



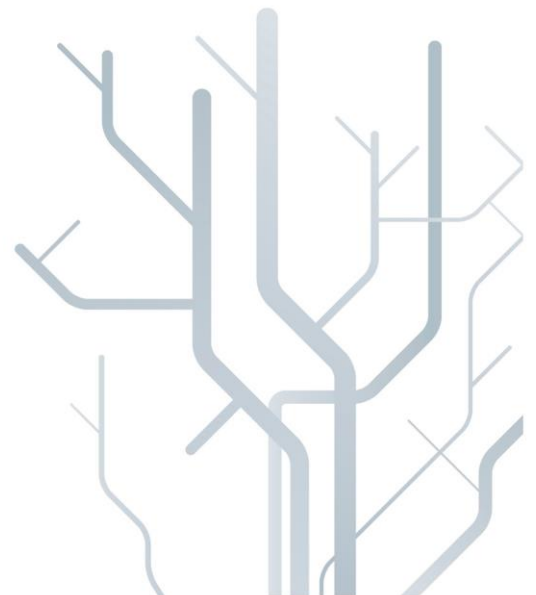
# Kvantitativ analyse av gentamicin i blodprøver med LC-MS

Jan Olav Lindåsen

Masteroppgave i farmasi

Vår 2013

Veiledere: professor Einar Jensen og førsteamanuensis Lars Småbrekke





# Forord

---

Denne masteroppgaven ble påbegynt i oktober 2012 og fullført i mai 2013. Arbeidet ble utført ved avdeling for legemiddelkjemi på institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø.

Jeg vil takke hovedveileder Einar Jensen for å ha gitt meg en meningsfull og utfordrende oppgave med flere overraskelser underveis, og for å ha holdt styr på det dyreste og mest lunefulle maskineriet jeg noen gang har vært borti. Takk til biveileder Lars Småbrekke for gode råd og tilbakemeldinger samt tolmodighet til å lese gjennom de mange iterasjonene av oppgaven som nå omsider er ferdig. Begge to har delt masse nyttig kunnskap underveis.

Takk til Kirsten Fausa for korrekturlesing, og takk til Marianne Haug og Sveinung Ingebrigtsen for nyttige og motiverende innspill.

Sist men ikke minst vil jeg takk vennene mine fra Driv for å ha gjort studietiden veldig mye mer underholdende enn den ellers ville vært.

Tromsø, mai 2013

Jan Olav Lindåsen



# Forkortelser

Forkortelse	Norsk	Engelsk
<b>µg</b>	Mikrogram	Microgram
<b>µL</b>	Mikroliter	Microlitre
<b>ACN</b>	Acetonitril	Acetonitrile
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisasjon	Electrospray ionization
<b>FA</b>	Maursyre	Formic acid
<b>HETP</b>	Høydeekvivalenten til en teoretisk plate	Height equivalent to a theoretical plate
<b>HILIC</b>	Hydrofil interaksjonskromatografi	Hydrophilic interaction chromatography
<b>HPLC</b>	Høyeffektiv væskekromatografi	High performance liquid chromatography
<b>IS</b>	Intern standard	Internal standard
<b>kPa</b>	Kilopascal	Kilopascal
<b>kV</b>	Kilovolt	Kilovolt
<b>L</b>	Liter	Litre
<b>LC</b>	Væskekromatografi	Liquid chromatography
<b>m/z</b>	Masse-ladningsforhold	Mass-charge ratio
<b>mL</b>	Milliliter	Millilitre
<b>MS</b>	Massespektrometri	Mass spectrometry
<b>ng</b>	Nanogram	Nanogram
<b>PSI</b>	Pund per kvadrattomme	Pounds per square inch
<b>RSD</b>	Relativt standardavvik	Relative standard deviation
<b>s</b>	Estimat for standardavvik	Estimate of standard deviation
<b>SIR</b>	Selektiv ionemonitorering	Selected ion recording
<b>TCA</b>	Trikkloreddiksyre	Trichloroacetic acid
<b>TPN</b>	Total parenteral ernæring	Total Parenteral Nutrition
<b>U(H)PLC</b>	Ultraeffektiv væskekromatografi	Ultra (high) performance liquid chromatography
<b>V</b>	Volum	Volume
$\bar{x}$	Middelverdi	Average value



## Sammendrag

---

På grunn av fare for alvorlige bivirkninger blir dosering av gentamicin basert på rutinemessig måling av serumkonsentrasjon. I dag måles serumkonsentrasjon med en immunoassaymetode som krevet et prøvevolum på 200-500 µL blod. For tidlig fødte barn har et lite blodvolum, og det er derfor ønskelig med en metode som krever et mindre prøvevolum.

Formålet med prosjektet var å utvikle en LC-MS metode for analyse av gentamicin i et mindre blodvolum.

Prøvene ble opparbeidet med proteinfelling med TCA og sentrifugering etterfulgt av fjerning av fosfolipider med Ostrosystemet. UPLC-kromatografi ble utført med HILIC-kolonne og deteksjon med ESI-MS i SIR-modus. Flere metoder for å hindre gentamicin i å binde til glass ble forsøkt.

Det er utviklet en LC-MS analysemetode basert på et prøvevolum på 50 µL. Det lot seg ikke gjøre å finne en pålitelig måte å hindre gentamicinbinding til glass. Gentamicinkomponentene lot seg ikke separere kromatografisk, men gentamicin C1 ( $m/z = 478$ ) og gentamicin C1a ( $m/z = 450$ ) kunne kvantifiseres separat fra gentamicin C2, C2a og C2b ( $m/z = 464$ ) på grunn av masseforskjellen.

Metoden oppfyller valideringskrav til presisjon ( $RSD < \pm 15 \%$ ), men ikke linearitet ( $R^2 > 0,99$ ) og nøyaktighet (prosentavvik fra sann verdi  $< \pm 15 \%$ ). Følsomheten er ikke bra nok til å kvantifisere gentamicin i ønsket konsentrasjonsområde (0,5-10 mg/L).





# Innholdsfortegnelse

---

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>3</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>5</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Bakgrunn</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Klinisk problemstilling</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Gentamicin</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Dosering.....	14
<b>2.3 Analyse av aminoglykosider i terapeutisk sammenheng</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4 Prøveopparbeidelse</b> .....	<b>15</b>
2.4.1 Proteinfelling.....	16
2.4.2 Ostro .....	16
<b>2.5 Ultra high performance liquid chromatography (UPLC)</b> .....	<b>17</b>
2.5.1 Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) .....	20
<b>2.6 Massespektrometri (MS)</b> .....	<b>21</b>
2.6.1 Inlet.....	21
2.6.2 Massefilter.....	22
<b>2.7 Intern standard (IS)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.8 Validering</b> .....	<b>22</b>
2.8.1 Linearitet .....	23
2.8.2 Nøyaktighet.....	23
2.8.3 Presisjon.....	23
2.8.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense .....	23
<b>2.9 Gentamicinanalyse med LC-MS</b> .....	<b>23</b>
2.9.1 Analyse av rent stoff.....	24
2.9.2 Analyse av serum.....	25
2.9.3 Analyse av annet biologisk materiale.....	27
2.9.4 Oppsummering.....	27

<b>2.10</b>	<b>Formål</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>Materiale og metode</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Stoffer</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Utstyr</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Serum</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Intern Standard</b>	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>Prøveløsninger</b>	<b>30</b>
<b>3.6</b>	<b>UPLC</b>	<b>30</b>
3.6.1	Kolonne	30
3.6.2	Mobilfasesammensetning	31
3.6.3	Mobilfasegradient	31
3.6.4	Injeksjonsvolum	31
<b>3.7</b>	<b>Massespektrometri</b>	<b>31</b>
3.7.1	Ionekilde	32
<b>3.8</b>	<b>Respons og gentamicinbinding til glass</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Prøveopparbeidelse med Ostro</b>	<b>32</b>
<b>3.10</b>	<b>Validering</b>	<b>33</b>
3.10.1	Linearitet	33
3.10.2	Nøyaktighet	33
3.10.3	Presisjon	33
3.10.4	Deteksjons- og kvantifiseringsgrense	33
<b>4.</b>	<b>Resultater</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Intern standard</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>UPLC</b>	<b>35</b>
4.2.1	Separasjon	35
<b>4.3</b>	<b>Massespektrometri</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Splitting av analyttene i to topper</b>	<b>36</b>
4.4.1	Injeksjonsvolumets påvirkning på splitting	37
4.4.2	Initial mobilfases påvirkning på splitting	37
4.4.3	Effekt av C18 forkolonne på splitting	37
<b>4.5</b>	<b>Respons og gentamicinbinding til glass</b>	<b>38</b>

4.5.1	Sammensetning av vann og organisk løsemiddel i prøven.....	38
4.5.2	Vurdering av behov for prøver uten analytt mellom analysene .....	38
4.5.3	Bruk av syre og base for å hindre glassbinding.....	38
4.5.4	Bruk av syre og base for å hindre glassbinding (med forkolonne).....	39
4.5.5	Endret respons over tid for prøver med og uten 0,1 % marusyre .....	39
4.5.6	Holdbarhet for prøver med syre.....	39
4.5.7	Repeterte analysers innvirkning på responsen for påfølgende analyser .....	39
4.5.8	Syrebehandling av glassvialer .....	40
4.5.9	Sammensetning av vann og organisk løsemiddel i prøven (med forkolonne)..	40
<b>4.6</b>	<b>Prøveopparbeidelse med Ostro .....</b>	<b>41</b>
4.6.1	Gjenvinningsgrad for Ostro-systemet .....	41
4.6.2	Sammenligning av to alternative mengdeforhold av intern standard og TCA ..	41
4.6.3	Løsning brukt til å skylle prøven gjennom Ostro-systemet.....	41
<b>4.7</b>	<b>Validering.....</b>	<b>42</b>
4.7.1	Linearitet .....	42
4.7.2	Nøyaktighet.....	44
4.7.3	Presisjon.....	45
4.7.4	Deteksjons- og kvantifiseringsgrense .....	45
<b>5.</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Splitting av analytten i to topper .....</b>	<b>47</b>
5.1.1	Teori om årsaken til splittingen.....	47
<b>5.2</b>	<b>Respons og gentamicinbinding til glass .....</b>	<b>47</b>
5.2.1	Mekanisme for glassbinding .....	48
<b>5.3</b>	<b>Prøveopparbeidelse med Ostro .....</b>	<b>48</b>
5.3.1	Løsning brukt til å skylle prøven gjennom Ostro-systemet.....	48
<b>5.4</b>	<b>Validering.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b>Feilkilder .....</b>	<b>49</b>
5.5.1	Intern standard .....	49
5.5.2	Uspesifikk binding til glass .....	49
5.5.3	Pipetteringsfeil .....	49
<b>5.6</b>	<b>Videre arbeid .....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>51</b>

<b>7. Referanser .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Vedlegg .....</b>	<b>55</b>
<b>8.1 Splitting av analytten i to topper .....</b>	<b>55</b>
<b>8.2 Respons og gentamicinbinding til glass .....</b>	<b>56</b>
<b>8.3 Prøveopparbeidelse med Ostro .....</b>	<b>63</b>

# 1. Innledning

---

Premature barn er på grunn av nedsatt immunforsvar spesielt utsatt for infeksjoner. Gentamicin brukes i behandlingen av flere av disse infeksjonene (1), men har potensielt alvorlige bivirkninger og et smalt terapeutisk vindu. Derfor må serumkonsentrasjonen overvåkes. Nå brukes en immunologisk metode som krever 200-500  $\mu\text{L}$  blod (2-4). Premature barn har et lite blodvolum, og derfor er det ønskelig å ha tilgang til en analysemetode som krever et mindre prøvevolum.



## 2. Bakgrunn

---

### 2.1 Klinisk problemstilling

Blodvolumet hos for tidlig fødte barn er i gjennomsnitt 83-85 ml/kg (5, 6), og de minste barna kan veie ned mot 500 gram. Det lave blodvolumet gjør det lite ønskelig å ta hyppige blodprøver med et prøvevolum på 500 µL. Mange for tidlig fødte barn får også total parenteral ernæring (TPN) og det er uvisst om TPN påvirker resultatet for den immunologiske metoden (7).

Kombinasjonen av væskrokromatografi (LC) og massespektrometri (MS) som analysemetode antas å kreve et mindre prøvevolum enn den immunologiske metoden. Det har tidligere blitt forsøkt med et prøvevolum på 25 µL (7, 8).

En god metode for analyse med LC-MS kan bli et alternativ eller en erstatning for den immunologiske metoden. Metoden bør oppfylle kravene til laboratorieavdeling seksjon 5 ved UNN (7):

Linearitet:  $R^2 \geq 0,99$

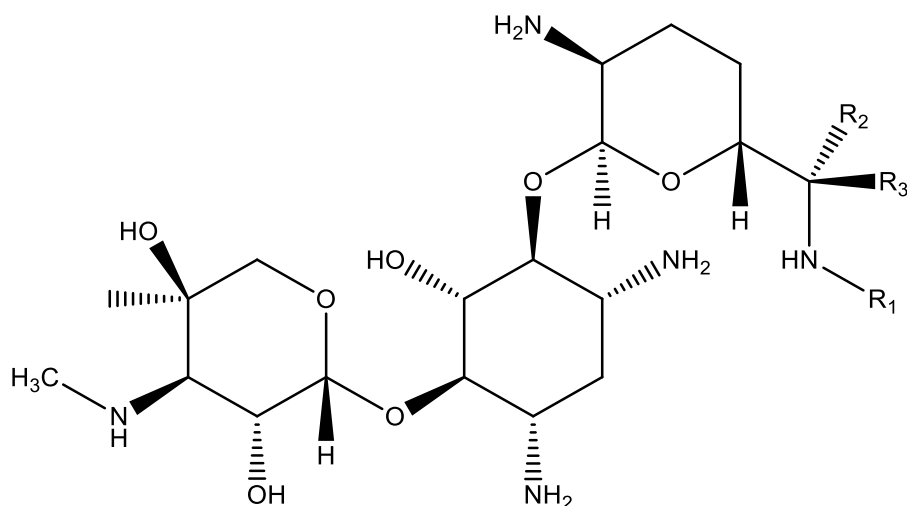
Nøyaktighet: Prosentavvik fra sann verdi  $< \pm 15 \%$

Presisjon: Relativt standardavvik  $\leq 15 \%$

### 2.2 Gentamicin

Gentamicin er en blanding av flere antibiotika i klassen aminoglykosider. Aminoglykosidene er polare forbindelser som brukes i behandling av en rekke infeksjoner. Vevsbinding gir høyere konsentrasjoner i nyrene og det indre øret. De mest alvorlige bivirkningene er ortotoksisitet og nefrotoksisitet.

I Ph. Eur. 7 er gentamicin beskrevet som en blanding av flere substanser produsert av *Micromonospora purpurea*. Hovedkomponentene er gentamicinene C1, C1a, C2, C2a og C2b. Molekylstrukturene er illustrert i figur 1. R-gruppene til de forskjellige gentamicinene, og mengdeforholdet av gentamicinene er vist i Tabell 1. Mengdeforholdet varierer mellom forskjellige produksjonspartier (8, 9). Fermenteringsprosessen som brukes i gentamicinproduksjon gir en rekke forurensninger. Flere av disse er identifiserte (10).



Figur 1. Generell gentamicinstruktur

Tabell 1. Oversikt over de enkelte gentamicinkomponentene. Krav til fordelingen er fastsatt av United States Pharmacopeia.

Forbindelse	CAS-NR	R1	R2	R3	Masse (g/mol)	Monoisotropisk masse (u)	Fordeling
<b>C1</b>	25876-10-2	CH3	CH3	H	477,60	477,32	25-50 %
<b>C1a</b>	26098-04-4	H	H	H	449,54	449,28	10-35 %
<b>C2</b>	25876-11-3	H	CH3	H	463,57	463,31	25-55 %
<b>C2a</b>	59751-72-3	H	H	CH3	463,57	463,31	
<b>C2b</b>	52093-21-7	CH3	H	H	463,57	463,31	

### 2.2.1 Dosering

Anbefalt dosering av gentamicin for voksne er 3-6 mg/kg/døgn fordelt på en eller to doser. For nyfødte er anbefalt dosering 4-7 mg/kg/døgn gitt som en enkeltdose hver 24-48 time (11) (12).

Effekten vedvarer etter at konsentrasjonen i blodet har gått under minste inhiberende konsentrasjon. Denne postantibiotiske effekten gjør at doseringshyppigheten kan reduseres til en dose daglig uten tap av effekt. Det lange doseringsintervallet gir lavere bunnkonsentrasjon, hvilket gir mindre akkumulering i nyrene.

En undersøkelse av farmakokinetisk profil for gentamicin hos premature barn viser at halveringstid og distribusjonsvolum er større hos barn med gestasjonsalder på under 30 uker sammenlignet med premature barn med gestasjonsalder på 30-34 uker. For premature barn er ekstracellulært væskevolum omvendt proporsjonalt med gestasjonsalder, og siden gentamicin er et polart molekyl er gentamicindistribusjonen avhengig av total mengde kroppsvann (13). Gestasjonsalder påvirker både halveringstid



og distribusjon, derfor må gestasjonsalder tas hensyn til i tillegg til vekten når dose for premature barn beregnes.

Tabell 2 viser anbefalte serumkonsentrasjoner og tidspunkt for prøvetakning ved gentamicinbehandling. Kilden nevner ikke om disse anbefalingene gjelder uansett alder.

**Tabell 2. Anbefalte serumkonsentrasjon for gentamicinbehandling (14). Det er stort sett gått bort fra behandling med flerdoseregime.**

	Endoseregime		Flerdoseregime (2-3x)	
<b>Måletidspunkt</b>	Rett før neste dose	8 timer etter dose	Rett før neste dose	1 time etter dose
<b>Konsentrasjon</b>	< 0,5 mg/l	1,5 - 4 mg/l	< 2 mg/l	5-10 mg/l

### 2.3 Analyse av aminoglykosider i terapeutisk sammenheng

Til terapeutisk monitorering av aminoglykosider er det hovedsaklig fluorescens polarisasjon immunoassay som er i bruk (15).

