



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Identifikasjon og kvantifisering av 7 benzodiazepiner, 2 metabolitter og 2 z-hypnotika ved hjelp av UHPLC MS/MS

Identification and Quantification of 7
Benzodiazepines, 2 Metabolites and 2 Z- Hypnotics
Using UHPLC MS/MS

Hege Kristin Soudska

Kjemi

Innholdsfortegnelse

1	Forord	4
2	Sammendrag	5
3	Summary.....	7
4	Forkortelser	9
5	Innledning.....	11
5.1	Benzodiazepiner i Norge	11
5.2	Risiko ved bruk av benzodiazepiner	12
5.3	Farmakologi	12
5.4	Legemiddelmonitorering.....	13
5.5	Komponentene i metoden	14
5.6	Metabolisme.....	17
5.7	Hensikten med denne oppgaven	18
6	Metode	19
6.1	Kromatografi.....	19
6.1.1	Væskekromatografi – HPLC	20
6.1.2	Mobilfase.....	20
6.1.3	Stasjonærfase	21
6.1.4	Gradienteluering	21
6.2	Massespektrometri	21
6.2.1	ESI	22
6.2.2	Trippel kvadrupol.....	22
6.2.3	Multiple reaction monitoring, MRM	23
6.2.4	Detektor.....	23
6.3	Prøveopparbeidelse	24
6.3.1	Proteinfelling	24
6.3.2	Støttet-væske-ekstraksjon (SLE).....	24
7	Metodeutvikling	25
7.1	Valg av komponenter til metoden.....	25
7.2	Renstoffer, kjemikalier og utstyr	25
7.3	Apparatur	26
7.4	Standarder, internstandarder og kontroller.....	27
7.5	Andre løsninger	29

7.6	Tuning av massespektrometeret.....	29
7.7	Kromatografisk metode.....	30
7.8	Prøveopparbeidelse	31
7.8.1	Proteinfelling	31
7.8.2	SLE.....	32
8	Metodevalidering	35
8.1	Linearitet:	35
8.2	Presisjon, reproduserbarhet og riktighet:	35
8.3	Utbytte:	36
8.4	Matrikseffekter:.....	36
8.5	LOD, Limit of detection:.....	36
8.6	LOQ, Limit of quantification:	36
8.7	Carry-over:.....	37
8.8	Robusthet:	37
8.9	Måleusikkerhet:.....	37
8.10	Holdbarhet:	37
8.11	Sammenligning:	38
9	Metodeutvikling, resultater og diskusjon.....	39
9.1	Valg av metode og komponenter	39
9.2	Utstyr, løsninger og konsentrasjoner	40
9.3	Tuning av massespektrometeret.....	41
9.4	Kromatografisk metode.....	43
9.5	Kolonner	45
9.6	Prøveopparbeidelse	47
9.6.1	SLE.....	47
9.6.2	Proteinfelling	49
9.7	Matrix matchede standard- og kontrollmateriale.....	50
10	Metodevalidering, resultater og diskusjon	52
10.1	Linearitet	52
10.2	Presisjon, repeterbarhet og riktighet	53
10.3	LOD og LOQ	58
10.4	Matrikseffekter.....	59
10.5	Utbytte	60
10.6	Carry-over	61
10.7	Identifikasjon.....	62
10.8	Robusthet	66

10.9	Måleusikkerhet.....	67
10.10	Holdbarhet.....	68
10.11	Sammenligning.....	68
11	Konklusjon.....	75
12	Referanser.....	76

1 Forord

Arbeidet med masteroppgaven ble utført på Sykehuset Østfold, Kalnes ved Seksjon for spesial- og tverrfaglige støttefunksjoner i samarbeid med Norges miljø- og biovitenskaplige universitet, fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, i tidsrommet november 2019 – oktober 2021.

Mange har bidratt til at jeg har kunnet gjennomføre studiet og masteroppgaven.

Takk til veileder Dag Ekeberg ved NMBU. Jeg har satt stor pris på innspill, råd og kommentarer underveis i arbeidet med oppgaven.

Takk til min gode kollega og venn Ingeborg Amundsen, som ikke bare har motivert meg til å starte med mastergradsarbeidet, men også stilt opp som veileder og hjulpet meg med å fullføre.

Takk til leder Heidi Kjøniksen som har gitt meg mulighet til å ta studiepermisjon og jobbe med masteroppgaven på seksjonen.

Takk alle gode kollegaer, for gode ord, for all praktisk hjelp, både til denne oppgaven, men også ved å ta over mine arbeidsoppgaver når jeg har vært borte.

Takk til min kjære familie og da spesielt Patrik, min aller beste venn og kjæreste. Uten deres støtte og kjærlighet hadde jeg aldri kunnet gjennomføre.

Fredrikstad, 29. November 2021

Hege Soudska

2 Sammendrag

Det er utviklet en væskechromatografisk metode for identifikasjon og konsentrasjonsbestemmelse av 7 benzodiazepiner, 2 metabolitter og 2 z-hypnotika, i serum. Komponentene metoden omfatter er zopiklon, zolpidem, klonazepam, nitrazepam, flunitrazepam, lorazepam, oksazepam, alprazolam, temazepam, nordiazepam og diazepam. Alle komponentene i metoden har dedikerte deutererte internstandarder bortsett fra flunitrazepam. Denne komponenten benytter seg av klonazepam-d4.

Den chromatografiske separasjonen utføres på kolonnen InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1x100 mm 2,7 micron. Det benyttes gradienteluering med surgjort 5 mM ammoniumformatbuffer pH 3,1 og metanol. Gradientprogrammet starter på 95 % buffer og 5 % MeOH. Etter 20 sekunder økes MeOH til 60 % slik at komponentene gradvis starter å eluere. Etter 2 minutter økes MeOH ytterligere til 80 %. Her holdes den i ett minutt før den i nok et minutt økes til 100 % for å vaske ut eventuelle gjenværende stoffer. Systemet bruker ett minutt for å komme tilbake til startgradient slik at det stabiliseres før neste injeksjon. Den totale analys tiden er på 6 minutter.

Alle komponenter har to unike MRM overganger, de deutererte internstandardene har en MRM overgang. Sammen med en stabil retensjonstid, danner dette grunnlaget for sikker identifisering av de ulike benzodiazepinene.

Standarder med konsentrasjoner i et relevant måleområde muliggjør kvantifisering av de ulike komponentene i metoden.

Prøveopparbeidelsen benytter SLE teknikk på plater med eter-eluering.

Prøvematerialet blandes med internstandard, vann og ammoniumkarbonatbuffer før tilsetning på platen. Eluatet tørkes inn og reløses i mobilfase; ammoniumformatbuffer og metanol 1:1.

Metoden ble validert etter laboratoriets prosedyre for metodevalidering; D 34518, som bygger på NS-EN ISO 15189. Valideringen viser at presisjon og repeterbarhet i hovedsak ligger innenfor laboratoriets krav på 10 % for CV og bias. Riktighet over tid blir kontrollert ved et eksternt kvalitetsprogram samt laboratoriets egne kontrollrutiner.

Lineariteten til metoden er tilfredsstillende med R^2 for alle komponenter over 0,99. Måleområdet er relevant i forhold til de konsentrasjoner som er forventet å finne ved anbefalt dosering, samtidig som det tar høyde for konsentrasjoner som finnes ved misbruk og overforbruk.

LOQ konsentrasjonen for komponentene er halve konsentrasjonen av laveste standard for den enkelte komponent. Kravet på 20 % for CV og bias ved LOQ er innfridd. LOD konsentrasjonen er 1:5 av LOQ konsentrasjonen for alle komponentene, bortsett fra for flunitrazepam. Den er 1:2 av LOQ. Dette innfrir kravet for LOD, hvor begge MRM overgangene skal ha signal/støy ratio på over 3.

Det er ikke funnet overdrag i metoden og metoden er stabil ved til små endringer i buffersammensetningen når det gjelder retensjonstid og respons.

Sammenligning med en eksisterende metode ved Universitetssykehuset i Nord-Norge viser god korrelasjon mellom de to metodene.

Ferdig opparbeidede prøver er holdbare; syv dager i autosamplere ved 4 °C.

3 Summary

A liquid chromatographic method has been developed for the identification and quantification of 7 benzodiazepines, 2 metabolites and 2 z-hypnotics in serum. The method includes the compounds zopiclone, zolpidem, clonazepam, nitrazepam, flunitrazepam, lorazepam, oxazepam, alprazolam, temazepam, nordiazepam and diazepam. All compounds in the method have dedicated deuterated internal standards except flunitrazepam. This compound uses clonazepam-d4.

The chromatographic separation is performed on the column InfinityLab Poroshell 120 EC/C18 2.1x100 mm 2.7 microns. A gradient elution with acidified 5 mM ammonium formate buffer pH 3.1 and methanol is used. The gradient program starts with 95 % buffer and 5 % MeOH. After 20 seconds, MeOH increases to 60 %, so the analytes gradually begin to elute. After 2 minutes MeOH is further increased to 80 %. Here it is kept for one minute before it is increased to 100 % for another minute to wash out any remaining compounds. The system uses one minute to return to the starting gradient so that it stabilizes before the next injection. The runtime is 6 minutes.

All compounds in the method have two unique MRM transitions, the internal standard has one MRM transition. Together with a stable retention time, this forms the basis for secure identification of the various benzodiazepines.

Standards with concentrations in a relevant measuring range, enable quantification of the compounds in the method.

The sample preparation is being processed on SLE plates with ether-elution. The sample material is mixed with internal standard, water and ammonium carbonate buffer, before adding to the plate. The eluate is dried and reconstituted in mobile phase, ammoniumformatebuffer and methanol 1:1.

The method was validated according to the laboratory's procedure for method validation; D 34518, based on NS-EN ISO 15189. The validation shows that the precision and repeatability are mainly within the laboratory's requirement of 10 % for CV and bias. Long time accuracy is checked by an external quality program as well as the laboratory's own control routines.

The linearity for the method is satisfactory with an R^2 for all the analytes above 0.99. The measuring range is relevant in relation to the concentrations that are expected to be found at the recommended dosage, and it also includes high concentrations which are found during abuse and over-consumption.

The LOQ concentration of the compounds is half the concentration of the lowest standard for each compound. The requirement of 20 % for CV and bias, is satisfactory.

The LOD concentration is 1:5 of the LOQ concentration for all the compounds, except for flunitrazepam. LOD for flunitrazepam is 1:2 of the LOQ. These concentrations fulfils the requirement for LOD, where both MRM transitions must have a signal/noise ratio of more than 3.

No carry-over have been found in the method and the method is stable in relation to small changes in the buffer composition as it comes to retention time and response.

Comparison with an existing method at the University hospital in Northern-Norway, shows a good correlation between the two methods.

Prepared samples are stable; seven days in autosampler at 4 °C.

4 Forkortelser

AF	ammoniumformatbuffer
C18	hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer
CE	kollisjonsenergi
CAV	celleakselerator
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon
CV	variasjonskoeffisienten
EC	end capped
ESI	elektrosprayionisering
FA	formic acid
g	gram
GABA	gammaaminosmørsyre
HPLC	høypresisjonsvæskekromatografi
LC	væskekromatografi
LLE	væske-væske ekstraksjon
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
<i>m/z</i>	masse per ladning
MeOH	metanol
mg/d	milligram per døgn
mL	milliliter
mM	millimolar
mm	millimeter
MRM	multiple reaction monitoring
MS-MS	massespektrometer - massespektrometer
MW	molmasse
nmol/L	nanomol per liter
NDM	N-demetyldiazepam
µL	mikroliter
µm	mikrometer
Q1/MS1	første kvadrupol
Q2/MS2	andre kvadrupol

R ²	korrelasjonskoeffisienten
RT	retensjonstid
SF	stasjonærfase
SIM	single ion monitoring
SLE	supported liquid extraction
SPE	fast fase ekstraksjon
SRM	selected reaction monitoring
V	volt

5 Innledning

Benzodiazepiner ble utviklet i 1960 årene for å erstatte eksisterende medikamenter som var blitt benyttet i behandling av angst og søvnløshet. Medikamentene, blant annet barbiturater, som til da hadde vært i bruk, var svært effektive, men de hadde til dels store uønskede bivirkninger. De var svært avhengighetsskapende og ekstremt toksiske når det kom til overdoser. (1)

Det er syntetisert over 1000 forskjellige benzodiazepiner siden 1960 og i tillegg til disse er det også utviklet z- hypnotika, benzodiazepinlignende preparater, som er brukt i behandlingen av insomni. Benzodiazepinbruken er svært utbredt i dagens samfunn selv om det senere er utviklet andre medikamenter til behandling av søvnløshet og angst. (1)

Under utviklingen av de første benzodiazepinene viste forsøk lovende resultater når det gjaldt uønskede bivirkninger. Dette har dessverre blitt en sannhet med modifikasjoner, siden man etter tiår med bruk, også ved denne typen medikamenter observerer bivirkninger, toleranseutvikling og avhengighet.(1)

5.1 Benzodiazepiner i Norge

I Norge er benzodiazepiner og z-hypnotika godkjent for behandling av angst, akutt forvirring og utagering, kramper og muskelspasmer samt i behandling av alkoholabstinens og insomni. (2)

Medikamentene er lite toksiske og de har et bredt terapeutisk vindu. De har en raskt innsettende effekt og beskrives som gode og trygge alternativer i behandling av pasienter med søvnproblematikk, angst og epilepsi. Likevel knyttes det en del bekymring til forskrivningen og bruken av benzodiazepiner i Norge. (3)

Retningslinjer både fra produsent og helsemyndigheter sier at det ikke er anbefalt å bruke disse medikamentene lenger enn i en 2-4 ukers periode. Likevel viser det seg at en stor andel av pasientene står på disse medisinene over flere år, og noen også med relativt høye doser. Dette til tross for at helsemyndighetene har klassifisert

benzodiazepiner som avhengighetsskapende og at det er mulighet for toleranseutvikling og misbruk. (2)

I 2008 ble det utarbeidet en rapport om bruken av benzodiazepiner i Norge. Resultatet av rapporten viste at i overkant av 6% av befolkningen i landet får foreskrevet minst ett benzodiazepin. En betydelig del av disse fikk også foreskrevet flere benzodiazepiner samtidig. Det er en større andel kvinner enn menn som får foreskrevet disse medikamentene, men det er flest menn som får foreskrevet minst to ulike benzodiazepiner samtidig. (4)

5.2 Risiko ved bruk av benzodiazepiner

Bivirkningene ved bruk av benzodiazepiner er både psykomotoriske og kognitive. Og de er doseavhengige. Litteraturen beskriver både problemer med hukommelse, dødsighet og konsentrasjonsvansker. Bruk av benzodiazepiner øker også risikoen for fall og skader. Når det gjelder bilkjøring ved inntak av disse medikamentene er dette forbundet med økt fare for ulykke og skade. Det anbefales heller ikke at eldre mennesker bruker benzodiazepiner da dette kan føre til tap av kognitive og psykomotoriske funksjoner. Bruk av disse medikamentene knyttes også til utviklingen av Alzheimer.(5)

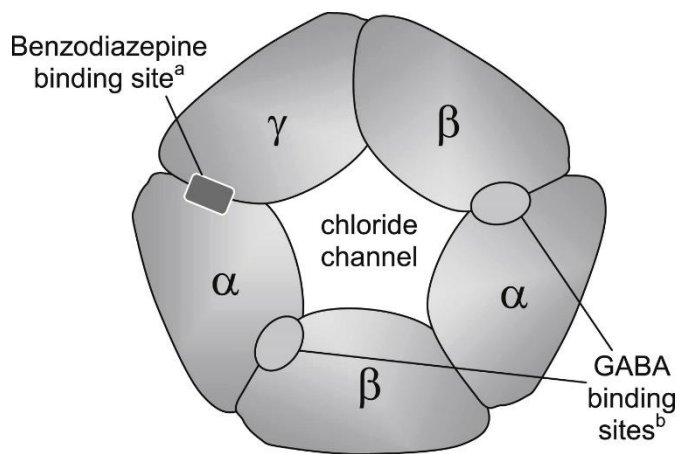
Benzodiazepiner har også et misbrukspotensiale. Medikamentene i seg selv kan gi ruseffekt og de kan også farmakodynamisk påvirke virkningen av andre rusmidler. Bruk av benzodiazepiner sammen med sentralstimulerende midler vil kunne dempe stress og angst, som følger med bruken av disse. Man ser også at overdoser ved opioidbruk ofte er en kombinasjon av benzodiazepiner eller alkohol og opioid. Selv om det er fokus på at det medfører en risiko for forverring ved å forskrive benzodiazepiner til personer med misbruksproblematikk, foregår dette i stor grad. I tillegg omsettes benzodiazepiner på det illegale markedet.(6)

5.3 Farmakologi

Signalstoffet GABA (gammaaminosmørsyre) er en viktig hemmende neurotransmitter i hjernen. Signalstoffet binder seg til GABA reseptorer i nevroner og påvirker disse til å åpne kloridkanaler og øke konsentrasjonen av klorid. Nevronene har i

utgangspunktet lav kloridkonsentrasjon. Ved en konsentrasjonssøkning depolariseres nevronet og det blir mindre mottakelig for signaler fra andre nerveceller. (7)

Benzodiazepiner bindes til GABA reseptoren og øker reseptorens affinitet for GABA. GABA vil senke aktiviteten mellom nerveceller og med dette føre til en anxiolytisk (angstdempende) eller hypnotisk (søvndyssende) effekt. (8) Se figur 1.



Figur 1 - GABA reseptorer i nevronet
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885392414001080

fra:

5.4 Legemiddelmonitorering

Legemiddelmonitorering er et ledd i oppfølgingen av pasienter som bruker vanedannende legemidler. Ved å måle serumkonsentrasjonen av legemidler i blod kan overforbruk eller misbruk avdekkes. Legemiddelmonitorering kan også brukes til å belyse årsaker til terapivikt, uventede bivirkninger eller at behandlingen har sterkere eller svakere effekt enn forventet. (9)

Når det gjelder referansegrenser for hva som er anbefalte serumkonsentrasjoner av benzodiazepiner, ble dette fastsatt av en arbeidsgruppe nedsatt av Norsk Forening for Farmakologi i 2016. Frem til dette tidspunktet hadde det vært brukt ulike referanseområder og tolkning ved de ulike medisinske laboratoriene. (9)

Pasientgruppen som står på benzodiazepiner er lite homogen. De har ulike problematikker og responderer også svært ulikt på behandlingen. I tillegg har disse

legemidlene mange uønskede effekter. Det er derfor anbefalt å ha et lavest mulig inntak. Det er således ikke fastsatt noe nedre, men kun en øvre referansegrense. Den øvre referansegrensen er fastsatt på bakgrunn av høyeste anbefalte døgndose for bruk ved angst eller uro og søvnproblematikk, se tabell 1. (9)

Blodprøver til konsentrasjonsmåling av benzodiazepiner i serum skal tas medikamentfastende, det vil si rett før neste dose. Under tolkning av resultatene må man være klar over at prøver tatt på andre tidspunkt kan gi misvisende svar. Andre faktorer som kan påvirke analyseresultatet er knyttet til pasientens organfunksjon, eller endringer i farmakokinetikken grunnet aldring. Også andre medikamenter pasienten tar, samt pasientens legemiddelmetabolisme kan påvirke resultatene. (9)

Anbefalte serumkonsentrasjoner

Tabell 1- Referansegrenser

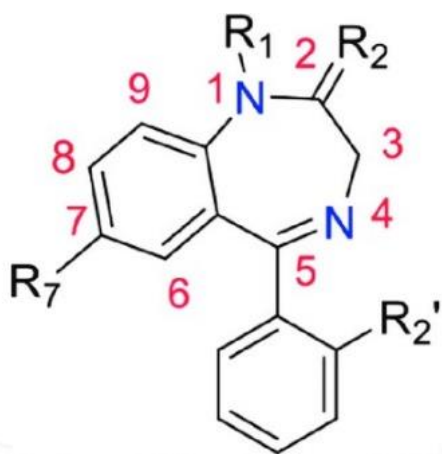
Legemiddel/dose som øvre referansegrense baseres på	Øvre referansegrense
Alprazolam (3 mg/d):	160 nmol/L
Diazepam + NDM (15 mg/d):	3500 nmol/L
Flunitrazepam (1 mg/d):	20 nmol/L
Klonazepam (1,5 mg/d):	50 nmol/L (60-220 nmol/L ved bruk som antiepileptikum)
Nitrazepam (5 mg/d):	300 nmol/L
Oxazepam (45 mg/d):	2500 nmol/L

(9)

5.5 Komponentene i metoden

Metoden som er utviklet omfatter separasjon, identifisering og kvantifisering av de benzodiazepiner som kan fåes på resept i Norge. Lorazepam som selges på dispensasjon fra Legemiddelverket er også tatt med. For diazepam er det også tatt med de aktive metabolittene desmetyldiazepam og temazepam.

