

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivan Džajić

**IZAZOVI BIOANALITIKE TIOPURINA I ENDOGENOG
FOLATA U ERITROCITIMA, PLAZMI I URINU - RAZVOJ
HPLC-DAD-FLD METODE ZA TERAPIJSKO PRAĆENJE
LIJEKOVA**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-UIP-2017-05-3949.



KRATICE

5-ASA	5-aminosalicilna kiselina
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolat
6-MMP	6-metilmerkaptopurin
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiogvanin
6-TIMP	6-tioinozin monofosfat
6-TU	6-tiourična kiselina
6-TX	6-tioksantin
ACN	acetonitril
AMTCI	4-amino-5-(metiltio)karbonil imidazol
ASK	askorbinska kiselina
AZA	azatioprin
CP	ciprofloksacin
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array detector</i>)
DBS	ispitivanje osušene krvi (engl. <i>dried blood spot</i>)
DHF	dihidrofolna kiselina
DLLME	disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DTT	ditiotritol
EDTA	etilendiamintetraacetat
FBP	protein koji veže folate (engl. <i>folate-binding protein</i>)
FLD	fluorescencijski detektor
HBSS	uravnotežena otopina soli (engl. <i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPRT	hipoksantin fosforiboziltransferaza (engl. <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>)

IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
LLE	ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. <i>liquid-liquid extraction</i>)
LLOQ	niža granica kvantifikacije (engl. <i>lower limit of quantification</i>)
MZ	metronidazol
PPT	precipitacija proteina
RNA	ribonukleinska kiselina
RSD	relativno standardno odstupanje (engl. <i>relative standard deviation</i>)
SLE	potpomognuta ekstrakcija tekućom fazom (engl. <i>supported liquid extraction</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
TDM	terapijsko praćenje lijekova (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
THF	tetrahidrofolna kiselina
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
XO	ksantin oksidaza

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Upalne bolesti crijeva.....	2
1.2	Liječenje upalnih bolesti crijeva.....	2
1.3	Tiopurinska terapija.....	3
1.3.1	Metabolizam azatioprina i merkaptopurina.....	3
1.3.2	Farmakogenetske razlike u metabolizmu tiopurina.....	4
1.4	Folna kiselina i folati.....	5
1.4.1	Terapijski učinak suplementacije folnom kiselinom	5
1.4.2	Folati i upalne bolesti crijeva	5
1.5	Terapijsko praćenje lijekova	6
1.6	Bioanalitika, izazovi u bioanalitici	6
1.7	Priprema biološkog uzorka, ekstrakcijske tehnike	7
1.7.1	Precipitacija proteina	7
1.7.2	Ekstrakcija tekuće – tekuće	8
1.7.3	Ekstrakcija na čvrstoj fazi	8
1.8	Pregled dosadašnjih istraživanja – objavljene metode, prednosti i nedostaci	8
1.8.1	Metode analize folata u biološkim uzorcima.....	8
1.8.2	Metode analize tiopurina u biološkim uzorcima	9
2	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	11
3	MATERIJALI I METODE	13
3.1	Materijali	14
3.1.1	Kemikalije	14
3.1.2	Radni instrumenti i pribor	14
3.1.3	Programi i programski paketi	15
3.2	Metode.....	15
3.2.1	Uvjeti kromatografske analize.....	15
3.2.2	Priprema otopina standarda	16
3.2.3	Uzimanje uzorka krvi, razdvajanje frakcije plazme i eritrocita.....	16
3.2.4	Priprema uzorka plazme za analizu 5-MTHF	17
3.2.5	Priprema uzorka eritrocita za analizu tiopurina.....	17
3.2.6	Priprema uzorka urina za analizu tiopurina.....	17

4	REZULTATI.....	18
4.1	Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode.....	19
4.1.1	Odjeljivanje ispitivanih spojeva	19
4.1.2	Odabir detektora za identifikaciju analita.....	21
4.2	Ispitivanje selektivnosti analitičke metode.....	21
4.3	Obrada uzorka plazme.....	23
4.3.1	Optimizacija uvjeta taloženja proteina plazme.....	23
4.3.2	Ispitivanje stabilnosti 5-MTHF u prisustvu perklorne kiseline	24
4.3.3	Optimizacija pripreme uzorka tehnikom ekstrakcije na čvrstoj fazi	25
4.4	Obrada uzorka eritrocita.....	29
4.4.1	Optimizacija koncentracije dodanog ditiotreitola u uzorku za analizu tiopurina	29
4.4.2	Optimizacija vremena zagrijavanja eritrocita.....	30
4.4.3	Ispitivanje linearnosti, osjetljivosti, ponovljivosti i točnosti	31
4.5	Obrada uzorka urina	33
5	ZAKLJUČAK	35
6	POPIS LITERATURE	37
7	ZAHVALE	44
8	SAŽETAK.....	46
9	SUMMARY	48

1 UVOD

1.1 Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) su kronični upalni autoimuni poremećaji gastrointestinalnog sustava. Glavne bolesti koje se u tu skupinu ubrajaju su idiopatska upalna bolest crijeva, ulcerozni kolitis te Crohnova bolest.

Glavne karakteristike ulceroznog kolitisa uključuju difuznu upalu mukozne membrane koja se širi proksimalno u različitim mjerama u oboljelih osoba. Izražena upala, zajedno s otpuštanjem brojnih upalnih medijatora uzroci su ulceracije ograničene na mukozu i submukozu debelog crijeva, s izostankom upale u njegovim dubljim slojevima. Histopatološke karakteristike uključuju nakupljanje neutrofila unutar *lamine proprie* i kripte tvoreći mikro-apscese. Česta je i deplecija mucina koji potiče iz vrčastih stanica. Ulcerozni kolitis karakterizira dijareja uz prisustvo krvi u stolici, iako dio pacijenata ima konstipaciju tijekom aktivnog perioda bolesti (uzrokovanu smanjenjem peristaltičke funkcije u odgovoru na upalne medijatore). Rekurentni karakter ulceroznog kolitisa karakterističan je u gotovo svih pacijenata [1].

Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog sustava, iako se najčešće radi o terminalnom ileumu, te se lezije u najranijim stadijima često formiraju na Peyеровim pločama. Kod otprilike 30 % pacijenata zahvaćeno je debelo crijevo, kod 40 % zahvaćeno je tanko crijevo, dok su kod 30 % zahvaćena i tanko i debelo crijevo [2]. Crohnovu bolest karakteriziraju agregati makrofaga koji formiraju granulome. Za razliku od ulceroznog kolitisa, obično zahvaća manje površine ili segmente crijeva te upala prodire kroz čitavu stijenku tog dijela crijeva [3]. Upalni proces može prodrijeti šire od gastrointestinalnog sustava, formirajući fistule. Bolest karakteriziraju abdominalna bol, proljev, uništenje mukoze te malapsorpcija. Sistemske znakovi uključuju povišenu tjelesnu temperaturu te gubitak tjelesne mase te su češći nego kod ulceroznog kolitisa.

Upalne bolesti crijeva obično započinju u dvadesetim ili tridesetim godinama života pacijenata te u većini slučajeva napreduju u relapsnu kroničnu bolest. Poznato je da je incidencija tih bolesti višestruko češća unutar obitelji, osobito unutar prvog koljena. Nasljedna komponenta je naglašena u obje bolesti, gdje kod ulceroznog kolitisa 8-14 % pacijenata prijavljuje obiteljsku povijest u usporedbi s 2-14 % kod Crohnove bolesti. U slučajevima gdje je oboje roditelja oboljelo, procjenjuje se da djeca prije tridesete godine razvijaju upalne bolesti crijeva s vjerojatnošću do jedne trećine. Studije na blizancima također su pokazale visoke stope preklapanja, pogotovo u jednojajčanih blizanaca [4].

1.2 Liječenje upalnih bolesti crijeva

Farmakoterapija upalnih bolesti crijeva obuhvaća lijekove iz različitih terapijskih skupina, te se većina njihovih osnovnih mehanizama zasniva na suprimiranju i modulaciji imunskog odgovora oboljele osobe, koji je osnova patogeneze ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti, iako izbor lijeka varira

zavisno o kliničkoj manifestaciji bolesti te njezinoj težini. U vidu izbora terapije, biološki lijekovi su posebno važna skupina lijekova. Njihova cijena s vremenom pada te iz godine u godinu mijenja izgled terapijskih smjernica, no u ovom radu primarni fokus bit će na ne-biološkoj farmakoterapiji. Među najranijim skupinama lijekova na tržištu bili su aminosalicilati, od kojih se i danas koriste 5-aminosalicilna kiselina (5-ASA), odnosno mesalazin te njezin prolijek sulfasalazin. Iz skupine kortikosteroida u uporabi su lijekovi kao što su hidrokortizon, prednizon i metilprednizolon. Metronidazol (MZ), inače korišten kao antimikrobni lijek, također pokazuje pozitivan učinak na tijek bolesti. Metotreksat je lijek koji je pokazao učinkovitost u održavanju remisije Crohnove bolesti, te u pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju kortikosteroidima [5]. Od imunosupresiva u užem smislu, koriste se ciklosporin te tiopurini, točnije azatioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) te tiogvanin (6-TG) [6].

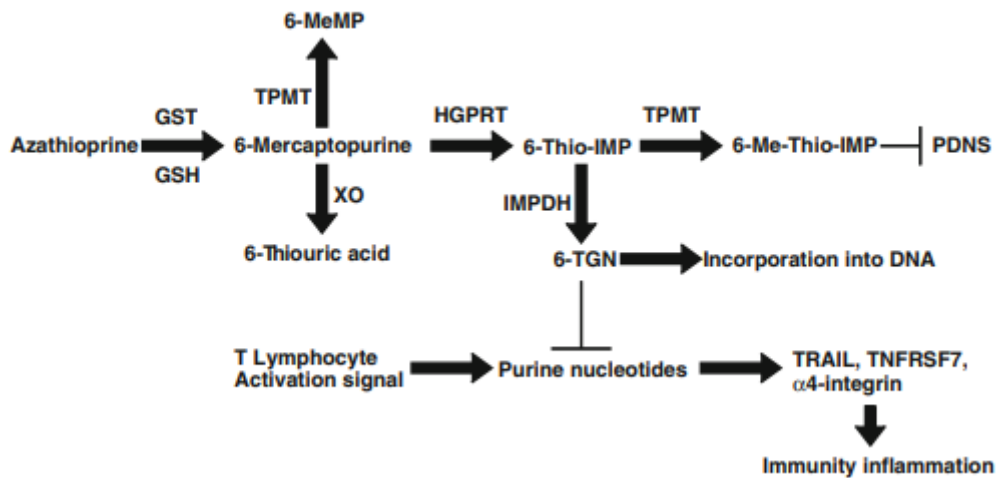
1.3 Tiopurinska terapija

Tiopurinski lijekovi stavljeni su na tržište sredinom prošloga stoljeća kao lijekovi u terapiji leukemije. 6-TG, kao i 6-MP te njegova „maskirana“ forma AZA citotoksični su i imunosupresivni lijekovi, antagonisti purina. Kao imunosupresivi korisni su i u drugim indikacijama, kao što je sprječavanje odbacivanja transplantiranog organa gdje se koadministriraju s ciklosporinom i kortikosteroidima. Od početka uporabe u kliničkoj praksi poznato je da se njihov farmakološki učinak bazira na inhibiciji sinteze proteina, DNA i RNA, te je početkom 21. stoljeća, koristeći nova saznanja o mehanizmu apoptoze uz uvid u široku mogućnost njihove primjene, njihov mehanizam djelovanja dodatno razjašnjen [7]. Sami po sebi nisu djelotvorni, ali nakon administracije podliježu značajnom metabolizmu. Glavni aktivni produkti unutarstaničnog metabolizma uključuju mono-, di- i tri- fosfate 6-tiogvanozina. Nalaze se u eritrocitima [8].

1.3.1 Metabolizam azatioprina i merkaptopurina

Nakon oralne administracije AZA se brzo neenzimski cijepa na derivate 6-MP i metil-4-nitro-5-imidazol. Oko 12 % doze podložno je tiolizi koja se odvija s druge strane atoma sumpora, dajući kao produkte hipoksantin i metil-4-nitro-5-tioimidazol. Aktivacija 6-MP uključuje tri različite rute, dvije kataboličke i jednu anaboličku. Počinje unutar stanice te je katalizira hipoksantin fosforiboziltransferaza (HPRT), dajući 6-tioinozin monofosfat (6-TIMP). Daljnji unutarstanični metabolizam kao produkte daje aktivne 6-tiogvaninske nukleotide koji membrane mogu prolaziti tek nakon defosforilacije. Ta metabolička ruta u eritrocitima u kompeticiji je s kataboličkom reakcijom metilacije [9] koja se može odviti na merkaptopurinskom i inozin nukleotidnom obliku lijeka. Ksantin oksidaza (engl. *xanthine oxidase*, XO) katalizira inaktivaciju 6-MP, kao produkt dajući 6-tiouričnu

kiselinu (6-TU). Drugi katabolički put uključuje S-metilaciju tiola tiopurin metiltransferazom (TPMT), citosolnim enzimom ovisnim o S-adenozil metioninu (Slika 1).



Slika 1. Metabolizam azatioprina i merkaptopurina (preuzeto iz [8])

1.3.2 Farmakogenetske razlike u metabolizmu tiopurina

Čest genetski polimorfizam odgovoran je za interindividualne varijacije u aktivnosti TPMT. Nasljedna varijabilnost aktivnosti TPMT predstavlja važan segment varijacija u osjetljivosti prema 6-MP i AZA. Pokazano je da su heterozigotni pacijenti na terapiji tiopurinima značajno podložniji epizodama leukopenije u usporedbi s divljim tipom, dok je kod homozigotnih pacijenata prisutna još jača mijelosupresija [10]. Također, aktivnost TPMT i formacija citotoksičnog 6-TG u negativnoj je korelaciji zbog spomenute kompeticije drugih metaboličkih putova s TPMT. Prema nekim istraživanjima, tioimidazolski metabolit je djelomično zaslužan za intoleranciju na AZA te se takvu vrstu intolerancije ne može predvidjeti praćenjem aktivnosti TPMT [11].

Za aktivnost enzima XO smatralo se da u zdravoj populaciji nema značajnih interindividualnih razlika, iako su kasnija istraživanja s drukčijom metodologijom pokazala da je aktivnost XO viša za oko 20 % kod muške populacije. Sumnja se i na postojanje skupina pacijenata s niskom aktivnošću jetrene XO [12]. Za inhibitore XO, kao što je alopurinol, poznato je da pojačavaju djelovanje 6-MP i AZA, inhibirajući jednu od njegovih kataboličkih ruta te se ova kombinacija često primjenjuje u praksi [13].

Podataka o različitoj aktivnosti enzima HPRT u zdrave populacije je malo, iako je njegov potpuni nedostatak zabilježen kod ljudi s Lesch-Nyhanovim sindromom. Kod ovih pojedinaca AZA i 6-MP nemaju citotoksična svojstva, što je direktno vezano uz molekularnu podlogu tog sindroma [12].

Kod pacijenata koji započinju terapiju tiopurinima, geno- i fenotipizacija enzima TPMT može pomoći u detekciji njegovog polimorfizma i sprječavanju teške mijelotoksičnosti. Terapijsko praćenje aktivnih metabolita nukleotida 6-TG i 6-MMP često je zapostavljena, ali korisna opcija koja može pomoći pri

optimizaciji farmakoterapije. U slučaju naglog pogoršanja stanja se obično prelazi na terapiju biološkim lijekovima, bez daljnjih pokušaja optimizacije doziranja tiopurina zasnovanog na koncentraciji njihovih metabolita [14].

