

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

NERIJUS KARLONAS

**RAMINAMŲJŲ-MIGDOMŲJŲ VAISTŲ LIKUČIŲ KIETAFAZĖ
EKSTRAKCIJA IŠ BIOLOGINĖS KILMĖS BANDINIŲ IR NUSTATYMAS
SPARČIOSIOS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2011 – 2014 metais Vilniaus universitete ir Valstybinėje teismo medicinos tarnyboje.

Mokslinis vadovas – prof. dr. (HP) Almira Ramanavičienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

Mokslinis konsultantas – prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Chemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

Nariai:

prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

prof. dr. Umit Divrikli (Pamukkalės universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

doc. dr. Evaldas Naujalis (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

dr. Sigita Jurkonienė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. kovo mėn. 27 d. 14 val. Vilniaus universiteto Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko g. 24, LT – 03225, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2015 m. vasario mėn. 27 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

NERIJUS KARLONAS

**SOLID PHASE EXTRACTION AND FAST GAS CHROMATOGRAPHY FOR A
RESIDUE ANALYSIS OF SEDATIVE-HYPNOTIC DRUGS IN BIOLOGICAL
SAMPLES**

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, chemistry (03 P)

Vilnius, 2015

This dissertation was prepared in Vilnius University, Faculty of Chemistry, the Department of Analytical and Environmental Chemistry, and the State Forensic Medicine Service under the Ministry of Justice of the Republic of Lithuania, the Toxicology laboratory in the period of 2011 – 2014.

Scientific supervisor – prof. dr. Almira Ramanavičienė (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03 P)

Scientific advisor – prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03 P)

The dissertation will be defended during the public meeting of the Council of Chemistry of Vilnius University:

Chairman:

prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03 P)

Members:

prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03 P)

prof. dr. Umit Divrikli (Pamukkale University, physical sciences, chemistry – 03 P)

doc. dr. Evaldas Naujalis (Center for Physical Science and Technology, physical sciences, chemistry – 03 P)

dr. Sigita Jurkonienė (Nature Research Centre, biomedical sciences, biology – 01 B)

The official discussion will be held at 14 p.m. 27 March 2015 in the meeting of the Council of Chemistry at the Auditorium of Inorganic Chemistry, in the Faculty of Chemistry, Vilnius University.

Address: Naugarduko st. 24, LT-03225 Vilnius, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation was mailed on the 27 February 2015.

The dissertation is available at the library of Vilnius University and the library of Center for Physical Science and Technology, and available online: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

1. ĮVADAS

Integracija į Vakarų Europą paskatino žalingų reiškinių ir psichoaktyvių medžiagų (raminamųjų-migdomųjų vaistų) spartesnį plitimą Lietuvoje. Atliktų epidemiologinių tyrimų duomenimis, dauguma Lietuvos gyventojų dažnai vartoja psichoaktyvias medžiagas benzodiazepinus bei kitas, naujos kartos medžiagas (zaleploną ir zopikloną). Pagrindiniai jų vartojimo plitimo veiksniai yra sudėtingos socialinės ir ekonominės sąlygos, geras prieinamumas bei motyvacijos stoka.

Benzodiazepinai – tai svarbiausias ir gausiausias vaistų pogrupis, kuris vartojamas nerimui mažinti ir miegui gerinti. Tai gama amino sviesto rūgšties receptorių agonistai. Šie vaistai veikia tas galvos smegenų dalis, kurios yra susijusios su nerimu, įtampos mažinimu ir mieguistumu. Pirmasis į vaistų rinką patekęs benzodiazepinas buvo chlordiazepoksidas (1960 m.). Vėliau buvo pristatyti ir kiti benzodiazepinai, o iki šių dienų Jungtinių Tautų konvencijoje (1971 m.) buvo užregistruota maždaug 35 šios grupės vaistų. Benzodiazepinų toksiškumas nėra didelis, jie veikia raminančiai, mažina nervinę įtampą, nerimą, baimę, padeda nemigos atvejais. Net ir nedidelės benzodiazepinų dozės gali paveikti protinį ir fizinį aktyvumą. Be to, daugumai jų būdingos traukulius slopinančios ir griaučių raumenis atpalaiduojančios savybės.

Zaleplonas ir zopiklonas savo chemine struktūra skiriasi nuo benzodiazepinų, tačiau kai kurios jų farmakologinės savybės yra labai panašios. Šie naujos kartos medikamentai yra mažesnio saugumo nei benzodiazepinai ir turi tendenciją sukelti fizinę priklausomybę, tačiau veiksmingai greitina užmigimą. Abiems vaistams yra būdingas labai panašus veiksmingumas, užtikrinantis gilų miegą. Lyginant su benzodiazepiniais, zaleplonas ir zopiklonas sukelia nerimą slopinantį ir traukulius malšinantį poveikį. Naujos kartos medikamentai, kaip ir benzodiazepinai, yra gama amino sviesto rūgšties receptorių agonistai.

Nustatyti benzodiazepinus bei zaleploną ir zopikloną biologinėse terpėse nėra lengva. Šie medikamentai yra tokia įvairiapusė cheminių junginių grupė, kad yra sunku surasti nesudėtingą metodą, kuris pašalintų trukdančius junginius, vaistus palikdamas ekstrakte. Literatūros duomenimis, dažniausiai šiuos raminamuosius migdomuosius vaistus galima išskirti ir sukonzentruoti iš biologinių terpių naudojant skystafazę ekstrakciją arba kietafazę ekstrakciją (KFE).

KFE metodas, palyginus su skystafaze ekstrakcija, turi keletą privalumų. Jis yra labai atrankus, sumažina emulsijos susidarymą bei tirpiklių naudojimą, gaunami švaresni ekstraktai, be to, šį metodą lengva automatizuoti. Naudojant KFE metodą raminamųjų-migdomųjų vaistų nustatymui, susiduriama su didele sorbentų įvairove (nepoliniais, polimeriniais arba jonų mainų sorbentais), kuri suteikia plačias galimybes kurti ir tobulinti naujus KFE metodus.

Pastaraisiais metais naujos kartos hidrofilinės-lipofilinės pusiausvyros (atvirkščiųjų fazių) polimeriniai arba mišraus tipo KFE sorbentai buvo sėkmingai panaudoti kelių raminamųjų-migdomųjų vaistų išskyrimui iš biologinių terpių. Šių naujų KFE sorbentų taikymo praktikoje rezultatai leidžia teigti, jog jie yra gerokai efektyvesni, greitesni ir paprastesni už tradicinius KFE sorbentus. Be to, KFE naudojant naujos kartos sorbentus yra ypač lengvai suderinama su chromatografiniais nustatymo metodais. Tokiu būdu KFE metodo sujungimas su sparčiosios dujų chromatografijos-neigiamos cheminės jonizacijos masių spektrometrijos metodu (DCh/NCJ-MS) turėtų atverti puikias perspektyvas raminamųjų-migdomųjų vaistų nustatymui biologinės kilmės mėginiuose.

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – nuodugniai ištirti ir pritaikyti kietafazės ekstrakcijos ir dujų chromatografijos-neigiamos cheminės jonizacijos masių spektrometrijos metodus efektyviam raminamųjų-migdomųjų vaistų likučių nustatymui biologinės kilmės mėginiuose. Tyrimams buvo pasirinktos dvi pakankamai aktualios analičių/mėginio matricos sistemos: penkiolika benzodiazepinų kraujyje bei zaleplonas ir zopiklonas hemolizuotame kraujyje.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Sukurti optimalią derivatizacijos procedūrą benzodiazepinų nustatymui.
2. Optimizuoti benzodiazepinų, zaleplono ir zopiklono efektyvaus atskyrimo bei nustatymo sparčiosios DCh/NCJ-MS metodu sąlygas.
3. Ištirti ir parinkti geriausius KFE metodus benzodiazepinų likučių išskyrimui iš kraujo bei zaleplono ir zopiklono likučių išskyrimui iš hemolizuoto kraujo mėginių.
4. Patvirtinti sukurtus KFE-DCh/NCJ-MS metodus kraujyje ir hemolizuotame kraujyje.
5. Pritaikyti sukurtus metodus realių kraujo mėginių analizei.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Benzodiazepinų, zaleplono ir zopiklono atskyrimas DCh/NCJ-MS metodu yra efektyvesnis, atrankesnis ir greitesnis lyginant su įprastiniais, anksčiau paskelbtais metodais.

2. Benzodiazepinų derivatizacija po KFE procedūros padidina jų nustatymo jautrį.

3. Sukurti KFE metodai yra atrankūs, tikslūs, atsikartojantys, pasižymintys puikiais išgavomis ir efektyvesni už tradicinius šiuo metu naudojamus KFE bei skystafazės ekstrakcijos metodus.

4. Nauji, pilnai pritaikyti KFE-DCh/NCJ-MS metodai gali būti naudojami sudėtingų biologinių terpių (kraujo ir hemolizuoto kraujo) analizei.

2. EKSPERIMENTO METODIKA

Benzodiazepinų (diazepamo, nordiazepamo, midazolamo, flunitrazepamo, bromazepamo, oksazepamo, nitrazepamo, temazepamo, lorazepamo, klonazepamo, alprazolamo, α -OH-midazolamo, triazolamo, α -OH-alprazolamo, 7-aminoklonazepamo) tyrimas buvo atliktas naudojant Agilent Technologies-7890A (Folsom, Kalifornija, JAV) dujų chromatografą su masių atrankiu detektoriumi (5975C NCJ-MS režimas). Jonizacijos šaltinis buvo valdomas cheminės jonizacijos režimu, reagentinės dujos metanas (grynumas 99,9995 %) buvo naudojamos visiems masių spektrometrijos matavimams. Greitas ir efektyvus 15 benzodiazepinų chromatografinis atskyrimas buvo atliktas naudojant DB-5HT kapiliarinę kolonėlę (30 m \times 0,320 mm vidinis diametras, 0,10 μ m nejudrios fazės sluoksnio storis). Kolonėlės temperatūra buvo užprogramuota: pradinė temperatūra buvo 180 $^{\circ}$ C, po to palaipsniui 50 $^{\circ}$ C per minutę temperatūra buvo didinama iki 325 $^{\circ}$ C. Galiausiai kolonėlė buvo pastoviai termostatuojama dar vieną minutę, esant 325 $^{\circ}$ C temperatūrai. Helio (grynumas 99,9996 %) dujos buvo naudojamos efektyviam 15 analičių atskyrimui kapiliarinėje kolonėlėje, pastovus šių dujų srautas – 3,5 mL min⁻¹. Dujų chromatografo garintuvo temperatūra – 250 $^{\circ}$ C, detektoriaus temperatūra – 300 $^{\circ}$ C, MS kvadrupolio ir MS jonizacijos šaltinio temperatūros buvo 150 $^{\circ}$ C. Į dujų chromatografinę sistemą buvo įpurškiama 1,0 μ L paruošto mėginio. KFE buvo atlikta naudojant Oasis MCX (30 mg, 1 mL) kolonėlę, kuri yra mišraus tipo (Waters, Jungtinė Karalystė).

Naujos kartos medikamentų (zaleplono ir zopiklono) analizė buvo atlikta naudojant Agilent Technologies-7890A (Folsom, Kalifornija, JAV) dujų chromatografą su masių atrankiu detektoriumi (5975C NCJ-MS režimas). Greitas ir efektyvus dviejų analičių chromatografinis atskyrimas buvo atliktas naudojant DB-5HT kapiliarinę kolonėlę (30 m \times 0,320 mm vidinis diametras, 0,10 μ m nejudrios fazės sluoksnio storis). Kolonėlės temperatūra buvo užprogramuota: pradinė temperatūra buvo 200 $^{\circ}$ C, po to palaipsniui 45 $^{\circ}$ C per minutę temperatūra buvo didinama iki 330 $^{\circ}$ C. Galiausiai kolonėlė buvo pastoviai termostatuojama dar vieną minutę, esant 330 $^{\circ}$ C temperatūrai. Helio (grynumas 99,9996 %) dujos buvo naudojamos efektyviam tirtų analičių atskyrimui kapiliarinėje kolonėlėje, pastovus šių dujų srautas – 3,0 mL min⁻¹. Dujų chromatografo

garintuvo temperatūra – 250 °C, detektoriaus temperatūra – 300 °C, MS kvadrupolio ir MS jonizacijos šaltinio temperatūros buvo nustatytos po 110 °C ir 160 °C. Į dujų chromatografinę sistemą buvo įpurškiama 1,0 µL paruošto mėginio. KFE metodo vystymui buvo naudojama Oasis MCX (30 mg, 1 mL) mišraus tipo kolonėlė ir Oasis HLB (30 mg, 1 mL) kolonėlė.

