

Utvikling og anvendelse av UPLC-MS baserte analyser av gentamicin i blodprøver

Sabah Tabassum Bashir

Masteroppgave i Farmasi

Vår 2016

Veiledere: Professor Einar Jensen og førsteamanuensis Lars Småbrekke

Forord

Denne masteroppgaven ble påbegynt i august 2015 og fullført i mai 2016. Arbeidet ble utført ved avdeling for legemiddelkjemi på institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø. Veilederne på oppgaven har vært Einar Jensen og førsteamanuensis Lars Småbrekke.

Jeg vil takke hovedveileder Einar Jensen for å ha gitt meg muligheten til å jobbe med denne oppgaven. Stor takk til Lars Småbrekke for gode råd, tips og konstruktive tilbakemeldinger. En spesiell takk til Terkel Hansen for bistand med maskinen som ikke var fullt så samarbeidsvillig i perioder.

Mine fabelaktige lesepartnere Edmund Theodore Assignon og Kristian Meier Sørensen er årsaken til at studietiden min har vært helt fantastisk. Livet på lesesalen ville ikke vært det samme uten dere!

Tusen takk til familien min i Oslo og spesielt min søster, Sadaf Bashir, som oppmuntret meg til å ta denne masteren i Tromsø. I Tromsø vil jeg spesielt takke Guttorm Sørensen og Wenche for å ha vært så snille og forenklet de hektiske studiedagene med å ha disket opp middag med kos. Sist men ikke minst, vil jeg også takke familien min i Tromsø; min reservemamma, Anja Vibeke Olsen og jentene for å ha støttet meg i tykt og tynt. Jeg er så utrolig glad i dere!

Tromsø, 2016.

Sammendrag

Gentamicin blir brukt i behandling av alvorlige infeksjoner hos barn og voksne. For å unngå alvorlige bivirkninger må behandlingen følges opp med plasmakonsentrasjonsmålinger. I dag måles serumkonsentrasjon med immunoassay basert metode som krever 200-500 µL blod.

Formålet med prosjektet var å utvikle en LC-MS basert metode for analyse av gentamicin i små prøvevolum, samt etablere en metode som kvantifiserer de ulike forbindelsene av gentamicin.

En LC-MS metode basert på bruk av en HILIC – UPLC kolonne ble forsøkt utviklet. Dette gav symmetriske, smale topper i kromatogrammene, noe som forenkler deteksjon og kvantifisering av små mengder. Det ble ikke oppnådd kromatografisk separasjon mellom de ulike komponentene. Ulempen med det er fare for ionesuppresjon og at det ikke er mulig å kvantifisere individuelt de isobare forbindelsene C2, C2a og C2b.

I det videre arbeid ble derfor HILIC-kolonnen erstattet med en C18 kolonne og med heptafluorosmørsyre som ioneparsreagens i mobil fase. Deteksjon i MS ble utført både i SIR- og MRM – mode. Optimale betingelser for SIR og MRM ble etablert. I dette systemet ble god separasjon oppnådd, både mellom intern standard (Tobramycin) og gentamicin og mellom de isobare forbindelsene C2, C2a og C2b. Resultat fra analyse av rene standarder viste at metoden har potensiale i analyse av klinisk relevante konsentrasjoner, både med hensyn på linearitet, minste detekterbare og minste kvantifiserbare mengde.

Et av målene med oppgaven var å opparbeide prøvene i 96-brønnsformat. Til dette ble det benyttet OSTRO plater (96 brønns-format) med et pakkemateriale som fjerner fosfolipider i serum. Proteiner ble felt ved hjelp av acetonitril eller trikloreddiksyre før videre rensing på OSTRO systemet. I analyser av de ferdig rensede prøvene var det ikke mulig å detektere verken gentamicin eller tobramycin.

Etter dette ble serumprøver rensset ved bruk av trikloreddiksyre til å felle ut proteiner og ved at supernatant ble ekstrahert med Etylacetat. Analyser av ferdig rensede prøver gav respons både for tobramycin og gentamicin og linearitet var tilfredsstillende, men utbytte etter ekstraksjon var dårlig. Metoden er derfor ikke egnet til analyse av prøver med klinisk relevante konsentrasjoner av gentamicin.

En LC-MS metode basert på bruk av C18 kolonner og en mobilfase med HFBA som ioneparsreagens er utviklet. Dersom problemet med rensing og ekstraksjon av gentamicin fra serum kan løses vil metoden sannsynligvis være godt egnet til analyse av gentamicin i kliniske relevante konsentrasjoner.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
INNHALDSFORTEGNELSE	IV
LISTE OVER FIGURER	VII
LISTE OVER TABELLER	VIII
LISTE OVER FORKORTELSER	IX
1 INNLEDNING	1
2 BAKGRUNN	1
2.1 GENTAMICIN	1
2.2 FARMAKOKINETIKK	2
2.2.1 BETYDNING AV ALDER	2
2.2.2 ABSORBSJON	3
2.2.3 DISTRIBUTUSJON	4
2.2.4 ELIMINASJON	4
2.3 DOSERING	5
2.4 PLASMAKONSENTRASJONSMÅLINGER (THERAPEUTIC DRUG MONITORING - TDM)	6
2.5 ANALYSE AV GENTAMICIN	7
2.6 PRØVEOPPARBEIDELSE	8
2.6.1 PROTEINFELLING	8
2.6.2 OSTRO	9
2.6.3 VÆSKE-VÆSKE EKSTRAKSJON	9
2.7 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)	10
2.8 ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)	11
2.9 VALG AV KOLONNE OG MOBILFASE	12
2.9.1 HILIC	12
2.9.2 RP-18 - IONEPARKROMATOGRAFI	12
2.10 MASSEPEKTROMETRI	13
2.10.1 INLET	13
2.10.2 IONEKILDE	13
2.10.3 MASSEANALYSATOR	14
2.11 INTERN STANDARD (IS)	16
2.12 VALIDERING AV ANALYSEMETODE	16
2.12.1 LINEARITET	16
2.12.2 NØYAKTIGHET	16
2.12.3 PRESISJON	17
2.12.4 DETEKSJONS- OG KVANTIFISERINGSGRENSE	17
2.12.5 ROBUSTHET	17
3 FORMÅL	18
4 MATERIALE	19
4.1 KJEMIKALIER OG UTGANGSSTOFFER	19
4.1.1 VANN	19
4.1.2 SERUM	19

4.2	UTSTYR	20
4.3	INTERN STANDARD	21
4.4	VALG AV KOLONNE	21
5	<u>METODE – HILIC</u>	<u>22</u>
5.1	TILLAGING AV STAMLØSNING	22
5.2	UPLC	22
5.2.1	KOLONNE	22
5.2.2	MOBILFASESAMMENSETNING	22
5.2.3	INJEKSJONSVOLUM	23
5.3	MASSESPEKTROMETRI	24
5.3.1	IONEKILDE	24
5.3.2	MASSEANALYSATOR	24
5.4	VALIDERING	25
5.4.1	LINEARITET - STANDARDPRØVER	25
6	<u>METODE – RP-18</u>	<u>26</u>
6.1	TILLAGING AV STAMLØSNING	26
6.2	UPLC	26
6.2.1	KOLONNE	26
6.2.2	MOBILFASESAMMENSETNING	26
6.2.3	INJEKSJONSVOLUM	26
6.3	MASSESPEKTROMETRI	26
6.3.1	IONEKILDE	26
6.3.2	MASSEANALYSATOR	27
6.4	PRØVEOPPARBEIDELSE	28
6.5	VALIDERING	29
6.5.1	LINEARITET – STANDARDPRØVER LØST I H ₂ O	29
6.5.2	LINEARITET-- STANDARDPRØVER MED SERUMPRØVER	29
7	<u>RESULTATER – HILIC</u>	<u>30</u>
7.1	UPLC	30
7.1.1	MOBILFASEGRADIENT	30
7.1.2	KROMATOGRAFISK SEPARASJON	31
7.2	INTERN STANDARD	33
7.3	MASSESPEKTROMETRI	35
7.3.1	FULLSCAN	35
7.4	STANDARDPRØVER FORTYNNET MED ULIKE FORTYNNINGSMIDLER	37
7.5	VALIDERING	39
7.5.1	STANDARDPRØVER FORTYNNET MED MeOH	39
7.5.2	STANDARDPRØVER FORTYNNET MED H ₂ O	44
8	<u>RESULTATER – RP-18</u>	<u>48</u>
8.1	UPLC	48
8.1.1	MOBILFASESAMMENSETNING- ISOKRATISK ELUERING	48
8.2	KROMATOGRAFISK SEPARASJON	51
8.3	MOBILFASE – OPTIMERING AV HFBA KONSENTRASJON	52
8.4	MASSESPEKTROMETRI	53
8.4.1	CONE VOLTAGE	53
8.4.2	KOLLISJONSENERGI	54
8.5	PRØVEOPPARBEIDELSE	55
	VALIDERING	59

8.5.1	STANDARDPRØVER LØST I H ₂ O	59
8.5.2	STANDARDPRØVER MED SERUM	61
9	<u>DISKUSJON</u>	62
9.1	HILIC	62
9.1.1	UPLC	62
9.1.2	INTERN STANDARD	63
9.1.3	MASSESPEKTROMETER	63
9.1.4	STANDARDPRØVER – ULIKE FORTYNNINGER	63
9.1.5	VALIDERING	64
9.2	RP-18	65
9.2.2	IDEELL HFBA KONSENTRASJON I MOBILFASE	65
9.2.3	MASSESPEKTROMETRI	66
9.2.4	PRØVEOPPARBEIDELSE	66
9.2.5	VALIDERING	67
10	<u>KONKLUSJON</u>	68
11	<u>REFERANSER</u>	69
12	<u>VEDLEGG.</u>	72

Liste over figurer

Figur 1. Struktur av gentamicin	2
Figur 2 Aldersbegreper relatert til nyfødtpperioden (15)	3
Figur 3. Illustrasjon av proteinfelling (38)	8
Figur 4. Fjerning av fosfolipider med OSTRO (39)	9
Figur 5. Oppsett for et HPLC/UPLC system (41)	10
Figur 6. Fremstilling av hvordan mobilfasehastigheten påvirker HETP ved forskjellige størrelser av stasjonærfasepartikler (41)	11
Figur 7. Oversikt over massespektrometer	13
Figur 8. Elektrospray Ionisering (44)	13
Figur 9. Kvadrupol analysator (45)	14
Figur 10. Trippelkvadrupol prinsippet. Bildet er modifisert fra (46)	15
Figur 11. Tobramycin struktur (49).....	21
Figur 12. Endring av mobilfasesammensetning under analysetiden.	30
Figur 13. Ingen kromatografisk separasjon mellom gentamicin og tobramycin	31
Figur 14. Kromatogram for gentamicin forbindelsene og tobramycin	32
Figur 15. SIR analyse av tobramycin.....	33
Figur 16. MRM analyse av tobramycin.....	34
Figur 17. Fullscanspekter av gentamicin	35
Figur 18. Fullscanspekter av tobramycin.....	35
Figur 19. Kromatogram for gentamicin forbindelsene som gir produksjon på 322 m/z.....	36
Figur 20. Dårlig signal av standardprøve som er fortynnet med ACN	37
Figur 21. SIR analyse av standardprøve som er fortynnet med H ₂ O	38
Figur 22. SIR analyse av standardprøve som er fortynnet med MeOH	38
Figur 23. SIR analyse av standardprøve fortynnet med MeOH.....	39
Figur 24. Kjørt SIR analyse av samme standardprøver dagen etter	40
Figur 25. SIR analyse av nye standardprøver	41
Figur 26. MRM analyse av standardprøvene	42
Figur 27. MRM analyse av fortynnet standardprøve	43
Figur 28. Andre forsøk på SIR analyse av standardprøve fortynnet med H ₂ O.....	44
Figur 29. MRM analyse av standardprøvene fortynnet med H ₂ O	45
Figur 30. MRM analyse av fortynnet serie med standardprøve	46
Figur 31. MRM analyse av ytterligere fortynnet standardprøver	47
Figur 32. Isokratisk eluering med 65 % vann og 35% ACN	48
Figur 33. Isokratisk eluering med 70% vann og 30% ACN	49
Figur 34. Isokratisk eluering med 72% vann og 28 % ACN	50
Figur 35. Kromatografisk separasjon med C 18 kolonne.....	51
Figur 36. Retensjonstiden til analyttene med ulik konsentrasjon HFBA i mobilfasene.	52
Figur 37. Optimal cone voltage for de ulike gentamicin komponentene og tobramycin.	53
Figur 38. Optimal kollisjonsenergi for gentamicin komponentene og tobramycin.....	54
Figur 39. Analyse av serumprøve etter proteinfelling med ACN og fjerning av fosfolipider på OSTRO	55
Figur 40. Analyse av serumprøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider på OSTRO.....	56
Figur 41. Analyse vandig gentamicin prøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider på OSTRO.	57
Figur 42. Analyse serumprøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider med etylacetat	58
Figur 43. SIR analyse av standardprøvene	59
Figur 44. MRM analyse av standardprøvene	60
Figur 45. SIR analyse av serumprøver etter proteinfelling og ekstraksjon med etylacetat	61

Liste over tabeller

Tabell 1. Oversikt over de ulike gentamicinfragmentene. Krav til fordeling mellom de ulike forbindelsene er fastsatt av United States Pharmacopeia (USP) (10, 12).....	2
Tabell 2. Halveringstiden hos spedbarn og premature (19)	4
Tabell 3. Doseringsforslag gitt etter kronologisk og postmenstruell alder (20).....	5
Tabell 4. Kjemikalier	19
Tabell 5. Utstyr	20
Tabell 6. Stamløsninger til HILIC kolonne	22
Tabell 7. Mobilfase brukt i HILIC kolonnen	22
Tabell 8. Mobilfasegradient i HILIC analysen	23
Tabell 9. SIR betingelser for gentamicin og tobramycin.....	24
Tabell 10. MS betingelser for fullscan.....	24
Tabell 11. Betingelser for MRM analyse av gentamicin og tobramycin	24
Tabell 12. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i hver serie.....	25
Tabell 13. Fortynnet standardprøver	25
Tabell 14. Fortynnet standardprøvene ytterligere.....	25
Tabell 15. Stamløsning til C-18 kolonne	26
Tabell 16. SIR betingelser for gentamicin og tobramycin	27
Tabell 17. Betingelser for MRM analyse av gentamicin og tobramycin	27
Tabell 18. Prøveopparbeidelse prosedyren.....	28
Tabell 19. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i standardprøvene med H ₂ O	29
Tabell 20. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i standardprøvene med serum.	29
Tabell 21. Forurensning med SIR analyse.....	33
Tabell 22. Forurensning med MRM analyse.....	34
Tabell 23. Datagrunn for SIR analyse av standardprøvene løst med H ₂ O (C18)	72
Tabell 24. Datagrunnlag for MRM analyse av standardprøvene løst i H ₂ O.....	73
Tabell 25. Datagrunnlag for SIR analyse av standardprøver med serum.	74

Liste over forkortelser

Forkortelse	Norsk	Engelsk
µg	Mikrogram	Microgram
µL	Mikroliter	Microlitre
µm	Mikrometer	Micrometer
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
CZE	Kapillær elektroforese	Capillary zone electrophoresis
ESI	Elektrosprayionisasjon	Electrospray ionization
FA	Maursyre	Formic Acid
FPIA	Fluorescens polarisasjon immunoassay	Fluorescens polarisation immunoassay
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate	Glomerular filtration rate
HETP	Høydeekvivalent til en teoretisk plate	Height equivalent to a theoretical plate
HFBA	Heptfluoro smørsyre	Heptafluorobutyric acid
HILIC	Hydrofil interaksjon kromatografi	Hydrophilic interaction chromatography
HPLC	Høyeffektiv væskechromatografi	High Performance liquid chromatography
IS	Intern standard	Internal standard
kV	Kilovolt	kilovolt
L	Liter	Litre
LC	Væskechromatografi	Liquid chromatography
m/z	Masse-ladningsforhold	Mass-charge ratio
mL	Milliliter	Millilitre
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massespektrometri	Mass spectrometry
ng	Nanogram	Nanogram
PMA	Postmenstruell alder	Postmenstrual age
RSD	Relativ standardavvik	Relative standard deviation
S	Estimat for standardavvik	Estimate of standard deviation
SIR	Selektiv ionemonitorering	Selected Ion Recording
TCA	Trikloroddisyre	Trichloroacetic acid
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering	Therapeutic drug monitoring
TPN	Total parenteral ernæring	Total parenteral nutrition

UPLC	Ultraeffektiv væskekromatografi	Ultra performance liquid chromatography
USP	United States Pharmacopeia	United States Pharmacopeia
Vd	Distribusjonsvolum	Volume og distribution

1 Innledning

Gentamicin er et bredspektret antibiotikum som blir brukt i behandling av alvorlige infeksjoner hos barn og voksne (1, 2). Legemiddelet er øre- og nyretoksisk, og toksisiteten avhenger av behandlingens lengde og laveste plasmakonsentrasjon før neste dose tas (3). Behandlingen må derfor følges opp med plasmakonsentrasjonsmålinger.

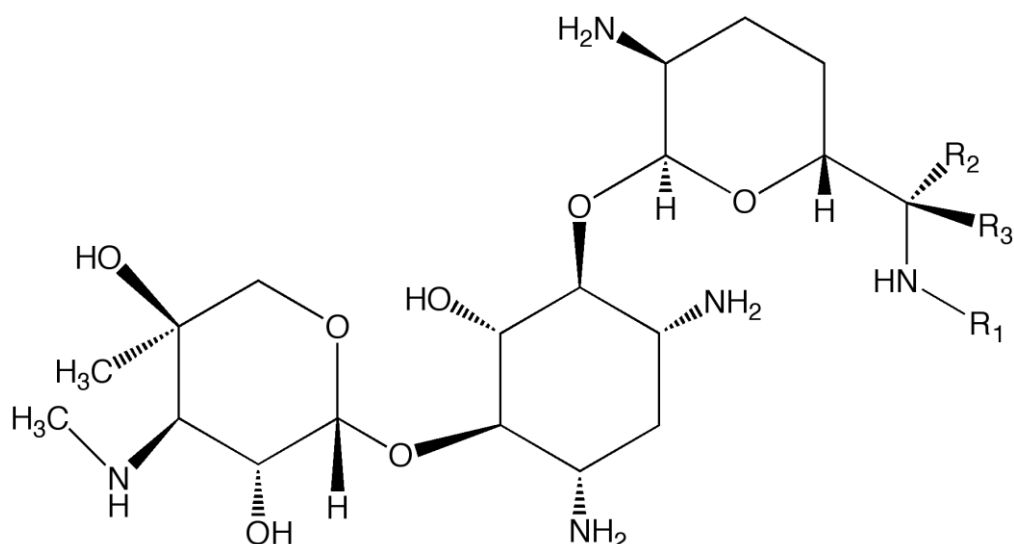
2 Bakgrunn

Et svangerskap varer normalt i 40 uker, og et for tidlig født barn (prematurt) er etter definisjon født før 37 fullgatte svangerskapsuker (4). Premature barn har ikke fullt utviklet immunforsvar og er derfor utsatt for infeksjoner (5). Mange får infeksjonsbehandling med aminoglykosider, eventuelt i kombinasjon med andre antibakterielle midler (1).

Blodvolumet estimeres utfra kroppsvekten, og hos små barn er gjennomsnittlig blodvolum på 80-85 ml/kg (6). Det vil si at et barn som veier 700 gram vil ha om lag 60 ml blod. En immunologisk analysemetode krever 200-500 μL blod for å analysere plasmakonsentrasjon av gentamicin (7, 8). En metode hvor man trenger mindre blodvolum for å måle plasmakonsentrasjonen av gentamicin vil derfor være attraktiv.

2.1 Gentamicin

Gentamicin ble oppdaget i 1963 (9), og blir nå laget ved fermentering av bakterien *Micromonospora purpurea*. Strukturen av gentamicin er vist i Figur 1 (10). Fermenteringen gir en blanding av molekylene C1, C1A, C2, C2a og C2b (11), og mengdeforholdet mellom de ulike molekylene vil variere mellom ulike produksjonsbatcher (10). R-gruppene, molekylvekt, monoisotopisk masse og mengdeforholdet til de forskjellige variantene er vist i Tabell 1.



Figur 1. Struktur av gentamicin

Tabell 1. Oversikt over de ulike gentamicinfragmentene. Krav til fordeling mellom de ulike forbindelsene er fastsatt av United States Pharmacopeia (USP) (10, 12)

Forbindelse	R1	R2	R3	Masse (g/mol)	Monoisotopisk Masse (u)	Fordeling
C1	CH3	CH3	H	477,60	477,32	25-50%
C1a	H	H	H	449,54	449,28	10-35%
C2	H	CH3	H	463,57	463,31	25-55%
C2a	H	H	CH3	463,57	463,31	
C2b	CH3	H	H	463,57	463,31	

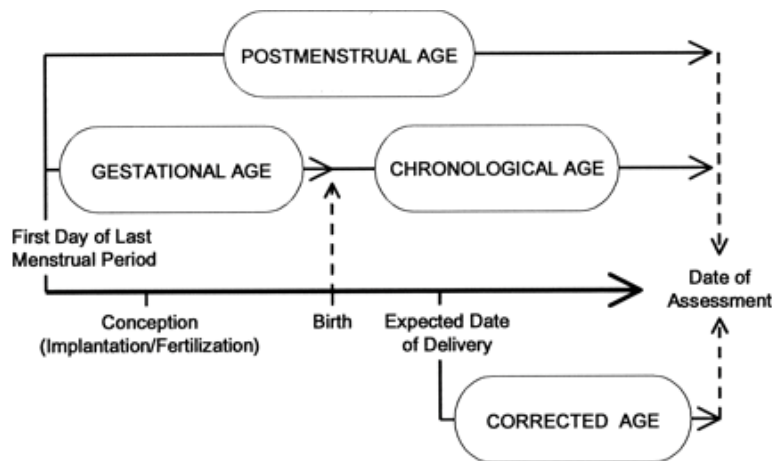
2.2 Farmakokinetikk

2.2.1 Betydning av alder

Aldring gir strukturelle og funksjonelle forandringer i organer som kan påvirke farmakokinetikken til legemidler, og forandring i kroppens sammensetning kan blant annet endre distribusjonsvolumet (Vd) av både fett- og vannløselige legemidler (13).

Hos premature barn vil farmakokinetikken til aminoglykosider i tillegg til vekt også være avhengig av gestasjonsalder og kronologisk alder. Disse begrepene brukes ofte feilaktig om hverandre, men forskjellen er viktig. Uppreis bruk av terminologi om alder begrenser muligheten for en god tolkning av data om valg av behandling og effekt av behandling for denne pasientgruppa.

Gestasjonsalder er tiden mellom den første dagen i siste menstruasjon og fødselsdagen målt i hele uker (14). Kronologisk alder (eller ”postnatal alder”) er tiden fra fødselen, og blir vanligvis beskrevet i dager, uker eller måneder. Postmenstruell alder er tiden mellom første dag i siste menstruasjon og fødsel pluss kronologisk alder (Fig. 2)(15).



Figur 2 Aldersbegreper relatert til nyfødtpperioden (15)

Både gestasjonsalder og kronologisk alder er viktige variabler for å predikere eliminasjonshastigheten av aminoglykosider (16).

Farmakokinetikken til aminoglykosider har blitt beskrevet med både 1, 2 og 3 kompartmentmodeller (16, 17). I en vanlig klinisk setting vil 1.ordens kinetikk med 1-kompartiment modell normalt beskrive eliminasjonsforløpet tilfredsstillende (17).

En 2-kompartiment modell kan gi en bedre beskrivelse av eliminasjonen (16), men det er usikkert om forskjellen mellom denne og en 1-kompartiment modell er klinisk relevant (17).

2.2.2 Absorpsjon

Gentamicin blir dårlig absorbert fra mage-tarmkanalen (<2%) (18) på grunn av de polare egenskapene, og blir derfor normalt gitt intravenøst over 30 minutter, da dette gir en forutsigbar serumprofil (16).

2.2.3 Distribusjon

Gentamicin er polart, har lav lipidløselighet, lav proteinbinding (<30%) (18) og vi finner høyere konsentrasjon i ekstracellulære væske enn i celler og vev (16). Unntaket er i spesielle celler i nyrebarken og i nyrene og i væsken rundt labyrinten i det indre øret (3, 18).

Vd er høyere hos nyfødte enn hos eldre pediatrike pasienter. Man finner også økt distribusjonsvolum hos pasienter med ødemtilstander, ascites og væskeoverbelastning. Dehydrerte pasienter har redusert Vd (18).

2.2.4 Eliminering

Gentamicin elimineres via glomerulær filtrasjon, og 99% utskilles uforandret i urinen.

Halveringstiden kan variere betydelig på grunn av variasjon i Vd, gestasjonsalder, kronologisk alder og plasmaclearance (16, 17).

Nefronene blir ferdig utviklet mellom uke 32 og 36 (16). Premature barn uten fullt utviklet nyre vil dermed ha lavere GFR og lenger halveringstid ved fødsel (16, 17). Tabell 2 viser halveringstiden til barn og premature (19).

Tabell 2. Halveringstiden hos spedbarn og premature (19)

Aldersgruppe / vekt	Halveringstid
Spedbarn: 1 uke til 6 måneders alder	3-3,5 timer
Fullbårne spedbarn og store premature yngre enn 1 uke gammel	5,5 timer
Små premature som veier over 2 kg	5 timer
Små premature sin veier 1,5-2 kg	8 timer
Små premature som mindre enn 1,5 kg	11,5 timer

2.3 Dosering

Aldersassosierte forandringer i organfunksjon og kroppssammensetning gjør det nødvendig å individualisere gentamicin behandling hos premature (16). De fleste studiene anbefaler høyere doser og forlenget doseringsintervall fordi det reduserer toksisitet, gir bedre effekt og reduserer kostnader (2, 16, 18). Det er tre aktuelle intervall; per 24, 36 eller 48 timer.

En klinisk studie gjort på premature barn foreslår å dosere 5 mg/kg hver 48 time for $GA \leq 29$ uker, 4,5 mg/kg hver 36 time for $30 \leq GA \leq 34$ og 4 mg/kg hver 24. time i de første dagene av livet(16). En annen klinisk studie anbefaler 6 mg/kg hver 48. time for de med $GA < 29$ uker, 36 timer for $GA 29-36$ uker og 24 timer for de født ved termin (17).

Databasen Up2date oppgir doseringsregimet både etter gestasjonsalder og postnatal alder eller etter kroppsvekt og postnatal alder(18).

På Universitetssykehuset i Nord Norge anbefaler doseringsregimet vist i Tabell 3.

Tabell 3. Doseringsforslag gitt etter kronologisk og postmenstruell alder (20)

Kronologisk alder	Postmenstruell alder	Anbefalt doseringsregimet
0-7 dager	< 29 uker	6 mg/kg hver 48. time
	29-36 uker	6 mg/kg hver 36. time
	≥ 37 uker	6 mg/kg hver 24. time
> 7 dager	< 29 uker	6 mg/kg hver 36. time
	≥ 29 uker	6 mg/kg hver 24. time

2.4 Plasmakonsentrasjonsmålinger (Therapeutic drug monitoring - TDM)

TDM ved behandling med gentamicin er viktig for å redusere risiko for nefro- og ototoksiske bivirkninger, og for å sikre tilstrekkelig høye konsentrasjoner for optimal effekt. Man tar rutinemessig målinger av bunn- og toppnivå av plasmakonsentrasjonen for å sikre at man er innenfor terapeutisk område. Prøve for bunnkonsentrasjon tas rett før neste injeksjon gis, og denne verdien skal være $< 0,5$ mg/L ved dosering en gang per døgn eller sjeldnere. Prøve for toppkonsentrasjon tas 30 min etter avsluttet infusjon (21).

2.5 Analyse av gentamicin

Kvantitative analyser av aminoglykosider i blod blir hovedsakelig gjort ved hjelp av en fluorescens polarisasjon immunoassay basert metode (FPIA) (22). Gentamicin fra blodprøven og et fluorescinmerket gentamicinderivat konkurrerer om binding til et monoklonalt antistoff. Deretter kvantifiseres det bundne derivatet med fluorescenspolarisasjon (8). Denne metoden kvantifiserer den totale mengden av gentamicin i serum, men den kvantifiserer ikke de ulike gentamicin forbindelsene i prøven (12). I tillegg til det er det også stilt spørsmål om samtidig behandling med total parenteral ernæring (TPN), som er en blanding av elektrolytter, aminosyrer og fettemulsjon vil påvirke målingen med FPIA (23).