Generelt er benzodiazepiner svake baser med upolare egenskaper. De består av en 1,4-diazepinring som er koblet sammen med en benzenring og en fenyling, se figur 2. Varierende substituenten, R, er koblet til denne strukturen. Forskjellen i farmakologien og de kjemiske egenskapene til de ulike benzodiazepinene er knyttet til disse substituentene. Se tabell 2. (10)



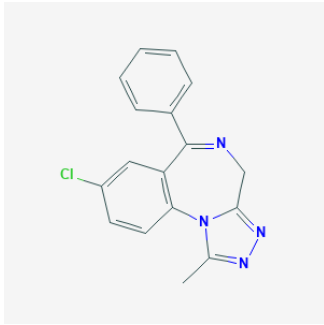
Figur 2 – Benzodiazepinstrukturen, fra: www.intechopen.com/chapters/63768

Tabell 2 – Benzodiazepiner, kjemiske egenskaper

Komponent	pKA	LogP	MW g/mol
Oxazepam	-1,50	2,01	286,71
Desmetyldiazepam	2,85	2,79	270,71
Temazepam	-1,40	2,16	300,74
Klonazepam	1,86	2,76	315,71
Nitrazepam	2,61	1,95	281,27
Flunitrazepam	1,70	2,20	313,28
Alprazolam	5,08	2,23	308,76
Lorazepam	-2,20	2,98	321,20
Zopiklon	6,89	0,97	388,80
Zolpidem	5,65	3,15	307,40
Diazepam	2,63	2,63	284,74

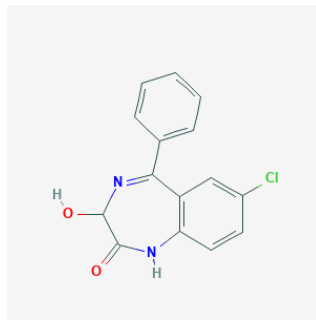
Kjemisk strukturformel for alle komponentene i metoden:

Alprazolam



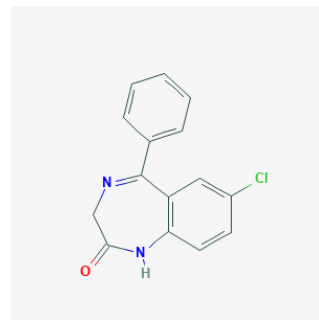
(11)

Oxazepam



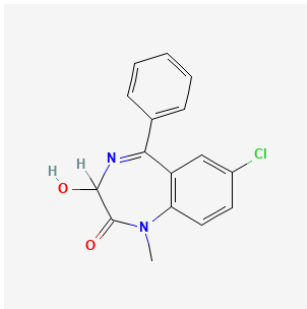
(12)

Desmetyldiazepam



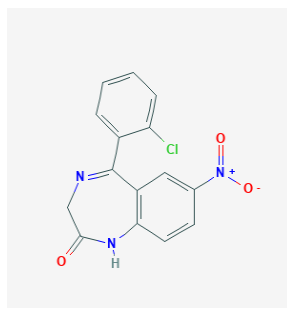
(13)

Temazepam



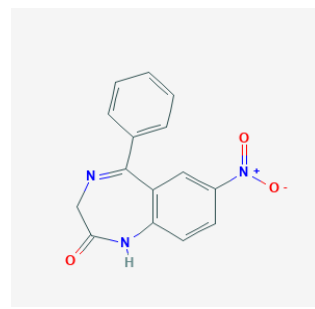
(14)

Klonazepam



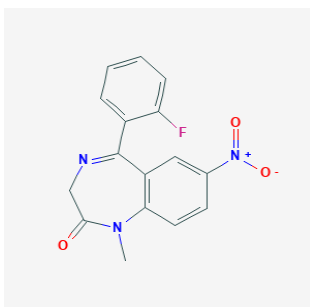
(15)

Nitrazepam



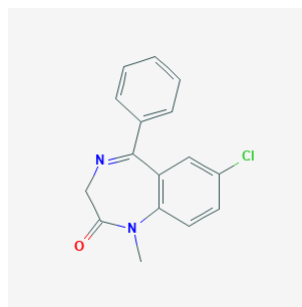
(16)

Flunitrazepam



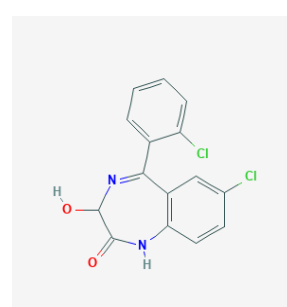
(17)

Diazepam



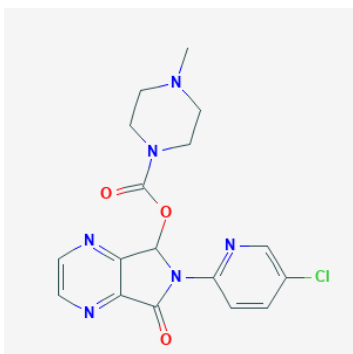
(18)

Lorazepam



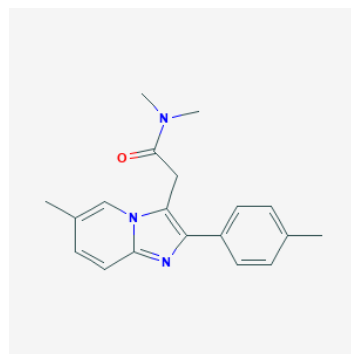
(19)

Zopiklon



(20)

Zolpidem

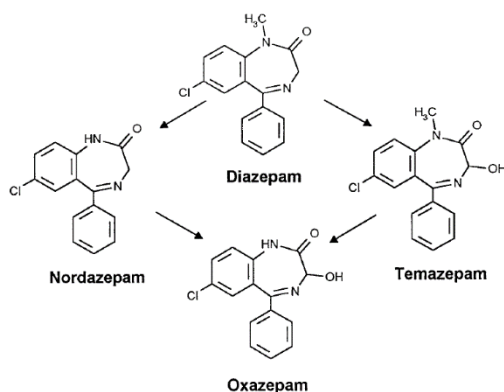


(21)

5.6 Metabolisme

Metabolismen av benzodiazepiner er hovedsakelig mediert av enzymer, cytokrom P-450, i leveren. Det finnes flere undergrupper av cytokrom P-450 som er tilpasset nedbrytningen av de ulike benzodiazepinene.(22)

Metabolismen går hovedsakelig gjennom tre steg. Først elimineres substituenten på posisjon 1 eller 2 på diazepinringen. Deretter hydroksyleres posisjon tre på diazepamringen. Dette fører ofte til at man har fått en aktiv metabolitt, slik man kan se når nordiazepam metaboliseres til oksazepam og når diazepam metaboliseres til temazepam. I det tredje trinnet vil en glukuronsyre konjugeres med hydroksylgruppen. Den upolare metabolitten blir da mer polar og kan dermed utskilles gjennom nyrene i urinen.(10)



Figur 3– Diazepam metabolismen

<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.907.2929&rep=rep1&type=pdf>

60 % av diazepam demetyliseres til nordiazepam. Resten hydroksyleres til temazepam. Begge komponentene vil kunne metaboliseres videre til oksazepam, se figur 3. Både temazepam og oksazepam kan konjugeres med en glukuronsyre for å bli mer polar og kan dermed elimineres via nyrene.(23)

5.7 Hensikten med denne oppgaven

Selv om benzodiazepinbruken i Norge er lav i forhold til andre nordiske land er det fremdeles mange pasienter som blir foreskrevet disse medikamentene. (24)

Med fokus på varighet og dose i forhold til risikofaktorer, er det behov for å følge konsentrasjonen av benzodiazepiner som pasienten inntar.(9)

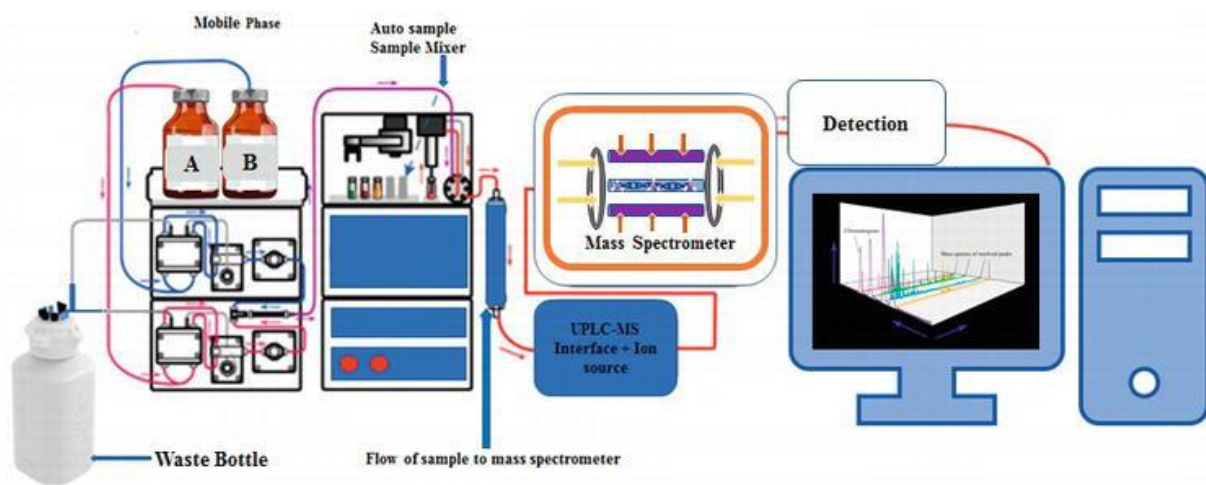
Sykehuset Østfold sørger for et helhetlig helsetilbud for 300 000 personer boende i Viken fylke. Sykehuset tilbyr akuttmedisin, men også behandling og utredning innen både somatikk og psykiatri. Ved Senter for laboratoriemedisin analyseres det prøver fra sykehuset, spesialisthelsetjenesten, kommunehelsetjenesten, fastleger samt private leger og institusjoner.

Seksjon for spesial- og tverrfaglige støttefunksjoner, som er en del av Senter for laboratoriemedisin, har ansvaret for analysering av farmakologiske prøver ved hjelp av kromatografi. Det har lenge vært planlagt å utvikle en metode for kvantifisering av benzodiazepiner, men på grunn av flytting av Sykehuset fra Fredrikstad til Kalnes og kapasitetsproblemer har dette vært utsatt.

Hensikten med oppgaven er derfor å utvikle en metode for å identifisere og kvantifisere de benzodiazepiner som brukes i behandling i Norge.

6 Metode

Innen legemiddelmonitorering er spesifikk analyse ved hjelp av væskekromatografi (LC) koblet til et tandem massespektrometer (MS-MS), ansett som gullstandarden når det gjelder analysemetodikk, se figur 4. Metoden gir sensitive og spesifikke resultater. Det er også mulighet for å utvikle metoder som kan analysere mange prøver på forholdsvis kort tid.(25)



Figur 4 - Væskekromatografi med massespektrometri, www.intechopen.com/chapters/72391

6.1 Kromatografi

Kromatografi er en separasjonsteknikk som baserer seg på vandringsen til en komponent gjennom et system. I systemet er det en mobil fase som komponenten beveger seg i og en stasjonær fase hvor komponenten bremses. De to fasene er ikke blandbare. Affiniteten til stasjonærfasen i forhold til mobilfasen avgjør hvor lang tid komponenten bruker på å bevege seg gjennom systemet.(26)

Det finnes flere ulike kromatografiske metoder. Metoden som er utviklet for analyse av benzodiazepiner baserer seg på væskekromatografi (HPLC – high performance liquid chromatography), omvendt fase, fordelingskromatografi, og det er derfor kun denne metodikken som vil bli omhandlet.

6.1.1 Væskekromatografi – HPLC

I væskekromatografi er mobilfasen en væske, mens stasjonærfasen kan være et fast stoff, en væske eller en kjemisk bundet fase. Tidligere sto betegnelsen HPLC for high pressure liquid chromatography. Dette kommer av at det benyttes kolonner med en stasjonærfase (SF) bestående av små (< 10 µm) uniforme partikler som er pakket meget tett sammen. Dette fører til at trykket i systemet er høyt (opp til 5000 psi). (27)

6.1.2 Mobilfase

Mobilfasevalg er ofte den største utfordringen i utvikling av en metode. Mobilfasen skal ha riktig polaritet, den skal ha rett viskositet og den må være kompatibel med detektoren som benyttes. Dersom mobilfasen som benyttes er mer upolar i forhold til stasjonærfasen vil kromatografien omtales som normal- fase kromatografi. Er mobilfasen mer polar enn stasjonærfasen, benyttes omvendt- fase kromatografi. (27)

I dag blir en stor del av analyser utført ved hjelp av omvendt- fase kromatografi. Den store fordelen med omvendt- fase, er at vann kan brukes som mobilfase. Vann er billig, ikke-toksisk og kompatibelt med biologiske løsninger. Sammen med vann benyttes ofte acetonitril, metanol eller tetrahydrofuran. Valg av mobilfase, men også stasjonærfase, avhenger av de intermolekylære kreftene mellom komponentene i prøven som skal separeres, mobilfasen og stasjonærfasen. Ofte vil man tilstrebe å velge en stasjonærfase som har lignende polaritet som komponenten, men samtidig passe på at det ikke er for stor affinitet mellom de to. Det vil føre til lange retensjonstider. (28)

Om komponentene foreligger på ionisert eller nøytral form har mye å si for selektiviteten til systemet. Det benyttes derfor ofte vandig bufferløsning i kombinasjon med et organisk løsemiddel for å ha kontroll på pH i separasjonen. (29)

6.1.3 Stasjonærfase

En HPLC kolonne inneholder små, porøse, uniforme partikler, ofte av silika, som fungerer som bæresubstans for stasjonærfasen. Silikaet reageres med klorsilan og det dannes monomere eller polymere overflatelag. Ved å variere substituentene på klorsilanet vil stasjonærfasen inneha ulike egenskaper og polaritet. (26)

I fordelingskromatografi vil stasjonærfasen bestå av en vandig løsning av organisk løsemiddel kjemisk bundet til overflatelagene i silikapartiklene. Dette kan for eksempel være en hydrokarbonkjede, C18 og vandig metanol. Hydrofobe deler av komponenten vil da bindes til C18 kjeden og hydrofile deler til metanol.(27)

6.1.4 Gradienteluering

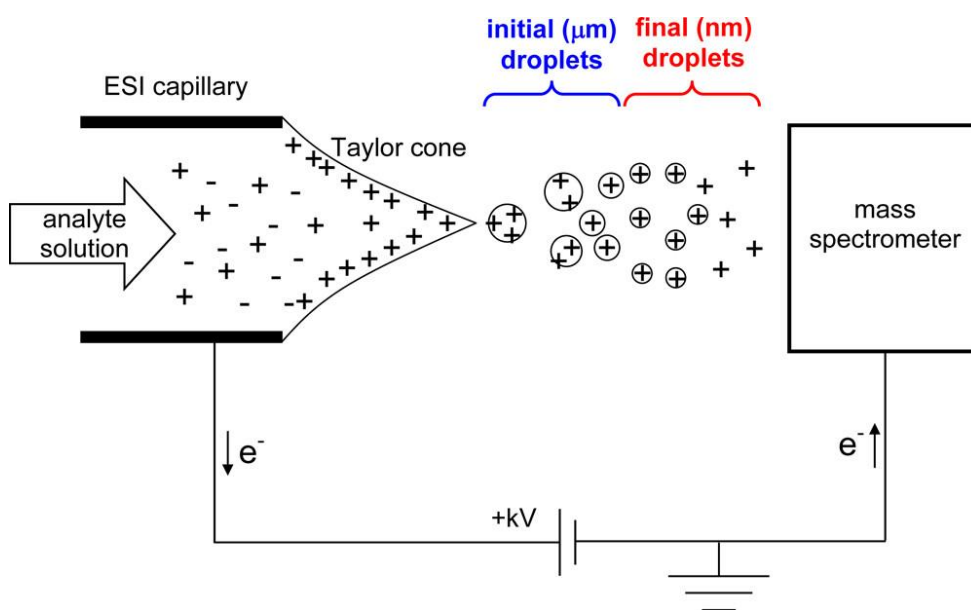
I motsetning til isokratisk eluering, hvor sammensetningen av mobilfase er konstant, vil gradienteluering endre sammensetningen av mobilfasen gjennom en kromatografisk analyse. Typisk er at man øker styrken på mobilfasen, gjør den mer upolar, gjennom analysen. Dette vil korte ned analysetiden fordi de komponentene som har høyest affinitet til den upolare stasjonærfasen vil gå over i mobilfasen og elueres ut. Dette vil også kunne gi smalere og mer symmetriske topper.(27)

6.2 Massespektrometri

Massespektrometri er en analysemetode som identifiserer og kvantifiserer enkeltelementer i en prøve. (28) Når et massespektrometer er koblet til en væskekromatograf, vil spektrometeret først ionisere komponenten etter hvert som komponentmolekylene kommer gjennom det kromatografiske systemet. Deretter vil ionene separeres etter masse og ladning. Tilslutt detekteres ionene og omdannes til et signal som behandles i et dataprogram.(30)

6.2.1 ESI

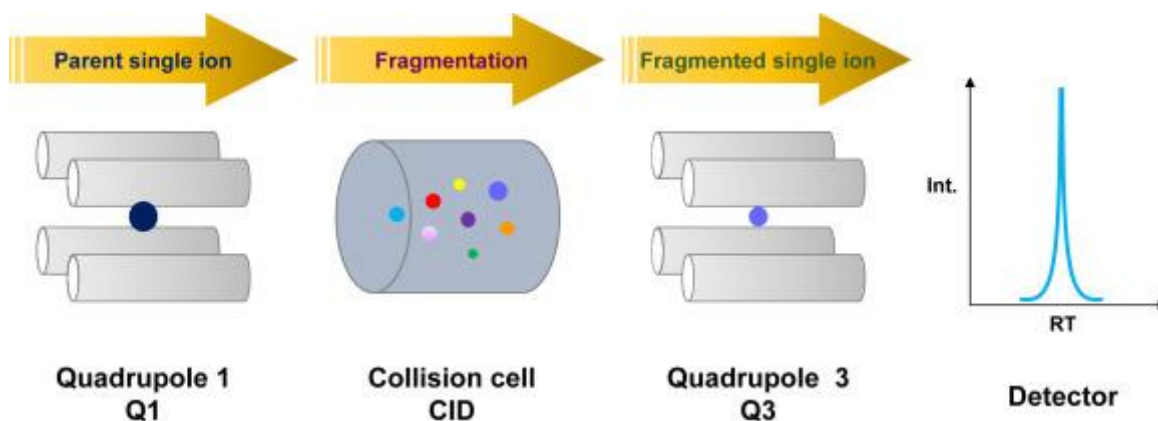
Elektrosprayionisering, ESI, er en myk ioniseringsteknikk som brukes i massespektrometre. Komponenten blir introdusert til ionekilden gjennom en tynn nål påsatt spenning og en strøm av gass. På denne måten dannes det en spray av komponentioner. I ionekilden er det høy temperatur og dråpene fordamper og ionene går over i gassfase når de trekkes gjennom kapillæret mot kvadrupolen inne i massespektrometeret, se figur 5. (30)



Figur 5 - Elektrosprayionisering, fra [www.https://pubs.acs.org/](https://pubs.acs.org/)

6.2.2 Trippel kvadrupol

Massespektrometeret trippel kvadrupol er mye brukt i legemiddelanalyser. Hver kvadrupol består av fire hyperbolske staver som er påsatt spenning med parvis like potensialer. Dette fører til at ioner i gassfase får en oscillerende bevegelse mens de passerer gjennom stavene. Kun de ionene med den ionemassen som kvadrupolen er innstilt på, passerer gjennom. En trippel kvadrupol består av to slike kvadrupler med en kollisjonscelle imellom. I kollisjonscellen blir molekylionene utsatt for kollisjonsgass slik at de fragmenterer.(30)



Figur 6 – Triple kvadrupol fra: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347436718301393

6.2.3 Multiple reaction monitoring, MRM

Multiple reaction monitoring, MRM, beskrives også i litteraturen som selected reaction monitoring, SRM. (30)

MRM baserer seg på at dersom alle parametre er konstante, vil et molekylion fra en bestemt komponent fragmentere på samme måte hver gang. Det er ingen scan i MRM, begge kvadrupolene er innstilt på å slippe gjennom bestemte masser. (30)

Den første kvadrupolen lar kun ioner med en bestemt masse passere. Dette kalles forløperion og er som oftest molekylionet. I kollisjonscellen vil dette fragmentere og danne produksjoner. Den siste kvadrupolen vil så kun slippe igjennom det eller de valgte produksjoner fra molekylionet eller forløperionet. Se figur 6. På denne måten vil kun en bestemt masse med et bestemt reaksjonsmønster bli detektert. MRM analyse er derfor forbundet med høy selektivitet og sensitivitet. (30)

6.2.4 Detektor

Etter kvadrupolen vil et bestemt fragment av molekylionet nå frem til detektoren. En mye brukt detektor er elektronmultiplikator. I elektronmultiplikatoren er det dynoder bestående av kobber og beryllium. Når fragmentionet treffer dynodene vil en strøm av elektroner slås løs og treffe neste dynode. På denne måten blir elektronstrømmen som til slutt danner et elektrisk signal, mye større enn den som

opprinnelig entret detektoren. Det elektriske signalet overføres til et dataprogram som brukes i analysearbeidet.(30)

6.3 Prøveopparbeidelse

Før en prøve skal analyseres må den renses. Serumprøver inneholder blant annet både proteiner og fettstoffer som kan påvirke analysen og forringe kvaliteten på instrumentet. Målet med en prøveopparbeidelse er å sitte igjen med den komponenten man skal undersøke og fjerne så mye som mulig av de uønskede forbindelsene. (26) Proteinfelling, fast-fase ekstraksjon, væske- væske ekstraksjon er forskjellige måter å rense prøver på før analyse.

6.3.1 Proteinfelling

En måte å indusere proteinfelling på, er å benytte et organisk løsemiddel, som metanol eller acetonitril. Det organiske løsemidlet vil påvirke proteinets elektriske punkt, slik at løseligheten i serum minskes og interaksjoner mellom proteinene øker. På denne måten dannes proteinaggater og de kan filtreres bort. (31) Proteinfelling er en rimelig og rask teknikk, men den fjerner ikke fosfolipidene i serumet. Fosfolipider kan bidra til økte matrixeffekter, men også til å tette kolonner eller andre deler i det kromatografiske systemet. (32)

6.3.2 Støttet-væske-ekstraksjon (SLE)

Støttet -væske ekstraksjon, SLE, kombinerer egenskapene fra to andre teknikker; fast-fase ekstraksjon, SPE og væske - væske ekstraksjon, LLE . For mens SPE renser ekstraktet for både proteiner og fosfolipider, klarer ikke LLE dette like godt. SPE er på den annen side mye mer tidkrevende og mer kostbart enn væske-væske ekstraksjon. SLE består av en plate eller kolonne pakket med kiselgur. Kiselgur er et silkarikt materiale. Man forbehandler prøven med en buffer for å sikre at komponenten foreligger på nøytral form. Dette oppnår ved en pH to enheter over basiske stoffers pKa. Prøven settes på kolonnen og komponenten elueres ut med et organisk løsemiddel. Fosfolipidene og proteinene sitter igjen i silikaen i kiselguren. En stor fordel med SLE er at den fint kan automatiseres.(33)

7 Metodeutvikling

7.1 Valg av komponenter til metoden

Når laboratoriet skal utvikle nye metoder er disse basert på ønsker fra samarbeidende rekvirenter, nytte og laboratoriets muligheter i forhold til apparatur og kapasitet. Ønsket om en analyse som kan identifisere og kvantifisere benzodiazepiner var allerede forelagt laboratoriet før flytting til Kalnes i 2015. Da denne metoden nå skulle utvikles ved det nye sykehuslaboratoriet, ble klinisk farmakolog og leder ved avdelingen involvert for å legge rammer for metoden.

7.2 Renstoffer, kjemikalier og utstyr

Tabell 3 - Renstoffer

Komponent	Produsent
Alprazolam	Chiron
Alprazolam	Cerilliant
Alprazolam-d5	Chiron
Diazepam	Chiron
Diazepam	Cerilliant
Diazepam-d5	Chiron
Nordiazepam	Chiron
Nordiazepam	Cerilliant
Nordiazepam-d5	Chiron
Temazepam	Chiron
Temazepam	Cerilliant
Temazepam-d5	Chiron
Oksazepam	Chiron
Oksazepam	Cerilliant
Oksazepam-d5	Chiron
Lorazepam	Chiron
Lorazepam	Cerilliant
Lorazepam -13C6	Chiron
Nitrazepam	Chiron
Nitrazepam	Cerilliant
Nitrazepam-d5	Chiron
Flunitrazepam	Chiron
Flunitrazepam	Cerilliant
Flunitrazepam -d3	Chiron
Zopiklon	Chiron
Zopiklon	Cerilliant
Zopiklon- d4	Chiron
Zolpidem	Chiron
Zolpidem	Cerilliant
Zolpidem- d6	Chiron

Klonazepam	Chiron
Klonazepam	Cerilliant
Klonazepam- d4	Chiron

Tabell 4 - Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Metanol, Chromasolv LC-MS ultra	Honeywell
Heptan Supelco hypergrade for LC-MS	Merck
Tertbutylmetyleter LiChrosolv	Merck
Etylacetat RECTAPUR	VWR
Acetonitril, Chromasolv LC-MS ultra	Honeywell
Isopropanol LiChrosolv	Merck
Ammoniumacetat AnalAR NORMAPUR	VWR
Ammoniumkarbonat, Supelco	Merck
Ammoniumformat LC-MS ultra	Honeywell/Fluka
Maursyre 98%	Honeywell

Tabell 5 - Utstyr

Utstyr	Produsent
Kolonne:InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1x100 mm 2,7 micron	Agilent
Kolonne:ACQUITY UPLC HSS T3 2,1 x100 mm, 1,8 µm	Waters
Isolute SLE+ og 2 mL oppsamlingsplate	Biotage
Pipetter: fast volum: 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL og justerbare volum: 20-200 µLog 100-1000 µL	Finnpipette
Begerglass	VWR
1,5 mL plastrør (Eppendorfrør)	Eppendorf
Glassflasker til løsninger 500 mL og 1000 mL	VWR

Tabell 6 – Løsninger og gasser

Navn	Kvalitet	Leverandør
Blank serum		Frivillig på laboratoriet
Milli-Q vann	18Ω	Merck
Nitrogen	2.0	Eget gassanlegg
Nitrogen	5.0	AGA

7.3 Apparat

Tabell 7- Apparat

Utstyr	Produsent
LC: Agilent 1260	Agilent
MS:Agilent 6470	Agilent
SPE dry til inndamping av løsemidler	Argonaut
Positive presssure til å tørke SLE platen	Waters
Sentrifuge til eppendorfrør	Abbot
Wortex mixer, IKA Wortex 3	IKA

7.4 Standarder, internstandarder og kontroller

Standarder og kontroller skal alltid være fra to ulike leverandører for å sikre at konsentrasjonene på renstoffene er korrekte, Internstandard benyttes for å korrigere for tap av komponent under prøveopparbeidelsen og/eller matrikseffekter under analysering. Tradisjonelt er det benyttet matriksmatchede kontroller og standarder i kromatografiske legemiddelanalyser. Den siste tiden har man gått mer bort fra dette da det benyttes egne internstandarder for å korrigere for eventuelle matrikseffekter. Dette er også aktuelt i denne metoden. Men for å sikre at det ikke oppstår problemer, er det tatt med to matriksmatchede kontroller i metodeutviklingen og valideringen.

