

Praktické cvičení

datum.....jméno.....

Téma praktika:

Hmotnostní spektrometrie, Stanovení Busulfanu LC/MS

Hladina busulfanu v plazmě se stanoví po kapalinové extrakci metodou HPLC s MS detekcí. Busulfan se používá před transplantací krevetvorných buněk jako základ vysokodávkované chemoterapie. Vedlejším účinkem busulfanu je při vysokých dávkách hepatotoxicita.

Přístroje a pomůcky:

Pipety

Vortex

Centrifuga MPW-351

Kapalinový chromatograf 1290 Infinity II

Hmotnostní detektor 6470 LC/TQ

Reagencie, spotřební materiál:

1. Mravenčan amonný
2. dH₂O
3. Methanol
4. Ethylacetát
5. D8-Busulfan (interní standard)
6. Kalibrační standard a kontroly (vlastní příprava)

Úkoly:

- 1) **Proveďte přípravu mobilní fáze, standardů, kontrol a vzorků**

Mobilní fáze:

A1 1mmol/l mravenčan amonný (0,0631 g do 1 L dH₂O)

B1 100% Methanol

Kontrola BUS 1, 2

Standard BUS 1-4

Vzorky pacienta (čas odběru 0h, 2h, 4h, 6h)

Materiál	Množství (μl)
Standard/Kontrola/Vzorek (do eppendorfek)	100 μl
Interní standard (d8-busulfan)	100 μl
Promíchat na vortexu	
Ethylacetát	800 μl
Intenzivně promíchat vortexem (t=10 s)	
Centrifugace 4000 RPM (t=10 min) PROGRAM 1	
Stáhnout supernatant do čistých, popsaných! zkumavek	600 μl
Odpařit ve vakuové odparce (50 °C)	
Resuspendovat v mobilní fázi	300 μl
Přepipetovat do vialek s inserty ve stojánku a zavíčkovat	

2) Analýza LC/MS

MF: **A1 1mmol/l mravenčan amonný : B1 100% Methanol**
A1:B1 90:10

1. Umístěte vzorky do správných pozic do autosampleru
2. Umístěte MF do správných pozic v reagenčním prostoru
3. Namontujte správnou kolonu
4. Vyberte metodu na stanovení busulfanu
5. Spusťte proplach mobilní fázi
6. Vytvořte worklist podle předlohy:

MF
STD1
STD2
STD3
STD4
K1
K2
VZ 0 hod
VZ 2 hod
VZ 4 hod
VZ 6 hod
MF
Proplach
Standby

7. Spusťte analýzu
8. Vyhodnoťte kalibrační křivku, kontrolní a patientské vzorky
9. Vytiskněte výsledky

3) Vyhodnocení

Program Microsoft Excel - výpočet AUC

- 4) Otevřít ikonu Microsoft Excel, pak zminimalizovat (na lištu)
- 5) Otevřít ikonu pk2.xla – vybrat „Povolit makra“
- 6) Zadat do sloupce A čas v minutách (0,120,240, 360)
- 7) Do sloupce B hladinu busulfanu v odpovídající minutě (ng/ml)
- 8) V horní liště obrazovky vybrat fx , šipkou rozbalit „naposledy použité“ označit vlastní a vybrat AUCO_t – OK
- 9) Do conc_Data napsat b1 : b4 , myší přejít do Time_Data napsat a1 : a4 a OK
- 10) Na dolním řádku je vypočteno AUC
- 11) C_{ss} (steady state) vypočítat jako podíl AUC a doby monitorování (AUC / 360), ponechat ng/ml
- 12) Pak provést přepočet AUC na[$\mu\text{mol/l/min}$]

AUC [ng/ml/min]

----- = AUC [$\mu\text{mol/l/min}$]

246,3 (mol hmotnost busulfanu)

- 13) Soubor – Konec – Ne

4) Výsledky

Čas odběru (hod)	c BUS ng/ml
0	
2	
4	
6	
K1	
K2	

AUC	ng/ml/min
AUC	$\mu\text{mol/l/min}$
C _{ss}	ng/ml

AUC – plocha pod křivkou

C_{ss} – koncentrace v ustáleném stavu

Závěr:

.....
.....
.....