

ORIGINAL

Desarrollo y validación de un procedimiento de medida para la medición simultánea de la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma mediante UHPLC-MS/MS



Raúl Rigo Bonnin* y Pedro Alía Ramos

Sección de Fármacos, Área de Bioquímica Especial, Laboratorio Clínico, Hospital Universitario de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona España

Recibido el 1 de agosto de 2016; aceptado el 16 de octubre de 2016

Disponible en Internet el 16 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Antibiótico;
Ceftazidima;
Meropenem;
Piperacilina;
UHPLC-MS/MS;
Validación

Resumen

Introducción: La ceftazidima, el meropenem y la piperacilina son antibióticos β -lactámicos de amplio espectro empleados en el tratamiento empírico de pacientes críticos con sepsis. Estos fármacos presentan una actividad antimicrobiana dependiente del tiempo por lo que sus concentraciones de masa en el plasma deberían medirse y mantenerse por encima de la concentración mínima inhibitoria. El objetivo de este estudio es desarrollar y validar un procedimiento de medida basado en la cromatografía de alta y rápida resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem para la medición simultánea de la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma.

Material y métodos: Después de una precipitación de proteínas de las muestras con acetoni-trilo y posterior dilución con agua, los eluatos son introducidos en una columna C_{18} de fase inversa usando un gradiente de agua/acetoni-trilo que contiene ácido fórmico. Los antibióticos son detectados mediante un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo trabajando en las modalidades de ionización por electroespray y monitorización de reacción múltiple.

Resultados: Los límites de cuantificación son cercanos a 0,50 mg/l. Los coeficientes de variación y sesgos relativos son inferiores a 10,8 y 12,0%, respectivamente. Los valores de recuperación están comprendidos entre 55,7 y 77,4%. La evaluación del efecto matriz muestra una sobreexpresión iónica para todos los antibióticos. No se observan interferencias ni contaminación por arrastre.

Conclusiones: El procedimiento de medida validado podría ser empleado en la práctica diaria del laboratorio clínico para la medición de estas magnitudes farmacológicas, principalmente en pacientes críticos con sepsis.

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: raul@bellvitgehospital.cat (R. Rigo Bonnin).

KEYWORDS

Antibiotic,
Ceftazidime,
Meropenem,
Piperacillin,
UHPLC-MS/MS,
Validation

Development and validation of a procedure for the simultaneous measurement of ceftazidime, meropenem and piperacillin mass concentration in plasma using UHPLC-MS/MS**Abstract**

Introduction: Ceftazidime, meropenem and piperacillin are broad spectrum antibiotics often used for the empirical treatment of infections in critically ill patients with sepsis. These antibiotics show time-dependent antimicrobial activity, meaning that the antibiotic mass concentration in plasma should be measured and maintained above the minimal inhibitory concentration. The aim of this study was to develop and to validate an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for the simultaneous measurement of ceftazidime, meropenem, and piperacillin mass concentration in plasma.

Material and methods: After protein precipitation with acetonitrile and subsequent dilution of the supernatant with water, eluates were introduced into a reverse-phase C₁₈ column using a water/methanol gradient containing formic acid. Antibiotics were detected by electrospray ionisation mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode.

Results: The lower limits of quantification were close to 0.50 mg/l. Coefficients of variation and absolute relative biases were less than 10.8 and 12.0%, respectively. Recovery values ranged from 55.7 to 77.4%. Evaluation of the matrix effect showed ion enhancement for all antibiotics. No interferences or carry-over were observed.

Conclusions: The validated measurement procedure could be used in daily clinical laboratory practice to measure the mass concentration of these antibiotics in plasma, and in critically ill patients with sepsis.