Sukurti nauji KFE-DCh/NCJ-MS metodai buvo patvirtinti žmogaus nehemolizuotame ir hemolizuotame kraujyje. Pagrindiniai sukurtų metodų patvirtinimo faktoriai buvo atrankumas, jautrumas, tiesiškumas, tikslumas, atsikartojamumas, išgava ir stabilumas.

Optimizuojant KFE-DCh/NCJ-MS metodus, gauti rezultatai buvo išreikšti santykiniais plotų koeficientais (RRF), kurie buvo apskaičiuoti pagal formulę:

$$\text{RRF} = \frac{A_S C_{IS}}{A_{IS} C_S} \quad (2,1),$$

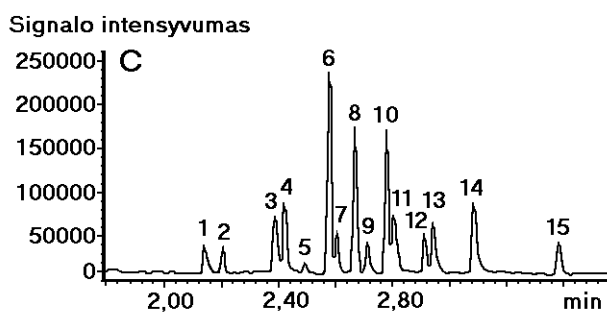
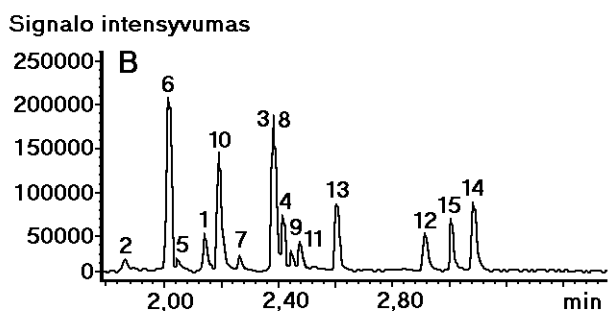
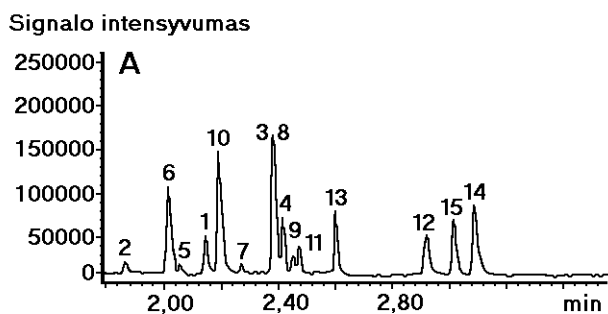
kur A_S – analitės smailės plotas, C_{IS} – vidinio standarto koncentracija (ng mL⁻¹), A_{IS} – vidinio standarto smailės plotas ir C_S – analitės koncentracija (ng mL⁻¹).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

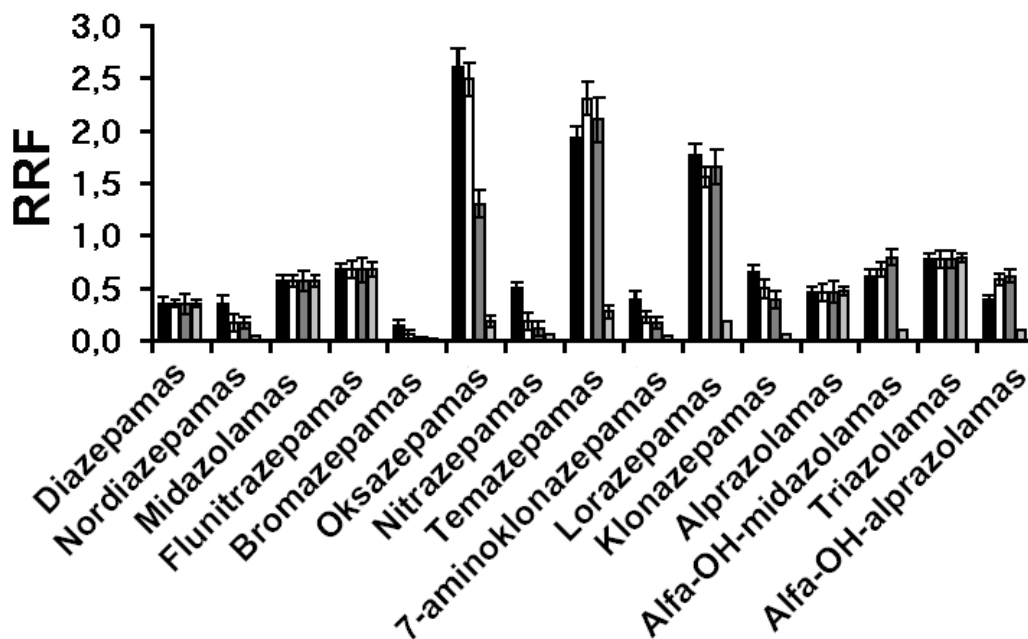
3.1. KFE metodo tobulinimas/pritaikymas benzodiazepinų analizei kraujyje ir greitas dujų chromatografinis nustatymas

Benzodiazepinus ir jų metabolitus galima nustatyti be papildomo derivatizacijos žingsnio, tačiau susiduriama su keletu problemų: registruojamos asimetriškos smailės, o nustatymas pasižymi blogu efektyvumu bei nedideliu detektavimo jautriu. Norint patikimai nustatyti mažas šių analičių koncentracijas, būtina jas derivatizuoti. Šiame eksperimente buvo optimizuojami pagrindiniai su derivatizacija susiję parametrai – derivatizacijos reagento prigimtis, derivatizacijos temperatūra ir trukmė.

Derivatizacijos reagento prigimtis buvo tirta, naudojant tris populiariausius derivatizacijos reagentus: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamidą (MSTFA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamidą (BSTFA) turintį 1 % trimetilchlorosilano, ir N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamidą (MTBSTFA). Šie reagentai buvo skiesti vienodomis dalimis, o galutiniai mišiniai buvo MSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t), BSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t) ir MTBSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t). Naudojant šiuos derivatizacijos mišinius buvo siekiama gauti didžiausius tirtų analičių smailių plotus ir taip pagerinti naujo metodo detektavimo jautrį. Taip pat didelis dėmesys buvo skiriamas pakankamam/patikimam derivatizuotų analičių smailių plotų atsikartojamumui. Šioje sistemoje optimaliausias tirtų analičių sililinimo (derivatizacijos) mišinys buvo MTBSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t) ir tik trijų analičių (temazepamo-TBDMS, α -OH-midazolamo-TBDMS, α -OH-alprazolamo-TBDMS) smailių plotai buvo mažesni, palyginti su kitų derivatų (1 ir 2 pav.). Po efektyvios MTBSTFA derivatizacijos benzodiazepinai ir jų metabolitai buvo konvertuojami į atitinkamus tert-butildimetilsililino (TBDMS) darinius, kurie yra žymiai patvaresni, hidrolitiškai stabilesni ir mažiau jautrūs drėgmei.



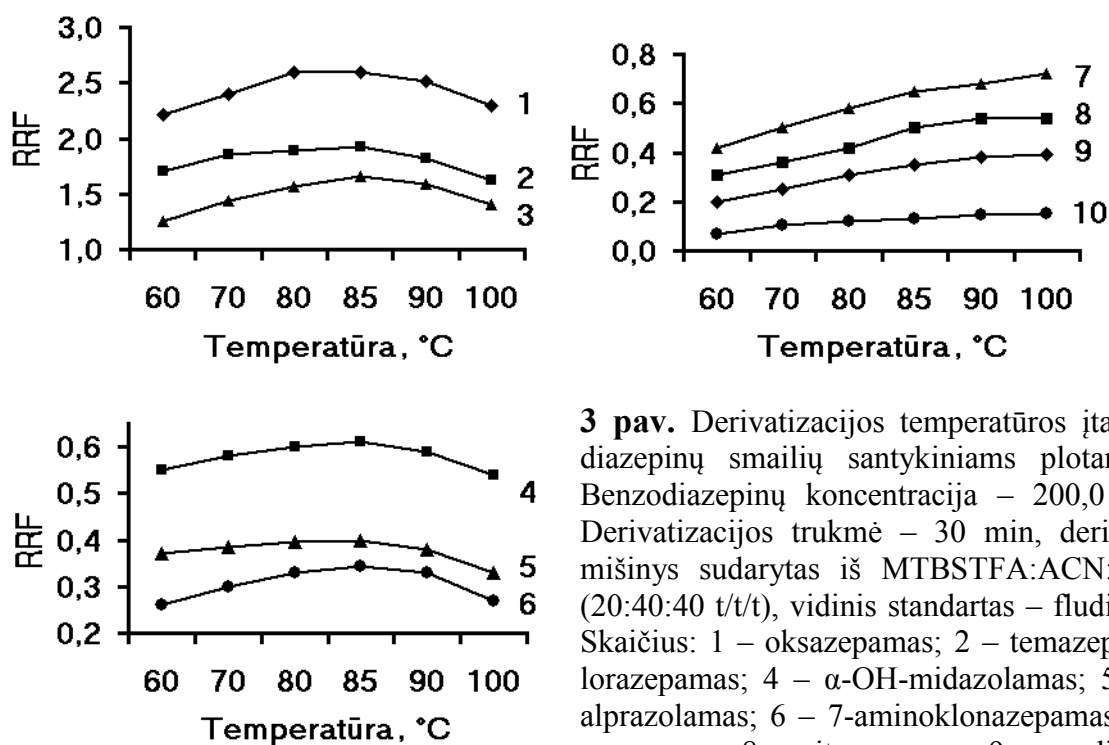
1 pav. Pasirinktų jonų chromatogramos gautos po benzodiazepinų derivatizacijos skirtingais reagentais: (A) MSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t), (B) BSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t) ir (C) MTBSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t). Derivatizacijos temperatūra – 80°C, trukmė – 30 min, tirtų analičių koncentracija – 200,0 ng mL⁻¹. Smailės: 1 – diazepamas; 2 – nordiazepamas; 3 – midazolamas; 4 – flunitrazepamas; 5 – bromazepamas; 6 – oksazepamas; 7 – nitrazepamas; 8 – temazepamas; 9 – 7-aminoklonazepamas; 10 – lorazepamas; 11 – klonazepamas; 12 – alprazolamas; 13 – α-OH-midazolamas; 14 – triazolamas; 15 – α-OH-alprazolamas.



2 pav. Trijų skirtingų derivatizacijos mišinių įtaka benzodiazepinų smailių santykiniam plotams ir derivatizuotų analičių bei nederivatizuotų analičių palyginimas (n=5). Derivatizacijos temperatūra – 80 °C, trukmė – 30 min, tirtų analičių koncentracija – 200,0 ng mL⁻¹, vidinis standartas – fludiazepamas. Žymėjimai: juodas stulpelis – MTBSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40t/t/t); baltas stulpelis – BSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t); pilkas stulpelis – MSTFA:ACN:etilacetatas (20:40:40 t/t/t); šviesiai pilkas stulpelis – standartinis tirtų analičių tirpalas metanolyje.

Derivatizacijos temperatūra ir trukmė

Tolimesnis tyrimų žingsnis buvo optimizuoti derivatizacijos temperatūrą ir trukmę. Derivatizacijos sąlygos, įskaitant skirtingas reakcijos temperatūras, kurios buvo 60, 70, 80, **85**, 90 ir 100 °C, ir reakcijos trukmes, kurios buvo 20, 25, **30**, 35, ir 40 min, išbandytos naudojant standartinius tiriamų analičių tirpalus. Optimalios derivatizacijos sąlygos yra pateiktos paryškintu šriftu. Silanizuotų analičių smailių plotai didėjo, didinant reakcijos temperatūrą ir maksimalūs smailių plotai buvo pasiekti esant 85 °C temperatūrai. Tęsiant eksperimentą, buvo papildomai didinama reakcijos temperatūra, kuri turėjo įtakos šių analičių smailių plotų sumažėjimui: oksazepamo-2TBDMS, temazepamo-TBDMS, 7-aminoklonazepamo-TBDMS, lorazepamo-2TBDMS, α -OH-midazolamo-TBDMS ir α -OH-alprazolamo-TBDMS (3 pav.).

