

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELCA KOMPARA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELCA KOMPARA

UPORABA RAVNOTEŽNE DIALIZE, ULTRAFILTRACIJE IN
ULTRACENTRIFUGIRANJA ZA DOLOČANJE VEZAVE UČINKOVIN NA
PLAZEMSKO ALBUMINE

USE OF EQUILIBRIUM DIALYSIS, ULTRAFILTRATION AND
ULTRACENTRIFUGATION FOR DETERMINING THE PLASMA PROTEIN
BINDING OF DRUGS

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm..

Zahvala

Najlepše se zahvaljuejmizr. prof. dr. Mojci Kerec Kos, mag. farm. za strokovno svetovanje, pomoč, potrpežljivost in spodbudo pri izdelavi magistrske naloge. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za praktične nasvete pri izvajanju eksperimentalnega dela naloge.

Posebna zahvala gre tudi moji družini za brezpogojno podporo in razumevanje med pisanjem magistrske naloge in tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm..

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	PORAZDELITEV	1
1.2	VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA PLAZEMSKÉ PROTEINE	2
1.3	PLAZEMSKI PROTEINI	3
1.3.1	ALBUMINI.....	4
1.4	METODE LOČEVANJA PROSTE IN VEZANE UČINKOVINE.....	4
1.4.1	RAVNOTEŽNA DIALIZA	4
1.4.2	ULTRAFILTRACIJA	6
1.4.3	ULTRACENTRIFUGIRANJE	7
1.4.4	PREDNOSTI IN SLABOSTI POSAMEZNIH METOD.....	8
1.5	PARAMETRI IN KINETIKA VEZAVE UČINKOVIN NA PLAZEMSKÉ PROTEINE	9
1.5.1	AFINITETNA KONSTANTA.....	9
1.5.2	ŠTEVILO VEZAVNIH MEST IN STOPNJA VEZAVE.....	10
1.5.3	ŠTEVILO RAZREDOV VEZAVE.....	10
1.5.4	SCATCHARDOV DIAGRAM.....	11
1.6	PREISKOVANI UČINKOVINI	11
1.6.1	PARACETAMOL.....	11
1.6.2	IBUPROFEN.....	13
2	NAMEN DELA.....	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	MATERIALI.....	16
3.1.1	PREISKOVANI UČINKOVINI	16
3.1.2	PLAZEMSKI PROTEINI	16
3.1.3	OSTALI REAGENTI IN TOPILA	16
3.1.4	APARATURE IN OSTALI PRIBOR	16
3.2	METODE.....	17
3.2.1	PRIPRAVA RAZTOPIN	17
3.2.2	RAVNOTEŽNA DIALIZA	23
3.2.3	ULTRAFILTRACIJA	26
3.2.4	ULTRACENTRIFUGIRANJE	29
3.2.5	HPLC ANALIZA.....	31
3.2.6	STATISTIČNA ANALIZA	32
4	REZULTATI.....	33
4.1	PARACETAMOL.....	33

4.1.1	UMERITVENA PREMICA BREZ ALBUMINOV	33
4.1.2	UMERITVENA PREMICA S KONSTANTNO KONCENTRACIJO ALBUMINOV	34
4.1.3	RAVNOTEŽNA DIALIZA	35
4.1.4	ULTRAFILTRACIJA	39
4.1.5	ULTRACENTRIFUGIRANJE	40
4.1.6	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	42
4.2	IBUPROFEN.....	43
4.2.1	UMERITVENA PREMICA.....	43
4.2.2	RAVNOTEŽNA DIALIZA	44
4.2.3	ULTRAFILTRACIJA	48
4.2.4	ULTRACENTRIFUGIRANJE	49
4.2.5	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	51
5	RAZPRAVA	53
5.1	PARACETAMOL.....	53
5.2	IBUPROFEN.....	59
6	SKLEP.....	64
7	LITERATURA IN VIRI	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Porazdelitev učinkovine v tkivo.....	3
Slika 2: Scatchardov diagram.....	11
Slika 3: Strukturna formula paracetamola (12).....	12
Slika 4: Strukturna formula ibuprofena (15).....	13
Slika 5: HPLC kromatogram dializirane raztopine paracetamola.....	19
Slika 6: HPLC kromatogram dializirane raztopine albuminov.....	19
Slika 7: Celica za ravnotežno dializo.....	24
Slika 8: Polnjenje zunanega valja z vzorcem (21).....	26
Slika 9: Zunanost in notranost centrifuge za izvedbo ultrafiltracije.....	27
Slika 10: Visokokakovostna ultracentrifuga.....	29
Slika 11: Rotor ultracentrifuge napolnjen z epruветami za ultracentrifugiranje.....	29
Slika 12: HPPLC sistem Agilent 1100 Series.....	31
Slika 13: Primer umeritvene premice paracetamola.....	33
Slika 14: Umeritvena premica- paracetamol+albumini.....	34
Slika 15: Primer umeritvene premice ibuprofena.....	43
Slika 16: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ravnotežni dializi.....	56
Slika 17: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ultrafiltraciji.....	57
Slika 18: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ultracentrifugiranju.....	58
Slika 19: Vezava paracetamola na humane albumine.....	58
Slika 20: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ravnotežni dializi.....	61
Slika 21: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ultrafiltraciji.....	61
Slika 22: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ultracentrifugiranju.....	62
Slika 23: Vezava ibuprofena na humane albumine.....	62

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prednosti in slabosti uporabljenih metod za določanje vezave učinkovin na plazemske proteine.....	8
Preglednica II: Priprava standardnih raztopin paracetamola.....	19
Preglednica III: Priprava standardnih raztopin paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov.....	20
Preglednica IV: Priprava standardnih raztopin ibuprofena.....	20
Preglednica V: Priprava albuminskih raztopin s paracetamolom.....	22
Preglednica VI: Priprava albuminskih raztopin z ibuprofenom.....	22
Preglednica VII: Umeritvena premica - paracetamol.....	33
Preglednica VIII: Primerjava naklonov (k) enačb posameznih umeritvenih premic paracetamola.....	34
Preglednica IX: Umeritvena premica - paracetamol+albumini.....	35
Preglednica X: Primerjava enačb posameznih umeritvenih premic paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov.....	35
Preglednica XI: Stabilnost paracetamola.....	35
Preglednica XII: Vezava paracetamola na sistem za ravnotežno dializo.....	36
Preglednica XIII: Vezava paracetamola na plazemske albumine.....	38
Preglednica XIV: Vezava paracetamola na sistem za ultrafiltracijo.....	39
Preglednica XV: Odziv slepih albuminskih raztopin (AUCsl) po ultrafiltraciji.....	40
Preglednica XVI: Vezava paracetamola na plazemske albumine.....	40
Preglednica XVII: Vezava paracetamola na epice za ultracentrifugiranje.....	41
Preglednica XVIII: Odziv slepih albuminskih raztopin(AUCsl) po ultracentrifugiranju.....	41
Preglednica XIX: Vezava paracetamola na plazemske albumine.....	41
Preglednica XX:Odvisne spremenljivke.....	42
Preglednica XXI:Rezultati Games-Howell testa.....	42
Preglednica XXII: Umeritvena premica- ibuprofen.....	44
Preglednica XXIII: Primerjava enačb posameznih umeritvenih premic ibuprofena.....	44
Preglednica XXIV: Stabilnost ibuprofena.....	44
Preglednica XXV: Vezava ibuprofena na sistem za ravnotežno dializo.....	45
Preglednica XXVI: Vezava ibuprofena na plazemske albumine.....	47
Preglednica XXVII: Vezava ibuprofena na sistem za ultrafiltracijo.....	48
Preglednica XXVIII: Vezava ibuprofena na plazemske albumine.....	49
Preglednica XXIX: Vezava ibuprofena na epice za ultracentrifugiranje.....	50
Preglednica XXX: Vezava ibuprofena na plazemske albumine.....	51
Preglednica XXXI: Odvisne spremenljivke.....	51
Preglednica XXXII: Rezultati Games-Howell testa.....	52
Preglednica XXXIII: Vezava na albumine.....	52
Preglednica XXXIV: Tukey.....	52

Povzetek

Del zdravilne učinkovine, ki se po vnosu v telo porazdeli po telesu, se lahko veže tudi na proteine v plazmi in tkivih. Pri vezavi na proteine v plazmi nastane kompleks zdravilna učinkovina-plazemski protein, ki zaradi svoje velikosti ne more prehajati sten kapilar in ima zato omejeno porazdelitev po telesu. Običajno so ti kompleksi tudi farmakološko neaktivni. Poznavanje vezave zdravilne učinkovine na plazemske albumine je pomembno, ko se odločamo za primeren odmerek zdravilne učinkovine pri zdravljenju.

V nalogi smo z ravnotežno dializo, ultrafiltracijo in ultracentrifugiranjem preučili vezavo paracetamola in ibuprofena na humane albumine. Izbrana analgetika imata zelo različen odstotek vezave. Poskuse smo izvajali z albuminskimi raztopinami, ki so vsebovale zdravilno učinkovino v treh različnih koncentracijah znotraj terapevtskega območja in konstantno koncentracijo albuminov, s katero smo posnemali fiziološke pogoje. Spremljali smo tudi stabilnost oz. izgubo učinkovin pri izbranih eksperimentalni pogojih. Koncentracijo paracetamola in ibuprofena v vzorcih smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) analizo z UV detekcijo.

Ugotovili smo, da sta obe zdravilni učinkovini stabilni pri pogojih ravnotežne dialize, se pa nekaj učinkovine izgubi z vezavo na sisteme. To izgubo smo upoštevali pri nadaljnih izračunih vezave učinkovine na humane albumine. Upoštevanje rezultatov vseh treh metod je povprečen odstotek vezave paracetamola na humane albumine 13.74% in ibuprofena 95.11%. Izbira metode (ravnotežna dializa, ultrafiltracija in ultracentrifugiranje) značilno vpliva na določitev vezave izbranih učinkovine na humane albumine, medtem ko testirane koncentracije zdravilnih učinkovin nimajo značilnega vpliva na vezavo na albumine.

Od vseh uporabljenih metod je ravnotežna dializa najbolj zamudna, saj je potrebno veliko časa za pripravo dializnih celic in vzpostavitev ravnotežja. Nasprotno pa sta ultrafiltracija in ultracentrifugiranje precej hitri metodi. Velika prednost ultracentrifugiranja je tudi ta, da se izognemo vplivu membrane na dobljene rezultate.

Ključne besede: paracetamol, ibuprofen, plazemski albumini, ravnotežna dializa, ultrafiltracija, ultracentrifugiranje

Abstract

A part of active substance, which is distributed in a body after intake, can also bind with protein in plasma and tissue. When protein binding happens in plasma, a complex active substance-plasma protein occurs, which cannot pass through capillary walls due to its size and thus has a limited distribution all over body. Usually these complexes are pharmacologically inactive. Knowledge of binding of active substance on plasma albumins is important, especially when we are deciding on appropriate dosage of active substance for treatment.

In our task, we studied binding of paracetamol and ibuprofen on human albumins with equilibrium dialysis, ultrafiltration and ultracentrifugation. Chosen analgesics have a very different percentage of binding. We were carrying out experiments with albumin solutions that contained active substance in three different concentrations inside the therapeutic area and unchangeable concentration of albumins that we imitated physiological conditions with. We also monitored stability and loss of active ingredients with chosen experimental conditions. We were determining concentration of paracetamol and ibuprofen in samples with high performance liquid chromatography (HPLC) analysis with UV detection.

We have found out that both active substances are stable at conditions of an equilibrium dialysis, but some active ingredient gets lost with binding on systems. We complied with this loss at further calculations of binding of active ingredient on human albumins. Considering the results of all three methods, the average percentage of paracetamol binding on human albumins is 13.74% and ibuprofen is 95.11%. The choice of a method (an equilibrium dialysis, ultrafiltration and ultracentrifugation) can influence on the determination of binding the chosen substance on human albumins while the tested concentrations of active substances do not have a typical influence on the albumin binding. The equilibrium dialysis is the most time-consuming of all the procedures we used, because it takes a lot of time to prepare dialysis cells and to establish balance. On the contrary, the ultrafiltration and ultracentrifugation are considerably quick methods. A great advantage of ultracentrifugation is also that we can avoid the influence of membrane on the results we get.

Key words: paracetamol, ibuprofen, human albumins, equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation

1 UVOD

Zdravilno učinkovino vnesemo v telo v obliki farmacevtske oblike. Po vnosu učinkovine je le-ta podvržena farmakokinetičnim procesom, ki si teoretično sledijo v naslednjem zaporedju: sproščanje, absorpcija, porazdelitev, metabolizem in izločanje. Posamezni procesi pogosto sovpadajo. V angleščini procese poimenujejo s kratico LADME (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination). V nadaljevanju se bomo osredotočili le na proces porazdelitve s poudarkom na vezavi zdravilnih učinkovin na plazemske albumine.

1.1 PORAZDELITEV

Zdravilna učinkovina se s sistemskim krvnim obtokom porazdeli po telesu. Obseg porazdelitve je odvisen od lastnosti zdravilne učinkovine in karakteristik organizma (npr. prekrvavitev organov). Zdravilna učinkovina se s krvjo prenese do tarčnega mesta, kjer učinkuje in tudi do drugih tkiv, kjer lahko povzroči neželene učinke. Molekule zdravilne učinkovine lahko iz materine krvi preidejo preko posteljice tudi v plodovno kri in tako vplivajo na razvijajoči se plod. V mlečnih žlezah se lahko zdravilna učinkovina izloči tudi v mleko doječih mater. Del zdravilne učinkovine se lahko veže na proteine v plazmi in tkivih. Lipofilne zdravilne učinkovine se prednostno nalagajo v maščevju in od tam počasi izločajo iz telesa (1).

Zdravilna učinkovina preide iz krvi preko sten kapilar v medcelično tekočino, ki jo skupaj s krvno plazmo uvrščamo med zunajcelično tekočino. V nadaljevanju lahko učinkovina preko celične membrane difundira v notranjost celic, v t.i. znotrajcelično tekočino. Porazdelitev zdravilnih učinkovin poteka hitro. Prehod učinkovin preko celičnih membran je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine in membrane. Na splošno velja, da lipofilne zdravilne učinkovine prehajajo celične membrane hitreje kot polarne in majhne molekule hitreje od večjih. Kompleks zdravilna učinkovina-plazemski protein je praviloma prevelik, da bi prešel preko celične membrane ali preko stene kapilar (1).

Prenos zdravilne učinkovine iz krvi v tkivo poteka s pasivno difuzijo in s hidrostatskim tlakom. Pasivna difuzija je proces s katerim potujejo molekule zdravilne učinkovine v smeri koncentracijskega gradienta, to je iz območja z visoko koncentracijo zdravilne učinkovine v območje z nizko koncentracijo zdravilne učinkovine.

Hidrostatski tlak predstavlja gradient tlaka med kapilarami in tkivom. Odgovoren je za prehod vodotopnih zdravilnih učinkovin v okoliška tkiva in za glomerulno filtracijo v ledvicah. Na venski strani kapilar, kjer je tlak manjši kot v okoliškem tkivu, lahko molekule zdravilne učinkovine preidejo nazaj v plazmo (1).

Porazdelitev zdravilnih učinkovin je lahko perfuzijsko ali difuzijsko omejena. Za zdravilne učinkovine, pri katerih je hitrost porazdelitve po telesu odvisna od prekrvavljenosti posameznih organov, pravimo, da imajo perfuzijsko omejeno porazdelitev. To so predvsem lipofilne zdravilne učinkovine, za katere je značilna dobra difuzija preko celične membrane. Najbolje so prekrvavljena pljuča, dobro tudi endokrine žleze, ledvica, jetra in srce. Maščevje pa ima najslabši krvni pretok. Tudi mišice so v mirujočem stanju slabo prekrvavljene, vendar se njihova prekrvavljenost zelo poveča s fizično aktivnostjo. Čas vzpostavitve porazdelitvenega ravnotežja za posamezno tkivo je odvisen tudi od velikosti tkiva in afinitete zdravilne učinkovine za tkivo. Večji kot je volumen organa, dlje časa poteka porazdeljevanje, ker lahko sprejme več zdravilne učinkovine (1).

Pri difuzijsko omejeni porazdelitvi pretok krvi ni omejujoč faktor, ampak imajo pomembno vlogo fizikalno-kemijske lastnosti zdravilne učinkovine (molekulska masa, naboj, lipofilnost). Na tak način se porazdeljujejo hidrofilne zdravilne učinkovine, ki slabo prehajajo preko celične membrane (1).

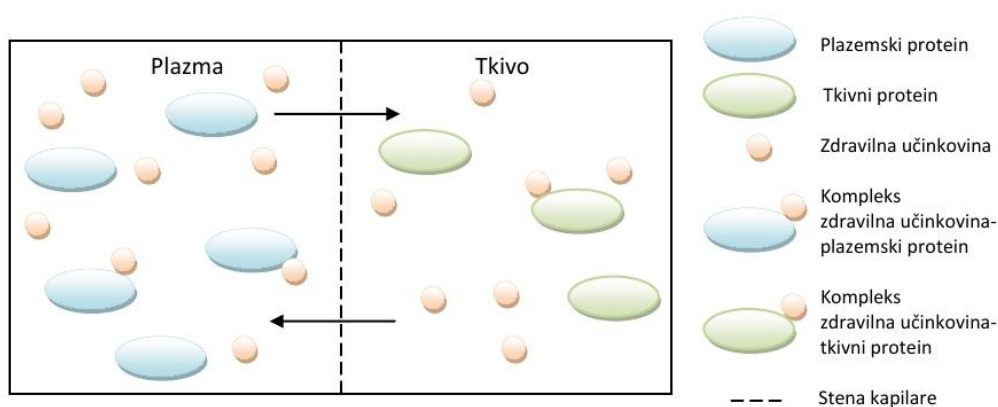
Stena kapilar je sestavljena iz plasti ploščatih endotelijskih celic, ki ležijo na bazalni membrani. Glede na prepustnost membrane ločimo tri vrste krvnih kapilar in sicer kontinuirane, fenestrirane in sinusoidne kapilare. Kontinuirane kapilare so najmanj prepustne. Nahajajo se tam, kjer mora biti vstop snovi v tkiva najbolj kontroliran (npr. v centralnem živčnem sistemu). Fenestrirane kapilare imajo med endotelijskimi celicami posamezne odprtine - fenestre. Zdravilne učinkovine te kapilare mnogo lažje prehajajo, ker je tu ovira za prehod samo še bazalna membrana. Nahajajo se v organih, kjer je smiselna večja prepustnost (npr. v ledvicah zaradi glomerulne filtracije in v prebavnem traktu zaradi absorpcije hranil). Sinusoidne kapilare pa niso niti v celoti obdane z bazalno membrano. V membrani se pojavljajo zelo velike odprtine, ki omogočajo prehod tudi velikim molekulam. Nahajajo se v jetrih, kjer poteka metabolizem in je potrebna izmenjava tudi večjih molekul (1).

1.2 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA PLAZEMSKÉ PROTEINE

Številne zdravilne učinkovine interagirajo s plazemskimi ali tkivnimi proteini in ostalimi makromolekulami (npr. melaninom, DNA). Vezava zdravilne učinkovine na proteine je

lahko reverzibilen ali ireverzibilen proces. Pri ireverzibilni vezavi se zdravilna učinkovina veže na protein z močnimi kovalentnimi vezmi. Velika večina zdravilnih učinkovin pa se veže na proteine reverzibilno. Z njimi tvori šibkejšje kemijske vezi kot so vodikove vezi ali van der Waalsove sile (1).

V farmakokinetiki je reverzibilna vezava zdravilne učinkovine na plazemske proteine poglavitnega pomena. Komplex zdravilna učinkovina-plazemski protein namreč zaradi svoje velikosti ne more prehajati sten kapilar in ima zato omejeno porazdelitev po telesu. Običajno je tudi farmakološko neaktiven. Prosta zdravilna učinkovina pa je majhna, zlahka prehaja membrane in je terapevtsko aktivna (1) (slika 1).



Slika 1: Porazdelitev učinkovine v tkivo

1.3 PLAZEMSKI PROTEINI

V plazmi je približno 1400 različnih proteinov. Mnogi od teh so prisotni le ob določenih fizioloških oz. patoloških stanjih. Normalna skupna koncentracija proteinov v plazmi znaša od 65 do 80 g/L. Plazemski proteini imajo v organizmu različne pomembne funkcije: vzdržujejo koloidni osmotski tlak, viskoznost in kislinsko-bazično ravnotežje v krvi, pomembni so tudi za prenos ionov in nevdotopnih snovi po krvi. Prav tako sodelujejo v sistemu komplementa, so protitelesa, faktorji strjevanja krvi, encimi, hormoni, vir aminokislin, strukturni proteini ter receptorji za neurotransmiterje in hormone (2, 3). Večina plazemskih proteinov se sintetizira v jetrih in potem prenese v krvni obtok. S krvjo krožijo po telesu in lahko prehajajo iz krvi tudi v zunajcelično tekočino. Razgradijo se v jetrih (4).

1.3.1 ALBUMINI

Albumini so proteini z molekulsko maso 66,3 kDa. Predstavljajo največji delež plazemskih proteinov. Zaradi visoke plazemske koncentracije in relativno majhne velikosti je albumin poglaviten protein tudi v medceličnini, cerebrospinalni tekočini, urinu in plodovnici. Približno 60% celotnega albumina v telesu se nahaja ekstravaskularno. Albumin v svoji strukturi nima stranske verige ogljikovih hidratov, vendar je vseeno dobro topen v vodi in sicer zaradi negativnega naboja pri fiziološkemu pH-ju (4). Albumin se sintetizira v jetrih, razgradi pa se s pinocitozo v vseh tkivih. Njegov normalni razpolovni čas izločanja je 15 do 19 dni. Referenčne vrednosti za albumin v plazmi znašajo od 32 do 55 g/L (2,4).