© 2016 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La ceftazidima (fig. 1A), el meropenem (fig. 1B) y la piperacilina (fig. 1C) son antibióticos β -lactámicos ampliamente utilizados en el tratamiento empírico de pacientes críticos con sepsis¹⁻³. En este tipo de pacientes, la farmacocinética de estos antibióticos es heterogénea e impredecible dadas las características físico-patológicas diferenciales que presentan respecto a otras poblaciones (elevada variabilidad en los volúmenes de distribución, eliminación, penetración y distribución del fármaco en los tejidos, así como la presencia de hipoalbuminemia y disfunción orgánica). Por este motivo, se recomienda que los regímenes posológicos en estos pacientes se basen en conceptos farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD). Para la ceftazidima (CFT), el meropenem (MEM) y la piperacilina (PIP), al tratarse de antibióticos dependientes del tiempo (con mínimo o nulo efecto postantibiótico), el parámetro PK/PD que mejor se asocia con la eficacia del tratamiento y con la prevención de la aparición de resistencia bacteriana es el porcentaje de tiempo durante el cual la concentración del antibiótico en el plasma se mantiene por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) ($\% T > CMI$ o $\% fT > CMI$)⁴⁻⁷. Sin embargo, actualmente no está claro cuáles han de ser los valores de estos parámetros PK/PD. Mientras que algunos estudios sugieren que estos valores deben estar comprendidos entre el 40 y el 70%, otros recomiendan aumentarlos hasta el 100% o, incluso, que los valores de la concentración del antibiótico en el plasma se mantengan entre cuatro y cinco veces por encima de la CMI⁴⁻⁷. La posibilidad de ajustar la dosis de estos antibióticos, a partir de los valores obtenidos mediante

la medición de sus concentraciones de masa en el plasma, podría suponer un avance importante en el tratamiento de las infecciones graves en los pacientes críticos.

En la actualidad, existen pocos trabajos publicados en los que se haya estudiado la medición simultánea de estas magnitudes farmacológicas mediante la cromatografía líquida de alta y rápida resolución (UHPLC) acoplada a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)⁸⁻¹². Tres de ellos⁹⁻¹¹ presentan tiempos cromatográficos relativamente elevados, y otros tres emplean tratamientos o preparación de la muestra que requieren tiempos considerables¹⁰⁻¹².

El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un procedimiento de medida para la medición simultánea de la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma basado en la UHPLC-MS/MS, que requiera un proceso de preparación de la muestra sencillo y práctico, así como un tiempo cromatográfico reducido.

Material y métodos**Reactivos químicos**

Para la preparación de los materiales de calibración y de control se emplean los materiales de referencia certificados *Ceftazidime CRS* (pureza del 85,3%), *Meropenem trihydrate CRS* (pureza del 87,0%) y *Piperacillin CRS* (pureza del 94,4%) de la Farmacopea Europea (European Directorate for the Quality of Medicines-Council of Europe, Estrasburgo, Francia). Como patrones internos (PI) se utilizan los fármacos deuterados D₅-Ceftazidima (PI para la CFT), D₆-Meropenem