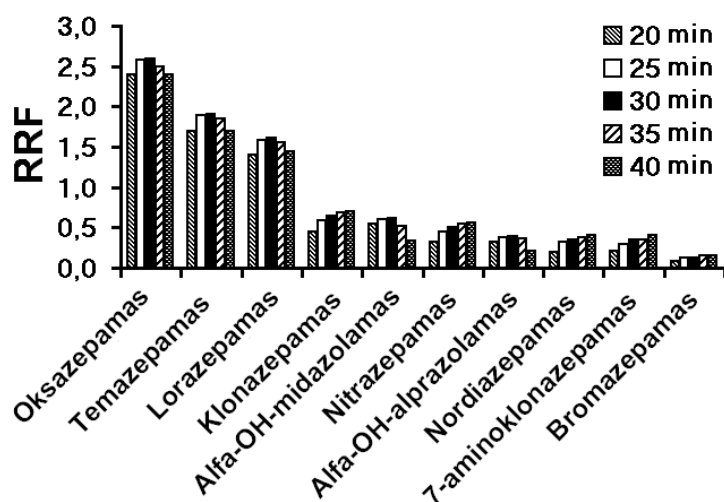


3 pav. Derivatizacijos temperatūros įtaka benzodiazepinų smailių santykiniam plotams ($n=5$). Benzodiazepinų koncentracija – 200,0 ng mL⁻¹. Derivatizacijos trukmė – 30 min, derivatizacijos mišinys sudarytas iš MTBSTFA:ACN:etilacetato (20:40:40 t/t/t), vidinis standartas – fludiazepamas. Skaičius: 1 – oksazepamas; 2 – temazepamas; 3 – lorazepamas; 4 – α -OH-midazolamas; 5 – α -OH-alprazolamas; 6 – 7-aminoklonazepamas; 7 – klonazepamas; 8 – nitrazepamas; 9 – nordiazepamas;

10 – bromazepamas.

Didžiausi tirtų analičių smailių plotai buvo gauti, kai sililinio reakcijos temperatūra 85 °C buvo palaikoma 30 min (4 pav.). Tęsiant eksperimentą, buvo papildomai ilginama reakcijos trukmė. Ilgėjant reakcijos trukmei, buvo pastebėta kai kurių analičių smailių plotų sumažėjimas, o kitų analičių smailių plotai nežymiai padidėjo. Apibendrinus gautus tyrimų rezultatus, buvo pasirinkta optimaliausia

derivatizacijos trukmė – 30 min. Keičiant reakcijos trukmę nuo 25 iki 30 min, nebuvo stebimi reikšmingi pokyčiai daugumos silanizuotų analičių smailių plotams. Optimaliausia benzodiazepinų ir jų metabolitų derivatizacija buvo atlikta naudojant MTBSTFA:ACN:etilacetato (20:40:40 t/t/t) mišinį, 85 °C reakcijos temperatūrą ir reakciją vykdant 30 min.



4 pav. Derivatizacijos trukmės įtaka benzodiazepinų smailių santykiniams plotams (n=5). Benzodiazepinų koncentracija – 200,0 ng mL⁻¹. Derivatizacijos temperatūra – 85 °C, derivatizacijos mišinys sudarytas iš MTBSTFA:ACN:etilacetato (20:40:40 t/t/t), vidinis standartas – fludiazepam.

Greitas dujų chromatografinis benzodiazepinų atskyrimas

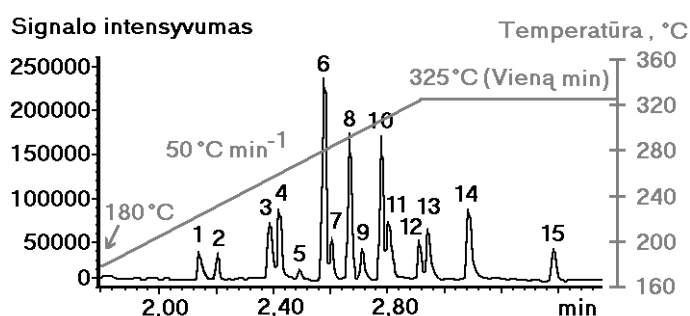
Greitas dujų chromatografinis tiriamų analičių atskyrimas tarpusavyje ir nuo galimų trukdančių junginių žymiai paspartino instrumentinės analizės eigą bei sumažino visos analizės kaštus. Dėl šios priežasties reikia stengtis optimizuoti pagrindinius sparčiosios dujų chromatografijos rodiklius.

Šiame darbe buvo optimizuojami pagrindiniai temperatūros rodikliai: pradinė ir galutinė kolonėlės temperatūros bei gradientinis temperatūros kėlimas. Optimizuojant instrumentinį metodą, ypatingas dėmesys buvo skiriamas tiriamų analičių smailių simetriškumo/asimetriškumo rodikliams bei analičių skiriamajai gebai. Eksperimentiniai duomenys pateikti 1 lentelėje. Optimalios sąlygos yra pateiktos paryškintu šriftu. Greitas DCh/NCJ-MS benzodiazepinų ir jų metabolitų atskyrimas buvo pasiektas per 3,9 min (5 pav.), išlaikant nepakitusius analičių chromatografinio efektyvumo rodiklius. Esant šiai sąlygai, tirtų benzodiazepinų smailių pločiai po MTBSTFA derivatizacijos svyravo nuo 0,020 iki 0,042 min. Dėl šios priežasties, apie 20 – 35 taškų suma suformuoja

kiekvieną smailę, kurios visiškai atitinka sparčiosios dujų chromatografijos analizės reikalavimus.

1 lentelė. Optimalių kolonėlės temperatūrų parinkimas, siekiant gauti greitą ir efektyvų benzodiazepinų ir jų metabolitų atskyrimą.

Temperatūros kolonėlėje			Atskyrimo trukmė, min			
Pradinė kolonėlės temperatūra, °C	Kolonėlės temperatūros kėlimas, °C min ⁻¹	Galutinė kolonėlės temperatūra, °C				
150	30/40/50/60	290	5,67	4,50	3,80	3,33
150	30/40/50/60	310	6,33	5,00	4,20	3,67
150	30/40/50/60	325	6,83	5,38	4,50	3,92
150	30/40/50/60	340	7,33	5,75	4,80	4,17
170	30/40/50/60	290	5,00	4,01	3,40	3,00
170	30/40/50/60	310	5,67	4,50	3,80	3,33
170	30/40/50/60	325	6,17	4,88	4,10	3,58
170	30/40/50/60	340	6,67	5,25	4,40	3,83
180	30/40/50/60	290	4,67	3,75	3,20	2,83
180	30/40/50/60	310	5,33	4,25	3,60	3,17
180	30/40/ 50 /60	325	5,83	4,63	3,90	3,42
180	30/40/50/60	340	6,33	5,00	4,20	3,67
250	30/40/50/60	290	2,33	2,00	1,80	1,67
250	30/40/50/60	310	3,00	2,50	2,20	2,00
250	30/40/50/60	325	3,50	2,88	2,50	2,25
250	30/40/50/60	340	4,00	3,25	2,80	2,50

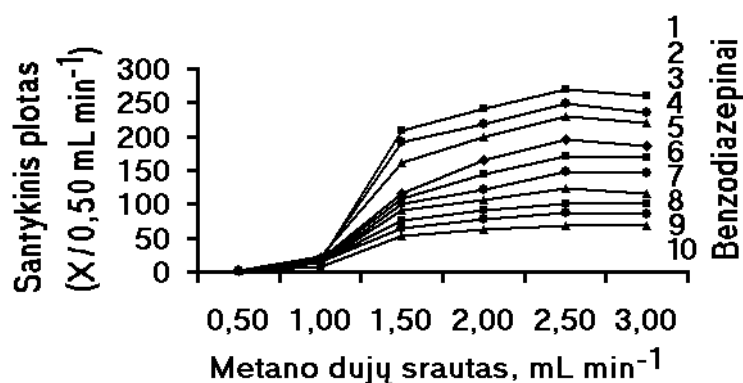


5 pav. Greitas ir efektyvus dujų chromatografinis benzodiazepinų atskyrimas. Pasirinktų jonų chromatograma gauta po MTBSTFA derivatizacijos, kai kiekvienos analitės koncentracija 200,0 ng mL⁻¹. Skaičiai prie smailių chromatogramoje sutampa su 1 C paveiksle pateikta numeracija.

Reagentinių dujų (metano) srauto optimizavimas

Metano (reagentinės) dujos yra vienas iš svarbiausių analitinio metodo jautrumui įtakos turinčių parametru. Šiame tyrime buvo optimizuojamas metano dujų srauto efektas, kuris yra tiesiogiai susijęs su parcialiniu reagentinių dujų slėgiu jonų šaltinyje.

Metano dujų srautas šiame tyrime buvo keičiamas nuo 0,50 iki 3,00 mL min⁻¹. Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, buvo pastebėta, kad tirtų analičių smailių plotai didėjo, didinant metano dujų srautą. Kartu didėjo ir parcialinis reagentinių dujų slėgis jonų šaltinyje, o tai padidina jonizacijos efektyvumą. Didesni metano dujų srautai nebuvo vertinami dėl turbo molekulinio siurblio apribojimų (maksimalus srautas – 3,00 mL min⁻¹). Tyrimo rezultatai leidžia teigti, kad analitinis prietaisas dirba efektyviai, kai metano dujų srautas 2,50 mL min⁻¹. Šis metano dujų srautas leidžia pasiekti maksimalų analitinio metodo jautrumą ir pakankamai gerą visų gautų benzodiazepinų rezultatų pakartojamumą. Detalūs tyrimų rezultatai yra pateikti 6 pav. Daugumoje anksčiau pateiktų metodų buvo naudojamas 2,00 mL min⁻¹ metano dujų srautas. Mano pasiūlytas metodas leidžia pasiekti iki 19,5 % didesnius tirtų analičių smailių plotus ir kartu pagerina šių analičių nustatymo jautrumą, kai yra naudojamas 2,50 mL min⁻¹ reagentinių dujų srautas, palyginus su įprastiniu, literatūroje nurodomu 2,00 mL min⁻¹ srautu.



6 pav. Metano dujų srauto įtaka analičių smailių santykiniam plotams (n=5). Helio dujų srautas – 3,5 mL min⁻¹, jonų šaltinio temperatūra – 150 °C. Skaičius: 1 – diazepam; 2 – midazolamas; 3 – bromazepam; 4 – α-OH-alprazolamas; 5 – klonazepam; 6 – lorazepam; 7 – 7-aminoklonazepam; 8 – oksazepam; 9 – nitrazepam; 10 – nordiazepam.

