

LC-MS basert analysemetode av gentamicin i blodprøver

Far-3901 Master i farmasi



Marianne Christiansen Haug

Mai 2012

Veiledere: professor Einar Jensen og førsteamanuensis Lars Småbrekke



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for legemiddelkemi, institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø. De siste analysene ble utført på felleslaboratoriet til Barents BioCentre ved forskningsparken i Tromsø. Arbeidet ble påbegynt i oktober 2011 og avsluttet i mai 2012.

Jeg vil takke mine veiledere, Einar Jensen og Lars Småbrekke, som introduserte meg for oppgaven. Arbeidet det siste året har vært utfordrende og lærerikt. Jeg setter stor pris på den gode hjelpen jeg har fått, både til laboratoriearbeid og skriving, og ikke minst på mang en hyggelig prat.

Jeg vil også takke Ole-Martin Fuskevåg ved Universitetssykehuset i Nord-Norge for god hjelp og nyttige råd.

Takk til Marte Stokvik Ovesen som har gjort det siste året overkommelig.

Jeg takker familien min, Øystein og mine kjære foreldre som alltid har støttet meg, uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag.

Avslutningsvis vil jeg takke Borghild, som gav oppgaven en ny mening. Du gir meg uendelig med motivasjon og gjør meg alltid glad. Til deg dedikerer jeg denne oppgaven.

Tromsø, mai 2012

Marianne Christiansen Haug

Sammendrag

Bakgrunn

Gentamicin er hyppig brukt til å behandle alvorlige infeksjoner, men kan ved langvarig behandling eller ved høy serumkonsentrasjon gi vevsskade i både nyrer og ører. Måling av serumkonsentrasjonen skjer rutinemessig med en immunologisk metode som krever et blodvolum på 500 µl. Hyppige målinger er i noen tilfeller nødvendig for å få god kontroll på behandlingen. Premature barn har lav kroppsvekt og lite blodvolum, og et prøvevolum på 500 µl er for stort til at man kan ta hyppige prøver for å følge serumkonsentrasjon.

Målsetning

Målet med studien var å utvikle en LC-MS basert analysemetode som vil kreve et mindre prøvevolum enn den immunologiske metoden.

Metode

Prøvene ble opparbeidet med felling av proteiner med 10 % TCA. Deretter ble supernatanten overført til OSTRO-kolonne for å fjerne lipider før analyse med LC-MS. Kromatografien ble utført med en BEH AMIDE-kolonne

En standardrekke med serumprøver i konsentrasjoner på 1, 4, 15, 30 og 50 µg/ml ble opparbeidet og analysert for validering av metoden.

Resultat

Det er utviklet en LC-MS metode for analyse av gentamicin basert på et prøvevolum på 25 µl serum. De fem ulike molekylene i gentamicin lot seg ikke fullstendig separere, men kunne kvantifiseres individuelt i det aktuelle konsentrasjonsområdet. Etter om lag 300 injeksjoner av prøve på var retensjonstid og form av gentamicin-toppene uendret.

Metoden må videreutvikles for å innfri krav til linearitet, relativt standardavvik og nøyaktighet.

Forkortelser

Forkortelse	Engelsk navn	Norsk navn
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
CE	Collision Energy	Kollisjonsenergi
CV	Cone Voltage	Spenning på cone
ESI	Electrospray Ionization	Elektronsprayionisasjon
FA	Formic Acid	Maursyre
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography	
IS	Internal Standard	Intern standard
LD	Limit of Detection	Deteksjonsgrense
LQ	Limit of Quantification	Kvantifiseringsgrense
MS	Mass Spectrometry	Massespektrometri
m/z	Mass to charge ratio	Masse-til-ladning-forhold
RSD	Relative Standard Deviation	Relativt standardavvik
SIR	Single Ion Recording	Single ion monitorering
S/N	Signal-to-Noise	Signal-til-støy-forhold
TCA	Trichloroacetic acid	Trikloreddiksyre
TPN	Total Parenteral Nutrition	Total parenteral ernæring
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography	Høy-effektiv væskekromatografi
µl	Microliter	Mikroliter
QC	Quality Control	Kvalitetskontroll

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Sammendrag	5
Forkortelser	7
Innholdsfortegnelse	9
1. Innledning	13
1.1 Introduksjon	13
1.2 Premature barn	13
1.3 Gentamicin	13
1.3.1 Klinisk bruk	14
1.3.2 Dosering.....	15
1.3.3 Bakgrunn analytisk.....	16
1.4 Prøveopparbeidelse	17
1.4.1 Felling av proteiner	17
1.4.2 OSTRO.....	17
1.5 Ultra performance liquid chromatography	20
1.5.1 HILIC kromatografi.....	21
1.5.2 Mobilfase	21
1.5.3 Kolonne	21
1.6 Massespektrometri	22
1.6.1 Ionekilder	23
1.6.2 Masseanalysator	23
1.6.3 MS/MS	23
1.6.4 Produktionskann.....	24

Innholdsfortegnelse

1.6.5 Selected ion recording.....	24
1.7 Intern standard	25
1.8 Validering av analysemetode	25
1.8.1 Linearitet	25
1.8.2 Nøyaktighet	25
1.8.3 Presisjon	25
1.8.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense	26
1.9 Hensikt	27
2. Materiale	29
2.1 Utgangsstoffer og kjemikalier.....	29
2.1.1 Serum.....	29
2.1.2 Vann.....	29
2.2 Utstyr	30
3. Metode	31
3.1 Intern standard	31
3.1.1 Sisomicin.....	31
3.1.2 Kanamycin	31
3.2 Tillaging av prøver.....	32
3.3 Prøveopparbeidelse	32
3.3.1 Felling av proteiner	32
3.3.2 OSTRO.....	33
3.4 Utvikling av metode for UPLC	34
3.4.1 Mobilfaser	34
3.4.2 Gradient	35

Innholdsfortegnelse

3.4.3 Kolonne	35
3.5 Utvikling av metode for MS	35
3.5.1 Ionekilde	35
3.5.2 Masseanalysator	35
3.5.3 Produktionskann	36
3.6 Validering av analysemetode	36
3.6.1 Linearitet	36
3.6.2 Nøyaktighet	36
3.6.3 Presisjon	36
3.6.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense	37
4. Resultater	39
4.1 Intern standard	39
4.2 Prøveopparbeidelse	39
4.3 UPLC	39
4.4 MS	39
4.4.1 Produktionskann	39
4.4.2 Fullskann	41
4.5 Kromatografi	43
4.5.1 Separasjon	43
4.5.2 Standarder i vann og serum	43
4.6 Validering	45
4.6.1 Linearitet	45
4.6.2 Nøyaktighet	47
4.6.3 Presisjon	48
4.6.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense	49

Innholdsfortegnelse

5. Diskusjon	51
5.1 Intern standard	51
5.2 Prøveopparbeidelse	51
5.3 LC-MS	52
5.4 Validering.....	52
5.5 Feilkilder	52
5.5.1 Intern standard	52
5.5.2 Gentamicin	53
5.5.3 Konsentrasjon kanamycin	53
5.5.4 Menneskelige feil.....	53
5.6. Fremtidig arbeid	53
6. Konklusjon	55
7. Referanser	57
8. Vedlegg	59
8.1 Tabeller standardkurver	59
8.2 Tuningverdier for MS.....	60
8.3 Beregning S/N.....	61
8.4 Kromatogram sisomicin.....	62

1. Innledning

1.1 Introduksjon

For tidlig fødte barn kan ha en kroppsvekt ned mot 600 gram. Disse barna har nedsatt immunforsvar og er utsatte for alvorlige infeksjoner. Samtidig behandling med flere ulike antibiotika er vanlig, og slike regimer inkluderer ofte aminoglykosidet gentamicin. For å tilpasse doseringen av gentamicin og redusere risiko for øre- og nyreskader må det tas blodprøver for å monitorere serumkonsentrasjonen. En blodprøve for analyse med en immunologisk metode krever 500 µl blod og kommer i tillegg til andre nødvendige blodprøver[1]. Et barn på 600 gram vil ha omtrent 50 milliliter blod[2].

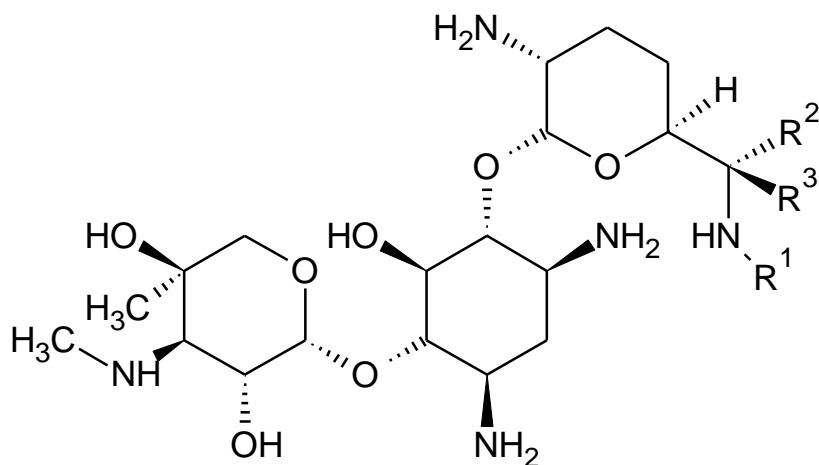
1.2 Premature barn

Et svangerskap varer normalt i 40 uker, og et barn født før fullførte 37. svangerskapsuke defineres som prematurt[3]. I Norge fødes det ca 3500 premature barn årlig, og av disse er det om lag 700 barn som får infeksjonsbehandling med aminoglykosider[4]. Behandlingen varer vanligvis inntil to uker. Ved behandling av premature barn legges det vekt på at barnet skal utsettes for minst mulig stress, og ikke utsettes for unødvendig smerte[3]. På grunn av nedsatt immunforsvar hos premature barn[5] vil ethvert stikk i huden i sammenheng med medisiner og prøvetaking utgjøre en risiko for nye infeksjoner.

1.3 Gentamicin

Gentamicin er et baktericid antibiotikum som hemmer proteinsyntesen i bakterien. Gentamicin blir fremstilt ved fermentering av *Micromonospora purpurea* og er en blanding av fem ulike molekyler C1, C1a, C2, C2a og C2b[6]. I preparatet kan forholdet mellom de ulike molekylene variere fra batch til batch. En kilde anslår fordelingen som vist i tabell 1[7]. Sammenhengen mellom hvert enkelt molekyl og effekt, bivirkninger og farmakokinetikk er ikke er fullstendig undersøkt[8].

Under fermenteringsprosessen av gentamicin dannes en rekke andre substanser[7]. Disse urenheterne er vanskelige å identifisere, og det er dermed vanskelig å forutsi om de eventuelt kan påvirke en analyse[9].



Figur 1. Struktur gentamicin

Tabell 1. Gentamicin, molekylvekt og fordeling mellom de ulike molekylene

Forbindelse	R1	R2	R3	Molekylvekt g/mol	[M+H] ⁺	% Fordeling
C1	CH ₃	H	CH ₃	477,60	478,3	20 - 40 %
C1a	H	H	H	449,54	450,3	10 - 30 %
C2	H	H	CH ₃	463,57	464,3	40 - 60 %
C2a	H	CH ₃	H	463,57	464,3	
C2b	CH ₃	H	H	463,57	464,3	

1.3.1 Klinisk bruk

Gentamicin brukes ofte ved infeksjoner som skyldes gram negative bakterier. Bivirkningene på nyrene skyldes akkumulasjon av aminoglykosider i proximale tubuli, men dette er normalt reversibelt i motsetning til hørselsskadene som trolig skyldes en kombinasjon av skade i deler av 8. hjernenerve og skade på sensoriske reseptorer i det indre øret[10]. Risiko for bivirkninger er først og fremst knyttet til bunnkonsentrasjonen av gentamicin[11]. Det er derfor viktig å monitorere nivået av gentamicin i blod både for å redusere risiko for bivirkninger samt sikre adekvat terapi.

Eliminasjonen hos premature kan være vanskelig å forutsi, da bare små endringer i væskebalansen vil føre til store endringer i distribusjonsvolumet. Dette fører til at behovet for hyppige målinger er større hos premature enn hos voksne[12].

Etttersom det ikke er funnet kilder som sier noe om effekten knyttet til hver enkelt komponent, er det uvisst om batchvariasjonen kan påvirke effekt.

1.3.2 Dosering

Ved dosering av gentamicin er det ofte oppgitt terapeutiske områder for topp- og bunnkonsentrasjon. Toppkonsentrasjonen er målt etter administrasjon, mens bunnkonsentrasjonen er målt rett før neste dose gis. Disse verdiene måles for å sikre tilfredsstillende terapeutisk effekt av legemidlet, samt for å minimalisere risikoen for bivirkninger.

