

Metodbeskrivning

**DROG 2:
U-Bensodiazepiner (verifiering), LCMSMS**Gäller för
Klinisk kemi

LU

DROG 2:**U-Bensodiazepiner (verif) på LCMSMS (NPU18178)****U-Demetyldiazepam (Nordazepam) (NPU28061)****U-Oxazepam (NPU28062)****U-Temazepam (3-OH-diazepam) (NPU28063)****U-Lorazepam (NPU28060)****U-7-aminoklonazepam (NPU28056)****U-7-aminonitrazepam (NPU28057)****U-7-aminoflunitrazepam (NPU28055)****U- α -OH-midazolam (NPU28059)****U- α -OH-alprazolam (NPU28054)****Bakgrund, indikation och tolkning**

Bensodiazepiner av olika slag har inom sjukvården stor användning som anxiolytika och hypnotika. Bensodiazepinerna tas snabbt upp i blodet och metaboliseras i stor utsträckning [1]. Dessa metaboliter och till en viss del ometaboliserade bensodiazepiner, utsöndras i urinen i oförändrad form och som glukuronider [1,2]. Det förekommer även ett omfattande missbruk av bensodiazepiner. För att påvisa förekomsten av bensodiazepiner i urin, används en screeningmetod baserad på ONLINE reagens [3, 4]. Positiva fynd från screeningen konfirmeras med denna LCMSMS-metod, som bestämmer de i Sverige vanligaste förekommande bensodiazepinerna och/eller deras huvudmetaboliter.

I analysen ingår alltid kvantitativ bestämning av:

Diazepammetaboliterna demetyldiazepam, temazepam (OH-diazepam) och oxazepam. Oxazepam finns även som eget läkemedel. Analysen innehåller även metaboliter till lorazepam, klonazepam, nitrazepam, flunitrazepam, midazolam och alprazolam.

Se tabell nedan över analyserade metaboliter (nedbrytningsprodukter) till resp läkemedel:

Läkemedel	Läkemedelssubstans	Analyserad Metabolit
<i>Stesolid, Diazepam</i>	Diazepam	Demetyldiazepam, Temazepam (OH-diazepam), Oxazepam
<i>Sobril, Oxascand</i>	Oxazepam	Oxazepam
<i>Temesta, Lorazepam</i>	Lorazepam	Lorazepam
<i>Iktorivil</i>	Klonazepam	7-aminoklonazepam
<i>Apodorm, Mogadon, Nitrazepam</i>	Nitrazepam	7-aminonitrazepam
<i>Flunitrazepam</i>	Flunitrazepam	7-aminoflunitrazepam
<i>Midazolam</i>	Midazolam	alfa-OH-midazolam
<i>Xanor, Alprazolam</i>	Alprazolam	alfa-OH-alprazolam

Metodbeskrivning

**DROG 2:
U-Bensodiazepiner (verifiering), LCMSMS**Gäller för
Klinisk kemi

LU

Analysprincip

Urinprovet hydrolyseras med enzymet β -glukuronidas för att bryta glukuroniden [1, 2]. Sedan fälls proteiner i urinen med acetonitril. Efter centrifugering späds provet innan injektion på LCMSMS. Bestämning av de olika benzodiazepin komponenterna sker med LCMSMS. Beräkning sker mot kalibreringskurva i 6 nivåer.

Referensintervall

Negativt (< gränsvärde 50 $\mu\text{g/L}$) [5-7]

Metodkaraktistika

Interferenser och felkällor

Humanurin innehåller inga endogena föreningar, som interfererar med metoden.

Detektionsgräns och Mätområde

Mätområde: 30 – 5 000 $\mu\text{g/L}$ [8]

Spårbarhet

Demetyldiazepam (Nordazepam)	Analyscertifikat Cerilliant
Demetyldiazepam-D5 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
Oxazepam	Analyscertifikat Cerilliant
Oxazepam-D5 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
Temazepam	Analyscertifikat Cerilliant
Temazepam-D5 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
Lorazepam	Analyscertifikat Cerilliant
Lorazepam-D4 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminoklonazepam	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminoklonazepam-D4 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminonitrazepam	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminonitrazepam-D5 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminoflunitrazepam	Analyscertifikat Cerilliant
7-aminoflunitrazepam-D7 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
α -OH-midazolam	Analyscertifikat Cerilliant
α -OH-midazolam-D4 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant
α -OH-alprazolam	Analyscertifikat Cerilliant
α -OH-alprazolam-D5 (IS)	Analyscertifikat Cerilliant

Metodbeskrivning

**DROG 2:
U-Bensodiazepiner (verifiering), LCMSMS**

Gäller för
Klinisk kemi

LU

Mätosäkerhet

Data från validering av metoden våren 2017 (170515-170620) [8].

