

Masteroppgave i legemiddelanalyse for graden Master i Farmasi.

Kvantitative analyser av gentamicin og tobramycin i blod med LC-MS/MS

Karina Nilsen

Mai 2009



Veiledere:

Einar Jensen, Universitetet i Tromsø

Ole-Martin Fuskevåg, Universitetssykehuset Nord-Norge HF

Lars Småbrekke, Universitetet i Tromsø

Avdeling for legemiddelkjemi

Institutt for farmasi

Universitetet i Tromsø

FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved medisinsk laboratorieavdeling, seksjon 5 ved UNN i perioden november 2008 til april 2009. Veiledere for oppgaven har vært Einar Jensen, Ole-Martin Fuskevåg og Lars Småbrekke.

En stor takk til Ole-Martin Fuskevåg, som har vært til stor hjelp for meg, med god veiledning underveis i laboratoriearbeidet og skriveprosessen. Takk til Anita Seljelund og Guro Emilie Liseth, for hjelp som dere har gitt meg. En takk rettes også til Lars Småbrekke, som var bi veileder, for god veiledning og nyttige råd gjennom skriveprosessen. Takk til Einar Jensen som var hovedveileder og introduserte meg for oppgaven.

Tusen takk, tante Nina, for korrekturlesning av oppgaven.

En stor takk til mine gode venninner Hege, Susanne, Tina, Bente og Ninja for god støtte, og fantastiske studieår i Tromsø.

Takk til mine besteforeldre som alltid har hatt stor tro på meg.

Tusen takk til min kjære samboer, Jan-Terje, for å ha holdt ut med meg og mitt til tider lunefulle humør, og for å ha vist mye tålmodighet og hjelp ellers.

Tusen takk til mine kjære foreldre, uten dere ville jeg ikke vært her jeg er i dag, dere har vært en enorm støtte for meg. Takker også min kjære lillesøster og storebror for oppmuntring og støtte gjennom studiet.

Tromsø, mai 2009

Karina Nilsen

FORKORTELSER

| | |
|--------------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| APPI | Atmospheric Pressure Photo-Ionization |
| CE | Collision Energy; (Kollisjonsenergi) |
| CV | Cone Voltage |
| ESI | Electrospray Ionization; (Elektrospray ionisering) |
| GC | Gas Chromatography; (gasskromatografi) |
| HILIC | HydrophILic interaction liquid Chromatography |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography; (Høyeffektiv væskekromatografi) |
| IS | Internstandard |
| LC | Liquid Chromatography; (Væskekromatografi) |
| LC- MS | Liquid Chromatography Mass Spectrometry |
| LLE | Liquid- Liquid Extraction; (væske- væske- ekstraksjon) |
| LOD | Limit of Detection; (Minste detekterbare mengde) |
| LOQ | Limit of Quantification; (Minste kvantifiserbare mengde) |
| M | Molar (mol/liter) |
| (M+H) ⁺ | Protonert molekyl ion |
| MeOH | Metanol |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring |
| MS | Mass Spectrometry; (Massespektrometri) |
| MS/MS | Tandem Mass Spectrometry |
| M _w | Molekylvekt |
| <i>m/z</i> | Mass to charge ratio; (Masse til landings forhold) |
| NaOH | Natriumhydroksid |
| RSD | Relativt standardavvik |
| SD | Standard avvik |
| SIR | Single Ion Recording |
| TBME | Tert-butylmetyleter |
| TCA | Trichloroacetic acid; (Triklorreddiksyre) |
| TIC | Total Ion Current |
| TPN | Total Parenteral Nutrition; (Total parenteral ernæring) |
| UNN | Universitetssykehuset Nord-Norge HF |
| UPLC | Ultra Performance Liquid Chromatography |
| UV | Ultra violet; (Ultra fiolett) |
| ZnSO ₄ | Zinksulfat |
| μM | Mikromolar |
| μl | Mikroliter |

SAMMENDRAG

Etter den første dosen, blir dosering av aminoglykosider styrt av hyppige målinger av serumkonsentrasjonen. Målingene blir gjort ved hjelp av en immunoassay basert metode. Denne metoden krever relativt store prøvevolum, og målingene kan påvirkes av samtidig behandling med TPN.

Målsetningen var å utvikle en LC- MS/MS basert metode for å kvantifisere tobramycin og gentamicin i små prøvevolum.

Det er utviklet en LC-MS/MS basert metode for analyse av tobramycin og gentamicin i små prøvevolum (25 µl). Ulike UPLC kolonner (BEH C₁₈-kolonne, Symmetri shield, BEH HILIC, Aminopropyl Luna, ZIC- HILIC og HSS T3 kolonne) ble testet. Ut fra disse forsøkene ble det videre arbeidet utført med HSS T3 kolonnen. Denne kolonnen ga god separasjon og symmetriske topper av analytter og internstandard, både når de ble analysert som rene forbindelser og etter ekstraksjon fra serum. Begge analyttene lot seg lett kvantifisere i det aktuelle konsentrasjonsområdet (0,8 µM- 40,9 µM).

Vi har sammenlignet analysesvar fra pasientprøver som var analysert ved hjelp av immunoassay metoden med svarene fra LC-MS/MS metoden. Disse prøvene samsvarte ikke, LC-MS/MS metoden ligger både lavere og høyere i konsentrasjon enn immunoassay metoden. Dette er vanskelig å forklare, men en mulig årsak kan være at det ikke er brukt gentamicinsulfat med kjente mengdeforhold av de ulike forbindelsene (C₁, C₂, C_{2a} og C_{1a}).

Validering av metoden viste at den ikke tilfredsstillt krav til linearitet ($R^2 \geq 0,99$) og relativt standardavvik ($RSD \leq \pm 15 \%$). Metoden danner likevel et godt utgangspunkt for videre arbeid med å etablere et alternativ til den immunoassay baserte metoden.

INNHALDSFORTEGNELSE

| | |
|---|-----------|
| FORORD | 2 |
| FORKORTELSER | 3 |
| SAMMENDRAG | 4 |
| INNHALDSFORTEGNELSE | 5 |
| 1. INTRODUKSJON | 7 |
| 1.1. Bakgrunn | 7 |
| 1.1.1. Problemstilling - klinikk | 7 |
| 1.1.2. Gentamicin og tobramycin | 8 |
| 1.1.3. Analytisk | 8 |
| 1.2. Formålet med oppgaven | 8 |
| 2. TEORI | 9 |
| 2.1. Aminoglykosider..... | 9 |
| 2.1.1. Tobramycin | 9 |
| 2.1.2. Gentamicin | 9 |
| 2.2. Internstandard | 10 |
| 2.3. Prøveopparbeidelse | 10 |
| 2.3.1. Væske-væske ekstraksjon..... | 11 |
| 2.4. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) | 11 |
| 2.5. Massespektrometri (MS)..... | 12 |
| 2.5.1. Generelt..... | 12 |
| 2.5.2. Ionekilder..... | 12 |
| 2.5.2.1. ESI..... | 13 |
| 2.5.2.2. APCI | 14 |
| 2.5.2.3. APPI | 15 |
| 2.5.3. Masseanalysator..... | 16 |
| 2.5.4. Deteksjon..... | 16 |
| 2.5.5. MS/MS | 17 |
| 2.5.5.1. Produksjon skann | 18 |
| 2.5.5.2. MRM | 18 |
| 3. MATERIALE OG METODE | 19 |
| 3.1. Materiale | 19 |
| 3.1.1. Utgangsforbindelser | 19 |
| 3.1.2. Kjemikalier | 19 |
| 3.1.3. Serum | 19 |
| 3.1.4. Vann..... | 19 |
| 3.2. Utstyr..... | 20 |
| 3.2.1. Pipetter..... | 20 |
| 3.2.2. Analyseverktøy | 20 |
| 3.2.3. Analytiske kolonner..... | 20 |
| 3.2.4. Utstyr til prøveopparbeidelse..... | 20 |
| 3.3. Utvikling av metode | 21 |
| 3.4. Massespektrometri | 21 |
| 3.4.1. Ionekilde | 21 |
| 3.4.2. Cone Voltage (CV)..... | 21 |
| 3.4.3. Kollisjonsenergi (CE) | 21 |
| 3.4.4. MRM | 22 |
| 3.5. Tillaging og fortynning..... | 23 |
| 3.6. Separasjon på HSS T3 kolonnen | 23 |
| 3.7. Væske-væske ekstraksjon fra serum..... | 24 |
| 3.8. Felling av proteiner fra serum | 25 |
| 3.8.1. Pasientprøver | 26 |

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.9. | Ultra performance liquid chromatography (UPLC) | 27 |
| 3.9.1. | Testing av ulike kolonner..... | 27 |
| 3.10. | LC-MS-MS | 28 |
| 3.11. | Validering av metoden | 28 |
| 3.11.1. | Linearitet | 28 |
| 3.11.2. | Nøyaktighet | 28 |
| 3.11.3. | Presisjon | 29 |
| 3.11.4. | Repeterbarhet | 29 |
| 3.11.5. | Deteksjonsgrense (LOD) og Kvantifiseringsgrense (LOQ)..... | 29 |
| 4. | RESULTATER..... | 30 |
| 4.1. | Væske- væske ekstraksjon fra serum | 30 |
| 4.2. | Felling av proteiner fra serum | 30 |
| 4.3. | Utvikling av væskekromatografi metoden | 30 |
| 4.4. | Pasientprøver | 30 |
| 4.5. | Kontrollprøver | 31 |
| 4.6. | Ultra performance liquid chromatography (UPLC) | 32 |
| 4.6.1. | Testing av ulike kolonner..... | 32 |
| 4.7. | Massespektrometri | 32 |
| 4.7.1. | Kollisjons energi (CE) | 32 |
| 4.7.2. | Internstandard..... | 32 |
| 4.7.3. | Ionekilde | 32 |
| 4.7.4. | MS og MS- MS av tobramycin og gentamicin | 34 |
| 4.7.4.1. | Produktionskann | 34 |
| 4.7.5. | Kromatografi av tobramycin og gentamicin i serum | 35 |
| 4.7.5.1. | Pasientprøve | 35 |
| 4.7.5.2. | Kontrollprøve | 36 |
| 4.7.5.3. | Standarder | 37 |
| 4.8. | Validering | 38 |
| 4.8.1. | Linearitet | 38 |
| 4.8.1.1. | Standardkurver | 38 |
| 4.8.2. | Nøyaktighet | 40 |
| 4.8.3. | Presisjon | 42 |
| 4.8.4. | Repeterbarhet | 43 |
| 4.8.5. | Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) | 44 |
| 5. | DISKUSJON..... | 45 |
| 5.1. | Væske-væske ekstraksjon fra serum | 45 |
| 5.2. | Felling av proteiner fra serum | 45 |
| 5.3. | Pasientprøver | 46 |
| 5.3.1. | Gentamicin blandingen | 46 |
| 5.4. | Ultra performance liquid chromatography (UPLC) | 47 |
| 5.4.1. | Testing av ulike kolonner..... | 47 |
| 5.5. | Massespektrometri | 48 |
| 5.5.1. | Ionekilde | 48 |
| 5.5.2. | Internstandard..... | 48 |
| 5.6. | Validering | 48 |
| 5.7. | Feilkilder | 49 |
| 5.8. | Fortsettelse av prosjektet | 49 |
| 6. | KONKLUSJON | 50 |
| 7. | REFERANSER | 51 |
| 8. | APPENDIKS..... | 53 |
| 8.1. | Appendiks A..... | 53 |
| 8.1.1. | Standardkurver..... | 55 |
| 8.1.2. | Tabell standardkurvene..... | 57 |

1. INTRODUKSJON

Aminoglykosidene tobramycin og gentamicin er hyppig brukt mot en rekke alvorlige infeksjoner. Begge forbindelsene kan være nyre og øretoksiske dersom maksimumskonsentrasjonen i blodet er for høy, eller dersom konsentrasjonen ikke kommer lavt nok før neste dose. Skadene kan i verste fall være irreversible. Det er derfor viktig å måle serumkonsentrasjonen ved jevne mellomrom, slik at pasienten ikke risikerer nyre eller øreskade. Standard metode for å måle serumkonsentrasjon av aminoglykosider er per i dag immunoassay basert [1].

1.1. Bakgrunn

1.1.1. Problemstilling - klinikk

Noen pasienter som får et aminoglykosid blir ernærte med total parenteral ernæring (TPN), som er en blanding av elektrolytter, aminosyrer og fettemulsjon. Det er kjent at samtidig ernæring med fettemulsjon kan påvirke immunoassay metoder for serumkonsentrasjonsmålinger av andre legemidler, men det er ikke kjent om dette også gjelder for måling av aminoglykosider. Siden det er usikkerhet om fettemulsjonen påvirker serumkonsentrasjonsmålingene av aminoglykosider, er det anbefalt å stoppe infusjonen av TPN minst fire timer før man tar blodprøve av pasienten. Denne anbefalingen er valgt ut i fra et "føre var prinsipp" [1].

En stopp i infusjonen før hver blodprøve skaper praktiske vanskeligheter dersom pasienten får mange legemidler intravenøst, og det kan føre til at klinikere velger å behandle med andre legemidler enn aminoglykosider eller at de ignorerer anbefalingen om å stoppe TPN infusjonen før hver blodprøve. Dette kan skape usikkerhet om hvordan man skal tolke resultatet av målingen, dersom fettemulsjonen påvirker konsentrasjonsmålingen av aminoglykosidet [1].

Til den immunoassay baserte metoden trengs det et prøvevolum på 200-500 µl serum, noe som kan være problematisk når pasienten er et prematurt barn [2-4].

1.1.2. Gentamicin og tobramycin

Gentamicin er en blanding av fem ulike forbindelser. Det er størst mengde av forbindelsene C₁, C_{1a}, C₂ og C_{2a} [5]. Strukturformel av gentamicin forbindelsene (C₁, C_{1a} og C₂) er vist i figur 2. Mengdeforholdene mellom de ulike gentamicinforbindelsene kan variere mellom ulike produksjonsbatcher [5-7].

Gentamicin er hyppigere brukt enn tobramycin, da tobramycin nesten utelukkende blir brukt i kombinasjonsbehandling mot en gramnegativ tarmbakterie (*Pseudomonas aeruginosa*) [1].

1.1.3. Analytisk

I litteraturen er det beskrevet analyse av tobramycin og gentamicin ved hjelp av mikrobiologiske assays, immunoassays og diverse HPLC baserte metoder [8, 9].

Mikrobiologiske assay har lenge vært brukt for å måle konsentrasjoner av antibiotika i kroppsvæske og vev. Tiden det tar fra man sår mediet til man får svar, ved bruk av tradisjonelle mikrobiologiske assay, er 18-24 timer. Det er vanskelig å måle aminoglykosider hos pasienter som får andre antibiotika i tillegg til aminoglykosider; forstyrrelse fra andre antimikrobielle midler kan gjøre resultatene ugyldige. Dette er et generelt problem med metoden og er en grunn til at den ikke brukes så ofte lenger [10].

I de siste årene har det vært en klar tendens til at immunoassay baserte medikamentanalyser erstattes med kromatografibaserte analysemetoder. Utviklingen av moderne massespektrometri (MS) har akselerert denne utviklingen på grunn av MS sin evne til selektivt å detektere små mengder av organiske forbindelser. I en rekke artikler er det beskrevet LC-MS/MS baserte analyser av tobramycin og gentamicin i ulike biologiske prøver [7, 8, 11-14]. En ulempe med LC-MS/MS metoder er at de kan kreve tidkrevende og kostbar prøveoppbehandling før endelig kvantitativ analyse. Dette er ugunstig når en analyse skal innføres som rutine i et klinisk farmakologisk laboratorium.

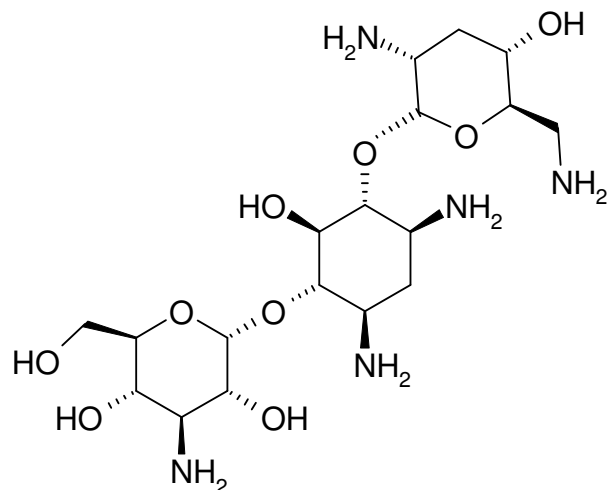
1.2. Formålet med oppgaven

Formålet med oppgaven var å utvikle en LC-MS/MS metode for kvantitativ analyse av gentamicin og tobramycin i blod ved bruk av små mengder prøvemateriale.

2. TEORI

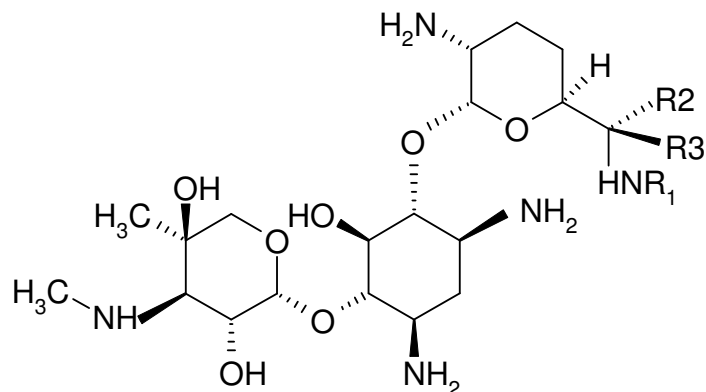
2.1. Aminoglykosider

2.1.1. Tobramycin



Figur 1. Strukturen av tobramycin, (Mw= 467, 26 g/mol).

2.1.2. Gentamicin



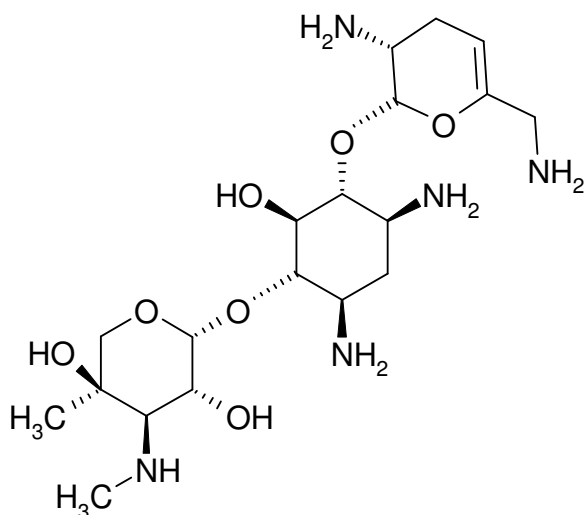
| Gentamicin | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Mw (g/mol) |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| C ₁ | CH ₃ | H | CH ₃ | 477,60 |
| C _{1a} | H | H | H | 449,54 |
| C ₂ | H | H | CH ₃ | 463,57 |
| C _{2a} | H | CH ₃ | H | 463,57 |
| C _{2b} | CH ₃ | H | H | 463,57 |

Figur 2. Strukturen og molekylvekt til de ulike typene av gentamicin.

