

# Priprema biološkog materijala i validacija bioanalitičkih HPLC metoda za ispitivanje lekova i njihovih metabolita

Ana Protić<sup>1\*</sup>, Biljana Otašević<sup>1</sup>, Jelena Golubović<sup>1</sup>, Mira Zečević<sup>1</sup>,  
Ljiljana Živanović<sup>1</sup>, Jelena Vekić<sup>2</sup>, Aleksandra Zeljković<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju, Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd, Srbija

\*Autor za korespondenciju: e-mail: [anna@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:anna@pharmacy.bg.ac.rs)

---

## Kratak sadržaj

Priprema biološkog materijala pre HPLC analize predstavlja kompleksnu proceduru koja je obično izvor velike varijabilnosti dobijenih analitičkih rezultata. Najčešće analizirane telesne tečnosti jesu plazma, serum, urin i saliva, i poželjno je primeniti što jednostavniju proceduru pri pripremi navedenih uzoraka. Kompleksnost i varijabilnost sastava biološkog materijala predstavlja jedan od glavnih problema u razvoju bioanalitičkih metoda. Plazma i urin sadrže veliki broj endogenih komponenta prisutnih u koncentracijama koje su obično veće od koncentracije samog leka i/ili njegovih metabolita. Osim što se lekovi i/ili njihovi metaboliti često nalaze u malim koncentracijama, njihova struktura može biti slična strukturi nekih endogenih komponenta. Imajući ovo u vidu, prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala je jedan od najvažnijih koraka u razvoju bioanalitičke metode. Bez obzira sa kojim se uzorcima biološkog materijala radi, važno je voditi računa da se tokom analize dobiju pouzdani i ponovljivi rezultati. Validacija bioanalitičkih hromatografskih metoda izvodi se prema preporukama *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* regulative, *Food and Drug Administration (FDA)* i *European Medicines Agency (EMA)*. U okviru postupka validacije ispituje se selektivnost, donja granica detekcije (LD), donja granica određivanja (eng. *lower limits of quantification*, LLOQ), opseg, linearnost, preciznost, tačnost, stabilnost i efikasnost postupka prečišćavanja uzoraka biološkog materijala.

**Ključne reči:** prikupljanje uzoraka biološkog materijala, priprema uzoraka biološkog materijala za HPLC analizu, validacija bioanalitičkih HPLC metoda

---

## Značaj praćenja lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu

Koncentracije leka i/ili njegovih metabolita u krvi podležu velikim interindividualnim varijacijama, koje mogu biti posledica fizioloških razlika, poremećaja funkcije nekih organa (pre svega bubrega i jetre) i istovremene primene drugih lekova (1). Shodno tome, istraživanja su ukazala da ovi faktori mogu značajno uticati na postizanje terapijskih koncentracija leka i/ili njegovih metabolita u krvi (2, 3). Iz navedenih razloga sve više se ide ka individualizaciji terapije kako bi se umanjile interindividualne razlike i postigle terapijske koncentracije i optimalno dejstvo leka i/ili njegovih metabolita. Osim toga, u novije vreme sve više se ističe značaj složenih farmakokinetičkih, farmakodinamičkih i toksikoloških studija prilikom razvoja leka. Iz tog razloga, veoma često, važne odluke se donose na osnovu dobijenih bioanalitičkih rezultata. Stoga, sposobnost bioanalitičke metode da pouzdano odredi koncentraciju leka i njegovih glavnih metabolita je od presudnog značaja (4). S obzirom da je potrebno izvršiti analizu složenih sistema i razdvajanje većeg broja komponenata, hromatografske metode, pre svega HPLC, imaju prednost u odnosu na konvencionalne analitičke metode. Dodatna prednost se ogleda i u tome što poseduju veću tačnost i osetljivost za male količine uzoraka. U konkretnom slučaju, izbor načina detekcije kod HPLC metode zavisi pre svega od koncentracije leka i/ili njegovih metabolita i vrste biološkog materijala koji treba analizirati (5–8).

U toku različitih faza razvoja leka neophodno je razvijati, modifikovati, validirati i revalidirati bioanalitičku metodu jer se tokom smenjivanja faza razvoja leka menjaju informacije od interesa kao i broj uzoraka za analizu (4).