Det er laget to sett med standarder og kontroller. Av erfaring fra tidligere vil zopiklon og lorazepam tape konsentrasjon i metanol sammen med de andre komponentene. Det er derfor egne standard- og kontrollsett for disse to komponentene løst i acetonitril. I metoden omtales disse for kalibrator eller kontroll ZOP. De andre komponentene er løst i metanol og omtales kun som kalibrator eller kontroll.

Det ble tillaget følgende konsentrasjoner:

Tabell 8 - Standarder

Standarder konsentrasjon (nmol/L)						
Komponent	STD LOQ	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
Oxazepam	50,00	100,00	500,00	1000,00	5000,00	10000,00
Temazepam	50,00	100,00	500,00	1000,00	5000,00	10000,00
Nordiazepam	50,00	100,00	500,00	1000,00	5000,00	10000,00
Diazepam	50,00	100,00	500,00	1000,00	5000,00	10000,00
Alprazolam	5,00	10,00	50,00	150,00	500,00	1000,00
Klonazepam	5,00	10,00	50,00	150,00	500,00	1000,00
Flunitrazepam	2,50	5,00	20,00	50,00	70,00	100,00
Nitrazepam	25,00	50,00	150,00	300,00	500,00	1500,00
Lorazepam	25,00	50,00	150,00	300,00	500,00	1500,00
Zolpidem	5,00	10,00	100,00	500,00	1000,00	2000,00
Zopiklon	5,00	2,00	10,00	10,00	20,00	40,00

Tabell 9 - Kontroller

Kontroller konsentrasjon (nmol/L)							
Komponent	LOQ	XL	Lav	Lav matrix	Medium	Høy matrix	Høy
Oxazepam	50,00	125,00	200,00	500,00	2500,00	5000,00	7500,00
Temazepam	50,00	125,00	200,00	500,00	2500,00	5000,00	7500,00
Nordiazepam	50,00	125,00	200,00	500,00	2500,00	5000,00	7500,00
Diazepam	50,00	125,00	200,00	500,00	2500,00	5000,00	7500,00
Alprazolam	5,00	12,50	40,00	50,00	160,00	500,00	750,00
Klonazepam	5,00	12,50	40,00	50,00	160,00	500,00	750,00
Flunitrazepam	2,50	7,00	7,00	20,00	50,00	70,00	75,00
Nitrazepam	25,00	70,00	200,00	150,00	300,00	500,00	1000,00
Lorazepam	25,00	70,00	200,00	150,00	300,00	500,00	1000,00
Zolpidem	5,00	12,50	50,00	100,00	500,00	1000,00	1500,00
Zopiklon	5,00	12,50	50,00	100,00	500,00	1000,00	1500,00

Tabell 10 – Deutererte internstandarder

Komponent	Konsentrasjon nmol/L
Oxazepam -d5	3429
Temazepam-d5	3270
Nordiazepam-d5	3630
Diazepam-d5	3450
Alprazolam-d5	639
Klonazepam-d4	316
Flunitrazepam-d3	125
Nitrazepam-d5	700
Lorazepam-13C6	305
Zopiklon-d4	254
Zolpidem-d6	320

7.5 Andre løsninger

5 mM ammoniumkarbonat buffer, pH 9,3, til prøveopparbeidelse: 1 liter Milli-Q vann tilsettes 0,48 g ammoniumkarbonat.

10 mM ammoniumacetatbuffer til mobilfase: 1 liter Milli-Q vann tilsettes 0,77 g ammoniumacetat

5 mM ammoniumformat buffer til mobilfase: 1 liter Milli-Q vann tilsettes 0,32 g ammoniumformat

5 mM ammoniumformat buffer til mobilfase: 1 liter Milli-Q vann tilsettes 0,32 g ammoniumformat og pH justeres til 3,1 med 1 mL maursyre

Etylacetat/heptan blanding til eluering: Etylacetat og heptan i forhold 4:1

Mobilfaser til reløsning: Surgjort ammoniumformat buffer og metanol i forhold 1:1

7.6 Tuning av massespektrometeret

Ved å tune massespektrometeret finner man de mest optimale innstillingene for analyse av komponentene. Det ble laget separate fortyninger av renstoffene med tilnærmet cut-off konsentrasjoner. Mobilfasene som ble benyttet er fra en eksisterende metode for rusmidler i urin, blant annet benzodiazepiner. 10 mM ammoniumacetatbuffer og metanol. Tuningen ble kjørt isokratisk, dvs. 50 % buffer og 50 % metanol, og uten kolonne.

Agilent har program for automatisk tuning. Erfaringsmessig er ikke dette alltid ideelt for flere komponenter i en metode. Tuningen ble derfor gjort manuelt. Den samme erfaringen gjelder også for programvaren sourceoptimizer. Her skal programmet finne den ideelle innstillingen for ionekilden. Siden det allerede finnes en metode for rusmidler i urin på laboratoriet ble det besluttet å benytte samme parametere for den nye benzodiazepinmetoden.

Ved hjelp av MS2scan ble alle forløperionene identifisert. Det ble scannet over et område der det var forventet å finne ionemassen til hver enkelt komponent.

Benzodiazepiner er erfaringsmessig best å ionisere i positiv mode så ionemassen er derfor molekylmassen +1.

Deretter ble den riktige fragmentorspenningen satt. Fragmentorspenningen styrer hastigheten til ionene i kapillæret mellom ionekilden og massespektrometeret. Er denne satt for lav vil ikke ionene nå frem til massespektrometeret. Er den for høy vil ionene fragmentere. Det ble gjort en MS2SIM i området 70-155 V.

Kollisjonsenergien, CE; er den spenningen ionene blir utsatt for i kollisjonscellen. Det er ønskelig med fragmenter, produksjoner, med høy respons. Det er derfor viktig at denne ikke blir satt for høy, da vil ionene danne mange små fragmenter. En produksjonskan ble gjort i området 10-70 V.

Celleakselerator, CAV, er spenningsgradienten mellom heksapolstavene i kollisjonscellen. Denne styrer tiden ionene tilbringer inne i kollisjonscellen. Det er ønskelig å danne produksjoner med god respons. Samtidig er det viktig at ionene ikke blir for lenge inne i kollisjonscellen slik at de blandes med andre komponentioner. CAV bestemmes ved å scanne på MRM.

For å vurdere resultatene fra tuningen ble programvaren Agilent Qualifier benyttet.

7.7 Kromatografisk metode

Det var ønskelig å benytte mobilfaser og kolonner som allerede var implementert i andre metoder ved laboratoriet. Mobilfasene, ammoniumacetat buffer og metanol, fra eksisterende RUS metode, ble derfor brukt som et utgangspunkt i metoden. RUS-metoden er en urinanalyse og inneholder også benzodiazepiner.

Gradienten startet med 95 % buffer og 5 % MeOH. Deretter ble det satt opp en lineær gradient opp til 100 % MeOH, for å se når komponentene eluerte. Det ble lagt inn en vask, med påfølgende stabiliseringstid for at systemet skulle være klar til neste injeksjon. Når retensjonstidene til de ulike komponentene var identifisert ble gradienten justert slik at programmet ikke ble lengre enn nødvendig, samtidig som så best mulig separasjon ble oppnådd.

For å undersøke om separasjon og respons kunne forbedres ytterligere ble den vandige ammoniumacetatbufferen byttet ut med 5 mM ammoniumformatbuffer og i

siste forsøk ble ammoniumformatbufferen pH justert til 3,1. Dette så ut til å bedre separasjonen, så det ble valgt å gå videre med denne bufferen.

Det ble testet ut to kolonner som var i bruk i eksisterende metoder.

1: Agilent: InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1x100 mm 2,7 micron

2: Waters: ACQUITY UPLC HSS T3 2,1 x100 mm, 1,8 µm

7.8 Prøveopparbeidelse

Utgangspunktet for prøveopparbeidelsen var å lage en rask og rimelig prøveopparbeidelse, men at det skulle ha tilstrekkelig kvalitet i forhold til renhet. Laboratoriet har erfaring med både SPE, SLE og proteinfelling i eksisterende metoder. Det ble besluttet å teste proteinfelling og SLE og undersøke om disse metodene hadde tilstrekkelig kvalitet. I alle forsøkene ble det satt opp en standardrekke. Det ble benyttet manuell prøveopparbeidelse i metodeutviklingen og valideringen. Dersom prøvemengden øker i omfang etter at metoden blir tatt i bruk, kan den overføres til pipetteringsrobot ved et senere tidspunkt.

7.8.1 Proteinfelling

En kalibreringsrekke ble satt opp:

20 µL kalibrator, 20 µL kalibrator ZOP, 60 µL 0-serum ble blandet med 50 µL internstandard og 400 µL acetonitril i et eppendorfrør. Blandingen ble vortexmixet i 20 sekunder og deretter sentrifugert i 10 minutter Supernantanen ble pipettert over i vials med inserts og satt på HPLC systemet for analyse.

7.8.2 SLE

Det ble gjort fire forskjellige prøveopparbeidelsesforsøk på SLE:

1:

I et eppendorfrør blandes følgende:

20 µL kalibrator, 20 µL kalibrator ZOP + 60 µL 0-serum

50 µL internstandard

100 µL Milli-Q vann

100 µL ammonuimkarbonatbuffer pH 9,3

Blandingen overføres til SLE platen

Absorpsjon ble indusert med lavt nitrogentrykk i 10-20 sekunder.

Etter 5 minutter ble komponentene eluert over i en 96 brønners plate med 2x 750 µL tertbutyleter med et intervall på 5 minutter mellom hver tilsetning av eter. For å hjelpe elueringen ble det påsatt et lavt trykk med nitrogen i 10-30 sekunder. Prøvene dampes inn til alt løsemiddelet er fordampet. Deretter reløses de i 100 µL mobilfase (50 % A og 50 % B)

2:

I et eppendorfrør blandes følgende:

20 µL kalibrator, 20 µL kalibrator ZOP + 160 µL 0-serum

50 µL internstandard

100 µL Milli-Q vann

100 µL ammonuimkarbonatbuffer pH 9,3

Blandingen overføres til SLE platen

Absorpsjon ble indusert med lavt nitrogentrykk 10-20 sekunder

Etter 5 minutter ble komponentene eluert over i en 96 brønners plate med 2x 750 µL etylacetat/heptan blanding med et intervall på 5 minutter mellom hver tilsetning av etylacetat/heptan. For å hjelpe elueringen ble det påsatt et lavt trykk med nitrogen i 10-30 sekunder. Prøvene dampes inn til alt løsemiddelet er fordampet. Deretter reløses de i 100 µL mobilfase (50 % A og 50 % B)

3:

I et eppendorfrør blandes følgende:

20 µL kalibrator, 20 µL kalibrator ZOP + 60 µL 0-serum

50 µL internstandard

100 µL Milli-Q vann

100 µL ammonuimkarbonatbuffer pH 9,3

Blandingen overføres til SLE platen

Absorpsjon ble indusert med lavt nitrogentrykk 10-20 sekunder

Etter 5 minutter ble komponentene eluert over i en 96 brønners plate med 2x 750 µL etylacetat/heptan blanding med et intervall på 5 minutter mellom hver tilsetning av etylacetat/heptan. For å hjelpe elueringen ble det påsatt et lavt trykk med nitrogen i 10-30 sekunder. Prøvene dampes inn til alt løsemiddelet er fordampet. Deretter reløses de i 100 µL mobilfase (50 % A og 50 % B)

4:

I et eppendorfrør blandes følgende:

20 µL kalibrator, 20 µL kalibrator ZOP + 160 µL 0-serum

50 µL internstandard

100 µL Milli-Q vann

100 µL ammonuimkarbonatbuffer pH 9,3

Blandingen overføres til SLE platen

Absorpsjon ble indusert med lavt nitrogentrykk 10-20 sekunder

Etter 5 minutter ble komponentene eluert over i en 96 brønners plate med 2x 750 μL tertbutyleter med et intervall på 5 minutter mellom hver tilsetning av eter. For å hjelpe elueringen ble det påsatt et lavt trykk med nitrogen i 10-30 sekunder. Prøvene dampes inn til alt løsemiddelet er fordampet. Deretter reløses de i 100 μL mobilfase (50 % A og 50 % B)

8 Metodevalidering

For å sikre at metoder som utvikles har god kvalitet og stabilitet, har sykehuset egne prosedyrer for metodevalidering. Prosedyren som beskriver validering av en kromatografisk metode; D 34518, bygger på NS-EN ISO 15189. Benzodiazepinmetoden er validert etter denne prosedyren.

8.1 Linearitet:

Fem standardrekker ble opparbeidet og analysert i en serie. Det ble gjort en vurdering i forhold til lineariteten ved å bestemme R^2 .

8.2 Presisjon, reproduserbarhet og riktighet:

For å vurdere presisjonen, innen-serie variasjonen, ble alle kontrollene opparbeidet og analysert i 10 replikater i en seie. Reproduserbarheten, mellom serie variasjonen, ble undersøkt ved å analysere kontrollene i ti forskjellige serier fordelt over flere dager med forskjellige prøveopparbeidere. CV og bias ble beregnet for begge forsøkene..

Riktighet kan sees i forhold til bias i de to forsøkene. Riktighet over tid følges ved å jevnlig analysere in-house produserte- og eksterne kontroller. De eksterne kontrollene leveres av et eksternt kontrollorgan, som LGC. LGC sender ut to prøver, åtte ganger i året som inneholder ulike konsentrasjoner av forskjellige benzodiazepiner. Disse blir analysert og resultatene blir rapportert inn. Dette danner grunnlaget for rapporten LGC sender ut i etterkant og som brukes i det kontinuerlige kvalitetsarbeidet ved laboratoriet.

8.3 Utbytte:

Under prøveopparbeidelse vil noe av komponenten kunne tapes. Beregning av ekstraksjonsutbytte vil påvise hvor mye.

En kjent mengde komponent ble tilsatt fem ulike serum før ekstraksjon og internstandard etter ekstraksjon. Utbyttet ble så beregnet mot responsene der komponent og internstandard var tilsatt etter ekstraksjon. Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet i tre ulike konsentrasjonsnivå.

8.4 Matrikseffekter:

Serum består av mange ulike komponenter. Disse vil, selv etter prøveopparbeidelse kunne suppressere eller forsterke signalet i massespektrometeret.

Matrikseffektene ble beregnet med å sammenligne responser fra en kjent mengde komponent og internstandard i seks ulike serum etter ekstraksjon med komponent og internstandard tilsatt i ren mobilfase. Matrikseffektene ble beregnet i tre ulike nivå.

8.5 LOD, Limit of detection:

Den minste konsentrasjonen som kan detekteres av systemet. LOD ble bestemt ved fortynde den laveste standardkonsentrasjonen, LOQ. Kravet for LOD er at det detekteres en kromatografisk topp av komponenten med riktig retensjonstid og at denne kan skilles fra støysignaler.

8.6 LOQ, Limit of quantification:

Den minste konsentrasjonen som kan kvantifiseres. LOQ ble bestemt ved å lage en fortykning med en konsentrasjon som var det halve av laveste standard. LOQ fortykningen ble ekstrahert og analysert i ti replikater.

8.7 Carry-over:

For å undersøke om det er overdrag fra en prøve til en annen i instrumentet ble det gjort en carry-over undersøkelse. Det ble satt opp en serie med en prøve med høy konsentrasjon og deretter to blanker. Disse ble analysert fem ganger. For å avgjøre om det var overdrag i systemet ble blankene sammenlignet med den høykonsentrerte prøven og standard 1, som representerer den nedre grensen av målområdet.

8.8 Robusthet:

Under tillaging av mobilfaser kan det forekomme små variasjoner som kan påvirke pH og ionestyrke.

Robustheten ble derfor testet ved å variere pH ved å benytte buffer med små endringer i konsentrasjon samt ulike mengder av tilsatt maursyre. Robustheten ble da vurdert i forhold til retensjonstidens stabilitet og responsen til de ulike komponentene.

8.9 Måleusikkerhet:

Det er flere faktorer som kan bidra til usikkerhet i måleresultatet. Disse ble identifisert og vurdert. En bevisstgjøring rundt måleusikkerheten vil kunne være til hjelp under feilsøking, men også til forebygging av feil eller unøyaktige analyseresultater.

8.10 Holdbarhet:

Holdbarheten av opparbeidede prøver ble testet ved å opparbeide og analysere en serie, la den stå i autosamplern i syv dager for så å analysere prøvene på nytt. Bias ble beregnet.

Holdbarheten av uåpnede renstoffampuller er bestemt av leverandør. Fortynninger til standarder og kontroller bør ikke lages samtidig i rutinearbeid. Således kan

holdbarheten fastsettes ved å lage kontrollfortynninger et halvt år etter standardfortynningene.

8.11 Sammenligning:

Riktigheten av prøvene ble videre undersøkt ved å sammenligne den nye metoden med en allerede eksisterende metode ved Universitetssykehuset i Nord-Norge.

9 Metodeutvikling, resultater og diskusjon

9.1 Valg av metode og komponenter

Når en ny analysemetode skal implementeres ved et offentlig sykehuslaboratorium, vil det alltid være en avveining mellom kostnad og klinisk nytteverdi. Kromatografiske analyser er forholdsvis kostbare og tidskrevende. Utstyret er dyrt å anskaffe og det medfører en betydelig kostnad å drifte analysene. Både kjemikalier og ikke minst renstoffer og utstyr til prøveoppbevaring er kostbare. Og i tillegg må man ha kvalifisert personell til å utføre og drifte metodene.

Analyselaboratoriet ikke utfører selv blir sendt til samarbeidslaboratorier fortrinnsvis i Norge, men også til utlandet. Benzodiazepiner har blitt sendt til Diakonhjemmets laboratorium. Systemet i Norge er lagt opp slik at sykehusene tjener penger på alle analyser de utfører. Alle analyser er taksert og Helfo overfører penger i forhold til de analysene sykehuset dokumenterer at de har gjennomført. Når en analyse sendes til et annet sykehus, medfører dette en kostnad for sykehuset på opptil 4 ganger takst fra Helfo. Da vil det sykehuset som utfører analysen fakturere avsender direkte.

Overforbruk eller feilbruk av benzodiazepiner har vist seg å ha en negativ virkning på en forholdsvis stor gruppe pasienter. Konsekvensene av dette vil kunne medføre kostnader for samfunnet, men ikke minst for den enkelte pasient. Ved å monitorere serumkonsentrasjonene av benzodiazepiner som blir foreskrevet i Norge, vil man bedre kunne styre doseringen eller avdekke misbruk.

I dag er måling av serumkonsentrasjonen til pasienter som tilhører området hvor laboratoriet på sykehuset Kalnes mottar sine prøver fra, marginal. Laboratoriet videresender få prøver til Diakonhjemmet selv om analysene har vært etterspurt fra både eksterne rekvisiterende som fastleger og spesialisthelsetjenesten, og interne rekvisiterende på sykehuset. Bakgrunnen for å utvikle og sette metoden i drift er å kunne sette større fokus på fordelene ved monitorering av benzodiazepinkonsentrasjonen og samtidig kunne tilby å analysere komponentene lokalt. Rekvisitene er bevisste på kostnader ved sending av prøver og ikke minst tar det lang tid å få svar på disse. Ved å kunne tilby analysen vil Sykehuset Østfold kunne yte bedre service overfor sine rekvisiterende, bedre helsehjelp til innbyggerne og forebygge offentlige kostnader

9.2 Utstyr, løsninger og konsentrasjoner

Benzodiazepiner i serum kan analyseres ved hjelp av flere forskjellige metoder og instrumenter. Det finnes ikke-kromatografiske metoder, som immunoanalyser, og kromatografiske metoder hvor mobilfasene enten er en gass eller en væske.

Immunanalysene blir i dag først og fremst benyttet innen screening hvor et eventuelt positivt prøvesvar bekreftes med en kromatografisk metode i etterkant.

Immunanalysene er kjent for falske positive resultater og kryssreaksjoner.

Gullstandarden er derfor kromatografiske analyser.(34)

Laboratoriet har instrumenter med immunoanalyser, men også til gass- og væskekromatografer koblet til massespektrometre. Gasskromatografen er tilkoblet et single massespektrometer, mens væskekromatografiinstrumentene har triplequad massespektrometer. Med immunanalysenes muligheter for feilaktige resultater ble det ikke vurdert å bruke disse instrumentene. Siden gasskromatografen ved laboratoriet kun har en singlequad tilkoblet, ble det vurdert dithen at væskekromatografenes triplequads ville være mest spesifikke og derfor ble benzodiazepinmetoden utviklet på denne.

Laboratoriet har gjennom innkjøpsavtaler blitt låst til bestemte leverandører av både renstoffer, kjemikalier og annet utstyr som benyttes i analyse.

Når en ny metode skal utvikles må måleområdet for de ulike komponentene bestemmes. I hvilke konsentrasjonsområder forventes det at de ulike komponentene befinner seg. Dette er ulikt fra komponent til komponent og det er derfor forskjellige målområder for de ulike benzodiazepinene. Utfordringen i fastsettelse av målområde er deteksjon, nøyaktighet og linearitet. Lave konsentrasjoner må ha god nok respons i forhold til støy, høye konsentrasjoner kan føre til at kurvene ikke lengre er lineære og dersom det er et veldig vidt målområde vil de høye konsentrasjonene på standardkurven veie tyngre slik at det er mer unøyaktighet i de lave konsentrasjonsresultatene.

Utgangspunktet for fastsettelse av måleområdet var de måleområdene andre sykehuslaboratorier benytter. De er ønskelig at alle som analyserer benzodiazepiner i Norge skal kunne tilby lignende måleområder. Det ble derfor laget fortyninger til 5 standarder og en LOQ standard til bruk i metodevalideringen. Som kontroller ble det

laget 4 kontroller, to matriksmatchede kontroller og en LOQ kontroll. Som en ekstra sikkerhet er kontroller og standarder laget fra renstoffampuller fra to ulike leverandører. Dette for å sikre at det ikke er noe feil med konsentrasjonen i ampullen i utgangspunktet, men også at den ikke forringes over tid. I drift vil disse ikke lages samtidig, men i intervaller på et halvt år.