På grunn av manglende kromofore eller fluorofore grupper er deteksjon av aminoglykosider svært utfordrende og flere ulike metoder har vært anvendt for separasjon og deteksjon. Tynnskikt-kromatografi (TLC) med densimetri (24), ulike væske-kromatografibaserte (LC) metoder med spektroskopisk og fluorescens deteksjon (25-29), elektrokjemisk deteksjon (30-33), evaporativ light scattering deteksjon (34-36) har vært anvendt. Kapillær elektroforese (CZE) har også vært forsøkt. Ulempen med de ulike LC-baserte metodene er at de alle krever pre- eller post-kolonne derivatisering. Dette gjelder også ved bruk av CZE som i tillegg ikke er så godt egnet for rutineanalyser. Derivatisering er tidkrevende og introduserer et ekstra trinn i en analytisk metode.

Derivatisering har negativ effekt på nøyaktighet og presisjon. Bruk av massespektrometri (MS) som detektor med sine muligheter for positiv identifikasjon og samtidig sensitiv og selektiv deteksjon peker seg derfor ut som et naturlig valg for analyse av aminoglykosider. MS kombinert med moderne kromatografi gir dessuten mulighet for individuell kvantitativ analyse av de isobare gentamicin forbindelsene C2, C2a og C2b.

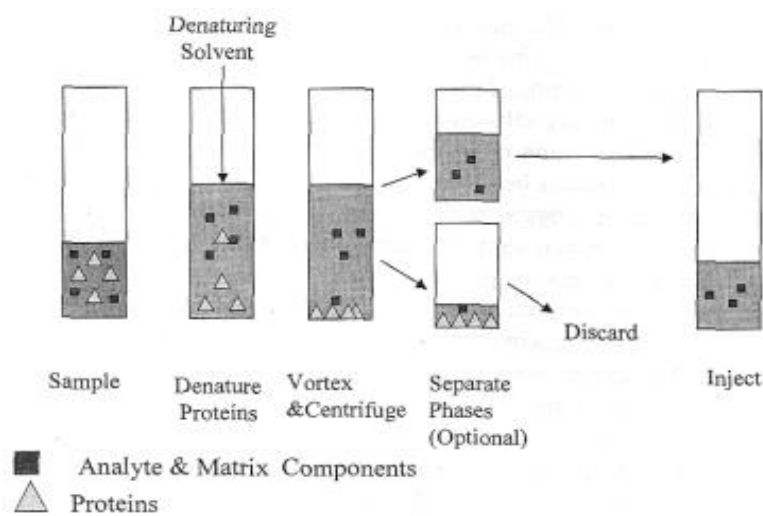
En kromatografisk metode med høy spesifisitet og sensitivitet som er i stand til å indentifisere, detektere og kvantifisere gentamicinforbindelsene i små prøvevolum vil være attraktiv for å kartlegge den farmakokinetiske profilen til gentamicin hos premature, og en slik metode vil også være av interesse i et klinisk perspektiv.

2.6 Prøveopparbeidelse

Blodprøver inneholder en kompleks blanding av salter, karbohydrater, lipider og proteiner som kan påvirke analysen og gi uønskede signaler i detektoren og interferere med signalene fra analytten. Det er allment kjent at proteiner har en tendens til å tette kolonnen på grunn av utfelling, og bør av den grunn ikke injiseres i LC. I tillegg vil en prøve uten fosfolipider gi mer informasjon enn dersom fosfolipider er tilstede (37). Prøveopparbeidelse er viktig i LC-MS, og det omfatter trinn hvor man fjerner uønskede komponenter fra blodprøver, reduserer mulige problemer med ionesuppresjon og oppkonsentrerer analytten man ønsker å analysere.

2.6.1 Proteinfelling

Figur 3 viser grunnleggende trinn i proteinfelling prosedyren. Trikloureddiksyre (TCA) og organiske løsemidler som metanol og acetonitril (ACN) er effektive til å fjerne proteiner fra blod (38). Proteinfelling fører også til at proteinbinding mellom legemiddel og proteiner brytes. Gentamicin som eventuelt er proteinbundet blir tilgjengelig for analyse.

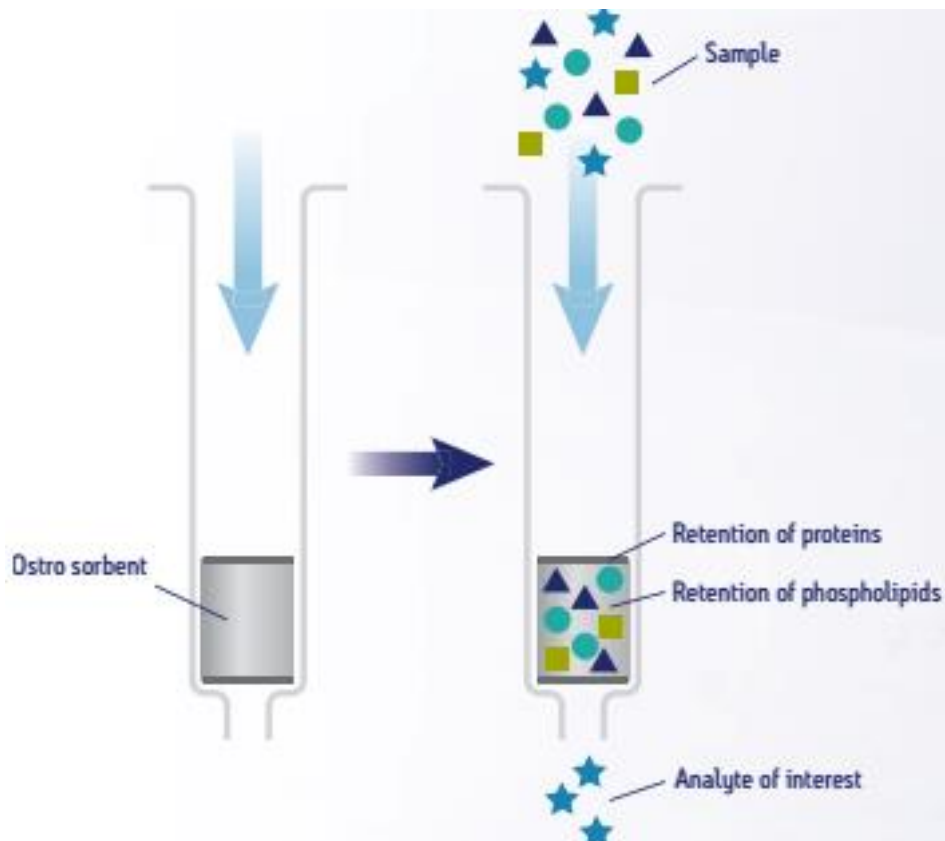


Figur 3. Illustrasjon av proteinfelling (38)

Proteinfelling blir etterfulgt av trinn med vortex og sentrifugering som resulterer i fase-separasjon hvor det denaturete proteinet samles på bunnen av beholderen. Supernatanten pipetteres uten at man får med proteinene.

2.6.2 OSTRO

OSTRO systemet brukes for å fjerne fosfolipider fra plasma og serum. OSTRO består av en ekstraksjonsplate med 96 brønner, og under denne er det plassert en samleplate. Supernatanten overføres etter proteinfelling til 96-brønnsformaten og denne utsettes for et trykk som presser supernatanten gjennom en matriks som retarderer fosfolipidene og prøven samles i samleplaten. Systemet muliggjør opparbeiding av flere prøver samtidig.



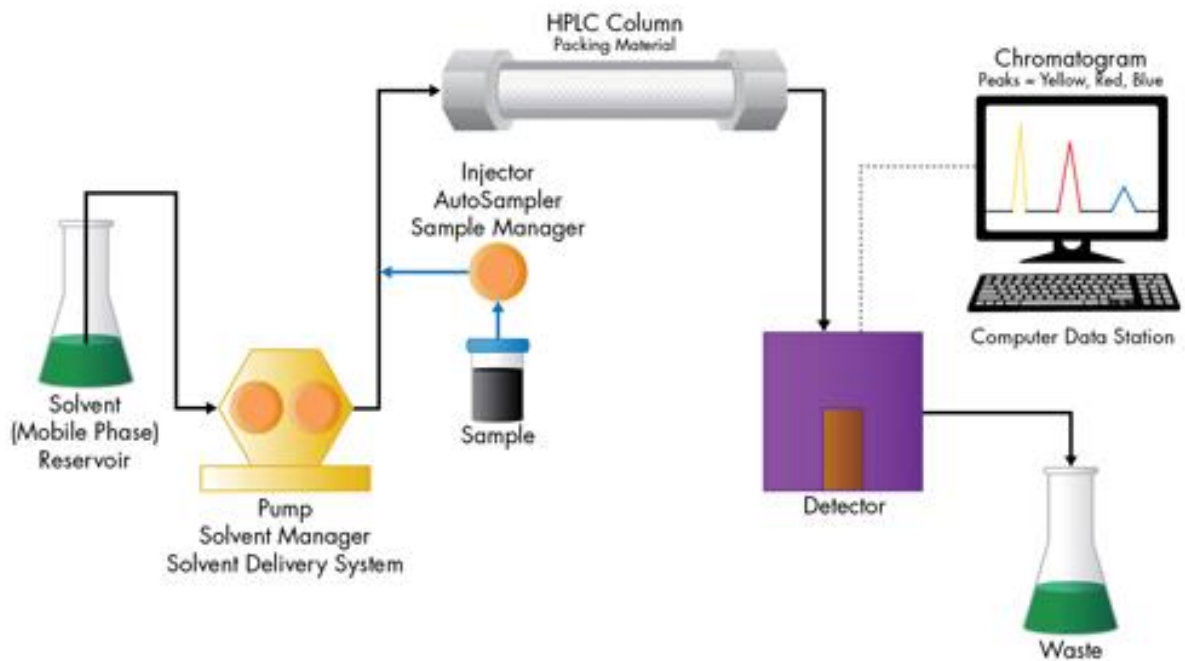
Figur 4. Fjerning av fosfolipider med OSTRO (39)

2.6.3 Væske-væske ekstraksjon

Med væske-væske ekstraksjon har man muligheten til å fjerne uønskede forbindelser. Serumprøven inneholder nøytrale forbindelser og fosfolipider som er lite vannløselig, og disse forbindelsen kan fjernes ved bruk av etylacetat i væske-væske ekstraksjon (40).

2.7 High Performance liquid chromatography (HPLC)

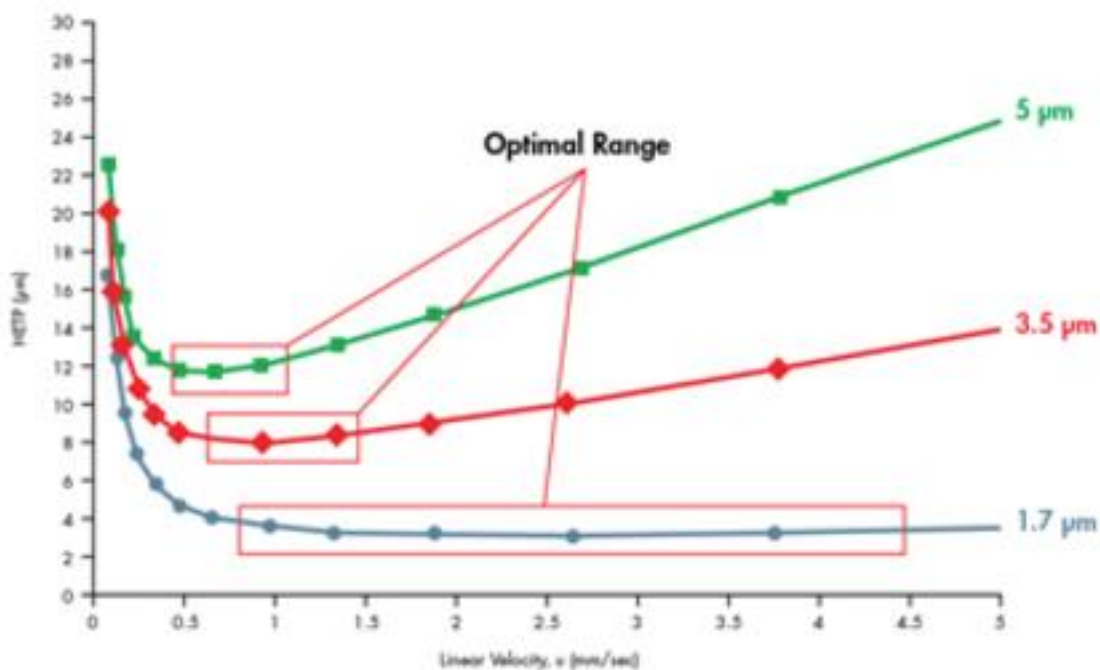
En væskechromatograf består av en høytrykkspumpe som brukes til å generere en spesifisert strømningshastighet på mobilfasen. Pumpen suger mobilfasen fra et reservoar og presser den gjennom kolonnen. En injektor introduserer prøveløsningen inn i den kontinuerlig strømmende mobilfasen som tar med seg prøven inn i HPLC-kolonnen. Kolonnen inneholder det chromatografiske pakkematerialet som er nødvendig for separasjon. Pakkematerialet kalles for stasjonærfase og består som regel av små silikapartikler med en hydrofil eller hydrofob overflate. Jo større affinitet et stoff har til stasjonærfasen, jo senere elueres den. Stoffene som elueres fra kolonnen går til en detektor som detekterer komponentene og konsentrasjonen på dem og sender tilsvarende signal til datamaskinen der den blir omdannet i et kromatogram(41). Detektoren som brukes i denne oppgaven er et MS.



Figur 5. Oppsett for et HPLC/UPLC system (41)

2.8 Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

UPLC skiller seg fra High performance liquid chromatography ved at UPLC kolonnen er pakket med partikler med mindre diameter. Liten partikkelstørrelse gjør at antall teoretiske plater (N) per lengdeenhet av kolonnen blir større enn i HPLC. UPLC har mange fordeler sammenlignet med HPLC. Med samme kolonnenlengde kan en få bedre separasjon, og en kort UPLC-kolonne kan gi samme separasjon som en lengre HPLC-kolonne. Analysetiden blir derfor kortere. En annen og viktig fordel med UPLC er at optimal flow hastighet for lav HETP er over et bredere område enn i tilfelle med HPLC, noe som igjen kan gi kortere analysetid med samtidig god separasjon (Fig. 6) (41).



Figur 6. Fremstilling av hvordan mobilfasehastigheten påvirker HETP ved forskjellige størrelser av stasjonærfasepartikler (41)

2.9 Valg av kolonne og mobilfase

Ved valg av kolonne tas det utgangspunkt i hvilke interaksjoner man ønsker å få mellom analytt og stasjonærfase. Med gentamicin, som er et polart og vannløselig molekyl med en log P på -3,1 (42), vil det være naturlig å velge kolonne med stasjonærfase med hydrofil overflate. Den retarderes da for eksempel ved hydrofile interaksjoner og hydrogenbindinger.

2.9.1 HILIC

I analyser av legemidler basert på LC-MS er det mest vanlig å bruke upolare, omvendt fase kolonner av C18-type. Gentamicin og tobramycin er vannløselige, polare forbindelser og C18 kolonner er derfor uegnet til analyse av disse forbindelsene. Tradisjonelle normal fase kolonner bruker mobilfaser som ikke er kompatible med MS som detektor.

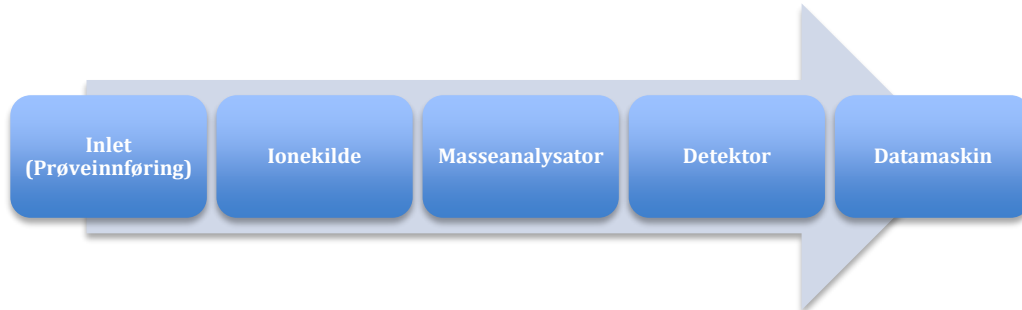
Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) kolonner er egnet til analyse av polare forbindelser og bruker mobilfaser kompatibel med MS. Det ble derfor valgt å undersøke om HILIC-kolonne var egnet til analyse av gentamicin og med tobramycin som intern standard. I en HILIC-kolonne vil analytter elueres i forhold til polaritet, jo mer polar en analytt er desto mer retarderes den. HILIC-kolonnen gir omvendt retensjonsrekkefølge i forhold til en C18-kolonne

2.9.2 RP-18 - Ioneparkromatografi

Som mobil fase i LC-MS er det mest vanlig å bruke blandinger av vann/acetoneitril eller vann/metanol tilsatt ca 0,1% maursyre. En slik mobil fase sammen med C-18 (RP-18) kolonner er uegnet til analyse av aminoglykosider. For å retardere polare forbindelser på C18-kolonner har en tidligere brukt langkjedede (octadecyl) sulfonsyrer som ioneparsreagenser i analyser av polare basiske forbindelser og langkjedede kvartere amin forbindelser som ioneparsreagens i analyse av polare, sure forbindelser. Disse reagensene er ikke kompatibel med MS som detektor. En studie (43) har vist at en kan bruke C18 kolonner og heptafluorosmørsyre som ioneparsreagens i analyse av gentamicin og at dette er kompatibelt med MS som detektor.

2.10 Massespektrometri

Massespektrometri kan benyttes både til kvalitative og kvantitative analyser og kan anvendes både som generell og selektiv detektor. Massespektrometer består av inlet, ionekilde, masseanalysator og detektor. Oppbygging til en massespektrometer er vist i Figur 7.



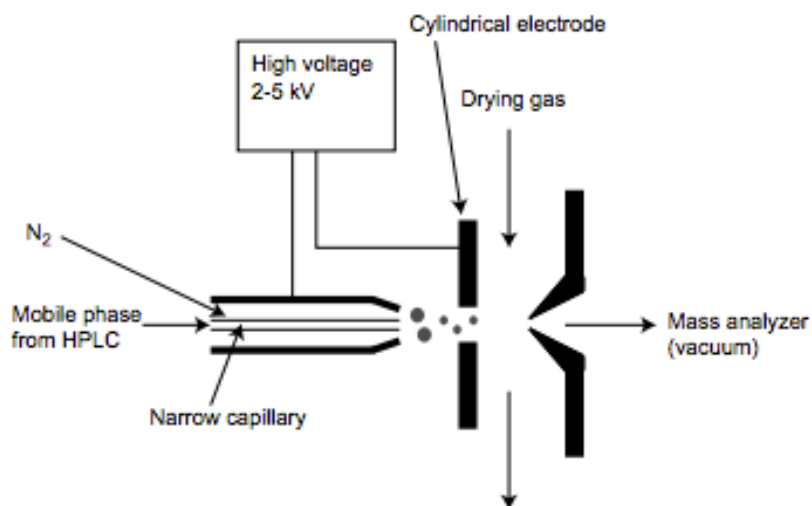
Figur 7. Oversikt over massespektrometer

2.10.1 Inlet

Inlet er der hvor prøven sendes inn i instrumentet, og det skjer enten ved direkte innsprøyting eller via et instrument. Instrumentet prøven går gjennom i denne oppgaven er UPLC.

2.10.2 Ionekilde

Molekylene i prøven må ha ladning for å kunne detekteres i MS, derfor passerer prøven en ionekilde. Ionekilden brukt i denne oppgaven er elektroprayionisering (ESI) og ionekilden sitter utenfor selve MS systemet. ESI er en myk ioniseringsteknikk som er mye brukt når MS benyttes som deteksjon i LC-system. I tillegg til det er ESI godt egnet til polare forbindelser.

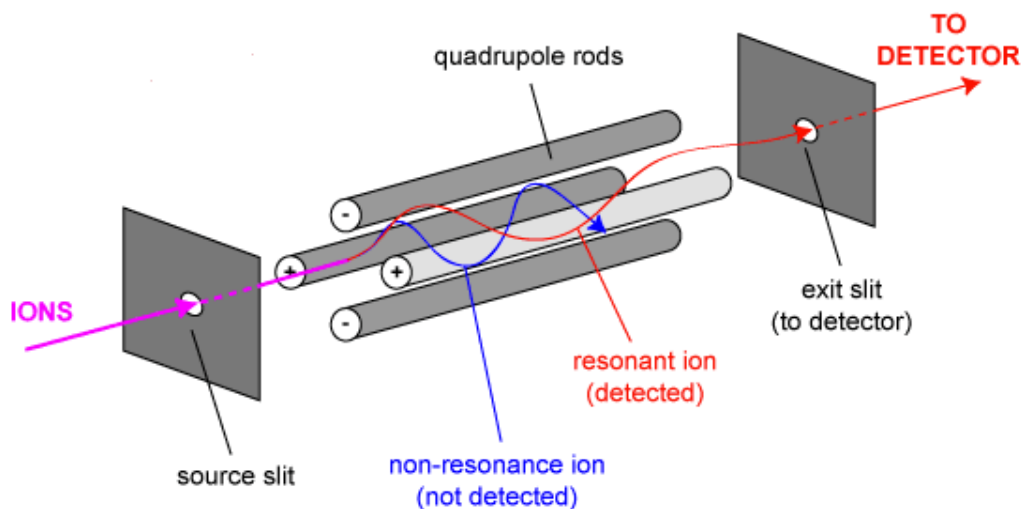


Figur 8. Elektropray Ionisering (44).

I ESI blir prøven introdusert i MS i en flyktig væskestrøm. Væskestrømmen går gjennom et tynt kapillarrør av metall. Dette er pålagt en spenning på 2-5 kV, noe som fører til at væsken går over til en spray av små dråper med ladning (plukker opp et H⁺) ved utgangen av kapillar-røret. Coaxialt rundt dette røret ligger et annet rør der det går en strøm av N₂ gjennom. Dette har to funksjoner; hjelper til at det dannes små dråper og en konsentrasjon av dråpestrømmen. Analyttmolekylene med ladning transporteres deretter videre til en masseanalysator (44).

2.10.3 Masseanalysator

I en masseanalysatoren blir ionene separert. Instrumentet brukt i denne oppgaven er konstruert etter kvadrupolprinsippet. En kvadrupol består av fire parallelle sylindriske elektroder som er diagonalt koblet parvis hvor det pålegges et oscillerende elektrisk felt (Fig 9).



Figur 9. Kvadrupol analysator (45).

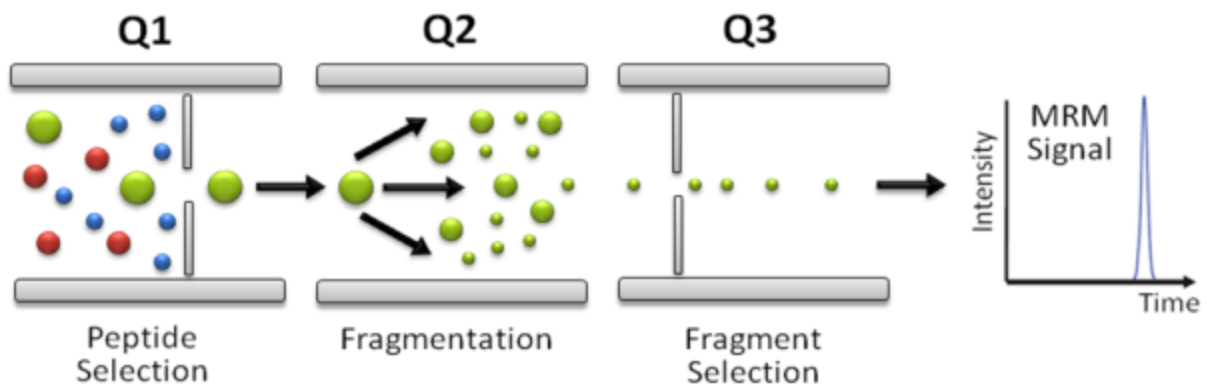
Analyttmolekyler sendes inn i det elektriske feltet og avhengig av m/z -forholdet vil ionene passere elektrodene og avslutningsvis nå fram til detektoren. Ved å variere spenningen som legges på elektrodene, velges hvilke ioner som når detektoren. Ioner med andre masser når ikke frem. Signalet fra detektoren gis i form av et massespektrum hvor intensiteten av ioner gis som funksjon av m/z -verdi (44). MS kan innstilles til å skanne et spesifikt masseintervall. Dette kan være bredt som i en fullscan analyse eller svært smalt som i en selected ion recording (SIR) analyse.

2.10.3.1 Selected ion recording, SIR

Ved kvantitative bestemmelser på svært lave konsentrasjoner er det vanlig å innstille MS til å foreta selektiv ionemonitorering (SIR). MS vil da under hele separasjonstiden kun se etter en bestemt masse eller noen få bestemte masser. En SIR gir et massekromatogram hvor intensiteten til den aktuelle masse gis som funksjon av retensjonstid (44). Forbindelser som ikke har de valgte m/z verdier vil ikke detekteres.

2.10.3.2 Multipel reaction monitoring, MRM

Dersom SIR ikke gir tilstrekkelig selektivitet, kan man utføre analysen med multipel reaction monitoring (MRM). MRM utføres med en trippelkvadrupol. Trippelkvadrupol består av 2 kvadrupoler med en kollisjonscelle imellom. Første kvadrupolen låses kun til den bestemte massen som er karakteristisk for det ionet som skal bestemmes, og alle andre masser får ikke passere første kvadrupol. Deretter passerer det spesifikke ionet til kollisjonscellen hvor den blir møtt med N_2 eller argon gass, og brytes ned til produksjoner. Disse produksjonene måles til slutt med den siste kvadrupolen og detektoren (Fig 10) (44).



Figur 10. Trippelkvadrupol prinsippet. Bildet er modifisert fra (46).

I MRM analyser kan man bruke ett eller flere produksjoner. Ved bruk av to eller flere produksjoner vil sikkerhet med hensyn på identifikasjon øke. Dersom forholdet i intensitet mellom de ulike produksjonene ligger innenfor gitte grenseverdier regnes identifikasjonen som sikker.

2.11 Intern standard (IS)

Internstandard er et stoff som tilsettes i prøveløsningen i en kjent mengde. Formålet med internstandard er å korrigere for tap av analytt som kan skje i alle ledd av analysen. IS bidrar til å opprettholde nøyaktighet og presisjon i analysen. Kriteriene ved valg av intern standard er at den oppfører seg lik analytten under prøveopparbeidelsen, men at det skal være mulig å separere den fra analytten. I tillegg til det bør IS være stabil under analysen og være tilgjengelig i ren form.

2.12 Validering av analysemetode

God tilvirkerpraksis (GMP) er et kvalitetssystem som omfatter prosedyrer og retningslinjer som må følges i henhold til all analysevirksomhet og tilvirkning av legemidler (44). GMP har krav om validering av utstyr og prosesser. Validering bygger på vurdering av linearitet, nøyaktighet, presisjon, deteksjons- og kvantifiseringsgrense og robusthet. I sum gir dette et mål på om man kan stole på analyseresultatene (44).

2.12.1 Linearitet

Lineariteten til en metode er et mål på metodens evne til å gi standardkurver med lineær funksjon av konsentrasjon. Standardkurven av dataene gir en regresjonslinje $y = ax + b$, (hvor y er respons, x er konsentrasjon og b er kurvens skjæringspunkt) og en regresjonskoeffisient. Regresjonskoeffisient, er et mål på lineariteten over et konsentrasjonsområde, og verdien bør helst ligge på 0,999. Den kan være litt mindre, men det avhenger av hvilket formål man har med metoden (44).

2.12.2 Nøyaktighet

Nøyaktighet forteller hvor nær den målte verdien er den sanne verdien. Nøyaktighet bestemmes ved at man sammenligner en kvalitetskontrollprøve med kjent konsentrasjon sammen med den målte verdien fra analysen (44). Avviket mellom den målte og sanne verdien representerer systematiske feil (44).