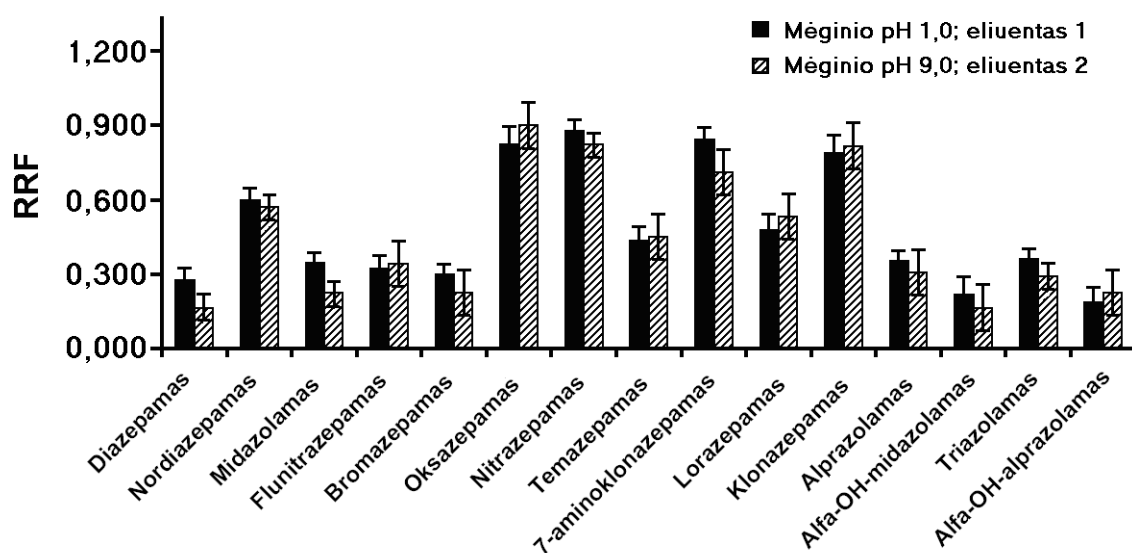
KFE metodo tobulinimas benzodiazepinų nustatymui

Šiame darbe buvo naudojamas ir taikomas mišraus tipo polimerinis sorbentas. Šis sorbentas yra sudarytas iš poli(N-vinilpirolidono-divinilbenzeno)-SO₃H, kurio paviršiaus plotas – 810 m² g⁻¹, ir parduodamas kolonėlėse (30 mg 1 mL) komerciniu pavadinimu Oasis MCX. Naudojant šį sorbentą, gali pasireikšti hidrofiliinės-lipofiliinės (atvirkščiųjų fazių) ir jonų mainų sąveikos tarp jonizuoto sorbento ir jonizuotų analičių. Dėl šios priežasties šis sorbentas yra tinkamas ir juo galima efektyviai bei patikimai išskirti penkiolika benzodiazepinų.

Mėginio pH – vienas iš pirmųjų šios sistemos optimizavimo žingsnių. Keičiant mėginio pH, keičiasi tirtų analičių sorbcija. Šiame darbe buvo naudojamos trys

skirtingos mėginio pH (pH – 1,0, pH – 7,0 arba pH – 9,0) vertės. Tiriamos analizės pirmiausiai buvo išekstrahuotos naudojant 1,0 mL gryno metanolio (MeOH), po to papildomai išekstrahuotos naudojant 1,0 mL MeOH ir 5 % amoniako mišinį.

Tirtų benzodiazepinų adsorbcija buvo labai panaši. Naudojant 0,1 M druskos rūgšties tirpalą, pH 1,0, visos tirtos analizės buvo adsorbuotos ant mišraus tipo sorbento dėl jonų mainų sąveikų. Tirtos analizės – bazės, kurių pK_a vertės yra intervale nuo 1,2 iki 6,5. Dėl šios priežasties visi benzodiazepinai buvo efektyviai išekstrahuoti naudojant MeOH ir 5 % amoniako mišinį. Kai buvo naudojami neutralus 0,1 M fosfatinis (pH 7,0) arba bazinis 0,1 M boratinis (pH 9,0) buferiniai tirpalai, visos tirtos analizės buvo adsorbuotos ant polimerinio sorbento dėl atvirkščiųjų fazių sąveikų ir galiausiai buvo efektyviai išekstrahuotos naudojant MeOH. Vis dėl to, kai mėginio pH 7,0, buvo gautas nepakankamas midazolamo ir triazolamo ekstrakcijos efektyvumas. Šių analičių pK_a vertės yra 6,2 ir 6,5 ir dėl to abi analizės buvo dalinai adsorbuotos ant polimerinio sorbento, kai buvo naudojamos neutralios (pH 7,0) sistemos sąlygos. Benzodiazepinų ekstrakcijos efektyvumai, kai mėginio pH buvo 1,0 ir pH 9,0, yra pateikti 7 paveiksle.



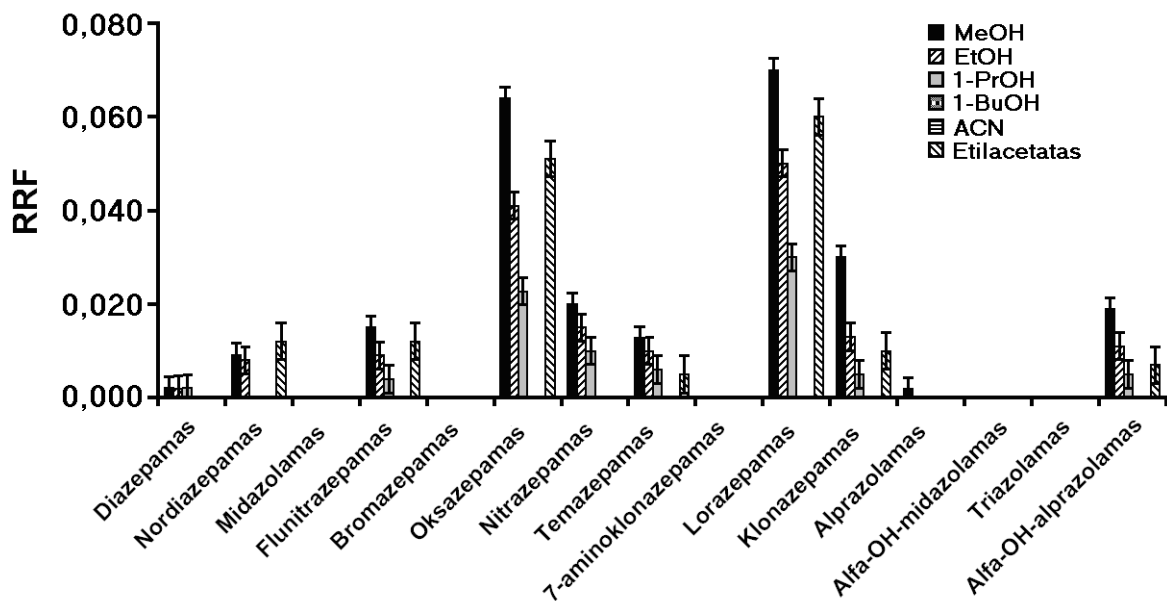
7 pav. Mėginio pH įtaka benzodiazepinų smailių santykiniams plotams. Pirmas eliuentas – mišinys sudarytas iš MeOH ir 5 % amoniako (n=5). Antras eliuentas – MeOH (n=5). Eliuento tūris – 1,0 mL, buvo naudojami keturi vidiniai standartai: fludiazepamas, oksazepamas-d5, klonazepamas-d4 ir 7-aminoklonazepamas-d4. Vandeniniai mėginiai buvo žymėti po 20,0 ng mL⁻¹ kiekvienos analizės atskirai.

Tokią benzodiazepinų adsorbciją KFE sorbente galima būtų paaiškinti analičių protonizacija/deprotonizacija. Visos tirtos analizės, esančios nejoninėje formoje, kai

mėginio pH 9,0, buvo adsorbuotos ant polimerinio sorbento ir sąveikavo su sorbentu specifine atvirkščiąjų fazių sąveika. Rūgštiniame tirpale (mėginio pH 1,0) tiriamos analitės yra joninėje formoje ir sąveikauja su mišraus tipo sorbentu specifine jonų mainų sąveika. Apibendrinant gautus eksperimentinius rezultatus, buvo pastebėta, kad sorbento plovimui galima naudoti įvairius organinius tirpiklius, kai mėginio pH 1,0. Šiuo papildomu plovimo žingsniu siekiama iš mišraus tipo sorbento pašalinti rūgštinės ir neutralios prigimties trukdančias medžiagas, nepašalinant benzodiazepinų adsorbuotų ant jonų mainų fazės. Po šio žingsnio buvo gauti vizualiai švaresni ekstraktai, lyginant su pradiniais ekstraktais, kai tiriamos analitės sąveikavo atvirkščiąjų fazių sąveika. Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, tolimesniems tyrimams buvo naudojamas optimalus mėginio pH 1,0.

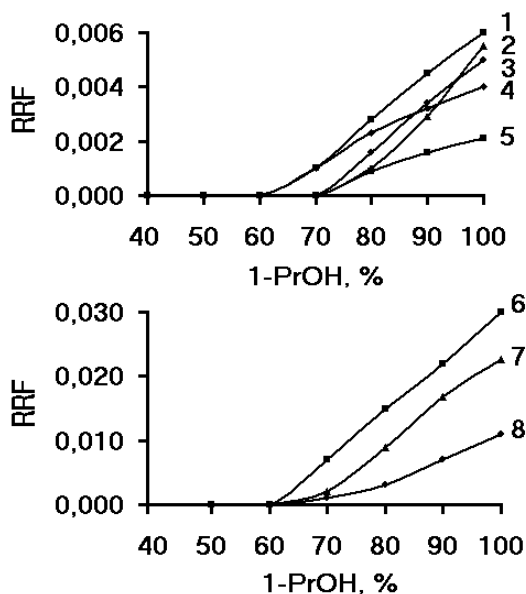
Trukdančių junginių išplovimas iš mišraus tipo (Oasis MCX) sorbento

Stengiantis gauti labai švairius ekstraktus tinkamus dujų chromatografijos analizei ir pašalinti trukdančius junginius iš mišraus tipo sorbento, buvo sėkmingai išbandyti ir optimizuoti trys plovimo žingsniai. Pirmas sorbento ploviklis buvo parūgštintas vanduo (0,1 M HCl), kurio pH 1,0, vėliau buvo naudojami organiniai tirpikliai. Siekiant išplauti trukdančius junginius iš mišraus tipo sorbento, buvo išbandyti skirtingi ploviklių tūriai, tai yra 0,1 M HCl (1,5 mL) ir ACN (1,0 mL). Šie plovikliai nesukėlė benzodiazepinų praradimų, bet kraujo matrica buvo nepakankamai pašalinta iš sorbento. Grynai MeOH, etanolis (EtOH), 1-propanolis (1-PrOH), 1-butanolis (1-BuOH) ir etilacetatas efektyviai pašalina trukdančias medžiagas iš mišraus tipo sorbento, bet šių gryną tirpiklių naudojimas lėmė ir kai kurių benzodiazepinų pasišalinimą iš sorbento (8 pav.).

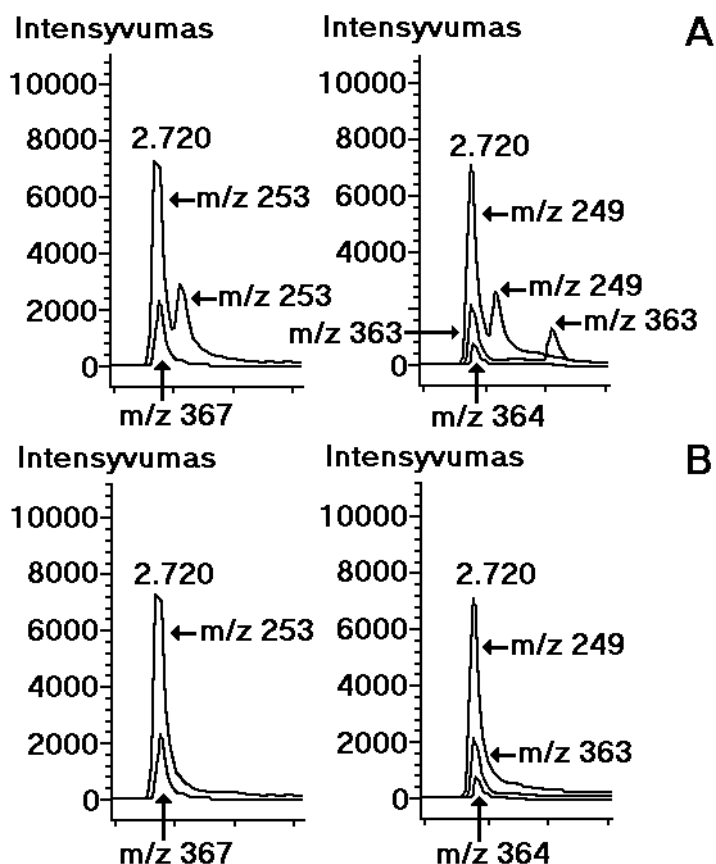


8 pav. Plovimo tirpiklio prigimties įtaka benzodiazepinų smalių santykiniams plotams (n=5). Ekstrahuojama grynais organiniais tirpikliais. Mėginio pH 1,0, eliuento tūris – 1,5 mL, buvo naudojami keturi vidiniai standartai. Kraujo mėginiai buvo žymėti po 20,0 ng mL⁻¹ kiekvienos analitės atskirai.