I følge retningslinjene for behandlingen, bør serumkonsentrasjoner være innenfor 2- 12 µg/ml, avhengig av doseringsregime. Dersom gentamicin doseres en gang i døgnet, bør bunnkonsentrasjon være <0,5 µg/ml, og en prøve tatt 8 timer etter infusjon ligge i intervallet 1,5-4 µg/ml. Med dosering tre ganger i døgnet bør bunnkonsentrasjon være <2 µg/ml, og toppkonsentrasjon ligge på 10-12 µg/ml[1]. anbefalte doseringer avhenger av kronologisk alder, gestasjonsalder og vekt. En kilde angir anbefalt dosering til 6 mg/kg/dose, med dosering hver 48.time[13], til et barn som er yngre enn syv dager og med gestasjonsalder under 29 uker. En annen kilde anbefaler 3,5 mg/kg/dose hver 24. time når det premature barnet veier mindre enn 1000 gram, uten å si noe om spesifikk gestasjonsalder[7].

Bestemmelsen av dosering til et prematurt barn er utfordrende. Det tas ofte utgangspunkt i vekt, men også gestasjonsalder spiller en viktig rolle. Gestasjonsalderen er tiden fra første dag i siste normale menstruasjonsperiode målt i hele uker[13], og gir en indikasjon på hvor langt barnet har rukket å utvikles. Både gestasjonsalder og alder er viktige variabler for å vurdere barnets utvikling.

En annen utfordring når det gjelder dosering av gentamicin til premature barn er at halveringstiden vil variere i forhold til gestasjonsalder, alder, væskestatus og

sykdomsforløp. En kilde angir halveringstid på 11,5 timer hos premature med ekstremt lav fødselsvekt, mot 8-9 timer hos fullbårne barn[14].

1.3.3 Bakgrunn analytisk

I dag brukes en immunologisk metode for å analysere serumkonsentrasjon av gentamicin. Dette gjøres ved at gentamicin fra pasientprøven og et fluorescinmerket gentamicinderivat konkurrerer om binding til et antistoff. Mengden bundet fluorescinmerket gentamicinderivat bestemmes og er omvendt proporsjonalt med konsentrasjon av gentamicin i prøven[15].

Den immunologiske metoden kvantifiserer den totale mengden gentamicin i serum, og en får ingen informasjon om forholdet mellom de ulike komponentene.

Ved hjelp av høyeffektiv væskechromatografi i kombinasjon med massespektrometri (UPLC-MS) kan en detektere og kvantifisere mindre mengder av en forbindelse, og en vil dermed trenge mindre blod til analysen. En kan også velge å kvantifisere komponentene hver for seg, og dermed studere et eventuelt forhold mellom ratio og effekt, bivirkninger og farmakokinetikk[8].

I væskechromatografi er bruk av omvendt fase og C18-kolonne mest utbredt til analyse av lipofile substanser. Etersom gentamicin er en polar, hydrofil forbindelse, er det vanskelig å oppnå gode resultater ved å bruke denne type kolonne. De siste årene har flere såkalte Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)- kolonner kommet på markedet. En slik kolonne vil øke retensjonstiden ved økende polaritet av analytt, og forenkle separasjon av forbindelsene. Flere artikler beskriver analyser av gentamicin ved hjelp av LC-MS[6, 8, 16-18]. Noen artikler beskriver studier hvor den aktuelle metoden som er utviklet ikke er tilfredsstillende robust, og mangler tilstrekkelig sensitivitet. Resultater fra noen av studiene lot seg ikke reprodusere, ved bruk av samme kolonne og mobilfase[19].

1.4 Prøveopparbeidelse

Blod og serum er komplekse blandinger som blant annet inneholder proteiner, lipider, karbohydrater og salter. Ved analyser av blod og serum er prøveopparbeidelse ofte nødvendig for å fjerne stoffer som kan interferere med bestemmelse av analytt og ødelegge apparatur. Proteiner i serum kan felle ut i UPLC-kolonnen og endre dens egenskaper, samt forstyrre deteksjonen i massespektrometeret. I prøveopparbeidelsen ønsker vi å fjerne disse stoffene fra prøven.

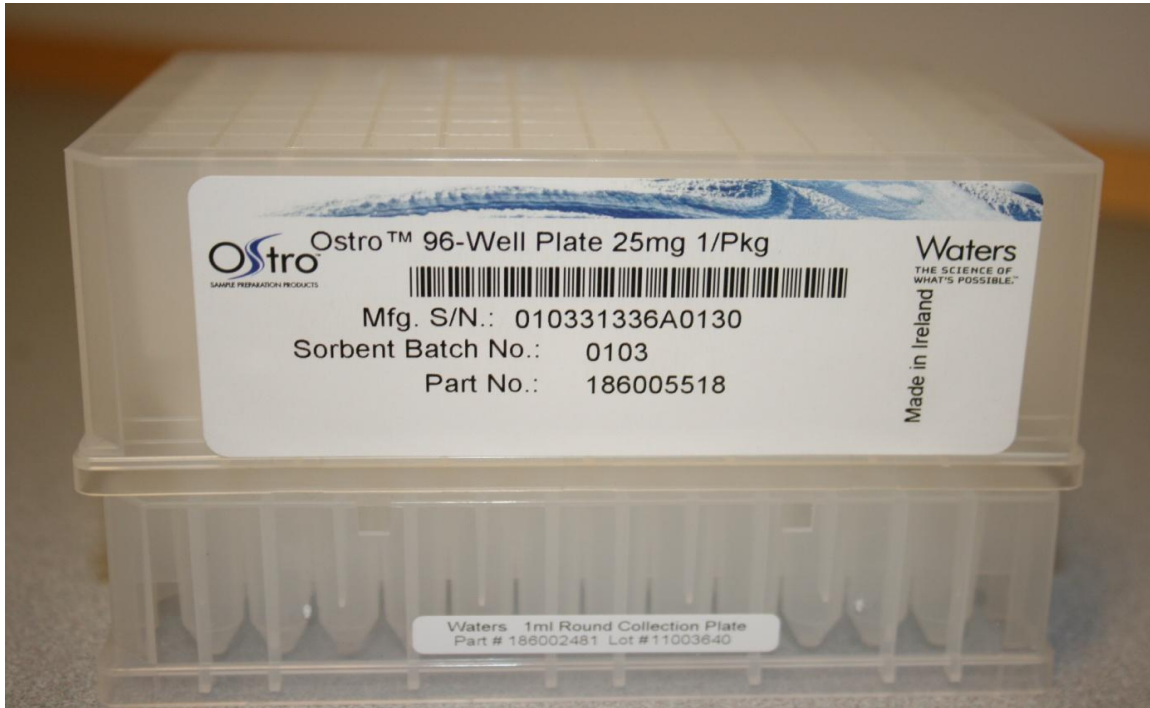
1.4.1 Felling av proteiner

Ved felling av proteiner fra serumprøven tilsettes det 10 % trikloreddiksyre (TCA), som gir bunnfall bestående av proteinet og TCA. Prøven sentrifugeres og supernatanten injiseres på systemet eller brukes til ytterligere prøveopparbeidelse.

1.4.2 OSTRO

Ostro-systemet er en relativt ny metode for å fjerne fosfolipider fra plasma og serumprøver. Dette gjøres ved å applisere serumprøven direkte i en brønn (figur 2) som er plassert over en 96-brønns plate. I brønnen er det en matriks som retarderer fosfolipidene i serumprøven. Når prøven er applisert tilsettes et egnet løsemiddel og brettene plasseres i oppsettet vist i figur 3. Prøven utsettes for et trykk og sendes, renses for lipider, til brønnen som står plassert under. Denne platen i 96-brønnsformat er tilpasset auto sampler og kan settes direkte i UPLC for analyse[20].

Innledning



Figur 2. Ostro prøveplate, med 96 brønner[21].

Innledning

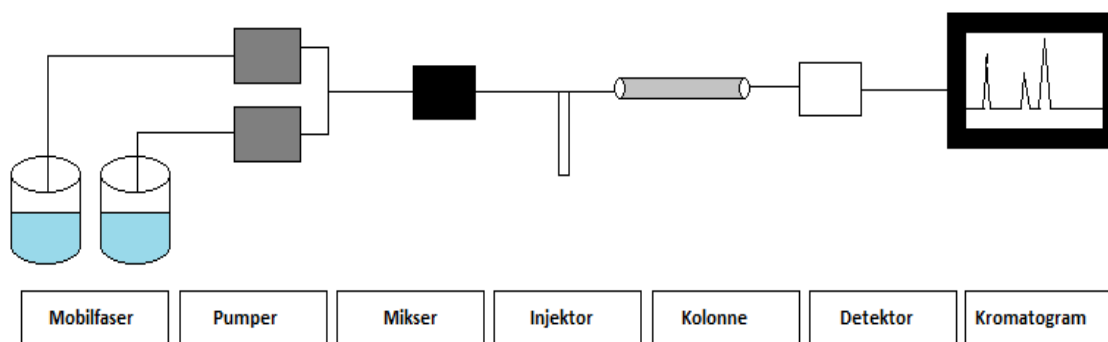


Figur 3. Oppsett Ostro[22]

1.5 Ultra performance liquid chromatography

UPLC er en form for væskekromatografi, som separerer forbindelser i en løsning. Prinsippet med væskekromatografi er at ulike forbindelser har ulike egenskaper, og dermed vil fordele seg ulikt mellom en mobil og en stasjonær fase, og kolonnen vil skille disse. Den mobile fasen er ulike løsemiddelsammensetninger i bevegelse gjennom den stasjonære fasen i kolonnen.

UPLC er det mest moderne innen dagens væskekromatografi. Den typiske UPLC-kolonne er pakket med partikler som har en diameter på 2,5 μm eller 1,7 μm . Dette gjør at antall teoretiske plater per lengdeenhet av kolonnen blir større enn tilsvarende HPLC-kolonne med partikkelstørrelse på 4 μm eller 5 μm . Dette gir smalere toppe i kromatogrammet, noe som resulterer i at det blir enklere å separere ulike forbindelser.



Figur 4. Oppsett UPLC

Prøven injiseres i injektoren, hvor mobilfasen, ved hjelp av en pumpe, passerer med en bestemt hastighet, målt i volum per tidsenhet. Prøven pumpes videre gjennom kolonnen til detektoren, som gir datagrunnlag for å lage et kromatogram[23, 24].

1.5.1 HILIC kromatografi

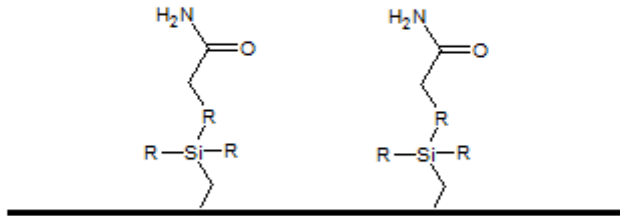
Hydrophilic interaction chromatography –HILIC, er en variant av normalfasekromatografi. Ved bruk av HILIC består den stasjonære fasen av polart materiale, slik at de polare komponentene i prøven vil retarderes ved hjelp av polare interaksjoner med partiklene i kolonnen. I motsetning til normalfasekromatografi, består mobilfasesammensetningen i HILIC av en blanding av vannløselige organiske løsemidler som metanol eller acetonitril og vann. Dette er en mobilfasesammensetning som er godt kompatibel med MS.

1.5.2 Mobilfase

Mobilfasene i HILIC kromatografi er organiske løsemidler og vann. Ved å tilpasse mobilfasenes sammensetning og lage en gradient, kan en kontrollere retensjonen av stoffene i prøven. HILIC-kolonnen gir omvendt retensjonsrekkefølge i forhold til en C18-kolonne.

1.5.3 Kolonne

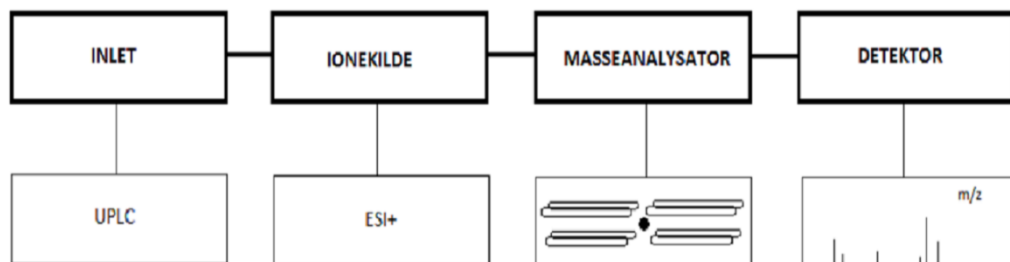
Den stasjonære fasen i kolonnen interagerer med stoffene i prøven, og gir separasjon ved at retensjonstiden til de ulike forbindelsene blir forskjellig. I HILIC består kolonnen av partikler med polar overflate, dermed vil de polare forbindelsene i prøven retarderes og separeres på grunnlag av ulik grad av polaritet. En HILIC-kolonne er som oftest silika eller polymerbasert. Kolonnen brukt i denne studien er en silikabasert amid-kolonne, som vist i figur 3[25].



