

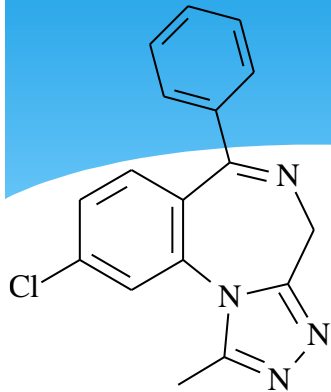
Κλινική Φαρμακευτική Ανάλυση

Βιολογικά δείγματα -
παραδείγματα

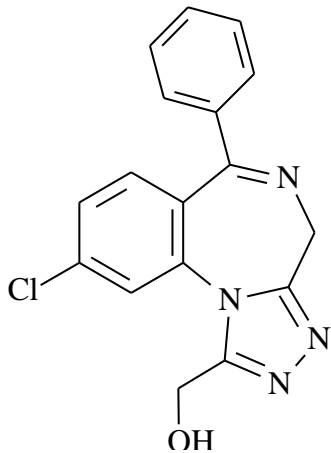
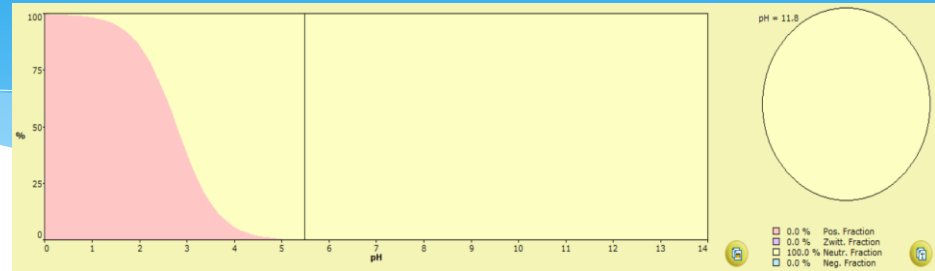
Ειρήνη Παντερή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης
Σημειώσεις, Αθήνα 2020

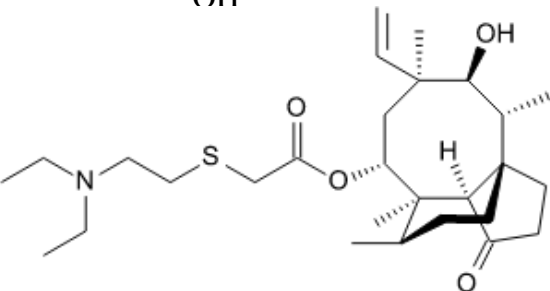
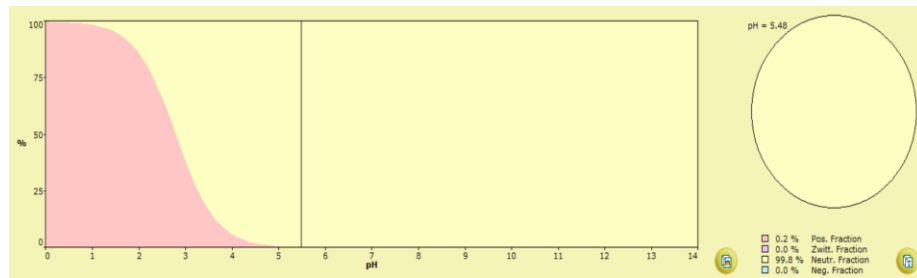
Ποσοτικός προσδιορισμός της αλπραζολάμης και της α-υδροξυ-αλπραζολάμης σε ανθρώπινο πλάσμα με HILIC-ESI/MS



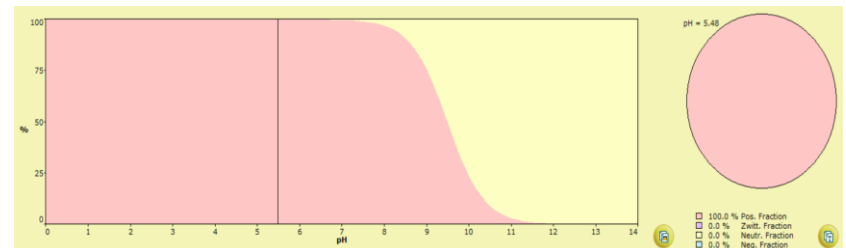
Αλπραζολάμη
Ακριβής μάζα: 308.083 g/mol
Μοριακός τύπος: C₁₇H₁₃ClN₄
Log D_{5,4}= 3,4
pKa: 2,8 ± 1,2



α-υδροξυ αλπραζολάμη
Ακριβής μάζα: 324.768 g/mol
Μοριακός τύπος: C₁₇H₁₄ClN₄O
Log D_{5,5}= - 2,9
pKa: 2,8 ± 1,2



Τιαμουλίνη (εσωτερικό πρότυπο)
Ακριβής μάζα: 493.32258 g/mol
Μοριακός τύπος: C₂₈H₄₇NO₄S
Log P=4,96
pKa: 9,5 ± 0,5



Υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE)

Δείγμα ανθρώπινου
πλάσματος
(50μL)