2.2. Internstandard

Internstandard (IS) er en forbindelse som tilsettes prøven i en kjent konsentrasjon så tidlig som mulig i den analytiske prosedyren [15]. Dette gjøres for å unngå systematiske feil og for å få størst mulig presisjon av kvantitative analyser.

I flere artikler er det beskrevet bruk av sisomicin som IS ved analyse av gentamicin og tobramycin [8, 12, 16]. Sisomicin ligner på strukturen til tobramycin og gentamicin, og oppfyller også de andre krav som stilles til en IS. Sisomicin ble derfor også her brukt som IS.



Figur 3. Strukturen til sisomicin, (Mw= 447, 27 g/mol).

2.3. Prøveopparbeidelse

Proteiner i serum må fjernes før analyse av legemidlene kan utføres på LC-MS/MS, siden proteiner kan felle ut i kolonnen og forandre dens egenskaper. Proteiner kan også forstyrre deteksjon av analytter i selve MS- instrumentet. Før analyse må derfor analyttene separeres fra proteiner i serum [15]. Det er prøvd to ulike strategier for dette. Det er forsøkt å isolere analyttene ved hjelp av væske- væske ekstraksjon, dvs. å få analyttene over i et organisk løsningsmiddel. Det er gjort forsøk med ulike organiske løsningsmidler. Den andre strategien som er testet er å felle proteiner fra serum og deretter injisere direkte på LC-MS/MS systemet.

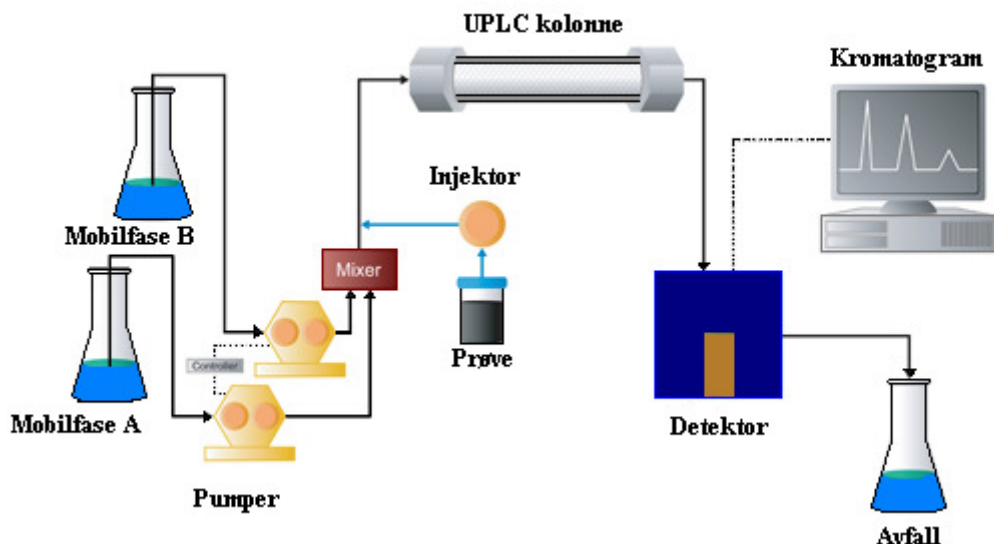
2.3.1. Væske–væske ekstraksjon

Det brukes to væsker i en væske–væske ekstraksjon, en vandig løsning og et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann [15]. I terapeutisk monitorering av legemidler representerer serum den vandige fasen.

2.4. Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

I væskerkromatografi separeres forbindelsene ved at mobilfase pumpes med konstant hastighet gjennom kolonnen. Analytten må løses i en væske som er blandbar med mobilfasen. En injektor injiserer løsningen direkte inn i mobilfasen før kolonnen, dette skjer under høyt trykk, se figur 4. Ved bruk av gradienteluering økes mobilfasestyrken gjennom analysen, mens mobilfasen har samme sammensetning gjennom hele analysen ved bruk av isokratisk eluering. Detektorene gir en elektrisk respons for forbindelsene, denne responsen bearbejdes av datamaskiner og viser det i form av kromatogram [15].

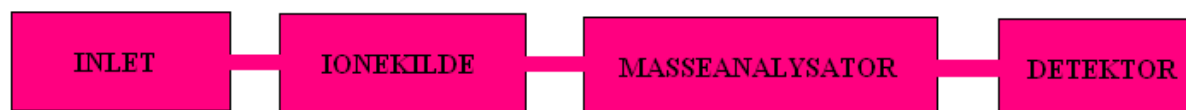
I dette arbeidet ble det brukt en UPLC, hovedforskjellen på UPLC og HPLC er at partiklene i UPLC kolonnen er mindre. UPLC kolonner gir bedre sensitivitet og separasjon, sammenliknet med standard HPLC teknikk [17]. Med UPLC oppnås tilfredsstillende separasjon på kortere tid enn ved bruk av HPLC kolonner.



Figur 4. Oversikt over UPLC mobilfase gradient system. Figuren er en modifisert fra [18].

2.5. Massespektrometri (MS)

2.5.1. Generelt



Figur 5. Skjematisk fremstilling av et massespektrometer. Figuren er modifisert fra [19].

Et massespektrometer består av fire hoveddeler, se figur 5.

Inlet brukes til å føre prøven inn i selve MS-instrumentet. Eksempler på inlet er GC og UPLC. Prøven kan også introduseres ved hjelp av en sprøyte. I ionekilden omdannes de nøytrale molekylene til ioner, og en får produsert molekylioner som er de intakte analyttene i ionisk form. Molekylionene kan fragmentere videre til ioner med lavere masser. Dette kan skje i større eller mindre grad, avhengig av betingelser i ionekilden. Ved hjelp av elektriske felt styres ionene ut av ionekilden og inn i masseanalysatoren der de blir separert etter forholdet masse over ladning (m/z).

2.5.2. Ionekilder

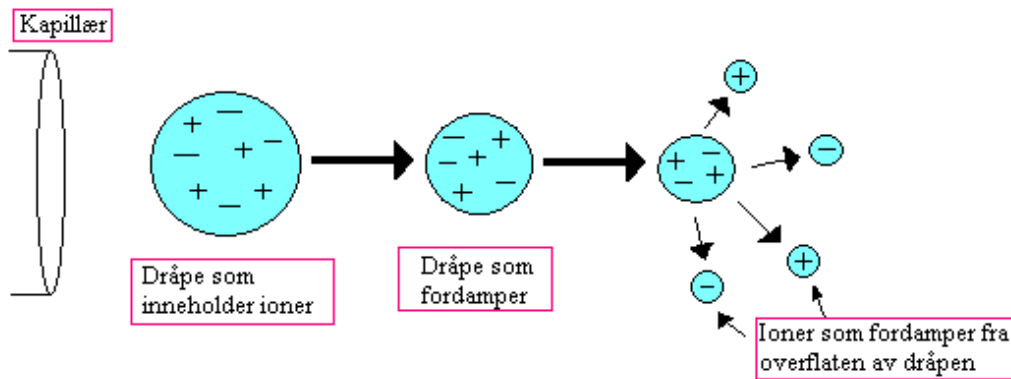
Det eksisterer en rekke ulike ionekilder som kan anvendes i kombinasjon med LC-MS/MS. Tre av disse er ESI, APCI og APPI. Ulike substanser vil gi optimal respons i ulike ionekilder. Men med en gitt substans kan det noen ganger være vanskelig å vite på forhånd hvilken ioniseringsteknikk som vil være best egnet for den aktuelle forbindelsen [19].

2.5.2.1. ESI

Elektrosprayionisering er en atmosfæretrykk ioniseringsteknikk, og som ved alle andre atmosfæretrykk ioniseringsteknikkene skjer dannelse av ioner utenfor vakuumsystemet av massespektrometret. Elektrospray er en prosess hvor mobilfasen med analytt fordampes og sendes ut av en dråpe og inn i en gassfase.

Mobilfasen med analytt kommer fra væskrokromatografen til ionekilden gjennom et stålkapillær. Mobilfasen som brukes, varierer ut fra hva som passer best til prøven under analyse. Det er en spenning på enden av kapillæret. Som en konsekvens av dette sterke elektriske feltet, blir prøveløsningen omdannet til aerosol med ladete dråper. Denne elektrospray prosessen er hjulpet av en inert gass (nitrogen) som også strømmer nedover staven rundt utsiden av kapillæret. De ladede dråpene blir mindre i størrelse på grunn av fordamping forårsaket av en strøm av varm nitrogen gass, også kjent som tørregass, som passerer på fremsiden av kilden. Til slutt blir ladete ioner fra prøven løst fra dråpene. Noen av disse ionene går inn i masse analysatoren hvor deres m/z - forhold måles [20].

ESI kan operere ved å se etter positive ioner (ESI^+) eller negative ioner (ESI^-).

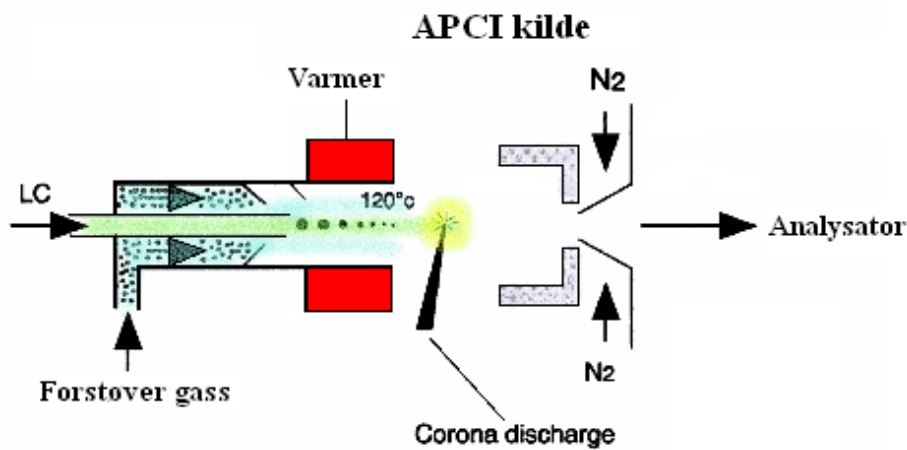


Figur 6. Skisse av ESI prosessen. Figuren er modifisert fra figur 2.2 [20].

2.5.2.2. APCI

Kilden i APCI er en modifisert elektrospraykilde. Selve veien inn i masse spektrometret er den samme som for ESI, men det er ingen spenning på kapillæret.

Kombinasjonen av forstøvergass og varme omdanner løsningen til en aerosol, som fordamper raskt. På innsiden av den varmede kilden er det en korona nål, pålagt høyspenning, og det er denne som fører til ionisering av molekyler i løsningen. I plasmaregionen rundt korona nålen danner en kombinasjon av kollisjons og ladnings reaksjoner en kjemisk ionisering. Molekyler i en prøve som passerer gjennom denne regionen av løsemiddelioner kan bli ionisert av en overføring av et proton for å danne $(M+H)^+$ eller $(M-H)^-$ ioner [20]. Protonerte analyttioner dannes ved at de reagerer med ladde gassfaseioner som kommer fra mobilfasen.

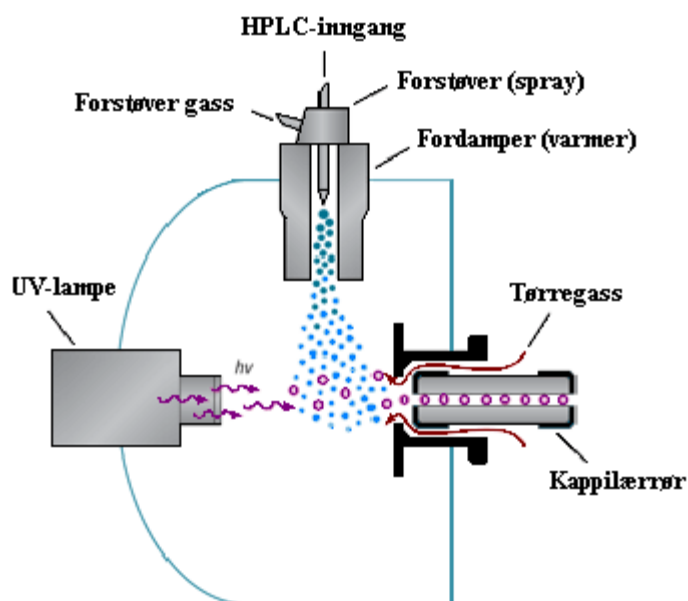


Figur 7. Skisse av APCI. Figuren er modifisert fra [21].

2.5.2.3. APPI

I APPI ioniseres gassfasemolekyler ved å bruke fotoner. På samme måte som ved ESI og APCI fordampes prøven av en forstøver. Analytten interagerer med fotoner som er sendt ut av en UV-lampe [22, 23]. Fotonene induserer en serie reaksjoner som fører til at prøvemolekylene blir ionisert [22].

En standard UV-lampe har tilstrekkelig høy fotonenergi (10,6 eV), som kreves for å ionisere mesteparten av organiske molekyler, uten å ionisere mobilfasemolekyler [23].

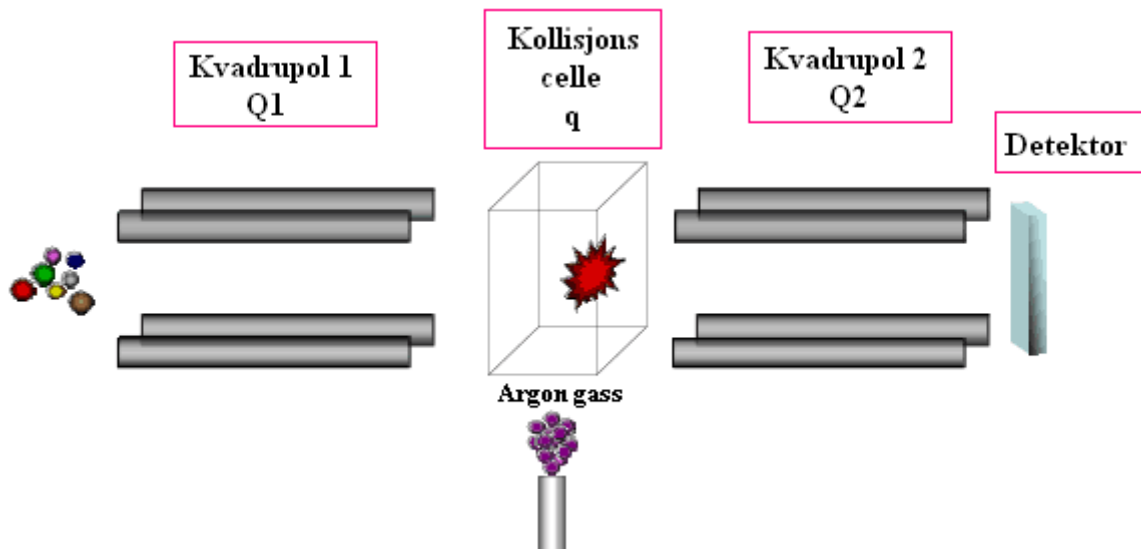


Figur 8. Skisse av APPI. Ioniseringen av molekyler skjer ved hjelp av UV-lampen. Figuren er en modifisert modell fra [24].

2.5.3. Masseanalysator

En stor del av massespektrometrene som er brukt i dag er konstruert etter kvadrupolprinsippet [15]. Kvadrupol analysatoren består av 4 parallelle metallstenger. Et positivt ion som kommer inn mellom metallstengene vil bli dratt mot en negativt ladd metallstang. Ladning skifter med en gitt frekvens og dermed vil ionet forandre retning [25].

I spektrometre med trippel kvadrupol virker den første kvadrupolen (Q1) som et massefilter. Den sender og akselererer et valgt ion videre mot kollisjonscellen (q). Trykket i kollisjonscellen er høyere og ioner kolliderer med en inert gass, for eksempel argon, noe som resulterer i fragmentering av kollisjonsindusert oppløsning. Fragmentene akselererer så inn i kvadrupol 2 (Q2), et annet skannende massefilter, som separerer dem før de går inn til detektoren [25].



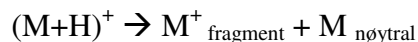
Figur 9. Skisse av en trippel kvadrupol. Figuren er en modifisert fra [26].

2.5.4. Deteksjon

Etter hvert som ioner passerer masseanalysatoren, detekteres de av en detektor som registrerer mengden ioner [15, 22]. Dataene presenteres som regel i et plott av relativ intensitet mot masse over ladning (m/z) [15].

2.5.5. MS/MS

I de mest vanlige tandem masse spektrometer- eksperimenter er den første analysatoren brukt til å isolere et forløperion (foreldreion), som spontant eller som følge av aktivering gjennomgår fragmentering for å danne produksjoner og nøytrale fragmenter [22].

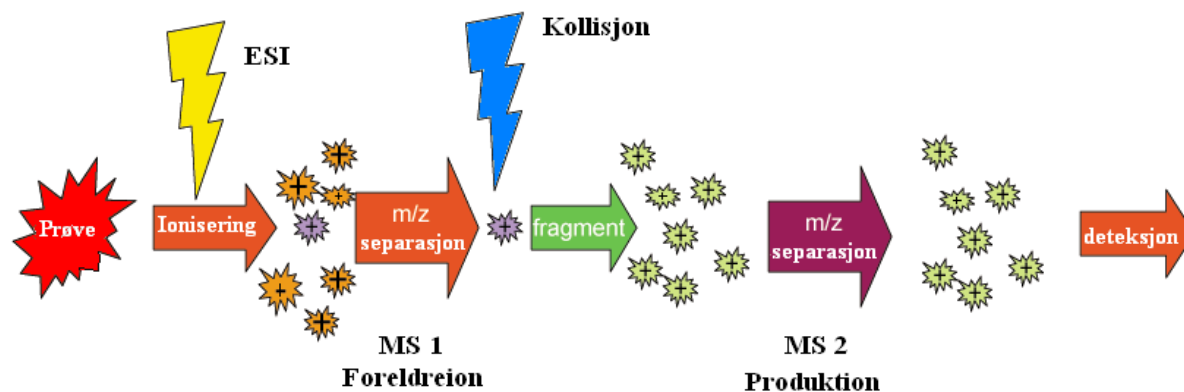


Alle ionene som dannes i kollisjonscellen går videre mot kvadrupol 2. Denne kan operere enten i skann mode eller låst på en eller flere definerte masser.

Tabell 1. Tabellen viser en oversikt over ulike typer skann som kan utføres avhengig av hvilke kvadrupol (Q) som er låst eller i skann.

| Q1 | Q2 | Skann |
|-------|-------|--------------|
| Låst | Skann | Produksjon |
| Skann | Låst | Foreldreion |
| Låst | Låst | MRM |
| Skann | Skann | Nøytralt tap |

I dette arbeidet er det blitt brukt produksjonskann og MRM. De andre to blir ikke nevnt mer, siden de ikke er blitt brukt i dette arbeidet.



Figur 10. En skisse av MS/MS. Figuren er modifisert fra [27].

2.5.5.1. Produktion skann

Den første formen for skanning består i å velge et ion med et valgt m/z forhold med det første spektrometret (Q1). Inne i kollisjonscella kolliderer dette ionet, reagerer og fragmenterer. Av et andre spektrometer (Q2) analyseres reaksjons produkter. Dette kalles et produktion skann [22]. I kombinasjonen LC-MS/MS med ESI, vil en som oftest velge $(M+H)^+$ som foreldreion.

