

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 meropenem en el plasma mitjançant cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem**

Raül Rigo Bonnin, Ariadna Arbiol Roca, José Manuel González de Aledo Castillo, 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 meropenem (Figura 1A) és un antibiòtic β -lactàmic àmpliament utilitzat en el tractament empíric de pacients crítics amb sèpsia que reben teràpia de reemplaçament renal continu (1). En aquest tipus de pacients, la farmacocinètica del meropenem (d'ara endavant MEM) és heterogènia i impredecible donades les característiques físico-patològiques diferencials que aquests pacients presenten respecte a altres poblacions (elevada variabilitat en els volums de distribució, eliminació, penetració i distribució del fàrmac als teixits, així com la presència d'hipoalbuminèmia i disfunció orgànica). Per aquest motiu, es recomana que els règims posològics en aquests pacients es basin en conceptes farmacocinètics (PK, acrònim de l'anglès *pharmacokinetic*) i farmacodinàmics (PD, acrònim de l'anglès *pharmacodynamic*) (1). Per al MEM, al tractar-se d'un antibiòtic temps-dependent¹, el paràmetre PK/PD que millor s'associa amb l'eficàcia del tractament i amb la prevenció de l'aparició de resistència bacteriana és el percentatge de temps durant el qual la concentració de l'antibiòtic en el plasma es manté per sobre de la concentració mínima inhibidora o CMI², calculat, bé sigui considerant el fàrmac unit i no unit a proteïnes o "total" (%T > CMI) o, únicament tenint en compte el fàrmac no unit a proteïnes o "lliure" (%fT > CMI) (1). Tot i això, actualment no estan clars quins han de ser els valors d'aquests paràmetres PK/PD. Mentre que alguns estudis suggereixen que els valors del %fT > CMI han d'estar compresos entre el 40 % i el 70 %, altres recomanen augmentar el %fT > CMI fins al 100 % o, fins i tot, que els valors de la concentració de MEM en el plasma es mantinguin entre quatre i cinc vegades per sobre de la CMI (2, 3).

La possibilitat d'ajustar la dosi de MEM a partir dels valors obtinguts del mesurament de la concentració d'aquest fàrmac en el plasma, podria suposar un avenç important en el tractament de les infeccions greus en els pacients crítics.

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 (4-10), 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*) (11-15). No obstant això, alguns d'aquests procediments presenten una sèrie de limitacions o inconvenients. Pel que fa a la capacitat de detecció, la majoria d'ells reporten límits de quantificació per sobre de 2 mg/L, valors, que podrien ser insuficients per dur a terme estudis dels paràmetres PK/PD de MEM.

¹ Antibiòtic temps-dependent: antibiòtic on la seva acció bactericida està relacionada amb el temps durant el qual la seva concentració en el plasma excedeix la concentració mínima bactericida o CMB.

Concentració bactericida mínima o CMB: concentració mínima d'un antibiòtic que, en un període de temps predeterminat, és capaç d'induir la mort *in vitro* del 99,9 % d'una població bacteriana prèviament estandarditzada.

² Concentració mínima inhibidora o CMI: concentració mínima d'un antibiòtic que, en un període de temps predeterminat, és capaç d'inhibir el creixement *in vitro* d'un inòcul bacterià prèviament estandarditzat.

Per altra banda, en alguns casos, s'utilitzen procediments de preparació de la mostra basats en l'extracció en fase sòlida o en l'extracció líquid-líquid, els quals, tot i que permeten disminuir la majoria de components de la mostra i donen lloc a extractes més "nets", són laboriosos i cars. A més, alguns dels procediments publicats, presenten un temps d'anàlisi per mostra relativament elevat (entre 4 i 20 min).

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un procediment de mesura ràpid així com validar un sistema basat en la cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UHPLC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem, per al mesurament de la concentració de massa de MEM en el plasma.

