

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php**Article original****Mesurament de la concentració de massa de docetaxel en el plasma mitjançant cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem**

Raül Rigo Bonnin, José Manuel González de Aledo Castillo, Ariadna Arbiol Roca, Mercedes Sanjuás Iglesias, Ariadna Padró Miquel, Beatriz Candás Estébanez, Pedro Alía Ramos

Àrea de Bioquímica Especial, Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, L'Hospitalet de Llobregat

2015 © Publicat per l'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

El docetaxel (Figura 1A) és un fàrmac semi-sintètic anàleg del paclitaxel (Figura 1B) que presenta activitat citotòxica i antineoplàsica. El docetaxel (d'ara endavant DCX) exerceix la seva activitat principalment en estimular i establir de forma simultània l'acoblament dels microtúbuls i evitar la seva despolimerització. Aquesta interrupció de l'acoblament normal del fus mitòtic origina trencaments cromosòmics aturant el cicle cel·lular G2/M. El DCX també induïx la mort cel·lular per apoptosi i la lisi cel·lular, encara que el mecanisme pel qual estimula l'apoptosi no està clarament establert (1).

La farmacocinètica del DCX es caracteritza per presentar una elevada variabilitat interindividual. Algunes de les causes d'aquesta variabilitat són l'edat, el gènere, l'ètnia, la insuficiència hepàtica, la presència de diversos polimorfismes genètics i la seva elevada unió a proteïnes plasmàtiques, principalment, a l'albumina i a l' α_1 -glicoproteïna àcida (2-4). Aquesta variabilitat farmacocinètica, juntament amb la seva toxicitat, influeixen en l'eficàcia i compliquen la dosi òptima d'administració. La possibilitat d'ajustar la dosi de DCX a partir dels valors obtinguts del mesurament de la concentració d'aquest fàrmac en el plasma, podria suposar un avenç important en el tractament dels pacients amb càncer.

En l'actualitat, per al mesurament d'aquesta magnitud farmacològica, s'han desenvolupat procediments de mesura que es basen en la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*) acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat (5-9), l'HPLC acoblada a l'espectrometria de masses o MS (acrònim

de l'anglès *mass spectrometry*) o l'HPLC acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem o MS/MS (acrònim de l'anglès *tandem mass spectrometry*) (10-21). No obstant això, alguns d'aquests procediments presenten una sèrie de limitacions o inconvenients. Pel que fa a la capacitat de detecció, tres d'ells (10, 11, 14) presenten límits de quantificació per sobre de 5 µg/L, valors, que podrien ser insuficients per dur a terme estudis farmacocinètics i farmacodinàmics de DCX. També, alguns d'ells (14, 15), utilitzen procediments de preparació de la mostra basats en la precipitació de proteïnes, els quals no permeten eliminar la majoria dels components d'una mostra donant lloc a extractes més "bruts" i, en conseqüència, a una major probabilitat de presentar un efecte matriu. Altres procediments publicats, basats en l'extracció en fase sòlida (11, 19, 21), tot i ser més eficaços de cara a l'eliminació dels diversos components de la mostra, són laboriosos i cars. A més, en la majoria de publicacions (10-12, 14, 16-21), es reporta un temps d'anàlisi per mostra relativament elevat (entre 4,5 i 18 min). De cara a la monitorització farmacoterapèutica d'un fàrmac o a la realització d'estudis farmacocinètics i farmacodinàmics, un temps d'anàlisi elevat podria suposar una disminució en el rendiment de treball d'una àrea específica d'un laboratori clínic. Per altra banda, només un dels articles publicats (13) emprà la cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UHPLC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) acoblada a l'MS/MS per al mesurament de la concentració de massa de DCX en el plasma. Aquests sistemes cromatogràfics permeten treballar amb columnes analítiques amb farcits de partícules inferiors a 2 µm, proporcionant una major resolució i eficàcia cromatogràfiques en

<http://www.acclc.cat/continguts/ivv187.pdf>

2015 © ACCLC. Tots els drets reservats.

un menor temps i permetent escurçar els temps de retenció (22, 23).

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un procediment de mesura així com validar un sistema basat en la UPLC-MS/MS per al mesurament de la concentració de massa de DCX en el plasma.

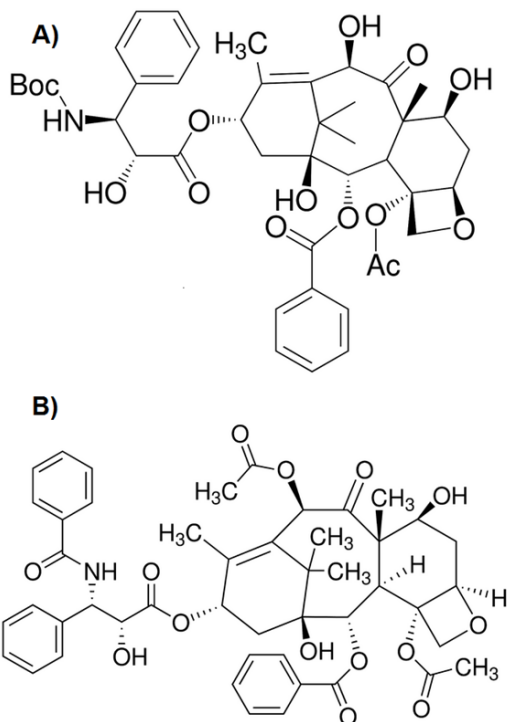


Figura 1. Estructura química de (A) docetaxel i (B) paclitaxel (estàndard intern).

2. Material i mètodes

2.1. Productes químics

Per a la preparació dels materials de calibratge i de control s'empra DCX trihidratat —material de referència certificat amb un puresa del 93,5 %— de la Farmacopea Europea (Estrasburg, França). Per a la preparació de la solució de treball d'estàndard intern, s'utilitza paclitaxel (d'ara endavant PCX) —material de referència certificat amb un puresa del 99,4 %— de la Farmacopea Europea.