Figur 5. Amid-kolonne, overflate

1.6 Massespektrometri

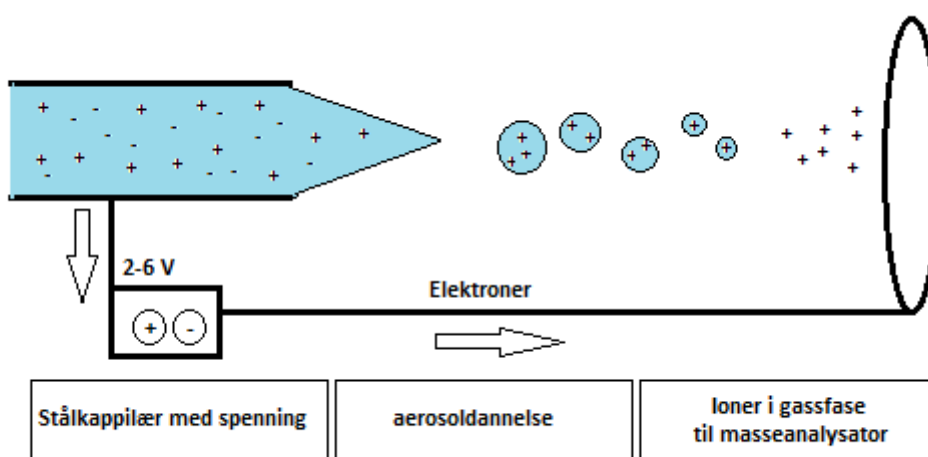
Ved å benytte massespektrometri kan en identifisere og kvantifisere forbindelser i en prøve. Et massespektrometer består av inlet, ionekilde, masseanalysator og detektor. Inlet i dette tilfellet vil være UPLC. Molekylene i prøven må ha ladning for å kunne detekteres i MS, derfor passerer prøven en ionekilde før den går videre gjennom masseanalysatoren, hvor ioner med ulik masse separeres og avslutningsvis når detektoren[26].



Figur 6. Oppsett massespektrometer

1.6.1 Ionekilder

I ionekilden vil molekylene i prøven få ladning. Elektrosprayionisasjon (ESI), er en mye brukt ioniseringsteknikk som er godt egnet til polare forbindelser[25, 27]. Prøven føres inn i MS i en væskestrøm som passerer et kapillærrør. Ved utgangen av kapillærrøret omdannes prøven til en aerosol ved hjelp av høy spenning og nitrogengass. Aerosoldråpene treffer deretter en elektrode som gir dem elektrisk ladning og væsken fordampes ved hjelp av en tørkegass[25, 28].



Figur 7. ESI-ionekilde

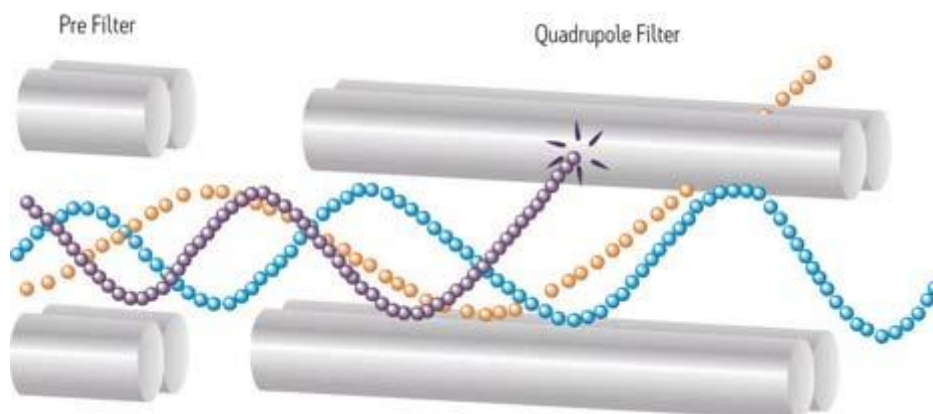
1.6.2 Masseanalysator

Masseanalysatoren separerer ionene i prøven etter masse til ladning, m/z -ratio. I denne oppgaven er det brukt en trippelkvadrupol. En kvadrupol består av fire parallelle stenger med ladning, og ved å regulere elektrisk ladning vil ionene passere med ulik hastighet avhengig av masse. Kvadrupolen kan stilles inn til å skanne en bestemt masse, eller skanne alle molekylionene som passerer.

1.6.3 MS/MS

Ved å koble sammen to kvadrupoler og plassere en kollisjonscelle i midten, kan en utføre tandem massespektrometri (MS/MS). Denne masseanalysatoren kalles for en

trippelkvadrupol, og består av to kvadrupoler og en kollisjonscelle i midten. Kollisjonscellen består av en heksapol omgitt av argongass. Inne i kollisjonscellen er det høyt trykk, og her vil molekylene fragmenteres før de går videre til kvadrupol nummer to. Ved bruk av MS/MS kan en utføre blant annet produktionskann og SIR.



Figur 8. Kvadrupol [29]

1.6.4 Produktionskann

Under produktionskann er den første kvadrupolen i trippelkvadrupolen innstilt på SIR, kollisjonscellen på, og den siste kvadrupolen på skann. En vil da kunne se hvilke fragmenter molekylene kan danne.

1.6.5 Selected ion recording

Ved SIR er den første kvadrupolen stilt inn til å slippe gjennom utvalgte masser. Kollisjonscellen og kvadrupol nummer to er slått av. Ved å bruke SIR når bare de massene vi er interessert i frem til detektoren, og en unngår andre eventuelt forstyrrende signal.

1.7 Intern standard

Ved å tilsette en intern standard bidrar en til å opprettholde nøyaktighet og presisjon i analysen. En kjent, konstant konsentrasjon av intern standard tilsettes alle prøver tidlig i analysen og vil på denne måten korrigere for tilfeldige feil som kan skje under prøveopparbeidelsen. Intern standard bør oppføre seg likt med analytten, og ikke finnes naturlig i prøvene.

1.8 Validering av analysemetode

Enhver analysemetode bør valideres for å dokumentere at metoden er egnet til sitt formål. Ved å validere metoden og bestemme linearitet, nøyaktighet og presisjon, bidrar det til å kvalitetssikre analyseresultatene[28, 30].

1.8.1 Linearitet

Lineariteten til en metode forteller om evnen til å gi standardkurver med en respons som er en lineær funksjon av konsentrasjon. Lineariteten dokumenteres med lineær regresjon og determinantens koeffisient, R^2 , som skal innfri til oppgitte krav[28]. R^2 er et mål på hvor godt de beregnede y-verdier representerer de faktiske y-verdiene.

1.8.2 Nøyaktighet

Metodens nøyaktighet angir hvor nær den målte verdi er den sanne verdi. Ved å lage prøver med kjent konsentrasjon og sammenligne målt konsentrasjon med den sanne verdien, får vi et mål på nøyaktighet. Nøyaktigheten skal sikre at metoden ikke har systematiske feil[28].

1.8.3 Presisjon

Presisjonen i en metode forteller noe om spredningen av parallelle målinger av en analytt i prøven. Presisjonen angis som regel som relativt standardavvik, RSD[28].

1.8.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrensen(LD) angir den laveste detekterbare konsentrasjon av stoff i en prøve, og oppgis gjerne i mikro- eller nanogram per milliliter. I kromatografien bestemmes deteksjonsgrensen ut i fra et signal-til-støy-forhold, S/N. Den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon, er kvantifiseringsgrensen(LQ). Kvantifiseringsgrensen kan bestemmes ut i fra S/N-forholdet[28].

1.9 Hensikt

Den overordnede hensikten med studien er å utvikle en LC-MS metode for å måle konsentrasjon av gentamicin i små volum av serum.

Delmål for studien

1. Utarbeide en god metode for prøveopparbeidelse
2. Kvantifisere de enkelte gentamicin-molekylene ved hjelp av UPLC-MS
3. Validere metoden

2. Materiale

2.1 Utgangsstoffer og kjemikalier

Tabell 2. Oversikt leverandør og lotnummer

Forbindelse	Leverandør	Lot
Gentamicin sulfat	Sigma-Aldrich	#075K8907
		#079K13862V
Sisomicin sulfat	Sigma-Aldrich	#116K1077
Kanamycin	Sigma-Aldrich	#70S60519
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich	#SZBB190AV
		#SZBB067BV
		#SZBC010AV
Maursyre (FA)	Sigma-Aldrich	#SZBB1170V
Ammonium acetat	Riedel-de Haën	#42640

2.1.1 Serum

Medikament fritt serum ble levert av Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN).

2.1.2 Vann

Alt vann som ble brukt i studien var Milli-Q water fra Millipore, USA

2.2 Utstyr

Tabell 3. Utstysrliste

Bruksområde	Utstyr	Leverandør	
UPLC	Acquility UPLC	Waters, Milford, USA	
	BEH AMIDE kolonne 1,7µm 2,1 x100 mm	Waters, Milford, USA	
	BEH AMIDE kolonne 2,5 µm 2,1 x75 mm	Waters, Milford, USA	
	X-bridge C-18-kolonne	Waters, Milford, USA	
	Sample vials 12x32 mm	Waters, Milford, USA	
	Sample vials 12x32 mm	Waters, Milford, USA	
MS	Quattro Premier XE Tandem	Waters, Milford, USA	
	Hamilton HPLC sprøyte 100 µl	Hamilton	
OSTRO	OSTRO	Waters	
	OSTRO sample plate	Waters	
	OSTRO collection plate	Waters	
Pipetter	0,5-10 µl	Eppendorf	Research, Tyskland
	10-100 µl	Eppendorf	Research, Tyskland
	100-1000 µl	Eppendorf	Research, Tyskland
	Pipettespisser	Eppendorf	Research, Tyskland
Annet	Eppendorfsentrifuge, Biofuge Fresco	Heraeus instruments	
	Vortex	Heidolph, Tyskland	
	Eppendorfrør	Brand GMBH	
	Vekt	Sartorius, Tyskland	

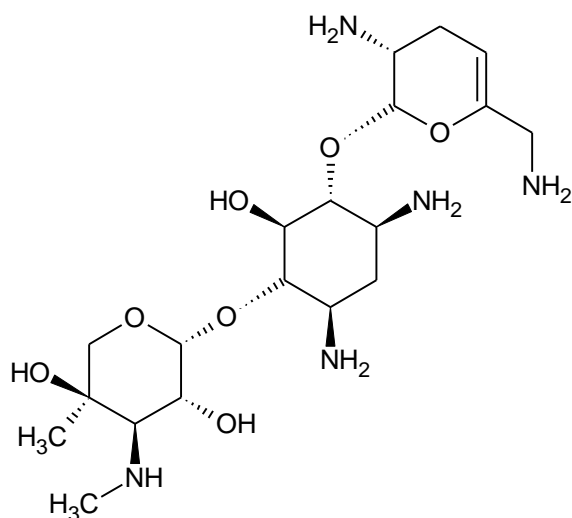
3. Metode

3.1 Intern standard

Sisomicin ble i starten brukt til intern standard, men mot slutten av studien ble en ny batch av gentamicin tatt i bruk, og det viste seg da at denne interfererte med signalene fra intern standard og dermed gav et upresist resultat. Et fullskann spekter av den nye batchen gentamicin gav et relativt kraftig signal på $m/z=448$. $(M+H)^+$ for sisomicin er 448. Det ble da valgt å arbeide videre med kanamycin som intern standard.

3.1.1 Sisomicin

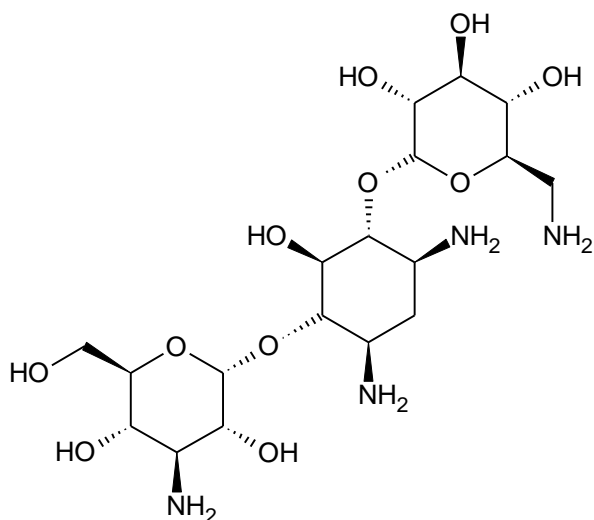
Sisomicin er tidligere brukt som intern standard i studier med gentamicin. Den har en masse på 447,5 g/mol og har en lignende struktur som gentamicin.



Figur 9. Struktur sisomicin

3.1.2 Kanamycin

Kanamycin har lignende struktur som gentamicin og har en masse på 484,5 g/mol.



Figur 10. Struktur kanamycin

3.2 Tillaging av prøver

Innledningsvis ble det laget en stamløsning av gentamicin og sisomicin. Tørrstoff ble løst i en blanding av metanol og vann (3:1). Ved tillaging av serumprøver ble medikamentfritt serum tilsatt ulike volum fra gentamicin stamløsning i tillegg til en fast konsentrasjon av sisomicin.