## Postupak i problemi prilikom prikupljanja uzoraka biološkog materijala za HPLC analizu

Pravilno odabran i prikupljen uzorak jedan je od važnih preduslova za dobijanje relevantnih rezultata prilikom određivanja koncentracije leka i/ili njegovih metabolita u biološkom materijalu. Uobičajeno je da se za određivanje lekova i metabolita u biološkom materijalu koriste venska krv, serum ili plazma, te je stoga važno poznavati efekte matriksa. Venska krv se uzima iz vena u lakatnom pregibu ili na dorzalnoj strani ruke, a primenjuje se samo ukoliko se analitička metoda može primeniti za punu krv, odnosno ukoliko se lek selektivno nakuplja u eritrocitima, kao u slučaju ciklosporina A (9). U novije vreme, pribegava se uzorkovanju kapilarne krvi na filter papiru, tzv. tehnika suve kapi krvi (eng. *dried blood spot*, DBS). Ovaj način prikupljanja krvi je minimalno invazivan, a uzorkuje se oko 100  $\mu$ L krvi (10). Ukoliko puna krv nije pogodna za izabrani HPLC postupak, iz venske krvi se izdvajaju serum (posle koagulacije krvi) ili plazma (centrifugiranjem krvi kojoj je dodat odgovarajući antikoagulans). Osnovna razlika u sastavu seruma i plazme potiče od fibrinogena, koji se pri dobijanju seruma konvertuje u fibrin i na taj način uklanja iz uzorka, te je

koncentracija proteina u plazmi za oko 2,5–5% viša nego u serumu. Shodno tome, sve HPLC metode koje su razvijene za serum, mogu se ravnopravno koristiti i u plazmi bez prethodnih modifikacija.

Ako je potrebno izdvojiti plazmu, koagulacija krvi se sprečava dodatkom antikoagulansa. Generalno, koncentracije leka u plazmi i serumu se neće bitno razlikovati ukoliko se izvrši pravilan odabir antikoagulansa (11). Najčešće korišćeni antikoagulansi su heparin, EDTA, citrati i oksalati. U zavisnosti od potreba istraživanja, koncentracije leka i/ili njegovih metabolita i stepena vezivanja za proteine plazme, mogu se primeniti različiti antikoagulansi. Heparin inhibira konverziju protrombina u trombin i time sprečava koagulaciju. Iako heparin ne utiče na preraspodelu vode između krvnih ćelija i plazme i ne interferira u najvećem broju analiza, njegova upotreba je ograničena zbog znatno više cene u poređenju sa drugim antikoagulansima. Antikoagulatni efekat EDTA i citrata zasniva se na stvaranju helata sa kalcijumovim jonom, a oksalat sprečava koagulaciju taloženjem kalcijuma. EDTA ne utiče bitno na preraspodelu vode između eritrocita i plazme, dok primena citrata i oksalata dovodi do razblaživanja plazme za nekoliko procenata. Natrijum-fluorid se može koristiti kao antikoagulantno sredstvo, mada se češće koristi kao konzervans, u smeši sa oksalatom ili EDTA (12).

Heparin treba izbegavati ukoliko se dođe do podataka da vezuje ispitivani lek i/ili metabolite i na taj način interferira sa izabranom metodom, kao što je pokazano u sličaju HPLC određivanja doksorubicina (13). Ukoliko lek hidrolizuje pod dejstvom endogenih esteraza, helirajući agensi su antikoagulansi izbora jer kompleksiraju jone kalcijuma i magnezijuma, uklanjaju ih iz uzorka i dovode do inaktivacije navedenih esteraza (inhibiciju esteraza nije moguće postići primenom fluorida). Ukoliko je koncentracija leka u biološkom materijalu mala, ne bi trebalo primenjivati citrate i oksalate jer dovode do razblaživanja uzorka, kao što je već napomenuto (14). Takođe, treba imati na umu i da je jedan od glavnih nedostataka primene seruma činjenica da na krvni koagulum mogu da se adsorbuju izvesne količine lekova ili metabolita, što snižava njihove ionako niske koncentracije. Studije su pokazale da prikupljanje uzoraka u epruvete koje sadrže gel za separaciju seruma ne dovodi do značajne promene koncentracije većine ispitivanih lekova (15–17). Ipak, dokazano je da primena ovih epruveta može značajno smanjiti koncentraciju fenitoina u serumu, usled adsorpcije na gel (18).