L'aigua de qualitat HPLC-MS i l'àcid acètic glacial són proporcionats per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya). Per altra banda, altres productes com l'acetat d'amoni, l'àcid fòrmic, el metanol i el metil *tert*-butil èter (d'ara endavant MTBE), tots de qualitat HPLC-MS, s'obtenen de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya).

2.2. Material de blanc

El material de blanc es prepara a partir de 30 mostres de pacients que no estan en tractament amb DCX o PCX. Aquestes mostres s'obtenen mitjançant punció venosa i es recullen en tubs de plasma amb EDTA-K₃ (Vacuette, Kremsmünster, Àustria). Posteriorment, les mostres són centrifugades a 1600 g durant 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament es realitza una barreja dels plasmes, s'agita durant 5 minuts amb l'ajuda d'un agitador magnètic i s'emmagatzema durant un temps inferior a 2 hores a (2-8) °C fins a la seva utilització.

2.3. Preparació de solucions primàries i solucions de treball

Es preparen dues solucions primàries de DCX 5,0 mg/L en metanol, una per als materials de calibratge i una altra per als materials de control. Posteriorment, s'elaboren set materials de calibratge en una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol (0, 10, 25, 100, 250, 1000 i 2500 µg/L) i tres materials de control en una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol (50, 500 i 1500 µg/L). Els materials elaborats són emmagatzemats a -80 °C en alíquotes de 150 µL.

Per a la preparació de la solució de treball de l'estàndard intern (100 µg/L de PCX), s'elabora una solució primària de PCX 10 mg/L en metanol i es realitza una dilució de la mateixa, emprant una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol com a dissolvent.

2.4. Preparació i tractament dels materials de calibratge i materials de control en matriu plasmàtica

Per a la preparació i tractament dels materials de calibratge en matriu plasmàtica, en tubs de borosilicat de 5 mL, s'afegeixen 250 µL d'aigua, 50 µL de la solució de treball d'estàndard intern i 50 µL de material de calibratge sobre 125 µL de material de blanc, obtenint-se uns valors dels calibradors en matriu plasmàtica compresos entre 4,0 µg/L i 1000 µg/L. Després d'agitar les diferents solucions durant 5 s amb l'ajuda d'un agitador Vòrtex, s'addicionen 1,5 mL de MTBE per dur a terme una extracció líquid-líquid. El tubs són agitats novament durant 45 s i centrifugats durant 5 min a 1500 g a temperatura ambient. Posteriorment, 1 mL de les fases orgàniques —que es troben a la part superior— es transfereixen a nous tubs de borosilicat de 5 mL i s'evaporen amb nitrogen fins a la sequedat a 40 °C. Seguidament, els residus resultants es redissolven amb 200 µL d'una solució d'aigua/metanol (50:50 v/v) que conté 0,1 % (v/v) d'àcid acètic, s'agiten els tubs durant 5 segons i es traspassen els seus continguts a vials cromatogràfics de vidre específics per al seu processament.

Els materials de control en matriu plasmàtica es preparen i tracten seguint el mateix procediment que els materials de calibratge. Els valors en aquests materials de control són 20, 200 i 600 µg/L.

2.5. Preparació i tractament de mostres

La preparació i el tractament de les mostres consisteix en una extracció líquid-líquid seguida d'una evaporació amb nitrogen de la fase orgànica i una reconstitució del residu obtingut.

Per a la preparació de les mostres, en tubs de borosilicat de 5 mL, s'afegeixen 250 µL d'aigua, 50 µL de la solució de treball d'estàndard intern i 50 µL d'una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol sobre 125 µL de material de blanc. Posteriorment, es du a terme el mateix tractament descrit anteriorment per als materials de calibratge i de control en matriu plasmàtica.

2.6. Sistema de mesura

S'empra un sistema ACQUITY® UPLC® acoblat a un espectròmetre de masses ACQUITY® TQD®, ambdós de Waters (Milford, Oh, Estats Units).

2.7. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels components de la mostra es porta a terme a 35 °C utilitzant una columna analítica C₁₈ en fase reversa Acquity UPLC® BEH 2,1 x 100 mm; 1,7 µm de Waters, a la qual se li ha incorporat un suport que conté un filtre de 2,0 µm (Waters). La fase mòbil està composta per una solució 2 mM d'acetat d'amoni i àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en aigua (fase mòbil A) i per una solució 2 mM d'acetat d'amoni i àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en metanol (fase mòbil B). El flux aplicat es manté a 0,4 mL/min i s'utilitza una elució isocràtica amb una composició del 30 % de

la fase mòbil A i del 70 % de la fase mòbil B. Les mostres tractades es mantenen a $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ a l'interior del mostrejador. El volum d'injecció de la mostra és 20 μL en un bucle de 50 μL i treballant en la modalitat d'injecció parcial amb l'agulla sobreixida.

2.8. Condicions de l'espectròmetre de masses

S'utilitza la ionització mitjançant electroesprai en mode positiu (ESI+). Per al DCX i el PCX, els ions precursors generats que donen un major senyal són els formats pels adductes del fàrmac protonat [Fàrmac-H]⁺. S'utilitza nitrogen com a gas de nebulització i de desolvatació, i argó com a gas de col·lisió. El DCX i el PCX es detecten treballant en la modalitat de monitorització múltiple de reacció o MRM (acrònim de l'anglès *multiple reaction monitoring*) emprant les següents relacions massa-càrrega (m/z): DCX, 808,3→527,0 (transició utilitzada per a la quantificació) i 808,3→509,0 (transició emprada per a la confirmació); PCX, 854,3→569,0 (transició per a la quantificació) i 854,3→569,0 (transició per a la confirmació). Per a cada un dels fàrmacs en estudi, seguint els criteris de la guia C50-A (24) de l'Institut per a la Normalització de Laboratoris Clínics (CLSI) i la Federació Internacional de Química Clínica i Ciències de Laboratori Clínic (IFCC), el quocient entre els senyals dels ions obtinguts entre les transicions de quantificació i de confirmació (senyal quantificació/confirmació) és utilitzat per a la identificació dels seus corresponents pics cromatogràfics. El temps d'integració o DT (acrònim de l'anglès *dwell time*) per a cada una de les transicions MRM és 0,2 s. El potencial de capil·laritat és 3,5 kV, la temperatura de la font d'ionització és 120 $^\circ\text{C}$ i s'utilitza una temperatura del gas de desolvatació de 400 $^\circ\text{C}$. Els fluxos del gas de desolvatació, del gas aplicat al con i del gas de col·lisió són 850 L/h, 150 L/h i 0,13 mL/min, respectivament. Els potencials de con aplicats són 18 V per al DCX i 24 V per al PCX, mentre que les energies de col·lisió emprades per ambdós fàrmacs són 10 eV per a les transicions de quantificació i 14 eV per a les transicions de confirmació.