9.3 Tuning av massespektrometeret

Under tuningen av massespektrometeret ble forløper- og produksjoner som danner grunnlaget for identifisering av de enkelte komponentene, identifisert og optimalisert i forhold til respons. Det ble forsøkt ulike innstillinger for å finne de parameterne som ga de mest beste forholdene for alle komponentene i metoden. Utordringen lå i å velge overganger som ga tilstrekkelig respons, og som var unike for den spesifikke komponenten. Spesielt viktig var dette for komponenter som ikke ble tilstrekkelig kromatografisk separert. Det viste seg at internstandard til flunitrazepam interfererte med klonazepam. Det ble derfor besluttet å utelukke denne og i stedet benytte internstandard til klonazepam for både flunitrazepam og for klonazepam. Flunitrazepam og klonazepam er forholdsvis like komponenter og det antas at matrikseffekter vil ha forholdsvis lik påvirkning på disse stoffene. Tabell 11 viser MS parametrene som ga de beste resultatene for metoden.

Tabell 11 – MS innstillinger

Compound	Precursor Ion <i>m/z</i>	Product Ion <i>m/z</i>	Fragmentor V	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
Zopiklon	389,2	217	95	45	4	Positive
Zopiklon-d4	393,2	245,1	95	30	4	Positive
Zolpidem	308,2	263,1	90	40	4	Positive
Zolpidem	308,2	235,1	90	40	4	Positive
Zolpidem-d6	314,2	235,1	120	45	4	Positive
Klonazepam-d4	320,1	274	105	35	4	Positive

Klonazepam	316,1	270,1	115	30	4	Positive
Klonazepam	316,1	214,1	105	55	4	Positive
Nitrazepam	282,1	236,1	85	35	4	Positive
Nitrazepam	282,1	180,1	155	25	4	Positive
Nitrazepam-d5	287,2	185,1	105	45	4	Positive
Flunitrazepam-d3	317,1	271,1	100	35	4	Positive
Flunitrazepam	314,1	268,1	115	35	4	Positive
Flunitrazepam	314,1	239,1	115	35	4	Positive
Lorazepam	321	303	95	20	4	Positive
Lorazepam	321	275	95	20	4	Positive
Lorazepam-13C6	327,1	281	110	50	4	Positive
Oksazepam-d5	292,1	246,2	105	30	4	Positive
Alprazolam-d5	314,1	286,2	110	35	4	Positive
Oksazepam	287,1	241,1	95	40	4	Positive
Oksazepam	287,1	103,9	95	40	4	Positive
Alprazolam	309,1	281,1	105	30	4	Positive
Alprazolam	309,1	205,1	110	55	4	Positive
Temazepam-d5	306,2	260,1	105	30	4	Positive
Temazepam	301,1	255,1	100	35	4	Positive
Temazepam	301,1	177	100	55	4	Positive
Nordiazepam-d5	276,1	140	140	35	4	Positive
Nordiazepam	271,1	165	105	30	4	Positive
Nordiazepam	271,1	140	105	30	4	Positive
Diazepam-d5	290,2	198,2	120	40	4	Positive
Diazepam	285,1	193,2	105	40	4	Positive
Diazepam	285,1	154,1	105	35	4	Positive
Zopiklon	389,2	245,1	95	25	4	Positive

9.4 Kromatografisk metode

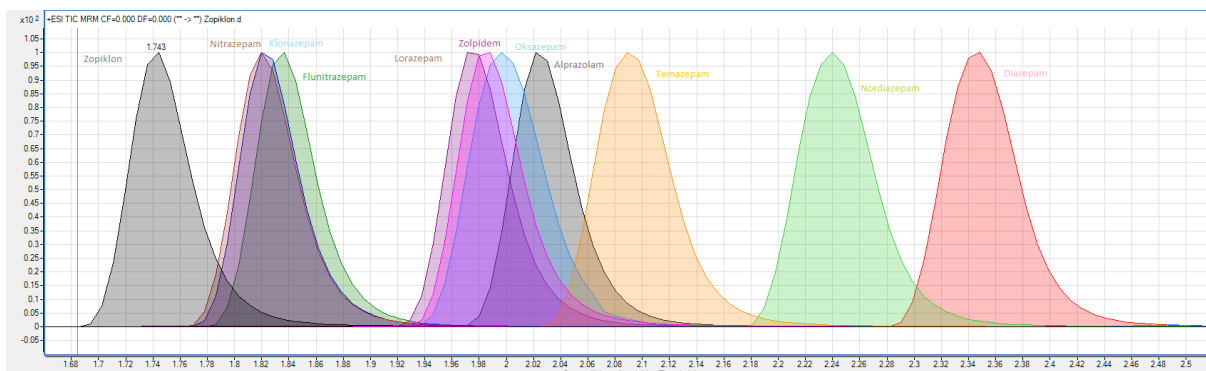
Med utgangspunkt i den eksisterende RUS-metoden, ble mobilfasene fra satt opp med en startgradient på 95 % A og 5 % B i 20 sekunder for å tillate komponentene å feste seg på kolonnen. A besto av 10mM ammoniumacetat buffer og B er ren metanol. Deretter ble det kjørt en lineær gradient med økende mengde B for å se når de ulike komponentene eluerte. Det ble gjort flere forsøk med både endret startgradient og ulike lineære gradienter, både slakke og bratte, for å forsøke å få en god separasjon med smale kromatografiske toppen. Når det ble forsøkt å bruke en startgradient med mer B, ble toppene både stygge og brede. Det ble derfor besluttet å benytte den opprinnelige startgradienten på 95 % A og 5 % B. En forholdsvis slakk lineær gradient fra 20 % A til 80 % B viste seg å gi den beste separasjonen og de smaleste kromatografiske toppene, se figur 7. Deretter ble det lagt inn vask med 100 % B for at alle rester skulle eluere før neste prøve og tilslutt startgradienten for å stabilisere systemet før neste injeksjon.

Gradientprogrammet varer i 6 minutter. Flow er satt til 0,5 mL/min og trykket er på max 600 bar, se tabell 12.

Tabell 12 - Gradientprogrammet

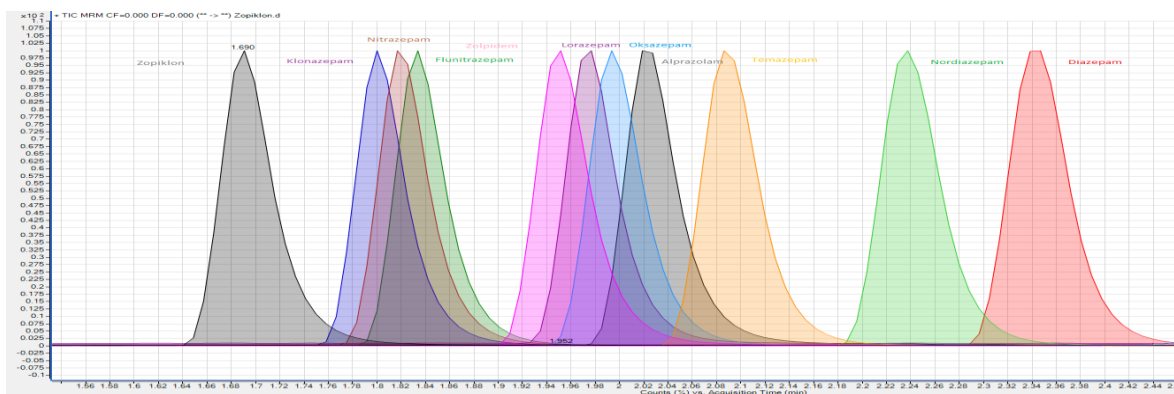
Tid i minutter	A (Buffer)	B (MeOH)
0	95	5
0,20	40	60
2,0	20	80
3,0	20	80
4,0	0	100
5,0	0	100
5,01	95	5

Til alle forsøkene ble det benyttet komponenter med konsentrasjoner på nivå med standard 2.

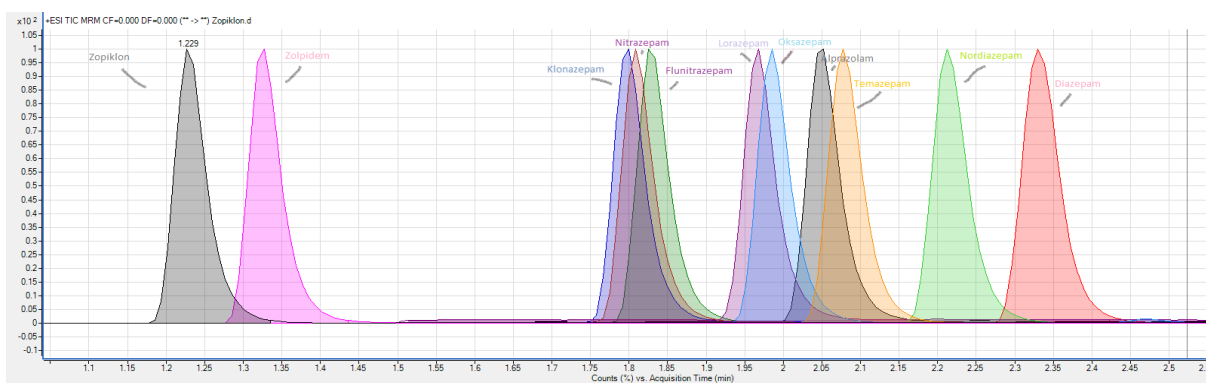


Figur 7 – Elueringsrekkefølge med ammoniumacetatbuffer

Det ble deretter forsøkt å bytte ut ammoniumacetat i bufferen med ammoniumformat for å undersøke om dette kunne ha noe å si for separasjonen, se figur 8. Tilslutt ble ammoniumformatbufferen surgjort. Dette ga det beste resultatet og det ble bestemt å gå videre med surgjort ammoniumformatbuffer og metanol, se figur 9.



Figur 8 - Elueringsrekkefølge med ammoniumformatbuffer



Figur 9 - Elueringsrekkefølge med ammoniumformatbuffer pH 3,1

Selv om surgjort ammoniumformatbuffer ga den beste separasjonen er det fremdeles kromatografiske topper som ikke er tilstrekkelig separert. Zopiklon og zolpidem som eluerer først er ikke grunnlinjeseperert. Mellom RT 1,796 min og 1,834 min eluerer klonazepam, nitrazepam, flunitrazepam tett på hverandre. Mellom RT 1,975 min og 1,994 min kommer lorazepam og oksazepam. Mellom RT 2,002 min og 2,087 min eluerer alprazolam og temazepam. Tilslutt følger nordiazepam og diazepam som heller ikke er fullstendig grunnlinjeseperert. Selv om det er ønskelig å separere alle komponentene fullstendig er ikke dette alltid mulig innenfor de rammer som er lagt. Problemet med co eluerende eller komponenter som eluerer tett på hverandre løses ved å bruke et sensitivt, høyoppløselig massespektrometer som detektor. Massespektrometret er selektivt i forhold til hvilke masser som detekteres og ved hjelp av triplequadrupolen gir det en sikker identifikasjon av de ulike komponentene.

9.5 Kolonner

To kolonnetyper er brukt i metodeutviklingen. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1x100 mm 2,7 micron fra Agilent består av silikapartikler hvor porøse partikler omkranser faste kjerner. Partiklene er påsatt monomere med karbonkjeder bestående av 18 karbonatomer. For å øke stabiliteten på kolonnen er kolonnen ettersilanisert (end capped) med kortere kjeder for å forhindre at de uderivatiserte silanolgruppene påvirker retensjonstiden.

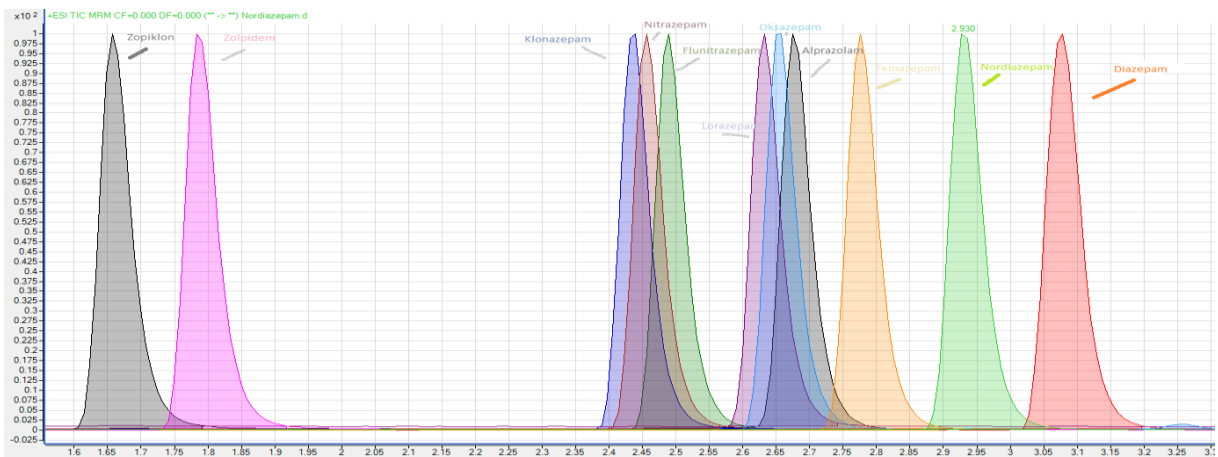
Laboratoriet har allerede god erfaring med denne kolonnen i den allerede etablerte RUS-metoden og alle innledende forsøk ble derfor gjort med denne kolonnen.

Siden C18 kolonner ofte er førstevalget ved utvikling av kromatografiske metoder var det ønskelig å prøve ut en annen C18 kolonne, fra en annen produsent, for å undersøke om det var mulig å forbedre separasjonen ytterligere.

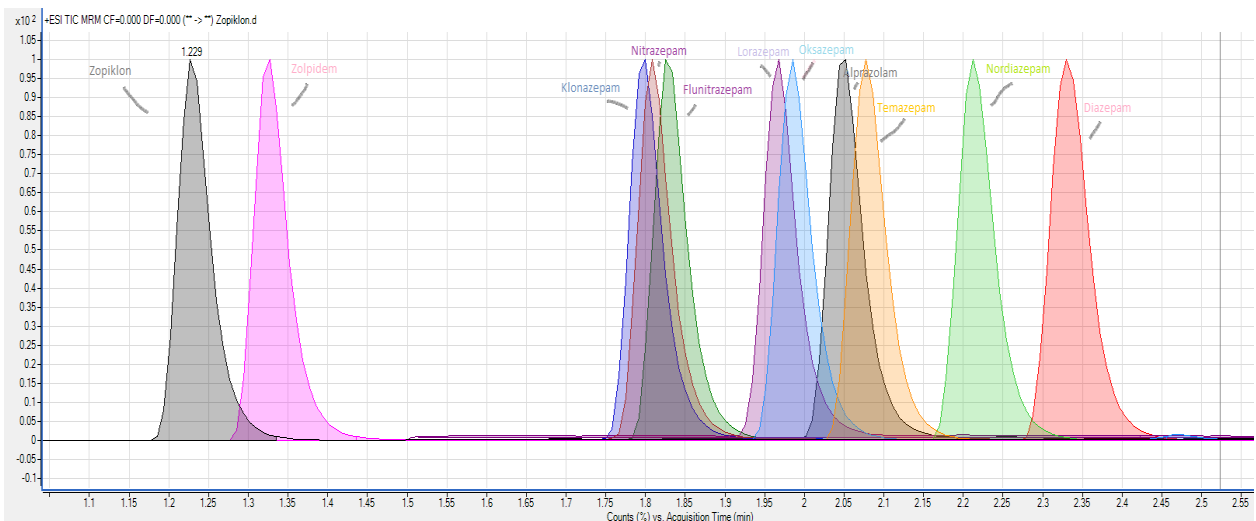
ACQUITY UPLC HSS T3 2,1 x100 mm, 1,8 µm fra Waters har 18 karboner i kjede bundet til silika på kolonnepartiklene. T3 teknologien er mer rettet mot de polare delene av komponentene og lover mer stabil retensjon ved å optimalisere porestørrelsen, overflatedekningen og ligandetettheten og ikke minst er C18 kjedene bundet med tre siloxanbindinger. Dette fører til mindre kolonneblødning, mindre tailing og stabile retensjonstider. (35)

Under metodeutviklingen var det ikke store forskjeller på separasjonskvaliteten mellom de to kolonnetypene, se figur 10 og 11.

Siden komponentene i metoden har hovedsakelig upolar karakter og fordelene av T3 kolonnen til Waters er rettet mot polar retensjon, ble kolonnen til Agilent valgt til denne metoden. InfinityLab Poroshell kolonnen er dessuten allerede i bruk i RUS-metoden og laboratoriet er derfor godt kjent med denne kolonnetypen.



Figur 10 – Elueringsrekkefølge med kolonnen Acquity UPLC HSS T3 2,1 x 100 mm 1,8 µm fra Waters



Figur 11 – Elueringsrekkefølge med kolonnen InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1x100 mm 2,7 micron fra Agilent

9.6 Prøveopparbeidelse

Under utviklingen av prøveopparbeidelsen, ble det gjort fire forskjellige forsøk med SLE og ett forsøk med proteinfelling. Alle forsøkene ble gjort ved å opparbeide en hel kalibreringsrekke og analysere disse på LC-MSMS. Vurderingene ble gjort ved å sammenligne responser for de ulike opparbeidelsene. Lipider, proteiner og andre urenheter i prøvematerialet vil kunne påvirke responsen, men også forurensning instrumentet. Komponentene zopiklon er valgt for å illustrere vurderingsgrunnlaget.

9.6.1 SLE

SLE kombinerer de to teknikkene SPE og LLE og er både tidkrevende og mer kostbar enn proteinfelling. Fordelen er at den gir renere ekstrakter som igjen gir høyere responser, lengre kolonnelevetid og mindre instrumentvedlikehold.

Når man analyserer biologisk materiale er det alltid et ønske om å bruke så lite av det som mulig. Både for å minimere risiko for forurensning av apparatur, men også for ikke å ta mer prøvemateriale fra pasienter enn nødvendig.

Kalibratorer og internstandarder er løst i organiske løsemidler. Når dette blandes med serum vil det kunne initiere en fellingsprosess. Mengden av organisk løsemiddel i forhold til mengde serum avgjør om serumet felles eller ikke. Det er ikke ønskelig at dette skjer før prøven skal overføres til SLE platen. Forsøkene ble derfor utført med to forskjellige mengder med serum, som ga et totalt prøvolum på 100 µL og 200 µL.

Alle prøvene ble behandlet med ammoniumkarbonat buffer før de ble påsatt SLE platen. Dette for å sikre at alle prøver hadde en pH 2 enheter over pKa som førte til at de basiske komponentene forelå på nøytral form. I nøytral form vil komponentene være løselige i organiske løsemidler og kan derfor elueres ut mens de vandige delene av prøven, fosfolipider og proteiner, blir igjen i kolonnematerialet.

Det ble også gjort forsøk med to ulike elueringsmidler. Ren tertbutylmetyleter og en blanding av etylacetat og heptan i forholdet 4:1. Tertbutylmetyleter er en et upolart løsningsmiddel. Etylacetat er en acetatester og fungerer som et polart, aprotisk

løsningsmiddel. Heptan er et upolart løsningsmiddel som består av en femkarbonet kjede.

Ulike prøvevolum;100µL / 200µL

Utfordringen med en liten mengde serum i en forholdsvis stor mengde organisk løsemiddel, er utfelling. En slik utfelling vil kunne observeres under prøveopparbeidelsen rent visuelt. Det ble ikke observert noen fellingsreaksjon under prøveopparbeidelsen med hverken 100 µL eller 200 µL prøvemateriale. Når det gjelder respons på instrumentet vil større mengde serum vil inneholde mer renstoff for å oppnå samme konsentrasjon som en mindre mengde serum. Høyere mengde serum oppnår derfor høyere respons enn når en mindre mengde serum er benyttet, se tabell 13. Det går derfor ikke å sammenligne responser. Vurderingen gikk derfor på å se om 100 µL prøvemateriale ga tilstrekkelig respons, siden en liten mengde er å foretrekke. Spesielt viktig er det for lave konsentrasjoner, da respons ofte taper seg over tid. Dersom responsen er lav i utgangspunktet kan det bli vanskelig å drifte metoden. 100 µL ga tilstrekkelig respons og det ble ikke observert noen utfelling og ble derfor benyttet videre i metoden.

Tabell 13– Zopiklon respons, ulike mengder prøvemateriale

	SLE Eter 100 µL Respons	SLE Eter 200 µL Respons	Bias %
Kalibrator 1	17285	17736	-3
Kalibrator 2	89884	154481	-72
Kalibrator 3	485168	720335	-48
Kalibrator 4	804660	1463060	-82
Kalibrator 5	1337188	2223551	-66

Elueringsmiddel

Når komponentene i metoden foreligger på nøytral form, vil de kunne løses i uorganiske løsemidler. Det er komponentens karakter som avgjør om hvor godt den løses og dermed eluerer ut. Komponentene i metoden er i hovedsak upolare, men har også polare funksjonelle grupper.

Etylacetat og heptan som elueringsmiddel hadde et høyere utbytte enn eter. Responsene var gjennomgående høyere for alle komponentene, se tabell 14. Når valget av elueringsmiddel likevel falt på MBTE var årsaken at heptan er langt mer helseskadelig, responsen for MBTE var tilfredsstillende og MBTE er allerede i bruk i flere av laboratoriets metoder.

Tabell 14 – Zopiklon respons, ulike elueringsmidler

	SLE Eter 100 µL Respons	SLE Etylacetat/heptan 100 µL Respons	Bias %
Kalibrator 1	17285	20866	-21
Kalibrator 2	89884	108066	-20
Kalibrator 3	485168	489676	-1
Kalibrator 4	804660	912458	-13
Kalibrator 5	1337188	1558882	-17

9.6.2 Proteinfelling

Den enkleste og rimeligste prøveoppbeidelsen er proteinfelling. I forsøket ble serumet felt ved hjelp av acetonitril i et eppendorfrør. I forkant var det tilsatt kalibratormateriale og internstandard. Etter analyse ble responsene for de ulike kalibratorene sammenlignet med kalibratorresponsen der det var benyttet SLE oppbeidelse med 100 µL prøvematerialet og eter som elueringsmiddel.

Responsene for proteinfellingen lå rundt 50 % lavere enn for SLE oppbeidelsen, se tabell 15. Den var også såpass lav for de laveste konsentrasjonene at det var fare for at det kunne oppstå problemer å detektere lave konsentrasjoner når metoden hadde vært en stund i drift. Dette med tanke på forurensing av instrument og kolonner. Proteinfelling ble derfor forkastet som prøveoppbeidelse.