Pri odabiru odgovarajućeg biološkog materijala treba voditi računa i o stabilnosti leka i/ili njegovih metabolita. Naime, ukoliko se serum (plazma) ne izdvoji odmah nakon uzorkovanja krvi, stajanjem dolazi do promene pH i temperature, što može uticati na preraspodelu leka između plazme i eritrocita. Jedan od važnih problema prilikom uzimanja krvi je i hemoliza koja može da se desi od momenta uzimanja krvi do

izdvajanja seruma (plazme) (12). Hemoliza dovodi do razblaživanja uzorka, ali i do interferencije u HPLC analitičkim metodama.

Lekovi i/ili njihovi metaboliti se mogu u velikom procentu vezivati za proteine plazme (seruma), što zavisi od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika. Po pravilu, kiseli i neutralni lekovi se vezuju za albumin, dok se bazni lekovi vezuju za  $\alpha_1$  kiseli glikoprotein. Stoga je pre ekstrakcije neophodno raskinuti vezu leka i/ili metabolita i proteina i denaturisati proteine, što se najčešće postiže organskim rastvaračem ili adekvatnim podešavanjem pH. Uklanjanje proteina je neophodno kada se radi HPLC analiza lekova iz biološkog materijala, budući da proteini ometaju analizu i u potpunosti su inkompatibilni sa HPLC sistemom ukoliko se koriste organski rastvarači u sastavu mobilne faze u zapreminskom udelu većem od 5%.

Prednost urina u odnosu na prethodno pomenute tipove biološkog materijala ogleđa se u neinvazivnom i relativno lakom načinu uzorkovanja (19). Uslov da bi se lek mogao ispitivati iz urina je da se izlučuje u nepromenjenom obliku u frakciji koja je veća od 10%, da izlučivanje bude strogo kontrolisano u smislu regulacije pH i minimiziranja inter- i intraindividualnih varijacija u pogledu diureze. Kada se prikuplja 24-časovni urin, dodaju se konzervansi koji sprečavaju ubrzan rast bakterija, a samim tim i degradaciju izlučenih lekova i njihovih metabolita. U svakom slučaju, kako bi se očuvala stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita, uzorak je potrebno što pre analizirati. Koncentracija proteina u urinu je veoma niska, te se odmah može izvršiti ekstrakcija leka i/ili njegovih metabolita, bez prethodne denaturacije proteina. Mora se voditi računa da na interpretaciju rezultata utiču zapremina, pH i jonska jačina urina.

Saliva se danas smatra biološkim materijalom koji može da posluži kao alternativa za serum, jer je procedura sakupljanja jednostavna, neinvazivna i ekonomičnija od venepunkcije (19). Prikuplja se stimulacijom lučenja, a najčešće se koristi mešana saliva, nastala sekrecijom podjezičnih, podviličnih i zaušnih žlezda. Nakon uzorkovanja, potrebno je smanjiti viskozitet salive, odnosno ukloniti mukopolisaharide, čestice hrane i bakterije, što se može postići različitim tehnikama (centrifugiranje, dijaliza ili filtracija) (20). Ukupna koncentracija proteina u salivi je manja od 1%, što znači da koncentracija leka u salivi reflektuje koncentraciju slobodnog leka u krvi. Ovo je posebno važno jer samo slobodna frakcija leka, deo koji nije vezan za proteine plazme, predstavlja biološki aktivan deo leka.

### **Priprema biološkog materijala za aplikaciju na HPLC analitički sistem**

Lek i/ili njegovi metaboliti, osim što se često u biološkom materijalu nalaze u veoma niskim koncentracijama, mogu imati strukturu sličnu strukturi nekih endogenih komponenata. Imajući ovo u vidu, prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala je jedan od najvažnijih koraka u razvoju HPLC bioanalitičke metode (5, 21). Uprkos velikom napretku u razvoju HPLC sistema koji se koriste za finalno određivanje lekova,

još uvek je neophodno izvršiti prethodni tretman biološkog materijala. Smatra se da se približno 80% ukupnog analitičkog postupka odnosi na prethodni tretman uzorka u cilju ekstrakcije, izolovanja ili koncentrisanja lekova i/ili njihovih metabolita od značaja (22). Bez obzira sa kojim se uzorcima biološkog materijala radi, važno je voditi računa da se tokom analize dobiju pouzdani i ponovljivi rezultati (6, 7).