2.9. Procediment de validació

El procediment de validació es porta a terme seguint les guies i recomanacions de l'Agència Europea del Medicament (EMA) i del CLSI-IFCC (24-26).

Les propietats metrològiques estudiades són la sensibilitat (metrològica), la selectivitat, la contaminació per arrossegament o residualitat, la capacitat de detecció (límit de detecció i límit de quantificació), l'interval de mesura (linealitat), la imprecisió intradiària, la imprecisió interdiària, el biaix relatiu intradiari, el biaix relatiu interdiari i l'eficiència del procés cromatogràfic (la recuperació i l'efecte matriu). Per altra banda, també es realitza un estudi de l'estabilitat de les diferents magnituds farmacològiques.

2.9.1. Calibratge i sensibilitat metrològica

Cada vegada que es realitzen mesuraments de la magnitud farmacològica en estudi es processen els set materials de calibratge.

La integració de les àrees sota la corba dels pics cromatogràfics suavitzats i el càlcul dels valors de la concentració de massa de DCX en el plasma es realitza utilitzant el programa informàtic TargetLynx[®] versió 4.1 de Waters. Les corbes de calibratge s'obtenen mitjançant un ajust lineal per ponderació $1/X^2$, exclouent l'opció de forçar la intersecció de la recta per l'ordenada en l'origen, després de representar gràficament, per a cada un dels materials de calibratge, el quocient $(A_{\text{DCX}} / A_{\text{PCX}}) \cdot C_{\text{PCX}}$ (eix d'ordenades, y) enfront als valors de la concentració de DCX (eix d'abscisses, x); sent A_{DCX} , l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic del DCX; A_{PCX} , l'àrea

sota la corba del pic cromatogràfic del PCX (estàndard intern); i C_{PCX} , el valor de la concentració de PCX en la solució de treball de l'estàndard intern. La sensibilitat metrològica es calcula com el valor del pendent de les distintes corbes de calibratge obtingudes després de realitzar l'ajust lineal.

Seguint els criteris de l'EMA (25), per als materials de calibratge, les diferències percentuals relatives entre els valors de la concentració de DCX calculades i teòriques han d'estar compreses entre $\pm 15\%$ i, entre $\pm 20\%$ a valors propers al límit de quantificació.

2.9.2. Selectivitat

Per a l'estudi de la selectivitat es processen 10 mostres de pacients que no estan en tractament amb DCX o PCX però sí que prenen, de manera individual o combinada, altres fàrmacs com antiepilèptics, antibiòtics, immunosupressors, digoxina o metotrexat. Dos pacients estan en tractament amb ciclosporina A, everolimus i micofenolat; dos amb tazobactam i valproat; un amb ceftriaxona i tacrolimus; un amb fenitoïna i metotrexat; un amb micofenolat i sirolimus; un amb digoxina; un amb carbamazepina i un altre amb cefepima. Tots els pacients presenten un valor de la concentració del fàrmac en el plasma o en la sang dins del seu corresponent interval terapèutic.

Seguint els criteris de l'EMA (25), es considera que els diferents fàrmacs no interfereixen en el mesurament de la magnitud farmacològica quan:

- En el temps de retenció del DCX, els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres són inferiors al 20 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en una mostra que conté DCX amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (PCX), els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres són inferiors al 5 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en una mostra que presenta DCX amb un valor que correspon al límit de quantificació.

2.9.3. Contaminació per arrossegament o residualitat

Per a l'estudi de la contaminació per arrossegament o residualitat es processa, en una mateixa sèrie i en un únic dia, una mostra que conté DCX amb un valor que correspon al límit de quantificació (LOQ), tres materials de blanc (calibrador 0; 0 $\mu\text{g/L}$) i un material de valor elevat (calibrador 7 en matriu plasmàtica; 1000 $\mu\text{g/L}$) seguint l'ordre següent: LOQ – Calibrador 7 – Calibrador 0 – Calibrador 0 – Calibrador 0.

Seguint els criteris de l'EMA (25), es considera que no existeix contaminació per arrossegament quan:

- En el temps de retenció del DCX, els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic per als tres materials de blanc són inferiors al 20 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté DCX amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (PCX), els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic per als tres materials de blanc són inferiors al 5 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que presenta DCX amb un valor que correspon al límit de quantificació.

2.9.4. Capacitat de detecció: límit de detecció i quantificació

Per estimar el límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LOQ), el material de calibratge amb el valor més baix (calibrador 1; 10 $\mu\text{g/L}$) es dilueix 2 i 5 vegades amb una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol. Cada una de les

diferents solucions diluïdes, així com el material de calibratge 1 no diluït, són tractats de la mateixa manera que els materials de calibratge en matriu plasmàtica, obtenint-se, uns valors teòrics de 4,0, 2,0 i 0,8 µg/L. Aquestes solucions es processen 15 vegades en un únic dia, així com 15 vegades durant 30 dies utilitzant una única sèrie per dia.

La guia C50-A del CLSI-IFCC (24) defineix el LOD com el valor mesurat mínim d'una magnitud biològica al qual la relació senyal/soroll o *S/N* (acrònim de l'anglès *signal-to-noise*) és ≥ 3 . Per altra banda, defineix el LOQ com el valor mesurat mínim d'una magnitud biològica que es pot estimar amb una imprecisió acceptable (coeficient de variació $\leq 20\%$) i que presenta una *S/N* ≥ 10 .