Tabell 15 – Zopiklon respons, SLE vs proteinfelling

	SLE Eter 100 µL Respons	Felling Respons	Bias %
Kalibrator 1	17285	7521	56
Kalibrator 2	89884	43591	52
Kalibrator 3	485168	206563	57

Kalibrator 4	804660	413157	49
Kalibrator 5	1337188	710940	47

9.7 Matrix matchede standard- og kontrollmateriale

Tradisjonelt har standarder og kontroller til bruk i kromatografiske metoder ved sykehuslaboratoriene vært laget ved å spike serum til ønskede konsentrasjoner. Eventuelt å tilsette like mye serum som det tilsettes prøvemateriale. Dette gjøres for at standarder og kontroller skal få tilnærmet likt matrix som prøvene. Men alle pasienter har unikt serum og forholdene i hvert pasientserum vil kunne påvirke analysen ulikt. Dette vil en deuterert eller C¹³ merket internstandard, som har samme retensjonstid som komponenten, kunne korrigere for.

En utfordring med å lage standard og kontrollmateriale ved å spike serum med renstoff til ønsket konsentrasjon, er at serumet må være blankt. Det vil si at man er avhengig at det ikke inneholder de komponentene som metoden omfatter eller andre stoff som kan påvirke metoden. Alternativene er å kjøpe blank – serum, som er kostbart eller å verve kollegaer som er villige til å gi bort serum. Det siste er noe som er ønskelig å gå bort i fra, det første belaster budsjettet til laboratoriet.

Den siste tiden har flere metoder blitt utviklet uten å benytte seg av matrixmatchede standarder og kontrollmateriale. Mange komponenter har egne deutererte eller C¹³ merkede internstandarder og man kan, ved å bruke en tilhørende internstandard for hver komponent, korrigere for tap av utbytte og matrixpåvirkning av komponenter i prøven.

Det er derfor ønskelig å sette opp denne metoden uten å bruke blank-serum i standarder og kontroller. Under metodeutviklingen, ble det kontrollert at alle komponenter har en tilfredsstillende respons i kalibratører med tilsatt serum. Disse ble sammenlignet med kalibratører uten tilsatt serum, se tabell 16.

Gjennom metodevalideringen er det tatt med to matrixmatchede kontroller i ulike nivå for hver komponent, dette for å sikre at metoden gir riktige kvantitative resultater uten matrixmatchede standarder. Metodevalideringen gir også kvantitative mål på korrigerings av matrikseffekter og tap under prøveopparbeidelsen.

Tabell 16 – Zopiklon standarder løst i acetonitril og i serum

	Acetonitril Respons	Serum Respons	Bias %
Kalibrator 1	15558	17285	-11
Kalibrator 2	97390	89884	8
Kalibrator 3	461474	485168	-5
Kalibrator 4	652064	804660	-23
Kalibrator 5	1459088	1337188	8

10 Metodevalidering, resultater og diskusjon

10.1 Linearitet

Korrelasjonsfaktoren, R^2 , er beregnet for gjennomsnittet av de fem standardkurvene. Det er ønskelig at korrelasjonsfaktoren er så nærme 1 som mulig. Laveste verdi for måleområdet er standard LOQ og høyeste er standard 5.

Tabell 17 - Linearitet

Komponent	Måleområde, nmol/L	R^2
Zopiklon	5-2000	0,998
Zolpidem	5-2000	0,999
Klonazepam	5-1000	0,998
Nitrazepam	25-1500	0,998
Flunitrazepam	5-100	0,992
Lorazepam	25-1500	0,996
Oksazepam	50-10 000	0,999
Alprazolam	5-1000	0,999
Temazepam	50- 10 000	0,999
Nordiazepam	50-10 000	0,999
Diazepam	50-10 000	0,998

Det er benyttet lineære kurver for alle komponentene, bortsett fra oksazepam, her er det benyttet kvadratisk kurve. Høye konsentrasjoner kan føre til at responsen blir veldig høy og at kurven krummes. I løpet av metodevalideringen er det observert at det varierer noe om kurvene er kvadratiske eller lineære. Dette gjelder spesielt de komponentene med høye konsentrasjoner. Dette løses ved å bruke beste kurvetilpasning under kvantifisering.

10.2 Presisjon, repeterbarhet og riktighet

Innen serie variasjon, presisjon

Resultatene fra presisjonsforsøket viser instrumentets og prøveopparbeiderens evne til å reprodusere resultatene under like forhold. Det er ønskelig at CV og bias ikke overstiger 10 %. Resultatene er presentert i tabell 18.

Tabell 18 – Innen-serie variasjon, presisjon, n=10

Komponent		XL	L	L med matriks	M	H med matriks	H
Zopiklon	Teoretisk nmol/L	12,5	50,0	100,0	500,0	1000,0	1500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	12,9	56,5	119,5	568,2	1363,7	1788,3
	CV %	3	2	3	3	4	4
	Bias %	3	13	19	14	36	19
Zolpidem	Teoretisk nmol/L	12,5	50,0	100,0	500,0	1000,0	1500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	11,5	50,8	104,7	498,8	1043,7	1538,9
	CV %	6	2	2	2	2	3
	Bias %	-8	2	5	0	4	3
Klonazepam	Teoretisk nmol/L	12,5	40,0	50,0	160,0	500,0	750,0
	Gjennomsnitt nmol/L	11,5	39,8	49,8	160,2	498,4	761,1
	CV %	7	4	3	2	3	3
	Bias %	-8	0	0	0	0	1
Nitrazepam	Teoretisk nmol/L	70,0	200,0	150,0	300,0	500,0	1000,0
	Gjennomsnitt nmol/L	63,4	201,5	1562	301,3	482,8	995,2
	CV %	9	3	4	4	2	3

	Bias %	-9	1	4	0	-3	0
Flunitrazepam	Teoretisk nmol/L	7,0	7,0	20,0	50,0	70,0	75,0
	Gjennomsnitt nmol/L	8,0	8,8	19,7	47,1	54,5	68,9
	CV %	18	9	8	5	7	5
	Bias %	15	26	-2	-6	-22	-8
Lorazepam	Teoretisk nmol/L	70,0	200,0	150,0	300,0	500,0	1000,0
	Gjennomsnitt nmol/L	58,9	188,3	137,4	299,7	493,2	982,6
	CV %	5	5	6	4	6	5
	Bias %	-16	-6	-8	0	-1	-2
Oksazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	120,6	183,2	515,7	2626,8	5118,8	7671,5
	CV %	7	2	2	3	2	3
	Bias %	-3	8	3	5	2	2
Alprazolam	Teoretisk nmol/L	12,5	40,0	50,0	160,0	500,0	750,0
	Gjennomsnitt nmol/L	11,4	38,1	47,7	153,4	487,1	743,1
	CV %	8	3	2	3	3	3
	Bias %	-9	-5	-5	-4	-3	-1
Temazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	119,9	191,6	524,4	2648,2	5120,5	7785,9
	CV %	7	3	2	2	2	2
	Bias %	-4	-4	5	6	2	4
Nordiazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	126,1	198,3	549,7	2758,7	5396,6	8099,6
	CV %	7	3	2	3	2	3
	Bias %	1	-1	10	10	8	8

Diazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt	117,3	180,9	491,6	2481,5	4974,6	7625,2
	CV %	6	2	2	2	2	3
	Bias %	-6	-10	-2	-1	-1	2

Både CV og bias for flunitrazepam overstiger 10 %. Dette er en komponent som gjennom hele metodevalideringen har vist seg å kunne være problematisk. Prøver med flunitrazepam er lavkonsentrerte og resulterer i et lavt målområde. Det at det er så store forskjeller i konsentrasjonene på de ulike komponentene i metoden, gjør det vanskelig å sikre optimale forhold for alle. Flunitrazepam er dessuten virkestoffet i Rohypnol, som er avregistrert i Norge. Det brukes nå kun på dispensasjon i spesielle tilfeller. Det kan derfor være aktuelt å ta flunitrazepam ut av metoden.

Zopiklon viser god reproduserbarhet, men bias er utenfor kravet på 10 %. Det er sannsynlig at kalibreringsrekken i dette forsøket ikke er helt korrekt. Riktigheten blir derfor vurdert i mellom serie forsøket.

Mellom serie variasjon, repeterbarhet

Repeaterbarhetsforsøket illustrerer den høyeste variasjonen en kan forvente i metoden. Det er ønskelig at CV og bias ikke overstiger 10 %. Resultatene er presentert i tabell 19.

Tabell 19 – Mellom serie variasjon, n=10

Komponent		XL	L	L med matriks	M	H med matriks	H
Zopiklon	Teoretisk nmol/L	12,5	50,0	100,0	500,0	1000,0	1500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	12,8	52,4	99,6	514,5	1015,7	1558,5
	CV %	5	5	4	8	8	7
	Bias %	2	5	0	3	2	4
Zolpidem	Teoretisk	12,5	50,0	100,0	500,0	1000,0	1500,0

	nmol/L						
	Gjennomsnitt nmol/L	11,6	50,1	104,6	478,5	1013,9	1504,7
	CV %	6	7	4	4	2	4
	Bias %	-7	0	5	-4	1	0
Klonazepam	Teoretisk nmol/L	12,5	40,0	50,0	160,0	500,0	750,0
	Gjennomsnitt nmol/L	11,5	39,9	50,7	156,7	491,6	760,1
	CV %	6	6	7	5	3	3
	Bias %	-8	0	1	-2	-2	1
Nitrazepam	Teoretisk nmol/L	70,0	200,0	150,0	300,0	500,0	1000,0
	Gjennomsnitt nmol/L	64,9	202,8	152,7	289,6	488,8	1009,8
	CV %	8	6	4	5	2	4
	Bias %	-7	1	2	-3	-2	1
Flunitrazepam	Teoretisk nmol/L	7,0	7,0	20,0	50,0	70,0	75,0
	Gjennomsnitt nmol/L	7,7	8,5	19,8	50,6	61,3	79,0
	CV %	20	23	28	12	16	9
	Bias %	10	21	-1	1	-12	5
Lorazepam	Teoretisk nmol/L	70,0	200,0	150,0	300,0	500,0	1000,0
	Gjennomsnitt nmol/L	55,9	182,2	139,3	289,4	457,0	965,9
	CV %	6	7	7	8	8	10
	Bias %	-20	-9	-7	-4	-9	-3
Oksazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	121,3	185,7	523,9	2551,1	5050,4	7499,6
	CV %	9	6	6	4	2	2
	Bias %	-3	-7	5	2	1	0
Alprazepam	Teoretisk	12,5	40,0	50,0	160,0	500,0	750,0

	nmol/L						
	Gjennomsnitt nmol/L	11,5	38,8	49,0	148,9	474,3	734,8
	CV %	8	6	8	5	3	4
	Bias %	-8	-3	-2	-7	-5	-2
Temazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt nmol/L	21,6	192,8	520,8	2489,8	4922,1	7481,2
	CV %	7	5	7	4	2	3
	Bias %	-3	-4	4	0	-2	0
Nordiazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt	127,3	202,6	565,6	2640,9	5133,5	7629,2
	CV %	7	5	6	4	2	2
	Bias %	2	1	13	6	3	2
Diazepam	Teoretisk nmol/L	125,0	200,0	500,0	2500,0	5000,0	7500,0
	Gjennomsnitt	121,1	191,9	535,0	2537,1	4964,8	7357,1
	CV %	9	6	6	5	2	3
	Bias %	-3	-4	7	1	-1	-2

Flunitrazepam ligger utenfor ønskelig bias og CV krav. Komponentene viser samme tendens i repeterbarhetsforsøket som i presisjonsforsøket.

Lorazepam XL kontroll har høy bias i både repetisjons- og presisjonsforsøket. Det kan se ut at den er laget med litt for lav konsentrasjon.

Riktighet

Riktigheten under metodevalideringen er vurdert i forhold til bias i presisjons og repeterbarhetsforsøket, samt ved deltagelse i LGCs TOX program.

Kravet for kvalitetskontroller, både for eksterne kvalitetskontroller og in-house produserte kontroller, er 1-3 s eller 2-2s. Det vil si at ett resultat utenfor 3 standard

avvik eller to resultater utenfor 2 standard avvik må føre til aksjon. Dette kan i ytterste grad være å stanse analysen.

I løpet av metodevalideringen har det blitt innsendt resultater på benzodiazepiner fire ganger. Tabell 20 viser resultatene for innsendingene til LGC. Z-score er et mål på hvor mange standard avvik resultatet er fra rett verdi, target verdi. Z- score på <1 betyr derfor at alle resultatene ligger mellom target verdi og 1 standard avvik. 0 spike betyr at det ikke var tilsatt noe benzodiazepin i prøven og at et negativt resultat er korrekt. Rapportene fra LGC viser derfor at resultatene fra denne metoden ligger innenfor gjeldende krav for eksterne kvalitetskontroller.

Tabell 20 – LGC resultater

Runde	Komponenter z-score							
	Diazepam	Nordiazepam	Temazepam	Oksazepam	Nitrazepam	Alprazolam	Klonazepam	Lorazepam
TX 257						0,34	-0,18	0-spike
TX 257						-0,37	0,05	-0,65
TX 259	0- spike	0-spike	0,64	0,51	0,9			
TX 259	0,43	1,1	0,29	0,35	-0,04			
TX261						-0,69	-0,11	-0,23
TX261						0-spike	-0,16	-0,82
TX 263	0,79	0,8	0,06	0,42	0,22			
TX 263	0,42	0,62	-0,12	0,5	-0,59			

10.3 LOD og LOQ

Limit of detection, LOD, ble bestemt ved å fortynne LOQ standarden 1:2 og 1:5. Kravet for LOD er at signal/støy skal være over 3 på begge MRM overganger. Det er sannsynligvis mulig for flere av komponentene å fortynne ytterligere, med dette er ikke hensiktsmessig for metoden og dens bruk.

LOQ, Limit of quantification, ble bestemt ved å fortynne standard 1, 1:2. Kravet er at CV og bias skal være mindre enn 20 %. Også her er det sannsynlig at LOQ kunne ha vært lavere for flere av komponentene, men det ble ikke prioritert å undersøke dette da det har lite klinisk nytteverdi.

De fleste komponentene oppnådde en LOD på 1:5 av LOQ.

LOQ ble fastsatt til halve verdien av standard 1. Flunitrazepam har en CV på 27 %, noe som er utenfor kravet. Nå har denne komponenten høy CV i flere konsentrasjonsområder, så heving av LOQ vil ikke forbedre variasjonen.

Resultatene er presentert i tabell 21.

Tabell 21 – LOD og LOQ

Komponent	LOD nmol/L	LOQ nmol/L
Zopiklon	1,0	5,0
Zolpidem	1,0	5,0
Klonazepam	1,0	5,0
Nitrazepam	5,0	25,0
Flunitrazepam	1,25	2,5
Lorazepam	5,0	25,0
Oksazepam	10,0	50,0
Alprazolam	1,0	5,0
Temazepam	10,0	50,0
Nordiazepam	10,0	50,0
Diazepam	10,0	50,0

10.4 Matrikseffekter

Matrikseffekten ble beregnet ved å sammenligne responsene på kromatogrammene fra de seks matrikspøvene med fire prøver uten tilsatt matriks. Deretter ble ratioene for responsene mellom komponent og internstandard i de to settene sammenlignet. På denne måten beregnes internstandardens evne til å korrigere for matrikseffektene i serumprøvene. Det er ønskelig at matrikseffektene ikke påvirker arealene mer enn 20 %. Av forsøket ses det påvirkning fra matriks, men tilsatt internstandard korrigerer godt for dette. Alle nivåer ligger opp mot 100 % med internstandard, bortsett fra flunitrazepam, se tabell 22.

Tabell 22 - Matrikseffekter

Komponent	Lav kontroll u/ ISTD %	Lav kontroll m/ ISTD %	Medium kontroll u/ ISTD %	Medium kontroll m/ ISTD %	Høy kontroll u/ ISTD %	Høy kontroll m/ ISTD %
Zopiklon	96,0	99,8	91,2	100,6	95,4	99,5
Zolpidem	73,2	102,7	75,7	104,6	76,4	99,5
Klonazepam	76,5	101,3	72,6	101,4	78,1	100,7
Nitrazepam	76,1	100,6	76,5	108,8	77,9	100,8
Flunitrazepam	52,2	75,3	60,8	86,7	52,5	68,6
Lorazepam	100,7	97,2	99,1	100,5	103,0	101,1
Oksazepam	107,9	109,0	104,4	108,1	103,7	100,9
Alprazolam	87,7	103,5	87,2	104,3	85,9	98,4
Temazepam	90,4	104,0	101,3	105,4	91,2	100,0
Nordiazepam	101,1	102,8	105,4	106,8	99,1	100,0
Diazepam	69,7	105,1	91,5	106,4	75,7	100,6

10.5 Utbytte

Utbyttet ble beregnet ved å sammenligne arealene fra de to prøvesettene uten internstandard, deretter ble det tatt hensyn til internstandard i beregningene. Et utbytte på over 80 % regnes som tilfredsstillende.

Forsøket viser at for de fleste stoffene er utbyttet fra ekstraksjonen forholdsvis høyt, selv uten å ta hensyn til internstandard, se tabell 23. Alle komponentene hadde et utbytte på over 80 % når det ble tatt hensyn til internstandardkorreksjon.

Tabell 23 - Utbytte

Komponent	Lav kontroll u/ ISTD	Lav kontroll m/ ISTD	Medium kontroll u/ ISTD	Medium kontroll m/ ISTD	Høy kontroll u/ ISTD	Høy kontroll m/ ISTD
Zopiklon	83,1	81,8	77,4	80,3	82,5	81,1
Zolpidem	94,7	94,8	94,3	98,1	95,9	96,6
Klonazepam	104,2	103,3	95,1	103,3	97,5	99,3
Nitrazepam	102,0	99,7	93,2	101,0	98,6	100,3
Flunitrazepam	104,9	104,1	92,6	100,6	100,1	102,0
Lorazepam	100,3	99,3	92,6	101,0	100,1	93,3
Oksazepam	102,6	100,1	94,9	101,7	100,1	98,4
Alprazolam	99,5	100,3	93,6	102,2	100,1	99,4
Temazepam	103,4	98,8	92,2	99,2	99,3	98,9
Nordiazepam	102,4	99,8	91,1	99,7	109,0	102,0
Diazepam	105,4	98,1	93,0	99,5	103,5	95,7

10.6 Carry-over

Det ble benyttet en prøve med konsentrasjon 2x høyeste standard og en blank – prøve til dette forsøket. De fleste komponentene viste ingen kromatografisk topp i 0 prøven etter den høykonsentrerte prøven. Dvs. ingen carry-over. For komponentene zopiklon og zolpidem, ble det observert en liten topp i 0 prøven. For å avgjøre om dette er en signifikant carry-over, ble arealene av den høye konsentrasjonen sammenlignet med arealet i 0 prøven og deretter med den laveste standarden, se tabell 24. For zopiklon er overdraget på 13 % i forhold til laveste standard. Dette må derfor alltid være med i vurderingen når prøveresultater skal valideres. Ved svært høye konsentrasjoner vil det være aktuelt å reanalysere påfølgende prøver.

Når en analyse er i drift, vil overdrag alltid bli vurdert da det kan oppstå ulike problemstillinger med instrumentet som fører til at en komponent følger med fra en prøve med høyere konsentrasjon til neste prøve.

Tabell 24 - Carry over

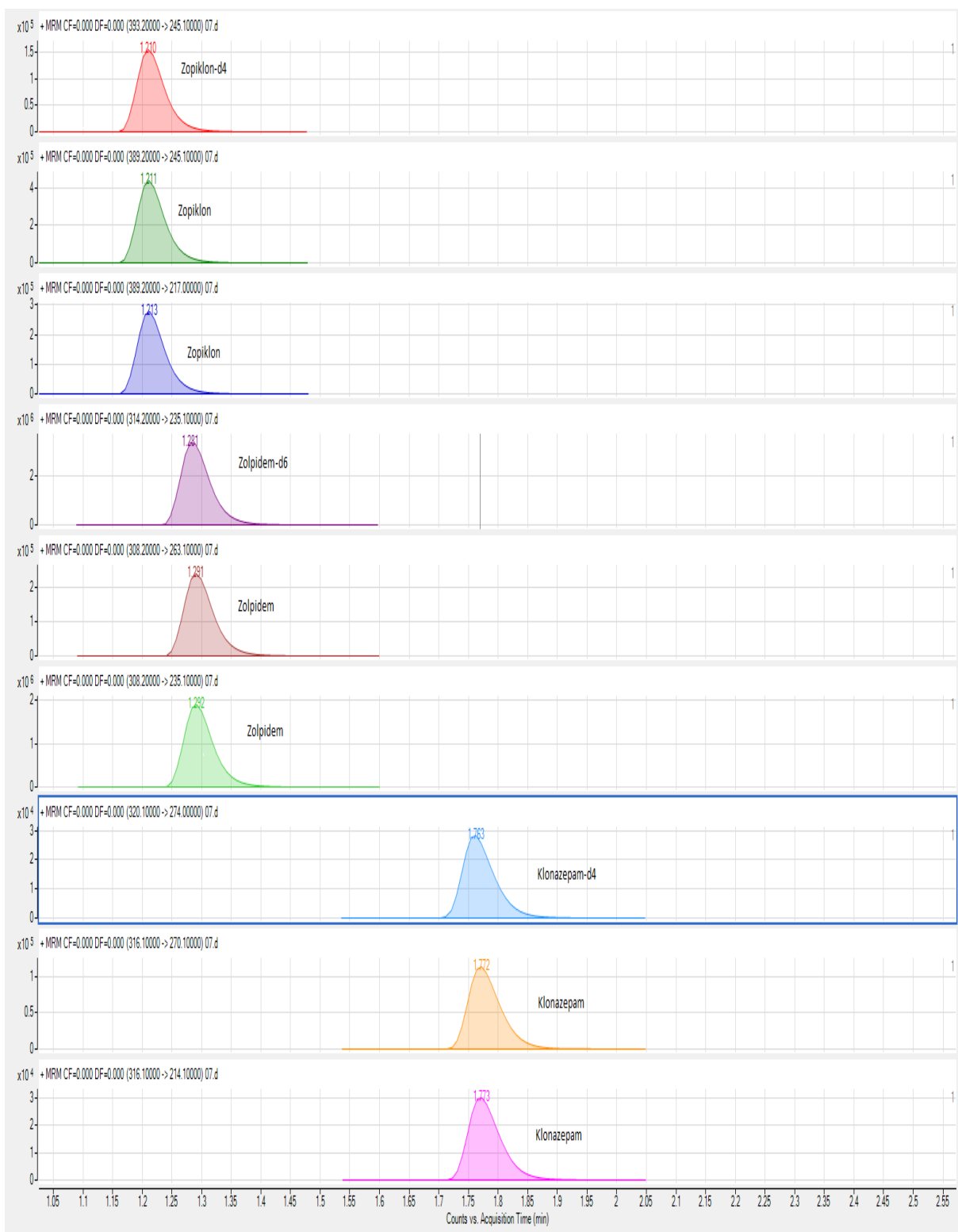
Komponent	Standard 1 Areal	Høykonsentrert prøve Areal	0 prøve etter høykonsentrert prøve Areal	Carry over %	Overdrag i forhold til standard 1 %
Zopiklon	7507	4085651	987	0	13
Zolpidem	53229	16264183	1978	0,01	4