2.12.3 Presisjon

Presisjon er et uttrykk for spredning i resultatene mellom parallelle målinger. Målingene blir gjort av samme analytt under identiske betingelser, og forskjellen som fremkommer er et mål på spredning. Presisjon er et mål på tilfeldige feil i målingene og kan bestemmes på tre nivåer:

1. *Repeterbarhet*: mål for spredning som oppnås når analyser utføres gjentatte ganger under samme betingelser i et kort tidsrom.
2. *Intermediær presisjon*: resultat av spredning mellom gjentatte målinger utført i samme laboratorium, men med varierende forhold som for eksempel at analyser blir utført av forskjellige analytikere og med forskjellig utstyr.
3. *Reproduserbarhet*: analysemetodens spredning mellom målinger utført på forskjellige laboratorier.

Spredning mellom enkeltmålingene rapporteres som prosent relativt standardavvik, RSD, og den beregnes på følgende måte:

$$RSD = \frac{s}{m} \times 100\%$$

s er standardavvik og m er middelveiden (44).

2.12.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrense er laveste konsentrasjon av et stoff som er mulig å detektere med en aktuell analysemetode. Kvantifiseringsgrense er den laveste konsentrasjon av en prøve som kan bestemmes med en tilfredsstillende presisjon. Både deteksjons- og kvantifiseringsgrense bestemmes ved hjelp av et signal-til-støy-forhold, S/N. Deteksjonsgrensen defineres ofte som S/N = 2 eller 3, og kvantifiseringsgrensen ofte som S/N = 10 (44).

2.12.5 Robusthet

Robusthet til en metode forteller om resultater fra en analyse blir signifikant påvirket av endringer som kan forekomme under utførelsen av analysen. Ved validering av robusthet fokuseres det på endring i variabler som pH, temperatur eller mobilfasesammensetning. Variabler som ikke er stabile må kontrolleres for å se om de oppfyller deres krav (44).

3 Formål

Målet for denne oppgaven var å utvikle en UPLC-MS basert analysemetode for gentamicin i blodprøver som skulle oppfylle følgende kriterier:

- i) Kvantifisere de ulike formene av gentamicin, inkludert individuell kvantifisering av de isobare formene C2, C2a og C2b, og uten behov for derivatisering.
- ii) Bruke små volum av prøve ($< 100 \mu\text{l}$)
- iii) Opparbeide prøvene i 96 brønns format
- iiii) fullstendig validering av metoden

4 Materiale

4.1 Kjemikalier og utgangsstoffer

Tabell 4. Kjemikalier

Forbindelse	Leverandør	Lot	Katalog nr	CAS-nr
Acetonitrile	Sigma-Aldrich	#SZBE131DV	34851-2.5L	75-05-8
Heptafluorobutyric acid	Sigma-Aldrich	#BCBP6551V	52411-25ML-F	375-22-4
Formic Acid	Sigma-Aldrich	#SZBB1170V	33015-1L	64-18-6
Trikloreddiksyre	Sigma-Aldrich	#BCBJ8671V	T6399-5G	76-03-9
Ethylacetate	Sigma-Aldrich	#STBF7589V	33211-1L-R	141-78-6
Methanol	Sigma-Aldrich	#STBF2903V	34860N-2.5L-R	67-56-1
Gentamicin sulfate	Sigma-Aldrich	#079K13862V	G1914-250MG	1405-41-0
Tobramycin sulfate	Sigma-Aldrich	#107K1480	T1783-100MG	79645-27-5

4.1.1 Vann

Vannet som er brukt er 18,2M Ω Milli-Q vann fra Millipore, USA.

4.1.2 Serum

Medikamentfritt serum ble utlevert fra Universitetssykehuset i Nord-Norge.

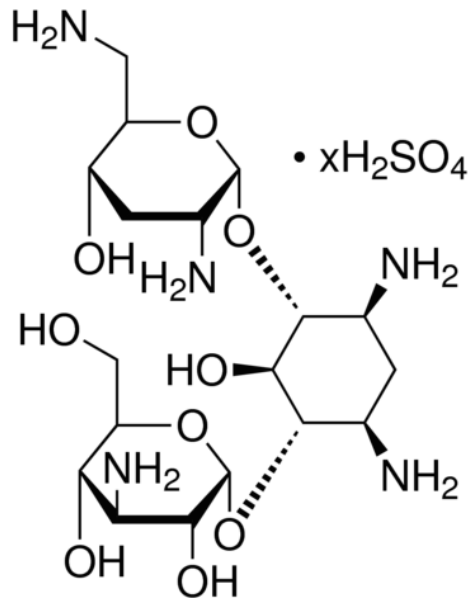
4.2 Utstyr

Tabell 5. Utstyr

Bruksområde/be skrivelse	Navn på utstyr	Leverandør
UPLC	Quaternary solvent manager Acquity UPLC H class	Waters
	Sample manager – FTN Acquity UPLC	Waters
	2996 PDA Detector Acquity UPLC	Waters
Forkolonne	XBridge™ BEH C18 2,5 µm Vanguard Pre-Column 2,1x 5 mm Column XP	Waters
Kolonne	XBridge™ BEH AMIDE 2,5 µm 2,1 x75 mm Column XP	Waters
	XBridge™ BEH Shield RP18 2,5 µm 2,1 x 100mm Column XP Part No. 186006055 Serial No. 011432254151 09	Waters
Vial	Sample vials 12 x 32 mm	Waters
	Screw cap bonded, pre-slit PTFE/Silicone septa for 12 x 32 mm vial	Waters
	PTFE/silicone septa, Maximum Recovery 12 x 32 mm glass Screw neck vial, cap, preslit Lot. 0670642190	Waters
OSTRO	Ostro-ekstraksjonsplate delnr: 186005518 Ostro-samleplate delnr: 186002481	Waters
MS	Quattro Premier XE	Waters
Pipetter	2-20 µl 20-200µl 100-1000µl	Eppendorf Research Plus
Pipettespisser	Finntip	Thermo Scientific
Eppendorf	Safe-lock tubes 1,5 ml Lot. D154803H	Eppendorf
Vekt	BP211D	Sartorius
Vortex	REAX top	Heidolph
Sentrifuger	Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Scientific

4.3 Intern Standard

Tobramycin ble valgt som internstandard (IS) da den har lignende struktur og fysikalske og kjemiske egenskaper som gentamicin. Molekylvekten er 467,51 g/mol. Tobramycin er dessuten sjelden brukt i behandling, og er tidligere brukt som IS med gentamicin i dyrestudier (47, 48).



Figur 11. Tobramycin struktur (49)

Det lages standardprøver med kjent konsentrasjon av IS og av analytt i medikamentfritt plasma. Det tilsettes lik mengde av IS i alle standardløsninger og økende konsentrasjon analytt i hver prøve. Deretter analyseres standardprøvene og topparealet til analytt og IS måles. En standardkurve settes opp ved å plote arealforholdet mellom analytt og internstandard mot konsentrasjon av stoff i blandingen. Arealtoppen til IS vil være den samme, men arealtoppen til analytten vil øke med økt konsentrasjon av stoffet i prøveløsningen (44).

4.4 Valg av kolonne

I denne oppgaven ble det først brukt HILIC kolonne og deretter en C-18 kolonne.

5 Metode – HILIC

5.1 Tillaging av stamløsning

Det ble laget stamløsninger av gentamicin og tobramycin (Tab 6), hvor tørrstoff ble løst i vann og oppbevart i kjøleskap.

Tabell 6. Stamløsninger til HILIC kolonne

	Gentamicin	Tobramycin
Mengde tørrstoff	9,55 mg	9,44 mg
Mengde vann	25 ml	25 ml
Konsentrasjon	0,382 mg/ml	0.378 mg/ml

5.2 UPLC

5.2.1 Kolonne

HILIC analysene er blitt utført med XBridge™ BEH AMIDE 2,5 µm 2,1 x75 mm Column XP. Det er en silikabasert amid-kolonne. Forkolonnen som ble brukt var XBridge™ BEH C18 2,5 µm Vanguard Pre-Column 2,1x 5 mm Column XP.

5.2.2 Mobilfasesammensetning

Mobilfasen bestod av H₂O og ACN. Mobilfasen var tilsatt 0,1 % maursyre (FA).

Tabell 7. Mobilfase brukt i HILIC kolonnen

Mobilfasekomponent A	Mobilfasekomponent B
H ₂ O + 0,1 % FA	ACN + 0,1 % FA

5.2.2.1 Isokratisk eluering vs Gradient eluering i HILIC

Innledningsvis ble det forsøkt å eluere ut gentamicin og tobramycin under isokratiske betingelser. Iskokratisk eluering viste seg å være uegnet, ved lave konsentrasjoner av vann i mobil fase ble hverken tobramycin eller gentamicin eluert ut av kolonna og ved høyere konsentrasjoner av vann eluerte begge forbindelsene ut i dødvolumet. Gradient eluering ble derfor valgt. Tabell 8 viser mobilfasegradienten som ga best resultat. Total analysetid var 20 min.

Tabell 8. Mobilfasegradient i HILIC analysen

Tid (min)	Flyt (ml/min)	H ₂ O (%)	ACN(%)
0	0,250	30	70
1	0,250	30	70
7	0,250	95	5
12	0,250	95	5
13	0,250	30	70
17	0,250	30	70

5.2.3 Injeksjonsvolum

Vi prøvde analysene med injeksjonsvolum på 1, 2, 3 og 5 µl for å optimere injeksjonsvolumet. De fleste HILIC analysene ble utført med et injeksjonsvolum på 3 µl.

5.3 Massespektrometri

MS instrumentet som ble brukt var Quattro Premier XE fra Waters.

5.3.1 Ionekilde

Ionekilden var Elektrosprayionisasjon (ESI+).

5.3.2 Masseanalysator

Det ble valgt å monitorere (M+H)⁺ ionene for alle forbindelsene. CV i ionekilden ble holdt konstant på 30V. Videre ble det kjørt en fullscan (Tab 10) analyse på rene prøver av gentamicin og tobramycin for å undersøke hvilke andre fragmenter de danner. Denne informasjonen ble brukt for å bestemme betingelsene for MRM analysen (Tab 11).

Tabell 9. SIR betingelser for gentamicin og tobramycin

Masse (g/mol)	(CV)	Stoff
450	30	Gentamicin C1a
464	30	Gentamicin C2, C2a, C2b
478	30	Gentamicin C1
468	30	Tobramycin

Tabell 10. MS betingelser for fullscan

Startmasse(u)	Sluttmasse(u)	Scann-tid(sek)	Tid mellom scan(sek)	Cone voltage (v)
70	520	0,2	0,05	30

Tabell 11. Betingelser for MRM analyse av gentamicin og tobramycin

Forbindelse	Parent (m/z)	Produktion (m/z)	Dwell (s)	Tid (min)
Gentamicin	450	322	0,5	3-8
Gentamicin	464	322	0,5	3-8
Gentamicin	478	322	0,5	3-8
Tobramycin	468	324	0,5	3-8

5.4 Validering

5.4.1 Linearitet - standardprøver

Det ble laget 3 serier med 4 standardprøver i hver serie. Gentamicin og tobramycin i hver serie ble løst og fortynnet med H₂O, MeOH og ACN. Tabell 12 viser gentamicin og tobramycin konsentrasjonen i hver standardprøve i en serie. Hver standardprøve ble analysert med 3 parallelle injeksjoner for å etablere en standardkurve og for undersøke lineariteten. Innledende forsøk viste dårlig respons i MS når prøven var løst i ACN. Lineariteten ble derfor kun undersøkt for standardprøvene løst i H₂O og MeOH.

Tabell 12. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i hver serie

	1. std prøve	2. std prøve	3. std prøve	4. std prøve
Gentamicin	9,55 µg/ml	19,1 µg/ml	38,2 µg/ml	76,4 µg/ml
Tobramycin	37.8 µg/ml	37.8 µg/ml	37.8 µg/ml	37.8 µg/ml

Videre ble standardprøvene fortynnet for å se om det var mulig å detektere lavere konsentrasjoner. Tabell 13 og 14 viser konsentrasjonene som ble analysert.

Tabell 13. Fortynnet standardprøver

	1. std prøve	2. std prøve	3. std prøve	4. std prøve
Gentamicin	1,91 µg/ml	3,82 µg/ml	7,64 µg/ml	15,28 µg/ml
Tobramycin	7,56 µg/ml	7,56 µg/ml	7,56 µg/ml	7,56 µg/ml

Tabell 14. Fortynnet standardprøvene ytterligere

	1. std prøve	2. std prøve	3. std prøve	4. std prøve
Gentamicin	0,382 µg/ml	0,764 µg/ml	1,528 µg/ml	3,056 µg/ml
Tobramycin	1,512 µg/ml	1,512 µg/ml	1,512 µg/ml	1,512 µg/ml

6 Metode – RP-18

6.1 Tillaging av stamløsning

Det ble laget stamløsninger av gentamicin og tobramycin (Tab 15), hvor tørrstoff ble løst i vann og oppbevart i kjøleskap.

Tabell 15. Stamløsning til C-18 kolonne

	Gentamicin	Tobramicin
Mengde tørrstoff	10,15 mg	10,00 mg
Mengde vann	10,00 ml	10,00 ml
Konsentrasjon	1,015 mg/ml	1,000 mg/ml

6.2 UPLC

6.2.1 Kolonne

Analysene er blitt utført med XBridge™ BEH Shield RP18 2,5 µm 2,1 x 100mm Column XP. Forkolonnen var den samme som i HILIC analysen; XBridge™ BEH C18 2,5 µm Vanguard Pre-Column 2,1x 5 mm Column XP.

6.2.2 Mobilfasesammensetning

Det ble brukt en blanding av H₂O og ACN med heptafluorosmørsyre (HFBA) som ioneparsreagens. Ulike konsentrasjoner av HFBA ble undersøkt for å finne optimal konsentrasjon.

6.2.2.1 Isokratisk eluering

Ulike forhold mellom H₂O og ACN ble undersøkt. Det ble valgt å bruke isokratisk eluering med H₂O: ACN i forholdet 72:28 (v/v) og 1% HFBA.

6.2.3 Injeksjonsvolum

De fleste prøvene ble analysert med injeksjonsvolum på 8 µL, og det ble også testet med injeksjoner på 2, 4, 6, 8 og 10 µL.

6.3 Massespektrometri

MS instrumentet som ble brukt var Quattro Premier XE fra Waters.

6.3.1 Ionekilde

Ionekilden som ble brukt var Elektrosprayionisasjon (ESI+).

6.3.2 Masseanalysator

Ved bruk av C18 kolonne var det mulig å separere alle de ulike forbindelsene fra hverandre. De kvantitative analysene ble utført enten ved hjelp av SIR eller ved hjelp av MRM. I SIR analysene ble det valgt å kun monitorere $(M+H)^+$ -ionene og CV ble undersøkt for å maksimere produksjon av $(M+H)^+$ -ionene. I hvilken grad det ble produsert fragmentioner var i denne sammenheng uinteressant.

I MRM analyser er optimal produksjon av egnet produksjon avhengig av kollisjonsenergi (CE) i kollisjonscellen. For å finne optimal CE ble det kjørt analyser med konstant mengde gentamicin og tobramycin. Betingelser for SIR og MRM analyser er oppgitt i Tabell 16 og 17.

Tabell 16. SIR betingelser for gentamicin og tobramycin

Masse (g/mol)	Cone voltage(CV)	Stoff
450	25	Gentamicin C1a
464	25	Gentamicin C2, C2a, C2b
478	35	Gentamicin C1
468	25	Tobramycin

Tabell 17. Betingelser for MRM analyse av gentamicin og tobramycin

Forbindelse	Parent (m/z)	Produksjon (m/z)	Kollisjonsenergi CE	Tid (min)
Gentamicin	450	322	25	2-12
Gentamicin	464	322	25	2-12
Gentamicin	478	322	35	2-12
Tobramycin	468	324	35	2-12

6.4 Prøveopparbeidelse

Et av målene var å opparbeide prøver i 96 brønns format ved bruk av OSTRO systemet. Det ble forsøkt først å felle proteiner enten med TCA eller kald ACN. Etter dette ble prøven sentrifugert ved 12000 g og supernatant overført til OSTRO systemet. Dette ble forsøkt flere ganger uten at tilfredsstillende resultat.

Etter proteinfelling vil prøven inneholde en rekke stoffer, inkludert fosfolipider. Fosfolipider har log P verdier i området 5-9 (50). Det ble derfor valgt å felle proteiner med TCA, sentrifugere og så ekstrahere ut fosfolipider og nøytrale forbindelser ved hjelp av etylacetat.

Tabell 18 viser prosedyren av prøveopparbeidelsen som ga best resultat.

Tabell 18. Prøveopparbeidelse prosedyren

Steg	Prosedyre
1	500 µL serum tillages med ønsket konsentrasjon gentamicin og tobramycin
2	200 µL serum overføres til eppendorf-rør
3	Det tilsettes 300 µL kald TCA (15%)
4	Vortex (10 sek)
5	Sentrifuger (12000G i 10 min)
6	Supernatant overføres til reagensrør
7	Det tilsettes 2 ml Etylacetat (EtOAc)
8	Blandes grundig
9	Henstand til faseseparasjon er oppnådd
10	EtOAc pippeteres av og kastes
11	Vannfase overføres til UPLC vial (max recovery)
12	Analyseres på LC-MS

6.5 Validering

6.5.1 Linearitet – standardprøver løst i H₂O

Innledningsvis ble det laget standardprøver løst i H₂O. Gentamicin og tobramycin konsentrasjonen i standardprøvene er vist i Tabell 19. Hver standardprøve ble analysert med 2 parallelle injeksjoner.

Tabell 19. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i standardprøvene med H₂O

Standardprøve	Gentamicin konsentrasjon ng/ µL	Tobramycin konsentrasjon ng/ µL
A	0,5	9,09
B	0,9	9,09
C	1,8	9,09
D	3,6	9,09
E	7,3	9,09
F	14,5	9,09
G	29,1	9,09

6.5.2 Linearitet-- standardprøver med serumprøver

Videre ble det det laget standardprøver A-E med serum med konsentrasjonen av gentamicin og tobramycin som vist i Tabell 20. Det ble laget 2 parallelle serier av hver standardprøve, og hver serie ble analysert med 3 parallelle injeksjoner.

Tabell 20. Konsentrasjon av gentamicin og tobramycin i standardprøvene med serum.

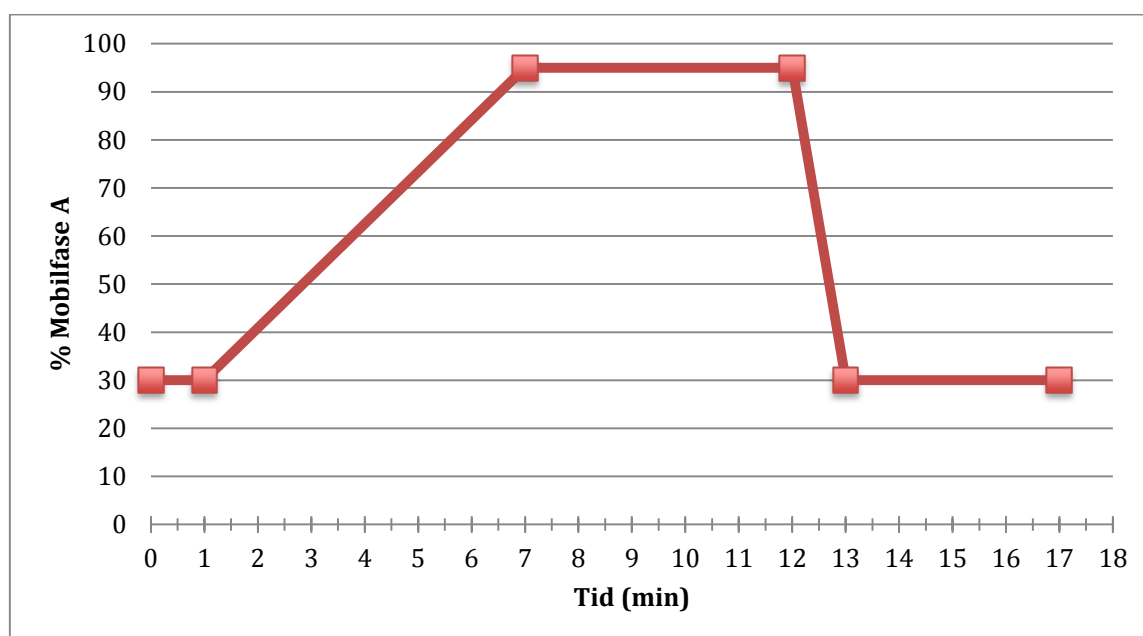
Standardprøve	Gentamicin konsentrasjon µg/ mL	Tobramycin konsentrasjon µg/ mL
A	5,6	18
B	11,2	18
C	22,3	18
D	44,6	18
E	89	18

7 Resultater – HILIC

7.1 UPLC

7.1.1 Mobilfasegradient

Innledningsvis ble det forsøkt å eluere ut gentamicin og tobramycin under isokratiske betingelser. Det fungerte ikke og da ble forsøkt å eluere analyttene med betingelser hvor vi varierte start- og sluttkonsentrasjon av mobilfasesammensetningen gradvis over tid. Ulike mobilfase gradienter ble forsøkt for å undersøke hvilken som var best egnet for å oppnå separasjon og gi et godt signal. Etter flere forsøk kom vi fram til en gradient som gav tilfredsstillende resultat (Tab 8).

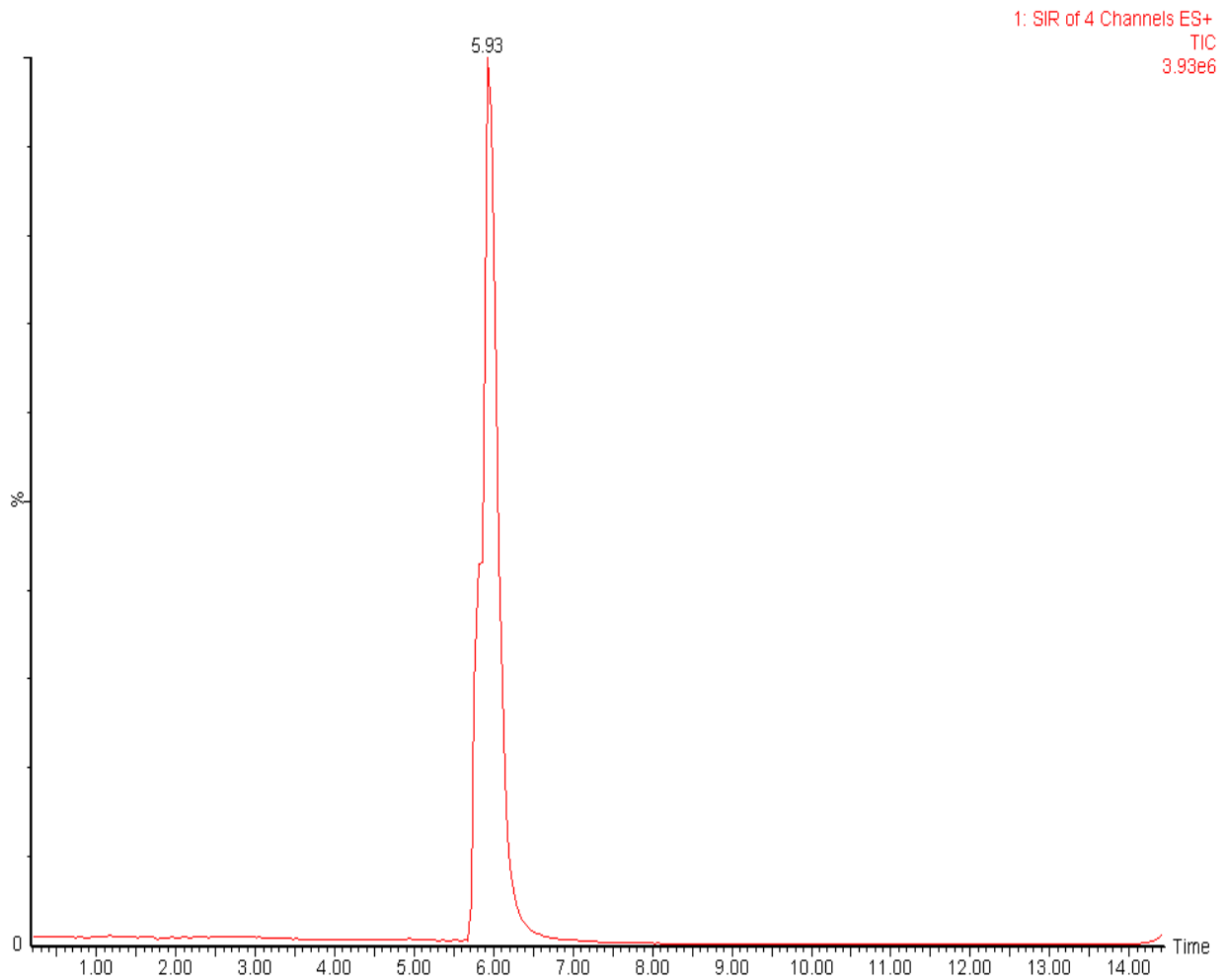


Figur 12. Endring av mobilfasesammensetning under analysetiden.

Figur 12 illustrerer endring av mobilfasesammensetningen i løpet av analysetiden. Gradienten startet med høy konsentrasjon av ACN, med økende andel H₂O etter kort tid. I perioden med høy konsentrasjon ACN ble mulig upolare substanser vasket ut, og i perioden med høy konsentrasjon av H₂O ble gentamicin og tobramycin eluert ut. Den isokratiske elueringen fra 13-17 minutt var nødvendig for å gjenopprette likevekt mellom mobil og stasjonærfase.

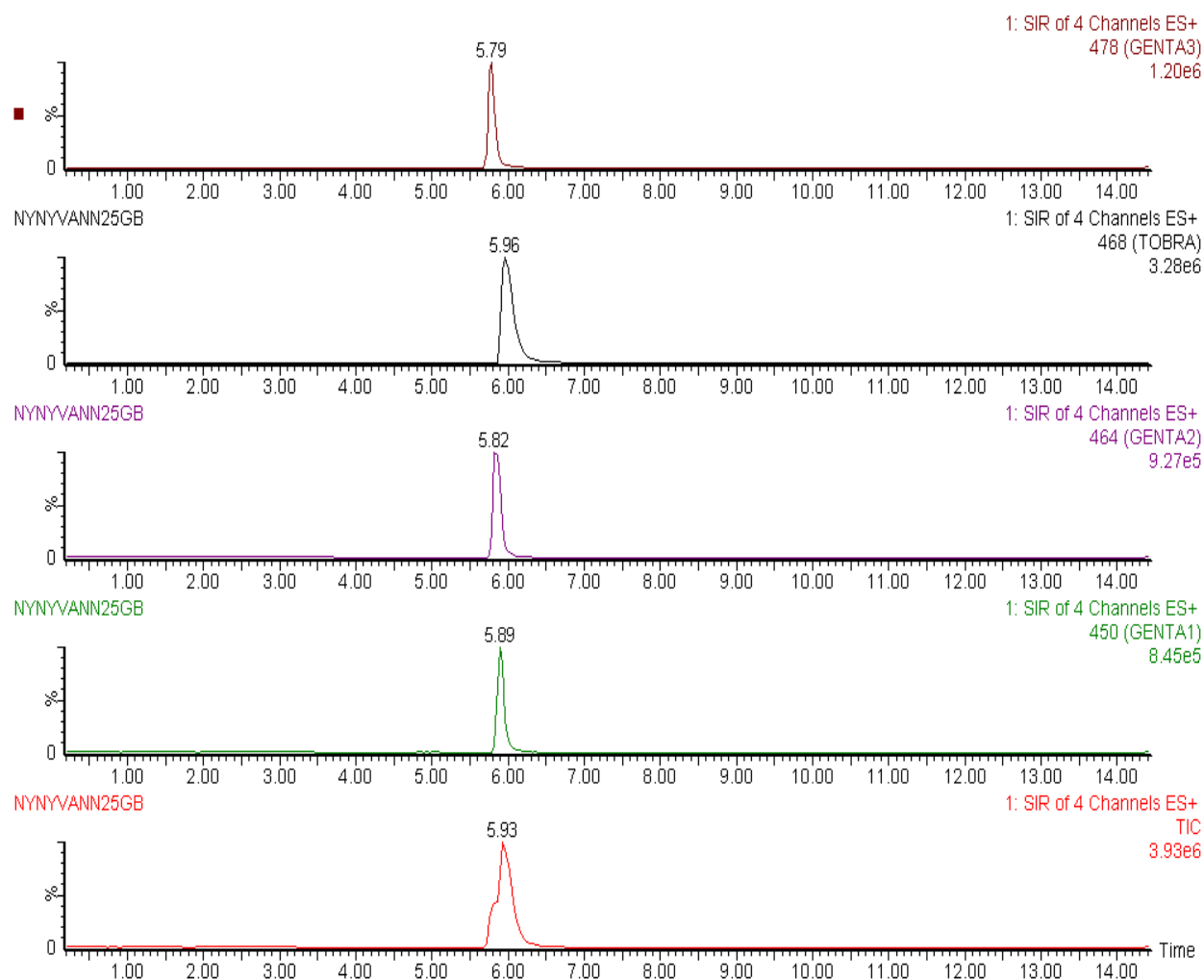
7.1.2 Kromatografisk separasjon

Metoden ga en kromatografisk topp etter passende antall minutter. Denne toppen skjulte både gentamicinforbindelsene og tobramycin (Fig 13).



