

„Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”

Techniczne aspekty przygotowania materiału i pracy z spektrometrem mas

Dr n. chem. Jakub Nawął

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD

Kierownik Zakładu: dr n. biol. Mariusz Ołtarzewski

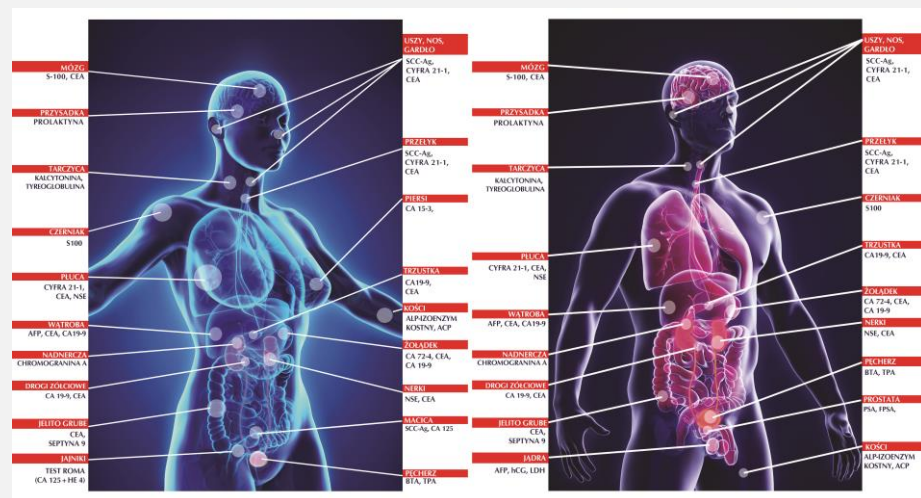
Warszawa 08 październik 2021 r

Diagnostyka medyczna

... to **nauka o rozpoznawaniu chorób.**

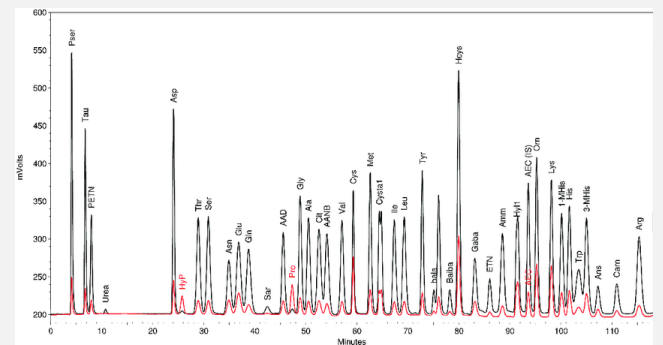
Diagnoza jest wynikiem:

1. badania podmiotowego
2. badanie przedmiotowego
3. badania dodatkowego
 - badania fragmentu tkanek, krwi, wydzielin i wydaliny
 - badania obrazowe
 - badania endoskopowe

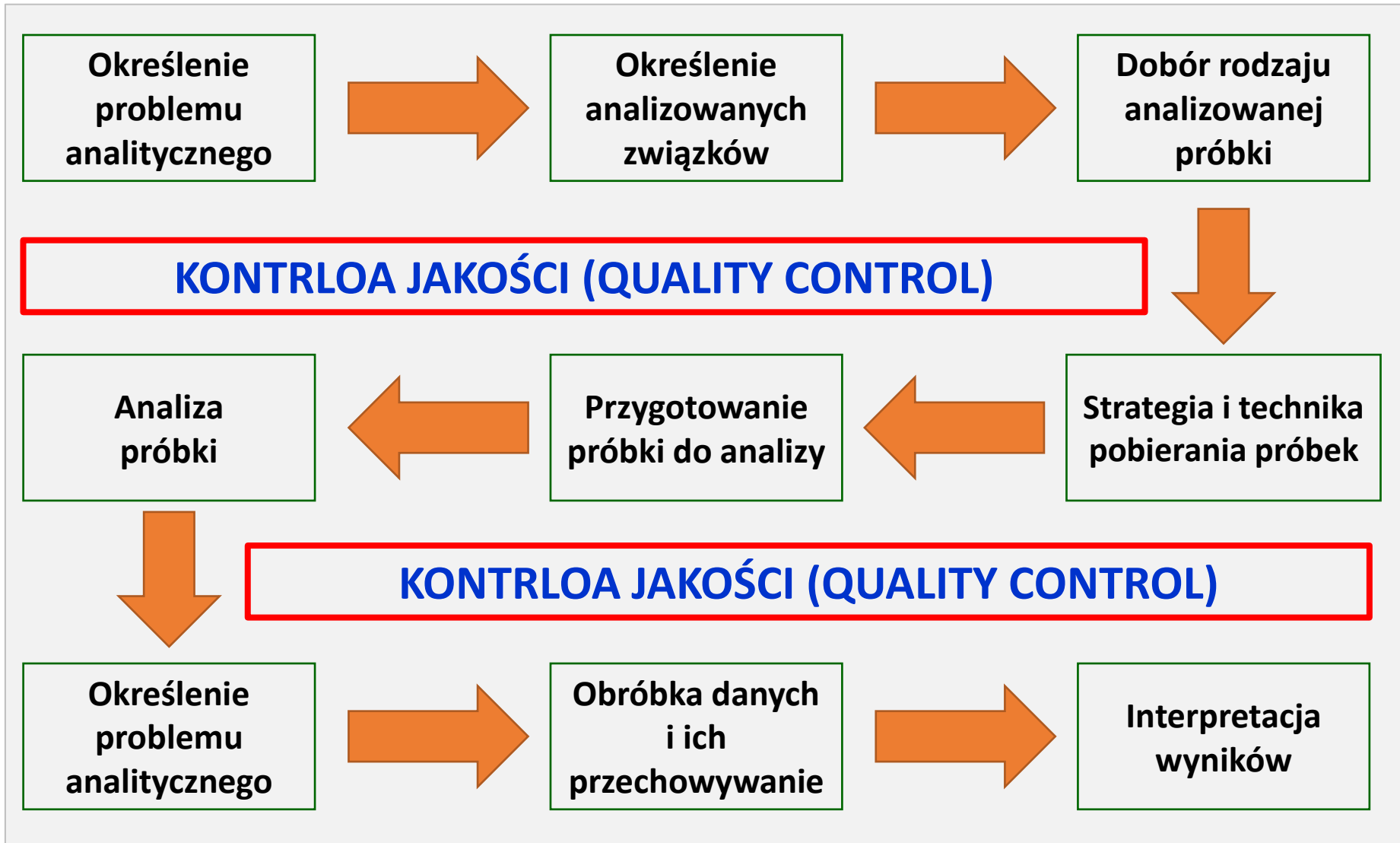


Proces analityczny

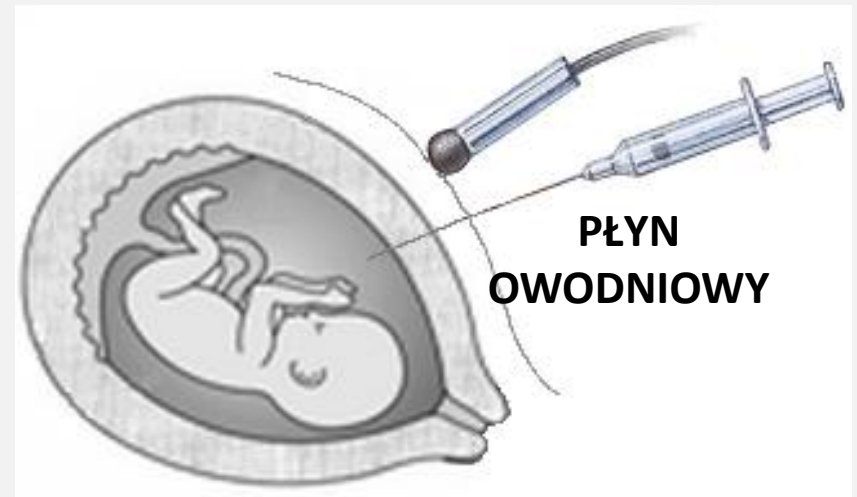
- Brak bezpośredniego kontaktu z pacjentem
- Operowanie na materiale pobranym od pacjenta
- Bardzo duża ilość wykonywanych badań
- Wykonywania analiz zarówno jakościowych jak i ilościowych
- Czas trwania analizy bardzo często musi być krótki
- Bardzo dobra komunikacja na drodze lekarz – biochemik
- Opracowanie nowych metod analitycznych, udoskonalanie istniejących, serwisowanie aparatury analitycznej
- kontrola jakości