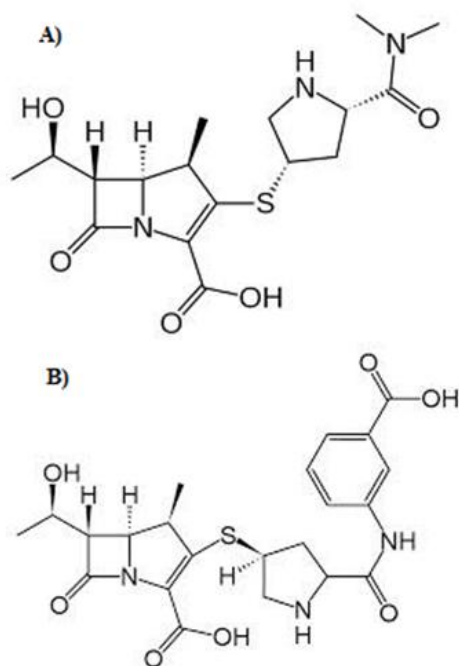


Figura 1. Estructura química de (A) meropenem i (B) ertapenem (estàndard intern).

2. Material i mètodes

2.1. Productes químics

El MEM que es fa servir per a la preparació de materials de calibratge i de control és subministrat per Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Alemanya). L'ertapenem (Figura 1B), que s'empra com a estàndard intern, és proveït per Merck Sharp & Dohme Corp. (Darmstadt, Alemanya).

L'aigua de qualitat HPLC-MS és proporcionada per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya). Per altra banda, altres productes com l'acetonitril, el metanol i l'àcid fòrmic, 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 MEM o ertapenem (d'ara endavant ETM). Aquestes mostres s'obtenen mitjançant punció venosa i es recullen en tubs de plasma amb heparina de liti (Vacuette, Kremsmünster, Àustria). Posteriorment, les mostres se centrifuguen a 1200 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 3 hores a (2-8) °C fins a la seva utilització.

2.3. Materials de calibratge, materials de control i solució de treball de l'estàndard intern

A partir de mesures de massa diferents, es preparen dues solucions primàries de MEM (2,0 g/L en aigua), una per als materials de calibratge i una altra per als materials de control. Seguidament, s'elaboren diferents solucions aquoses secundàries (vuit per als materials de calibratge i tres per als materials de control) que presenten 10 vegades el valor teòric dels materials de calibratge i de control que es faran servir. Els materials de calibratge (0,0, 5,0, 10, 25, 50, 75, 100 i 150 mg/L) i els materials de control (1,0, 30 i 90 mg/L) es preparen afegint 1 part de volum de la corresponent solució secundària realitzada anteriorment sobre 9 parts de volum de material de blanc (dilució 1/10). Els materials elaborats són emmagatzemats a -80 °C en alíquotes de 100 µL.

Per a la preparació de la solució de treball de l'estàndard intern (30 mg/L d'ETM), s'elabora una solució primària d'ETM 2,0 g/L en aigua i es realitza una dilució de la mateixa, emprant acetonitril com a dissolvent.

2.4. Preparació i tractament de les mostres

La preparació i el tractament de les mostres consisteix en una precipitació de proteïnes seguida d'una dilució final de l'eluat obtingut.

En un tub tipus Eppendorf d'1,5 mL, s'afegeixen 50 µL de calibrador, control o mostra de plasma i 200 µL de la solució de treball d'estàndard intern (30 mg/L d'ETM en acetonitril). La mescla s'agita en un vòrtex durant 2 minuts i, posteriorment, el tub se centrifuga durant 10 min a 13000 g a temperatura ambient. Finalment, 100 µL del sobrenedant es dilueixen amb 900 µL d'una solució d'àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en aigua, s'agita la solució durant 5 segons i s'afegeix el contingut a un vial cromatogràfic de vidre específic per al seu processament.