Apibendrinant gautus eksperimentinius tyrimo rezultatus, buvo nustatyta, kad 1-PrOH yra geriausias plovimo tirpiklis, kuris pašalina visus kraujo matricos junginius iš mišraus tipo sorbento. Nepaisant teigiamų 1-PrOH savybių, šis tirpiklis dalinai ekstrahuoja ir kai kurias analites, todėl buvo išbandyti parūgštinto vandens (0,15 M HCl) ir 1-PrOH mišiniai. Eksperimento rezultatai pateikti 9 paveiksle. Optimali 1-PrOH koncentracija, kurią naudojant minimaliai pašalinamos analitės iš mišraus tipo sorbento, buvo 60 %. Apibendrinant gautus eksperimentinius rezultatus, galima teigti, jog trys plovimo žingsniai yra reikalingi ir jie buvo naudojami, siekiant visiškai pašalinti kraujo matricos junginius iš mišraus tipo sorbento. Naudojant šiuos tris plovimo žingsnius buvo gauti labai švarūs ekstraktai bei chromatogramos (10 pav.).



9 pav. Mišraus tipo sorbento plovimo įtaka tirtų analičių smailių santykiniams plotams ($n=5$). Sorbentas plautas ekstrakciniais mišiniais, kurie buvo sudaryti iš parūgštinto vandens (0,15 M HCl) ir 1-PrOH. Mėginio pH 1,0, ekstrakcinio mišinio bendras tūris – 1,5 mL. Kraujo mėginiai buvo žymėti po $20,0 \text{ ng mL}^{-1}$ kiekvienos analitės atskirai. Skaičius: 1 – temazepamas; 2 – klonazepamas; 3 – α -OH-alprazo-lamas; 4 – flunitrazepamas; 5 – diazepamas; 6 – lorazepamas; 7 – oksazepamas; 8 – nitrazepamas.



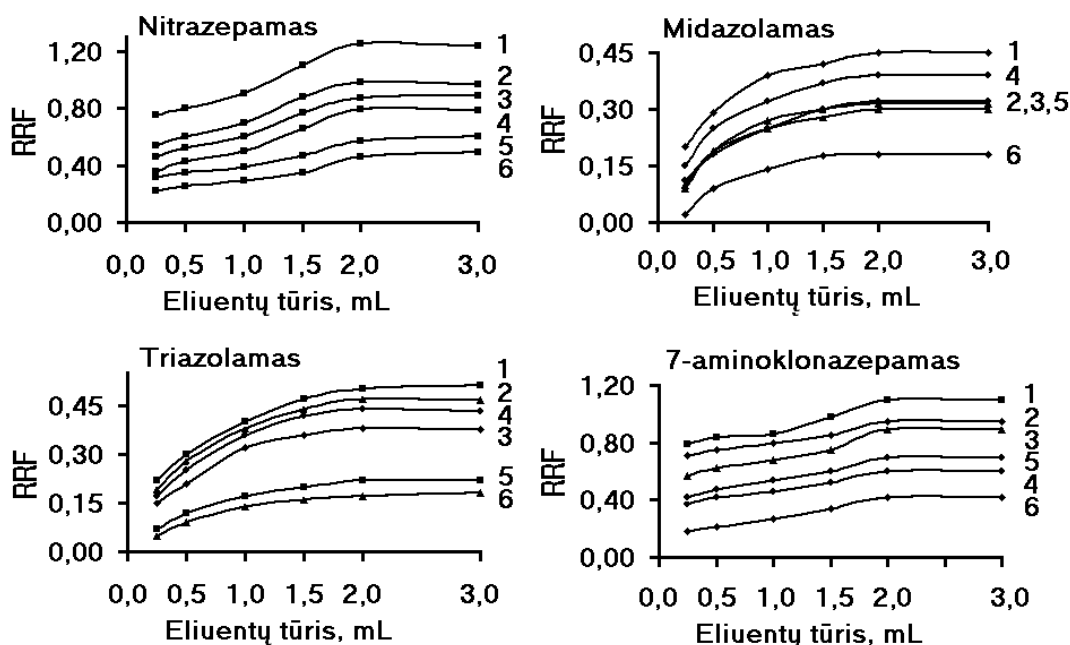
A

B

10 pav. 7-aminoklonazepamo-d4 (m/z 253, 367) ir 7-aminoklonazepamo (m/z 249, 363, 364) pasirinktų jonų chromatogramos gautos iš žymėtų ($20,0 \text{ ng mL}^{-1}$) kraujo mėginių po KFE plovimo žingsnių: (A) 1,5 mL 0,1 M HCl (pH 1,0) ir 1,0 mL ACN; (B) 1,5 mL 0,1 M HCl (pH 1,0), 1,5 mL mišinio sudaryto iš 1-PrOH ir 0,15 M HCl parūgštinto vandens (60:40 t/t) ir 1,0 mL ACN. Visi KFE žingsniai buvo atlikti, kai srauto greitis 1 mL min^{-1} .

Benzodiazepinų eliuavimas iš mišraus tipo (Oasis MCX) sorbento

Eliuavimo etapo tobulinimas buvo vienas iš paskutinių KFE metodo optimizavimo etapų. Jo metu buvo siekiama nutraukti visas jonų mainų sąveikas, kurios vyko tarp jonizuotų analičių ir jonizuoto sorbento. Šiam tikslui pasiekti buvo pasirinkti ir ištirti šeši eliuavimo mišiniai, kurie buvo sudaryti iš MeOH, EtOH, 1-PrOH, 1-BuOH, ACN arba etilacetato, kurių sudėtyse buvo 5 % amoniako. Didinant šių mišinių eliuavimo tūrį nuo 0,25 iki 3,0 mL buvo stengiamasi maksimaliai išekstrahuoti visas tiriamas analites (11 pav.).

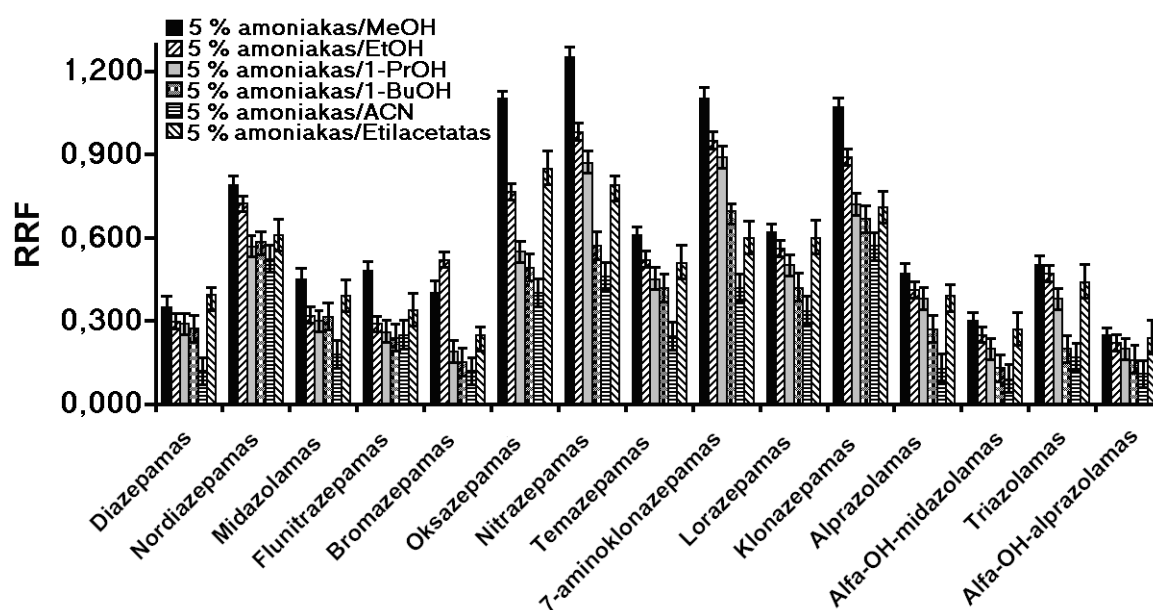


11 pav. Eliuentų tūrio įtaka pasirinktų analičių smailių santykiniam plotams ($n=5$). Kraujo mėginiai buvo žymėti po $20,0 \text{ ng mL}^{-1}$ kiekvienos analizės atskirai. Skaičius: 1 – MeOH turintis 5 % amoniako; 2 – EtOH turintis 5 % amoniako; 3 – 1-PrOH turintis 5 % amoniako; 4 – etilacetatas turintis 5 % amoniako; 5 – 1-BuOH turintis 5 % amoniako; 6 – ACN turintis 5 % amoniako.

Tirtų analičių smailių plotai reikšmingai didėjo, kai eliuentų tūris buvo keičiamas nuo 0,25 iki 2,0 mL. Vis dėl to, nebuvo pastebėta reikšmingų pokyčių analičių smailių plotuose, kai buvo didinamas eliuentų tūris nuo 2,0 iki 3,0 mL (11 pav.).

Šioje KFE sistemoje optimaliausias eliuento mišinys – MeOH savo sudėtyje turintis 5 % amoniako, o šio mišinio efektyviausias tūris – 2,0 mL (12 pav.). Šis mišinys užtikrina visišką tirtų benzodiazepinų deprotonizaciją, kai tiriamos analizės tampa

neutralios formos ir gali būti nevaržomai ekstrahuotos, o mišraus tipo sorbentas išlieka stabilioje joninėje formoje.



12 pav. Ekstrahento prigimties įtaka benzodiazepinų smailių santykiniam plotams ($n=5$). Ekstrahuojama organinius tirpikliais, kurių sudėtyse yra 5 % amoniako. Eliuentų tūris – 2,0 mL. Mėginio pH 1,0, buvo naudojami keturi vidiniai standartai. Kraujo mėginiai buvo žymėti po 20,0 ng mL⁻¹ kiekvienos analizės atskirai.

KFE metodo patvirtinimas benzodiazepinų nustatymui kraujyje

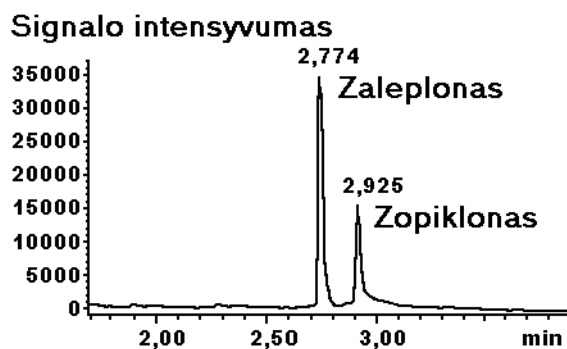
Eksperimentų rezultatai parodė, kad mišraus tipo sorbentas poli(N-vinilpirolidonas-divinilbenzenas)-SO₃H (Oasis MCX) turi daug privalumų išskiriant analites iš biologinių terpių, nes pasižymi geru rezultatų atsikartojamumu ir atrankumu. Be to, metodas turi keletą privalumų lyginant su kitais, anksčiau paskelbtais metodais. Kraujo mėginyje esančių benzodiazepinų aptikimo ir nustatymo ribos buvo nuo 0,24 iki 0,62 ng mL⁻¹ ir 0,72 iki 1,89 ng mL⁻¹. Kalibravimo kreivės yra tiesinės, determinacijos koeficientas didesnis nei $r^2 \geq 0,9961$. Tyrimo metu naudojamų kokybės kontrolės mėginių santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo mažesni nei 7,0 % ($n=10$) ir metodo vienos dienos bei dešimties dienų tikslumas buvo nuo 89,5 iki 110,5 %. Tai parodo gerą metodo atsikartojamumą vidinės laboratorijos atkuriamumo sąlygomis. Be to, maksimalios tirtų analičių ekstrakcijos išgavos buvo pasiektos intervale nuo 80,6 iki 91,4 %, išskyrus oksazepamo (70,8 %), lorazepamo (62,2 %), klonazepamo (61,8 %) ir α -OH-alprazolamo (61,1 %). Apibendrinus galima teigti, kad naujas KFE metodas yra

tikslus, jautrus ir atrankus bei tinkamas analičių nustatymui dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu, naudojant neigiamą cheminę jonizaciją.