2.9.5. Interval de mesura (linealitat)

Seguint els criteris de l'EMA (25) i del CLSI EP6-A (26), per a l'estudi de la linealitat dins de l'interval de mesura, el material de calibratge amb el valor més elevat (calibrador 7; 2500 µg/L) es dilueix amb una solució 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en metanol en les proporcions 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 i 0:4. Aquestes solucions diluïdes són tractades de la mateixa manera que els materials de calibratge en matriu plasmàtica, obtenint-se, uns valors teòrics de 1000, 750, 500, 250 i 0,0 µg/L.

Es processen, aleatòriament, per triplicat i en un únic dia, les diferents solucions diluïdes. Per a cada una de les solucions, es calculen els coeficients de variació i la diferència relativa percentual entre els valors mesurats obtinguts i els seus corresponents valors teòrics. Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors de les imprecisions i de les diferències percentuals obtingudes han de ser $\leq 15\%$.

Posteriorment, es representen gràficament els valors mesurats obtinguts de les diferents solucions (eix d'ordenades, *y*) enfront als valors teòrics esperats (eix d'abscisses, *x*). Per considerar la linealitat de l'interval de mesura, s'apliquen els criteris de la guia CLSI EP6-A (26) utilitzant el programa informàtic Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, Regne Unit).

2.9.6. Imprecisió i biaix

Per estimar la imprecisió i el biaix es fan servir 4 mostres amb diferents valors de la magnitud farmacològica: un material de valor baix amb un valor corresponent al LOQ i els tres materials de control. Es calcula la imprecisió i el biaix mitjançant les fórmules:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$\delta_r (\%) = \frac{(\bar{x} - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on *CV*, *s*, \bar{x} , δ_r i μ són el coeficient de variació, la desviació estàndard, la mitjana aritmètica, el biaix relatiu i el valor convencional, respectivament. El valor convencional emprat correspon al valor teòric assignat mitjançant pesada.

Per al càlcul de la imprecisió i biaix intradiari es processen 15 vegades, en una única sèrie i en un mateix dia, els tres materials de control i el material de valor baix amb un valor corresponent al LOQ. Per altra banda, per al càlcul de la imprecisió i biaix interdiari, es processen les mateixes mostres 15 vegades, durant 30 dies, utilitzant una única sèrie per dia.

Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors del *CV* i δ_r obtinguts han de ser $\leq 15\%$ i $\leq 20\%$, per a la mostra de valor baix amb un valor corresponent al LOQ.

2.9.7. Eficiència del procés cromatogràfic: recuperació i efecte matriu

L'eficiència d'un procés cromatogràfic depèn de la pèrdua dels components d'interès durant el procés d'extracció de la mostra (recuperació) i de l'efecte combinat en el senyal analític que poden produir diferents substàncies al coeluir amb els components en estudi durant el procés d'ionització de la mostra (efecte matriu).

L'estudi de l'eficiència del procés cromatogràfic es realitza seguint els criteris del CLSI-IFCC (24), l'EMA (25) i el procediment emprat per Viswanathan *et al.* (27). Per dur-ho a terme, s'utilitzen tres tipus de mostres diferents amb un valor de 20, 200 i 600 µg/L en el cas del DCX i a un valor de 100 µg/L, en el cas del PCX. Per a cada un dels fàrmacs, aquests tres tipus de mostres són: solucions primàries de DCX o de PCX diluïdes en una solució 2 mM d'acetat d'amoni i àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en aigua/metanol (70/30 v/v); sis mostres de plasma de pacients diferents que no contenen cap dels fàrmacs i a les quals se'ls hi afegeix DCX o PCX després del procés d'extracció (Mostres B); i les mateixes 6 mostres a les quals se'ls hi afegeix DCX o PCX abans del procés d'extracció (Mostres C).

Emprant les àrees dels pics cromatogràfics obtingudes després de processar aleatòriament totes aquestes mostres, el percentatge de recuperació (RE) i d'efecte matriu (ME) per al DCX es calcula com:

$$RE_{DCX} (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees Mostres C})_{DCX}}{(\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{DCX}} \cdot 100$$

$$ME_{DCX} (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{DCX}}{(\text{Mitjana Àrees Mostres A})_{DCX}} \cdot 100$$

Seguint els criteris del CLSI-IFCC (24) i l'EMA (25), una vegada realitzats aquests càlculs, els valors dels percentatges de recuperació i d'efecte matriu obtinguts per al DCX han de ser independents dels valors de la magnitud en estudi (ha d'existir una diferència percentual màxima del 15 %) i reproduïbles (han de presentar un coeficient de variació $\leq 15\%$).

Per altra banda, per tal de conèixer si l'estàndard intern (PCX) és capaç de compensar la possible pèrdua del component en estudi—també anomenat *analit*—durant el procés d'extracció de la mostra i el possible efecte matriu ocasionat en la font d'ionització, es calcula el percentatge de recuperació normalitzat (n-RE) i el d'efecte matriu normalitzat (n-ME) utilitzant les següents fórmules:

$$n-RE (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees Mostres C})_{DCX} / (\text{Mitjana Àrees Mostres C})_{PCX}}{(\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{DCX} / (\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{PCX}} \cdot 100$$

$$n-ME (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{DCX} / (\text{Mitjana Àrees Mostres B})_{PCX}}{(\text{Mitjana Àrees Mostres A})_{DCX} / (\text{Mitjana Àrees Mostres A})_{PCX}} \cdot 100$$

A l'igual que per al cas del DCX, seguint els criteris del CLSI-IFCC (24) i l'EMA (25), una vegada realitzats aquests càlculs, els valors obtinguts dels percentatges de recuperació i d'efecte matriu normalitzats han de ser independents dels valors de la magnitud en estudi (ha d'existir una diferència percentual màxima del 15 %) i reproduïbles (han de presentar un coeficient de variació $\leq 15\%$).

2.9.8. Estabilitat

Seguint els criteris del CLSI-IFCC (24) i l'EMA (25), s'estudia l'estabilitat de la concentració de massa de DCX i de PCX en les solucions primàries, l'estabilitat de la concentració de massa de DCX en el plasma a curt i llarg termini, així com l'estabilitat de la

concentració de massa de DCX en l'extracte de les mostres de plasma que es troben dins del mostrejador del sistema cromatogràfic.