Immunoassaymetodene baserer seg på kompetitiv binding til antistoff. Mengdeforholdet mellom gentamicinene kan ikke måles med immunoassaymetoden, og det er uklart om de forskjellige gentamicinkomponentene gir ulikt utslag i målingen (16).

Økt selektivitet og potensiale for økt følsomhet gjør LC-MS et lovende alternativ til immunoassay. Økt følsomhet vil kreve mindre prøvevolum, og evnen til separat kvantifisering av gentamicinkomponentene er nyttig om det oppdages at disse har forskjellig virknings- eller bivirkningsprofil.

Før blodprøver kan analyseres med LC-MS må prøven opparbeides (17). Dette gjør LC-MS analyse mer krevende å gjennomføre enn immunoassay som i mindre grad krever prøveoppbeidelse.

### 2.4 Prøveoppbeidelse

Prøveoppbeidelse er nødvendig fordi blod inneholder proteiner som kan felle ut i UPLC-kolonnen, og fosfolipider samt andre overflateaktive stoffer som påvirker effektiviteten til elektroprayonisering (18).

### 2.4.1 Proteinfelling

Proteiner i serum kan felle ut i UPLC-kolonnen og tette den igjen. Derfor må proteinene fjernes før analyse. Ved å tilsette trikloreddiksyre (TCA) feller proteinene ut, og når prøven er sentrifugert vil proteinene ligge på bunnen slik at man kan pipettere ut supernatanten uten å få med proteinene.

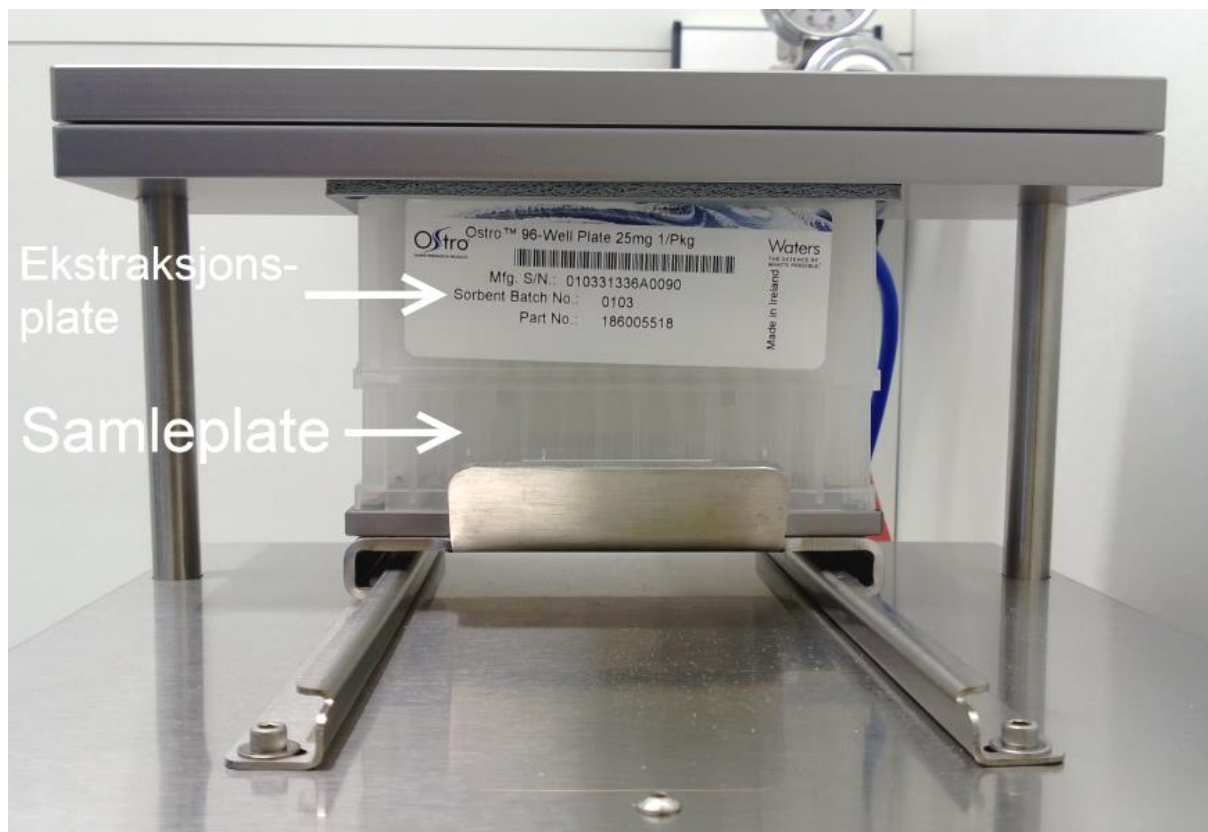
### 2.4.2 Ostro

Ostro er et system for fjerning av fosfolipider fra plasma og serum. Systemet består av en ekstraksjonsplate med 96 brønner, og en samleplate plassert under.

Den generiske standardprosedyren for prøveopparbeiding med Ostro er som følger:

- 50-200  $\mu$ L serum tilsettes en brønn i ekstraksjonsplaten.
- 1 % maursyre (FA) i acetonitril (ACN) tilsettes i forholdet 3:1 med mengden serum.
- Løsningen blandes manuelt ved pipettering.
- Ved hjelp av trykk på 60 PSI (414 kPa) i 5 minutter passerer prøven gjennom en matriks i ekstraksjonsplaten som holder igjen fosfolipidene. Prøven renner ned i samleplaten.
- Samleplaten settes rett i UPLC-maskinen for analyse.

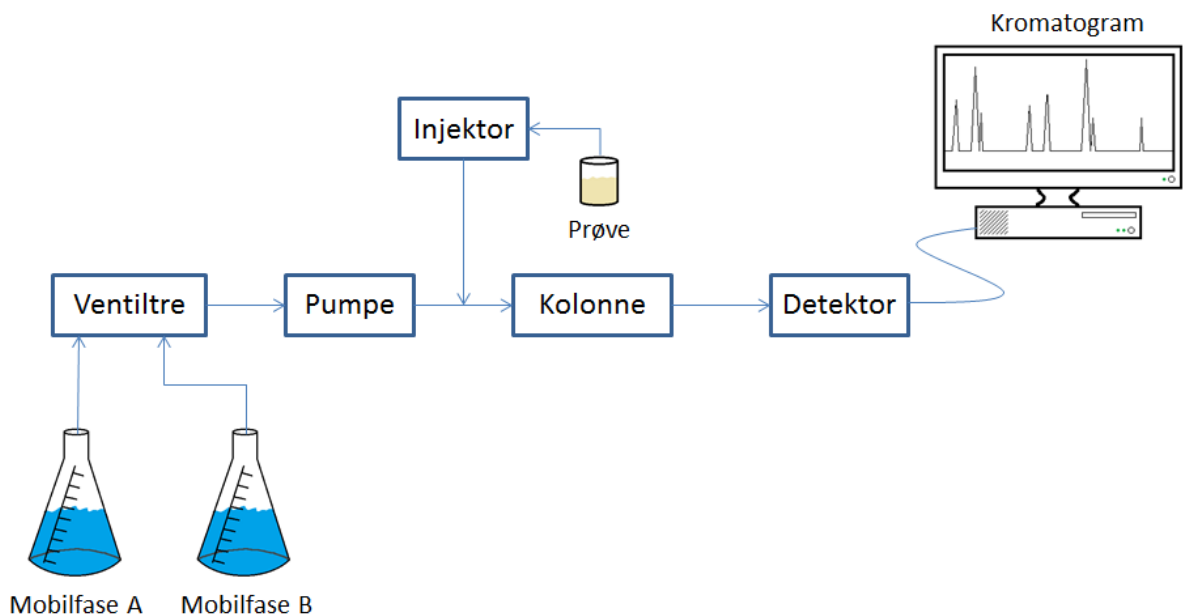
Metoden som brukes i denne oppgaven avviker fra standardprosedyren.



Figur 2. Ostro ekstraksjonsplate og samleplate.

## 2.5 Ultra high performance liquid chromatography (UPLC)

UPLC er den mest moderne varianten av væskekromatografi. I væskekromatografi fører en flytende mobilfase analytten gjennom en kolonne pakket med stasjonær fase. Jo større affinitet et stoff har til stasjonærfasen, jo senere vil den eluere. Når analytten kommer ut av kolonnen går den til en detektor, som i dette tilfellet er MS. Et slikt oppsett kalles LC-MS.



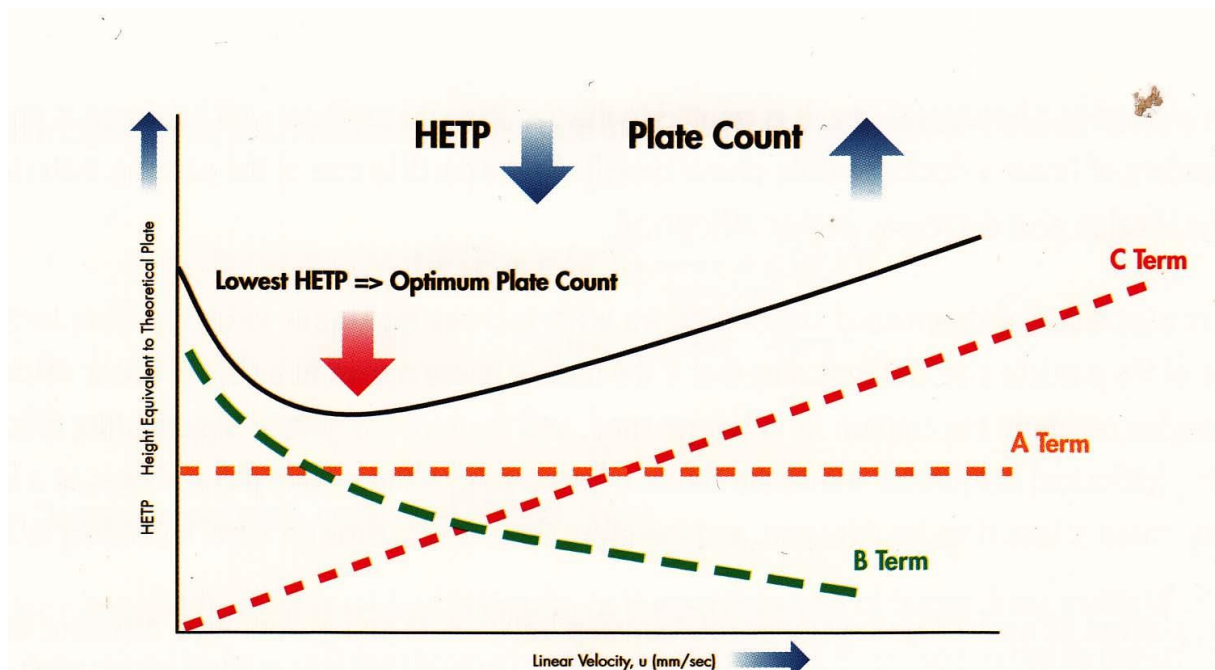
**Figur 3. Oversiktsbilde for et HPLC/UPLC-system.**

Diffusjon i mobilfase, eddydiffusjon og massetransport mellom stasjonær- og mobilfase er de tre parametrene som bidrar til økt båndspredning.

Van Deemters ligning beskriver forholdet mellom høydeekvivalenten til en teoretisk plate (HETP), diffusjon i mobilfase (A), eddydiffusjon (B), massetransport mellom stasjonær- og mobilfase (C), og hastigheten til mobilfasen (u).

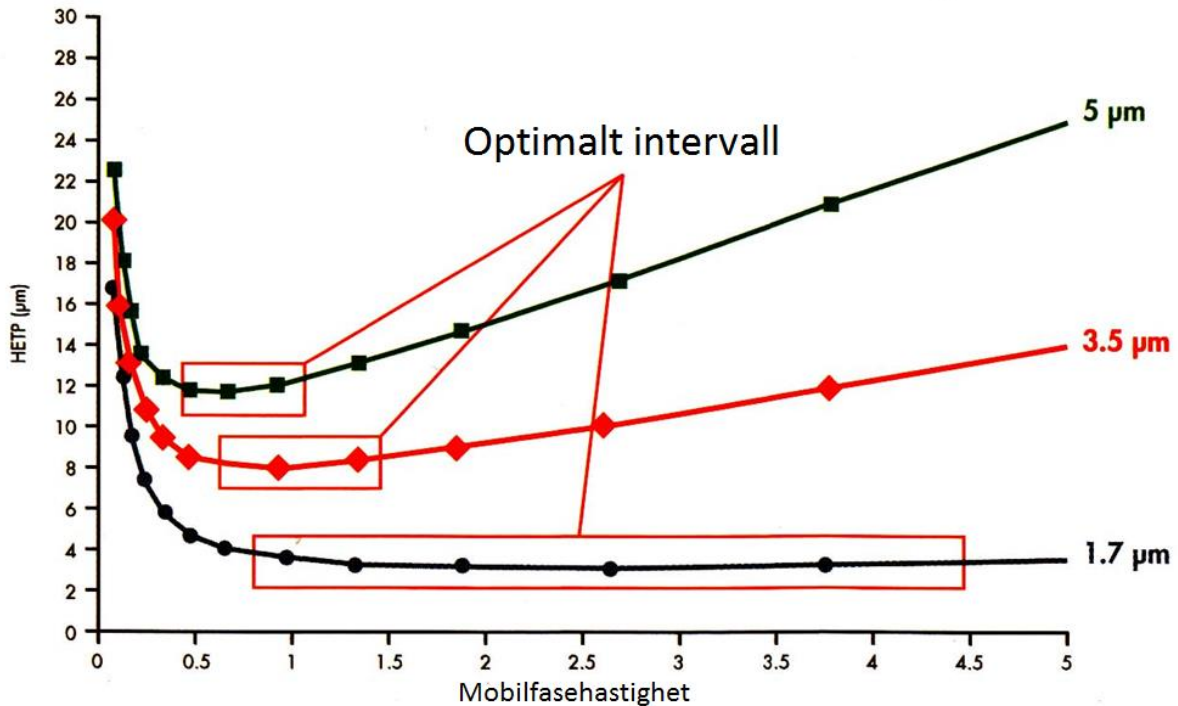
$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

Figur 4 viser hvordan mobilfasehastigheten påvirker HETP. Det optimale område for mobilfasehastigheten til mobilfasen gir lavere båndspredning enn både høyere og lavere hastighet.



Figur 4. Grafisk fremstilling av hvordan mobilfasehastigheten påvirker HETP. Figuren er hentet fra "Beginners Guide to UPLC". ISBN: 978-1-879732-07-0.

Figur 5 viser at det optimale intervallet for mobilfasehastigheten blir større når stasjonærfasepartiklene blir mindre, og HETP blir lavere med mindre stasjonærfasepartikler. Båndspredningen blir mindre, slik at oppløsningsevnen øker.



Figur 5. Grafisk fremstilling av hvordan mobilfasehastigheten påvirker HETP ved forskjellige størrelser for stasjonærfasepartikler. Figuren er tilpasset fra "Beginners Guide to UPLC". ISBN: 978-1-879732-07-0.

Kolonnene fått stadig mindre stasjonærfasepartikler. Mindre partikler er det som skiller UPLC® fra HPLC. UPLC gir forbedret sensitivitet, hastighet og oppløsning sammenlignet med HPLC (19). UPLC® er et varemerke som tilhører Waters Corporation, men navnet blir sammen med UHPLC ofte brukt om metoden på generell basis.

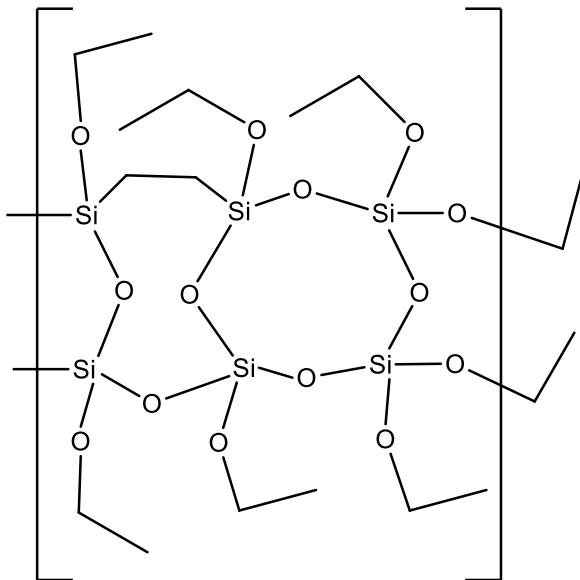
### 2.5.1 Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)

HILIC er en form for normalfasekromatografi. Det vil si at stasjonærfasen i kolonnen er laget av et polart materiale. Mobilfasen er typisk acetonitril med 5-40 % vanninnhold. Analytretensjon antas å være forårsaket av fordeling av analytten mellom den relativt hydrofobe mobilfasen, og et tildels stillestående vannlag langs kolonnens hydrofile materiale, dette er til forskjell fra vanlig normalfasekromatografi der mobilfasen ikke er vannholdig, og adsorpsjon til kolonnemateriale står for retensjonen (20).

Hvis en reversfasekolonne brukes til å analysere uderivatiserte polare molekyler som gentamicin, vil analytten eluere ut i dødvolumet. Da blir kapasitetsfaktoren liten, hvilket betyr at oppløsningsevnen blir dårligere enn den hadde blitt om analytten eluerte senere. Når analytten eluerer i en vannrik mobilfase (som er vanlig for reversfasekromatografi) kan sterk ionesuppresjon forekomme og respons i ESI-MS vil

bli dårlig. I et HILIC-system der retensjonen er bedre vil analytten eluere i en blanding av acetonitril og vann som gir bedre respons i ESI-MS (21). Mobilfasens lavere viskositet gjør at kortere analysetid kan oppnås sammenlignet med reversfasekromatografi (20).

I denne oppgaven brukes en polymerbasert HILIC-kolonne der partiklene består av polyetoksysilan (se figur 3).



Figur 6. Polyetoksysilan (22).