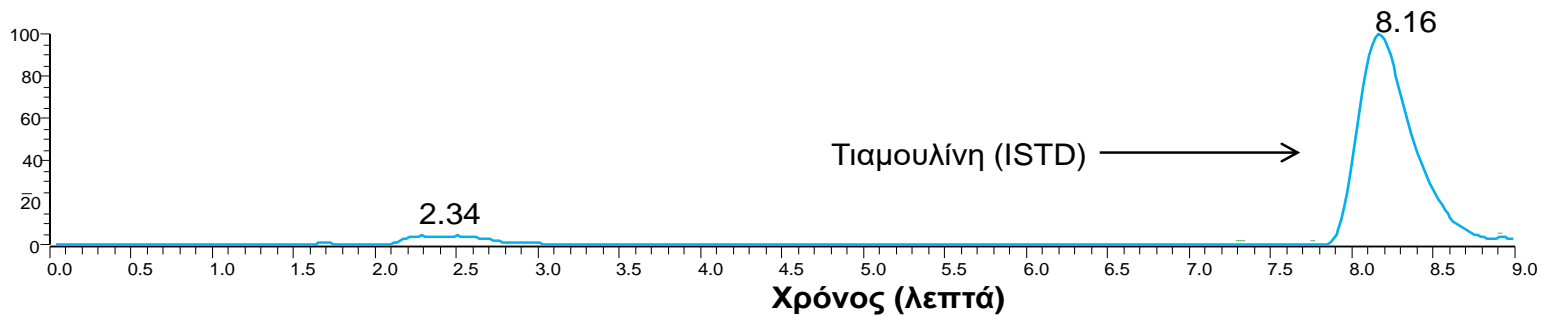
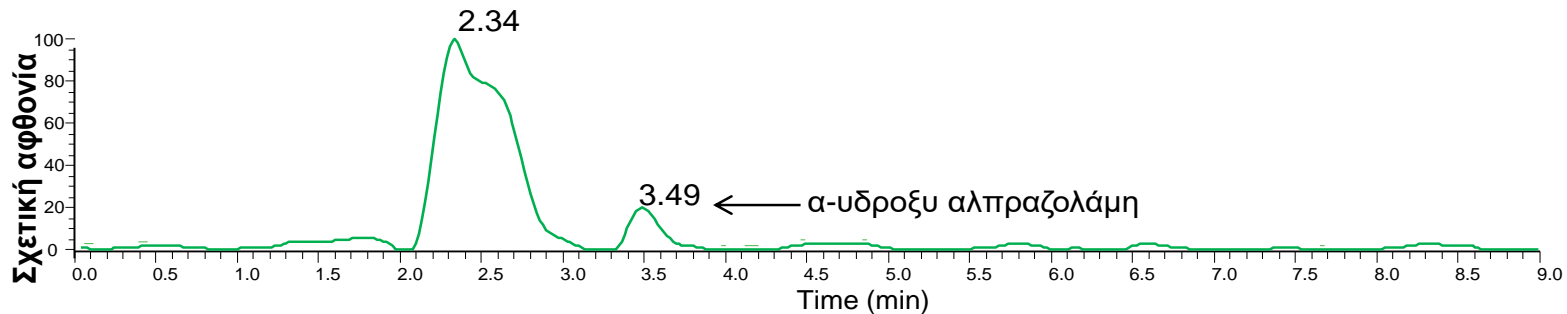
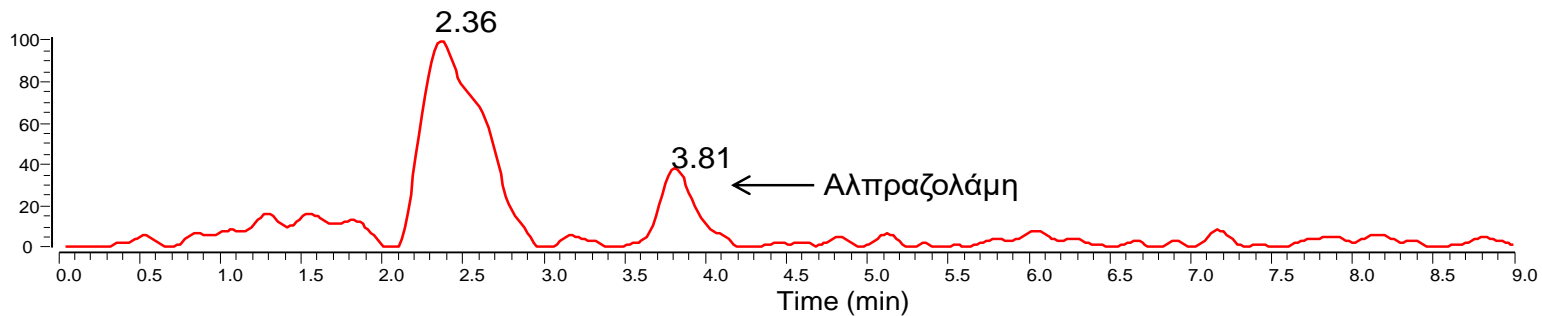
- 100μL διαλύματος τιαμουλίνης (2500ng mL^{-1})
- 100μL ρυθμιστικού διαλύματος 10mM οξικού αμμωνίου, $\text{pH}\sim 7$

Υγρό- Υγρό εκχύλιση

- 1200μL τριτοταγής βουτυλο μεθυλαιθέρας
- ανάδευση για 2,5 λεπτά
- φυγοκέντρηση για 12 λεπτά, 12,000 στροφές, 4°C
- Παραλαβή 1100μL από την οργανική φάση