Primarna funkcija albumina je vzdrževanje koloidno-osmotskega tlaka. Pomemben je tudi za vezavo in prenos številnih molekul kot so proste maščobne kisline, fosfolipidi, kovinski ioni, aminokisline, bilirubin, hormoni- kortizon, aldosteron, tiroksin in triptofan ter zdravilne učinkovine. Preko elektrostatskih in hidrofobnih interakcij veže predvsem kisle zdravilne učinkovine (salicilate, peniciline,...) (1, 4).

1.4 METODE LOČEVANJA PROSTE IN VEZANE UČINKOVINE

Obstajajo številne metode za preučevanje vezave zdravilne učinkovine na plazemske proteine (1). V eksperimentalnem delu naloge se bomo ukvarjali z ravnotežno dializo, ultrafiltracijo in ultracentrifugiranjem

1.4.1 RAVNOTEŽNA DIALIZA

Ravnotežna dializa poteka v celici sestavljeni iz dveh prostorov enakih volumnov, ki ju razmejuje polprepustna membrana. Na eni strani membrane se nahaja plazma z zdravilno učinkovino, na drugi pa pufer. Polprepustna membrana prepušča samo molekule, ki so po velikosti manjše od membranskih por. Prosta učinkovina lahko prehaja preko polprepustne membrane, prehod kompleksa zdravilna učinkovina-plazemski protein pa zaradi velikosti ni mogoč. To omogoča ločitev proste učinkovine in učinkovine vezane na plazemske proteine. Dializa poteka do vzpostavitve ravnotežja, ko se koncentracija zdravilne učinkovine v pufru izenači s koncentracijo proste zdravilne učinkovine v plazmi. Čas, ki je potreben, da se vzpostavi ravnotežje, določimo eksperimentalno (5).

Na hitrost ravnotežne dialize vplivajo naslednji dejavniki:

- Temperatura:

Dializa običajno poteka pri 37°C, saj želimo posnemati fiziološke pogoje. Temperatura vpliva na hitrost gibanja molekul. Pri višjih temperaturah se prej vzpostavi ravnotežje, ker se molekule hitreje gibljejo.

- Vrsta membrane:

Membrane se med seboj razlikujejo po sestavi in velikosti membranskih por. Vrsto membrane izberemo glede na uporabljeno zdravilno učinkovino in plazemske proteine. Želimo, da izbrana zdravilna učinkovina prehaja skozi pore membrane, proteini pa ne. Večja velikost membranskih por pomeni, da se ravnotežje prej vzpostavi.

- Razmerje med površino polprepustne membrane, kjer poteka dializa in volumnom dializne celice:

Večje kot je razmerje, hitreje bo prišlo do ravnotežja med koncentracijama, saj ima zdravilna učinkovina na razpolago večjo površino za prehod preko membrane.

- Mešanje:

Z mešanjem preprečimo, da bi se proteini nabrali ob membrani in ovirali prehod zdravilne učinkovine preko membrane. S tem zmanjšamo čas potreben za vzpostavitev ravnotežja (6).

Po vzpostavitvi ravnotežja analiziramo puferske dializate in izračunamo odstotek vezave zdravilne učinkovine na proteine plazme. Na dobljene rezultate lahko vplivajo številni dejavniki:

- pH plazme:

pH uporabljenih raztopin je praviloma 7,4. Želimo namreč posnemati fiziološke pogoje. Tekom eksperimenta se izgublja CO₂, zato se lahko pH rahlo zviša. Te spremembe so pomembne pri delu z zdravilnimi učinkovinami, katerih vezava je odvisna od pH.

- Volumski premik:

Plazma je hipertonična v primerjavi z vodo, zato voda prehaja v plazemski prostor, katerega volumen se veča. Posledično se spremeni ionska moč in pH. Te spremembe lahko vplivajo na vezavo zdravilne učinkovine na plazemske proteine. Da se izognemo osmotskemu premiku tekočine, uporabimo izotonične pufre ali pa dodamo v pufer ustrezen polimer (npr. dekstran).

- Donnanov efekt:

Nabiti proteini ne morejo prehajati preko membrane. Z namenom doseganja elektronevtralnosti pride do pretoka ionov z nizko molekulsko maso, kamor lahko sodi tudi prosta učinkovina. Rezultat je lahko različna koncentracija proste učinkovine na obeh straneh membrane. Problem zmanjšamo z uporabo izotoničnega pufrja, ki so mu dodani

elektroliti (npr. NaCl). Na ta način zmanjšamo razliko v ionski moči na obeh straneh membrane.

- Nelinearna vezava zdravilne učinkovine na plazemske proteine:

Pri konstantni koncentraciji proteinov v plazmi imamo na voljo določeno število vezavnih mest za zdravilno učinkovino. Pri terapevtskih koncentracijah večine zdravilnih učinkovin je odstotek vezave konstanten. Pri visokih plazemskih koncentracijah nekaterih zdravilnih učinkovin pa se lahko vsa vezavna mesta na proteinih zasedejo in delež vezane učinkovine v plazmi z naraščanjem koncentracije učinkovine pada.

- Vezava zdravilne učinkovine na dializno celico in membrano:

Dializne celice in membrane so sestavljene iz polimerov, ki lahko nase vežejo tudi zdravilne učinkovine. Nespecifično vezavo zdravilne učinkovine na dializno celico in membrano je potrebno upoštevati pri eksperimentalnem delu.

- Čas dialize:

Za vzpostavitev ravnotežja je navadno potreben daljši čas dialize. To je problematično pri delu z zdravilnimi učinkovinami, ki niso stabilne in se v tem času razgradijo (6).

1.4.2 ULTRAFILTRACIJA

Ultrafiltracija je hitra in enostavna metoda za določanje odstotka vezave zdravilne učinkovine na plazemske proteine. Prav zaradi teh lastnosti se veliko uporablja za rutinsko delo v industriji in laboratorijih (7).

Sistem za ultrafiltracijo je sestavljen iz zunanega in notranjega valja. Notranji valj ima na dnu polprepustno membrano, ki omogoča ločitev proste in na proteine vezane zdravilne učinkovine. Prosta zdravilna učinkovina ima dovolj nizko molekulsko maso, da lahko prehaja preko membrane. Plazemski proteini in kompleksi zdravilna učinkovina-plazemski protein pa so veliko večji in ne morejo preko membrane. Ultrafiltracijo izvajamo s pomočjo centrifuge. Vsebina zunanega valja prehaja preko membrane v notranji valj na osnovi centrifugalne sile. Volumen ultrafiltrata je odvisen od pogojev centrifugiranja (7).

Na dobljene rezultate lahko vplivajo nekateri dejavniki, ki jih moramo ustrezno nadzorovati med samo izvedbo ultrafiltracije in jih upoštevati tudi kasneje pri analizi podatkov. To so:

- Temperatura:

Vpliv temperature na vezavo zdravilne učinkovine na plazemske proteine ni zanemarljiv. Če želimo doseči ponovljive rezultate, moramo dosledno vzdrževati konstantno

temperaturo tekom celotnega procesa ultrafiltracije. To dosežemo z uporabo termostatirane centrifuge.

- pH:

pH vpliva na vezavo nekaterih zdravilnih učinkovin na plazemske proteine. Za zdravilne učinkovine, s katerimi delamo, moramo poznati dopustne spremembe v pH-ju, ki ne vplivajo značilno na vezavo. Tekom ultrafiltracije se namreč sprošča CO₂, kar povzroči dvig pH-ja v vzorcu. Značilnim spremembam pH-ja in izhlapevanju CO₂ iz vzorca se lahko izognemo z uporabo sistema za ultrafiltracijo, ki ima zaprt vsebnik z vzorcem (7).

1.4.3 ULTRACENTRIFUGIRANJE

Ultracentrifugiranje je razmeroma enostavna metoda za ločitev nevezane zdravilne učinkovine od kompleksov zdravilna učinkovina-plazemski protein. Glavna prednost te metode je, da ločitev ne poteka s pomočjo membrane, s čimer se izognemo vplivu membrane na dobljene rezultate (7).

Ločitev izvedemo s pomočjo epruvt za centrifugiranje in visokokakovostne ultracentrifuge. Ultracentrifuga omogoča centrifugiranje s hitrostjo do 100.000 obratov/minuto (pospešek do 800.000×g). Takšne sile so potrebne za ločevanje koloidnih delcev od disperznega medija (8, 9). Med centrifugiranjem pri zelo visokih obratih ostane prosta zdravilna učinkovina enakomerno razporejena po celotni epruveti za centrifugiranje, medtem ko se plazemski proteini in kompleksi zdravilna učinkovina-plazemski protein zaradi velikosti nakopičijo v smeri centrifugalne sile; torej na dnu epruvete za centrifugiranje. Da izmerimo koncentracijo proste zdravilne učinkovine, torej vzorčimo raztopino na začetku ali nekje v sredini epruvete za centrifugiranje (7).

Na dobljene rezultate lahko vplivata naslednja vzroka:

- Sedimentacija nevezane zdravilne učinkovine:

Do tega pojava lahko pride v večjem obsegu pri zdravilnih učinkovinah z visoko molekulsko maso. S poskusi so dokazali, da se koncentracija proste zdravilne učinkovine z molekulsko maso od 200 do 300 g/mol v zgornjih delih epruvt za centrifugiranje zmanjša le za 9 do 14 %, kar naj bi minimalno vplivalo na določitev vezave zdravilne učinkovine na plazemske proteine. Odvisna pa je tudi od viskoznosti vzorca. Bolj viskozni vzorci namreč lahko povzročijo tudi sedimentacijo zdravilnih učinkovin z nizko molekulsko maso, ker omejujejo njihovo razpršitev.

- Moteno ravnotežje vezave:

Do tega pride, če se med ultracentrifugiranjem nevezana zdravilna učinkovina in kompleks zdravilna učinkovina-plazemski protein premikata z različno hitrostjo. Če je ravnotežje vezave moteno, preverimo tako, da izmerimo posebej koncentracijo proteinov $[P_T]$ in zdravilne učinkovine $[D_T]$ v različnih delih epruvete za centrifugiranje. Ravnotežje vezave ni moteno, če vrednosti dobljenih parov ležijo na premici, ki jo opišemo z enačbo 1.

$$[D_T] = k * P_T + [D_f] \quad (\text{enačba 1})$$

$[P_T]$ - koncentracija proteinov, D_T - celokupna koncentracija zdravilne učinkovine, $[D_f]$ - koncentracija nevezane zdravilne učinkovine

Vpliv vezave zdravilne učinkovine na sistem za ultracentrifugiranje (epruvete za centrifugiranje) je pri tej metodi v večini primerov zelo majhen (7).

1.4.4 PREDNOSTI IN SLABOSTI POSAMEZNIH METOD

V preglednici I so predstavljene prednosti in slabosti posameznih metod za določanje vezave učinkovin na plazemske proteine, ki smo jih uporabili v eksperimentalnem delu naloge.

Preglednica I: Prednosti in slabosti uporabljenih metod za določanje vezave učinkovin na plazemske proteine

	PREDNOSTI	SLABOSTI
RAVNOTEŽNA DIALIZA	<ul style="list-style-type: none"> • V stanju ravnotežja lahko izmerimo koncentracijo zdravilne učinkovine na obeh straneh membrane. S tem kompenziramo vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ravnotežno dializo. Vezava na sistem namreč ne vpliva na koncentracijsko razmerje v ravnotežju, ampak le na masno bilanco (5). 	<ul style="list-style-type: none"> • Sestavljanje sistema za ravnotežno dializo je nekoliko zahtevnejše (7). • Metoda je zamudna, saj je potrebno veliko časa za vzpostavitev ravnotežja (5). • Lahko pride do vezave zdravilne učinkovine na polprepustno membrano in stene dializnih celic (6). • Volumski premik (5) • Donnanov efekt (5)

Nadaljevanje preglednice I: Prednosti in slabosti uporabljenih metod za določanje vezave učinkovin na plazemske proteine

	PREDNOSTI	SLABOSTI
ULTRAFILTRACIJA	<ul style="list-style-type: none"> Izvedba je hitra in enostavna (10) 	<ul style="list-style-type: none"> Vezava zdravilne učinkovine na membrano in stene sistema za ultrafiltracijo (7). Prepuščanje proteinov v ultrafiltrat (7). Agregacija zadržanih proteinov na polprepustni membrani (7). Problematično nadziranje temperature in pH-ja (7).
ULTRACENTRIFUGIRANJE	<ul style="list-style-type: none"> Odsotnost polprepustne membrane (7). Vezava zdravilne učinkovine na epruvete za centrifugiranje naj bi bila v večini primerov zelo majhna (7). 	<ul style="list-style-type: none"> Motnje v vzpostavitvi ravnotežja vezave (7). Sedimentacija proste zdravilne učinkovine (7). Cena visokokakovostne ultracentrifuge (7).

1.5 PARAMETRI IN KINETIKA VEZAVE UČINKOVIN NA PLAZEMSKÉ PROTEINE

Kinetiko vezave zdravilne učinkovine na plazemski protein z enim razredom vezavnih mest lahko opišemo z enačbo 2 (1).



[P]- koncentracija prostih vezavnih mest na plazemskih proteinih, [D]- koncentracija proste zdravilne učinkovine v plazmi, PD - koncentracija kompleksa zdravilna učinkovina-plazemski protein.

1.5.1 AFINITETNA KONSTANTA

Afinitetna konstanta (K_a) izraža razmerje med molarno koncentracijo produktov in reaktantov iz enačbe 2 (1). Prikažemo jo z enačbo 3.

$$K_a = \frac{PD}{P * D} \quad (\text{enačba 3})$$

[PD]- koncentracija kompleksa zdravilna učinkovina-plazemski protein, P - koncentracija prostih vezavnih mest na plazemskih proteinih, $[D]$ - koncentracija proste zdravilne učinkovine.

Od afinitetne konstante je odvisno v kolikšnem obsegu se bo zdravilna učinkovina vezala na plazemski protein. Zdravilne učinkovine z visokim odstotkom vezave na plazemske proteine imajo visoko vrednost afinitetne konstante. Te zdravilne učinkovine obstajajo pretežno v kompleksu s plazemskimi proteini. Pri zdravljenju s takimi zdravilnimi učinkovinami so potrebni visoki odmerki, da lahko dosežemo primerne plazemske koncentracije proste učinkovine, ki so farmakološko učinkovite (1).

1.5.2 ŠTEVILO VEZAVNIH MEST IN STOPNJA VEZAVE

Povprečno število vezavnih mest, ki so na molekuli proteina na razpolago za vezavo, označimo z » n «. Stopnja vezave (r) predstavlja razmerje med koncentracijo vezane zdravilne učinkovine v plazmi in celokupno koncentracijo proteinov (1). Za en razred vezavnih mest jo matematično prikažemo z enačbo 4.

$$r = \frac{[PD]}{P_T} = \frac{n * K_a * [D]}{1 + K_a * [D]} \quad (\text{enačba 4})$$

r - stopnja vezave, n - število vezavnih mest na molekuli proteina, K_a - afinitetna konstanta, $[D]$ - koncentracija proste zdravilne učinkovine v plazmi, $[PD]$ - koncentracija kompleksa zdravilna učinkovina-plazemski protein, kar je enako koncentraciji vezane zdravilne učinkovine, $[P_T]$ - koncentracija proteinov

1.5.3 ŠTEVILO RAZREDOV VEZAVE

Molekule proteinov lahko vsebujejo več vrst vezavnih mest, ki z različno afiniteto vežejo zdravilno učinkovino. En razred vezave predstavljajo vezavna mesta, ki imajo enako afiniteto do učinkovine. Za več razredov vezave izračunamo stopnjo vezave z enačbo 5, v kateri vsak člen predstavlja en razred vezave (1).

$$r = \frac{n_1 * K_{a1} * D}{1 + K_{a1} * D} + \frac{n_2 * K_{a2} * D}{1 + K_{a2} * D} + \dots \quad (\text{enačba 5})$$

r - stopnja vezave, n -ji- število vezavnih mest na molekuli proteina, K_a -ji- afinitetne konstante, $[D]$ - koncentracija proste zdravilne učinkovine

Iz enačb, ki opisujejo kinetiko vezave učinkovin na plazemske proteine lahko razberemo, da se vsaka molekula zdravilne učinkovine veže na neodvisno vezavno mesto na proteinu

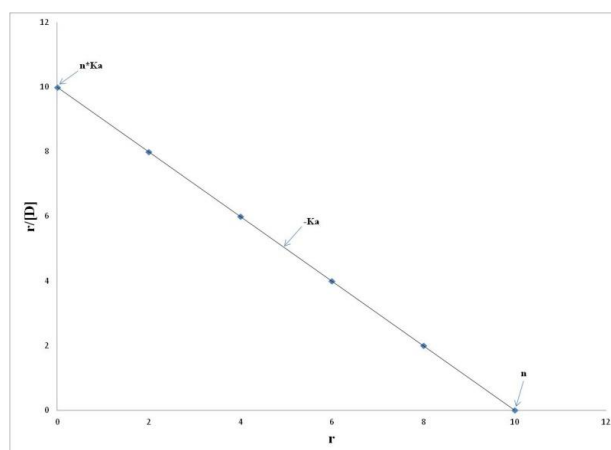
in pri tem ne vpliva na vezavo učinkovine na druga mesta. V praksi pa to vedno ni tako. V nekaterih primerih vezava prve molekule omogoči vezavo naslednjih z mnogo večjo afiniteto. To imenujemo kooperativni efekt. Primer kooperativnega efekta je vezava kisika na hemoglobin (1).

1.5.4 SCATCHARDOV DIAGRAM

Scatchardov diagram je v primeru enega razreda vezavnih mest in reverzibilne ravnotežne vezave premica z naklonom enakim negativni vrednosti afinitetne konstante ($-K_a$). Abscisa seka v točki n , katere vrednost je enaka številu vezavnih mest. Scatchardov diagram prikazuje enačba 6, grafično pa je predstavljen na sliki 2.

$$\frac{r}{D} = n * K_a - K_a * r \quad (\text{enačba 6})$$

r - stopnja vezave, $[D]$ - koncentracija proste zdravilne učinkovine v plazmi, n - število vezavnih mest, K_a - afinitetna konstanta

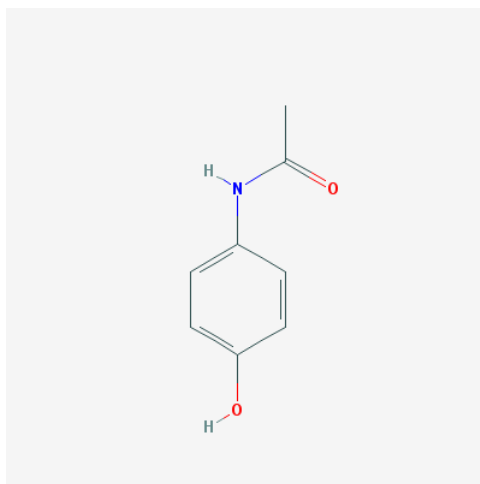


Slika 2: Scatchardov diagram

1.6 PREISKOVANI UČINKOVINI

1.6.1 PARACETAMOL

Paracetamol je bel kristaliničen prah, brez vonja. Dobro se raztaplja v alkoholu, slabše pa v vodi. V diklorometanu in etru je praktično netopen (11). Molekulska masa paracetamola znaša 151,2 g/mol. Vrednost pK_a je 9,38, $\log P$ pa 0,46 (12). Strukturo paracetamola prikazuje slika 3.



Slika 3: Strukturna formula paracetamola (12)

TERAPEVTSKE INDIKACIJE

Paracetamol ima analgetično, antipiretično in šibko protivnetno delovanje. Uporabljamo ga peroralno ali rektalno pri blagih do zmernih bolečinah ali pri vročini. Paracetamol prednostno izberemo za zdravljenje bolnikov, pri katerih je uporaba salicilatov in ostalih nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID) kontraindicirana, kot so npr. astmatiki, ljudje s peptičnim ulkusom in otroci. Na splošno se priporoča tudi pri zdravljenju starejših ljudi (11).

FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

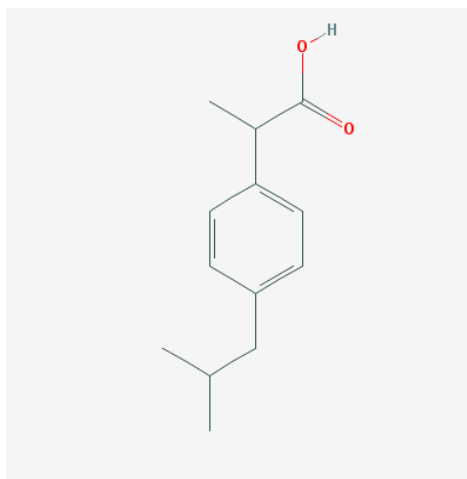
Paracetamol je derivat p-aminofenola. Mehanizem njegovega delovanja še ni natančno pojasnjen, najverjetneje pa gre za inhibicijo sinteze prostaglandinov v osrednjem živčevju in na periferiji (13, 14).

FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Paracetamol se zlahka absorbira iz prebavnega trakta. Najvišjo plazemsko koncentracijo doseže 10 do 60 minut po peroralni uporabi. Enakomerno se porazdeli v večino tkiv v telesu. Prehaja tudi placento in v mleko doječih mater. Vezava na plazemske proteine se v območju terapevtskih koncentracij giblje med 10 in 20 odstotki. Paracetamol se presnavlja pretežno v jetrih in izloča v urin kot konjugat z glukuronsko ali žveplovo kislino. Manjši del zdravilne učinkovine se metabolizira do N-acetil-p-benzokinonimina. Gre za toksičen metabolit, ki se pri uporabi običajnih odmerkov odstranjuje s konjugacijo z glutationom. Pri previsokih odmerkih pa se ta metabolit nakopiči v jetrih in povzroči njihovo okvaro, ki se lahko konča s smrtnim izidom. V nespremenjeni obliki se iz organizma izloči manj kot 5% paracetamola. Njegov razpolovni čas niha od 1 do 3 ur (11).

1.6.2 IBUPROFEN

Ibuprofen je bel ali brezbarven kristaliničen prah. Slabo se raztaplja v vodi, dobro pa v acetonu, diklorometanu, kloroformu, etru in metanolu. Topi se tudi v razredčenih raztopinah alkalijskih hidroksidov in karbonatov (11). Molekulska masa ibuprofena znaša 206,3 g/mol. Vrednost pKa je 4,91, logP pa 3,97 (15). Strukturo ibuprofena prikazuje slika 4.



Slika 4: Strukturna formula ibuprofena (15)

TERAPEVTSKE INDIKACIJE

Ibuprofen se uporablja za zdravljenje blagih do zmernih bolečin in vnetij v primeru dismenoreje, glavobola, pooperativne bolečine, zobobola, skeletnomišične bolečine, osteoartritisa, revmatoidnega artritisa in ostalih akutnih in kroničnih vnetnih bolezni ter za zniževanje povišane telesne temperature (11).

FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Ibuprofen je derivat propionske kisline in spada v skupino NSAID. NSAID so zaviralci encima ciklooksigenaze, s čimer zavrejo sintezo prostaglandinov in tromboksanov iz arahidonske kisline. Obstaja več oblik encima ciklooksigenaze; ciklooksigenaza-1 je konstitutivna oblika encima, ciklooksigenaza-2 pa je inducibilna oblika encima in nastane v celicah in tkivih pri vnetjih. Inhibicija encima COX-2 je odgovorna za analgetični, antipiretični in protivnetni učinek NSAID. Z inhibicijo COX-1 se sprožijo neželeni učinki, ki se izrazijo predvsem v prebavnem traktu (11, 16). Nedavno so odkrili še ciklooksigenazo-3 obliko encima. Je konstitutiven encim, ki naj bi bil v centralnem živčnem sistemu obsežno vpleten v posredovanje bolečine (13).

FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Ibuprofen se hiro absorbira iz prebavnega trakta. Največjo plazemsko koncentracijo doseže 1 do 2 uri po zaužitju. Na plazemske proteine se veže od 90 do 99% ibuprofena. Posledica obsežne vezave je majhen volumen porazdelitve. Tudi prehod v mleko doječih mater je zelo majhen. Ibuprofen se hitro presnovi v jetrih in izloči z urinom predvsem v obliki metabolitov. Le približno 1% ibuprofena se izloči v nespremenjeni obliki (11).

2 NAMEN DELA

Številne zdravilne učinkovine se v krvnem obtoku vežejo na plazemske proteine. Kompleks zdravilna učinkovina-plazemski protein, ki pri tem nastane, je tako velik, da ne more prehajati kapilarnih in celičnih membran. Posledično se lahko porazdeli po telesu le prosta oz. nevezana zdravilna učinkovina in pride do mesta delovanja, kjer sproži farmakološki učinek. Poznavanje obsega vezave zdravilne učinkovine na plazemske proteine je torej ključnega pomena pri določitvi ustreznega odmerka zdravila za uspešno zdravljenje.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge bomo določali odstotek vezave dveh analgetičnih zdravilnih učinkovin na humane albumine. Za preučevanje smo izbrali paracetamol in ibuprofen, ker imata po literarnih podatkih zelo različen obseg vezave. Vežava paracetamola na plazemske albumine je v območju terapevtskih koncentracij majhna in znaša od 10 do 20 odstotkov, medtem ko se ibuprofen veže na plazemske albumine v več kot 90-ih odstotkih.

Pri delu bomo uporabili tri različne metode: ravnotežno dializo, ultrafiltracijo in ultracentrifugiranje. Te metode se najpogosteje uporabljajo za oceno obsega vezave zdravilne učinkovine na plazemske proteine. Najprej bomo s pomočjo literarnih podatkov in preliminarnih poskusov določili primerne eksperimentalne pogoje za posamezno metodo. Nato pa bomo z vsako metodo ovrednotili obseg vezave obeh zdravilnih učinkovin na humane albumine.

Rezultate pridobljene z različnimi metodami bomo primerjali med seboj in z literarnimi podatki. Poskušali bomo najti vzrok morebitnih razlik in ocenili uporabnost metod. Pri tem bomo upoštevali še praktični vidik samih metod.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 PREISKOVANI UČINKOVINI

PARACETAMOL, BioXtra $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija

IBUPROFEN, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija

3.1.2 PLAZEMSKI PROTEINI

HUMANI ALBUMINI, Alburnorm 200g/L (v nadaljevanju osnovna raztopina albuminov), Octapharma (IP) Limited, Manchester, Velika Britanija. Raztopina vsebuje najmanj 96% humanega albumina pridobljenega iz humane plazme. Gre za bistro, rumeno in rahlo viskozno tekočino.

3.1.3 OSTALI REAGENTI IN TOPILA

- Dinatrijev hidrogen fosfat dodekahidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev klorid, NaCl , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Destilirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- Natrijev hidroksid, NaOH , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev acetat trihidrat, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Nemčija
- Ocetna kislina, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Acetonitril, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Ultračista voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, Združene države Amerike), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

3.1.4 APARATURE IN OSTALI PRIBOR

- Elektronska tehtnica AG245, Mettler Toledo, Švica
- Elektronska tehtnica Excellence Plus, Mettler Toledo, Švica
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Švica
- pH meter MA 5750, Iskra, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Slovenija
- Magnetno mešalo HI 190M, Hanna Instruments, Italija

- Dializne membrane Spectra/Por, 6.000-8.000 Dalton molecular weight cut off, Thomas Scientific, Združene države Amerike
- Dializne celice Bel-Art Scienceware, Združene države Amerike
- Inkubator Uniequip, Laborgerätebau- und vertriebs GmbH, Nemčija
- Sistemi za ultrafiltracijo Centrisart I, 5.000 Dalton, Sartorius, Nemčija
- Centrifuga Centric 322A, Tehnica, Slovenija
- Ultracentrifuga Thermo Scientific Sorvall wx Ultra Centrifuge Series, Thermo Scientific, Združene države Amerike
- Epice za ultracentrifugo, 1,5mL, Ultra Microtube, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, Združene države Amerike
- Injekcijske igle G21, TIK, Kobarid, Slovenija
- Brizge, Trojector- 3, Hamburg, Nemčija
- Polavtomatske pipete, Eppendorf Research (2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L), Hamburg, Nemčija
- Viale
- Sistem za filtracijo mobilne faze ; membranski filtri Nylon, 47mm \times 0,45 μ m
- HPLC sistem Agilent Technologies 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija
- HPLC kolona, Onyx Monolith C18, 50 \times 4,6mm, Phenomenex, Torrance, ZDA
- Predkolona za HPLC, C18, 4,0 \times 3,0mm, Phenomenex, Torrance, Združene države Amerike
- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453, Agilent technologies, Loveland, Colorado, ZDA
- Kiveta 105.202 QS, Hellma Analytics, Müllheim, Nemčija

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

3.2.1.1 IZOTONIČNI FOSFATNI PUFER

Za pripravo 1 L izotoničnega fosfatnega pufru smo v destilirani vodi raztopili:

- 2,38 g Na₂HPO₄,
- 0,19 g KH₂PO₄ in
- 8 g NaCl.

Pripravljen pufer smo s pomočjo pH metra in z uporabo 1M NaOH umerili na pH=7,4. Uporabili smo ga za pripravo vseh ostalih raztopin uporabljenih v eksperimentalnem delu naloge.

3.2.1.2 RAZTOPINE UČINKOVIN

OSNOVNA RAZTOPINA PARACETAMOLA

Pripravili smo osnovno raztopino paracetamola s koncentracijo 60 mg/L. In sicer smo natehtali 15 mg paracetamola in ga raztopili v 250 ml izotoničnega fosfatnega pufru (pH=7,4). Paracetamol se je v pufru dobro raztopil.

OSNOVNA RAZTOPINA IBUPROFENA

Za pripravo osnovne raztopine ibuprofena s koncentracijo 100 mg/L smo natehtali 10 mg ibuprofena in ga raztopili v 100 ml izotoničnega fosfatnega pufru (pH=7,4). Ibuprofen se v fosfatnem pufru slabše raztaplja. Da se je popolnoma raztopil, smo bučko z osnovno raztopino nekaj časa mešali na magnetnem mešalu, nato pa še postavili za približno 10 minut v ultrazvočno kadičko.

Za vsako učinkovino smo vedno pripravili tri paralele osnovnih raztopin; A, B in C.

3.2.1.3 STANDARDNE RAZTOPINE UČINKOVIN ZA UMERITVENO PREMICO

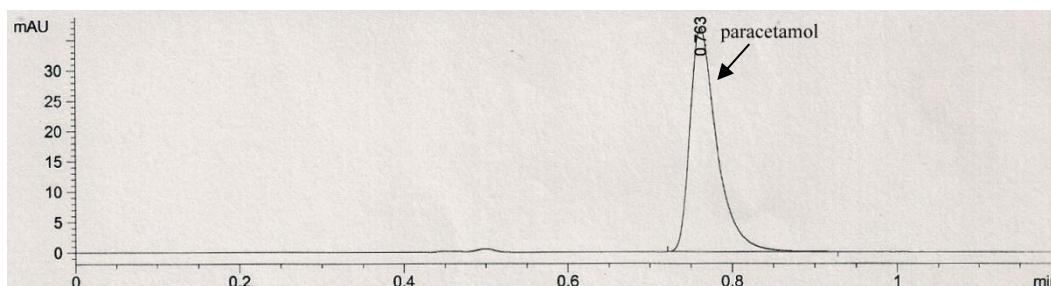
Raztopine učinkovin za umeritveno premico smo pripravili direktno v vialo z redčenjem osnovnih raztopin učinkovine z izotoničnim fosfatnim pufrom do željene končne koncentracije. Koncentracijsko območje raztopin za umeritveno premico smo izbrali glede na pričakovane odzive vzorcev. Pri tem smo upoštevali terapevtske plazemske koncentracije učinkovin in literaturni podatek o odstotku vezave izbranih učinkovin na plazemske proteine. Volumne smo odmerjali s polavtomatskimi pipetami. V preglednici II je prikazan način priprave standardnih raztopin paracetamola. Na takšen način pripravljene umeritvene premice smo uporabili pri ultrafiltraciji in ultracentrifugiranju.

Preglednica II: Priprava standardnih raztopin paracetamola

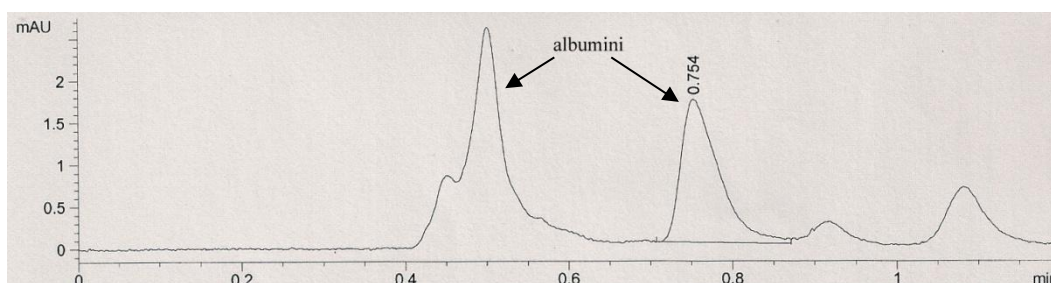
PARACETAMOL									
	st. 0	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8
c [mg/L]	0	0,6	1,5	3	6	12	18	24	30
V_(P) [μL]	/	10	25	50	100	200	300	400	500
V_(PBS) [μL]	1000	990	975	950	900	800	700	600	500

Opomba: st. 0, st. 1, ..., st. 8- ime standardne raztopine paracetamola, c [mg/L]- koncentracija paracetamola v standardni raztopini, V_(P) [μL]- volumen osnovne raztopine paracetamola, V_(PBS)[μL]- volumen izotoničnega fosfatnega pufru

Ugotovili smo, da med ravnotežno dializo prehaja preko polprepustne membrane tudi nekaj albuminov, katerih odziv se pri HPLC analizi prekriva z odzivom paracetamola in tako moti analizo (sliki 5 in 6).



Slika 5: HPLC kromatogram dializirane raztopine paracetamola



Slika 6: HPLC kromatogram dializirane raztopine albuminov

Zato smo se odločili, da naredimo umeritveno premico iz standardnih raztopin paracetamola, ki vsebujejo tudi določeno konstantno koncentracijo albuminov. Takšno umeritveno premico smo uporabili samo pri ravnotežni dializi, saj pri ultrafiltraciji in ultracentrifugiranju nismo mogli dobiti dovolj filtrata iz slepe raztopine albuminov. Koncentracija albuminov je morala biti enaka, kot se pojavlja po ravnotežni dializi na puferski strani. Preko polprepustne membrane prehajajo samo proteini določene velikosti in albumine takšne velikosti smo želeli tudi v standardnih raztopinah za umeritveno

krivuljo. To smo dosegli tako, da smo izvedli ravnotežno dializo samo z raztopinami albuminov s koncentracijo 40 g/L (slepa raztopina albuminov). Po vzpostavitvi ravnotežja smo puferske vzorce zbrali skupaj in jih poleg izotoničnega fosfatnega pufra uporabili za pripravo standardnih raztopin za umeritveno krivuljo. V preglednici III je prikazana priprava standardnih raztopin paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov.

Preglednica III: Priprava standardnih raztopin paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov

PARACETAMOL+ALBUMINI									
	st. 0	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8
c [mg/L]	0	0,6	1,5	3	6	12	18	24	30
V_(P) [μL]	/	10	25	50	100	200	300	400	500
V_(PBS+alb.) [μL]	150	150	150	150	150	150	150	150	150
V_(PBS) [μL]	850	840	825	800	750	650	550	450	350

Opomba: st. 0, st. 1,..., st. 8- ime standardne raztopine paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov, c[mg/L]- koncentracija paracetamola v standardni raztopini, V_(PBS+alb.)[μL]- volumen dializirane slepe raztopine albuminov (puferski vzorci), V_(P)[μL]- volumen osnovne raztopine paracetamola, V_(PBS)[μL]- volumen izotoničnega fosfatnega pufra

Pri ibuprofenu nismo potrebovali umeritvene premice z albumini, saj se albumini med HPLC analizo izločijo iz kolone hitreje od ibuprofena in tako ne motijo odziva ibuprofena. Način priprave standardnih raztopin ibuprofena je prikazan v preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava standardnih raztopin ibuprofena

IBUPROFEN									
	st. 0	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8
c [mg/L]	0	0,2	0,5	1,5	2,5	5	10	25	50
V_(I) [μL]	/	2	5	15	25	50	100	250	500
V_(PBS) [μL]	1000	998	995	985	975	950	900	750	500

Opomba: st. 0, st. 1,..., st. 8- ime standardne raztopine ibuprofena, c[mg/L]- koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, V_(I)[μL]- volumen osnovne raztopine ibuprofena, V_(PBS)[μL]- volumen izotoničnega fosfatnega pufra

IZRAČUN PARAMEROV IZ ENAČBE UMERITVENE PREMICE

S HPLC analizo smo določili površine pod kromatografskimi vrhovi (AUC) za slepo raztopino albuminov in vse standardne raztopine zdravilne učinkovine. S pomočjo programa Microsoft Excel smo narisali diagram AUC v odvisnosti od koncentracij zdravilne učinkovine v standardi raztopini. Te smo izračunali iz natehte zdravilne učinkovine in upoštevajoč redčitve.

Z metodo najmanjših kvadratov smo določili enačbo umeritvene premice ($AUC = k * c_{ZU} + n$) in koeficient determinacije (R^2). Iz enačbe umeritvene premice smo povratno izračunali koncentracijo zdravilne učinkovine ($c_{i ZU}$) v posamezni standardni raztopini glede na izmerjen AUC (enačba 7).

$$c_{i(ZU)} = \frac{(AUC-n)}{k} \quad (\text{enačba 7})$$

Izračunali smo točnost analizne metode, ki nam pove kakšno je ujemanje povratno izračunane koncentracije zdravilne učinkovine v standardu ($c_{i(ZU)}$) z njeno dejansko koncentracijo ($c_{d(ZU)}$) (enačba 8).

$$\text{točnost [\%]} = 100 * \frac{c_{i ZU}}{c_{d ZU}} \quad (\text{enačba 8})$$

Za vsako HPLC analizo smo naredili novo umeritveno premico, za katero so bile standardne raztopine učinkovine pripravljene iz iste osnovne raztopine kot vzorci.

3.2.1.4 ALBUMINSKE RAZTOPINE UČINKOVIN

Osnovna raztopina albuminov, ki smo jo uporabili kot vir proteinov, vsebuje humane albumine v koncentraciji 200 g/L. Albuminske raztopine učinkovin smo pripravili tako, da je koncentracija humanih albuminov v njih znašala 40 g/L. S tem smo simulirali fiziološke pogoje, saj referenčna vrednost za albumine v serumu znaša 36,3 – 49,1 g/L. Z vsako učinkovino smo pripravili albuminske raztopine s tremi različnimi koncentracijami učinkovine, ki pa so bile vse znotraj njihovih terapevtskih plazemskih koncentracij. V preglednicah V in VI je prikazan način priprave albuminskih raztopin učinkovin.

Preglednica V: Priprava albuminskih raztopin s paracetamolom

PARACETAMOL			
	vz. 1	vz. 2	vz. 3
$c_{(P)}$ [mg/L]	6	18	30
$V_{(os. razt. alb)}$ [mL]	2	2	2
$V_{(P)}$ [mL]	1	3	5
$V_{(PBS)}$ [mL]	7	5	3

Opomba: vz. 1, vz. 2, vz. 3- ime albuminske raztopine, $c_{(P)}$ [mg/L]- koncentracija paracetamola v albuminski raztopini, $V_{(os. razt. alb)}$ [mL]- volumen osnovne raztopine albuminov, $V_{(P)}$ [mL]- volumen osnovne raztopine paracetamola, $V_{(PBS)}$ [mL]- volumen izotoničnega fosfatnega puфра

Preglednica VI: Priprava albuminskih raztopin z ibuprofenom

IBUPROFEN			
	vz. 1	vz. 2	vz. 3
$c_{(I)}$ [mg/L]	10	25	50
$V_{(os. razt. alb)}$ [mL]	2	2	2
$V_{(I)}$ [mL]	1	2,5	5
$V_{(PBS)}$ [mL]	7	5,5	3

Opomba: vz. 1, vz. 2, vz. 3- ime albuminske raztopine, $c_{(I)}$ [mg/L]- koncentracija ibuprofena v albuminski raztopini, $V_{(os. razt. alb)}$ [mL]- volumen osnovne raztopine albuminov, $V_{(I)}$ [mL]-volumen osnovne raztopine ibuprofena, $V_{(PBS)}$ [mL]- volumen izotoničnega fosfatnega puфра

Pripravili smo tudi slepo raztopino albuminov in sicer smo odmerili 2 mL osnovne raztopine albuminov in redčili z izotoničnim fosfatnim puфrom do 10 mL.

Vse albuminske raztopine smo umerili na pH=7,4.

3.2.1.5 MOBILNI FAZI ZA HPLC ANALIZO

Na osnovi literarnih podatkov in po dodatni optimizaciji smo za HPLC analizo učinkovin izbrali naslednji mobilni fazi (17, 18, 19).

PARACETAMOL:

Mobilno fazo za HPLC analizo paracetamola sta sestavljala 50 mM raztopina KH_2PO_4 in acetonitril v razmerju 92:8 (v/v). 50 mM KH_2PO_4 smo pripravili tako, da smo 6,8 g KH_2PO_4 raztopili v 1L ultračiste vode.

IBUPROFEN:

Pri HPLC analizi ibuprofena smo uporabili mobilno fazo, ki je bila sestavljena iz 25 mM acetatnega puфра s pH=5 in acetonitrila v razmerju 55:45 (v/v). Acetatni pufer smo

pripravili tako, da smo 3,4025 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ raztopili v 1L ultračiste vode. Raztopino smo z očetno kislino umerili na $\text{pH}=5$.

Pred HPLC analizo smo pripravljene raztopine za mobilno fazo prefiltrirali in razplinili v ultrazvočni kadički. Filtrirali smo samo tisti del mobilne faze, ki smo ga sami pripravili, torej 50 mM raztopino KH_2PO_4 in acetatni pufer. Za to smo uporabili sistem za filtracijo mobilne faze, ki je sestavljen iz rezervoarja, steklenega lijaka, membranskega filtra in steklenice. Raztopino smo s pomočjo vodne črpalke prefiltrirali iz rezervoarja preko membranskega filtra v steklenico. S tem smo odstranili morebitne neraztopljene delce, ki bi kasneje ovirali HPLC analizo.