## 2.6 Massespektrometri (MS)

Et massespetrometer er et instrument som brukes til å separere ioner etter forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ). I denne oppgaven er det brukt en MS med elektrospay ionekilde (ESI).

I en ESI ionekilde får analytten ladning ved at den tar opp et proton. I MS instrumentet vil en observere  $(M+H)^+$ . En viss fragmentering av analytt vil forekomme.



Figur 7. Blokkdiagram for komponentene i massespektrometeret som brukes i denne oppgaven. Komponentene med grønn farge befinner seg i et vakuum.

### 2.6.1 Inlet

Prøven kan sendes inn i apparatet ved direkte innsprøytning, eller via et instrument som UPLC eller en gaskromatograf.

### 2.6.2 Massefilter

Instrumentet som brukes i denne oppgaven bruker en kvadrupolanalysator. Den består av fire parallelle sylindriske elektroder som er parvis tilkoblet og danner et elektrisk felt. Spenningen som legges på elektrodene er en kombinasjon av vekselspenning med radiofrekvens, og likespenning. Ioner sendes inn i feltet mellom stengene, og avhengig av  $m/z$ -forholdet vil ionene kolliderer med elektrodene, eller fortsette videre til detektoren. Ved å variere det elektriske feltet velges hvilke ioner som kommer frem til detektoren.

Massefilteret kan søke etter alle masser en etter en (skanning), eller det kan stilles til å søke etter bare en eller noen få masser (selected ion recording, SIR). SIR-modus gir økt følsomhet sammenlignet med skann-modus (17). I skannmodus vil hver masse bare slippe gjennom i kort tid, mens alle andre ioner aldri når detektoren. I SIR-modus måles bare en eller noen få masser, slik at flere av ionene av interesse når detektoren enn de gjør i skann-modus.

### 2.7 Intern standard (IS)

Bruk av IS er en metode for å korrigere for tap av analytt under analyse. IS er et stoff som tilsettes i fast mengde til prøvene som skal analyseres. IS tilsettes prøven så tidlig som mulig, og skal ligne analytten så mye som mulig, men må være forskjellig nok til at den ikke interferer med målingen av analytten. Ved å se på ratioen mellom arealet til analytten og IS i stedet for bare arealet til analytten kompenseres det for tap under prøveopparbeiding og andre tilfeldige feil. Det forutsettes at IS og analytten har like fysiske og kjemiske egenskaper.

### 2.8 Validering

Ved å regne ut nøyaktighet, presisjon, linearitet, deteksjons- og kvantifiseringsgrense fås et mål på graden av tillit som stilles til resultatene fra analysen. Validering av analytiske metoder utføres for å demonstrere hvorvidt en metode er egnet til det tenkte bruksområdet.



### 2.8.1 Linearitet

Linearitet er et mål på hvor lineær standardkurve som oppnås med analysemetoden. Ideelt sett skal alle datapunktene passe inn på linje med formen  $y = ax + b$  (17).

### 2.8.2 Nøyaktighet

Nøyaktighet er et mål på avvik mellom sann verdi og målt verdi. Avviket representerer systematisk feil. Som referanse for hva som er sann verdi brukes en kvalitetskontrollprøve (QC-prøve) med kjent konsentrasjon, eller svaret fra en validert analysemetode (17), for eksempel en metode beskrevet i Ph. Eur.

### 2.8.3 Presisjon

Presisjon er et mål på spredningen mellom parallelle målinger. Forskjellig resultat fra to målinger av samme prøve under identiske betingelser betyr at det er spredning i resultatet. Spredning oppgis vanligvis som relativt standardavvik.  $RSD = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$  hvor  $s$  er standardavviket og  $\bar{x}$  er målt middelvei (17).

### 2.8.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrense er den laveste konsentrasjonen av stoff som med sikkerhet kan bekreftes å være tilstede i prøven. Nedre kvantifiseringsgrense er den laveste konsentrasjonen som kan kvantifiseres med tilfredsstillende presisjon. Både deteksjons- og kvantifiseringsgrense bestemmes ut i fra signal/støyforholdet i kromatogrammet (17).

## 2.9 Gentamicinanalyse med LC-MS

Det finnes flere artikler som beskriver analyse av gentamicin og andre aminoglykosider med LC-MS. Noen av dem beskriver analyse av rent stoff (10, 23-26), andre beskriver analyse i serum (7, 8, 16, 27-30) eller annet biologisk materiale (31-37). Prøveopparbeiding og valg av kolonner/mobilfaser varierer.

### 2.9.1 Analyse av rent stoff

Tabell 3. Oversikt over kolonner brukt til analyse av rent stoff

Forfatter, år, ref.	Kolonne/beste kolonne
<b>Kumar, P.et al. 2012. (23)</b>	ZICs–HILIC, 2.1 × 150 mm, 3.1 µm, SeQuant AB, Umea, Sweden
<b>Vucicevic-Prcetic, K. et al. 2011. (24)</b>	Eclipse Plus C18 50 × 4.6 mm, 1.8 µm. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
<b>Wen Jiang. et al. 2011. (25)</b>	SeQuant ZIC®-HILIC, 100 × 2.1 mm, 3.5 µm/100 Å. Merck, P/N 1504410001.
<b>Li, B.et al. 2011. (10)</b>	A Hydrosphere C18 column, 250 × 4.6mm, 5µm. i.d., YMC, Kyoto, Japan
<b>Grahek, R.et al. 2009. (26)</b>	Synergi Hydro-RP, 250 × 4.6mm i.d.,5µm, Phenomenex. Torrance, CA, USA.

Kumar P. et al beskrev optimalisering av analysebetingelser for ti aminoglykosider inkludert gentamicin. Seks forskjellige HILIC-kolonner ble forsøkt, zwitterionisk kolonne gav best separasjon. Forskjellige mobilfasegradienter påvirket ikke separasjonen av stoffene. Forfatterne konkluderer med at valg av stasjonær fase bestemmer selektiviteten ved analyse av aminoglykosider, ikke mobil fase. Metoden ble testet ved å analysere aminoglykosidene i honning.  $R^2$  var større enn 0,99 i området 40-500 µg/kg (23).

Vucicevic-Prcetic K. et al. viste tilfredsstillende resultater med reversfasekolonne.  $R^2$  var større enn 0,99, for alle komponentene utenom gentamicin c2b, som hadde  $R^2$  bedre enn 0,98. Alle gentamicinkomponentene ble separert. Standardkurven som er brukt dekker konsentrasjonsområdet 25-500 mg/L (24). Dette er høyere enn det terapeutiske vinduet som måles i klinisk sammenheng (0,5-10 mg/L).

Wen Jiang. et al. brukte en zwitterionisk kolonne til analyse av neomycin, apramycin, og kanamycin. Forfatterne beskriver god separasjon og fin form på toppene i kromatogrammene (25). Metoden er ikke validert, og lot seg ikke reprodusere (8).

Li B. et al brukte LC-PED (pulsed electrochemical detection) med reversfasekolonne som beskrevet i den europeiske farmakopeen. Natriumioner i mobilfasen gjør at metoden ikke er kompatibel med MS. Det ble likevel brukt MS indirekte ved at kromatogramtopper av interesse ble samlet fra LC-PED, desaltet og analysert med MS (10). Denne metoden krever for mange steg til å være et hensiktsmessig utgangspunkt til rutinemessige analyser av blodprøver.

Grahek R. et al. beskrev en metode for å identifisere forurensninger i gentamicin med reversfasekolonne. Separasjonen av gentamicinkomponentene ble god (26), men hadde fokuset på identifikasjon av stoffene og ikke på kvantitativ analyse. Metoden er ikke validert for kvantitativ analyse.

Resultatene fra disse metodene er ikke direkte overførbare til analyse i serum fordi behovet for prøveopparbeiding av serumprøver gjør det vanskeligere å oppfylle valideringskravene.

## 2.9.2 Analyse av serum

Tabell 4. Oversikt over kolonner brukt til analyse av aminoglykosider i serum.

Forfatter, år, ref.	Kolonne/beste kolonne	Prøveopparbeidelse
<b>Haug, M. 2012. (8)</b>	HILIC AMIDE 2,1 × 75 mm 2,5 µm. Waters, USA.	25 µL serum tilsatt 80 µL IS og 25 µL 10 % TCA fryses, tines og sentrifugeres. 80 µL supernatant skylles gjennom Ostro med 240 µL 10 % TCA.
<b>Baietto, L. et al. 2010. (27)</b>	SYNERGY 4u Hydro-RP 80A 250 × 4.6 mm i.d.; Phenomenex; Torrance, CA, USA.	200 µL serum tilsettes 40 µL IS og 200 µL ACN. Etter sentrifugering fortynnes 100 µL supernatant med 400 µL vann:trifluoreddiksyre i forholdet 98:2, v:v.
<b>Nilsen, K. 2009. (7)</b>	Acquity HSS T3 2,1 × 100 mm 1,8 µm. Waters, USA.	25 µL serum tilsatt 80 µL IS og 25 µL 10 % TCA fryses, tines og sentrifugeres. Supernatanten analyseres.
<b>Angela (QI) Shen. et al. 2008. (28)</b>	Agilent Zorbax SB-C8 30 × 2.0 mm, 5 µm particle size.	Prøven syrebehandles med saltsyre, så tilsettes ACN med iblandet IS slik at forholdet blir 1:6 prøve:ACN. Etter sentrifugering tørkes supernatanten og rekondisjoneres med mobilfase.
<b>Heller, D. et al. 2005. (29)</b>	Waters ODS-AM, 3mm × 150mm, with 3.5µm silica.	500 µL serum tilsettes 100 µL IS og 100 µL 30 % TCA. 300 µL supernatant overføres til autosampler.
<b>Oertel, R. et al. 2004. (30)</b>	ZIC-HILIC column, 100 × 2.1 mm. SeQuant; Umea, Sweden.	Fast-fase-ekstraksjon med "Gilson Automatic Sample Processor for Solid Phase Extraction ASPEC XL"
<b>Isoherranen, N. et al. 2000. (16)</b>	Symmetry C18 RP. 100 × 4.6 mm; 3.5 µm. Waters.	Fast-fase-ekstraksjon med Oasis (30 mg) solid-phase extraction cartridge, Waters.

Haug M. utviklet en metode for gentamicinanalyse med HILIC-kolonne og prøvevolum på 25 µL. Ostro-systemet ble brukt i prøveopparbeidingen. Metoden oppfylte ikke krav til linearitet, relativt standardavvik og nøyaktighet (8).

Baietto L. et al. utviklet og validerte en simultan analyse av daptomycin, amikacin, gentamicin, og rifampicin i humant serum med en reversfasekolonne. I gjennomsnitt ble  $R^2$  på 0.998 og målt verdi var innenfor  $\pm 15$  % av sann verdi for alle analyttene (27).

Serumvolumet som brukes er 200  $\mu\text{L}$ . Retensjonstiden for gentamicin er kort (3.50 min), og eluerer i en vannrik mobilfase.

Nilsen K. utviklet en metode for gentamicinanalyse prøvevolum på 25  $\mu\text{L}$ . Seks forskjellige kolonner ble forsøkt, to av dem var HILIC-kolonner. Best resultat ble oppnådd med reversfasekolonne. Metoden oppfylte ikke krav til linearitet og relativt standardavvik.

Angela (QI) Shen. et al. sammenlignet en zwitterionisk HILIC-kolonne og en C8 reversfasekolonne med ione-paring til analyse av spectinomycin, streptomycin, gentamicin og amikacin. Reversfasekolonnen gav best form på kromatografittoppen og best følsomhet. Forfatterne syrebehandlet prøvene for å oppnå god gjenvinningsgrad på grunn av uspesifikk binding av analytt til både glass og plast (28). Det gis ingen informasjon om nøyaktighet, linearitet eller presisjon.

Heller, D. et al. beskrev en metode for måling av gentamicin i serum, urin, melk og nyrevevsprøve hos kveg med reversfasekolonne. Det ble ikke forsøkt å kvantifisere gentamicinkomponentene individuelt. For serummetoden brukes et prøvevolum på 500  $\mu\text{L}$ . Kolonnen fungerte dårligere etter noen hundre analyser på grunn av urene prøver (29).

Oertel, R. et al. brukte en zwitterionisk HILIC-kolonne til simultan analyse av amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, paromomycin, og tobramycin. Prøven ble opparbeidet med fastfaseekstraksjon (30). Metoden lot seg ikke reprodusere (7), og også her er prøvevolumet på 500  $\mu\text{L}$ .

Isoherranen, N. et al. beskrev en metode der gentamicinkomponentene først blir separert i fraksjoner ved hjelp av innledende kromatografi og siden identifisert ved hjelp av MS, kjernemagnetisk resonans, tynnskiktkromatografi og smeltepunktbestemmelse. Etter derivatisering og separasjon med HPLC ble kvantifisering utført med UV-spektroskopi (16). Denne analysen krever for mange steg for rutineanalyse.

### 2.9.3 Analyse av annet biologisk materiale

Tabell 5. Oversikt over kolonner brukt til analyse av annet biologisk materiale.

Forfatter	Kolonne/ beste kolonne
<b>Kaufmann, A. et al. 2012. (31)</b>	Kinetex C-18, 2.1 × 150 mm, 2.6 µm. Phenomenex. Torrance, CA, USA.
<b>Almeida, M. et al. 2012. (32)</b>	X-Terra MS C18 2.1 × 100 mm, 3.5 µm. Waters, USA.
<b>Bohm, D. et al. 2010. (33)</b>	HILIC "Atlantis". 150 × 2.1 mm, 3 µm.
<b>Oliveira, R. et al. 2009. (34)</b>	C18 X-Terra MS. 150 × 2.1mm, 5 µm, Waters, Milford, MA.
<b>Zhu, W. et al. 2008. (35)</b>	Capcell Pak C18 UG120 column. 150 mm × 2.0 mm, 5 µm. Shiseido, Chuo-ku, Tokyo, Japan.
<b>Ishii, R. et al. 2008. (36)</b>	ZIC-HILIC column, 100 × 2.1mm, 5 µm, 200 Å. SeQuant, Umea, Sweden.
<b>Lecaroz, C. et al. 2006. (37)</b>	Lichrospher C8 60 RP 250 mm × 4 mm Merck Darmstadt, Germany.

Flere artikler beskriver analyse av annet biologisk materiale enn serum. Som for eksempel svinemusklér (31) (35) (36), svinenyrrer (32) (35) (36), fisk, kalvenyrer og kalvelever (31), høns (32, 35), kveg, hest (32) og epler (33), melk (34) (35), lever fra svin og kylling, muskler fra kylling, honning (35), muskler og nyrrer fra kveg (36), vev og cellekulturer fra mus (37).

Prøvene som omtales i disse artiklene skiller seg fra serum i varierende grad, og er mindre relevante enn analysene av serum, men informasjonen om hvilke kolonner som har blitt valgt er av interesse.

### 2.9.4 Oppsummering

Metodene beskrevet over har ulemper som behov for derivatisering eller andre kompliserende ledd i analysen, behov for et prøvevolum i samme størrelsesorden som immunoassayanalyse, for kort retensjonstid til å separere analytt fra interferenter, manglende validering, eller at de ikke har vist seg mulig å reproducere.

De fleste analysene har blitt utført med reversfasekromatografi, til tross for at HILIC-kromatografi gjør at analytten ikke trenger å derivatiseres og tillater analytten å eluere i en mobilfase rik på organisk løsemiddel, noe som gir bedre respons i ESI-MS.

## 2.10 Formål

Formålet med oppgaven er å utvikle en LC-MS metode for analyse av gentamicin i små volum blod, som tilfredsstiller kravene til laboratorieavdeling seksjon 5 ved UNN (målte verdier innenfor  $\pm 15\%$  av sann verdi, RSD for presisjon  $< 15\%$  og  $R^2 \geq 0,99$  (7)).

## 3. Materiale og metode

### 3.1 Stoffer

Tabell 6. Stoffer.

Stoff	Leverandør	Lot#	CAS-NR
<b>Gentamicinsulfat</b>	Sigma-aldrich	061M13111V	1405-41-0
<b>Kanamycinsulfat</b>	Sigma-aldrich	BCBJ7520V	59-01-8
<b>Metanol</b>	Sigma-aldrich	SZBB232SV	67-56-1
<b>Acetonitril</b>	Sigma-aldrich	SZBC010AV SZBC135BV	75-05-8
<b>Maursyre</b>	Sigma-aldrich	SZBB1170V	64-18-6
<b>Triklorediksyre</b>	Merck	K5307107	76-03-9
<b>Ammoniakklysning 32 %</b>	Merck	B513826	7664-41-7

### 3.2 Utstyr

Tabell 7. Utstyr.

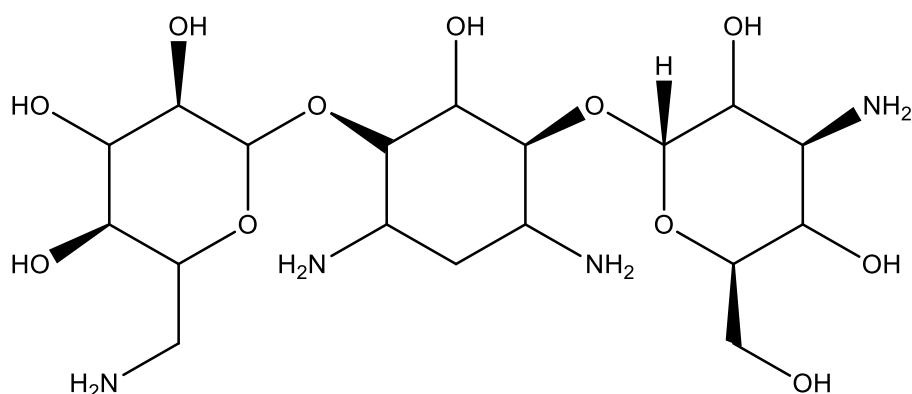
Beskrivelse	Navn	Produsent
<b>5-40 µL</b>	Finnpipette Digital	Finnland labsystems
<b>50-200 µL</b>	Proline	Biohit
<b>100-1000 µL</b>	Research	Eppendorf
<b>Pipettespisser</b>	Finntip	Thermo scientific
<b>UPLC</b>	Acquity UPLC H-Class	Waters
<b>Forkolonne</b>	XBridge™ BEH C18 2,5 µm Vanguard Pre-Column 2,1x5 mm Column XP	Waters
<b>Kolonne</b>	XBridge™ BEH HILIC 2,5µm 2,1x75mm Column XP	Waters
<b>Prøveglass</b>	12x32mm glass (600000751CV)	Waters
<b>MS</b>	Quattro Premier XE Tandem (IFA) Xevo TQ MS (Forskningsparken)	Waters Waters
<b>MS-sprøyte</b>	Gastight #1725	Hamilton
<b>Vekt</b>	BP211D	Sartoris
<b>Vortex</b>	Reax top	Heidolph
<b>Ostro</b>	Ostro-ekstraksjonsplate delnr: 186005518 Ostro-samleplate delnr: 186002461 Positive Pressure-96 Processor	Waters
<b>Eppendorfrør</b>	Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf

### 3.3 Serum

Medikamentfritt serum ble levert av Universitetssykehuset Nord-Norge.