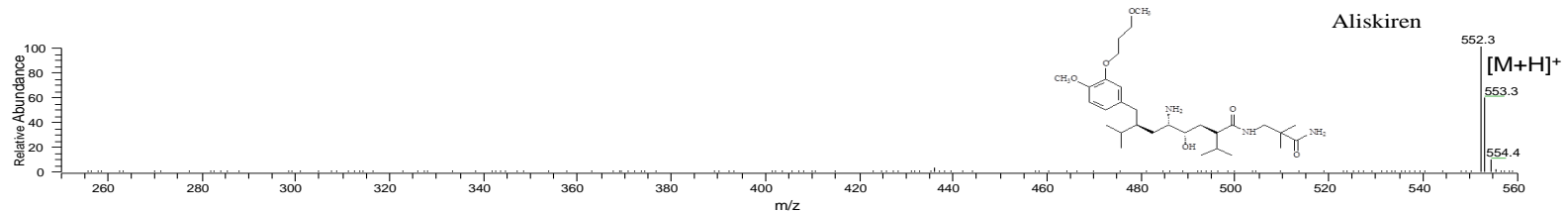
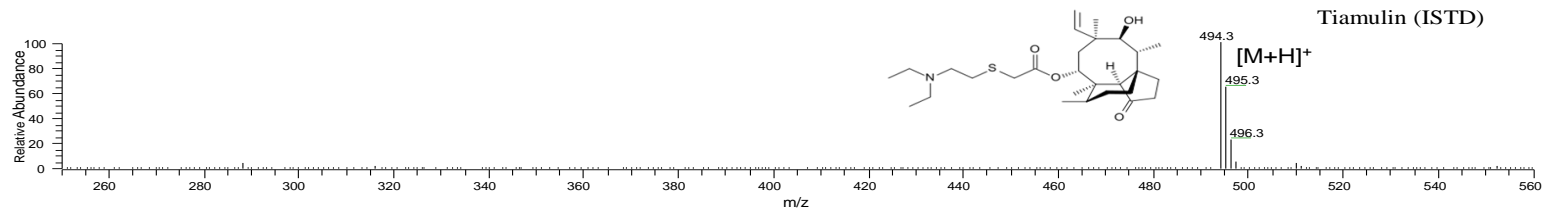
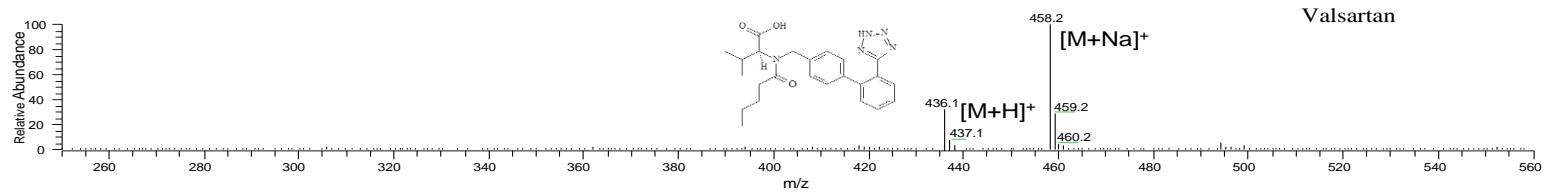
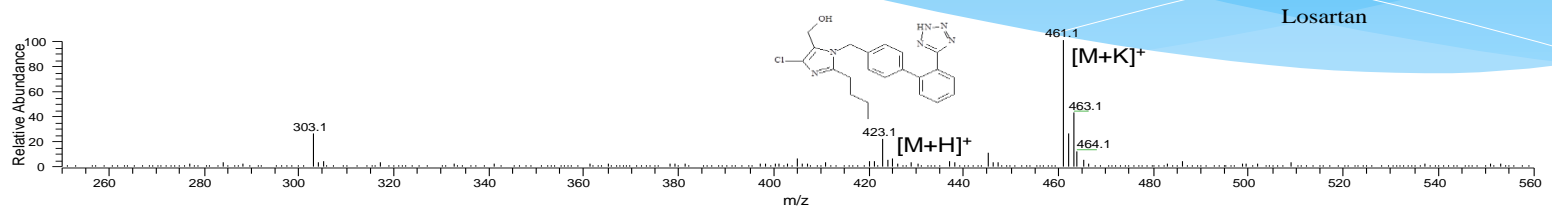
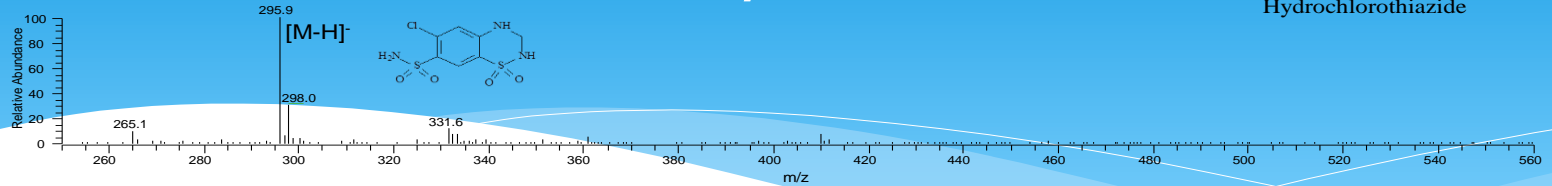
Εξάτμιση μέχρι
ξηρού και
ανασύσταση

- Ρεύμα αζώτου (N_2)
- 25°C
- Ανασύσταση με 400μL κινητής φάσης
- Ανάμιξη σε vortex



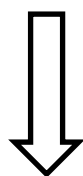
Τυπικό χρωματογράφημα μαζών συγκέντρωσης $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ για την αλπραζολάμη και τον μεταβολίτη της (LOQ level) και 2500ng mL^{-1} για την τιαμουλίνη (ISTD).

Αντιυπερτασικά σε ανθρώπινο πλάσμα LC-ESI/MS



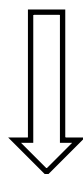
Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και διήθηση

50 μL πλάσματος + 50 μL διάλυμα εργασίας αναλυτών + 100 μL IS
+ 650 μL ακετονιτρίλιο + 100 μL 5mM HCOONH_4

