

이온쌍 역상 HPLC를 이용한 인체 말초혈액단핵구에서 이노신 5'-일인산 탈수소효소 활성의 정량적 측정

신혜진 · 권순호 · 박지명 · 권순호¹ · 이경률 · 김영진 · 이상후*

(재)서울의과학연구소 질량분석부, ¹순천향대학병원 내과
(2010. 10. 1. 접수, 2010. 11. 22. 승인)

Quantitative determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography

Hye-Jin Shin, Soonho Kwon, Jimyeong Park, Soon Hyo Kwon¹, Kyoung-Ryul Lee, Young-Jin Kim and Sanghoo Lee*

Dept. of Bioanalysis, Seoul Medical Science Institute & Seoul Clinical Laboratory, Seoul 152-766, Korea,

¹Dept. of Internal Medicine, Soonchunhyang University Hospital 22, Seoul 140-743, Korea

(Received October 1, 2010; Accepted November 22, 2010)

요 약: 본 연구에서는 이온쌍 역상 HPLC/UV를 이용하여 건강한 한국인에서 분리된 말초혈액단핵구(PBMCs)에서 이노신 5'-일인산 탈수소효소(IMPDH)의 활성을 측정하였다. IMPDH는 이노신 5'-일인산(IMP)을 잔토신 5'-일인산(XMP)로 전환시키는 베타-니코틴아마이드 아데닌 디뉴클로티드 수화물(β -NAD⁺) 의존성 탈수소효소이며, 이것의 활성은 기질인 IMP와 조효소인 NAD⁺의 존재 하에서 분해한 PBMCs로부터 생성된 XMP에 해당하는 HPLC 크로마토그램을 정량적으로 분석함으로써 측정하였다. 생성된 XMP는 260 nm에서 검출하였다. 이동상으로는 7 mM tetra-*n*-butylammonium hydrogen sulfate가 포함된 37 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 5.5)와 methanol의 혼합용액(85:15, v/v)을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. 정량 범위는 0.2-50.0 μ M이었으며, 이 때 정량 한계(LOQ)는 0.2 μ M이었다. 또한, 본 연구에서 확립된 시험법은 일내 정밀성(0.88-1.47%), 정확성(98.74-99.99%)과 일간 정밀성(0.85-5.24%), 정확성(99.95-101.65%)을 측정하여 검증하였다. 11명의 건강한 한국인에 대한 IMPDH 활성 측정 결과, 18.29-36.60 nmol/h/mg protein(평균값 27.70 \pm 6.28 nmol/h/mg protein)이었다.

Abstract: A quantitative analytical method has been established for the measurement of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet detection (HPLC/UV). IMPDH is a β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD⁺)-dependent dehydrogenase in which the enzyme converts inosine 5'-monophosphate (IMP) into xanthosine 5'-monophosphate (XMP). Its activity was measured by quantifying a HPLC chromatogram corresponding to XMP produced during the incubation of lysed

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)70-7115-8697 Fax : +82-(0)2-858-2814

E-mail : sprout30@scllab.co.kr

PBMCs with IMP as a substrate and NAD^+ as a coenzyme. XMP produced was detected at a wavelength of 260 nm. The mobile phase was composed of a mixture of 37 mM potassium dihydrogen phosphate containing 7 mM tetra-*n*-butylammonium hydrogen sulfate adjusted to pH 5.5 and methanol (85:15, v/v) with a flow rate of 1 mL/min. The calibration curve was linear ($r^2=0.999999$) in the range of 0.2-50.0 μM and the limit of quantification (LOQ) was 0.2 μM . The intra- and inter-day precisions were between 0.88-1.47% and 0.85-5.24%, respectively. The intra- and inter-day accuracies were between 98.74-99.99% and 99.95-101.65%, respectively. IMPDH activity in 11 Korean healthy volunteers ranged from 18.29 to 36.60 nmol/h/mg protein (mean = 27.70 \pm 6.28 nmol/h/mg protein).