### 3.4 Intern Standard

Kanamycin ble valgt som IS fordi den er billig, og er tidligere brukt som IS for gentamicinanalyse (8). Strukturen ligner på gentamicin. Molekylvekten er 484,50 g/mol og monoisotropisk masse er 484,24 u.



Figur 8. Kanamycinstruktur

### 3.5 Prøveløsninger

Til metodeutvikling ble det laget stamløsninger med gentamicin og kanamycin. Disse ble oppbevart på glassflasker i kjøleskap.

Tabell 8. Stamløsninger.

	Gentamicin	Kanamycin
<b>Mengde tørrstoff</b>	0,09878 g	0,10304 g
<b>Mengde metanol</b>	50 ml	50 ml
<b>Mengde vann</b>	Til totalt 100±0,1 ml	Til totalt 250±0,15 ml
<b>Konsentrasjon</b>	0,99 g/L	0,41 g/L

### 3.6 UPLC

#### 3.6.1 Kolonne

Alle analyser er utført med en XBridge™ BEH HILIC 2,5 µm 2,1x75 mm Column XP. Fordi en andel av analyttene kom ut i dødvolumet ble det senere i prosjektet satt på en C18 forkolonne, XBridge™ BEH C18 2,5 µm 2,1x5 mm Vanguard Pre-Column XP.



### 3.6.2 Mobilfasesammensetning

Tre forskjellige sammensetninger av vann og ACN ble forsøkt som svak mobilfase. Vann ble brukt som sterk mobilfase, som vist i Tabell 9. Alle mobilfasene var tilsatt 0,1 % FA. ACN:vann i forholdet 98:2 viste seg best egnet som svak mobilfase.

Tabell 9. Mobilfaser

Svak mobilfase	Sterk mobilfase
ACN:vann 90:10 + 0,1 % FA	
ACN:vann 95:5 + 0,1 % FA	Vann +0,1 % FA
ACN:vann 98:2 + 0,1 % FA	

### 3.6.3 Mobilfasegradient

Diverse gradienter ble utprøvd for å oppnå passende retensjon. Mobilfasegradienten i Tabell 10 gav best resultat. Sterk mobilfase er vann med 0.1 % FA, svak mobilfase er 98:2 ACN:vann.

Tabell 10. Mobilfasegradient.

Tid (min)	Flyt (mL/min)	Sterk mobilfase (%)	Svak mobilfase (%)
0	0,4	1	99
5	0,4	1	99
6	0,4	70	30
9	0,4	70	30
11	0,4	1	99
16	0,4	1	99

### 3.6.4 Injeksjonsvolum

De fleste prøvene ble analysert med injeksjonsvolum på 5 µL, men det ble også testet injeksjoner på 4, 3, 2 og 1 µL.

## 3.7 Massespektrometri

Fullscan og SIR ble brukt. Betingelsene for SIR-modus er vist i Tabell 11. Tabell 12 viser MS-betingelser for fullskann.

Tabell 11. SIR-fil og cone voltage.

Masse	Delay (s)	Cone (V)	Stoff
450,5	0,050	25	Gentamicin C1a
464,5	0,050	25	Gentamicin C2, C2a, C2b
478,5	0,050	25	Gentamicin C1
485,5	0,050	30	Kanamycin

Tabell 12. MS-betingelser for fullskann.

Startmasse (u)	Sluttmasse (u)	Skann-tid (sek)	Tid mellom skann (sek)	Cone voltage (v)
280	600	0,5	0,1	25

### 3.7.1 Ionekilde

Elektrosprayionisasjon (ESI+) ble brukt.

## 3.8 Respons og gentamicinbinding til glass

Forskjellige blandinger av ACN og vann med og uten tilsatt FA eller ammoniakk ble forsøkt for å se hvordan det påvirker respons og gentamicinbinding til glass. Det ble også forsøkt å syrebehandle prøvevialene.

## 3.9 Prøveopparbeidelse med Ostro

Prøveopparbeidelsen ble utført med Ostro-systemet. Prosedyren i Tabell 13 gav best resultat. Prosedyren er basert på tidligere arbeid utført på instituttet (8). Fire forskjellige løsninger ble forsøkt i steg syv, og to forskjellige mengdeforhold av IS og 10 % TCA i ACN i steg 1 ble forsøkt.

**Tabell 13. Endelig metode for prøveoppbeidelse**

Steg	Prosedyre
1	50 µL serum tilsettes 150 µL IS og 25 µL 10 % TCA i ACN (-20°C)
2	Vortex i 5 sekunder
3	Prøvene fryses (-20°C) i 30 minutter og tines etterpå
4	Vortex i 5 sekunder
5	Prøvene sentrifugeres ved 16000 g i 10 minutter
6	100 µL supernatant pipetteres over i Ostro-ekstraksjonsplate
7	300 µL 0,1% FA i ACN tilsettes
8	Løsningen blandes i Ostro-brønnen ved pipettering
9	43 PSI (296 kPa) trykk påføres i 5 minutter
10	Prøven analyseres

### 3.10 Validering

Analysene brukt til validering ble utført på Barents BioCenter Lab i forskningsparken i Tromsø. MS-instrumentet som ble brukt var en Xevo TQ MS fra Waters.

#### 3.10.1 Linearitet

Tre serumprøver med gentamicinkonsentrasjon på 50, 100 og 200 mg/L ble opparbeidet og analysert med tre injeksjoner hver.

#### 3.10.2 Nøyaktighet

To QC-prøver med gentamicinkonsentrasjon på 75 og 150 mg/L ble opparbeidet og analysert med tre injeksjoner hver.

#### 3.10.3 Presisjon

Tre paralleller fra hver av de to QC-prøvene ble brukt til validering av presisjon.

#### 3.10.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

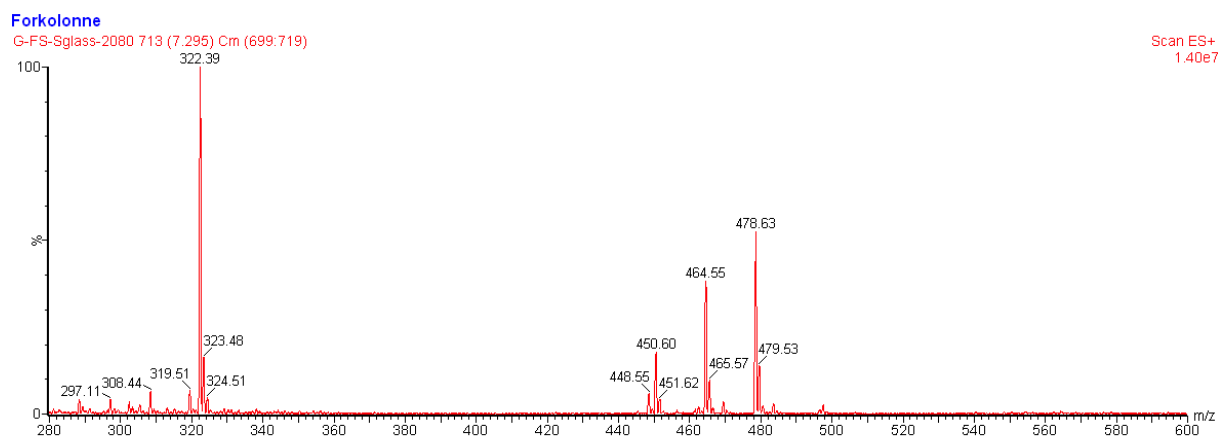
Deteksjons- og kvantifiseringsgrense ble estimert på grunnlag av signal/støy-ratioen til den minst konsentrerte prøven i standardrekken.



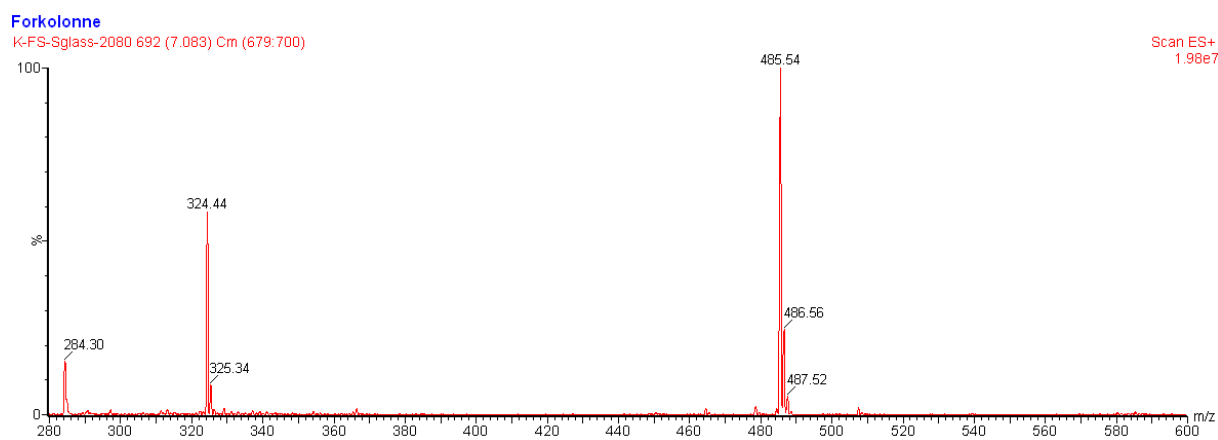
## 4. Resultater

### 4.1 Intern standard

Figur 9 viser fullskansspekter for gentamicin og Figur 10 for kanamycin. Kanamycin har ingen masser som gir interferens av betydning med massene til gentamicinene.



**Figur 9. Fullskansspekter av Gentamicin. De tre massene 450,60, 464,55 og 478,33 er gentamicinkomponentene.**



**Figur 10. Fullskansspekter av Kanamycin, masse 485,54.**

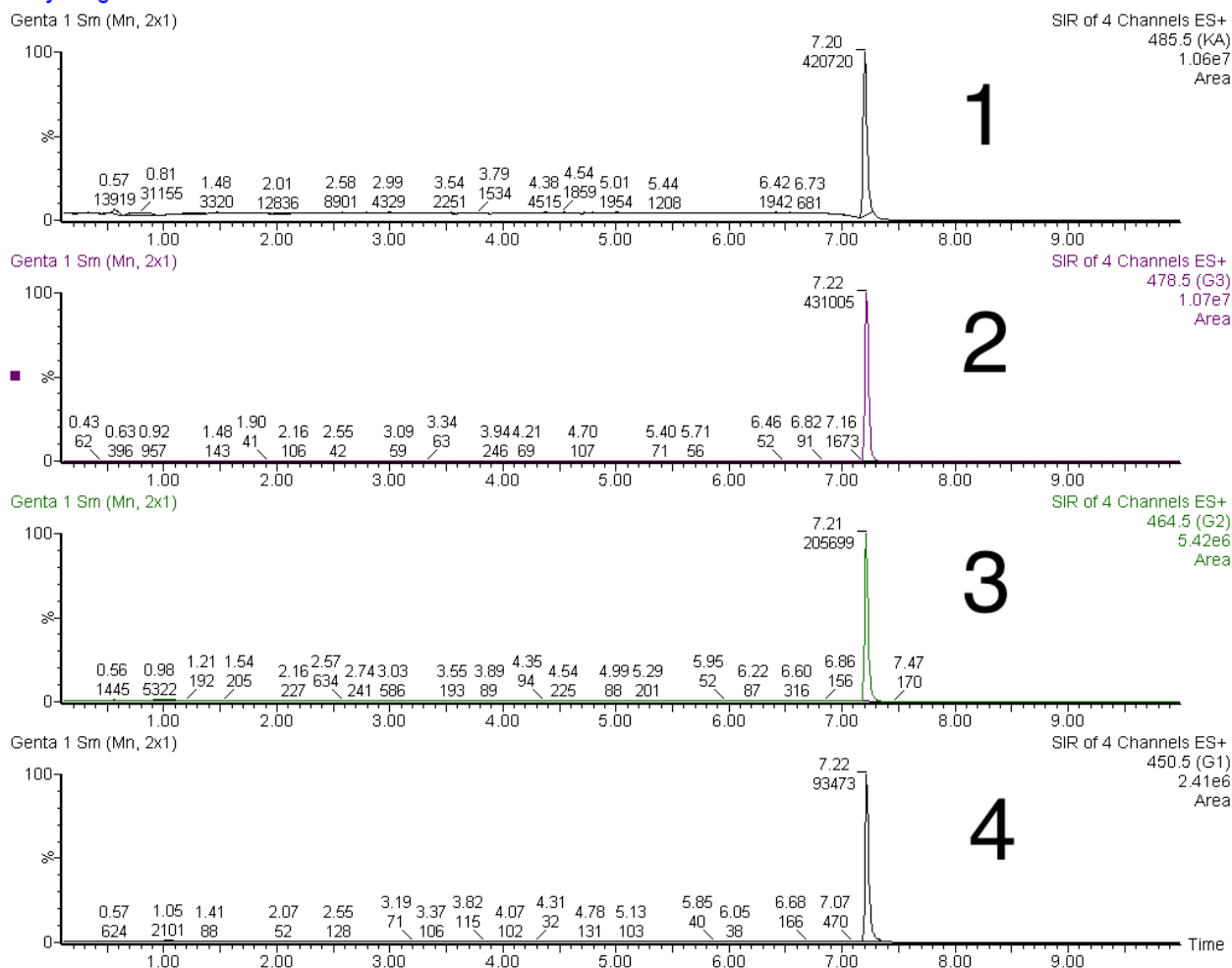
### 4.2 UPLC

#### 4.2.1 Separasjon

Komponentene lar seg ikke separere kromatografisk. Med unntak av gentamicin C2, C2a og C2b, som har samme masse, lar de seg kvantifisere separat på grunn av masseforskjellen. Se Figur 11.

## Fortynning

Genta 1 Sm (Mn, 2x1)



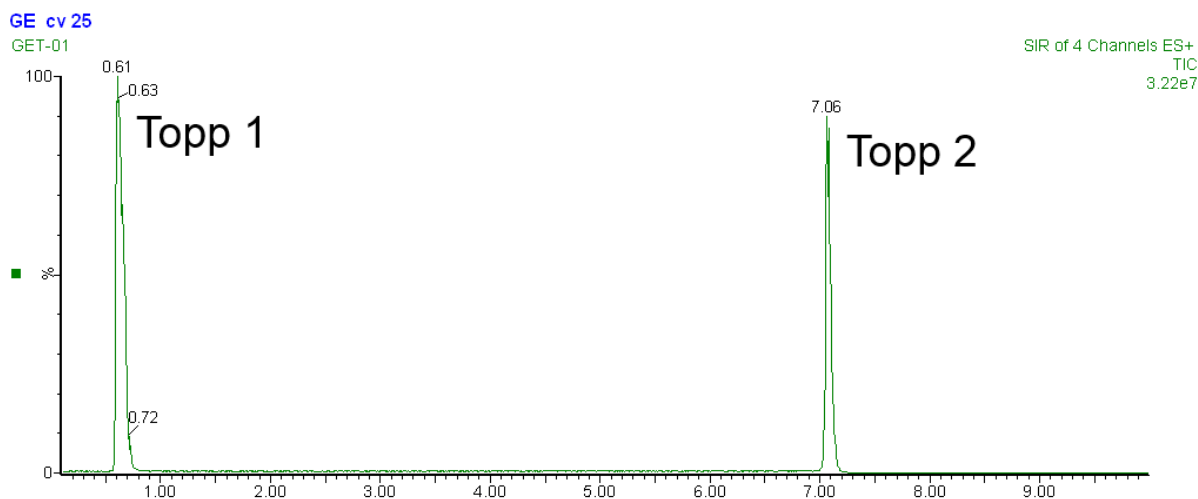
Figur 11. SIR-kromatogram av 1 (kanamycin), 2 (gentamicin c1), 3 (gentamicin c2, c2a, c2b) og 4 (gentamicin c1a) fra samme prøve.

## 4.3 Massespektrometri

Prøvene ble analysert i SIR-modus. Massene for SIR-modus og instillingene for cone voltage vises i Tabell 11.

## 4.4 Splitting av analyttene i to topper

Når gentamicin løst i vann analyseres blir analytten fordelt i to kromatogramtopper. Den første toppen kommer ut med dødvolumet etter under ett minutt, mens den andre toppen kom etter rundt 7 minutter, som vist i Figur 12.



**Figur 12. Kromatogram for en vandig gentamicinprøve. Analyttene kommer i to forskjellige topper.**

Det ble laget prøver løst i forskjellige blandinger av metanol og vann, og ACN og vann med og uten 0,1 % FA for å undersøke hvordan det påvirker ratioen mellom topp 1 og topp 2. Økende mengde metanol i prøveløsningen, gir høyere 2/1-ratio. Økende mengde ACN i prøveløsningen gir enda høyere 2/1-ratio. Se Tabell 20 og Tabell 21.