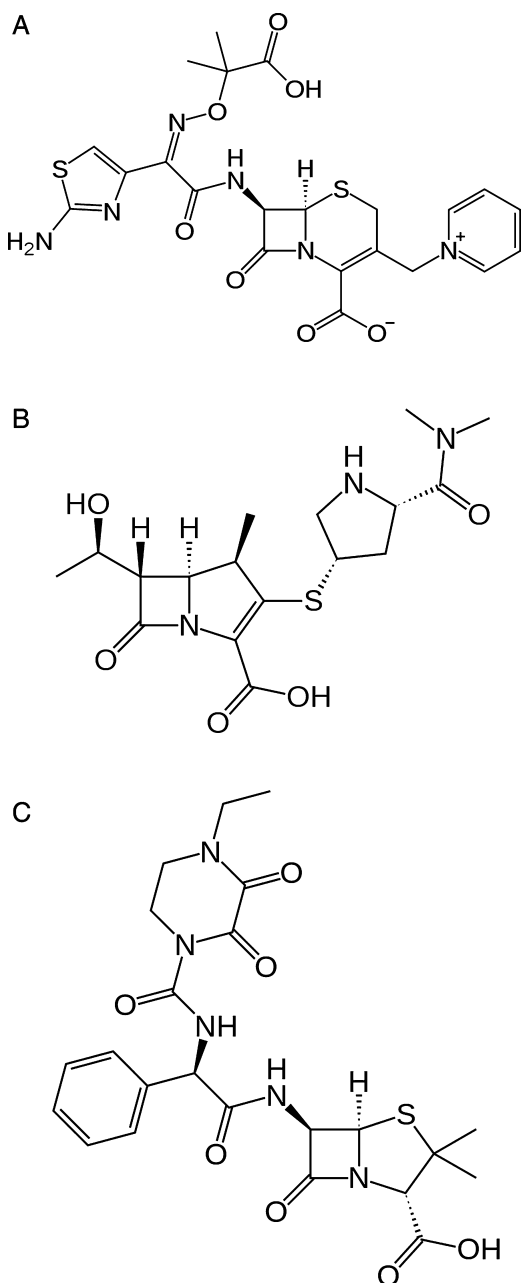


Fig. 1 Estructura química de: A) ceftazidima, B) meropenem y C) piperacilina.

(PI para el MEM) y D₅-Piperacilina (PI para la PIP), que se obtienen de la empresa Toronto Research Chemicals Inc (Ontario, Canadá). El acetonitrilo, el agua, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el ácido fórmico, todos ellos de calidad LC-MS, son proporcionados por Sigma-Aldrich S. A. (Madrid, España).

Preparación de soluciones primarias y soluciones de trabajo

Se preparan dos soluciones primarias de 2,0 g/l que contienen los fármacos en estudio, una para los materiales de calibración y otra para los materiales de control. Las soluciones primarias se obtienen pesando una cantidad apropiada

de cada material de referencia certificado, y disolviendo todos estos materiales en 20 mL de una solución compuesta por agua: metanol: DMSO (50:25:25, v/v/v). Seguidamente, se elaboran diferentes soluciones acuosas secundarias (9 para los materiales de calibración y 3 para los materiales de control) que presentan 10 veces el valor teórico de los materiales de calibración y de control que se emplearán en el estudio. Estas soluciones se almacenan a -80 °C en alícuotas de 50 µL en tubos tipo Eppendorf. En el momento del análisis, se preparan los materiales de calibración (0,0; 0,50; 1,00; 5,00; 15,0; 45,0; 75,0; 125 y 175 mg/l) y los materiales de control (3,00; 30,0 y 120 mg/l) añadiendo una parte de volumen de la correspondiente solución secundaria descrita anteriormente sobre 9 partes de volumen de un material de blanco (una mezcla de 30 muestras de plasmas de pacientes que no han ingerido ni se les ha suministrado ninguno de los fármacos en estudio).

Por otro lado, se preparan tres soluciones primarias, una para cada PI, diluyendo 1 mg del PI en 10 mL de un disolvente apropiado (DMSO, metanol o agua, de acuerdo con las instrucciones del certificado de análisis del fabricante). Estas soluciones se almacenan a -80 °C en alícuotas de 100 µL en tubos tipo Eppendorf. En el momento del análisis, y para 20 muestras, se prepara una solución de trabajo de PI añadiendo 100 µL de cada uno de los PI en 6 mL de acetonitrilo.

Preparación y tratamiento de las muestras

La preparación y tratamiento de las muestras consiste en una precipitación de proteínas seguida de una dilución acuosa del sobrenadante obtenido.

En un tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, se añaden 100 µL de cada calibrador, control o muestra de plasma de paciente y 300 µL de la solución de trabajo de PI. La mezcla se agita en un vórtex durante 3 min y, posteriormente, el tubo se centrifuga durante 10 min a 11.000 g a 4 °C. Finalmente, 100 µL del sobrenadante se diluyen con 400 µL de agua, se agita la solución durante 5 s y se añade el contenido en un vial cromatográfico específico para su procesamiento.

Sistema de medida

Se emplea un sistema de medida ACQUITY®-UPLC® acoplado a un espectrómetro de masas ACQUITY®-TQD®, ambos de Waters Cromatografía S. A. (Sant Cugat del Vallès, España).

Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica de los componentes de la muestra se realiza a 30 °C utilizando una columna analítica C₁₈ en fase reversa Acquity UPLC® BEH™ 2,1 × 100 mm; 1,7 µm, equipada con un filtro de 0,2 µm y una precolumna Acquity® UPLC® BEH™ C₁₈ VanGuard Pre-column (5 mm × 2,1 mm; 130 Å, 1,7 µm) (Waters Cromatografía S. A.). La fase móvil está compuesta por una solución de ácido fórmico 0,1% (v/v) en agua (fase móvil A) y una solución de ácido fórmico 0,1% (v/v) en acetonitrilo (fase móvil B). El flujo aplicado se mantiene a 0,4 mL/min durante todo el proceso cromatográfico. Del minuto 0,0 al 0,5 se

Tabla 1 Parámetros del espectrómetro de masas para la ceftazidima, el meropenem, la piperacilina y sus correspondientes patrones internos

Antibiótico	Tiempo de retención (min)	Transición para la cuantificación (<i>m/z</i>)	Transición para la confirmación (<i>m/z</i>)	Potenciales de cono (V)	Energías de colisión (eV)
Ceftazidima	1,11	546,9 > 467,9	546,9 > 166,9	20	12 (10 [*])
[D ₅]-Ceftazidima	1,11	551,9 > 467,9	-	20	12
Meropenem	1,12	384,0 > 141,0	384,0 > 254,0	25	15 (15 [*])
[D ₆]-Meropenem	1,12	390,0 > 147,0	-	25	15
Piperacilina	1,38	517,9 > 143,0	517,9 > 359,0	25	20 (15 [*])
[D ₅]-Piperacilina	1,38	522,9 > 148,0	-	25	20

ESI: electrospray ionization (ionización mediante electroespray); MRM: Multiple Reaction Monitoring (reacción de monitorización múltiple); *m/z*: relación masa-carga.

* Valores para la confirmación.

realiza una elución isocrática con una proporción de la fase móvil A del 98%. Seguidamente, entre los min 0,5 y 2,0, la proporción de la fase móvil A decrece gradualmente del 98 al 50% (gradiente lineal). Finalmente, se reequilibra la columna analítica durante 1,0 min empleando la proporción inicial de la fase móvil A (98%). Las muestras extraídas se mantienen a (4 ± 1) °C en el interior del muestreador y el volumen de inyección de muestra es de 10 µL.

Condiciones del espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas opera en las modalidades de ionización positiva mediante electroespray (ESI+) y de reacción de monitorización múltiple (MRM). Se utiliza nitrógeno como gas de nebulización y de desolvatación, y argón como gas de colisión. Para cada antibiótico, se emplean dos transiciones MRM: una para la cuantificación («quantifier») y otra para la identificación o confirmación («qualifier»). En cambio, para cada PI, se utiliza una única transición MRM. Las transiciones de MRM utilizadas, así como los potenciales de cono y las energías de colisión se muestran en la [tabla 1](#). Además, para todos los antibióticos y sus correspondientes PI, se emplean los siguientes valores de los parámetros del espectrómetro de masas: un potencial de capilaridad de 1,2 kV, un potencial de extracción de 3 V, un potencial de radiofrecuencia de 0,1 V, una temperatura de la fuente de ionización de 130 °C, una temperatura de desolvatación de 450 °C, un flujo de desolvatación de 800 L/h, un flujo del gas de colisión de 0,20 mL/min y un tiempo de integración («Dwell time») de 50 ms.

Validación

El procedimiento de desarrollo y validación está basado, principalmente, en la guía de la Agencia Europea del Medicamento (EMA)¹³ y en las recomendaciones del CLSI^{14,15}.

Procedimiento de calibración

Cada vez que se realizan mediciones de las magnitudes farmacológicas se procesan los nueve materiales de calibración y los tres materiales de control.

La integración de las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos suavizados y el cálculo de los valores de la concentración de masa de los antibióticos en el plasma se llevan a cabo mediante el programa informático TargetLynx®

v. 4.1 de Waters Cromatografía. Las curvas de calibración se obtienen mediante un ajuste lineal por ponderación 1/X, excluyendo la opción de forzar la intersección de la recta por la ordenada en el origen.

Selectividad

Para el estudio de la selectividad se procesan 10 muestras de pacientes que no están en tratamiento con los antibióticos en estudio pero sí con otros fármacos: antiepilépticos (fenitoína, lamotrigina, valproato), digoxina, micofenolato, u otros antibióticos (aztreonam, cefepina, cloxacilina, tobramicina, vancomicina). Todos los pacientes presentan unos valores de la concentración de masa del fármaco en el plasma dentro del intervalo terapéutico, o bien por encima de la concentración mínima inhibitoria del patógeno en cuestión.

Contaminación por arrastre

Para el estudio de la contaminación por arrastre se procesan, en una misma serie y en dos días distintos, una muestra con un valor elevado (calibrador 8; 175 mg/l) seguida de tres materiales de blanco (calibrador 0; 0 mg/l).

Límite de cuantificación

La EMA¹³ define el límite de cuantificación (LLOQ) como el mínimo valor de una magnitud que puede obtenerse con una imprecisión aceptable ($CV \leq 20\%$) y cuya relación señal/ruido (S/N) es ≥ 5 .

Para estimar el LLOQ, se diluye un material de valor bajo (calibrador 2; 1,00 mg/l) en una proporción 1:1 y en una proporción 1:4 con un material de blanco (calibrador 0; 0 mg/l). Cada una de las diferentes soluciones diluidas, así como el material sin diluir, se procesan 10 veces en un único día y 10 veces durante 20 días no consecutivos utilizando una única serie por día.

Imprecisión y sesgo

Para estimar la imprecisión y el sesgo se utilizan los tres materiales de control preparados anteriormente (3,0, 30 y 120 mg/l). Para el cálculo de la imprecisión y sesgo intraseries se procesan 10 veces, en una única serie y en un mismo día, los tres materiales de control. Por otra parte, para el cálculo de la imprecisión y sesgo interdiarios, se procesan las mismas muestras 10 veces, durante 20 días no consecutivos, utilizando una única serie por día. Los

valores convencionales empleados para estimar los sesgos corresponden a los valores asignados mediante pesada.

Eficiencia del proceso cromatográfico (recuperación y efecto matriz)

El estudio de la eficiencia del proceso cromatográfico está basado en la guía de la EMA¹³, en las recomendaciones del CLSI^{14,15} y en el procedimiento descrito por Viswanathan et al.¹⁶. Para llevarlo a cabo, se utilizan tres tipos de muestras diferentes a un valor de 3,00; 30,0 y 120 mg/l para cada antibiótico y a un valor de 2,0 mg/l, para los PI. Para cada uno de los antibióticos y PI, estos tres tipos de muestras son: soluciones primarias de CFT, MEM, PIP y de sus correspondientes PI diluidas con la fase móvil A (muestras A); seis muestras de plasma de pacientes diferentes que no contienen ninguno de los antibióticos y a las que se les añade CFT, MEM, PIP o PI después del proceso de extracción (muestras B); y las mismas 6 muestras a las que se les adiciona CFT, MEM, PIP o PI antes del proceso de extracción (muestras C).

A partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos después de procesar aleatoriamente todas estas muestras, el porcentaje de recuperación (RE) y del factor de efecto matriz (ME) para cada antibiótico se calculan como:

$$RE(\%) = \frac{(\text{Media áreas muestras C})}{(\text{Media áreas muestras B})} \cdot 100$$

$$ME(\%) = \frac{(\text{Media áreas muestras B})}{(\text{Media áreas muestras A})} \cdot 100$$