Les mostres utilitzades, el número de vegades que aquestes són processades seguint un ordre aleatori, les condicions d'emmagatzematge i els períodes de temps que es fan servir per a cada un dels estudis de l'estabilitat són:

- Solucions primàries de DCX i PCX, 10 vegades, (5 ± 3) °C i 1, 3 i 7 dies, per a l'estudi de l'estabilitat de les solucions primàries;
- Solucions primàries de DCX i PCX, 10 vegades, (-75 ± 3) °C i 6 mesos, per a l'estudi de l'estabilitat de les solucions primàries;
- Tres materials de control (20, 200 i 600 µg/L), 10 vegades, (5 ± 3) °C i 1, 3 i 7 dies, per a l'estudi de l'estabilitat a curt termini;
- Tres materials de control (20, 200 i 600 µg/L), 10 vegades, (-75 ± 3) °C i 6 mesos, per a l'estudi de l'estabilitat a llarg termini;
- Extractes dels tres materials de control (20, 200 i 600 µg/L), 10 vegades, (4 ± 1) °C i 6, 12 i 24 hores, per a l'estudi de l'estabilitat de l'extracte de les mostres dins del mostrejador del sistema cromatogràfic.

Per a cada estudi, s'avalua l'estabilitat calculant la diferència relativa percentual (*PD*) emprant la següent equació:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y}{Y} \right)$$

on X_i és cada un dels valors mesurats obtinguts en les diferents mostres utilitzades una vegada transcorregut el seu període d'emmagatzematge, Y és el valor teòric assignat i n és el nombre de vegades que s'han processat les mostres ($n = 10$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI-IFCC (24) i l'EMA (25), es considera que les magnituds són estables si la *PD* obtinguda està compresa entre ± 15 %.

3. Resultats i discussió

3.1. Desenvolupament del procediment de mesura cromatogràfic

En el desenvolupament del procediment de mesura cromatogràfic s'han combinat diverses fases mòbils i columnes d'UHPLC que ens ha permès optimitzar la resolució i eficàcia cromatogràfiques, així com obtenir uns pics cromatogràfics simètrics, unes relacions *S/N* elevades i un reduït temps de retenció. En referència a les fases mòbils, s'han estudiat diferents combinacions les quals estaven compostes d'aigua, per una banda, i de metanol o acetonitril com a solvent orgànic, per una altra. Totes aquestes fases mòbils s'han combinat amb acetat d'amoni (2 mM), amb 0,1 % d'àcid fòrmic (v/v) o amb ambdós additius. De totes les possibles combinacions, la que ha donat lloc a una major separació cromatogràfica i una major sensibilitat (metrològica) en el detector de l'espectròmetre de masses ha sigut la composta per aigua i metanol —ambdues amb acetat d'amoni i àcid fòrmic— i utilitzant una elució isocràtica (70 % metanol i 30 % aigua). En referència a les columnes d'UHPLC C_{18} en fase reversa, s'han avaluat dos tipus de columnes amb partícules híbrides amb ponts d'etilè o BEH (acrònim de l'anglès *Bridged Ethylene Hybrid*) les quals presenten una mateixa mida de partícula (1,7 µm) i diàmetre intern (2,1 mm) però diferent longitud (50 mm enfront 10 mm). La columna amb una longitud de 50 mm (Acquity UPLC® BEH 2,1 x 50 mm, 1,7 µm) va donar

lloc a temps de retenció més curts (0,62 min per al PCX i 0,73 min per al DCX) però pics cromatogràfics amples i amb formes asimètriques, probablement, per la proximitat dels pics al front d'elució. Així, la utilització de la columna Acquity UPLC® BEH 2,1 x 100 mm, en combinació amb les fases mòbils esmentades i treballant en la modalitat isocràtica, és la que ens ha permès obtenir una millor resolució i eficàcia cromatogràfiques.

En les condicions cromatogràfiques descrites, els temps de retenció per al DCX i al PCX són 1,92 i 1,76 min, respectivament (Figura 2). El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives i que inclou el temps de rentat del sistema cromatogràfic) és 3,5 minuts. El temps de processament per a 10 mostres, incloent el processament de materials de calibratge i de control així com el temps necessari per a la seva preparació, és inferior a 3 h.

Per altra banda, tots els paràmetres de l'espectròmetre de masses s'han optimitzat mitjançant la infusió directa, a un flux de 20 µL/min, d'una solució 10 mg/L de DCX i PCX en aigua/metanol (50:50 v/v) que conté 0,1 % (v/v) d'àcid acètic. Tant per al DCX com per al PCX, s'ha observat que la major sensibilitat metrològica s'obté quan s'utilitza la ionització mitjançant electroesprai en mode positiu (ESI+), sent els ions més abundants, els corresponents als adductes del fàrmac protonat [Fàrmac-H]⁺. La selecció dels ions monitoritzats (ions producte) s'ha realitzat estudiant els patrons de fragmentació dels ions precursors en la cèl·lula de col·lisió de l'espectròmetre de masses en tàndem. El DCX i el PCX es detecten treballant en la modalitat MRM, monitoritzant els ions precursors i els ions producte que proporcionen un major senyal analític. Per evitar errors en la identificació del DCX i del PCX, així com per confirmar l'absència d'altres components similars de la mostra que hagin pogut coeluir i contribuir falsament a la detecció d'aquests fàrmacs, s'han fet servir dues transicions MRM. Una transició és utilitzada per a la quantificació: 808,3→527,0 per al DCX i 854,3→569,0 per al PCX, i l'altra transició és emprada per a la confirmació: 808,3→509,0 i 854,3→509,0 per al DCX i PCX, respectivament.