2.5. Sistema de mesura

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

2.6. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels components de la mostra es porta a terme a 40 °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 d'àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en aigua (fase mòbil A) i per una solució d'àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en acetonitril (fase mòbil B). El flux aplicat es manté a 0,4 mL/min i s'utilitza un gradient d'elució lineal. Del minut 0,0 al 0,7 es realitza una elució isocràtica amb una composició de la fase mòbil A del 95 %. Seguidament, entre els minuts 0,7 i 1,8, la composició de la fase mòbil A decreix gradualment del 95 % al 45 % (gradient lineal). Finalment, es reequilibra la columna analítica durant un 1,2 min emprant la composició inicial de la fase mòbil A (95 %). Les mostres extretes es mantenen a (4 ± 1) °C a l'interior del mostrejador. El volum d'injecció de la mostra és de 10 µL en un bucle de 50 µL treballant en la modalitat d'injecció parcial amb l'agulla sobreexida.

2.7. Condicions de l'espectròmetre de masses

S'utilitza la ionització mitjançant electroesprai en mode positiu (ESI+). Per al MEM i l'ETM, 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 MEM i l'ETM 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*): MEM, 384,2→141,0 (transició utilitzada per a la quantificació) i 384,2→340,1 (transició emprada per a la confirmació); ETM, 476,2→346,0 (transició per a la quantificació) i 476,2→432,1 (transició per a la confirmació). Per a cada un dels fàrmacs en estudi, seguint els criteris de la guia C50-A (16) 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 40 ms. El potencial de capil·laritat és 1,2 kV, la temperatura de la font d'ionització és 140 °C i s'utilitza una temperatura del gas de desolvatació de 350 °C. Els fluxos del gas de desolvatació i del gas de col·lisió són 800 L/h i 0,20 mL/min, respectivament. Els potencials de con aplicats són 25 V per al MEM i l'ETM, mentre que les energies de col·lisió emprades per ambdós fàrmacs són 15 eV per a les transicions de quantificació i 12 eV per a les transicions de confirmació.

2.8. 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 (16-18).

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.

2.8.1. Calibratge i sensibilitat metrològica

Cada vegada que es realitzen mesuraments de la magnitud farmacològica en estudi es processen els vuit 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 MEM 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, 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_{MEM} / A_{ETM})· C_{ETM} (eix d'ordenades, *y*) enfront als valors de la concentració de MEM (eix d'abscisses, *x*); sent A_{MEM} , l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic del MEM; A_{ETM} , l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de l'ETM (estàndard intern); i C_{ETM} , el valor de la concentració d'ETM 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 (18), per als materials de calibratge, les diferències percentuals relatives entre els valors de la concentració de MEM calculades i teòriques han d'estar compreses entre ± 15 % i entre ± 20 % a valors propers al límit de quantificació.

2.8.2. Selectivitat

Per a l'estudi de la selectivitat es processen 13 mostres de pacients que no estan en tractament amb MEM o ETM però sí que prenen, de manera individual o combinada, altres antibiòtics com penicil·lines (amoxicil·lina i piperacil·lina), cefalosporines (cefuroxima, cefepima i ceftriaxona) o inhibidors de la β-lactamasa (àcid clavulànic i tazobactam). Tres pacients estan en tractament amb amoxicil·lina/àcid clavulànic; tres amb piperacil·lina/tazobactam; tres amb ceftriaxona; tres amb cefepima i un amb cefuroxima. Tots els pacients presenten uns valors de la concentració d'antibiòtic en el plasma per sobre de la CMI del patogen en qüestió.

Seguint els criteris de l'EMA (18), es considera que els diferents antibiòtics no interfereixen en el mesurament de la magnitud farmacològica quan:

- En el temps de retenció del MEM, 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 MEM amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (ETM), 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 MEM amb un valor que correspon al límit de quantificació.

2.8.3. 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 MEM amb un valor que correspon al límit de quantificació (LOQ), tres materials de blanc (calibrador 0; 0 mg/L) i un material de valor elevat (calibrador 8; 150 mg/L) seguint l'ordre següent: LOQ – Calibrador 8 – Calibrador 0 – Calibrador 0 – Calibrador 0.