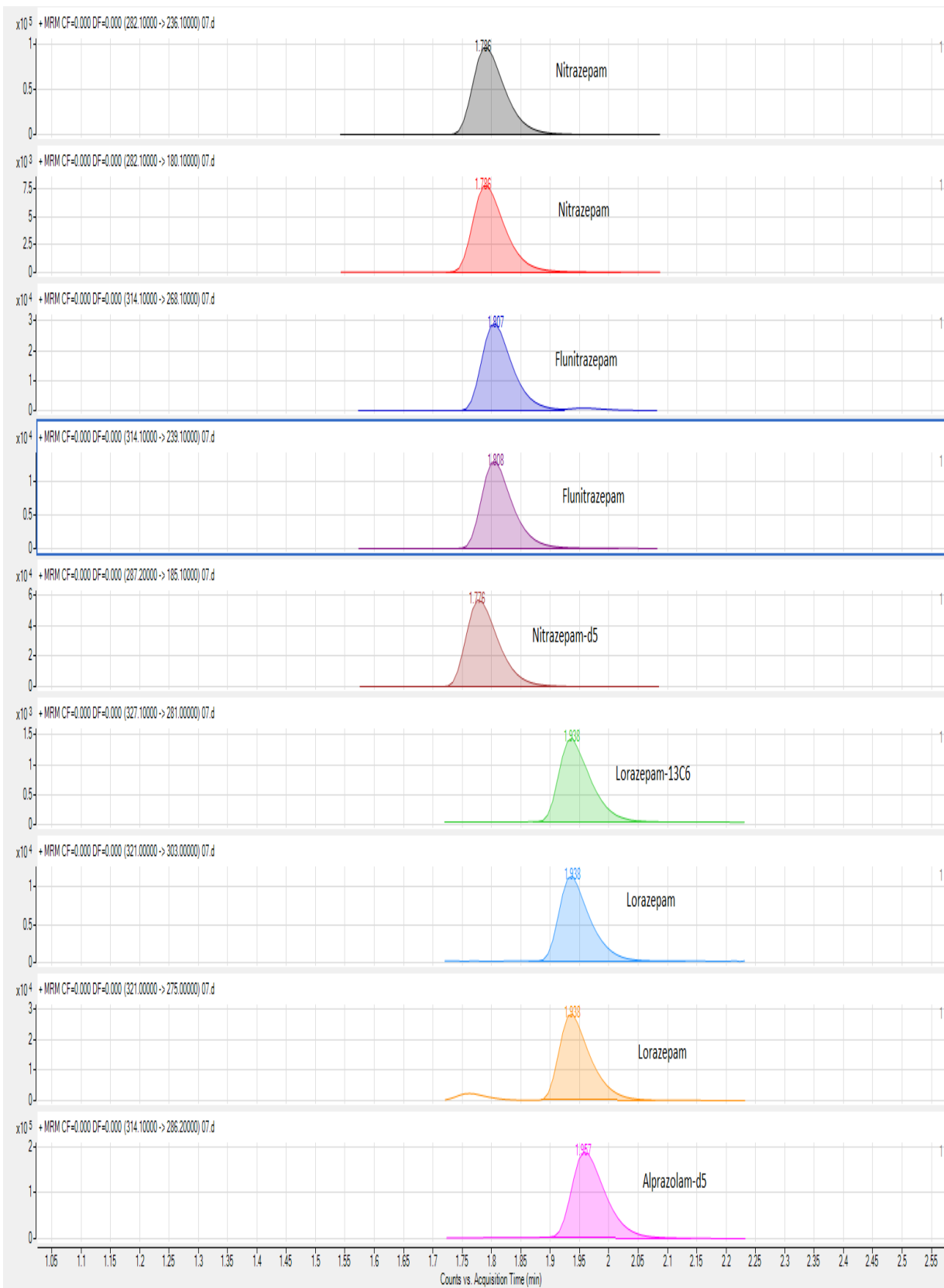
10.7 Identifikasjon

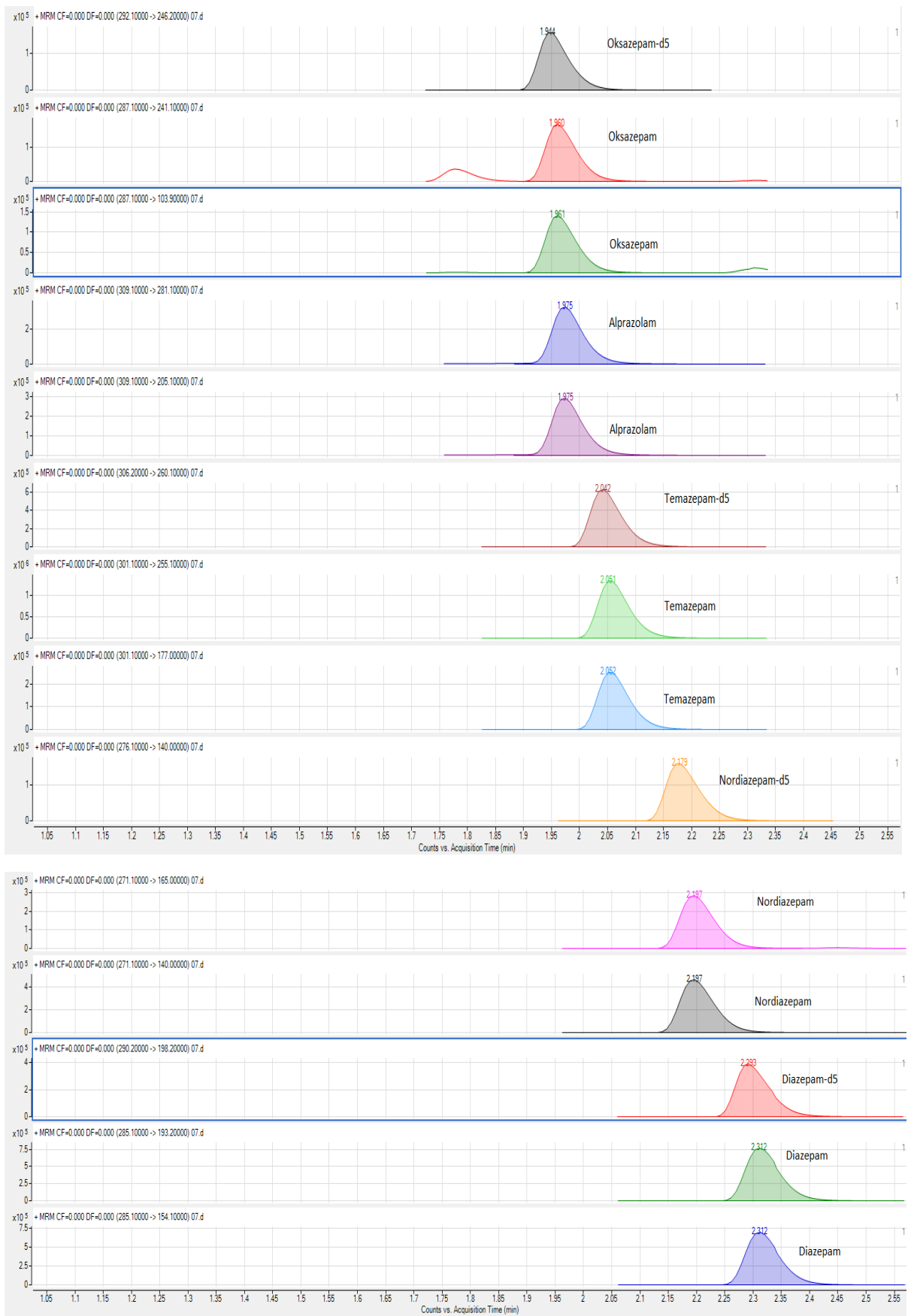
Kriteriet for at komponent skal identifiseres er at retensjonstiden skal være den samme som for referansestandard og at begge MRM overganger skal være tilstede og i samme forhold som for referansestandard. Internstandard vil oppføre seg tilnærmet likt som den respektive standard. Den eluerer noe tidligere enn standarden og det er tatt med kun en MRM overgang for denne.

Flere av komponentene eluerer tett på hverandre. Dette er ikke problematisk da alle komponentene har unike MRM overganger. De vil dermed ikke kunne forveksles.

Figur 12 viser MRM overganger, retensjonstider og respons for alle komponenter og deres internstandarder i metoden.







Figur 12- Kromatogram for komponentene i benzodiazepinmetoden

10.8 Robusthet

Robustheten er testet ved å gjøre endringer i buffertilsetningen. Det er tilsatt 25 % mer og mindre ammoniumformat og maursyre i forhold til metodens oppskrift på buffer. Undersøkelsen viser at små endringer i buffersammensetningen ikke påvirker retensjonstidene nevneverdig, se tabell 25. Når det gjelder respons, så vil endringene påvirke likt for både standarder, internstandarder og prøver, se tabell 26. Endring i respons vil derfor ikke påvirke robustheten dersom den ikke blir så lav at det blir en utfordring med deteksjon. Eller så høy at den fører til krummede standardkurver. Forsøket viser at det er endringer i respons, men at de ikke påvirker deteksjonen.

Tabell 25 – Robusthetsforsøk, retensjonstid

Komponente r	RT	Endring i retensjonstid i forhold til metodens buffer			
	AF 5 mM, FA 1mL	AF 3.75 mM FA 1ML	AF 6.25 mM FA 1mL	AF 5 mM FA 0.75mL	AF 5 mM FA 1.25MmL
Zopiklon	1,237	101 %	99 %	100 %	100 %
Zolpidem	1,316	101 %	99 %	101 %	100 %
Klonazepam	1,806	100 %	100 %	100 %	100 %
Nitrazepam	1,828	100 %	100 %	100 %	100 %
Fluitrazepam	1,840	100 %	100 %	100 %	100 %
Lorazepam	1,972	100 %	100 %	100 %	100 %
Oksazepam	1,994	100 %	100 %	100 %	100 %
Alprazolam	2,008	100 %	100 %	100 %	100 %
Temazepam	2,092	100 %	100 %	100 %	100 %
Nordiazepam	2,230	100 %	100 %	100 %	100 %
Diazepam	2,350	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabell 26 – Robusthetsforsøk, respons

Komponenter	Respons	Endring i respons i forhold til metodens buffer			
	AF 5 mM FA 1 mL	AF 3.75 mM FA 1 mL	AF 6.25 mM FA 1mL	AF 5 mM FA 0.75 mL	AF 5 mM FA 1.25 mL
Zopiklon	568905	86 %	91 %	80 %	79 %
Zolpidem	1349052	98 %	102 %	93 %	90 %
Klonazepam	90433	81 %	90 %	72 %	72 %
Nitrazepam	6232	76 %	89 %	67 %	74 %
Fluitrazepam	34563	87 %	97 %	79 %	76 %
Lorazepam	11079	76 %	75 %	67 %	66 %
Oksazepam	180183	73 %	73 %	66 %	63 %
Alprazolam	180556	105 %	104 %	97 %	88 %
Temazepam	1406814	85 %	78 %	75 %	70 %
Nordiazepam	413053	90 %	99 %	79 %	83 %
Diazepam	696162	95 %	99 %	90 %	88 %

10.9 Måleusikkerhet

Vurdering av måleusikkerheten viser at både tillaging av standarder og prøveopparbeidelse gir et stort usikkerhetsbidrag. En feil i konsentrasjonen til standarden vil føre til at laboratoriet utgir feil resultat på prøvekonsentrasjonene. Det samme vil kunne skje dersom det gjøres feil i prøveopparbeidelsen. Her er det i tillegg risiko ved forbyting av pasientprøver.

Dersom det tilsettes for lite/mye internstandard i enkelt prøver vil prøvekonsentrasjonen korrigeres på samme måte som den korrigeres ved matrikseffekter. Dette bidraget er likevel noe mindre da denne feilkilden kan avdekkes når prøveresultatene gjennomgås.

Feil i kromatografi og deteksjon gir et mindre bidrag til usikkerhet. Erfaring med disse analysene vil i stor grad avdekke feil og korrigere disse før analyse eller svarutgivelse.

Bidragene til måleusikkerhet er presentert i tabell 27.

Tabell 27 – Måleusikkerhet

	Prosess	Usikkerhetsbidrag
Standarder	Tillaging	Stort
Prøveopparbeidelse	Manuell pipettering	Stort
	Tilsetting av internstandard	Middels
HPLC	Kromatografisk separasjon	Lite
MS	Variierende respons	Lite

10.10 Holdbarhet

Det ble gjort et holdbarhetsforsøk på ferdige opparbeidede prøver. Dette er særlig aktuelt ved etterbestillinger av analyser eller ved driftsproblemer. De ferdig opparbeidede prøvene ble analysert dag 1 og deretter ble de stående i autosamplere i syv dager for så å bli analysert på nytt. Resultatene fra den syvende dagen viste kun små avvik fra dag 1. De fleste resultatene hadde et avvik på mindre enn 5 %. Alle komponentene, bortsett fra flunitrazepam, lå innenfor et 10 % avvik. Flunitrazepam avvok på det meste 16 %. Flunitrazepam har vist seg å være den mest ustabile komponenten i metoden og avviket kan derfor også skyldes spredning i analyseresultatet. Holdbarhetsforsøket viser at prøvene er holdbare i en uke i autosamplere.

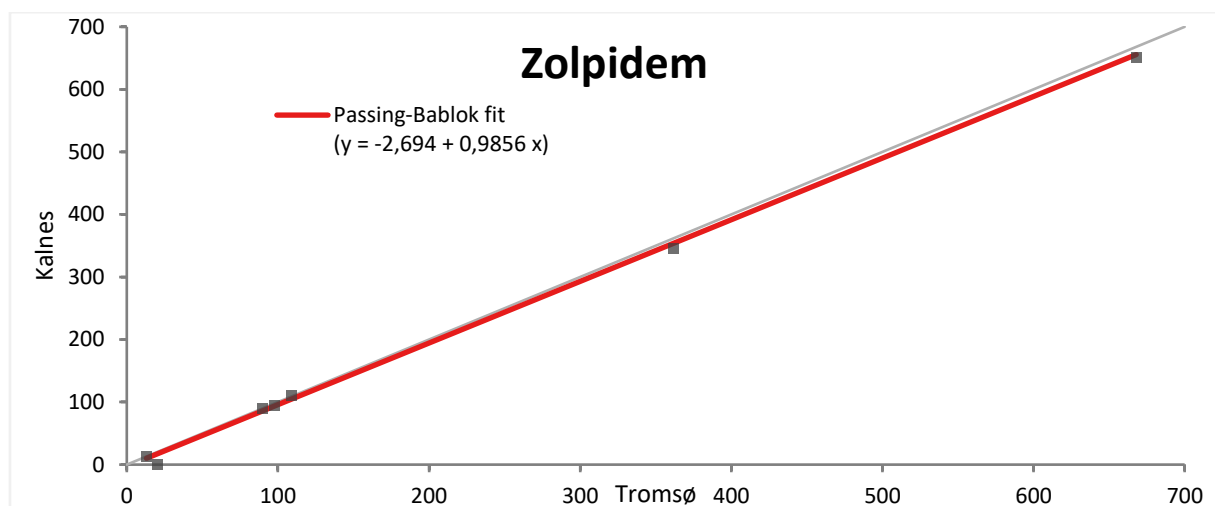
10.11 Sammenligning

Det er gjort en metodesammenligning med Universitetssykehuset i Nord-Norge. 27 prøver med varierende komponenter og konsentrasjoner ble analysert ved begge sykehuslaboratorier. Oppbevaring av prøver, transport og analysetidspunkt ble samkjørt mellom de to laboratoriene for å redusere faktorer som kunne påvirke resultatene. Metodesammenligningen viser god korrelasjon mellom de to metodene selv om noen komponenter har en intercept som avviker fra 0 og en slope som avviker noe fra 1,0. Lorazepam, nordiazepam og diazepam har en slope på 13 %. Dette vil føre til større konsentrasjonsavvik i høyere konsentrasjoner. Siden anbefalt nivå er i

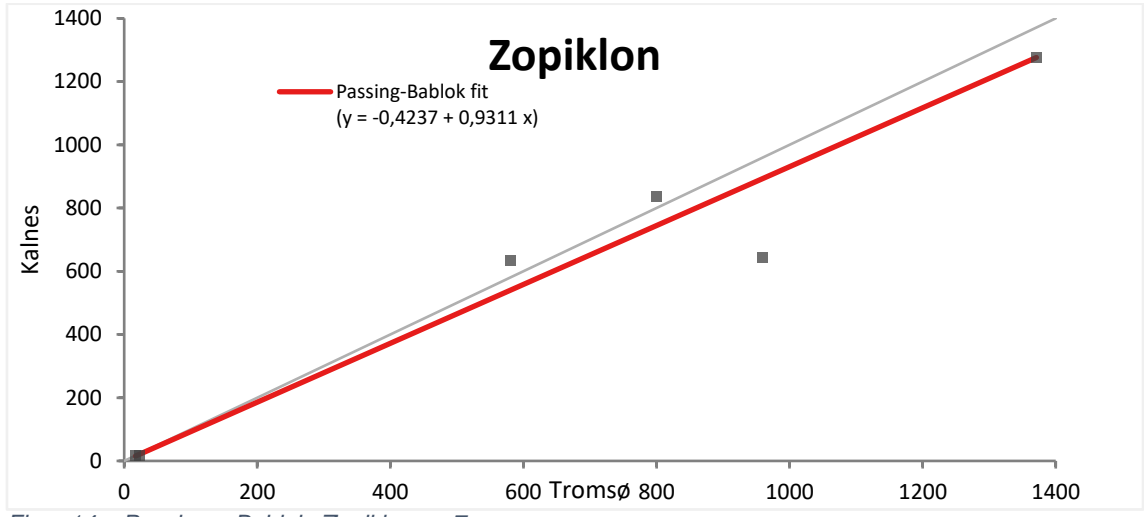
lavere konsentrasjonsområder vil dette ikke ha så stor klinisk betydning da man uansett ønsker at pasienten skal innta mindre legemiddel.

En prøve viser en lav konsentrasjon på zolpidem med referansemetoden fra Universitetssykehuset i Tromsø. Analyse på Kalnes viser ingen kromatografisk topp for denne komponenten. Se figur 12. Prøven før på serien har en høy konsentrasjon. Her kan det mistenkes overdrag i referansemetoden. Bakgrunnen for denne mistanken er at referanselaboratoriet påviste lave konsentrasjoner av noen benzodiazepiner i prøver man med sikkerhet visste at disse ikke var tilstede. Disse prøvene var spiket – tilsatt komponent i blank-serum. Spiking av prøver ble gjort på laboratoriet på Sykehuset Østfold. Komponentene Tromsø påviste, var ikke tilsatt.

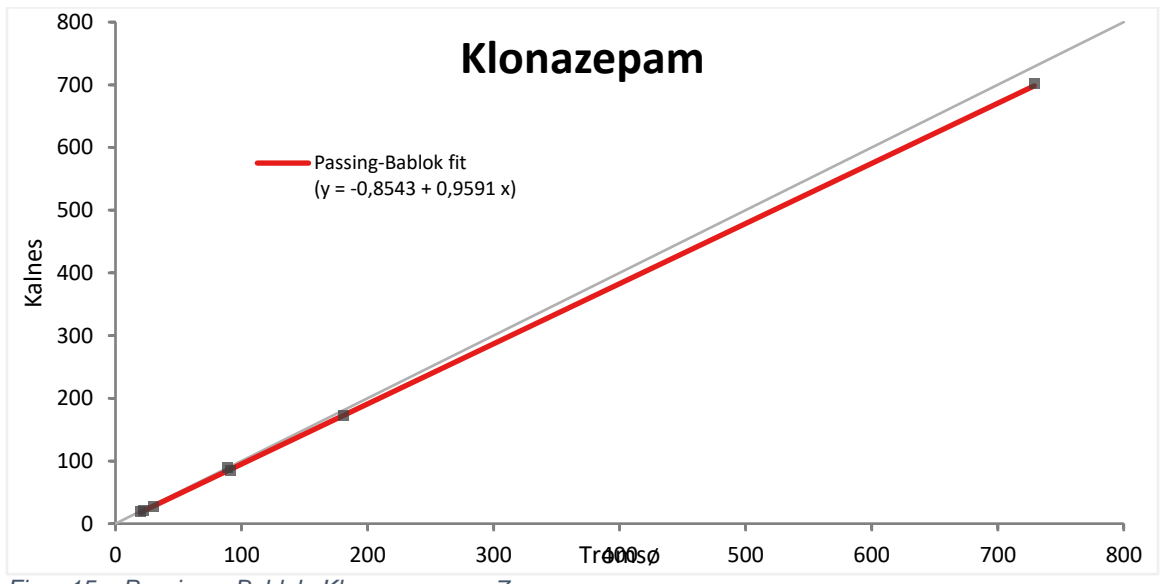
Figurene 13- 23 viser sammenligningen mellom de to laboratoriene. Det er gjort en Passing – Bablok regresjon med analyseverktøyet Analyze – it. Resultatene fra referanselaboratoriet, Universitetssykehuset i Tromsø er på x-aksen. Resultatene fra den nye benzodiazepinmetoden på Sykehuset Østfold er langs y-aksen.



