

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), próbówki do ultrafiltracji AMICON ULTRA 500 μl; 10 kDa, próbówki Easy CAP; 1,5 ml, wytrząsarka typu Minishaker MS1, wirówka EBA 12R, roztwory wzorcowe gliklazu 1 μg/ml - 50 μg/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

Przed przystąpieniem do analizy ustawić w aparacie HPLC następujące parametry:

- ✓ Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1ml/min
- ✓ Długość fali : 226 nm
- ✓ Objętość nastrzyku: 50ul
- ✓ Temperatura kolumny: temperatura pokojowa

2. Przygotowanie próbek do wyznaczenia stężenia leku wolnego metodą ultrafiltracji

- ✓ Do 2 próbek ultrafiltracyjnych pobrać po 0.5 ml osocza pacjenta leczonego gliklazem i umieścić w górnej części naczynka Millipora, szczelnie zamknąć.
- ✓ W celu oddzielenia leku wolnego od związanego, próbówki ultrafiltracyjne umieścić w wirówce, wirować zgodnie z następującymi warunkami: temperatura wirowania: 25°C, czas wirowania: 15 min, szybkość wirowania: 12000g.
- ✓ Z każdej próbówki pobrać 50 μl uzyskanego filtratu i nastrzyknąć na kolumnę chromatograficzną w celu wyznaczenia stężenia leku wolnego.

3. Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej

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

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

Probówki starannie zamknąć i wymieszać przy użyciu wytrząsarki.

4. Analiza HPLC

- ✓ Przygotowane próbki nastrzykiwać kolejno w objętości 50 μ l 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.

5. Obliczenia

Wyznaczenie równania krzywej wzorcowej

- ✓ Wyznaczyć stężenie gliklazydu w analizowanych próbkach.
- ✓ Za pomocą programu Microsoft Excel wykreślić krzywą wzorcową jako zależności pola powierzchni piku gliklazydu od stężenia leku w próbce.
- ✓ Za pomocą programu Microsoft Excel wyznaczyć parametry prostej, sprawdzając istotność wyrazu wolnego.
- ✓ Na podstawie wyznaczonego równania obliczyć stężenia oznaczone, ocenić dokładność metody

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.
- ✓ Znając całkowite stężenie leku oznaczone u pacjenta oraz stężenie leku wolnego wyznaczone za pomocą metody ultrafiltracji obliczyć z różnicy stężenie leku

związanego z białkiem, a następnie wyznaczyć ułamek oraz stopień leku związanego z białkami osocza.