1.4 Folna kiselina i folati

Folna kiselina i folati skupina su vitamina topljivih u vodi, nužnih u pravilnoj i uravnoteženoj prehrani. Izraz „folna kiselina“ i „folati“ u literaturi su generički pojam koji se odnosi na skupinu strukturno sličnih spojeva s istim osnovnim kosturom, ali različitim oksidacijskim stanjem i brojem vezanih glutamata. Folna kiselina je poznatija i kao vitamin B₉, a glavna biološka funkcija folata je funkcija kofaktora enzima u reakcijama prijenosa jednog ugljika. Ugljik koji folati doniraju može biti na oksidacijskoj razini metanola (L-5-metil-THF), formaldehida (5,10-metilen-THF) ili formijata (5,10-metenil-THF). Svaki od tih oblika ima specifičnu ulogu u unutarstaničnom metabolizmu [15]. Potrebni su za središnje stanične funkcije kao što su sinteza aminokiselina, nukleinskih kiselina, rast i replikacija. U prirodi folate susrećemo u hrani, gdje se nalaze u poliglutamatnim reduciranim oblicima. Glavna dva reducirana oblika su: 7,8-dihidrofolat (DHF) i 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF). Da bi ostvarila svoju biološku aktivnost, folna kiselina se mora reducirati u svoj aktivni tetrahidrofolatni oblik [15].

1.4.1 Terapijski učinak suplementacije folnom kiselinom

Meta-analiza koja je sakupila podatke osam randomiziranih studija utjecaja folne kiseline na prevenciju moždanog udara pokazala je da smanjuje njegovu vjerojatnost za 18 % [16] te se pokazalo da je u korelaciji sa smanjenim razinama homocisteina u krvi. U trudnica je pokazano da je pojavnost defekata neuralne cijevi smanjena s 3,5 na 1000 na 0,9 na 1000 kod žena koje su uzimale multivitaminske pripravke s folnom kiselinom tijekom prvih 6 tjedana trudnoće, u usporedbi s ženama koje su uzimale pripravke bez folne kiseline ili uopće nisu [17]. Unatoč brojnim istraživanjima koja dovode u korelaciju povećan unos folata i smanjenu pojavnost kardiovaskularnih bolesti, nije dokazano da smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti niti smrtnost u pacijenata s povješću kardiovaskularnih bolesti [18]. Manjak folata implicira se u patogenezi brojnih drugih bolesti, kao što su megaloblastična anemija [19], kolorektalni karcinom [20] i neuropsihijatrijski poremećaji kod starije populacije [21].

1.4.2 Folati i upalne bolesti crijeva

Istraživan je odnos deficijencije folata i IBD. Jedna studija je pokazala značajno niže koncentracije folata, kobalamina i piridoksina u pacijenata u usporedbi s kontrolom [22]. Također je pokazano da

pacijenti s aktivnom IBD imaju značajno niže razine tih vitamina od pacijenata s neaktivnom IBD. Razlog tih abnormalnosti ima multifaktorijalnu etiologiju. Može biti povezan s povećanim potrebama, smanjenim unosom putem prehrane, smanjenom apsorpcijom ili upotrebom određenih terapeutika, primjerice sulfasalazina [23].

Zbog svojih doprinosa zdravlju, postoji trend povećanja dnevnog unosa folata koji se provodi na dva načina. Jedan način je fortifikacija namirnica sintetskom folnom kiselinom gdje se koristi sintetski monoglutamadni oksidirani oblik. On pokazuje vrlo visok stupanj stabilnosti i biorapoloživosti, zbog čega predstavlja glavni odabir kod suplementacije i fortifikacije prehrambenih proizvoda. Drugi način provođenja trenda povišenja unosa folne kiseline je biofortifikacija putem prirodnog povećanja razina fermentacijom ili bioprocesiranjem. Pekarski kvasac primjer je prirodnog izvora bogatog folatima [24]. U krvi i cerebrospinalnoj tekućini fiziološki se pojavljuje dominantno u svojoj transportnoj formi, N⁵-metiltetrahidrofolnoj kiselini (5-MTHF) [25]. Dio je standardnih krvnih pretraga kod pacijenata s rizikom malnutricije te može predstavljati uzrok anemije kod pacijenata s IBD. Terapija visokim dozama metotreksata mora biti kombinirana s reduciranim oblicima folne kiseline u svrhu prevencije njegove jake toksičnosti [25], a leukovorin (folinska kiselina) se koristi kao antidot u slučaju predoziranja antagonistima folne kiseline [26]. Također, kod izrazito deficijentnih ljudi se propisuje suplementacija tabletama folne kiseline.

1.5 Terapijsko praćenje lijekova

Terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) je kliničko mjerenje koncentracija određenih lijekova u biološkim uzorcima u zadanim intervalima, bilo u svrhu praćenja toksikološkog stanja uzrokovanog određenim lijekovima u čovjekovu organizmu, bilo u svrhu održavanja stalne terapijske koncentracije u pacijentovom krvotoku. Na taj način se optimizira individualni režim doziranja. Za većinu lijekova TDM nije nužan i koristi se prvenstveno za praćenje lijekova s uskom terapijskom širinom, visokim stupnjem farmakokinetičke varijabilnosti te lijekova za koje je poznato da mogu pokazivati neželjene učinke. Zasniva se na pretpostavci da postoji objašnjiv odnos između doze lijeka i njegove koncentracije u krvi ili plazmi, odnosno koncentracije i terapijskog učinka. Počinje nakon propisivanja lijeka te uključuje određivanje početnog režima doziranja prikladnog za kliničko stanje i samog pacijenta, po pitanju dobi, tjelesne težine, funkcije organa te već prisutnu terapiju [27].

1.6 Bioanalitika, izazovi u bioanalitici

Bioanalitika je ključan dio otkrića i razvoja lijekova. Odnosi se na analizu spojeva (lijekovi, metaboliti, biomarkeri) u biološkim uzorcima te uključuje brojne korake, počevši sa sakupljanjem

uzoraka, sve do analize i izvještaja o dobivenim podacima. Prvi korak je sakupljanje uzoraka iz kliničkih i pretkliničkih studija te slanje istih u analitički laboratorij. Potom se uzorak obrađuje, što predstavlja ključan korak u bioanalitici. Da bi se postigli pouzdani rezultati, priprema uzorka mora biti robustna i ponovljiva. Njezina uloga je uklanjanje interferencija iz matrice uzorka u svrhu poboljšanja učinkovitosti analitičkog sustava, što je nerijetko zahtjevno za provedbu i dugotrajno [28]. Složenost svakog od brojnih koraka analize bioloških uzoraka čini ovu granu analitike posebno podložnom optimizaciji u vidu prinosa i vremena trajanja analitičke metode.

Posljednji korak je analiza uzorka i detekcija traženog spoja. U bioanalitičkim laboratorijima, u svrhu separacije i detekcije tekućinska kromatografija uparena s tandemskom masenom spektrometrijom zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti predstavlja čest odabir.

1.7 Priprema biološkog uzorka, ekstrakcijske tehnike

Osim uklanjanja analitičkih interferencija, struktura kompleksnih matrica bioloških uzoraka (plazma, puna krv, urin, druga tkiva) također predstavlja nužnu komponentu koja se prije injektiranja u analitičke instrumente mora pročistiti. U idealnom slučaju, uzorak ne bi zahtijevao nikakvu predobradbu jer svaka manipulacija može dovesti do gubitka dijela analita ili, još gore, gubitka mogućnosti kvantifikacije [29]. Uobičajeno korištene metode pripreme uzoraka u biološkim laboratorijima su precipitacija proteina (engl. *protein precipitation*, PPT), ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE) [28].

1.7.1 Precipitacija proteina

Teoretska podloga PPT zasniva se na interakciji taložnog reagensa i funkcionalnih skupina proteina. Organska otapala i razrijeđeni detergensi remete intramolekulske hidrofobne interakcije proteina. Posljedično, gubitkom native strukture smanjuje se hidratacija proteina, a time i njihova topljivost u vodi. Topljivi proteini općenito imaju hidrofobnu sredinu okruženu hidrofilnom površinom koja sadrži slobodne ionizirane bočne ogranke. Ionizacijsko stanje ovih skupina može se mijenjati promjenom pH medija. Koncentrirane otopine soli smanjuju topljivost proteina smanjujući hidratijsko stanje proteina. Reagensi poput gvanidina, tiocijanata, tioureje i ureje natječu se za vodikove veze molekule. Česte otopine za PPT su organska otapala, metalni ioni, soli, koncentrirane otopine kiselina poput trikloroetene i perklorne. U slučaju manipulacije pH sustava, analiti moraju biti stabilni na ekstremne uvjete kojima se u tom slučaju izlažu [30].

1.7.2 Ekstrakcija tekuće – tekuće

Ekstrakcija tekuće - tekuće (engl. *liquid - liquid extraction*, LLE) je jednostavna tehnika obrade uzorka. Uključuje dodavanje organskog otapala koje se ne miješa s vodom u vodenu otopinu (plazma, urin, serum) u svrhu ekstrakcije analita u organsku fazu. Iako u velikoj mjeri pročišćava uzorak od soli i biomakromolekula, LLE često koekstrahira i druge neželjene spojeve. Parametri koji igraju važnu ulogu su pH vrijednost vodene faze, pK_a analita i particijski koeficijent distribucije analita između organske i vodene faze, kada je analit slaba baza ili kiselina [30].

Posebna, nova vrsta ekstrakcije tekuće-tekuće, razvijena 2006. godine je disperzivna mikroekstrakcija tekućih faza (engl. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME). To je brza i jednostavna metoda ekstrakcije i ukoncentriravanja organskih spojeva iz vodenih otopina. Zasniva se na naglom injektiranju ekstrakcijskog (poput tetrakloretilena) i disperzijskog (poput acetona) otapala u vodenu fazu pomoću šprice, stvarajući opalescentnu disperziju finih čestica ekstrakcijskog otapala [31].

1.7.3 Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE) je tehnika koja se na nekoj razini može razumijevati analogno kromatografskim metodama. To je jednostavna tehnika koja koristi 50-200 mg sorbensa za razdvajanje analita od kompleksne matrice. Uz uklanjanje interferencija, SPE se koristi i za ukoncentriravanje proučavanih spojeva. Osnovni tipovi su obrnuto-fazna, normalno-fazna te SPE s ionskom izmjenom, od kojih se svaka vrsta koristi za različit tip spoja [30]. Razvoj SPE metode povezan je sa svojstvima proučavanog analita, njegovoj koncentraciji, prirodi matrice uzorka, tipu kromatografije uključenom u korak odvajanja i detekcije. Najranije SPE kolone za jednokratnu uporabu koriste se od 1978., a u formi šprice je prvi put upotrijebljen 1979. godine [32]. Danas je SPE najraširenija tehnika pripreme uzoraka zbog svoje visoke učinkovitosti, povoljne cijene, reproducibilnosti, jednostavnosti uporabe i ekološke prihvatljivosti. Nove nedavno razvijene SPE metode uključuju μ SPE ili korištenje plosnatih diskova [28].

1.8 Pregled dosadašnjih istraživanja – objavljene metode, prednosti i nedostaci

1.8.1 Metode analize folata u biološkim uzorcima

Koncentracija ukupnih serumskih folata i 5-MTHF linearno korelira te se taj oblik nerijetko analizira kao pokazatelj ukupnog statusa folata u serumu. Česta tehnika za analizu 5-MTHF je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenim spektrometrom [26,33–35]. U nekim provedenim istraživanjima detekcija metabolita folne kiseline provedena je UV-Vis detektorom

[36,37], a u dijelu istraživanja korišten je i fluorescencijski detektor (FLD) [24,38–41], bilo sam za sebe, bilo u kombinaciji s UV-Vis detektorom, zavisno o spojevima koji su u istraživanjima obuhvaćeni. Rjeđe korištena tehnika elektrokemijske detekcije bila je privlačna zbog mogućnosti vrlo niskih granica detekcije u usporedbi s granicama detekcije UV detektorom, kao i bolje selektivnosti [42–44].

U predobradbi uzoraka plazme, uzorak je deproteiniziran i pripremljen za injektiranje u kolonu na različite načine. Jedan od njih je korištenje perklorne kiseline, centrifuge i filtriranje kroz filter veličine pora 0,45 µm uz dobro iskorištenje [44]. Uzorak se također može obraditi korištenjem fosfatnog pufera pH 7,0 te grijanjem na vodenoj kupelji 10 min i centrifugiranjem uz ponovnu ekstrakciju i centrifugiranje istaloženih proteina te pročišćavanje metabolita folata na afinitetnoj koloni s FBP (protein koji vezuje folate, engl. *folate binding protein*) što se pokazalo kao relativno brza, linearna i dovoljno osjetljiva metoda [35]. Jedna validacijska studija koja je ispitivala HPLC metodu predobradbom putem deproteinizacije s acetonitrilom praćeno SPE, LLE s *n*-heksanom, metanolom i etanolom bez SPE, te deproteinizacije mješavinom etanola i metanola praćeno SPE procedurom, od kojih je zadnja davala najviše iskorištenje, dalo je vremenski isplative (35 min za provedbu kromatografije) i specifične rezultate [37]. Za uzorak urina razvijena je brza i osjetljiva metoda koja koristi novu ekstrakcijsku tehniku (DLLME potpomognutu ultrazvukom) koja je proteine taložila otopinom trikloroctene kiseline te ih uklanjala filtracijom. Iskorištenje ekstrakcije obogaćenih uzoraka bilo je između 94,3 % i 98,2 % te se metoda pokazala reproducibilnom, jednostavnom, ekonomski povoljnom i ekološki prihvatljivom [36].

Otopine folata nužno je stabilizirati te se uz dodatak antioksidansa, najčešće askorbinske kiseline, otopina u velikoj mjeri stabilizira, dajući nepromijenjenu koncentraciju otopine nakon sat vremena, u usporedbi s 47 % ragrađenog standarda bez dodatka antioksidansa [35]. Običaj je uzorke s metabolitima folne kiseline čuvati i obrađivati zaštićene od svjetlosti [25].