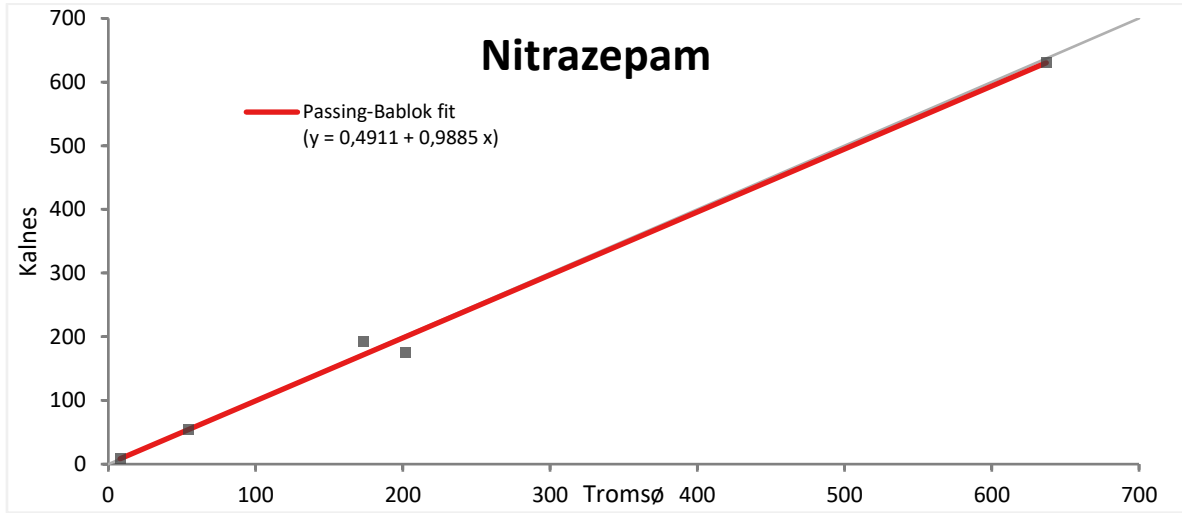
Figur 13 – Passing – Bablok, Zolpidem, n=7



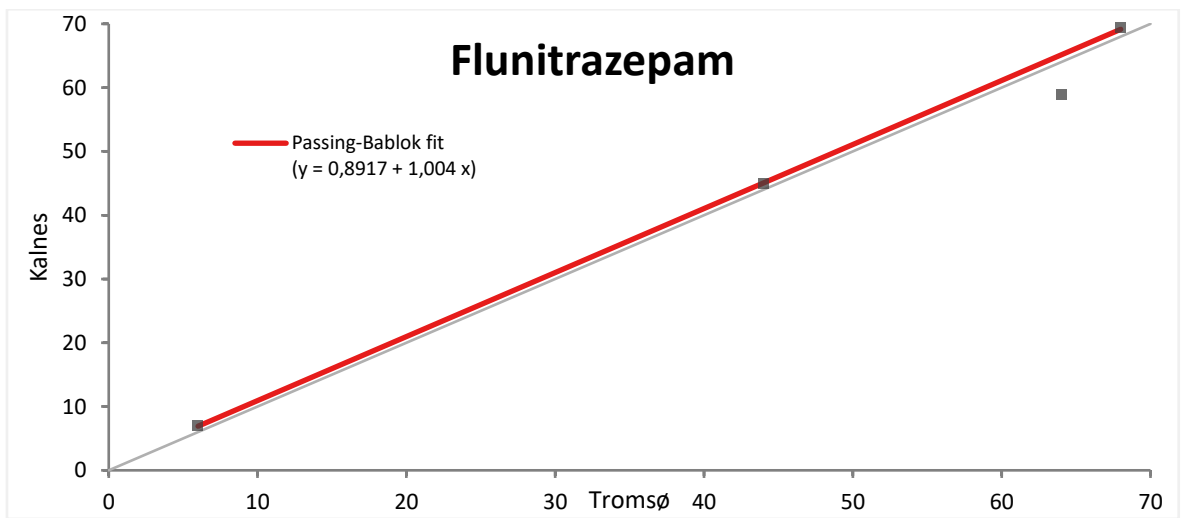
Figur 14 – Passing – Bablok, Zopiklon, n=7



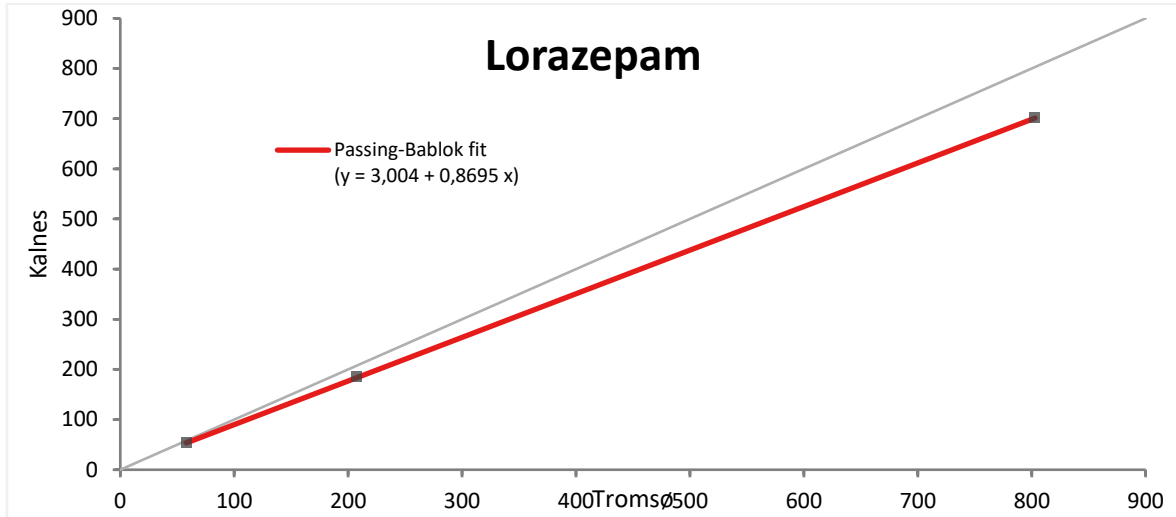
Figur 15 – Passing – Bablok, Klonazepam, n=7



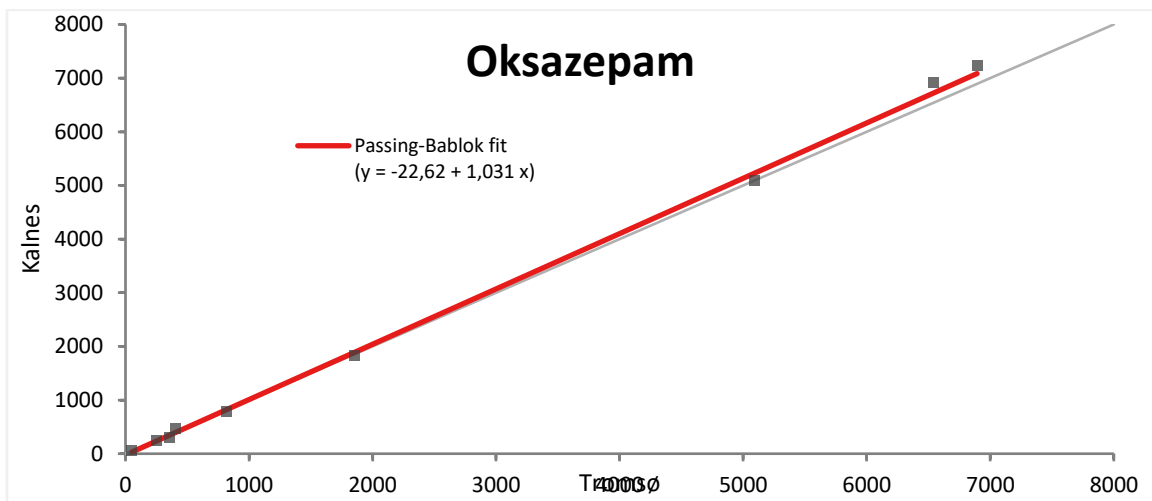
Figur 16 – Passing – Bablok, Nitrazepam, n=5



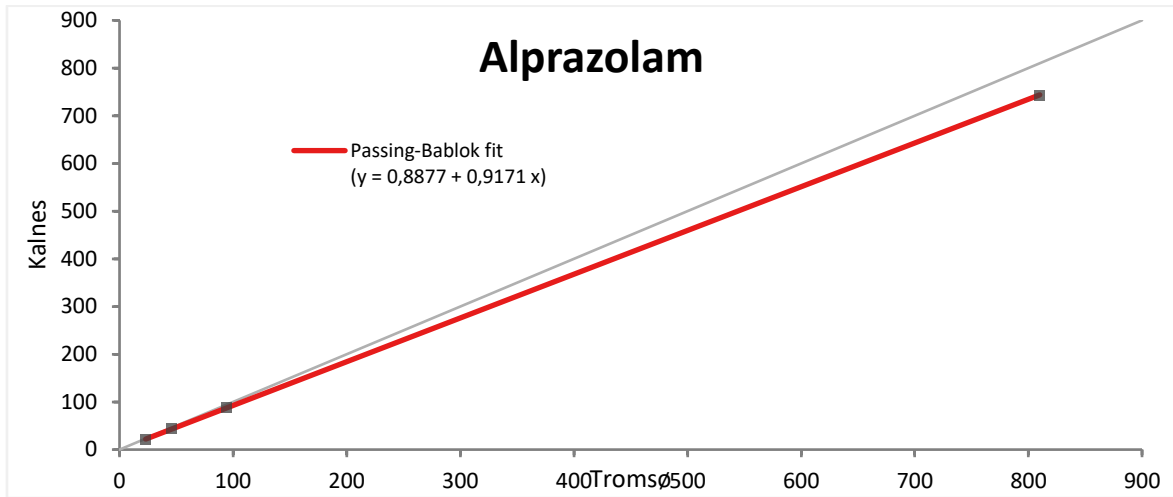
Figur 17 – Passing – Bablok, Flunitrazepam, n=4



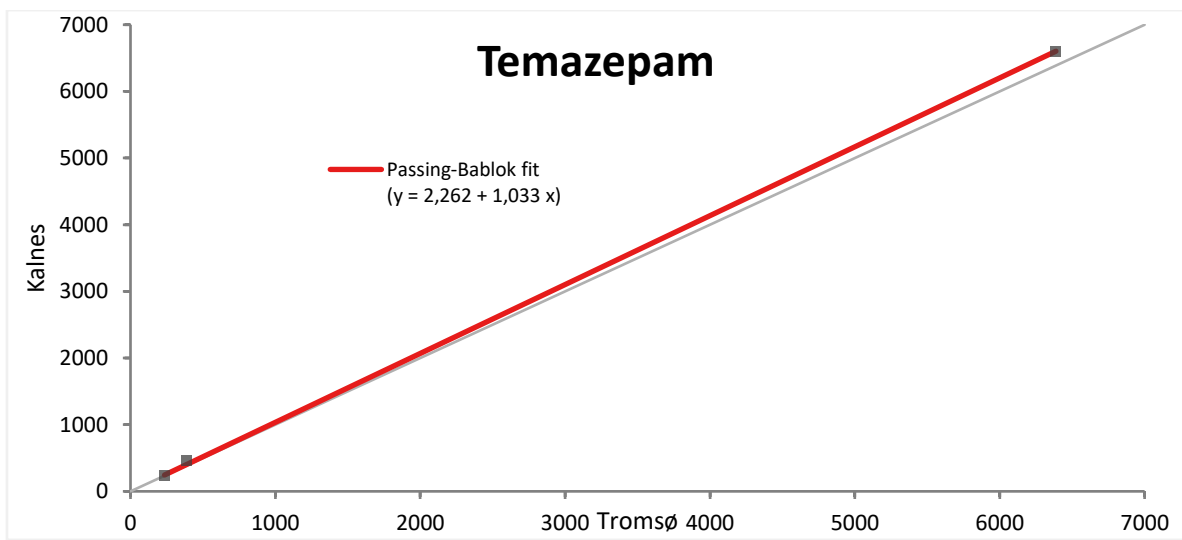
Figur 18 – Passing – Bablok, Lorazepam, n=3



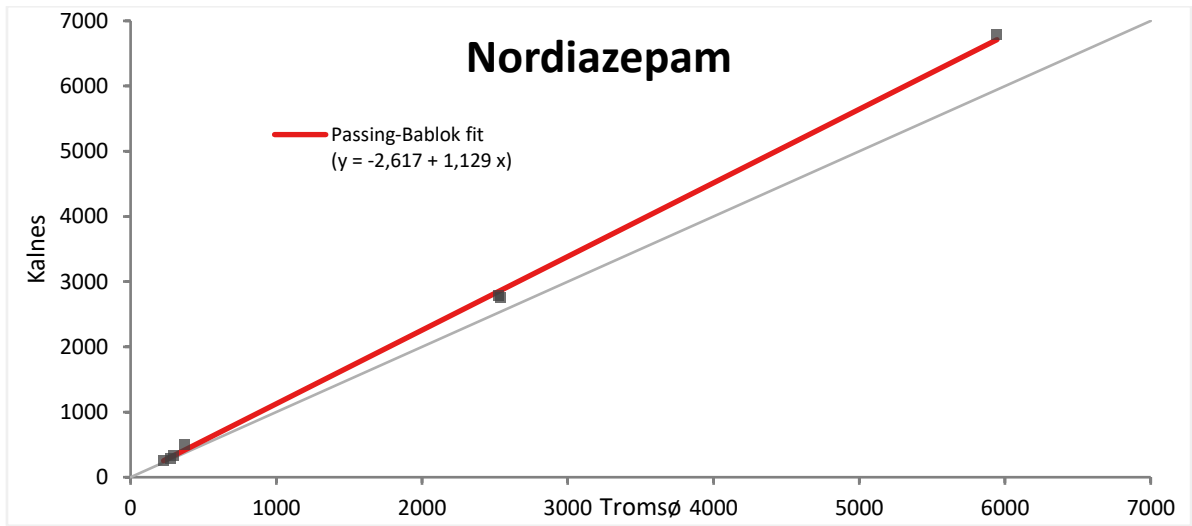
Figur 19 – Passing – Bablok, Oksazepam, n=9



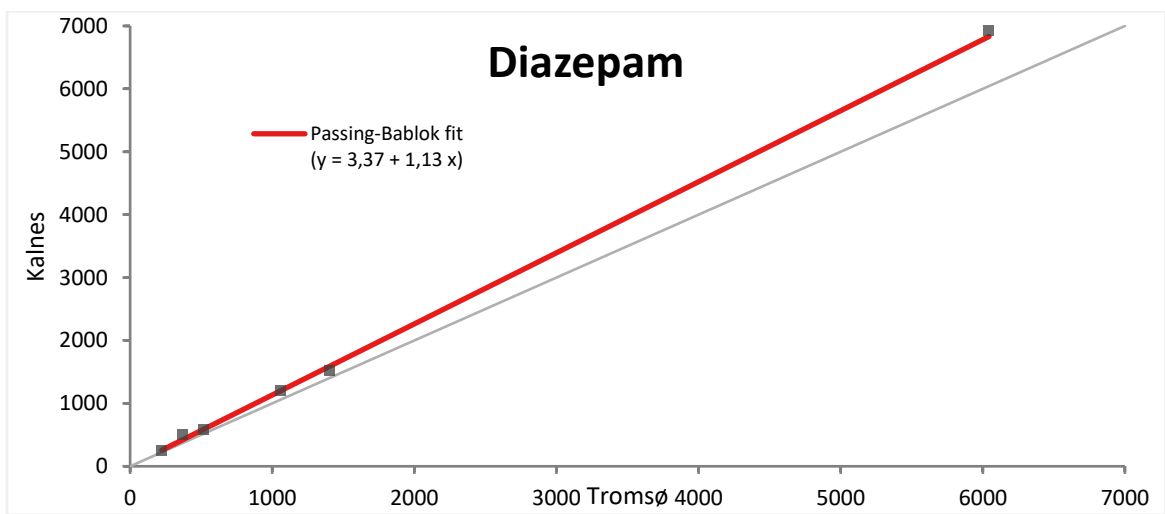
Figur 20 – Passing – Bablok, Alprazolam, n=4



Figur 21 – Passing – Bablok, Temazepam, n=3



Figur 22 – Passing – Bablok, Nordiazepam, n=7



Figur 23 – Passing – Bablok, Diazepam, n=6

11 Konklusjon

Metoden som er utviklet indentifiserer og kvantifiserer 7 benzodiazepiner, 2 metabolitter samt 2 z-hypnotika. Metoden er validert etter laboratoriets prosedyre for metodevalidering for kromatografiske analyser. Metoden gir tilfredsstillende resultater i forhold til de kravene som er satt og kan derfor settes i rutinedrift.

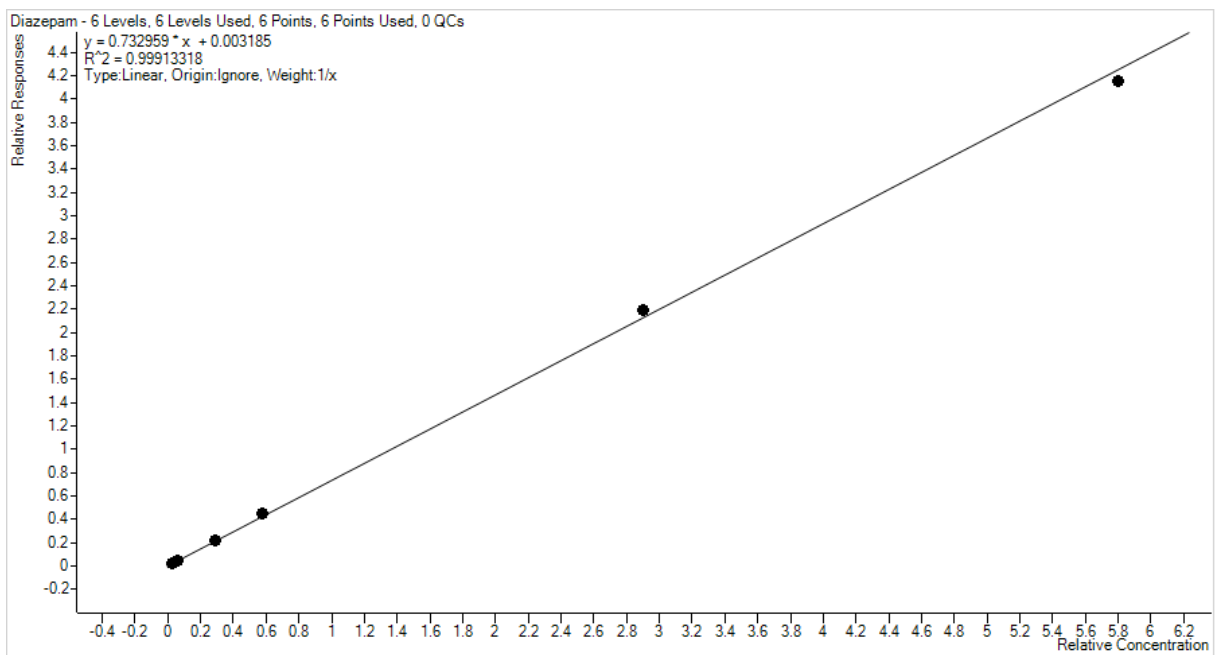
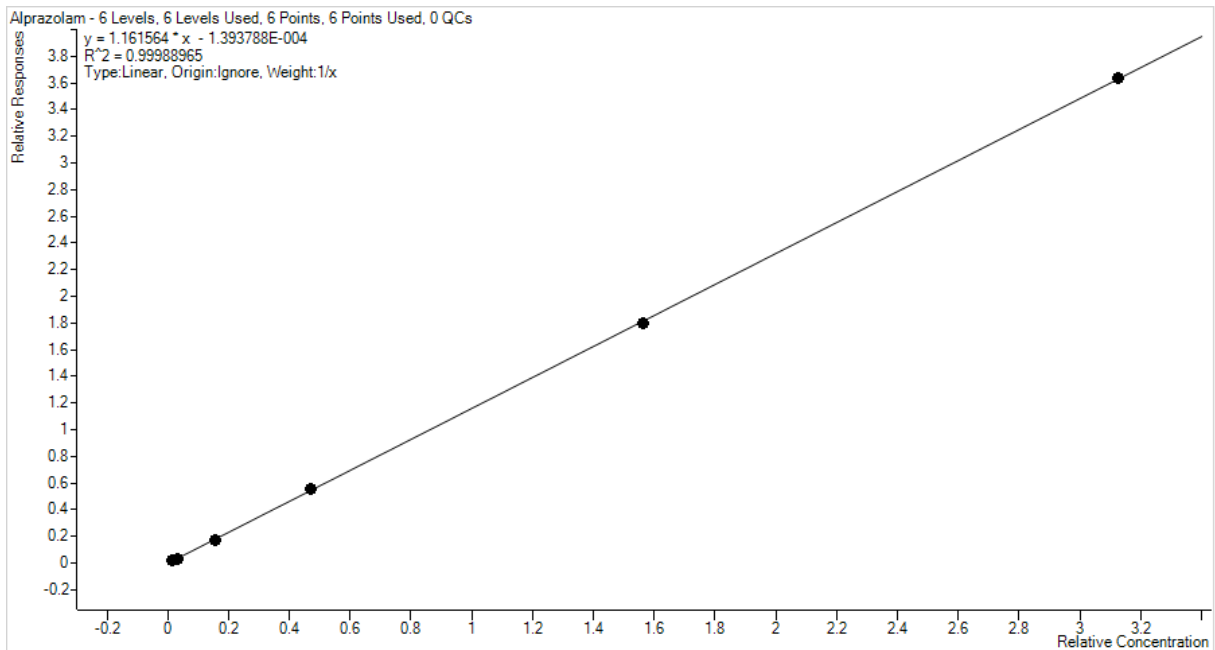
12 Referanser

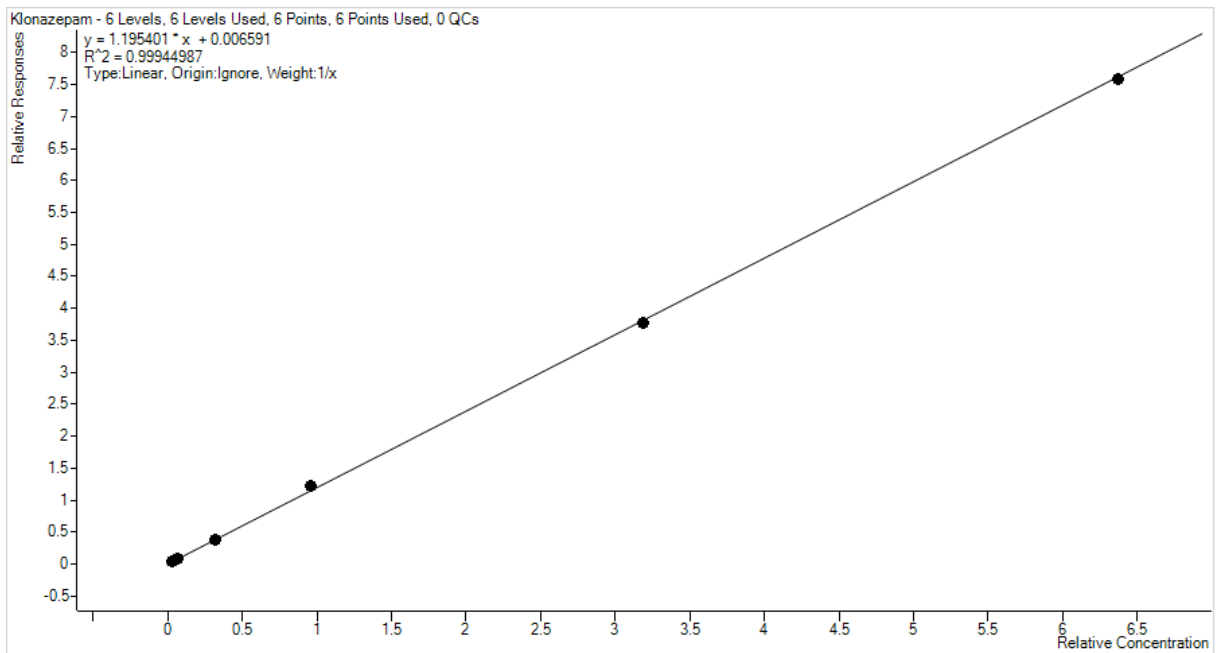
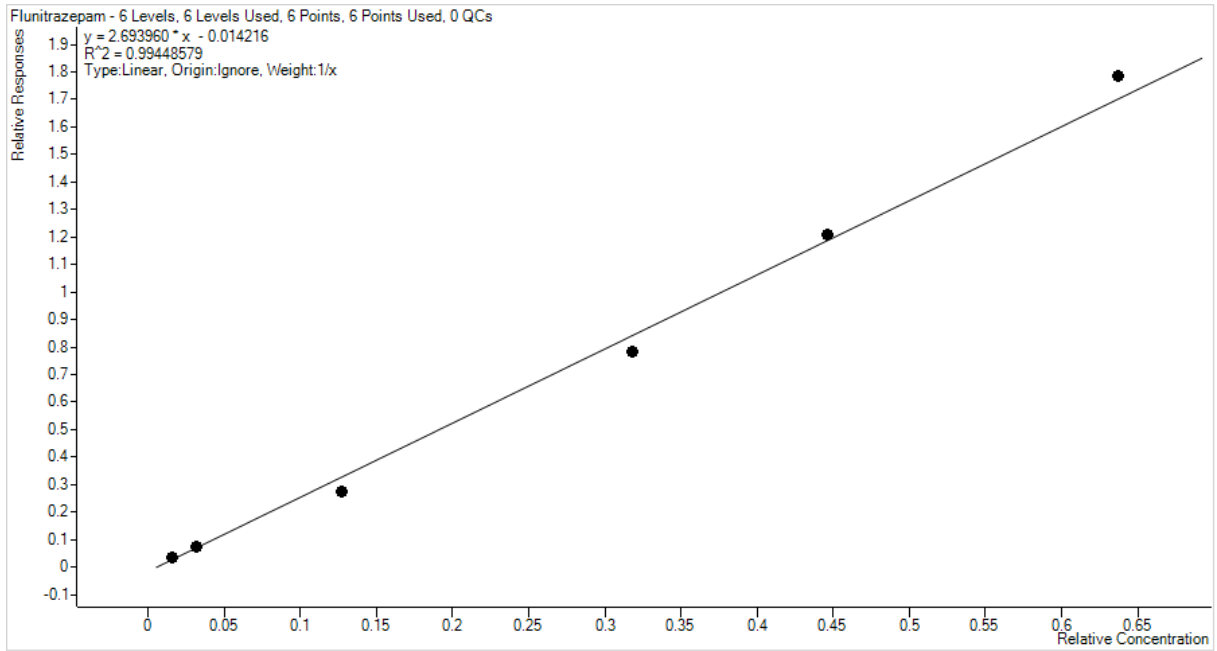
1. Lader M. Benzodiazepines revisited—will we ever learn? *Addiction*. 2011;106(12):2086-109.
2. Kjosavik SR, Ruths S, Hunskaar S. Use of addictive anxiolytics and hypnotics in a national cohort of incident users in Norway. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(3):311-9.
3. BRAMNESS JG, LID TG. God forskrivning av benzodiazepiner i allmennpraksis. *UTPOSTEN*. 2017;5:9.
4. Handal M, Skurtveit S, Mørland JG. Samtidig bruk av ulike benzodiazepiner. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2012.
5. Soyka M. Treatment of benzodiazepine dependence. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(12):1147-57.
6. Waal H, Bramness JG. Benzodiazepiner til personer med rusmiddelproblemer? 610–2.
7. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International review of cytology*. 2002;213:1-47.
8. Howard P, Twycross R, Shuster J, Mihalyo M, Wilcock A. Benzodiazepines. *Journal of pain and symptom management*. 2014;47(5):955-64.
9. Helland A, Berg JA, Gustavsen I, Nordal K, Hilberg T, Aronsen L, et al. Serum concentration measurements of addictive drugs. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, ny Raekke*. 2016;136(5):400-2.
10. Mihic SJ, Harris RA. Hypnotics and sedatives. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th ed* New York, USA: McGraw-Hill. 2011:457-80.
11. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 2118, Alprazolam 2021 [cited 2021 10.20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alprazolam>.
12. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 4616, Oxazepam 2021 [cited 2021 10.20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxazepam>.
13. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 2997, Nordazepam 2021 [cited 2021 10.20.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nordazepam>.
14. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 5391, Temazepam 2021 [cited 2021 10.20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tamazepam>.
15. Information NCfB. PubChem Substance Record for SID 387083999, 1622-61-3 2021 [cited 2021 10.25.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/387083999>.
16. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 4506, Nitrazepam 2021 [cited 2021 10.25.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrazepam>.
17. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 3380, Flunitrazepam 2021 [cited 2021 10.25.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flunitrazepam>.
18. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 3016, Diazepam 2021 [cited 2021 10.20.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diazepam>.
19. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 3958, Lorazepam 2021 [cited 2021 10.25.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lorazepam>.
20. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 5735, Zopiclone 2021 [cited 2021 10.20.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zopiclone>.
21. Information NCfB. PubChem Compound Summary for CID 5732, Zolpidem. 2021 [cited 2021 10.20.]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zolpidem>.
22. Chouinard G, Lefko-Singh K, Teboul E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cellular and molecular neurobiology*. 1999;19(4):533-52.
23. Jung F, Richardson TH, Raucy JL, Johnson EF. Diazepam Metabolism by cDNA-Expressed Human 2C P450s: Identification of P4502C18 and P4502C19 as LowKM Diazepam N-Demethylases. *Drug Metabolism and Disposition*. 1997;25(2):133-9.