Seguint els criteris de l'EMA (18), es considera que no existeix contaminació per arrossegament quan:

- En el temps de retenció del MEM, 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 MEM amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (ETM), 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 MEM amb un valor que correspon al límit de quantificació.

2.8.4. Capacitat de detecció: límit de detecció i quantificació

Per estimar el límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LOQ), un material de valor baix (calibrador 1; 5 mg/L) es dilueix 5, 10 i 20 vegades amb un material de blanc (calibrador 0; 0 mg/L). Cada una de les diferents solucions diluïdes es processa 20 vegades en un únic dia, així com 20 vegades durant 35 dies utilitzant una única sèrie per dia.

La guia C50-A del CLSI-IFCC (16) 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 ≤ 20 %) i que presenta una *S/N* ≥ 10.

2.8.5. Interval de mesura (linealitat)

Seguint els criteris del CLSI EP6-A (17) i de l'EMA (18), per a l'estudi de la linealitat de l'interval de mesura, un material de valor elevat (calibrador 8; 150 mg/L) es dilueix amb un material de blanc (calibrador 0; 0 mg/L) en les proporcions 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 i 0:4, per aconseguir uns valors teòrics de 150, 112,5, 75, 37,5 i 0 mg/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 (18), 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 (17) utilitzant el programa informàtic Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, Regne Unit).

2.8.6. 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 (1,0, 30 i 90 mg/L). 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 20 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 20 vegades, durant 35 dies, utilitzant una única sèrie per dia.

Seguint els criteris de l'EMA (18), 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.

2.8.7. 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 (16), l'EMA (18) i el procediment emprat per Viswanathan *et al.* (19). Per dur-ho a terme, s'utilitzen tres tipus de mostres diferents amb un valor de 1,0, 30 i 90 mg/L en el cas del MEM i a un valor de 30 mg/L, en el cas de l'ETM. Per a cada un dels fàrmacs, aquests tres tipus de mostres són: solucions primàries de MEM o d'ETM diluïdes en la fase mòbil A (Mostres A); sis mostres de plasma de pacients diferents que no contenen cap dels fàrmacs i a les que se'ls hi

afegeix MEM o ETM després del procés d'extracció (Mostres B); i les mateixes 6 mostres a les quals se'ls hi afegeix MEM o ETM 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 MEM es calcula com:

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

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

Seguint els criteris del CLSI-IFCC (16) i l'EMA (18), una vegada realitzats aquests càlculs, els valors dels percentatges de recuperació i d'efecte matriu obtinguts per al MEM 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 (ETM) 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:

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

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

A l'igual que per al cas del MEM, seguint els criteris del CLSI-IFCC (16) i l'EMA (18), 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 $\leq 15\%$).

2.8.8. Estabilitat

Seguint els criteris del CLSI-IFCC (16) i l'EMA (18), s'estudia l'estabilitat de la concentració de massa de MEM i d'ETM en les solucions primàries, l'estabilitat de la concentració de massa de MEM en el plasma a curt i llarg termini, així com l'estabilitat de la concentració de massa de MEM 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 MEM i ETM, 10 vegades, $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ i 2, 5 i 7 dies, per a l'estudi de l'estabilitat de les solucions primàries;
- Tres materials de control (1,0, 30 i 90 mg/L), 10 vegades, $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ i 2, 5 i 7 dies, per a l'estudi de l'estabilitat a curt termini;
- Tres materials de control (1,0, 30 i 90 mg/L), 10 vegades, $(-75 \pm 3)^\circ\text{C}$ i 6 mesos, per a l'estudi de l'estabilitat a llarg termini;

- Extractes dels tres materials de control (1,0, 30 i 90 mg/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:

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

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 (16) i l'EMA (18), es considera que les magnituds són estables si la *PD* obtinguda està compresa entre $\pm 15\%$.