Key words: IMP, XMP, IMPDH activity, PBMCs, HPLC

1. 서 론

IMPDH는 *de novo* guanosine triphosphate (GTP) 생합성 경로에 관여하는 속도조절효소(rate-limiting enzyme)로서, IMP를 XMP로 전환시키는 NAD^+ 의존적인 탈수소효소이다(Fig. 1).¹

Mycophenolic acid(MPA)는 장기 이식 후 급성 거부 반응을 억제하기 위해 사용되는 면역억제제로, B 및 T lymphocyte 증식에 사용되는 purine 합성에 중요한 guanine monophosphate (GMP)의 생합성 과정 중 *de novo* 경로에 관여하는 주 효소인 IMPDH를 가역적 및 비경쟁적으로 억제한다.²⁻⁵ 최근, 장기이식 환자에서 mycophenolate mofetil (MMF)의 사용이 효과적인 면역억제제로 사용되고 있는데, MMF는 MPA의 전구체로 체내에서 대사되어 IMPDH를 억제하므로 활성화된 lymphocyte에 선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.⁶ IMPDH는 514 아미노산(amino acid) 잔기로 이루어진 단백질로, 84%의 유사성을 가진 types I 및 types II 두 가지의 isoform으로 나뉘며,^{7,8} 이 중 활성화된 lymphocyte는 types II에 더욱 많이 반응하는 것으로 알려져 있다. IMPDH types I은 지속적으로 발현되어 정상세포나 암세포에서 독성을 제거하거나 감소시키는 작용을 한다.^{6,9} 즉, lymphocyte에 MMF가 존재할 때 IMPDH type II가 선택적으로 발현이 감소되어 세포증식을 저해한다.¹⁰ MPA는 새로운 DNA 합성

억제와 활성화된 T lymphocyte의 세포분열(G1-S)을 억제하고, MPA에 의한 GTP의 고갈은 항증식(antiproliferative) 효과와 세포막 당단백(glycoprotein)으로의 GDP-fucose와 GDP-mannose의 전달을 차단하여 혈관 내피세포에 세포유착분자(adhesion molecules)의 부착을 저해하여 염증 부위로 lymphocyte의 이동을 감소시킬 수 있다.⁶

HPLC는 효소 활성을 측정하기 위한 유용한 기기로 보고되고 있는데, 대표적인 적용 사례로 thiopurine 약물의 대사와 관련된 thiopurine S-methyltransferase (TPMT)¹¹와 단백질 노화 관련 효소인 protein L-isopartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT)¹² 등이 HPLC법으로 활성을 측정하는 방법으로 보고되었다.

IMPDH 활성 측정과 관련하여, Langman *et al.*는 면역억제제에 의해 IMPDH의 활성이 저해되는 것을 방사성동위원소법으로 측정하였으나,¹³ 최근에는 간편하고 정확하다는 장점 때문에 HPLC를 이용한 방법으로 전환되고 있다.^{10,14} 비록 HPLC를 이용한 IMPDH 활성 측정에 관한 보고는 국외에 소수 있지만, 현재까지 건강한 한국인을 대상으로 수행한 IMPDH 활성 측정에 관한 보고는 없는 상태이다.

따라서 본 연구에서는 HPLC/UV를 이용한 PBMCs 내의 IMPDH 활성 측정법을 검증하고, 건강한 성인의 IMPDH 활성 범위를 측정하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

생성물인 XMP와 기질인 IMP 및 조효소인 NAD^+ 는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. Ion-pair reagent인 tetra-*n*-butylammonium hydrogen sulfate는 Merck Co. (Germany), Ficoll-Plaque

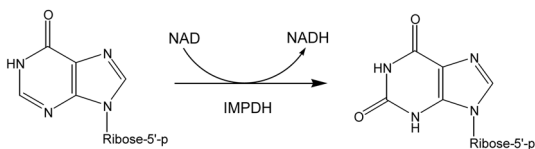


Fig. 1. Mechanism of IMPDH-mediated reaction.

solution은 GE Healthcare Bio-Sciences AB Co. (Sweden), Bradford protein assay reagent는 Bio-Rad Laboratories Co. (USA), potassium dihydrogen phosphate는 Amresco Co. (Germany), perchloric acid는 Showa (Japan)에서 구입하였고, 그 외의 methanol, acetonitrile 및 water는 DUKSAN (Korea) 또는 Fisher Scientific Co. (USA)에서 구입하였으며, 특급이나 HPLC용 등급을 사용하였다.

2.2. 시료 전처리

건강한 성인의 혈액을 EDTA 처리가 되어 있는 튜브에 7 mL 이상 채혈하여 실온에서 6시간 이내에 PBMCs를 분리하였다. PBMCs의 분리는 Ficoll-Paque 4 mL 층 위로 혈액과 동량의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를 섞어 혼합액을 부은 다음, 실온에서 700 g의 속도로 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 PBMCs 층만 따로 모아 15 mL 튜브로 옮기고, 약 2배의 PBS를 첨가하여 4 °C에서 700 g의 속도로 5분 동안 원심분리를 2회 반복하여 PBMCs pellet을 수집하였다. PBMCs의 pellet에 3 mL의 red blood cell (RBC) lysis buffer (150 mM ammonium chloride, 10 mM potassium hydrogen carbonate, 0.1 mM disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 7.3)를 첨가하여 얼음 위에 방치하고, 4 °C에서 900 g의 속도로 10분 동안 원심분리 하여 pellet 만 남기고 상층액을 버린 다음, 분석하기 전까지 -80 °C에서 보관하였다.

PBMCs의 pellet에 표준반응 용액(40 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)와 100 mM potassium chloride) 200 μ L로 재부유시킨 다음, 균질기(PT 1200 Polytron-Aggregate homogenizer, Kinematica, Inc., NY, USA)를 이용하여 15초간 5회 분해하였다(이하, 공 PBMCs 분해물). PBMCs의 pellet을 분해하는 동안 얼음에서 방치하면서 수행하였고, 불용성 단편을 제거하기 위해 4 °C에서 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮기고, 즉시 단백질 정량을 하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad Laboratories Co.의 Bradford protein assay reagent를 이용하였다. 공 PBMCs 분해물은 -80 °C에 보관하거나, 즉시 분석하였다.

2.3. 기기 및 분석조건

HPLC 장치는 Agilent 사의 HPLC 1200 series (Agilent, Palo Alto, CA, USA)와 데이터 처리 소프트웨어인 ChemStation을 사용하였다. HPLC의 구성은

on-line degasser, Quaternary 펌프, UV 검출기의 가변 파장 검출기(Variable Wavelength Detector, VWD)로 이루어졌다. 기타 장비로는 원심분리기(centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 탁상용 혼합기(VORTEX-2 GENIE[®], Scientific Industries, Inc., USA), 제빙기(VISION Scientific Co. LTD, Korea), 배양기(Jeio Tech, Inc., Korea), 균질기(PT 1200 Polytron-Aggregate homogenizer, Kinematica, Inc., NY, USA)를 사용하였다. 본 실험에서는 시료 50 μ L를 자동주입기로 주입한 후, security guard cartridge가 연결된 CAPCELL PAK C18 ACR (i.d. 4.6 mm, length 250 μ m, particle size 5 μ m, Shiseido, Japan) 컬럼을 이용하여 분리하였고, 이때 컬럼 온도는 25 °C로 유지하였다. 이동상은 7 mM tetra-*n*-butylammonium hydrogen sulfate가 포함된 37 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 5.5)와 methanol의 혼합용액(85:15, v/v)을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. 컬럼으로 용출된 XMP는 260 nm에서 검출하였다.