Proces analityczny



Rodzaj próbki



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

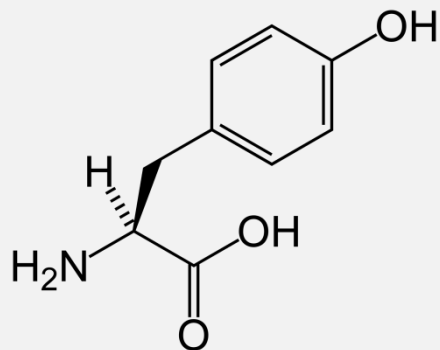


**Instytut
Matki i Dziecka**

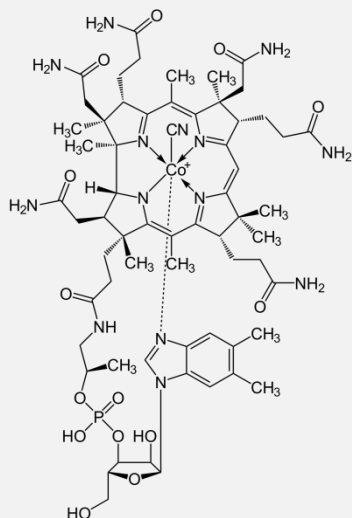
Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



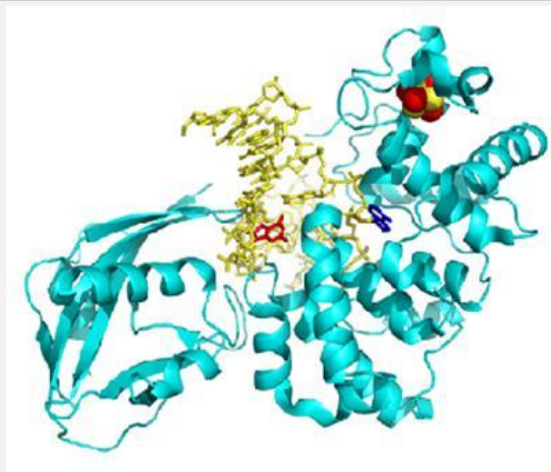
Określenie badanych związków



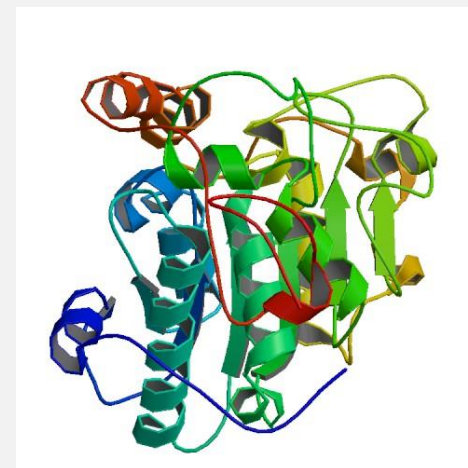
Amino kwasy



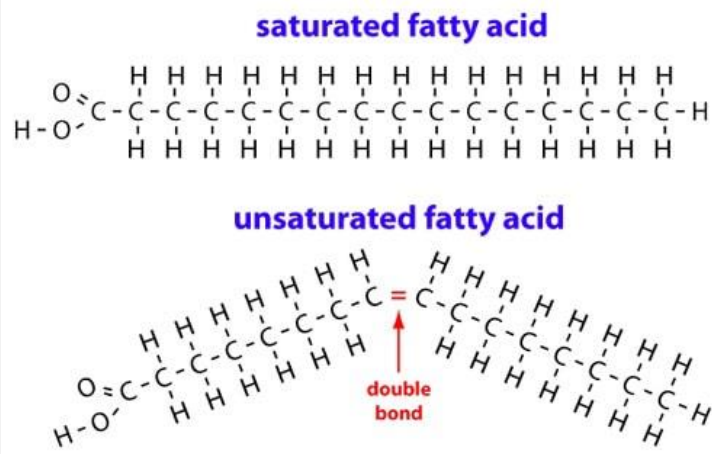
Witaminy



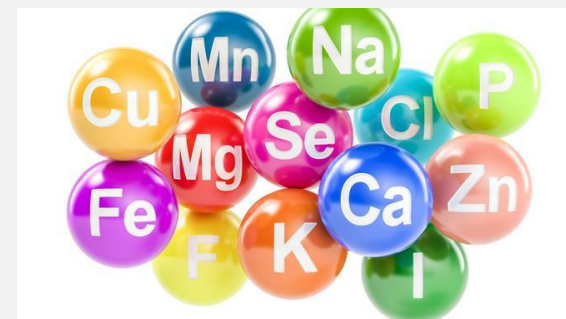
Białka



Enzyme



Kwasy tłuszczowe



Makro i mikroelementy

Przygotowanie próbek do analizy

Cel	Sposób realizacji
Homogeniczność pobranej próbki	Mielenie, mieszanie, analiza sitowa
Stabilność próbki na etapie przechowywania lub transportu	Konserwacja chemiczna, termiczna lub liofilizacja
Usunięcie interferentów z matrycy próbki	odpylanie, usuwanie, zawiesiny, osuszanie, odtlenienie, usuwanie składników reaktywnych
Przekształcenie analitów w pochodne w celu: 1. Ułatwienia izolacji 2. Rozdzielenie składników mieszaniny 3. Analizy ilościowej i jakościowej	Reakcje derywatyzacji
Zmiana matrycy próbki pod daną technikę analityczną	Odparowanie do sucha, ekstrakcja, sorpcja
Zwiększenie stężenia substancji śladowych	Techniki wzbogacania i zateżniania próbek

