

LC-MS/MS를 이용한 비글견 혈장 중 파록세틴의 고감도 분석

장규영¹ · 강승우^{1,3} · 한상범³ · 염정록³ · 이경률^{1,2} · 이희주^{1,2*}

¹바이오코아(주) 신약개발지원사업부,
²(재)서울의과학연구소 약물동력학팀, ³중앙대학교 약학대학
(2006. 11. 7. 접수. 2007. 2. 27. 승인)

Sensitive determination of paroxetine in canine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Kyu Young Chang¹, Seung Woo Kang^{1,3}, Sang Beom Han³, Jeong-Rok Youm³,
Kyung Ryul Lee^{1,2} and Hee Joo Lee^{1,2*}

¹Dept. of Drug Development Supporting Service, BioCore Co., Ltd., 108-1, Yangjea-dong,
Seocho-gu, Seoul, 137-130, Korea

²Dept. of Pharmacokinetics, Seoul Medical Science Institute, Seoul Clinical Laboratory, 7-14,
Dongbinggo-dong, Yongsan-gu, Seoul, 140-809, Korea

³College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221, Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul, 156-756, Korea

(Received November 7, 2006; Accepted February 27, 2007)

요 약: 본 연구에서는 비글견 혈장 중의 파록세틴을 액체상추출법(LLE)으로 전처리하고 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(LC-MS/MS)로 신속하게 분석하는 방법을 개발하였다. 파록세틴과 내부표준물질로 사용한 플루오세틴을 TBME(*tert*-butyl methyl ether)로 추출하고 상층액을 취하여 건조시킨 후, 이동상 100 μ L로 재분산하여 LC-MS/MS에 주입하였다. HPLC 분석조건으로 Capcell Pak UG120(2.0 \times 150 mm, 5 μ m) 컬럼을 사용하였으며, 이동상은 50% 아세트니트릴(pH 3, formic acid로 조정) 용액을 사용하였고, 유량은 0.2 mL/min으로 하였다. MS/MS의 SRM(selective reaction monitoring) 방법으로 파록세틴과 플루오세틴의 선구 이온, 생성 이온을 각각 m/z 330 \rightarrow 192, m/z 310 \rightarrow 148로 분석한 결과 0.02~5 ng/mL의 농도범위에서 상관계수(R^2) 0.9993으로 좋은 직선성을 나타내었다. 또한 정량한계는 0.02 ng/mL이며, 정밀성은 일내 및 일간 변동계수가 7.67% 이하이고, 정확도는 92.96~102.99%로 비글견 혈장 중의 파록세틴의 약물동력학 연구에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 확인하였다.

Abstract: A simple and sensitive method for the determination of paroxetine in canine plasma was developed and validated by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Fluoxetine was used as an internal standard. Paroxetine and internal standard in plasma samples were extracted using TBME (*tert*-butyl methyl ether). A centrifuged upper layer was then evaporated and reconstituted with

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-3461-9133 Fax : +82-(0)2-3461-0590

E-mail: heejoolee0@yahoo.co.kr

mobile phase of 50% acetonitrile adjusted to pH 3 by formic acid. The reconstituted samples were injected into a Capcell Pak UG120 (2.0 × 150 mm, 5 μm) column. Using MS/MS with SRM (selective reaction monitoring) mode, the transitions (precursor to product) monitored were m/z 330 → 192 for paroxetine, and m/z 310 → 148 for internal standard. Linear detection responses were obtained for paroxetine concentration range of 0.02~5 ng/mL. A correlation coefficient of linear regression (R^2) was 0.9993. Detection of paroxetine in canine plasma was accurate and precise, with limit of quantification at 0.02 ng/mL. The method has been successfully applied to pharmacokinetic study of paroxetine in healthy beagle dogs.

Key words : Paroxetine, LC-MS/MS, canine plasma, pharmacokinetic study

1. 서 론

파록세틴(paroxetine)은 (3S-trans)-3-[(1,3-benzodioxol-5-yl-oxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)piperidine의 화학구조(Fig. 1)를 가지며, 불안을 수반하는 우울증 및 모든 형태의 우울성 질환, 강박장애, 공황장애, 사회불안장애 및 사회공포증, 월경 전 불쾌감 등의 치료제로 사용되고 있다. 파록세틴의 약리작용은 세로토닌이 신경말단으로 재흡수 되는 것을 선택적으로 차단하여 발생되며(selective serotonin re-uptake inhibitor, SSRI),^{1,4} 삼환계 항우울제와 약리효과는 비슷하지만 세로토닌이 신경말단으로 다시 흡수되어 불활성화하는 것을

선택적으로 차단하기 때문에 뇌에서 세로토닌의 작용이 강화된다⁵⁻⁹. 또한 항콜린성 작용 등의 자율신경계 및 심혈관계 작용이 거의 나타나지 않고, 모노아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs)의 무차별적 상호작용이 없기 때문에 부작용이 적은 장점을 가지고 있다⁵⁻⁹. 파록세틴의 최고혈중농도 도달 시간은 3~8시간이며, 혈중소실반감기는 약 15~22시간이고, 작용 발현시간은 2주이며, 주로 신장과 분변을 통하여 배설되는 것으로 보고되어 있다.¹⁰