	Nivå (µg/L)	Antal (n)	Medelvärde	Total CV%
Demetyldiazepam (Nordazepam)	50	25	52.9	8.7
	500	25	465.0	4.7
	3000	25	2984	4.4
Oxazepam	50	25	49.6	4.8
	500	25	476.0	3.0
	3000	25	3024	2.8
Temazepam	50	25	50.4	3.6
	500	25	472.8	2.3
	3000	25	3007	3.1
Lorazepam	50	25	50.2	4.0
	500	25	487.0	2.7
	3000	25	3028	3.6
7-aminoklonazepam	50	25	52.9	3.5
	500	25	522.2	4.7
	3000	25	3095	3.3
7-aminonitrazepam	50	25	52.1	2.7
	500	25	515.8	2.3
	3000	25	2999	3.0
7-aminoflunitrazepam	50	25	51.1	3.1
	500	25	513.5	2.4
	3000	25	3034	3.3
alfa-OH-midazolam	50	25	52.3	1.7
	500	25	493.4	2.4
	3000	25	3072	3.2
alfa-OH-alprazolam	50	25	53.5	8.2
	500	25	472.1	6.6
	3000	25	3048	6.5

Övrig information

Validering har utförts av Klinisk kemi i Lund [8, 9]. Riktigheten kontrolleras genom deltagande i externt kontrollprogram (EQUALIS och LGC).

Ackreditering

U-Bensodiazepiner verifiering är ackrediterad.

Metodbeskrivning

**DROG 2:
U-Bensodiazepiner (verifiering), LCMSMS**Gäller för
Klinisk kemi

LU

Referenser

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia 1999, Saunders, 3:e upplagan sid 950 – 955.
2. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. Lund: Studentlitteratur 2012, ISBN 978-91-44-04787-4, 9:e upplagan sid 712.
3. Klette, K.L., Wiegand, R. F., Horn, C. K., Stout, P. R., Magluilo Jr., J. (2005) Urine Benzodiazepine Screening using Roche Online KIMS Immunoassay with β -glucuronidase hydrolysis and confirmation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol*, vol. 29, 193-200.
4. Produktblad Benzodiazepines II (BNZ2) ONLINE KIMS, Cobas c-system, Roche Diagnostcs Mannheim.
5. Hansson T, Helander A, Beck O, Elmgren A, Kugelberg F, Kronstrand R. Enhetliga analyser av narkotika i urin krävs för rättssäkerheten, *Läkartidningen* 2015; 112 (39), 1671-1677.
6. Equalis rekommendation S013 version 1.0, Narkotikaanalyser i urinprov, Expertgruppen för Läkemedel och toxicologi, 2015-10-01, https://www.equalis.se/media/dyaonv31/s013_gränsvärden-för-narkotika-i-urin_1-0.pdf
7. Equalis rekommendation S027 version 1.0, Rutiner vid beställning och svarsrapportering av narkotikaanalyser i urinprov, Expertgruppen för Läkemedel och toxicologi, 2019-02-28, https://www.equalis.se/media/bfpezhyg/s027_rutiner-vid-beställning-och-svarsrapportering-av-narkotikaanalyser-i-urinprov_1-0.pdf
8. Valideringsprotokoll för U-Bensodiazepiner verifiering ([dok ID 17-464](#)), Klinisk kemi Lund, finns på arbetsplatsen.
9. Validering - Överföring av LC-MS/MS metod för DROG2: U-Bensodiazepiner (verif) till vätskehanteringsrobot Hamilton STARlet ([dok ID 19-24](#))
10. Dugan, S. et. al.: Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20°C. *J. Anal. Toxicol.*, 18: 391-396, 1994.
11. Instrumenthandhavande Hamilton Microlab STARlet Robot (Jupiter) ([dok ID C-8898](#)), aktuell version.
12. Instrumenthandhavande Hamilton Microlab STARlet Robot (Saturnus) [dok ID C-10203](#), aktuell version.
13. Instrumenthandhavande LCMSMS 6500-2 ([dok ID 16-610](#)), aktuell version, finns på arbetsplatsen.
14. Produktblad β -Glucuronidase isolated from *Escherichia coli* K 12, Roche Diagnostic GmbH. Tyskland.
15. Sciex manual för Analyst. Finns på arbetsplatsen.