Aptartas KFE-DCh/NCJ-MS metodas buvo taikomas kelių benzodiazepinų nustatymui realiuose kraujo mėginiuose po vienkartinio vaisto pavartojimo. Visi tirti kraujo mėginiai nesukėlė jokių papildomų problemų, nustatant analites iš biologinių terpių. Lietuvoje iš benzodiazepinų grupės junginių dažniausiai yra vartojami diazepam, klonazepam, lorazepam, kuriuos kraujyje po tam tikro laiko (iki trijų dienų) galima aptikti nepakitusius, be to, kartu galima nustatyti ir jų metabolitus. Nustačius kraujyje minėtų junginių ir jų metabolitų koncentracijas, galima daryti išvadą apie galimo poveikio laipsnį ir apie suvartotą kiekį bei dozę.

3.2. KFE metodo tobulinimas/pritaikymas zaleplono ir zopiklono analizei hemolizuotame kraujyje ir greitas dujų chromatografinis nustatymas

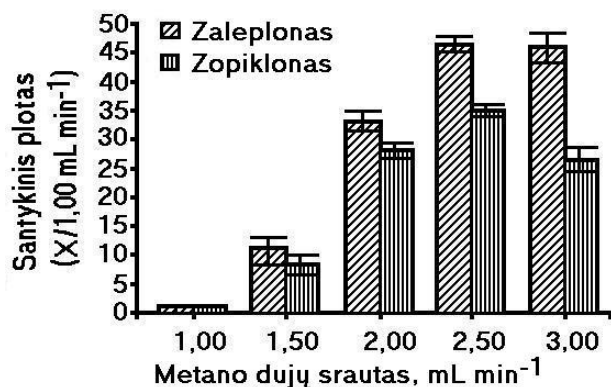
Greitas dujų chromatografinis abiejų analičių atskyrimas buvo atliktas, keičiant pradines (150, **200** ir 250 °C) ir galutines (300, **330** ir 350 °C) kolonėlės temperatūras, taip pat parenkant optimalų kolonėlės gradientinį temperatūrinį kėlimą (30, **45** ir 50 °C min⁻¹) ir optimizuojant nešančių dujų helio srautą (1,0, 2,0, **3,0** ir 7,0 mL min⁻¹). Optimalios instrumentinio metodo sąlygos yra pateiktos paryškintu šriftu. Optimizuojant DCh/NCJ-MS instrumentinį metodą ypatingas dėmesys buvo skiriamas tiriamų analičių smailių simetriškumo/asimetriškumo rodikliams bei analičių skiriamajai gebai. Greitas DCh/NCJ-MS zaleplono ir zopiklono atskyrimas buvo pasiektas per 3,89 min (13 pav.), kai nenukenčia pagrindiniai abiejų analičių chromatografiniai efektyvumo rodikliai.



13 pav. Greitas ir efektyvus dujų chromatografinis zaleplono ir zopiklono atskyrimas. Pasirinktų jonų chromatograma gauta išanalizavus aukščiausios koncentracijos zaleplono (100,0 ng mL⁻¹) ir zopiklono (200,0 ng mL⁻¹) standartinį tirpalą.

Reagentinių (metano) dujų srauto optimizavimas

Metano dujos yra vienas iš svarbiausių analitinio metodo jautrumą aprašančių parametru. Šiame tyrime buvo optimizuojamas metano dujų srauto efektas, kuris yra tiesiogiai susijęs su parcialiniu reagentinių dujų slėgiu jonų šaltinyje. Metano dujų srautas buvo keičiamas nuo 1,00 iki 3,00 mL min⁻¹. Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, buvo pastebėta, kad tirtų analičių smailių plotai didėjo, didinant metano dujų srautą. Kartu didėjo ir parcialinis reagentinių dujų slėgis jonų šaltinyje, o tai padidina jonizacijos efektyvumą. Analitinis prietaisas dirba efektyviai, kai metano dujų srautas – 2,50 mL min⁻¹. Šis metano dujų srautas leidžia pasiekti maksimalų analitinio metodo jautrumą ir pakankamai gerą abiejų gautų analičių rezultatų pakartojamumą (14 pav.). Daugumoje anksčiau pateiktų analitinių metodų naudojamas 2,00 mL min⁻¹ metano dujų srautas. Mano pasiūlytas metodas leidžia pasiekti iki 1,5 karto didesnius tirtų analičių smailių plotus ir pagerina jautrumą šioms analitėms, kai yra naudojamas 2,50 mL min⁻¹ reagentinių dujų srautas, lyginant su įprastiniu literatūroje naudojamu 2,00 mL min⁻¹ srautu.

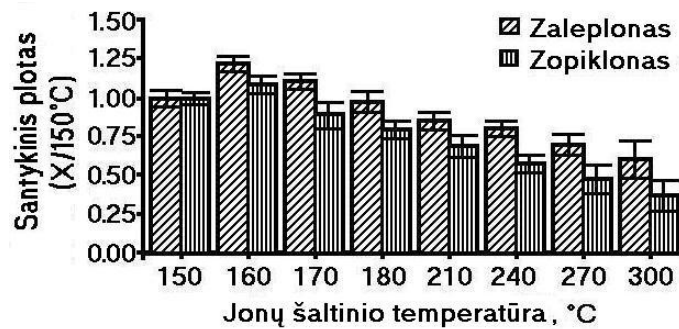


14 pav. Metano dujų srauto įtaka tirtų analičių smailių santykiniams plotams (n=5). Helio dujų srautas – 3,0 mL min⁻¹, jonų šaltinio temperatūra – 160 °C.

Jonų šaltinio temperatūros optimizavimas

Optimali jonų šaltinio temperatūra taip pat gali pagerinti instrumentinio metodo jautrumą. Jonų šaltinio temperatūra šiame darbe buvo optimizuota intervale nuo 150 iki 300 °C. Apibendrinant gautus eksperimentinių tyrimų rezultatus, buvo pastebėta, kad didinant jonų šaltinio temperatūrą didėjo ir nustatomi detektavimo triukšmai visiems analičių jonams. Dėl šios priežasties reikšmingai sumažėjo tirtų analičių smailių plotai. Kai jonų šaltinio temperatūra buvo 160 °C, tirtų analičių signalo ir triukšmo santykiai

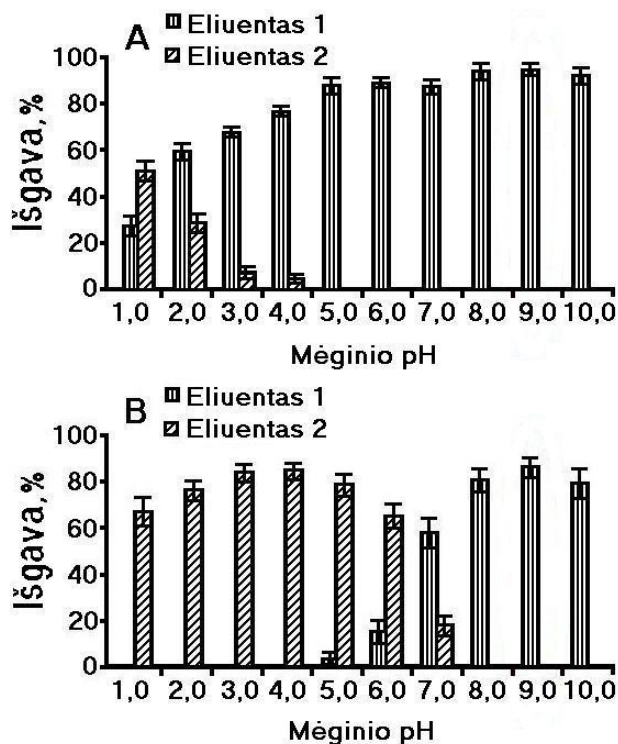
buvo didžiausi. Geriausi tirtų analičių jautrumai ir gautų rezultatų atsikartojamumai buvo gauti, kai jonų šaltinio temperatūra buvo 160 °C (15 pav.).



15 pav. Jonų šaltinio temperatūros įtaka tirtų analičių smailių santykiniam plotams (n=5). Metano dujų srautas – 2,5 mL min⁻¹, helio dujų srautas – 3,0 mL min⁻¹.

KFE metodo tobulinimas zaleplono ir zopiklono nustatymui

Tinkamo sorbento pasirinkimas yra vienas iš svarbiausių KFE metodo tobulinimo žingsnių. Šio sorbento funkcija – efektyviai išskirti tiriamas analites ir patikimai atskirti trukdančias medžiagas iš sudėtingų biologinių terpių. Šiame darbe buvo naudojamas ir taikomas mišraus tipo polimerinis sorbentas (Oasis MCX, 30 mg 1 mL). Vienas iš pagrindinių KFE metodo optimizavimo etapų – mėginio pH parinkimas. Šiam tikslui įgyvendinti buvo paruošti įvairių pH verčių buferiniai tirpalai (nuo pH 1,0 iki pH 10,0). Eksperimentų rezultatai yra pateikti 16 paveiksle.



16 pav. Mėginio pH įtaka tirtų analičių (zaleplono (A) ir zopiklono (B)) ekstrakcijų išgavoms. Pirmas eliuentas – mišinys sudarytas iš n-butilacetato turinčio 20 % 2-propanolio (n=5). Antras eliuentas – mišinys sudarytas iš ACN turinčio 4 % amoniako (n=5). Eliuento tūris – 1,0 mL. Vandeniniai mėginiai buvo žymėti zaleplonu (30,0 ng mL⁻¹) ir zopiklonu (60,0 ng mL⁻¹).

Apibendrinant gautus eksperimentinių tyrimų rezultatus, buvo pastebėta skirtinga tirtų analičių adsorbcija (16 pav.). Kai buvo naudojami rūgštinis (pH 1,0 – 4,0) arba buferinis tirpalai, zopiklonas, kuris yra katijono formoje, buvo adsorbuotas ant mišraus tipo sorbento dėl jonų mainų sąveikų. Deja, zopiklonas gali dalinai hidrolizuotis rūgštinėje aplinkoje ir todėl gali sumažėti ekstrakcijos išgava. Zaleplono adsorbcijos mechanizmas tame pačiame pH intervale kol kas nėra iki galo supastas ir akivaizdu, kad šis mechanizmas yra individualus/skirtingas. Dėl šios priežasties zaleplonas nebuvo atskirtas į vieną frakciją. Kai buvo pasirinktos neutralios arba šiek tiek rūgštinės (pH 5,0 – 7,0) sąlygos, zaleplonas, kuris yra neutralioje formoje, buvo adsorbuotas ant polimerinio sorbento dėl atvirkščiųjų fazių mechanizmo ir buvo pakankamai gerai išekstrahuotas, naudojant 1,0 mL n-butilacetato ir 2-propanolio (80:20 t/t) mišinį. Zopiklonas esant toms pačioms sąlygoms buvo adsorbuotas dėl atvirkščiųjų fazių ir/arba jonų mainų sąveikų ir dėl šios priežasties analizė buvo ekstrahuota dviem žingsniais. Tirtomis sąlygomis zopiklonas buvo dalinai jonizuotas (pK_a 6,79). Kai buvo naudojamas šarminis buferinis tirpalas (pH 8,0 – 10,0), abi tirtos analizės buvo neutralioje formoje ir jos buvo adsorbuotos ant polimerinio sorbento dėl atvirkščiųjų fazių sąveikų. Tirtos analizės buvo sėkmingai išekstrahuotos naudojant 1,0 mL n-butilacetato ir 2-propanolio (80:20 t/t) mišinį. Šios KFE sistemos optimaliausia ir efektyviausia mėginio pH vertė – 9,0. Be to, abi tirtos analizės buvo patikimai išekstrahuotos vienu ekstrakciniu žingsniu.

Dviejų KFE kolonėlių palyginimas

Eksperimentas buvo tęsiamas, siekiant palyginti dvi KFE kolonėles, tai yra, Oasis MCX (sorbentas poli(N-vinilpirolidonas-divinilbenzenas)-SO₃H, 810 m² g⁻¹, 30 mg) ir Oasis HLB (sorbentas poli(N-vinilpirolidonas-divinilbenzenas), 830 m² g⁻¹, 30 mg) bei įvertinti abiejų analičių ekstrakcijų efektyvumus. Apibendrinant gautus eksperimentinius rezultatus, buvo nustatyta, kad abi tirtos analizės buvo gerai adsorbuotos ant abiejų tirtų sorbentų ir pakankamai geras ekstrakcijos efektyvumas buvo pasiektas naudojant žymėtus hemolizuoto kraujo mėginius (2 lentelė). Tirtuose kraujo mėginiuose zaleplono ir zopiklono koncentracija buvo 30,0 ng mL⁻¹ ir 60,0 ng mL⁻¹, o mėginio pH 9,0.