Standardrekken som ble brukt hadde gentamicin-konsentrasjoner fra 0,5 – 80 µg/ml og en kanamycinkonsentrasjon på 13 µg/ml. Det ble også laget kvalitetskontrollprøver(QC) med ulike konsentrasjoner på 1, 4, 15, 30 og 50 µg/ml.

3.3 Prøveopparbeidelse

Det ble forsøkt å felle proteiner og injisere rett på UPLC-MS, samt opparbeidelse ved hjelp av OSTRO-systemet, i tillegg til disse metodene i kombinasjon.

3.3.1 Felling av proteiner

Serumprøvene ble opparbeidet ved å felle ut proteiner med TCA.

Tabell 4. Prosedyre utfelling

Nr.	Prosedyre
1.	25 µl serum med gentamicin tilsettes 80 µl intern standard og 25 µl 10 % TCA
2.	Vortex i 5 sekunder
3.	Prøvene fryses (-74C) i 10 minutter
4.	Prøvene tines, vortex i 5 sekunder
5.	Supernatant overføres til vial for analyse

3.3.2 OSTRO

Det ble forsøkt å sette serumprøver direkte på ostro-kolonnen, sammenlignet med å overføre supernatanten fra steg 5 i tabell 4, på ostro-kolonnen. Det siste alternativet gav best resultat (tabell 6).

Tabell 5. Prosedyre OSTRO

Nr.	Prosedyre
1.	50 µl serum appliseres på OSTRO-kolonne
2.	150 µl ACN med 10 % TCA tilsettes
3.	Løsningen blandes ved pipettering
4.	Prøvene påføres trykk i omtrent 10 minutter
5.	Prøvene har passert kolonnen og er klar til analyse direkte fra brønn

Tabell 6. Endelig metode for prøveopparbeidelse

Nr.	Prosedyre
1.	25 µl serum med gentamicin tilsettes 80 µl intern standard og 25 µl 10 % TCA
2.	Vortex i 5 sekunder
3.	Prøvene fryses (-74C) i 10 minutter
4.	Prøvene tines, vortex i 5 sekunder
5.	80 µl supernatant overføres til OSTRO-kolonne
6.	240 µl ACN med 10 % TCA tilsettes
7.	Løsningen blandes ved pipettering
8.	Prøvene påføres trykk i omtrent 10 minutter
9.	Prøvene har passert kolonnen og er klar til analyse direkte fra brønn

3.4 Utvikling av metode for UPLC

For å oppnå en akseptabel separasjon og et godt signal av prøvene, ble ulike mobilfasesammensetninger utprøvd. Dette ble utført med isokratisk eluering på en HILIC AMIDE kolonne.

3.4.1 Mobilfaser

Mobilfasesammensetning nummer 3 i tabell 3 gav størst grad av separasjon av forbindelsene, samt best signal og ble derfor brukt videre.

Tabell 7. Mobilfasesammensetninger

Nr	Mobilfase A	Mobilfase B
1	H ₂ O + 150 mM NH ₄ OA _c + 1 % FA	ACN + 1 % FA
2	H ₂ O + 20 mM NH ₄ OA _c + 0,1 % FA	ACN + 20 mM NH ₄ OA _c + 0,1 % FA
3	H ₂ O + 0,1 % FA	ACN/H ₂ O (90/10 %) + 0,1 % FA

3.4.2 Gradient

Ulike gradienter ble utprøvd for å få best mulig separasjon. Gradienten i tabell 7 ble brukt videre i arbeidet.

Tabell 8. Mobilfasegradient

Tid	% A	% B	Flow
0	0	100	0,300 ml / min
2	0	100	0,300 ml / min
5	70	30	0,300 ml / min
6	70	30	0,300 ml / min
7	0	100	0,300 ml / min
9	0	100	0,300 ml / min

3.4.3 Kolonne

Analysene ble utført med bruk av en HILIC AMIDE kolonne 2,5 µm 2,1 X 75 mm.

3.5 Utvikling av metode for MS

En løsning med kjent konsentrasjon av gentamicin og sisomicin ble brukt til å finne akseptable verdier for cone voltage og kollisjonsenergi (CV og CE). Ved disse verdiene vil en få god intensitet av signalet og mest protonert molekylion (M+H)⁺.

3.5.1 Ionekilde

Som ionekilde ble elektronspray ionisering (ESI+) brukt.

3.5.2 Masseanalysator

Innledningsvis ble det kjørt fullskann på rene prøver av gentamicin og sisomicin. Videre ble det laget en SIR-fil, hvor kun bestemte masser slapp gjennom.

Tabell 9. SIR, selected ion recording

Forbindelse	Målt [M+H] ⁺ (m/z)
Gentamicin C1	474,3
Gentamicin C1a	450,3
Gentamicin C2, C2a, C2b	464,3
Sisomicin	448,3
Kanamycin	485,3

3.5.3 Produktionskann

Det ble kjørt produktionskann av hvert enkelt gentamicin-molekyl for å undersøke om fragmentene av gentamicin C1 og C2 kunne interferere med C1a.

3.6 Validering av analysemetode

3.6.1 Linearitet

Serumprøvene ble laget i tre paralleller av hver konsentrasjon. Prøvene ble opparbeidet og hver parallell ble analysert med 3 injeksjoner.

3.6.2 Nøyaktighet

Det ble laget QC-prøver med konsentrasjoner 15 µg/ml, 30 µg/ml og 50 µg/ml, i tre paralleller som ble opparbeidet og analysert med en injeksjon hver.

3.6.3 Presisjon

Tre paralleller av hver QC-prøve ble analysert for validering av presisjon.

3.6.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Serumprøven med den laveste konsentrasjonen ble videre fortynnet for å finne LD og LQ. Det ble analysert 1 injeksjon av hver fortynningsprøve.

4. Resultater

4.1 Intern standard

Kanamycin ble valgt til intern standard da dens egenskaper og struktur gjorde den velegnet, samt at det var denne som var lettest tilgjengelig.

4.2 Prøveopparbeidelse

Hver serumprøve på 25 μ l ble tilsatt 80 μ l IS og 25 μ l 10 % TCA, mikset på vortex i 5 sekunder og satt i fryser på -74°C i 10 minutter. Deretter ble prøvene tint, mikset på vortex i 5 sekunder og satt til sentrifugering på 10000 g i 5 minutter. 80 μ l supernatant ble overført til OSTRO kolonne, og tilsatt 240 μ l ACN med 10 % TCA. Prøven ble blandet ved pipettering. OSTRO-platen, med en 96-brønnsplate under, ble utsatt for et trykk på 15 psi i 15 minutter, deretter 20 psi i 1 min. 96-brønnsplaten ble deretter satt i UPLC for analyse.

4.3 UPLC

Ulike mobilfasegradienter, samt kolonnetemperatur og flow ble testet, til slutt ble gradienten i tabell 7 brukt, med en flow på 0,3 ml/min og en kolonnetemperatur på 60°C . Span ble satt til 0,2, dwell 0,025 og resolution 16. Det ble brukt en BEH AMIDE kolonne 2,5 μ m 2,1 x75 mm fra Waters.

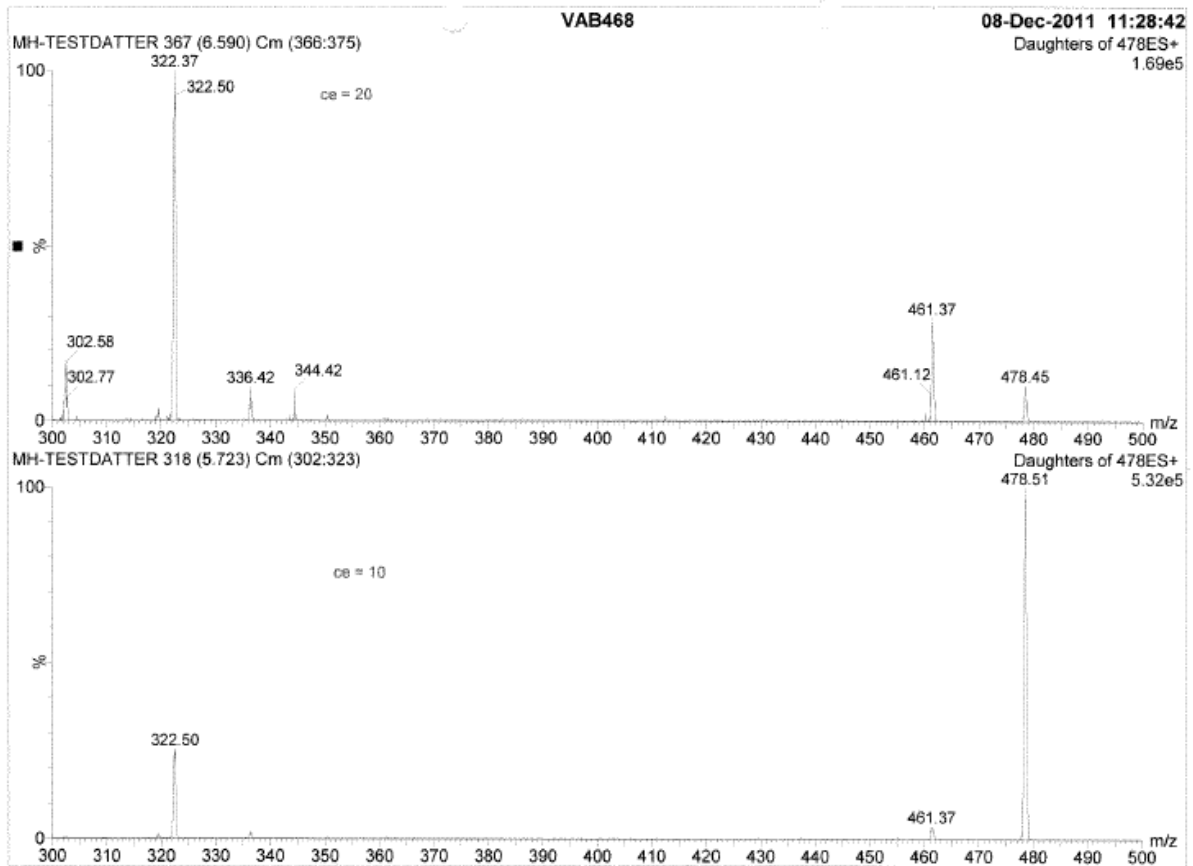
4.4 MS

Det ble valgt å arbeide med en cone voltage, CV, på 35. Som ionekilde ble ESI⁺ brukt. Ved SIR ble [M+H]⁺ som oppgitt i tabell 8 brukt.

4.4.1 Produktionskann

Etter å ha kjørt produktionskann på gentamicin C1 (m/z=478) og C2 (m/z=464), hver for seg, kunne vi utelukke at de kunne danne fragmenter som ville interferere med resultatet. Det ble ikke dannet fragmenter med hverken m/z=464 eller m/z=450, altså massene som ble brukt ved SIR (tabell 8).

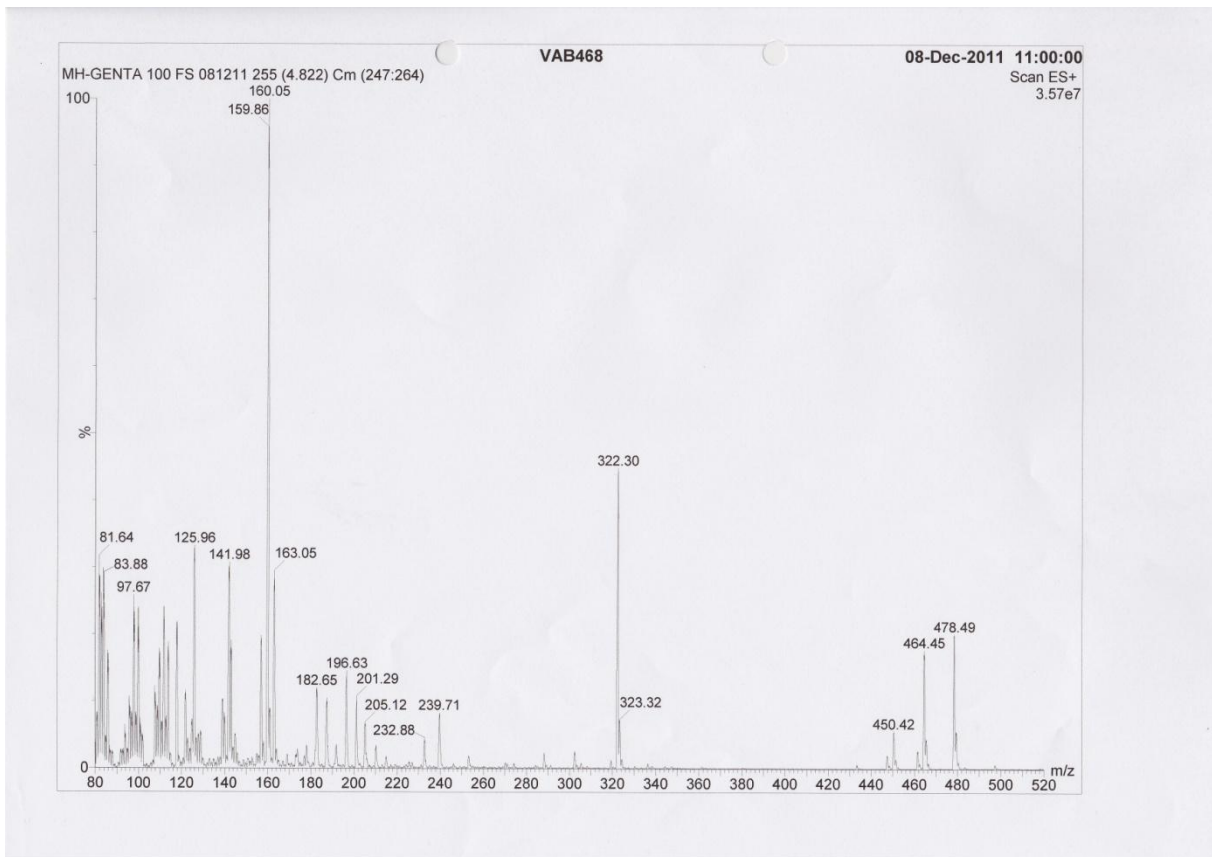
Resultater



Figur 11. Produktionskann av gentamicin C1, testet med ulike verdier for kollisjonsenergi. Viser datter på $m/z=322$. Viser at det ikke dannes $m/z=464$ eller $m/z=450$.