3.2.2 RAVNOTEŽNA DIALIZA

3.2.2.1 EKSPERIMENTALNA IZVEDBA

Polprepustne membrane, ki smo jih uporabili za ravnotežno dializo smo morali 24 ur namakati v destilirani vodi. Po tem času smo jih sprali z destilirano vodo in pustili eno uro v izotoničnem fosfatnem pufru s $\text{pH}=7,4$. Polprepustne membrane so izdelane iz regeneriranih celuloznih vlaken, katerih izhodna surovina so odpadna bombažna vlakna. Regenerirana celulozna vlakna, dobljena z regeneracijo naravne celuloze, so kemično čista celuloza (20).

V nadaljevanju smo pripravili dializne celice (slika 7). Vsaka dializna celica je sestavljena iz dveh delov, med katera smo položili omočeno membrano, s katere smo pred tem odstranili odvečno tekočino. Pri delu smo morali biti previdni, saj se nismo smeli dotakniti dela membrane, kjer bo potekala dializa. Na membrano smo položili drugi del dializne celice in ju z vijaki privili tesno skupaj. Vdolbine na obeh straneh membrane smo napolnili s pomočjo injekcijske brizge. Volumen vdolbinic je na obeh straneh membrane enak (1mL). Po končanem polnjenju smo preverili, da v vdolbinicah niso ostali zračni mehurčki, saj bi se s tem zmanjšal volumen raztopin in tudi površina, ki je namenjena dializi. Odprtine smo na koncu zamašili z vijaki, da smo preprečili izhlapevanje raztopin.



Slika 7: Celica za ravnotežno dializo

Dializne celice smo polnili z različnimi raztopinami, glede na to, kaj smo želeli v eksperimentu preveriti. Pripravljene dializne celice smo postavili v inkubator na 37 °C do vzpostavitve ravnotežja. Po končani inkubaciji smo s pomočjo injekcijske brizge vzorčili na puferski strani dializne celice.

3.2.2.2 STABILNOST ZDRAVILNE UČINKOVINE MED RAVNOTEŽNO DIALIZO

Stabilnost zdravilne učinkovine smo preverili tako, da smo v bučkah pripravljene standardne raztopine zdravilnih učinkovin izpostavili pogojem ravnotežne dialize. Po 20 urah smo vzorčili raztopine in izvedli HPLC analizo.

Stabilnost zdravilne učinkovine izrazimo kot delež zdravilne učinkovine, ki ne razpade v času in pogojih ravnotežne dialize glede na vsebnost zdravilne učinkovine v sveže pripravljene raztopini (enačba 9).

$$\text{Stabilnost \%} = 100 * \frac{c_n}{c_d} \quad (\text{enačba 9})$$

c_n - koncentracija zdravilne učinkovine v standardni raztopini, ki je bila izpostavljena pogojem ravnotežne dialize, c_d - koncentracija zdravilne učinkovine v sveže pripravljene standardni raztopini

3.2.2.3 ČAS, POTREBEN ZA VZPOSTAVITEV RAVNOTEŽJA

Dializne celice smo na eni strani napolnili z izotoničnim fosfatnim pufrom, na drugi pa s slepo raztopino albuminov ali z albuminskimi raztopinami, ki vsebujejo konstantno

koncentracijo albuminov (40 g/L) in različne koncentracije zdravilne učinkovine v terapevtskem območju (albuminske raztopine z učinkovino). Dializne celice smo inkubirali pri 37°C in vzorčili na puferski strani najprej po 20 urah in nato še po 40 urah.

Namen tega sklopa poskusov je ugotoviti koliko časa je potrebno, da se vzpostavi ravnotežje.

3.2.2.4 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA SISTEM ZA RAVNOTEŽNO DIALIZO

Med poskusom ravnotežne dialize se lahko nekaj učinkovine veže na dializni sistem; na celice in na membrano. S temi poskusi želimo oceniti kakšen je odstotek vezave zdravilne učinkovine na sistem za ravnotežno dializo. Dializne celice smo na eni strani napolnili z izotoničnim fosfatnim pufrom, na drugi strani pa z raztopinami zdravilne učinkovine različnih koncentracij (brez albuminov). Poskus smo izvedli za obe učinkovini. Celice smo postavili v inkubator na 37°C. Po 20 urah smo vzeli vzorce iz obeh strani dializne celice in jih analizirali.

Odstotek vezave zdravilne učinkovine, ki se v času in pogojih ravnotežne dialize ne veže na sistem za ravnotežno dializo izračunamo z enačbo 10.

$$\% ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo = 100 * \frac{\Sigma AUC}{dAUC} \quad (\text{enačba } 10)$$

ΣAUC - vsota površin pod kromatografskim vrhom za raztopini na obeh straneh celice v ravnotežju, $dAUC$ - površina pod kromatografskim vrhom pri sveže pripravljene raztopini

3.2.2.5 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

Ta del poskusov je bil za nas najpomembnejši. Dializne celice smo na eni strani napolnili s pufrom, na drugi pa s slepo raztopino albuminov ali albuminskimi raztopinami z učinkovino. Po 20 urni inkubaciji na 37°C smo vzorčili na puferski strani in analizirali vzorce. S pomočjo dobljenih rezultatov smo lahko izračunali odstotek vezave zdravilne učinkovine na albumine.

Odstotek vezane zdravilne učinkovine na plazemske albumine (β) izrazimo kot razmerje med koncentracijo vezane učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja c_b in celokupno koncentracijo učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja c_{pl} (enačba 13). Do potrebnih podatkov pridemo s pomočjo enačb 11 in 12.

$$c_b = c_{d(ZU)} - 2 * c_f \quad (\text{enačba 11})$$

$$c_{pl} = c_{d(ZU)} - c_f \quad (\text{enačba 12})$$

$$\beta = \frac{c_b}{c_{pl}} * 100 \quad (\text{enačba 13})$$

$c_{d(ZU)}$ - začetna koncentracija zdravilne učinkovine v raztopini albuminov, c_f -koncentracija nevezane zdravilne učinkovine v pufru v stanju ravnotežja

Če je potrebno, upoštevamo pri izračunih tudi vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ravnotežno dializo in stabilnost zdravilne učinkovine. V takih primerih nadomestimo vrednost $c_{d(ZU)}$ z $c_{d1(ZU)}$ (enačba 14).

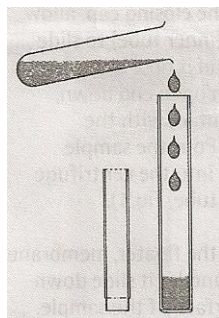
$$c_{d1(ZU)} = x_1 * x_2 * c_{d(ZU)} \quad (\text{enačba 14})$$

$c_{d1(ZU)}$ - začetna koncentracija zdravilne učinkovine v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ravnotežno dializo, x_1 -delež ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo, x_2 -delež ZU, ki ne razpade v času in pogojih ravnotežne dialize

3.2.3 ULTRAFILTRACIJA

3.2.3.1 EKSPERIMENTALNA IZVEDBA

Sistemi za ultrafiltracijo so zaprti s pokrovčkom. Pred uporabo smo pokrovček odprli in odstranili notranji valj. Postavili smo ga na čisto površino z membrano navzgor. Pri tem smo pazili, da se nismo dotaknili polprepustne membrane. V zunanji valj smo odpipetirali 2,5 mL vzorca (slika 8). Nato smo previdno vstavili notranji valj z membrano; pustili smo, da sam zdrsne na površino vzorca.



Slika 8: Polnjenje zunanjega valja z vzorcem (21)

Pripravljene sisteme za ultrafiltracijo smo postavili v centrifugo (slika 9). Sistemov nismo zaprti s pokrovčkom. Najprej smo jih centrifugirali le toliko časa, da smo dosegli hitrost

1000 obratov/minuto. Nato smo počakali 5 minut, da se je membrana dobro omočila. Po tem času smo nastavili centrifugo na 4000 obratov/minuto in centrifugirali 10 minut.



Slika 9: Zunanost in notranjost centrifuge za izvedbo ultrafiltracije

Ultrafiltrat, ki je prešel preko membrane v notranji valj, smo morali čim prej po končanem centrifugiranju vzorčiti, saj bi počasi prešel nazaj v zunanji valj. To smo lahko naredili na dva načina. Ultrafiltrat smo odpipetirali s pomočjo pipete neposredno iz celotnega sistema za ultrafiltracijo ali pa smo s pinceto odstranili notranji valj, da smo lažje dostopali do pridobljenega ultrafiltrata.

Z metodo ultrafiltracije smo najprej preverili v kakšnem odstotku se preiskovana zdravilna učinkovina veže na sistem za ultrafiltracijo, nato pa smo določili še delež vezave zdravilne učinkovine na plazemske albumine.

3.2.3.2 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA SISTEM ZA ULTRAFILTRACIJO

S tem poskusom smo želeli ugotoviti, če je vezava preiskovanih zdravilnih učinkovin na sistem za ultrafiltracijo značilna. Zunanje valje smo v tem primeru napolnili z raztopinami učinkovin različnih koncentracij (brez dodanih albuminov). Ultrafiltracijo smo izvedli po zgoraj opisanem postopku in analizirali pridobljene vzorce.

Odstotek zdravilne učinkovine, ki se tekom procesa ultrafiltracije ne veže na sistem za ultrafiltracijo, izračunamo z enačba 15.

$$\% ZU, ki se ne veže na sistem za ultrafiltracijo = 100 * \frac{AUC}{dAUC} \quad (\text{enačba 15})$$

AUC - površina pod kromatografskim vrhom za raztopino, ki je bila izpostavljena pogojem ultrafiltracije ,
 $dAUC$ - površina pod kromatografskim vrhom sveže pripravljene raztopine

3.2.3.3 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

To je bil poglobljen poskus pri ultrafiltraciji. Z njim smo določili vezavo zdravilne učinkovine na plazemske albumine. Zunanje valje smo napolnili s slepo raztopino albuminov ali z albuminskimi raztopinami, ki vsebujejo konstantno koncentracijo albuminov (40g/L) in različne koncentracije zdravilne učinkovine v terapevtskem območju (albuminske raztopine z učinkovino). Tudi tokrat smo ultrafiltracijo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.1.

Odstotek vezave zdravilne učinkovine na plazemske albumine (β) izračunamo z razmerjem med koncentracijo zdravilne učinkovine vezane na albumine po ultrafiltraciji (c_b) in začetno koncentracijo zdravilne učinkovine v raztopini albuminov ($c_{d\ ZU}$) (enačba 17). Do potrebnih podatkov pridemo s pomočjo enačbe 16.

$$c_b = c_{d(ZU)} - c_f \quad (\text{enačba 16})$$

$$\beta = \frac{c_b}{c_{d\ ZU}} * 100 \quad (\text{enačba 17})$$

c_f ; koncentracija nevezane zdravilne učinkovine v ultrafiltratu

Če je potrebno, upoštevamo pri izračunih tudi vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ultrafiltracijo. V takšnih primerih nadomestimo vrednost $c_{d(ZU)}$ z $c_{d1(ZU)}$ (enačba 18).

$$c_{d1\ ZU} = x * c_{d(ZU)} \quad (\text{enačba 18})$$

$c_{d1(ZU)}$ - začetna koncentracija zdravilne učinkovine v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ultrafiltracijo, x - delež zdravilne učinkovine, ki se ne veže na sistem za ultrafiltracijo

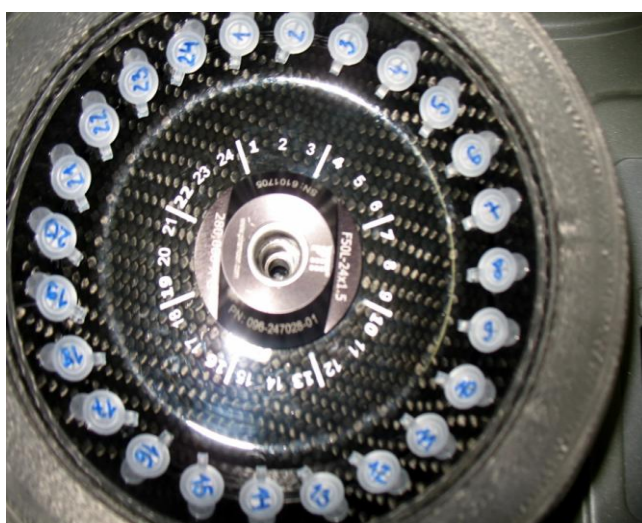
3.2.4 ULTRACENTRIFUGIRANJE

3.2.4.1 EKSPERIMENTALNA IZVEDBA

Epruvete za ultracentrifugiranje so plastične. Imajo konično dno in zaskočni pokrovček in so namenjene le za ultracentrifugiranje. Vanje smo odpipetirali ustrezen volumen preiskovane raztopine in zaprli pokrovček. Epruvete smo vstavili v rotor ultracentrifuge in zaprli komorna vrata (slika 10 in 11). Na kontrolni enoti ultracentrifuge smo nastavili željene pogoje centrifugiranja. Naše vzorce smo centrifugirali 2 uri pri 37 °C in 50000 obratih/minuto.



Slika 10: Visokokakovostna ultracentrifuga



Slika 11: Rotor ultracentrifuge napolnjen z epruветami za ultracentrifugiranje

Po končanem centrifugiranju smo s pomočjo pipete vzorčili iz sredine supernatanta. Na dnu epruvete je bil lepo viden sediment, ki je bil nekoliko temneje obarvan od supernatanta.

Z metodo ultracentrifugiranja smo preverjali vezavo izbranih zdravilnih učinkovin na epruvete za centrifugiranje in pa vezavo na plazemske albumine.

3.2.4.2 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA SISTEM ZA ULTRACENTRIFUGIRANJE

S tem poskusom smo želeli ugotoviti, če je vezava zdravilne učinkovine na površino epruвет za centrifugiranje res tako majhna in nepomembna kot navajajo literaturni podatki. Epruvete za ultracentrifugiranje smo napolnili z raztopinami zdravilnih učinkovin različnih koncentracij znotraj terapevtskega območja (brez dodanih albuminov). Po izvedbi poskusa smo analizirali pridobljene vzorce.

Odstotek zdravilne učinkovine, ki se tekom procesa ultracentrifugiranja ne veže na epruvete za ultracentrifugiranje izračunamo z enačbo 19.

$$\% ZU, ki se ne veže na sistem za ultracentrifugiranje = 100 * \frac{AUC}{dAUC} \quad (\text{enačba 19})$$

AUC- površina pod kromatografskim vrhom za raztopino, ki je bila izpostavljena pogojem ultracentrifugiranja, *dAUC*- površina pod kromatografskim vrhom sveže pripravljene raztopine

3.2.4.3 VEZAVA ZDRAVILNE UČINKOVINE NA PLAZEMSKA ALBUMINE

Namen tega poskusa je bil ugotoviti delež vezave zdravilne učinkovine na plazemske albumine. Epruvete za ultracentrifugiranje smo v tem primeru polnili s slepo raztopino albuminov ali z albuminskimi raztopinami z učinkovino.

Odstotek vezave zdravilne učinkovine na plazemske albumine (β) izračunamo z razmerjem med koncentracijo zdravilne učinkovine vezane na albumine po poteku ultracentrifugiranja (c_b) in začetno koncentracijo zdravilne učinkovine v raztopini albuminov ($c_{d\ ZU}$) (enačba 21). Do potrebnih podatkov pridemo s pomočjo enačbe 20.

$$c_b = c_{d(zU)} - c_f \quad (\text{enačba } 20)$$

$$\beta = \frac{c_b}{c_{d \text{ } zU}} * 100 \quad (\text{enačba } 21)$$

c_f ; koncentracija nevezane zdravilne učinkovine v supernatantu

Če je potrebno, upoštevamo pri izračunih tudi vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ultracentrifugiranje. V takšnih primerih nadomestimo vrednost $c_{d(zU)}$ z $c_{d1(zU)}$ (enačba 22).

$$c_{d1(zU)} = x * c_{d(zU)} \quad (\text{enačba } 22)$$

$c_{d1(zU)}$ - začetna koncentracija zdravilne učinkovine v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ultracentrifugiranje, x - delež zdravilne učinkovine, ki se ne veže na epruvete za ultracentrifugiranje

3.2.5 HPLC ANALIZA

Za analizo vzorcev smo uporabili HPLC sistem Agilent 1100 Series (slika 12).



Slika 12: HPPLC sistem Agilent 1100 Series

3.2.5.1 POGOJI HPLC ANALIZE

Pogoje HPLC analize smo okvirno določili z upoštevanjem obstoječih literaturnih podatkov in jih nato še dodatno optimizirali (17, 18, 19).

POGOJI HPLC ANALIZE PARACETAMOLA

Vrsta kolone: Onyx Monolith C18, 50×4,6mm

Sestava mobilne faze: 92% 50 mM KH₂PO₄, 8% acetonitril

Pretok mobilne faze: 2 mL/min

Temperatura kolone: 35 °C

Valovna dolžina detekcije: 243 nm

Volumen injiciranja: 5 µL

POGOJI HPLC ANALIZE IBUPROFENA

Vrsta kolone: Onyx Monolith C18, 50×4,6mm

Sestava mobilne faze: 55% 24 mM acetatni pufer (pH=5), 45% acetonitril

Pretok mobilne faze: 2 mL/min

Temperatura kolone: 30°C

Valovna dolžina detekcije: 230 nm

Volumen injiciranja: 25 µL

3.2.6 STATISTIČNA ANALIZA

Pridobljene rezultate smo obdelali s pomočjo računalniških programov Excell in SPSS. S pomočjo Excell-a smo določili enačbe umeritvenih premic ter povprečja, standardne deviacije in koeficiente variacije meritev pri posameznih eksperimentalnih pogojih. Statistično analizo smo opravili s pomočjo programa SPSS. Uporabili smo:

- enosmerno in dvosmerno ANOVA: za preučevanje vpliva opisnih spremenljivk (metoda in koncentracija) in njune medsebojne interakcije (metoda*koncentracija) na rezultate poskusa (odstotek vezave učinkovine na albumine)
- Levenov test: za ugotavljanje homogenosti varianc
- post hoc test (Games-Howell ali Tukey): za preučevanje razlik med posameznimi skupinami meritev

Hipoteze smo preverjali pri stopnji tveganja 5% ($p=0,05$).

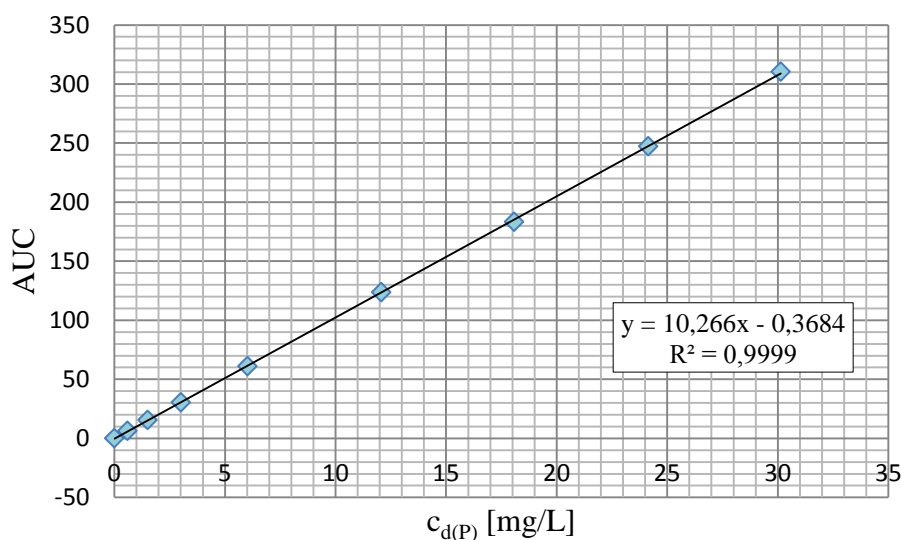
4 REZULTATI

4.1 PARACETAMOL

4.1.1 UMERITVENA PREMICA BREZ ALBUMINOV

Na sliki 13 in v preglednici VII je predstavljen primer umeritvene premice iz standardnih raztopin paracetamola in točnost povratno izračunanih koncentracij standardnih raztopin.

Preglednica VIII prikazuje enačbe posameznih umeritvenih premic paracetamola.