2.5.5.2. MRM

MRM brukes til kvantitative analyser. Sammenliknet med SIR (single ion recording) vil MRM gi mindre interferens og i de fleste tilfeller også gjøre det mulig å detektere/kvantifisere mindre mengder av analytten [19].

3. MATERIALE OG METODE

3.1. Materiale

3.1.1. Utgangsforbindelser

| | | |
|--------------------|-------------------|--------------------------|
| Rene forbindelser: | Tobramycin sulfat | Sigma- Aldrich, Tyskland |
| | Gentamicin sulfat | Sigma- Aldrich, Tyskland |
| | Sisomicin sulfat | Sigma- Aldrich, Tyskland |

3.1.2. Kjemikalier

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Acetonitril | Merck, Tyskland |
| Ammoniakk-løsning | Merck, Tyskland |
| Ammoniumacetat | Merck, Tyskland |
| Cyclohexan | Merck, Tyskland |
| Dietyleter | Merck, Tyskland |
| Diklormetan | Merck, Tyskland |
| Etylacetat | Merck, Tyskland |
| Hexan | Merck, Tyskland |
| Isoamylalkohol | Merck, Tyskland |
| Karbonatbuffer (NaHCO ₃) | Merck, Tyskland |
| Maursyre | Sigma- Aldrich, Tyskland |
| Metanol | Merck, Tyskland |
| NaOH | Flucka, Tyskland |
| <i>n</i> -klorbutan | Flucka, Tyskland |
| TCA | Flucka, Tyskland |
| Tert-butylmetyleter (TBME) | Merck, Tyskland |
| Toluen | Merck, Tyskland |
| ZnSO ₄ | Merck, Tyskland |

3.1.3. Serum

Medikamentfritt serum som er benyttet i metodeutviklingen ble levert av blodbanken på Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN) HF, Tromsø.

3.1.4. Vann

Alt vann som er brukt i metodeutviklingen er Milli-Q vann. (Milli-Q rensesystem, Millipore, USA).

3.2. Utstyr

3.2.1. Pipetter

| | | |
|--------------|---------------------|----------|
| 1 - 10µl | Eppendorf Reference | Tyskland |
| 10 - 100µl | Eppendorf Research | Tyskland |
| 100 - 1000µl | Eppendorf Research | Tyskland |

3.2.2. Analyseverktøy

| | |
|---|-----------------------------|
| Acquity UPLC (Væskekromatograf) | Waters, Milford, USA |
| Quattro Premier XE Tandem massespektrometer | Waters, Manchester England. |

3.2.3. Analytiske kolonner

| | |
|--|------------------|
| Acquity UPLC BEH C ₁₈ - kolonne, 1,7 µm, 2, 1*100 mm | Waters, USA |
| Acquity UPLC BEH Symmetry shield C18, 1,7 µm, 2, 1*50 mm | Waters, USA |
| Acquity UPLC BEH HILIC, 1,7 µm, 2, 1* 100 mm | Waters, USA |
| Aminopropyl Luna kolonne, 5U NH ₂ , 5 µm, 150* 2,0 mm | Phenomenex, USA |
| ZIC- HILIC kolonne, 50* 2,1 mm, 3.5 µm | SeQuant, Sverige |
| ZIC- HILIC forkolonne, 20* 2,1 mm, 5 µm | SeQuant, Sverige |
| Acquity UPLC HSS T3 kolonne, 1,8 µm 2, 1*100 mm | Waters, USA |

3.2.4. Utstyr til prøveopparbeidelse

| | | |
|---------------|--------------------------|----------|
| Sentrifuge | Heraeus sepatech Biofuge | Tyskland |
| Vortex mikser | Heidolph REAX | Tyskland |
| Vekt | Mettler MT5 | Sveits |

3.3. Utvikling av metode

Gentamicin sulfat inneholder 4 ulike forbindelser, C_1 , C_{1a} , C_2 og C_{2a} , men mengdeforholdet mellom disse var ikke oppgitt. Det ble derfor tatt utgangspunkt i en sammensetning funnet i en artikkel [7]. I følge denne er mengdeforholdet C_1 : 41,2 %, C_{1a} : 9,4 %, $C_2 + C_{2a}$: (39,3 + 10,1) = 49,4 %. Det kan tenkes at det også forekommer små mengder av forbindelsen C_{2b} .

3.4. Massespektrometri

3.4.1. Ionekilde

Under utvikling av denne metoden, ble det testet tre ulike ioniseringsteknikker. De teknikkene som ble testet var APPI, APCI og ESI. ESI⁺ ble valgt for det videre arbeidet.

Det ble gjort innledende forsøk med bruk av APPI og APCI ionisering for å vurdere om disse ville være godt egnet til analyse av tobramycin og gentamicin. Begge ionekildene ble testet med rene forbindelser løst i mobilfase. APCI-ionisering ble i tillegg testet ved å analysere serumprøver tilsatt gentamicin og tobramycin. Resultatene viste at APCI og APPI var lite egnet til analyse av disse forbindelsene. I alt videre arbeid ble det brukt ESI.

3.4.2. Cone Voltage (CV)

For de ulike fragmentene ble cone voltage (CV) testet for å finne CV-verdi for optimal produksjon av $(M+H)^+$. Ved for lav/høy CV ble intensiteten av signalet lavt eller helt borte. Den CV som ga mest intensitet ble valgt.

3.4.3. Kollisjonsenergi (CE)

For de ulike $(M+H)^+$ ioner ble kollisjonsenergi (eV) testet for å finne optimal produksjon av produksjon egnet for kvantitativ analyse. En optimal CE-verdi gjør at alle $(M+H)^+$ ioner omdannes til et fåtall intense produksjon med høyest mulig masse.

3.4.4. MRM

De optimale kollisjonsenergiene ble brukt videre, og det ble valgt to produksjoner for hvert fragment av tobramycin og gentamicin. De produksjonene med høyest intensitet ble valgt og brukt til å lage MRM metode. Den optimale cone voltage som var funnet ble også brukt i MRM metoden.

Tabell 2. En oversikt over ulike typer mobilfaser og kolonner som er testet i metodeutviklingen.

| Mobilfaser | Kolonner | Resultat |
|--|--|----------------|
| 60 % MeOH:H₂O+ maursyre | HSS T3 kolonne | + ¹ |
| 70 % MeOH: H₂O + (4 mM) ammoniumacetat | HSS T3 kolonne | + ¹ |
| 40:60 MeOH: H₂O + 0,02 % maursyre | BEH C ₁₈ -kolonne | – |
| A: H₂O + 0,1 % maursyre | BEH HILIC | + ³ |
| B: ACN + 0,1 % maursyre | HSS T3 kolonne | + ⁴ |
| 50:50 H₂O: ACN | Aminopropyl Luna kolonne | + ³ |
| 65 % ACN + 2mM ammoniumacetat+ 0,04 % maursyre | Aminopropyl Luna kolonne | – |
| 60:40 ACN: H₂O | Aminopropyl Luna kolonne | – |
| 80:20 ACN: H₂O+ 5 mM ammoniumacetat | ZIC- HILIC kolonne | – |
| 60:40 ACN: H₂O+ 5 mM ammoniumacetat + 0,05 % maursyre | BEH C ₁₈ -kolonne ZIC- HILIC kolonne | – – |
| 40:60 MeOH: H₂O +maursyre | BEH C ₁₈ -kolonne | + ² |
| A: 5 % ACN + 95 % H₂O + 0,2 % maursyre + 2 mM ammoniumacetat | ZIC- HILIC kolonne | – |
| B: 95 % ACN +5 % H₂O + 0,2 % maursyre + 2 mM ammoniumacetat | BEH HILIC- kolonne | + ³ |
| A: Ammoniakk-løsning 10 mM : H₂O + NaOH pH 10,9 B: ACN | Symmetri Shield kolonne | + ² |
| A: 5 % ACN + 95 % H₂O + 2 mM ammoniumacetat + 350 µl eddiksyre | BEH HILIC | – |
| B: 95 % ACN + 5 % H₂O + 2 mM ammoniumacetat + 350 µl eddiksyre | | |

– Ikke egnet

¹ Denne mobilfasesammensetningen og kolonnen ble bare testet med rene forbindelser.

² Denne mobilfasesammensetningen og kolonnen ga resultater ved analyse av rene forbindelser, men ikke ved bruk av serumprøver/ felling med TCA.

³ Disse resultatene så lovende ut, men etter videre testing viste det seg at de ikke var egnet.

⁴ Godt egnet for rene forbindelser og analyse av ekstrakt av serum, ble derfor valgt i det videre arbeid

3.5. Tillaging og fortynning

Stamløsning av legemidlene og internstandarden ble lagd i en blanding av vann: metanol (3:1 (v/v)) og oppbevart i brune glass.

Tabell 3. Konsentrasjoner av stamløsningene som ble lagd.

| | Innveid (mg) | Molekylvekt (g/mol) | MeOH+ Vann (L) | Renhet (%) | Konsentrasjon (μM) |
|--------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|--|
| Tobramycin | 5,528 | 467,52 | 0,004 | 98 % | 2897 |
| Gentamicin* | 2,339 | 477,59 | 0,004 | 98,1 % | 1201 |
| Sisomicin | 5,692 | 1385 | 0,004 | 80 % | 822 |

* Gentamicin total, det ble tatt utgangspunkt i molekylvekten til gentamicin C₁.

Det ble lagd en kombinert bruksløsning av tobramycin (100 μ M) og gentamicin (160 μ M), i medikamentfritt serum. Til 1764,5 μ l medikamentfritt serum ble det tilsatt 166,5 μ l fra gentamicin stamløsningen og 69 μ l fra tobramycin stamløsningen.

Bruksløsningen ble brukt til å lage en standardrekke. Tidlig i arbeidet hadde standardrekken følgende tobramycin/ gentamicin konsentrasjoner: 24/38,4 μ M, 12/19,2 μ M, 6/9,6 μ M, 3/4,8 μ M, 1,5/2,4 μ M, 0,75/1,2 μ M. Senere ble bruksløsningen brukt til å lage standardrekke med disse tobramycin/gentamicin konsentrasjonene; 25,6/40,9 μ M - 12,8/20,5 μ M - 6,4/10,2 μ M - 3,2/5,1 μ M - 1,6/2,6 μ M - 0,8/1,3 μ M.

3.6. Separasjon på HSS T3 kolonnen

Ulike mobilfaser og gradientsammensetninger ble testet. Den mobilfasesammensetningen som ble brukt i dette arbeidet er vist i tabell 4. Mobilfasene var A: H₂O + 0,1 % maursyre, B: ACN + 0,1 % maursyre.

Tabell 4. Mobilfasegradient ved bruk av HSS T3 kolonne.

| Min. | ml/min | % A | % B |
|----------------|---------------|------------|------------|
| Initial | 0,2 | 99,9 | 0,1 |
| 2,1 | 0,2 | 99,9 | 0,1 |
| 2,2 | 0,2 | 20,0 | 80,0 |
| 2,8 | 0,4 | 20,0 | 80,0 |
| 2,9 | 0,4 | 99,9 | 0,1 |
| 4,3 | 0,4 | 99,9 | 0,1 |

3.7. Væske-væske ekstraksjon fra serum

I rutinen for analyse av legemidler ved medisinsk laboratorieavdeling, seksjon 5 anvendes ulike organiske løsemidler til å ekstrahere ulike legemidler fra serum. De ulike løsemidlene ble testet på serumprøver av tobramycin og gentamicin, se tabell 5.

Tabell 5. Ulike organiske løsemidler som ble testet for ekstraksjon av legemidler fra serum. Alle rørene inneholdt 100 µl av tobramycin/gentamicin i serum (10/16µM), det ble tilsatt 50 µl karbonatbuffer (NaHCO₃) og deretter organisk løsemiddel

| Reagensrør | Organisk løsemiddel 1000 µl av: |
|------------|------------------------------------|
| 1 | Diklormetan |
| 2 | Diklormetan: MeOH (9:1) |
| 3 | Hexan: etylacetat 70:30 |
| 4 | Etylacetat |
| 5 | N-klorbutan: etylacetat |
| 6 | TBME (tert-butylmetyleter) |
| 7 | TBME-n-klorbutan (9:1) |
| 8 | Cyclohexan |
| 9 | Hexan: Etylacetat (1:1) |
| 10 | Toluen:Isoamylalkohol (8:2) |
| 11 | Hexan: dietyleter (50:50) |
| 12 | n-klorbutan |

Etter tilsetning av karbonatbuffer (pH 11,4), og de organiske løsemidlene til serumprøver ble de blandet på vortex mikser i ca. 10 sek. Deretter ble de sentrifugert og 800 µl av den organiske fasen ble overført til nye reagensrør. Disse rørene ble satt til avdamping ved 40 °C til det ikke var mer væske igjen. Prøven ble deretter løst i 120 µl mobilfase (H₂O og 0,1 % maursyre), og 100 µl ble overført til vialer og analysert på LC-MS.

3.8. Felling av proteiner fra serum

Det ble testet ulike fellingsreagenser for å felle ut proteiner fra serum.

Tabell 6. Tabellen viser eksempler på ulike fellingsreagenser som ble testet for proteinfelling fra serum i dette arbeidet.

| Tobramycin/ gentamicin i serum | IS | Fellingsreagens: | Fellingsreagens: |
|--------------------------------|-------|--------------------------------|------------------|
| 100 µl | 50 µl | 50 µl 10 % TCA | – |
| 100 µl | 50 µl | 20 µl 30 % TCA | – |
| 100 µl | 50 µl | 300 µl 10 % TCA | – |
| 50 µl | 50 µl | 8 µl 30 % TCA | – |
| 50 µl | 50 µl | 5 µl 30 % TCA | – |
| 50 µl | 50 µl | 10 µl 30 % TCA | – |
| 50 µl | 25 µl | 10 µl 30 % TCA | – |
| 25 µl | 80 µl | 25 µl 10 % TCA | – |
| 100 µl | 50 µl | 50 µl 30 % TCA | 100 µl ACN |
| 50 µl | 25 µl | 10 µl 30 % TCA | 50 µl ACN |
| 50 µl | 25 µl | 10 µl 30 % TCA | 100 µl ACN |
| 50 µl | 25 µl | 10 µl 30 % TCA | 300 µl ACN |
| 50 µl | 25 µl | 5 µl 30 % TCA | 100 µl ACN |
| 50 µl | 25 µl | 5 µl 30 % TCA | 300 µl ACN |
| 100 µl | 50 µl | 500 µl ACN | – |
| 50 µl | 50 µl | 300 µl ACN | – |
| 50 µl | 25 µl | 100 µl ACN | – |
| 50 µl | 25 µl | 300 µl ACN | – |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl ZnSO ₄ (0,1M) | 100 µl ACN |
| 100 µl | 50 µl | 200 µl ZnSO ₄ 0,1 M | 500 µl ACN |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl ZnSO ₄ (0,1M) | 200 µl ACN |
| 100 µl | 50 µl | 200 µl ZnSO ₄ 0,1 M | 500 µl MeOH |
| 100 µl | 50 µl | 200 µl ZnSO ₄ 0,1 M | – |
| 100 µl | 50 µl | 300 µl MeOH | – |

Fellingsreagensene nevnt i tabellen er testet for proteinfelling fra serum i ulike konsentrasjoner av tobramycin/ gentamicin i serum og IS. Noen av prøvene ble fortynnet med mobilfase etter sentrifugering.

Fremgangsmåten for proteinfelling fra serum:

- Tilsetting av legemidlene, IS og fellingsreagens(er)
- Rist på vortex mikser i ca 5 sek
- Sett prøvene i fryser i 10 min (-74 °C)
- Sentrifuger prøvene i 5 min på 10000 g
- Overfør til vialer klar til analyse

Etter testing av direktefelling med ulike fellingsreagenser, ulike blandingsforhold av TCA og ulike fremgangsmåter, viste det seg 10 % TCA ga best resultater. Når det omtales proteinfelling videre i oppgaven, er det denne metoden det vises til.

3.8.1. Pasientprøver

Tabell 7. Oversikt over standardrekke og pasientprøver. Alle prøvene ble tilsatt 80 µl IS (5 µM) før 25 µl 10 % TCA.

| Eppendorfrør | 25 µl fra: |
|--------------|--|
| S1 | tobramycin/gentamicin i serum (25,6/40,9 µM) |
| S2 | tobramycin/gentamicin i serum (12,8/20,5 µM) |
| S3 | tobramycin/gentamicin i serum (6,4/10,2 µM) |
| S4 | tobramycin/gentamicin i serum (3,2/5,1 µM) |
| S5 | tobramycin/gentamicin i serum (1,6/2,6 µM) |
| S6 | tobramycin/gentamicin i serum (0,8/1,3 µM) |
| P1 | Pasientprøve 1 |
| P2 | Pasientprøve 2 |
| P3 | Pasientprøve 3 |
| P4 | Pasientprøve 4 |
| P5 | Pasientprøve 5 |
| P6 | Pasientprøve 6 |
| P7 | Pasientprøve 7 |

Fra serumprøven ble det overført 25 µl til eppendorfrør og tilsatt 80 µl IS (5 µM), deretter ble 25 µl 10 % TCA tilsatt. Etter tilsetting av legemidlene/pasientprøvene, IS og fellingsreagens ble rørene ristet på vortex mikser i ca. 5 sek og satt i fryser i 10 minutter (-74 °C). Deretter ble prøven tint og blandet på vortex mikser i ca. 5 sek og sentrifugert i 5 minutter ved 10000 g. Det ble overført 80 µl av prøvematerialet til UPLC vialer for analyse med LC-MS-MS teknikk.

Alle serumprøver som ble brukt i dette arbeidet ble opparbeidet på denne måten.

3.9. Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

3.9.1. Testing av ulike kolonner

Tabell 8. Tabellen viser en oversikt over de ulike kolonnene som ble testet i dette arbeidet.

| Kolonne | Lengde | Indre diameter | Partikkelstørrelse | Produsent |
|-----------------------------|--------|----------------|--------------------|------------|
| BEH C ₁₈ kolonne | 100 mm | 2,1 mm | 1,7 µm | Waters |
| BEH Symmetri shield kolonne | 50 mm | 2,1 mm | 1,7 µm | Waters |
| BEH HILIC kolonne | 100 mm | 2,1 mm | 1,7 µm | Waters |
| Aminopropyl Luna kolonne | 150 mm | 2,0 mm | 5 µm | Phenomenex |
| ZIC- HILIC kolonne | 50 mm | 2,1 mm | 3,5 µm | SeQuant |
| ZIC- HILIC forkolonne | 20 mm | 2,1 mm | 5 µm | SeQuant |
| HSS T3 kolonne | 100 mm | 2,1 mm | 1,8 µm | Waters |

Utvelgelse av kolonne ble utført ved at det ble undersøkt om de ga tilfredsstillende separasjon og symmetriske topper ved analyse av rene forbindelser. Dersom denne testen ga tilfredsstillende resultat, ble de også testet ved å analysere ekstrakt fra serumprøver. Det viste seg at flere kolonner, selv om de ga tilfredsstillende resultat med rene forbindelser, ikke var egnet til analyse av ekstrakt fra serumprøver. Flere artikler [11, 28] indikerte at ZIC-HILIC kolonnen kunne være egnet til analyse av gentamicin og tobramycin. Det ble derfor gjort flere forsøk med å bruke denne kolonnen, men det var ikke mulig å reproducere de resultat oppnådd i forsøkene beskrevet i litteraturen. Det videre arbeid ble derfor utført med HSS T3 kolonnen fra Waters, da denne ga god separasjon og symmetriske topper også ved analyse av ekstrakt fra serum. Disse resultatene ble også oppnådd med bruk av en mobilfase som er kompatibel med ESI-LC-MS systemet.