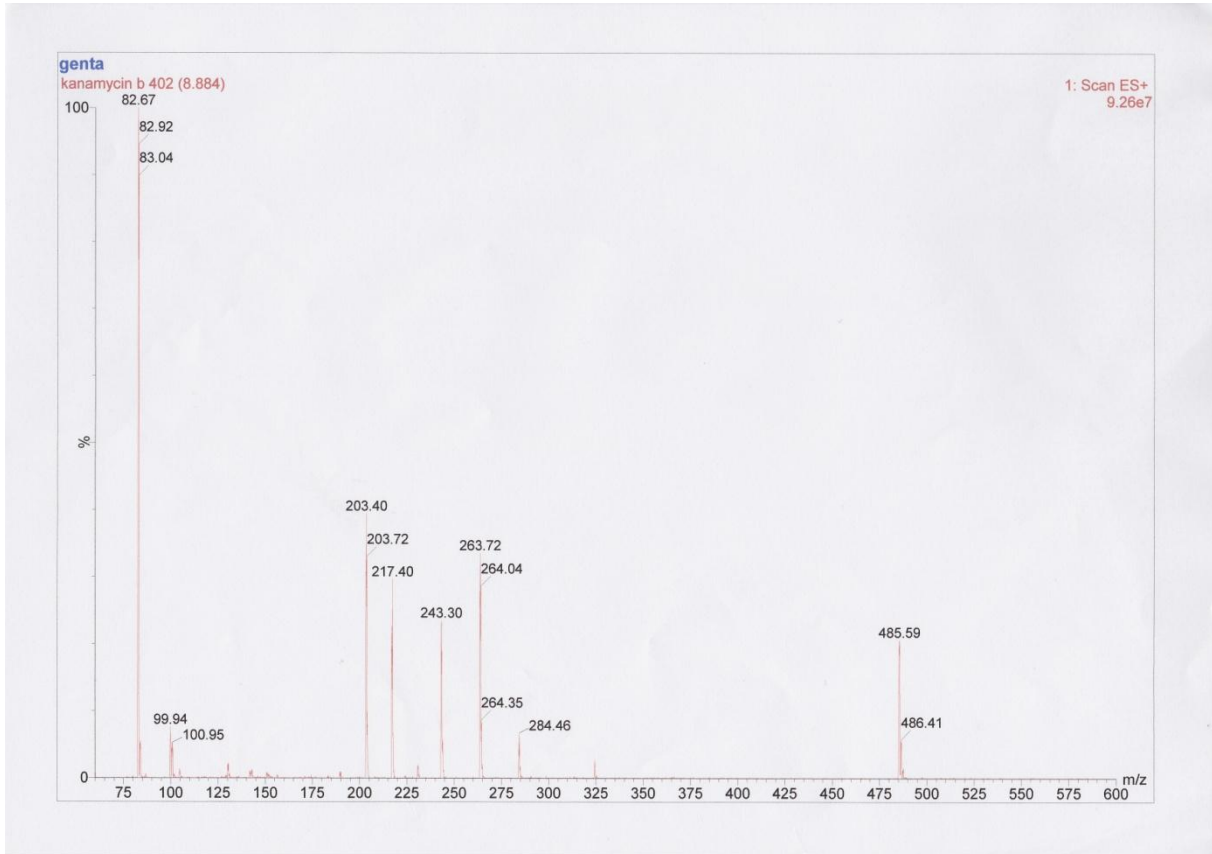
Resultater

4.4.2 Fullskann



Figur 12. Fullskann av første batch med gentamicin, viser lite signal på m/z=448.

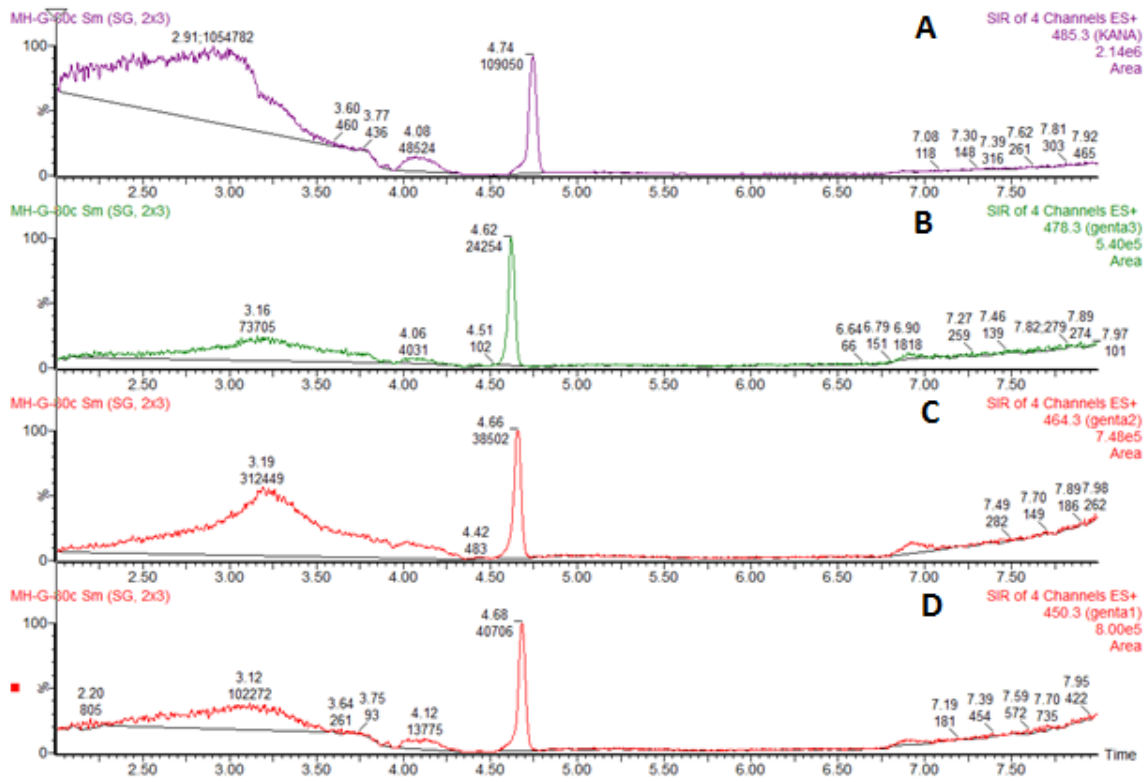
Resultater



Figur 13. Fullskann kanamycin, viser $m/z=485$.

4.5 Kromatografi

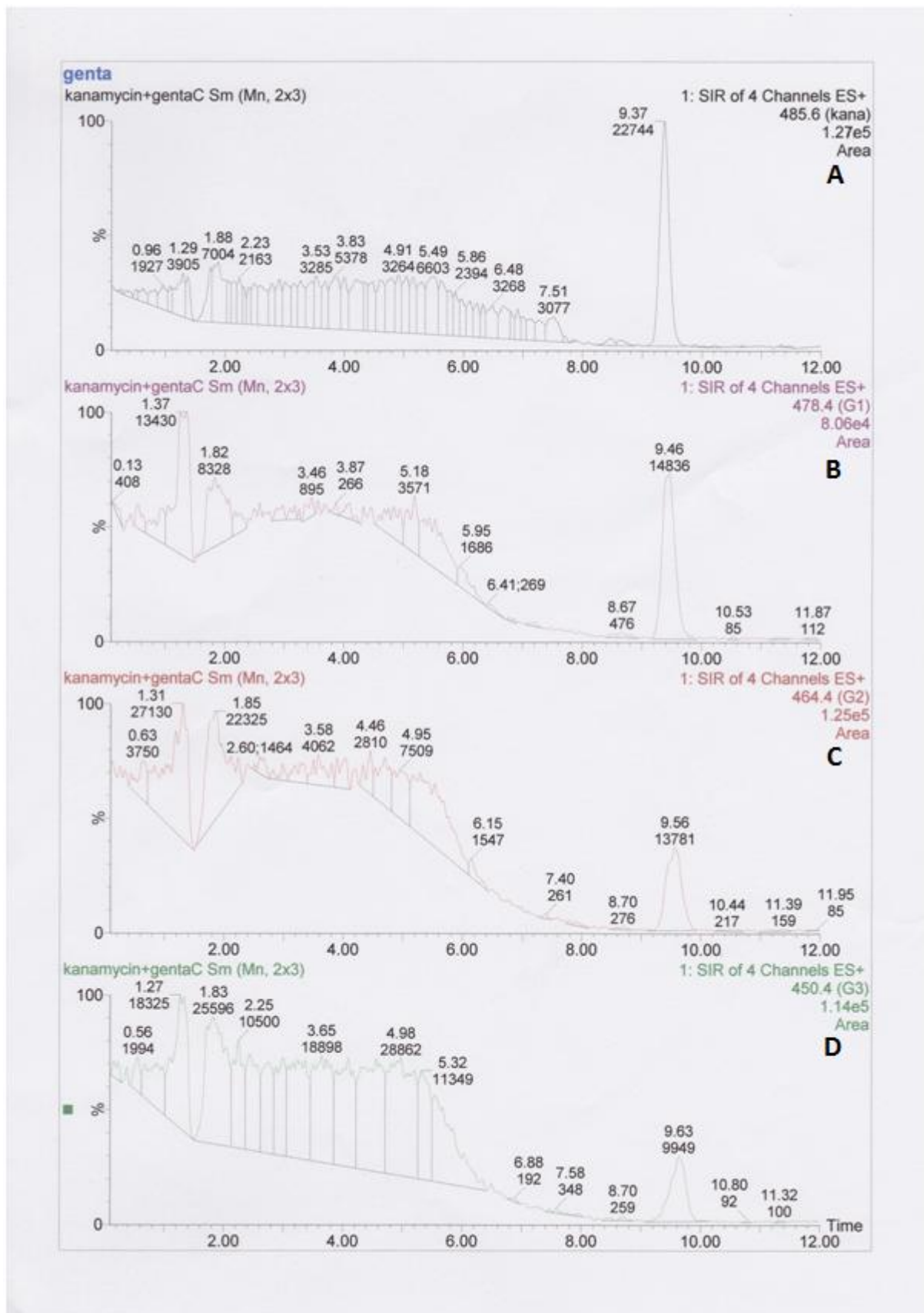
4.5.1 Separasjon



Figur 14. Viser grad av separasjon i serumprøve med sluttbetingelsene. A – kanamycin, B – gentamicin C1, C – gentamicin C2, D – gentamicin C1a.