Slika 13: Primer umeritvene premice paracetamola

Preglednica VII: Umeritvena premica - paracetamol

Ime vzorca	$c_{(P)}$ [mg/L]	$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC	$c_{i(P)}$ [mg/L]	Točnost [%]
st. 0	0	0	0	/	/
st. 1	0,60	0,60	6,2	0,64	106,0
st. 2	1,50	1,51	15,5	1,55	102,6
st. 3	3,00	3,02	30,5	3,01	99,6
st. 4	6,00	6,03	61,1	5,99	99,3
st. 5	12,00	12,07	123,8	12,10	100,2
st. 6	18,00	18,08	183,3	17,89	98,9
st. 7	24,00	24,14	247,4	24,13	100,0
st. 8	30,00	30,14	310,3	30,26	100,4

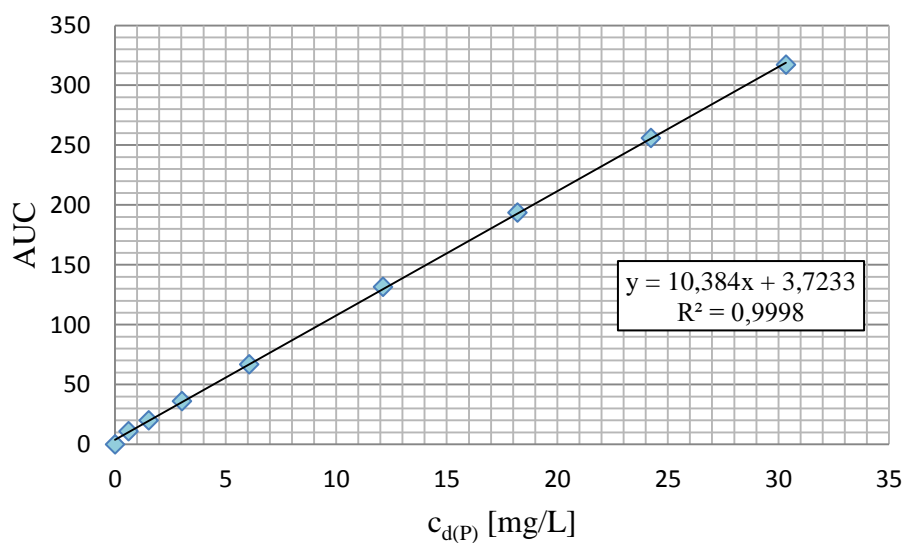
Opomba: $c_{(P)}$ [mg/L]- načrtovana koncentracija paracetamola v standardni raztopini, $c_{d(P)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija paracetamola v standardni raztopini, AUC- površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, $c_{i(P)}$ [mg/L]- povratno izračunana koncentracija paracetamola v standardni raztopini

Preglednica VIII: Primerjava naklonov (k) enačb posameznih umeritvenih premic paracetamola

Enačba umeritvene premice	
$y=9,6251x+0,7479$	
$y=9,9241x+0,9739$	
$y=10,193x-0,9902$	
$y=10,15294x-0,35337$	
$y=9,9543x-0,0369$	
$y=10,825x-0,1655$	Povprečje: 10,2
$y=10,266x-0,3684$	S.D.: 0,4
$y=10,539x-0,352$	K.V.: 3,7%

4.1.2 UMERITVENA PREMICA S KONSTANTNO KONCENTRACIJO ALBUMINOV

Slika 14 prikazuje umeritveno premico iz standardnih raztopin paracetamola, ki vsebujejo tudi konstantno koncentracijo albuminov. Točnost povratno izračunanih koncentracij standardnih raztopin je prikazana v preglednici IX. Preglednica X prikazuje enačbe posameznih umeritvenih premic paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov.



Slika 14: Umeritvena premica- paracetamol+albumini

Preglednica IX: Umeritvena premica - paracetamol+albumini

Ime vzorca	$c_{(P)}$ [mg/L]	$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC	$c_{i(P)}$ [mg/L]	Točnost [%]
st. 0	0	0	0	/	/
st. 1	0,60	0,61	10,9	0,69	114,0
st. 2	1,50	1,52	19,9	1,56	102,7
st. 3	3,00	3,03	36,1	3,12	102,9
st. 4	6,00	6,07	66,9	6,08	100,3
st. 5	12,00	12,12	131,4	12,30	101,4
st. 6	18,00	18,20	193,6	18,29	100,4
st. 7	24,00	24,24	255,8	24,28	100,1
st. 8	30,00	30,34	317,1	30,18	99,5

Opomba: $c_{(P)}$ [mg/L]- načrtovana koncentracija paracetamola v standardni raztopini paracetamola, $c_{d(P)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija paracetamola v standardni raztopini paracetamola, , AUC - površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, $c_{i(P)}$ [mg/L]- iz umeritvene premice izračunana koncentracija paracetamola v standardni raztopini

Preglednica X: Primerjava enačb posameznih umeritvenih premic paracetamola s konstantno koncentracijo albuminov

Enačba umeritvene premice	Povprečje:	10,3
$y=10,384x+3,7233$	S.D.:	0,1
$y=10,179x+5,7261$	K.V.:	1,41%

4.1.3 RAVNOTEŽNA DIALIZA

4.1.3.1 STABILNOST PARACETAMOLA

V preglednici XI vidimo kolikšen del paracetamola ne razpade pri pogojih ravnotežne dialize.

Preglednica XI: Stabilnost paracetamola

c(P) [mg/L]	cd(P) [mg/L]	cn(P) [mg/L]	Stabilnost [%]		
6	6,01	6,25	104		
	6,04	5,93	98,1		
	6,07	6,17	101,6		
	6,02	6,07	100,9		
	6,02	5,91	98,1		
	6,06	6,09	100,6	Povprečje (n=8):	100,3
	6,07	6,06	99,9	S.D.:	2
	6,07	6,02	99,2	K.V.:	2,00%
18	18,02	19,53	108,3		
	18,13	18,23	100,5		
	18,2	18,77	103,1		
	18,05	18,48	102,4		

Nadaljevanje preglednice XI: Stabilnost paracetamola

c(P) [mg/L]	cd(P) [mg/L]	cn(P) [mg/L]	Stabilnost [%]		
18	18,07	17,91	99,1		
	18,18	18,62	102,4	Povprečje (n=8):	102,1
	18,2	18,44	101,3	S.D.:	2,9
	18,22	18,18	99,8	K.V.:	2,80%
30	30,04	31,3	104,2		
	30,22	28,94	95,8		
	30,34	30,89	101,8		
	30,08	30,75	102,2		
	30,12	29,84	99,1		
	30,3	30,32	100,1	Povprečje (n=8):	100,3
	30,34	30,44	100,3	S.D.:	2,6
	30,36	29,94	98,6	K.V.:	2,60%

Opomba: $c_{(P)}$ [mg/L]- načrtovana koncentracija paracetamola v standardni raztopini, $c_{d(P)}$ [mg/L]- koncentracija paracetamola v sveže pripravljene standardni raztopini, $c_{n(P)}$ [mg/L]- koncentracija paracetamola v standardni raztopini, ki je bila izpostavljena pogojem ravnotežne dialize

4.1.3.2 VEZAVA PARACETAMOLA NA SISTEM ZA RAVNOTEŽNO DIALIZO

V preglednici XII je prikazano v kolikšnem odstotku se paracetamola veže na sistem za ravnotežno dializo.

Preglednica XII: Vezava paracetamola na sistem za ravnotežno dializo

$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC _A	AUC _B	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo		
6,01	30,70	30,50	58,58	104,5		
6,01	29,40	29,20	58,58	100,0		
6,04	27,50	27,40	58,92	93,2		
6,04	27,60	27,60	58,92	93,7		
6,07	28,80	28,80	59,15	97,4		
6,02	28,90	28,70	60,68	94,9		
6,02	28,70	28,60	60,76	94,3		
6,01	28,60	28,70	60,06	94,6		
6,06	32,40	31,80	60,78	105,6		
6,06	29,10	28,20	60,78	94,3		
6,07	31,10	30,60	60,86	101,4		
6,07	29,40	29,60	60,86	96,9		
6,07	29,20	29,00	60,90	95,6		
6,01	29,20	29,20	60,65	96,3		
6,00	29,50	29,50	60,56	97,4		
6,00	28,30	28,40	60,56	93,6	Povprečje	97,0%
6,01	29,30	29,30	60,69	96,6	S.D.:	3,6%
6,01	29,10	29,10	60,69	95,9	K.V.:	3,8%
18,02	89,10	88,80	174,23	102,1		
18,02	86,40	86,30	174,23	99,1		

Nadaljevanje preglednice XII: Vezava paracetamola na sistem za ravnotežno dializo

$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC _A	AUC _B	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo		
18,13	83,70	83,70	175,27	95,5		
18,20	88,40	87,90	175,96	100,2		
18,20	88,60	88,60	175,96	100,7		
18,05	86,20	86,00	180,08	95,6		
18,07	87,40	87,40	180,32	96,9		
18,02	90,40	89,40	179,85	100,0		
18,18	89,30	90,30	184,32	97,4		
18,18	90,70	91,10	184,32	98,6		
18,20	86,60	86,10	184,56	93,6		
18,22	88,70	88,90	184,69	96,2		
18,22	91,20	88,00	184,69	97,0		
18,02	88,80	88,30	182,64	97,0		
18,00	89,50	89,30	182,40	98,0		
18,00	85,10	84,60	182,40	93,0	Povprečje	97,3%
18,04	87,20	87,30	182,77	95,5	S.D.:	2,4%
18,04	87,40	87,20	182,77	95,5	K.V.:	2,5%
30,04	144,80	144,50	289,89	99,8		
30,22	136,70	136,50	291,62	93,7		
30,22	129,10	128,50	291,62	88,3		
30,34	147,60	147,60	292,77	100,8		
30,34	147,00	146,80	292,77	100,4		
30,08	140,80	138,90	299,49	93,4		
30,08	144,50	143,20	299,49	96,1		
30,12	147,70	146,80	299,89	98,2		
30,04	152,20	151,50	299,09	101,5		
30,30	152,00	151,80	307,86	98,7		
30,34	147,50	146,50	308,27	95,4		
30,34	145,80	144,60	308,27	94,2		
30,36	152,00	152,10	308,47	98,6		
30,36	152,50	149,40	308,47	97,9		
30,04	144,70	144,30	304,64	94,9		
30,04	148,80	146,30	304,64	96,9		
30,00	145,40	145,50	304,23	95,6	Povprečje	96,6%
30,08	147,40	147,00	305,05	96,5	S.D.:	3,2%
30,08	145,60	145,50	305,05	95,4	K.V.:	3,3%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija paracetamola v standardni raztopini paracetamola, AUC_A in AUC_B - površini pod kromatografskim vrhom paracetamola na eni in drugi strani dializne celice v ravnotežju, dAUC - izračunana površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, ki bi jo določili, če se paracetamol ne bi nič vezal na sistem za ravnotežno dializo

4.1.3.3 VEZAVA PARACETAMOLA NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

Preglednica XIII prikazuje vezavo paracetamola na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah paracetamola.

Preglednica XIII: Vezava paracetamola na plazemske albumine

$c_{a(p)}$ [mg/L]	$c_{a1(p)}$ [mg/L]	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	c_{pl} [mg/L]	β [%]		
6,04	5,86	2,68	0,49	3,18	15,5		
6,04	5,86	2,60	0,67	3,26	20,4		
6,02	5,84	2,75	0,34	3,09	11,0		
6,02	5,84	2,75	0,34	3,09	11,0		
6,01	5,83	2,56	0,70	3,27	21,6		
6,01	5,83	2,62	0,59	3,21	18,3		
6,01	5,83	2,53	0,76	3,30	23,2		
6,00	5,82	2,60	0,62	3,22	19,2		
6,00	5,82	2,68	0,46	3,14	14,7	Povprečje (n=11):	17,1%
6,00	5,82	2,67	0,48	3,15	15,3	S.D.:	4,0%
6,00	5,82	2,63	0,56	3,19	17,5	K.V.:	23,5%
18,13	17,64	7,67	2,30	9,97	23,0		
18,13	17,64	7,60	2,45	10,05	24,4		
18,07	17,58	7,82	1,95	9,77	20,0		
18,07	17,58	7,77	2,05	9,81	20,8		
18,07	17,58	8,02	1,54	9,56	16,1		
18,18	17,69	8,26	1,17	9,43	12,4		
18,18	17,69	8,31	1,07	9,38	11,4		
18,18	17,69	8,33	1,03	9,36	11,0		
18,20	17,71	8,38	0,96	9,34	10,3		
18,20	17,71	8,25	1,21	9,46	12,8		
18,02	17,54	8,45	0,64	9,09	7,1		
18,02	17,54	7,76	2,02	9,78	20,7		
18,02	17,54	8,31	0,92	9,23	10,0		
18,00	17,51	7,99	1,53	9,52	16,0	Povprečje (n= 16):	15,7%
18,00	17,51	8,00	1,51	9,51	15,8	S.D.:	5,2%
18,00	17,51	7,80	1,92	9,72	19,7	K.V.:	33,3%
30,04	29,02	13,66	1,69	15,36	11,0		
30,04	29,02	13,36	2,29	15,65	14,6		
30,22	29,19	12,66	3,87	16,53	23,4		
30,22	29,19	12,81	3,58	16,39	21,9		
30,12	29,10	13,30	2,50	15,80	15,8		
30,12	29,10	13,43	2,23	15,66	14,3		
30,30	29,27	13,34	2,60	15,93	16,3		
30,30	29,27	13,53	2,21	15,74	14,1		
30,34	29,31	13,81	1,69	15,50	10,9		
30,34	29,31	13,03	3,25	16,28	20,0		
30,34	29,31	13,78	1,75	15,53	11,3		
30,04	29,02	13,07	2,87	15,95	18,0		

Nadaljevanje preglednice XIII: Vezava paracetamola na plazemske albumine

$c_{d(P)}$ [mg/L]	$c_{d1(P)}$ [mg/L]	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	c_{pl} [mg/L]	β [%]		
30,04	29,02	13,15	2,71	15,87	17,1		
30,04	29,02	12,60	3,82	16,42	23,2		
30,04	29,02	13,16	2,70	15,86	17,0	Povprečje (n=17):	16,0%
30,00	28,98	13,21	2,56	15,77	16,2	S.D.:	4,5%
30,00	28,98	13,96	1,06	15,02	7,1	K.V.:	28,1%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v raztopini albuminov, $c_{d1(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo zdravilne učinkovine na sistem za ravnotežno dializo, c_f [mg/L]- koncentracija nevezanega paracetamola v pufru v stanju ravnotežja, c_b [mg/L]- koncentracija vezanega paracetamola v raztopini albuminov v stanju ravnotežja, c_{pl} [mg/L] - celokupna koncentracija paracetamola v raztopini albuminov v stanju ravnotežja, β [%]- odstotek vezanega paracetamola na plazemske albumine

4.1.4 ULTRAFILTRACIJA

4.1.4.1 VEZAVA PARACETAMOLA NA SISTEM ZA ULTRAFILTRACIJO

Iz preglednice XIV lahko razberemo v kolikšnem odstotku se paracetamol veže na sistem za ultrafiltracijo.

Preglednica XIV: Vezava paracetamola na sistem za ultrafiltracijo

$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ultrafiltracijo		
6,02	54,80	60,68	90,3	Povprečje (n=3):	95,4%
6,02	58,10	60,76	95,6	S.D.:	4,9%
6,01	60,70	60,60	100,2	K.V.:	5,2%
18,05	184,10	180,08	102,2	Povprečje (n=3):	98,3%
18,07	162,20	180,32	90,0	S.D.:	7,2%
18,02	184,70	179,85	102,7	K.V.:	7,4%
30,08	274,50	299,49	91,7	Povprečje (n=3):	94,6%
30,12	294,90	299,89	98,3	S.D.:	3,4%
30,04	280,20	299,09	93,7	K.V.:	3,6%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija paracetamola v standardni raztopini, AUC- površina pod kromatografskim vrhom paracetamola v ultrafiltratu, dAUC- izračunana površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, ki bi jo določili, če se paracetamol ne bi nič vezal na sistem za ultrafiltracijo

4.1.4.2 VEZAVA PARACETAMOLA NA PLAZEMSKA ALBUMINE

V preglednici XV vidimo kakšen odziv dajejo pri retencijskem času paracetamola slepe albuminske raztopine po ultrafiltraciji.

Preglednica XV: Odziv slepih albuminskih raztopin (AUC_{sl}) po ultrafiltraciji

AUC_{sl}	
7,2	
7,2	Povprečje:
7,6	S.D.:
8,9	K.V.:
	7,7
	0,8
	10,4%

Preglednica XVI prikazuje vezavo paracetamola na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah paracetamola.

Preglednica XVI: Vezava paracetamola na plazemske albumine

c_{d(P)} [mg/L]	c_{d1(P)} [mg/L]	AUC- AUC_{sl}	c_{r(P)} [mg/L]	c_{b(P)} [mg/L]	β [%]		
6,02	5,74	48,98	4,84	0,90	15,7		
6,02	5,75	47,78	4,72	1,03	17,9		
6,02	5,75	54,78	5,42	0,33	5,7	Povprečje (n=5):	11,8%
6,04	5,76	49,78	5,00	0,75	13,1	S.D.:	5,5%
6,04	5,76	53,48	5,38	0,38	6,6	K.V.:	46,2%
18,05	17,74	167,18	16,75	0,99	5,6		
18,05	17,74	148,48	14,86	2,88	16,2		
18,07	17,77	142,28	14,24	3,53	19,9		
18,07	17,77	164,38	16,47	1,30	7,3	Povprečje (n=6):	12,8%
18,11	17,80	160,28	16,11	1,70	9,5	S.D.:	6,0%
18,11	17,80	144,98	14,57	3,23	18,2	K.V.:	47,3%
30,08	28,46	244,58	24,55	3,91	13,7		
30,12	28,49	240,58	24,14	4,35	15,3		
30,12	28,49	275,68	27,68	0,81	2,9		
30,18	28,55	243,98	24,51	4,04	14,1		
30,16	28,53	273,08	25,24	3,29	11,5		
30,16	28,53	281,88	26,05	2,48	8,7	Povprečje (n=8):	11,4%
30,08	28,46	266,48	24,63	3,82	13,4	S.D.:	4,0%
30,08	28,46	271,68	25,11	3,34	11,7	K.V.:	35,1%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v albuminski raztopini, $c_{d1(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo paracetamola na sistem za ultrafiltracijo, AUC- površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, AUC_{sl} - površina pod kromatografskim vrhom pri retencijskem času paracetamola za slepo raztopino albuminov $c_{r(P)}$ [mg/L] - koncentracija nevezanega paracetamola v ultrafiltratu, $c_{b(P)}$ [mg/L]- koncentracija vezanega paracetamola v raztopini albuminov po ultrafiltraciji, β [%], - odstotek vezave paracetamola na plazemske albumine

4.1.5 ULTRACENTRIFUGIRANJE

4.1.5.1 VEZAVA PARACETAMOLA NA SISTEM ZA ULTRACENTRIFUGIRANJE

Iz preglednice XVII lahko razberemo v kolikšnem odstotku se paracetamol veže na epice za ultracentrifugiranje.

Preglednica XVII: Vezava paracetamola na epice za ultracentrifugiranje

$c_{d(P)}$ [mg/L]	AUC	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ultracentrifugiranje		
6,04	64,90	61,60	105,4	Povprečje (n=3):	100,2%
6,03	60,80	61,52	98,8	S.D.:	4,6%
6,04	61,00	63,26	96,4	K.V.:	4,6%
18,08	181,20	185,28	97,8	Povprečje (n=3):	95,9%
18,11	180,50	190,49	94,8	S.D.:	1,7%
18,08	180,90	190,24	95,1	K.V.:	1,7%
30,18	303,60	309,46	98,1	Povprečje (n=3):	97,3%
30,18	306,60	317,72	96,5	S.D.:	0,8%
30,14	309,10	317,29	97,4	K.V.:	0,8%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija paracetamola v standardni raztopini paracetamola, AUC- določena površina pod kromatografskim vrhom paracetamola v supernatantu, dAUC - izračunana površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, ki bi jo določili, če se paracetamol ne bi nič vezal na sistem za ultracentrifugiranje

4.1.5.2 VEZAVA PARACETAMOLA NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

V preglednici XVIII vidmo kakšne odzive dajejo pri retencijskem času paracetamola slepe albuminske raztopine po ultracentrifugiranju.

Preglednica XVIII: Odziv slepih albuminskih raztopin (AUC_{sl}) po ultracentrifugiranju

AUC_{sl}		
9,4		
9,0		
9,1		
9,8	Povprečje:	9,5
9,8	S.D.:	0,4
9,9	K.V.:	4,1%

Preglednica XIX prikazuje vezavo paracetamola na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah paracetamola.

Preglednica XIX: Vezava paracetamola na plazemske albumine

$c_{d(P)}$ [mg/L]	$c_{dI(P)}$ [mg/L]	AUC- AUC _{sl}	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	β [%]		
6,03	6,03	58,10	5,38	0,65	10,8		
6,02	6,02	57,40	5,32	0,70	11,6	Povprečje	11,1%
6,04	6,04	54,60	5,35	0,68	11,3	S.D.:	0,4%
6,03	6,03	54,90	5,38	0,64	10,7	K.V.:	3,9%
18,10	17,35	174,30	16,12	1,24	7,1		

Nadaljevanje preglednice XXIV: Stabilnost ibuprofena

$c_{d(P)}$ [mg/L]	$c_{d1(P)}$ [mg/L]	AUC- AUC _{sl}	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	β [%]		
18,05	17,31	170,50	15,77	1,54	8,9		
18,11	17,37	168,20	16,42	0,95	5,4		
18,08	17,34	163,40	15,95	1,39	8,0	Povprečje	7,1%
18,11	17,37	170,40	16,20	1,16	6,7	S.D.:	1,2%
18,08	17,34	170,60	16,22	1,12	6,5	K.V.:	17,1%
30,16	29,35	277,40	25,64	3,70	12,6		
30,08	29,27	274,40	25,36	3,90	13,3		
30,18	29,37	275,20	26,84	2,52	8,6		
30,14	29,33	275,30	26,85	2,47	8,4	Povprečje	10,0%
30,18	29,37	282,30	26,82	2,55	8,7	S.D.:	2,3%
30,14	29,33	282,90	26,88	2,45	8,4	K.V.:	23,2%

Opomba: $c_{d(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v albuminski raztopini, AUC - površina pod kromatografskim vrhom paracetamola, AUC_{sl} - površina pod kromatografskim vrhom pri retencijskem času paracetamola za slepo raztopino albuminov, $c_{d1(P)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija paracetamola v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo paracetamola na sistem za ultracentrifugiranje, c_f [mg/L] - koncentracija nevezanega paracetamola v supernatantu, c_b [mg/L] - koncentracija vezanega paracetamola v raztopini albuminov po ultracentrifugiranju, β [%] - odstotek vezave paracetamola na plazemske albumine

4.1.6 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

4.1.6.1 Dvofaktorska ANOVA

Preglednica XX prikazuje vpliv posamezne opisne spremenljivke (metode in koncentracije) ter njune interakcije (metoda*koncentracija) na vezavo paracetamola na albumine.