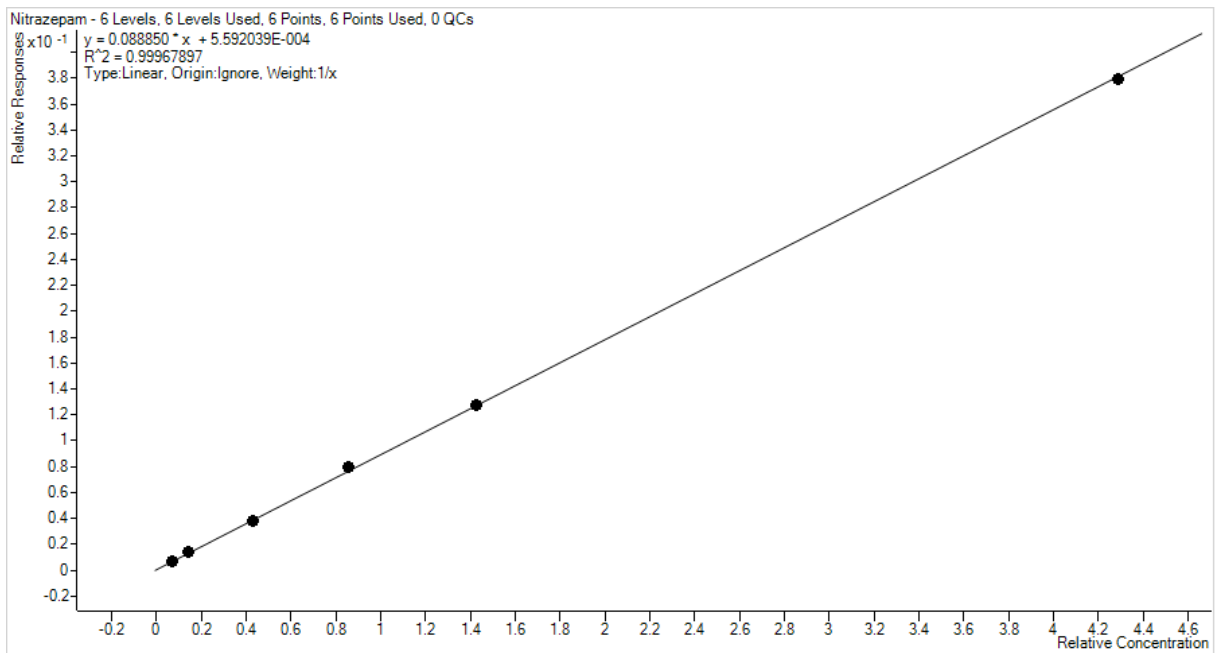
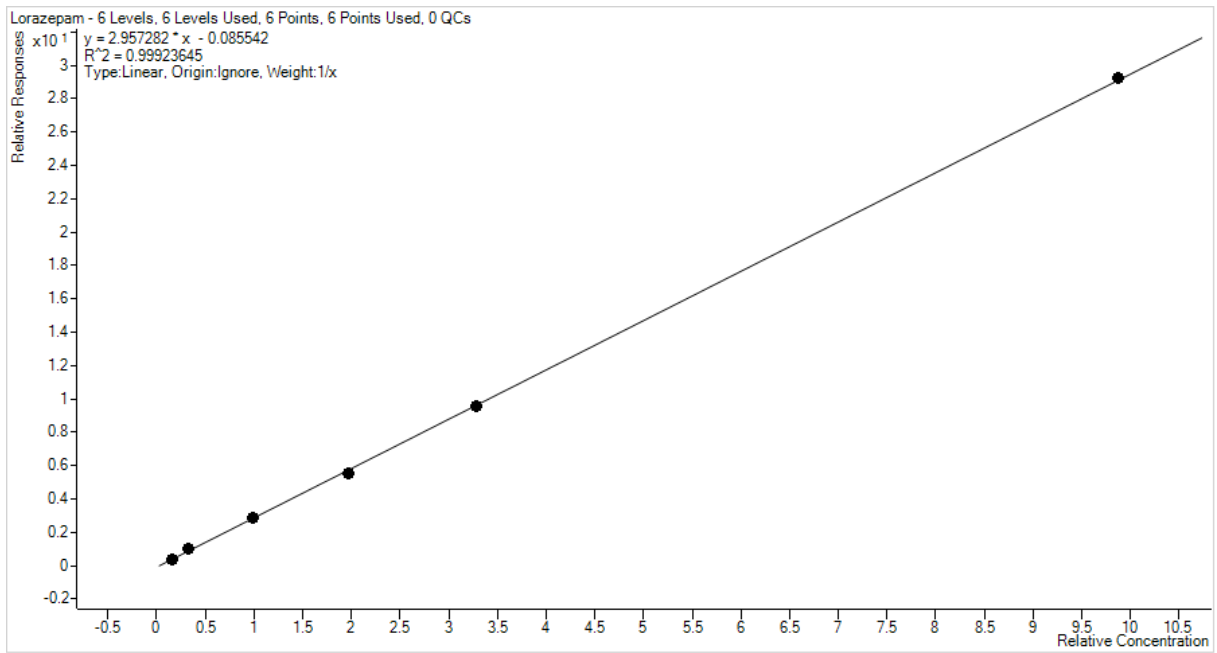
24. Hausken AM, Furu K, Skurtveit S, Engeland A, Bramness JG. Starting insomnia treatment: the use of benzodiazepines versus z-hypnotics. A prescription database study of predictors. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(3):295-301.
25. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B.* 2009;877(23):2198-207.
26. Greibrokk T, Karlsen J, Rasmussen KE, Lundanes E. *Kromatografi : separasjon og deteksjon.* Oslo: Pensumtjeneste; 2005.
27. Miller JM. *Chromatography: Concepts and Contrasts.* Second ed. New Jersey, Canada: Wiley; 2009.
28. Holler FJ, Skoog D, Crouch S. *Principles of Instrumental Analysis,* Brooks. 2007.
29. Bergés R, Sanz-Nebot V, Barbosa J. Modelling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase. *Journal of Chromatography A.* 2000;869(1-2):27-39.
30. De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications.* 2007. John Wiley.8.
31. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2003;785(2):263-75.
32. Skov K, Hadrup N, Smedsgaard J, Frandsen H. LC–MS analysis of the plasma metabolome—A novel sample preparation strategy. *Journal of Chromatography B.* 2015;978:83-8.
33. Wang W, Liu J, Han Y, Huang W, Wang Q. The most convenient and general approach for plasma sample clean-up: multifunction adsorption and supported liquid extraction. *Bioanalysis.* 2012;4(3):223-5.
34. Drummer OH. Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1998;713(1):201-25.
35. Part I: Polar Compound Retention: Waters corporation; 2016 [updated Tuesday, October 11 2016; cited 2021 11.02]. :[Available from: <https://www.waters.com/webassets/cms/promotion/docs/Polar-Retention-Reversed-Phase-LC-Webinar-%20Pres-Kevin-Jenkins-Oct2016.pdf>

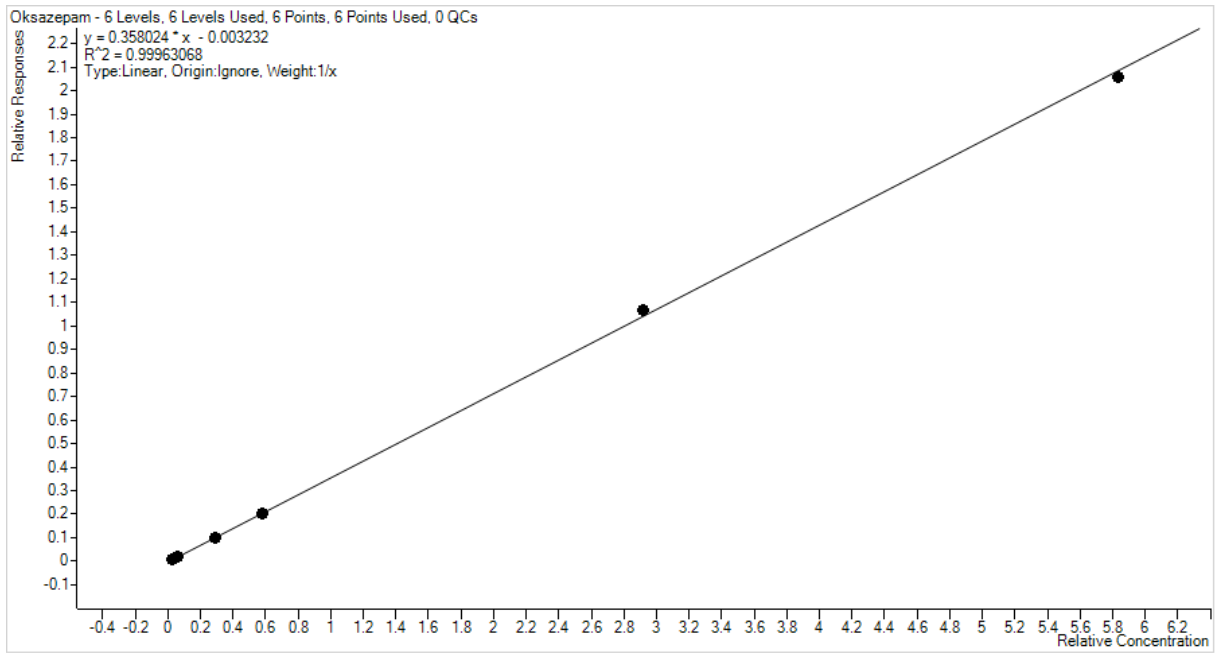
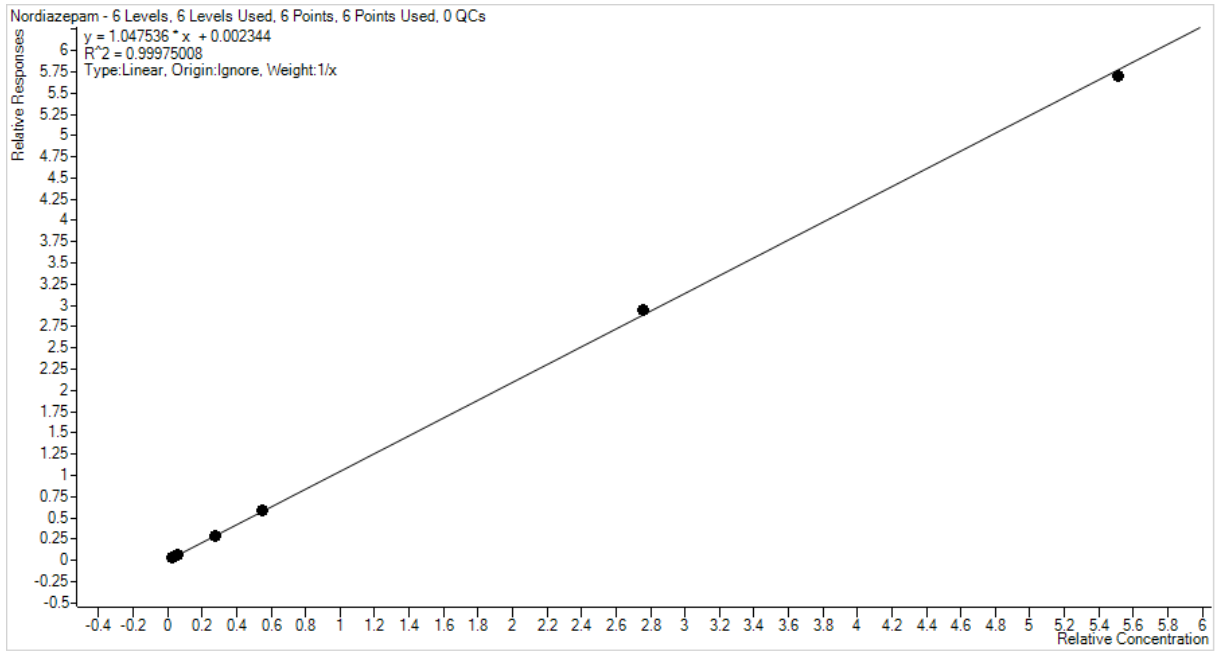
Vedlegg

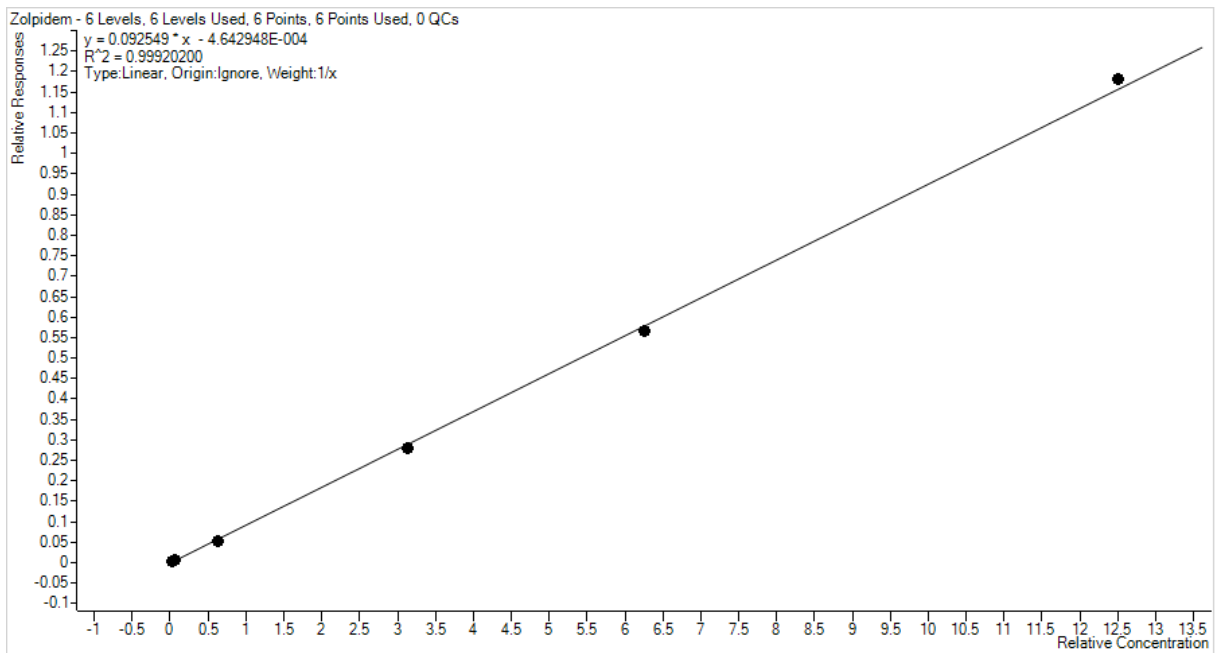
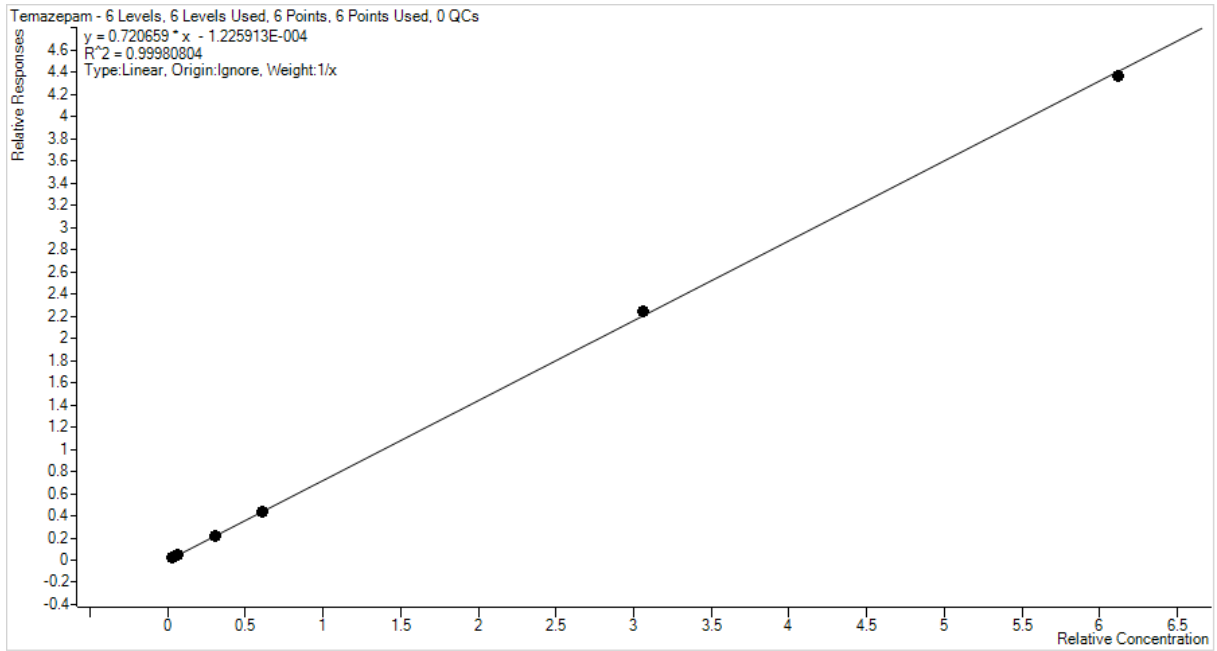
Kalibreringskurver for alle analyttene i metoden

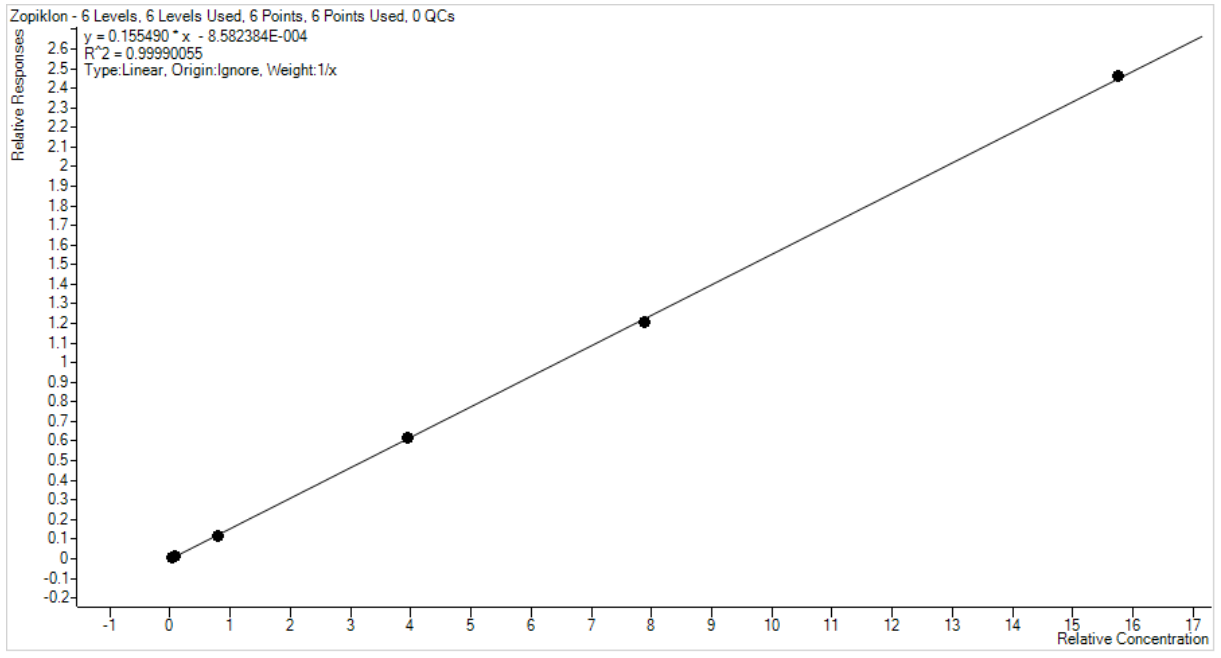














Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway