

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Aparatura

Spektrofotometr Specol (Niemcy).

Wykonanie

Po doustnym podaniu ochotnikowi tabletki Polopiryny S zawierającej 300 mg kwasu acetylosalicylowego (ASA) każda próbka moczu musi być zebrana. Należy:

- zanotować czas oddania moczu,
- zanotować objętość moczu,
- próbki moczu do analizy (10 ml) zabrać ze sobą na zajęcia.

Ze względów bioetycznych studenci otrzymują próbki moczu z salicylanami zebrane wg poniższej procedury.

Szczegółowa procedura zbierania próbek moczu

- Aby uzyskać wystarczającą ilość moczu w ciągu pierwszych godzin po podaniu leku, 1 h przed eksperymentem należy wypić 400 ml wody. Bezpośrednio przed podaniem leku wypróżnić całkowicie pęcherz moczowy. Zostawić 15 ml moczu do przygotowania krzywej wzorcowej i próbki ślepej.
- Tabletkę Polopiryny S popić 200 ml wody.
- Zbierać mocz przez 24 h od momentu zażycia leku. Dla każdej próbki zanotować czas oddania moczu oraz zmierzyć jego objętość.
- Przechowywać w zamrażalce przeznaczoną do analizy próbkę moczu (10–15 ml) po uprzednim jej opisaniu.

Uwaga! Bardzo ważne jest, aby wszystkie próbki moczu zostały zebrane. Jeśli nawet jedna zostanie pominięta, cały eksperyment traci ważność.

Absorbancję salicylanów po derywatywacji odczynnikiem Trindera zmierzyć zgodnie z procedurą opisaną w sekcji *Oznaczanie salicylanów w moczu*. Uzyskane dane użyć do obliczenia stałej szybkości eliminacji i biologicznego okresu półtrwania salicylanów.

Roztwory

- Odczynnik Trindera: odważyć 40 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 850 ml wody, następnie dodać 120 ml 1 mol/l HCl.
- Roztwór podstawowy salicylanu sodu: w kolbie miarowej o pojemności 250 ml rozpuścić 0,125 g salicylanu sodu w wodzie. Końcowe stężenie salicylanu wynosi 0,5 mg/ml.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

- Po 0,5 ml moczu (bez salicylanów) przenieść do czterech probówek i dodać roztwór podstawowy salicylanu sodu o objętości odpowiednio: I – 0,04 ml, II – 0,16 ml, III – 0,3 ml i IV – 0,4 ml. Roztwory uzupełnić wodą do 1 ml, dodając kolejno 0,46 ml (I), 0,34 ml (II), 0,2 ml (III) i 0,1 ml (IV), i wymieszać. Następnie dodać po 5 ml odczynnika Trindera i ponownie wymieszać. Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$. Spektrofotometr wykalibrować uprzednio przy użyciu próbki ślepej.
- Próbkę ślepą przygotować poprzez zmieszanie 0,5 ml moczu (bez salicylanów) oraz 0,5 ml wody. Dodać 5 ml odczynnika Trindera i ponownie wymieszać.
- W programie Excel przygotować wykres krzywej wzorcowej przedstawiający zależność absorbancji jako funkcji stężenia salicylanów; $A = f(C)$. Wyznaczyć parametry prostej typu $y = ax$. Wyniki zapisać w protokole.

Tabela 4.1. Przygotowanie krzywej wzorcowej salicylanów w moczu

Roztwór [ml]	Próbka ślepa	I	II	III	IV
Mocz (bez salicylanów)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salicylan sodu [0,5 mg/ml]	0	0,04	0,16	0,3	0,4
Woda	0,5	0,46	0,34	0,2	0,1
Odczynnik Trindera	5	5	5	5	5

Oznaczenie salicylanów w moczu

0,5 ml moczu zebranego po jednorazowej dawce 300 mg kwasu acetylosalicylowego rozcieńczyć w próbówce z 0,5 ml wody i wymieszać. Dodać 5 ml odczynnika Trindera i ponownie wymieszać. Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda_{max} = 540$ nm i wyniki zapisać w protokole.

Obliczenie skumulowanej ilości salicylanów wydanych z moczem w przeliczeniu na kwas acetylosalicylowy oraz wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych

1. Obliczyć ilość salicylanów wydaloną z moczem w poszczególnych czasach w przeliczeniu na masę kwasu acetylosalicylowego X_{u_i} zgodnie ze wzorem:

$$X_{u_i} = \frac{A_i}{a} \cdot N \cdot V_i \cdot 1,125$$

gdzie: A_i – absorbancja próbki,

a – współczynnik kierunkowy krzywej wzorcowej,

N – rozcieńczenie próbki ($N = 2$),

V_i – objętość moczu oddanego w danym czasie,

1,125 – współczynnik równy stosunkowi mas molowych kwasu acetylosalicylowego (180,16 g/mol) i salicylanu sodu (160,11 g/mol).