Figur 13. Ingen kromatografisk separasjon mellom gentamicin og tobramycin

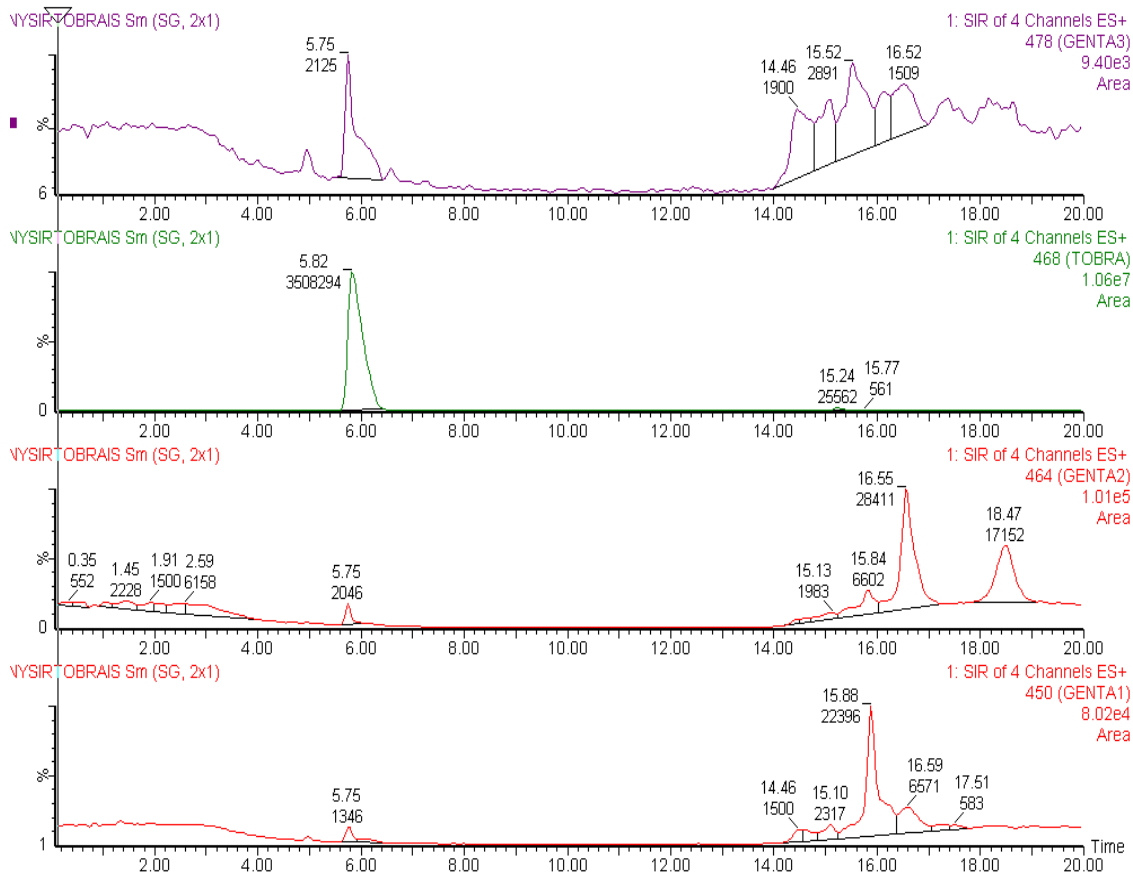
Kromatogram (Fig. 14) for de ulike (M+H)⁺ verdiene viser at HILIC kolonnen gir symmetriske og skarpe topper, men det er ingen god separasjon mellom de ulike gentamicin forbindelsene og heller ingen separasjon mellom tobramycin og gentamicin. Kromatogrammene gir heller ingen informasjon om mengdeforholdet mellom gentamcin C2, C2a og C2b.



Figur 14. Kromatogram for gentamicin forbindelsene og tobramycin

7.2 Intern standard

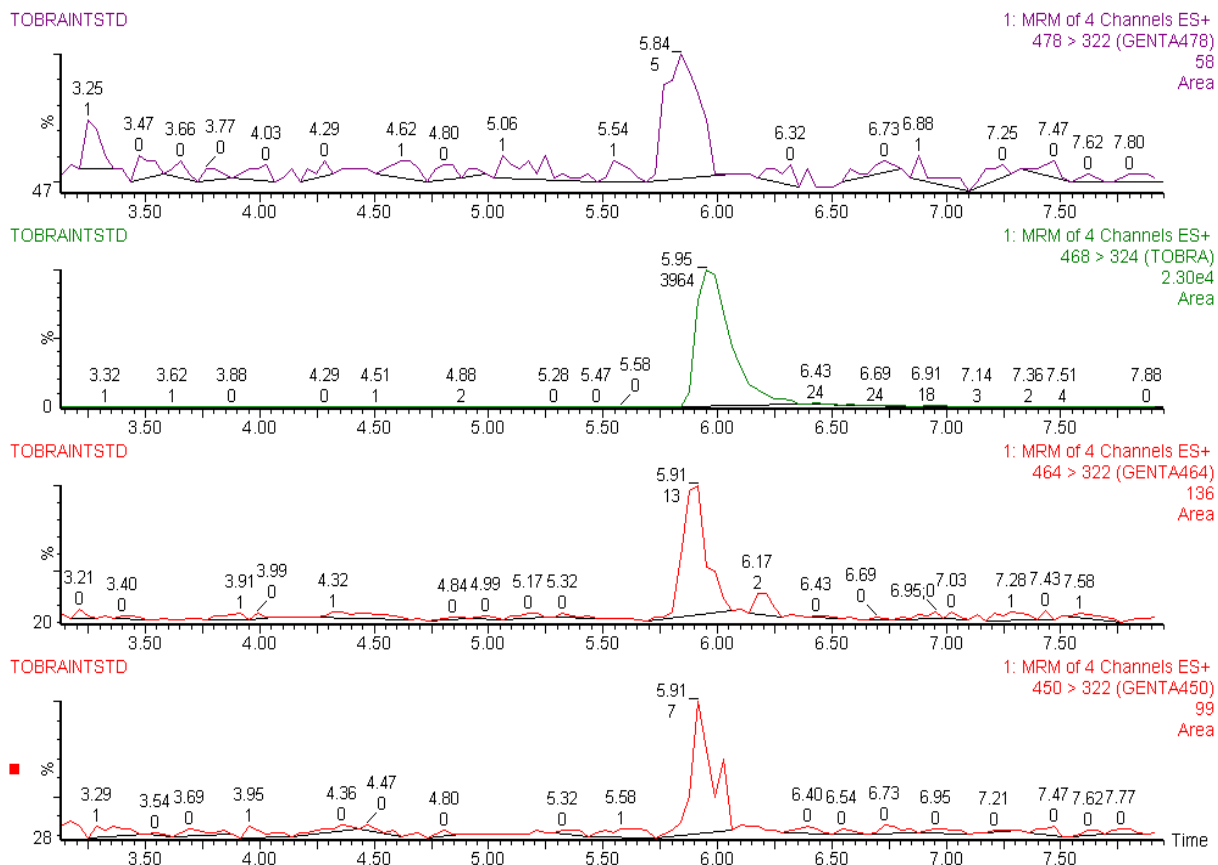
På grunn av dårlig kromatografisk separasjon mellom tobramycin og gentamicin, ble det kjørt både en SIR og en MRM analyse på tobramycin alene for å undersøke om den gir et signal som kan tolkes som gentamicin (Fig 15 og 16). Vi beregnet summen av arealet på toppene til gentamicin mot tobramycin's topp (Tab 21 og 22). Forurensningen var på 0,16% med SIR analyse og 0,63% med MRM analyse.



Figur 15. SIR analyse av tobramycin

Tabell 21. Forurensning med SIR analyse

	Gentamicin			Tobramycin
Forbindelse	450	464	478	468
Areal	1346	2046	2125	3508294
Sum areal	Gentamicin forbindelsene: 5517			3508294
Forurensning	$(5517/3508294) \times 100 \% = \underline{\underline{0,16\%}}$			



Figur 16. MRM analyse av tobramycin

Tabell 22. Forurensning med MRM analyse

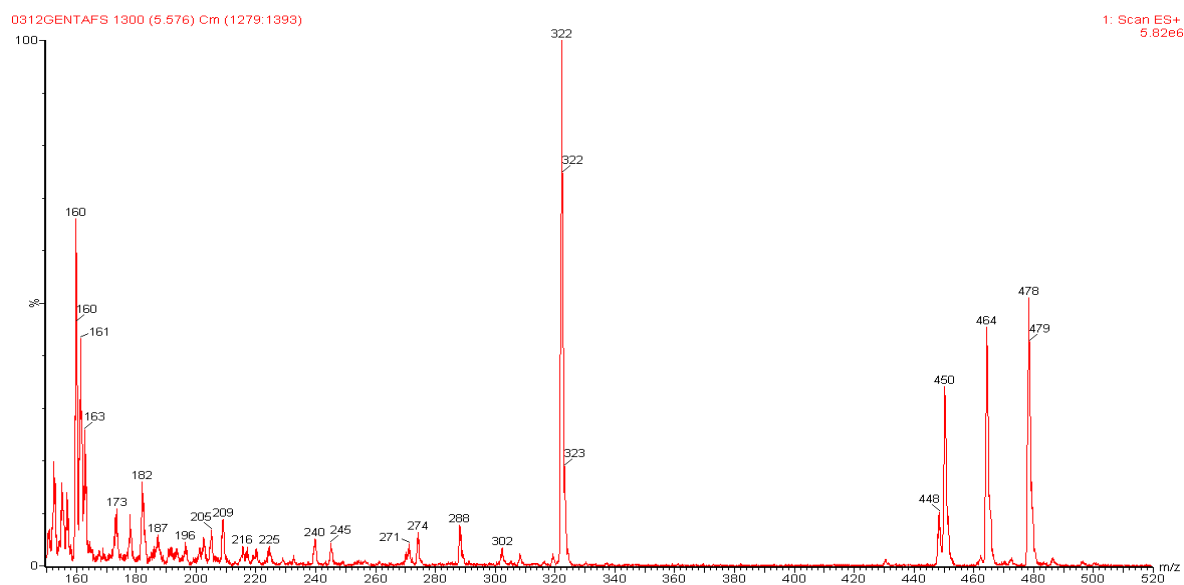
	Gentamicin			Tobramycin
Forbindelse	450	464	478	468
Areal	7	13	5	3964
Sum areal	25			3964
Forurensning	$(25/3964) \times 100 \% = \mathbf{0,63 \%}$			

7.3 Massespektrometri

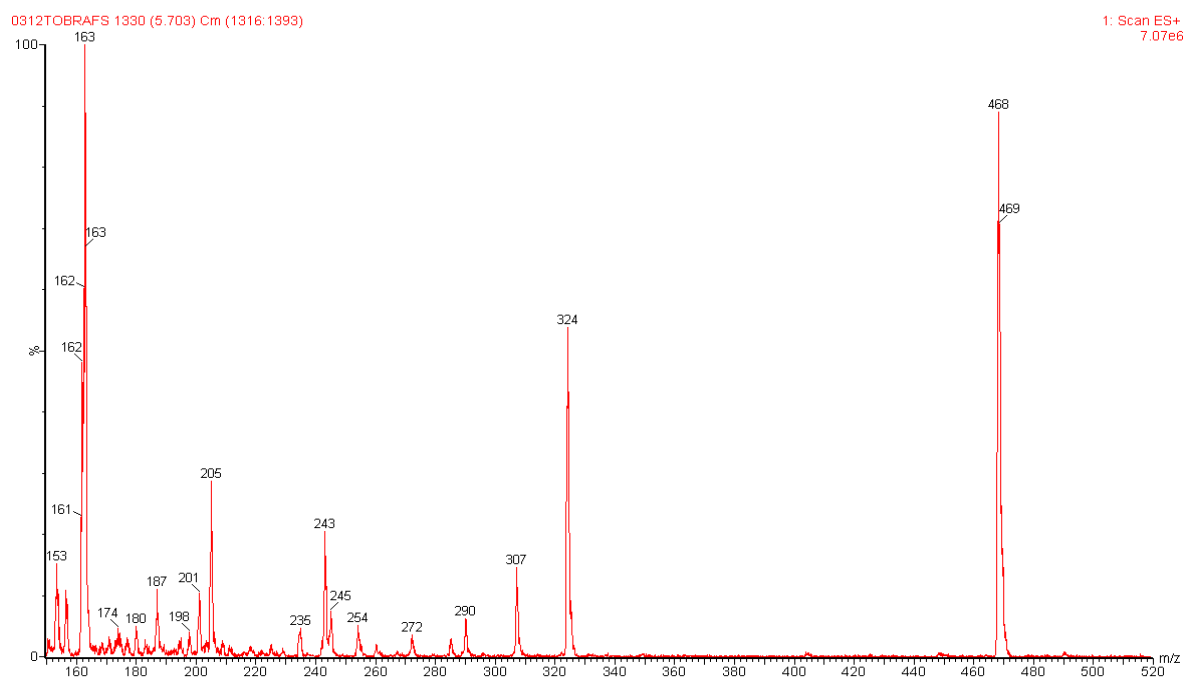
Prøvene ble analysert med SIR og MRM modus. Betingelsene for begge analysene er gitt i Tabell 9 og 11. Det ble også kjørt en fullscan analyse av gentamicin og tobramycin.

7.3.1 Fullscan

Fullscanspekter viste at gentamicin danner produktion på 322 m/z og tobramycin danner et produktion på 324 m/z. (Fig 17 og 18) Denne informasjonen blir brukt videre for å velge betingelser for MRM analyse.

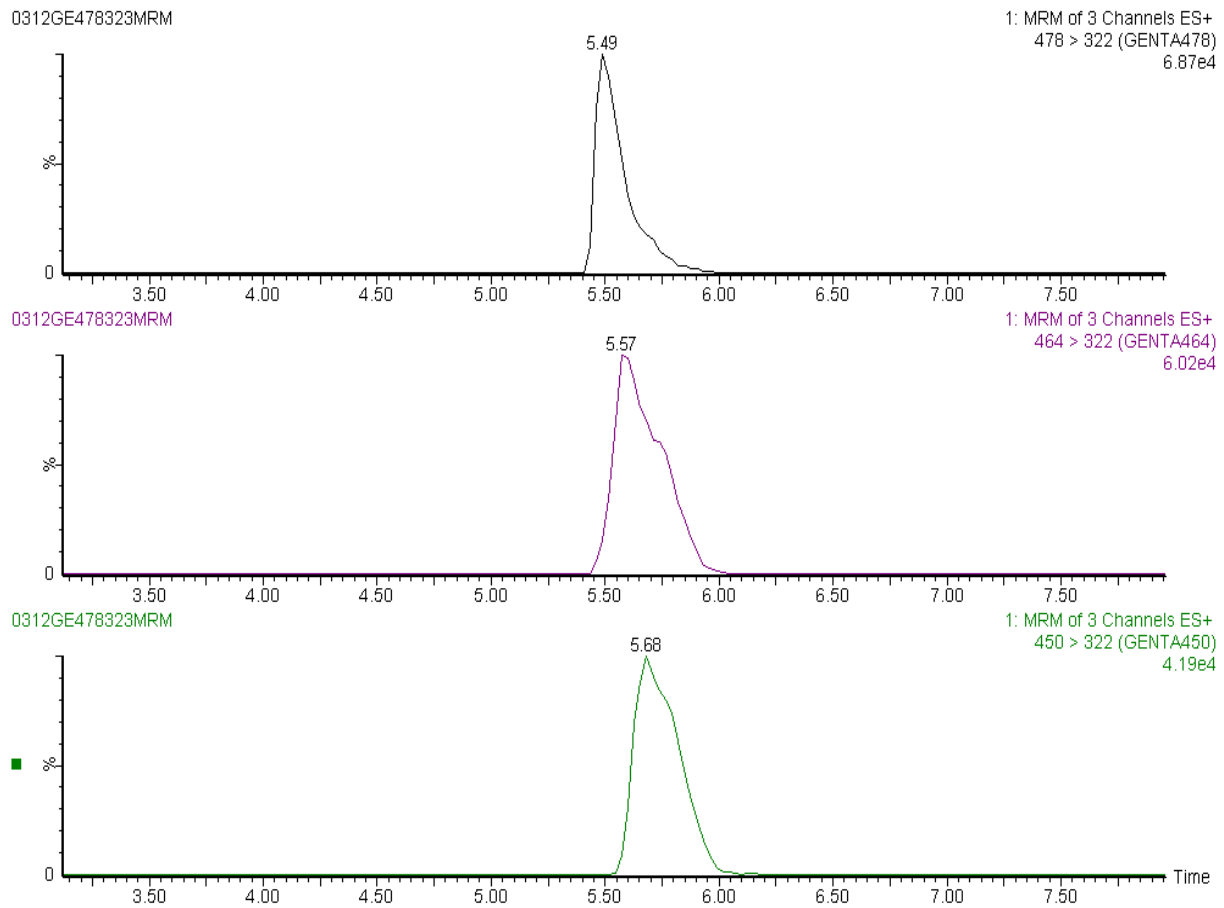


Figur 17. Fullscanspekter av gentamicin



Figur 18. Fullscanspekter av tobramycin

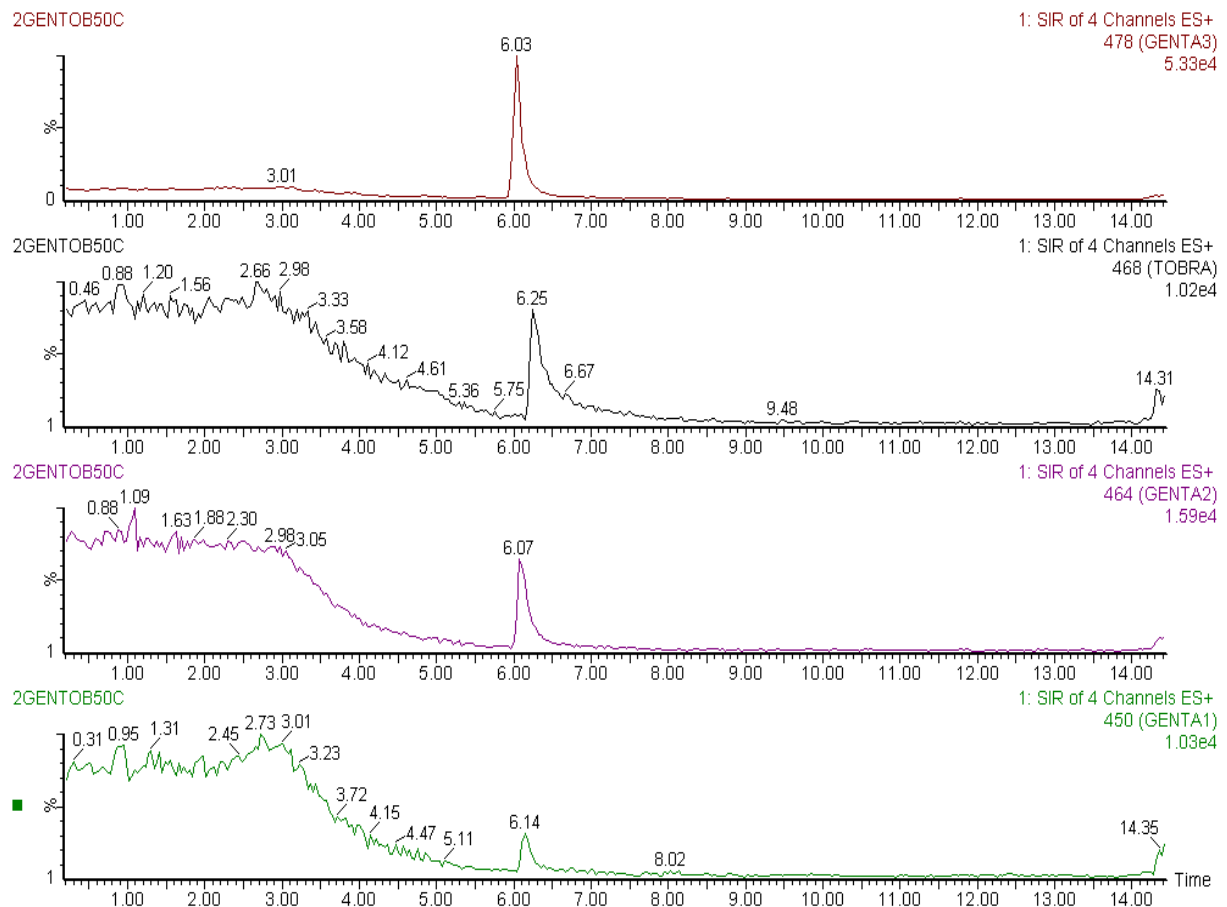
For å finne ut om 322 m/z var produksjon av alle gentamicin forbindelsene ble det kjørt en MRM analyse av kun gentamicin. Figur 19 viser at produksjoner på 322 m/z stammer fra alle gentamicin variantene.



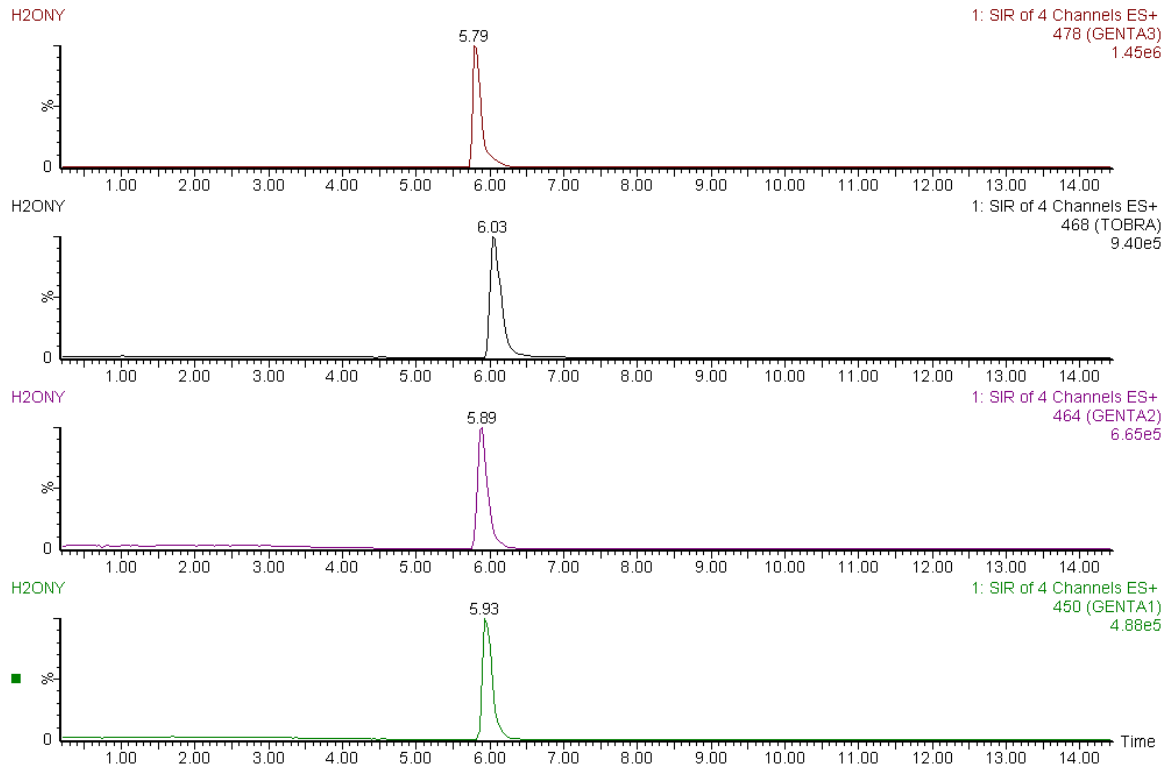
Figur 19. Kromatogram for gentamicin forbindelsene som gir produksjon på 322 m/z

7.4 Standardprøver fortynnet med ulike fortynningsmidler

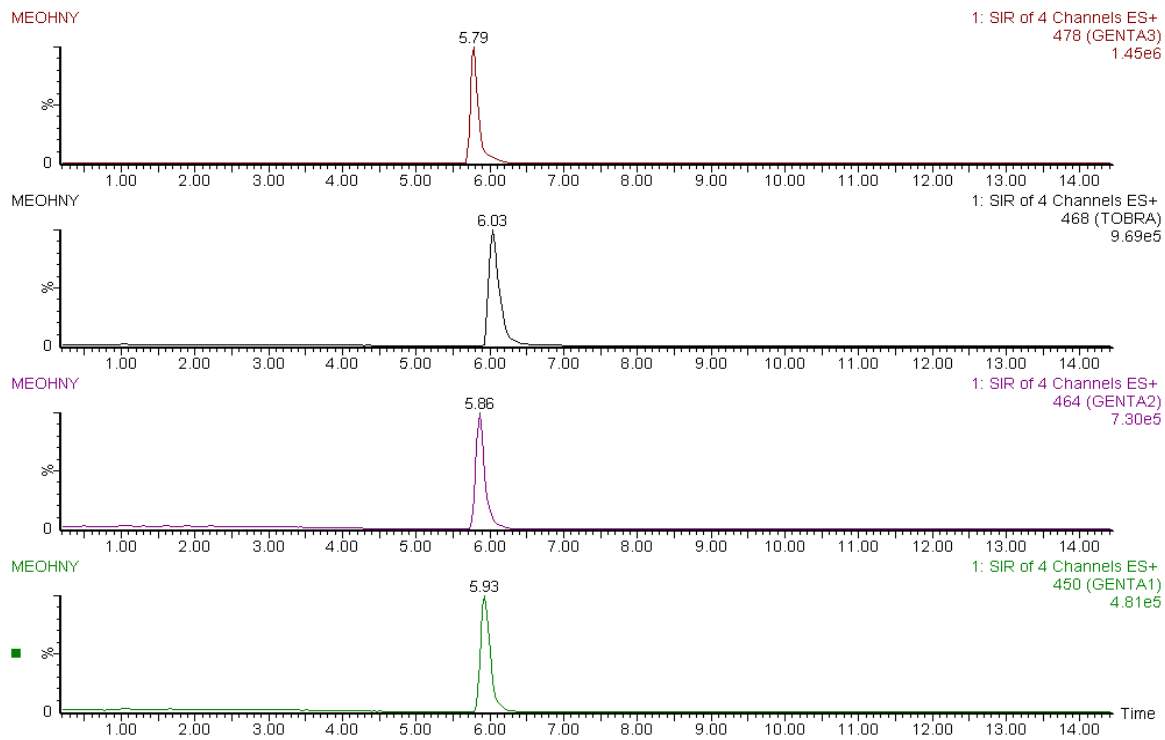
Seriene med standardprøvene var løst og fortynnet med ACN, H₂O og MeOH. Resultatene fra SIR analyse av standardprøvene løst i ACN ga ikke et optimal kromatogram (Fig 20). Fortynningsmidlene H₂O og MeOH ga derimot stabile signaler av både tobramycin og gentamicin (Fig. 21 og 22).



Figur 20. Dårlig signal av standardprøve som er fortynnet med ACN



Figur 21. SIR analyse av standardprøve som er fortynnet med H₂O



Figur 22. SIR analyse av standardprøve som er fortynnet med MeOH

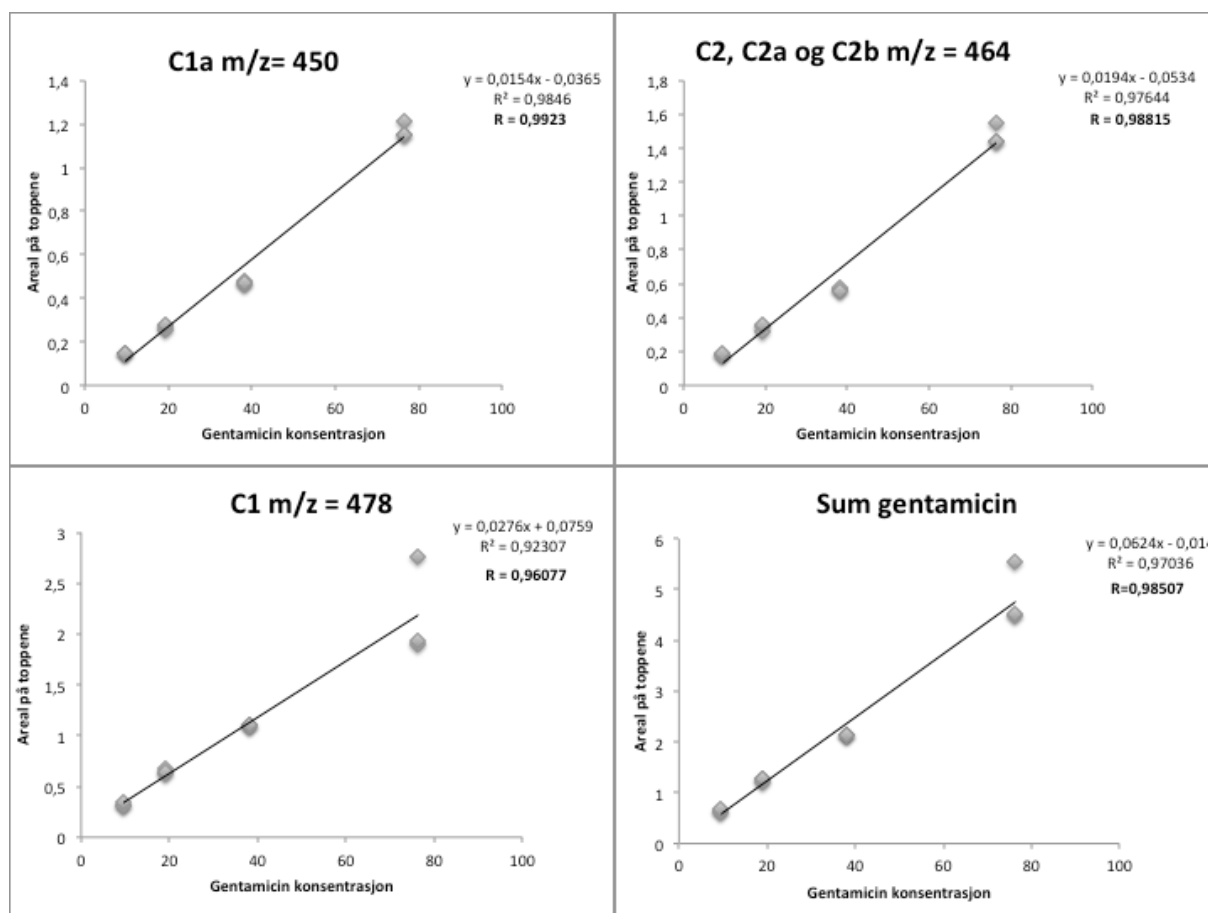
7.5 Validering

7.5.1 Standardprøver fortynnet med MeOH

Gentamicin konsentrasjonen i standardprøvene var på 9,55 – 76,4 µg/ml, mens tobramycin konsentrasjonen i var 37,8 µg/ml.

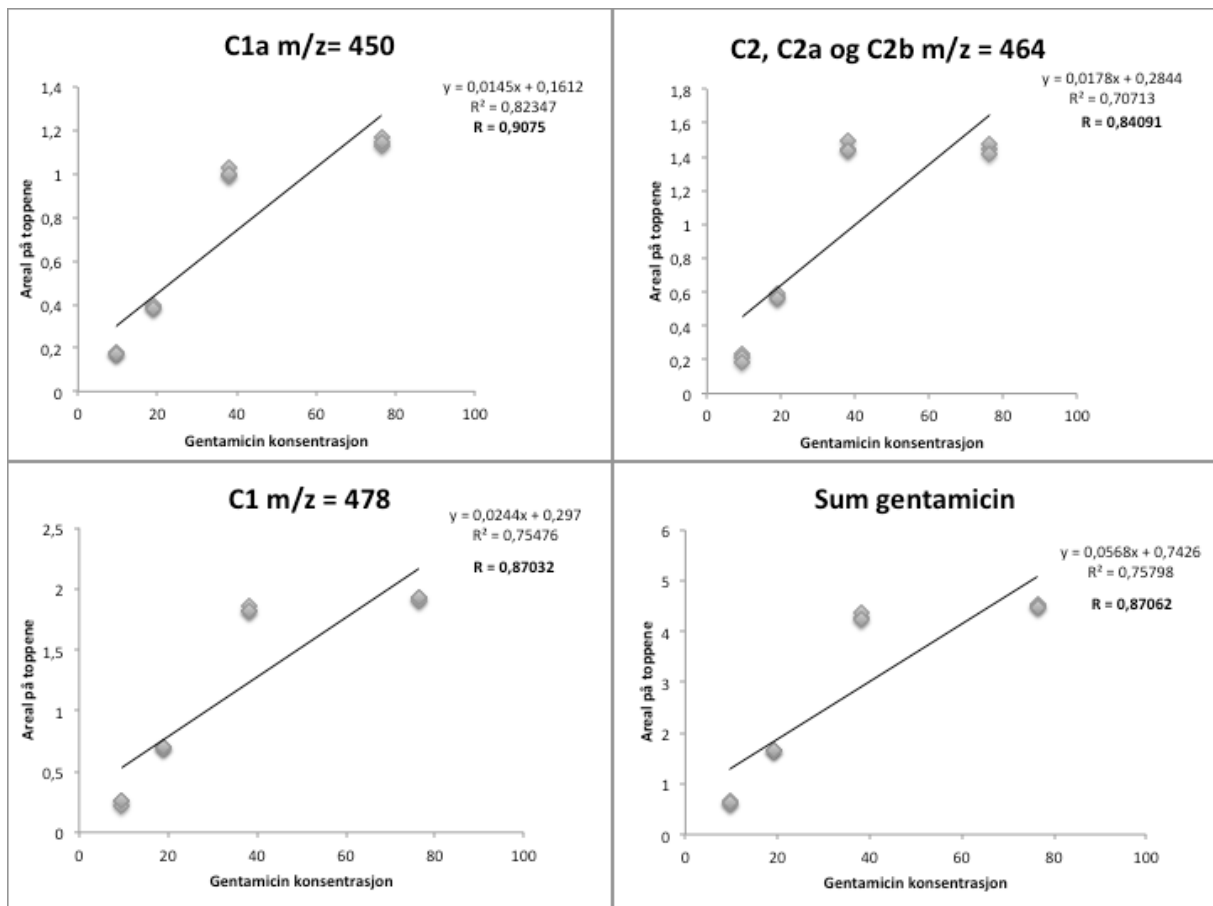
7.5.1.1 Linearitet- SIR analyse av standardprøver fortynnet med MeOH

Det ble laget en serie med standardprøver som det ble kjørt SIR analyse på. Det resulterte i ønskelig standardkurver (Fig. 23).

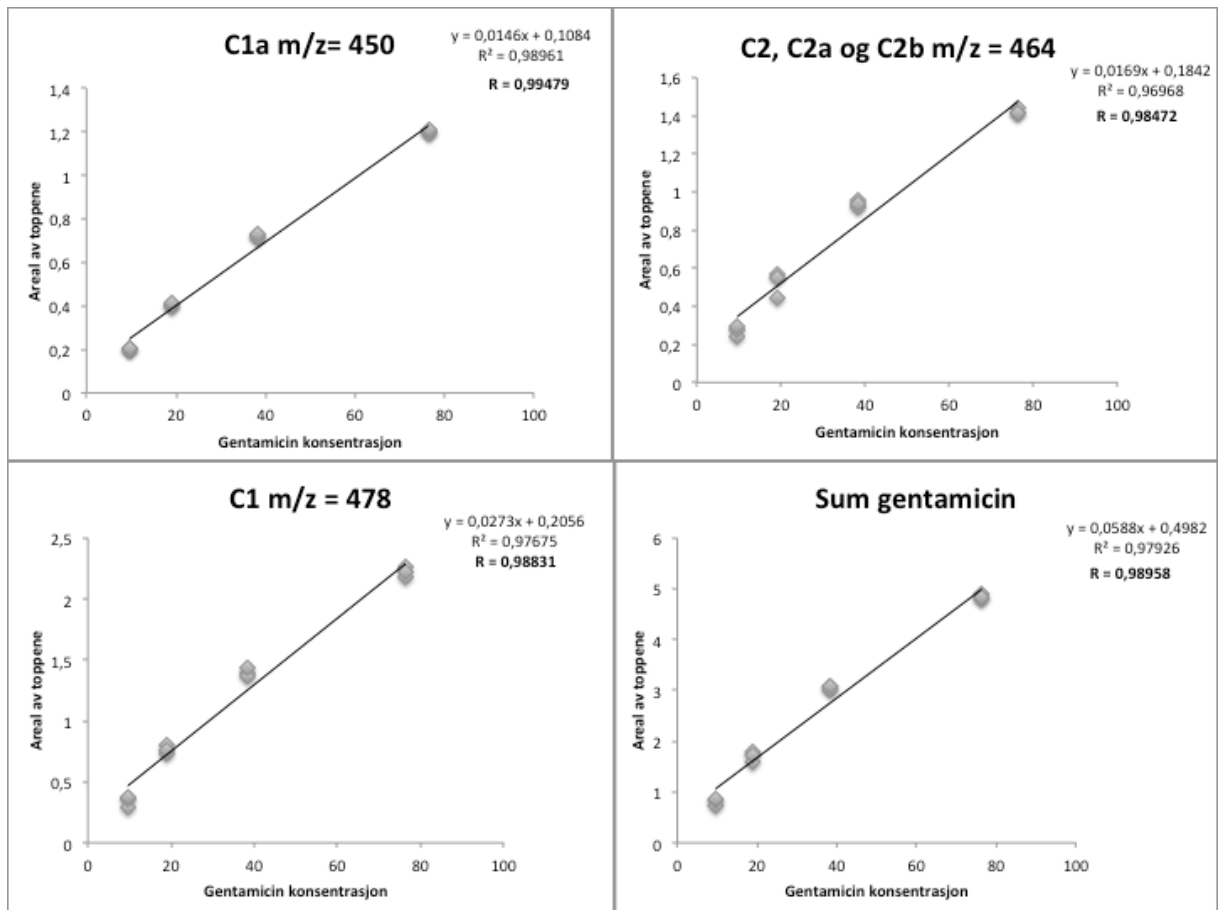


Figur 23. SIR analyse av standardprøve fortynnet med MeOH

For å undersøke om standardkurvene var stabile, ble det kjørt en ny SIR analyse på samme serie dagen etter. Det ga ikke helt optimale kromatogrammer (Fig 24). Det ble bestemt å lage nye standardprøver av stamløsningene, og SIR analyse av de nye standardprøvene ga igjen ønskede standardkurver som vist i Figur 25.



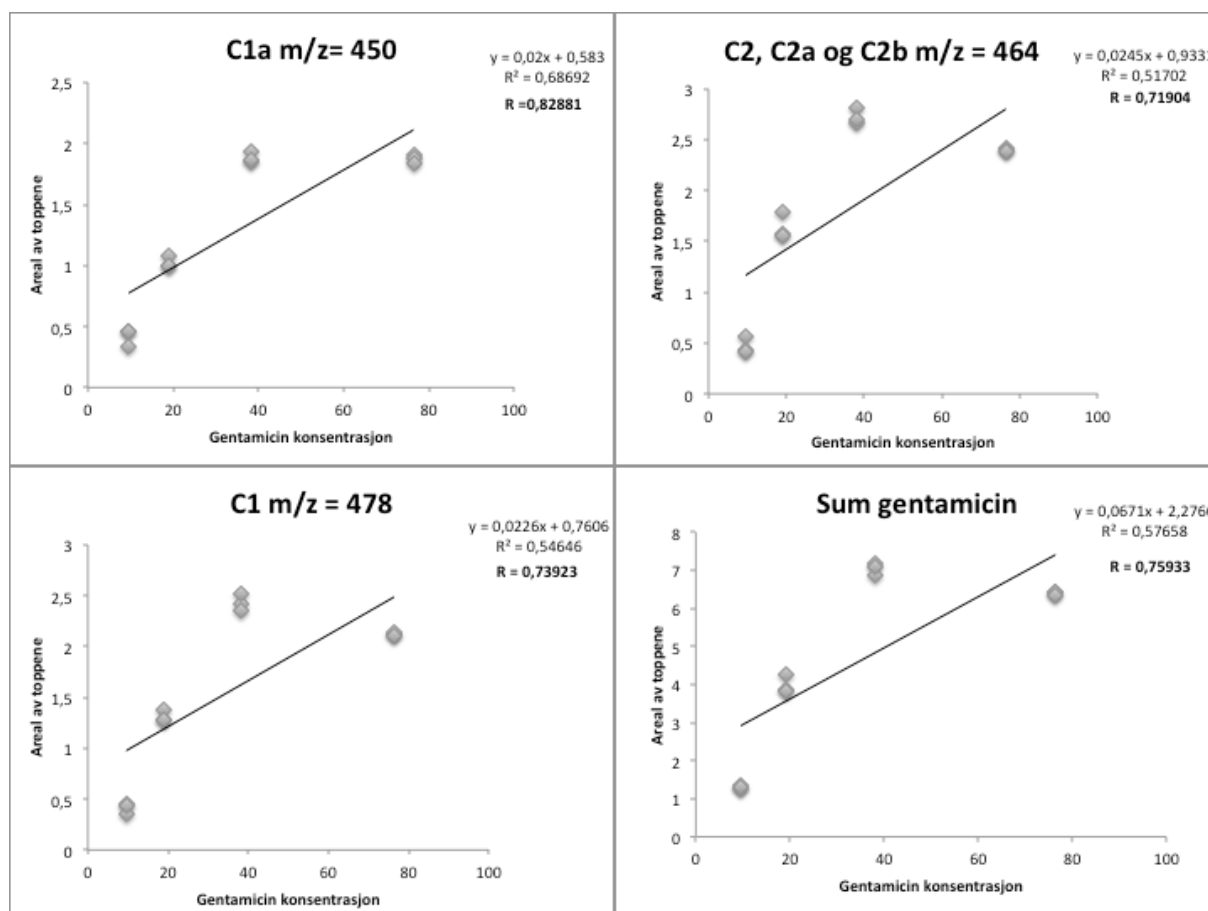
Figur 24. Kjørt SIR analyse av samme standardprøver dagen etter



Figur 25. SIR analyse av nye standardprøver

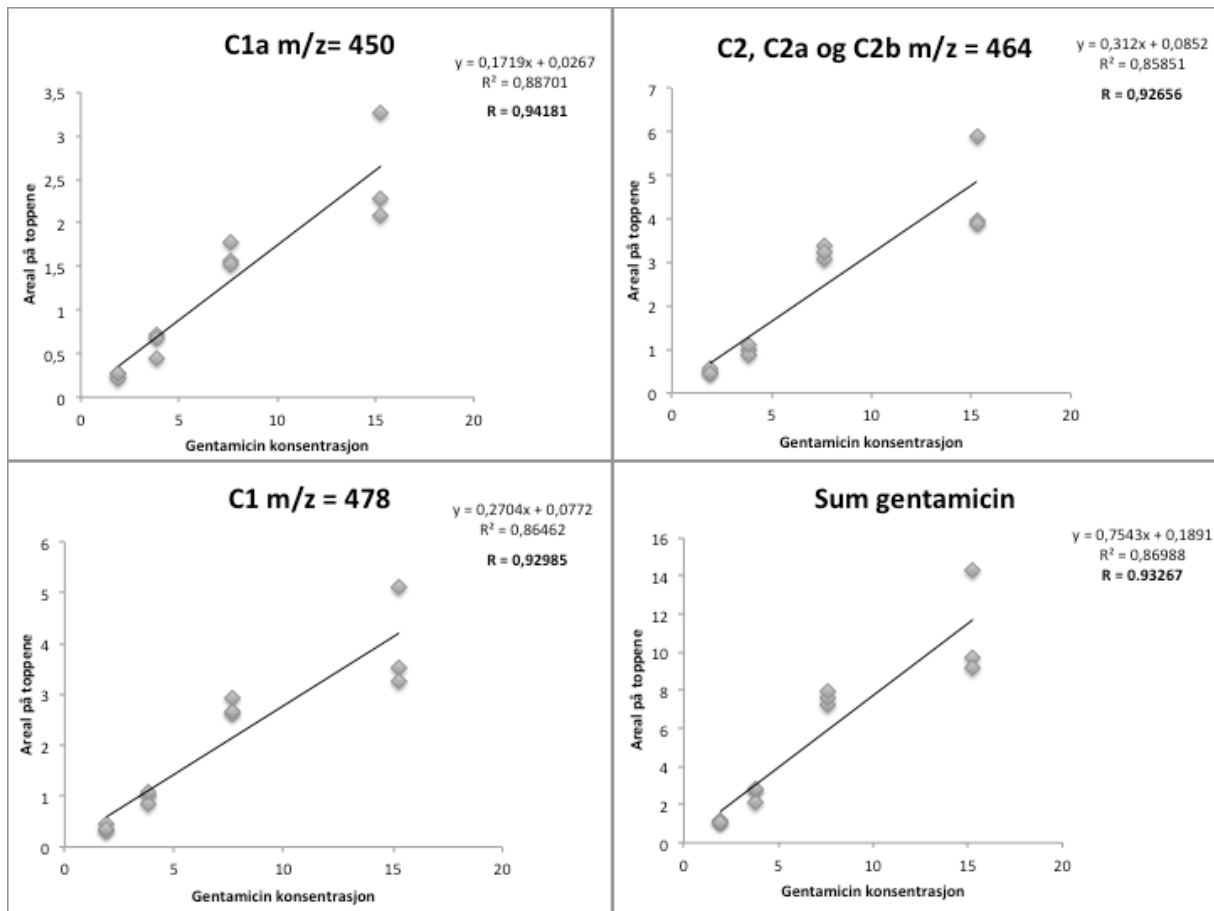
7.5.1.2 Linearitet- MRM analyse av standardprøvene fortynnet med MeOH

Videre ble det kjørt en MRM analyse på standardprøvene. Standardkurvene ble ikke som ønsket (Fig 26).



Figur 26. MRM analyse av standardprøvene

Standardprøvene ble fortynnet, og gentamicin konsentrasjonen i de fortynnete prøvene var på 1,91 – 15,28 µg/ml og tobramycin konsentrasjonen var på 7,56 µg/ml. MRM resultatene fra den fortynnete serien ga noe bedre resultat (Fig 27).



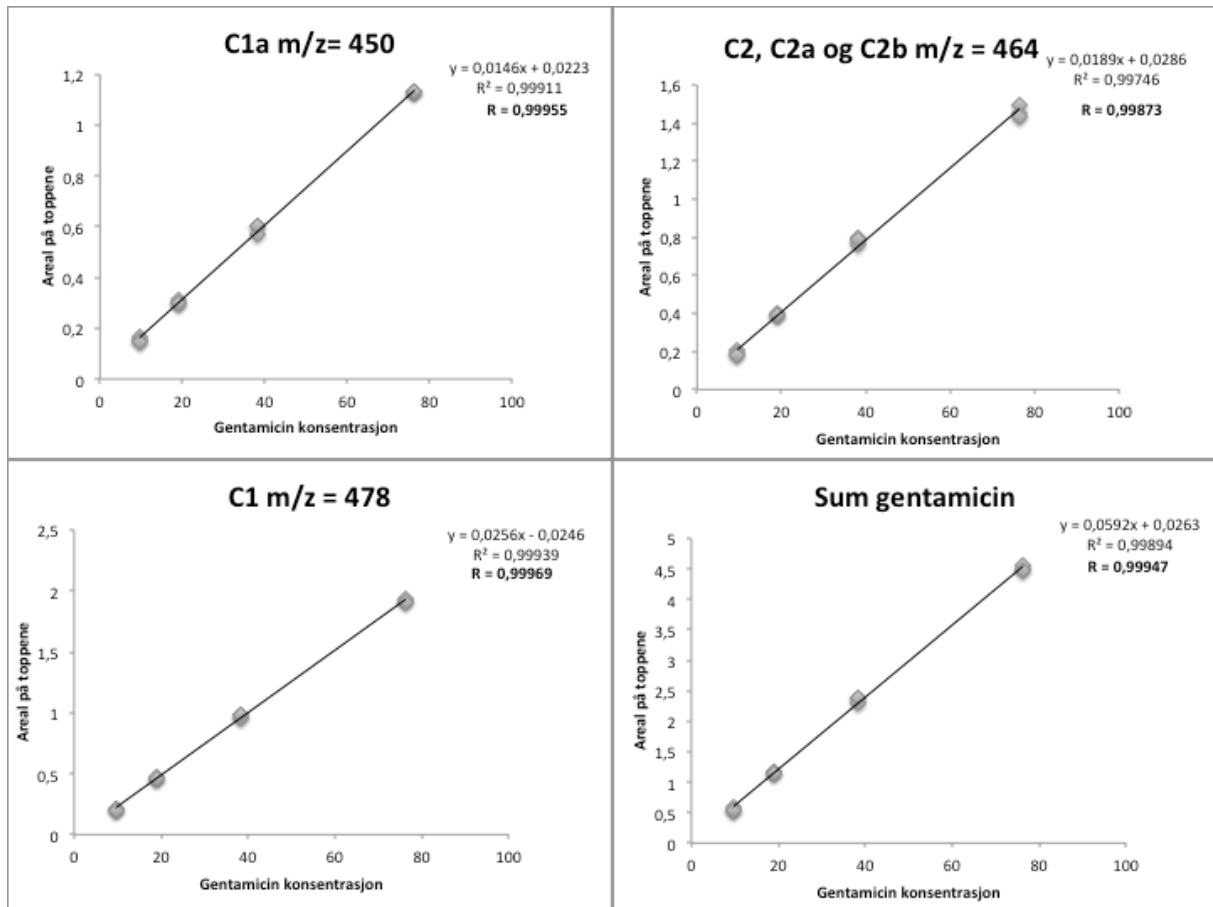
Figur 27. MRM analyse av fortynnet standardprøve

7.5.2 Standardprøver fortynnet med H₂O

Gentamicin konsentrasjonen i standardprøvene var her også på 9,55 – 76,4 µg/ml, mens tobramycin konsentrasjonen i var 37,8 µg/ml.

7.5.2.1 Linearitet - SIR analyse av standardprøvene fortynnet med H₂O

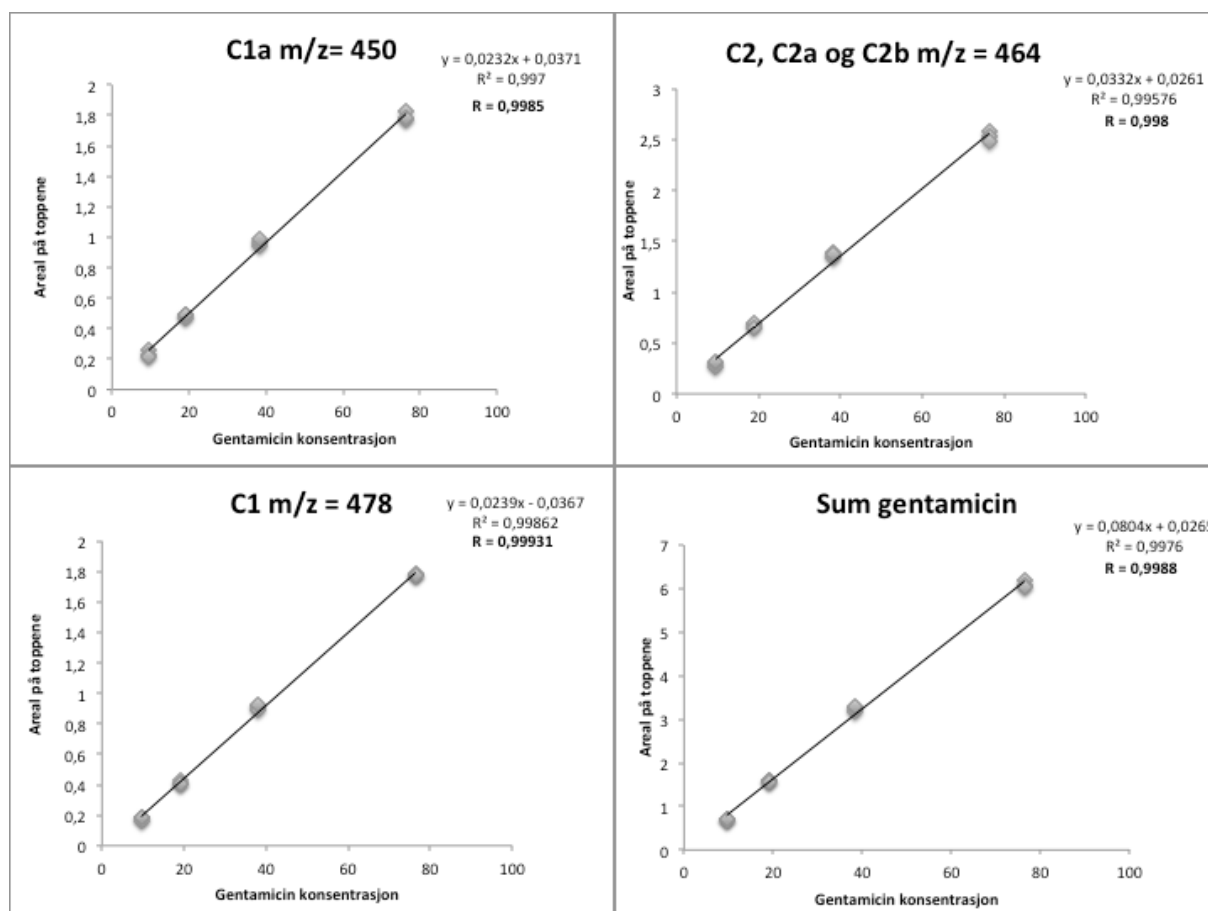
SIR analyse av serie med standardprøver løst i H₂O resulterte i akseptable standardkurver (Figur 28). Dagen etter ble det kjørt ny SIR analyse på samme serie, og resultatet var som omtrent de samme som de i Figur 28.



Figur 28. Andre forsøk på SIR analyse av standardprøve fortynnet med H₂O

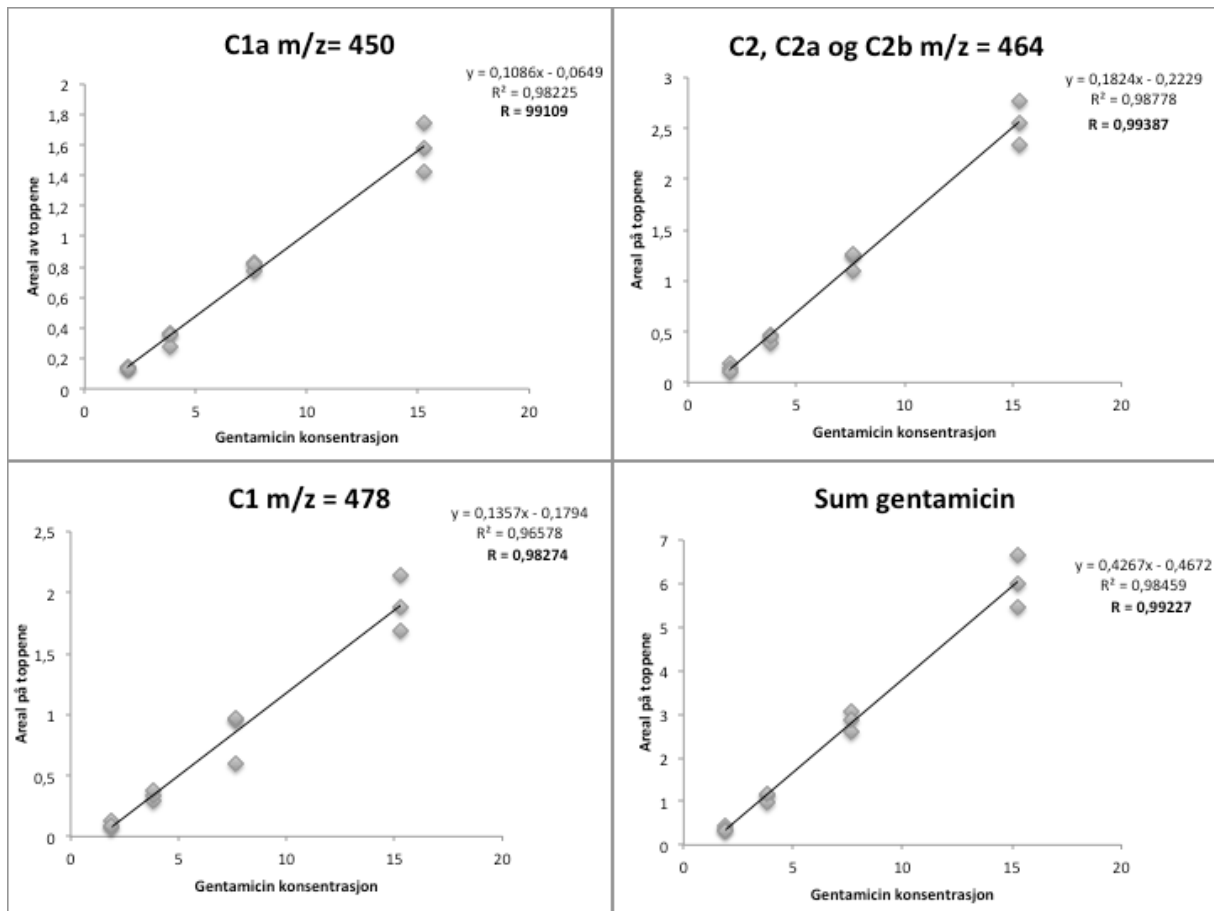
7.5.2.2 Linearitet - MRM analyse av standardprøvene fortynnet med H₂O

MRM analyse av standardprøvene ga også gode standardkurver og korrelasjonskoeffisient (Fig 29).



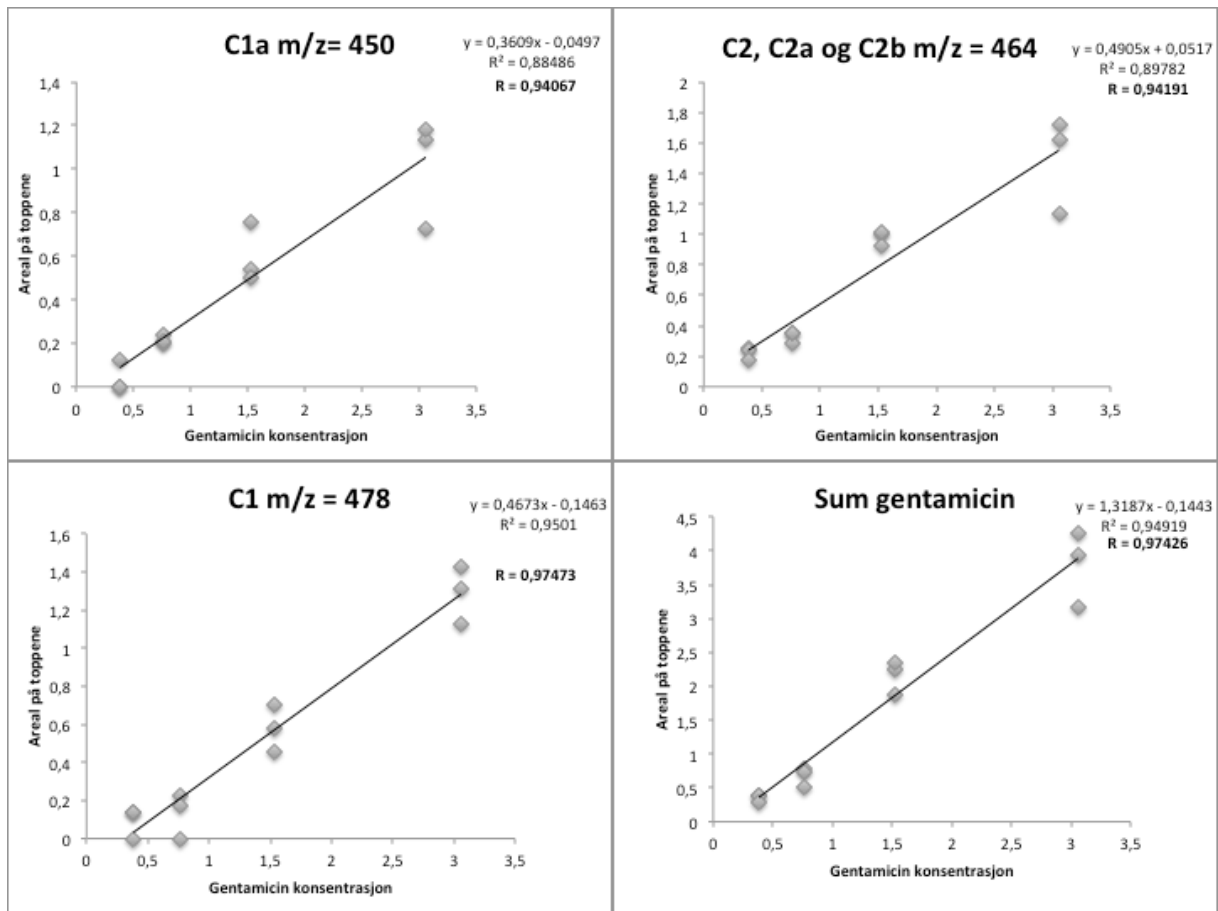
Figur 29. MRM analyse av standardprøvene fortynnet med H₂O

Standardprøvene ble fortynnet og gentamicin konsentrasjon i fortynnet serie var på 1,91 – 15,28 µg/ml og tobramycin konsentrasjon på 7,56 µg/ml. MRM analysen av denne serien ga standardkurvene vist i Figur 30.



Figur 30. MRM analyse av fortynnet serie med standardprøve

Standardprøvene ble fortynnet ytterligere til gentamicinkonsentrasjonen i området 0,381-3,056 µg/ml og tobramycin konsentrasjonen på 1,512 µg/ml. MRM analyse av denne serien med standardprøve ga standardkurver som vist i Figur 31.



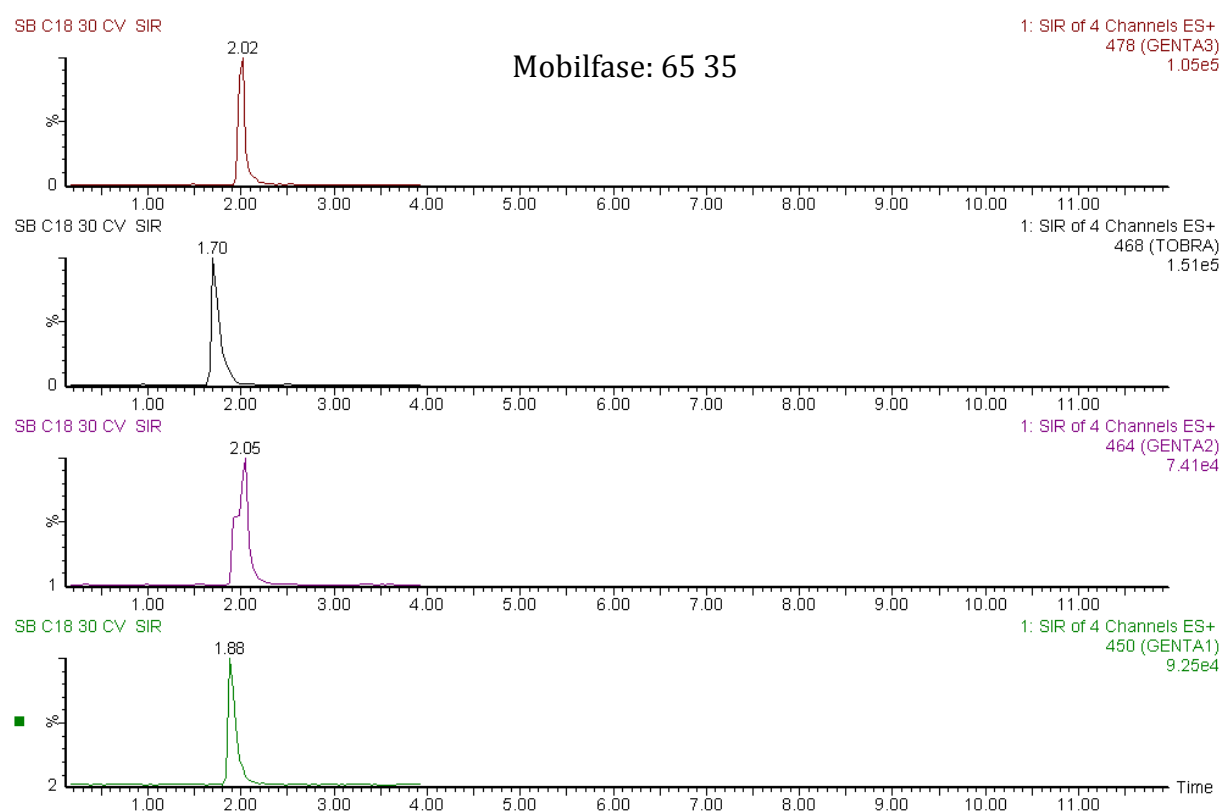
Figur 31. MRM analyse av ytterligere fortynnet standardprøver

8 Resultater – RP-18

8.1 UPLC

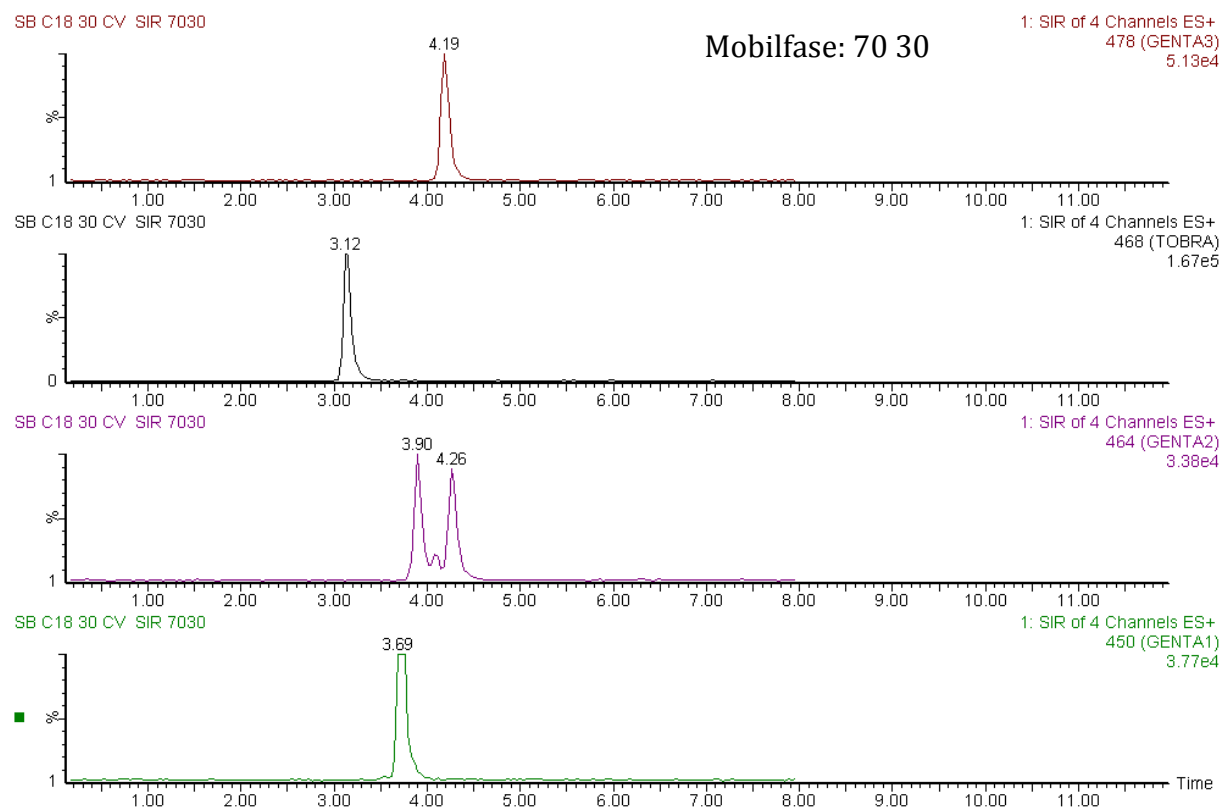
8.1.1 Mobilfasesammensetning- Isokratisk eluering

Analyttene ble eluert med isokratiske betingelser. Innledningsvis ble det forsøkt med en mobilfasesammensetning som bestod av vann og ACN i forholdet 65:35, og det resulterte i at toppen kom ut for tidlig som vist i Figur 32. Retensjonsfaktoren (k) var på omtrent 1,02 og det er ønskelig med retensjonsfaktor over 2.



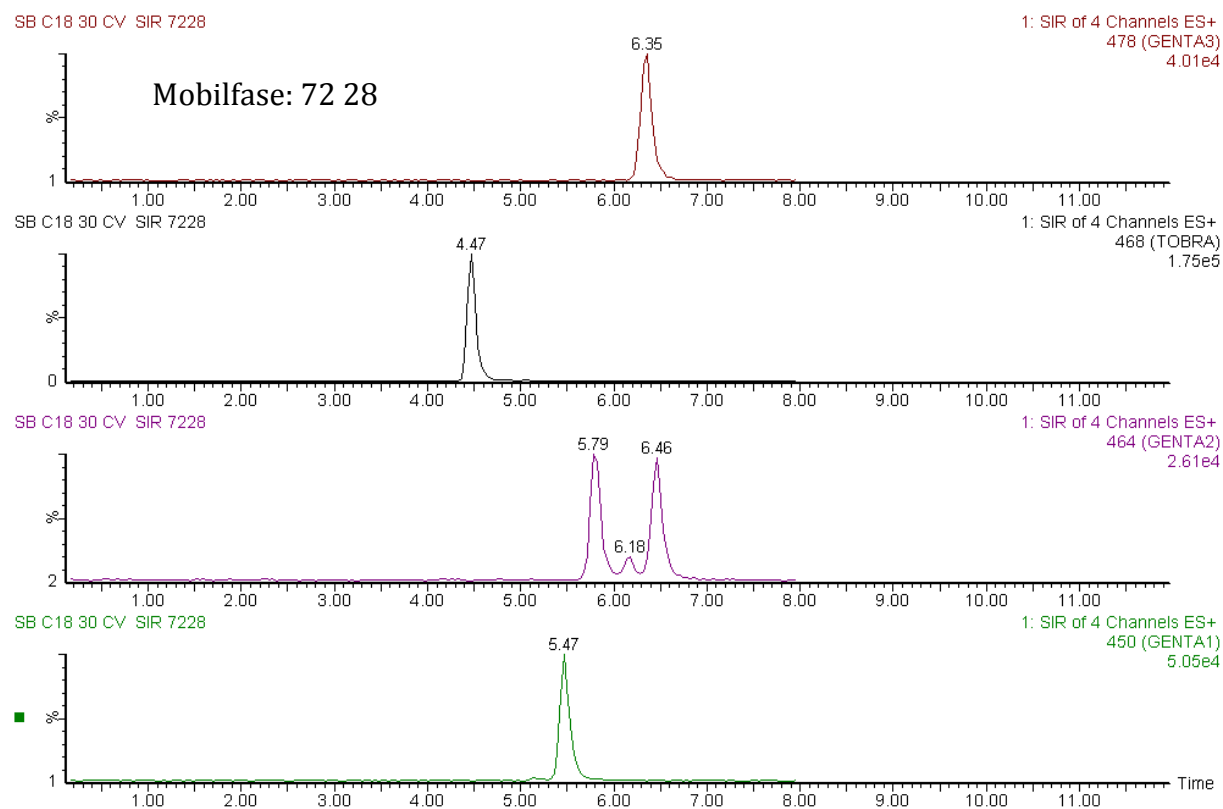
Figur 32. Isokratisk eluering med 65 % vann og 35% ACN

Deretter ble det forsøkt med 70 % vann og 30% ACN. Det ga god separasjon samt god retensjonstid på toppene som vist i Figur 33.



Figur 33. Isokratisk eluering med 70% vann og 30% ACN

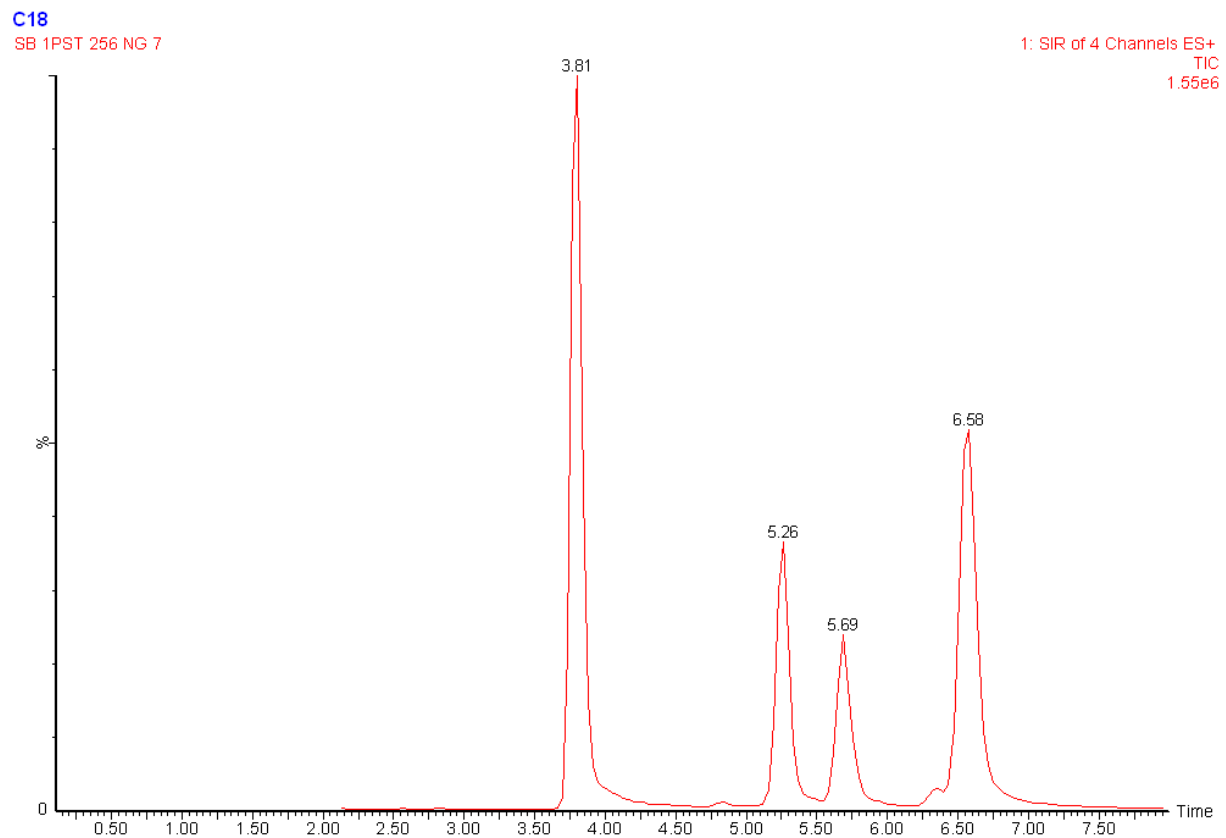
Mobilfasesammensetning med 72% vann og 28% ACN ga best resultat (Fig 34), og med denne sammensetningen fikk vi også separert 464 m/z gentamicinfragmentene. Da separasjon og retensjonsfaktor var tilfredsstillende ble det bestemt å fortsette med denne sammensetningen.



Figur 34. Isokratisk eluering med 72% vann og 28 % ACN

8.2 Kromatografisk separasjon

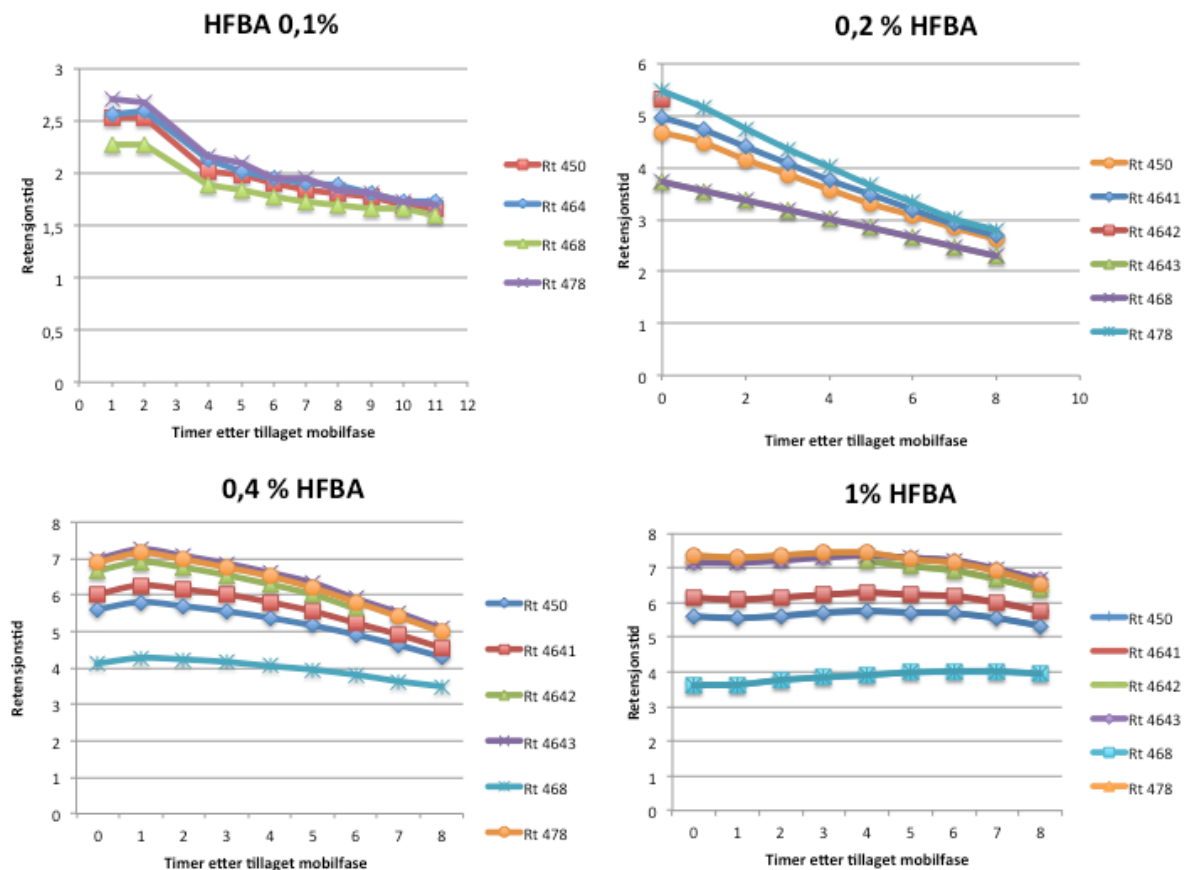
Analyse av standardprøver med ioneparkromatografi med C18 kolonne ga kromatografisk separasjon. Denne separasjonen viser en topp for de viktigste gentamicin fragmentene og tobramycin (Fig. 35). I tillegg fikk vi med denne kolonnen også separasjon av de isobare gentamicin forbindelsene ((M+H)⁺ = 464 m/z) (Fig. 35).



Figur 35. Kromatografisk separasjon med C 18 kolonne

8.3 Mobilfase – optimering av HFBA konsentrasjon

Etter å ha kjørt analyser en dag ble det observert at retensjonstiden ble kortere. I tillegg til det luktet det smørsyre i laboratoriet. Antagelig fordampet HFBA da det er en flyktig syre. Med ønske om å holde retensjonstiden stabil ble det bestemt å finne den ideelle konsentrasjonen av HFBA i mobilfasen. Det ble forsøkt med konsentrasjoner på 0,1– 1 % (Fig 36).



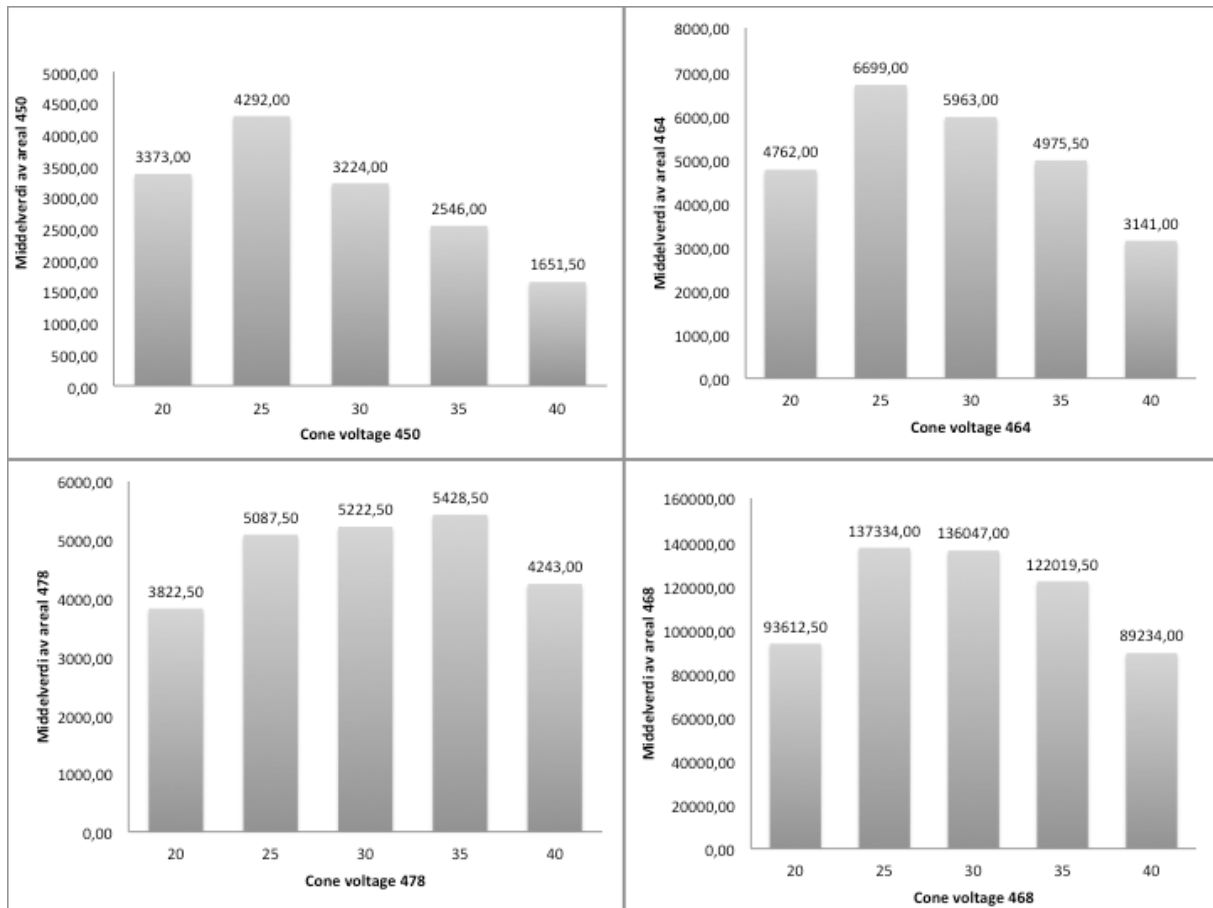
Figur 36. Retensjonstiden til analyttene med ulik konsentrasjon HFBA i mobilfasene.

Grafene i Figur 36 viser retensjonstiden som funksjon av tid etter tillaging av mobilfase ved ulike konsentrasjoner av HFBA. Ved lav konsentrasjon avtok retensjonstiden, men ble relativt stabil med 1 % HFBA. Med 1% HFBA ble det antatt at systemet var mettet og likevekten forskjøvet fullstendig mot ioneparet. Det ble også observert at det tok omtrent 1 time før det ble innstilt likevekt mellom mobilfasen og HFBA etter tillaging av mobilfasen.

8.4 Massespektrometri

8.4.1 Cone Voltage

Det ble kjørt flere analyser med konstant mengde gentamicin og tobramycin med CV i området 20 - 40. Figur 37 illustrerer hvilken CV som ga maks utslag for de enkelte fragmentene.

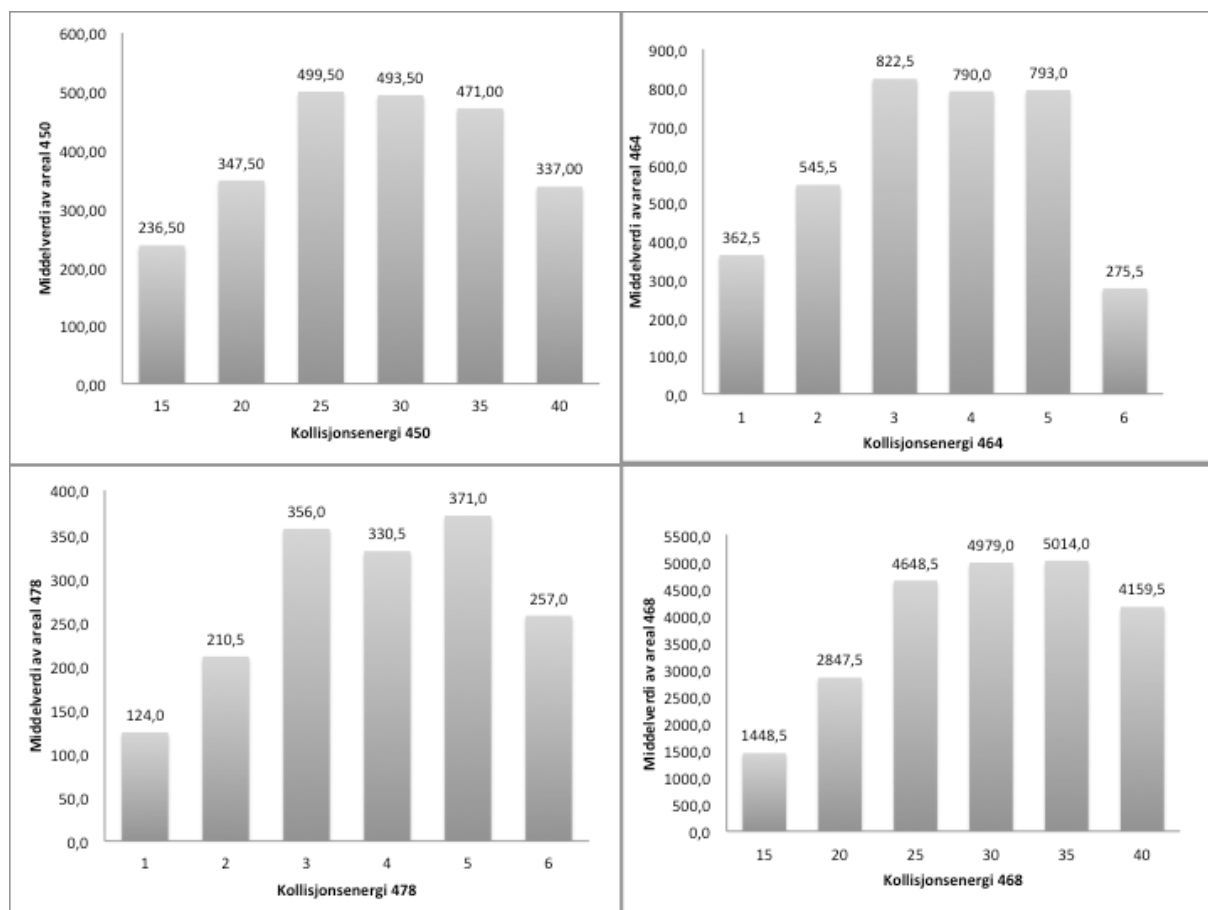


Figur 37. Optimal cone voltage for de ulike gentamicin komponentene og tobramycin.

Optimal CV var 25 for tobramycin og gentamicinfragmentene 450 og 464. Gentamicin fragment 478 hadde optimal CV på 35. MS ble etter dette koblet til optimal CV for alle gentamicin fragmentene og tobramycin.

8.4.2 Kollisjonsenergi

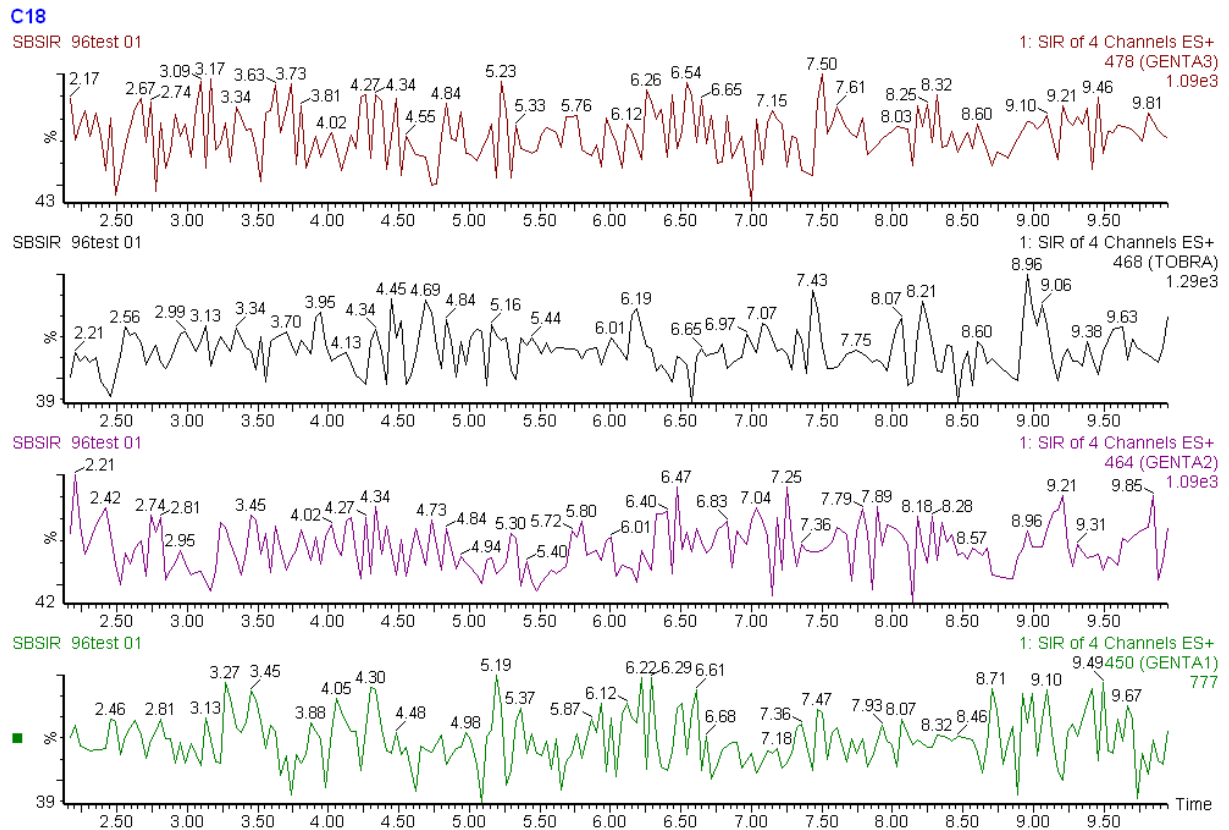
I MRM analyse fragmenteres gentamicin til produktion med masse på 322 m/z, og tobramycin til produktion med masse på 324 m/z. Det ble kjørt analyser med CE i området 15-40. Den optimale CE for gentamicin fragmentene 450 og 464 var på 25. For gentamicin 478 og tobramycin var den optimale CE på 35 (Fig. 38).



Figur 38. Optimal kollisjonsenergi for gentamicin komponentene og tobramycin

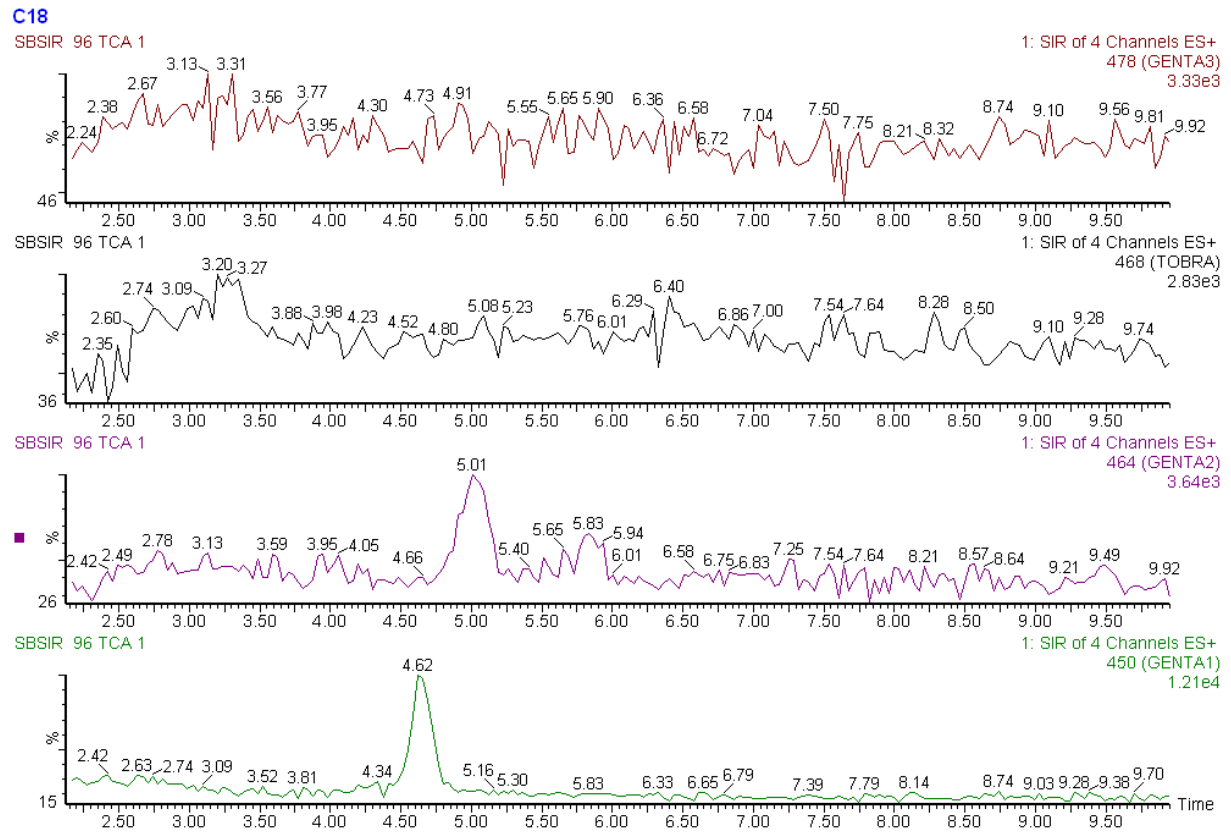
8.5 Prøveoppbeidelse

Formålet med oppbeidelsen av prøver i serum var å bli kvitt proteiner, fosfolipider og andre interferenser. Innledningsvis ble det forsøkt å felle ut proteinene med iskald ACN, og deretter ble supernatanten overført til OSTRO for fjerning av fosfolipidene. Videre ble prøven fra samleplaten analysert. MS ga ingen signal av gentamicin eller tobramycin, det var kun støy i kromatogrammet som vist i figur 39.



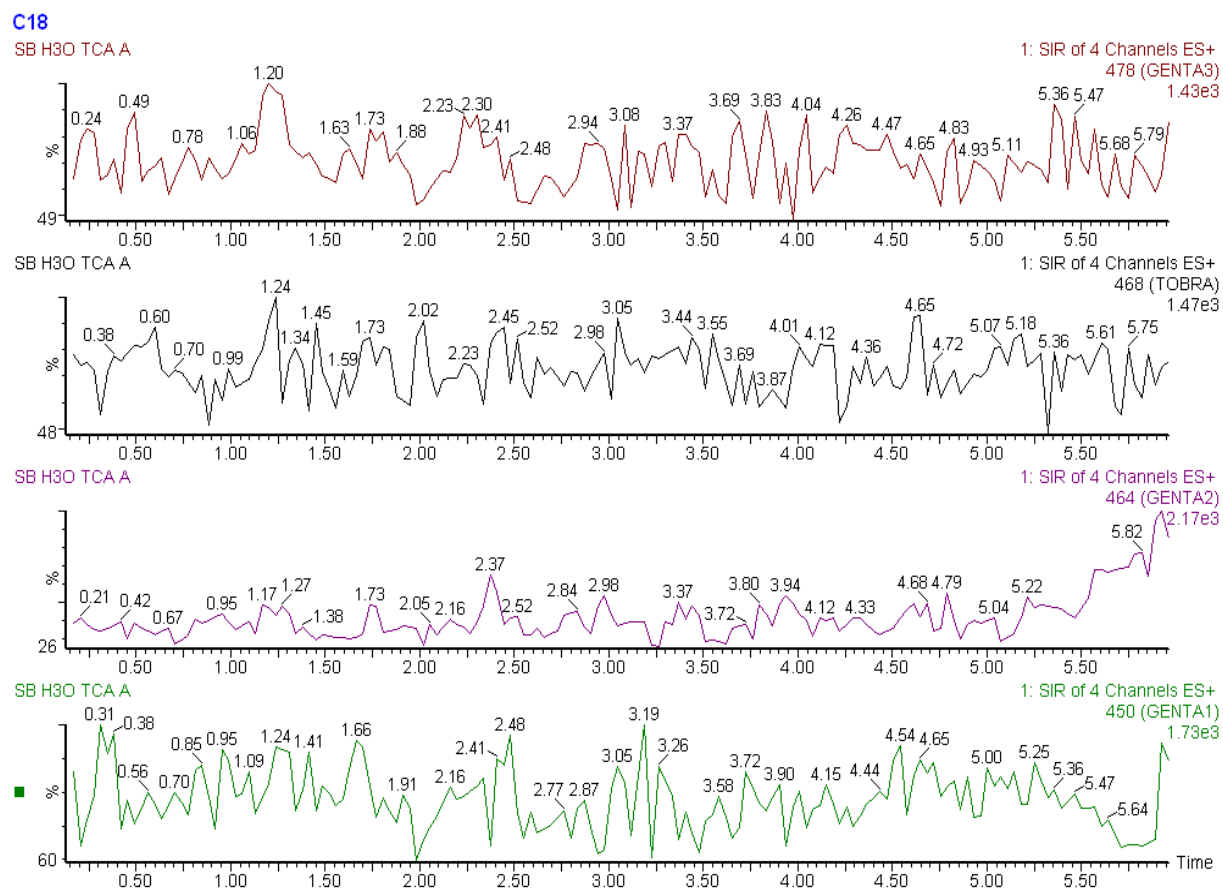
Figur 39. Analyse av serumprøve etter proteinfelling med ACN og fjerning av fosfolipider på OSTRO

Deretter ble det forsøkt å felle ut proteinene med kald TCA (15%). Kromatogrammet ga en liten topp på gentamicin fragmentene 450 m/z og 464 m/z. Ellers så var det stort sett bare støy i kromatogrammet denne gangen også (Fig. 40).



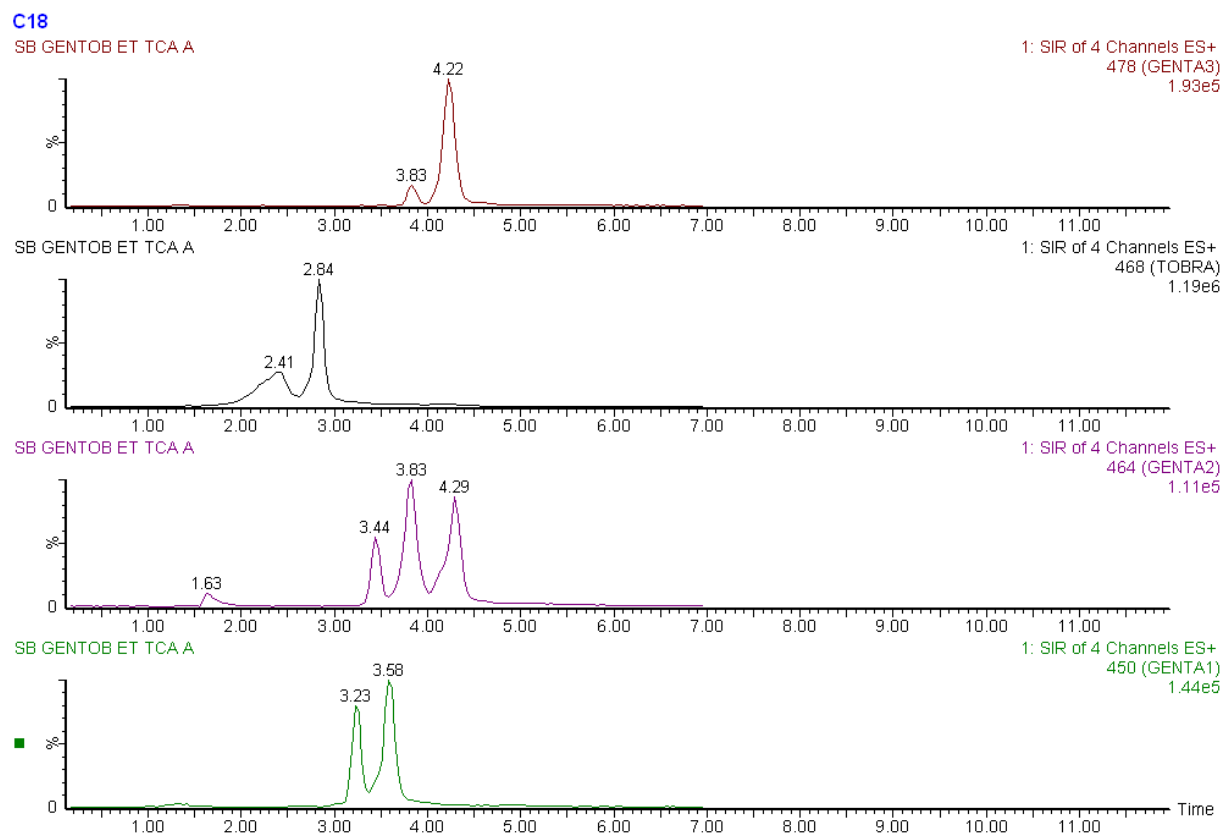
Figur 40. Analyse av serumprøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider på OSTRO

Det oppstod mistanke om at serumet i kombinasjon med OSTRO, var årsaken til at fraværende signal. Dermed ble det forsøkt å analysere en standardprøve som bestod gentamicin som var løst og fortynnet med H₂O. Fortsatt fikk vi ikke noe signal (Fig 41).



Figur 41. Analyse vandig gentamicin prøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider på OSTRO.

Det ble antatt at OSTRO holdt igjen gentamicin i matriksen. Det ble bestemt å forsøke prøveopparbeidelsen av serumet uten OSTRO. Det ble laget serumprøver der proteinene ble felt med TCA. Videre ble fosfolipidene og nøytrale forbindelser fjernet med etylacetat. Etter faseparasjon ble etylacetat fjernet og supernatanten ble overført til vial glass og analysert. Dette ga signal fra både gentamicin og tobramycin (Fig. 42). Med dette ble antagelsen om OSTRO bekreftet, og OSTRO ble ikke brukt mer i oppgaven.



Figur 42. Analyse serumprøve etter proteinfelling med TCA og fjerning av fosfolipider med etylacetat

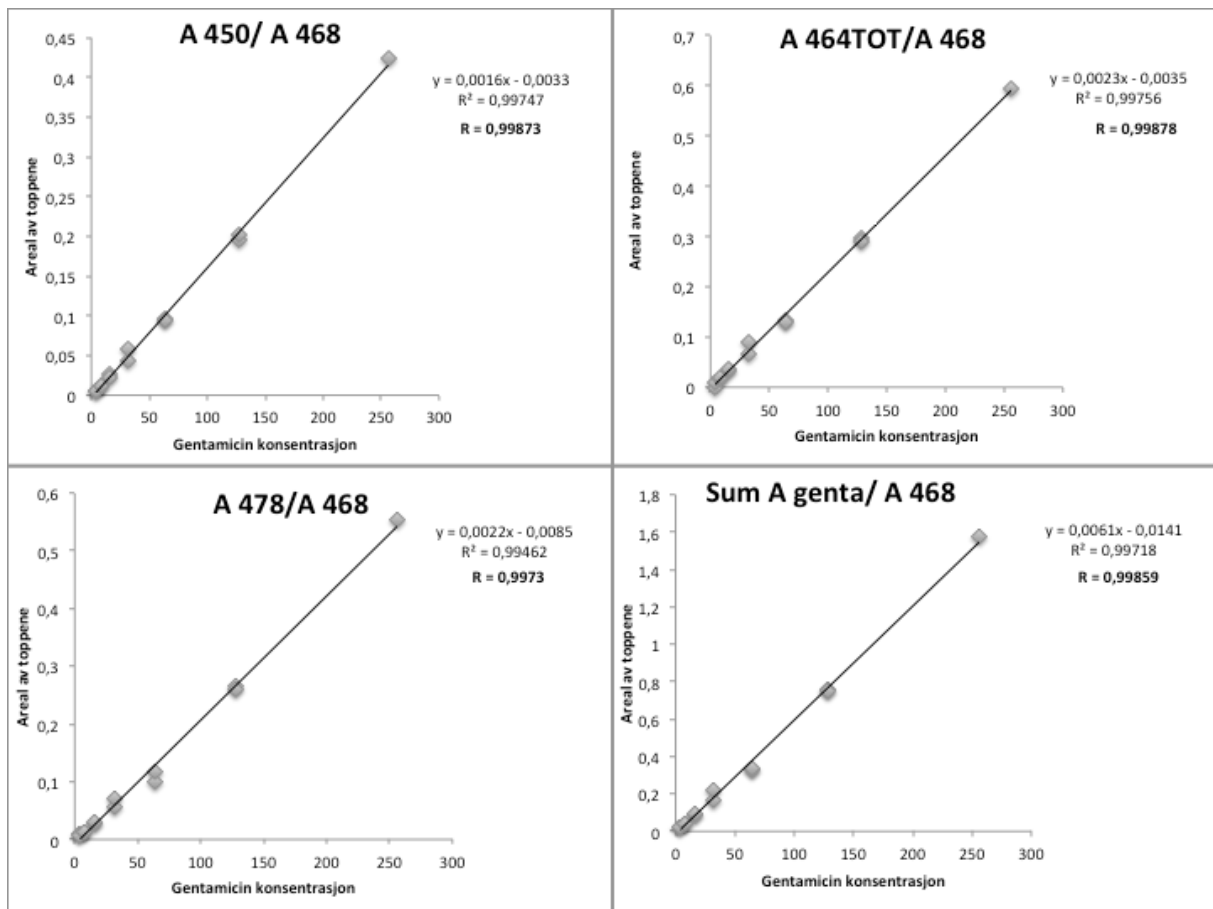
Validering

8.5.1 Standardprøver løst i H₂O

Gentamicin konsentrasjonen i standardprøvene var på 0,5 – 29 ng/μL og tobramycin konsentrasjonen var på 9,09 ng/ μL.

8.5.1.1 Linearitet – SIR analyse

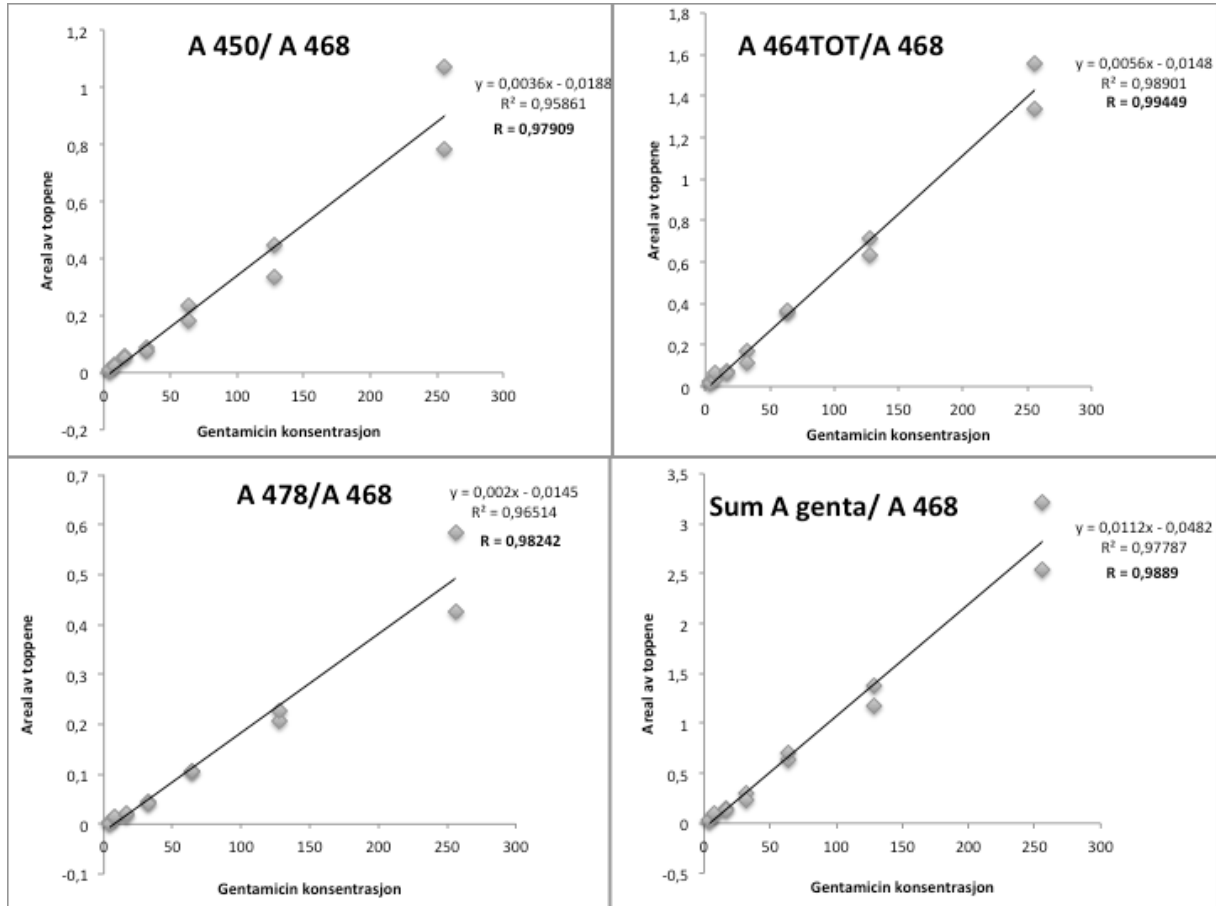
SIR analyse av standardprøvene gav ønskelige standardkurver som vist i Figur 43. Se Tabell 23 for beregningsgrunnlaget.



Figur 43. SIR analyse av standardprøvene

8.5.1.2 Linearitet- MRM analyse

Det ble også kjørt MRM analyse av standardprøvene for å øke sensitiviteten til analysen, og det ga akseptable standardkurver (Fig 44). Se tabell 24 for beregningsgrunnlag.



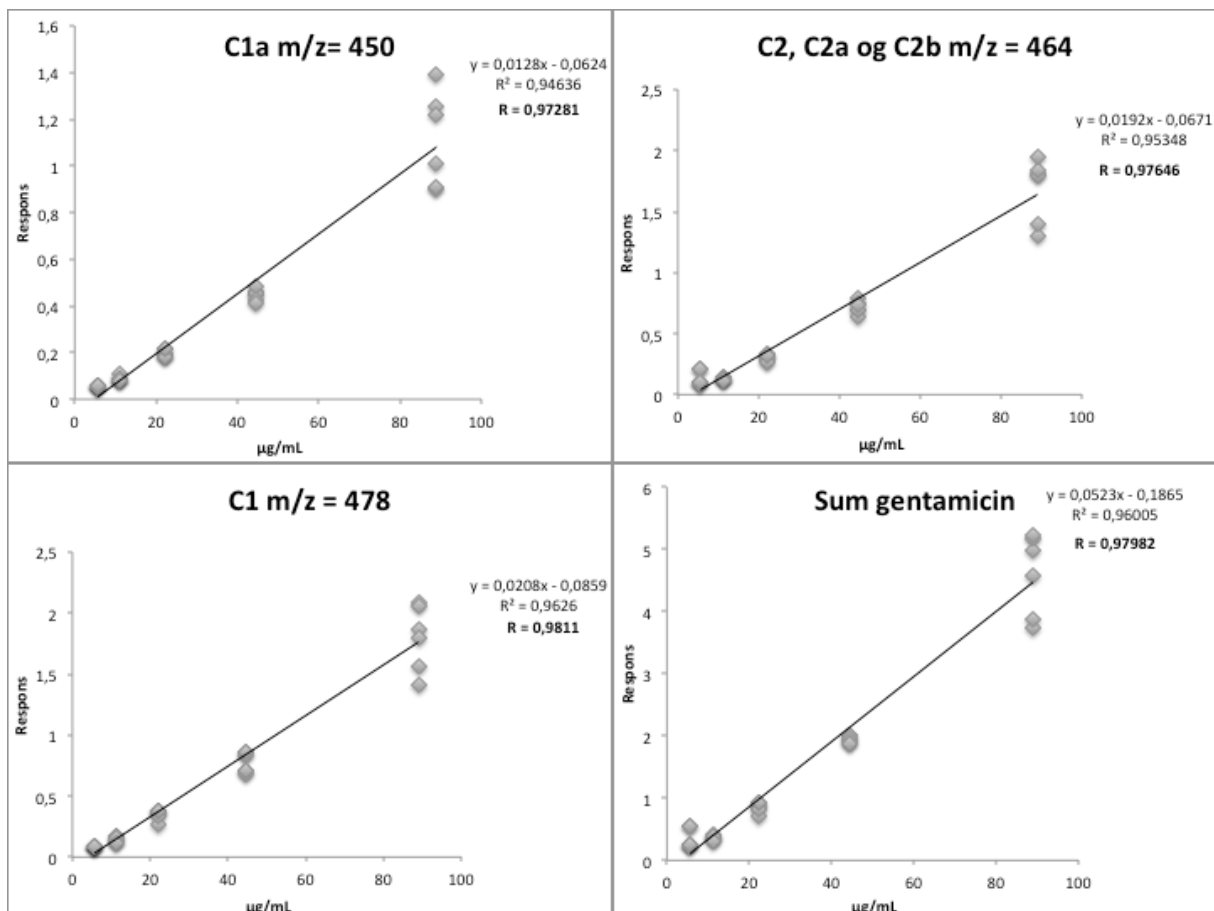
Figur 44. MRM analyse av standardprøvene

8.5.2 Standardprøver med serum

Gentamicin konsentrasjonen i de ulike serumprøvene var på 5,6 - 89 µg/mL og tobramycin konsentrasjonen var på 18 µg/mL. Serumprøver med lavere konsentrasjoner enn 5,6 µg/mL ga svært svake signal.

8.5.2.1 Linearitet – SIR analyse

SIR analysen av standardprøvene med serumprøvene ga gode standardkurver som vist i Figur 45. Se tabell 25 for beregningsgrunnlag.



Figur 45. SIR analyse av serumprøver etter proteinfelling og ekstraksjon med etylacetat

9 Diskusjon

9.1 HILIC

MS som detektor setter krav til sammensetning av mobil fase som gjør at tradisjonelle normalfase kolonner ikke kan brukes. HILIC gir en retensjonsrekkefølge av substanser som ligner på det en vil få med tradisjonelle normal fase kolonner, det vil si at upolare forbindelser får kort retensjonstid og mer polare forbindelser får lengre retensjonstid. Mobilfaser som brukes i analyser med HILIC kolonner er blandinger av vann/ACN eller vann/MeOH tilsatt ca 0,1% maursyre. Dette er mobilfaser som er kompatible med MS som detektor. Det ble derfor valgt å undersøke potensialet til HILIC kolonner til analyse av ikke-derivatisert gentamicin og tobramycin.

9.1.1 UPLC

9.1.1.1 Mobilfasesammensetning

Forbindelsene ble forsøkt å bli eluert med isokratiske betingelser, men det fungerte ikke tilfredsstillende. Forbindelsene kom ut enten alt for tidlig og i dødvolumet, eller så kom de ut veldig sent. På bakgrunn av dette ble det forsøkt å eluere ut forbindelsene med gradient betingelser. Det ble forsøkt med flere ulike gradienter og gradienten i Tabell 8 erklærte vi oss fornøyd med.

En mulig ulempe med gradient eluering er at etter analysen tar det litt tid før det gjenopprettes likevekt mellom mobil og stasjonærfase. I denne metoden er det beregnet en tid på 4 minutter, og det er mulig det trengtes mer tid for å gjenopprette likevekten sånn at HILIC kolonnen var klar til å utføre en ny analyse.

9.1.1.2 Kromatografisk separasjon

Med HILIC kolonne fikk vi ikke en kromatografisk separasjon mellom tobramycin og gentamicin. Alt kom ut i en smal og fin topp, og under den toppen skjulte alle gentamicin fragmentene og tobramycin seg (Fig. 13). Det var kun noen sekunder imellom retensjonstiden på forbindelsene. Det var heller ingen kromatografisk separasjon eller mulighet for individuell kvantifisering av de isobare gentamicin forbindelsene C2, C2a og C2b.

9.1.2 Intern standard

På grunn av at tobramycin og gentamicin kokromatograferer, ble det undersøkt om tobramycin ga noe signal som kunne tolkes som gentamicin. SIR og MRM analyse av tobramycin gav topper for m/z-verdiene 450, 464 og 478 som i areal bare var 0,16% (SIR) og 0,63% (MRM) av arealet under tobramycin toppen (m/z = 468). Dette er verdier som bare i ubetydelig grad vil bidra til en systematisk feil i analysen, og tobramycin som intern standard ble derfor vurdert som godt egnet.

9.1.3 Massespektrometer

9.1.3.1 Fullscan

Et av fragmentene fra fullscan-analysen av gentamicin hadde en m/z verdi = 322. Dette fragmentet hadde høy intensitet og er derfor en god kandidat som et produktion i en MRM analyse. Men ut fra en fullscan, singel MS analyse er det umulig å vite om m/z = 322 er et fragment felles for de ulike gentamicin forbindelsene. Det ble derfor utført produktion analyser der parent ion var m/z = 450, m/z = 464 eller m/z = 478. I alle tilfellene hadde et av produktionene med m/z = 322. Fragmentet med m/z = 322 er derfor et fragment de ulike gentamicin forbindelsene har felles, og derfor godt egnet som produktion i en MRM analyse.

9.1.4 Standardprøver – ulike fortynninger

Fortynningsmidlene som det ble forsøkt å fortynne gentamicin i var ACN, H₂O og MeOH. SIR analyse av disse standardprøvene ga akseptable kromatogrammer med fortynningsmidlene H₂O og MeOH, men ikke av ACN. Basert på dette ble kun standardprøver løst og fortynnet med MeOH og H₂O analysert videre.

9.1.5 Validering

9.1.5.1 Standardprøver løst i MeOH

SIR analyse av standardprøvene løst og fortynnet i MeOH ga ustabile standardkurver. SIR analyse ga korrelasjonskoeffisient på (0,961-0,992) første dag, og dagen etter en korrelasjonskoeffisient på (0,841-0,907) av samme analyse. Det virket som at det hadde nådd en metning andre dagen ut ifra standardkurvene. Det ble tillaget nye standardkurver med samme konsentrasjonsområde, og det ga igjen ønsket standardkurver med korrelasjonskoeffisient på (0,984-0,995).

Innledningsvis ga MRM analyse av standardprøvene en ikke optimal korrelasjonskoeffisient på (0,719-0,829). Standardprøvene ble fortynnet for å se om det ga noe bedre standardkurver, og det gjorde det med en korrelasjonskoeffisient på (0,927-0,942).

9.1.5.2 Standardprøver løst i H₂O

SIR analyse av standardprøvene løst og fortynnet i H₂O ga noe mer stabile resultater enn standardprøver som var fortynnet i MeOH. SIR analysen ga gode standardkurver og korrelasjonskoeffisient på (0,998-0,999) både første dag og holdt seg like stabil dagen etter. MRM analysene ga også god korrelasjonskoeffisient på (0,997-0,999). Standardprøvene ble fortynnet for å se om det var mulig å detektere lavere konsentrasjoner. MRM analyse av de fortynnede prøvene ga standardkurver og en korrelasjonskoeffisient på (0,983-0,994). Standardprøvene ble fortynnet ytterligere og MRM analyse av disse standardprøvene ga en korrelasjonskoeffisient på (0,941-0,975).

9.2 RP-18

I en analyse av aminoglykosider i honning (43) er det brukt en C18 kolonne og en mobil fase av vann/ACN med 5 mM HFBA som ioneparsreagens. I de videre forsøk ble det derfor valgt å bruke en C18 kolonne og vann/ACN tilsatt HFBA som mobil fase.

9.2.1.1 Isokratisk eluering

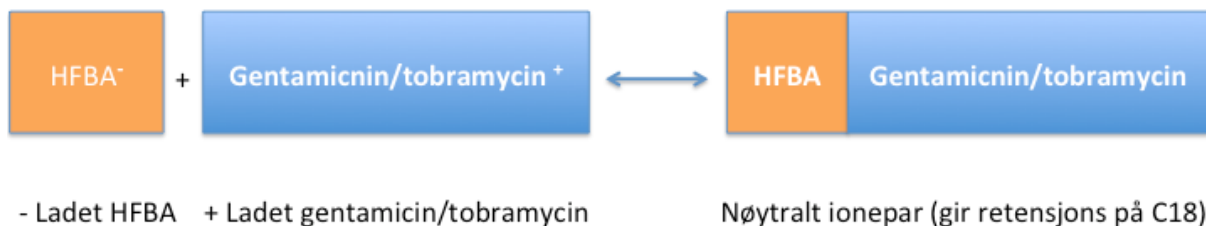
Det ble forsøkt å eluere ut forbindelsene med ulike isokratiske betingelser og den vi erklærte oss fornøyd med bestod av 72% H₂O og 28% ACN. Med denne mobilfasesammensetningen fikk vi en fin kromatografisk separasjon med god retensjonsfaktor. Mobilfasen var også tilsatt 1% HFBA.

9.2.1.2 Kromatografisk separasjon

I motsetning til HILIC kolonnen fikk vi med C18 kolonnen og valgt mobilfasesammensetning en optimal kromatografisk separasjon. Vi fikk skilt alle gentamicin forbindelsene og tobramycin fra hverandre. I tillegg til det fikk vi også en kromatografisk separasjon av de isobare forbindelsene C2, C2a og C2b.

9.2.2 Ideell HFBA konsentrasjon i mobilfase

I de første forsøkene var konsentrasjonen av HFBA i mobil fase 0,1%. I løpet av dagen ble retensjonstid for alle forbindelsene kortere og kortere. En mulig tolking av dette er at retensjon av gentamicin og tobramycin er avhengig av følgende likevekt:



Etter som konsentrasjonen av HFBA minsker, vil likevekten drives mot venstre og følgelig vil retensjonstid avta. Det ble derfor valgt å prøve ulike, høyere konsentrasjoner av HFBA i mobil fase. Som resultatene viser, gikk retensjonstiden opp for alle forbindelsene med økende konsentrasjon av HFBA. Ved konsentrasjoner av HFBA fra 0,8 % og oppover var det ikke lenger noen vesentlig økning av retensjonstid og retensjonstid holdt seg stabil i løpet av dagen. En forklaring på dette kan være at likevekten nå er drevet helt mot høyre og at retensjonstider derfor vil være stabile. I alt videre arbeid ble det derfor valgt å bruke 1% HFBA i mobil fase.

9.2.3 Massespektrometri

9.2.3.1 CV og CE

Det ble utført analyser med ulike CV og CE for å finne ut hvilken CE og CV som var optimal og som ga best signal av de gentamicin forbindelse og tobramycin. Optimaliserte CE og CV er vist i figur 38 og 39.

9.2.4 Prøveopparbeidelse

Et av målene med oppgaven var å opparbeide prøvene i 96 brønns format. Vi valgte å bruke OSTRO plater med et pakkemateriale designet for å fjerne fosfolipider fra serum. Tanken var at OSTRO systemet skulle brukes etter at proteiner var felt ut ved hjelp av kald TCA eller ACN. Alle forsøk med å rense serumprøver på denne måten var mislykket, det var ikke mulig å se hverken gentamicin eller tobramycin i de påfølgende LC-MS analysene. For å finne årsaken til dette løste vi rene tobramycin og gentamicin standarder i H₂O og ”renset” disse på OSTRO-systemet. Heller ikke nå var det mulig å se gentamicin og tobramycin i LC-MS analysene. En sannsynlig forklaring på dette er at aminoglykosidene fester seg til pakkematerialet i OSTRO-platene.

Det ble derfor nødvendig å velge en annen strategi for rensing av serumprøvene. Felling av proteiner ble utført ved hjelp av kald TCA. Etter sentrifugering ble supernatant ekstrahert ved hjelp av etylacetat for å fjerne fosfolipider og eventuelt nøytrale forbindelser. Etter ekstraksjon med etylacetat ble supernatant overført til analyse på LC-MS. Kromatogrammene viste at både tobramycin og de ulike gentamicinforbindelsene var tilstede, men i mye mindre mengder enn forventet. Laveste konsentrasjon som det var mulig å kvantifisere var ca 10 ganger høyere enn forventet bunnkonsentrasjon i serum.

En forklaring på det lave utbyttet er at TCA i supernatanten har dannet et nøytralt ioneparskompleks med både tobramycin og gentamicin og dermed har en stor fraksjon av disse gått over i etylacetatfasen.

9.2.5 Validering

9.2.5.1 Standardprøver løst i H₂O

SIR og MRM analyse av standardprøver løst i H₂O ga rimelig gode standardkurver med korrelasjonskoeffisient på (SIR: 0,997-0,999) (MRM: 0,979-0,994). Gentamicin konsentrasjonen i standardprøvene var på 0,5 – 29 ng/μL og tobramycin konsentrasjonen var på 9,09 ng/ μL. Vi jobbet dermed ikke lenger med rene standarder, og gikk over til serumprøver.

9.2.5.2 Standardprøver løst i serum

SIR analysen av standardprøver løst i serum ga gode standardkurver og gode korrelasjonskoeffisienter i området 0,972-0,981. Problemet her var at konsentrasjonen av gentamicin i prøven var mye høyere enn det vi ønsket å detektere. Gentamicin konsentrasjonen i de ulike serumprøvene var på 5,6 - 89 μg/mL og tobramycin konsentrasjonen var på 18 μg/mL.

10 Konklusjon

Det var noen positive sider ved bruk av HILIC kolonnen, men ulempene var større.

De positive sidene var at vi fikk god respons i MS og det var mulig å detektere og kvantifisere små mengder gentamicin. Minste konsentrasjon av gentamicin var på 0,381 µg/ml og laveste konsentrasjon av tobramycin på 1,512 µg/ml. I tillegg til det ga kromatografien skarpe og fine topper.

Ulempene med HILIC kolonnen var at det ga for dårlig kromatografisk separasjon av de ulike gentamicin forbindelsene og tobramycin. Det var heller ingen kromatisk separasjon mellom isobare gentamicin forbindelsene C2, C2a og C2b. Det ble også observert at retensjonstiden var ustabil. I tillegg det varierte korrelasjonskoeffisienten. Det ble bestemt å avslutte arbeidet med HILIC kolonnen, fordi den var uegnet i forhold til målene vi hadde satt oss.

Med C18 kolonnen fikk vi en akseptabel kromatografisk separasjon av gentamicinforbindelsene og tobramycin. Vi fikk også separert de isobare forbindelsene som også var ett av delmålene. Når det gjelder prøveopparbeidelsen har det ikke blitt funnet en metode for prøveopparbeidelse i 96 brønnsformatet som gir godt utbytte av analytten. Muligens kan OSTRO plate pakket med annet materiale fungere. Som viderearbeid vil jeg anbefale å oparbeide prøven med å felle serumproteinene med ACN og ikke TCA, og ta supernatanten over i et nytt glass og dampe det tørt. Deretter reløse det i vann. Ved tilsetning av etylacetat vil gentamicin være vannløselig og det vil ikke være mulighet for ionepardanning/ioneparekstraksjon. I analyse av rene standarder er minste detekterbare mengde og kvantifiserbare mengde så lav at metoden har et potensiale på analyse av serumprøver.

Metoden er ikke fullstendig validert. Det hadde heller ingen hensikt da vi ikke klarte å detektere gentamicin i serum i klinisk relevante konsentrasjoner.

11 Referanser

1. Polin RA. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics*. 2012;129(5):1006-15.
2. Gopal V, Keane M, Ail D. Survey on the Use of Gentamicin and Vancomycin in Adult Intensive Care Units. *Journal of the Intensive Care Society*. 2013;14(3):244-9.
3. Vinks A, Mouton J, Derendorf H. Aminoglycosides. *Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer; 2014. p. 201-22.
4. Markestad T, Halvorsen B. Faglige retningslinjer for oppfølging av for tidlig fødte barn. Oslo, Norge: Sosial og Helsedirektoratet; 2007 [cited 2015 september]. Available from: <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/274/Nasjonale-faglige-retningslinjer-for-oppfolging-av-for-tidlig-fodte-barn-IS-1419.pdf>.
5. Li J, Li H, Mao H, Yu M, Feng T, Yang F, et al. Vgamma9Vdelta2-T lymphocytes have impaired antiviral function in small-for-gestational-age and preterm neonates. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(3):253-60.
6. T23 Ernæring, væskesubstitusjon og elektrolyttforstyrrelser. Oslo: Norsk legemiddelhandbok; 2013 [cited 2015 september]. Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/s%C3%B8ker/+%2Bblodvolum/26581>.
7. L1.2.9.1 Gentamicin. Oslo, Norge: Norsk legemiddelhandbok; 2013 [cited 2015 oktober]. Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/29580?expand=1>.
8. Gentamicin [Internet]. Laboratoriemedisinsk klinikk ved Universitetssykehuset i Trondheim - St. Olavs Hospital. [cited 1 oktober 2015]. Available from: http://data.helsemidt.no/ftp/stolav/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html.
9. Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, Wagman GH, Rosselet JP, Marquez JA, et al. Gentamicin, 1 a New Antibiotic Complex from Micromonospora. *J Med Chem*. 1963;6(4):463-4.
10. Claes PJ, Busson R, Vanderhaeghe H. Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization. *J Chromatogr*. 1984;298(3):445-57.
11. Council of E. Gentamicin sulphate - European pharmacopoeia : vol. 1. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2010.
12. Isoherranen N, Soback S. Determination of gentamicins C-I, C-Ia, and C-2 in plasma and urine by HPLC. *Clin Chem*. 2000;46(6):837-42.
13. Mangoni AA, Jackson SHD. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;57(1):6-14.
14. Definisjoner og forkortelser innen Nyfødtdisinsin [Internet]. Helsebiblioteket - Universitetssykehuset Nord Norge. Available from: <http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/metodebok-for-nyf%C3%B8dtmedisin/15-definisjoner-vekst>.
15. Engle WA, American Academy of Pediatrics Committee on F, Newborn. Age terminology during the perinatal period. *Pediatrics*. 2004;114(5):1362-4.
16. Fuchs A, Guidi M, Giannoni E, Werner D, Buclin T, Widmer N, et al. Population pharmacokinetic study of gentamicin in a large cohort of premature and term neonates. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(5):1090-101.
17. Klingenberg C, Smabrekke L, Lier T, Flaegstad T. Validation of a simplified netilmicin dosage regimen in infants. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(6-7):474-9.

18. Gentamicin (systemic): Pediatric drug information [Internet]. UpToDate. [cited 09 Mars, 2016]. Available from: http://www.uptodate.com/contents/gentamicin-systemic-pediatric-drug-information?source=search_result&search=gentamicin+children&selectedTitle=1~145-F10482906.
19. Gentamicin Sulfate [Internet]. American Society of Health-System Pharmacists, Inc. 1959-2016 [cited 2009]. Available from: <https://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a382664.htm>.
20. Veiledende i.v dosering av antibiotika ved sepsis/meningitt. 2012 29 september 2015. In: Metodebok i nyfødttmedisin- [Internet]. Tromsø: Universitetssykehuset. 4th. [55]. Available from: http://www.unn.no/getfile.php/UNN/INTER/Enhet/BUK_web/Dokumenter/NyfodtIntensiv_dok/Metodebok_nyf%C3%B8dtUNN2012.pdf.
21. Gentamicin i serum - Laboratoriehåndbok Nord-Norge: Universitetssykehuset 2004. Available from: <http://www.unn.no/laboratoriehandbok/gentamicin-i-serum-article18299-14289.html>.
22. Stead DA. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J Chromatogr B*. 2000;747(1-2):69-93.
23. Småbrekke L. Personlig meddelelse. 2016.
24. Hubicka U, Krzek J, Woltyńska H, Stachacz B. Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry. *J AOAC Int*. 2009;92(4):1068-75.
25. Al-Amoud AI, Clark BJ, Chrystyn H. Determination of gentamicin in urine samples after inhalation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatisation with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;769(1):89-95.
26. Krzek J, Woltyńska H, Hubicka U. Determination of Gentamicin Sulphate in Injection Solutions by Derivative Spectrophotometry. *Analytical Letters*. 2009;42(3):473-82.
27. Gubernator J, Drulis-Kawa Z, Kozubek A. A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions. *Int J Pharm*. 2006;327(1-2):104-9.
28. Al-Majed AA. A New LC Method for Determination of Some Aminoglycoside Antibiotics in Dosage Forms and Human Plasma Using 7-Fluoro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole as a Fluorogenic Pre-Column Label. *Chromatographia*. 2008;68(11-12):927-34.
29. Yan HD, Xu PY, Huang HC, Qiu JP. Analysis of spectinomycin in fermentation broth by reversed-phase chromatography. *Chemical Papers*. 2009;63(6):635-40.
30. Ghinami C, Giuliani V, Menarini A, Abballe F, Travaini S, Ladisa T. Electrochemical detection of tobramycin or gentamicin according to the European Pharmacopoeia analytical method. *J Chromatogr A*. 2007;1139(1):53-6.
31. Manyanga V, Kreft K, Divjak B, Hoogmartens J, Adams E. Improved liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for the analysis of gentamicin. *J Chromatogr A*. 2008;1189(1-2):347-54.
32. Manyanga V, Grishina O, Yun Z, Hoogmartens J, Adams E. Comparison of liquid chromatographic methods with direct detection for the analysis of gentamicin. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(2):257-62.
33. Li B, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Adams E. Mass spectrometric characterization of gentamicin components separated by the new European Pharmacopoeia method. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;55(1):78-84.
34. Clarot I, Chaimbault P, Hasdenteufel F, Netter P, Nicolas A. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*. 2004;1031(1-2):281-7.

35. Megoulas NC, Koupparis MA. Development and validation of a novel LC/ELSD method for the quantitation of gentamicin sulfate components in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(1):73-9.
36. Wang MJ, Hu CQ. Analysis of spectinomycin by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Chromatographia.* 2006;63(5-6):255-60.
37. Li W, Zhang J, Tse FLS. *Handbook of LC-MS bioanalysis : best practices, experimental protocols, and regulations.* Hoboken, New Jersey: Wiley; 2013. 1 online resource (xix, 684 pages) p.
38. Rossi DT, Sinz MW. *Mass Spectrometry in Drug Discovery.* New York Basel, Switzerland: Marcel Dekker, Inc; 2002.
39. Ostro pass-through sample preparation product. In: Corporation W, editor. Milford, U.S.A.2015. p. 1.
40. Carmical J, Brown S. The impact of phospholipids and phospholipid removal on bioanalytical method performance. *Biomed Chromatogr.* 2016.
41. Eric S. Grumbach, Joseph C. Arsenault, McCabe DR. *Beginners guide to UPLC - Ultra-Performance Liquid Chromatography* 2009. Available from: http://www.waters.com/waters/en_NO/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?locale=en_NO&cid=134803614.
42. Drugbank: Gentamicin properties: Drugbank; 2005 [updated 22.05.2014. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>.
43. Emily Barrey, Olga Shimelis, Espenschied KG. Aminoglycoside Analysis in Pork Muscle using Molecularly Imprinted Polymer Cleanup and LC/MS/MS Detection.32.3.
44. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Legemiddelanalyse.* 2. utgave ed. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS; 2010. 7 p.
45. Gates DP, Bull DID. *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)* Bristol: School of Chemistry, University of Bristol; [updated 14/01/2008. Available from: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>.
46. Schmidt A, Picotti P, Aebersold R. Systembiologie Proteomanalyse und Systembiologie. *Systems biology and proteomic analysis.* 2008;14(1):44-6.
47. Heller DN, Peggins JO, Nochetto CB, Smith ML, Chiesa OA, Moulton K. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;821(1):22-30.
48. Cherlet M, Baere SD, Backer PD. Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000;35(11):1342-50.
49. Tobramycin sulfate salt: Sigma-Aldrich; [Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1783?lang=en®ion=NO>.
50. Di-Stearoyl-3-Sn-Phosphatidylcholine: Drugbank; 2005 [updated 16.09.13. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB04178>.

12 Vedlegg.

Tabell 23. Datagrunn for SIR analyse av standardprøvene løst med H₂O (C18)

Kons.	450	464	478	468	450/468 Snitt.	464/468 Snitt	478/468 Snitt	Tot/468 Snitt
0,5 ng/μL	1110	1557	1522	176494	0,00617267	0,00964313	0,00819914	0,02401494
	1029	1778	1321	169909				
0,9 ng/ μL	1900	2934	2289	169040	0,01169431	0,01801114	0,01316479	0,04287023
	2032	3122	2139	167261				
1,8 ng/ μL	4167	5428	4328	159254	0,02420599	0,0354883	0,02888874	0,08858302
	3419	5670	4703	153689				
3,6 ng/ μL	7304	11115	9393	165229	0,05156188	0,07804457	0,06395509	0,19356154
	7011	10569	8456	118995				
7,3 ng/ μL	14882	20540	15276	154153	0,09488856	0,13147617	0,10743022	0,33379495
	14610	20325	18140	156698				
14,5 ng/ μL	30718	46693	41808	156898	0,19918137	0,29343218	0,26302914	0,75564269
	31304	44699	40114	154527				
29,1 ng/ μL	66924	93986	87570	157817	0,424060779	0,59553787	0,554883187	1,574481837

Tabell 24. Datagrunnlag for MRM analyse av standardprøvene løst i H₂O

Kons.	450	464	478	468	450/468 Snitt.	464/468 Snitt	478/468 Snitt	Tot/468 Snitt
0,5 ng/μL	6	29	4	1178	0,00807155	0,02059629	0,00169779	0,03036564
	8	12		724				
0,9 ng/ μL	23	29	8	815	0,02415059	0,04858124	0,01160142	0,08433324
	15	46	10	747				
1,8 ng/ μL	50	68	16	897	0,05320108	0,07259575	0,01883051	0,14462734
	46	63	18	908				
3,6 ng/ μL	80	164	43	947	0,08078371	0,1430496	0,04387591	0,26770922
	71	104	39	921				
7,3 ng/ μL	186	360	108	1017	0,20885433	0,35968346	0,10572892	0,67426672
	232	361	104	988				
14,5 ng/ μL	408	765	251	1208	0,39099137	0,67155401	0,21731228	1,27985766
	470	751	240	1058				
29,1 ng/ μL	978	1668	532	1250	0,9259567	1,44624667	0,50425978	2,87646316
	1077	1569	587	1007				

Tabell 25. Datagrunnlag for SIR analyse av standardprøver med serum.

Kons.	Parallell	450	464	478	468	450/468 Snitt.	464/468 Snitt	478/468 Snitt	Tot/468 Snitt
5,6 µg/mL	A	4034	7008	6188	69745	0,05470083	0,1748844	0,08677765	0,45508359
		3261	13865	5623	64740				
		3631	13643	5506	64964				
	B	3897	6324	5780	68876	0,05729104	0,0953858	0,08634852	0,23902537
		3856	6853	5939	69480				
		4076	6524	6111	68166				
11,2 µg/mL	A	8802	10799	13190	78855	0,09623429	0,1351388	0,14313526	0,37450836
		9150	13865	13188	101493				
		8994	13643	13678	103467				
	B	8959	13692	17328	104722	0,08532458	0,1268485	0,14774285	0,35991592
		9408	13985	17149	106966				
		9181	13254	13074	111325				
22,3 µg/mL	A	20715	33635	40532	106882	0,18818734	0,2907562	0,3376702	0,81661375
		19715	30466	39685	106655				
		19927	29148	28052	107191				
	B	17002	30637	31467	95584	0,20517191	0,3275392	0,36273128	0,89544242
		20271	31358	35009	93214				
		19296	28543	33602	87640				
44,6 µg/mL	A	38426	55194	71920	85984	0,45554862	0,6748003	0,85121882	1,98156778
		36058	54264	66569	78033				
		37791	56736	71355	82574				
	B	30150	49480	42336	62817	0,43937123	0,7569713	0,69984002	1,8961825
		25980	45327	43433	60821				
		25782	46294	44630	62731				
89 µg/mL	A	69267	89602	96578	68580	1,10156567	1,639771	1,68958921	4,4309259
		60543	121357	124906	67065				
		105504	136680	136287	75797				
	B	82570	120954	137159	65760	1,12752852	1,7287559	1,90277678	4,75906125
		78014	124945	131852	64197				
		78583	120725	135209	86191				