생체시료 중 파록세틴의 분석은 주로 액체크로마토그래피(HPLC)¹¹⁻¹⁴와 기체크로마토그래피(GC)¹⁵⁻¹⁶로 하는 방법들이 주로 이용되었다. 액체크로마토그래피의 경우 파록세틴을 유도체화 하지 않고 형광검출기 또는 자외선검출기로 분석하는 방법과 dansyl chloride 등과 같은 유도체화 반응시약을 이용해 형광검출기로 분석한 방법 등이 보고되어 있다. 이러한 분석방법들은 검출한계가 주로 5 ng/mL로 생체시료 분석을 수행하기에는 다소 감도가 낮으며, 가장 감도가 좋게 보고되어 있는 문헌에서도 그 검출한계가 0.2 ng/mL에 불과하다.¹² 최근에는 주로 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS) 또는 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(LC-MS/MS, triple quadrupole 또는 ion trap 방식)를 이용한 혈 중 파록세틴의 고감도 분석법이 많이 보고¹⁷⁻²¹되고 있으며, 생체시료의 전처리 방법으로는 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)과 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)이 주로 사용되었다. 그러나 액체크로마토그래피-질량분석기들의 다양한 분석 방법에 따라 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 각 문헌별로 0.05~5 ng/mL으로 100배 정도의 큰 차이를 보이고 있다.

본 연구에서는 생체시료 중 파록세틴의 초고감도 분석법을 개발하기 위하여, 액체-액체 추출법(LLE)과 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(LC-MS/MS)를

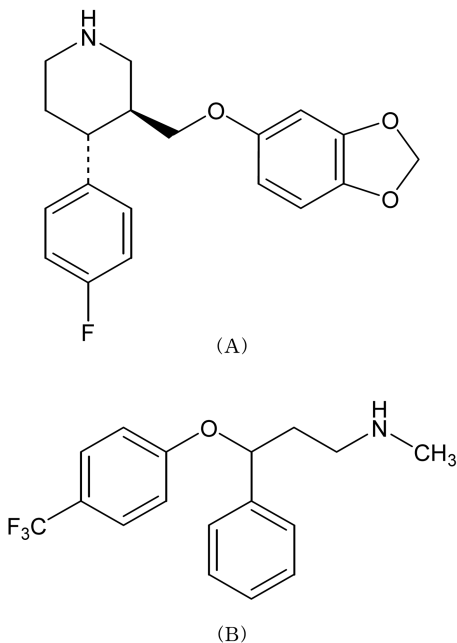


Fig. 1. Chemical structures of (A) paroxetine, (B) fluoxetine (I.S.).

사용하여 이미 보고된 정량한계보다 더욱 낮은 농도의 정량한계를 얻을 수 있었으며, FDA 가이드라인에 준하여 분석법의 검증(validation)을 실시하였다. 또한, 파록세틴을 투여한 비글견 혈장을 시간별로 채취하고, 본 분석법에 의해 혈 중 파록세틴의 농도를 구하여, 약물동력학 연구에 응용할 수 있었다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

파록세틴(paroxetine)과 내부표준물질로 사용한 플루오세틴(fluoxetine)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)의 시판품을 사용하였다. 이동상 제조에 사용한 아세트니트릴, 포름산, 탈이온수는 Fisher Scientific사(Springfield, NJ, USA)의 HPLC급 시약을 구입하여 사용하였으며, 시료 전처리에 사용한 TBME (*tert*-butyl methyl ether) 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다.

HPLC는 Thermo Finnigan Surveyor HPLC (Thermo Electron Co., San Jose, CA, USA)를, 시료주입을 위한 autosampler는 CTC ANALYTICS PAL (Zwingen, Switzerland)를, 펌프질량분석기(MS/MS)는 TSQ Quantum Ultra (Thermo Electron Co., San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 본 연구에 사용한 MS/MS는 collision cell이 90°로 휘어진 방식으로, 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 크게 줄일 수 있는 장점이 있어 고감도의 생체시료 분석에 유용하게 사용되고 있다.

HPLC 컬럼은 Shiseido Capcell Pak UG120(2.0 × 150 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 컬럼 보호를 위해 ChemTech Korea사(Seoul, Korea)의 stainless steel frit 조합형(0.5 μm)을 장착하였다. 데이터 처리장치로는 Thermo Electron사의 Xcalibur (Ver. 1.4)를 사용하였다.

2.2. 표준검량선 작성

파록세틴 표준품을 50% 메탄올에 녹여 농도를 1 mg/mL가 되도록 제조한 후, 이 용액을 냉동 보관하였던 비글견 공혈장으로 희석하여 혈장 중 파록세틴 농도가 각각 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 및 5 ng/mL가 되도록 비글견 표준혈장을 만들었다. 또한 내부표준물질인 플루오세틴도 50% 메탄올에 녹여 1 mg/mL가 되도록 하고, 이 용액을 50% 메탄올로 희석하여 100 ng/mL가 되도록 제조한 후, 차광하여 4 °C에 보관하였다.

비글견 표준혈장 시료 0.3 mL를 시험관에 넣고 여

기에 내부표준물질인 플루오세틴 용액 20 μL를 가하고 탁상용 혼합기에서 10초간 혼합하였다. 여기에 TBME(*tert*-butyl methyl ether) 1.5 mL를 넣고 왕복진탕기에서 15분 동안 추출하였다. 13,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후, 시험관을 냉동고에서 넣어 수층을 냉동시켰다. 수층이 얼어있는 상태에서, 상층의 유기층을 취하여 깨끗한 새 시험관에 옮기고 40 °C에서 질소기류로 완전히 건조시켰다. 건조가 된 후, 이동상 100 μL를 가하여 재용해 시킨 뒤, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 깨끗한 상층을 취해 바이알에 담은 후, 이 중 20 μL를 LC-MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 파록세틴의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

2.3. LC-MS/MS 조건 최적화 및 분석법 검증

비글견 혈장 중 파록세틴의 정량은 이미 보고된 LC-MS/MS 분석법을 참고¹⁹하여 최적의 조건을 확립한 후 수행하였다. 전처리된 혈장 시료는 다음의 조건에서 정량하였다. 분석 컬럼은 생체시료 분석에서 자주 사용하는 Shiseido Capcell Pak UG120(2.0 × 150 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 컬럼 보호를 위해 stainless steel frit 조합형(0.5 μm)도 장착하였다. 이동상으로는 50% 아세트니트릴을 제조한 후, 여기에 포름산을 가하여 용액의 산도를 pH 3.0으로 조정하고, 0.2 μm membrane filter에 여과하고, 초음파세척기에서 가스를 제거한 것을 사용하였다. 분석 컬럼의 오븐 온도는 40°C로 일정하게 하였고, 이동상의 유속은 0.2 mL/min로 하여 분석하였다.

검출을 위한 MS/MS 분석조건으로, 먼저 이온화 방식은 ESI(electrospray ionization)를 선택하였으며, positive ion mode에서 SRM(selected reaction monitoring) 방법을 사용하였다. Nebulizing gas로 질소가스, collision gas로 아르곤가스를 사용하였고, 기타 MS/MS 분석 파라미터는 spray voltage 5 kV, sheath gas pressure 20, aux gas pressure 10, capillary temp. 320°C, tube lens offset 78(I.S.는 70), collision pressure 1.2 mTorr, collision energy 20(I.S.는 10)로 설정하여 최적화 하였다. 파록세틴과 내부표준물질로 사용한 플루오세틴의 선구 이온은(precursor ion) 각각 m/z 330, 310의 수소화된 분자이온([M+H]⁺)을 사용하였으며, 생성 이온(precursor ion)으로 m/z 192, 148을 각각 모니터링 하였다.

하루에 실험을 5회 반복 시행하여 일내 재현성과 정확성을 구하였고, 5일간 실험을 반복 수행하여 일간

재현성을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

2.4. 비글건 혈장 시료의 처리 및 농도 계산

건강이 양호한 비글건 6마리에게 파록세틴을 16 mg/kg의 용량으로 경구투여한 후, 각 시간별로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹이고 3초동안 진탕한 다음 이 중 0.3 mL를 취하여 검량선 작성과 동일한 방법으로 전처리하였다. 전처리한 최종 시료를 LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 파록세틴의 피크 면적비를 구하고, 미리 작성한 검량선에 대입하여 비글건 혈장 중 파록세틴의 농도를 구하였다.

3.1. 비글건 혈장 중 파록세틴의 분석법 검증

파록세틴과 내부표준물질인 플루오세틴은 positive ion mode에서 수소화된 분자이온([M+H]⁺)인 m/z 330 (Fig. 2)과 m/z 310 (Fig. 3)이 가장 강한 검출세기를 보여, 이 이온들을 각 물질의 선구 이온으로 선정하였다. 특히 파록세틴의 경우에는 [M+H]⁺ 이온 외의 다른 토막이온은 검출되지 않았다. 선정된 선구이온에 대하여 product ion scan을 하였을 때, 파록세틴은 m/z 192, 178, 151, 135, 123, 109, 70의 이온이 검출되었고, 플루오세틴의 경우에는 m/z 148 이온만 검출되었다. 따라서 검출세기가 가장 큰 파록세틴의 m/z 192

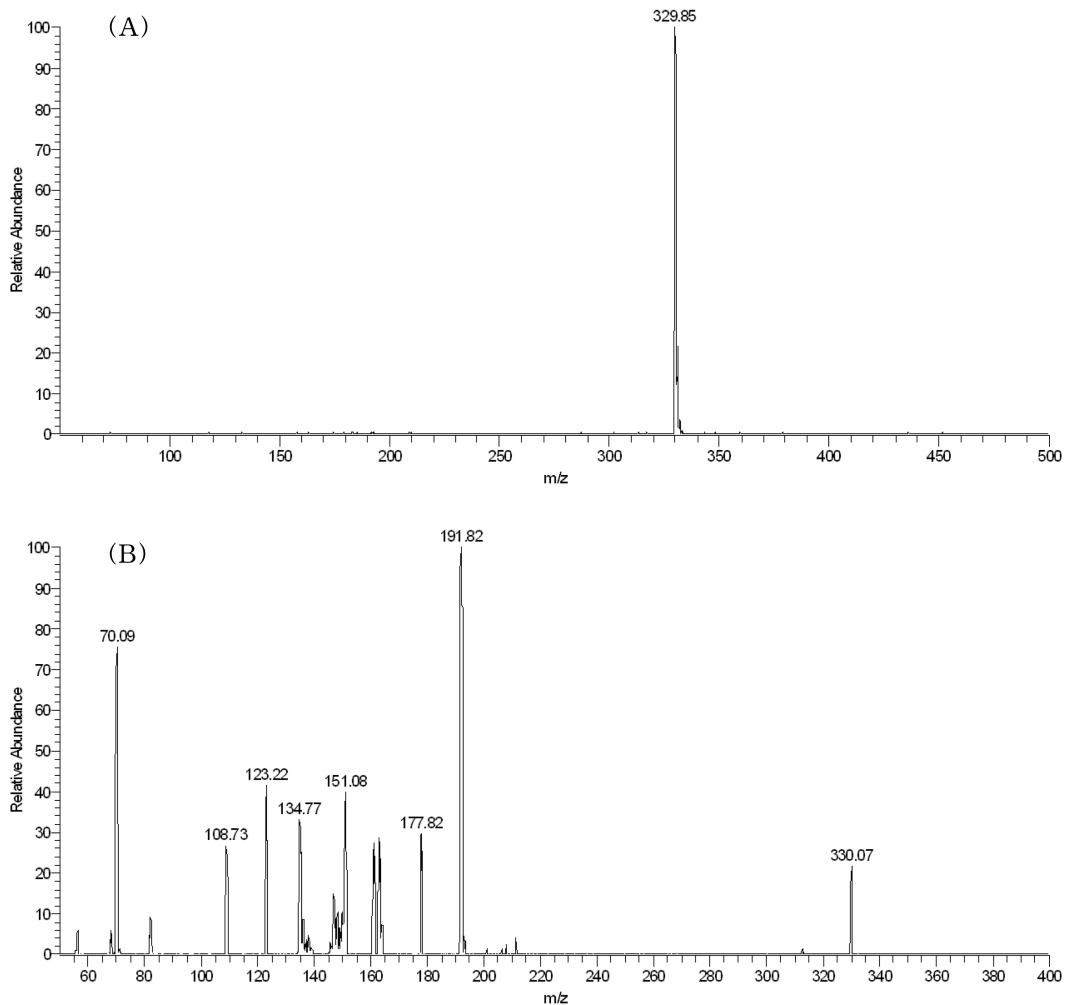


Fig. 2. Representative electrospray spectra of (A) Q1 mass spectrum of paroxetine, (B) product ion spectrum for the [M+H]⁺ molecule of paroxetine.

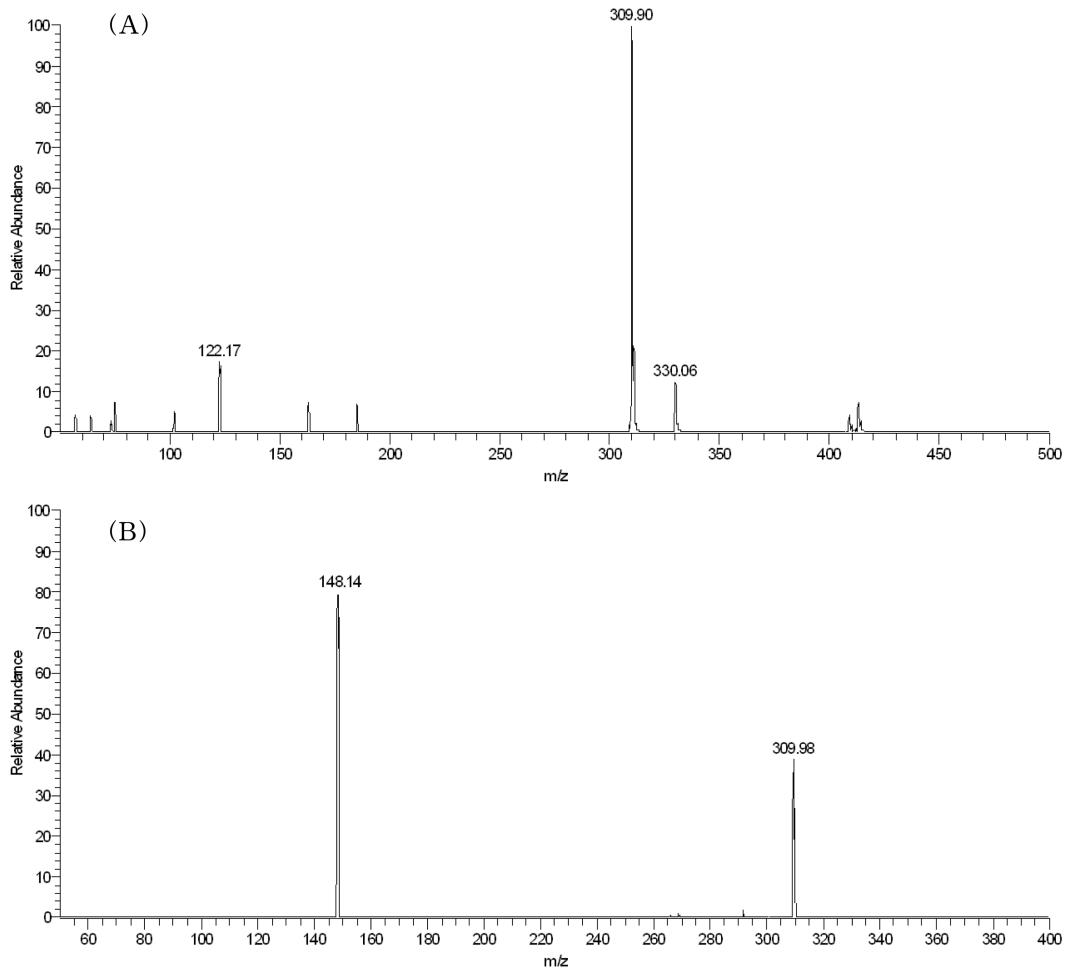


Fig. 3. Representative electrospray spectra of (A) Q1 mass spectrum of fluoxetine, (B) product ion spectrum for the $[M+H]^+$ molecule of fluoxetine.

와 플루오세틴의 m/z 148의 이온을 생성이온으로 선정하였다. 따라서 파록세틴과 플루오세틴의 ion transition을 m/z 330 \rightarrow 192, m/z 310 \rightarrow 148로 하여 SRM 방식으로 정량하였을 때, 가장 좋은 검출감도를 나타내었다.

건강한 비글견의 공혈장과 공혈장에 파록세틴과 내부표준물질을 함께 가한 것 및 파록세틴 제제를 투여한 후 2 시간 후에 채취한 혈장시료를 본 시험방법에 따라 전처리한 후, LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 파록세틴 피크의 머무름 시간은 1.8분, 내부표준물질 플루오세틴 피크의 머무름 시간은 2.0분이며, 총 유지시간은 2.6분이었다. MS/MS의 높은 선택성 때문에 비글견 공혈장 시료에서 파록세틴과 플루오세틴의 피크 외에

어떠한 피크도 검출되지 않았으며, 피크의 모양과 두 물질간의 분리 상태도 양호하였다.

비글견의 공혈장 시료, 비글견 공혈장에 내부표준물질만 가한 시료 및 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 ng/mL의 검량선용 비글견 표준혈장 시료를 각각 전처리한 후 LC-MS/MS로 분석하였을 때, 비글견 혈장 시료로부터 구한 파록세틴 검량선의 계산식은 $Y(\text{파록세틴/내부표준물질 피크 면적의 비율}) = 0.72145 X(\text{파록세틴 농도, ng/mL}) + 0.00104$ ($R^2=0.9993$)으로 0.02~5 ng/mL의 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 6).

혈장 중 파록세틴 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 0.02 ng/

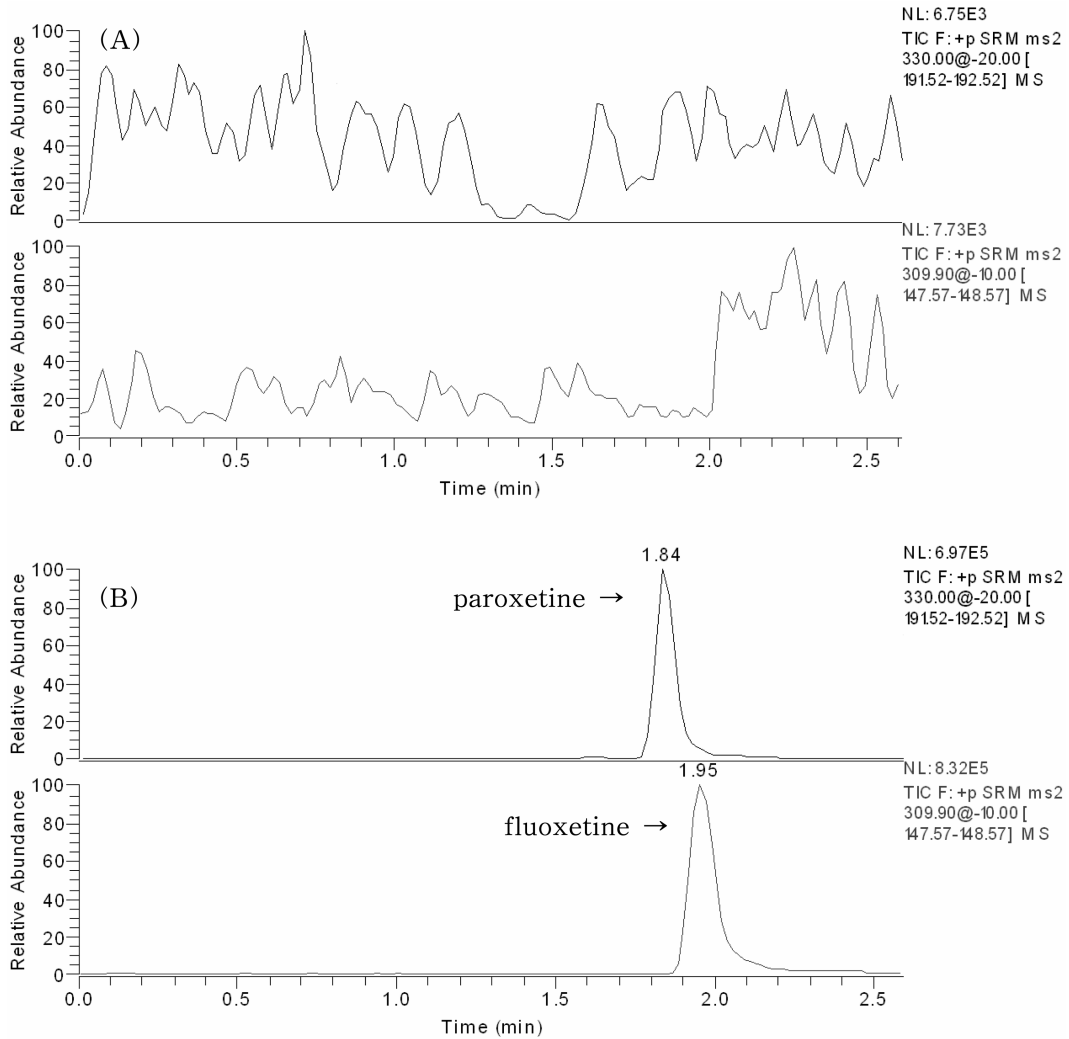


Fig. 4. LC-MS/MS chromatograms of (A) blank canine plasma, (B) blank canine plasma spiked with paroxetine and internal standard (1 ng/mL as paroxetine).

mL로 정하였다. 각기 다른 4가지 농도(0.02, 0.2, 1 및 5 ng/mL)의 파록세틴의 비글견 표준혈장을 분석하였을 때, 본 분석법의 정밀성(C.V., %)은 일내 정밀성이 2.12~5.66%, 일간 정밀성은 3.15~7.67% 범위로 나타났고, 정확성은 92.96~102.99%로 나타났으며(Table 1), 전처리를 통한 파록세틴의 회수율은 75.2~82.6%이었다. 이로부터 비글견 혈장 중 파록세틴에 대한 본 연구의 LC-MS/MS 분석법은 비글견에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

3.2. 확립된 분석법을 파록세틴의 약물동력학 연구에 응용

건강상태가 양호한 6 마리의 비글견에게 파록세틴 대조약(REFERENCE)과 시험약(TEST) 제제를 16 mg/kg의 용량으로 교차 경구투여한 후, 각 비글견으로부터 시간별로 혈장을 채취하였다. 파록세틴이 포함되어 있는 비글견 혈장 시료는 -70°C에 보관한 후, 분석 전에 해동하여 비글견 표준혈장과 동일한 방법으로 전처리하고 LC-MS/MS 분석법으로 정량하였다. 비글견 혈장 중 대조약과 시험약 두 제제에 대한 파록세틴의 농도-시간 곡선을 Fig. 7에 나타내었다.

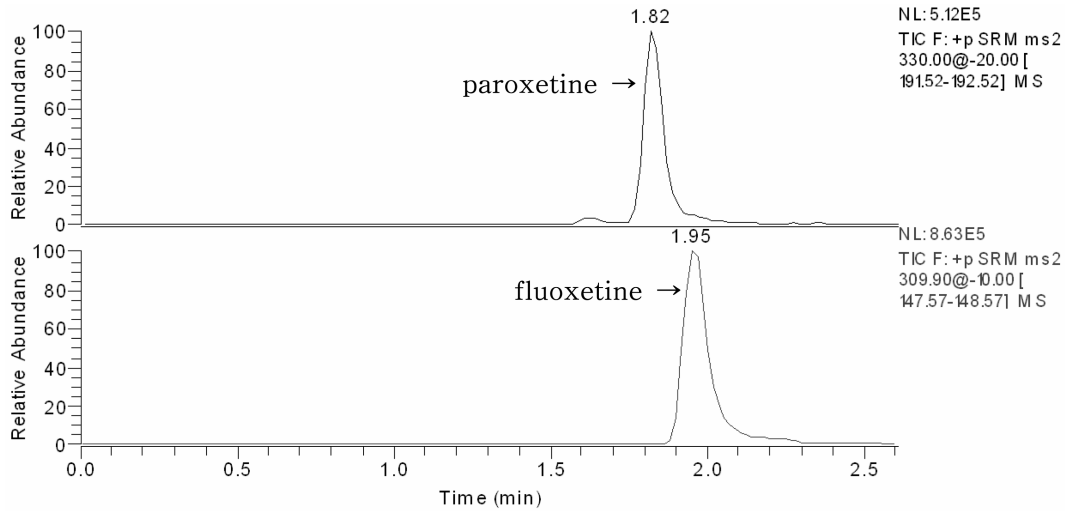


Fig. 5. LC-MS/MS chromatograms of canine plasma sample at 2 h after oral administration of paroxetine tablets (16 mg/kg).

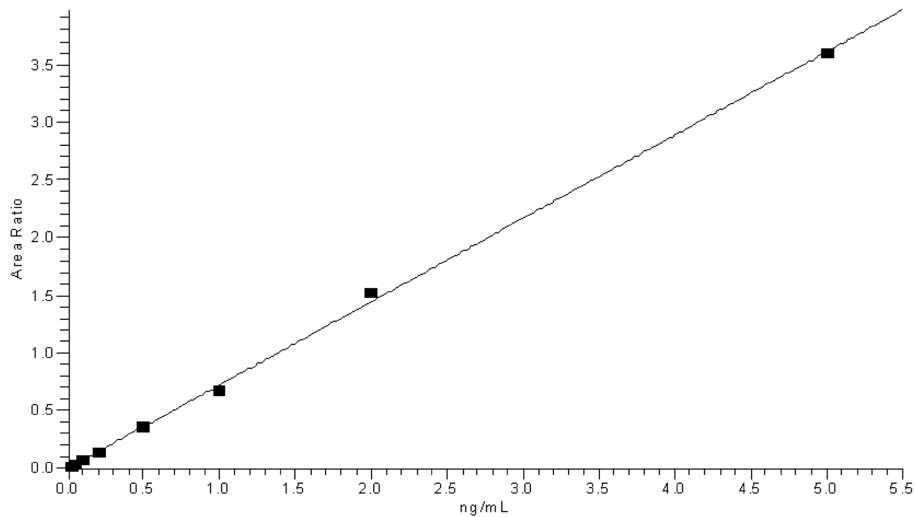


Fig. 6. Calibration curve of paroxetine in canine plasma ($y = 0.72145x + 0.00104$, $R^2 = 0.9993$).

Table 1. Precision and accuracy for the LC-MS/MS analysis of paroxetine in canine plasma

Conc. (ng/mL)	Precision (C.V., %)		Accuracy ^a (%)
	Intraday	Interday	
0.02	5.66	4.28	102.99±6.24
0.2	5.27	5.15	98.58±5.23
1	4.38	7.67	93.15±4.09
5	2.12	3.15	92.96±1.97

a: Mean ± SD (n = 5)

3.3. 보고된 다른 문헌과의 감도 비교

생체시료 중 파록세틴의 분석에 관한 많은 연구에

서 2000년도 이전에는 주로 HPLC에 자외선(UV), 형광 검출기(FLD)를 사용한 연구가 대부분이었다. 이 중에서 가장 감도가 좋은 것이 형광검출기를 사용한 분석법으로 그 검출한계가 0.2 ng/mL¹²에 불과하였다. 이러한 고전적인 방법은 간섭물질과 피크가 겹치면 정량이 불가능하였으므로, 복잡한 시료 매트릭스에서 정량할 경우에는 이동상의 조성을 조절하여 최대한의 분리도가 유지되도록 하였다. 그 결과 1개의 시료당 분석시간이 최소 10~20분 이상이 되어야 분석의 정확성과 정밀성이 확보될 수 있었다. 전임상 또는 임상시험에서 의약품의 생체이용률 연구와 약물동력학 연구를 수행하기 위해서는 수백~수천 개의 생체시료분석

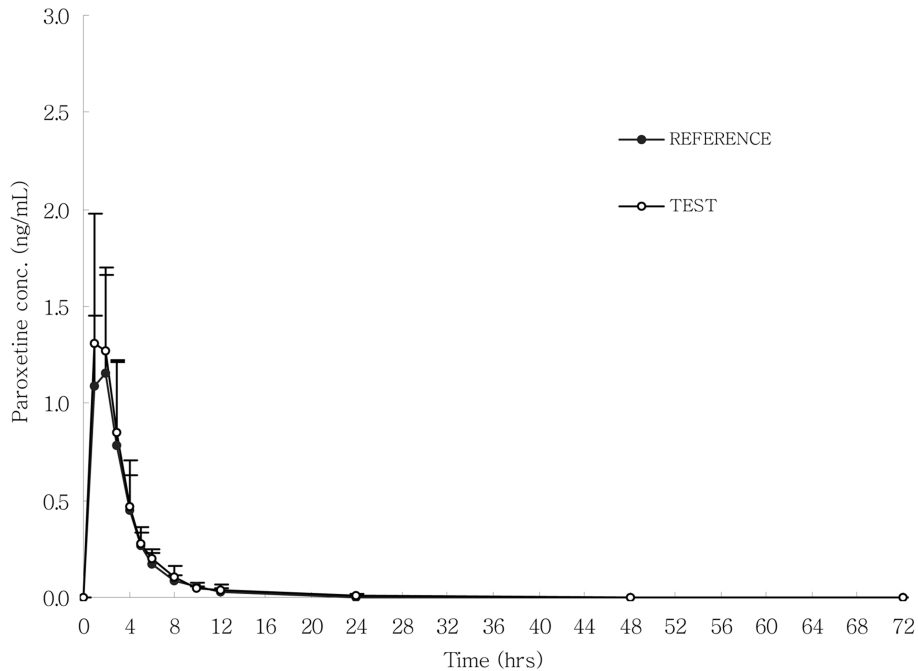


Fig. 7. Mean plasma concentration-time profile of paroxetine after oral administration of paroxetine tablets (16 mg/kg). Bars represent standard deviation of the mean (n = 3).

이 이루어져야 하는데, 이를 고전적인 HPLC-UV, HPLC-FLD 방법으로 수행하기에는 선택성과 긴 분석 시간에 따른 여러 가지 문제점이 발생하게 된다.

이를 해결하기 위하여 2000년대 초반부터 LC-MS 또는 LC-MS/MS를 이용한 생체시료 중의 의약품 분석이 매우 활발하게 진행되었으며, 파록세틴 또한 LC-MS, LC-MS/MS(triple quadrupole과 ion trap 방식)에 의한 분석법이 보고되었다. 이 중 Juan 등¹⁷은 plasma 시료 0.5 mL에서 LC-MS(single quadrupole)로 분석하여 정량한계 5 ng/mL, Segura 등¹⁸은 plasma 시료 1 mL에서 ion trap 방식의 LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.7 ng/mL, Zhu 등¹⁹은 plasma 시료 0.5 mL에서 triple quadrupole 방식의 LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.2 ng/mL, Naidong 등²⁰은 plasma 시료 0.4 mL에서 triple quadrupole 방식의 LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.05 ng/mL, Massaroti 등²¹은 plasma 시료 0.5 mL에서 triple quadrupole 방식의 LC-MS/MS로 분석하여 정량한계 0.2 ng/mL를 보고하였고 파록세틴의 생물학적동등성시험을 수행하였다. 하지만 본 연구에서는 plasma 시료 0.3 mL를 취하여 정량한계 0.02 ng/mL의 결과를 보여 기존에 보고된 방법에 비하여 양호한 분석결과를 얻었다.

4. 결 론

본 연구에서는 TBME(*tert*-butyl methyl ether)를 추출용매로 이용한 액체-액체 추출법(LLE)과 텐덱질량 분석법(LC-MS/MS)을 이용하여 비글견 혈장 중 파록세틴을 정량 분석하였다. 비글견 표준혈장 시료로부터 구한 검량선은 0.02~5 ng/mL 범위에서 상관계수(R^2) 0.9993으로 매우 양호한 직선성을 보였다. 일내 정밀성이 2.12~5.66%, 일간 정밀성은 3.15~7.67%이었으며, 정확성은 92.96~102.99%로 생체분석에 이용할 수 있는 충분한 정밀성과 정확성을 갖고 있음을 검증하였다. 또한, 기존 보고된 분석법보다 감도를 향상시켜 정량한계를 0.02 ng/mL까지 낮춤으로써 파록세틴의 반감기인 22시간 이상 최대 72시간까지 비글견 혈장 중 파록세틴의 농도를 측정할 수 있었다. 본 분석법을 비글견 혈장 중의 파록세틴 정량 및 약물동력학 연구에 적용하였으며, 향후 임상시험 등의 관련분야에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. G. C. Dunbar, J. B. Cohn, L. F. Fabre, J. P. Feighner, R.

- R. Fieve, J. Mendels and R. K. Shrivastava, *Br. J. Psychiatry*, **159**, 394-398 (1991).
2. C. G. Gottfries, I. Karlsson and A. L. Nyth, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, **6**, 354-359 (1992).
3. S. M. Holliday and G. L. Plosker, *Drugs Aging*, **3** 278-299 (1993).
4. R. Lane, D. Baldwin and S. Preskom, *J. Psychopharmacol.*, **9**, 5-11 (1995).
5. D. K. Raap and L. D. Van de Kar, *Life Sci.*, **65**, 1217-1235 (1999).
6. Y. Zhang, D. K. Raap, F. Garcia, F. Serres, Q. Ma, G. Battaglia and L. D. Van de Kar, *Brain Res*, **855**, 58-66 (2000).
7. B. Rodriguez de la Torre, J. Dreher, I. Malevany, M. Bagli, M. Kolbinger, H. Omran, B. Luderitz and M. L. Rao, *Ther. Drug. Monit.*, **23**, 435-440 (2001).
8. C. Duverneuil, G. L. de la Grandmaison, P. de Mazancourt and J. C. Alvarez, *Ther. Drug. Monit.*, **25**, 565-573 (2003).
9. K. Titier, N. Castaing, E. Scotto-Gomez, F. Pehourcq, N. Moore and M. Molimard, *Ther. Drug. Monit.*, **25**, 581-587 (2003).
10. C. Hiemke and S. Hrtter, *Pharmacol. and Ther.*, **85**, 11-28 (2000).
11. J. P. Foglia, D. Sorisio, M. Kirshner and B. G. Pollock, *J. Chromatogr. B*, **693**, 147-151 (1997).
12. J. G. Shin, K. A. Kim, Y. R. Yoon, I. J. Cha, Y. H. Kim and S. G. Shin, *J. Chromatogr. B*, **713**, 452-456 (1998).
13. C. Lpez-Calull and N. Dominguez, *J. Chromatogr. B*, **724**, 393-398 (1999).
14. I. A. Zainaghi, V. L. Lanchote and R. H. C. Queiroz, *Pharmacol. Res.*, **48**, 217-221 (2003).
15. C. T. Lai, E. S. Gorden, S. H. Kennedy, A. N. Bateson, R. T. Coutts and G. B. Baker, *J. Chromatogr. B*, **749**, 275-279 (2000).
16. H. J. Leis, W. Windischhofer and G. Fauler, *J. Chromatogr. B*, **779**, 353-357 (2002).
17. H. Juan, Z. Zhiling and L. Huande, *J. Chromatogr. B*, **820**, 33-39 (2005).
18. M. Segura, J. Ortuno, M. Farre, R. Pacifici, S. Pichini, J. Joglar and J. Segura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1455-1461 (2003).
19. Z. Zhu and L. Neirinck, *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, **780**, 295-300 (2002).
20. W. Naidong and A. Eerkes, *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 28-36 (2004).
21. P. Massaroti, N. M. Cassiano, L. F. Duarte, D.R. Campos, M. A. M. Marchioretto, G. Bernasconi, S. Calafatti, F. A. P. Barros, E. C. Meurer and J. Pedrazzoli, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **8**, 340-347 (2005).