Przygotowanie próbek do analizy

Matryca

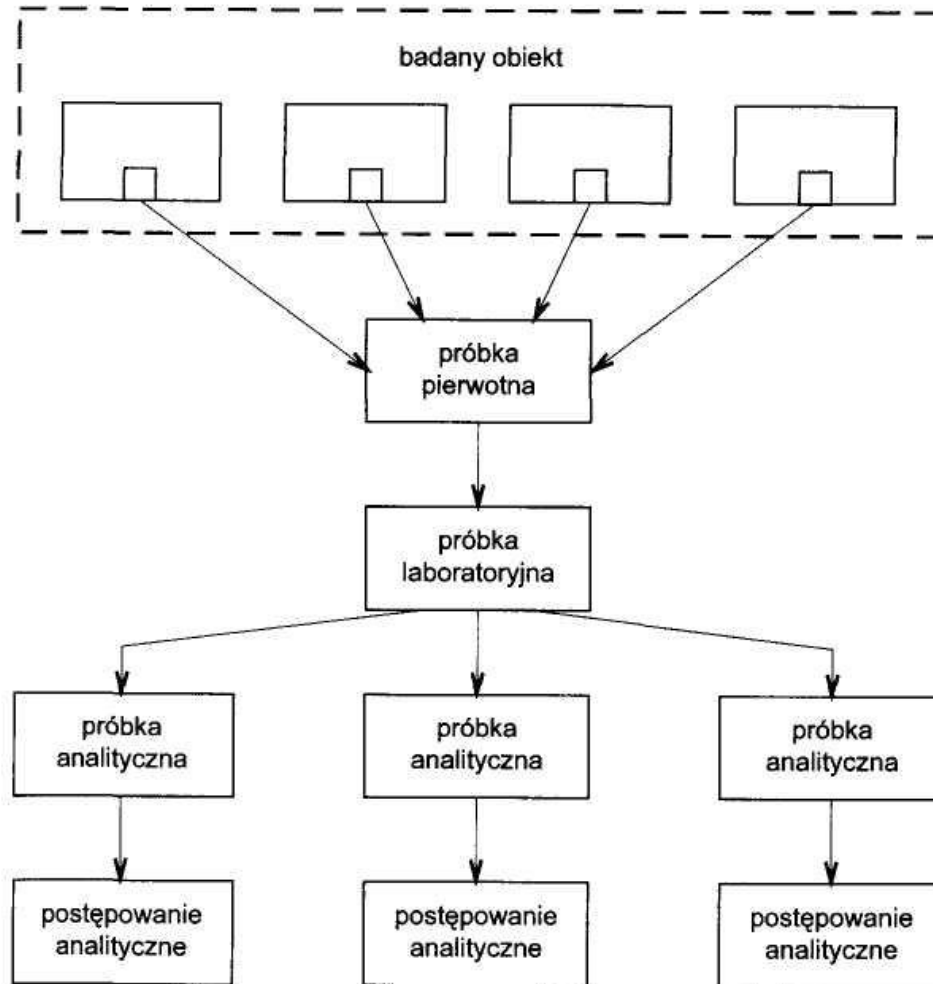
Wszystkie składniki próbki
poza analitem

Analit

Składnik, który
jest oznaczany



Przygotowanie próbek do analizy



Przygotowanie próbek do analizy

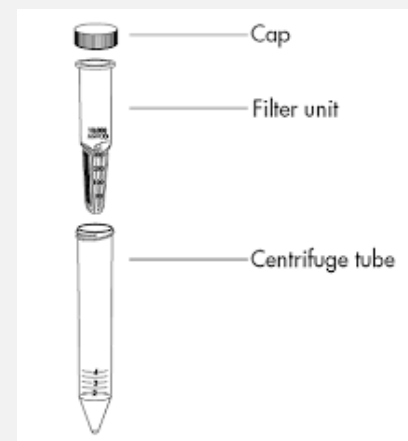
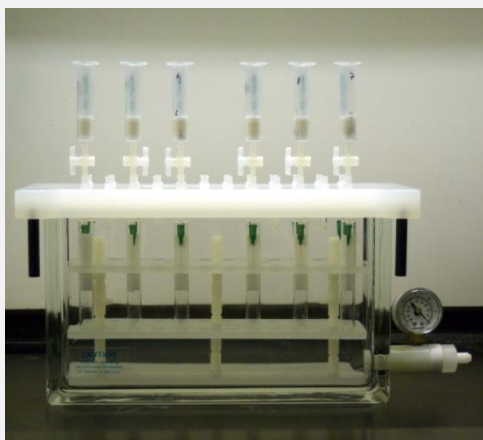
Najczęstsze problemy spotykane na etapie przygotowania próbek:

1. Czas przygotowania próbek
2. Zbyt niskie odzyski
3. Obecność zanieczyszczeń
4. Powtarzalność
5. Koszt



Przygotowanie próbek do analizy

Techniki stosowane na etapie przygotowania próbek



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

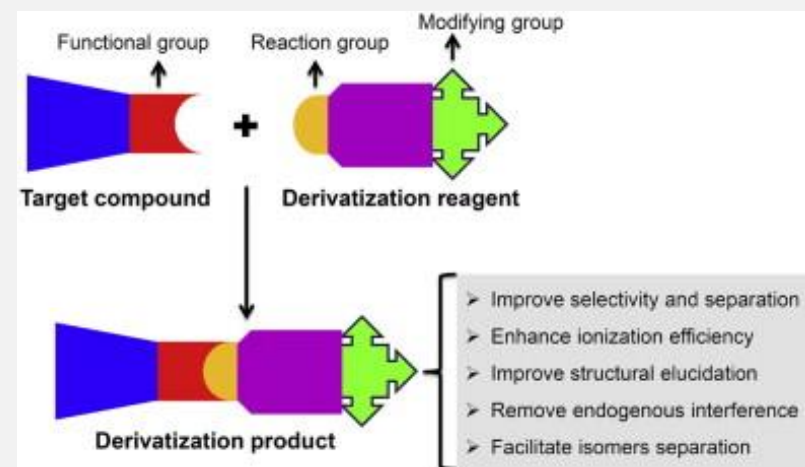
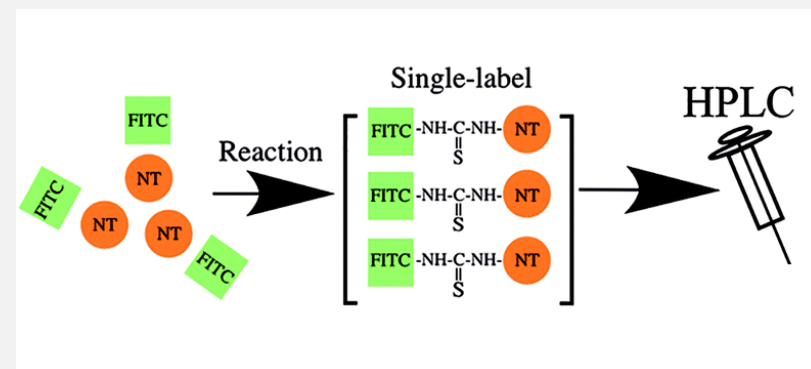


Przygotowanie próbek do analizy

Derywatywacja to proces polegający na przeprowadzeniu analizowanych związków umożliwiając ich oznaczanie z wykorzystaniem danej metody analitycznej.

Derywatyzację stosuje się w celu:

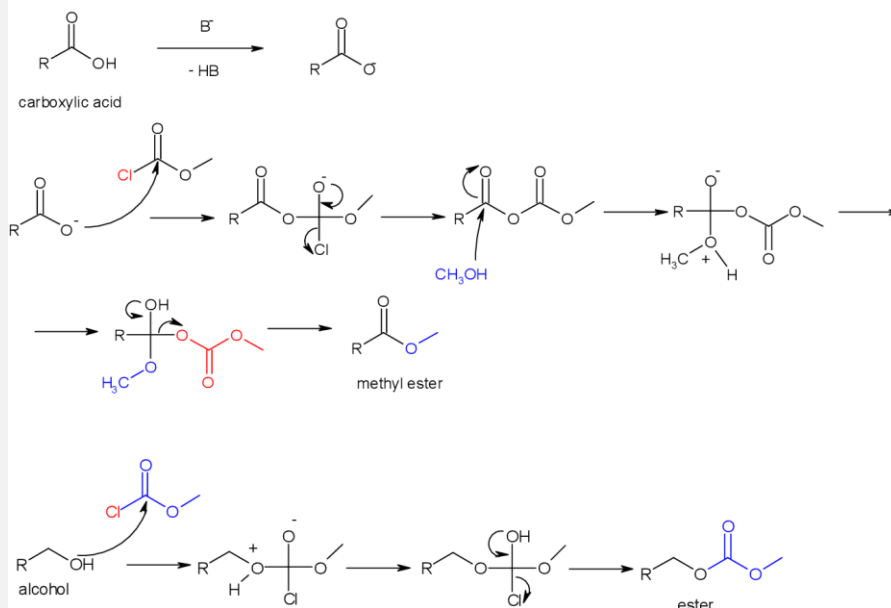
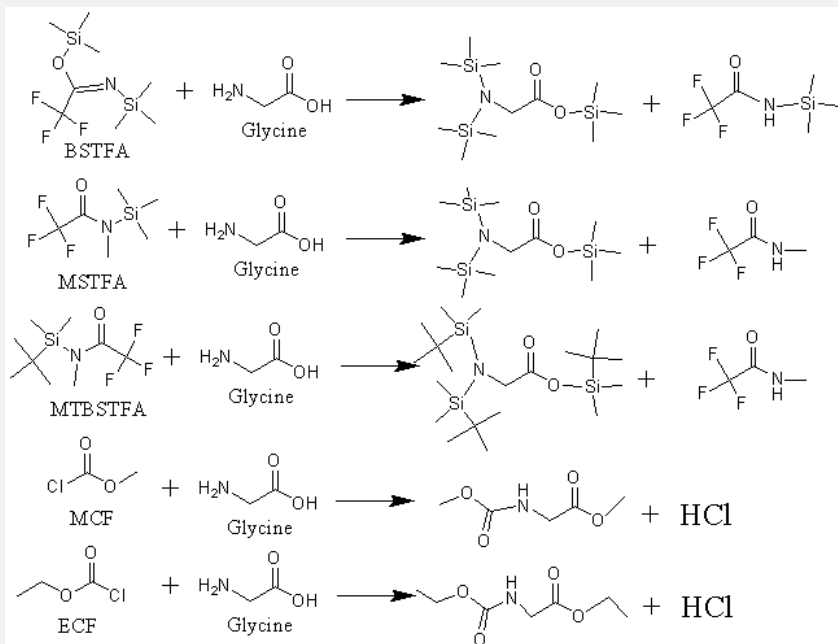
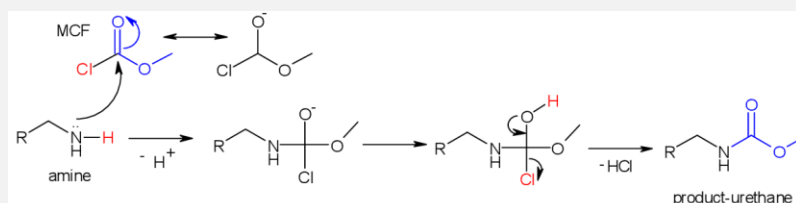
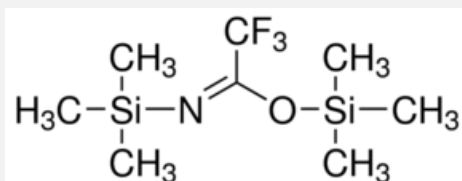
- zwiększenia lub zmniejszenia lotności analitów
- zwiększenia stabilności termicznej analitów
- zwiększenie czułości lub specyficzności oznaczenia przez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych
- zmianę polarności analitu, przez zablokowanie grup funkcyjnych
- uzyskanie barwnego produktu reakcji bądź zmiany barwy analitu, co umożliwia zastosowanie prostych metod kolorymetrycznych
- specyficznego zatrzymania analitu na warstwie nośnika pokrytego reagentem (wzbogacenia)



Przygotowanie próbek do analizy

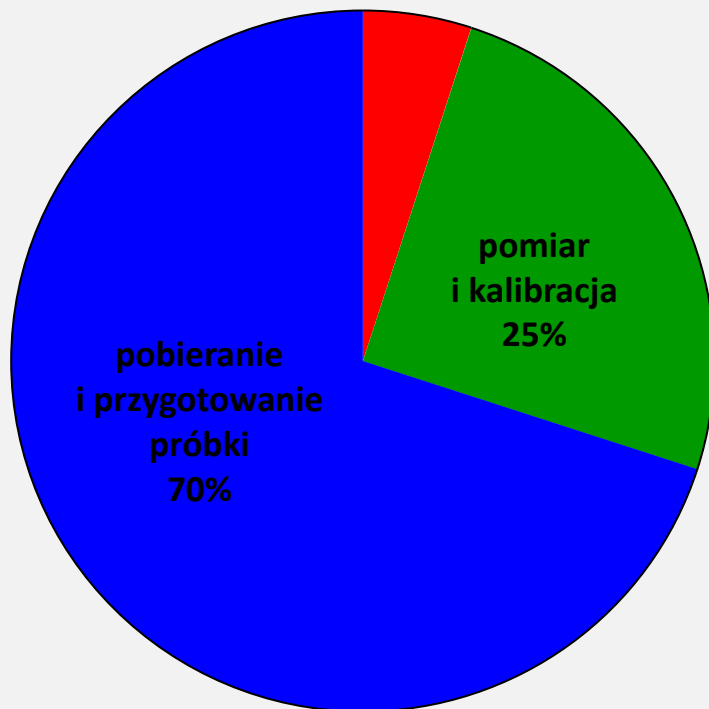
Odczynnik derywatyzujący powinien zawierać dwie grupy funkcyjne, z których jedna jest reaktywna i łączy się z analitem oraz sygnałowa, która umożliwi detekcję i zwiększa czułość analizy. Derywatyzacja opiera się na następujących reakcjach:

- sililowanie
- alkilowanie
- acylowanie
- estryfikacja



Przygotowanie próbek do analizy

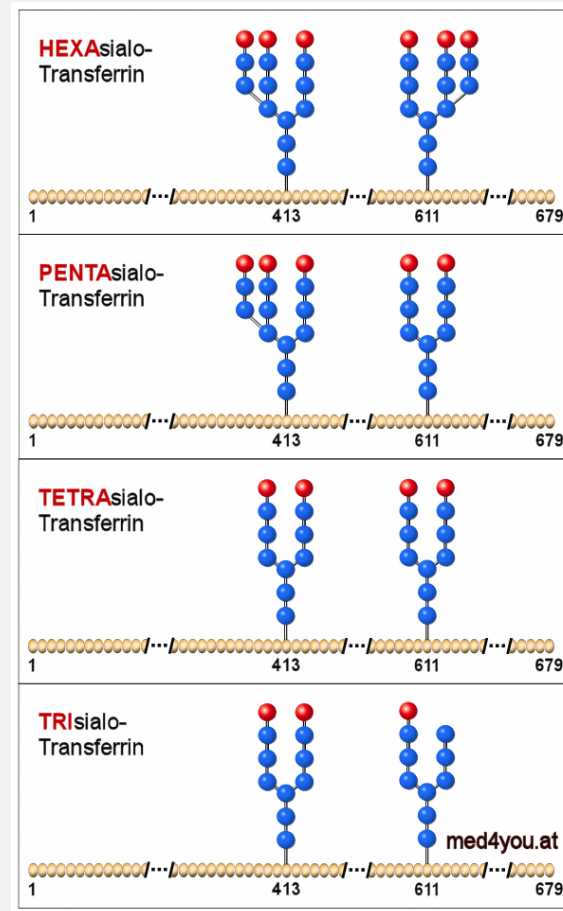
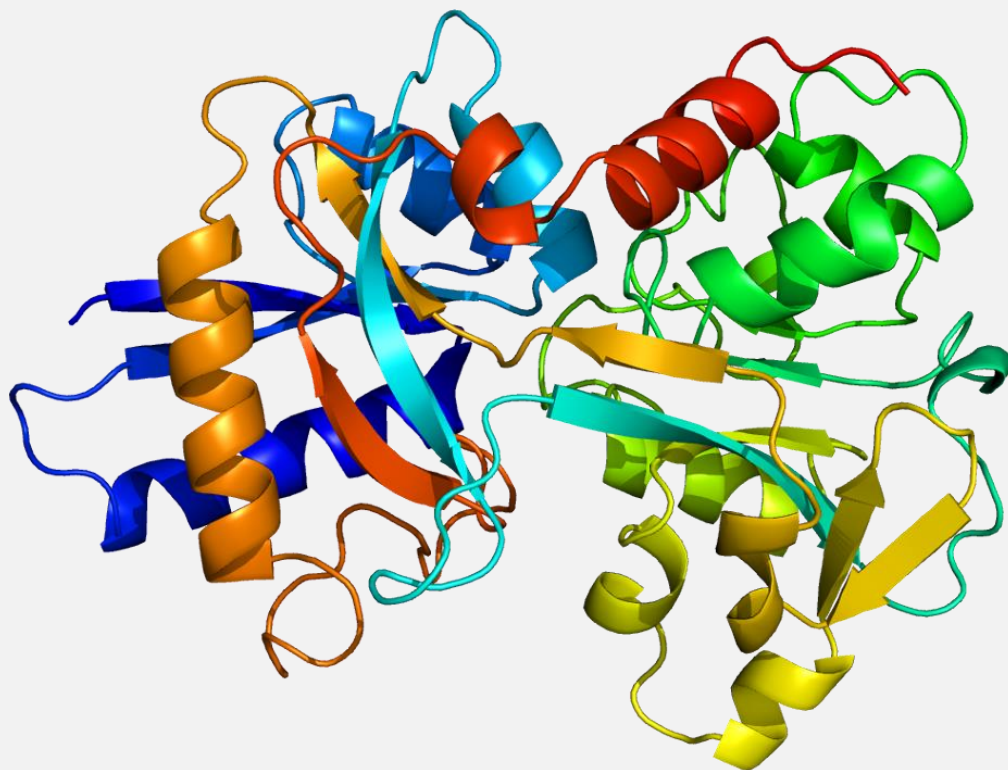
Potrzebny czas



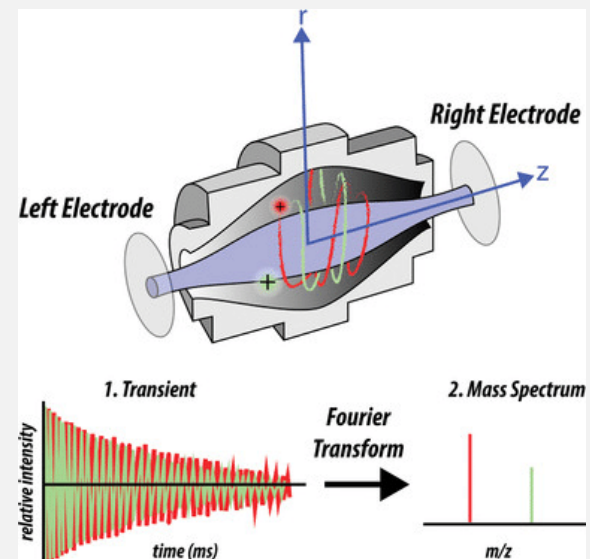
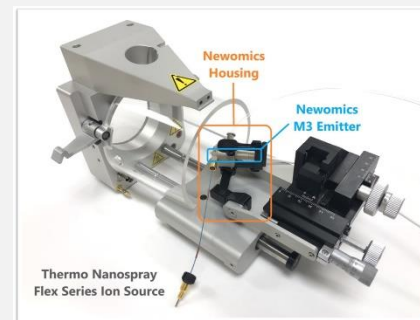
Źródła błędów



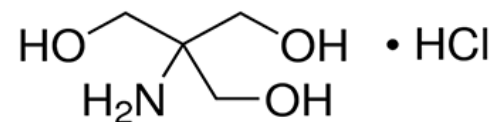
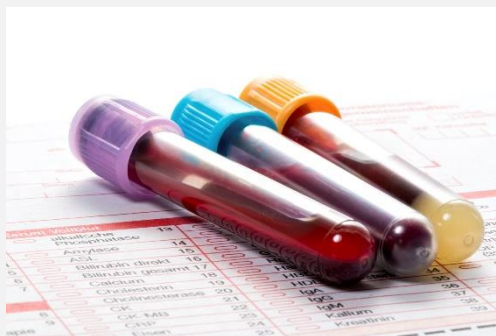
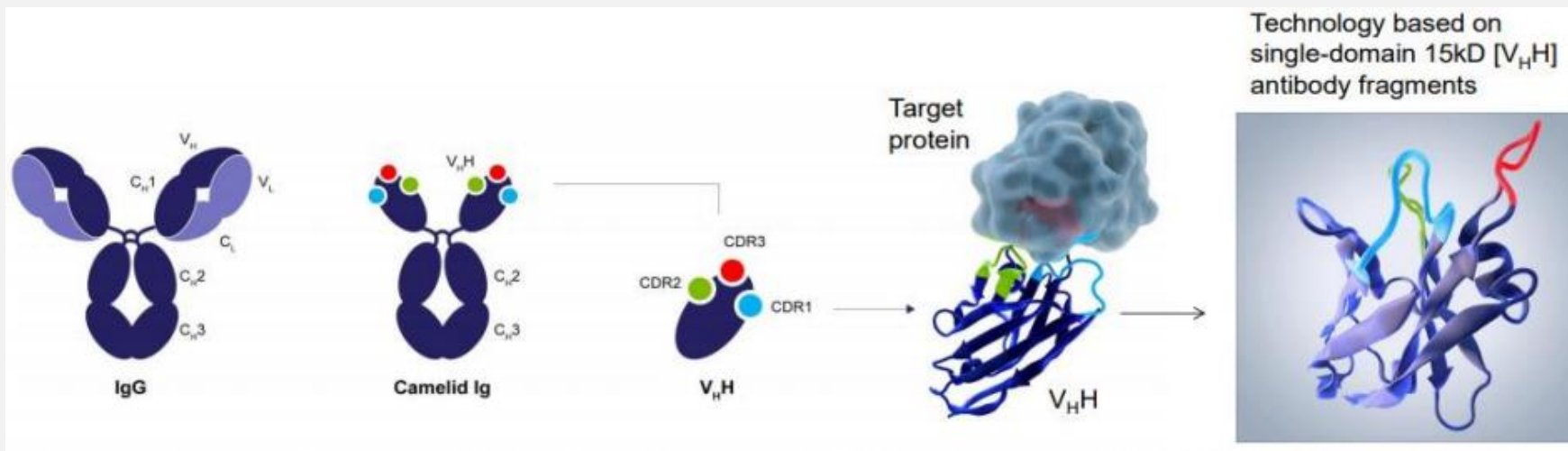
Procedura przygotowania próbek - Transferyna