3. Resultats i discussió

3.1. Condicions cromatogràfiques

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 avaluades, la utilització d'aigua conjuntament amb acetonitril en lloc de metanol com a solvent orgànic de la fase mòbil, ha donat lloc a una major separació cromatogràfica i una major sensibilitat (metrològica) en el detector de l'espectròmetre de masses. Per altra banda, el fet d'afegir àcid fòrmic —en una proporció de volums del 0,1 %— en lloc d'acetat o format d'amoni (a diferents concentracions) ha produït un increment del senyal analític en el detector com a conseqüència d'una disminució del soroll de fons. A més a més, per tal d'afavorir una millor resolució cromatogràfica entre els pics de MEM i d'ETM així com poder escurçar els temps cromatogràfics, s'ha fet servir un gradient d'elució lineal. En referència a les columnes d'UHPLC C_{18} en fase reversa avaluades (Acquity UPLC[®] BEH 2,1 x 50 mm, 1,7 μ m; Acquity UPLC[®] BEH 2,1 x 100 mm, 1,7 μ m; Acquity UPLC[®] HSS T3 2,1 x 50 mm, 1,8 μ m i Acquity UPLC[®] HSS T3 2,1 x 100 mm, 1,8 μ m; totes elles de Waters), la que empra partícules híbrides amb ponts d'etilè o BEH (acrònim de l'anglès *Bridged Ethylene Hybrid*) amb una longitud de 100 mm, en combinació amb les fases mòbils esmentades i treballant en la modalitat de gradient, és la que ens ha permès obtenir una millor resolució i eficàcia cromatogràfiques.

En les condicions cromatogràfiques descrites, els temps de retenció per al MEM i l'ETM són 1,05 i 1,09 min, respectivament (Figura 2). El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dues injeccions consecutives i que inclou el temps de rentat del sistema cromatogràfic) és 3,0 minuts. El temps de processament per a 10 mostres, incloent el de materials de calibratge i de control així com el temps necessari per a la seva preparació, és inferior a 1,5 h.

