

Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline iz uzoraka salive

**Biljana Otašević, Ana Protić*, Jelena Golubović, Mira Zečević,
Milica Cerović, Ljubica Bralović**

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*Autor za prepisku, e-mail: anna@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

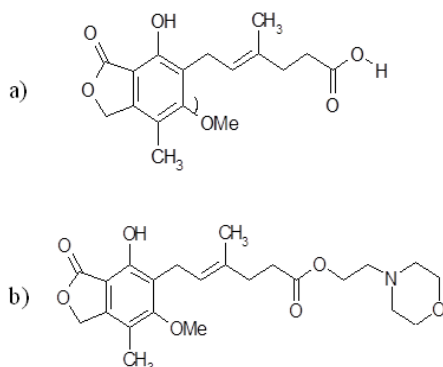
Farmakološki efekti leka direktno zavise od koncentracije leka u plazmi, odnosno njegove slobodne frakcije. Kod određenih lekova, kao što je imunosupresiv mikofenolna kiselina, smanjenje koncentracije dovodi do izostanka terapijskog efekta, dok povećanje koncentracije može dovesti do toksičnih efekata. Ozbiljni neželjeni efekti mogu dovesti do fatalnih ishoda, bilo da se radi o odbacivanju transplantiranog organa ili ozbiljnom oštećenju bubrega i jetre. Iz tog razloga potrebno je sprovoditi stalno praćenje nivoa mikofenolne kiseline u krvi. Imajući u vidu učestalost uzorkovanja, dostupnost i neinvazivan način sakupljanja, saliva ima prednost nad plazmom zbog čega se u skorije vreme sve više koristi kao uzorak. Međutim, zbog brojnih interferirajućih endogenih supstanci, nečistoća i viskoznosti, salivu je neophodno prethodno obraditi za kvalitativno i kvantitativno praćenje mikofenolne kiseline UPLC metodom. U ovom radu je opisana upotreba čvrsto-tečne ekstrakcije kao metode izbora za pripremu uzoraka salive. Pošto na efikasnost ekstrakcije utiču različiti eksperimentalni uslovi koje je potrebno strogo kontrolisati, predložen je protokol koji podrazumeva: kondicioniranje polimernog kertridža za čvrsto-tečnu ekstrakciju metanolom i vodom, nanošenje uzorka zajedno sa 0,1 % mravljom kiselinom, ispiranje kertridža vodom i eluiranje mikofenolne kiseline smešom acetonitrila i 0,2 % mravlje kiseline.

Ključne reči: mikofenolna kiselina, saliva, uzorkovanje, priprema uzorka, čvrsto-tečna ekstrakcija.

1. Uvod

1.1 Značaj terapijskog praćenja mikofenolne kiseline

Mikofenolna kiselina je imunosupresiv koji se koristi nakon transplantacije organa, najčešće bubrega, srca i jetre, kao i u terapiji nekih autoimunih bolesti (reumatoidnog artritisa, lupusa nefritisa, nekih dermatoloških oboljenja, vaskulitisa). Iako je mikofenolna kiselina aktivni princip, u cilju poboljšanja resorpcije u terapiji se koristi u obliku estera, mikofenolat mofetila (Slika 1). Mikofenolat mofetil se kompletno resorbuje nakon *per os* primene i pod dejstvom esteraza hidrolizuje do aktivnog oblika. Oslobođena kiselina se dalje metaboliše do fenil- i acil-glukuronida mikofenolne kiseline koji se eliminišu iz organizma putem urina, a samo malim delom (6 %) se izlučuju putem stolice. Mikofenolna kiselina selektivno inhibira proliferaciju T- i B-limfocita tako što se vezuje za enzim inozin monofosfat dehidrogenazu (za mesto za koje se vezuje nikotinamid) i tako selektivno, reverzibilno i nekompetitivno inhibira ovaj enzim. Pošto je enzim inozin monofosfat dehidrogenaza uključen u *de novo* sintezu purina, ova inhibicija ima za posledicu izostanak proliferacije [1, 2].



Slika 1. Hemijska struktura mikofenolne kiseline (a) i mikofenolat mofetila (b)

Figure 1. Chemical structure of mycophenolic acid (a) and mycophenolate mofetil (b)

Mikofenolna kiselina se visokim procentom vezuje za proteine plazme, albumine (više od 95 %), a za efekte je odgovoran mali procenat slobodne frakcije leka. Predoziranje lekom dovodi do povećane nefrotoksičnosti, a subdoziranje do odbacivanja transplantata. Vezivanje za proteine podleže varijabilnostima u populaciji zbog genetike, zdravstvenog stanja pacijenta ili primene drugih lekova koji se kompetitivno vezuju za albumine. Metabolizam mikofenolne kiseline, takođe, podleže interindividualnim varijabilnostima zbog postojanja genetskog polimorfizma. Kod

pacijenata sa ozbiljnom bubrežnom disfunkcijom dolazi do smanjenja procenta vezane frakcije leka pa slobodna frakcija dramatično raste, kao i potencijal ispoljavanja neželjenih efekata [1–3]. Iz navedenog, jasna je značajnost terapijskog praćenja i određivanja koncentracije mikofenolne kiseline u plazmi.

Pregledom literature pronađene su metode koje koriste plazmu kao biološki materijal prilikom određivanja mikofenolne kiseline [2, 4]. Međutim, zbog učestalosti uzorkovanja krvi i invazivnosti postupka venopunkcije, plazma ne predstavlja najpogodniji biološki materijal za terapijsko praćenje leka, posebno kod dece, pacijenata sa nepristupačnim venama i malokrvnih pacijenata. Ni urin ne bi bio pogodan biološki materijal jer mikofenolnu kiselinu koristi populacija sa kompromitovanom funkcijom bubrega i, posledično, izlučivanje leka i metabolita je podložno varijacijama.

Prema najnovijim istraživanjima, saliva se može koristiti kao biološki materijal za terapijsko praćenje mikofenolne kiseline. Iako je u kliničkoj praksi materijal izbora i dalje plazma, mogućnost korišćenja salive je posebno značajna jer ona predstavlja prirodni ultrafiltrat plazme i praktično je deproteinizovana tečnost (procenat proteina manji od 1 %) u kojoj se nalazi samo nevezan lek. U isto vreme, koncentracija leka u salivi je u dobroj korelaciji sa koncentracijom slobodne frakcije leka u krvi [4, 5].

1.2. Upotreba salive kao biološkog materijala

Saliva predstavlja jedinstven prostor za distribuciju lekova i na njoj su primenljivi mnogi opšti principi koji regulišu kretanje lekova u organizmu. U idealnoj situaciji, postoji konstantan odnos nivoa leka u salivi i plazmi koji je nezavisan od koncentracije leka i koji ne pokazuje interindividualne razlike. Najvažnije osobine lekova koje regulišu penetraciju leka u salivu su molekulska veličina, lipofilnost, pKa i vezivanje za proteine plazme. Osnovni fiziološki faktori su pH vrednosti pljuvačke, njen protok i patofiziološko stanje usne duplje. Farmakokinetički modeli za distribuciju lekova u salivu, koji obuhvataju većinu ovih faktora, zasnovani su na osnovnim principima klirensa organa i protoka salive uzimajući u obzir stepen vezivanja za proteine plazme i *Henderson-Hasselbalch*-ovu jednačinu za pH/pKa efekte. Slabe baze su najmanje pouzdane za monitoring iz salive jer su osetljive na uticaj pH. Neutralne komponente su najpouzdanije i koncentracija ovih, kao i mnogih slabo kiselih lekova, odražavaće vrednost lekova u plazmi. Promene u protoku pljuvačke, vremenu uzorkovanja i neke patofiziološke promene ispitanika mogu zakomplikovati upotrebu salive u terapijskom praćenju i upotrebu u farmakokinetičkim studijama [6–10].

Adekvatno merenje protoka i sastava salive ključno je za mnoge dijagnostičke, eksperimentalne i kliničke protokole. Saliva se može sakupljati pod stimulisanim ili nestimulisanim uslovima. Stimulacija protoka salive može se vršiti raznim agensima od kojih se gustatorni i mastikatorni stimuli najčešće koriste za ubrzanje protoka.

Najčešće korišćeni stimuli su parafin, žvakaće gume i limunska kiselina dok se farmakološki i električni stimulansi koriste za tretman pacijenata kod kojih je protok salive usporen. Nestimulisana saliva je ona koja se sakuplja bez stimulacije.

Saliva može biti sakupljena kao ukupna ili se može sakupljati pojedinačno sa svake pljuvačne žlezde. Ukupna saliva je proizvod rada svih žlezda dok pojedinačna saliva može biti sakupljena direktno iz parotidne, submandibularne ili sublingvalne žlezde. Saliva sakupljena iz pojedinačnih žlezda je u prednosti u odnosu na ukupnu salivu jer ne sadrži elemente koji se obično nalaze u ukupnoj salivi kao što su ostaci epitelnih ćelija, hrane, bakterije, leukociti. Ali, ukoliko je potrebno utvrditi rad svih pljuvačnih žlezda, ukupna saliva je bolji izbor, klinički je relevantnija i znatno se češće sakuplja [6–10].

Protok salive pokazuje značajne inter-individualne kao i intra-individualne razlike u određenim situacijama, pa je stoga potrebno standardizovati metode za prikupljanje salive. Nestimulisani protok je pod uticajem mnogih faktora, od kojih je stepen hidratacije najznačajniji. Potvrđeno je da gubitak telesne tečnosti od 8 % dovodi do 100 % smanjenja protoka salive. Hiperhidratacija, izlaganje svetlosti, mirisni stimulansi i položaj tela, takođe, mogu uticati na protok. Uočeno je da, ukoliko se saliva uzorkuje od pacijenata koji stoje, protok će biti veći, dok je u ležećem položaju protok manji. Ispitanici bi trebalo da ne puše, i ne unose hranu i piće 1-2 časa pre uzorkovanja. Pre samog uzorkovanja, usnu duplju bi trebalo isprati dejonizovanom vodom. Salivu treba prikupljati u sedećem položaju, glavu nagnuti napred i otvoriti oči. Neophodan je period mirovanja od 5 minuta u takvom položaju sa minimalnim pokretima lica [6–10].

Treba naglasiti da protok i sastav salive takođe zavise i od dnevnih i sezonskih promena. Protok parotidne žlezde dostiže svoj maksimum u zimskom periodu, dok ukupni protok podleže cirkardijalnom ritmu i dostiže maksimum u popodnevnom časovima. Stanje pacijenta i upotreba lekova može uticati na protok i sastav salive. Kada se vrši sakupljanje stimulisane salive, faktori kao što su vreme stimulacije, priroda stimulansa koji se koristi i veličina pljuvačnih žlezda utiču na sastav i brzinu protoka [6–10]. Zbog potencijalnih interferencija svih pomenutih faktora, trebalo bi standardizovati vreme i način sakupljanja salive kako bi se izbegli uticaji na rezultate studija.

1.3. Priprema uzoraka primenom čvrsto-tečne ekstrakcije

Analiza uzoraka je neophodna u terapijskom praćenju lekova, a obično sadrži pet faza: uzorkovanje, priprema uzorka, separacija (razdvajanje), određivanje (kvalitativna i kvantitativna analiza) i analiza podataka. Svaka faza je bitna za dobijanje pouzdanih rezultata, ali uzorkovanje i priprema uzoraka su ključne komponente analitičkog procesa. Na ove dve faze se potroši preko 80 % vremena u sprovođenju analize. Sve

faze su uzastopne i ako se jedna od ovih faza ne izvede na pravi način, učinak postupka će biti loš i dovešće do nepouzdanih rezultata [11–14].

Čvrsto-tečna ekstrakcija (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) je separaciona metoda pogodna za izolovanje analita, njihovo koncentrisanje i prečišćavanje. To je tehnika zasnovana na selektivnoj raspodeli jedne ili više komponenti između dve faze, od kojih je jedna čvrsti sorbens, a druga faza je tečnost, mada može biti i emulzija, gas ili superkritični fluid. Pri procesu čvrsto-tečne ekstrakcije dolazi do retencije analita (postupak sa retencijom analita) ili interferencije (postupak bez retencije analita) na sorbensu. Mehanizmi su različiti i zavise od karakteristika sorbensa i analita. Da bi retencija analita bila kvantitativna i reproduktivna, potrebno je podesiti i kontrolisati eksperimentalne parametre koji utiču na efikasnost čvrsto-tečne ekstrakcije.

Izbor SPE sistema zavisi od osobina analita i sorbensa. U odnosu na polarnost analita i sorbensa, SPE metoda može biti:

1. Normalno fazna (eng. *Normal Phase*, NP) SPE: koristi se kada je analit polaran; bira se polaran sorbens, a interakcija koja se odvija između analita i sorbensa može biti vodonična veza, dipol-dipol interakcija ili π - π interakcija.
2. Reverzno fazna (eng. *Reversed Phase*, RP) SPE: primenjuje se kada je analit nepolaran ili slabo polaran; bira se nepolarni sorbens, a interakcije koje se ostvaruju na međufazi su *Van der Waals*-ove (particione, hidrofobne).
3. Jonoizmenjivačka SPE: može biti anjonska i katjonska; mehanizam retencije zasniva se na elektrostatičkom privlačenju između funkcionalnih grupa analita i sorbensa; za interakciju je neophodno da funkcionalne grupe analita budu u jonizovanom obliku što se postiže podešavanjem pH vrednosti uzorka, a u zavisnosti od pKa analita i sorbensa.