2.4. 분석 방법 검증

건강한 성인으로부터 분리한 공 PBMCs 분해물 40 μ L를 포함한 표준반응 용액을 매질로 하여, XMP를 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 및 50.0 μ M로 각각 제조한 후 HPLC로 분석하여 얻어진 피크 면적에 대해 검량선을 작성하였다. 또한 정밀성과 정확성 측정을 위하여, 공 PBMCs 분해물 40 μ L를 포함한 표준반응 용액을 매질로 하여, XMP의 각기 다른 3가지 농도(0.5, 5.0 및 50.0 μ M)를 각각 첨가하여, 각각 일내 5회 측정하고, 일간 5일간 측정하였다. 정확성은 bias로 나타내었으며, 이는 기지의 농도에서 측정된 농도의 평균값을 뺀 후, 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다. 또한 정밀성은 표준편차를 평균 분석값(상대표준편차, RSD)으로 나눈 값으로서, 재현성을 %로 구하여 검증하였다.

2.5. IMPDH 활성 분석

이온쌍 역상 HPLC/UV를 이용한 IMPDH 활성 분석법은 Chiarelli *et al.*¹⁰와 Glander *et al.*¹⁴의 방법을 참고하여 분석하였다. 모든 분석은 2회 반복 실험 하였다. 표준물질 XMP를 물에 녹여 1 mM의 농도가 되도록 제조한 후 4 °C에서 보관하고, 이 용액을 -80 °C에 보관하였던 공 PBMCs 분해물 40 μ L를 포함한 표준반응 용액을 매질로 하여, XMP의 농도가 각각 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 및 50.0 μ M이 되도록 제조하였다.

건강한 성인의 IMPDH 활성을 분석하기 위하여, 분석할 PBMCs 분해물 40 μL 를 포함한 표준반응 용액에 1 mM IMP와 1 mM NAD^+ 를 첨가하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 3 시간 반응시킨 후, 냉장 보관하였던 4 M perchloric acid 20 μL 을 넣어 반응을 정지시켰다. 그런 다음에 4 $^\circ\text{C}$ 에서 12,000 g로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 담은 후, 5 M potassium carbonate 10 μL 을 넣어 중화시키고, -80 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 보관한 다음 해동시켜 HPLC 컬럼에 50 μL 를 주입하여 30분에 걸쳐 분석하였다. IMPDH 활성은 표준물질 XMP의 검량선을 이용하여 분석할 PBMCs로부터 생산된 XMP의 농도를 구하고, 효소 반응시간과 단백질 양으로 나누어 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 IMPDH 활성은 분해한 PBMCs를 IMP와 NAD^+ 와 함께 방치한 다음 생성된 XMP의 양을

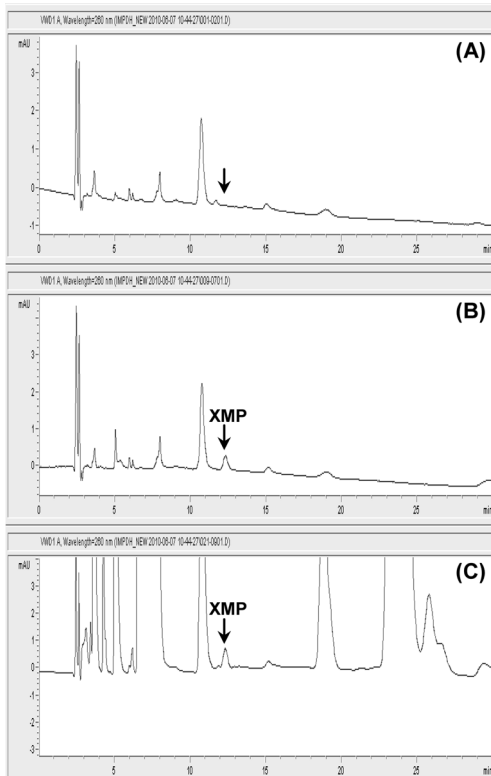


Fig. 2. Chromatograms of (A) blank human PBMC lysates, (B) blank human PBMC lysates spiked with XMP (0.5 μM) and (C) human PBMC lysates incubated with IMP and NAD^+ . (Retention Time = 12.5 min)

정량적으로 분석함으로써 측정하였다[nmol (XMP의 양) / h(반응시간) / mg(단백질의 양)].

