

Podczas sporządzania wykresu kalibracyjnego należy przestrzegać następujących zasad:

- wykres kalibracyjny powinien obejmować zakres stężeń analitów w próbkach rzeczywistych,
- roztwory kalibracyjne należy dozować do kolumny przynajmniej dwukrotnie,
- punkty do sporządzenia wykresu kalibracyjnego powinny być rozmieszczone równomiernie w badanym zakresie stężeń.

Wykres kalibracyjny można przedstawić w postaci równania prostej. Charakteryzując go, należy podać wartości: zakresu liniowości, współczynnika korelacji liniowej, współczynnika liniowości lub wariancji R^2 . W idealnym przypadku wykres wzorcowy powinien przebiegać przez początek układu współrzędnych.

2.11.6.

Proteomika ilościowa

Postęp instrumentalny w zakresie wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas umożliwił przeprowadzenie jednoczesnej identyfikacji białek obecnych w komórkach organizmów żywych i ich oznaczenie ilościowe. Badania takie są przedmiotem ważnej i szybko rozwijającej się dziedziny nauki, jaką jest proteomika. Ilościowe analizy proteomiczne umożliwiają monitorowanie zmian zawartości poszczególnych białek w wyniku różnych stanów chorobowych i/lub w odpowiedzi na stosowanie leków farmakologicznych. Pozwala to lepiej zrozumieć rolę białek w funkcjonowaniu organizmu i odkrywaniu białkowych markerów chorób.

W proteomice porównawczej, mającej na celu określenie wyłącznie zmian zawartości poszczególnych białek w próbce badanej względem kontrolnej, na przykład w organizmie zdrowym i chorym, nie ma potrzeby określania ich stężenia. W przypadku wyizolowania białek, których zawartość w próbce badanej w znaczący sposób maleje lub wzrasta w stosunku do próbki kontrolnej, konieczne są badania umożliwiające wyznaczenie stężenia konkretnego białka.

Ilościowe oznaczenia proteomiczne z wykorzystaniem układu LC-MS przeprowadza się w dwojaki sposób:

- modyfikuje się białka znacznikami zawierającymi atomy stabilnych ciężkich izotopów,
- wprowadza się do próbki wzorcowej wzorzec wewnętrzny oznaczanego białka, o znanym stężeniu i zawierający w swojej strukturze najcięższy izotop danego pierwiastka (jest to istota metody rozcieńczenia izotopowego).

Sposób pierwszy wykorzystywany jest w proteomice porównawczej. Do jednej próbki, na przykład porównawczej, na etapie wzrostu komórek (in vivo) lub po wyizolowaniu białek z materiału biologicznego (in vitro), wprowadza się atomy cięższego izotopu, a do drugiej atomy lżejszego izotopu tego samego pierwiastka. W wyniku analizy MS obu próbek otrzymuje się widma mas, które różnią się

wartością m/z , odpowiadającą różnicy mas cząsteczkowych znaczników izotopowych. Porównanie intensywności obu widm umożliwia ustalenie względnej zawartości poszczególnych białek w obu próbkach. W handlu dostępnych jest kilka odczynników do znakowania izotopowego, a samo oznaczenie jest względnie proste.

Drugi sposób, czyli metoda rozcieńczenia izotopowego, polega na dodaniu do próbki zawierającej oznaczane białko tego samego białka o znanym stężeniu, ale zawierającego w swojej strukturze izotop (np. ^{15}N). Pozwala to obliczyć stężenie białka w próbce na podstawie wcześniej sporządzonego wykresu kalibracyjnego. Metodę rozcieńczenia izotopowego stosuje się do oznaczenia zarówno białek natywnych (o konformacji, w jakiej występują i funkcjonują w organizmie), jak i peptydów powstałych w wyniku trawienia enzymatycznego danego białka.

2.12.

Szybka chromatografia cieczowa kolumnowa

O szybkości procesu chromatografowania decydują w kolumnowej chromatografii cieczowej długość i średnica kolumny, rodzaj fazy stacjonarnej i fazy ruchomej, natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej i jej temperatura. W szybkiej chromatografii ważne są także parametry techniczne chromatografu i dozownika oraz systemu zbierania danych. Czynniki te powinny być tak dobrane, aby przy możliwie jak najkrótszym czasie rozdzielania składników mieszaniny ich rozdzielenie było jak najlepsze. Jakość rozdzielania składników mieszaniny zależy od selektywności kolumny, której miarą jest współczynnik retencji lub współczynnik rozdzielania i sprawności kolumny, wyrażanej liczbą pól teoretycznych. Sprawność kolumny zależy od wielkości cząstek jej wypełnienia i ich jednorodności, wielkości powierzchni właściwej, rozmiaru porów, lepkości i szybkości przepływu fazy ruchomej oraz od temperatury.

Na sprawność kolumny chromatograficznej w dużym stopniu wpływa wielkość cząstek fazy stacjonarnej. Im są one mniejsze, tym większa sprawność. Z klasycznego wykresu równania van Deemtera wynika, że kolumna może osiągnąć wysoką sprawność przy optymalnej, względnie małej liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej. Owszem, było to słuszne, gdy w HPLC stosowano wypełnienia o średnicach cząstek powyżej 3 μm . Jednak zastosowanie wypełnień kolumnowych, których cząstki o średnicy 1,7 μm i mniejszych są bardzo jednorodne, sprawiło, że przebieg wykresu van Deemtera znacznie różni się od jego przebiegu dla cząstek większych (ryc. 2.62). Zastosowanie cząstek o średnicy 1,7 μm pozwala uzyskiwać około trzykrotnie większą sprawność kolumny niż zastosowanie cząstek o średnicy 5 μm i dwukrotnie większą niż w przypadku cząstek o średnicy 3,5 μm . Daje to wyższą rozdzielczość pików składników rozdzielanych mieszanin odpowiednio o 70 i o 40%. Obecnie dostępne są fazy stacjonarne, których cząstki mają jeszcze mniejsze średnice, na przykład 1,5 μm .