Preglednica XX: Odvisne spremenljivke

Spremenljivka	p
Metoda	9,4175*10 ⁻⁷
Koncentracija paracetamola	0,567
Metoda*Koncentracija paracetamola	0,703

4.1.6.2 Enofaktorska ANOVA za metodo

Z enofaktorsko Anovo smo potrdili, da metoda značilno vpliva na vezavo paracetamola na humane albumine (p=0,0000005). Z Levenov testom smo ugotovila, da med posameznimi skupinami meritev obstajajo značilne razlike v homogenosti varianc (p=0,017), zato smo v nadaljevanju za ugotavljanje razlik v vezavi na albumine v odvisnosti od uporabljene metode uporabili Games-Howell-ov test (preglednica XXI).

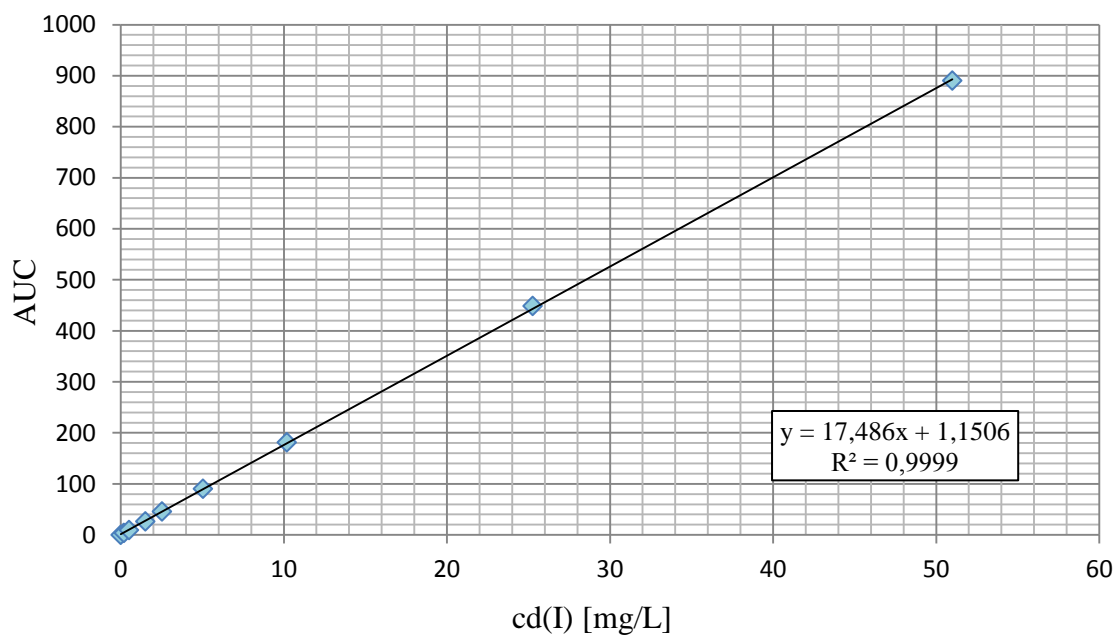
Preglednica XXI: Rezultati Games-Howell testa

Metoda 1	Metoda 2	p
Ravnotežna dializa	Ultrafiltracija	0,008
Ravnotežna dializa	Ultracentrifugiranje	6,05*10 ⁻⁹
Ultrafiltracija	Ultracentrifugiranje	0,088

4.2 IBUPROFEN

4.2.1 UMERITVENA PREMICA

Na sliki 15 in v preglednici XXII je predstavljen primer umeritvene premice iz standardnih raztopin ibuprofena in točnost povratno izračunanih koncentracij. Preglednica XXIII prikazuje enačbe posameznih umeritvenih premic ibuprofena.



Slika 15: Primer umeritvene premice ibuprofena

Preglednica XXII: Umeritvena premica- ibuprofen

Ime vzorca	$c_{(t)}$ [mg/L]	$c_{d(t)}$ [mg/L]	AUC	$c_{i(t)}$ [mg/L]	Točnost [%]
st. 0	0	0	0	/	/
st. 1	0,20	0,20	3,6	0,14	69,3
st. 2	0,50	0,51	9,0	0,45	88,0
st. 3	1,50	1,52	26,2	1,43	94,5
st. 4	2,50	2,55	45,8	2,55	100,1
st. 5	5,00	5,06	90,3	5,10	100,9
st. 6	10,00	10,20	181,2	10,30	100,9
st. 7	25,00	25,28	448,3	25,57	101,2
st. 8	50,00	51,00	890,0	50,83	99,7

Opomba: $c_{(t)}$ [mg/L]- načrtovana koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, $c_{d(t)}$ [mg/L] - dejanska koncentracija ibuprofena v standardni raztopini AUC - površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, $c_{i(t)}$ [mg/L]- povratno izračunana koncentracija ibuprofena v standardni raztopini

Preglednica XXIII: Primerjava enačb posameznih umeritvenih premic ibuprofena

Enačba umeritvene premice		
$y=18,196x+0,0607$		
$y=17,595x-0,6214$		
$y=17,441x+1,4918$		
$y=15,983x+5,0047$		
$y=16,387x+1,7863$		
$y=17,032x+1,938$		
$y=17,486x+1,1506$	Povprečje:	17,2
$y=17,172x+0,8943$	S.D.:	0,7
$y=17,138x+1,4064$	KV.:	3,8%

4.2.2 RAVNOTEŽNA DIALIZA

4.2.2.1 STABILNOST IBUPROFENA

V preglednici XXIV vidimo kolikšen del ibuprofena ne razpade pri pogojih ravnotežne dialize.

Preglednica XXIV: Stabilnost ibuprofena

$c_{(t)}$ [mg/L]	$c_{d(t)}$ [mg/L]	$c_{n(t)}$ [mg/L]	Stabilnost [%]	
10,00	10,37	11,31	109,1	
	10,37	11,27	108,7	
	10,37	11,10	107,0	
	10,00	11,02	110,2	
	10,00	10,67	106,7	
	10,00	10,94	109,4	

Nadaljevanje preglednice XXIV: Stabilnost ibuprofena

$c_{(t)}$ [mg/L]	$c_{d(t)}$ [mg/L]	$c_{n(t)}$ [mg/L]	Stabilnost [%]		
10,00	10,03	10,33	102,9		S.D.: 4,1
	10,02	9,84	98,2		K.V.: 3,8%
25,00	25,93	28,33	109,3		
	25,93	28,34	109,3		
	25,93	28,37	109,4		
	25,00	23,15	92,6		
	25,00	23,09	92,3		
	25,00	22,61	90,4		Povprečje (n=8): 100,4
	25,08	25,39	101,2		S.D.: 8,2
	25,06	24,65	98,4		K.V.: 8,2%
50,00	51,85	55,95	107,9		
	51,85	55,90	107,8		
	51,85	55,67	107,4		
	50,00	54,29	108,6		
	50,00	54,12	108,2		
	50,00	53,91	107,8		Povprečje (n=8): 106,1
	50,16	51,49	102,7		S.D.: 3,6
	50,12	49,38	98,5		K.V.: 3,4%

Opomba: $c_{(t)}$ [mg/L]- načrtovana koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, $c_{d(t)}$ [mg/L]- koncentracija ibuprofena v sveže pripravljene standardni raztopini, $c_{n(t)}$ [mg/L]- koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, ki je bila izpostavljena pogojem ravnotežne dialize

4.2.2.2 VEZAVA IBUPROFENA NA SISTEM ZA RAVNOTEŽNO DIALIZO

V preglednici XXV je prikazano v kolikšnem odstotku se ibuprofen veže na sistem za ravnotežno dializo.

Preglednica XXV: Vezava ibuprofena na sistem za ravnotežno dializo

$c_{d(t)}$ [mg/L]	AUC _A	AUC _B	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo
10,00	88,00	86,40	175,90	99,1
10,00	88,10	86,90	175,90	99,5
10,00	88,60	87,90	175,90	100,3
10,00	87,80	86,80	175,90	99,3
10,00	89,40	88,80	175,90	101,3
10,37	86,70	85,70	170,75	101,0
10,37	91,50	90,40	170,75	106,5
10,37	87,40	86,50	170,75	101,8
10,00	88,30	87,60	165,66	106,2

Nadaljevanje preglednice XXV: Vezava ibuprofena na sistem za ravnotežno dializo

$c_{d(t)}$ [mg/L]	AUC _A	AUC _B	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ravnotežno dializo		
10,00	87,60	86,70	165,66	105,2		
10,03	84,30	83,80	172,80	97,3		
10,02	80,40	79,70	172,67	92,7	Povprečje	100,2%
10,03	86,00	85,00	172,80	99,0	S.D.:	4,1%
10,02	81,00	80,20	172,67	93,4	K.V.:	4,1%
25,00	221,70	219,40	437,52	100,8		
25,00	220,30	216,90	437,52	99,9		
25,00	218,60	215,20	437,52	99,2		
25,00	218,20	215,30	437,52	99,1		
25,00	227,30	223,70	437,52	103,1		
25,93	225,60	221,10	419,36	106,5		
25,93	231,30	228,40	419,36	109,6		
25,93	216,30	213,20	419,36	102,4		
25,00	215,70	213,60	411,46	104,3		
25,08	218,50	213,80	429,01	100,7	Povprečje	101,5%
25,06	208,90	207,40	428,76	97,1	S.D.:	4,0%
25,08	204,90	203,40	429,10	95,2	K.V.:	4,0%
50,00	446,20	440,80	873,50	101,5		
50,00	448,40	446,20	873,54	102,4		
50,00	430,10	428,00	873,54	98,2		
50,00	457,40	455,30	873,54	104,5		
50,00	436,60	429,90	873,54	99,2		
51,85	446,80	441,10	833,72	106,5		
51,85	441,20	436,90	833,72	105,3		
51,85	435,90	432,30	833,72	104,1		
51,85	453,40	447,30	833,72	108,0		
50,00	430,00	426,80	821,14	104,3		
50,00	413,10	409,20	821,14	100,1		
50,16	435,40	432,60	856,26	101,4	Povprečje	102,4%
50,16	424,50	412,40	856,26	97,7	S.D.:	3,2%
50,12	430,10	423,80	855,58	99,8	K.V.:	3,1%

Opomba: $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, AUC_A in AUC_B- določeni površini pod kromatografskim vrhom ibuprofena na eni in drugi strani dializne celice v ravnotežju, dAUC- izračunana površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, ki bi jo določili, če se ibuprofen ne bi nič vezal na sistem za ravnotežno dializo

4.2.2.3 VEZAVA IBUPROFENA NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

Preglednica XXVI prikazuje vezavo ibuprofena na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah ibuprofena.

Preglednica XXVI: Vezava ibuprofena na plazemske albumine

$c_{d(i)}$ [mg/L]	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	c_{pl} [mg/L]	β [%]		
10,04	0,42	9,20	9,62	95,6		
10,04	0,35	9,33	9,69	96,3		
10,00	0,36	9,28	9,64	96,3		
10,00	0,37	9,26	9,63	96,2		
10,00	0,36	9,27	9,64	96,2		
10,00	0,36	9,28	9,64	96,3		
10,00	0,24	9,52	9,76	97,6		
10,00	0,26	9,49	9,74	97,4		
10,00	0,24	9,51	9,76	97,5		
10,00	0,26	9,47	9,74	97,3		
10,13	0,21	9,71	9,92	97,9		
10,13	0,20	9,72	9,93	98,0		
10,13	0,22	9,69	9,91	97,8	Povprečje (n=15):	97,1%
10,08	0,20	9,67	9,88	97,9	S.D.:	0,8%
10,08	0,23	9,63	9,85	97,7	K.V.:	0,8%
25,10	0,86	23,37	24,24	96,4		
25,10	0,96	23,17	24,14	96,0		
25,10	0,89	23,32	24,21	96,3		
25,00	0,81	23,38	24,19	96,6		
25,00	0,79	23,41	24,21	96,7		
25,00	0,81	23,39	24,19	96,7		
25,00	0,79	23,41	24,21	96,7		
25,33	0,74	23,85	24,59	97,0		
25,33	0,74	23,84	24,58	97,0		
25,33	0,77	23,78	24,55	96,9		
25,20	0,71	23,77	24,49	97,1	Povprečje (n=13):	96,7%
25,20	0,72	23,76	24,48	97,1	S.D.:	0,3%
25,20	0,68	23,83	24,52	97,2	K.V.:	0,4%
50,20	1,81	46,58	48,39	96,3		
50,20	1,87	46,47	48,33	96,1		
50,20	1,91	46,37	48,29	96,0		
50,00	1,75	46,51	48,25	96,4		
50,00	1,72	46,56	48,28	96,4		
50,00	1,72	46,56	48,28	96,4		
50,00	1,75	46,50	48,25	96,4		
50,00	1,73	46,54	48,27	96,4		
50,00	1,75	46,50	48,25	96,4		
50,00	1,74	46,52	48,26	96,4		
50,00	1,78	46,45	48,22	96,3		
50,65	1,65	47,34	49,00	96,6		
50,65	1,52	47,61	49,13	96,9		
50,40	1,62	47,15	48,78	96,7	Povprečje (n=16):	96,5%
50,40	1,57	47,26	48,83	96,8	S.D.:	0,2%
50,40	1,60	47,20	48,80	96,7	K.V.:	0,2%

Opomba: $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v raztopini albuminov, c_f [mg/L]- koncentracija nevezanega ibuprofena v pufru v stanju ravnotežja, c_b [mg/L]- koncentracija vezanega ibuprofena v raztopini albuminov v stanju ravnotežja, c_{pl} [mg/L]- celokupna koncentracija ibuprofena v raztopini albuminov v stanju ravnotežja, β [%]- odstotek vezanega ibuprofena na plazemske albumine

4.2.3 ULTRAFILTRACIJA

4.2.3.1 VEZAVA IBUPROFENA NA SISTEM ZA ULTRAFILTRACIJO

Iz preglednice XXVII lahko razberemo v kolikšnem odstotku se ibuprofen veže na sistem za ultrafiltracijo.

Preglednica XXVII: Vezava ibuprofena na sistem za ultrafiltracijo

$c_{d(t)}$ [mg/L]	AUC	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ultrafiltracijo		
10,00	147,90	175,33	84,4		
10,00	148,90	175,33	84,9		
10,00	145,30	175,33	82,9		
10,37	155,00	170,75	90,8		
10,37	155,30	170,75	91,0		
10,37	162,90	170,75	95,4	Povprečje (n=8):	88,3%
10,03	155,50	172,80	90,0	S.D.:	4,2%
10,02	149,80	172,53	86,8	K.V.:	4,8%
25,93	405,80	419,36	96,8		
25,93	402,10	419,36	95,9		
25,93	392,80	419,36	93,7	Povprečje (n=5):	92,6
25,08	387,50	429,10	90,3	S.D.:	4,2
25,06	370,80	428,76	86,5	K.V.:	4,6%
50,00	732,00	879,13	83,3		
50,00	727,00	879,13	82,7		
50,00	721,90	879,13	82,1		
51,85	785,20	833,72	94,2		
51,85	751,40	833,72	90,1		
51,85	777,80	833,72	93,3	Povprečje (n=8):	87,8
50,16	767,80	856,26	89,7	S.D.:	4,8
50,12	744,50	855,58	87,0	K.V.:	5,4%

Opomba: $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, AUC- površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena v ultrafiltratu, dAUC - izračunana površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, ki bi jo določili, če se ibuprofen ne bi nič vezal na sistem za ultrafiltracijo

4.2.3.2 VEZAVA IBUPROFENA NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

Preglednica XXVIII prikazuje vezavo ibuprofena na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah ibuprofena.

Preglednica XXVIII: Vezava ibuprofena na plazemske albumine

$c_{d(t)}$ [mg/L]	$c_{a1(t)}$ [mg/L]	AUC	$c_{f(t)}$ [mg/L]	$c_{b(t)}$ [mg/L]	β [%]		
10,37	9,16	6,40	0,09	9,07	99,0		
10,37	9,16	5,80	0,05	9,11	99,5		
10,37	9,16	5,50	0,03	9,13	99,7	Povprečje (n=5):	98,7%
10,13	8,94	5,70	0,22	8,72	97,5	S.D.:	1,0%
10,08	8,90	5,50	0,21	8,69	97,7	K.V.:	1,0%
25,93	24,01	14,00	0,56	23,44	97,7		
25,93	24,01	13,40	0,53	23,48	97,8		
25,93	24,01	14,00	0,56	23,44	97,7	Povprečje (n=5):	97,4%
25,33	23,45	14,70	0,75	22,70	96,8	S.D.:	0,5%
25,20	23,34	14,30	0,73	22,61	96,9	K.V.:	0,5%
51,85	45,52	24,80	1,24	44,29	97,3		
51,85	45,52	22,90	1,12	44,40	97,5		
51,85	45,52	23,10	1,13	44,39	97,5	Povprečje (n=5):	97,0%
50,65	44,47	29,40	1,61	42,86	96,4	S.D.:	0,6%
50,40	44,25	29,70	1,63	42,62	96,3	K.V.:	0,6%

Opomba: $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v albuminski raztopini, $c_{a1(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo ibuprofena na sistem za ultrafiltracijo, AUC - površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, $c_{f(t)}$ [mg/L]- koncentracija nevezanega ibuprofena v ultrafiltratu, $c_{b(t)}$ [mg/L]- koncentracija vezanega ibuprofena v raztopini albuminov po ultrafiltraciji, β [%]- odstotek vezave ibuprofena na plazemske albumine

4.2.4 ULTRACENTRIFUGIRANJE

4.2.4.1 VEZAVA IBUPROFENA NA SISTEM ZA ULTRACENTRIFUGIRANJE

Iz preglednice XXIX lahko razberemo v kolikšnem odstotku se ibuprofen veže na epice za ultracentrifugiranje.

Preglednica XXIX: Vezava ibuprofena na epice za ultracentrifugiranje

$c_{d(t)}$ [mg/L]	AUC	dAUC	% ZU, ki se ne veže na sistem za ultracentrifugiranje		
10,02	170,80	172,96	98,8	Povprečje (n=3):	97,7%
10,05	170,00	173,47	98,0	S.D.:	1,2%
10,02	167,00	173,13	96,5	K.V.:	1,2%
25,05	424,60	431,05	98,5	Povprečje (n=3):	98,8%
25,13	428,70	432,34	99,2	S.D.:	0,3%
25,13	427,00	432,00	98,8	K.V.:	0,3%
50,10	839,30	861,12	97,5	Povprečje (n=3):	98,2%
50,10	836,10	860,02	97,2	S.D.:	1,6%
50,25	862,80	862,59	100,0	K.V.:	1,6%

Opomba: : $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v standardni raztopini, AUC - določena površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena v supernatantu, dAUC - izračunana površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, ki bi jo določili, če se ibuprofen ne bi nič vezal na sistem za ultracentrifugiranje

4.2.4.2 VEZAVA IBUPROFENA NA PLAZEMSKÉ ALBUMINE

Preglednica XXX prikazuje vezavo ibuprofena na plazemske albumine pri treh različnih koncentracijah ibuprofena.

Preglednica XXX: Vezava ibuprofena na plazemske albumine

$c_{d(t)}$ [mg/L]	$c_{d1(t)}$ [mg/L]	AUC	c_f [mg/L]	c_b [mg/L]	β [%]		
10,11	9,88	9,50	0,48	9,40	95,2		
10,20	9,97	9,30	0,47	9,50	95,3		
10,02	9,79	8,90	0,47	9,32	95,2		
10,05	9,82	8,30	0,43	9,39	95,6	Povprečje (n=6):	93,1%
10,02	9,79	16,20	0,86	8,93	91,2	S.D.:	3,9%
10,05	9,82	25,30	1,39	8,42	85,8	K.V.:	4,2%
25,28	24,97	18,30	0,98	23,99	96,1		
25,50	25,19	22,10	1,20	24,00	95,2		
25,05	24,75	23,30	1,30	23,44	94,7		
25,13	24,82	30,20	1,71	23,12	93,1	Povprečje (n=6):	89,2%
25,05	24,75	77,70	4,45	20,30	82,0	S.D.:	9,1%
25,13	24,82	111,70	6,44	18,39	74,1	K.V.:	10,2%
50,55	49,64	38,20	2,12	47,52	95,7		
51,00	50,08	41,30	2,30	47,79	95,4		
50,10	49,20	276,70	16,06	33,14	67,4		
50,25	49,35	134,70	7,79	41,55	84,2	Povprečje (n=6):	84,6%
50,10	49,20	157,00	9,08	40,12	81,5	S.D.:	10,5%
50,25	49,35	142,30	8,22	41,12	83,3	K.V.:	12,4%

Opomba: $c_{d(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v albuminski raztopini, $c_{d1(t)}$ [mg/L]- dejanska koncentracija ibuprofena v raztopini albuminov, upoštevajoč vezavo ibuprofena na sistem za ultracentrifugiranje, AUC- površina pod kromatografskim vrhom ibuprofena, c_f [mg/L]- koncentracija nevezanega ibuprofena v supernatantu, c_b [mg/L]- koncentracija vezanega ibuprofena v raztopini albuminov po ultracentrifugiranju, β [%]- odstotek vezave ibuprofena na plazemske albumine

4.2.5 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

4.2.5.1 Dvofaktorska ANOVA

Preglednica XXXI prikazuje vpliv posamezne opisne spremenljivke (metode in koncentracije) ter njune interakcije (metoda*koncentracija) na vezavo ibuprofena na albumine.