En referència a la preparació i tractament de les mostres, tot i que una extracció líquid-líquid no és el procediment d'extracció més idoni per obtenir recuperacions acceptables i prevenir l'efecte matriu que es pot produir durant el procés d'ionització de les mostres, en el nostre cas, la utilització d'aquest tipus d'extracció utilitzant MTBE seguida d'una evaporació amb nitrogen de la fase orgànica i una reconstitució del residu obtingut, ens ha permès obtenir recuperacions i efectes matrius acceptables els quals han sigut similars als estudis prèviament publicats (11, 15, 19, 21).

3.2. Procediment de validació

3.2.1. Calibratge i sensibilitat metrològica

Totes les corbes de calibratge obtingudes durant el procediment de validació són lineals dins de l'interval (1,95-1000) µg/L. Un exemple d'equació obtinguda per a la corba de calibratge és $y = 0,115 \cdot x + 0,056$ (coeficient de determinació; $r^2 = 0,9983$). Les diferències percentuals relatives obtingudes, entre els valors de la concentració de DCX calculades i teòriques, estan compreses entre 2,8 i 7,7 % per a tots els materials de calibratge excepte per als materials amb valors propers al LOQ, on aquestes diferències es troben dins de l'interval (6,8-19,1) %. Per altra banda, els valors de sensibilitat metrològica estan compresos entre 0,101 i 0,132.

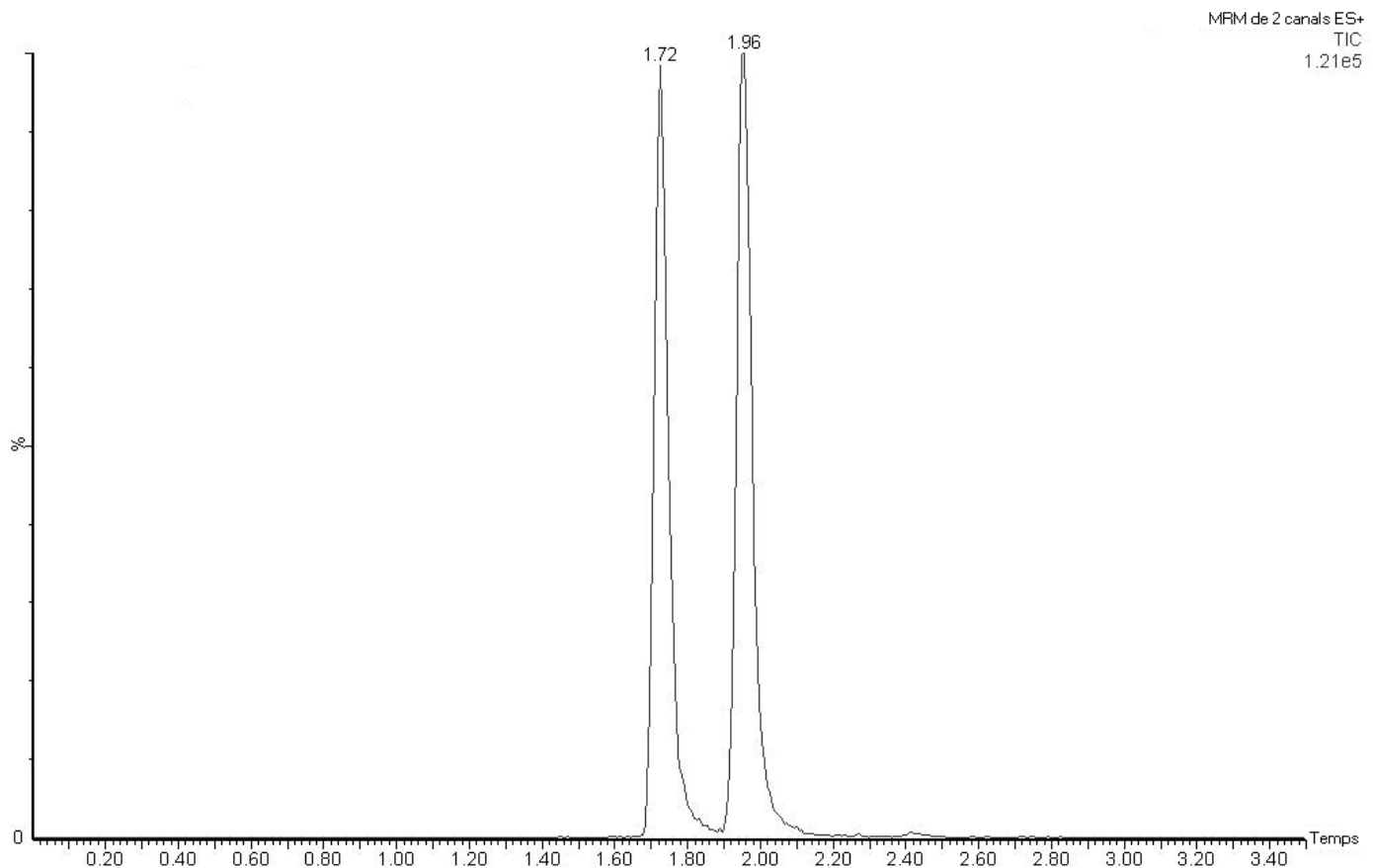


Figura 2. Cromatograma MRM representatiu obtingut en un pacient que presenta una concentració de massa de docetaxel en el plasma de 161,7 µg/L.

3.2.2. Selectivitat

Per a totes les mostres de pacients processades no s'observen cromatogrames amb pics interferents. En el temps de retenció del DCX, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són $\leq 1,8$ % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté DCX amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció del PCX, aquests valors d'àrea són $\leq 0,9$ %.

3.2.3. Contaminació per arrossegament o residualitat

No s'observa una contaminació per arrossegament. En el temps de retenció del DCX, per als tres materials de blanc, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són 5,9, 5,1 i 4,7 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté DCX amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció del PCX, aquests valors d'àrea són 3,8, 1,6 i 1,1 %.

3.2.4. Capacitat de detecció: límit de detecció i límit de quantificació

El LOD és 0,96 µg/L amb una relació S/N de 7,8, mentre que el LOQ és 1,95 µg/L ($S/N = 17,5$; $CV = 12,4$ %). El LOQ obtingut és similar o més baix que els reportats en altres estudis (10, 11, 13, 14, 16, 25).

3.2.5. Interval de mesura (linealitat)

L'interval de mesura és lineal entre (1,95–1000) µg/L ($y = 0,939 \cdot x + 15,4$; $r^2 = 0,9909$). Les diferències relatives percentuals entre els valors mesurats obtinguts i els seus corresponents valors

teòrics són $\leq 5,3$ %. Per altra banda, els diferents CV obtinguts són $\leq 13,7$ %.

3.2.6. Imprecisió i biaix

Els diferents valors d'imprecisió i biaix relatiu obtinguts es mostren a la Taula 1. El sistema de mesura cromatogràfic avaluat presenta imprecisions i biaixos relatius inferiors als requisits establerts per l'EMA (15 % i 20 % per a la mostra de valor baix amb un valor corresponent al LOQ). A més, els valors obtinguts per aquestes propietats metrollògiques són similars o millors que els observats en les publicacions ja existents (12, 15–18, 20, 24).

3.2.7. Eficiència del procés cromatogràfic: recuperació i efecte matriu

Els valors de RE, ME, n-RE i n-ME obtinguts es mostren a les Taules 2 i 3. La utilització del PCX com estàndard intern permet compensar la pèrdua de DCX durant el procés d'extracció de la mostra, amb independència de quin sigui el valor de la magnitud, i amb una imprecisió acceptable (≤ 15 %). Pel que fa als valors de ME, es pot observar que existeix una supressió iònica que es veu compensada per la utilització del PCX com a estàndard intern.

L'avaluació de l'efecte matriu és un dels estudis més importants que s'han de realitzar quan s'utilitzen sistemes de mesura cromatogràfics que presenten un espectròmetre de masses com a sistema de detecció, perquè l'existència d'un efecte matriu no compensat podria conduir a una manca d'exactitud de mesura dels valors mesurats obtinguts per a una magnitud en particular. Idealment, s'hauria de fer servir el propi analit marcat amb

isòtops estables com a estàndard intern, el qual permetria no només compensar el possible efecte matriu que es pogués ocasionar, sinó també compensar la pèrdua de l'analít durant el procés d'extracció de la mostra i les possibles fluctuacions del senyal del detector, així com confirmar que la separació cromatogràfica ha evolucionat correctament, entre altres. Tot i això, degut a que generalment aquests tipus d'estàndards interns són difícils d'aconseguir i el seu preu sol ser elevat, freqüentment es fan servir anàlegs estructurals que presenten propietats fisicoquímiques semblants a les de l'analít. Al nostre cas, al igual que altres autors (10, 12, 13, 16-18), s'utilitza el PCX—un taxà, com també ho és el DCX, que presenta unes propietats i estructura químiques similars a les del DCX— com a primera i única opció d'estàndard intern. Encara que en el nostre procediment cromatogràfic desenvolupat, el DCX i PCX no elueixen simultàniament, fet que podria portar a una falta de compensació de l'efecte matriu i d'altres característiques, els

resultats obtinguts posen de manifest que la selecció del PCX com a estàndard intern ha estat encertada.

3.2.8. Estabilitat

La concentració de massa de DCX en el plasma és estable 7 dies a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($PD \leq -13,1\%$) i 6 mesos a $(-75 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($PD \leq -5,9\%$). Per altra banda, dins del mostrejador del sistema cromatogràfic, la concentració de massa de DCX en l'extracte de les mostres de plasma és estable 24 hores a $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ ($PD \leq -9,7\%$). En les solucions primàries de DCX i PCX la seva concentració de massa és estable durant 7 dies si aquestes es conserven a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($PD \leq -11,9\%$ i $-10,8\%$ per al DCX i el PCX, respectivament) i 6 mesos a $(-75 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($PD \leq -6,9\%$ i $-7,2\%$ per al DCX i el PCX, respectivament). Els valors negatius dels PD indiquen una descomposició o degradació d'ambdós fàrmacs al llarg del temps.

Taula 1. Valors d'imprecisió i de biaix relatiu obtinguts per al sistema de mesura cromatogràfic basat en la UHPLC-MS/MS per a la concentració de massa de docetaxel en el plasma.

Valor teòric de la magnitud farmacològica ($\mu\text{g/L}$)	Intradiari ($n = 15$)			Interdiari ($n = 15$)		
	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	δ_r (%)	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	δ_r (%)
2,00 (LOQ)	$1,92 \pm 0,19$	10,0	-4,0	$1,95 \pm 0,24$	12,4	-2,5
20,0 (QC1)	$19,0 \pm 1,31$	6,9	-5,0	$18,0 \pm 1,51$	8,4	-10,0
200 (QC2)	$196 \pm 9,80$	5,0	-2,0	$192 \pm 11,7$	6,1	-4,0
600 (QC3)	$592 \pm 24,3$	4,1	-1,3	$589 \pm 30,0$	5,1	-1,8

n , nombre de mostres processades; \bar{x} , mitjana aritmètica; s , desviació estàndard; CV, coeficient de variació; δ_r , biaix relatiu; LOQ, límit de quantificació; QC1, Material de control 1; QC2, Material de control 2; QC3, Material de control 3.

Taula 2. Percentatges de recuperació i de recuperació normalitzats obtinguts per al sistema de mesura cromatogràfic basat en la UHPLC-MS/MS.

Valor teòric de la magnitud farmacològica (mg/L)	% RE	% n-RE
20,0	$79,4 \pm 9,6$	$91,2 \pm 8,9$
200	$83,1 \pm 8,2$	$95,4 \pm 8,7$
600	$81,5 \pm 6,2$	$93,5 \pm 6,5$
\bar{x} global (%)	81,3	93,4
s global (%)	6,3	7,8
CV global (%)	7,8	8,4

% RE, percentatge de recuperació; % n-RE, percentatge de recuperació normalitzat; \bar{x} , mitjana aritmètica; s , desviació estàndard; CV, coeficient de variació.

Taula 3. Percentatges d'efecte matriu i d'efecte matriu normalitzats obtinguts per al sistema de mesura cromatogràfic basat en la UHPLC-MS/MS.