Sumaryczną (kumulowaną) ilość kwasu acetylosalicylowego X_{u_t} wydaloną jako salicylan sodu w kolejnych n próbkach moczu oblicza się, sumując ilości X_{u_i} wydane do danego czasu t :

$$X_{u_t} = \sum_{i=1}^n X_{u_i}$$

Wszystkie wyniki obliczeń wpisać do protokołu.

2. Sporządzić wykres zależności $X_{u_t} = f(t)$ w programie Excel. Ustalić graniczną wartość skumulowanej ilości salicylanów w moczu w przeliczeniu na kwas acetylosalicylowy (X_{u_∞}).
3. Obliczyć wartości $\ln(X_{u_\infty} - X_{u_t})$ dla poszczególnych czasów t .
4. Sporządzić wykres zależności $\ln(X_{u_\infty} - X_{u_t}) = f(t)$, wykorzystując arkusz programu Excel. Na podstawie równania uzyskanej prostej, analogicznego do równania 4.7, obliczyć stałą szybkości eliminacji k_e salicylanów tworzących się z kwasu acetylosalicylowego. Następnie obliczyć biologiczny okres półtrwania salicylanów.
5. Na podstawie wartości X_{u_∞} obliczyć procent dawki kwasu acetylosalicylowego wyeliminowany drogą nerkową w formie salicylanów (f_u): $f_u = \frac{X_{u_\infty}}{D} \cdot 100\%$.

6. Wyznaczyć k_e i $t_{0,5}$ salicylanów w programie TopFit wg podanej niżej instrukcji.
7. Porównać wyniki wyznaczone za pomocą programów Excel i TopFit.

Instrukcja obsługi programu TopFit

1. Uruchomić program TopFit. Otwiera się strona MENU SELECTION, a na niej MAIN MENU, z którego należy wybrać opcję 4 – EDIT HEADER. Otwiera się strona HEADER, którą należy opisać, zmieniając okienka tabulatorem, a następnie wcisnąć klawisz F1 (Save).
2. Z MAIN MENU wybrać opcję 5 – EDIT DATA.
3. Otwiera się strona FORMULATION DATA. Po wciśnięciu klawisza spacji wybiera się sposób podania leku: wybrać Absorption (Tablet).
4. Wcisnąć klawisz F7. Otwiera się strona DOSING TABLE. Za pomocą spacji należy rozwinąć listę jednostek czasu i podanej dawki i sprawdzić, czy wartości są zgodne z danymi z analizowanego przykładu. W tabeli należy wpisać czas $t = 0$ i podaną dawkę leku, a następnie zatwierdzić klawiszem F1.
5. Wcisnąć klawisz F8. Otwiera się strona DATA SETS, na której jako matrycę należy ustawić „urine”; jako jednostkę mg/none. Wcisnąć klawisz F8.
6. Do tabeli należy wpisać czasy pobrania próbek moczu i skumulowane ilości salicylanów wydalone z moczem przeliczone na masę ASA.
7. Wcisnąć trzykrotnie F1, wrócić do MAIN MENU.
8. Z MAIN MENU wybrać opcję 8 – ENTER METHODS MENU, a z METHODS MENU opcję 2 – STANDARD COMPARTMENT MODELS.
9. Z SELECT DISPOSITION MODEL należy wybrać opcję 1 – ONE COMPARTMENT.
10. Ze STANDARD COMPARTMENT MODELS należy wybrać opcję 1 – SELECT DATA SETS.
11. Na stronie LIST SELECTION należy zaznaczyć myszą ► z lewej strony wyświetlonej pozycji. Wcisnąć F1.
12. Ze STANDARD COMPARTMENT MODEL wybrać opcję 6 – START ITERATION.
13. Na stronie RESULTS MENU wybrać opcję 2 – VIEW GRAPHICS. Przeanalizować przebieg wykresu z asystentem.
14. Po naciśnięciu F10 na ekranie ponownie pojawia się RESULTS MENU, z którego należy wybrać opcję 1 – VIEW RESULTS.
15. Otwiera się strona LIST SELECTION. Wcisnąć F1. Przeanalizować parametry farmakokinetyczne z asystentem. Wartości k_e i $t_{0,5}$ wpisać do protokołu.
16. Wcisnąć F10, wrócić do MAIN MENU. Wybrać opcję 0 – Exit TopFit.