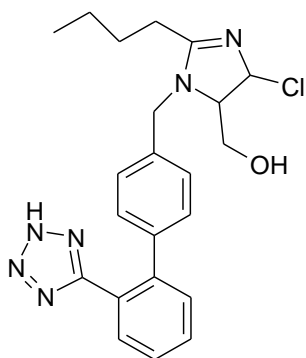
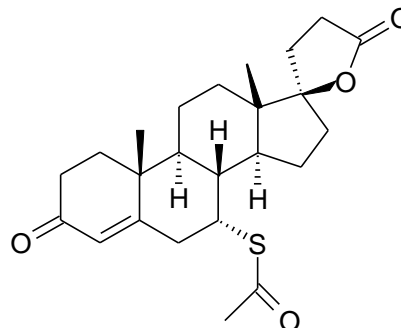


Ćwiczenie: Oznaczenie ilościowe czterech substancji leczniczych w surowicy metodą HPLC-DAD



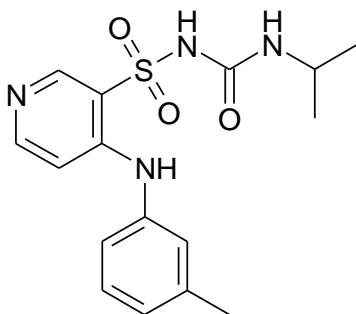
Losartan

(4-chloro-1-butyl 2-[[2'-(1H-tetrazol-5-ilo)bifenył-4-ilo]metylo]-1H-imidazol-5-ilo) metanol



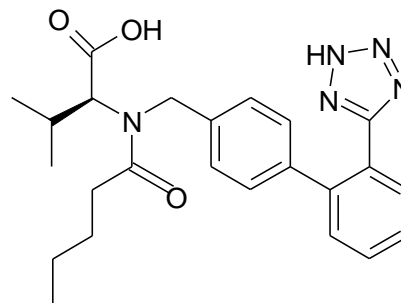
Spironolaktone

7 α -acetylotio-3-keto-17 α -pregn-4-ene-21,17-karbolaktone



Torasemid

N-[(izopropylamino)karbonylo]-4-[(3-metylofenylo)amino]pirydno-3-sulfonoamid



Valsartan

kwask (S)-3-metylo-2-(N-[[2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-ilo)bifenył-4-ilo]metylo]pentanamido)butanowy

Analiza metodami chromatograficznymi leków w materiał biologiczny wymaga odpowiedniego przygotowania próbki, które ma na celu uwolnienie leku z miejsc wiążących w białkach, wyizolowanie wolnego leku, usunięcie białek i innych składników interferujących oraz zatężenie próbki w celu zwiększenia czułości oznaczenia. Ponadto, procedura przygotowania próbek obejmuje, obok izolacji związków badanych z materiału biologicznego, często także ich derywatyzację w celu zwiększenia oznaczalności.

Wybór odpowiedniej metody izolacji związków z materiału biologicznego uzależniony jest od właściwości fizykochemicznych badanych substancji, a zwłaszcza od ich polarności, a także od rodzaju materiału biologicznego, z którego lek ma być wyodrębniony. Najczęściej

wykorzystuje się ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe. Bezpośrednia analiza chromatograficzna leków w materiale biologicznym jest możliwa bardzo rzadko i tylko w szczególnych przypadkach. Na ogół próbki wymagają co najmniej odbiałczenia.

Typowy sposób odbiałczania polega na zmieszaniu 1 objętości osocza lub surowicy z 3 objętościami roztworów kwasów (6% kwas chlorowy (VII), kwas trójchlorooctowy) lub rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą (etanol, metanol, acetonitryl, aceton). Po dokładnym wymieszaniu i odczekaniu kilku minut powstały osad odwirowuje się i próbkę klarownego nadsącza wprowadza na kolumnę HPLC. Można w ten sposób usunąć z próbki do 99% białek. Wadą tej metody jest rozcieńczenie próbki.

Do najczęściej stosowanych grup leków stanowiących podstawę leczenia choroby nadciśnieniowej należą: blokery receptorów angiotensynowych (np. losartan, valsartan), blokery enzymu konwertującego angiotensynę (I-ACE) oraz substancje, różne pod względem struktury chemicznej, należące do grupy leków o działaniu diuretycznym (np. torasemid, spironolakton). Stosowane w terapii nadciśnienia tętniczego połączenia to: inhibitor ACE i diuretyk, antagonist receptoru angiotensyny II i diuretyk oraz możliwe jest zastosowanie dwóch leków o działaniu diuretycznym.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z aparaturą do HPLC i przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej losartanu, torasemidu, spironolaktonu i valsartanu w surowicy oraz obliczenie wybranych chromatograficznych parametrów retencyjnych. Ćwiczenie ma również na celu zapoznanie z przygotowaniem próbki do analizy.

Roztwory:

Roztwory wzorcowe losartanu, torasemidu, spironolaktonu i valsartanu.