Mostra	ME (%)			n-ME (%)		
	20,0 µg/L	200 µg/L	600 µg/L	20,0 µg/L	200 µg/L	600 µg/L
Plasma 1	84,3	93,4	96,5	94,2	96,7	99,0
Plasma 2	77,3	88,6	92,2	96,6	100,5	98,2
Plasma 3	83,4	85,9	87,6	94,6	97,7	95,1
Plasma 4	88,2	92,7	94,4	94,0	97,2	99,0
Plasma 5	69,8	77,6	85,5	90,5	88,2	94,5
Plasma 6	74,2	81,1	83,3	87,8	91,7	93,9
\bar{x} (%)	79,5	86,6	89,9	93,0	95,3	96,6
<i>s</i> (%)	6,9	6,3	5,2	3,2	4,5	2,4
CV (%)	8,7	7,3	5,8	3,4	4,7	2,4
\bar{x} global (%)		85,3			95,0	
<i>s</i> global (%)		7,3			3,6	
CV global (%)		8,6			3,8	

ME, percentatge d'efecte matriu; n-ME, percentatge d'efecte matriu normalitzat; \bar{x} , mitjana aritmètica; *s*, desviació estàndard; CV, coeficient de variació.

4. Conclusions

En aquest treball es desenvolupa un procediment de mesura i es valida un sistema de mesura basat en la UHPLC-MS/MS que permet el mesurament de la concentració de massa de DCX en el plasma. Tenint en compte el temps d'anàlisi i les propietats metrològiques del sistema validat, aquest podria ser útil per a la monitorització farmacoterapèutica de DCX en diferents tipus de pacients, particularment, en pacients amb càncer que reben quimioteràpia neoadjuvant, possibilitant una millor comprensió de l'eficàcia d'aquest fàrmac.

5. Bibliografia

- Baker SD, Sparreboom A, Verweij J. Clinical pharmacokinetics of docetaxel: recent developments. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:235–52.
- Bruno R, Vivier N, Vergniol JC, De Phillips SL, Montay G, Sheiner LB. A population pharmacokinetic model for docetaxel (Taxotere): model building and validation. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996;24:153–72.
- Bruno R, Vivier N, Veyrat-Follet C, Montay G, Rhodes GR. Population pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. *Invest New Drugs* 2001;19:163–9.
- Minami H, Kawada K, Sasaki Y, Igarashi T, Saeki T, Tahara M, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of protein-unbound docetaxel in cancer patients. *Cancer Sci* 2006;97:235–41.
- Zuffa López L, Aldaz Pastor A, Aramendia Beitia LM, Arrobas Velilla J, Giraldez Deiró J. Determination of docetaxel and paclitaxel in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application to clinical pharmacokinetic studies. *Ther Drug Monit* 2006;28:199–205.
- Andersen A, Warren DJ, Brunsvig PF, Aamdal S, Kristensen GB, Olsen H. High sensitivity assays for docetaxel and paclitaxel in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. *BMC Clin Pharmacol* 2006;6:1–10.
- Ciccolini J, Catalin J, Blachon MF, Duran A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of docetaxel (Taxotere) in plasma using liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;759:299–306.
- Garg MB, Ackland SP. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for the determination of docetaxel in human plasma or urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:383–8.
- Richheimer SL, Tinnermeier DM, Timmons DW. High-performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal Chem* 1992;64:2323–6.
- Gao S, Zhou J, Zhang F, Miao H, Yun Y, Feng J, *et al.* Rapid and sensitive liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the analysis of paclitaxel, docetaxel, vinblastine, and vinorelbine in human plasma. *Ther Drug Monit* 2014;36:394–400.
- Navarrete A, Martínez-Alcázar MP, Durán I, Calvo E, Valenzuela B, Barbas C, *et al.* Simultaneous online SPE-HPLC-MS/MS analysis of docetaxel, temsirolimus and sirolimus in whole blood and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;921–922:35–42.
- Hendrikx JJ, Dubbelman AC, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JH, Beijnen JH. Quantification of docetaxel and its metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013;27:1925–34.
- Du P, Li N, Wang H, Yang S, Song Y, Han X, *et al.* Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of total docetaxel from a lipid microsphere formulation in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;926:101–7.

14. Yamaguchi H, Fujikawa A, Ito H, Tanaka N, Furugen A, Miyamori K, *et al.* A rapid and sensitive LC/ESI-MS/MS method for quantitative analysis of docetaxel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;893–894:157–61.
15. Corona G, Elia C, Casetta B, Frustaci S, Toffoli G. High-throughput plasma docetaxel quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2011;412:358–65.
16. Mortier KA, Renard V, Verstraete AG, Van Gussem A, Van Belle S, Lambert WE. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid. *Anal Chem* 2005;77:4677–83.
17. Guitton J, Cohen S, Tranchand B, Vignal B, Droz JP, Guillaumont M, *et al.* Quantification of docetaxel and its main metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:2419–26.
18. Kuppens IELM, van Maanen MJ, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH. Quantitative analysis of docetaxel in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2005;19:355–361.
19. Grozav AG, Hutson TE, Zhoua X, Bukowski RM, Ganapathi R, Xua Y. Rapid analysis of docetaxel in human plasma by tandem mass spectrometry with on-line sample extraction. *J Pharm Biomed Anal* 2004;36: 125–31.
20. Baker SD, Zhao M, He P, Carducci MA, Verweij J, Sparreboom A. Simultaneous analysis of docetaxel and the formulation vehicle polysorbate 80 in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2004;324:276–84.
21. Parise RA, Ramanathan RK, Zamboni WC, Egorin MJ. Sensitive liquid chromatography–mass spectrometry assay for quantitation of docetaxel and paclitaxel in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;789:231–6.
22. Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;825:134–43.
23. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of Application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006;68:908–18.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Mass spectrometry in the clinical laboratory: General principles and guidance. C50-A. Wayne, PA: CLSI-IFCC, 2007.
25. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation, London. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London: EMA, 2011. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. (Consultat: 2015-03-15).
26. Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. EP6-A. Wayne, PA: CLSI, 2003.
27. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, *et al.* Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 2007;24:1962–73.