Osim strukture i osobina ciljanog molekula, prilikom izbora sorbensa bitna je i priroda uzorka. Uzorak za SPE može da bude u obliku vodenog rastvora ili rastvora u organskom rastvaraču. Ukoliko je uzorak vodeni rastvor, ciljani analit u njemu može biti prisutan u jonizovanom ili nejjonizovanom obliku. Kada je ciljani analit nejjonizovan, adekvatan izbor je RP-SPE. Ukoliko je analit jonizovan, pogodna je jonoizmenjivačka SPE. Zavisno od toga kako ciljani analit jonizuje, biraju se jak katjonski ili anjonski izmenjivač za analit koji slabo jonizuje, odnosno slab katjonski ili anjonski izmenjivač za analit koji jako jonizuje. Ukoliko je uzorak u obliku rastvora u organskom rastvaraču, zavisno od polarnosti može se primeniti NP-SPE ili RP-SPE, a ukoliko je analit jonizovan, primenjuje se jonoizmenjivačka SPE [11–14].

Mehanizmi retencije zavise od karakteristika sorbensa i mogu biti zasnovani na principima jednostavne adsorpcije, građenja kompleksa, građenja jonskih parova ili jonske izmene. Da bi retencija ciljanog analita bila efikasna, interakcija sorbensa sa

analitom mora biti znatno jača od svih interakcija ciljanog analita sa komponentama matriksa. Na efikasnost SPE utiče i kapacitet sorbensa, jačina interakcije sa analitom, zatim, vrsta rastvarača, temperatura i način ekstrakcije. U zavisnosti od složenosti uzorka, postoji mogućnost upotrebe kombinovanih sorbensa različitih mehanizama retencije. U novije vreme u upotrebi su polimerni sorbensi većih kapaciteta i bolje selektivnosti.

Osnovni zahtev pri izboru sorbensa za SPE je da dobijena *Recovery* vrednost bude reproduktivna pri svakom analiziranju. Izvođenje SPE se definiše protokolima kako bi prinos ekstrakcije bio što veći. Postupak SPE sastoji se od sledeća četiri koraka:

1. Kondicioniranje: izvodi se propuštanjem rastvarača ili smeše rastvarača kroz kertridž, čime je omogućeno njegovo aktiviranje.
2. Nanošenje uzorka: propuštanjem uzorka u kome se nalazi analit dolazi do vezivanja komponenti iz matriksa za sorbens.
3. Ispiranje: cilj ove faze je da se odstrane komponente matriksa, a da analit ostane vezan za sorbens.
4. Eluiranje: koristi se rastvarač koji ima jaku eluacionu moć, odnosno sposobnost da raskine veze između analita i sorbensa. Zapremina rastvarača treba da bude takva da se uz minimalno razblaženje dobijaju reproduktivne *Recovery* vrednosti. Takođe, brzina protoka rastvarača može uticati na reproduktivnost eluiranja [11–14].

2. Eksperimentalni deo

2.1. Hemikalije i reagensi

Referentni standard mikofenolne kiseline i mikofenolat mofetila dobijeni su od Sigma Aldrich. Za hromatografsku analizu korišćen je acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich) i mravlja kiselina HPLC čistoće (Merck), a tokom ekstrakcije metanol i amonijum hidroksid *pro analysi* čistoće (Centrohem).

2.2. Uređaji i eksperimentalni uslovi

Za hromatografsku analizu korišćen je tečni hromatograf UPLC Accela, Thermo Scientific opremljen autosamplerom, UV/VIS *photo-diode array* detektorom i degazerom kao i hromatografska kolona Hypersil Gold (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm veličine čestica), Thermo Scientific. Za prečišćavanje vode korišćen je Simplicity 185 sistem (Millipore). Hromatografsku mobilnu fazu predstavljala je smeša acetonitril - mravlja kiselina (0,1 % vodeni rastvor) pripremljena u odnosu 30:70 (V/V) i propuštana pri protoku od 350 $\mu\text{L min}^{-1}$. Mobilna faza je pre upotrebe filtrirana kroz najlonske

membranske filtere veličine pora 0,45 μm Agilent Technologies. Temperatura kolone je podešena na 25 °C dok je detekcija vršena na talasnoj dužini od 254 nm. Injekciona zapremina je bila 5 μL .

Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije je izvođen pomoću Phenomenex komore za ekstrakciju i Phenomenex kertridža Strata X 33u Polymeric Reversed Phase 60 mg / 3 mL.

2.3. Priprema rastvora

2.3.1. Priprema rastvora referentnih standarda

Osnovni rastvori referentnih standarda mikofenolne kiseline i mikofenolat mofetila pripremani su u koncentraciji 1 mg mL⁻¹ pri čemu je kao rastvarač korišćena smeša acetonitril–voda (50:50, V/V). Radna smeša standarda je pripremljena razblaživanjem osnovnih rastvora standarda istom smešom rastvarača i sadržala je 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mikofenolne kiseline i 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mikofenolat mofetila kao internog standarda. Radna smeša standarda je korišćena za opterećivanje salive i za razvoj SPE metode. Pre nanošenja na kertridže, 1 mL radne smeše standarda je pomešan sa 1 mL salive, odnosno sa 1 mL mobilne faze kako bi se postigle iste koncentracije analita.

2.3.2. Prikupljanje i priprema uzoraka salive

Pljuvačka je sakupljena od 6 zdravih dobrovoljaca (4 ženskog pola, 2 muškog). Sakupljena je pod nestimulisanim uslovima i to kao mešovita. Uzorci pljuvačke su pomešani i do analiziranja čuvani na temperaturi od -20 °C. Pre nanošenja na kertridže, zbog viskoznosti, pljuvačka je razblaživana u odnosu 1:1 (V/V) i opterećivana radnom smešom standarda tako što je u 1 mL pljuvačke dodat 1 mL radne smeše standarda. Nakon mešanja na ultrazvučnom kupatilu, vršeno je izdvajanje proteina istaloženih u prisustvu organskog rastvarača, centrifugiranjem na 4000 obrtaja min⁻¹, u trajanju od 10 minuta. Dobijeni supernatant je zatim nanošen na kertridže.

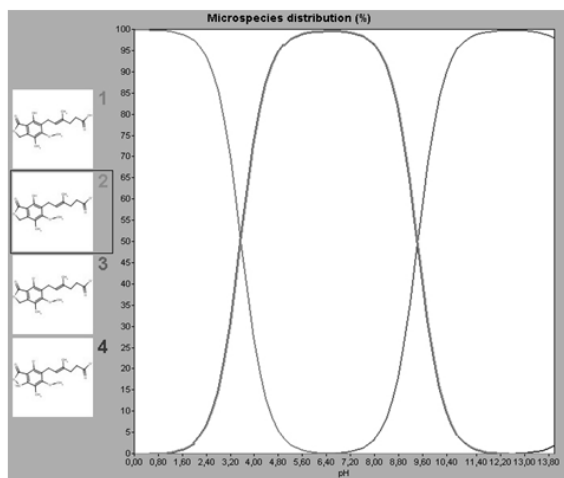
3. Rezultati i diskusija

Kompleksnost i varijabilnost biološkog materijala je glavni problem kod razvoja bioanalitičke metode. Osim toga, lekovi i metaboliti su u biološkom materijalu prisutni u veoma niskim koncentracijama, tako da su za određivanje potrebne veoma osetljive metode. Zato je prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala glavni korak u razvoju bioanalitičkih metoda.

Salivu je neophodno prečistiti pre daljeg određivanja zbog viskoznosti i interferirajućih komponenti. Interferencije, prisutne u matriksu, podrazumevaju imunoglobuline, proteine, enzime, mucin, kao i ureu i amonijak. U literaturi je zabeleženo prečišćavanje uzoraka uglavnom putem taloženja proteina i

centrifugiranjem, nakon čega se koristi bistri supernatant [2, 4, 15]. Imajući u vidu da su savremeni analitički sistemi jako osetljivi i da se neka od interferencija može ireverzibilno vezivati (npr. za hromatografsku kolonu), ovakav postupak obično rezultira visokim troškovima čišćenja ili zamenom delova uređaja. Uklanjanje interferencija iz matriksa je značajno i zbog mogućnosti pojave neželjenih pikova na hromatogramu i otežavanja tumačenja dobijenih rezultata. U literaturi je zabeleženo korišćenje pretkolona koje bi trebalo da preduprede kontaminaciju kolone [15]. U cilju povećanja selektivnosti metode, u ovom radu je ispitana mogućnost primene čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje uzoraka salive za dalju analizu mikofenolne kiseline primenom UPLC metode.