Procedura przygotowania próbek - Transferyna



Procedura przygotowania próbek - Transferyna



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

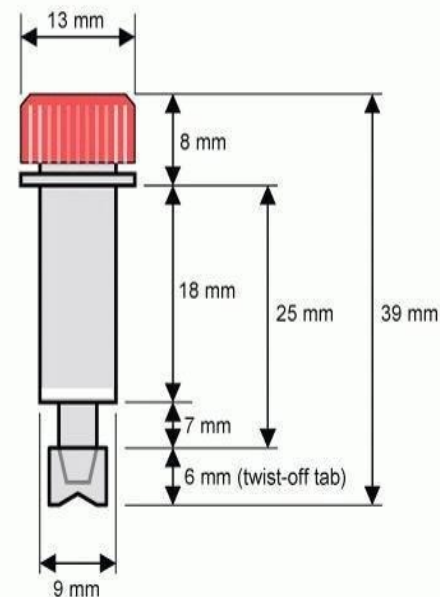


Procedura przygotowania próbek - Transferyna



Thermo Scientific Pierce
Centrifuge Columns, 0.8 mL
(Cat. No. 89868)

Total column capacity = 0.8 mL



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

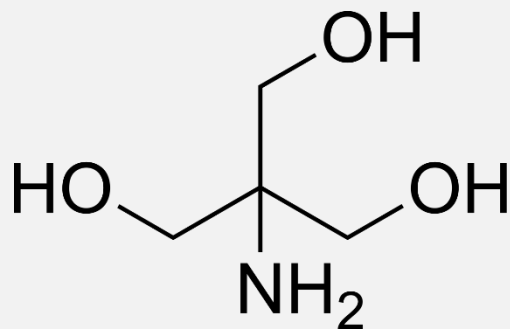


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



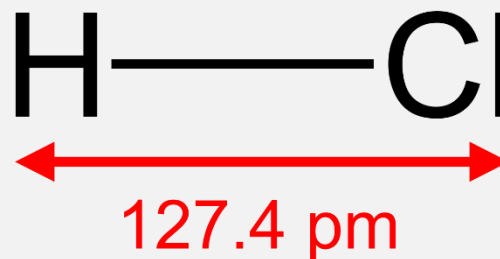
Procedura przygotowania próbek - Transferyna



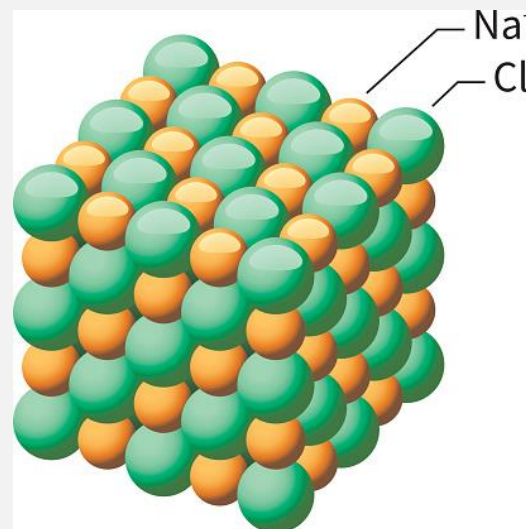
TRIS



Matryca do izolacji transferyn



HCl

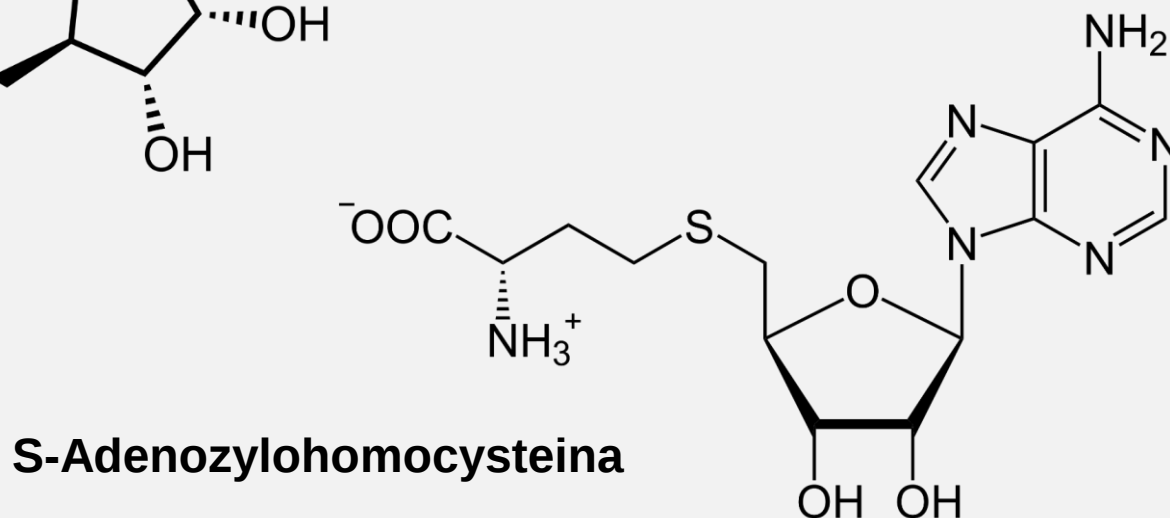
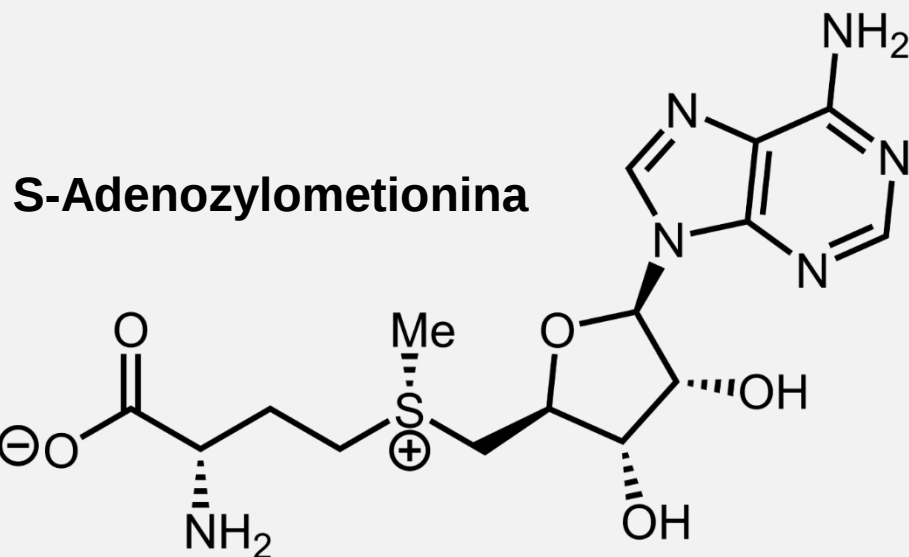