3.10. LC-MS-MS

Det ble valgt å ta med to produksjoner for hvert fragment. Ett for kvantifisering og ett for kontroll. Det ble testet ulike cone voltage og kollisjonsenergi for de ulike produksjonene og den optimale cone voltage og kollisjonsenergi ble brukt i MRM metoden.

Tabell 9. Optimaliserte betingelser for fragmentene til MRM metoden som er brukt i metodeutviklingen.

| Forbindelser | Foreldreion (g/mol) | Produksjon (g/mol) | Dwell (sek) | CV (V) | CE (eV) |
|----------------|---------------------|--------------------|-------------|--------|---------|
| Sisomicin (IS) | 448,2 | 160,1 | 0,01 | 33 | 21 |
| Gentamicin C1a | 450,0 | 160,1 | 0,01 | 37 | 20 |
| Gentamicin C1a | 450,0 | 322,1 | 0,01 | 37 | 15 |
| Gentamicin C2 | 464,0 | 160,1 | 0,01 | 37 | 20 |
| Gentamicin C2 | 464,0 | 322,1 | 0,01 | 37 | 15 |
| Tobramycin | 468,2 | 163,1 | 0,01 | 31 | 22 |
| Tobramycin | 468,2 | 324,2 | 0,01 | 31 | 17 |
| Gentamicin C1 | 478,2 | 157,1 | 0,01 | 37 | 20 |
| Gentamicin C1 | 478,2 | 322,1 | 0,01 | 37 | 15 |

3.11. Validering av metoden

3.11.1. Linearitet

Det ble opparbeidet 3 paralleller av standardrekka og proteinfelling fra serum ble gjort som beskrevet i 3.8. Prøvene ble analysert med 1 injeksjon av hver parallell.

3.11.2. Nøyaktighet

En prøve med medikamentfritt serum ble tilsatt gentamicin og tobramycin. Tobramycin konsentrasjonen var 3 μM og den totale gentamicin konsentrasjonen var 4,8 μM . Fra denne prøven ble det overført 100 μl til fire ulike rør og tilsatt en standard fra standardrekka i tre av disse rørene, se tabell 10.

Tabell 10. Oversikt over konsentrasjoner som ble brukt til å validere nøyaktighet.

| Nivå | Mengde fra prøven 3 μM : | 100 μl fra standard nr. | Konsentrasjon av tobramycin | Konsentrasjon av gentamicin total |
|------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0 | 100 μl | - | 3,0 μM | 4,80 μM |
| 1 | 100 μl | 2 | 7,9 μM | 12,64 μM |
| 2 | 100 μl | 4 | 3,1 μM | 4,96 μM |
| 3 | 100 μl | 6 | 1,9 μM | 3,04 μM |

Etter at prøvene var blandet på vortex mikser i 5 sek, ble det tatt ut 3 paralleller av hver prøve. Det ble analysert 1 injeksjon av nivå 0 og 2 injeksjoner av hver parallell i de andre nivåene.

3.11.3. Presisjon

Det ble lagd 3 prøver med gentamicin og tobramycin i serum for validering av intermediær presisjon. Konsentrasjonen på prøvene er vist i tabellen nedenfor. Det ble tatt ut 3 paralleller fra hver prøve. Til slutt ble det analysert 1 injeksjon av hver parallell.

Tabell 11. Oversikt over konsentrasjoner som ble brukt for å validere presisjon.

| Prøvene: | Tobramycin konsentrasjonen: | Den totale gentamicin konsentrasjonen: |
|-----------------|------------------------------------|---|
| Prøve 1 | 20 µM | 32 µM |
| Prøve 2 | 10 µM | 16 µM |
| Prøve 3 | 2 µM | 3,2 µM |

3.11.4. Repeterbarhet

Repeterbarheten ble testet ved å lage to prøver med legemidlene i serum. Prøvene som ble lagd hadde tobramycin konsentrasjoner på 3 µM og 10 µM, total gentamicin konsentrasjonene var 4,8 µM og 16 µM. Det ble opparbeidet 6 paralleller av hver prøve. Det ble analysert 1 injeksjon av hver parallell.

3.11.5. Deteksjonsgrense (LOD) og Kvantifiseringsgrense (LOQ)

For å finne LOD og LOQ ble standardrekka fortynnet videre. Det ble analysert 1 injeksjon av hver fortynning.

4. RESULTATER

4.1. Væske- væske ekstraksjon fra serum

Ekstraksjonsutbyttet var lite eller ingenting ved væske- væske- ekstraksjon med organiske løsemidlene.

4.2. Felling av proteiner fra serum

Den beste metoden for å felle av proteiner fra serum var direktefelling med 10 % TCA. Etter blanding av 25 µl 10 % TCA, 25 µl prøve og 80 µl IS og vortex mikser i 5 sek, ble rørene satt i fryser i 10 min (-74 °C). Etter opptining av prøven og ny blanding på vortex mikser, ble den sentrifugert i 5 min ved 10000 g. Supernatanten ble overført til UPLC vialer for analyse.

4.3. Utvikling av væskrokromatografi metoden

En rekke ulike kombinasjoner av UPLC- kolonner og mobilfaser ble testet. Best resultat ble oppnådd ved bruk av HSS T3 kolonnen og mobilfasen vist i tabell 4.

4.4. Pasientprøver

Pasientprøvene ble analysert ved hjelp av LC-MS/MS. I tabell 12 er de oppnådde resultat presentert sammen med resultat oppnådd ved immunoassay måling på de samme prøvene.

Tabell 12. Tabellen viser konsentrasjoner av pasientprøvene funnet.

| Pasient prøver | Total gentamicin konsentrasjon funnet (µM) | Total gentamicin konsentrasjon ved immunologisk metode (µM) | avvik (µM) | % Avvik |
|----------------|--|---|------------|---------|
| P1 | 0,0 | < 0,8 | – | – |
| P2 | 2,9 | 2,9 | 0,0 | 0,0 |
| P3 | 5,8 | 7,3 | 1,6 | 21,2 |
| P4 | 22,8 | 17,0 | -5,8 | -34,1 |
| P5 | 1,2 | 1,7 | 0,5 | 31,1 |
| P6 | 6,2 | 5,5 | -0,7 | -12,8 |
| P7 | 4,0 | 3,6 | -0,4 | -11,1 |

4.5. Kontrollprøver

Sammenlikningen av konsentrasjonene ved analyse ved hjelp av LC-MS/MS metoden og immunoassay metoden er presentert i tabell 13 og 14.

Tabell 13. Tabellen viser konsentrasjoner av gentamicin ($C_1+C_2+C_{1a}$) i kontrollprøver funnet ved LC-MS/MS metode og ved immunoassay metoden.

| Kontroll Prøver | Total gentamicin konsentrasjon funnet ved LC-MS/MS (μM) | Total gentamicin konsentrasjon ved immunologisk metode (μM) | avvik (μM) | % avvik |
|-----------------|--|--|-------------------------|---------|
| A | 0,00 | 0,00 | – | – |
| B | 0,95 | 1,05 | 0,10 | 9,37 |
| C | 2,25 | 3,14 | 0,89 | 28,45 |
| D | 5,65 | 8,39 | 2,74 | 32,62 |
| E | 9,35 | 14,68 | 5,33 | 36,29 |
| F | 10,95 | 20,96 | 10,01 | 47,77 |

Tabell 14. Tabellen viser konsentrasjoner av tobramycin i kontrollprøver funnet ved LC-MS/MS metode og ved immunoassay metoden.

| Kontroll prøver | Tobramycin konsentrasjon funnet. ved LC-MS/MS (μM) | Tobramycin konsentrasjon ved immunoassay metoden (μM) | avvik (μM) | % avvik |
|-----------------|---|--|-------------------------|---------|
| A | 0,00 | 0,00 | – | – |
| B | 1,45 | 2,14 | 0,69 | 32,29 |
| C | 3,00 | 4,28 | 1,28 | 29,95 |
| D | 5,25 | 8,57 | 3,32 | 38,71 |
| E | 7,75 | 14,99 | 7,24 | 48,30 |
| F | 9,90 | 21,41 | 11,51 | 53,77 |

Ut fra tabell 13 og 14 kan en se at konsentrasjonene funnet ved analyse av kontrollprøvene ved hjelp av LC-MS/MS metoden ligger lavere sammenliknet med immunoassay metoden.

4.6. Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

4.6.1. Testing av ulike kolonner

Tabell 15. Tabellen viser hvilke kolonner som ga resultater ved analyse av rene forbindelser og serumprøver.

| Kolonne | Rene forbindelser av gentamicin og tobramycin | Serumprøver av gentamicin og tobramycin |
|------------------------------|---|---|
| HSS T ₃ kolonne | + | + |
| BEH C ₁₈ -kolonne | + | - |
| ZIC- HILIC kolonne | - | - |
| Symmetri Shield kolonne | + | - |
| BEH HILIC kolonne | + | + |
| Aminopropyl Luna kolonne | + | + |

C₁₈- kolonnene retarderte ikke forbindelsene tilfredsstillende, ZIC-HILIC kolonnen og symmetri shield kolonnen ga ingen anvendbare resultater. Aminopropyl Luna kolonnen, BEH HILIC kolonnen ga resultater og HSS T₃ kolonnen ga resultater som kunne benyttes videre.

4.7. Massespektrometri

4.7.1. Kollisjons energi (CE)

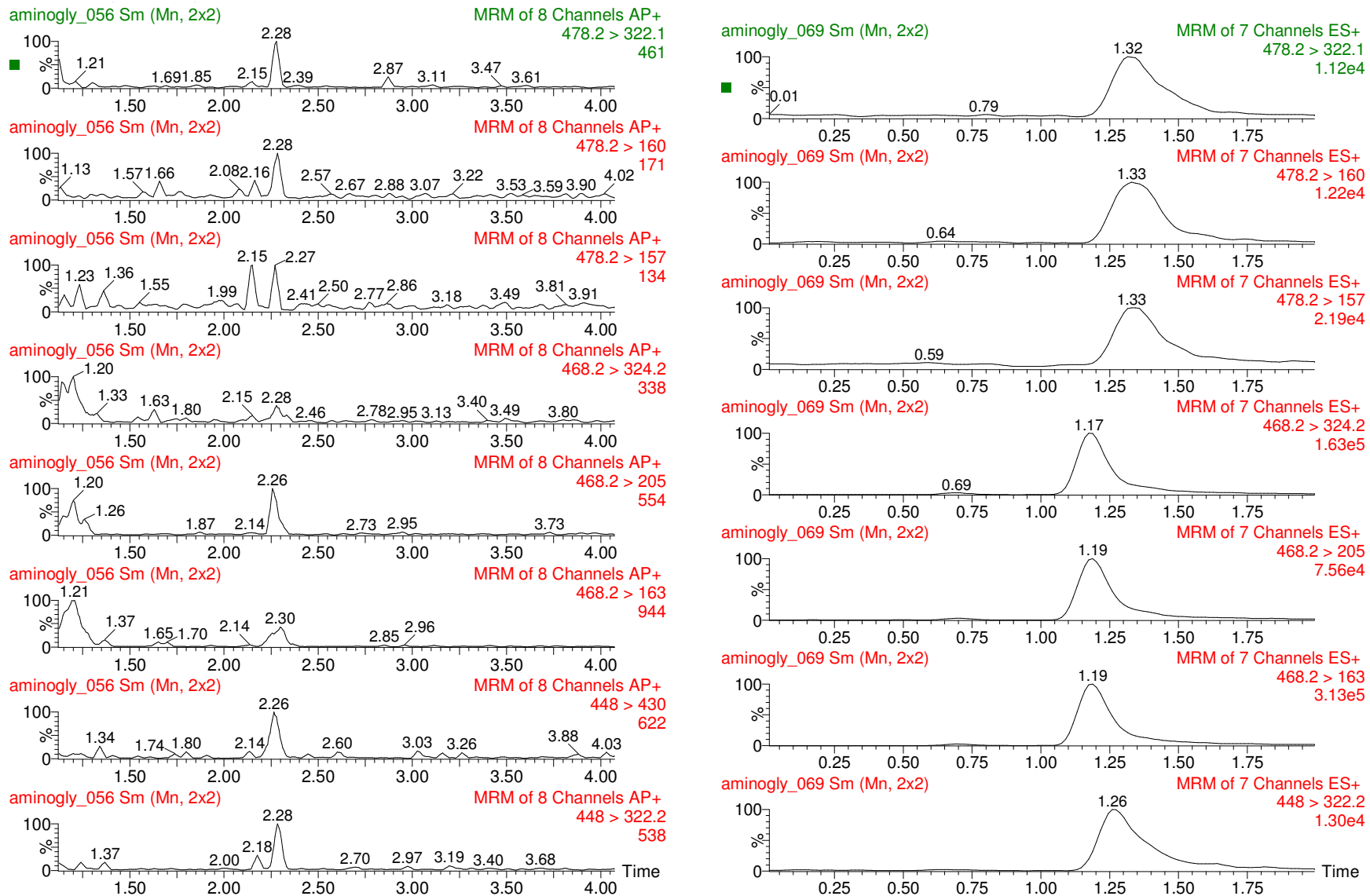
Ved den optimale kollisjonsenergien for fragmentene viste det seg typisk fragmenter ved $m/z = 160$ og 322 for alle gentamicin formene, og ved $m/z = 163$ og 324 for tobramycin.

4.7.2. Internstandard

Sisomicin ble valgt som IS da den er veldig lik legemidlene strukturelt. Sisomicin er også funnet beskrevet brukt som IS i litteraturen [8, 12, 16].

4.7.3. Ionekilde

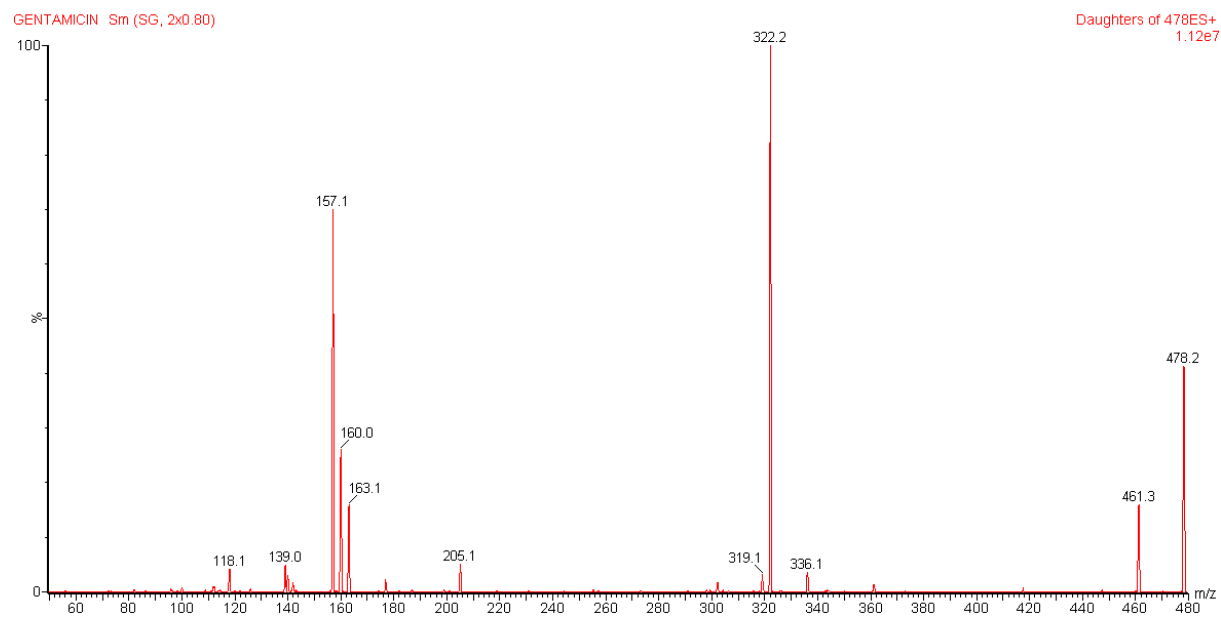
I dette arbeidet ble det valgt å benytte ESI⁺ da det var denne ioniseringsteknikken som ga best resultat.



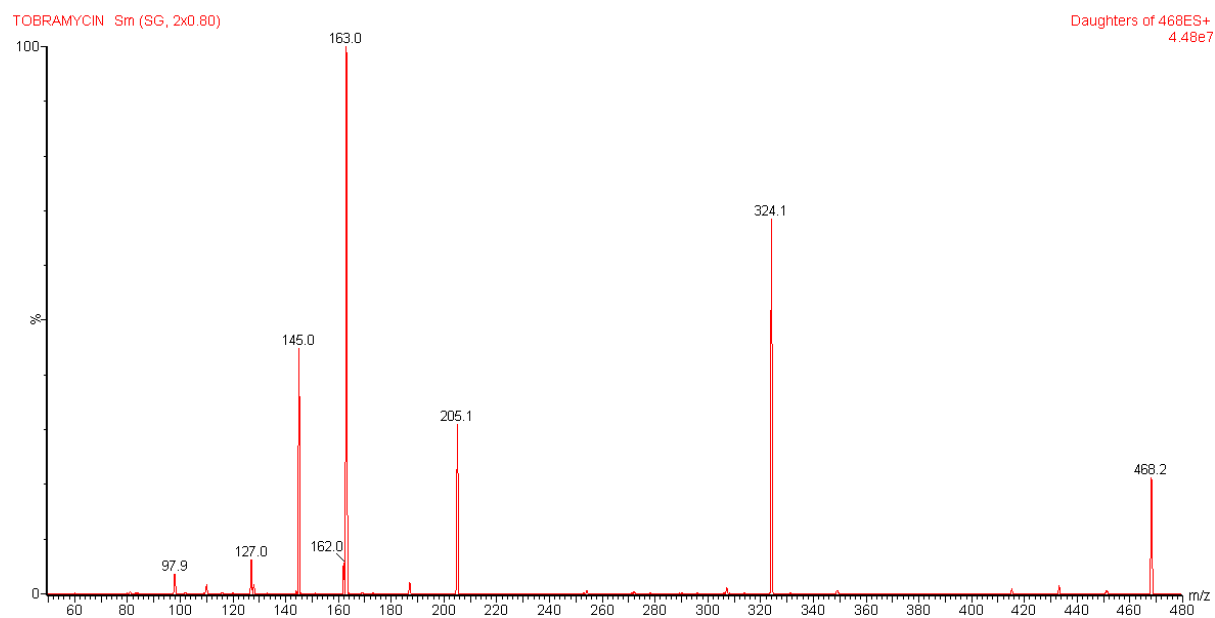
Figur 11. Figuren viser tobramycin (20 µM) og gentamicin (total konsentrasjon på 32 µM) analysert ved bruk av APCI ioniseringsteknikk (kromatogram til venstre) og ESI ionisering (kroatogram til høyre). Fra topp til bunn er det gentamicin C₁, tobramycin og IS.

4.7.4. MS og MS- MS av tobramycin og gentamicin

4.7.4.1. Produktionskann



Figur 12. Figuren viser produktion skann av gentamicin C₁.