Odczynniki:

- Metanol do HPLC,
- Acetonitryl do HPLC
- Bufor fosforanowy o pH 3,0.

Aparatura

- Chromatograf cieczowy LaChrom Elite wyposażony w pompę tłokową, degazer, autosampler, kolumna ACE C18 100A, Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Scotland) – o średnicy ziaren 5 μm , długości 250 mm i średnicy wewnętrznej

4,6 mm wyposażona w prekolumnę, detektor DAD, komputerowy system rejestracji i przetwarzania danych.

- Wirówka Sigma 1-14K.

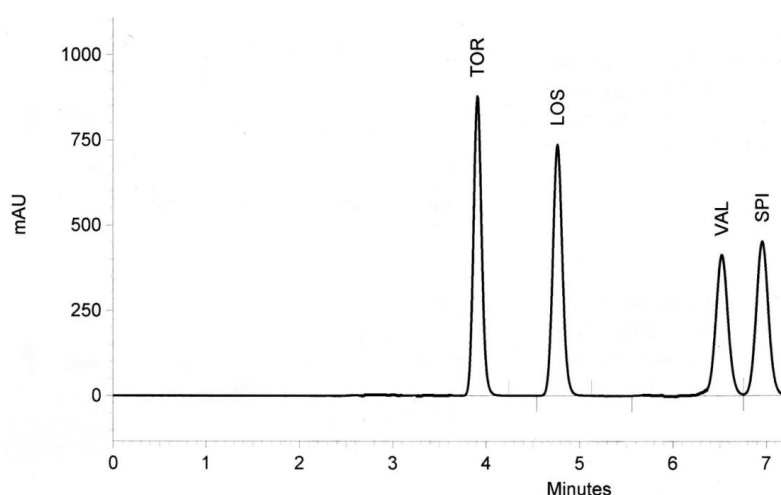
Przygotowanie próbki do badań.

Do 100 μ l surowicy wzbogaconej badanymi lekami, dodać 1,5 mL metanolu (odczynnik odbiałczający), wytrząsać przez ok. 1 minutę i odstawić na 10 min. Następnie wirować 4 minuty przy 4500 rpm. Pobrać za pomocą strzykawki nadsącz, przesączyć przez sączek strzykawkowy o wielkości porów 0,45 μ m i umieścić w fiolce zakręcanej korkiem zaopatrzonej w septę. Próbkę podpisać.

Warunki chromatograficzne:

- faza ruchoma: bufor fosforanowy o pH 3,0 - acetonitryl - metanol (30 : 20 : 50 v/v/v),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 mL/min,
- temperatura kolumny – 25°C,
- ciśnienie na wlocie kolumny do 125 bar,
- objętość próbki dozowanej na kolumnę 10 μ L,
- detekcja spektrofotometryczna przy 230 nm,
- Czas analizy: 8 min.

Przykładowy chromatogram rozdzielania badanych związków zamieszczono poniżej.



Analiza jakościowa i ilościowa

Nastrzyknąć na kolumnę roztwory wzorcowe i badane. Po zarejestrowaniu chromatogramów dla roztworów wzorcowych i badanych, porównując uzyskane wartości t_R pików oraz widma absorpcji dokonać identyfikacji składu próbki badanej.

Na podstawie wielkości pól powierzchni pików substancji wzorcowych (o znanym stężeniu) i składników próbki badanej, wykorzystując kalibrację jednopunktową obliczyć ich stężenie w nadsączu.

$$C_b = \frac{P_b \cdot C_w}{P_w}$$

C_b – stężenie badanego składnika [mg/mL]

P_b – powierzchnia badanego składnika

P_w – powierzchnia wzorca

C_w – stężenie wzorca [mg/mL].

Następnie biorąc po uwagę sposób przygotowania próbki, obliczyć stężenie leków w otrzymanej surowicy.

Korzystając z poniższych wzorów dla zidentyfikowanych w próbce związków obliczyć:

- a) współczynnik retencji **k**,
- b) liczbę pól teoretycznych **N** (przy założeniu, że piki są symetryczne),
- c) dla każdej pary związków obliczyć:
 - współczynnik rozdzielania **α**
 - rozdzielczość pików **R_s** .

Nr próbki	Związek	t_R [min]	w_b [min]	N	k	R_s	α	Stężenie [mg/mL]

t_R – czas retencji

w_b – szerokość przy podstawie piku

t_M – czas retencji substancji nie zatrzymywanej wyrażony w minutach

$$t_M = \frac{L}{u}$$

L – długość kolumny w cm

u – prędkość liniowa fazy ruchomej 0,17 cm/s

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

k_2 – współczynnik retencji związku silniej zatrzymwanego w kolumnie

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$$

t_{R1} – czas retencji substancji słabiej zatrzymywanej w kolumnie

t_{R2} – czas retencji substancji silniej zatrzymywanej w kolumnie

w_{b1} – szerokość przy podstawie piku 1 w minutach

w_{b2} – szerokość przy podstawie piku 2 w minutach.