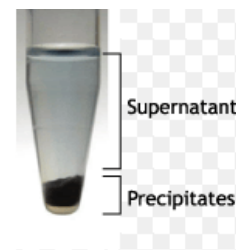


Ανάδευση 1min

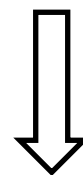
Φυγοκέντρωση



16000 RPM
25°C, 20 min

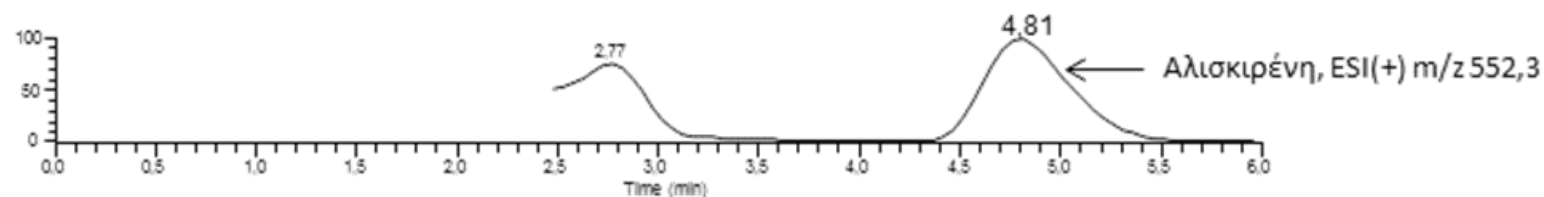
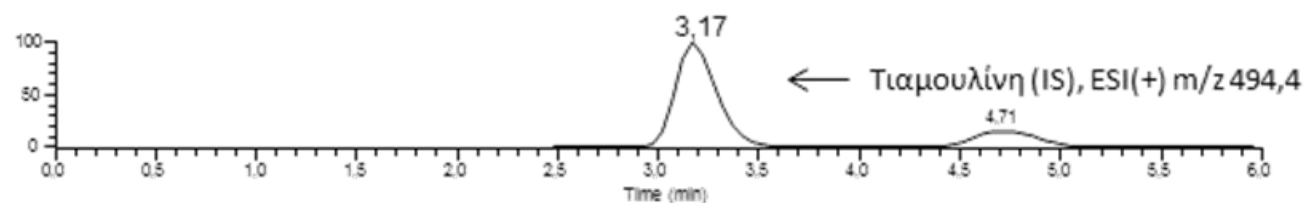
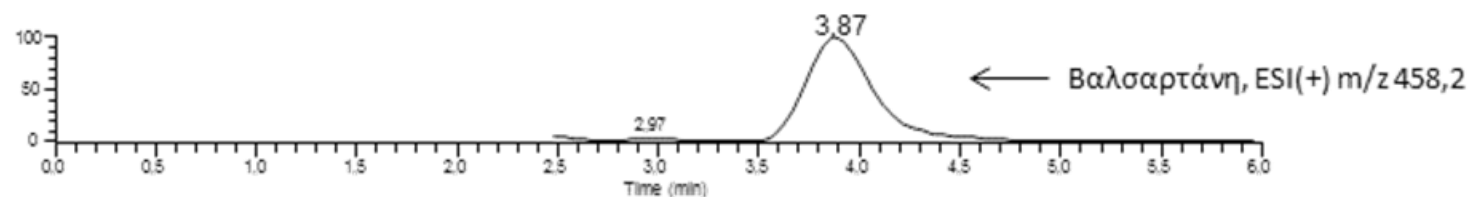
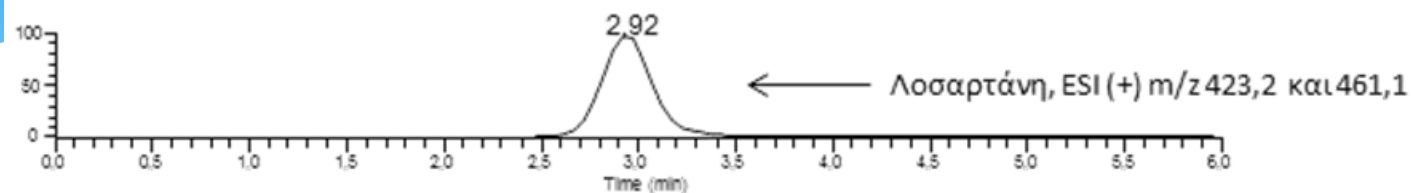
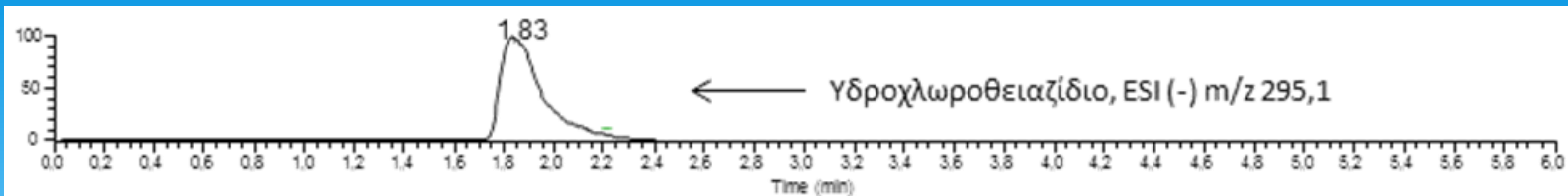


