**Analiza instrumentalna klasyczna**

**FARMACJA II rok**

**Ćwiczenie 1. Walidacja metody badawczej**

Celem ćwiczenia jest opanowanie zagadnień teoretycznych dotyczących procesu walidacji metod analitycznych oraz praktyczne poznanie części procesu walidacji na przykładzie oznaczania nieprecyzyjności i obciążenia metody oznaczania stężenia białka z odczynnikiem Bradford.

1. **Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford**

Aparatura i sprzęt laboratoryjny:

* czytnik EnVision
* probówki Eppendorf
* pipety automatyczne
* płytki 96-dołkowe
* wortex

Materiał badany i odczynniki:

* surowica badana
* surowica kontrolna
* odczynnik Bradford
* 0,9% NaCl
* standard BSA (2 mg/mL)

**UWAGA! Każda grupa ćwiczeniowa wykonuje po 20 oznaczeń stężenia białka w surowicy badanej i po 10 oznaczeń w surowicy kontrolnej.**

Wykonanie:

* przygotować 100-krotne rozcieńczenia próbki badanej i kontrolnej z 0,9% NaCl (**końcowa objętość próbki – 1 mL**)
* sporządzanie 8-punktowej krzywej kalibracyjnej

- opisać probówki

- przygotować po 0,04 mL wzorców o stężeniach: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 mg/mL) (**UWAGA!** Wzorzec o stężeniu 2 mg/mL odmierzyć bezpośrednio na płytkę z wyjściowego roztworu BSA!)

* nanieść po 5 μl przygotowanych rozcieńczeń surowicy badanej i surowicy kontrolnej oraz przygotowanych wzorców w 2 powtórzeniach na płytkę (wg schematu)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 2,0 | 2,0 | B | B | B | B |  |  |  |  |  |  |
| B | 1,5 | 1,5 | B | B | B | B |  |  |  |  |  |  |
| C | 1,0 | 1,0 | B | B | K | K |  |  |  |  |  |  |
| D | 0,75 | 0,75 | B | B | K | K |  |  |  |  |  |  |
| E | 0,5 | 0,5 | B | B | K | K |  |  |  |  |  |  |
| F | 0,25 | 0,25 | B | B | K | K |  |  |  |  |  |  |
| G | 0,125 | 0,125 | B | B | K | K |  |  |  |  |  |  |
| H | 0 | 0 | B | B |  |  |  |  |  |  |  |  |

* dodać do każdej studzienki po 250 μl odczynnika Bradford
* inkubować płytkę 20 minut
* zmierzyć absorbancję przy długości fali λ= 540 nm
* wykreślić krzywą kalibracyjną = wykres zależności absorbancji od stężeń wzorca i wyznaczyć stężenie badanych roztworów białka

Obliczenia:

* nieprecyzyjność – obliczyć wartość średnią (Xśrednia), odchylenie standardowe (SD) i współczynnik zmienności (CV) z 20 oznaczeń stężenia białka **w surowicy badanej (c)**

i=1

Xśrednia  = Σ c / n

n=20

i=1

SD = Σ (Xi-Xśrednia)2 / (n-1)

n=20

SD

CV = x 100 [%]

Xśrednia

* obciążenie (bias) – zebrać wyniki oznaczeń stężenia białka w surowicy kontrolnej ze wszystkich grup. Obliczyć wartość średnią (Xśrednia), różnicę bezwzględną () i różnicę względną (%) z 10 oznaczeń stężenia białka **w surowicy kontrolnej (ckontrola).**

i=1

Xśrednia  = Σ ckontrola / n

n=10

 = Xśrednia – Xdeklarowana

Xśrednia – Xdeklarowana

% = x 100 [%]

Xdeklarowana

Sprawozdanie powinno zawierać:

* strona tytułowa
* zasada metody Bradford
* zakres wartości referencyjnych dla stężenia białka całkowitego w surowicy
* tabela z wartościami A odczytanymi na aparacie
* wykres zależności A od stężenia (c) roztworów wzorcowych (krzywa wzorcowa) na papierze milimetrowym
* wyznaczone z wykresu stężenia białka w materiale kontrolnym (10) i badanym (20) (wyniki podane w μg/mL i g/dL)
* obliczenia – nieprecyzyjność i obciążenie (z zastosowanymi wzorami)
* wnioski