

****Instrukcja Badania Peptydów za pomocą HPLC****

**1. Cel Instrukcji**

Instrukcja ta została opracowana w celu standaryzacji badań **peptydów** za pomocą **HPLC** (High-Performance Liquid Chromatography). Dokument ten zawiera szczegółowe wytyczne dotyczące:

- **Przygotowania próbek** peptydów do analizy.
- **Optymalnych warunków pracy HPLC** dla większości peptydów.
- **Interpretacji wyników** w analizie jakościowej i ilościowej.
- **Zalecanych praktyk laboratoryjnych** w celu zapewnienia powtarzalności i wiarygodności wyników.

Instrukcja jest odpowiednia do badania większości **peptydów liofilizowanych** dostępnych w postaci proszku, zarówno w wersjach iniekcyjnych, jak i oralnych.

**2. Materiały i Aparatura**

**2.1. Materiały:**

- **Fiolka z peptydem (liofilizowany proszek)** – dowolny peptyd w ilości odpowiedniej do badań analitycznych (np. 1–5 mg).
- **Woda dejonizowana klasy HPLC** lub odpowiedni rozpuszczalnik (np. bufor fosforanowy, 0,1% TFA w wodzie, acetonitryl).
- **Filtry strzykawkowe (0,2 µm)** klasy HPLC do usuwania zanieczyszczeń przed analizą.
- **Strzykawki jałowe** do rozpuszczania peptydu.
- **Pipety automatyczne** i końcówki jednorazowe.
- **Fiolki autosamplera** kompatybilne z urządzeniem HPLC.

**2.2. Sprzęt:**

- **Aparat HPLC** z detektorem:
 - **Detektor UV** (najczęściej stosowany dla peptydów, optymalna długość fali: 220 nm).
 - Alternatywnie: **MS (Mass Spectrometry)** dla bardziej precyzyjnej analizy strukturalnej.
- **Kolumna HPLC** odpowiednia do analizy peptydów:
 - **Kolumna C18** (150 x 4,6 mm, 5 µm) – najczęściej stosowana do rozdzielania peptydów.
 - Alternatywnie: kolumny C8 lub kolumny z fazą odwróconą dla specyficznych peptydów.
- **Termostat do kolumny HPLC** zapewniający stabilną temperaturę w zakresie **25–40°C**.

**3. Przygotowanie Roztworu Peptydu**

**3.1. Rozpuszczanie liofilizatu:**

1. Przygotowanie fiolki:

- Usun plastikowy kapsel.
- Zdezynfekuj gumowy korek alkoholem izopropylowym (70%) w celu zachowania sterylności.

2. Dodanie rozpuszczalnika:

- Wprowadź odpowiednią ilość rozpuszczalnika (np. **1 ml wody klasy HPLC** lub odpowiedniego buforu) za pomocą jałowej strzykawki przez gumowy korek.
- **Stężenie początkowe:** Zalecane stężenie to **1–5 mg/ml**, w zależności od wymagań analitycznych.

3. Mieszanie:

- Delikatnie mieszaj fiolkę ruchem kolistym, aż proszek całkowicie się rozpuści.
- **Nie wstrząsaj gwałtownie**, aby uniknąć denaturacji peptydu.

****3.2. Filtrowanie roztworu:****

1. ****Filtracja:****

- Przefiltruj roztwór przez ****filtr strzykawkowy (0,2 µm)**** do czystej fiolki autosamplera.
- Celem filtracji jest usunięcie ewentualnych zanieczyszczeń mechanicznych mogących wpływać na wyniki HPLC.

2. ****Kontrola jakości roztworu:****

- ****Przezroczystość****: Roztwór powinien być klarowny, bez widocznych cząstek stałych.
- ****Stabilność****: Używaj roztworu w ciągu ****24 godzin**** od przygotowania, przechowując go w lodówce (2–8°C).

****4. Warunki Pracy HPLC****

****4.1. Faza ruchoma:****

- ****Faza A:**** 0,1% TFA (kwas trifluorooctowy) w wodzie klasy HPLC.
- ****Faza B:**** 0,1% TFA w acetonitrylu.
- ****Gradient elucji:****
 - ****Od 5% do 50% fazy B**** w ciągu ****30 minut****.
 - Gradient może być dostosowany w zależności od specyficznego peptydu.

****4.2. Kolumna:****

- ****Kolumna C18**** (150 x 4,6 mm, 5 µm) – zalecana do większości peptydów.
- ****Temperatura kolumny:**** ****25–40°C****, optymalnie 30°C.

****4.3. Detekcja:****

- ****Detektor UV****: Długość fali ****220 nm**** (optymalna dla większości peptydów).
- Alternatywnie: ****MS (Mass Spectrometry)**** dla szczegółowej analizy strukturalnej i masowej.

****4.4. Prędkość przepływu i objętość próbki:****

- ****Prędkość przepływu:**** ****1 ml/min**** (chyba że protokół wymaga inaczej).
- ****Objętość próbki:**** ****10–50 µl****, w zależności od czułości aparatu i stężenia próbki.

****5. Analiza Danych i Interpretacja Wyników****

****5.1. Analiza jakościowa:****

- ****Identyfikacja pików:**** Na podstawie ****czasu retencji**** w porównaniu do wzorców referencyjnych.
- ****Profil czystości:**** Oceniaj czystość peptydu na podstawie ****jednorodności pików****.
- ****Charakterystyka zanieczyszczeń:**** Dodatkowe piki mogą wskazywać na obecność zanieczyszczeń.

****5.2. Analiza ilościowa:****

- ****Krzywa kalibracyjna:**** Przygotuj na podstawie ****roztworów wzorcowych**** o znanym stężeniu.
- ****Obliczenia stężenia:**** Na podstawie powierzchni pików i krzywej kalibracyjnej.

****6. Uwagi i Zalecenia****

- ****Przechowywanie:**** Gotowy roztwór przechowywać w ****lodówce (2–8°C)**** i używać w ciągu 24 godzin.
- ****Ochrona przed światłem:**** Roztwory peptydów są wrażliwe na światło UV – przechowuj w ciemnych fiolkach.
- ****Kontrola jakości:**** Regularnie sprawdzaj stan kolumny HPLC oraz jakość faz ruchomych.
- ****Utylizacja:**** Zużyte próbki oraz odpady chemiczne utylizuj zgodnie z lokalnymi przepisami.

7. Wnioski i Praktyczne Zastosowanie

- Instrukcja jest **uniwersalna** i może być stosowana do badania różnych peptydów, zarówno **iniekcyjnych**, jak i **oralnych**.
- **HPLC** zapewnia **wysoką rozdzielczość** i **precyzyjną identyfikację** peptydów, co jest niezbędne w badaniach analitycznych i kontrolach jakości.

Instrukcja ta może być modyfikowana i dostosowywana w zależności od specyficznych wymagań analitycznych oraz charakterystyki badanego peptydu.