Διήθηση



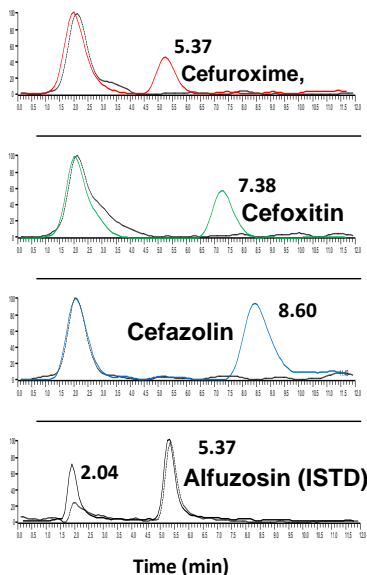
Μικροφίλτρα Millipore
PTFE 0,45 μm

Εισαγωγή στο σύστημα LC-ESI/MS



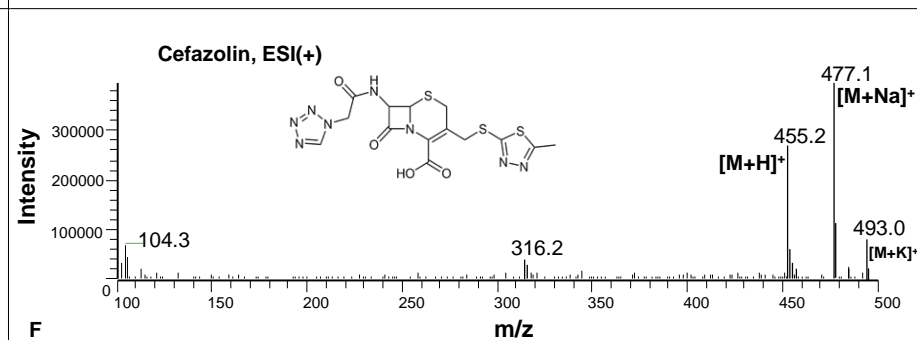
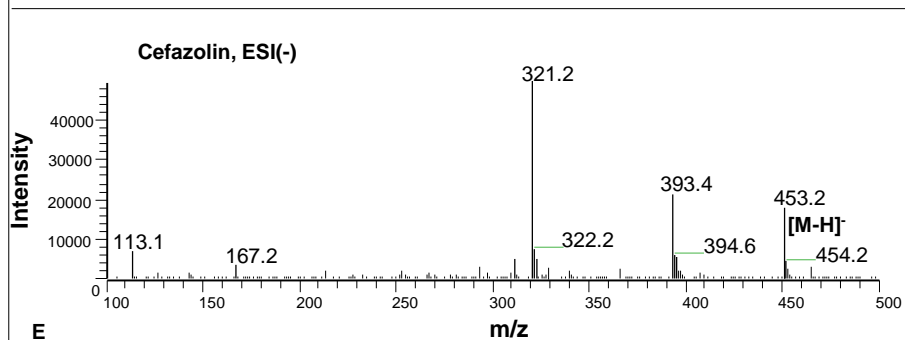
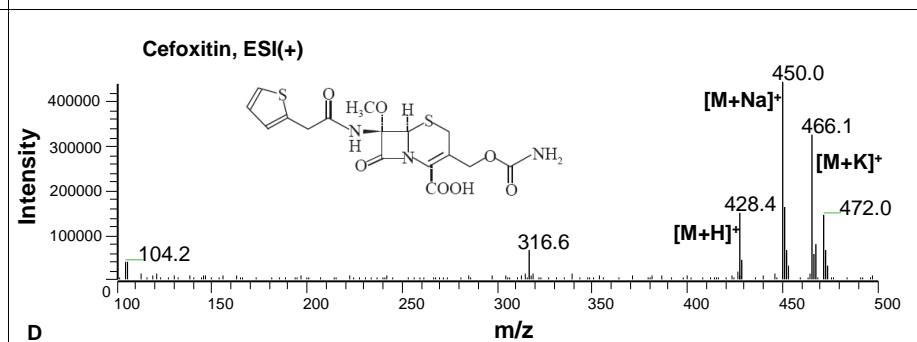
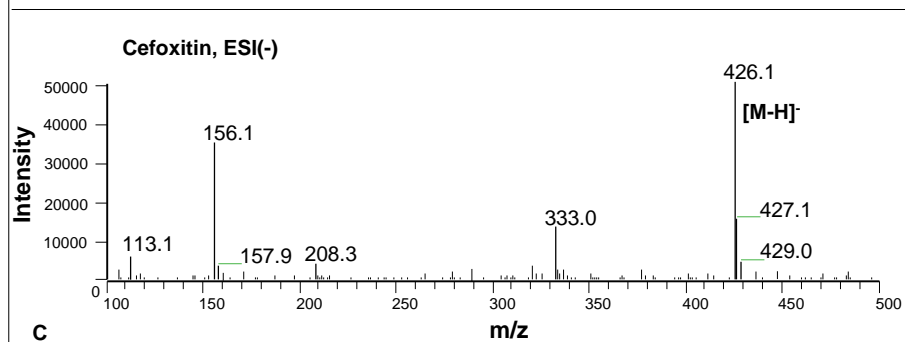
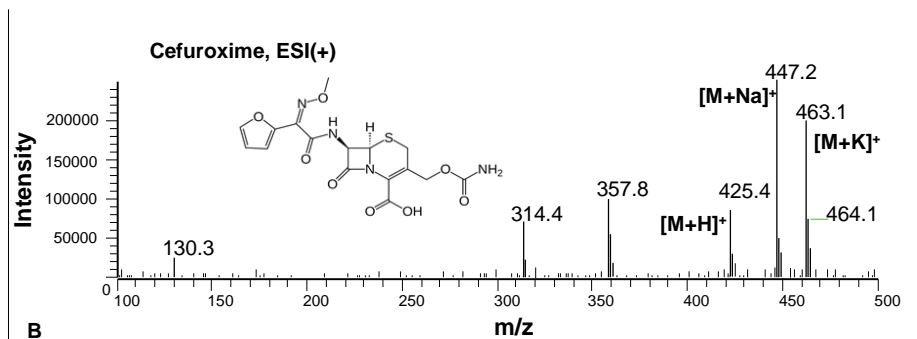
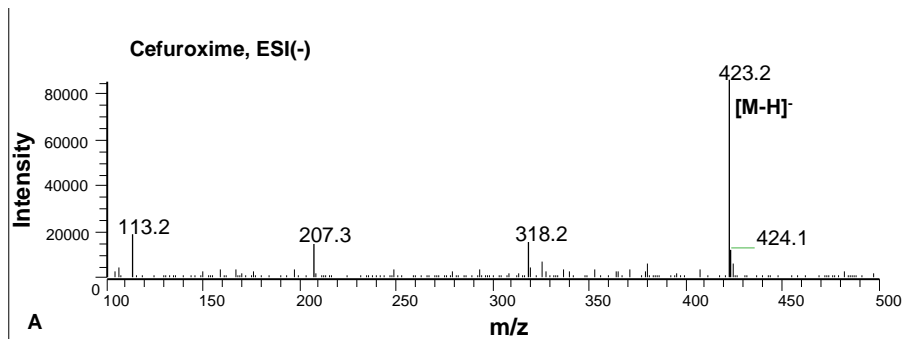
Ιοντικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος πλάσματος εμβολιασμένου με μέση συγκέντρωση των αναλυτών, 100 ng mL^{-1} , και 25 ng mL^{-1} εσωτερικού προτύπου.