NaCl

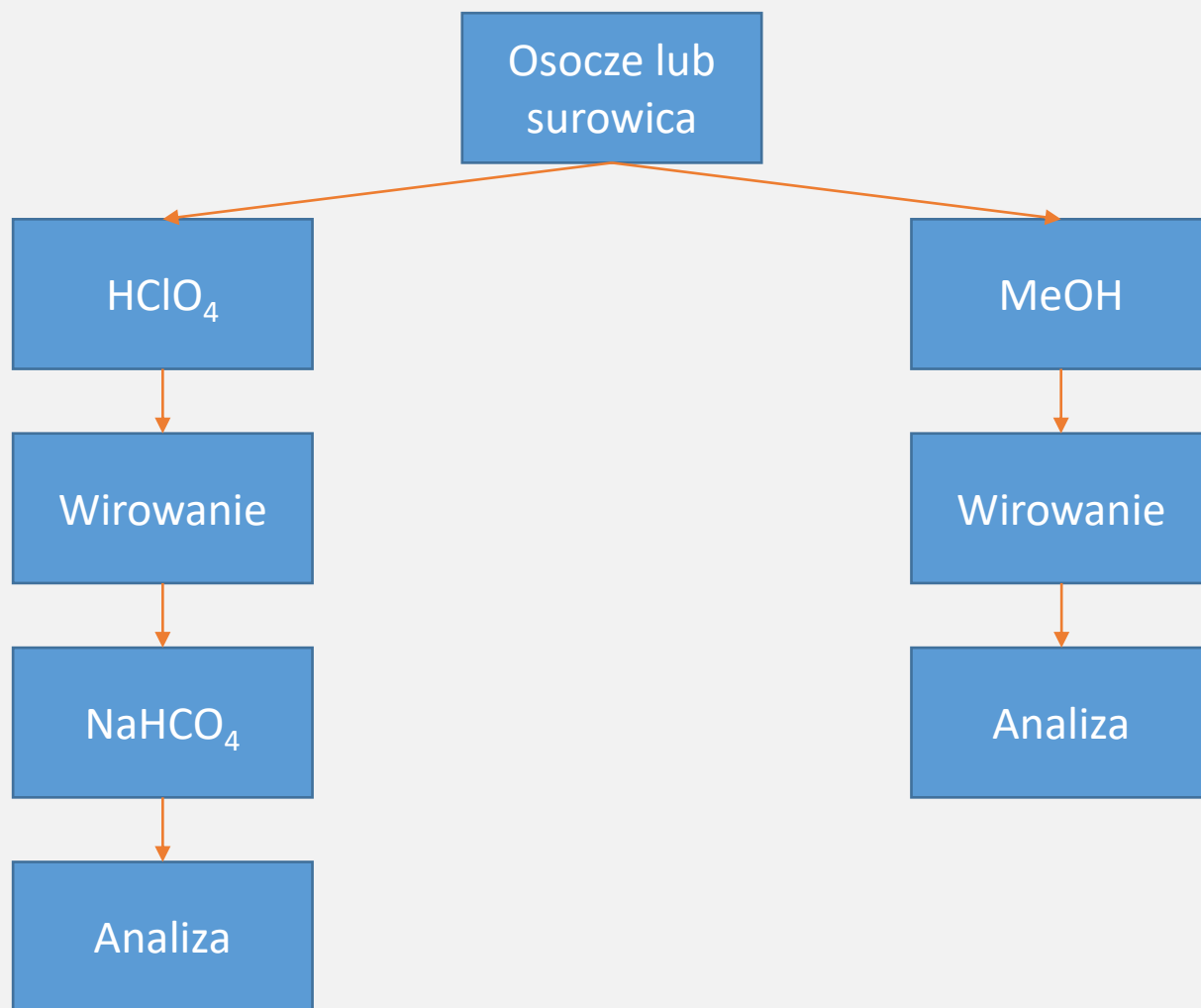
Procedura przygotowania próbek - Transferyna

1. Kolumnę wirówkową (Pierce, nr kat. 89868) zawierającą 40 μ l zawiesiny perełek antytransferyny przemyć 4 razy 700 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7.
2. 10- μ l próbkę osocza rozcieńczyć 90 μ l 0,9% roztworu NaCl i nanieść na kolumnę wirówkową.
3. Próbkę inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym przemyć próbkę 6-krotnie 700 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7.
4. Elucja transferyny (50 μ l, 100 mM glicyna-HCl, pH 2,7).
5. Wymytą frakcję zobojętnić 1–1,5 μ l 1,0 M Tris-HCl, pH 9,0
6. Przechowywano w temperaturze -80 ° C.
7. W celu ponownego użycia kolumnę przemyć 5 razy 700 ml 1 M glicyny-HCl, pH 2,7 i zrównoważyć buforem do przemywania (5 razy 700 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7).
8. Analizować za pomocą nanoLC-HRMS.

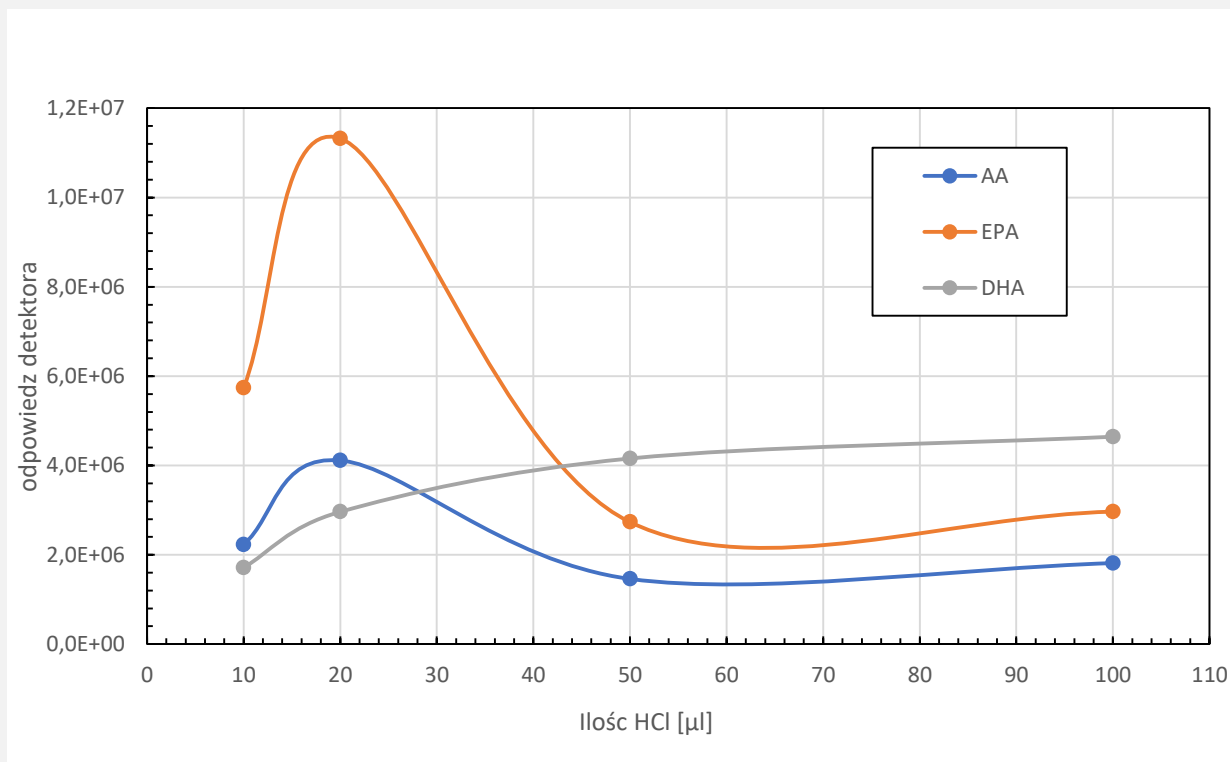
Procedura przygotowania próbek – SAM i SAH