Preglednica XXXI: Odvisne spremenljivke

Spremenljivka	p
Metoda	$6,6766 \cdot 10^{-10}$
Koncentracija ibuprofena	0,063
Metoda*Koncentracija ibuprofena	0,076

4.2.5.2 Enofaktorska ANOVA za metodo

Z enofaktorsko Anovo smo potrdili, da metoda značilno vpliva na vezavo paracetamola na humane albumine ($p=0,000000003$). Z Levenov testom smo ugotovili, da med posameznimi skupinami meritev obstajajo značilne razlike v homogenosti varianc ($p=4,1877^{10^{-17}}$), zato smo v nadaljevanju za ugotavljanje razlik v vezavi na albumine v odvisnosti od uporabljene metode uporabili Games-Howell-ov test (preglednica XXXII).

Preglednica XXXII: Rezultati Games-Howell testa

Metoda 1	Metoda 2	Sig.
Ravnotežna dializa	Ultrafiltracija	0,009
Ravnotežna dializa	Ultracentrifugiranje	0,003
Ultrafiltracija	Ultracentrifugiranje	0,001

4.2.5.3 Enofaktorska ANOVA za koncentracijo

Preglednica XXXIII prikazuje statistično razliko med sredinami skupin.

Preglednica XXXIII: Vezava na albumine

	Sig.
Med skupinami	0,227

Preglednica XXXIV prikazuje statistične razlike v vezavi na albumine med pari odvisne spremenljivke (koncentracije).

Preglednica XXXIV: Tukey

Metoda 1	Metoda 2	Sig.
10	25	0,599
10	50	0,199
25	50	0,751

5 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil oceniti vezavo dveh zdravilnih učinkovin na humane plazemske albumine s pomočjo treh različnih metod. Za izvedbo naloge smo izbrali dve analgetični učinkovini- paracetamol in ibuprofen. Od vseh možnih zdravilnih učinkovin, ki smo jih imeli na razpolago, sta ti dve najbolj odgovarjali našim zahtevam. Želeli smo zdravilni učinkovini, ki sta topni v izotoničnem fosfatnem pufru, imata ustrezno visoke terapevtske plazemske koncentracije, sta stabilni pri pogojih, ki jih zahteva ravnotežna dializa in dajeta dobre odzive pri HPLC analizi z UV detekcijo. Poleg tega smo želeli, da bi se ti dve zdravilni učinkovini vezali na plazemske albumine v različnih odstotkih. Na podlagi teh zahtev smo se odločili za paracetamol, ki se v območju terapevtskih plazemskih koncentracij le malo veže na plazemske proteine. Literaturni podatki navajajo, da ta odstotek znaša med 10 in 25 %. V nekaterih virih najdemo podatek, da lahko odstotek vezave v primeru zastrupitve naraste tudi do 50 %, medtem ko drugi navajajo, da je vezava le malo odvisna od odmerka (21, 22). Naš naslednji izbor pa je bil ibuprofen, ki se na plazemske proteine veže od 90 do 99 % (23).

Vezavo na plazemske albumine smo za vsako zdravilno učinkovino ocenili s tremi različnimi metodami: ravnotežno dializo, ultrafiltracijo in ultracentrifugiranjem. Ravnotežna dializa velja za zlati standard med metodami za določanje vezave zdravilnih učinkovin na plazemske proteine. Ultrafiltracija in ultracentrifugiranje pa sta zaradi hitrejše izvedbe pogosto uporabljeni metodi v praksi.

5.1 PARACETAMOL

Terapevtske plazemske koncentracije paracetamola znašajo od 5 do 20 mg/L. Albuminske raztopine smo pripravili s tremi različnimi koncentracijami paracetamola; 6, 18 in 30 mg/L. Podatki v literaturi navajajo, da se na proteine v plazmi veže od 10 do 25 % paracetamola. Glede na to, da smo z analizo metodo določali le koncentracije nevezanega paracetamola v ravnotežju, smo v albuminski raztopini s koncentracijo 6 mg/L po poskusu torej pričakovali približno 4,5 do 5,5 mg/L paracetamola (24, 25).

Umeritvena premica za paracetamol, ki smo jo pripravili v koncentracijskem območju paracetamola od 0,6 do 30 mg/L, je bila linearna. Koeficient determinacije znaša 0,9999 in točnost povratno izračunanih koncentracij od 99,3 do 106,0 %. Ugotovili smo, da je točnost analize metode slabša pri najnižjih koncentracijah (106,0% in 102,6%) (preglednica VII in slika 13).

Med razvojem HPLC metode za določanje paracetamola smo ugotovili, da se po ravnotežni dializi določena frakcija humanih albuminov izloča iz kolone sočasno s paracetamolom (sliki 5 in 6). Zato smo naredili umeritveno krivuljo za paracetamol tudi iz standardnih raztopin paracetamola, ki vsebujejo določeno konstantno koncentracijo albuminov (preglednica IX in slika 14).

Ravnotežna dializa je praviloma dolgotrajna metoda. Čas, ki je potreben za vzpostavitev ravnotežja, smo določili eksperimentalno in sicer smo testirali 20 in 48 ur. Ugotovili smo, da se ravnotežje vzpostavi že po 20 urah. Ugotoviti smo morali, kakšna je stabilnost naše učinkovine v tem času. Stabilnost smo preverjali pri vseh treh testiranih koncentracijah paracetamola. najprej smo izmerili odziv sveže pripravljenim raztopinam, nato pa smo raztopine postavili v inkubator na 37°C in po 20 urah ponovno izmerili odzive raztopin. Ugotovili smo, da v testiranih pogojih paracetamol pri nobeni izmed koncentracij ne razpada, zato izgube paracetamola zaradi razpada med ravnotežno dializo v nadaljnih izračunih nismo upoštevali.

Pri metodah ultrafiltracije in ultracentrifugiranja nismo preverjali stabilnosti raztopin, saj je izvedba teh metode hitrejša in je majhna verjetnost, da bi v tem času prišlo do razpada preiskovane učinkovine.

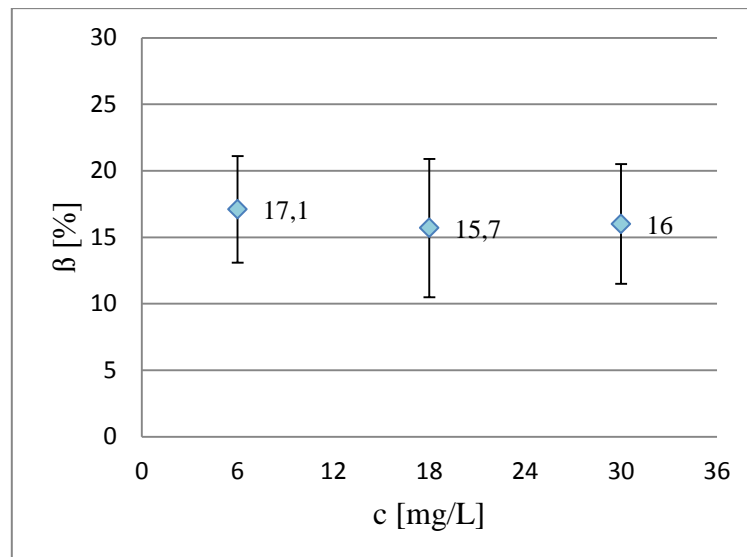
Paracetamol se med ravnotežno dializo izgublja z vezavo na dializne celice in membrano. Ugotovili smo, da se na sistem za ravnotežno dializo veže pri 6 mg/L v povprečju 3 % paracetamola, pri 18 mg/L 2,7 %, pri 30 mg/L pa 3,4 %. Te odstotke smo upoštevali pri izračunu parametrov vezave paracetamola na plazemske albumine. Zaradi vezave paracetamola na sistem za ravnotežno dializo se je namreč zmanjšala količina paracetamola, ki je bila na razpolago za vezavo na plazemske albumine.

Pri ultrafiltraciji se veže na sistem več paracetamola kot pri ravnotežni dializi. In sicer se v povprečju pri najnižji koncentraciji veže 4,6 % paracetamola, pri srednji 1,7 %, pri najvišji pa 5,4 %. Pri ultrafiltraciji je zdravilna učinkovina v stiku z večjo površino sistema kot pri ravnotežni dializi (21), kar je lahko eden od vzrokov višjih odstotkov vezave učinkovine na sistem. Dejstvo pa je tudi, da so sistemi (membrana, plastika) pri različnih metodah sestavljeni iz različnih materialov, kar tudi vpliva na vezavo učinkovin. Odstotek vezave zdravilne učinkovine na sistem za ultrafiltracijo smo upoštevali pri izračunu vezave zdravilne učinkovine na humane albumine. Pri teh izračunih smo dodatno upoštevali še odziv slepe raztopine humanih albuminov po ultrafiltraciji. Določena frakcija humanih albuminov daje namreč po ultrafiltraciji odziv pri enakem retencijskem času kot

paracetamol. Odziv slepe raztopine albuminov je pri ultrafiltraciji majhen (v povprečju 7,7) v primerjavi z najnižjimi odzivi učinkovine, ki so 50 in več.

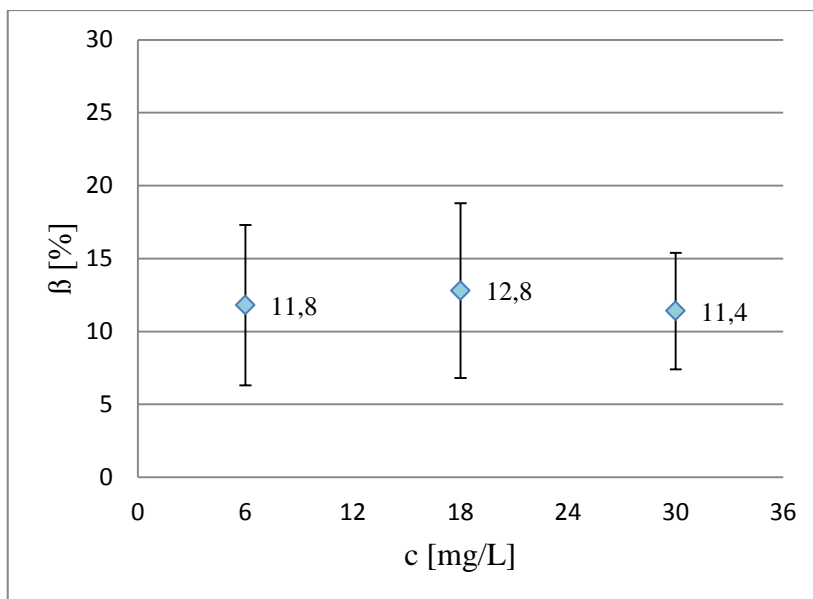
Zadnja metoda, ki smo jo uporabili, je ultracentrifugiranje. Ugotovili smo, da je pri koncentraciji paracetamola 6 mg/L vezava na sistem zanemarljivo majhna. Pri koncentraciji 18 mg/L se na epruvete veže v povprečju 4,1 % paracetamola, pri 30 mg/L pa 2,7 % paracetamola. Pri računanju odstotkov vezave paracetamola na humane albumine smo vezavo paracetamola na epruvete za centrifugiranje upoštevali tako le pri srednji in najvišji koncentraciji paracetamola. Poleg tega smo pri vseh koncentracijah učinkovine upoštevali še odziv albuminske frakcije pri retencijskem času paracetamola.

Po izvedbi ravnotežne dialize in analizi vzorcev smo ugotovili, da je odstotek vezave paracetamola na humane plazemske albumine konstanten v testiranem koncentracijskem območju (slika 16). Dobljene povprečne vrednosti so znotraj intervala, ki ga navaja literatura (od 10 do 20 %) (21, 22). Odstotki vezave se za posamezne raztopine z enako koncentracijo paracetamola zelo razlikujejo. Koeficient variabilnosti znaša tudi do 33 %. Deloma lahko na to vpliva uporaba humanih plazemskih albuminov. Pri delu z biološkim materialom je namreč pričakovana nekoliko večja variabilnost med vzorci. Poleg tega pa je treba upoštevati tudi iztrošenost dializnih celic. Te so namreč v uporabi že veliko let in ne tesnijo več tako dobro. Možno je tudi, da smo pri polnjenju z iglo prebodli membrano ali pa, da je nastal zračni mehurček, zaradi katerega se je zmanjšal volumen vzorca in hkrati tudi površina za dializo, če je bil mehurček na membrani. Med samo inkubacijo lahko pride tudi do izhlapevanja vzorca.



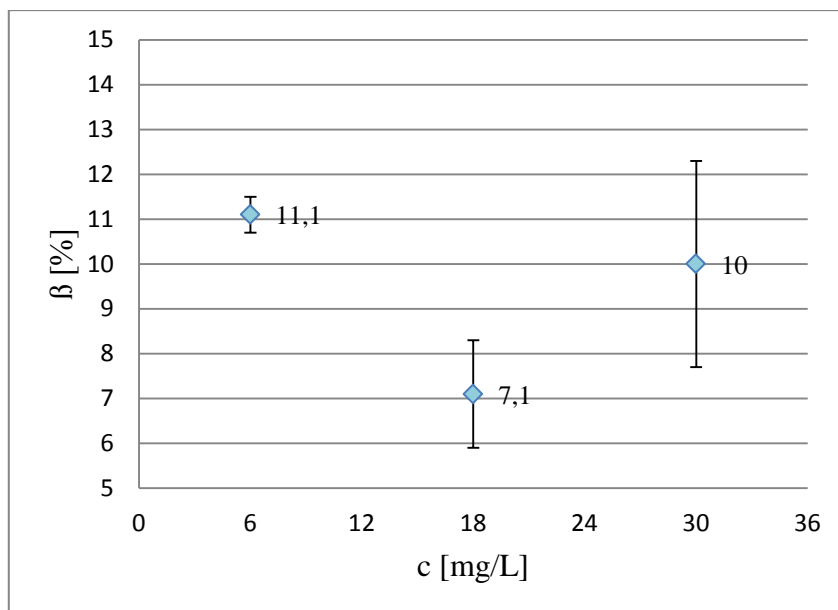
Slika 16: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ravnotežni dializi

Odstotki vezanega paracetamola na albumine, določeni z ultrafiltracijo, so prav tako pri vseh treh koncentracijah zelo podobni in sicer se pri koncentraciji paracetamola 6 mg/L veže na humane albumine 11,8 % zdravilne učinkovine, pri 18 mg/L 12,8 % in pri 30 mg/L 11,4 % (slika 17). Tudi pri tej metodi so vrednosti povprečnih odstotkov znotraj literaturnega intervala. Variabilnost med posameznimi meritvami je pri ultrafiltraciji še večja kot pri ravnotežni dializi, tudi do 47 %. Le malo verjetno je, da bi bila biološka variabilnost humanih albuminov vzrok za tako velike razlike med posameznimi rezultati. Morebiten razlog je lahko uporaba nekoliko starejših sistemov za ultrafiltracijo. Dotrajanost le-teh je lahko vplivala na prepustnost membrane. Zanimljivo pa ni niti človeški faktor. Možno je, da je pri jemanju sistemov iz centrifuge, prenašanju in vzorčenju prišlo do premika notranjega valja in posledično prehoda vzorca preko membrane.

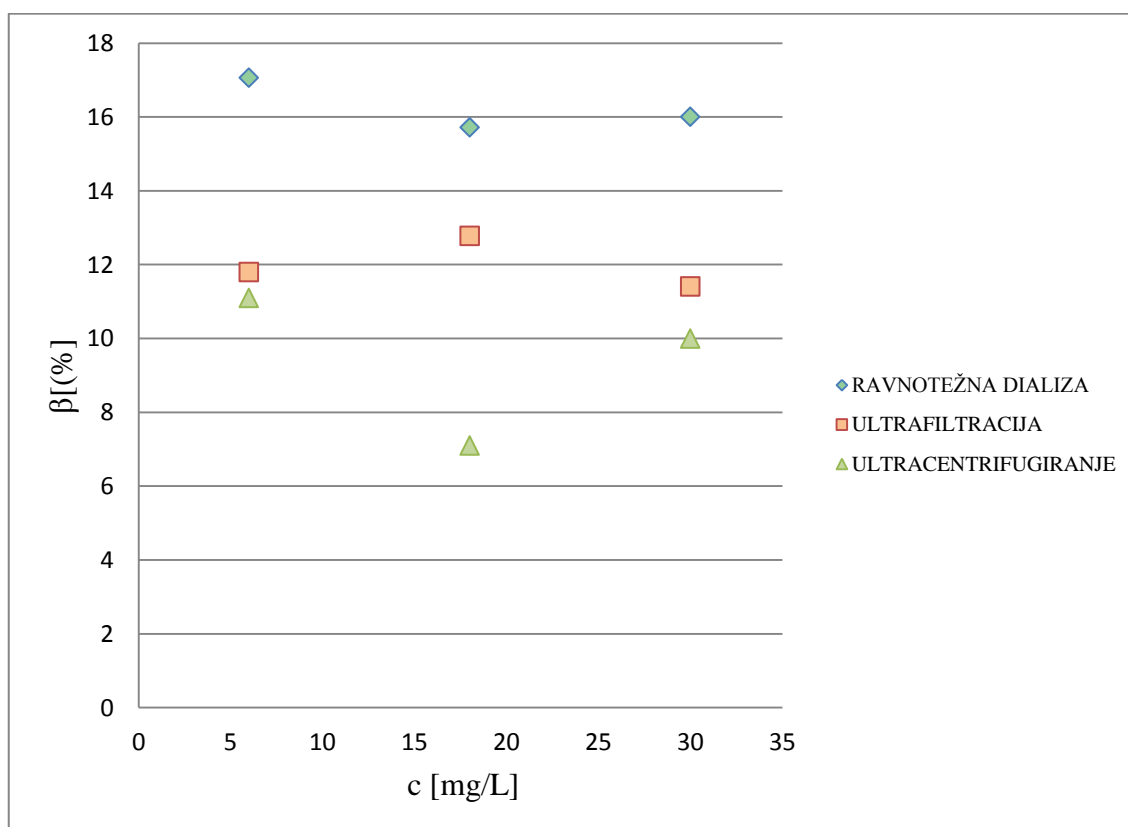


Slika 17: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ultrafiltraciji

Pri ultracentrifugiranju je pri koncentraciji paracetamola 6 mg/L odstotek vezave paracetamola na humane albumine znašal 11,1 %, pri 18 mg/L 7,1 %, pri 30 mg/L pa 10,0 % (slika 18). Odstotek variabilnosti vezave je pri posamezni koncentraciji zdravilne učinkovine veliko nižji kot pri ostalih dveh metodah. Pri koncentraciji paracetamola 6 mg/L je koeficient variabilnosti znašal le 3,93 %. Pri višjih koncentracijah je bila variabilnost nekoliko večja; pri koncentraciji paracetamola 18 mg/L je znašala 17,12 %, pri koncentraciji 30 mg/L pa 23,21%. Menimo, da na variabilnost rezultatov pri tej metodi vpliva tudi vzorčenje po končanem centrifugiranju. Pomembno je, da ne pipetiramo na dnu, kjer nastane usedlina, ki vsebuje tudi na plazemske proteine vezano učinkovino.



Slika 18: Vezava paracetamola na humane plazemske albumine pri ultracentrifugiranju



Slika 19: Vezava paracetamola na humane albumine

S statistično analizo smo ugotovili, da na vezavo paracetamola na plazemske albumine ne vpliva značilno koncentracija paracetamola, ima pa značilen vpliv uporabljena metoda (preglednica XX). In sicer je značilna razlika med rezultati pridobljenimi z ravnotežno

dializo in ultrafiltracijo oz. ultracentrifugiranjem. Ultrafiltracija in ultracentrifugiranje pa nam data rezultate med katerimi ni značilnih razlik (preglednica XXI). Interakcija med obema parametroma (metodo in koncentracijo učinkovine) nima značilnega vpliva na vezavo paracetamola na plazemske albumine.

5.2 IBUPROFEN

Terapevtske plazemske koncentracije ibuprofena znašajo od 10 do 50 mg/L. Take koncentracije določimo v plazmi 1-2 uri po enkratnem 400 mg odmerku ibuprofena, vendar že šest ur po aplikaciji koncentracija učinkovine pade na približno 5 mg/L (23, 26). Pri pripravi umeritvene premice smo upoštevali, da se ibuprofen veže na plazemske proteine v več kot 90 % (23), kar pomeni, da so koncentracije proste zdravilne učinkovine po vezavi veliko nižje od omenjenih terapevtskih. Umeritveno premico za ibuprofen smo tako pripravili v koncentracijskem območju od 0,2 do 50 mg/L in je linearna, saj znaša koeficient determinacije 0,9999. Točnost povratno izračunanih koncentracij standardnih raztopin se giblje od 69,3 % do 101,2%. Pri najnižji koncentraciji smo vedno dobili zelo slabo ujemanje (69,3%) (preglednica XXII in slika 15), vendar smo rezultat vseeno upoštevali, saj je bil koeficient determinacije umeritvene premice v redu (0,9999).