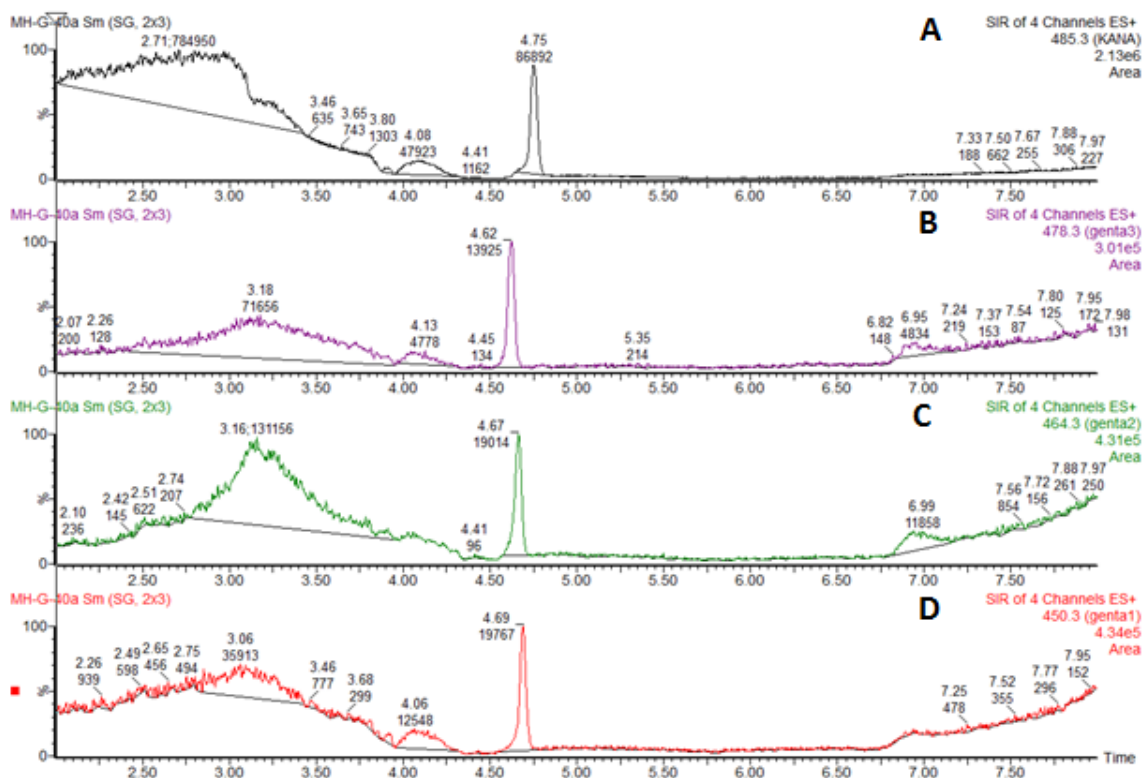
4.5.2 Standarder i vann og serum

Resultater



Figur 15. Kromatogram, vandig prøve. Viser fra øverst; A- intern standard kanamycin, B- gentamicin C1, C- gentamicin 1a og nederst D- gentamicin C2, C2a og C2b

Resultater



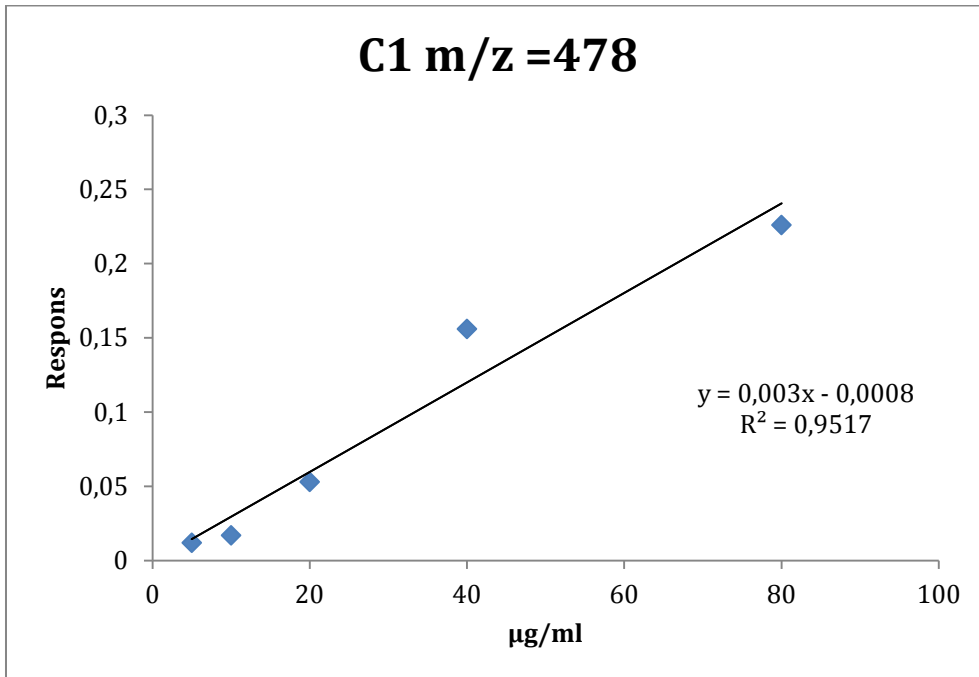
Figur 16. Serumprøve med gentamicinkonsentrasjon 40 µg/ml og kanamycin 13 µg/ml. A – kanamycin, B – gentamicin C1, C – gentamicin C2, D – gentamicin C1a. Sammenlignet med vanddig prøve I figure 16, ser en at det er lite forurensinger igjen etter prøveopparbeidelsen.

4.6 Validering

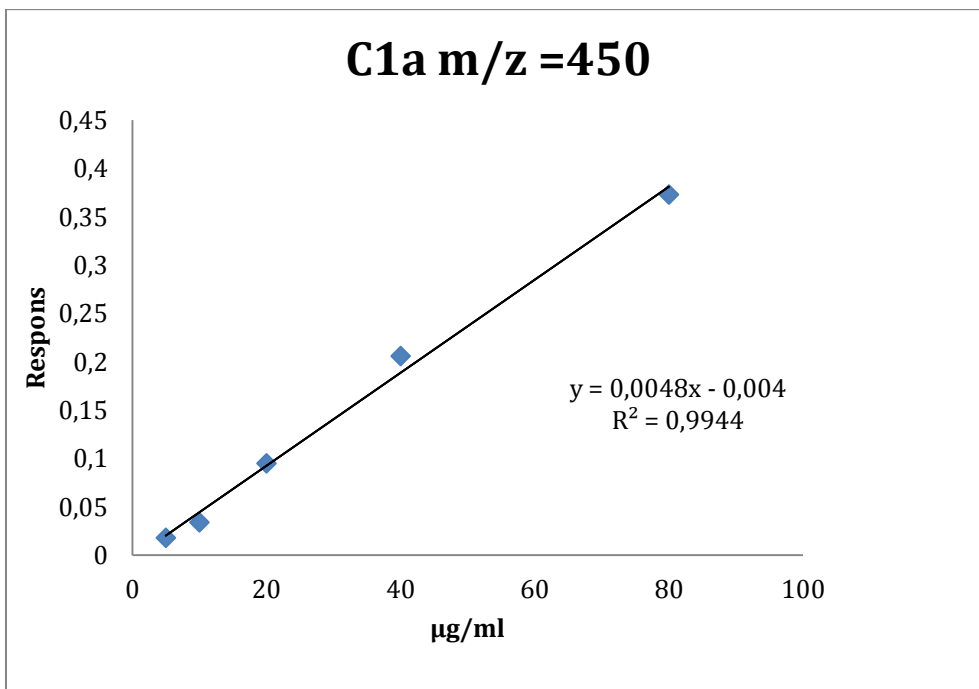
Analysene viste sprikende resultat med hensyn på linearitet og relativt standardavvik.

4.6.1 Linearitet

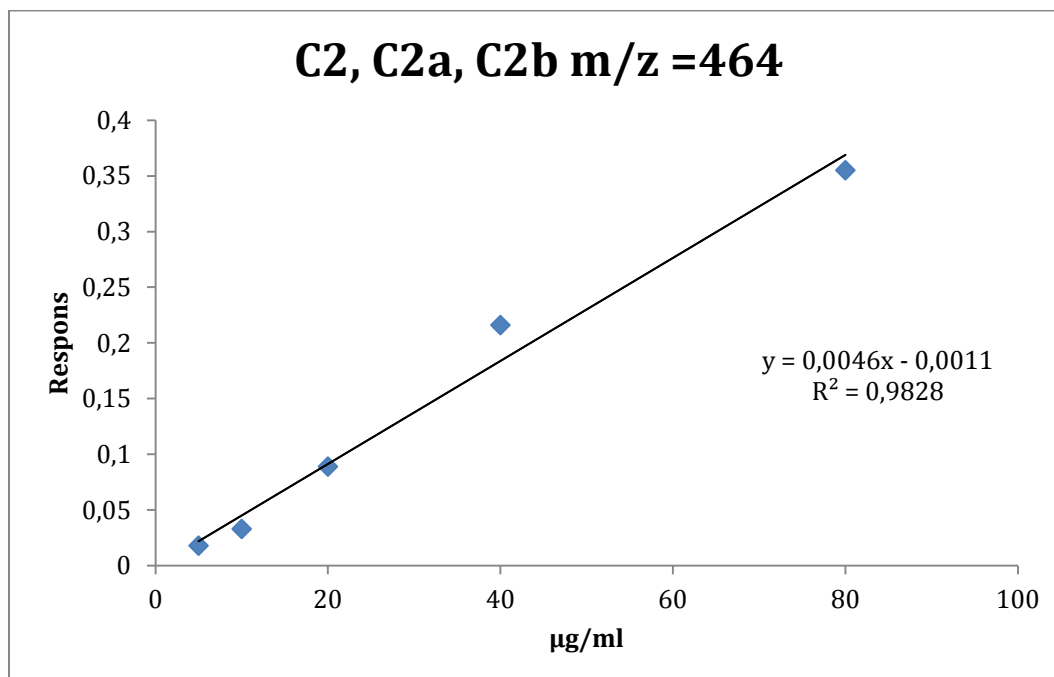
Standardkurvene viser variasjon i determinantens koeffisient, R^2 . Det beste resultatet ble funnet i analysen av molekyl C1a, $R^2 \geq 0,99$.



Figur 17. Standardkurve gentamicin C1



Figur 18. Standardkurve gentamicin C1a



Figur 19. Standardkurve gentamicin C2, C2a og C2b

4.6.2 Nøyaktighet

Kontrollprøver med tre ulike kjente konsentrasjoner ble hver delt i tre paralleller før prøveopparbeidelsen, og analysert med en parallell hver for testing av nøyaktighet. Ifølge kravene til medisinsk laboratorieavdeling[31], $RSD \leq 15\%$ og gjenvinningsgrad $100 \pm 15\%$, er det bare prøven på 50 µg/ml, som fyller krav til relativt standardavvik, mens det er tre prøver som ikke fyller kravet til nøyaktighet.

Tabell 10. Validering av nøyaktighet, gentamicin C1

Gentamicin C1	15 µg/ml	30 µg/ml	50 µg/ml
Gj.snitt konsentrasjon	15,8	28	58
RSD	44,1	24,9	3,3
% av sann verdi	105,3	93,3	116

Tabell 11. Validering av nøyaktighet, gentamicin C1a

Gentamicin C1a	15 µg/ml	30 µg/ml	50 µg/ml
Gj.snitt konsentrasjon	15,4	29,3	62,2
RSD	23,4	18,1	8,3
% av sann verdi	102,7	97,7	124,4

Tabell 12. Validering av nøyaktighet, gentamicin C2, C2a, C2b

Gentamicin C2, C2a, C2b	15 µg/ml	30 µg/ml	50 µg/ml
Gj.snitt konsentrasjon	15,5	30,7	65,4
RSD	24,5	24,4	5,8
% av sann verdi	103,3	102,3	130,8

4.6.3 Presisjon

Tre paralleller av hver QC ble analysert for spredning i resultatene. Alle prøvene ligger innenfor kravene for relativt standardavvik, $RSD \leq 15\%$.

Tabell 13. Validering av presisjon, QC 15. Tallene viser areal under kurve

15 µg/ml	C1	C1a	C2	Kanamycin
Gjennomsnitt	4458	7562	7311	117610
Standardavvik	156,5	329,3	386,1	4477,6
RSD (%)	3,5	4,4	5,0	3,8

Tabell 14. Validering av presisjon, QC 30. Tallene viser areal under kurve

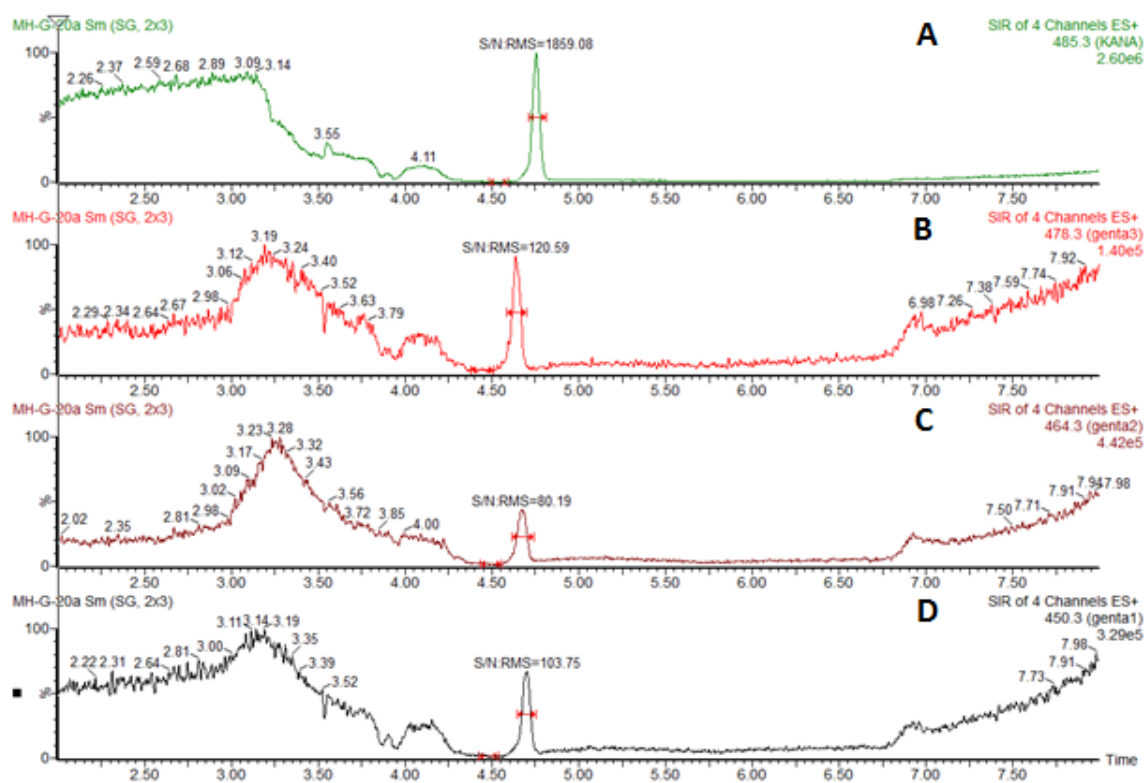
30 µg/ml	C1	C1a	C2	Kanamycin
Gjennomsnitt	6387	10170	10568	70590
Standardavvik	124	219,5	635	5250
RSD (%)	1,9	2,2	6,0	7,4

Tabell 15. Validering av presisjon, QC 50. Tallene viser areal under kurve

50 µg/ml	C1	C1a	C2	Kanamycin
Gjennomsnitt	9447	16489	16841	49633
Standardavvik	591,6	534,7	478	2133,8
RSD (%)	6,3	3,2	2,8	4,3

4.6.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Standardrekka ble videre fortynnet for å bestemme deteksjons- og kvantifiseringsgrensen. Programvaren til LC-MS systemet har en egen funksjon for å beregne S/N-forhold direkte i kromatogrammet.