Osnovni ciljevi pretretmana uzorka su: uklanjanje makromolekulskih kontaminirajućih elemenata ili bilo kojih supstanci koje mogu interferirati u hromatografskom razdvajanju, solubilizacija lekova i/ili njihovih metabolita koja će omogućiti njihovu aplikaciju na HPLC analitički sistem, razblaživanje ili uklanjanje interferencija koje potiču od rastvarača, koncentrisanje leka i/ili njegovih metabolita da bi se osigurala koncentracija iznad detekcionog limita mernog instrumenta, ili derivatizacija u cilju poboljšanja osetljivosti i specifičnosti. Najčešće korišćeni načini pripreme biološkog materijala jesu čvrsto-tečna ekstrakcija, taloženje proteina, uparavanje, filtracija i tečno-tečna ekstrakcija. U novije vreme najčešće se koristi tehnika čvrsto-tečne ekstrakcije jer omogućava istovremeno koncentrisanje leka i/ili njegovih metabolita i prečišćavanje više uzoraka biološkog materijala, a moguća je i automatizacija ovog procesa.

## **Validacija bioanalitičkih HPLC metoda**

Validacija bioanalitičkih HPLC metoda uključuje sve postupke koji dokazuju da je razvijena metoda koja je namenjena kvantitativnoj analizi lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu pouzdana za predloženu namenu (23). Validacija bioanalitičke hromatografske metode izvodi se prema *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* regulativi (24), *Food and Drug Administration (FDA)* (23) i *European Medicines Agency (EMA)* smernicama (25).

U okviru ovog rada, validacija je najviše zasnovana na smernicama EMA i preporukama FDA, pri čemu se u okviru postupka validacije ispituje selektivnost, osetljivost (ispitivanjem donje granice detekcije (LD) i donje granice određivanja (eng. *lower limits of quantification*, LLOQ)), opseg, linearnost, preciznost, tačnost i stabilnost, a često je potrebno dokazati i efikasnost postupka prečišćavanja uzoraka (26–29).

Koncept biovalidacije koji je izložen u ovom radu može biti primenjen na veliki broj bioanalitičkih metoda, ali je pre svega namenjen hromatografskim metodama uključujući HPLC, GC, LC/MS i LC/MS/MS (26).

Jako važan deo validacije svake metode je dokazivanje da je metoda specifična. Za metodu se može reći da je specifična ukoliko se registruje signal koji potiče isključivo od jednog leka ili njegovog metabolita. Selektivnost metode je njena

sposobnost da se meri signal ispitivanog leka i/ili njegovog metabolita i razlikuje od svih ostalih signala. Kako većina hromatografskih metoda spada u separacione metode i samim tim registruje signale koji potiču i od velikog broja drugih lekova i/ili njihovih metabolita koji nisu od interesa, termin selektivnost je prikladnije koristiti u ovom kontekstu. Interferencije kod biološkog materijala mogu biti endogenog i egzogenog porekla. Endogene uključuju metabolite lekova kao i njihove prekursore, degradacione produkte lekova, lekove koji se istovremeno primenjuju, vitamine i njihove metabolite i/ili degradacione proizvode, supstance koje se normalno nalaze u krvi kao što su hormoni, proteini, lipidi... Egzogenog porekla su nečistoće koje potiču iz reagenasa koji se koriste za pripremu uzoraka, supstance koje se koriste u proizvodnji laboratorijske opreme (npr. plastifikatori) (30).

Selektivnost metode potvrđuje se ispitivanjem blanko uzoraka plazme i urina dobijenih od najmanje šest dobrovoljaca različitih godina i pola. Nakon izvođenja postupka prečišćavanja, blanko uzorci se ispituju prema interferirajućim supstancama poređenjem sa sveže pripremljenim uzorcima plazme i urina opterećenim standardima ispitivanih supstanci u LLOQ koncentraciji (23).