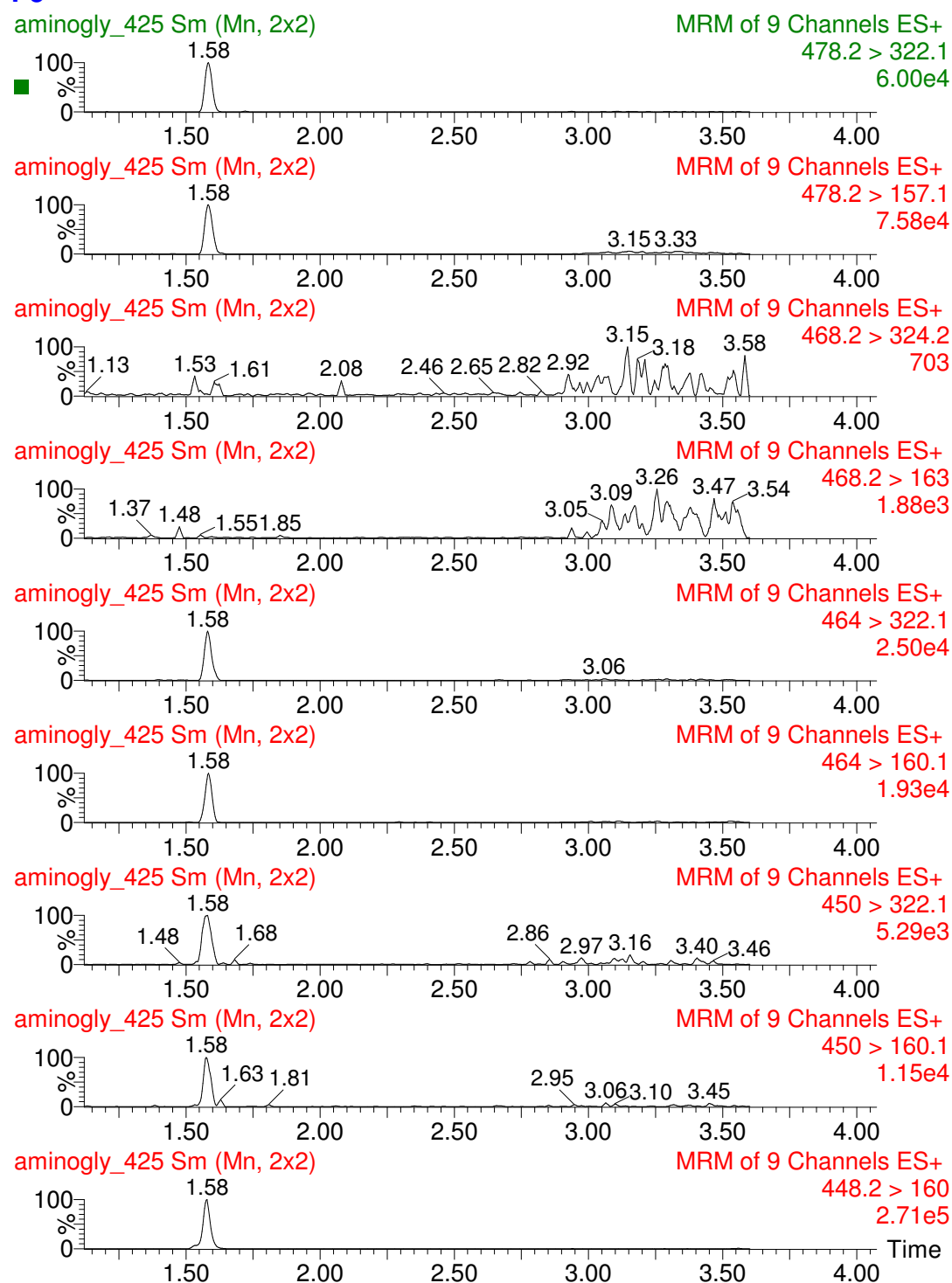


Figur 13. Figuren viser produktion skann av tobramycin.

4.7.5. Kromatografi av tobramycin og gentamicin i serum

4.7.5.1. Pasientprøve

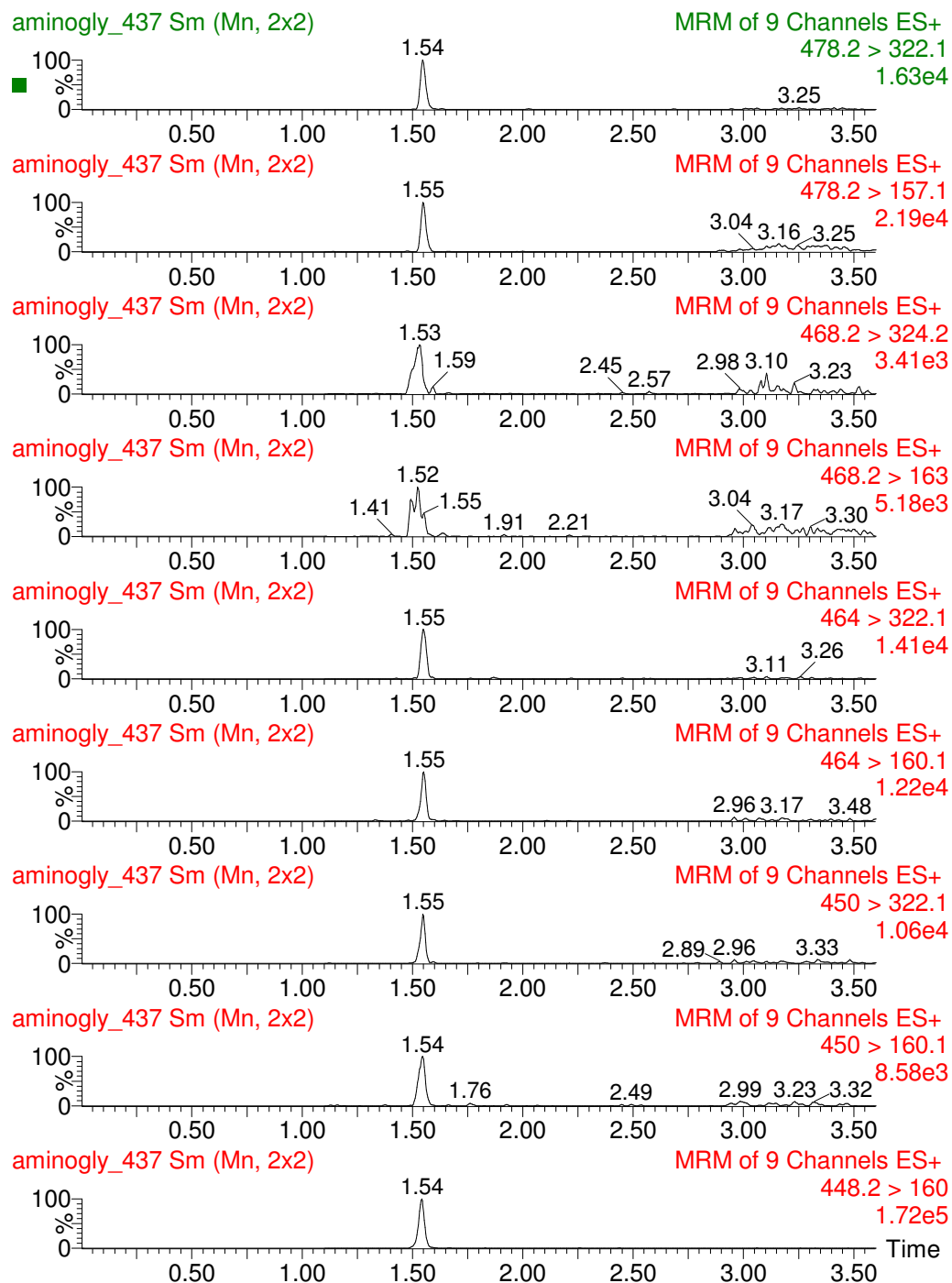
P5



Figur 14. Figuren viser et kromatogram av en pasientprøve. Fra topp til bunn er det gentamicin C₁, tobramycin, gentamicin C₂, C_{1a} og IS.

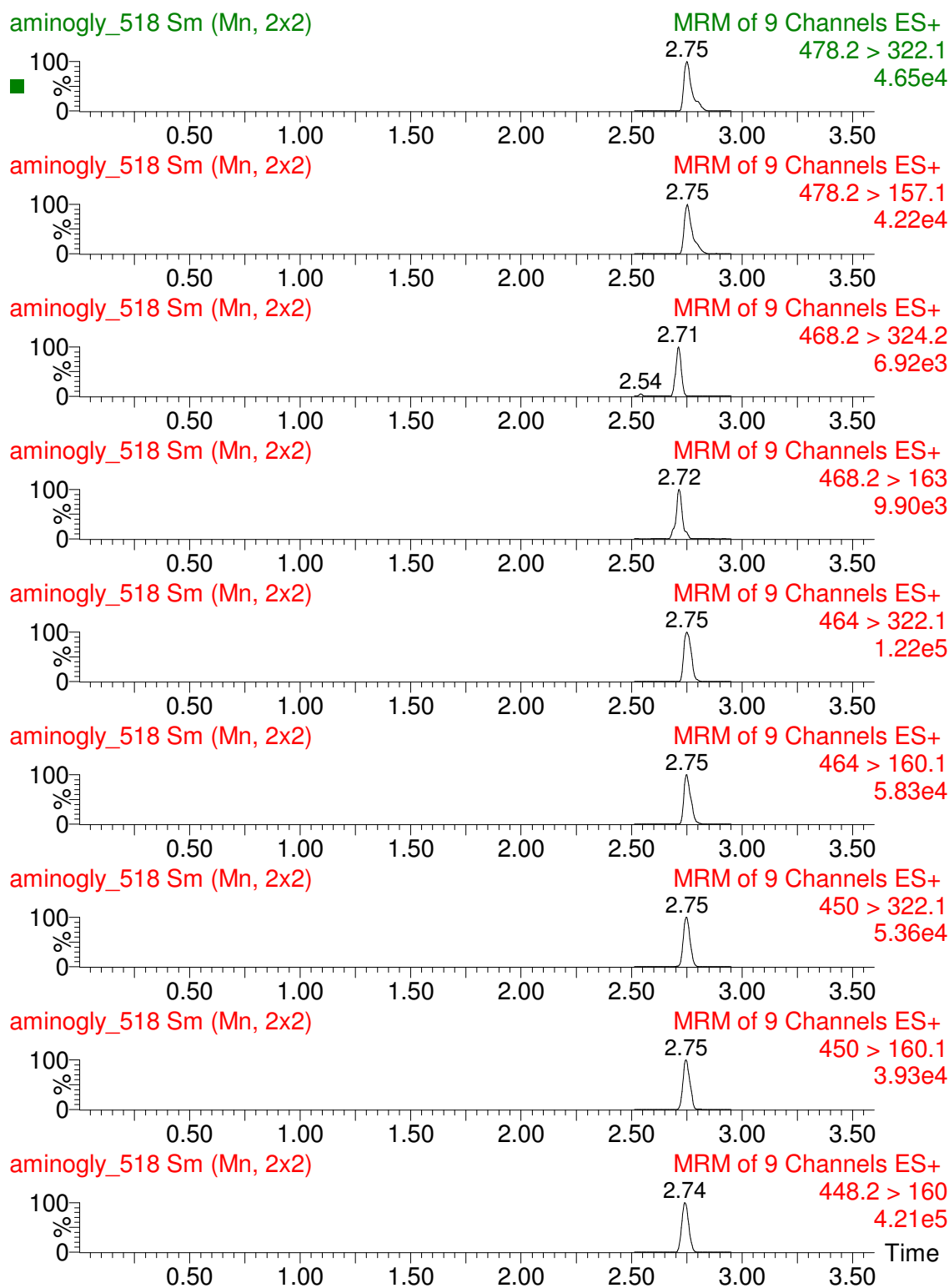
4.7.5.2. Kontrollprøve

B



Figur 15. Figuren viser kromatogram av en kontrollprøve. Fra toppen og ned er det gentamicin C₁, tobramycin, gentamicin C₂, gentamicin C_{1a} og IS.

4.7.5.3. Standarder



Figur 16. Figuren viser kromatogram av standard 2 i standardrekke, tobramycin/gentamicin konsentrasjon på 12,8/40,5 μM . Fra toppen og ned er det gentamicin C₁, tobramycin, gentamicin C₂, gentamicin C_{1a} og IS.

4.8. Validering

Aktuelle krav til analysemetodene er ikke oppfylt verken med hensyn på linearitet ($R^2 \geq 0,99$) eller relativt standardavvik ($RSD \leq \pm 15 \%$).

4.8.1. Linearitet

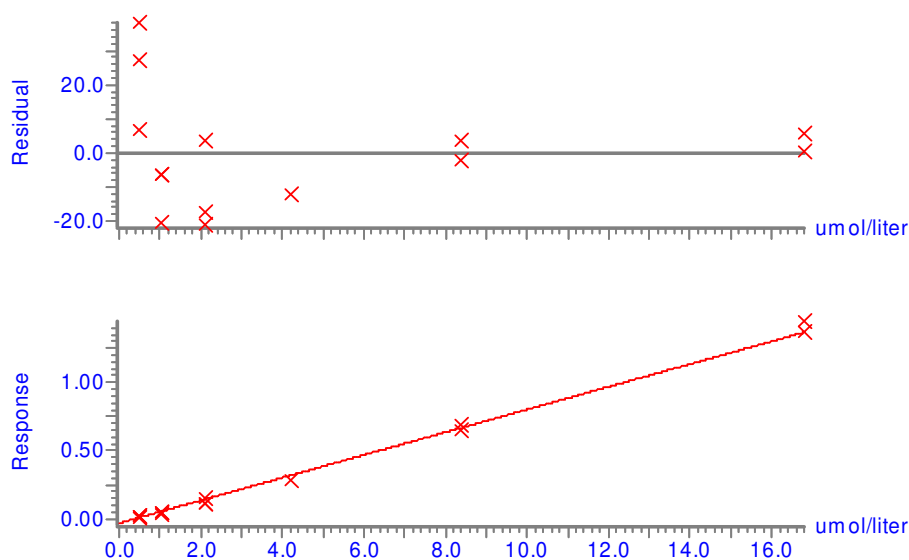
Linearitet forteller om metoden gir standardkurver der responsen er en lineær funksjon av konsentrasjon. Linearitet dokumenteres med lineær regresjon, R^2 [15].

Standardkurvene viser noe variasjon. R^2 er bra ved noen produksjoner, mens for eksempel tobramycin har dårlig R^2 . Det er valgt å fokusere mest på gentamicin og dens produksjon da det er gentamicin som brukes mest.

4.8.1.1. Standardkurver

Det er 3 opparbeidede paralleller av standardrekka som er utgangspunktet av disse standardkurvene.

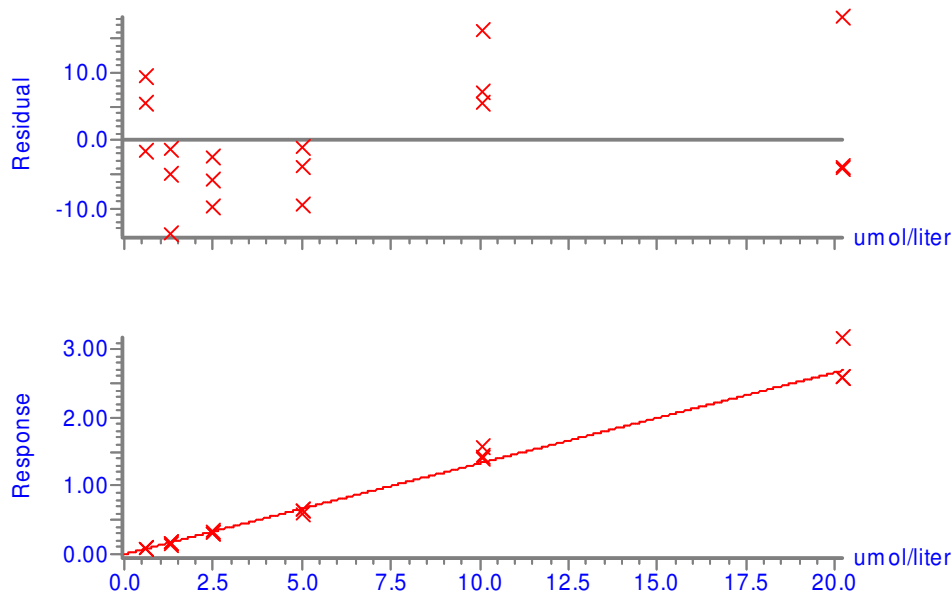
Compound name: GentamicinC1 157
Correlation coefficient: $r = 0.995254$, $r^2 = 0.990530$
Calibration curve: $0.0832014 * x + -0.0307189$
Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Figur 17. Standardkurve og residualplott av Gentamicin C₁ produksjon 157.

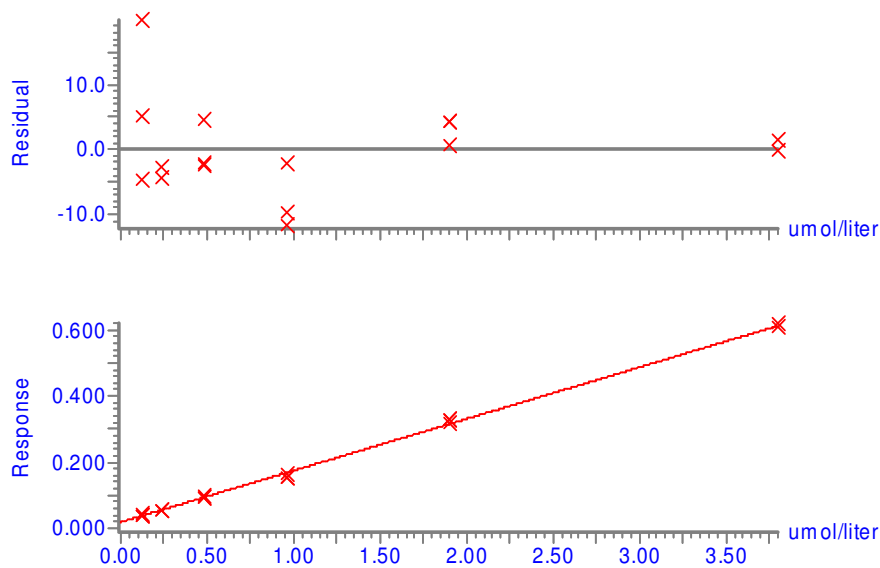
Resultater

Compound name: GentamicinC2 160
Correlation coefficient: $r = 0.993271$, $r^2 = 0.986587$
Calibration curve: $0.132802 * x + 0.00126033$
Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



Figur 18. Standardkurve og residualplott av gentamicin C₂ produktion 160.