Figur 20. Eksempel på beregning av S/N. Vist ovenfor er en serumprøve med gentamicinkonsentrasjon 80 µg/ml. A – kanamycin, B – gentamicin C1, C – gentamicin C2, D – gentamicin C1a.

Resultater

1,25 ng/ml lot seg kvantifisere. Dette tilsvarer om lag 20 pg på kolonnen. Dette betyr at dersom serumprøven oppkonsentreres, kan man kvantifisere også prøver der konsentrasjonen er lavere enn 1,25 ng/ml.

En kan se at tall for LD og LQ ligger under den laveste konsentrasjonen i standardrekken som ble brukt. Analysene som er grunnlaget for beregningen av deteksjons- og kvantifiseringsgrensene ble utført på et annet LC-MS system enn analysene av de siste standardprøvene.

5. Diskusjon

5.1 Intern standard

Innledningsvis ble sisomicin valgt til intern standard da denne var brukt i flere tidligere studier og var lett tilgjengelig. Etter en tid ble det oppdaget av denne ikke var egnet, da en ny batch av gentamicin gav signal på samme masse. Det ble vurdert å bruke streptomycin videre som intern standard, men da denne ikke lot seg skaffe tidsnok, ble kanamycin valgt i stedet. Det ble gjort søk etter tidligere studier der kanamycin ble brukt som intern standard, uten resultat. Kanamycin ble likevel vurdert som egnet, da det er strukturelle likheter med gentamicin, samt at sannsynligheten er liten for at denne skulle være tilstede i serumprøvene, da kanamycin ikke har markedsføringstillatelse i Norge.

5.2 Prøveopparbeidelse

Det ble testet felling av proteiner i ulike volumforhold med 10 % TCA. Metoden i tabell 4 ble brukt til å opparbeide prøvene før OSTRO. Det ble forsøkt en rekke sammensetninger av prøve og løsemiddel i OSTRO-platen, da det ikke ble funnet tidligere studier å hente informasjon fra. Det ble tatt utgangspunkt i produsentens anbefalinger. Det ble valgt å ta ut maksimalt med prøve fra supernatant fra prøveopparbeidelsen, og tilpasse tilsetning av løsemiddel ut i fra et 1:3 forhold med ACN tilsatt 10 % TCA. Dette gav gode kromatogram, uten mye støy, sammenlignet med vandige prøver. Informasjon fra produsenten gav ingen retningslinjer gjeldende mengde trykk og tidsperspektiv ved bruk av OSTRO-systemet. Det ble gjort flere forsøk med ulike mengder trykk i ulike tidsintervall på prøvene i OSTRO-platen. Videre arbeid kan optimalisere prosedyren. Sammenlignet med tidligere studier, synes prøveopparbeidelsen å være god, det var lite tegn til forurensinger i prøven under LC-MS- analysen.

5.3 LC-MS

Metoden er utviklet ved bruk av en amid-kolonne. Det ble kjørt om lag 300 injeksjoner på samme kolonne, uten at egenskapene så ut til å forandres. Dette indikerer en robust metode som lar seg reproducere. Alle analysene ble kjørt på samme type kolonne, og da dette gav gode resultater ble det ikke brukt tid på å prøve andre kolonner.

Det ble brukt tid på å optimalisere tuningverdier i metoden. Dette ble gjort mens arbeidet foregikk på Institutt for farmasi, avdeling for legemiddelkjemi. Da arbeidet senere ble flyttet til Forskningsparken, ble det ikke tid til å teste de samme variablene. Det kan tenkes at metoden her kunne vært ytterligere optimalisert, ettersom vi ikke fikk brukbare resultater for de laveste konsentrasjonene i standardrekken.

5.4 Validering

Metoden som er utviklet tilfredsstillende ikke krav til linearitet, relativt standardavvik samt prosentvis utbytte av sann verdi. Med tanke på validering av presisjon, fylte alle prøvene krav til relativt standardavvik. Dette forteller at etter gjentatte injeksjoner fra samme prøveglass i UPLC, er det små variasjoner i analyseresultatene.

Resultatene av valideringen tyder på at det må arbeides med å optimalisere metoden for prøveopparbeidelsen, for å senke relativt standardavvik og forbedre nøyaktigheten.

5.5 Feilkilder

5.5.1 Intern standard

Sisomicin er lite egnet som intern standard, ettersom masse 448 ble observert i den andre batchen med gentamicin. Det er ikke arbeidet mye med kanamycin som intern standard, men den er antakeligvis godt egnet, da det er lite tenkelig at det skal dannes fragmenter av gentamicin som kan interferere med den massen.

5.5.2 Gentamicin

Det viste seg å være vesentlige forskjeller på de to batchene som ble brukt i studien. Det er derfor vanskelig å overføre resultatene og metoden til en vilkårlig annen batch. Optimalt burde flere batcher av gentamicin blitt studert.

5.5.3 Konsentrasjon kanamycin

Da den siste standardrekken ble tillaget, med kanamycin som intern standard, endte det med en for høy konsentrasjon av kanamycin i forhold til konsentrasjonsintervallet til gentamicin. Dette kan ha bidratt til unøyaktighet ved beregning av linearitet, nøyaktighet og presisjon.

5.5.4 Menneskelige feil

Pipetteringsfeil er en feilkilde som i stor grad kan påvirke resultatene i en slik studie hvor prøvevolumene er svært små. Det er viktig med gode rutiner og en presis arbeidsmåte for å minimere muligheten for slike feil.

5.6. Fremtidig arbeid

Metoden krever videre valideringsarbeid. Resultatene tyder på at nøyaktigheten kan forbedres ved å videreutvikle prosedyren for prøveopparbeidelsen.

I tillegg bør man arbeide med å optimalisere betingelsene for OSTRO-systemet, med hensyn til løsemiddelsammensetning, prøve- og løsemiddelvolum, trykk og tidsforbruk. En god metode for prøveopparbeidelse vil gi et godt grunnlag for serumanalyser av polare antibiotika.

Etter om lag 300 injeksjoner er det ingen tegn til at kolonnens egenskaper er endret. Dette er særlig viktig i forhold til anvendelse i større skala, og står i kontrast til tidligere erfaring med andre typer kolonner.

En validert metode vil kunne være grunnlag for studier hvor man har behov for å analysere gentamicin eller andre antibiotika i små blodvolum. Et særlig aktuelt

Diskusjon

eksempel kan være farmakokinetikkstudier av slike legemidler hos premature barn. Det er stor mangel på slike studier siden man har vært avskåret fra å ta hyppige blodprøver i situasjoner der det samlede blodtapet for barnet blir for stort.

6. Konklusjon

Det er utviklet en LC-MS basert metode for kvantifisering av gentamicin i serumprøver med volum 25 µl. Medikamentfritt serum tilsatt gentamicin og intern standard ble brukt til analysene i studien.

Det er utviklet en metode for prøveoppbeidelse som fungerer godt og gir gode resultater sammenlignet med tidligere anvendte prosedyrer.

Gentamicin-molekylene lot seg ikke fullstendig separere, men kvantifiseringen av hvert enkelt molekyl var vellykket.

Valideringen av metoden viser at den ikke fyller gjeldende krav til linearitet og nøyaktighet. Metoden viser tilfredsstillende resultater med hensyn til presisjon.

7. Referanser

1. Universitetssykehuset Nord-Norge, *Gentamicin*. 07.12.2011; Available from: <http://www.unn.no/laboratoriehaandbok/gentamicin-article18299-14289.html>.
2. legemiddelhandbok, N. *Ernæring og væskesubstitusjon*. 20.06.2010; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/s%C3%B8ker/Omtrentlig+blodvolum/26581>.
3. helsedirektoratet, S.-o. *Faglige retningslinjer for oppfølging av for tidlig fødte barn*. 19.04.12; Available from: <http://helsedirektoratet.no/publikasjoner/nasjonale-faglige-retningslinjer-for-oppfolging-av-for-tidlig-fodte-barn/Publikasjoner/nasjonale-faglige-retningslinjer-for-oppfolging-av-for-tidlig-fodte-barn.pdf>.
4. Småbrekke, L., *Tall basert på data fra UNN og ekstrapolert til hele fødselskohorten*.
5. Reigstad, H. and T. Markestad, [*Treatment of extremely premature infants--which limits and what problems?*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2001. **121**(6): p. 711-4.
6. Li, B., et al., *Mass spectrometric characterization of gentamicin components separated by the new European Pharmacopoeia method*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **55**(1): p. 78-84.
7. Lexicomp, *søk etter Gentamicin*. 07.12.2011; Available from: <http://online.lexi.com/crlsql/servlet/crlonline?siteid=298>.
8. Isoherranen, N. and S. Soback, *Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC*. Clin Chem, 2000. **46**(6 Pt 1): p. 837-42.
9. Li, B., et al., *Analysis of unknown compounds in gentamicin bulk samples with liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(3): p. 393-402.
10. Micromedex. 18.05.12; Available from: <http://www.micromedex.com/>.
11. Småbrekke, L., *personlig meddelelse*.
12. RELIS. 08.12.11; Available from: http://relis.arnett.no/Utdredning_Ekstern.aspx?Relis=5&S=961.
13. *Metodebok i nyfødttmedisin*. 14.12.2011; Available from: <http://www.unn.no/getfile.php/UNN-Internett/Enhet/BUK/Dokumenter/4%20INFEKSJONER%20HOS%20NYF%C3%98DTE%20OG%20BARN%20UNDER%20%20MND.pdf>.
14. Ali, A.S., M.F. Farouq, and K.A. Al-Faify, *Pharmacokinetic approach for optimizing gentamicin use in neonates during the first week of life*. Indian J Pharmacol, 2012. **44**(1): p. 36-40.
15. St. Olavs Hospital, U.i.T. *Analyser, Laboratoriemedisinsk klinikk*. 19.04.12; Available from: http://www.helse-midt.no/ftp/stolav/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html.
16. Heller, D.N., et al., *LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **821**(1): p. 22-30.
17. Baietto, L., 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): p. 791-8.
18. G.Seidl, H.P.N., *Gentamicin C: Separation of C1,C1a,C2,C2a and C2b Components by HPLC Using Isocratic Ion-Exchange Chromatography and Post-Column Derivatisation*. 1988.
19. Wen Jiang, P.A., Tobias Jonsson, Petrus Hemström, *Analysis of Aminoglycosides with a Zwitterionic HILIC Stationary Phase and Mass Spectrometry Detection*.
20. Waters. 13.04.2012; Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10156075>.
21. Waters. *bilde 2 hentet fra nettsted*. 09.05.12; Available from: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003672en.pdf>.

Referanser

22. Waters. *bilde 1 hentet fra nettsted.* 09.05.12]; Available from: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CA&cid=10161512.
23. Waters, *Beginners guide to liquid chromatography.* 2009.
24. Waters, *Beginners guide to UPLC, ultra-performance liquid chromatography.* 2009.
25. Nguyen, H.P. and K.A. Schug, *The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications.* J Sep Sci, 2008. **31**(9): p. 1465-80.
26. Jensen, E., *Forelesning massespektrometri 05.12.11.* 2011.
27. Appelblad, P., et al., *Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase.* J Sep Sci, 2008. **31**(9): p. 1529-36.
28. Stig Pedersen-Bjergaard, K.E.R., *Legemiddelanalyse.* 2004.
29. Waters, *bilde 3 hentet fra nettsted.*
30. Leksikon, S.N. *Validering.* Available from: <http://snl.no/validering>.
31. Nilsen, K., *Kvantitative analyser av gentamicin og tobramycin i blod med LC-MS/MS,* in *Institutt for farmasi, avdeling for legemiddelkjemi.* 2009, Universitetet i Tromsø: Tromsø.