LD je jako važan jer daje pretpostavku o osetljivosti metode koja se potvrđuje analizom uzoraka biološkog materijala dobijenih od pacijenata koji su na terapiji lekom koji se ispituje.

Prva tačka na kalibracionoj krivoj je u LLOQ koncentraciji. LLOQ koncentracija je ona u kojoj je signal leka i/ili njegovog metabolita 5 puta veći u poređenju sa signalom blanko uzoraka biološkog materijala na tom retencionom vremenu, i pikovi ispitivanih supstanci bi trebalo da budu jasno uočljivi, odvojeni od pikova koji potiču iz biološkog materijala i reproduktivni sa preciznošću od 20% i tačnošću u opsegu od 80–120% (23). Za procenu preciznosti i tačnosti u LLOQ koncentraciji koristi se po 5 rastvora za ispitivanu supstancu.

Odnos površina pikova ispitivanih supstanci i internog standarda (IS) u zavisnosti od koncentracije se obično koristi za procenu linearnosti metode. Opseg koncentracija u okviru koga je ispitivana linearnost metode izabran je na osnovu očekivanih koncentracija lekova i/ili njihovih metabolita u uzorcima biološkog materijala pacijenata. Kalibraciona kriva obuhvata ispitivanje blanko uzoraka biološkog materijala, nultih uzoraka (blanko biološki materijal opterećen IS), i 7 uzoraka blanko biološkog materijala opterećenih IS i rastućim koncentracijama lekova i/ili njihovih metabolita u definisanom opsegu, uključujući i LLOQ koncentraciju (23, 29).

Preciznost metode predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz homogenih uzoraka pod istim uslovima. Tačnost metode predstavlja meru usaglašenosti eksperimentalno dobijenih rezultata predloženom metodom sa pravim vrednostima (31).

Preciznost i tačnost metode se određuje za tri QC koncentracije (niska, srednja i visoka), iz 5 uzoraka po koncentraciji, koje su u opsegu koncentracija kalibracione krive. Preciznost i tačnost određuju se u toku jednog dana i označavaju se kao *intra-day*, i u toku tri uzastopna dana i označavaju se kao *inter-day* preciznost i tačnost. Preciznost se izražava kao koeficijent varijacije (KV, %) za svaku od 3 navedene koncentracije. Zahtev prema EMA smernicama je da preciznost mora biti  $\pm 15\%$ , osim za LLOQ, gde se dozvoljava  $\pm 20\%$ . Tačnost metode mora biti 85–115%, sem za LLOQ, gde se dozvoljava 80–120%. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da li metoda pokazuje zadovoljavajuću preciznost i tačnost.

Prilikom prečišćavanja biološkog materijala nije neophodno da *recovery* vrednost lekova i/ili njihovih metabolita bude 100% već da *recovery* lekova i/ili njihovih metabolita i IS bude dokazano stalan, precizan i reproduktivan. *Recovery* eksperimenti se sprovode u 3 koncentracije (niska, srednja i visoka). U svakoj od navedenih koncentracija pravi se po 5 rastvora i porede se rezultati dobijeni iz uzoraka nakon prečišćavanja i standardnih rastvora koji nisu prečišćavani, i koji predstavljaju 100% *recovery*. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da li efikasnost postupka prečišćavanja zavisi od koncentracije, kao i da li priroda biološkog materijala pokazuje značajan uticaj na *recovery* vrednosti lekova i/ili njihovih metabolita.

Stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu zavisi pre svega od hemijskih osobina ispitivanih supstanci, ali i od prirode biološkog materijala i pakovanja u kojima se lekovi i/ili njihovi metaboliti čuvaju. Shodno tome, stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u različitim biološkim materijalima i u različitoj vrsti ambalaže se mora posebno ispitivati.

Uslovi pri kojima se ispituje stabilnost biraju se na taj način da realno odražavaju uslove kojima će uzorci biološkog materijala biti izloženi. Prema EMA preporukama i FDA regulativi propisuje se ispitivanje: Stabilnosti analita tokom analize uzoraka (*eng. Post-Preparative Stability*), Stabilnosti analita pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju uzoraka (*eng. Freeze – thaw cycles*), Kratkoročne temperaturne stabilnosti (*eng. short-term temperature stability*) i Dugoročne stabilnosti (*eng. long term stability*) (23, 25). Stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu ispituje se za dve QC koncentracije (niža i viša). Za svaku koncentraciju pravi se najmanje po 3 rastvora.