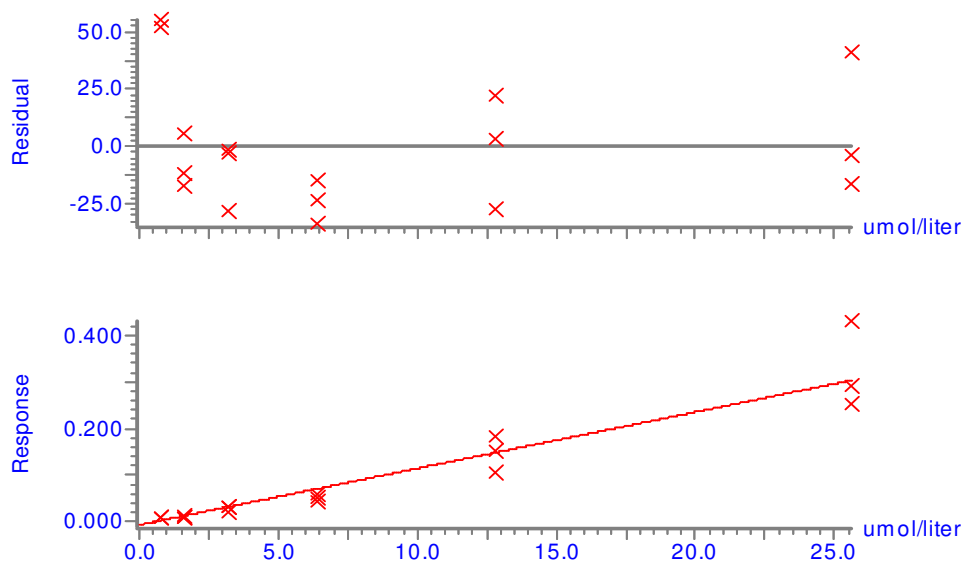
Compound name: GentamicinC1a 160
Correlation coefficient: $r = 0.998506$, $r^2 = 0.997014$
Calibration curve: $0.156103 * x + 0.0188717$
Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Figur 19. Standardkurve og residualplott av gentamicin C_{1a} produktion 160.

Resultater

Compound name: Tobramycin163
Correlation coefficient: $r = 0.960608$, $r^2 = 0.922767$
Calibration curve: $0.012094 * x + -0.00660522$
Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Figur 20. Standardkurve og residualplott av tobramycin produksjon 163.

4.8.2. Nøyaktighet

Analysemetodens nøyaktighet skal forsikre at det ikke er systematisk feil med metoden, avvik fra sann verdi. Ved å analysere en kontrollprøve med kjent konsentrasjon kan nøyaktighet bestemmes, kontrollprøvens kjente innhold brukes som sann verdi [15].

Tabell 16. Oversikt over relativt standardavvik og % utbytte av gentamicin C₁ ved validering av nøyaktighet.

| Gentamicin C1 | Nivå 0 | Nivå 1 | Nivå 2 | Nivå 3 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Konsentrasjon i prøven | 1,98 | 5,21 | 2,04 | 1,25 |
| Gjennomsnitts konsentrasjon funnet | 1,08 | 4,92 | 1,48 | 0,76 |
| SD | 0,10 | 0,34 | 0,06 | 0,07 |
| RSD (%) | 9,11 | 6,86 | 3,84 | 9,17 |
| % utbytte av sann verdi | 54,55 | 94,44 | 72,42 | 60,35 |

Tabell 17. Oversikt over relativt standardavvik og % utbytte av gentamicin C₂ ved validering av nøyaktighet.

| Gentamicin C2 | Nivå 0 | Nivå 1 | Nivå 2 | Nivå 3 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Konsentrasjon i prøven | 2,37 | 6,24 | 2,45 | 1,50 |
| Gjennomsnitts konsentrasjon funnet | 1,20 | 5,64 | 1,73 | 0,87 |
| SD | 0,08 | 0,38 | 0,09 | 0,06 |
| RSD (%) | 6,66 | 6,68 | 5,36 | 6,45 |
| % utbytte av sann verdi | 50,54 | 90,26 | 70,67 | 58,04 |

Tabell 18. Oversikt over relativt standardavvik og % utbytte av gentamicin C_{1a} ved validering av nøyaktighet.

| Gentamicin C1a | Nivå 0 | Nivå 1 | Nivå 2 | Nivå 3 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Konsentrasjon i prøven | 0,45 | 1,19 | 0,47 | 0,29 |
| Gjennomsnitts konsentrasjon funnet | 0,25 | 1,09 | 0,38 | 0,21 |
| SD | 0,03 | 0,08 | 0,02 | 0,02 |
| RSD (%) | 11,76 | 7,03 | 6,41 | 11,10 |
| % utbytte av sann verdi | 54,30 | 91,60 | 81,32 | 71,74 |

Tabell 19. Oversikt over relativt standardavvik og % utbytte av tobramycin ved validering av nøyaktighet.

| Tobramycin | Nivå 0 | Nivå 1 | Nivå 2 | Nivå 3 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Konsentrasjon i prøven | 3,00 | 7,90 | 3,10 | 1,90 |
| Gjennomsnitts konsentrasjon funnet | 2,25 | 5,03 | 2,08 | 1,46 |
| SD | 0,32 | 0,48 | 0,20 | 0,18 |
| RSD (%) | 14,26 | 9,60 | 9,80 | 12,22 |
| % utbytte av sann verdi | 75,00 | 63,71 | 67,16 | 76,75 |

Aksept kriteriene for nøyaktighet ved medisinsk laboratorieavdeling, seksjon 5 er ved presentasjon av RSD $\leq 15\%$, og ved presentasjon av gjenvinningsgrader det $100 \pm 15\%$.

Ut fra tabell 16- 18, gentamicin C₁, C₂ og C_{1a}, kan en se at alle de ulike prøvene ligger innenfor ved presentasjon av RSD, noe som sier at konsentrasjonene funnet i de ulike parallellene ligger nær hverandre. Men dersom en ser på gjenvinningsgraden ser en at resultatet for de fleste prøvene ikke når opp til kriteriene som er satt.

Ut fra tabell 19, tobramycin, kan en se at alle prøvene ligger innenfor kravet for RSD. Men ved presentasjon av % utbytte av sann verdi er det ikke noen av prøvene som når opp til kravet.

4.8.3. Presisjon

Presisjon sier noe om spredning i analyseresultatene [15].

Aksept kriteriene for presisjon ved medisinsk laboratorieavdeling, seksjon 5 er $\leq 15\%$.

Ut fra tabell 20 og 21, prøve 1 og 2, kan en se at RSD er innenfor kriteriene som stilles.

Tabell 23, prøve 3, viser at RSD ligger utenfor for gentamicin C₁, C_{1a}, men innenfor for gentamicin C₂ og tobramycin.

Tabell 20. Tabellen viser resultatene ved validering av presisjon, prøve 1.

| Prøve 1 | Gentamicin C ₁ | Gentamicin C ₂ | Gentamicin C _{1a} | Tobramycin |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|
| SD | 0,6 | 0,2 | 0,1 | 0,5 |
| RSD (%) | 8,2 | 1,8 | 5,2 | 2,5 |

Tabell 21. Tabellen viser resultatene ved validering av presisjon, prøve 2.

| Prøve 2 | Gentamicin C ₁ | Gentamicin C ₂ | Gentamicin C _{1a} | Tobramycin |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|
| SD | 0,6 | 0,3 | 0,1 | 0,9 |
| RSD (%) | 13,5 | 5,8 | 6,1 | 8,7 |

Tabell 22. Tabellen viser resultatene ved validering av presisjon, prøve 3.

| Prøve 3 | Gentamicin C ₁ | Gentamicin C ₂ | Gentamicin C _{1a} | Tobramycin |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|
| SD | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,3 |
| RSD (%) | 17,6 | 11,4 | 23,1 | 12,9 |

4.8.4. Repeterbarhet

Konsentrasjonene i disse 2 prøvene var som nevnt i 3.11.4, tobramycin konsentrasjon på 3 μM og 10 μM total gentamicin konsentrasjonene var 4,8 μM og 16 μM .

Ut fra tabell 23 kan en se at alle oppfyller kravene til relativt standardavvik som stilles ($\leq 15\%$). Tabell 24 viser at tobramycin og gentamicin C₁ ikke oppfyller kravene som stilles, men Gentamicin C₂ og Gentamicin C_{1a} oppfyller kravene.

Tabell 23. Tabellen viser resultatene for validering av repeterbarhet for de ulike legemidlene.

| Prøve 1 | Gentamicin C ₁ | Gentamicin C ₂ | Gentamicin C _{1a} | Tobramycin |
|-------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| Parallell 1 | 4,4 μM | 5,2 μM | 0,9 μM | 10,1 μM |
| Parallell 2 | 4,5 μM | 5,4 μM | 1,0 μM | 11,9 μM |
| Parallell 3 | 4,3 μM | 4,6 μM | 0,8 μM | 9,1 μM |
| Parallell 4 | 3,9 μM | 5,0 μM | 1,0 μM | 12,2 μM |
| Parallell 5 | 3,9 μM | 4,7 μM | 0,9 μM | 10,2 μM |
| Parallell 6 | 3,9 μM | 4,6 μM | 0,9 μM | 8,7 μM |
| STD | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 1,4 |
| Gj.snitt | 4,1 | 4,9 | 0,9 | 10,4 |
| RSD (%) | 8,1 | 6,4 | 9,9 | 13,6 |

Tabell 24. Tabellen viser resultatene for validering av repeterbarhet for de ulike legemidlene.

| Prøve 2 | Gentamicin C ₁ | Gentamicin C ₂ | Gentamicin C _{1a} | Tobramycin |
|-------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|
| Parallell 1 | 1,4 μM | 1,6 μM | 0,3 μM | 3,6 μM |
| Parallell 2 | 1,2 μM | 1,5 μM | 0,3 μM | 3,5 μM |
| Parallell 3 | 1,5 μM | 1,6 μM | 0,3 μM | 3,4 μM |
| Parallell 4 | 1,1 μM | 1,4 μM | 0,3 μM | 3,1 μM |
| Parallell 5 | 1,2 μM | 1,4 μM | 0,3 μM | 3,5 μM |
| Parallell 6 | 1,0 μM | 1,5 μM | 0,3 μM | 2,4 μM |
| Std.avvik | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,5 |
| Gj.snitt | 1,3 | 1,5 | 0,3 | 3,3 |
| RSD (%) | 16,3 | 7,2 | 0,0 | 15,1 |

4.8.5. Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ)

LOD er den laveste konsentrasjonen av forbindelsen som kan detekteres med den aktuelle analysemetoden. LOQ er den laveste konsentrasjonen av forbindelsen som kan kvantifiseres i prøven med den aktuelle analysemetoden [15].

LOD og LOQ ble beregnet fra videre fortyninger av standardrekka som beskrevet i 3.11.5.

LOD = S/N* konsentrasjonen av prøven * 3

LOQ = S/N* konsentrasjonen av prøven * 10

Der S er høyden på toppen og N er høyden på støy.

Tabell 25. Tabellen viser de beregnede LOD og LOQ.

| Forbindelse | LOD (μM) | LOQ (μM) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tobramycin | 0,21 | 0,69 |
| Gentamicin C1 | 0,06 | 0,21 |
| Gentamicin C2 | 0,14 | 0,46 |
| Gentamicin C1a | 0,01 | 0,02 |

Ut fra tabell 25 kan en se at både LOD og LOQ beregnet er lavere enn den laveste konsentrasjonen i standardrekka som ble brukt.

De laveste konsentrasjonene i standardrekka som ble brukt i dette arbeidet var; tobramycin konsentrasjon på $0,8 \mu\text{M}$ og total gentamicin konsentrasjon på $1,28 \mu\text{M}$. Ved å ta utgangspunkt i mengdeforhold fra artikkelen ble konsentrasjonene av de ulike forbindelsene i gentamicin: $C_1 = 0,5 \mu\text{M}$, $C_2 = 0,6 \mu\text{M}$ og $C_{1a} = 0,1 \mu\text{M}$.

Disse resultatene tilsier at standardrekka ligger over både LOD og LOQ.

5. DISKUSJON

Det er utviklet en metode for måling av gentamicin og tobramycin i små volum (25 µl) blod ved hjelp av LC-MS-MS. Ved bruk av direktefelling av proteiner fra serum går prøveopparbeidelsen veldig raskt, og selve LC-MS/MS analysen tar 5 minutter. En av de metodene som er beskrevet i litteraturen ble forsøkt brukt, men det var ikke mulig å reproducere de resultat som ble presentert der [11]. Metoden tilfredsstillende ikke de krav medisinsk laboratorieavdeling, seksjon 5 stiller til linearitet og relativt standardavvik.

Metoden danner likevel et godt grunnlag for videre arbeid, slik at immunoassay baserte metoder etter hvert kan erstattes med LC-MS/MS baserte metoder.

5.1. Væske-væske ekstraksjon fra serum

Det ble ingen anvendbare resultater ved analyse av prøven etter test av væske- væske-ekstraksjon. Det var ikke et uventet resultat da dette er meget polare legemidler. Regulering av pH til 11,4 ble gjort for å øke løseligheten i organisk løsemiddel

5.2. Felling av proteiner fra serum

Det er blitt testet felling med ACN, ACN + TCA, ACN + ZnSO₄, MeOH, ZnSO₄ og ZnSO₄ + MeOH, som ikke ga anvendbare resultat.

Proteinfelling med 30 % TCA fungerte noe bedre. Ved bruk av 50 µl prøve, 50 µl IS og 8 µl 30 % TCA viste seg at det oppsto utfelling etter nedfrysing av prøvene over natten.

Det ble testet videre med ulike mengder prøve, IS og 10 % TCA. Det ble testet å sette prøvene i kjøleskap i 10 min etter tilsetning av IS og 10 % TCA, deretter sentrifugering. Vialene ble fryst ned over natten og det oppsto utfelling nok en gang. Dermed ble det testet å sette prøvene i fryser i 10 min isteden for i kjøleskap. Vialene som ble satt i fryser over natten, viste ikke lengre tegn til ytterligere utfelling. Det som viste seg å gi best resultat var å tilsette 80 µl IS til 25 µl prøve, deretter 25 µl 10 % TCA.

Det ble testet å sette prøvene i fryser før sentrifugering, slik at fellingsprosessen skulle bli mer fullstendig før sentrifugeringen. Og at det dermed ikke skulle oppstå ytterligere utfelling ved nedfrysing av vialene.

5.3. Pasientprøver

De LC-MS/MS baserte målingene avviker til dels sterkt fra immunoassay målingene. Det er ingen systematiske avvik, det er oppnådd både større og lavere verdi ved LC-MS/MS målingen sammenliknet med immunoassay målingene. Avvikene varierer fra + 31,1 til -34,1 prosent. Det er vanskelig å gi en fullgod forklaring på dette. Et bidrag til de observerte forskjellene kan være at sammensetningen av gentamicin varierer fra batch til batch. Om de ulike sammensetningene kan gi ulik respons i immunoassay metoden er ikke kjent. I LC-MS/MS metoden er det også forutsatt at de ulike variantene av gentamicin gir lik respons. Siden den eksakte sammensetningen av gentamicin som ble brukt er ukjent, er det umulig å fastslå om dette er korrekt eller ikke.

Tabell 12 viser resultat av analyse av pasientprøver utført ved hjelp av LC-MS/MS og analyser på samme prøver analysert ved hjelp av immunoassay metode som brukes ved UNN. Pasientprøve 1 kunne ikke immunoassay metoden gi svar på, på grunn av at konsentrasjonen var $<0,8 \mu\text{M}$. Det ble ikke funnet noe ved analyse av denne pasientprøven ved LC-MS/MS metoden heller, det kan tenkes at det er en lavere konsentrasjon i denne prøven enn LOD, og dermed ikke kan detekteres.

Det at konsentrasjonene funnet ved bruk av LC-MS/MS metoden avviker fra immunoassay metoden kan være på grunn av at mengdeforholdet i forbindelsene av gentamicin kan være et annet enn det som ble tatt utgangspunkt i her. Dersom det i dette arbeidet hadde vært brukt et gentamicin sulfat med oppgitt mengdeforhold av de ulike forbindelsene, ville det vært kjente konsentrasjoner av alle forbindelsene i standardkurven og dermed lettere å finne riktig konsentrasjon ved analyse av pasientprøver.

5.3.1. Gentamicin blandingen

Da LC-MS/MS metoden ga lavere konsentrasjoner ved analyse av pasientprøver og kontrollprøvene sammenliknet med resultater fra immunoassay metoden, ble det undersøkt mer om gentamicin. Det ble da funnet at gentamicin foreligger i flere strukturer, og ikke bare C_1 , som det var tatt utgangspunkt i. Det ble gjort søk i litteraturen etter artikler med mengdeforhold av gentamicinforbindelsene. Det ble tatt utgangspunkt i et mengdeforhold funnet i litteraturen [7]. Mengdeforholdene mellom de ulike gentamicinforbindelsene kan som nevnt variere mellom ulike produksjonsbatcher [5-7]. Mengdeforholdene som er beskrevet i litteraturen er 25-50 % av C_1 , 10- 35 % av C_{1a} , og 25-55 % av summen av C_2 og C_{2a} [6].

5.4. Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

5.4.1. Testing av ulike kolonner

Alle kolonnene unntatt HSS T3 kolonnen ga resultater som ikke var tilfredsstillende. For kolonne av typen C₁₈ kan dette forklares med at gentamicin og tobramycin er svært polare og vil dermed ha liten eller ingen retensjon på kolonner av denne typen. I følge litteraturen skulle ZIC-HILIC kolonnen være godt egnet [11]. Selv etter gjentatte forsøk lyktes det ikke å reproducere resultatene beskrevet i litteraturen. Muligens kan dette skyldes batch til batch variasjoner av slike kolonner. BEH HILIC kolonnen ga symmetriske topper av både legemidlene og internstandardene, men ved analyse av standardrekka ble lineariteten svært dårlig. Det er vanskelig å forklare hvorfor de to HILIC kolonnene ikke lot seg bruke.

Luna kolonnen inneholdt en aminopropylkjede som stasjonærfase. Ved pH < 9 vil sannsynligvis -NH₂ gruppene være ioniserte (-NH₃⁺) og med samtidig ladning på analytten vil også dette gi liten mulighet for retensjon.

HSS T3 kolonnen er en hybrid, utviklet for å kunne analysere både upolare og polare forbindelser og da med mobilfase som er kompatibel med ESI-MS. Resultatene viser at den er det beste alternative for analyser av gentamicin og tobramycin ved hjelp av LC-MS/MS.

5.5. Massespektrometri

5.5.1. Ionekilde

APPI ga ikke gode resultater ved analyse av de rene forbindelsene av tobramycin og gentamicin. Dette kan skyldes at aminoglykosidene ikke inneholder kromofor som absorberer lys fra UV-lampen [19].

APCI ga resultater ved analyse av de rene forbindelsene og i serum, dermed er det vist at det er mulig å bruke APCI. Signalet ved ekstraksjon fra serum med TCA ble kraftig redusert ved bruk av APCI som ionekilde, ved bytte til ESI⁺ ble det bedre signal. Dette kan forklares ved at -NH₂ gruppen i aminoglykosidene lett tar opp et proton når mobilfasen og analytt kommer inn i ESI- kilden.

Figur 11 viser eksempel på kromatogram av analyse av samme prøve analysert ved bruk av både APCI (til venstre i figuren) og ESI (til høyre i figuren) som ioniseringsteknikk.. Serumprøven inneholdt gentamicin C₁ og tobramycin. Figuren viser at det er dårligere signal og mindre symmetriske topper ved bruk av APCI som ioniseringskilde enn ESI.

5.5.2. Internstandard

Det ble testet ulike overganger av sisomicin som internstandard. Produksjon med m/z på 160 ble valgt som overgang, siden dette ga best resultatet med hensyn på linearitet av standardkurven. Sisomicin ble valgt som IS da den er veldig lik legemidlene strukturelt, og den var også brukt i litteraturen [8, 12, 16]. Det ble gjort søk etter deuterert gentamicin og tobramycin uten hell. Deuterert gentamicin og tobramycin kunne vært bedre IS enn sisomicin. Ut fra tallene som er brukt i standardkurvene (tabell 30-37 i appendiks 8.1.) kan en se at IS arealene drifter litt. Det at IS arealene drifter litt kan være et tegn på at sisomicin ikke er optimal som internstandard i dette tilfellet.