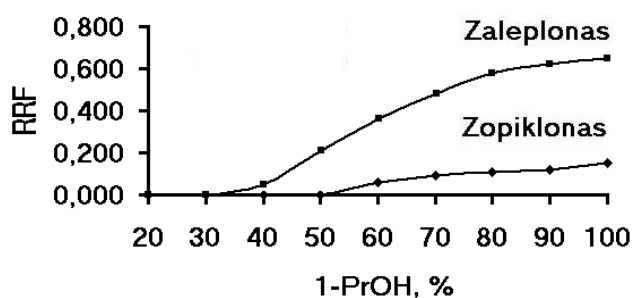
2 lentelė. Dviejų KFE kolonėlių palyginimas (n=5). Abiejų tirtų sorbentų kiekiai po 30 mg. Žymėto hemolizuoto kraujo mėginio pH 9,0.

Analitės	Ekstrakcijos efektyvumas – išgava (Vidutinė vertė ± SN, %)	
	Oasis MCX	Oasis HLB
Zaleplonas	95,5 ± 3,1	94,6 ± 3,4
Zopiklonas	82,7 ± 3,7	83,3 ± 3,9

Tolimesniems optimizavimo tyrimams buvo pasirinktas tinkamas Oasis HLB atvirkščiųjų fazių (hidrofilinis-lipofilinis) sorbentas. Šis sorbentas pasižymi didesniu paviršiaus plotu (iki 830 m² g⁻¹), be to, Oasis HLB tipo sorbento naudojimas žymiai sumažina eksperimento savikainą.

Trukdančių junginių išplovimas iš polimerinio (Oasis HLB) sorbento

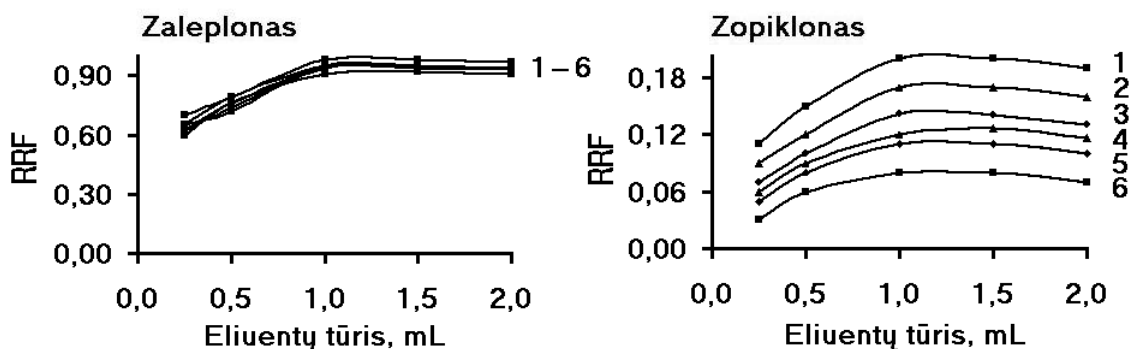
Polimerinio sorbento plovimas prieš galutinį eliuavimo žingsnį yra būtinas. Plovimo metu yra stengiamasi iš sorbento pašalinti hemolizuoto kraujo trukdančias medžiagas ir gauti labai švairius ekstraktus, kurie būtų tinkami analizuoti dujų chromatografijos metodu. Šis eksperimentas buvo atliktas dviem žingsniais: pirmiausia plaunama 0,1 M boratiniu buferiniu tirpalu, kurio pH 9,0, o vėliau organinio tirpiklio mišiniu. Buvo ištirti skirtingi boratinio buferinio tirpalo (pH 9,0) tūriai (nuo 0,5 iki 2,0 mL). Gauti rezultatai parodė, kad daliniam sorbento išplovimui visiškai pakanka 1,0 mL. Toks buferinio tirpalo tūris nesukėlė tirtų analičių praradimo, tačiau trukdantys junginiai buvo nepakankamai pašalinti iš polimerinio sorbento. Vėlesniame plovimo žingsnyje buvo pasirinktas optimizuotas benzodiazepinų nustatymo metodas, kai 1-PrOH buvo naudojamas kaip geriausias sorbento plovimo tirpiklis, todėl antrasis plovimo žingsnis buvo papildomai optimizuotas, naudojant 1-PrOH ir šarminio vandens (0,1 % amoniako) mišinius. Gauti eksperimentų rezultatai parodė, kad optimalus 1-PrOH kiekis mišinyje yra 30 % ir esant šiam 1-PrOH kiekiui buvo registruojami minimalūs tirtų analičių praradimai (17 pav.). Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, buvo pastebėta, kad kompleksiskai naudojant du plovimo žingsnius KFE sistemoje buvo pašalintos neutralios kilmės trukdančios medžiagos ir gauti vizualiai švarūs ekstraktai.



17 pav. Polimerinio sorbento plovimo įtaka tirtų analičių (zaleplono ($30,0 \text{ ng mL}^{-1}$) ir zopiklono ($60,0 \text{ ng mL}^{-1}$)) smailių santykiniams plotams ($n=5$). Sorbentas plautas ekstrakciniais mišiniais, kurie buvo sudaryti iš šarminio vandens (0,1 % amoniako) ir 1-PrOH. Mišinio bendras tūris – 1,0 mL, žymėto hemolizuoto kraujo mėginio pH 9,0.

Abiejų analičių eliuavimas iš polimerinio (Oasis HLB) sorbento

Geras, stiprus eliuentas turėtų pakankamai gerai išekstrahuoti analites, naudojant pakankamai mažą eliuento tūrį. Kita vertus, stiprus eliuentas gali papildomai išekstrahuoti labai daug trukdančių junginių. Dėl šios priežasties galutinis KFE žingsnis buvo optimizuojamas, keičiant įvairius ekstrakcinės prigimties organinius tirpiklius. Optimizuojant KFE sistemą buvo ištirti skirtingo poliškumo organiniai tirpikliai, pavyzdžiui, MeOH, ACN, etilacetatas, n-butilacetatas, dichlormetanas, arba toluenas, keičiant šių tirpiklių tūrį intervale nuo 0,25 iki 2,0 mL (18 pav.).



18 pav. Eliuentų tūrio įtaka tirtų analičių (zaleplono ($30,0 \text{ ng mL}^{-1}$) ir zopiklono ($60,0 \text{ ng mL}^{-1}$)) smailių santykiniams plotams ($n=5$). Žymėto hemolizuoto kraujo mėginio pH 9,0. Skaičius: 1 – n-butilacetatas; 2 – toluenas; 3 – dichlormetanas; 4 – etilacetatas; 5 – ACN; 6 – MeOH.

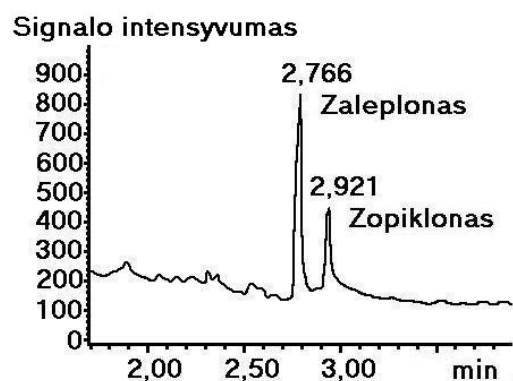
Apibendrinant gautus eksperimentinių tyrimų rezultatus, buvo nustatyta, kad visi organiniai eliuantai efektyviai išekstrahuoja zaleploną, kai tirtų eliuentų tūris 1,0 mL. Tačiau, poliniai eliuantai – MeOH arba ACN – nėra tinkami, nes kartu su analitėmis išekstrahuoja daug trukdančių junginių. Be to, buvo nustatyta nepakankama zopiklono išgava (iki 36,0 % ($n=5$)), kai analitės koncentracija buvo $60,0 \text{ ng mL}^{-1}$. Vadinasi, šie poliniai tirpikliai buvo netinkami abiejų analičių ekstrakcijai tirti.

Tolimesniame eksperimente abi analitės buvo išekstrahuotos su etilacetatu, n-butilacetatu, dichlormetanu, toluenu, arba šių eliuentų mišiniais, kuriuose yra 2-propanolio (80:20 t/t). Eksperimento rezultatai parodė, kad, naudojant šiuos eliuentus, buvo gauti šiek tiek mažesni zopiklono ($\leq 67,5\%$) ekstrakcijos efektyvumai, lyginant su mišiniu, kuris buvo sudarytas iš n-butilacetato ir 2-propanolio (80:20 t/t) (3 lentelė). Be to, vizualiai švarūs ekstraktai buvo gauti naudojant šiuos nepolinius eliuentus, arba jų mišinius.

3 lentelė. Ekstrahento prigimties įtaka tirtų analičių (zaleplono ($30,0\text{ ng mL}^{-1}$) ir zopiklono ($60,0\text{ ng mL}^{-1}$)) ekstrakcijų išgavoms ($n=5$). Eliuentų tūris – $1,0\text{ mL}$. Žymėto hemolizuoto kraujo mėginio pH $9,0$.

Ekstrahentai	Išgava (Vidutinė vertė \pm SN, %)	
	Zaleplonas	Zopiklonas
Etilacetatas	$94,50 \pm 2,63$	$36,83 \pm 2,61$
Etilacetatas – 2-propanolis (80:20 t/t)	$84,67 \pm 3,52$	$47,17 \pm 3,15$
N-butilacetatas	$93,52 \pm 2,42$	$66,67 \pm 2,68$
N-butilacetatas – 2-propanolis (80:20 t/t)	$94,07 \pm 3,20$	$83,04 \pm 3,55$
Dichlormetanas	$93,26 \pm 5,06$	$40,74 \pm 4,72$
Dichlormetanas – 2-propanolis (80:20 t/t)	$95,70 \pm 3,89$	$67,52 \pm 4,57$
Toluenas	$97,24 \pm 2,59$	$43,31 \pm 3,78$
Toluenas – 2-propanolis (80:20 t/t)	$85,36 \pm 3,31$	$61,19 \pm 3,09$

Tolimesniems tyrimams – metodo patvirtinimui buvo naudojamas n-butilacetato ir 2-propanolio (80:20 t/t) mišinys, kuris leido pasiekti pakankamai geras tirtų analičių ekstrakcijos išgavas. Šiuos pasiekimus atspindi tipinė pasirinktų jonų chromatograma, kuri buvo gauta išekstrahavus kraujo mėginį, kuriame buvo abi tirtos analitės (19 pav.). Gauta chromatograma parodė, kad abi tirtos analitės buvo atskirtos viena nuo kitos ir trukdančios medžiagos neužkirto kelio šių analičių nustatymui.



19 pav. Pasirinktų jonų chromatograma gauta atlikus žymėto hemolizuoto kraujo mėginio ekstrakciją, kai zaleplono ($1,0\text{ ng mL}^{-1}$) ir zopiklono ($2,0\text{ ng mL}^{-1}$) koncentracijos yra ties kiekybine metodo nustatymo riba.

KFE metodo patvirtinimas abiejų analičių nustatymui hemolizuotame kraujyje

Nustačius pagrindines ekstrakcijos sąlygas, naujas KFE metodas buvo pilnai patvirtintas. Vidutinė ekstrakcijos išgava buvo didesnė nei 90,1 % zaleplonui ir 82,9 % zopiklonui. Metodo atsikartojamumas svyravo nuo 3,04 iki 10,58 % zaleplonui ir nuo 4,08 iki 9,52 % zopiklonui. Metodo tikslumas zaleplonui ir zopiklonui buvo intervaluose nuo -5,73 iki 6,00 % ir nuo -7,00 iki 6,32 %. Eksperimentų rezultatai parodė, kad polimerinis sorbentas Oasis HLB turi daug privalumų nustatant naujos kartos analites iš biologinių terpių, nes pasižymi geru rezultatų atsikartojamumu, atrankumumu ir ypatingu jautrumu (kiekybinio nustatymo riba $\leq 2 \text{ ng mL}^{-1}$) naudojant mažą mėginio kiekį.