Kratkoročna temperaturna stabilnost uzoraka ispituje se nakon otapanja uzoraka do sobne temperature i čuvanja uzoraka na ovoj temperaturi 4–24 h. Ova dužina čuvanja na sobnoj temperaturi je izabrana shodno očekivanju da se uzorci mogu čuvati na sobnoj temperaturi tokom analize uzoraka. Na ovaj način potvrđuje se stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu za vreme skupljanja i prečišćavanja uzoraka. Tri ciklusa zamrzavanje – topljenje izvode se zamrzavanjem uzoraka na temperaturu od  $-20^{\circ}\text{C}$  i postepenim topljenjem na sobnoj temperaturi u 3 ciklusa. Ispitivanje dugoročne stabilnosti podrazumeva čuvanje uzoraka na temperaturi od –

20°C i to tri meseca za uzorke urina i šest meseci za uzorke plazme. Stabilnost se procenjuje poređenjem srednjih vrednosti koncentracija nakon određenog perioda čuvanja uzoraka i inicijalnih koncentracija ispitivanih lekova i/ili njihovih metabolita. U slučaju da za potrebe farmakokinetičkih studija uzorci moraju biti duže u autoinjektoru preporučuje se i ispitivanje stabilnosti analita tokom analize uzoraka i u dužem periodu od 24h. Da bi se izvršila procena ove vrste stabilnosti QC uzorci se prečiste, a zatim čuvaju propisano vreme na sobnoj temperaturi.

Validirana bioanalitička HPLC metoda se zatim primenjuje za određivanje lekova i/ili njihovih metabolita iz uzoraka biološkog materijala dobijenih od pacijenata, koji se nalaze na terapiji odgovarajućim lekom. Osim potvrde osetljivosti metode za određivanje ciljanog leka i/ili njegovih metabolita u biološkom materijalu, bitno je i da metoda pokazuje zadovoljavajuću selektivnost u odnosu na druge lekove koji se mogu istovremeno primenjivati (23, 25, 29).

## **Zaključak**

Praćenje lekova i njihovih metabolita u biološkom materijalu je poslednjih godina postalo veoma važno zbog individualizacije terapije, praćenja složenih farmakokinetičkih, farmakodinamičkih i toksikoloških studija prilikom razvoja leka i doping kontrole kod profesionalnih sportista. Kako bi se omogućilo adekvatno praćenje lekova i metabolita, bitno je obratiti pažnju na ograničenja prilikom prikupljanja, čuvanja i pripreme biološkog materijala. Za analizu bioloških uzoraka dobijenih od pacijenata uslov je da se koriste validirane bioanalitičke metode prema preporukama ICH, FDA ili EMA.

## **Zahvalnica**

Zahvaljujemo Ministarstvu obrazovanja i nauke Republike Srbije koje je finansijski podržalo ovaj rad putem projekta br. 172033.