In this study a direct injection HILIC/ESI-MS assay was developed for the quantitation of cefuroxime, cefoxitin and cefazolin in breast milk and human plasma. The described assay was applied to the analysis of breast milk and human plasma samples collected from lactating women and patients that were treated intravenously with the analytes.



Quantification of cephalosporins in breast milk and human plasma by direct injection hydrophilic interaction liquid chromatography/positive-ion electropray ionization mass spectrometry

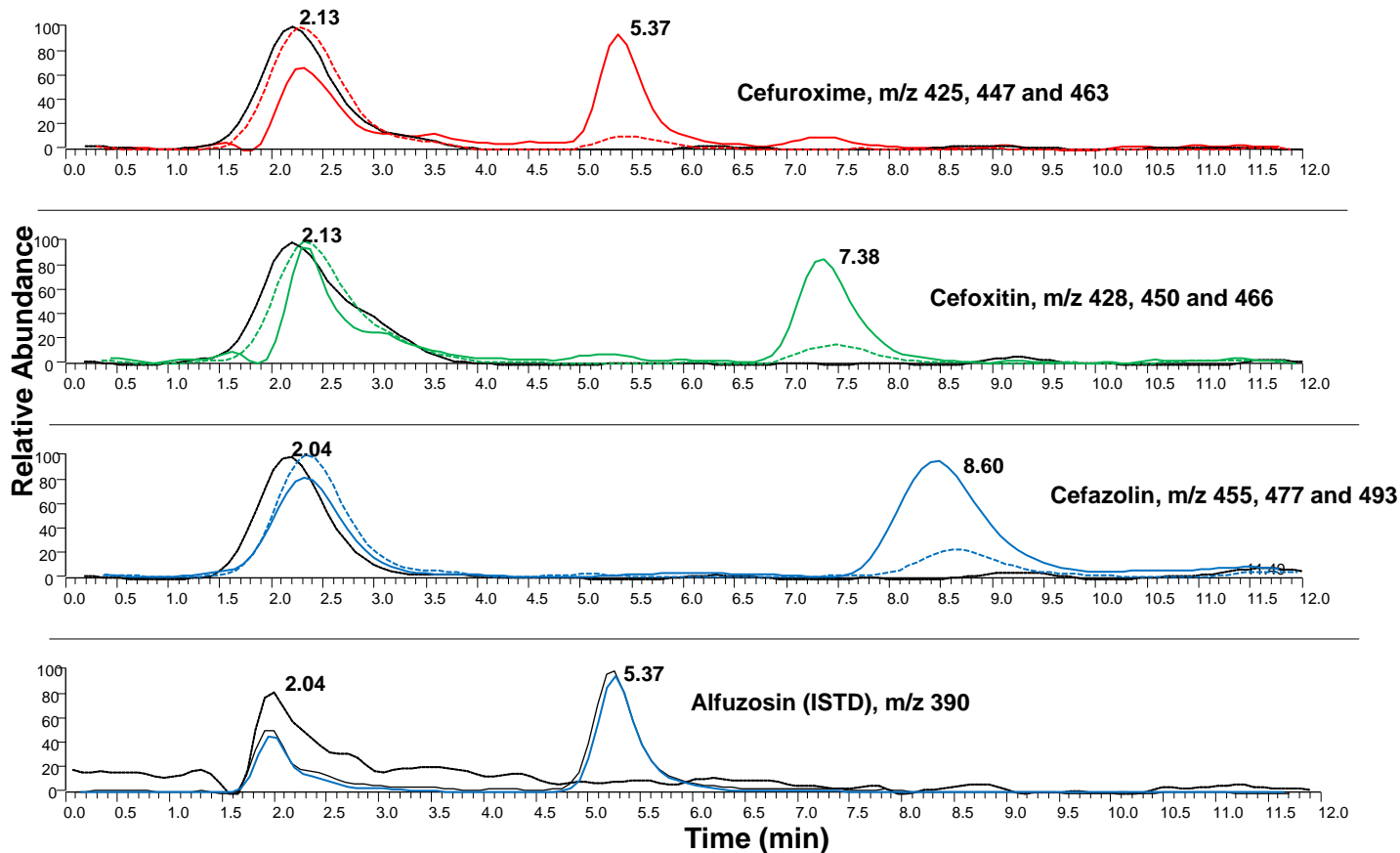
Evaggelos Kiriazopoulos, Sabina Zaharaki, Ariadni Vonaparti, Panagiota Vourna, Eirini Panteri-Petratou, Dimitra Gennimata and Irene Panderi