#### 4.4.1 Injeksjonsvolumets påvirkning på splitting

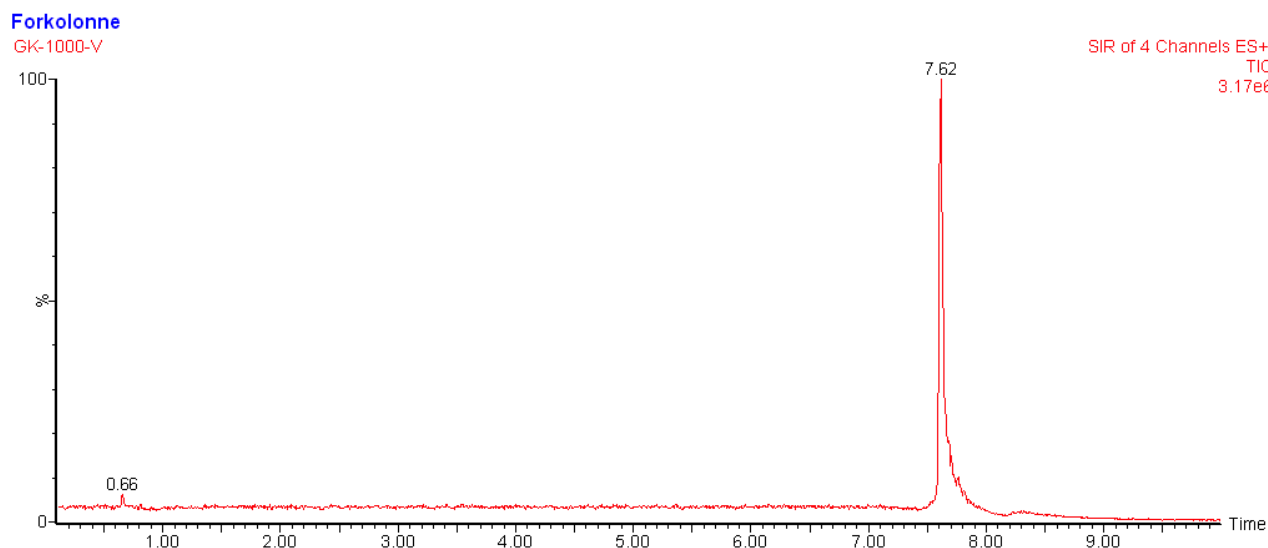
Mindre injeksjonsvolum gir høyere 2/1-ratio. Se Tabell 22.

#### 4.4.2 Initial mobilfases påvirkning på splitting

Mobilfasesammensetningen påvirker 2/1-ratio. Svak mobilfase i forholdet 98:2 ACN:vann gir en høyere 2/1-ratio enn både 95:5 og 90:10. Se Tabell 23.

#### 4.4.3 Effekt av C18 forkolonne på splitting

Med en C18 forkolonne foran HILIC-kolonnen blir problemet med at analytten kommer ut i to topper nesten borte, selv når prøveløsningen består av vann. Se Figur 13.



**Figur 13. Kromatogram for en vandig gentamicinprøve med forkolonne. Nesten all analytten kommer ut i topp 2.**

## 4.5 Respons og gentamicinbinding til glass

### 4.5.1 Sammensetning av vann og organisk løsemiddel i prøven

Prøveløsning i blandingsforholdet 60:40 vann:ACN gir høyest respons i topp 2, men da kommer en andel av analytten ut i dødvolumet også, hvis forkolonne ikke er montert. 20:80 vann:ACN er det beste kompromisset mellom respons og ønsket om å unngå den tidlige toppen. I begge tilfeller er responsen best når prøven er tilsatt 0,1 % FA. Se Tabell 24.

### 4.5.2 Vurdering av behov for prøver uten analytt mellom analysene

Det ser ikke ut til at å analysere analyttfrie prøver mellom analysene har noen betydning for responsen. Se Tabell 25.

### 4.5.3 Bruk av syre og base for å hindre glassbinding

For å hindre at gentamicinet i prøvene binder til glassveggen i prøvevialen ble det forsøkt å tilsette henholdsvis FA og ammoniakk i en konsentrasjon på 0,1 % til prøveløsningen. Prøveløsningen bestod av 20:80 vann:ACN. En prøve uten tilsetning av syre eller base ble analysert sammen med disse for å sammenligne. Prøvene ble analysert rett etter at de ble laget, og de to påfølgende dagene. Resultatet viser at ammoniakk gir minst binding til glass, mens syre gir mindre binding til glass enn prøven uten tilsetning. Se Tabell 26.



#### 4.5.4 Bruk av syre og base for å hindre glassbinding (med forkolonne)

Etter at C18 forkolonne ble installert ble det laget fem prøver som ble målt rett etter at de ble laget, og dagen etter. Prøvene var tilsatt henholdsvis 0,1 % og 1 % FA, 0,1 % og 1 % ammoniakk, og den siste var uten tilsetning. Da prøvene var nye gav prøven uten tilsetning høyest respons. Dagen etter gav prøven med 0,1% FA best respons, over dobbelt så stor respons som prøven med 0,1 % ammoniakk. De andre prøvene gav så dårlig respons at det ikke var mulig å beregne areal for alle massene. Se Tabell 27. Altså ble prøven med 0,1% FA bedre over tid, mens prøven uten syre eller base ble dårligere.

#### 4.5.5 Endret respons over tid for prøver med og uten 0,1 % marusyre

For å undersøke tendensen med at syreprøven ble bedre med tid, mens den syrefrie ble dårligere ble følgende forsøk utført: To prøver løst i vann (den ene tilsatt 0,1 % FA) ble analysert annenhver gang hver halvtime i 12 timer.

Prøven tilsatt syre gav respons på alle massene først etter 6,5 timer, og gav økede respons frem til analyseserien stoppet. Prøven uten syre hadde etter bare en time så dårlig respons at det ikke lenger var mulig å beregne areal for alle massene. Syv timer senere (rett etter at prøven med syre begynte å gi respons) gav den syrefrie igjen stor nok respons til at areal kunne beregnes for alle massene. Responsen fortsatte å øke. Syreprøven gav mange ganger så sterk respons som prøven uten syre. Dette betyr kanskje at responsen fra den syrefrie prøven stammer fra prøven tilsatt syre. Se Tabell 28.

#### 4.5.6 Holdbarhet for prøver med syre

Syreprøven fra avsnitt 4.5.5 ble analysert igjen tre dager senere. Responsen var nå omtrent dobbelt så stor som 12 timer etter at den ble laget. Se Tabell 29.

#### 4.5.7 Repeterte analysers innvirkning på responsen for påfølgende analyser

En prøve med god respons ble analysert fire ganger på rad, deretter ble en helt ny prøve med 0,1 % FA ble analysert. Den nye prøven gav god respons med en gang, selv om resultatene beskrevet i avsnitt 4.5.4 og 4.5.5 tilsier at responsen skulle blitt dårlig. En ny tilsvarende prøve ble analysert rett etterpå som kontroll. Denne gav også god respons med en gang. Dette tyder på at flere analyser på rad påvirker responsen til påfølgende analyser. Se Tabell 31.

En ny prøve med 0,1 % FA ble laget og analysert som første prøve den dagen. Responsen nær null, i tråd med resultatene fra avsnitt 4.5.4 og 4.5.5. Etterpå ble en prøve med god respons analysert fire ganger på rad, før den første prøven ble analysert igjen. Igjen ble responsen nær null (se Tabell 32), i motsetning til det som kunne forventes ut i fra resultatet i Tabell 31.

#### **4.5.8 Syrebehandling av glassvialer**

For å se om den langsomt økende responsen til syreprøvene skyldes en tidsavhengig reaksjon mellom maursyren og silanolgruppene i glassveggen ble følgende eksperiment utført: En ny prøve tilsatt 0,1 % FA ble laget i en glassvial som på forhånd hadde stått et døgn i en blanding av 20:80 vann:ACN med 0,1 % FA. Prøven var den første som ble analysert den dagen, for å sikre at tidligere analyser ikke skulle påvirke resultatet. Prøven gav bra respons med en gang og ble analysert flere ganger på rad. Den nådde et platå for responsen tredje gangen den ble analysert. Dette tyder på at syrebehandling av glassvialer gjør at prøven får høy respons med en gang. Se Tabell 33.

En ny prøve ble tilberedt i en syrebehandlet glassvial og analysert som den første prøven den dagen. Denne gangen ble responsen nær null, i motsetning til det som kunne forventes ut i fra resultatet i Tabell 33. Dette tyder på at det likevel ikke hjelper å syrebehandle glassvialene. Se Tabell 34.

For å undersøke hvordan responsen ble for prøver i syrebehandlede vialer med lavere konsentrasjoner, ble det laget en serie med fem prøver som dekker konsentrasjonsområdet fra 7,5 mg/L til 120 mg/L. Det ble kjørt tre paralleller av hver prøve. Dagen prøvene ble laget gav alle prøvene så dårlig respons at det ikke var mulig å beregne areal. Igjen ser det ikke ut til å være noen løsning å syrebehandle glassene, i strid med resultatet i Tabell 33. Da prøvene ble analysert igjen de to påfølgende dagene var responsen sterk. Se Tabell 35, Tabell 36 og Tabell 37.

#### **4.5.9 Sammensetning av vann og organisk løsemiddel i prøven (med forkolonne)**

For å undersøke om forkolonnen påvirker hvilken prøveløsning som gir best respons ble det laget prøver løst i forskjellige blandinger av vann og ACN, med og uten 0,1 % FA. Disse prøvene tilsvarer prøvene i Tabell 24. Prøvene ble analysert rett etter at de ble laget og dagen etter. I strid med resultatene sett i avsnitt 4.5.4 og 4.5.5 er det ingen

betydelig forskjell på prøver med og uten syre hverken dagen de ble laget eller dagen etter. Se Tabell 30.

## 4.6 Prøveopparbeidelse med Ostro

### 4.6.1 Gjenvinningsgrad for Ostro-systemet

To forskjellige løsemiddelblandinger ble brukt til å skylle prøvene gjennom Ostro-systemet for å sammenligne gjenvinningsgrad. En prøve ble fordelt i seks paralleller. Tre ble skylt gjennom Ostro-ekstraksjonsplaten med 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA, og tre ble skylt gjennom med 10 % TCA i ACN. To prøver ble overført direkte til oppsamlingsplaten og tilsatt henholdsvis 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA og 10% TCA i ACN for å sammenligne med prøvene som gikk gjennom ekstraksjonsplaten.

10 % TCA i ACN gav best gjenvinningsgrad, men 90:10 ACN:vann gav størst respons. Se Tabell 38.

### 4.6.2 Sammenligning av to alternative mengdeforhold av intern standard og TCA

Siden gentamicin ikke er løselig i ren ACN ble et forsøk gjort for å se om mer vann i prøven ville gi bedre resultat. Den vandige løsningen med IS bidrar til å øke vanninnholdet i prøven slik at sammensetning B gir en mer vandig prøve enn sammensetning A.

A:	B:
50 µL serum	50 µL serum
50 µL IS	150 µL IS
150 µL 10 % TCA i ACN	50 µL 10 % TCA i ACN

Metode B gav minst spredning mellom resultatene både ved analyser fra samme brønn, og fra brønn til brønn. Responsen ble også mer enn dobbelt så stor. Se Tabell 41.

### 4.6.3 Løsning brukt til å skylle prøven gjennom Ostro-systemet

Ved to anledninger ble presisjon for prøver skylt gjennom Ostro-ekstraksjonsplaten med 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA og 10 % TCA i ACN sammenlignet. I begge tilfeller ble en prøve splittet i seks paralleller som gjennomgikk proteinfelling med TCA etterfulgt av sentrifugering, før supernatanten ble overført til Ostro-ekstraksjonsplate. Tre brønner ble tilsatt 10 % TCA i ACN, og tre brønner ble tilsatt 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA.

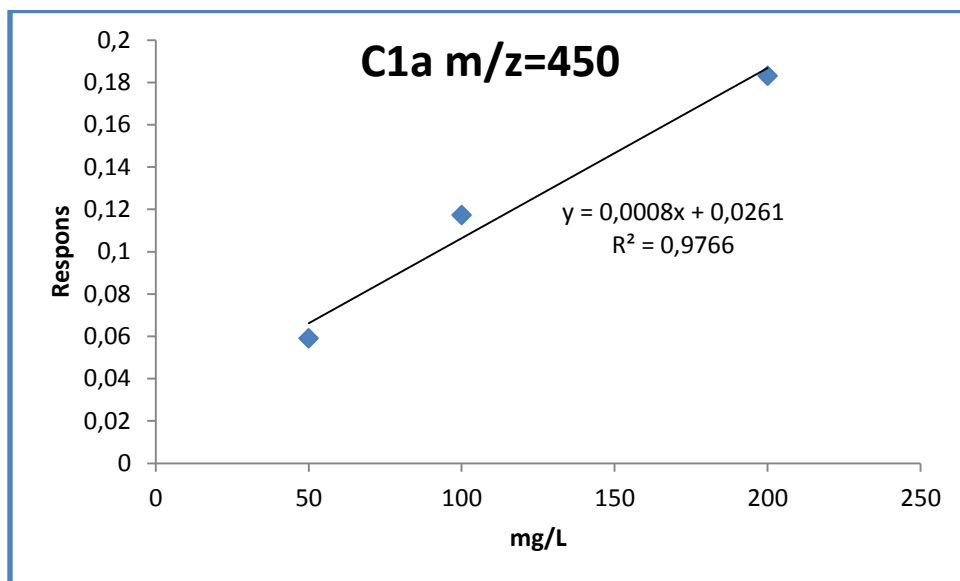
90:10 ACN:vann med 0,1 % FA gav i gjennomsnitt minst spredning ved analyse fra samme brønn, men de to forsøkene motsier hverandre, og spredningen mellom resultatene fra brønn til brønn var mange ganger større enn for 10% TCA i ACN. Se Tabell 39 og Tabell 40.

ACN med og uten 0,1 % FA ble også sammenlignet. Resultatet ble nesten helt likt både med tanke på spredning mellom resultater fra samme brønn, fra brønn til brønn og respons. Se Tabell 42. Begge alternativene gav bedre resultatet enn 10 % TCA i ACN og 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA.

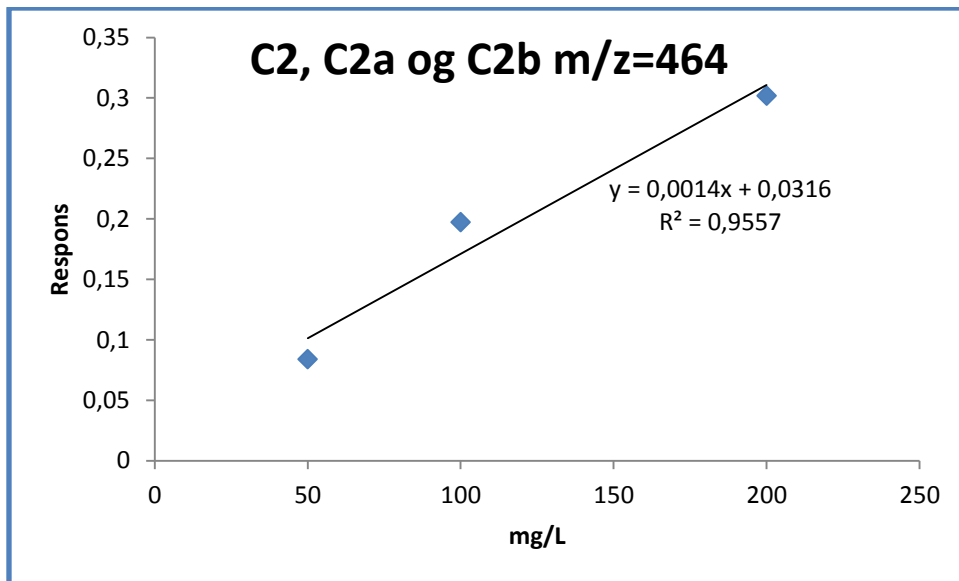
## 4.7 Validering

### 4.7.1 Linearitet

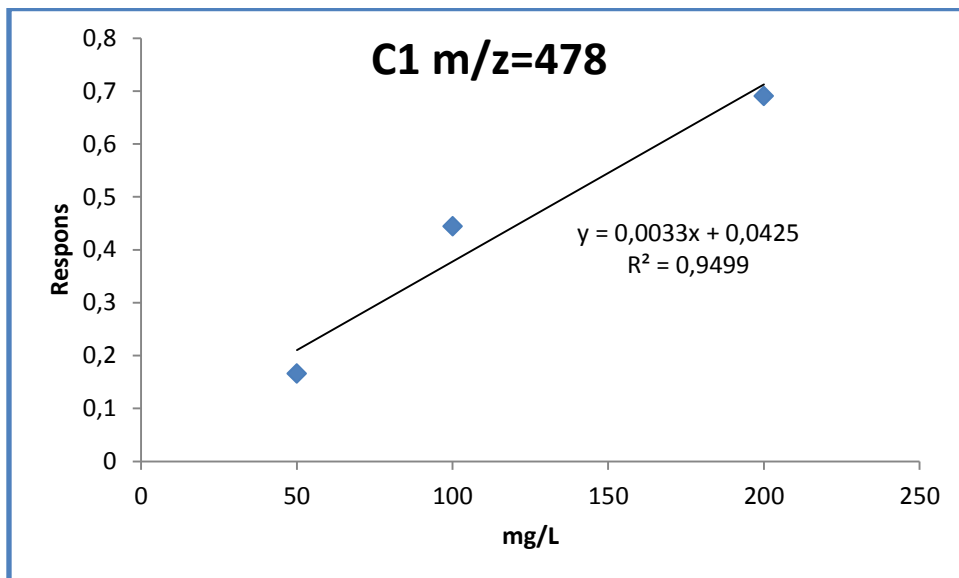
Tre konsentrasjoner ble analysert med tre injeksjoner hver for å lage standardkurve. Ingen av komponentene oppfylder kravet til linearitet ( $R^2 > 0,99$ ). Se Tabell 43 for beregningsgrunnlaget.