## Literatura

1. Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem* 2007; 40:752–764.
2. González-Roncero FM, Gentil MA, Brunet M, Algarra G, Pereira P, Cabello V, et al. Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil in Kidney Transplant Patients With Renal Insufficiency. *Transplant Proc* 2005; 37:3749–3751.
3. Kiberd BA, Puthenparumpil JJ, Fraser A, Tett SE, Lawen J. Impact of Mycophenolate Mofetil Loading on Drug Exposure in the Early Posttransplant Period. *Transplant Proc* 2005; 37:2320–2323.
4. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14:375–388.
5. Živanović Lj, Ličanski A, Zečević M, Jocić B, Kostić M. Application of Experimental Design in Optimization of Solid Phase Extraction of Mycophenolic Acid and Mycophenolic Acid Glucuronide from Human Urine and Plasma and SPE-RP-HPLC method validation. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47:575-585.
6. Lima ES, Abdalla DSP. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Anal Chim Acta* 2002; 465:81–91.
7. Thurman EM, Mills ES. *Solid-Phase Extraction, Principles and Practice*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
8. Deyl Z. *Quality control in pharmaceutical analysis, separation methods*. The Netherlands: Elsevier science BV, 1997:1-30.
9. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:95–99.
10. Edelbroek PM, Van der Heijden J, Stolk LM. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit*. 2009;31: 327-36.
11. Bergeron A, Bergeron A, Furtado M, Garofolo F. Impact of plasma and whole-blood anticoagulant counter ion choice on drug stability and matrix effects during bioanalysis. *Bioanalysis* 2009; 1:537-548.
12. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia PA, 1999.
13. Kümmerle A, Krueger T, Dusmet M, Vallet C, Pan Y, Ris HB, Decosterd LA. A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33:475-494.
14. Hammett-Stabler CA. The pre-analytical phase of drug testing: from specimen collection to analysis. In: Dasgupta A. ed. *Handbook of drug monitoring methods: therapeutics and drugs of abuse*: Humana Press, 2008: 87-96.
15. Dasgupta A, Dean R, Saldana S, Konnaman G, McLawhon RW. Absorption of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. *Am J Clin Pathol* 1994;101:456-461.
16. Koch TR, Platoff G. Suitability of collection tubes with separator gels for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1990;12:277-280.
17. Landt M, Smith CH, Hortin GL. Evaluation of evacuated blood-collection tubes: effects of three types of polymeric separators on therapeutic drug-monitoring specimens. *Clin Chem* 1993;39:1712-1717.
18. Quattrocchi F, Karnes HT, Robinson JD, Hendeles L. Effect of serum separator blood collection tubes on drug concentrations. *Ther Drug Monit* 1983;5:359-362.

19. Gjerde H, Leere Øiestad E, Christophersen AS. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi* 2011;21:5-14
20. Liu H, Delgado MR. Therapeutic drug concentration monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:453-70.
21. Lough WJ, Wainer IW. *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996.
22. Kataoka H. Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *Curr Pharm Anal* 2005;1:65-84.
23. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, Centre for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, 2001.
24. *International Conference on Harmonisation, topic Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, version 4, Geneva, 2005.
25. *Guideline on bioanalytical method validation*, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu).
26. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of Bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14:23–31.
27. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13:89–97.
28. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17:193–218.
29. Živanović Lj, Protić A, Zečević M, Jocić B, Kostić M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50:640-648.
30. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14:23–31.
31. Ivanović D, Zečević M, Malenović A. *Analitika lekova udžbenik za laboratorijsku nastavu*. Beograd: Akademija štamparija, 2000:50–51.

# Purification of biological samples and validation of bioanalytical HPLC methods for analysis of drugs and their metabolites

Ana Protić<sup>1\*</sup>, Biljana Otašević<sup>1</sup>, Jelena Golubović<sup>1</sup>, Mira Zečević<sup>1</sup>,  
Ljiljana Živanović<sup>1</sup>, Jelena Vekić<sup>2</sup>, Aleksandra Zeljković<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of biomedical chemistry, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade, Serbia

---

## Summary

Purification of biological matrix prior to HPLC analysis has been complex procedure and source of great variability of analytical results. The most used biological matrixes used for analysis are plasma, serum, urine and saliva and it has been advisable to use the simplest procedure for purification of these samples. Biological matrixes are complex and variability of its content is the main problem in development of bioanalytical methods. Namely, plasma and urine samples contain large number of endogenous compounds in concentrations much larger than concentration of investigated analyte. The concentrations of investigated analytes are often in very low concentrations and its structure can be very similar to structure of some endogenous compounds. Due to this problem, purification and concentration of biomatrix is one of the most important steps in development of bioanalytical methods. For bioanalytical methods the most important parameters are reliability and repeatability of the analytical results. Validation of bioanalytical chromatographic methods can be conducted according to *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, *Food and Drug Administration (FDA)* and *European Medicines Agency (EMA)*. During the validation process selectivity, limit of detection (LOD), *lower limits of quantification* (LLOQ), range, linearity, precision, accuracy, stability and efficacy of biological sample purification have to be investigated.

**Key words:** collection of biological samples, purification of biological samples, validation of bioanalytical methods.

---