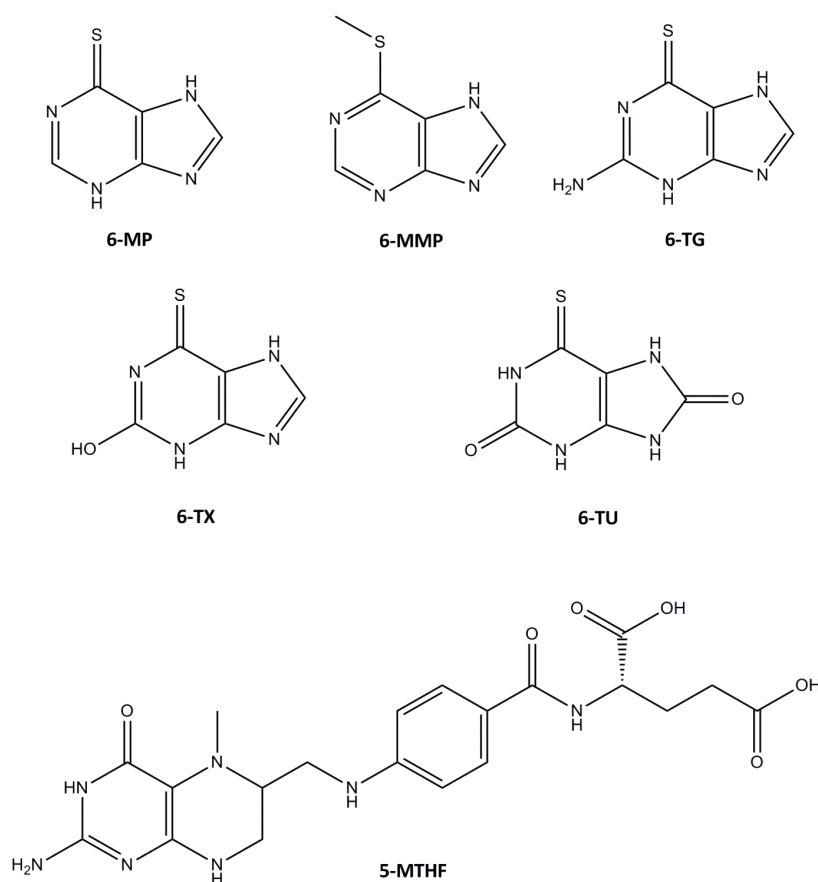
1.8.2 Metode analize tiopurina u biološkim uzorcima

Ekstrakcija tiopurina iz eritrocita se u pronađenim istraživanjima uglavnom provodila na slične načine, uz varijacije. Za dobivanje frakcije eritrocita uobičajenom procedurom, uzorak krvi s dodatkom antikoagulanta je centrifugiran te su plazma i *buffy coat* (frakcija nekoagulirane krvi koja sadrži leukocite i trombocite i nalazi se između slojeva eritrocita i plazme) odbačeni, a preostali talog eritrocita ispiran uravnoteženom otopinom anorganskih soli (engl. *Hanks' balanced salt solution*, HBSS). Protokol za ekstrakciju metabolita koju su opisali Dervieux i Boulieu [45], ponekad uz manje modifikacije, korišten je i u drugim istraživanjima [46–48] te obuhvaća miješanje suspenzije eritrocita s ditiotreitolum (DTT) kao antioksidansom, vodom i perklornom kiselinom. Sadržaj je potom centrifugiran na sobnoj temperaturi, a supernatant grijan na 100 °C. Na taj način tiopurinski nukleotidi

su se u potpunosti hidrolizirali u dušične baze, a 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) je prešao u 4-amino-5-(metiltio)karbonil imidazol (AMTCl), spoj koji se lako kvantificira pri istim kromatografskim uvjetima kao i ostali metaboliti [46], te je tako obrađen uzorak injektiran u HPLC sustav. Metaboliti tiopurina u svim pronađenim istraživanjima detektirani su pomoću detektora s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD), UV-Vis spektroskopijom. Zagrijavanje otopine dugotrajan je, no nužan korak u predobradi te u cijeloj analizi on predstavlja vremenski najzahtjevniji dio.

U jednoj validiranoj metodi vrijednoj spominjanja, objavljenoj 2018. godine analizirana je krv pacijenata koristeći kao uzorak malu količinu osušene krvi (engl. *dried blood spot*, DBS), te kao analitičku tehniku tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultrahigh performance liquid chromatography*, UHPLC) uparen s tandemskim masenim spektrometrom. Iako je obuhvaćala dugotrajne korake soniciranja i sušenja u struji dušika, sama separacija UHPLC tehnikom trajala je samo 5 minuta [49].

Prema našim najboljim saznanjima, nije razvijena jedinstvena kromatografska metoda koja obuhvaća kvantifikaciju folata i metabolita tiopurina u krvi i urinu (Slika 2). Osmišljavanjem jedinstvene metode omogućila bi se analiza ovih spojeva na istom analitičkom instrumentu, koristeći iste uvjete analize.



Slika 2. Strukture ispitanih spojeva

2 OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Općeniti problem kod TDM-a stalni je pritisak unutar zdravstvenog sustava u svrhu davanja usluga uz najmanju moguću cijenu. Jedan način uvođenja racionalne upotrebe resursa može biti utvrđivanje je li određena pretraga opravdana [27]. Dio odgovornosti racionalizacije resursa je i na kliničkim laboratorijima za analizu lijekova iz terapije. Njihova uloga je izmjeriti koncentraciju lijeka u uzorku koja se razmatra u kontekstu njegovog referentnog intervala. Od ključne je važnosti da analitičke metode za terapijsko praćenje lijekova traju što kraće i što su više protočne, omogućavajući obradu velikog broja uzoraka u određenom vremenu za potrebe rutinskih kontrola i praćenja. Zbog interindividualne varijabilnosti u farmakokinetici AZA i 6-MP, oni spadaju među lijekove kod kojih TDM može poboljšati ishod liječenja [14]. Tiopurinski metaboliti djelomično se izlučuju i urinom. Analiza tiopurina u urinu predstavljala bi brz i neinvazivan način za redovnu kontrolu adherencije. Što se tiče statusa folata, potrebno ga je pratiti kod pacijenata s IBD kako bi se utvrdilo treba li im suplementacija i u kojoj mjeri. Stoga je cilj ovog istraživanja postaviti temelje jedinstvenoj, selektivnoj, visokoprotlačnoj, brznoj i jednostavnoj HPLC metodi za kvantifikaciju 5-MTHF u plazmi, odnosno tiopurina u eritrocitima i urinu.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- 5-metiltetrahidrofolna kiselina (Carbosynth, St. Gallen, Švicarska)
- 6-merkaptopurin monohidrat, >98 % (TCI, Tokyo, Japan)
- 6-metilmerkaptopurin, 98 % (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- 6-tiogvanin ≥ 98 %, (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 6-tioksantin (Carbosynth, St. Gallen, Švicarska)
- 6-tiourična kiselina, natrijeva sol dihidrat (Carbosynth, St. Gallen, Švicarska)
- acetonitril, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- askorbinska kiselina, p.a. (Sigma, St. Louis, SAD)
- D,L-ditiotreitol (TCI, Tokyo, Japan)
- diklormetan, p.a. (T.T.T., Sveta Nedjelja, Republika Hrvatska)
- etil-acetat, p.a. (Lach-Ner, Brno, Češka Republika)
- izopropanol, HPLC čistoće (Fisher Chemical, Hampton, SAD)
- kloroform, p.a. (Carlo-Erba, Barcelona, Španjolska)
- metanol, HPLC čistoće (J.T.Baker, Center Valley, SAD)
- mravlja kiselina Lichropur 98-100 % (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev klorid, p.a. (Merck, Kenilworth, SAD)
- perklorna kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ultračista voda - proizvedena Ultra Clear UV sustavom za pročišćavanje vode (SG Water, Barsbittel, Njemačka)
- umjetni urin - negative urine control (Cerilliant, Round Rock, SAD)

3.1.2 Radni instrumenti i pribor

U izradi ovog rada korišteni su sljedeći radni instrumenti i pribor:

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- analitička vaga MX5 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- BD Vacutainer epruvete od 3 mL s EDTA (Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- Bond-Elut C18 500 mg 6 mL SPE kolona (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Bond-Elut C8 500 mg 6 mL SPE kolona (Agilent, Santa Clara, SAD)
- celulozni nitratni membranski filteri za filtraciju pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- centrifuga mini G, 6000 okretaja u minuti (IKA, Staufen im Bresgau, Njemačka)

- dry block thermostat TDB-120 (Biosan, Riga, Latvija)
- Isolute PLD+ 1 mL (Biotage, Uppsala, Švedska)
- mikropipete Rainin Pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Novum SLE kolona 1 mL (Phenomenex, Torrance, SAD)
- Oasis HLB 3 mL SPE kolona (Waters, Milford, SAD)
- Phree Phospholipid Removal kolona 1mL (Phenomenex, Torrance, SAD)
- plastične epruvete od 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- stakleni sustav za filtriranje pokretnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Elmasonic S30H (Elma Ultrasonic, Singen, Njemačka)
- vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- vortex miješalica Vortex 2 (IKA, Staufen im Bressgau, Njemačka)
- XBridge C18 kolona (150 × 4,6 mm, 3,5 μm veličina čestica) (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.1.3 Programi i programski paketi

- računalni program Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, SAD)
- programski paket za obradu podataka Chemstation for LC 3D A10.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.2 Metode

3.2.1 Uvjeti kromatografske analize

Kromatografska analiza provedena je na XBridge C18 koloni (dimenzije 150 × 4,6 mm, veličina čestica punila 3,5 μm). Kao sastavnica A pokretne faze primijenjena je smjesa ultračiste vode i mravlje kiseline u omjeru 99,9:0,1 (V/V). Kao sastavnica B pokretne faze primijenjena je smjesa metanola i mravlje kiseline u omjeru 99,9:0,1 (V/V). Sastavnice su profiltrirane pomoću sustava za filtriranje pokretnih faza i celuloznog nitratnog membranskog filtera veličine pora 0,45 μm.

Sustav za injektiranje uzoraka u kolonu namješten je na 30 μL po uzorku. Temperatura kolone iznosila je 30 °C, dok je protok pokretne faze postavljen na 1 mL/min.

Korištena je gradijentna elucija te su volumni udjeli sastavnica pokretne faze u određenim točkama analize prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Gradijentni program analize

t (min)	φ_A (%)	φ_B (%)
0-3	95	5
3-10	95 \rightarrow 80	5 \rightarrow 20
10-12	80	20
12-15	80 \rightarrow 50	20 \rightarrow 50
15-17	50 \rightarrow 0	50 \rightarrow 100
17-19	0	100
19	95	5

UV-Vis detekcija i određivanje provedeni su na valnim duljinama 302 i 342 nm bez referentnih valnih duljina te širinom vrpce 4 nm, dok je fluorescencijski detektor postavljen na ekscitacijsku valnu duljinu od 286 nm i emisijsku valnu duljinu od 361 nm.

3.2.2 Priprema otopina standarda

Pri izradi metode za analizu tiopurina umjesto realnih uzoraka pacijenata korišteni su slijepi uzorci eritrocita i urina obogaćeni standardnim otopinama, dok je za analizu 5-MTHF korištena plazma dobrovoljca budući da je on sam fiziološki prisutan spoj.

3.2.2.1 Matične otopine

Matične otopine 6-MP, 6-TG, 6-TX, 6-TU i 6-MMP pripravljene su u koncentracijama od 100 $\mu\text{g/mL}$ otapanjem odgovarajuće količine standarda u 10 mM NaOH. Matična otopina 5-MTHF pripravljena je u koncentraciji od 20 $\mu\text{g/mL}$ otapanjem odgovarajuće količine standarda u 1 mM NaOH.

3.2.2.2 Radne otopine

Radne otopine tiopurina za obogaćivanje uzoraka eritrocita pripravljene su razrjeđivanjem matičnih otopina tiopurina vodom, dajući sljedeće koncentracije: 600 ng/mL za 6-MP, 5 $\mu\text{g/mL}$ za 6-TG, 6-TX i 6-TU, 72 $\mu\text{g/mL}$ za 6-MMP. Radna otopina 5-MTHF pripravljena je razrjeđivanjem matične otopine do koncentracije 200 ng/mL.

3.2.3 Uzimanje uzorka krvi, razdvajanje frakcije plazme i eritrocita

Provedeno istraživanje odobreno je od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa 643-02/20-01/02, ur.broj 251-62-03-20-2, Zagreb, 28. siječnja 2020.). 5 mL krvi dobrovoljca izvađeno je venepunkcijom, koristeći

etilendiamintetraacetat (EDTA) kao antikoagulant. Centrifugirana je tijekom 10 minuta na 1500 g i 4 °C kako bi se razdvojile frakcije plazme i eritrocita.

3.2.4 Priprema uzorka plazme za analizu 5-MTHF

Cijeli postupak proveden je u zatamnjenim uvjetima zbog fotonestabilnosti analita u otopini. Frakcija plazme kapalicom je izvađena kao tekući supernatant centrifugirane krvi i prebačena u Eppendorf epruvete. 1,0 mL plazme pomiješano je s 10 µL vodene otopine ASK koncentracije 3 g/L. Taloženje proteina provedeno je dodatkom 50 µL 70 % otopine perklorne kiseline. Nakon miješanja na vortex miješalici i 5 minuta mirovanja uzorak je centrifugiran na 1800 g tijekom 5 minuta.

SPE procedura koja je dala najbolje rezultate obuhvaćala je kondicioniranje kolone s 2 mL metanola, te potom s 2 mL vode nakon čega se kolona nije ostavljala suhom. Naneseno je 500 µL uzorka te isprano s 2 mL vode. Eluirano je s 1,5 mL MeOH s 1 g/L askorbinske kiseline. Sakupljena eluirana frakcija uparena je te je suhi ostatak otopljen u 100 µL vodene otopine askorbinske kiseline koncentracije 100 µg/mL.

3.2.5 Priprema uzorka eritrocita za analizu tiopurina

Nakon uklanjanja supernatanta i *buffy coat*-a, preostali eritrociti isprani su s po 1 mL HBSS i centrifugirani 5 minuta na 1000 g dva puta te zamrznuti na -20°C do analize. U Eppendorf epruvetu, u 200 µL tako pripremljenih eritrocita dodano je 50 µL 70 % perklorne kiseline, 150 µL 50 mg/mL otopine DTT te 50 µL vodene otopine standarda mješavine tiopurina. U realnom uzorku umjesto radnih otopina standarda koristio bi se jednak volumen vode. Sadržaj epruvete centrifugiran je na 1800 g 10 min te je supernatant prebačen u prazne Eppendorf epruvete te u blok grijač temperature 100 °C, grijan 40 minuta te nakon hlađenja injektiran u sustav.

3.2.6 Priprema uzorka urina za analizu tiopurina

Umjetni urin obogaćen je sa standardnim otopinama 6-MP, 6-TX, 6-TU u koncentraciji 5 µg/mL, istaložen s koncentriranom otopinom perklorne kiseline, dajući koncentraciju 0,5 M perklorne kiseline te razrijeđen 3 puta s vodom. Potom je nakon centrifugiranja 5 minuta na 1500 g u instrument injektirano 30 µL tako priređenog supernatanta. U realnom uzorku umjesto radne otopine standarda tiopurina koristio bi se jednak volumen vode.