5.6. Validering

Metoden som er utviklet tilfredsstiller ikke avdelingens krav med hensyn på linearitet og relativt standardavvik. Ved analyse av pasientprøver ble resultatene sammenliknet med antatte sanne verdier for innhold av gentamicin. Det ble målt både for høye og for lave verdier. Dette tyder på at metoden ikke har en bestemt systematisk feil. Men de til dels store avvik og spredning av enkeltresultat tyder på at tilfeldige feil kan gi store utslag i begge retninger. Et

eksempel på dette er at muligens kan graden av overgang fra $(M+H)^+$ til ett produktion variere noe fra gang til gang.

5.7. Feilkilder

Det ble funnet i litteraturen at aminoglykosidene binder til glass [12, 29]. I dette arbeidet ble aminoglykosidene oppbevart i glass, noe som også kunne påvirket resultatene.

Selv om en bruker en IS som oppfører seg likt analytten, er det mulighet for eventuell interferens med matriks. Pipetteringsfeil er også en mulig feilkilde som kan påvirke resultatene, særlig når en jobber med små volum.

5.8. Fortsettelse av prosjektet

Det er en del mer som kan testes, det er planer om å fortsette metodeutviklingen med en nyutviklet amid- HILIC kolonne fra Waters som snart blir tilgjengelig, det ble ikke tid til å gjøre noe med dette i forbindelse med denne masteroppgaven. Planen videre er også å gjøre et korrelasjonsplott av pasientprøver analysert ved hjelp av immunoassay metoden og plote mot LC-MS/MS metoden.

6. KONKLUSJON

Det er utviklet en LC-MS/MS basert metode for kvantitative analyse av tobramycin og gentamicin i små prøvevolum (25 µl). Det ble gjort analyser av rene forbindelser av gentamicin og tobramycin i mobilfase, medikamentfritt serum tilsatt legemidlene og pasientprøver. Pasientprøvene ble sammenliknet med immunoassay metoden, som brukes ved UNN. Resultatene samsvarte ikke, noen konsentrasjoner lå under, mens andre lå høyere ved bruk av LC-MS/MS metoden. Dette er vanskelig å gi en forklaring på, men en mulig årsak kan at det ikke er brukt gentamicinsulfat med kjente mengdeforhold av de ulike forbindelsene (C_1 , C_2 og C_{1a}).

Metoden er tilfredsstillende med små prøvevolum. LOD og LOQ er tilfredsstillende nivå, men metoden når ikke gjeldende krav til linearitet ($R^2 \geq 0,99$) og relativt standardavvik ($RSD \leq \pm 15 \%$).

7. REFERANSER

1. Småbrekke, L., *Personlig meddelelse*
2. *Helse Bergen S- Aminoglykosider*. 26.03.2009; Available from: http://www.helsebergen.no/helsepersonell/handboker/LabHandbok/lkb/s_-_Aminoglykosider.htm.
3. *Helse- midt Gentamicin og Tobramycin*. Available from: http://www.helsemidt.no/ftp/stolav/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ambbok.html.
4. *Helse-Nord, UNN prøvemateriale*. 10.07.2008; Available from: <http://www.unn.no/proevemateriale/category11670.html>.
5. Manyanga, V., et al., *Comparison of liquid chromatographic methods with direct detection for the analysis of gentamicin*. J Pharmaceut Biomed Anal, 2007. **45**(2): p. 257-262.
6. Heller, D.N., S.B. Clark, and H.F. Righter, *Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(1): p. 39-49.
7. Cherlet, M., et al., *Quantitative analysis of gentamicin in animal tissues by ion- pair reversed phase high- performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry*
8. Keevil, B.G., S.J. Lockhart, and D.P. Cooper, *Determination of tobramycin in serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with a fluorescence polarisation assay*. J Chromatogr B, 2003. **794**(2): p. 329-335.
9. Clarot, I., et al., *Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*. J Chromatogr, 2004. **1031**(1-2): p. 281-287.
10. Maitra, S.K., et al., *Determination of aminoglycoside antibiotics in biological fluids: a review*. Clin Chem, 1979. **25**(8): p. 1361-7.
11. Oertel, R., V. Neumeister, and W. Kirch, *Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum*. J Chromatogr A, 2004. **1058**(1-2): p. 197-201.
12. Attema-de Jonge, M.E., et al., *Simple and sensitive method for quantification of low tobramycin concentrations in human plasma using HPLC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **862**(1-2): p. 257-62.
13. Isoherranen, N. and S. Soback, *Determination of gentamicin C₁, C_{1a} and C₂ in Plasma and Urine by HPLC*. Clin Chem, 2000. **46**: p. 837-842.
14. Guo, M.X., L. Wrisley, and E. Maygoo, *Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Anal Chim Acta, 2006. **571**(1): p. 12-6.
15. Pedersen- Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse 2004*: Fagbokforlaget. s. 215, 257-259, 261, 262, 271, 492, 493, 495-497.
16. Soltes, L., *Aminoglycoside antibiotics--two decades of their HPLC bioanalysis*. Biomed Chromatogr, 1999. **13**(1): p. 3-10.
17. Swartz, M.E., *UPLC: An introduction*. 2005.
18. Waters. *High- Pressure- Gradient System (figur)*. Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049064>.
19. Jensen, E., *Personlig meddelelse*.
20. Ashcroft, A.E., *Ionization methods in organic mass spectrometry*. 1997: The Royal Society of Chemistry. s. 19, 28, 29.
21. *Google- søk etter APCI figur*. Available from: http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/ency/pics/a_apci.gif.

22. Hoffmann, E.d. and V. Stroobant, *Mass spectrometry (principles and applications)*. 3 ed. 2007. s. 99,175, 189, 190.
23. Kazakevich, Y. and R. LoBrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007, New Jersey: Wiley. s. 291.
24. *Agilent Technologies (APPI figur)*. Available from: <http://www.chem.agilent.com/EN-US/PRODUCTS/INSTRUMENTS/MS/ATMOSPHERICPRESSUREPHOTOIONIZATIONSOURCE/Pages/gp2294.aspx>.
25. Waters. *MS- Mass spectrometry*. Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10073244> - <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10091204>.
26. *Google- søk etter bilder*. Available from: http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HP_LC_ESI_MS_3.gif.
27. *Wikipedia MS/MS figur*. Available from: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MS_MS.png.
28. Ishii, R., et al., *Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Food Addit Contam, 2008: p. 1-11.
29. Cherlet, M., S.D. Baere, and P.D. Backer, *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): p. 1342-50.

8. APPENDIKS

8.1. Appendiks A

Tabell 26. Tabellen viser en oversikt over konsentrasjonene til de ulike fragmentene i standardrekka.

| Konsentrasjon (µM) | Tobramycin | Gentamicin total | Gentamicin C1 (41,2 %) | Gentamicin C2(49,4 %) | Gentamicin C1a(9,4 %) |
|--------------------|------------|------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Standard 1 | 25,60 | 40,96 | 16,88 | 20,23 | 3,85 |
| Standard 2 | 12,80 | 20,48 | 8,44 | 10,12 | 1,93 |
| Standard 3 | 6,40 | 10,24 | 4,22 | 5,06 | 0,96 |
| Standard 4 | 3,20 | 5,12 | 2,11 | 2,53 | 0,48 |
| Standard 5 | 1,60 | 2,56 | 1,05 | 1,26 | 0,24 |
| Standard 6 | 0,80 | 1,28 | 0,53 | 0,63 | 0,12 |

Tabell 27. Tabellen viser en oversikt over konsentrasjonene av de ulike forbindelsene i standardrekka som ble brukt i starten av metodeutviklingen.

| Konsentrasjon (µM) | Tobramycin | Gentamicin total | Gentamicin C1 (41,2 %) | Gentamicin C2(49,4 %) | Gentamicin C1a(9,4 %) |
|--------------------|------------|------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Standard 1 | 24,00 | 38,40 | 15,82 | 18,97 | 3,61 |
| Standard 2 | 12,00 | 19,20 | 7,91 | 9,48 | 1,80 |
| Standard 3 | 6,00 | 9,60 | 3,96 | 4,74 | 0,90 |
| Standard 4 | 3,00 | 4,80 | 1,98 | 2,37 | 0,45 |
| Standard 5 | 1,50 | 2,40 | 0,99 | 1,19 | 0,23 |
| Standard 6 | 0,75 | 1,20 | 0,49 | 0,59 | 0,11 |

Tabell 28. Oversikt over hvordan opparbeidelsen av prøvene ved validering av repeterbarhet ble gjort. Alle prøvene ble tilsatt 240 µl IS (5 µM) før 75 µl fellingsreagens (10 % TCA).

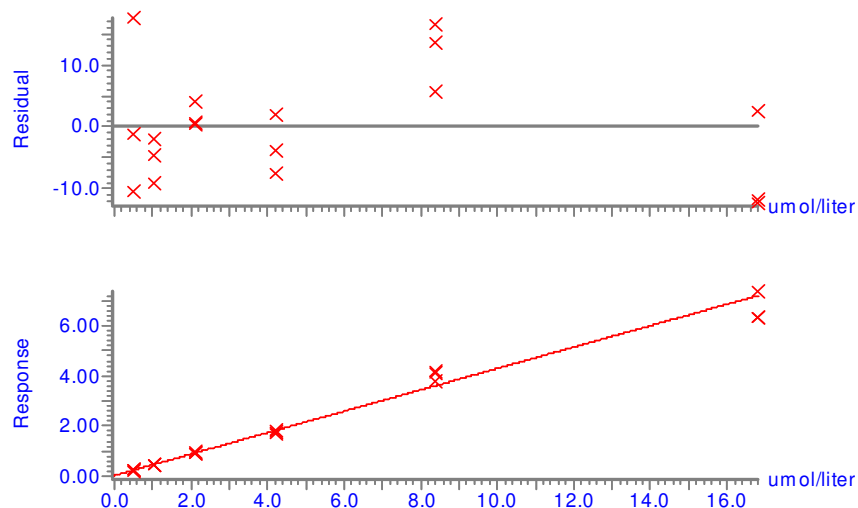
| Eppendorfrør | 75 µl fra prøven: |
|-----------------|-------------------|
| R1. Parallell 1 | 10 µM, R1 |
| R1. Parallell 2 | 10 µM, R1 |
| R1. Parallell 3 | 10 µM, R1 |
| R1. Parallell 4 | 10 µM, R1 |
| R1. Parallell 5 | 10 µM, R1 |
| R1. Parallell 6 | 10 µM, R1 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |
| R2. Parallell 1 | 3 µM, R2 |

Tabell 29. Oversikt over konsentrasjoner av standarder, nivå og repeterbarhet (fra valideringen).

| Konsentrasjon (μM) | Tobramycin | Gentamicin total | Gentamicin C1 (41,2 %) | Gentamicin C2(49,4 %) | Gentamicin C1a(9,4 %) |
|--|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Standard 1 | 25,60 | 40,96 | 16,88 | 20,23 | 3,85 |
| Standard 2 | 12,80 | 20,48 | 8,44 | 10,12 | 1,93 |
| Standard 3 | 6,40 | 10,24 | 4,22 | 5,06 | 0,96 |
| Standard 4 | 3,20 | 5,12 | 2,11 | 2,53 | 0,48 |
| Standard 5 | 1,60 | 2,56 | 1,05 | 1,26 | 0,24 |
| Standard 6 | 0,80 | 1,28 | 0,53 | 0,63 | 0,12 |
| Nivå 0 | 3,00 | 4,80 | 1,98 | 2,37 | 0,45 |
| Nivå 1 | 7,90 | 12,64 | 5,21 | 6,24 | 1,19 |
| Nivå 2 | 3,10 | 4,96 | 2,04 | 2,45 | 0,47 |
| Nivå 3 | 1,90 | 3,04 | 1,25 | 1,50 | 0,29 |
| Nivå 0 | 3,00 | 4,80 | 1,98 | 2,37 | 0,45 |
| Repeterbarhet 2 | 10,00 | 16,00 | 6,59 | 7,90 | 1,50 |
| Repeterbarhet 3 | 3,00 | 4,80 | 1,98 | 2,37 | 0,45 |

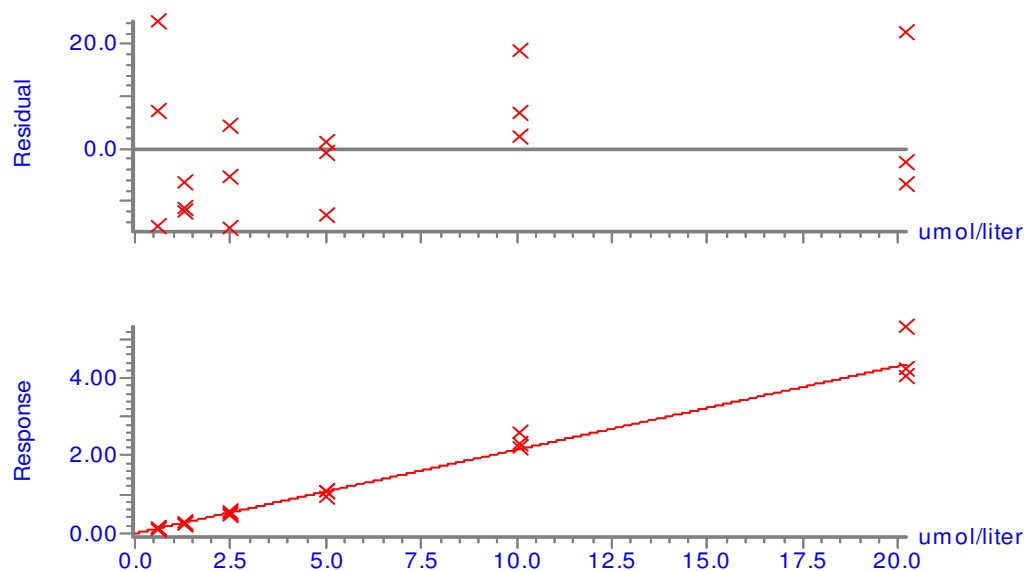
8.1.1. Standardkurver

Compound name: GentamicinC1 322
 Correlation coefficient: $r = 0.992682$, $r^2 = 0.985418$
 Calibration curve: $0.42697 * x + 0.0298911$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



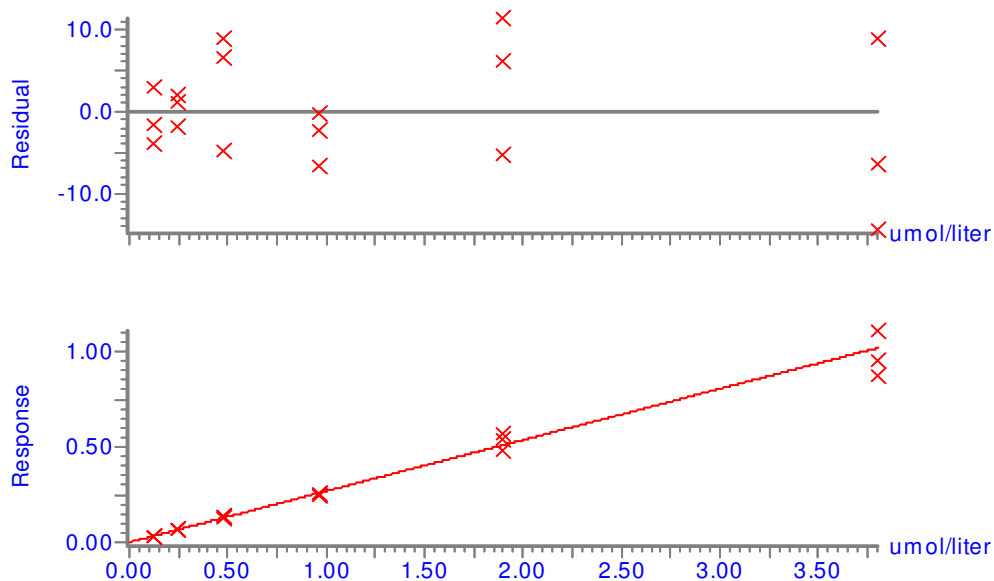
Figur 21. Standardkurve og residualplott av gentamicin C1 produksjon 322.

Compound name: GentamicinC2 322
 Correlation coefficient: $r = 0.986763$, $r^2 = 0.973701$
 Calibration curve: $0.21556 * x + -0.00347702$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



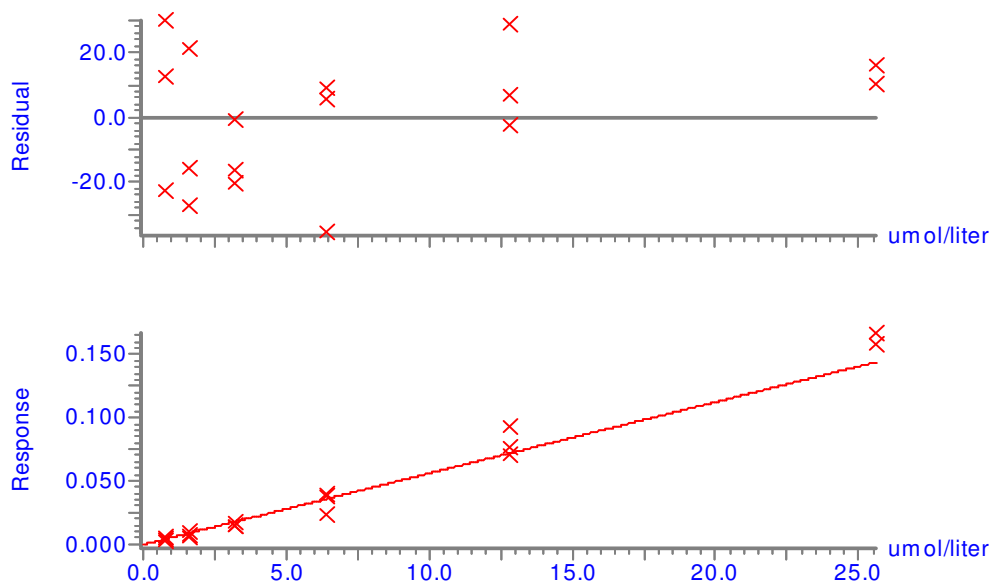
Figur 22. Standardkurve og residualplott av gentamicin C2 produksjon 322.

Compound name: GentamicinC1a 322
 Correlation coefficient: $r = 0.995967$, $r^2 = 0.991950$
 Calibration curve: $0.267973 * x + 0.000945192$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



Figur 23. Standardkurve og residualplott av gentamicin C1 produksjon 322.

Compound name: Tobramycin324
 Correlation coefficient: $r = 0.964543$, $r^2 = 0.930343$
 Calibration curve: $0.00564465 * x + -0.000500524$
 Response type: Internal Std (Ref 9), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



Figur 24. Standardkurve og residualplott av tobramycin produksjon 324.

