Katedra laboratorních metod LF MU Bakalářské studium - Zdravotní laborant, 2.ročník

Klinická biochemie cvičení – podzimní semestr

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 krvetvorných 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 |

1. **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 fází
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 |

1. Spusťte analýzu
2. Vyhodnoťte kalibrační křivku, kontrolní a pacientské vzorky
3. Vytiskněte výsledky
4. **Vyhodnocení**

**Program** Microsoft Excel **- výpočet AUC**

1. Otevřít ikonu Microsoft Excel, pak zminimalizovat (na lištu)
2. Otevřít ikonu pk2.xla – vybrat „Povolit makra“
3. Zadat do sloupce A čas v minutách (0,120,240, 360)
4. Do sloupce B hladinu busulfanu v odpovídající minutě (ng/ml)
5. V horní liště obrazovky vybrat fx , šipkou rozbalit „naposledy použité“ označit vlastní a vybrat AUCO\_t – OK
6. Do conc\_Data napsat b1 : b4 , myší přejít do Time\_Data napsat a1 : a4 a OK
7. Na dolním řádku je vypočteno AUC
8. Css (stady state) vypočítat jako podíl AUC a doby monitorování ( AUC / 360 ), ponechat ng/ml
9. Pak provést přepočet AUC na[µmol/l/min]

 AUC [ng/ml/min]

 ---------------------------------------------- = AUC [µmol/l/min]

 246,3 (mol hmotnost busulfanu)

1. Soubor – Konec – Ne

**4) Výsledky**

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

|  |  |
| --- | --- |
| **AUC**  | **ng/ml/min**  |
| **AUC**  | **μmol/l/min** |
| **Css**  | **ng/ml** |

AUC – plocha pod křivkou

Css – koncentrace v ustáleném stavu

**Závěr:** ……………………………………………………………………………….……………………………………………………………………………….……………………………………………………………………………………………………….