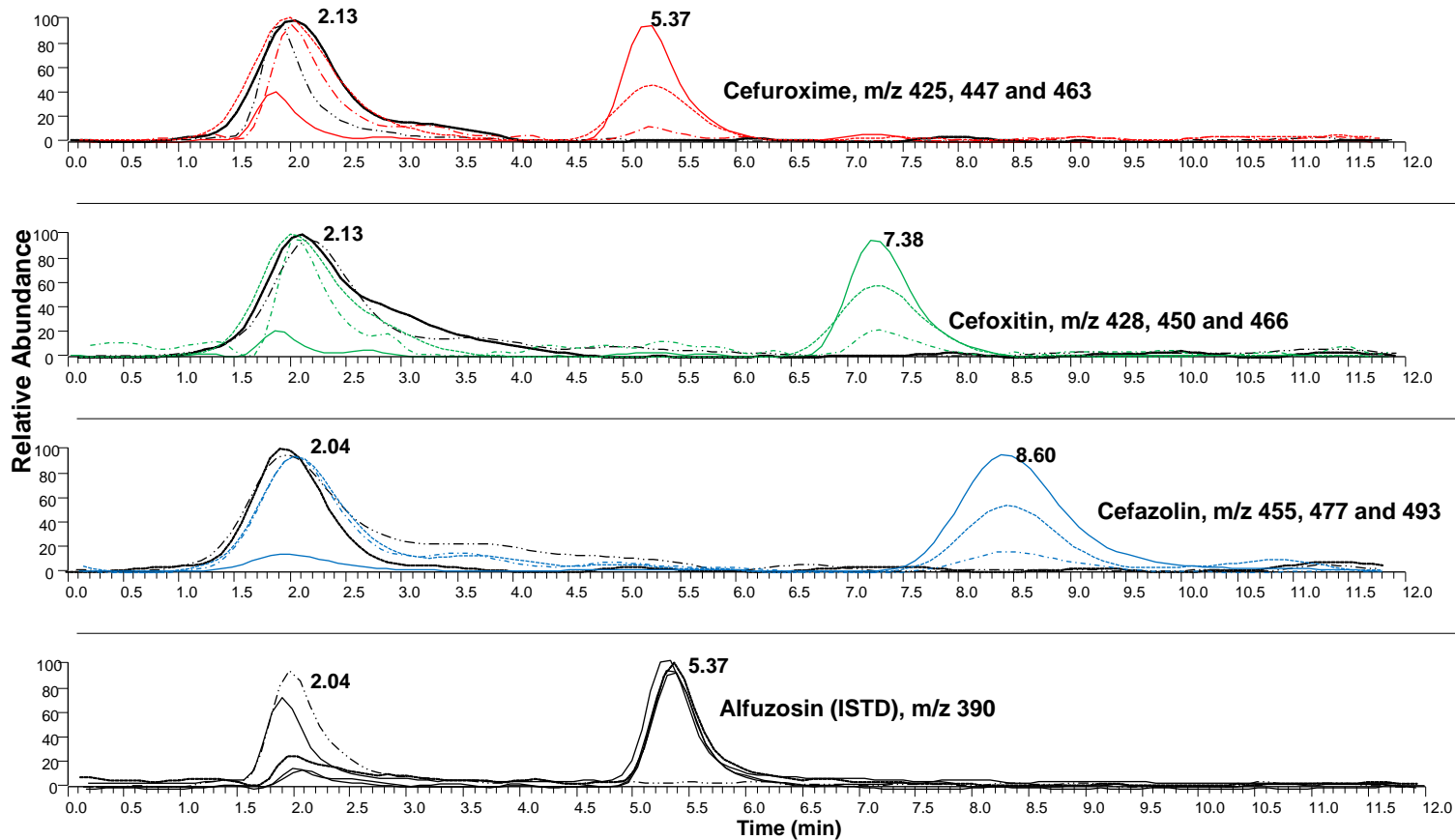
Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και διήθηση



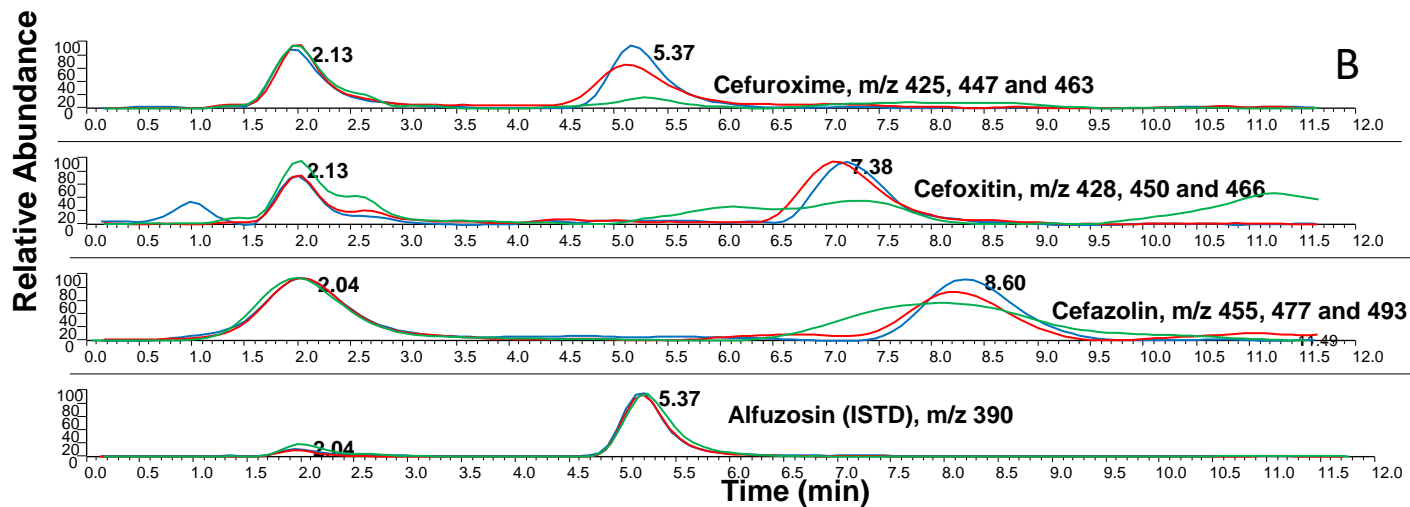
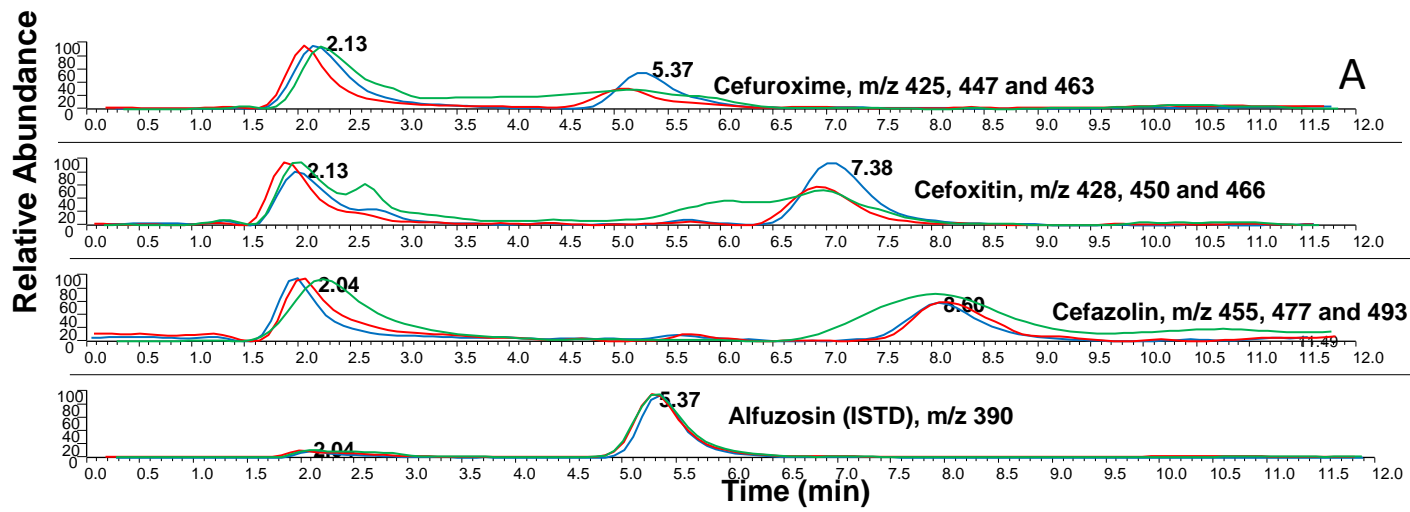
- Η προετοιμασία του δείγματος που ακολουθήθηκε ήταν η κατακρήμνιση πρωτεϊνών με φυγοκέντριση μετά από προσθήκη σημαντικής ποσότητας ακετονιτριλίου.