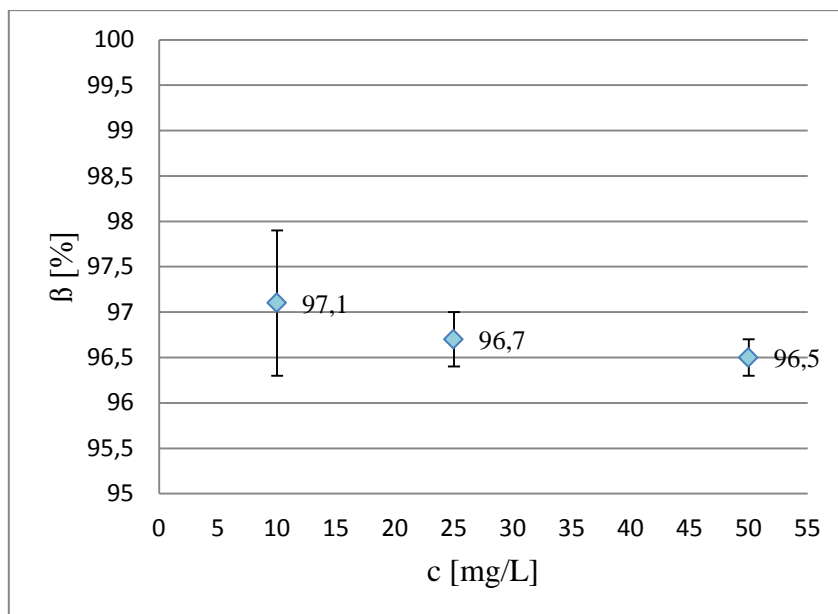
V poskusih smo uporabljali raztopine s koncentracijam ibuprofena 10, 25 in 50 mg/L. Za preverjanje stabilnosti ibuprofena smo raztopinam pomerili odzive pred in po 20-urni inkubaciji na 37°C. V večini primerov smo izmerili po inkubaciji celo večji odziv (106,5%, 100,4% in 106,1%), kar je nekoliko presenetljivo. Zdravilna učinkovina med inkubacijo kvečjemu razpada. Poleg tega so bili rezultati stabilnosti pri koncentraciji 25 mg/L zelo spremenljivi. V enem primeru smo izmerili, da je razpadlo 9,6 % ibuprofena. Odzive raztopin po 20-urni inkubaciji smo določili s pomočjo umeritvene premice pripravljene iz svežih standardnih raztopin. Mogoče bi bilo bolje, da bi te raztopine shranili v hladilnik in jih analizirali sočasno z raztopinami, ki so bile 20 ur na 37°C. Na ta način bi se izognili morebitnemu vplivu trenutnega delovanja HPLC-ja. Vendar pa bi s tem poskusom kontrolirali le vpliv temperature na razpad zdravilne učinkovine, ne pa tudi kakšen vpliv ima na to pretečeni čas od priprave raztopine. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da v nadaljnjih izračunih razpada ibuprofena ne upoštevamo.

Ibuprofen se tudi ne izgublja z vezavo na dializne celice in membrano. Posamezni rezultati se med seboj le malo razlikujejo, saj največja variabilnost znaša 4,11 %.

V veliko večjem obsegu se ibuprofen veže na sisteme za ultrafiltracijo, saj se pri koncentraciji 10 mg/L veže na sistem v povprečju 11,7 % ibuprofena, 7,4 % pri koncentraciji 25 mg/L in 12,2 % pri koncentraciji 50 mg/L. Vezavo ibuprofena na sistem za ultrafiltracijo smo upoštevali pri izračunih vezave ibuprofena na humane plazemske albumine. Tako v primeru paracetamola kot tudi v primeru ibuprofena se veže na sistem za ultrafiltracijo več zdravilne učinkovine kot na sistem za ravnotežno dializo. Za to je ključna vrsta materiala in površina sistema, ki pride v stik z zdravilno učinkovino. Pri ultrafiltraciji je ta večja kot pri ravnotežni dializi.

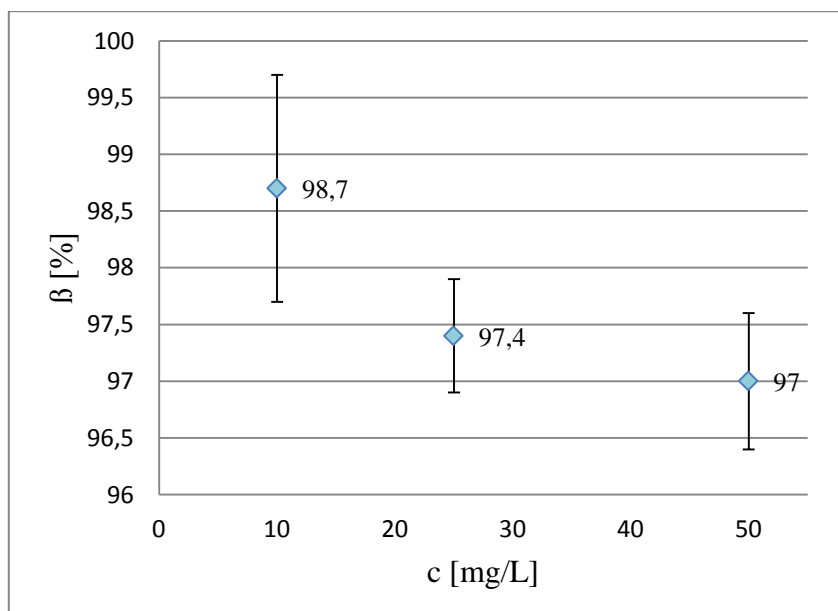
Pri metodi ultracentrifugiranja je bila vezava ibuprofena na epruvete za centrifugiranje manjša kot pri ostalih dveh metodah, vendar smo jo vseeno upoštevali pri nadaljnjem izračunu vezave ibuprofena na humane plazemske albumine. Pri koncentraciji 10 mg/L smo upoštevali 2,3 % vezavo, pri koncentraciji 25 mg/L 1,2 % vezavo, pri najvišji koncentraciji pa 1,8 % vezavo. Možno je, da ti odstotki ne predstavljajo zdravilne učinkovine vezane na epruvete, ampak delež zdravilne učinkovine, ki je tekom ultracentrifugiranja sedimentiral.

V nadaljevanju smo določali vezavo ibuprofena na humane plazemske albumine (slika 23). Z uporabo metode ravnotežne dialize smo pri koncentraciji ibuprofena 10 mg/L v povprečju določili 97,1 % vezavo, pri koncentraciji ibuprofena 25 mg/L smo določili 96,7 % vezavo in pri najvišji koncentraciji ibuprofena, 50 mg/L, se je na humane plazemske albumine vezalo 96,5 % ibuprofena (slika 19). Največje razlike so bili med rezultati pri najnižji koncentraciji ibuprofena, a je tudi v tem primeru koeficient variabilnosti znašal le 0,83%. Med posameznimi koncentracijami ibuprofena ni razlik v odstoku vezave in se tudi ujemajo z literaturnimi podatki, ki navajajo, da se na plazemske proteine veže od 90 do 99 % ibuprofena.



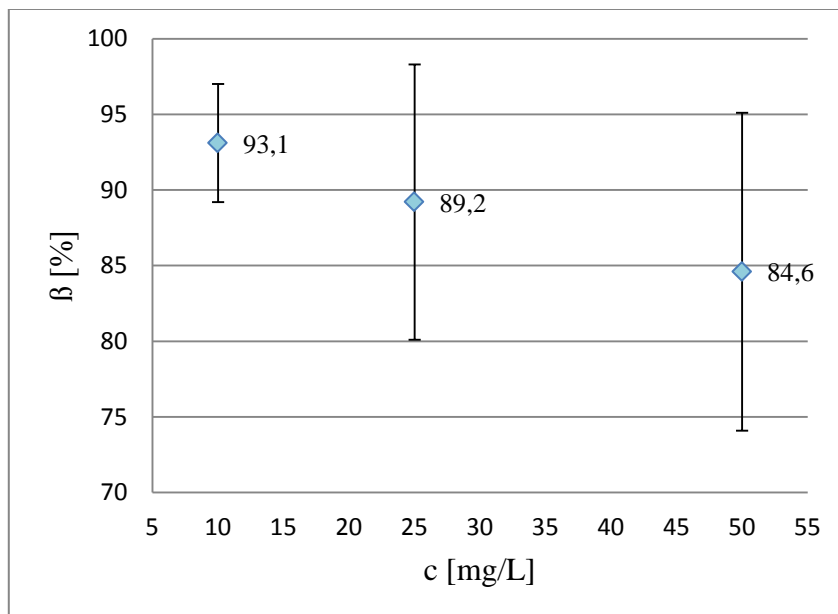
Slika 20: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ravnotežni dializi

Z metodo ultrafiltracije smo določili, da se pri koncentraciji ibuprofena 10 mg/L veže na humane plazemske albumine 98,7 % ibuprofena, pri 25 mg/L 97,4 %, pri 50 mg/L pa 97,0 % (slika 20). Rezultati so znotraj raztopin iste koncentracije zelo ponovljivi. Ujemajo se z literaturnimi podatki glede vezavo ibuprofena na plazemske proteine in sovpadajo z rezultati pridobljenimi z metodo ravnotežne dialize.

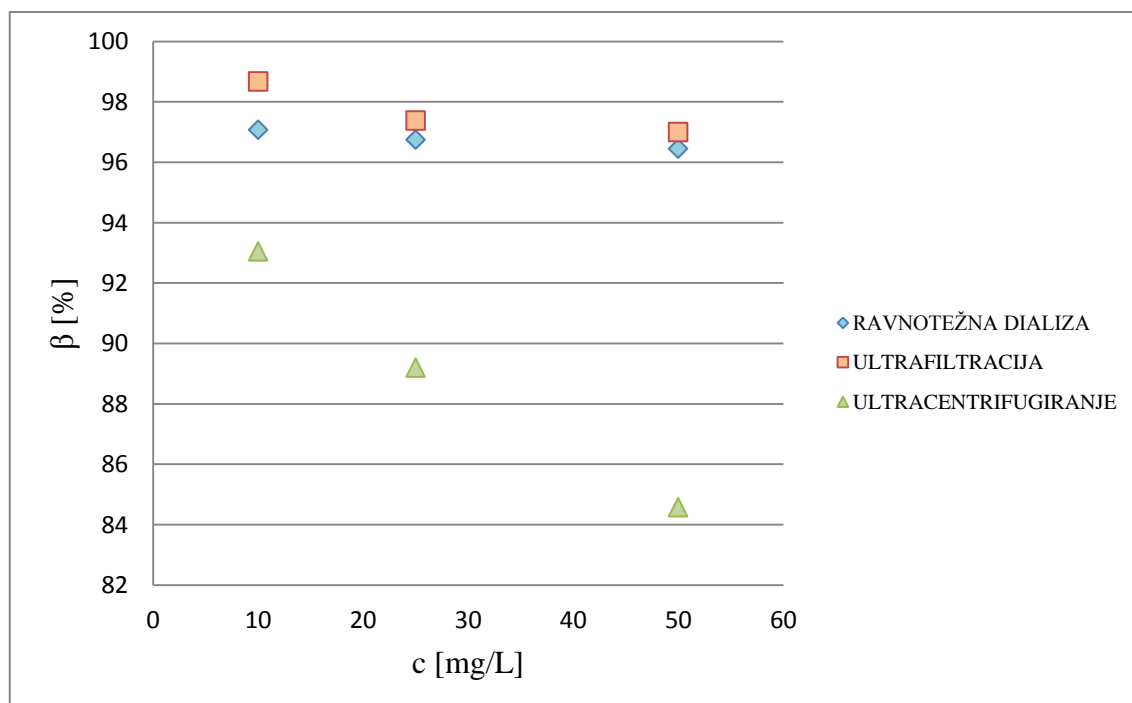


Slika 21: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ultrafiltraciji

Z metodo ultracentrifugiranja smo določili nižje vrednosti odstotka vezave ibuprofena na humane plazemske albumine kot s preostalima dvema metodama. Pri najnižji koncentraciji se je na humane plazemske albumine vezalo 93,1 % ibuprofena, pri srednji 89,2 %, pri najvišji pa 84,6 % (slika 21).



Slika 22: Vezava ibuprofena na humane plazemske albumine pri ultracentrifugiranju



Slika 23: Vezava ibuprofena na humane albumine

Koncentracija ibuprofena ima glede na rezultate statistične analize neznačilen vpliv na vezavo ibuprofena na plazemske albumine (preglednica XXXI), medtem ko je vpliv uporabljene metode značilen (preglednica XXXI). In sicer je med vsemi pari uporabljenih metod (ravnotežna dializa in ultrafiltracija, ravnotežna dializa in ultracentrifugiranje ter ultrafiltracija in ultracentrifugiranje) značilna razlika v odstotku vezave ibuprofena na plazemske albumine (preglednica XXXII).

Na podlagi pridobljenih eksperimentalnih rezultatov smo ugotovili, da z vsemi metodami dobimo odstotke vezave učinkovin na plazemske albumine, ki so skladni z literaturnimi podatki (11). Rezultati statistične analize so pokazali, da v primeru obeh učinkovin vrsta uporabljene metode ima značilen vpliv na rezultate. Ravnotežna dializa je od vseh treh metod najbolj zamudna. Nekoliko zahtevnejše je že samo sestavljanje sistema za ravnotežno dializo, potem pa je potrebno še veliko časa, da se vzpostavi ravnotežje. Lahko pride tudi do vezave zdravilne učinkovine na polprepustno membrano in stene dializnih celic. Enak problem z izgubo zdravilne učinkovine preko vezave na membrano in stene sistema imamo tudi pri ultrafiltraciji. Velika prednost ultrafiltracije v primerjavi z ravnotežno dializo pa je hitrost in enostavnost izvedbe poskusa. Precej enostavna je tudi izvedba ultracentrifugiranja. Prednost te metode je še odsotnost polprepustne membrane. Omejeno uporabo pa ima zaradi visoke cene ultracentrifuge, ki jo potrebujemo za izvedbo.

6 SKLEP

- Upoštevajoč rezultate vseh treh metod (ravnotežne dialize, ultrafiltracije in ultracentrifugiranja) je povprečen odstotek vezave paracetamola na humane albumine 13.74%, kar je v skladu z literaturnimi podatki.
- Ibuprofen se na humane albumine veže v zelo visokem odstotku. Najnižji odstotek vezave smo določili z metodo ultracentrifugiranja in je znašal 84.6%, najvišji pa z metodo ultrafiltracije- 98.7%. Povprečen odstotek vezave upoštevajoč rezultate vseh treh metod je 95.11%.
- Testirane koncentracije paracetamola (6, 18 in 30 mg/L) ne vplivajo značilno na odstotek vezave paracetamola na humane albumine ($p=0.567$), medtem ko ima uporabljena metoda značilno vpliva na vezavo ($p<0.0001$). Značilne razlike so med rezultatih ravnotežne dialize in ultrafiltracije ter ravnotežne dialize in ultracentrifugiranja.
- Tudi pri ibuprofenu uporabljena metoda značilno vpliva na vezavo zdravilne učinkovine na humane albumine ($p<0.0001$). Značilne razlike so med vsemi pari uporabljenih metod. Vpliv koncentracija ibuprofena na njegovo vezavo na humane albumine ni značilen ($p=0.063$).
- Ibuprofen in paracetamol sta v testiranih koncentracijah stabilna pri pogojih ravnotežne dialize.
- Med poskusi se nekaj zdravilne učinkovine izgubi z vezavo na sisteme, kar smo upoštevali pri izračunih vezave učinkovin na humane albumine. Pri ravnotežni dializi se je na dializne celice vezalo v povprečju 3.03% paracetamola, medtem ko se ibuprofen ni vezal na dializne celice. Pri ultrafiltraciji se je na sisteme vezalo 3.09% paracetamola in 10.4% ibuprofena. Na epice za ultracentrifugiranje pa se je povprečno vezalo 3.4% paracetamola in 1.77% ibuprofena.
- Ravnotežna dializa je najbolj zamudna metoda, saj je potrebno veliko časa za vzpostavitev ravnotežja. Poleg tega je možna vezave zdravilne učinkovine na polprepustno membrano in stene dializnih celic.
- Izvedba ultrafiltracije je hitra in enostavna, a tudi tukaj se lahko zdravilne učinkovine vežejo na sistem za ultrafiltracijo.

- Ultracentrifugiranje je edina metoda, pri kateri se izognemo vplivu membrane na dobljene rezultate, vendar pa njeno uporabo omejuje visoka nabavna cena ultracentrifuge.

7 LITERATURA IN VIRI

1. **Shargel L, Wu-Pong S, Yu A.** Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 6. izdaja. Singapore : The McGraw-Hill Companies, 2012, str. 205-252.
2. **Marc J, Černe D.** Klinična kemija. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009, str. 95-108.
3. **Karas Kuželički N, Mencej Bedrač S, Mlinar B, Ostanek B in Trošt Z.** Vaje iz klinične kemije II. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, 2011, str. 15-25.
4. **A. Burtis C, R. Ashwood E.** Fundamentals of clinical chemistry. 5.izdaja. Združene države Amerike : Saunders Company, 2001, str. 325-351.
5. **A.L. Eriksson M, Gabrielsson J, B. Nilsson L.** Studies of drug binding to plasma proteins using a variant of equilibrium dialysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005, str. 381-389.
6. **Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A.** Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko. Ljubljana : Fakulteta za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, 2001, str. 30-33.
7. **E. Evans W, J. Schentag J, J. Jusko W, Harrison H.** Applied pharmacokinetics: Principles of therapeutic drug monitoring. 2. izdaja. Spokane, WA : Applied Therapeutics, 1986, str. 220-224.
8. Thermo SCIENTIFIC. Sorvall™ WX Floor Ultra Centrifuges. Pridobljeno iz spletne strani <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/sorvall-wx-floor-ultra-centrifuges-1.html>. Dostopano: 14.10.2014
9. Thermo Scientific Sorvall® WX Ultra Centrifuge Series. Pridobljeno iz spletne strani [http://iris.fishersci.ca/LitRepoQA.nsf/0/1B15C7DD5024E497852573E10048E014/\\$file/Thermo%20WX%20Centrifuges%20PDF_27.pdf](http://iris.fishersci.ca/LitRepoQA.nsf/0/1B15C7DD5024E497852573E10048E014/$file/Thermo%20WX%20Centrifuges%20PDF_27.pdf). Dostopano: 14.10.2014
10. **Tuan Giam Chuang V, Maruyama T, Otagiri M.** Updates on contemporary protein binding techniques. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2009, str. 358-364.
11. **C. Sweetman S.** Martindale, The complete drug reference. 33. izdaja. Velika Britanija : Pharmaceutical Press, 2002, str. 43-44,71-73.
12. DrugBank. Acetaminophen. Pridobljeno iz spletne strani <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00316>. Dostopano: 20.09.2014
13. **Dolinar T, Mrhar A.** Paracetamol-učinkovito in varno zdravilo? Farmacevtski vestnik, 2005, str. 229-240.
14. **Kerec Kos M.** Zdravila za zdravljenje bolečine. Farmacevtski vestnik, 2012, str. 6-9.

15. DrugBank. Ibuprofen. Pridobljeno iz spletne strani <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>. Dostopano: 23.09.2014
16. Centralna baza zdravil. SmPC za zdravilo Diverin 400 mg filmsko obložene tablete. Pridobljeno iz spletne strani . [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView). Dostopano: 23.09.2014
17. **Nageswara Rao R, Narasaraju A.** Rapid separation and determination of process-related substances of paracetamol using reversed-phase HPLC with photo diode array as detector. *Analytical sciences*, 2006, str. 287-292.
18. **Calinescu O, A. Badea I, Vladescu L, Meltzer V, Pincu E.** HPLC separation of acetaminophen and its impurities using a mixed-mode reversed-phase/cation exchange stationary phase. *Journal of chromatographic science*, 2011, str. 335-342.
19. **Canaparo R, Muntoni E, P. Zara G, Della Pepa C, Berno E, Costa M, Eandi M.** Determination of ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography*, 1999, str. 219-226.
20. SPECTRUM LABS. Spectra/Por. Pridobljeno iz spletne strani <http://www.spectrumlabs.com/lit/420x10116x000.pdf>. Dostopano: 29.08.2014
21. Navodila za uporabo sistemov za ultrafiltracijo. Goettingen, Nemčija : Sartorius AG.
22. **Rugelj D.** Določanje vezave varfarina in paracetamola na plazemske albumine z ravnotežno dializo in ultrafiltracijo. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005.
23. Pharmacology. Paracetamol pharmacokinetics. Pridobljeno iz spletne strani <http://sepia.unil.ch/pharmacology/index.php?id=87>. Dostopano: 10.07.2014
24. **R. Bushra A.** An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, *Oman medical journal*, Zv. 25, 2010, str. 155-161.
25. **E. Stocker M, E. Montgomery J.** Serum paracetamol concentrations in adult volunteers following rectal administration. *British journal of anaesthesia*, Zv. 87, str. 638-640.
26. GlobalRPH. Labs-DRUG levels. Pridobljeno iz spletne strani http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm. Dostopano: 10.10.2013
27. Bandolier. Oral NSAID pharmacokinetics. Pridobljeno iz spletne strani <http://www.medicine.ox.ac.uk/bandolier/booth/painpag/topical/oralkin.html>. Dostopano: 10.10.2014