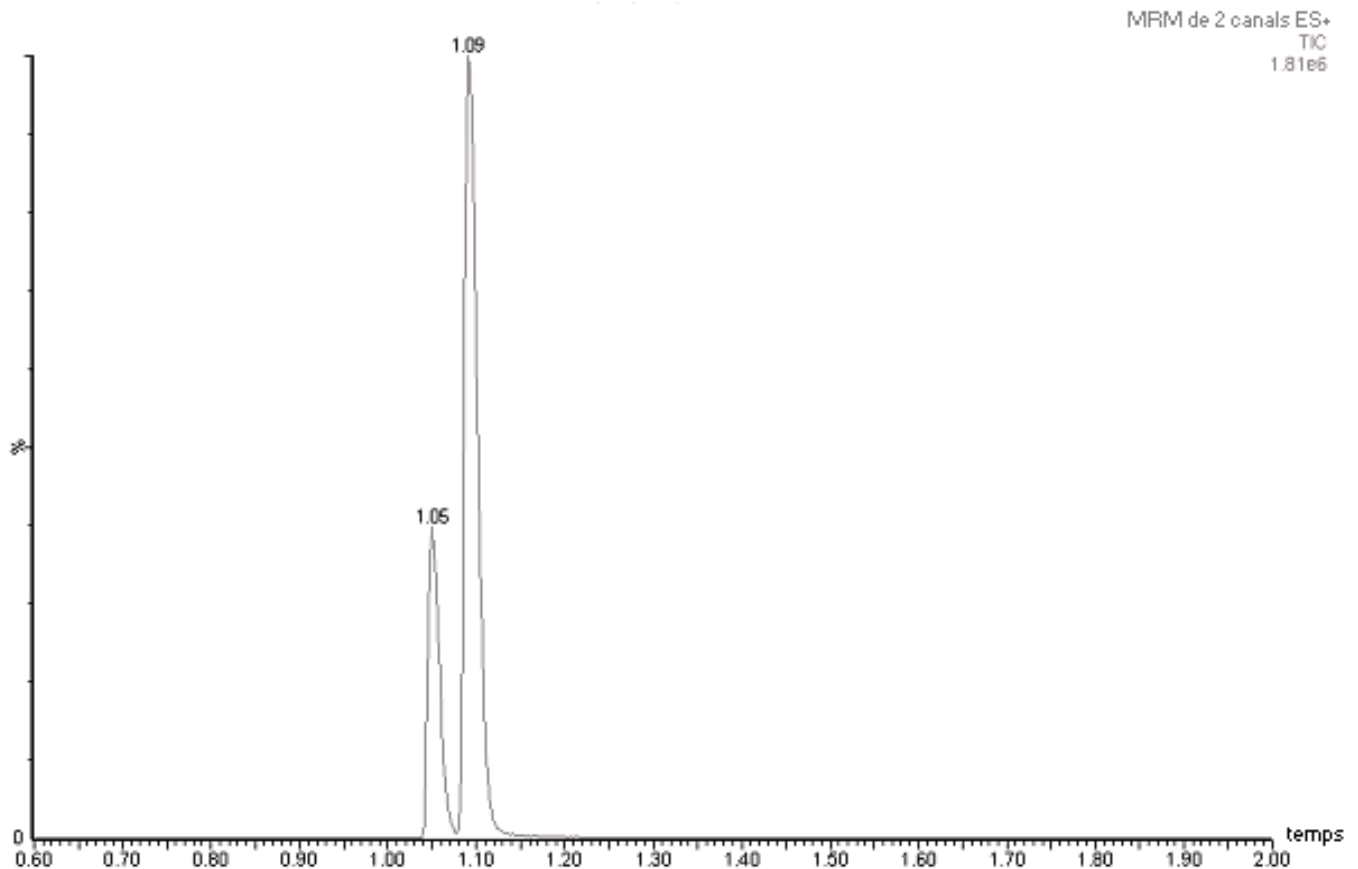


Figura 2. Cromatograma MRM representatiu obtingut en un pacient que presenta una concentració de massa de meropenem en el plasma de 8,0 mg/L.

3.2. Condicions de l'espectròmetre de masses

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 100 mg/L de MEM i d'ETM —s'han dissolt 1 mg de MEM i d'ETM en 10 mL d'una solució de 0,1 % (v/v) d'àcid fòrmic en aigua—. Tant per al MEM com per a l'ETM, 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 dut a terme estudiant els patrons de fragmentació dels ions precursors en la cèl·lula de col·lisió de l'espectròmetre de masses en tàndem. El MEM i l'ETM 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 MEM i de l'ETM, així com per confirmar l'absència d'altres components similars de la mostra que hagin pogut co-eluir i contribuir falsament a la detecció d'aquests fàrmacs, s'han fet servir dues transicions MRM. Una transició és utilitzada per a la quantificació: 384,2→141,0 per al MEM i 476,2→346,0 per a l'ETM, i l'altra transició és emprada per a la confirmació: 384,2→340,1 i 476,2→432,1 per al MEM i l'ETM, respectivament.

3.3. Preparació i tractament de les mostres

La precipitació de proteïnes no és el procediment de preparació de mostres més idoni per obtenir recuperacions acceptables i prevenir l'efecte matriu que es pot produir durant el procés d'ionització de les mostres. Tot i això, en el nostre treball, la combinació d'una precipitació de proteïnes amb acetonitril seguida d'una dilució subsegüent de l'extracte amb una solució 0,1 % (v/v) d'àcid fòrmic en aigua, ens ha permès, per una banda, obtenir recuperacions i efectes matrius acceptables i similars als publicats per altres autors (11-15) i, per una altra, simplificar altres procediments d'extracció descrits en la bibliografia (11, 13).

3.4. Procediment de validació

3.4.1. Calibratge i sensibilitat metrològica

Totes les corbes de calibratge obtingudes durant el procediment de validació són lineals dins de l'interval (5-150) mg/L. Un exemple d'equació obtinguda per a la corba de calibratge és $y = 0,086 \cdot x - 0,111$ (coeficient de determinació; $r^2 = 0,9932$). Les diferències percentuals relatives obtingudes, entre els valors de la concentració de MEM calculades i teòriques, estan compreses entre 0,9 i 5,9 % 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 (3,7-16,3) %. Per altra banda, els valors de sensibilitat metrològica estan compresos entre 0,082 i 0,088.