Mikofenolna kiselina je kiselo jedinjenje sa pKa vrednostima 3,60 i 9,50. Prva pKa vrednost potiče od kiselih osobina karboksilne grupe, a druga od slabo kiselih osobina fenolne grupe. Na Slici 2 je prikazana raspodela jonskih i molekularnih oblika leka u zavisnosti od pH vrednosti rastvora, dobijena pomoću softvera *Marvin Sketch 4.1.13, Chem Axon Ltd.* Može se uočiti da se do pH 3,60 ovaj lek dominantno nalazi u molekularnom obliku. Daljim porastom pH, raste udeo karboksilatnog anjona koji je najzastupljeniji oblik do pH 9,50, kada se u rastvoru nalaze i karboksilatni i fenolatni anjon. Na osnovu uvida u raspodelu jonskog i molekularnog oblika vršeno je predviđanje stepena vezivanja za sorbens i vrsta interakcije leka sa sorbensom i rastvaračima korišćenim u različitim fazama SPE.



Slika 2. Raspodela jonskih i molekularnih formi mikofenolne kiseline u zavisnosti od pH vrednosti rastvora

Figure 2. Distribution of ionic and molecular forms of mycophenolic acid in dependence of solution pH value

Pregledom literature je uočeno da se Strata™ X, Phenomenex SPE kertridži sa polimernim sorbensom veoma uspešno koriste u reverzno faznoj ekstrakciji, omogućavajući intenzivnu retenciju neutralnih, baznih ili kiselih jedinjenja [16]. Ovi kertridži pokrivaju širok spektar analita i omogućavaju jednostavniji razvoj metode za brzu i efikasnu pripremu uzorka. U ovom radu ispitana je mogućnost njihove primene za prečišćavanje uzoraka salive koja sadrži mikofenolnu kiselinu.

U preliminarnim ispitivanjima, varirani su uslovi nanošenja uzorka, ispiranja i eluiranja (Tabele I, II i III). Kondicioniranje je bilo isto za sve varijacije i podrazumevalo je korišćenje metanola i vode. U cilju procene selektivnosti metode, u svim eksperimentima je paralelno, u odvojenom kertridžu, propuštana slepa proba koju čini matriks bez analita.

Tabela I Varijacije postupka nanošenja uzorka

Table I Variation of sample introduction procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode		
Nanošenje uzorka	1 mL smeše acetonitril - voda 50:50 (V/V) + 1 mL smeše standarda	1 mL 0,1 % mravlje kiseline + 1 mL smeše standarda	2 mL 0,1 % mravlje kiseline + 1 mL smeše standarda
Ispiranje	1 mL vode		
Eluiranje	2 mL smeše acetonitril 0,2 % mravlja kiselina 50:50 (V/V)		

Tabela II Varijacije postupka ispiranja kertridža

Table II Variation of cartridge washing procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode				
Nanošenje	1 mL 0,1 % mravlje kiseline + 1 mL smeše standarda				
Ispiranje	1 mL 0,1 % mravlje kiseline	2 mL 0,1 % mravlje kiseline	1 mL vode	1,5 mL vode	2 mL vode
Eluiranje	2 mL smeše acetonitril - 0,2 % mravlja kiselina 50:50 (V/V)				

Tabela III Varijacije postupka eluiranja
Table III Variation of elution procedure

Kondicioniranje	2 puta: 2 mL metanola, potom 2 mL vode			
Nanošenje	1 mL 0,1 % mravlje kiseline + 1 mL smeše standarda			
Ispiranje	1 mL vode			
Eluiranje	1 mL AcN + 1 mL 0,1 % mravlje kis.	1 mL AcN + 2 mL 0,1 % mravlje kis.	1 mL AcN + 1 mL 0,2 % mravlje kis.	1 mL AcN + 1 mL amonijum hidroksida

Nakon nanošenja uzorka, sakupljane su zapremine koje su prošle kroz kertridž za svaku varijaciju. U ovoj fazi, analit treba da se što više veže za sorbens. Najbolji rezultati dobijeni su kada se nanošenje vrši sa 1 mL 0,1 % mravlje kiseline. Pošto je pH vrednost korišćene smeše rastvarača u fazi nanošenja bila 3,01 očekivano je da se analit nalazi uglavnom u molekulskom obliku. U interakciji analita sa sorbensom zastupljene su hidrofobne *Van der Waals*-ove veze (benzenov prsten i račvasti alkil niz sorbensa interaguju sa ugljovodoničnim nepolarnim delom strukture analita) i vodonične veze sa polarnim delovima sorbensa (laktamska grupa sorbensa i polarna fenolna i karboksilna grupa mikofenolne kiseline). Budući da je pri ovim uslovima uočeno najveće vezivanje analita za sorbens, u svim ostalim eksperimentima nastavljeno je nanošenje uzorka sa 1 mL 0,1 % mravlje kiseline. Dalje su vršene varijacije uslova za ispiranje i eluiranje uzorka.