Smoothed and normalized mass chromatogram of a blank breast milk sample (black line) overlaid with smoothed and normalized mass chromatograms (SIM mode) of calibration breast milk samples spiked with $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (dashed line) and $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solid line) of cefuroxime (red line), cefoxitin (green line), cefazolin (blue line) and $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ alfuzosin.

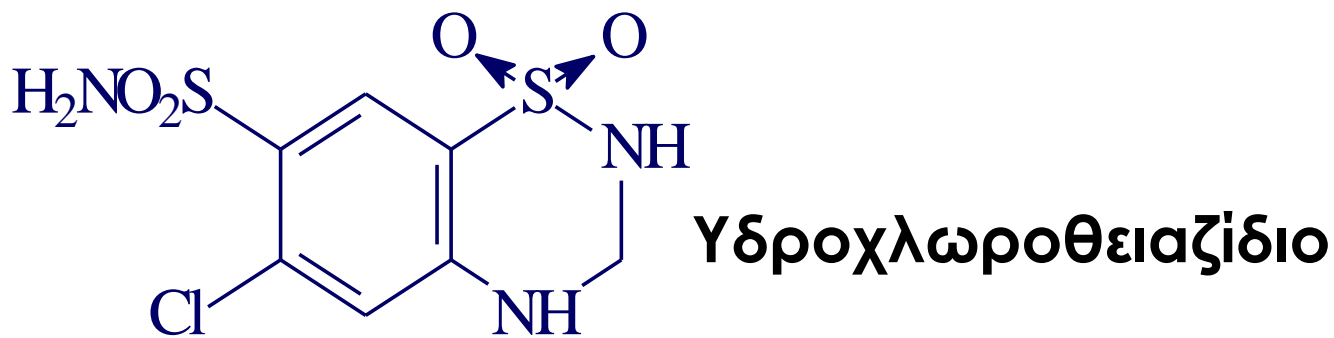


Smoothed and normalized mass chromatograms of a zero blank plasma sample (black solid line) overlaid with a blank plasma sample (black dashed and dotted line) and with smoothed and normalized mass chromatograms (SIM mode) of calibration plasma samples spiked with 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (dashed dotted line), 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (dashed line) and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (solid line) of cefuroxime (red line), cefoxitin (green line), cefazolin (blue line) and 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ alfuzosin.



Smoothed and normalized mass chromatograms obtained from the analysis of 25 (blue line), 50 (green line) and 100 μL (red line) of breast milk (A), human plasma (B)

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου LC-ESI/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Βεναζεπρίλης, της Βεναζεπριλάτης και του Υδροχλωροθειαζιδίου σε Ανθρώπινο Πλάσμα



Προκατεργασία δειγμάτων Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

- ❖ Στήλες SPE: Oasis HLB 30 mg/1ml
(Hydrophilic Lipophilic Balanced)
- ❖ Ενεργοποίηση: 1 x 1,0 ml μεθανόλη
1 x 1,0 ml H₂O
- ❖ Εφαρμογή δείγματος: 1 mL δείγματος πλάσματος
+ 100 μL δ/τος χλωροθαλιδόνης 10 μg mL⁻¹
+ 100 μL δ/τος H₃PO₄ 10%
- ❖ Έκπλυση : 2 x 1,0 mL δ/τος HCOOH 10%
- ❖ Έκλουση : 800 μL μεθανόλης

LC-ESI/MS – human plasma - SPE