4 REZULTATI

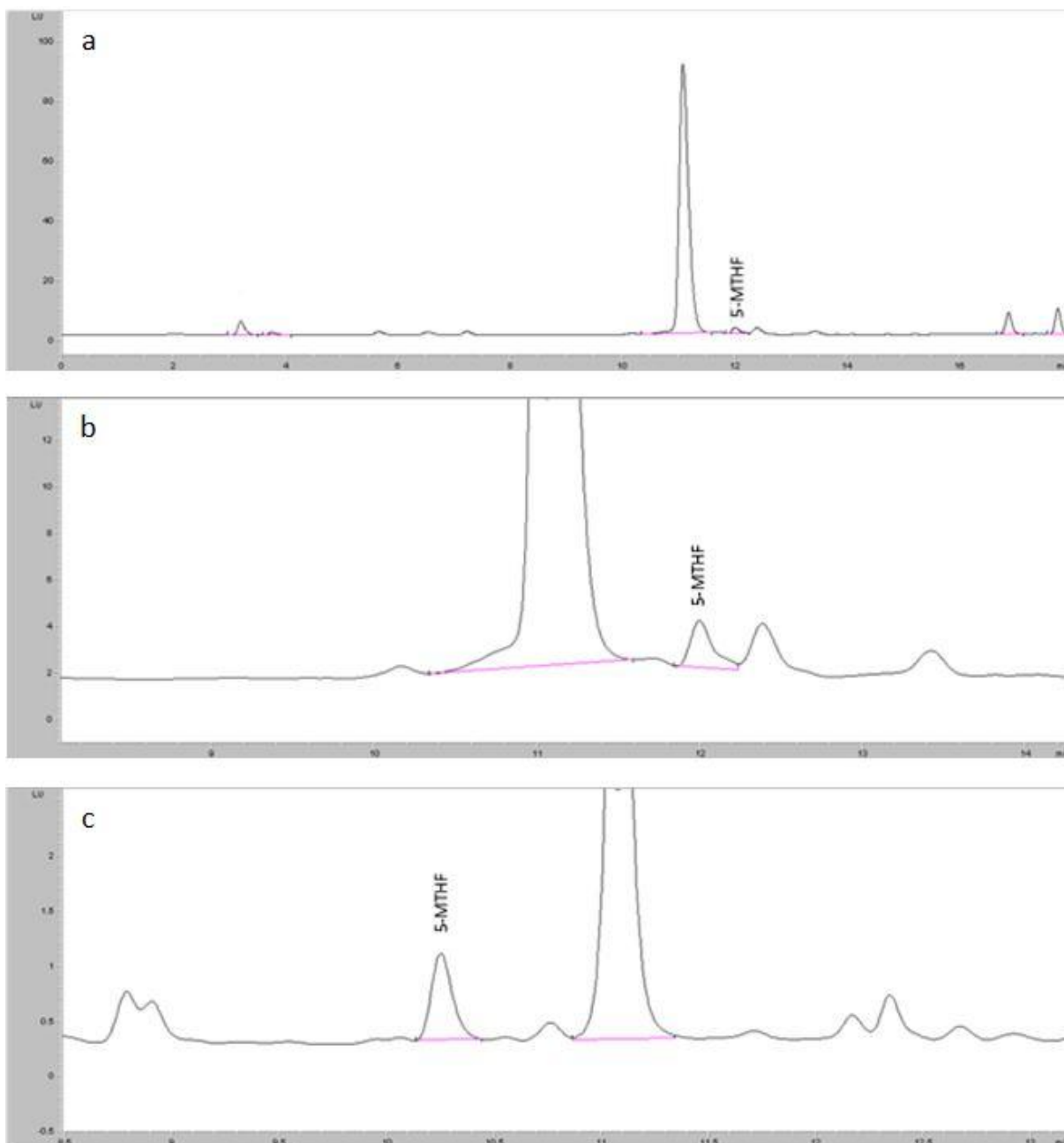
4.1 Razvoj i optimizacija HPLC-DAD metode

4.1.1 Odjeljivanje ispitivanih spojeva

Stacionarna faza u analizi značajno utječe na selektivnost metode te je među prvim koracima njezin izbor ključan. Isprobano je nekoliko kromatografskih kolona:

- Agilent XBridge C18 (150 × 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm)
- Agilent XBridge Phenyl (150 × 4,6 mm, veličina čestica, 3,5 μm)
- Agilent Zorbax SB-C8 (150 × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm)

Kolona XBridge Phenyl pokazivala je loše razdvajanje rano izlazećih analita elucije te je nakon nekoliko pokušaja optimiranja odbačena mogućnost njezine upotrebe. U istim uvjetima puštena je otopina 6-MMP na C18 koloni – s retencijskim vremenom 26,60 min, te njegov razgradni produkt dobiven kiselom hidrolizom – 4-amino-5-(metiltio)karbonil imidazol (AMTCI) koji je opisan u radu s protokolom iz 1998. godine [45] imao vrijeme retencije 3,42 min. Otopina standarda i AMTCI analizirana je i na Zorbax C8 koloni gradijentnom elucijom. Hidrofilniji analiti izlazili su kasnije u usporedbi s drugim kolonama. To svojstvo je bilo poželjno budući da plazma sadrži brojne polarne interferencije koje u reverzno faznoj kromatografiji imaju relativno malena vremena zadržavanja. Rad je nastavljen na Zorbax C8 koloni jer je ona pokazivala najbolje odjeljivanje sastavnica vodene otopine standarda. Međutim, pri analizi realnog uzorka plazme uočeno je da 5-MTHF eluira ubrzo nakon velikog pika koji predstavlja interferenciju iz plazme koji bi, u slučaju *tailinga*, potencijalno mogao prekriti pik 5-MTHF te onemogućiti njegovo određivanje (slike 3a i 3b). Kada je za isti uzorak upotrijebljena XBridge C18 kolona, analit je eluirao prije interferencije te je ta kolona upotrijebljena za daljnja istraživanja (slika 3c).



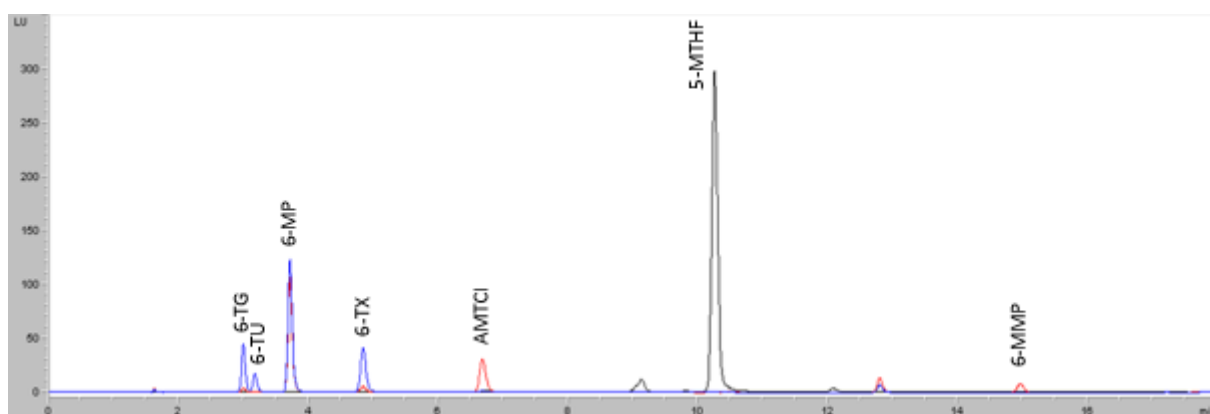
Slika 3. a) kromatogram uzorka plazme obrađenog PPT analiziranog na Zorbax C8 koloni, b) uvećani prikaz kromatograma sa slike 1a, c) uvećani prikaz kromatograma na koloni XBridge C18. Svi kromatogrami snimljeni na FLD, valne duljine 286/361 nm

Nakon odabira nepokretne faze, optimizirao se sastav pokretne faze. Na temelju prijašnjih istraživanja na tiopurinima [50] od početka se koristila pokretna faza s 0,1 % mravlje kiseline jer je ona osiguravala prikladan pH za analizu AZA i sličnih spojeva, za razliku od neutralne ili lužnate. Kao organska sastavnica pokretne faze razmatrani su ACN i metanol, no budući da je ACN po svojim karakteristikama snažniji eluens te ostavlja manje prostora za optimizaciju metode, izabran je metanol. U najranijim analizama rađena je analiza sa stalnim sastavom pokretne faze od 10 % i 20 % metanola i

0,1% mravlje kiseline u vodi (V/V), no prevelik udio organske tvari u pokretnoj fazi uzrokovao je prebrzu eluciju sastavnica uzorka s manjim vremenima zadržavanja. U daljnjem radu isprobavani su različiti profili gradijentne elucije, koji bi omogućavali bolje odijeljivanje sastavnica na početku kromatograma. Gradijentni profil elucije naveden je u tablici 1.

4.1.2 Odabir detektora za identifikaciju analita

U ovom radu kao detektori korišteni su DAD i FLD. DAD je podešen na detekciju pri 302 nm (AMTCl, 6-MMP) te 342 nm (6-TG, 6-TU, 6-MP, 6-TX). Za detekciju 5-MTHF FLD je podešen na ekscitaciju pri valnoj duljini od 286 nm te detekciju emisije pri valnoj duljini od 361 nm. Valja istaknuti kako je granica određivanja 5-MTHF bila 5 ng/mL pri analizi standardne otopine, što je iznimno zadovoljavajuće za HPLC sustav s manje osjetljivim detektorom poput fluorescencijskog u usporedbi s masenim spektrometrom. Reprezentativni kromatogram smjese standardnih otopina prikazan je na slici 4.



Slika 4. Kromatogram smjese standardnih otopina. Plavo - 342 nm, crveno - 302 nm, crno - fluorescencija 286 nm/361 nm

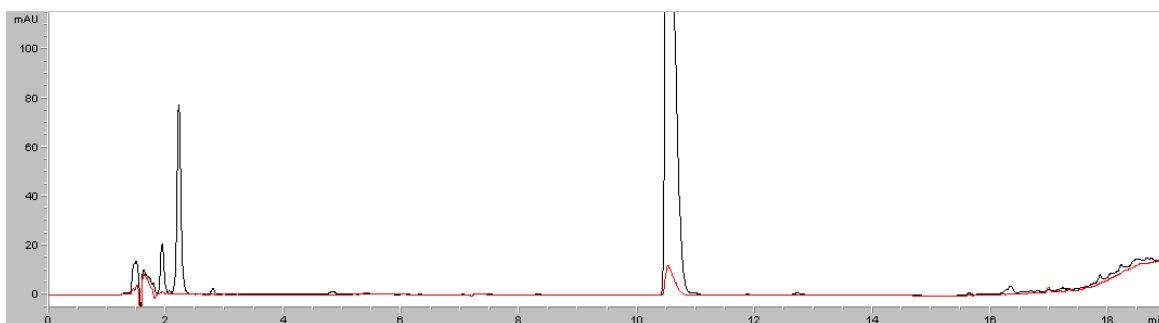
4.2 Ispitivanje selektivnosti analitičke metode

U različitim biološkim tekućinama, matriks je složen te sadrži biološki važne spojeve prisutne fiziološki u tekućini ili nastale kao produkt lize stanica (dispergirani proteini, lipidi, nukleinske kiseline, šećeri), predstavljajući organske interferencije koje se u potpunosti ne mogu ukloniti.

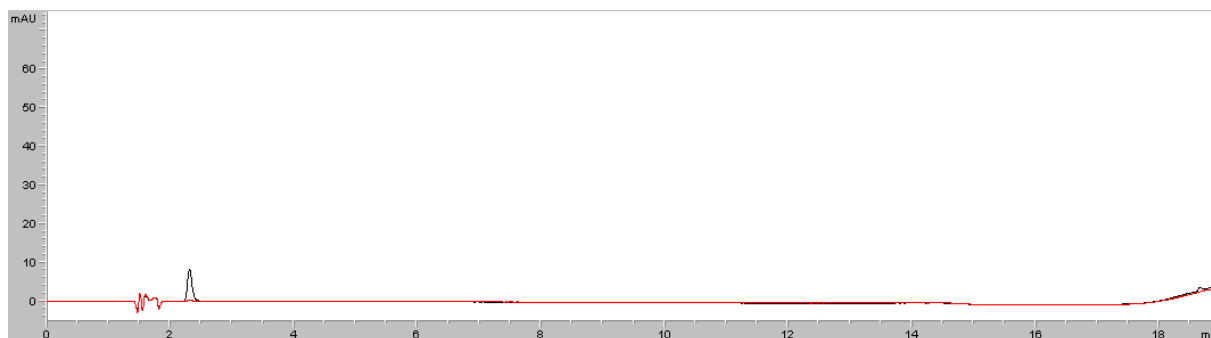
Drugi aspekt složenosti uzorka u pacijenata oboljelih od IBD često je politerapija. U nekim slučajevima IBD politerapija je nužna za tretiranje kompleksnog stanja, a u drugima je korisna za smanjenje nuspojava postojeće terapije, kao što je kombinirana terapija AZA i alopurinola [13].

U oba slučaja ključno je pokazati da je metoda selektivna, odnosno da je u stanju dati signal analita koji se može razlikovati od signala ostatka uzorka [51].

Na slikama 5 i 6 prikazani su slijepi uzorci eritrocita i umjetnog urina pripremljeni prema protokolima iz poglavlja 3.2.5 i 3.2.6. Kao što se može vidjeti, pikovi interferencija iz slijepih uzoraka vremenski se ne poklapaju s vremenima zadržavanja analita (Slika 4), iz čega se može zaključiti da je metoda selektivna. Slijepi uzorak realne plazme kao takav ne postoji, budući da je 5-MTHF fiziološki prisutna molekula.

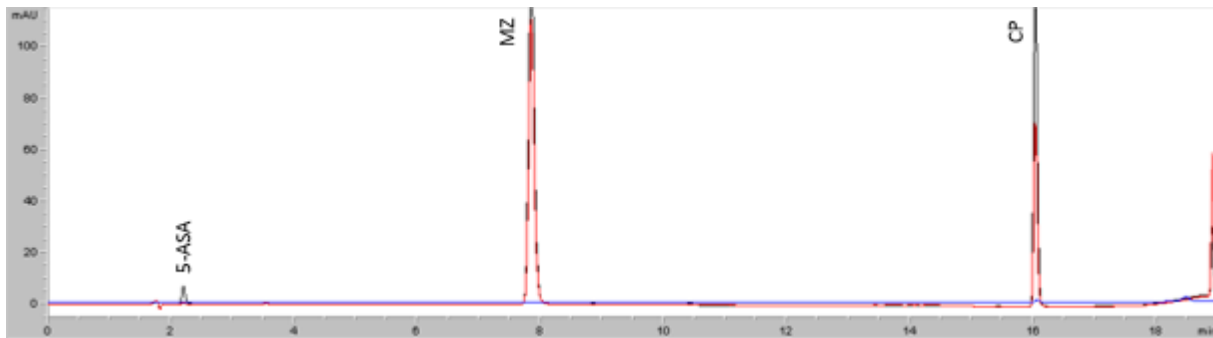


Slika 5. Slijepi uzorak eritrocita, bez dodanih analita. Crveno - 342 nm, crno - 302 nm



Slika 6. Slijepi uzorak umjetnog urina. Crveno - 342 nm, crno - 302 nm

Selektivnost metode s obzirom na kombiniranu terapiju provedena je analizom otopina standarda nekih od uobičajenih lijekova u pratećoj terapiji: prednizon, metilprednizolon, ciprofloksacin (CP), 5-ASA i MZ. Od interferirajućih lijekova, unutar vremena trajanja metode izlazili su 5-ASA, MZ i CP, što je vidljivo na kromatogramu (slika 7). Ovom analizom potvrdilo se da lijekovi iz politerapije ne eluiraju u istom vremenu kao i analiti, čineći metodu selektivnom s obzirom na te spojeve. Što se tiče 5-MTHF, na kromatogramu je vidljivo da nijedan spoj iz preostale terapije ne emitira na valnoj duljini detekcije fluorescencijskim detektorom, što znači da ostatak terapije ne interferira s analitom iz krvne plazme.