8. Vedlegg

8.1 Tabeller standardkurver

Tabell 16. Tall for gentamicin C1, brukt til standardkurve

Konsentrasjon	Areal C1	Areal IS	Respons C1/IS
5	1362	107792	0,012
10	1986	120088	0,017
20	6742	127259	0,053
40	13890	89079	0,156
80	24121	106913	0,226

Tabell 17. Tall for gentamicin C1a, brukt til standardkurve

Konsentrasjon	Areal C1a	Areal IS	Respons C1a/IS
5	2075	107792	0,018
10	4146	120088	0,034
20	12107	127259	0,095
40	18381	89079	0,206
80	39894	106913	0,373

Tabell 18. Tall for gentamicin C2, C2a, C2b, brukt til standardkurve

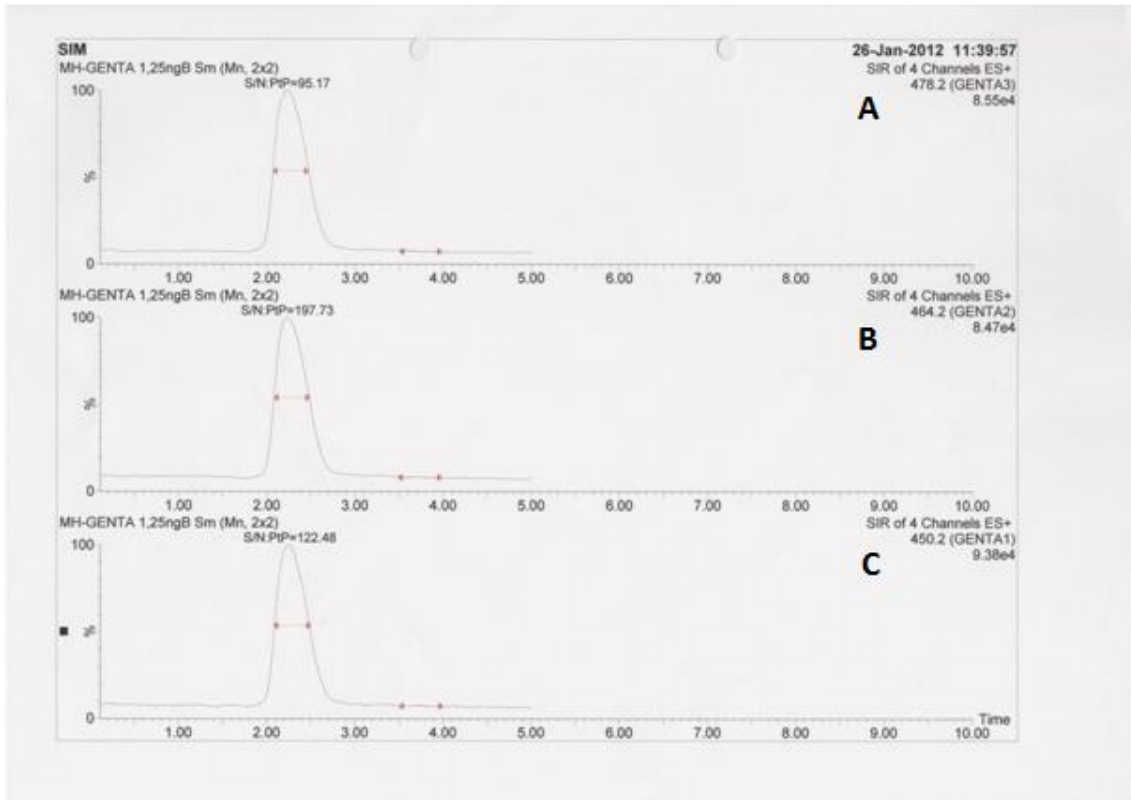
Konsentrasjon	Areal C2	Areal IS	Respons C2/IS
5	1995	107792	0,018
10	3764	120088	0,033
20	11350	127259	0,089
40	19210	89079	0,216
80	37865	106913	0,355

8.2 Tuningverdier for MS

Tabell 19. Tuningverdier

Variabel	Verdi
Ionization mode	ESI+
Capillary (kV)	0,75
Cone (V)	35
Desolvation temperature (°C)	200
Cone gas flow (L/Hr)	20
Desolvation gas flow (L/Hr)	400
Collision energy (eV)	5
LM resolution	2,5
HM resolution	16
Ion energy	0,4
Span	0,2

8.3 Beregning S/N

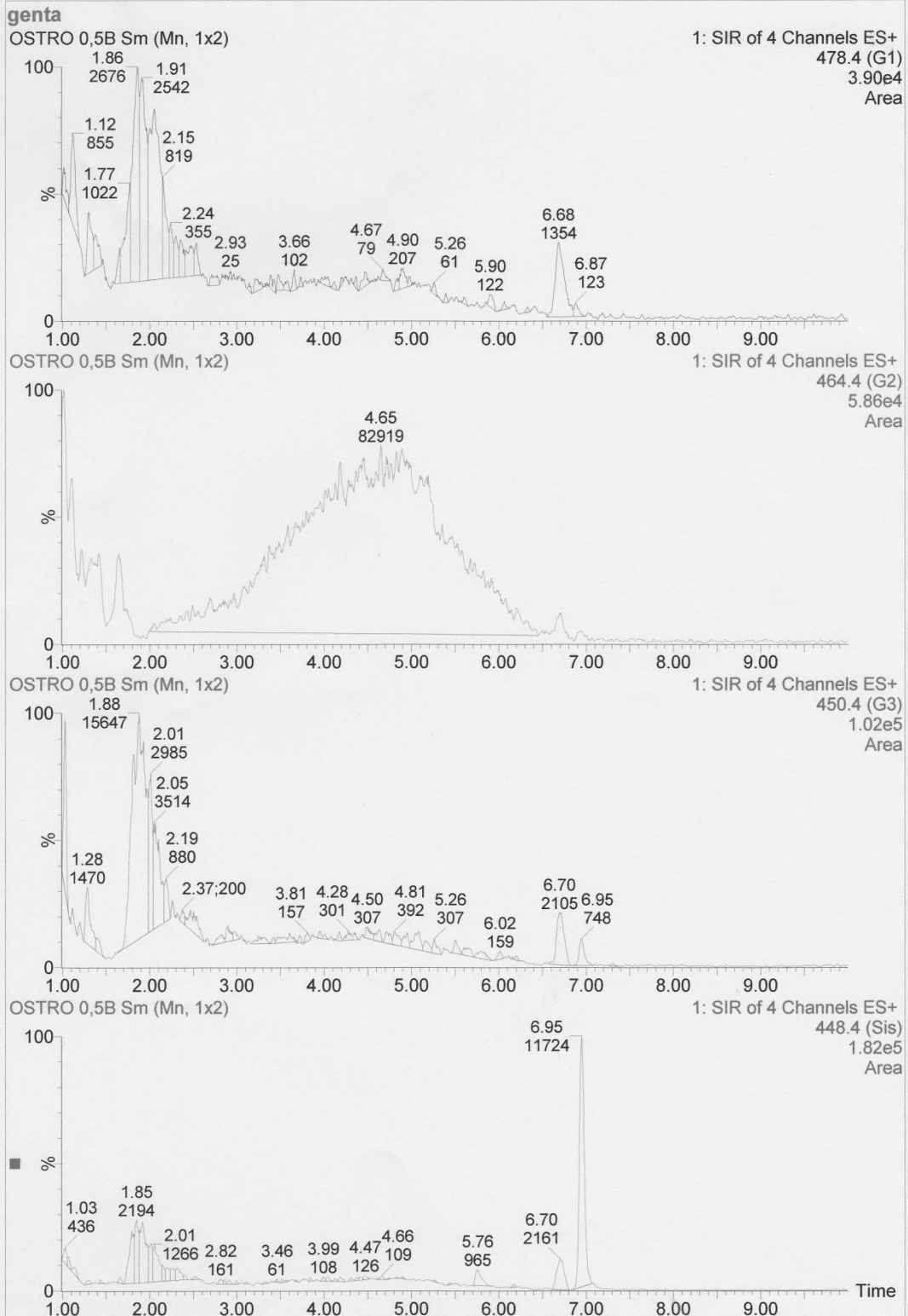


Figur 21. Kromatogram som viser beregning av S/N. Gentamicinprøve med konsentrasjon 1,25 ng/ml. A – gentamicin C1, B – gentamicin C2, C – gentamicin C1a.

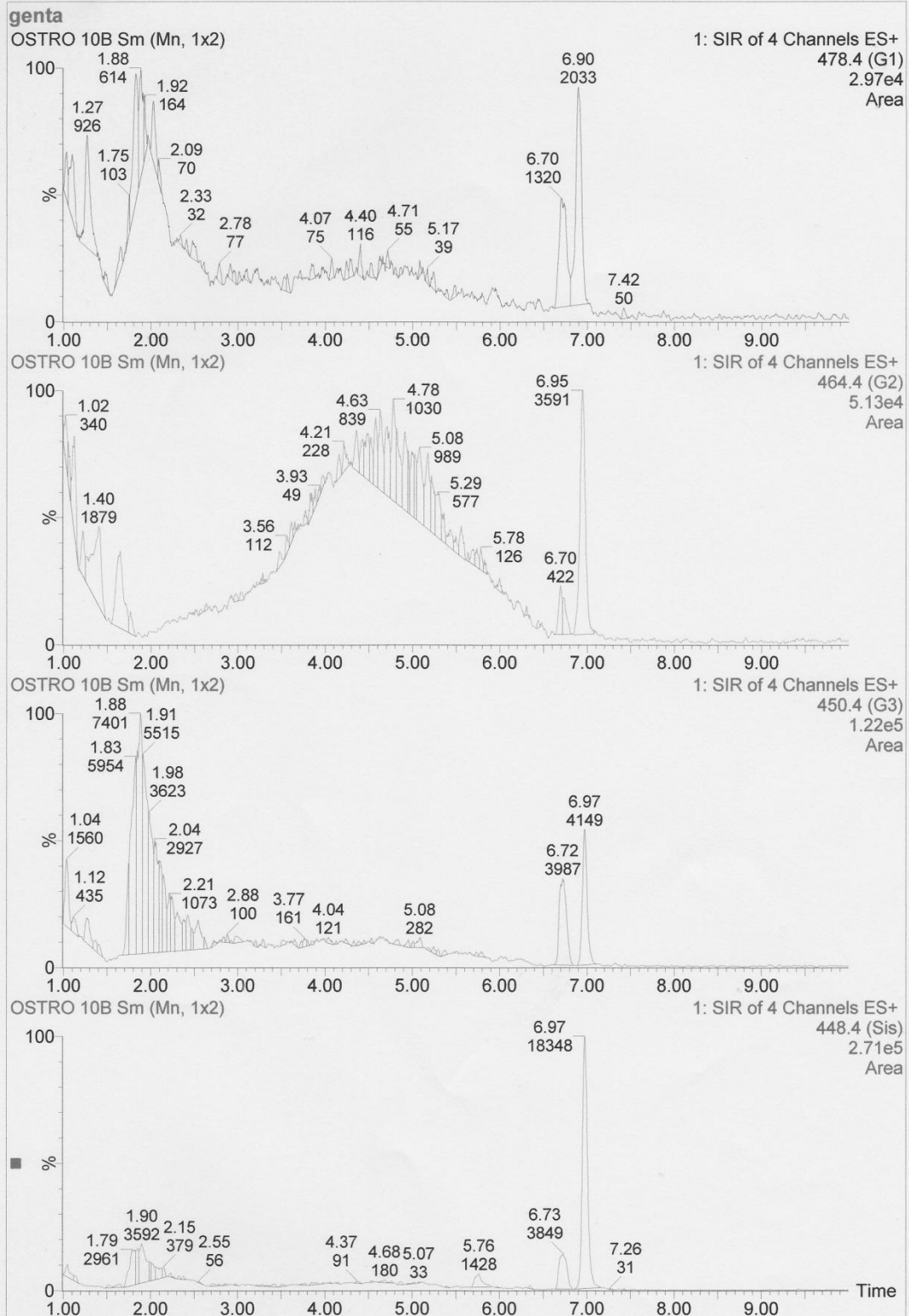
8.4 Kromatogram sisomicin

Samme konsentrasjon av sisomicin, med gentamicinkonsentrasjon, 5 µg/ml, 10 µg/ml og 80 µg/ml. Disse viser at arealet for sisomicin varierer, selv om konsentrasjonen er konstant. Dette tyder på en forurensing i batch 2 av gentamicin.

Vedlegg



Vedlegg



Vedlegg