U fazi ispiranja je potrebno da se što više nečistoća poreklom iz rastvora ili matriksa otkloni sa sorbensa, a da analit ostane vezan za sorbens. Propuštanjem kroz kertridž različitih rastvarača za ispiranje, sakupljani su uzorci koji su analizirani u UPLC sistemu. Dobijeni rastvori koji su sadržali najveće količine nečistoća, interferencija ili supstanci poreklom iz biološkog materijala, i u kojima nije uočeno prisustvo supstanci od interesa, odslikavaju najbolji izbor rastvarača za ispiranje. Ispitivan je uticaj rastvarača različite kiselosti, da bi se ustanovio stepen spiranja analita u neutralnoj i kiseloj sredini. Zaključeno je da je korišćenje vode pogodnije od vodenog rastvora mravlje kiseline budući da voda ne raskida veze analita i sorbensa. Nije dobijena značajna razlika nakon korišćenja različitih zapremina vode, pa je izabrana najmanja zapremina, od 1 mL, kako bi faza ispiranja bila što kraća i jednostavnija.

Eluiranjem treba da se raskine veza analita i sorbensa i da celokupna količina analita pređe u rastvor koji se sakuplja i dalje analizira. Isprobane su različite kombinacije udela acetonitrila (AcN) i mravlje kiseline, kao i acetonitril i amonijum hidroksid. Najefikasnije eluiranje je postignuto korišćenjem 1 mL AcN sa 1 mL 0,2 %

mravlje kiseline. Pri pH vrednosti ovog eluenta (2,88), analit se u većem stepenu nalazi u molekulskom obliku i vrši se raskidanje polarnih veza sa sorbensom.

U cilju provere efikasnosti predloženog postupka ekstrakcije i preciznosti (reproduktivnosti) dobijenih rezultata, pri izabranim uslovima propuštano je još devet novih kontrolnih uzoraka salive. Preciznost predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz uzorka pod istim uslovima. Statistički je procenjena izračunavanjem relativne standardne devijacije (RSD, %). Uzorci su pripremani u 3 QC (eng. *Quality Control*) koncentracije leka (niska, srednja i visoka) sa po 3 ponavljanja. Prema FDA smernicama (eng. *Food and Drug Administration*) dozvoljeno je da RSD vrednost za svaku QC koncentraciju bude manja od 15 % [17]. Efikasnost ekstrakcije je procenjivana na osnovu izračunavanja *Recovery* vrednosti, odnosno, na osnovu rezultata koji su dobijeni analiziranjem standardnih rastvora koji nisu propuštani kroz kertridže i standardnih rastvora kojima je saliva opterećena a zatim prečišćena predloženom SPE metodom (Tabela IV).

Tabela IV Rezultati ispitivanja efikasnosti i preciznosti metode

Table IV Results of method efficacy and precision testing

Koncentracija analita	10 µg mL ⁻¹			40 µg mL ⁻¹			100 µg mL ⁻¹		
<i>Recovery</i> , %	104,10	102,05	102,05	96,76	102,95	81,22	75,99	96,52	97,22
Srednje <i>Recovery</i> , %	102,73			93,64			89,91		
RSD, %	1,15			11,95			13,41		

RSD Relativna standardna devijacija

Na osnovu prikazanih *Recovery* vrednosti, dokazana je zadovoljavajuća efikasnost postupka ekstrakcije, a RSD vrednosti su ukazale na dobru preciznost određivanja mikofenolne kiseline. Iako je predložena SPE metoda brza i jednostavna za izvođenje, zbog složenosti korišćenog biološkog materijala, u postupku ekstrakcije potrebno je voditi računa o stabilnosti uzorka, imajući u vidu niske koncentracije leka koje se očekuju kod pacijenata.