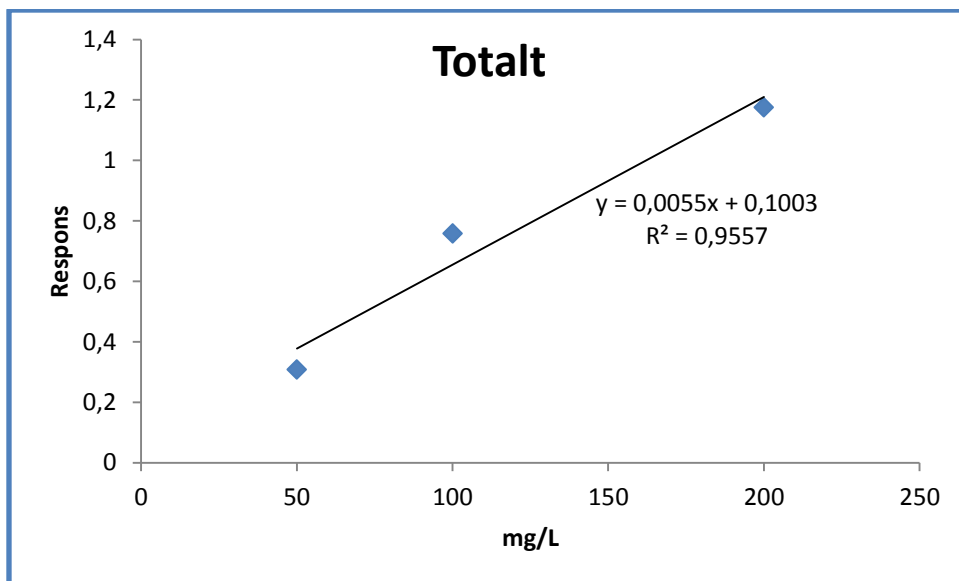
Figur 14. Standardkurve for gentamicin C1a.  $Y = 0,0008029x$ .



Figur 15. Standardkurve for gentamicin C2, C2a og C2b.  $Y = 0,0013948x$ .



Figur 16. Standardkurve for gentamicin C1.  $Y = 0,0033495x$ .



Figur 17. Standardkurve for alle gentamicinkomponentene.  $Y = 0,0055474x$ .

#### 4.7.2 Nøyaktighet

Det ble analysert tre paralleller fra hver av de to QC-prøvene. Gjennomsnittet er brukt til å beregne nøyaktighet. Gentamicin C1a oppfyller ikke kravet til prosentavvik fra sann verdi på  $\pm 15\%$ , men de resterende komponentene gjør det. Se Tabell 44 for beregningsgrunnlaget.

Tabell 14. Validering av nøyaktighet for gentamicin C1a.

Gentamicin C1a	75 mg/L	150 mg/L
Gjennomsnittskonsentrasjon	94,4 mg/L	168,9 mg/L
% avvik fra sann verdi	25,8 %	12,6 %

Tabell 15. Validering av nøyaktighet for gentamicin C2, C2a og C2b.

Gentamicin C2, C2a og C2b	75 mg/L	150 mg/L
Gjennomsnittskonsentrasjon	75 mg/L	161,8 mg/L
% avvik fra sann verdi	0,0 %	7,9 %

Tabell 16. Validering av nøyaktighet for gentamicin C1.

Gentamicin C1	75 mg/L	150 mg/L
Gjennomsnittskonsentrasjon	68,4 mg/L	154,4 mg/L
% avvik fra sann verdi	-8,8 %	2,9 %

Tabell 17. Validering av nøyaktighet for alle gentamicinkomponentene.

Gentamicin totalt	75 mg/L	150 mg/L
Gjennomsnittskonsentrasjon	73,8 mg/L	158,3 mg/L
% avvik fra sann verdi	-1,6 %	5,5 %

#### 4.7.3 Presisjon

Det ble analysert tre paralleller fra hver av de to QC-prøvene. Dette danner grunnlaget for beregning av presisjon. Alle komponentene oppfyller kravet til RSD < 15 %. Se Tabell 44 for beregningsgrunnlaget.

Tabell 18. Validering av presisjon. Tabellen viser RSD og s.

	75 mg/L		150 mg/L	
	RSD	s	RSD	s
RSD for C1a	10 %	0,0076	5,1 %	0,0238
RSD for C2, C2a, C2b	1,3 %	0,0014	5,0 %	0,0113
RSD for C1	8,1 %	0,0186	2,2 %	0,0116

#### 4.7.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Deteksjons- og kvantifiseringsgrense ble beregnet ved å beregne signal/støy-ratio for den minst konsentrerte prøven i standardrekken og estimere konsentrasjonen ved S/N-ratio på 10 (kvantifiseringsgrense) og 3 (deteksjonsgrense). Se Figur 18 for beregningsgrunnlaget.

Tabell 19. Tabellen viser deteksjons- og kvantifiseringsgrense for gentamicin.

Forbindelse	Kvantifiseringsgrense	Deteksjonsgrense
C1a	3,9 mg/L	1,2 mg/L
C2, C2a, C2b	5,8 mg/L	1,7 mg/L
C1	9,3 mg/L	2,8 mg/L





## 5. Diskusjon

---

### 5.1 Splitting av analytten i to topper

Problemet med at gentamicin kommer ut i to topper forsvinner nesten helt når 20:80 eller 0:100 vann:ACN brukes som prøveløsning samtidig som 98:2 ACN:vann brukes som svak mobilfase. Når forkolonne brukes blir det bare splitting når små mengder analyseres, da hovedsaklig for kanamycin og gentamicin C1a.

#### 5.1.1 Teori om årsaken til splittingen

Økende vannmengde i prøveløsningen øker andelen analytt som eluerer i dødvolumet. I HILIC-kromatografi er vann en sterk mobilfase. I en prøve med mye vann vil en andel av analytten forbli i en vandig "plugg" som følger mobilfasestrømmen raskt gjennom kolonna, og dermed gir en tidlig topp. Resten av analytten (som ikke fulgte med i den vandige pluggen), kommer ut i en annen topp flere minutter senere fordi hydrofile interaksjoner med det stillestående vannlaget i kolonna har gitt retensjon.

### 5.2 Respons og gentamicinbinding til glass

Uten forkolonne så det ut til at flere analyser på rad ikke påvirket responsen til påfølgende analyser (4.5.2), og at 0,1 % ammoniakk i prøveløsningen løser problemet med glassbinding (4.5.3).

Med forkolonne ble resultatene annerledes. 0,1 % FA tilsatt prøveløsningen gav best respons, men først etter flere timer (4.5.4, 4.5.5 og 4.5.8). Et forsøk gjort senere (5.4.9) viste ingen forskjell av betydning på prøver med og uten tilsatt syre.

Et forsøk tyder på at repeterte analyser ikke påvirker resultatet for påfølgende analyser (4.5.7), men to andre forsøk (4.5.5 og 4.5.7) tyder på det motsatte.

Syrebehandling av glassene så først ut til å gi god respons umiddelbart for prøver tilsatt syre (4.5.8), men påfølgende forsøk viste ikke denne tendensen (4.5.8).

Forsøkene angående glassbinding og responsendring ved flere forsøk på rad gav motstridende resultater. Hva som kan være årsaken til dette er ikke kjent. Ut i fra resultatene fra disse eksperimentene er det ikke mulig å trekke noen konklusjon om noen pålitelig fremgangsmåte for å hindre glassbinding.

### 5.2.1 Mekanisme for glassbinding

Glassbindingen antas å være en ionebinding mellom positivt ladete amingrupper på gentamicin, og negativt ladede hydroksylgrupper i glass. Ved høy pH vil amingruppene på gentamicinmolekylene miste ladningen, og ved lav pH vil hydroksylgruppene miste ladningen. I begge tilfeller vil i teorien gentamicin ikke binde til glasset. Denne antatte mekanismen kan ikke forklare resultatene fra forsøkene vedrørende respons og glassbinding.

## 5.3 Prøveopparbeidelse med Ostro

### 5.3.1 Løsning brukt til å skylle prøven gjennom Ostro-systemet

90:10 ACN:vann med 0,1 % FA gav bedre respons og mindre spredning ved flere analyser fra samme brønn. Likevel er 10 % TCA i ACN best fordi 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA gir mer enn fire ganger så stor spredning fra brønn til brønn sammenlignet med 10 % TCA i ACN.

Ren ACN, eller ACN tilsatt 0,1 % FA gir aller best resultatet både med tanke på respons, spredning ved analyser fra samme brønn, og spredning fra brønn til brønn.

## 5.4 Validering

Fem konsentrasjoner ble opprinnelig analysert for å lage standardkurven, men de to mest konsentrerte prøvene gav så avvikende resultat at de måtte utelates fra beregningene, sammen med to QC-prøver som da havnet utenfor standardkurvens konsentrasjonsområde.

Basert på dette ufullstendige datagrunnlaget oppfyller metoden krav til presisjon, men ikke kravene til linearitet og nøyaktighet.

Standardkurven dekker konsentrasjonsområdet 50 – 200 mg/L. Det ble forsøkt å lage standardkurve i konsentrasjonsområdet man ønsker å måle (0,5-10 mg/L), men disse mengdene gav ikke brukbart resultat. Kvantifiserings- og deteksjonsgrensene i Tabell 19 viser at følsomheten ikke er god nok.

## 5.5 Feilkilder

### 5.5.1 Intern standard

Tabell 26 viser at kanamycin binder til glass i større grad enn gentamicinkomponentene. Helst skulle det vært brukt deuterert gentamicin.

### 5.5.2 Uspesifikk binding til glass

Gentamicin binder til glass og også i større grad til plast. Alle løsninger ble oppbevart i glassbeholdere, og alle pipettespissene som ble brukt var av plast. Ostro-brønnene er også av plast. Derfor er det rimelig å anta at noe stoff har gått tapt fra løsningene.

### 5.5.3 Pipetteringsfeil

Pipetteringsfeil under tillaging av prøver kan ha bidratt til små feil.

## 5.6 Videre arbeid

Metoden slik den er nå kan ikke kvantifisere gentamicin i lav nok konsentrasjon (0,5-10 mg/L), men optimalisering av prøveopparbeidingen kan gjøre det mulig å måle lavere konsentrasjoner.

Prøveopparbeidingen fortynner prøven ned til 5% av serumkonsentrasjonen. Ifølge de generelle retningslinjene for Ostrosystemet skal ACN tilsettes i forholdet 3:1 med mengden serum, men det kan hende at et mindre volum kan brukes. Det er også mulig å ta med en større del av supernatanten, med større risiko for å få med proteinene i bunnen.

MS-instrumentet brukt i denne oppgaven er flere generasjoner eldre enn de nyeste maskinene som har bedre følsomhet. Et bedre resultat kan oppnås dersom metoden brukes med en nyere MS.

Dersom metoden kan forbedres tilstrekkelig vil det bli mulig å gjøre bedre studier på farmakokinetisk profil for gentamicin hos spedbarn fordi man da kan analysere flere prøver som danner datagrunnlag for dose/konsentrasjon-kurver.



## 6. Konklusjon

---

Det er utviklet en LC-MS metode for analyse av gentamicin i serum med prøvevolum på 50 µL. Prøvene bestod av serum tilsatt gentamicin. Komponentene lot seg ikke separere med kromatografi, men C1 og C1a lot seg kvantifisere separat fra C2, C2a, og c2b.

Det lyktes ikke å finne en løsning på problemet med at gentamicin binder til glass.

Metoden oppfylder valideringskravet til presisjon, men ikke til linearitet og nøyaktighet, og deteksjons- og kvantifiseringsgrensen er for høy til å analysere gentamicin i ønsket konsentrasjonsområde.



## 7. Referanser

---

1. Metodebok i nyfødttmedisin: Universitetssykehuset Nord-Norge; 2012.
2. Gentamicinanalyse [cited 2012 07.10]. Labhåndbok, Medisinsk biokjemi, St. Olavs hospital]. Available from: [http://www.helse-midt.no/ftp/stolav/labhandboker/Medisinsk\\_biokjemi/wap/P/nr0780.htm](http://www.helse-midt.no/ftp/stolav/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/wap/P/nr0780.htm).
3. Gentamicin [cited 2012 07.10]. Laboratoriehåndbok, Universitetssykehuset Nord-Norge]. Available from: <http://www.unn.no/laboratoriehaandbok/gentamicin-article18299-14289.html>.
4. Analyseoversikt - aminoglykosider [cited 2012 02.12]. Available from: [http://www.helse-bergen.no/fagfolk/laboratoriene/analyseoversikt/Lists/Analyseoversikt/DispForm.aspx?ID=418&Source=http%3A%2F%2Fwww%2Ehelse-bergen%2Eno%2Ffagfolk%2Flaboratoriene%2Fanalyseoversikt%2FSider%2Falle\\_analyser%2Easpx](http://www.helse-bergen.no/fagfolk/laboratoriene/analyseoversikt/Lists/Analyseoversikt/DispForm.aspx?ID=418&Source=http%3A%2F%2Fwww%2Ehelse-bergen%2Eno%2Ffagfolk%2Flaboratoriene%2Fanalyseoversikt%2FSider%2Falle_analyser%2Easpx).
5. Bauer K, Linderkamp O, Versmold HT. Systolic blood pressure and blood volume in preterm infants. Archives of disease in childhood. 1993;69(5 Spec No):521-2.
6. Wright IM, Goodall SR. Blood pressure and blood volume in preterm infants. Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition. 1994;70(3):F230-1.
7. Nilsen K. Kvantitative analyser av gentamicin og tobramycin i blod med LC-MS/MS (masteroppgave) 2009.
8. Haug MC. LC-MS basert analysemetode av gentamicin i blodprøver (masteroppgave) 2012.
9. Claes PJ, Busson R, Vanderhaeghe H. Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization. Journal of chromatography. 1984;298(3):445-57.
10. Li B, Van Schepdael A, Hoogmartens J, Adams E. Mass spectrometric characterization of gentamicin components separated by the new European Pharmacopoeia method. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2011;55(1):78-84. English.
11. Småbrekke L. Personlig meddelelse. 2013.
12. SPC legemiddelverket [cited 2012 31.10]. Available from: [http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx?SearchID=06667bda-59aa-4c0e-8447-5d7c5a13056e#SPCHUMAN\\_04\\_02](http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=06667bda-59aa-4c0e-8447-5d7c5a13056e#SPCHUMAN_04_02).
13. Rocha M, Almeida A, Afonso E, Martins V, Santos J, Leitao F, et al. The kinetic profile of gentamicin in premature neonates. J Pharm Pharmacol. 2000;52(9):1091-7.
14. Helsetilsyn S. Bruk av antibiotika i sykehus: Elanders Publishing AS, Oslo; 2001.
15. Stead DA. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications. 2000;747(1-2):69-93.
16. Isoherranen N, Soback S. Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC. Clinical chemistry. 2000;46(6 Pt 1):837-42.
17. Rasmussen SP-BKE. Legemiddelanalyse: Fagbokforlaget; 2004.
18. Sample Preparation for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [cited 2012 05.12]. Available from: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/37324-Sample-Preparation-for-Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry/>.
19. Churchwell M, Twaddle N, Meeker L, Doerge D. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci Journal Issue Improving Sensitivity in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 2005;825(2):134-43.
20. Hemstrom P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. J Sep Sci. 2006;29(12):1784-821.
21. Jensen E. Personlig meddelelse. 2013.
22. BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology [cited 2012 06.12]. Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618172>.
23. Kumar P, Rubies A, Companyo R, Centrich F. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. J Sep Sci. 2012;35(4):498-504.

24. Vucicevic-Prcetic K, Cservenak R, Radulovic N. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;56(4):736-42.
25. Jiang W, Appelblad P, Jonsson T, Hemström P. Analysis of Aminoglycosides with a Zwitterionic HILIC Stationary Phase and Mass Spectrometry Detection. *Chromatography Today*. 2011.
26. Grahek R, Zupancic-Kralj L. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2009;50(5):1037-43.
27. Baietto L, D'Avolio A, De Rosa F, Garazzino S, Michelazzo M, Ventimiglia G, et al. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(2):791-8.
28. Shen AQ, Morgan L, Barroso ML, Zhang X. Method Development of LC-MS/MS Analysis of Aminoglycoside Drugs: Challenges and Solutions. 2008.
29. Heller DN, Peggins JO, Nochetto CB, Smith ML, Chiesa OA, Moulton K. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005;821(1):22-30.
30. Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *Journal of chromatography A*. 2004;1058(1-2):197-201.
31. Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Analytica chimica acta*. 2012;711:46-53.
32. Almeida M, Rezende C, Souza L, Brito R. Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2012;29(4):517-25.
33. Bohm DA, Stachel CS, Gowik P. Confirmatory method for the determination of streptomycin in apples by LC-MS/MS. *Analytica chimica acta*. 2010;672(1-2):103-6.
34. de Oliveira RC, Paschoal JA, Sismotto M, Airoidi FP, Reyes FG. Development and validation of an LC-APCI-MS-MS analytical method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk. *Journal of chromatographic science*. 2009;47(9):756-61.
35. Zhu WX, Yang JZ, Wei W, Liu YF, Zhang SS. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *Journal of chromatography A*. 2008;1207(1-2):29-37.
36. Ishii R, Horie M, Chan W, MacNeil J. Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(12):1509-19.
37. Lecaroz C, Campanero M, Gamazo C, Blanco-Prieto M. Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(3):557-63.



## 8. Vedlegg

### 8.1 Splitting av analytten i to topper

Tabell 20. Tabellen viser hvordan mengdeforholdet mellom metanol og vann med og uten 0,1 % FA påvirker 2/1-ratio ved gentamicinanalyse. Det er ikke brukt forkolonne.

Navn	Vann:MeOH (prøve)	ACN:vann (Svak mobilfase)	Syre	Areal topp 1 Rt ≈ 0,6 min	Areal topp 2 Rt ≈ 7 min	Ratio 2/1
GET-01	100:0	90:10		2 258 716	1 675 850	0,74
GET-02	80:20	90:10		2 410 813	1 638 259	0,68
GET-03	60:40	90:10		2 057 192	1 794 414	0,87
GET-04	40:60	90:10		2 358 308	2 010 493	0,85
GET-05	20:80	90:10		2 583 378	2 303 212	0,89
GET-06	0:100	90:10		1 064 023	2 198 927	2,07
GETS-01	100:0	90:10	x	2 159 136	1 745 668	0,81
GETS-02	80:20	90:10	x	2 324 152	2 158 966	0,93
GETS-03	60:40	90:10	x	2 194 346	2 031 036	0,93
GETS-04	40:60	90:10	x	2 760 113	2 056 614	0,75
GETS-05	20:80	90:10	x	2 745 821	2 280 085	0,83
GETS-06	0:100	90:10	x	2 199 060	2 387 711	1,09

Tabell 21. Tabellen viser hvordan mengdeforholdet mellom ACN og vann med og uten 0,1 % FA påvirker 2/1-ratio ved gentamicinanalyse. Det er ikke brukt forkolonne.

Navn	Vann:ACN (Prøve)	ACN:vann (Svak mobilfase)	Syre	Areal topp 1 Rt ≈ 0,6 min	Areal topp 2 Rt ≈ 7 min	Ratio 2/1
GET-ACN-90-01	100:0	90:10		106 158 224	116 581 800	1,10
GET-ACN-90-02	80:20	90:10		97 996 088	109 486 840	1,12
GET-ACN-90-03	60:40	90:10		88 584 120	126 587 824	1,43
GET-ACN-90-04	40:60	90:10		87 193 128	148 156 160	1,70
GET-ACN-90-05	20:80	90:10		13 325 788	148 031 936	11,11
GET-ACN-90-06	0:100	90:10		9 543 521	118 859 816	12,45
GETS-ACN-90-01	100:0	90:10	x	94 908 232	113 808 424	1,20
GETS-ACN-90-02	80:20	90:10	x	93 384 304	122 057 824	1,31
GETS-ACN-90-03	60:40	90:10	x	83 968 928	135 386 752	1,61
GETS-ACN-90-04	40:60	90:10	x	81 624 912	140 058 336	1,72
GETS-ACN-90-05	20:80	90:10	x	31 331 204	148 110 720	4,73
GETS-ACN-90-06	0:100	90:10	x	7 692 927	137 328 048	17,85

Tabell 22. Tabellen viser hvordan mindre injeksjonsvolum påvirker 2/1-ratio. Det er ikke brukt forkolonne.

Navn	Injeksjonsvolum	ACN:vann (Svak mobilfase)	Areal topp 1 Rt ≈ 0,6 min	Areal topp 2 Rt ≈ 7 min	Ratio 2/1
GE-06-5yl	5 µL	90:10	38 907 612	114 089 792	2,93
GE-06-4yl	4 µL	90:10	38 577 172	96 071 088	2,49
GE-06-3yl	3 µL	90:10	19 803 906	91 725 992	4,63
GE-06-2yl	2 µL	90:10	11 852 321	84 148 080	7,10
GE-06-1yl	1 µL	90:10	2 821 448	27 008 554	9,57

Tabell 23. Tabellen viser hvordan mobilfasesammensetningen påvirker 2/1-ratio. Prøvene er løst i metanol. Det er ikke brukt forkolonne.

ACN:vann (Svak mobilfase)	Ratio 2/1
90:10	2,93
95:5	6,28
98:2	6,38

## 8.2 Respons og gentamicinbinding til glass

Tabell 24. Tabellen viser hvordan mengdeforholdet mellom ACN og vann med og uten 0,1 % FA påvirker respons ved gentamicinanalyse. Det er ikke brukt forkolonne.

Navn	Vann:ACN (Prøve)	ACN:vann (Svak mobilfase)	Syre	Areal topp 1 Rt ≈ 0,6 min	Areal topp 2 Rt ≈ 7 min	Ratio 2/1
GET-ACN-98-01	100:0	98:2		11 893 425	17 777 259	1,49
GET-ACN-98-02	80:20	98:2		9 744 409	24 309 017	2,49
GET-ACN-98-03	60:40	98:2		4 089 021	24 240 115	5,93
GET-ACN-98-04	40:60	98:2		0	20 549 360	-
GET-ACN-98-05	20:80	98:2		0	7 563 310	-
GET-ACN-98-06	0:100	98:2		0	13 535 211	-
GETS-ACN-98-01	100:0	98:2	x	7 123 170	24 124 965	3,39
GETS-ACN-98-02	80:20	98:2	x	2 817 509	23 851 121	8,47
GETS-ACN-98-03	60:40	98:2	x	1 308 228	24 884 995	19,02
GETS-ACN-98-04	40:60	98:2	x	0	21 799 969	-
GETS-ACN-98-05	20:80	98:2	x	0	11 815 480	-
GETS-ACN-98-06	0:100	98:2	x	0	13 541 829	-

Tabell 25. Tabellen viser respons for en prøve analysert flere ganger, med og uten analyttfri prøve mellom analysene. Det er ikke brukt forkolonne.

Navn	Areal
Tom	0
Genta nr 1	1 127 169
Genta nr 2	1 157 810
Genta nr 3	1 163 394
Tom	0
Genta nr 4	1 203 214
Tom	0
Genta nr 5	1 132 999
Tom	0
Genta nr 6	1 157 876
Genta nr 7	1 288 630
Genta nr 8	1 101 604

Tabell 26. Tabellen viser en sammenligning av tre prøver analysert rett etter at de ble laget, og de to påfølgende dagene. Den ene er tilsatt 0,1 % ammoniakk (merket B i tabellen), den andre er tilsatt 0,1 % FA (merket S i tabellen), og den tredje er uten tilsetning (merket N i tabellen). Prøveløsningen består av 20:80 vann:ACN og svak mobilfase er 98:2 ACN:vann. Det er ikke brukt forkolonne.

pH	Dag	450		464		478		485		478/ 485	464 /485	450 /485	Tot /485
		Areal	%	Areal	%	Areal	%	Areal	%				
N	0	127311	100 %	288854	100 %	423871	100 %	623712	100 %	0,68	0,46	0,20	0,45
B	0	120195	100 %	258139	100 %	534576	100 %	588666	100 %	0,91	0,44	0,20	0,52
S	0	118257	100 %	228329	100 %	622795	100 %	513348	100 %	1,21	0,44	0,23	0,63
N	1	67096	53 %	163829	57 %	463619	109 %	170116	27 %	2,73	0,96	0,39	1,36
B	1	126786	105 %	257597	100 %	497494	93 %	636014	108 %	0,78	0,41	0,20	0,46
S	1	90394	76 %	201126	88 %	547121	88 %	194884	38 %	2,81	1,03	0,46	1,43
N	2	86626	68 %	211627	73 %	615360	145 %	181174	29 %	3,40	1,17	0,48	1,68
B	2	138119	115 %	324693	126 %	600395	112 %	756887	129 %	0,79	0,43	0,18	0,47
S	2	104209	88 %	263660	115 %	692015	111 %	209118	41 %	3,31	1,26	0,50	1,69

**Tabell 27. Tabellen viser en sammenligning av fem prøver målt rett etter at de ble laget og dagen etter. To er med 0,1 og 1 % FA (merket S og SS i tabellen), to er med 0,1 og 1 % ammoniakk (merket B og BB i tabellen), og den siste er uten tilsetning (merket N i tabellen). Prøveløsningen består av 20:80 vann:ACN og svak mobilfase er 98:2 ACN:vann. Det er brukt forkolonne.**

pH	D ag	450		464		478		485		478/ 485	464 /485	450 /485	Tot /485
		Areal	%	Areal	%	Areal	%	Areal	%				
<b>N</b>	0	12 107	100 %	25 066	100 %	30 689	100 %	106 609	100 %	0,29	0,24	0,11	0,21
<b>S</b>	0	3 265	100 %	2 738	100 %	5 075	100 %	15 523	100 %	0,33	0,18	0,21	0,24
<b>SS</b>	0	2 805	100 %	1 062	100 %	3 734	100 %	0	100 %	-	-	-	-
<b>B</b>	0	2 509	100 %	734	100 %	3 611	100 %	0	100 %	-	-	-	-
<b>BB</b>	0	2 562	100 %	0	100 %	4 195	100 %	0	100 %	-	-	-	-
<b>N</b>	1	4 381	36 %	0	0 %	4 696	15 %	0	0 %	-	-	-	-
<b>S</b>	1	90 748	2779 %	223 662	8169 %	511 626	10081 %	423 580	2729 %	1,21	0,53	0,21	0,65
<b>SS</b>	1	2 433	87 %	0	0 %	3 750	100 %	0	-	-	-	-	-
<b>B</b>	1	42 258	1684 %	83 970	11440 %	182 952	5067 %	175 443	-	1,04	0,48	0,24	0,59
<b>BB</b>	1	1 688	66 %	0	-	2 899	69 %	0	-	-	-	-	-

**Tabell 28.** Tabellen viser analyse av en prøve tilsatt 0,1% FA (Syreprøve), og en prøve uten (vannprøve). Begge er løst i vann. Prøvene ble analysert annenhver gang hver halvtime i 12 timer. Det er brukt forkolonne.

Tid	Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin
<b>0 t</b>	Vannprøve1	27 991	49 380	117 200	188 667
<b>0,5 t</b>	Syreprøve1	2 109	0	2 861	0
<b>1 t</b>	Vannprøve2	1 290	0	3 311	0
<b>1,5 t</b>	Syreprøve2	1 011	0	2 597	0
<b>2 t</b>	Vannprøve3	2 674	0	3 245	0
<b>2,5 t</b>	Syreprøve3	1 786	0	2 657	0
<b>3 t</b>	Vannprøve4	1 215	0	2 485	0
<b>3,5 t</b>	Syreprøve4	1 273	0	2 970	0
<b>4 t</b>	Vannprøve5	1 317	0	2 920	0
<b>4,5 t</b>	Syreprøve5	2 251	0	3 584	0
<b>5 t</b>	Vannprøve6	1 926	171	2 802	0
<b>5,5 t</b>	Syreprøve6	9 266	14 278	24 560	0
<b>6 t</b>	Vannprøve7	788	277	2 737	0
<b>6,5 t</b>	Syreprøve7	15 319	24 502	37 012	28 151
<b>7 t</b>	Vannprøve8	3 624	3 130	3 612	21 172
<b>7,5 t</b>	Syreprøve8	36 892	73 151	156 657	56 326
<b>8 t</b>	Vannprøve9	6 020	6 982	9 445	31 371
<b>8,5 t</b>	Syreprøve9	47 461	77 286	257 095	68 960
<b>9 t</b>	Vannprøve10	10 601	15 915	32 582	56 430
<b>9,5 t</b>	Syreprøve10	82 831	169 000	394 649	103 407
<b>10 t</b>	Vannprøve11	20 272	33 415	46 240	84 159
<b>10,5 t</b>	Syreprøve11	78 590	166 832	421 631	104 032
<b>11 t</b>	Vannprøve12	19 688	38 691	99 802	102 571
<b>11,5 t</b>	Syreprøve12	86 615	193 470	476 854	124 137

**Tabell 29.** Tabellen viser Syreprøven fra Tabell 28 analysert om igjen.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin
<b>Syreprøve13</b>	151 689	384 727	745 252	289 074
<b>Syreprøve14</b>	204 099	488 246	849 066	299 933
<b>Syreprøve15</b>	198 193	475 421	837 847	328 404

**Tabell 30. Tabellen viser prøver med forskjellige sammensetninger av ACN og vann, med (merket S) og uten (merket N) 0,1 % FA. Prøvene ble analysert rett etter at de ble laget, og dagen etter.**

Vann: ACN	p H	D a g	450		464		478		Totalt		478/ 450	478 /464	464 /450
			Areal	%	Areal	%	Areal	%	Areal	%			
100:0	N	0	253 765	100 %	522 225	100 %	987 298	100 %	1 763 288	100 %	3,89	1,89	2,06
100:0	S	0	308 556	100 %	616 371	100 %	1 229 017	100 %	2 153 944	100 %	3,98	1,99	2,00
80:20	N	0	391 671	100 %	762 360	100 %	1 462 451	100 %	2 616 482	100 %	3,73	1,92	1,95
80:20	S	0	342 733	100 %	729 981	100 %	1 375 648	100 %	2 448 362	100 %	4,01	1,88	2,13
60:40	N	0	341 371	100 %	704 583	100 %	1 222 076	100 %	2 268 030	100 %	3,58	1,73	2,06
60:40	S	0	361 347	100 %	758 479	100 %	1 285 833	100 %	2 405 659	100 %	3,56	1,70	2,10
40:60	N	0	285 853	100 %	702 363	100 %	1 188 650	100 %	2 176 866	100 %	4,16	1,69	2,46
40:60	S	0	367 874	100 %	822 166	100 %	1 304 669	100 %	2 494 709	100 %	3,55	1,59	2,23
20:80	N	0	253 304	100 %	568 072	100 %	1 092 900	100 %	1 914 276	100 %	4,31	1,92	2,24
20:80	S	0	40 756	100 %	148 223	100 %	489 353	100 %	678 332	100 %	12,01	3,30	3,64
0:100	N	0	289 687	100 %	619 561	100 %	1 126 156	100 %	2 035 404	100 %	3,89	1,82	2,14
0:100	S	0	304 187	100 %	659 279	100 %	1 100 782	100 %	2 064 248	100 %	3,62	1,67	2,17
100:0	N	1	303 857	120 %	568 367	109 %	1 181 595	120 %	2 053 819	116 %	3,89	2,08	1,87
100:0	S	1	327 532	106 %	607 953	99 %	1 257 652	102 %	2 193 137	102 %	3,84	2,07	1,86
80:20	N	1	358 467	92 %	73 557	10 %	1 283 462	88 %	1 715 486	66 %	3,58	17,45	0,21
80:20	S	1	343 219	100 %	677 054	93 %	1 245 809	91 %	2 266 082	93 %	3,63	1,84	1,97
60:40	N	1	329 827	97 %	691 412	98 %	1 239 477	101 %	2 260 716	100 %	3,76	1,79	2,10
60:40	S	1	337 535	93 %	731 816	96 %	1 297 343	101 %	2 366 694	98 %	3,84	1,77	2,17
40:60	N	1	320 309	112 %	700 933	100 %	1 179 513	99 %	2 200 755	101 %	3,68	1,68	2,19
40:60	S	1	357 875	97 %	823 299	100 %	1 241 930	95 %	2 423 104	97 %	3,47	1,51	2,30
20:80	N	1	15 325	6 %	49 666	9 %	192 855	18 %	257 846	13 %	12,58	3,88	3,24
20:80	S	1	39 316	96 %	135 931	92 %	532 865	109 %	708 112	104 %	13,55	3,92	3,46
0:100	N	1	247 685	86 %	516 362	83 %	879 508	78 %	1 643 555	81 %	3,55	1,70	2,08
0:100	S	1	255 281	84 %	582 357	88 %	942 190	86 %	1 779 828	86 %	3,69	1,62	2,28

**Tabell 31. Tabellen viser en prøve med bra respons analysert 4 ganger på rad etterfulgt av prøvene Serie og NySerie. Disse to prøvene er prøver med 0,1 % FA som ble laget fortløpende før de ble analysert. Det er brukt forkolonner.**

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin
GKS-4060-F 17	250 522	559 365	1 115 273	1 433 214
GKS-4060-F 18	69 952	190 297	353 224	377 119
GKS-4060-F 19	42 148	69 892	128 352	196 010
GKS-4060-F 20	82 618	185 069	411 308	335 782
Serie	77 200	188 535	479 798	396 402
NySerie	86 230	164 030	348 840	447 714

Tabell 32. Tabellen viser en nylaget prøve (GKS-2080-ny) løst i 20:80 vann:ACN med 0,1 % FA analysert før og etter en prøve med god respons. Den var den første prøven som ble analysert den dagen. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
GKS-2080-ny	0	0	0	0	0
Syreglass 7	118 645	276 543	549 065	666 684	944 253
Syreglass 8	114 196	280 273	624 295	648 192	1 018 764
Syreglass 9	121 584	300 027	583 287	690 662	1 004 898
Syreglass 10	124 041	311 923	568 141	683 538	1 004 105
GKS-2080-ny 2	0	0	0	0	0
GKS-2080-ny 3	158 025	379 500	565 564	774 561	1 103 089
GKS-2080-ny 4	182 823	470 594	738 936	829 557	1 392 353
GKS-2080-ny 5	188 171	459 517	833 571	919 194	1 481 259

Tabell 33. Tabellen viser en prøve løst i vann med 0,1 % FA der glassvialen på forhånd har stått i en blanding av 20:80 vann:ACN med 0,1 % FA i et døgn før prøven ble laget. Prøven var den første som ble analysert den dagen. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
Syreglass	101 756	171 706	303 041	512 362	576 503
Syreglass 1	107 859	221 926	474 215	507 152	804 000
Syreglass 2	143 513	292 731	554 259	683 787	990 503
Syreglass 3	132 705	317 768	629 873	708 619	1 080 346
Syreglass 4	139 793	270 965	665 898	725 445	1 076 656
Syreglass 5	134 004	314 498	564 190	714 577	1 012 692
Syreglass 6	127 062	326 168	637 790	750 378	1 091 020

Tabell 34. Tabellen viser en prøve løst i vann med 0,1 % FA der glassvialen på forhånd har stått i en blanding av 20:80 vann:ACN med 0,1 % FA i et døgn før prøven ble laget. Prøven var den første som ble analysert den dagen. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
GKS-Syreglass	0	0	0	0	0
GKS-Syreglass 1	130 170	247 374	519 833	435 979	897 377

Tabell 35. Tabellen viser en serie med 5 prøver analysert tre ganger hver. A inneholder 7,5 mg/L gentamicin, og konsentrasjonen dobles frem til E som inneholder 120 mg/L. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
Sglass-2080-A1	0	0	0	0	0
Sglass-2080-A2	0	0	0	0	0
Sglass-2080-A3	0	0	0	0	0
Sglass-2080-B1	0	0	0	0	0
Sglass-2080-B2	0	0	0	0	0
Sglass-2080-B3	0	0	0	0	0
Sglass-2080-C1	0	0	0	0	0
Sglass-2080-C2	0	0	0	0	0
Sglass-2080-C3	0	0	0	0	0
Sglass-2080-D1	0	0	0	0	0
Sglass-2080-D2	0	0	0	0	0
Sglass-2080-D3	0	0	0	0	0
Sglass-2080-E1	0	0	0	0	0
Sglass-2080-E2	0	0	0	0	0
Sglass-2080-E3	0	0	0	0	0

Tabell 36. Tabellen viser serien fra Tabell 35 analysert på nytt dagen etter. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
Sglass-2080-A4	92 432	176 022	303 547	226 464	572 001
Sglass-2080-A5	138 260	277 816	608 715	316 834	1 024 791
Sglass-2080-A6	138 892	303 605	634 313	321 049	1 076 810
Sglass-2080-B4	225 827	534 475	819 421	264 394	1 579 723
Sglass-2080-B5	203 624	513 354	935 782	268 901	1 652 760
Sglass-2080-B6	202 929	471 643	903 189	277 939	1 577 761
Sglass-2080-C4	370 211	845 948	1 214 251	269 521	2 430 410
Sglass-2080-C5	359 604	833 060	1 235 366	259 264	2 428 030
Sglass-2080-C6	365 051	825 367	1 297 138	264 331	2 487 556
Sglass-2080-D4	316 778	715 584	1 234 956	262 338	2 267 318
Sglass-2080-D5	318 364	703 235	1 200 669	270 482	2 222 268
Sglass-2080-D6	322 510	764 455	1 190 187	257 005	2 277 152
Sglass-2080-E4	426 278	997 676	1 431 454	247 355	2 855 408
Sglass-2080-E5	442 459	969 382	1 474 450	251 670	2 886 291
Sglass-2080-E6	431 604	1 004 752	1 464 654	244 282	2 901 010



Tabell 37. Tabellen viser serien fra Tabell 35 analysert på nytt to dager senere. Det er brukt forkolonne.