Parengta metodika buvo pritaikyta minėtų analičių nustatymui realiuose mėginiuose – žmogaus hemolizuotame kraujyje – tirti. Apibendrinus galima teigti, kad naujas KFE-DCh/NCJ-MS metodas yra tikslus, jautrus ir atrankus bei tinkamas abiejų analičių nustatymui.

IŠVADOS

1. Optimizuojant derivatizacijos sąlygas nustatyta, kad benzodiazepinų molekulės derivatizuotos MTBSTFA pasižymi didžiausiu jautrumu, gautų rezultatų atkuriamumu analizuojant DCh/NCJ-MS metodu. Nustatyta, kad MTBSTFA derivatizuotų benzodiazepinų dujų chromatografinis smailių efektyvumas didesnis negu naudojant MSTFA ir BSTFA derivatizacijos reagentus. Geriausi analizės rezultatai buvo gauti derivatizacijai naudojant MTBSTFA:acetonitrilo:etilacetato (20:40:40 (t/t/t)) mišinį, kai temperatūra 85 °C ir trukmė 30 min.
2. Sukurti jautrūs, atrankūs analičių nustatymo DCh/NCJ-MS metodai, kai chromatografinis 15 benzodiazepinų bei zaleplono ir zopiklono atskyrimas ir nustatymas atliekamas optimaliomis sąlygomis per 3,90 ir 3,89 min. Šie metodai pasižymi simetriškomis visų nustatomų analičių smailės formomis ir minimaliais pločiais, taigi jie užtikrina didelį analizės našumą ir mažą analizės savikainą.
3. KFE metodas buvo pirmą kartą panaudotas optimizuojant mėginio paruošimą esant pH 1,0. Ekstraktai, gauti benzodiazepinus adsorbavus ant jonų mainų fazės sorbento ir praplovus trimis tirpalais (0,1 M HCl, pH 1,0; 1-propanolio ir 0,15 M HCl mišiniu (60:40 t/t); acetonitrilu), vizualiai buvo švaresni lyginant su ekstraktais gautais naudojant atvirkščiųjų fazių sąveikas, kai mėginio yra pH 9,0. Naudojant mišraus tipo sorbentą, benzodiazepinai buvo sėkmingai išgauti naudojant 2,0 mL 5 % (t/t) amoniako tirpalą metanolyje.
4. Sukurtas KFE-DCh/NCJ-MS metodas buvo pilnai patvirtintas benzodiazepinų nustatymui vienos analizės metu. Kraujo mėginyje esančių benzodiazepinų aptikimo ir nustatymo ribos buvo 0,24 – 0,62 ng mL⁻¹ ir 0,72 – 1,89 ng mL⁻¹. Tyrimo metu naudojamų trijų kokybės kontrolės mėginių tikslumas buvo nuo 89,5 iki 110,5 %, o metodo atsikartojamumo santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo mažesni nei 7,0 %.
5. Apie 1,5 karto jautresnis zaleplono ir zopiklono nustatymas DCh/NCJ-MS metodu buvo pasiektas naudojant 2,50 mL min⁻¹ metano reagentinių dujų srautą ir 160 °C jonų šaltinio temperatūrą. Zaleplono ir zopiklono adsorbcija ant mišraus tipo KFE sorbento priklausė nuo mėginio pH, kuris kito pH 1,0 – 10,0 ribose bei nuo skirtingų tirtų analičių pK_a verčių. Iširtos analizės gerai adsorbavosi ant Oasis MCX ir Oasis HLB sorbentų dėl atvirkščiųjų fazių sąveikų, esant mėginio pH 9,0. Pakankamai geri (iki 82,7 %)

ekstrakcijos efektyvumai buvo pasiekti naudojant 1,0 mL n-butilacetato ir 2-propanolio (80:20 t/t) mišinį.

6. Pilnai patvirtintas KFE-DCh/NCJ-MS metodas pasižymėjo dideliu jautrumu zaleplono ir zopiklono nustatymui hemolizuotame kraujyje. Kiekybinio nustatymo riba buvo 1,00 ng mL⁻¹ zaleplonui ir 2,00 ng mL⁻¹ zopiklonui. Vidutinė ekstrakcijos išgava buvo didesnė nei 90,1 % zaleplonui ir 82,9 % zopiklonui. Metodo atsikartojamumas svyravo nuo 3,04 iki 10,58 % zaleplonui ir nuo 4,08 iki 9,52 % zopiklonui. Metodo tikslumas buvo nuo -5,73 iki 6,00 % zaleplonui ir nuo -7,00 iki 6,32 % zopiklonui.

7. Sukurti KFE-DCh/NCJ-MS metodai buvo sėkmingai pritaikyti benzodiazepinų, zaleplono ir zopiklono likučių nustatymui realiuose mėginiuose po vienkartinio geriamojo vaisto pavartojimo, esant klinikiniais ir teismo medicininiais atvejams.

**AUTORIAUS MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO
DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS**

Moksliniai straipsniai:

1. **N. Karlonas**, A. Padarauskas, A. Ramanavicius, Z. Minkuviene, A. Ramanaviciene. Rapid and highly sensitive determination of clonazepam and 7-aminoclonazepam in whole blood using gas chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Chemija* 23 (2012) 91-99, ISSN 0235-7216.
2. **N. Karlonas**, A. Padarauskas, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in whole blood using rapid GC with negative-ion chemical ionization MS. *Journal of Separation Science* 36 (2013) 1437-1445, ISSN 1615-9306.
3. **N. Karlonas**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Development of an SPE method for the determination of zaleplon and zopiclone in hemolyzed blood using fast GC with negative-ion chemical ionization MS. *Journal of Separation Science* 37 (2014) 551-557, ISSN 1615-9306.

Mokslinių konferencijų tezių sąrašas:

1. **N. Karlonas**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. Gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry for the determination of diazepam, nordiazepam, oxazepam and temazepam in whole blood. Theses of The conference of Chemistry and Technology of Inorganic materials, Kaunas, Kaunas University of Technology, 27 April 2011, p. 71 - 73, ISBN 978-9955-25-981-7.
2. **N. Karlonas**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. High sensitive analysis method for the determination of alprazolam, midazolam and their α -hydroxy metabolites in blood, using gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. 10th International Conference of Lithuanian Chemists, Chemistry 2011, Vilnius, Lithuanian Academy of Sciences, 14 October 2011, p. 63, ISBN 978-9955-634-65-2.
3. **N. Karlonas**, Z. Minkuviene, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Separation and sample pretreatment analysis of 15 benzodiazepines in whole blood using GC/NICI-MS. 6th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign, Kaunas, Vytautas Magnus University, 1 - 4 June 2012, p. 27.

- 4. N. Karlonas**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Development of a mixed-mode solid phase extraction for a multi-residue analysis of 15 benzodiazepines in blood by rapid gas chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. 7th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign, Kaunas, Vytautas Magnus University, 16 - 19 May 2013, p. 39, ISSN 2335-8653.
- 5. N. Karlonas**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. Development of a mixed-mode cation-exchange polymeric sorbent assay for the determination of zopiclone in biological matrices using fast gas chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. 11th International Conference of Lithuania's Chemists, Vilnius, Institute of Chemistry, 27 September 2013, p. 27, ISBN 978-609-95511.
- 6. N. Karlonas**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. Simultaneous determination of benzodiazepines in biological matrices using a mixed-mode cation-exchange polymeric sorbent and fast gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. 18th International Scientific Conference, EcoBalt 2013, Vilnius, Vilnius University, 25 - 27 October 2013, p. 28, ISBN 978-609-459-241-6.
- 7. N. Karlonas**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Validation of a mixed-mode solid phase extraction method for the determination of benzodiazepines and their metabolites in whole blood. International Conference of Lithuanian Chemical Society, Chemistry and Chemical Technology 2014, Kaunas, Kaunas University of Technology, 25 April 2014, p. 24 - 26, ISSN 2351-5643.
- 8. N. Karlonas**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Comparison of two SPE sorbents for a residue analysis of zaleplon and zopiclone by fast gas chromatography technique. 8th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign, Kaunas, Vytautas Magnus University, 15 - 16 May 2014, p. 84, ISSN 2335-8653.

CURRICULUM VITAE

Nerijus Karlonas

Vilniaus universitetas, chemijos fakultetas

Analizinės ir aplinkos chemijos katedra

Naugarduko 24, LT-03225 Vilnius, Lietuva

nerijuskarlonas@yahoo.com

Gimimo data

1982 m. liepos 6 d., Varėna

Mokymas ir mokslinė kvalifikacija

2001 – 2005 bakalauro studijos Vilniaus universitete chemijos fakultete, suteiktas chemijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis;

2005 – 2007 magistro studijos Vilniaus universitete chemijos fakultete, suteiktas chemijos magistro kvalifikacinis laipsnis;

2011 – 2014 doktorantūros studijos Vilniaus universitete chemijos fakultete analizinės ir aplinkos chemijos katedroje.

Užimtumas ir pareigos

2003 – 2004 UAB “Žemaitijos Pienas”, chemijos laboratorija, laborantas, Vilnius, Lietuva;

2004 – 2007 Nacionalinė veterinarijos laboratorija, cheminių tyrimų skyrius, chemikas-inžinierius, Vilnius, Lietuva;

2007 – 2009 Mykolo Romerio universitetas teismo medicinos institutas, toksikologijos laboratorija, teismo medicinos ekspertas, Vilnius, Lietuva;

2009 – Valstybinė teismo medicinos tarnyba prie LR Teisingumo ministerijos, toksikologijos laboratorija, teismo medicinos ekspertas, Vilnius, Lietuva.

SUMMARY IN ENGLISH

A sensitive and selective method for simultaneous quantitation and identification of 15 benzodiazepines in human whole blood using fast gas chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry was investigated. A derivatization step using different silylation reagents, time, and temperature was tested. Extracts were silylated at 85 °C for 30 min using a mixture of N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide, acetonitrile, ethyl acetate (at 20:40:40 v/v/v) and subjected to gas chromatographic analysis. A mixed-mode Oasis MCX column was used for solid phase extraction. To the best of my knowledge, this solid phase extraction method has been used for the first time for the optimization of sample preparation at pH 1.0. Different extraction solvents or mixtures of solvents of different compositions for elution of the adsorbed analytes, and washing steps for eliminating interferences in the column were tested. The analytes were eluted from the column using 5 % (v/v) NH₄OH in methanol. The complete method for determination of benzodiazepines in blood was validated following the recommendation for new methods. The limits of detection of 15 benzodiazepines in whole blood samples ranged from 0.24 to 0.62 ng mL⁻¹. The relative standard deviations of samples used for three different quality control concentration levels were lower than 7.0 %, and the accuracy ranged from 89.5 to 110.5 %. The presented method has several advantages of elimination of interferences, a multi-residue analysis, and very fast chromatographic separation of the analytes. Finally, the applicability of this method for determination of trace concentrations of several benzodiazepines in real blood samples was demonstrated.

A solid phase extraction method for determination of zaleplon and zopiclone in human hemolyzed blood using fast gas chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry was investigated and validated. Furthermore, the sensitivity of the analytical method was examined by optimising various negative-ion chemical ionization mass spectrometry parameters, including the methane reagent gas flow rate and ion source temperature. About 1.5 times higher sensitivity of the analytical method was achieved using 2.50 mL min⁻¹ methane reagent gas flow rate and 160 °C ion source temperature. To the best of my knowledge, this solid phase extraction method has

been used for the first time for the optimization of sample preparation at different pH values (pH 1.0 – 10.0) using a mixed-mode Oasis MCX column. However, both analytes were well retained on Oasis MCX and Oasis HLB columns, also sufficient extraction efficiency was achieved at pH 9.0. For further study a hydrophilic-lipophilic sorbent Oasis HLB was selected due to the polarity of sorbent surface and its large surface area ($830 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) in order to achieve efficient extraction of both analytes in a single step. Special attention was paid to choosing washing and eluting solvents, resulting in a particularly/extremely clean and moisture free extract. I have described a fully validated method for the determination of both analytes in blood. The mean extraction efficiency was higher than 90.1 % for zaleplon, and 82.9 % for zopiclone. The precision for zaleplon and zopiclone was between 3.04 – 10.58 % and 4.08 – 9.52 %, respectively. The accuracy was in the range from -5.73 to 6.00 %, and from -7.00 to 6.32 % for zaleplon and zopiclone, respectively. The developed method shows high sensitivity and specificity towards analytes present in blood.