Fig. 2는 HPLC/UV를 이용하여 전혈에서 사람의 PBMCs를 분리한 후 분해하여 내인성물질과 기질로부터 XMP를 분석하였을 때 얻은 크로마토그램이다. Fig. 2(A)는 건강한 성인으로 분리된 PBMCs 분해물에 IMP와 NAD^+ 를 첨가하지 않았을 때 XMP에 해당되는 피크가 나타나지 않았다는 것을 의미하며, Fig. 2(B)는 건강한 성인으로 분리된 PBMCs 분해물에 0.5 μM 의 XMP를 외부에서 첨가하였을 때의 XMP의 피크이다. 이 크로마토그램 결과로부터 XMP의 머무름 시간이 12.5분이라는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 2(C)는 건강한 성인으로 분리된 PBMCs 분해물에 IMP와 NAD^+ 를 반응하는 동안 첨가하였을 때 XMP의 피크로, Fig. 2(B)에서 보여준 표준용액의 XMP와 같은 12.5 분의 머무름 시간을 확인할 수 있었다.

본 연구의 분석법의 검증 결과, 표준 PBMCs 시료로부터 구한 XMP의 검량선의 회귀식은 농도비 (y) = $17.526912 \times \text{피크면적비}(x) - 0.557753$ 이고, 결정계수(r^2)는 0.999999로, 0.2-50.0 μM 범위에서 매우 좋은 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 이때 LOQ는 0.2 μM 이었다. 각기 다른 3가지 농도(0.5, 5.0 및 50.0 μM)의 XMP의 표준 PBMCs를 분석하였을 때 본 분석방법의 일내 정밀성이 0.88-1.47%, 정확성은 98.74-99.99%으로 측정되었고, 일간 정밀성이 0.85-5.24%, 정확성은 99.95-101.65%로 측정되었다(Table 1). 이러한 결과들은 본 분석법이 국제적으로 승인된 가이드라인의 범주에 있다는 것으로 확인되었다.¹⁶

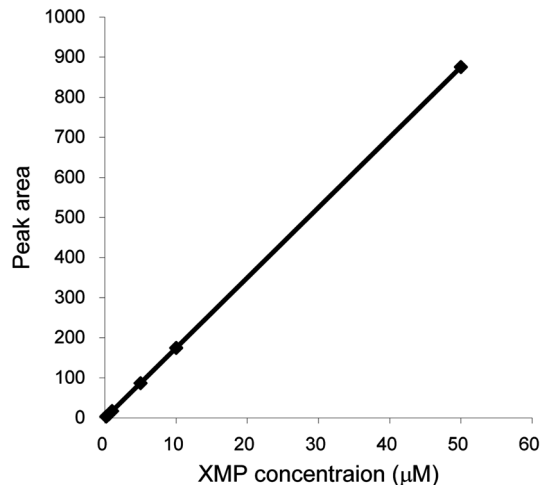
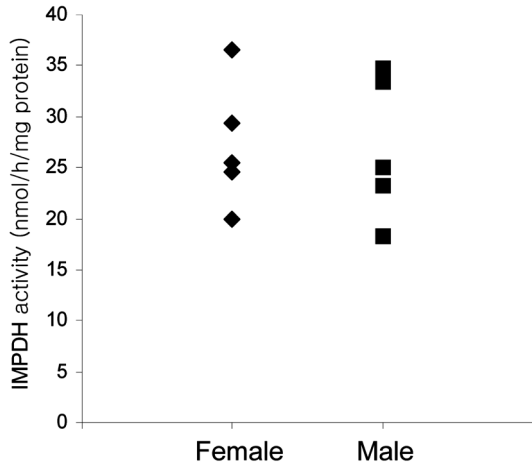


Fig. 3. A calibration curve of standard XMP.