3.4.2. Selectivitat

Per a totes les mostres de pacients processades no s'observen cromatogrames amb pics interferents. En el temps de retenció del MEM, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són ≤ 3,6 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté MEM amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció de l'ETM, aquests valors d'àrea són ≤ 0,9 %.

3.4.3. Contaminació per arrossegament o residualitat

No s'observa una contaminació per arrossegament. En el temps de retenció del MEM, per als tres materials de blanc, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són 9,4, 8,1 i 8,7 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra

que conté MEM amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció de l'ETM, aquests valors d'àrea són 2,7, 1,9 i 2,6 %.

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

El LOD és 0,09 mg/L amb una relació S/N de 3,8, mentre que el LOQ és 0,27 mg/L (S/N = 11,5; CV = 17,2 %).

3.4.5. Interval de mesura (linealitat)

L'interval de mesura és lineal entre (0,27-150) mg/L ($y = 1,086 \cdot x - 4,883$; $r^2 = 0,9985$). Les diferències relatives percentuals entre els valors mesurats obtinguts i els seus corresponents valors teòrics són ≤ 9,9 %. Per altra banda, els diferents CV obtinguts són ≤ 14,1 %.

3.4.6. 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).

3.4.7. 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. Tot i que s'obtenen valors de RE relativament baixos, la utilització de l'ETM com estàndard intern permet compensar la pèrdua de MEM 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 la qual és compensada per la utilització de l'ETM 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'analit 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 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'analit. Al nostre cas, s'utilitza l'ETM —un carbaquè, al igual que el MEM, que presenta unes propietats i estructura químiques similars al del MEM— com a primera i única opció d'estàndard intern. Encara que en el nostre procediment cromatogràfic desenvolupat, el MEM i l'ETM 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 de l'ETM com a estàndard intern ha sigut encertada.

3.4.8. Estabilitat

La concentració de massa de MEM en el plasma és estable 5 dies a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ($PD \leq -12,9 \%$) i 6 mesos a $(-75 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ($PD \leq -7,2 \%$). Per altra banda, dins del mostrejador del sistema cromatogràfic, la concentració de massa de MEM en l'extracte de les mostres de plasma és estable 12 hores a $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ($PD \leq -12,2 \%$). En les solucions primàries de MEM i d'ETM la seva

concentració de massa és estable durant 5 dies si aquestes es conserven a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ($PD \leq -13,2\%$ i $-11,4\%$ per al MEM i l'ETM, 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 meropenem en el plasma.

Valor teòric de la magnitud farmacològica (mg/L)	Intradiari ($n = 20$)			Interdiari ($n = 20$)		
	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV (%)	δ_r (%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV (%)	δ_r (%)
0,25 (LOQ)	$0,25 \pm 0,041$	16,4	0,0	$0,27 \pm 0,047$	17,2	8,0
1,0 (QC1)	$1,10 \pm 0,13$	11,9	10,0	$0,96 \pm 0,15$	13,5	-4,0
30,0 (QC2)	$31,1 \pm 2,12$	6,8	3,7	$31,4 \pm 2,35$	7,5	4,6
90,0 (QC3)	$88,1 \pm 1,72$	1,9	-2,1	$86,7 \pm 3,98$	4,6	-3,6

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
1,0	$74,1 \pm 7,1$	$96,0 \pm 7,5$
30,0	$77,2 \pm 4,9$	$99,1 \pm 5,1$
90,0	$81,4 \pm 3,5$	$104,5 \pm 3,8$
\bar{x} global (%)	77,6	96,2
s global (%)	6,3	6,4
CV global (%)	8,1	6,7