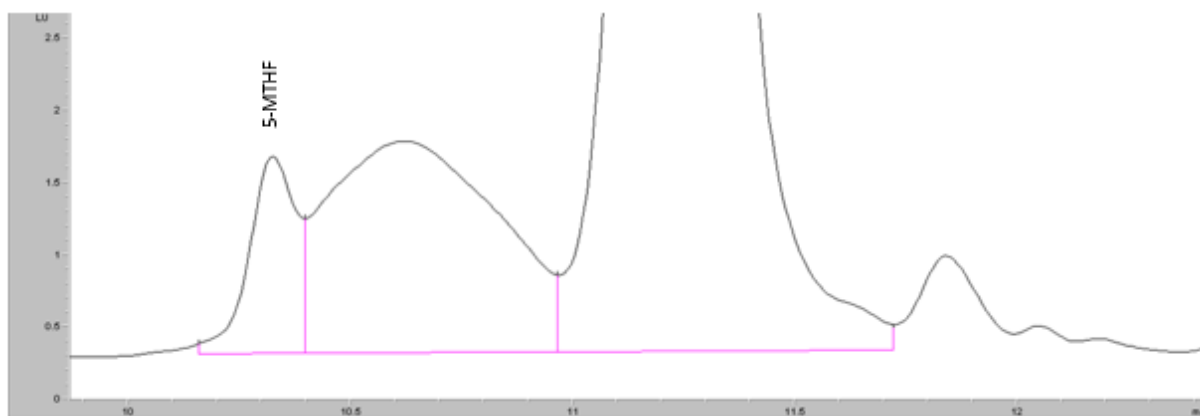


Slika 7. Interferirajući lijekovi potencijalno prisutni u terapiji. Crveno - 342 nm, crno - 302 nm, plavo - fluorescencija 286 nm/361 nm

4.3 Obrada uzorka plazme

4.3.1 Optimizacija uvjeta taloženja proteina plazme

Pri tekućinskoj kromatografiji korištenoj za analizu koncentracije 5-MTHF uzorak plazme je nužno obraditi na način da se uklone interferencije koje bi mogle začepiti kromatografsku kolonu. U prvom redu to su proteini. U preliminarnim ispitivanjima proteini su taloženi korištenjem organskih otapala. Korišteni su acetonitril i metanol u omjerima 2:1 te 3:1 u odnosu na plazmu. Pri puštanju realnog uzorka u kojem su istaloženi proteini pik 5-MTHF znatno se smanjio te je radi povećanja stabilnosti analita, uz rad u zatamnjanim uvjetima (zbog njegove fotonestabilnosti) u uzorak dodana vodena otopina antioksidansa. Ispitana je stabilnost analita uz dodatak askorbinske kiseline u količinama od 15 do 90 μg po uzorku plazme. Svi uzorci su dobro izmiješani na vortex miješalici i centrifugirani. Uzeti su jednaki ekvivalenti supernatanta te su upareni do suha. Zatim je svaki otopljen u 100 μL 1g/L askorbinske kiseline te je injektirano 30 μL te otopine. Uzorci su injektirani odmah nakon pripreme te u razmaku od dva sata, budući da je analit u tom periodu već pokazao značajnu stabilnost. Uzorci taloženi acetonitriplom davali su signal za red veličine manji od onih kod kojih je kao *crash solvent* korišten metanol. Najveći signal i stabilnost nakon dva sata od pripreme pokazivao je uzorak taložen metanolom u omjeru 2:1. Dodatak askorbinske kiseline pokazao se kao dobar način stabilizacije otopine, a masa od 90 μg po uzorku optimalnom. U istoj količini dodavala se za sve preostale obrade uzorka. Količina *crash solvent*-a u odnosu na plazmu nije utjecala na rezultate mjerenja. Isprobane su i spomenute obrade uzorka na kolonama za uklanjanje fosfolipida i proteina *Phree phospholipid removal* i *Isolute* kao potpora samom taloženju proteina kako bi se povećala selektivnost, no neki od rezultata su ukazivali na neuklonjene interferencije koje su smetale u određivanju 5-MTHF te rezultati analiza nisu bili ponovljivi (rezultati preliminarnih istraživanja nisu uključeni u rad). Na slici 8 vidi se primjer kromatograma dobivenog korištenjem *Isolute* kolone.



Slika 8. Kromatogram obrađen PPT na Isolute koloni, uz ACN kao agens za taloženje. Fluorescencija, 286/361 nm

Pik 5-MTHF koeluirao je s onečišćenjem što onemogućuje njegovu pouzdanu kvantifikaciju. U probiru načina predobradbe takve tehnike su se izbjegavale te se tražila metoda s najčišćim pikovima i interferencijama uklonjenim u što većoj mjeri. Iako su metode *Phree phospholipid removal* i *Isolute* načelno davale „čišće“ kromatograme, uklanjajući više interferencija od precipitacije proteina, zbog nedovoljne selektivnosti za određivanje folata ovi načini predobradbe nisu dalje istraživani.

4.3.2 Ispitivanje stabilnosti 5-MTHF u prisustvu perklorne kiseline

Prije nego što su provedeni druge tehnike ekstrakcije, na otopini standarda 5-MTHF ispitana je stabilnost analita nakon dodatka drugih sredstava za taloženje proteina, specifično perklorne kiseline. Budući da se kromatografska elucija započinje s malim volumnim udjelom metanola, injektiranje otopina velikog udjela organske faze moglo bi dovesti do utjecaja otapala (engl. *solvent effect*) i prijevremene elucije analita, dovodeći u pitanje selektivnost, točnost i preciznost metode. Iako postoji opcija upariti metanol te nanijeti otopinu resuspendiranu u vodenoj otopini antioksidansa, ona obuhvaća dugotrajan korak uparivanja organskog otapala koji se mora provoditi dva puta ukoliko se uzorak nanosi na SPE kolonu. Upotrebom perklorne kiseline dobiveni su zadovoljavajući rezultati, gdje se površina pika 5-MTHF u dva sata smanjila za 3,42 %. Mjerenje je provedeno i nakon sedam sati te je površina pika tada iznosila 63,81 % u odnosu na pik odmah nakon otapanja, što je značilo da otopina nije dugo stabilna te je bolje uzorak nanositi odmah nakon taloženja proteina radi što manje degradacije analita. Koncentrirana perklorna kiselina pokazala se kao adekvatni agens za taloženje proteina, ne uvodeći dodatno organsko otapalo.

4.3.3 Optimizacija pripreme uzorka tehnikom ekstrakcije na čvrstoj fazi

U svrhu uklanjanja interferencija iz uzorka sa što manjim gubicima analita, uz taloženje proteina provedeno je pročišćavanje plazme ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Budući da bi proteini iz uzorka smetali prilikom provođenja ekstrakcije u svakoj od tehnika, slično spomenutim isprobanim metodama (*Phree phospholipid removal*, *Isolute*), prethodno ih je trebalo istaložiti. Taloženje organskim otapalom kao u tim metodama nije dolazilo u obzir jer se uzorak u takvom mediju ne bi smio nanositi na kolone zbog snažne sposobnosti elucije metanola i acetonitrila. Uz to, ekstrakcije tekuće-tekuće zahtijevaju postojanje dvaju medija s naglašenom razlikom u raspodijeli, od kojih je jedan organski a drugi vodeni. Ovoj problematici moglo se pristupiti uparavanjem organskog *crash solvent*-a, no taj korak znatno bi produžio vrijeme analize, budući da je za nanošenje na HPLC kolonu također predviđen nužni korak uparavanja organskog otapala (ekstrakcijski medij). U prethodnim istraživanjima [44] pronađeno je da se proteini mogu taložiti dodavanjem perklorne kiseline. Perklorna kiselina dodavala se u obliku koncentrirane otopine, radi manjeg razrjeđenja uzorka, dajući koncentraciju 0,5M. Tako tretiran uzorak kao otapalo sadrži vodu, prikladan medij kojeg svaka od korištenih ekstrakcijskih tehnika zahtijeva kao polaznu točku.

4.3.3.1 Odabir optimalne metode za dodatno pročišćavanje uzorka plazme

Za odabir optimalne metode pročišćavanja uzorka i ekstrakcije analita isprobano je nekoliko različitih tehnika:

- Agilent Bond Elut C-18 – SPE kolona
- Agilent Bond Elut C-8 – SPE kolona
- HLB – SPE kolona
- SLE kolona
- DLLME

Za uzorke ekstrahirane tehnikom DLLME kao ekstrakcijsko sredstvo isprobavani su diklormetan i kloroform, svaki pomiješan s metanolom u omjeru 2:1. Umjesto realnog uzorka plazme upotrijebljena je otopina standarda 5-MTHF pomiješana s perklornom kiselinom i otopinama NaCl, ukupne koncentracije 0,05 %, 0,5 % te 1 % (*m/V*). Nakon miješanja otapala, uzorci su miješani na vortex miješalici, potom stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta, upareni i redispergirani u 100 μ L otopine askorbinske kiseline koncentracije 3 g/L. Ni jedna od ovih metoda nije davala površinu pika koja je bila integrabilna ili površine nisu bile dovoljno velike da bi pokazale potencijal za daljnje pokušaje optimizacije. Takvi rezultati ukazuju na razgradnju folata u tim otapalima ili izostanak ikakve ekstrakcije. Napravljeni su i eksperimenti s pH vrijednošću podešenom na izoelektričnu točku 5-MTHF (pri čemu bi 5-MTHF trebao biti u potpunosti neioniziran te posljedično i najlipofilniji, dovodeći do najvećeg postotka ekstrakcije), no oni nisu davali bolje rezultate. Upitna je validnost

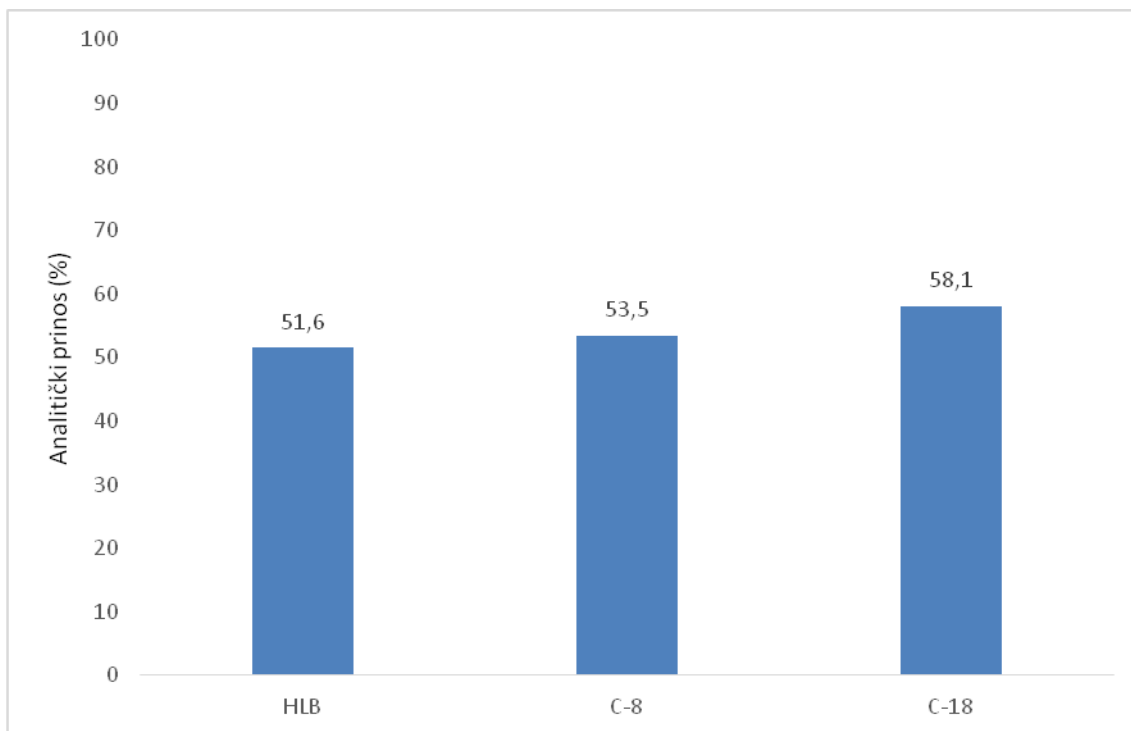
rezultata radova koji su na ovaj način dobivale značajniji prinos [36], iako ključ može ležati u činjenici da se radi o manje kompleksnoj vrsti biološkog uzorka (urin). DLLME je, kao modificirana ekstrakcija tekuće-tekuće, obično pogodnija za lipofilne, neutralne spojeve. Za ionske spojeve ključna je kontrola pH vrijednosti, no ona se teže postiže u varijabilnim uzorcima. Iz navedenih razloga nastavilo se s preostalim tehnikama.

Potpomognuta ekstrakcija tekućom fazom (SLE, engl. *supported liquid extraction*) provodila se na uzorku plazme pomiješanom s 1 % vodenom otopinom HCOOH u omjeru 1:1. Takva smjesa nanosena je na tri različite SLE kolone spojene na komoru sa sniženim tlakom. Smjese su eluirane s 1800 μL čistog diklormetana, smjese diklormetana i izopropanola u omjeru 95:5 (V/V) ili etil-acetata tijekom 5 minuta. Ove metode nisu dale odaziv analita iznad granice dokazivanja (omjer signal/šum bio je manji od 3).

Sve ekstrakcije na SPE kolonama (C-18, C-8 i HLB) provedene su u jednakim uvjetima analize: Kondicioniranje kolone s 3 mL MeOH, 2 mL H₂O i 2 mL otopine ASK koncentracije 3 g/L. Priređena je otopina standarda 5-MTHF koncentracije 500 ng/mL te je pomiješana sa 50 μL perklorne kiseline da bi se podudarala s realnim uzorkom. Na svaku SPE kolonu dodavalo se 200 μL tako priređene otopine. Nakon nanošenja, kolone su isprane s 2 mL vode te eluirane s 1,5 mL metanolne otopine 1 g/L askorbinske kiseline.

Nanošenjem sakupljene metanolne frakcije na kolonu bez daljnje obrade dobivali su se razvučeni pikovi zbog utjecaja otapala. To je ukazalo na nužnost koraka uparavanja organskog otapala. Nedostatak koraka ukoncentriravanja uzorka na uparivaču njegova je dugotrajnost. Međutim uparavanje nije dodatno razgrađivalo analit što je potvrđeno eksperimentalno, uparavanjem 100 μL otopine standarda 5-MTHF pomiješane s 200 μL metanola s 1 g/L ASK te provedbom HPLC analize u jednakim uvjetima.

Uparavanje i ponovno otapanje ostatka provelo na isti način kao i u DLLME metodi te su tako priređene otopine injektirane na HPLC kolonu. Prinosi ekstrakcija na pojedinim SPE kolonama prikazani su na slici 9.



Slika 9. Prinos 5-MTHF na tri različite SPE kolone (izraženo u % prema površini pika neobrađene otopine standarda)

Prinos od 58,1 % davala je C-18 kolona te je ona odabrana za daljnja istraživanja.