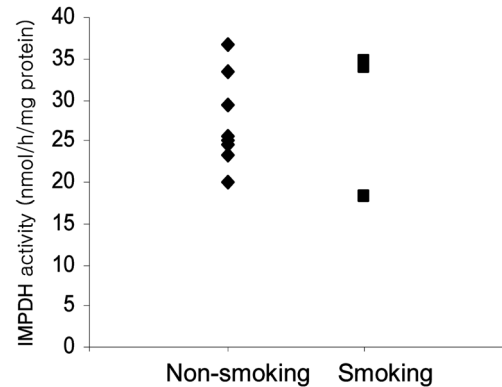
Table 1. Precision and accuracy of XMP determination in human PBMC lysates

XMP (μ M)	Intra-assay (n = 5)		Inter-assay (n = 5)	
	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
0.5	98.74	1.47	101.65	5.24
5.0	99.99	0.88	100.71	1.51
50.0	99.71	1.19	99.95	0.85

Fig. 4. IMPDH activities in human PBMC lysates obtained from 11 healthy volunteers. Comparison of the IMPDH activities between female (\blacklozenge , n = 5) and male (\blacksquare , n = 6).

Chiarelli *et al.*¹⁰와 Glander *et al.*¹⁴의 방법을 참고하여 11명의 건강한 한국인의 남, 녀 지원자에게 EDTA 처리가 된 튜브에 전혈을 채혈한 후, Ficoll-Paque을 이용하여 PBMCs를 분리하였다. 분리한 PBMCs는 RBC lysis 처리 후 40 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)와 100 mM potassium chloride가 혼합된 용액 200 μ L로 재부유시킨 다음, 균질기로 분해하여 단백질을 정량 하고, 40 μ L의 단백질을 37 °C에서 반응하는 동안 IMP와 NAD⁺를 첨가하여 생성된 XMP의 피크면 적비를 표준검량선을 이용하여 농도를 계산하였다. IMPDH 활성은 생성된 XMP를 효소 반응시간(3 시간)과 단백질 양으로 나누어 계산하였다.

Fig. 4와 Fig. 5는 11명의 건강한 한국인의 IMPDH의 활성을 나타내는 그래프이며, 범위는 18.29-36.60 nmol/h/mg protein(평균값 27.70 ± 6.28 nmol/h/mg protein)으로 남자(평균값 28.11 ± 6.89 nmol/h/mg protein; n = 6), 여자(평균값 27.20 ± 6.22 nmol/h/mg protein; n = 5)와 비흡연자(평균값 27.21 ± 5.54 nmol/h/mg protein;

Fig. 5. Comparison of IMPDH activities between non-smoking (\blacklozenge , n = 8) and smoking (\blacksquare , n = 3) groups.

n = 8), 흡연자(평균값 29.00 ± 9.28 nmol/h/mg protein; n = 3)간의 차이가 거의 없음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 건강한 한국인 지원자의 IMPDH의 활성 범위와 기존에 보고된 국외 사례들과의 IMPDH의 활성 범위를 비교해 보았을 때 유사한 수준임을 알 수 있었다. Glander *et al.*의 보고에 의하면 독일의 건강한 남, 여 지원자 60명의 IMPDH 활성 범위의 측정 결과 4.72-32.92 nmol/h/mg protein(평균값 18.39 nmol/h/mg protein)로 나이와 성별에 따라 차이가 없었다.¹⁴ Maiguma *et al.*의 보고에 의하면 일본의 건강한 지원자 10명의 IMPDH 활성 측정 결과 5.93-15.28 nmol/h/mg protein(평균값 9.86 nmol/h/mg protein)이었다.¹⁵