Así mismo, para conocer si los PI son capaces de compensar el posible efecto matriz ocasionado en la fuente de ionización, se calcula el porcentaje del factor de efecto matriz normalizado (n-ME) a partir de la siguiente fórmula:

$$n - ME(\%) = \frac{(\text{Media áreas muestras B}) / (\text{Media áreas muestras B})_{PI}}{(\text{Media áreas muestras A}) / (\text{Media áreas muestras A})_{PI}} \cdot 100$$

Estabilidad

Se lleva a cabo un estudio de la estabilidad a corto (a los 1, 3 y 7 días a $5 \pm 3^\circ\text{C}$) y a largo plazo (a los 6 meses a -80°C) empleando los materiales de control, y un estudio de la estabilidad en el muestreador (a las 6, 12 y 24 h a $4 \pm 1^\circ\text{C}$) utilizando los extractos de los materiales de control.

Para cada estudio y magnitud farmacológica, se procesan las distintas muestras 10 veces y se evalúa la estabilidad calculando la diferencia relativa porcentual (PD) utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde X_i es cada uno de los valores obtenidos para las diferentes muestras utilizadas una vez transcurrido el período de almacenamiento de las mismas, Y es el valor teórico asignado, y n es el número de veces que se han procesado las muestras ($n=10$, en nuestro caso).

Según la EMA, se considera que las magnitudes son estables si la PD obtenida está comprendida entre $\pm 15\%$.

Aplicación en muestras biológicas

El procedimiento basado en la UHPLC-MS/MS descrito está siendo empleado en un programa de optimización de la terapia antibiótica en pacientes críticos, que ha sido aprobado por el Comité de Ética de nuestro hospital y cumple con los requisitos de la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Pacientes

Se evalúa la aplicabilidad del procedimiento UHPLC-MS/MS procesando diferentes muestras de pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva de nuestro hospital. Estos pacientes sufren algún tipo de infección bacteriana grave y son tratados con alguno de los antibióticos incluidos en el presente estudio (tabla 2).

Administración antibiótica

De acuerdo con los criterios del clínico, la estrategia terapéutica consiste en la infusión continua de alguno de los antibióticos en estudio, previa administración de una dosis de carga (infusión durante 30 min) seguida de una dosis de mantenimiento (tabla 2). Asimismo, si a las 48 h del inicio del tratamiento los valores de las diferentes magnitudes farmacológicas eran superiores a 4 veces la CMI, la dosis del fármaco fue reducida según el criterio del clínico (tabla 2).

Recogida de la muestra

Las muestras de los pacientes se obtienen pasadas 24–48 h del inicio del tratamiento antibiótico para garantizar que la concentración del fármaco se encuentra en las condiciones de estado estacionario. Adicionalmente, se recogen muestras a las 24 h después de un cambio de dosis. Estas muestras se obtienen mediante punción venosa y se recogen en tubos de plasma que contienen heparina de litio (Vacuette S. A., Madrid). Seguidamente, son centrifugadas a 2.000 g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido es alicuotado y almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

Resultados y discusión

Condiciones cromatográficas

Durante el desarrollo del procedimiento de medida basado en la UHPLC-MS/MS se han combinado varias fases móviles y columnas específicas de UHPLC permitiendo optimizar la resolución y eficacia cromatográficas, así como obtener unos picos cromatográficos simétricos, unas relaciones S/N elevadas y unos tiempos de retención reducidos. En lo

Tabla 2 Información relacionada con pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Intensiva de nuestro hospital que presentan algún tipo de infección bacteriana

Paciente	Patógeno aislado causante de la infección	CMI (mg/L)	Antibiótico administrado	Días de tratamiento	Dosis/frecuencia inicial (g/h)	Concentración del antibiótico en el estado estacionario a las 48 h (mg/L)	Dosis/frecuencia a las 48 h (g/h)	Concentración del antibiótico en el estado estacionario a las 72 h (mg/L)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,0	Ceftazidima	5	4/24	72,2	3/24	44,7
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0	Meropenem	2	5/24	33,5	-	-
3	<i>Escherichia coli</i>	16,0	Piperacilina	3	12/24	99,7	11/24	76,2
4	<i>Proteus mirabilis</i>	< 1,0	Ceftazidima	3	6/24	54,2	4/24	20,0
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1,0	Meropenem	4	5/24	48,8	4/24	29,4
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0	Piperacilina	5	12/24	81,8	10/24	36,5

CMI: concentración mínima inhibitoria.