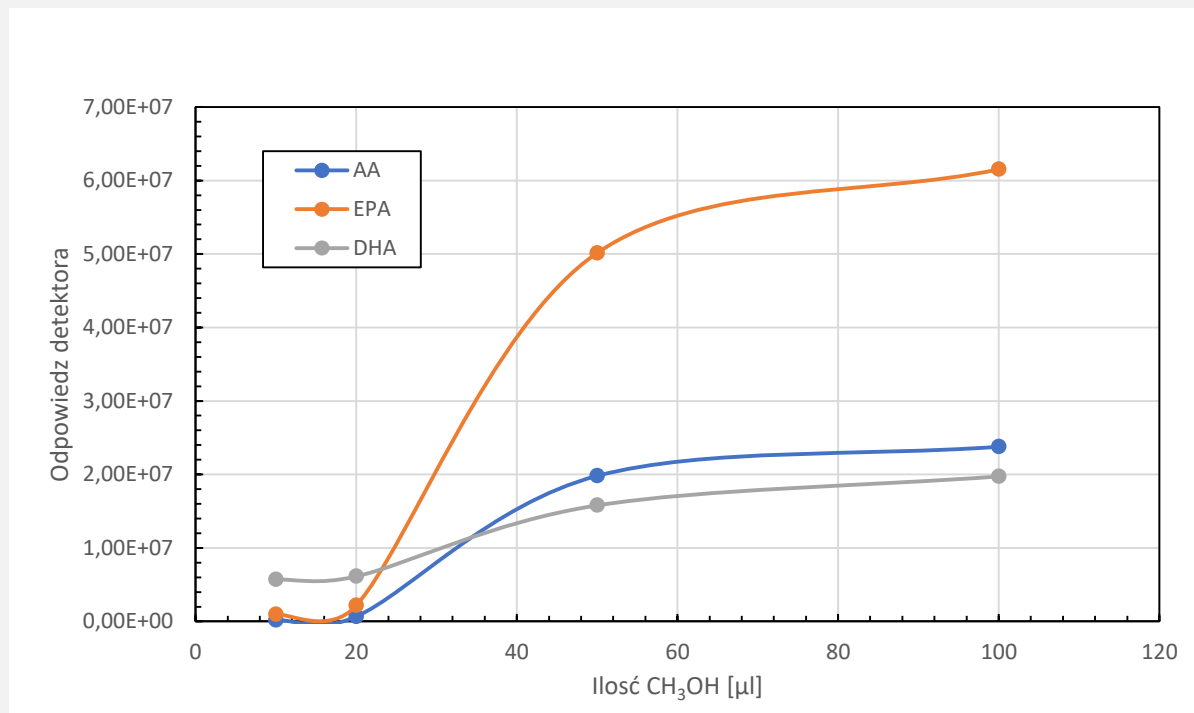
Procedura przygotowania próbek – SAM i SAH



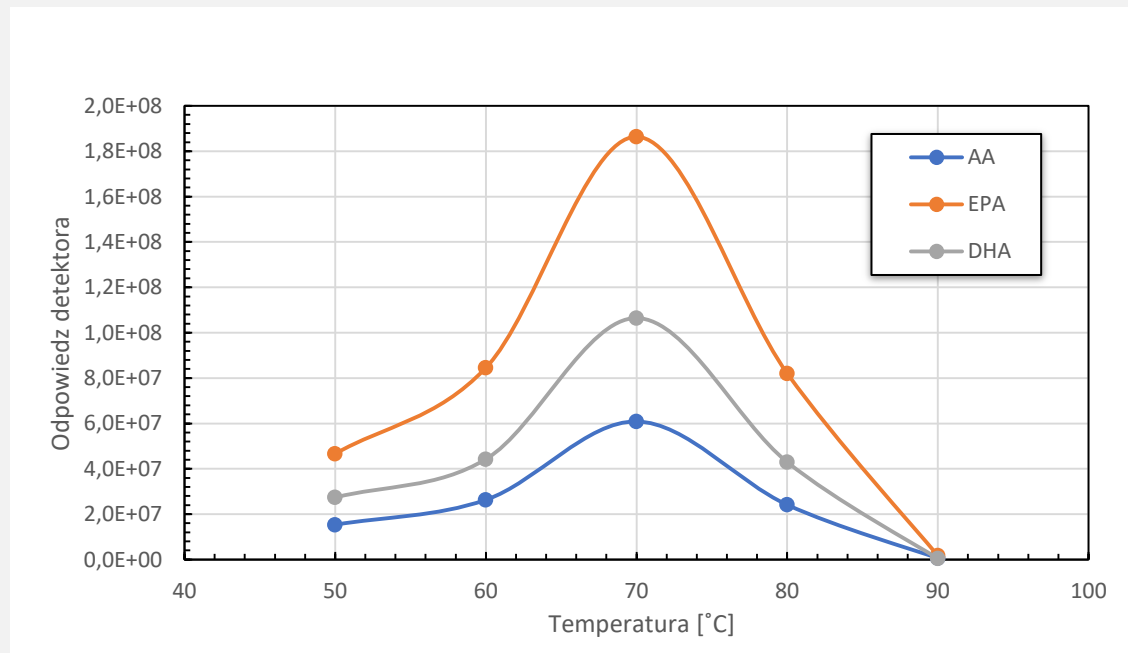
Procedura przygotowania próbek – Kwasy tłuszczowe



Procedura przygotowania próbek – Kwasy tłuszczowe



Procedura przygotowania próbek – Kwasy tłuszczowe



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

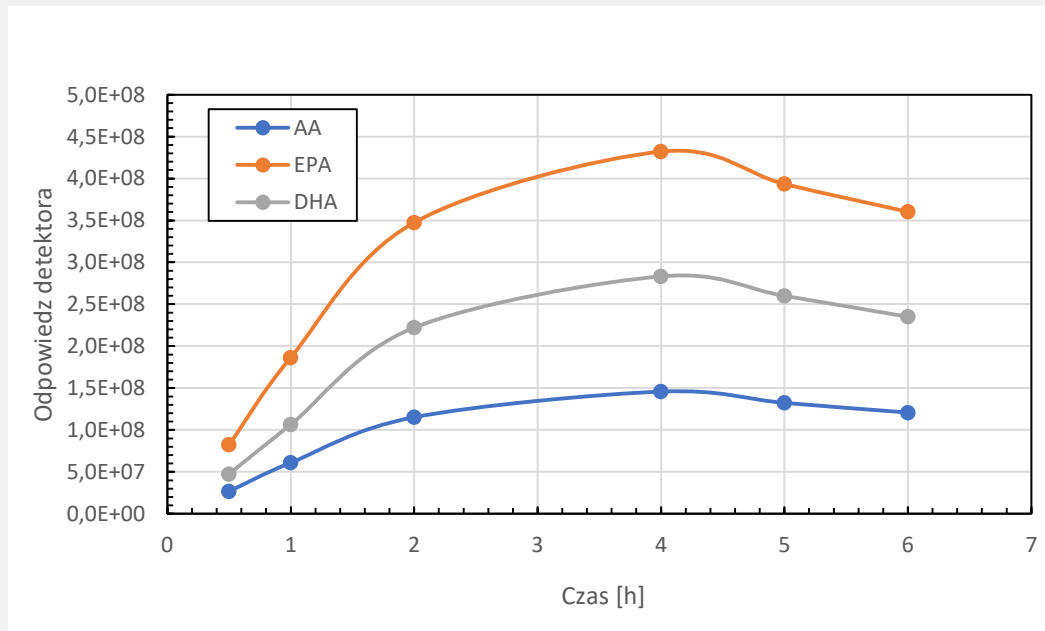


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Procedura przygotowania próbek – Kwasy tłuszczowe



Procedura przygotowania próbek – Kwasy tłuszczowe

- Do 100 μL próbki osocza lub surowicy krwi dodano 200 μL 0,1 M roztworu kwasu chlorowodorowego i 1000 μL metanolu
- Otrzymane mieszaniny ogrzewano przez 4h w temperaturze 60°C w suszarce laboratoryjnej Po zakończeniu ogrzewania próbki studzono i ekstrahowano za pomoc 1 mL heksanu.
- Następnie fazę organiczną oddzielano i analizowano za pomocą GC-MS/MS.

Dziękuję za uwagę



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