% 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 (%)		
	1,0 mg/L	30 mg/L	90 mg/L	1,0 mg/L	30 mg/L	90 mg/L
Plasma 1	65,2	59,9	57,9	101,9	100,2	99,9
Plasma 2	52,7	55,5	51,4	98,6	84,0	89,6
Plasma 3	59,6	46,3	44,9	98,1	104,9	100,1
Plasma 4	66,2	64,6	65,5	89,6	98,4	94,3
Plasma 5	71,1	65,4	55,8	111,1	102,0	126,6
Plasma 6	58,2	52,1	50,2	88,1	87,1	85,1
\bar{x} (%)	62,2	57,3	54,3	97,9	96,1	97,0
<i>s</i> (%)	6,6	7,4	7,1	8,4	8,5	9,1
CV (%)	10,6	12,9	13,2	8,6	8,9	9,4
\bar{x} global (%)	57,9			97,8		
<i>s</i> global (%)	7,4			10,3		
CV global (%)	12,8			10,5		

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 MEM en el plasma. Tenint en compte el temps d'anàlisi i les propietats metrològiques del sistema validat, aquest podria ser útil per a la realització d'estudis PK/PD i per a la monitorització farmacoterapèutica de MEM en diferents tipus de pacients, particularment, en pacients crítics amb sèpsia que reben teràpia de reemplaçament renal continu, possibilitant una millor comprensió de l'eficàcia d'aquest fàrmac.

5. Bibliografia

- Nicolau DP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. *Clin Infect Dis* 2008;47(Suppl 1):32-40.
- Carlier M, Carrette S, Roberts JA, Stove V, Verstraete A, Hoste E, *et al.* Meropenem and piperacilline/tazobactam prescribing in critically ill patients: does augmented renal clearance affect pharmacokinetic/pharmacodynamic target attainment when extended infusions are used?. *Critical Care* 2013;17:R84. Disponible a: <<http://ccforum.com/content/pdf/cc12705.pdf>>. (Consultat: 2015-03-15).
- Wong G, Brinkman A, Benefield RJ, Carlier M, De Waele JJ, El Helali N, *et al.* An international multicentre survey of β -lactam antibiotic therapeutic drug monitoring practice in intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1416-23.
- Verdier M-C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 β -lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4873-9.
- McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JPJ. Analysis of 12 β -lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:2039-43.
- Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;864:161-7.
- Bilgrami I, Roberts JA, Wallis SC, Thomas J, Davis J, Fowler S, Goldrick PB, Lipman J. Meropenem dosing in critically ill patients with sepsis receiving high-volume continuous venovenous hemofiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2974-8.
- Isla A, Rodríguez-Gascón A, Trocóniz IF, Bueno L, Solinís MA, Maynar J, *et al.* Population pharmacokinetics of meropenem in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy. *Clin Pharmacokinet* 2008;47:173-80.
- Robatel C, Buclin T, Eckert P, Schaller MD, Biollaz J, Decosterd LA. Determination of meropenem in plasma and filtrate-dialysate from patients under continuous veno-venous haemodiafiltration by SPE-LC. *J Pharm Biomed Anal* 2002;29:17-33.
- Giles LJ, Jennings AC, Thomson AH, Creed G, Beale RJ, McLuckie A. Pharmacokinetics of meropenem in intensive care unit patients receiving continuous veno-venous hemofiltration or hemodiafiltration. *Crit Care Med* 2000;28:632-7.
- Colin P, De Bock L, T'jollin H, Boussery K, Van Bocxlaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify β -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013;103:285-93.

12. Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven β -lactam antibiotics and two β -lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:416-22.
13. Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, Ogura S, Itoh Y. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:1038-42.
14. Cohen-Wolkowicz M, White NR, Bridges A, Benjamin DK Jr, Kashuba AD. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of six antimicrobials in plasma for pharmacokinetic studies in premature infants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:3497-506.
15. Ahsman MJ, Wildschut ED, Tibboel D, Mathot RA. Microanalysis of beta-lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetic studies in neonates. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:75-80.
16. 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.
17. Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. EP6-A. Wayne, PA: CLSI, 2003.
18. 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).
19. 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.