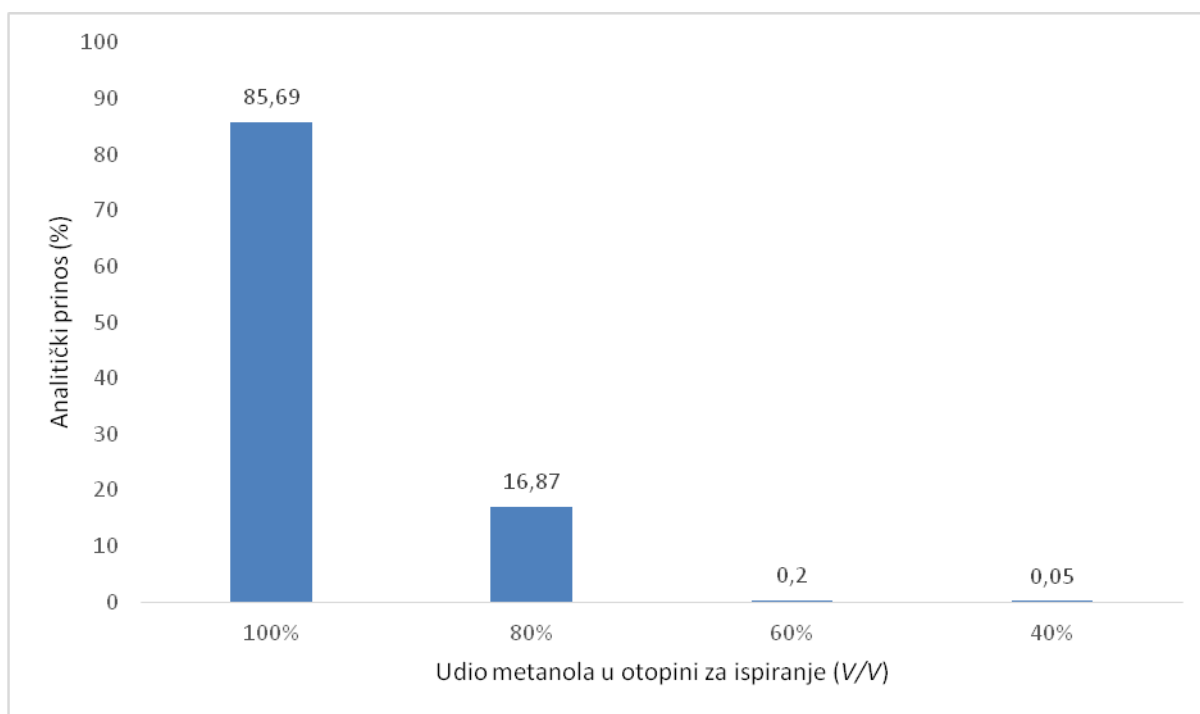
Ispitano je i može li se nanositi veća količina uzorka na C-18 kolonu radi ukoncentriravanja na način da je nanoseno 600 μ L otopine standarda umjesto dotadašnjeg uobičajenog volumena 200 μ L. Analiza je dala površinu pika koja korelira s povećanjem nanesenog volumena, uz još veći prinos što je zadovoljavajuć rezultat, budući da se na ovaj način mogu postići niže razine dokazivanja i određivanja te posljedično povećati osjetljivost metode.

4.3.3.2 Optimizacija udjela metanola u ispiranju uzorka sa SPE kolone

Kao i u tekućinskoj kromatografiji, razdioba afiniteta analita prema nepokretnoj ili pokretnoj fazi značajno se mijenja promjenom udjela organskog otapala u pokretnoj fazi, utječući na zastupljenost polarnog karaktera pokretne faze u obrnuto-faznoj kromatografiji: što je manji udio metanola u eluensu, manja količina lipidnih sastavnica će se ispirati i predstavljati moguća onečišćenja u kromatogramu.

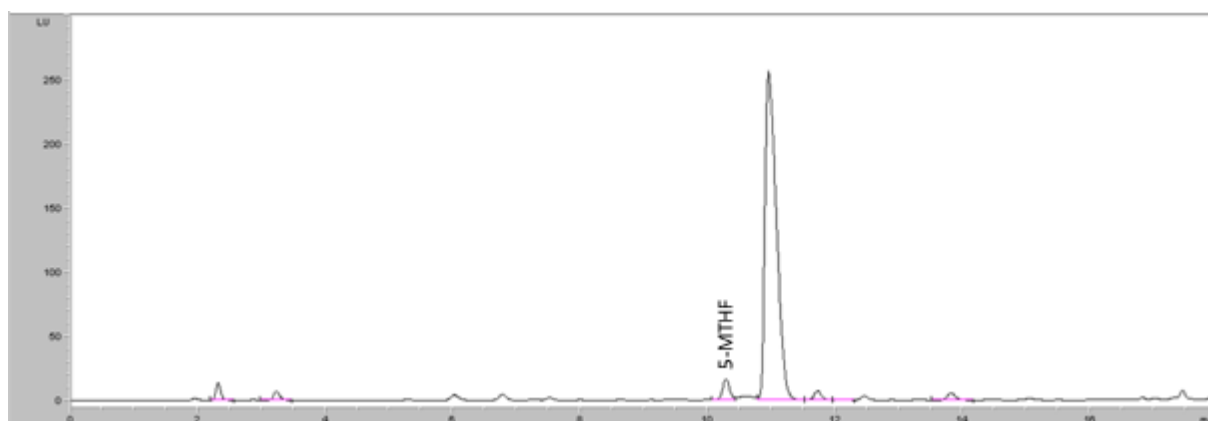
Kondicioniranje C-18 SPE kolone provedeno je analogno dosadašnjem protokolu. Zbog razloga navedenih u prethodnom poglavlju, na kolone je nanošeno 600 μ L otopine standarda pomiješane s perklornom kiselinom i askorbinskom kiselinom (ukupna koncentracija 1 g/L ASK).

Kolone su ispirane s 1,5 mL metanola u vodi, u udjelima 40 – 100 % (V/V), što je upareno i redispergirano po uzoru na postupak DLLME te je nakon centrifugiranja uzorak analiziran. Prinosi su vidljivi na slici 10.



Slika 10. Prinos 5-MTHF s obzirom na udio metanola pri eluiranju (izraženo u % prema površini pika neobrađene otopine standarda)

Najveći prinos dalo je ispiranje kolone 100 % metanolom te se on značajno smanjio smanjenjem udjela metanola pri eluiranju. Smanjenje je daleko od zanemarivog te nije promijenilo izgled kromatograma u mjeri gdje bi takav gubitak analita bio opravdan. Kromatogram uzorka plazme na optimalnim uvjetima obrade prikazan je na slici 11.



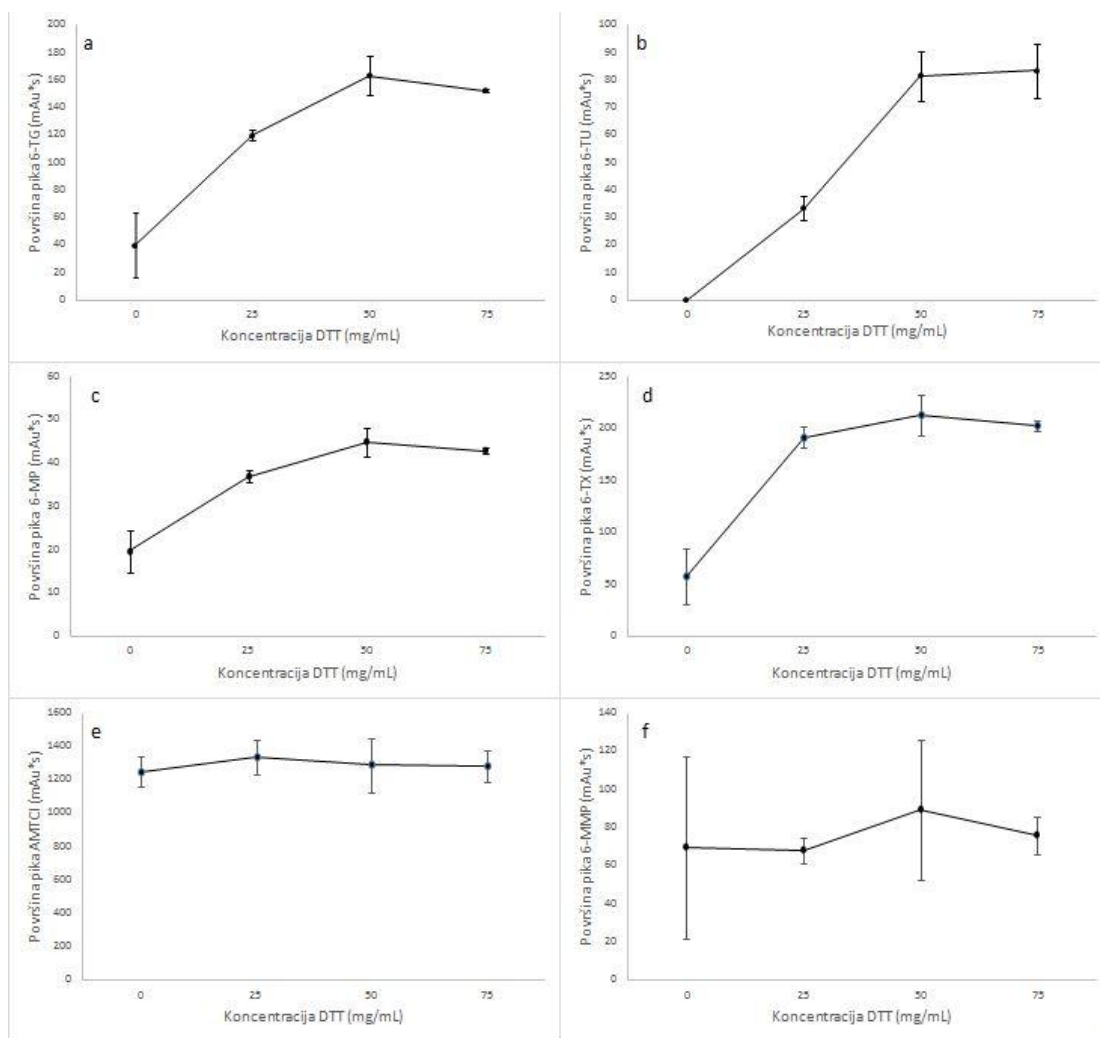
Slika 11. Kromatogram uzorka plazme pri optimalnim uvjetima. Fluorescencija, 286/361 nm

4.4 Obrada uzorka eritrocita

4.4.1 Optimizacija koncentracije dodanog ditiotreitola u uzorku za analizu tiopurina

Ispitan je utjecaj koncentracije dodanog antioksidansa DTT korištenog za stabilizaciju analita u eritrocitima. U 200 μL eritrocita, uz 50 μL koncentrirane perklorne kiseline i 50 μL prethodno pripremljene otopine standarda tiopurinskih metabolita, u svaki uzorak se dodavalo i 150 μL otopine DTT. Dodane su otopine DTT priređene u koncentracijama 25, 50 i 75 mg/mL, te je u jedan uzorak dodano 150 μL vode (otopina bez antioksidansa). Svi uzorci su grijani u blok grijaču te obrađeni po protokolu opisanom u poglavlju 3.2.5 Metode – Priprema uzorka eritrocita za analizu tiopurina.

Uzorci su rađeni u duplikatu te su točke na dijagramima pojedinih tiopurinskih metabolita prikazane uz njihovo standardno odstupanje (slika 12).

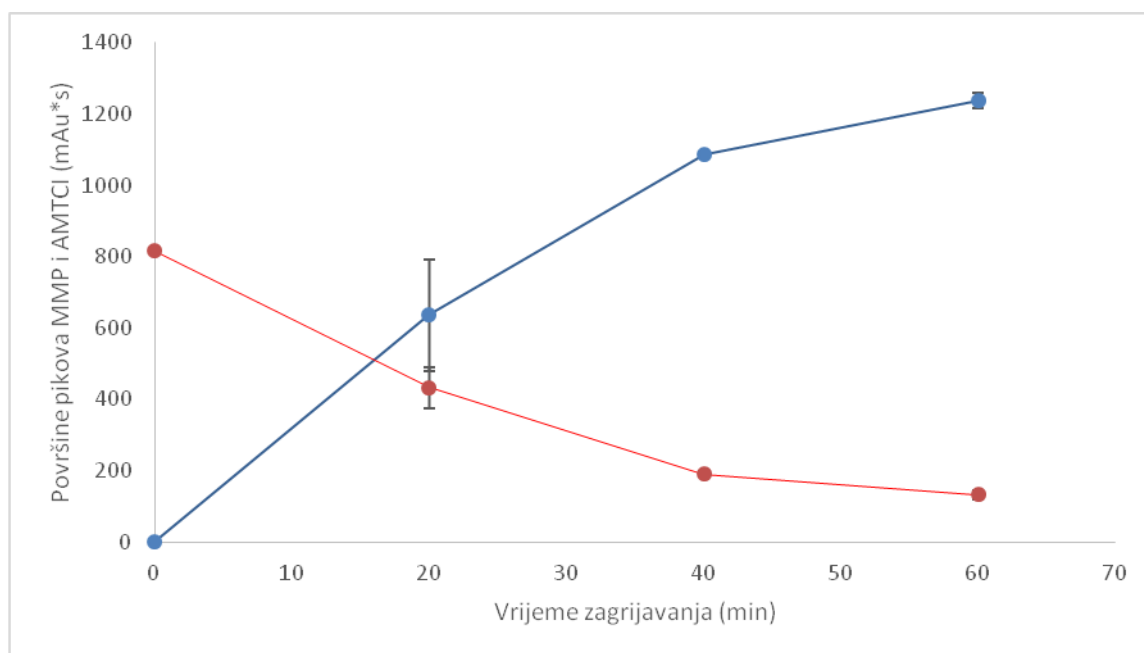


Slika 12. Ovisnosti površina pika a) 6-TG, b) 6-TU, c) 6-MP, d) 6-TX, e) AMTCl, f) 6-MMP o koncentraciji DTT

Svi analiti imali su najveću površinu pika pri dodatku otopine DTT koncentracije 50 mg/mL. Veće koncentracije DTT nisu rezultirale značajno većom površinom pikova ni u jednog od analiziranih spojeva, što znači da je koncentracija priređene otopine DTT 50 mg/mL optimalno stabilizirala uzorak.

4.4.2 Optimizacija vremena zagrijavanja eritrocita

Cilj metode postići je zadovoljavajući prinos, točne i precizne rezultate te u isto vrijeme osigurati visoku protočnost metode. Dio standardnog protokola za analite koji se u biološkim tekućinama nalaze u obliku nukleotida je njihova hidroliza u oblik slobodne baze. U ovoj metodi predobradbe uzorka radi se o kiseljoj hidrolizi. Jedan se od analita, 6-MMP, tijekom tog procesa prevodi u razgradni produkt AMTCI. Važno je stoga u što većoj mjeri prevesti 6-MMP u njegov derivat da bi se mogao pouzdanije kvantificirati. Ispitivano je vrijeme zagrijavanja uzorka potrebno za prevođenje standarda 6-MMP u derivat AMTCI (Slika 13). Uzorci su obrađivani po metodi opisanoj u poglavlju 3.2.5 Metode – Priprema uzorka eritrocita za analizu tiopurina. Promatrane su površine pikova 6-MMP i AMTCI, budući da se u ovoj metodi koncentracija tiopurinskog metabolita 6-MMP izražava koncentracijom produkta njegove hidrolize AMTCI (derivat dobiven obradom uzorka). Oba spoja detektirana su spektrofotometrijski na 302 nm te se na dijagramu također može uočiti veća osjetljivost metode na AMTCI u usporedbi s MMP.