Navn	C1a	C2, C2a, C2b	C1	Kanamycin	Sum gentamicin
<b>Sglass-2080-A4</b>	126 795	306 671	622 182	332 770	1 388 418
<b>Sglass-2080-A5</b>	129 647	298 728	750 057	328 351	1 506 783
<b>Sglass-2080-A6</b>	135 585	315 138	684 916	321 745	1 457 384
<b>Sglass-2080-B4</b>	201 662	460 243	1 007 204	265 598	1 934 707
<b>Sglass-2080-B5</b>	235 754	546 407	892 256	269 392	1 943 809
<b>Sglass-2080-B6</b>	212 836	492 098	966 054	271 051	1 942 039
<b>Sglass-2080-C4</b>	369 708	854 660	1 286 041	260 789	2 771 198
<b>Sglass-2080-C5</b>	387 430	794 503	1 331 884	255 727	2 769 544
<b>Sglass-2080-C6</b>	354 586	831 565	1 266 246	247 412	2 699 809
<b>Sglass-2080-D4</b>	317 451	757 809	1 235 353	264 613	2 575 226
<b>Sglass-2080-D5</b>	320 809	700 448	1 230 901	249 216	2 501 374
<b>Sglass-2080-D6</b>	297 441	756 033	1 183 099	241 034	2 477 607
<b>Sglass-2080-E4</b>	423 525	956 191	1 575 454	242 682	3 197 852
<b>Sglass-2080-E5</b>	445 497	974 798	1 391 576	260 722	3 072 593
<b>Sglass-2080-E6</b>	407 443	1 019 135	1 558 290	239 352	3 224 220

### 8.3 Prøveopparbeidelse med Ostro

Tabell 38. Tabellen viser respons og gjenvinningsgrad når 90:10 ACN:vann med 0,1 % FA eller 10 % TCA i ACN brukes til å skylle prøvene gjennom Ostro-systemet. Det er brukt forkolonne.

	90:10 ACN:vann + 0,1 % FA		10 % TCA i ACN	
	Areal	Gjenvinningsgrad	Areal	Gjenvinningsgrad
<b>C1a</b>	191 885	64 %	187 815	82 %
<b>C2, C2a, C2b</b>	487 225	64 %	270 098	79 %
<b>C1</b>	833 298	69 %	217 122	98 %
<b>Kanamycin</b>	679 958	55 %	1 575 944	81 %

**Tabell 39.** Tabellen viser seks prøver analysert tre ganger hver. Tre av disse (TCA-X, Y, Z) ble skylt gjennom Ostro med 150 µL 10 % TCA i ACN, de tre siste (9010-X, Y, Z) ble skylt gjennom med 90:10 ACN:vann tilsatt 0,1 % FA. "Ostro-9010-y1" er ikke tatt med i beregningen av avvik.

Navn	450	464	478	485	Total genta	Tot/485	Tot genta snitt	Tot/485 snitt	% avvik samme brønn	% avvik mellom brønner			
OSTRO-TCA-X1	137 112	211 259	130 961	700 778	479 332	0,68							
OSTRO-TCA-X2	170 096	252 507	213 035	791 560	635 638	0,80	594 169	0,77	15,45 %				
OSTRO-TCA-X3	178 355	258 999	230 183	810 298	667 537	0,82							
OSTRO-TCA-Y1	192 519	298 808	206 049	878 073	697 376	0,79							
OSTRO-TCA-Y2	188 449	325 034	232 018	891 600	745 501	0,84	726 455	0,81	5,17 %	5,09 %			
OSTRO-TCA-Y3	193 281	325 080	218 126	918 109	736 487	0,80							
OSTRO-TCA-Z1	207 813	308 702	275 244	980 503	791 759	0,81							
OSTRO-TCA-Z2	233 975	322 101	232 929	998 173	789 005	0,79	809 912	0,81	4,98 %				
OSTRO-TCA-Z3	203 251	322 409	323 311	1 021 917	848 971	0,83							
OSTRO-9010-X1	215 917	507 565	805 996	930 236	1 529 478	1,64							
OSTRO-9010-X2	219 261	453 309	873 616	836 785	1 546 186	1,85	1 546 312	1,79	13,62 %				
OSTRO-9010-X3	218 095	470 950	874 227	827 771	1 563 272	1,89							
OSTRO-9010-Y1	4 660	2 328	3 574	6 143	10 562	1,72							
OSTRO-9010-Y2	229 861	494 705	658 544	773 705	1 383 110	1,79	963 322	1,76	2,91 %	70,74 %			
OSTRO-9010-Y3	220 550	453 660	832 646	867 809	1 506 856	1,74							
OSTRO-9010-Z1	135 152	214 309	148 570	629 567	498 031	0,79							
OSTRO-9010-Z2	136 853	208 149	159 920	660 884	504 922	0,76	501 291	0,77	3,50 %				
OSTRO-9010-Z3	137 325	200 706	162 889	656 108	500 920	0,76							

**Tabell 40. Tabellen viser seks prøver analysert tre ganger hver. Tre av disse (TCA-R, S, T) ble skylt gjennom Ostro med 300 µL 10 % TCA i ACN, de tre siste (9010-R, S, T) ble skylt gjennom med 90:10 ACN:vann tilsatt 0,1 % FA. OSTRO-TCA-T3 og OSTRO-9010-S1 er ikke tatt med i beregningen av avvik.**

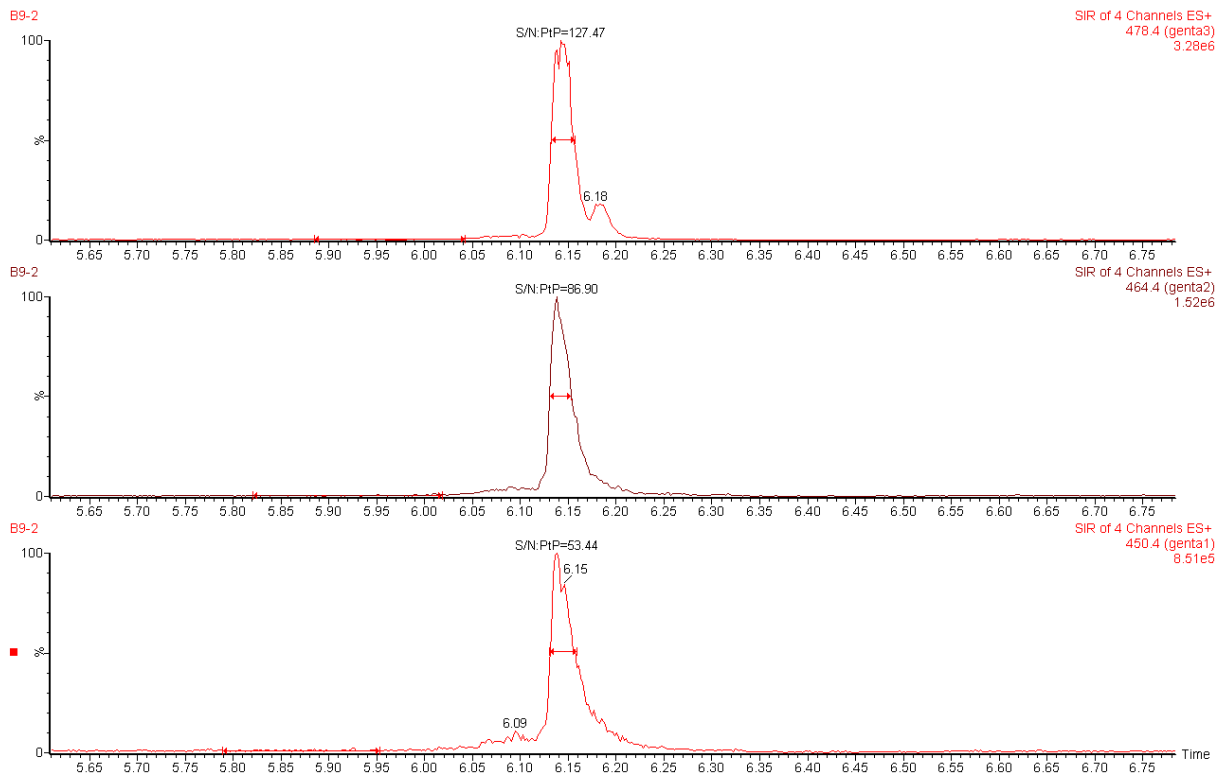
Navn	450	464	478	485	Total genta	Tot/ 485	Tot genta snitt	Tot/ 485 snitt	% avvik Samme brønn	% avvik Mellom brønner
OSTRO-TCA-R1	144 126	231 482	166 900	1 126 846	542 508	0,48				
OSTRO-TCA-R2	152 839	238 705	215 329	1 210 141	606 873	0,50	561 962	0,48	18,45 %	
OSTRO-TCA-R3	143 142	221 551	171 812	1 193 192	536 505	0,45				
OSTRO-TCA-S1	149 114	258 493	338 831	1 262 509	746 438	0,59				
OSTRO-TCA-S2	158 681	233 556	229 383	1 284 143	621 620	0,48	711 064	0,56	2,93 %	18,29 %
OSTRO-TCA-S3	164 993	282 175	317 965	1 248 851	765 133	0,61				
OSTRO-TCA-T1	166 218	225 705	179 582	1 149 442	571 505	0,50				
OSTRO-TCA-T2	147 323	249 827	149 464	1 231 248	546 614	0,44	559 060	0,47	10,51 %	
OSTRO-TCA-T3	0	0	0	0	0	-				
OSTRO-9010-R1	64 538	86 943	75 216	595 434	226 697	0,38				
OSTRO-9010-R2	83 941	111 520	98 572	648 927	294 033	0,45	272 111	0,43	10,86 %	
OSTRO-9010-R3	79 311	117 603	98 689	642 197	295 603	0,46				
OSTRO-9010-S1	2 189	1 461	1 516	3 523	5 166	1,47				
OSTRO-9010-S2	142 217	286 724	650 322	934 156	1 079 263	1,16	1 067 755	1,14	22,86 %	81,20 %
OSTRO-9010-S3	143 244	322 771	590 232	941 465	1 056 247	1,12				
OSTRO-9010-T1	159 186	281 801	637 643	1 032 128	1 078 630	1,05				
OSTRO-9010-T2	164 432	354 359	601 236	1 021 294	1 120 027	1,10	1 058 007	1,04	11,32 %	
OSTRO-9010-T3	152 618	338 861	483 884	988 147	975 363	0,99				

**Tabell 41.** Tabellen viser seks prøver analysert tre ganger hver. SA, SB, og SC består av 50 µL serum (med 100 mg/L gentamicin), 150 µL IS (40 mg/L) og 50 µL 10 % TCA i ACN. CA, CB, og CC består av 50 µL serum, 50 µL IS, og 150 µL 10 % TCA i ACN. Alle seks prøvene ble skylt gjennom Ostro-systemet med 300 µL 10 % TCA i ACN. Det er brukt forkolonne.

Navn	450	464	478	485	Total genta	Tot/485	Tot genta snitt	Tot/485 snitt	% avvik samme brønn	% avvik mellom brønner
SA1	38 228	54 967	42 196	223 768	135 391	0,61				
SA2	75 335	127 279	112 851	400 720	315 465	0,79	263 478	0,69	26,31 %	
SA3	87 839	134 066	117 673	495 616	339 578	0,69				
SB1	96 650	146 032	140 129	469 319	382 811	0,82				
SB2	97 744	149 816	155 164	452 729	402 724	0,89	386 076	0,83	11,77 %	18,55 %
SB3	92 432	145 742	134 518	470 802	372 692	0,79				
SC1	90 786	124 812	77 972	462 482	293 570	0,63				
SC2	78 533	139 051	121 024	391 611	338 608	0,86	321 472	0,74	31,22 %	
SC3	76 787	133 947	121 505	468 342	332 239	0,71				
CA1	22 927	41 978	29 137	35 953	94 042	2,62				
CA2	22 601	41 233	31 830	31 249	95 664	3,06	95 273	2,74	18,45 %	
CA3	22 595	40 848	32 670	37 618	96 113	2,55				
CB1	26 751	52 757	35 015	36 465	114 523	3,14				
CB2	26 630	49 817	36 441	29 642	112 888	3,81	111 756	3,51	19,05 %	28,65 %
CB3	26 419	48 018	33 419	30 237	107 856	3,57				
CC1	20 375	36 712	23 043	25 437	80 130	3,15				
CC2	20 940	37 247	26 652	42 144	84 839	2,01	83 956	2,65	42,83 %	
CC3	21 037	38 909	26 953	31 018	86 899	2,80				

Tabell 42. Tabellen viser seks prøver analysert tre ganger hver. Prøvene består av 50 uL serum (med 100 mg/L gentamicin), 150 uL IS (40 mg/L) og 50 uL 10 % TCA. Prøvene A1, A2 og A3 ble skylt gjennom Ostro-systemet med 300 µL ACN tilsatt 0,1 % FA. Prøvene B1, B2, og B3 ble skylt gjennom med 300 µL ACN. A3-1 og B3-1 er ikke tatt med i beregningen av avvik. Det er brukt forkolonne.

Navn	450	464	478	485	Total genta	Tot/485	Tot genta snitt	Tot/485 snitt	% avvik samme brønn	% avvik mellom brønner
A1-1	144 054	306 781	666 231	666 665	1 117 066	1,68				
A1-2	130 265	308 424	707 581	595 957	1 146 270	1,92	1 164 199	1,85	14,67 %	
A1-3	144 931	317 052	767 277	631 422	1 229 260	1,95				
A2-1	149 406	286 970	665 451	761 072	1 101 827	1,45				
A2-2	136 028	283 084	733 564	746 164	1 152 676	1,54	1 101 100	1,53	9,43 %	13,28 %
A2-3	142 532	276 529	629 736	658 835	1 048 797	1,59				
A3-1	0	0	0	0	0	-				
A3-2	156 682	282 964	652 590	687 922	1 092 236	1,59	1 109 160	1,63	4,84 %	
A3-3	143 046	295 507	687 531	675 694	1 126 084	1,67				
B1-1	133 143	308 497	671 158	732 251	1 112 798	1,52				
B1-2	145 467	311 420	635 420	635 740	1 092 307	1,72	1 126 068	1,69	18,49 %	
B1-3	146 509	313 924	712 665	640 250	1 173 098	1,83				
B2-1	137 305	306 545	642 664	650 693	1 086 514	1,67				
B2-2	145 774	277 440	624 266	649 393	1 047 480	1,61	1 050 108	1,62	6,06 %	16,02 %
B2-3	142 975	271 156	602 198	646 652	1 016 329	1,57				
B3-1	704	1 594	479	0	2 777	-				
B3-2	131 829	283 180	736 806	593 524	1 151 815	1,94	1 113 552	1,90	4,70 %	
B3-3	126 869	290 851	657 568	580 751	1 075 288	1,85				



Figur 18. Kromatogram med beregning av S/N-ratio. Prøven inneholder 50 mg/L gentamicin.

Tabell 43. Datagrunnlag for standardkurve.

Kons.	450	464	478	485	478/485 Snitt	464/485 Snitt	450/485 Snitt	Tot/485 Snitt
50 mg/L	27 512	33 395	77 287	390 708	0,165591	0,084027	0,059079	0,308697
	22 994	40 926	69 746	459 520				
	27 985	38 218	72 538	492 850				
100 mg/L	48 085	92 489	205 106	430 037	0,44415	0,197119	0,117179	0,758448
	59 084	92 321	209 845	489 205				
	58 391	92 077	209 394	490 902				
200 mg/L	81 155	133 850	319 973	443 065	0,690238	0,301929	0,183116	1,175282
	77 518	119 019	285 167	441 002				
	76 220	133 625	280 977	400 310				

Tabell 44. Datagrunnlag for validering av presisjon og nøyaktighet.

Kons.	450	464	478	485	478/485	464/485	450/485	Tot/485
75 Mg/L	38 629	48 820	115 319	467 486	0,2467	0,1044	0,0826	0,4337
	32 846	50 130	101 752	485 396	0,2096	0,1033	0,0677	0,3806
	37 618	51 799	112 674	488 451	0,2307	0,1060	0,0770	0,4137
150 Mg/L	58 365	103 459	229 997	433 632	0,5304	0,2386	0,1346	0,9036
	60 083	101 259	236 737	464 789	0,5093	0,2179	0,1293	0,8565
	65 923	101 758	235 944	461 455	0,5113	0,2205	0,1429	0,8747

