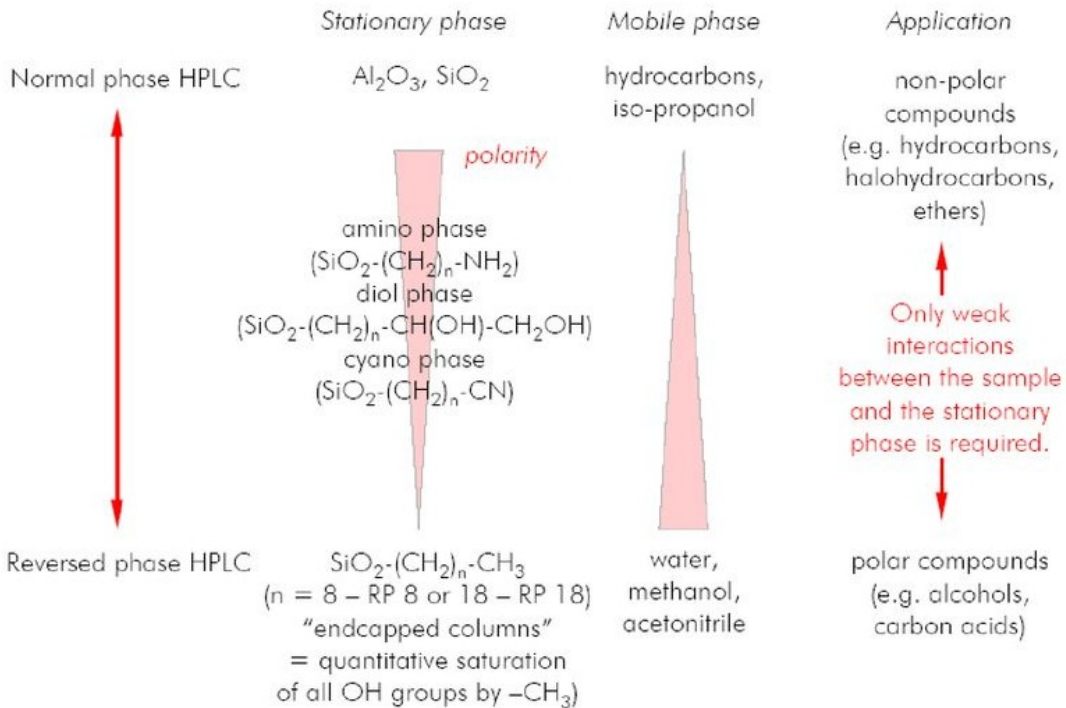
- Zalo ena na specifick  interakci mezi vybranou stacion rn  f z  a mobiln  f z .

Stacion rn  f ze



SCX...strong cation exchange
SAX...strong anion exchange
Silica ...bare silica phase
CN...cyanopropyl phase
NH₂...amino phase

F5...pentafluorophenyl phase
Phenyl...butyl-phenyl phase
C₄...butyl phase
C₈...octyl phase
C₁₈...octadecyl phase

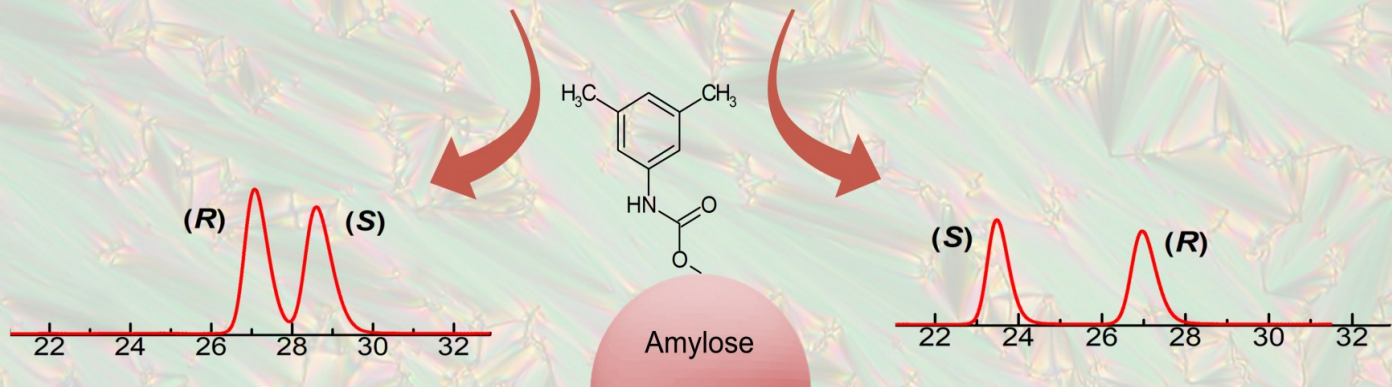
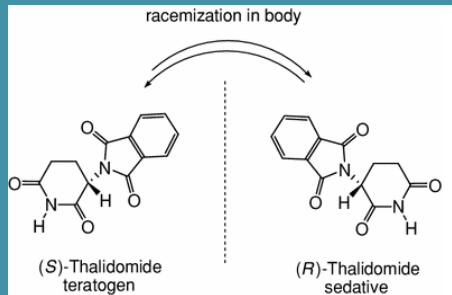
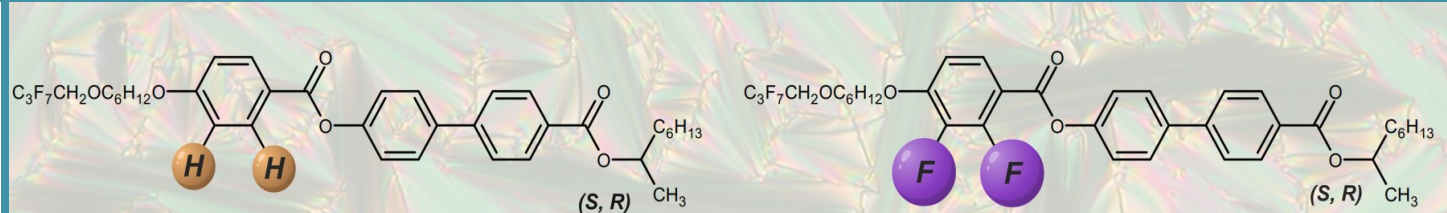
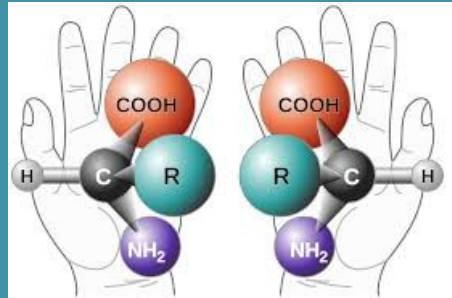


Separáčnı metody v BFCH



Kapalinov chromatografie, Chirálnı HPLC

- Založena na specifické interakci mezi vybranou stacionární fází a mobilní fází.



Děkuji za pozornost!