4. 결 론

결론적으로, 본 연구에서는 이온쌍 역상 HPLC/UV 분석법을 이용하여 건강한 성인 PBMCs에서의 이노신 5'-일인산 탈수소효소 활성의 정량적 측정법을 검증하였다. 검증 결과 생체시료 분석법의 국제적 규정에 만족할 만한 수준으로 결과가 얻어졌고, 이 분석법을 이용하여 건강한 한국인의 PBMCs 내에 IMPDH 활성 범위를 평가하였다. IMPDH의 활성은 여자와 남자, 흡연자와 비흡연자간의 차이가 없음을 확인하였다. 이 분석 방법은 향후 한국인들의 PBMCs 내 IMPDH의 활성을 측정하는 데에 유용한 분석법이 될 것으로 사료되며, 또한 향후 한국인의 장기이식환자에게 면역억제제 투여 후, 시간대별 PBMCs의 IMPDH 활성을 측정하여 장기이식 환자의 면역억제제 투여량을 결정하는데도 유용한 분석법이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 서울의과학연구소 자체연구개발 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. W. Wang and L. Hedstrom, *Biochemistry*, **36**(28), 8479-8483(1997).
2. A. C. Allison and E. M. Eugui, *Immunopharmacology*, **47**(2-3), 85-118(2000).
3. E. M. Eugui and A. C. Allison, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **685**, 309-329(1993).
4. M. A. Fleming, S. P. Chambers, P. R. Connelly, E. Nimmesgern, F. Fox, F. J. Bruzzese, S. T. Hoe, J. R. Fulghum, D. J. Livingston, C. M. Stuver, M. D. Sintchak, K. P. Wilson and J. A. Thomson, *Biochemistry*, **35**(22), 6990-6997(1996).
5. A. C. Allison, T. Hovi, R. W. Watts and A. D. Webster, *Lancet*, **2**(7946), 1179-1183 (1975).
6. A. C. Allison and E. M. Eugui, *Springer Semin. Immunopathol.*, **14**(4), 353-380(1993).
7. Y. Natsumeda, S. Ohno, H. Kawasaki, Y. Konno, G. Weber and K. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **265**(9), 5292-5295(1990).
8. S. F. Carr, E. Papp, J. C. Wu and Y. Natsumeda, *J. Biol. Chem.*, **268**(36), 27286-27290(1993).
9. Y. Konno, Y. Natsumeda, M. Nagai, Y. Yamaji, S. Ohno, K. Suzuki and G. Weber, *The J. Biol. Chem.*, **266**(1), 506-509(1991).
10. L. R. Chiarelli, M. Molinaro, C. Libetta, C. Tinelli, L. Cosmai, G. Valentini, A. Dal Canton and M. Regazzi, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **69**(1), 38-50(2010).
11. E. Jacqz-Aigrain, E. Bessa, Y. Medard, Y. Mircheva and E. Vilmer, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **38**(1), 1-8(1994).
12. T. Furuchi, S. Kosugi, K. Ohno, T. Egawa, M. Sekine, M. Katane and H. Homma, *Anal. Biochem.*, **384**(2), 207-212(2009).
13. L. J. Langman, D. F. LeGatt and R. W. Yatscoff, *Clin. Chem.*, **41**(2), 295-299(1995).
14. P. Glander, K. P. Braun, P. Hambach, S. Bauer, I. Mai, I. Roots, J. Waiser, L. Fritsche, H. H. Neumayer, K. Budde, *Clin. Biochem.*, **34**(7), 543-549(2001).
15. T. Maiguma, T. Yosida, K. Otsubo, Y. Okabe, A. Sugitani, M. Tanaka, R. Oishi and D. Teshima, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **35**(1), 79-85(2010).
16. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bio-analytical Method Validation (2001).