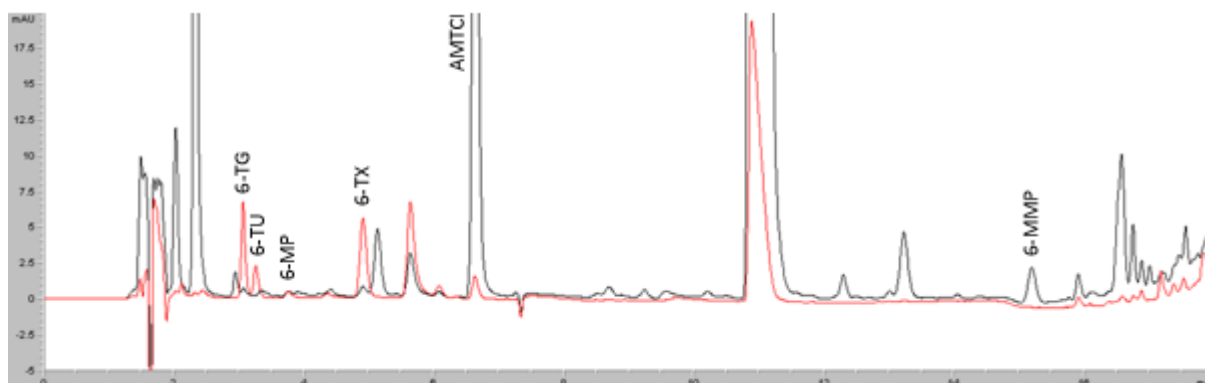
Slika 13. Grafički prikaz prevođenja MMP (plavo) u AMTCI (crveno) zagrijavanjem (trake pogreške predstavljaju standardno odstupanje, $n=2$)

Kako se u periodu od 40. do 60. minute površina pika MMP smanjila za 7,2 % u odnosu na početnu površinu, hidroliza zagrijavanjem tijekom 40 minuta uzeto je kao optimalno vrijeme za prevođenje

ovog koraka metode. Dobiveni uvjeti moraju se provjeriti na realnom uzorku pacijenta da bi se ovo moglo sa sigurnošću tvrditi.

4.4.3 Ispitivanje linearnosti, osjetljivosti, ponovljivosti i točnosti

Slijepi uzorak eritrocita obogaćen je standardima tiopurina u koncentracijama koje su unutar reda veličine koncentracija tiopurina u realnom uzorku te obrađen pri navedenim optimalnim uvjetima (slika 14).



Slika 14. Kromatogram uzorka eritrocita obogaćen standardnim otopinama pri optimalnim uvjetima predobrađbe. Koncentracije analita: 6-TG, 6-TX, 6-TU 100 ng/mL, 6-MP 15 ng/mL, 6-MMP 2000 ng/mL. Crveno - 342 nm, crno - 302 nm

Zbog nemogućnosti pristupa realnim uzorcima pacijenata, metoda je provedena na uzorcima cijepljenim tiopurinima uspoređenim sa slijepim uzorcima. Nužno je provjeriti jesu li ovi uvjeti optimalni koristeći realan uzorak.

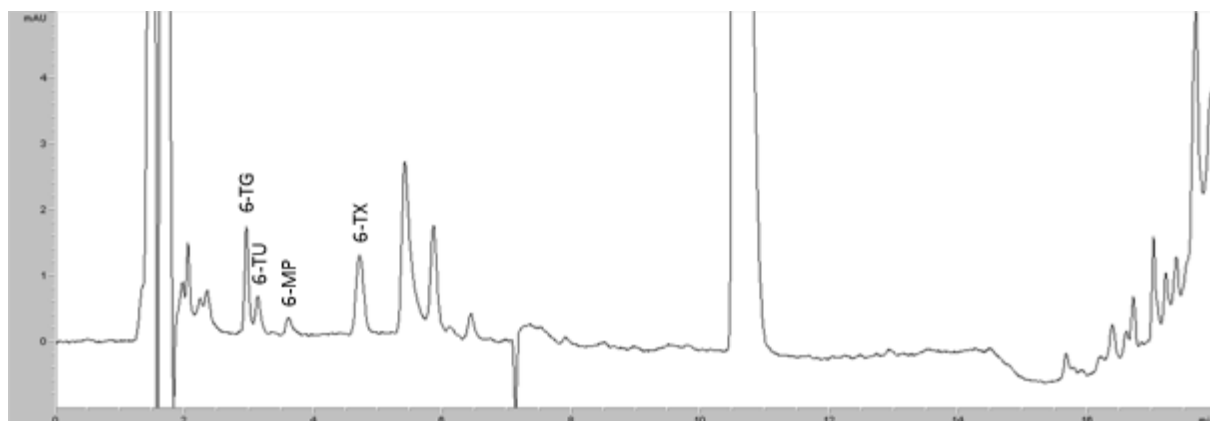
Linearnost je ispitana na slijepim uzorcima eritrocita obogaćenim standardnim otopinama tiopurina na pet koncentracijskih razina predobrađenim pri optimalnim uvjetima. Parametri linearnosti prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Parametri linearnosti tiopurinskih metabolita

analit	raspon (ng/mL)	jednadžba pravca	koeficijent korelacije (r)	povratno izračunati prinosi (%) ^a	LLOQ (ng/mL)
6-TG	40-400	$y = 0,0619 x + 0,5903$	0,9982	95,13-105,64	40
6-TU	40-400	$y = 0,0285 x + 0,2385$	0,9978	87,12-107,66	40
6-MP	5-45	$y = 0,1266 x + 3,5183$	0,9894	90,11-110,10	5
6-TX	40-400	$y = 0,0806 x + 0,3844$	0,9947	90,96-109,35	40
6-MMP ^b	600-5400	$y = 0,0360 x + 7,2655$	0,9989	96,16-111,97	^c

^aprinosi izračunati na temelju omjera koncentracije izračunate iz kalibracijske krivulje te stvarne koncentracije za svaku točku krivulje, ^bparametri se odnose na pik AMTCI, ^cnije ispitano jer je AMTCI očekivan u koncentraciji višoj od LLOQ

Iz podataka u tablici 2 vidi se da se svi koeficijenti korelacije nalaze u rasponu od 0,989 do 0,999, što pokazuje vrlo dobru linearnost za biološki uzorak. Povratno izračunati prinosi nalaze se u zadovoljavajućem području, unutar 15 % od stvarne vrijednosti. Osim toga, vrlo nizak LLOQ za analite (čak do 5 ng/mL) izvrstan je za bioanalitičku metodu bez masenog detektora. Na Slici 15 prikazan je kromatogram uzorka pri LLOQ.



Slika 15. Kromatogram uzorka eritrocita obogaćenog standardnim otopinama pri optimalnim uvjetima, snimano pri valnoj duljini 342 nm. Koncentracije analita: 6-TG, 6-TX, 6-TU 40 ng/mL, 6-MP 5 ng/mL. Kromatogram snimljen pri valnoj duljini 302 nm nije prikazan jer je očekivana koncentracija AMTCI viša od LLOQ

Ponovljivost je ispitana na četiri koncentracijske razine (LLOQ, niska, srednja, visoka) u pentaplikatu. U tablici 3 prikazana su relativna standardna odstupanja (engl. *relative standard deviation*, RSD) za pojedine tiopurinske analite.

Tablica 3. Parametri ponovljivosti

analit	RSD (%)			
	LLOQ (40/5/600 ng/mL) ^a	niska konc. razina (200/20/3200 ng/mL) ^a	srednja konc. razina (260/30/3600 ng/mL) ^a	visoka konc. razina (400/45/5400 ng/mL) ^a
6-TG	12,63	4,87	4,99	9,13
6-TU	10,03	14,81	4,74	2,75
6-MP	18,06	18,82	10,83	24,76
6-TX	3,43	5,64	6,75	2,92
6-MMP	3,78	4,10	2,24	10,83

^akoncentracije prikazane kao 6-TG,6-TU,6-TX/6-MP/6-MMP

RSD vrijednosti bile su niže od 14,81 % za sve analite osim 6-MP. S druge strane, RSD vrijednosti za 6-MP dosezale su i do 24,76 %. On je ujedno i analit čije su očekivane koncentracije za red veličine manje od ostalih analita, čime nije iznenađujuć ovakav rezultat.

Ispitivanje točnosti rađeno je na četiri koncentracijske razine (LLOQ, niska, srednja i visoka), u pentaplikatu. Rezultati su prikazani kao analitički prinos, tj. srednja vrijednost omjera izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije izražen u postotku.

Tablica 4. Parametri točnosti

analit	analitički prinos (%)			
	LLOQ (40/5/600 ng/mL) ^a	niska konc. razina (200/20/3200 ng/mL) ^a	srednja konc. razina (260/30/3600 ng/mL) ^a	visoka konc. razina (400/45/5400 ng/mL) ^a
6-TG	98,60	102,24	96,51	94,18
6-TU	114,59	105,46	102,76	99,94
6-MP	87,29	90,51	71,57	68,60
6-TX	101,35	99,70	108,71	95,24
6-MMP	98,78	95,52	101,39	90,29

^akoncentracije prikazane kao 6-TG,6-TU,6-TX/6-MP/6-MMP

Vrijednosti analitičkih prinosa kretale su se između 90,29 % i 114,59 % za sve analite osim 6-MP koji je imao niže prinose, do 68,60 %. Razlozi tomu navedeni su u prijašnjem ulomku.

Svi rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i točnosti metode odgovaraju zahtjevima Europske agencije za lijekove [52] za sve analite, osim za 6-MP koji ne zadovoljava prema svojim parametrima ponovljivosti i točnosti. Potrebno je utvrditi uzrok lošijim rezultatima za 6-MP te po potrebi modificirati metodu. Što se tiče ostalih analita, rezultati ponovljivosti i točnosti ispitanih analita usporedivi su s nedavno objavljenim radovima iste tematike [53, 54], što potvrđuje da ova metoda leži na čvrstim temeljima te da su njezini rezultati vjerodostojni.

4.5 Obrada uzorka urina

Uzorak umjetnog urina, obogaćen otopinama 6-TU, 6-TX i 6-MP do koncentracije 5 µg/mL istaložen je s perklornom kiselinom, po uzoru na preostale metode taloženja proteina. Nakon razrijeđivanja vodom 3x, centrifugiranja 5 minuta, injektiran je na kolonu pri istim postavkama kao i uzorci eritrocita i plazme. Osnovna namjena ovog dijela metode s aspekta tiopurina polukvantitativne je prirode, budući da se može koristiti za neinvazivno ispitivanje adherencije na terapiju. Zbog visoke varijabilnosti u volumenu izlučenog urina, 5-MTHF nije bio predmet istraživanja u uzorcima urina.



Slika 16. Uzorak urina obogaćen standardima tiopurina. Crveno - 342 nm, crno - 302 nm

Zbog viših očekivanih koncentracija navedenih analita u uzorku urina, kao i jednostavne predobradbe uzorka, ova metoda pokazuje potencijal za brzo praćenje adherencije ili varijabilnosti u metabolizmu.

5 ZAKLJUČAK

U ovom radu postavljeni su temelji za bioanalitičku metodu analize tiopurinskih metabolita i 5-MTHF u uzorcima poput eritrocita, plazme i urina. Kao što se može vidjeti iz dobivenih rezultata, predobradba bioloških uzoraka te njihova analiza vrlo su zahtjevne, s naglaskom na zadovoljavanje kriterija selektivnosti koji često predstavlja glavnu prepreku, pogotovo u vidu korištenja detektora s nizom dioda i fluorescencijskog detektora. Unatoč tome, ispitivanjem i optimizacijom velikog broja metoda predobradbe postignut je zadovoljavajuć prinos 5-MTHF u uzorku plazme, kao i dostatna selektivnost analita u svim uzorcima. Pri predobradbi uzorka plazme najboljom tehnikom pokazala se ekstrakcija na čvrstoj fazi korištenjem C-18 kolone. Pri obradi uzorka eritrocita optimirani su vrijeme zagrijavanja uzoraka te koncentracija antioksidansa. Jednostavna dilucija te centrifugiranje uzorka umjetnog urina pokazale su zadovoljavajuću selektivnost za 6-TU, 6-MP i 6-TX očekivane u ovom uzorku. Prednosti razvijene metode su njezino kratko trajanje te niske granice određivanja (reda veličine 10 ng/mL za 5-MTHF i 100 ng/mL za tiopurine). Metodu treba ispitati na realnim uzorcima pacijenata kako bi se potvrdili rezultati istraživanja. Ispitane su linearnost, točnost i preciznost metode pripreme eritrocita za analizu tiopurina. Linearnost je izražena koeficijentom korelacije koji je za sve analite prelazio 0,989. Točnost metode izražena je preko analitičkog prinosa koji je iznosio od 90,29 % do 114,59 % za sve analite osim 6-MP čiji je analitički prinos bio niži, i do 68,60 %. Ponovljivost metode metabolita pokazala je zadovoljavajuće rezultate (RSD < 14,81 % za sve analite osim 6-MP s RSD < 24,76 %), što otvara mogućnost buduće rutinske primjene ove metode nakon njezine potpune validacije i reevaluacije metode za analizu 6-MP.

6 POPIS LITERATURE

- [1] K. Head, J. Jurenka, Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options, *Altern. Med. Rev.* 8 (2003) 247–283.
- [2] K. Head, J. Jurenka, Inflammatory bowel disease part II: Crohn’s disease - Pathophysiology and conventional and alternative treatment options, *Altern. Med. Rev.* 9 (2004) 360–401.
- [3] R.J. Xavier, D.K. Podolsky, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature.* 448 (2007) 427–434. doi:10.1038/nature06005.
- [4] A.N. Ananthakrishnan, Epidemiology and risk factors for IBD, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (2015) 205–217. doi:10.1038/nrgastro.2015.34.
- [5] C.A. Lamb, N.A. Kennedy, T. Raine, P.A. Hendy, P.J. Smith, J.K. Limdi, B. Hayee, M.C.E. Lomer, G.C. Parkes, C. Selinger, K.J. Barrett, R.J. Davies, C. Bennett, S. Gittens, M.G. Dunlop, O. Faiz, A. Fraser, V. Garrick, P.D. Johnston, M. Parkes, J. Sanderson, H. Terry, D.R. Gaya, T.H. Iqbal, S.A. Taylor, M. Smith, M. Brookes, R. Hansen, A.B. Hawthorne, British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults, *Gut.* 68 (2019) s1–s106. doi:10.1136/gutjnl-2019-318484.
- [6] B. Meijer, M.L. Seinen, N.N.W. Leijte, C.J.J. Mulder, A.A. Van Bodegraven, N.K.H. De Boer, Clinical Value of Mercaptopurine after Failing Azathioprine Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease, *Ther. Drug Monit.* 38 (2016) 463–470. doi:10.1097/FTD.0000000000000312.
- [7] C.J. Cara, A.S. Pena, M. Sans, L. Rodrigo, M. Guerrero-Esteo, J. Hinojosa, J. García-Paredes, L.G. Guijarro, Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: Towards a new paradigm in clinical practice, *Med. Sci. Monit.* 10 (2004) 247–255.
- [8] S. Sahasranaman, D. Howard, S. Roy, Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64 (2008) 753–767. doi:10.1007/s00228-008-0478-6.
- [9] T. Dervieux, R. Boulieu, Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC, *Clin. Chem.* 44 (1998) 551–555. doi:10.1093/clinchem/44.3.551.
- [10] M. Kurzawski, K. Dziewanowski, B. Gawrońska-Szklarz, L. Domański, M. Drożdżik, The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism on azathioprine-induced myelotoxicity in renal transplant recipients, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 435–441. doi:10.1097/01.ftd.0000164393.09402.c9.
- [11] D.P.B. McGovern, S.P.L. Travis, J. Duley, E.M. Shobowale-Bakre, H.R. Dalton, Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity, *Gastroenterology.* 122 (2002) 838–839. doi:10.1053/gast.2002.32124.

