

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. dH<sub>2</sub>O
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 dH<sub>2</sub>O)

**B1** 100% Methanol

**Kontrola BUS 1, 2**

**Standard BUS 1-4**

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

| <b>Materiál</b>   | <b>Množství (μl)</b> |
|---|----------------------|
| 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!<br>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<sub>ss</sub> (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 <sub>ss</sub> | ng/ml                 |

AUC – plocha pod křivkou

C<sub>ss</sub> – koncentrace v ustáleném stavu

#### Závěr:

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