4. Zaključak

Saliva predstavlja kompleksan uzorak endogenih supstanci, velike viskoznosti koju dodatno komplikuje i prisustvo epitelnih ćelija. Iz tog razloga veoma je važna

metoda pripreme i prečišćavanja uzoraka salive za kvalitativno-kvantitativnu analizu raspoložive koncentracije lekova ili njihovih metabolita. U ovom radu optimizovani su uslovi čvrsto-tečne ekstrakcije kao metode izbora za pripremu uzoraka salive za određivanje imunosupresiva mikofenolne kiseline. Svaka od četiri faze metode čvrsto-tečne ekstrakcije je optimizovana i predloženi su optimalni uslovi koji podrazumevaju: kondicioniranje polimernog kertridža za čvrsto-tečnu ekstakciju metanolom i vodom, nanošenje uzorka zajedno sa 0,1% mravljom kiselinom u odnosu 1 :1 (V:V), ispiranje kertridža vodom i eluiranje mikofenolne kiseline smešom acetonitrila i 0,2 % mravlje kiseline, takođe, u odnosu 1 : 1 (V:V).

Zahvalnica

Ovaj rad predstavlja deo rezultata naučno-istraživačkog projekta broj 172033 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

5. Literatura

1. Protić A. Razvoj metoda za ispitivanje stabilnosti mikofenolat mofetila i praćenje mikofenolne kiseline i glukuronida mikofenolne kiseline u plazmi i urinu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet; 2011.
2. Bing S, Shuijun L, Yuan Z, Xuelu Y, Yu F, Zhihong L, Qiang H, Chen Y. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 50:515-21.
3. Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007; 46 (1):13-58.
4. Wiesen M, Farowski F, Feldkötter M, Hoppe B, Müller C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva device. *J Chromatogr A.* 2012; 1241:52-9.
5. Kuypers D, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger M, Tett S, Cattaneo D, Tönshoff B, Holt D, Chapman J, Van Gelder T. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:341-58

6. Navezesmh C, Christensen J, Brightman N. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res.* 1999; 71(7):1363-69.
7. Dawesc H. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* 1987; 66:648-53.
8. Shannoi NL. Climatological effects on human parotid gland function. *Arch Oral Biol.* 1996; 11:451-53.
9. Dawesc H. Rhythms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol.* 1974; 2:253-79.
10. Dawesc H. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Arch Oral Biol.* 1969; 14:277-94.
11. Introduction to Solid Phase Extraction, Charlton scientific Laboratory Suppliers; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na http://www.charltonsci.co.uk/spe_introduction.pdf.
12. Shulamit L. Introduction to Solid Phase Extraction. Medtechnica. 2006; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE-09_pharmacy.pdf.
13. Zwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications. *Pol J Environ. Stud.* 2006; 15:677-90.
14. Guide to Solid Phase Extraction, Sigma Aldrich Co. 1998; [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
15. Mendoza A, Gohh R, Akhlaghi F. Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006; 28:402-06.
16. Phenomenex. [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na www.phenomenex.com.
17. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. [preuzeto 2012-11-02] Dostupno na www.fda.gov.

Analysis of mycophenolic acid from saliva samples after its purification with the method of solid-liquid extraction

**Biljana Otašević, Ana Protić*, Jelena Golubović, Mira Zečević,
Milica Cerović, Ljubica Bralović**

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

*corresponding author, e-mail: anna@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Pharmacological effect of a drug depends on its free fraction in plasma. By certain drugs, like immunosuppressive mycophenolic acid, concentrations below therapeutic lead to rejection of the transplanted organ while concentrations above therapeutic lead to toxic effects, primarily on kidney and liver. For this reason constant monitoring of mycophenolic acid in plasma is necessary. Concerning frequency of sampling, availability and non-invasive way of sampling, saliva presents one of the best biological materials for analysis. On the other hand, numerous interfering endogen substances, impurities and high viscosity of saliva make this biological material difficult for purification. Mycophenolic acid has to be purified and concentrated from saliva to be consequently determined applying appropriate analytical method. In this paper solid phase extraction method for purification of saliva has been presented. The efficacy of solid phase extraction has been influenced by many different experimental parameters, so these parameters has to be strongly controlled, and protocol of extraction procedure has been proposed. In this way conditioning of polymeric sorbent has been done with methanol and purified water, samples have been applied together with 0.1 % formic acid, washing has been done with purified water and elution of mycophenolic acid has been performed with acetonitrile and 0.2 % formic acid.

Keywords: Mycophenolic acid, saliva, sampling, sample preparation protocol, solid-phase extraction.