- [12] L.J.J. Derijks, L.P.L. Gilissen, P.M. Hooymans, D.W. Hommes, Review article: Thiopurines in inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24 (2006) 715–729. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02980.x.
- [13] M.P. Sparrow, S.A. Hande, S. Friedman, W.C. Lim, S.I. Reddy, D. Cao, S.B. Hanauer, Allopurinol safely and effectively optimizes thioguanine metabolites in inflammatory bowel disease patients not responding to azathioprine and mercaptopurine, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22 (2005) 441–446. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02583.x.
- [14] L.P.L. Gilissen, D.R. Wong, L.G.J.B. Engels, J. Bierau, J.A. Bakker, A.D.C. Paulussen, M.J. Romberg-Camps, A. Stronkhorst, P. Bus, L.P. Bos, P.M. Hooymans, R.W. Stockbrügger, C. Neef, A.A.M. Masclee, Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy, *J. Crohn's Colitis.* 6 (2012) 698–707. doi:10.1016/j.crohns.2011.12.003.
- [15] K. Pietrzik, L. Bailey, B. Shane, Folic acid and 1-5-methyltetrahydrofolate: Comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Clin. Pharmacokinet.* 49 (2010) 535–548. doi:10.2165/11532990-000000000-00000.
- [16] X. Wang, X. Qin, H. Demirtas, J. Li, G. Mao, Y. Huo, N. Sun, L. Liu, X. Xu, Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis, *Lancet.* 369 (2007) 1876–1882. doi:10.1016/S0140-6736(07)60854-X.
- [17] A. Milunsky, H. Jick, S.S. Jick, C.L. Bruell, D.S. Maclaughlin, K.J. Rothman, W. Willett, Multivitamin/Folic Acid Supplementation in Early Pregnancy Reduces the Prevalence of Neural Tube Defects, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 262 (1989) 2847–2852. doi:10.1001/jama.1989.03430200091032.
- [18] L.A. Bazzano, K. Reynolds, K.N. Holder, J. He, Effect of Folic Acid Supplementation on Risk of Cardiovascular Diseases, *Jama.* 296 (2006) 2720. doi:10.1001/jama.296.22.2720.
- [19] C.S. Hesdorffer, D.L. Longo, Drug-induced megaloblastic anemia, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1649–1658. doi:10.1056/NEJMra1508861.
- [20] N. Keum, E.L. Giovannucci, Folic acid fortification and colorectal cancer risk, *Am. J. Prev. Med.* 46 (2014) S65–S72. doi:10.1016/j.amepre.2013.10.025.
- [21] J.R. Araújo, F. Martel, N. Borges, J.M. Araújo, E. Keating, Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression, *Ageing Res. Rev.* 22 (2015) 9–19. doi:10.1016/j.arr.2015.04.005.
- [22] Y. Erzin, H. Uzun, A.F. Celik, S. Aydin, A. Dirican, H. Uzunismail, Hyperhomocysteinemia in Inflammatory Bowel Disease Patients Without Past Intestinal Resections, *J. Clin. Gastroenterol.* 42 (2008) 481–486. doi:10.1097/mcg.0b013e318046eab0.

- [23] M. Yakut, Y. Üstün, G. Kabaçam, I. Soykan, Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases, *Eur. J. Intern. Med.* 21 (2010) 320–323. doi:10.1016/j.ejim.2010.05.007.
- [24] J.D.M. Patring, J.A. Jastrebova, S.B. Hjortmo, T.A. Andlid, I.M. Jägerstad, Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2406–2411. doi:10.1021/jf048083g.
- [25] S. Belz, C. Frickel, C. Wolfrom, H. Nau, G. Henze, High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 661 (1994) 109–118. doi:10.1016/0378-4347(94)00328-9.
- [26] K. Liu, X. Dai, D. Zhong, P. Deng, J. Ma, X. Chen, Simultaneous determination of 6R-leucovorin, 6S-leucovorin and 5-methyltetrahydrofolate in human plasma using solid phase extraction and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 902–910. doi:10.1016/j.jchromb.2009.02.046.
- [27] J.S. Kang, M.H. Lee, Overview of therapeutic drug monitoring, *Korean J. Intern. Med.* 24 (2009) 1–10. doi:10.3904/kjim.2009.24.1.1.
- [28] M.M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 3–11. doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.028.
- [29] I. Finoulst, M. Pinkse, W. Van Dongen, P. Verhaert, Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011). doi:10.1155/2011/245291.
- [30] N.Y. Ashri, M. Abdel-Rehim, Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices, *Bioanalysis.* 3 (2011) 2003–2018. doi:10.4155/bio.11.201.
- [31] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [32] M.-C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 856 (1999) 3–54.
- [33] A. Zayed, R. Bustami, W. Alabsi, T. El-Elimat, Development and validation of a rapid high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of folic acid in human plasma, *Pharmaceuticals.* 11 (2018). doi:10.3390/ph11020052.

- [34] B.C. Nelson, C.M. Pfeiffer, S.A. Margolis, C.P. Nelson, Solid-phase extraction-electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum, *Anal. Biochem.* 325 (2004) 41–51. doi:10.1016/j.ab.2003.10.009.
- [35] D.J. Hart, P.M. Finglas, C.A. Wolfe, F. Mellon, A.J.A. Wright, S. Southon, Determination of 5-methyltetrahydrofolate (¹³C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 206–213. doi:10.1006/abio.2002.5662.
- [36] A. Akbari, N. Chamkouri, A. Zadabdollah, Determination trace levels of vitamin C and folic acid in urine sample by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method coupled HPLC-UV, *Orient. J. Chem.* 32 (2016) 3027–3033. doi:10.13005/ojc/320623.
- [37] M. Grotzkyj Giorgi, K. Howland, C. Martin, A.B. Bonner, A Novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): A validation study and application, *Sci. World J.* 2012 (2012) 1–9. doi:10.1100/2012/359721.
- [38] J. Chládek, L. Šišpera, J. Martínková, High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 744 (2000) 307–313. doi:10.1016/S0378-4347(00)00257-7.
- [39] W. Luo, H. Li, Y. Zhang, C.Y.W. Ang, Rapid method for the determination of total 5-methyltetrahydrofolate in blood by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 766 (2002) 331–337. doi:10.1016/S0378-4347(01)00521-7.
- [40] A. Ormazabal, A. García-Cazorla, B. Pérez-Dueñas, V. Gonzalez, E. Fernández-Álvarez, M. Pineda, J. Campistol, R. Artuch, Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: Reference values for a paediatric population, *Clin. Chim. Acta.* 371 (2006) 159–162. doi:10.1016/j.cca.2006.03.004.
- [41] P. Giulidori, M. Galli-Kienle, G. Stramentinoli, Liquid-chromatographic monitoring of 5-methyltetrahydrofolate in plasma, *Clin. Chem.* 27 (1981) 2041–2043. doi:10.1093/clinchem/27.12.2041.
- [42] H. Ghandour, P.J. Bagley, D. Shemin, N. Hsu, P.F. Jacques, L. Dworkin, A.G. Bostom, J. Selhub, Distribution of plasma folate forms in hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid, *Kidney Int.* 62 (2002) 2246–2249. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00666.x.
- [43] T. Opladen, V.T. Ramaekers, G. Heimann, N. Blau, Analysis of 5-methyltetrahydrofolate in serum of healthy children, *Mol. Genet. Metab.* 87 (2006) 61–65.

doi:10.1016/j.ymgme.2005.08.011.

- [44] M. Shimoda, Simultaneous Determination of Tetrahydrofolate and N5-Methyltetrahydrofolate in Pig Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *J. Vet. Med. Sci.* 54 (1992) 249–253.
- [45] T. Dervieux, R. Bouliou, Identification of 6-methylmercaptopurine derivative formed during acid hydrolysis of thiopurine nucleotides in erythrocytes, using liquid chromatography-mass spectrometry, infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance assay, *Clin. Chem.* 44 (1998) 2511–2515. doi:10.1093/clinchem/44.12.2511.
- [46] A.F. Hawwa, J.S. Millership, P.S. Collier, J.C. McElnay, Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 401–409. doi:10.1016/j.jpba.2008.10.045.
- [47] H. Kirchherr, M. Shipkova, N. Von Ahsen, Improved method for therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine in whole-blood by lc/msms using isotope-labeled internal standards, *Ther. Drug Monit.* 35 (2013) 313–321. doi:10.1097/FTD.0b013e318283ed5d.
- [48] C. Stefan, W. Walsh, T. Banka, K. Adeli, Z. Verjee, Improved HPLC methodology for monitoring thiopurine metabolites in patients on thiopurine therapy, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 764–771. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.025.
- [49] S. Supandi, Y. Harahap, H. Harmita, R. Andalusia, Quantification of 6-mercaptopurine and its metabolites in patients with acute lymphoblastic leukemia using dried blood spots and UPLC-MS/MS, *Sci. Pharm.* 86 (2018). doi:10.3390/scipharm86020018.
- [50] E. Brusač, M.L. Jeličić, D.A. Klarić, B. Nigović, N. Turk, I. Klarić, A. Mornar, Pharmacokinetic profiling and simultaneous determination of thiopurine immunosuppressants and folic acid by chromatographic methods, *Molecules.* 24 (2019). doi:10.3390/molecules24193469.
- [51] D. Dadgar, P.E. Burnett, Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1995) 23–31. doi:10.1016/0731-7085(95)01634-1.
- [52] Europska agencija za lijekove, Guideline on bioanalytical method validation, revizija 1, korekcija 2 (2011) Amsterdam, Nizozemska
- [53] N. Erb, U. Haverland, D.O. Harms, G. Escherich, G. Janka-Schaub, High-performance liquid chromatographic assay of metabolites of thioguanine and mercaptopurine in capillary blood, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 796 (2003) 87–94. doi:10.1016/j.jchromb.2003.08.006.

- [54] B.M. Oliveira, A.J. Romanha, T.M.A. Alves, M.B. Viana, C.L. Zani, An improved HPLC method for the quantitation of 6-mercaptopurine and its metabolites in red blood cells, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 649–658. doi:10.1590/S0100-879X2004000500004.

7 ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na stručnom vodstvu, svim savjetima te pomoći pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem asistentima Edvinu i Mariu na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela. Zahvale svim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na ugodnoj radnoj atmosferi.

8 SAŽETAK

Ivan Džajić

**IZAZOVI BIOANALITIKE TIOPURINA I ENDOGENOG FOLATA U ERITROCITIMA,
PLAZMI I URINU - RAZVOJ HPLC-DAD-FLD METODE ZA TERAPIJSKO PRAĆENJE
LIJEKOVA**

Bioanalitika i terapijsko praćenje lijekova područja su izrazito prožeta problematikom koja se stalnim napretkom znanosti rješava, bilo da se radi o zdravstvenom, analitičkom ili financijskom aspektu. Cilj ovog istraživanja bio je postavljanje temelja analitičkoj HPLC metodi koja bi kvantificirala 5-MTHF u plazmi, odnosno tiopurine u eritrocitima i urinu, istovremeno obraćajući pozornost na što jednostavniju praktičnu primjenjivost i vjerodostojnost njezinih rezultata.

Kao uzorci plazme za analizu 5-MTHF korišteni su uzorci zdravog dobrovoljca, a kao uzorci eritrocita korišteni su uzorci zdravog dobrovoljca obogaćeni tiopurinskim metabolitima u očekivanim koncentracijama. Kao uzorak urina upotrijebljen je umjetni urin obogaćen tiopurinskim metabolitima.

Razvijena je HPLC-DAD-FLD metoda vremena trajanja 18 minuta. Od većeg broja ispitanih ekstrakcijskih tehnika, kao optimalna metoda pripreme uzorka plazme pokazala se predobradba ekstrakcijom na čvrstoj fazi, uz perklornu kiselinu kao taložni reagens. Nakon optimizacije količine antioksidansa ditiotreitola i vremena zagrijavanja uzoraka na 100 °C u blok-grijaču, eritrociti su obrađeni pri optimalnim uvjetima te analizirani HPLC metodom. Uzorak urina uključivao je jednostavan korak taloženja proteina pomoću perklorne kiseline te razrjeđenja. Važan zahtjev selektivnosti za ovu metodu je zadovoljen. Ispitani su validacijski parametri linearnosti, točnosti i ponovljivosti za metodu analize tiopurinskih metabolita u eritrocitima. Pri ispitivanju linearnosti, koeficijent korelacije je u svih analita iznosio preko 0,989, a donja granica kvantifikacije metode bila je reda veličine 10-100 ng/mL. Kod ispitivanja točnosti analitički prinosi analita iznosili su između 90,29 % i 114,6 %. Ponovljivost metode nije prelazila vrijednost relativne standardne devijacije od 14,81 %, osim u slučaju 6-MP. Unatoč zahtjevnosti predobradbe i analize bioloških uzoraka, razvijena je kratkotrajna, selektivna i ponovljiva bioanalitička metoda sa zadovoljavajćim prinosom kod svih očekivanih analita.

Ključne riječi: bioanalitika, terapijsko praćenje lijekova, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, 5-metiltetrahidrofolat, azatioprin

9 SUMMARY

**CHALLENGES OF BIOANALYSIS OF THIOPURINES AND ENDOGENOUS FOLATE IN
RED BLOOD CELLS, PLASMA AND URINE - DEVELOPMENT OF HPLC-DAD-FLD
METHOD FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING**

Bioanalysis and therapeutic drug monitoring are scientific areas distinctly filled with problems that are being dealt with by constant scientific progress from healthcare, analytical and financial standpoints. The goal of the research conducted in this paper was to set up a HPLC method which would be used for quantification of 5-MTHF in plasma and thiopurines in red blood cells and urine, while paying attention to its practical applicability and the credibility of its results.

Samples taken from a healthy volunteer were used both for the analysis of 5-MTHF and the thiopurine metabolite analysis, the latter one being spiked with the analyte standards in their respective expected concentrations.

A HPLC-DAD-FLD method has been developed, with a run time of 18 minutes. Out of a wide variety of extraction techniques tested, solid-phase extraction using perchloric acid as a crash solvent showed to be an optimal plasma sample preparation method. Upon the optimization of both DTT concentrations and time spent heating the samples in a dry-block heater, red blood cell samples were prepared under optimal conditions and analyzed using the HPLC method. The urine sample preparation contained a simple step that consisted of protein precipitation using perchloric acid and sample dilution. A key requirement of method selectivity has been met. Validation parameters of method linearity, accuracy and repeatability were tested for the analysis of thiopurine metabolites in red blood cells. The correlation coefficient calculated for determining the method's linearity was found to be over 0,989, with the method's lower limit of quantification being between 10 and 100 ng/mL, depending on the analyte tested. The recoveries calculated for determining the method's accuracy were between 90,29% and 114,6%. The method's repeatability, expressed in RSD remained under 14,81% except for 6-MP. Despite the demanding nature of sample preparation procedure and the analysis of biological samples, a quick, selective and precise analytical method with a satisfactory recovery of all expected analytes has been developed.

Keywords: bioanalysis, therapeutic drug monitoring, high performance liquid chromatography, 5-methyltetrahydrofolate, azathioprine