

Ćwiczenie 3.

Ocena stężeń leku wolnego i związanego z białkami osocza z zastosowaniem metody ultrafiltracji

Część praktyczna

Aparatura i materiały

Zestaw HPLC Agilent Technologies 1220, faza stacjonarna: kolumna Eclipse Plus C₁₈ (4,6x100 mm; 3,5 μm), faza ruchoma: mieszanina 0,04M buforu KH₂PO₄ o pH 3,8 i acetonitrylu (51 : 49; v/v), probówki do ultrafiltracji AMICON ULTRA 500 μl; 10 kDa, probówki Easy CAP; 1,5 ml, wytrząsarka typu Minishaker MS1, wirówka EBA 12R, roztwory wzorcowe gliklazu 1μg/ml - 50μg/ml, 0,9% roztwór NaCl, zestaw pipet automatycznych .

Wykonanie

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stopnia wiązania gliklazu z białkami osocza.

Próbkę osocza pobrano od pacjenta diabetologicznego ze zdiagnozowaną cukrzycą typ 2, przyjmującego doustnie Diaprel MR w dawce 90 mg na dobę. Próbkę zebrano w 2h od podania leku i oznaczono stężenie całkowite gliklazu.

1. Ustawienie parametrów analizy HPLC

Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1ml/min

Ustawienie pracy detektora UV: 226 nm

Objętość nastrzyku: 50ul

Temperatura kolumny: temperatura pokojowa

Przygotowanie próbek do wyznaczenia stężenia leku wolnego metodą ultrafiltracji

Do 2 probówek ultrafiltracyjnych pobrać po 0.5 ml osocza pacjenta leczonego gliklazdem, I umieścić w górnej części naczynka Millipora, szczelnie zamknąć.

W celu oddzielenia leku wolnego od związanego probówki ultrafiltracyjne umieścić w wirówce, wirować zgodnie z następującymi warunkami: temperatura wirowania: 37°C, czas wirowania: 25 min, szybkość wirowania: 15000 rpm.

Z każdej probówki pobrać 50 μl uzyskanego filtratu i nastrzyknąć na kolumnę chromatograficzną w celu wyznaczenia stężenia leku wolnego.

1. Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej

Do probówek Easy CAP o pojemności 1,5 ml pobrać za pomocą pipet automatycznych odpowiednie objętość roztworów wzorcowych gliklazydu i roztworu 0,9% NaCl, według danych podanych poniżej:

	1	2	3	4	5	6
Objętość roztworu wzorcowego gliklazydu	50 µl (1 µg/ml)	50 µl (2,5 µg/ml)	50 µl (5 µg/ml)	50 µl (10 µg/ml)	50 µl (20 µg/ml)	50 µl (50 µg/ml)
Objętość roztworu 0,9% NaCl	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl

Probówki staranie zamknąć, wymieszać przez 30 sec przy użyciu wytrząsarki.

2. Analiza HPLC

Przygotowane próbki nastrzykiwać kolejno w objętości 50 µl na kolumnę chromatograficzną.

Po każdym nastrzyku starannie przepłukać strzykawkę roztworem metanolu.

Analizę chromatograficzną prowadzić każdorazowo 5 minut.

Po zakończeniu analizy odczytać pole powierzchni uzyskanego piku.

3. Przygotowanie próbek do wyznaczenia stężenia leku wolnego metodą ultrafiltracji

Do 2 probówek ultrafiltracyjnych pobrać po 0.5 ml osocza pacjenta leczonego gliklazydem, I umieścić w górnej części naczynka Millipora, szczelnie zamknąć.

W celu oddzielenia leku wolnego od związanego probówki ultrafiltracyjne umieścić w wirówce, wirować zgodnie z następującymi warunkami: temperatura wirowania: 37°C, czas wirowania: 25 min, szybkość wirowania: 12000 rpm.

Z każdej probówki pobrać 50 µl uzyskanego filtratu i nastrzyknąć na kolumnę chromatograficzną w celu wyznaczenia stężenia leku wolnego.

4. Obliczenia

Wyznaczenie równania krzywej wzorcowej

Wyznaczyć stężenie gliklazydu w analizowanych próbkach.

Za pomocą programu Microsoft Excel wykreślić krzywą wzorcową jako zależności pola powierzchni piku glikozydu od stężenia leku w próbce.

Za pomocą programu Microsoft Excel wyznaczyć parametry prostej, sprawdzając istotność wyrazu wolnego.

Obliczenie stężenia leku wolnego oraz stopnia wiązania leku z białkami osocza

Na podstawie równania krzywej wzorcowej, obliczyć stężenie leku wolnego w próbkach poddanych ultrafiltracji. Uzyskaną wartość z dwóch badanych próbek uśrednić, podając równocześnie odchylenie standardowe.

Znając całkowite stężenie leku oznaczone u pacjenta oraz stężenie leku wolnego wyznaczona za pomocą metody ultrafiltracji obliczyć z różnicy stężenie leku związanego z białkiem a następnie wyznaczyć ułamek oraz stopień leku związanego z białkami osocza.