8.1.2. Tabell standardkurvene

Tabell 30. Tabellen viser tallene for gentamicin C₁, produksjon 157, brukt til standardkurve.

| GentamicinC ₁ 157 | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 2,1 | 2,81 | 1159 | 7728 | 0,15 | S4 Parallell 1 | 2,17 | 3,4 |
| Standard | 1,05 | 2,77 | 336 | 8685 | 0,039 | S5 Parallell 1 | 0,83 | -20,5 |
| Standard | 0,5 | 2,78 | 230 | 10377 | 0,022 | S6 Parallell 1 | 0,64 | 27,2 |
| Standard | 16,8 | 2,8 | 17983 | 13078 | 1,375 | S1 Parallell 2 | 16,9 | 0,6 |
| Standard | 8,4 | 2,8 | 6225 | 8961 | 0,695 | S2 Parallell 2 | 8,72 | 3,8 |
| Standard | 4,2 | 2,77 | 2811 | 10144 | 0,277 | S3 Parallell 2 | 3,7 | -11,9 |
| Standard | 2,1 | 2,76 | 1210 | 11270 | 0,107 | S4 Parallell 2 | 1,66 | -21 |
| Standard | 1,05 | 2,78 | 517 | 10146 | 0,051 | S5 Parallell 2 | 0,98 | -6,5 |
| Standard | 0,5 | 2,79 | 281 | 10491 | 0,027 | S6 Parallell 2 | 0,69 | 38,2 |
| Standard | 16,8 | 2,79 | 21261 | 14681 | 1,448 | S1 Parallell 3 | 17,78 | 5,8 |
| Standard | 8,4 | 2,78 | 8739 | 13358 | 0,654 | S2 Parallell 3 | 8,23 | -2 |
| Standard | 2,1 | 2,75 | 1755 | 15412 | 0,114 | S4 Parallell 3 | 1,74 | -17,3 |
| Standard | 1,05 | 2,74 | 784 | 15377 | 0,051 | S5 Parallell 3 | 0,98 | -6,4 |
| Standard | 0,5 | 2,75 | 214 | 15637 | 0,014 | S6 Parallell 3 | 0,53 | 6,7 |

Tabell 31. Tabellen viser tallene for gentamicin C₁, produksjon 322, brukt til standardkurve.

| GentamicinC ₁ 322 | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 16,8 | 1,59 | 45102 | 6114 | 7,376 | S1 Parallell 1 | 17,21 | 2,4 |
| Standard | 8,4 | 1,58 | 27669 | 6580 | 4,205 | S2 Parallell 1 | 9,78 | 16,4 |
| Standard | 4,2 | 1,57 | 14849 | 8803 | 1,687 | S3 Parallell 1 | 3,88 | -7,6 |
| Standard | 2,1 | 1,57 | 7096 | 7362 | 0,964 | S4 Parallell 1 | 2,19 | 4,2 |
| Standard | 1,05 | 1,57 | 4277 | 9351 | 0,457 | S5 Parallell 1 | 1 | -4,6 |
| Standard | 0,5 | 1,58 | 1939 | 8060 | 0,241 | S6 Parallell 1 | 0,49 | -1,3 |
| Standard | 16,8 | 1,59 | 52127 | 8198 | 6,359 | S1 Parallell 2 | 14,82 | -11,8 |
| Standard | 8,4 | 1,59 | 28508 | 6941 | 4,107 | S2 Parallell 2 | 9,55 | 13,7 |
| Standard | 4,2 | 1,58 | 14747 | 8415 | 1,752 | S3 Parallell 2 | 4,03 | -3,9 |
| Standard | 2,1 | 1,57 | 8316 | 8944 | 0,93 | S4 Parallell 2 | 2,11 | 0,4 |
| Standard | 1,05 | 1,6 | 4354 | 9276 | 0,469 | S5 Parallell 2 | 1,03 | -2 |
| Standard | 0,5 | 1,59 | 2136 | 9659 | 0,221 | S6 Parallell 2 | 0,45 | -10,4 |
| Standard | 16,8 | 1,6 | 54040 | 8548 | 6,322 | S1 Parallell 3 | 14,74 | -12,3 |
| Standard | 8,4 | 1,58 | 30492 | 7985 | 3,819 | S2 Parallell 3 | 8,87 | 5,6 |
| Standard | 4,2 | 1,57 | 16312 | 8782 | 1,857 | S3 Parallell 3 | 4,28 | 1,9 |
| Standard | 2,1 | 1,56 | 9184 | 9841 | 0,933 | S4 Parallell 3 | 2,12 | 0,8 |
| Standard | 1,05 | 1,56 | 4396 | 10038 | 0,438 | S5 Parallell 3 | 0,96 | -9 |
| Standard | 0,5 | 1,56 | 2604 | 9271 | 0,281 | S6 Parallell 3 | 0,59 | 17,6 |

Tabell 32. Tabellen viser tallene for gentamicin C₂, produksjon 322, brukt til standardkurve.

| Gentamicin C₂ 322 | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 32534 | 6114 | 5,321 | S1Parallell 1 | 24,7 | 22,3 |
| Standard | 10,1 | 1,57 | 16982 | 6580 | 2,581 | S2 Parallell 1 | 11,99 | 18,7 |
| Standard | 5 | 1,56 | 8255 | 8803 | 0,938 | S3 Parallell 1 | 4,37 | -12,7 |
| Standard | 2,5 | 1,57 | 4113 | 7362 | 0,559 | S4 Parallell 1 | 2,61 | 4,3 |
| Standard | 1,3 | 1,56 | 2289 | 9351 | 0,245 | S5 Parallell 1 | 1,15 | -11,4 |
| Standard | 0,6 | 1,56 | 1268 | 8060 | 0,157 | S6 Parallell 1 | 0,75 | 24,4 |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 33260 | 8198 | 4,057 | S1 Parallell 2 | 18,84 | -6,7 |
| Standard | 10,1 | 1,58 | 16126 | 6941 | 2,323 | S2 Parallell 2 | 10,79 | 6,9 |
| Standard | 5 | 1,57 | 9151 | 8415 | 1,087 | S3 Parallell 2 | 5,06 | 1,2 |
| Standard | 2,5 | 1,56 | 4531 | 8944 | 0,507 | S4 Parallell 2 | 2,37 | -5,4 |
| Standard | 1,3 | 1,57 | 2260 | 9276 | 0,244 | S5 Parallell 2 | 1,15 | -11,8 |
| Standard | 0,6 | 1,57 | 1032 | 9659 | 0,107 | S6 Parallell 2 | 0,51 | -14,7 |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 36220 | 8548 | 4,237 | S1 Parallell 3 | 19,67 | -2,6 |
| Standard | 10,1 | 1,56 | 17794 | 7985 | 2,229 | S2 Parallell 3 | 10,35 | 2,5 |
| Standard | 5 | 1,55 | 9370 | 8782 | 1,067 | S3 Parallell 3 | 4,97 | -0,7 |
| Standard | 2,5 | 1,55 | 4468 | 9841 | 0,454 | S4 Parallell 3 | 2,12 | -15,1 |
| Standard | 1,3 | 1,55 | 2594 | 10038 | 0,258 | S5 Parallell 3 | 1,22 | -6,5 |
| Standard | 0,6 | 1,55 | 1256 | 9271 | 0,135 | S6 Parallell 3 | 0,64 | 7,4 |

Tabell 33. Tabellen viser tallene for gentamicin C₂, produksjon 160, brukt til standardkurve.

| Gentamicin C₂ 160 | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 19396 | 6114 | 3,172 | S1Parallell 1 | 23,88 | 18,2 |
| Standard | 10,1 | 1,57 | 10267 | 6580 | 1,56 | S2 Parallell 1 | 11,74 | 16,2 |
| Standard | 5 | 1,56 | 5294 | 8803 | 0,601 | S3 Parallell 1 | 4,52 | -9,6 |
| Standard | 2,5 | 1,57 | 2313 | 7362 | 0,314 | S4 Parallell 1 | 2,36 | -5,7 |
| Standard | 1,3 | 1,56 | 1404 | 9351 | 0,15 | S5 Parallell 1 | 1,12 | -13,7 |
| Standard | 0,6 | 1,56 | 688 | 8060 | 0,085 | S6 Parallell 1 | 0,63 | 5,6 |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 21177 | 8198 | 2,583 | S1 Parallell 2 | 19,44 | -3,7 |
| Standard | 10,1 | 1,58 | 9993 | 6941 | 1,44 | S2 Parallell 2 | 10,83 | 7,3 |
| Standard | 5 | 1,57 | 5545 | 8415 | 0,659 | S3 Parallell 2 | 4,95 | -1 |
| Standard | 2,5 | 1,56 | 2907 | 8944 | 0,325 | S4 Parallell 2 | 2,44 | -2,5 |
| Standard | 1,3 | 1,57 | 1532 | 9276 | 0,165 | S5 Parallell 2 | 1,23 | -5,1 |
| Standard | 0,6 | 1,57 | 770 | 9659 | 0,08 | S6 Parallell 2 | 0,59 | -1,6 |
| Standard | 20,2 | 1,57 | 21975 | 8548 | 2,571 | S1 Parallell 3 | 19,35 | -4,2 |
| Standard | 10,1 | 1,56 | 11319 | 7985 | 1,418 | S2 Parallell 3 | 10,66 | 5,6 |
| Standard | 5 | 1,56 | 5616 | 8782 | 0,639 | S3 Parallell 3 | 4,81 | -3,9 |
| Standard | 2,5 | 1,55 | 2957 | 9841 | 0,301 | S4 Parallell 3 | 2,25 | -9,9 |
| Standard | 1,3 | 1,56 | 1723 | 10038 | 0,172 | S5 Parallell 3 | 1,28 | -1,3 |
| Standard | 0,6 | 1,56 | 819 | 9271 | 0,088 | S6 Parallell 3 | 0,66 | 9,3 |

Tabell 34. Tabellen viser tallene for gentamicin C_{1a}, produktion 322, brukt til standardkurve.

| Gentamicin C _{1a} 322 | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 3,8 | 2,73 | 8703 | 9852 | 0,883 | S1 Parallell 1 | 3,32 | -12,5 |
| Standard | 1,9 | 2,76 | 4644 | 9385 | 0,495 | S2 Parallell 1 | 1,85 | -2,7 |
| Standard | 0,96 | 2,76 | 2863 | 11360 | 0,252 | S3 Parallell 1 | 0,93 | -3,3 |
| Standard | 0,48 | 2,81 | 912 | 7728 | 0,118 | S4 Parallell 1 | 0,42 | -12,6 |
| Standard | 0,24 | 2,77 | 642 | 8685 | 0,074 | S5 Parallell 1 | 0,25 | 5,1 |
| Standard | 0,12 | 2,78 | 413 | 10377 | 0,04 | S6 Parallell 1 | 0,12 | 2,2 |
| Standard | 3,8 | 2,78 | 12963 | 13078 | 0,991 | S1 Parallell 2 | 3,73 | -1,8 |
| Standard | 1,9 | 2,79 | 4873 | 8961 | 0,544 | S2 Parallell 2 | 2,04 | 7,1 |
| Standard | 0,96 | 2,76 | 2783 | 10144 | 0,274 | S3 Parallell 2 | 1,01 | 5,5 |
| Standard | 0,48 | 2,75 | 1594 | 11270 | 0,141 | S4 Parallell 2 | 0,51 | 5,9 |
| Standard | 0,24 | 2,78 | 767 | 10146 | 0,076 | S5 Parallell 2 | 0,26 | 7,7 |
| Standard | 0,12 | 2,79 | 419 | 10491 | 0,04 | S6 Parallell 2 | 0,12 | 2,8 |
| Standard | 3,8 | 2,76 | 16096 | 14681 | 1,096 | S1 Parallell 3 | 4,13 | 8,7 |
| Standard | 1,9 | 2,76 | 7361 | 13358 | 0,551 | S2 Parallell 3 | 2,06 | 8,6 |
| Standard | 0,96 | 2,72 | 3894 | 15072 | 0,258 | S3 Parallell 3 | 0,95 | -0,8 |
| Standard | 0,48 | 2,75 | 1919 | 15412 | 0,125 | S4 Parallell 3 | 0,44 | -7,5 |
| Standard | 0,24 | 2,73 | 1068 | 15377 | 0,069 | S5 Parallell 3 | 0,24 | -2 |
| Standard | 0,12 | 2,75 | 560 | 15637 | 0,036 | S6 Parallell 3 | 0,11 | -10,5 |

Tabell 35. Tabellen viser tallene for gentamicin C_{1a}, produktion 160, brukt til standardkurve.

| Gentamicin C _{1a} 160 | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 1,9 | 2,76 | 2981 | 9385 | 0,318 | S2 Parallell 1 | 1,91 | 0,7 |
| Standard | 0,96 | 2,76 | 1718 | 11360 | 0,151 | S3 Parallell 1 | 0,85 | -11,7 |
| Standard | 0,48 | 2,81 | 712 | 7728 | 0,092 | S4 Parallell 1 | 0,47 | -2,3 |
| Standard | 0,24 | 2,77 | 481 | 8685 | 0,055 | S5 Parallell 1 | 0,23 | -2,6 |
| Standard | 0,12 | 2,78 | 429 | 10377 | 0,041 | S6 Parallell 1 | 0,14 | 19,9 |
| Standard | 3,8 | 2,78 | 8108 | 13078 | 0,62 | S1 Parallell 2 | 3,85 | 1,3 |
| Standard | 1,9 | 2,79 | 2939 | 8961 | 0,328 | S2 Parallell 2 | 1,98 | 4,2 |
| Standard | 0,96 | 2,76 | 1678 | 10144 | 0,165 | S3 Parallell 2 | 0,94 | -2,2 |
| Standard | 0,48 | 2,75 | 1095 | 11270 | 0,097 | S4 Parallell 2 | 0,5 | 4,5 |
| Standard | 0,24 | 2,78 | 555 | 10146 | 0,055 | S5 Parallell 2 | 0,23 | -4,4 |
| Standard | 0,12 | 2,79 | 385 | 10491 | 0,037 | S6 Parallell 2 | 0,11 | -4,6 |
| Standard | 3,8 | 2,76 | 8971 | 14681 | 0,611 | S1 Parallell 3 | 3,79 | -0,2 |
| Standard | 1,9 | 2,76 | 4387 | 13358 | 0,328 | S2 Parallell 3 | 1,98 | 4,4 |
| Standard | 0,96 | 2,72 | 2321 | 15072 | 0,154 | S3 Parallell 3 | 0,87 | -9,9 |
| Standard | 0,48 | 2,75 | 1417 | 15412 | 0,092 | S4 Parallell 3 | 0,47 | -2,4 |
| Standard | 0,12 | 2,75 | 603 | 15637 | 0,039 | S6 Parallell 3 | 0,13 | 5,2 |

Tabell 36. Tabellen viser tallene for tobramycin, produksjon 163, brukt til standardkurve.

| Tobramycin163 | | | | | | | | |
|---------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 25,6 | 2,7 | 4240 | 9852 | 0,43 | S1 Parallell 1 | 36,13 | 41,1 |
| Standard | 12,8 | 2,73 | 1711 | 9385 | 0,182 | S2 Parallell 1 | 15,62 | 22 |
| Standard | 6,4 | 2,74 | 671 | 11360 | 0,059 | S3 Parallell 1 | 5,43 | -15,1 |
| Standard | 3,2 | 2,79 | 245 | 7728 | 0,032 | S4 Parallell 1 | 3,17 | -1,1 |
| Standard | 1,6 | 2,75 | 121 | 8685 | 0,014 | S5 Parallell 1 | 1,7 | 6 |
| Standard | 0,8 | 2,75 | 87 | 10377 | 0,008 | S6 Parallell 1 | 1,24 | 55,2 |
| Standard | 25,6 | 2,76 | 3302 | 13078 | 0,253 | S1 Parallell 2 | 21,43 | -16,3 |
| Standard | 12,8 | 2,77 | 1374 | 8961 | 0,153 | S2 Parallell 2 | 13,22 | 3,3 |
| Standard | 6,4 | 2,74 | 533 | 10144 | 0,053 | S3 Parallell 2 | 4,89 | -23,6 |
| Standard | 3,2 | 2,72 | 348 | 11270 | 0,031 | S4 Parallell 2 | 3,1 | -3,1 |
| Standard | 1,6 | 2,75 | 107 | 10146 | 0,011 | S5 Parallell 2 | 1,42 | -11,3 |
| Standard | 0,8 | 2,78 | 85 | 10491 | 0,008 | S6 Parallell 2 | 1,22 | 52,4 |
| Standard | 25,6 | 2,73 | 4277 | 14681 | 0,291 | S1 Parallell 3 | 24,63 | -3,8 |
| Standard | 12,8 | 2,74 | 1417 | 13358 | 0,106 | S2 Parallell 3 | 9,32 | -27,2 |
| Standard | 6,4 | 2,68 | 675 | 15072 | 0,045 | S3 Parallell 3 | 4,25 | -33,6 |
| Standard | 3,2 | 2,72 | 329 | 15412 | 0,021 | S4 Parallell 3 | 2,31 | -27,8 |
| Standard | 1,6 | 2,7 | 145 | 15377 | 0,009 | S5 Parallell 3 | 1,32 | -17,3 |

Tabell 37. Tabellen viser tallene for tobramycin, produksjon 324, brukt til standardkurve.

| Tobramycin324 | | | | | | | | |
|---------------|---------------|------|---------------|----------|---------|----------------|-------|-------|
| Type | Standard kons | RT | Areal analytt | Areal IS | Respons | Prøve tekst | µM | %Dev |
| Standard | 12,8 | 1,52 | 608 | 6580 | 0,092 | S2 Parallell 1 | 16,47 | 28,7 |
| Standard | 6,4 | 1,5 | 201 | 8803 | 0,023 | S3 Parallell 1 | 4,14 | -35,4 |
| Standard | 3,2 | 1,52 | 128 | 7362 | 0,017 | S4 Parallell 1 | 3,18 | -0,6 |
| Standard | 1,6 | 1,52 | 57 | 9351 | 0,006 | S5 Parallell 1 | 1,17 | -27,1 |
| Standard | 0,8 | 1,51 | 43 | 8060 | 0,005 | S6 Parallell 1 | 1,04 | 30 |
| Standard | 25,6 | 1,53 | 1301 | 8198 | 0,159 | S1 Parallell 2 | 28,2 | 10,2 |
| Standard | 12,8 | 1,54 | 531 | 6941 | 0,077 | S2 Parallell 2 | 13,65 | 6,6 |
| Standard | 6,4 | 1,53 | 328 | 8415 | 0,039 | S3 Parallell 2 | 6,99 | 9,2 |
| Standard | 3,2 | 1,5 | 125 | 8944 | 0,014 | S4 Parallell 2 | 2,56 | -20,1 |
| Standard | 1,6 | 1,52 | 97 | 9276 | 0,01 | S5 Parallell 2 | 1,94 | 21,1 |
| Standard | 0,8 | 1,51 | 29 | 9659 | 0,003 | S6 Parallell 2 | 0,62 | -22,9 |
| Standard | 25,6 | 1,52 | 1428 | 8548 | 0,167 | S1 Parallell 3 | 29,68 | 15,9 |
| Standard | 12,8 | 1,51 | 559 | 7985 | 0,07 | S2 Parallell 3 | 12,49 | -2,4 |
| Standard | 6,4 | 1,51 | 332 | 8782 | 0,038 | S3 Parallell 3 | 6,78 | 5,9 |
| Standard | 3,2 | 1,5 | 144 | 9841 | 0,015 | S4 Parallell 3 | 2,68 | -16,2 |
| Standard | 1,6 | 1,51 | 72 | 10038 | 0,007 | S5 Parallell 3 | 1,35 | -15,5 |
| Standard | 0,8 | 1,5 | 42 | 9271 | 0,005 | S6 Parallell 3 | 0,9 | 12,5 |