* El paciente fue exitus al segundo día del tratamiento.

concerniente a las fases móviles evaluadas, la utilización de agua conjuntamente con acetonitrilo en lugar de metanol como solvente orgánico, ha dado lugar a una mejor separación cromatográfica y una mayor sensibilidad (metrológica) en el espectrómetro de masas. Por otra parte, el hecho de añadir ácido fórmico –en una proporción de volumen de 0,1%– a las fases móviles en lugar de acetato o formiato de amonio (a diferentes concentraciones) ha producido un incremento de la señal analítica en el detector como consecuencia de la disminución del ruido de fondo. Respecto a las columnas de UHPLC estudiadas (Acquity UPLC® BEH 2,1 × 50 mm, 1,7 μm; Acquity UPLC® BEH 2,1 × 100 mm, 1,7 μm; Acquity UPLC® HSS T3 2,1 × 50 mm, 1,8 μm y Acquity UPLC® HSS T3 2,1 × 100 mm, 1,8 μm; todas ellas de Waters), la Acquity UPLC® BEH 2,1 × 100 mm, 1,7 μm, en combinación con las fases móviles mencionadas y trabajando en la modalidad de gradiente, es la que nos ha permitido obtener una mejor resolución y eficacia cromatográficas.

En las condiciones cromatográficas descritas, los tiempos de retención para la CFT, D₅-CFT, MEM, D₆-MEM, PIP y el D₅-PIP son 1,11; 1,11; 1,12; 1,12; 1,38 y 1,38 min, respectivamente (fig. 2). El tiempo de análisis es 3,5 min, inferior al obtenido en otros procedimientos previamente reportados⁹⁻¹¹.

Condiciones del espectrómetro de masas

Los parámetros del espectrómetro de masas se han optimizado mediante la infusión directa de los antibióticos y sus PI, a una concentración de 10 mg/L, en una solución de ácido fórmico 0,1% en agua: acetonitrilo (50:50 v/v) y a un flujo de 20 μL/min. Para cada fármaco, la utilización de la ionización mediante electrospray en modo positivo (ESI+) ha permitido obtener una mayor sensibilidad metrológica, siendo los iones precursores más abundantes los correspondientes a los aductos del fármaco protonado ([M-H]⁺). La selección de los iones producto se ha llevado a cabo estudiando los patrones de fragmentación de los iones precursores en la célula de colisión del espectrómetro de masas en tándem. Todos los fármacos se han detectado trabajando en la modalidad MRM, monitorizando los iones precursores y los iones producto que han presentado una mayor señal analítica. Para evitar errores en la identificación de los antibióticos estudiados, así como para confirmar la ausencia de otros componentes similares en la muestra que hayan podido coeluir y contribuir falsamente la detección de estos fármacos, se han empleado dos transiciones MRM: una para la cuantificación y otra para la confirmación (tabla 1).

Preparación y tratamiento de las muestras

Pese a que la precipitación de proteínas no es el procedimiento de preparación de muestras más idóneo para obtener recuperaciones aceptables y prevenir el efecto matriz que puede producirse durante el proceso de ionización de las muestras, en nuestro estudio, la combinación de una precipitación de proteínas con acetonitrilo seguida de una dilución subsiguiente del extracto con agua, simplifica el procedimiento de extracción publicado por otros autores⁴⁻¹⁶, y da lugar a valores de recuperación y efecto matriz aceptables (tabla 3).

Validación

Procedimiento de calibración

Todas las curvas de calibración obtenidas son lineales entre 0,5 mg/l y 175 mg/l. A modo de ejemplo, alguna de las ecuaciones de calibración obtenidas son: $y = 2,6485 \cdot x + 2,9698$ ($r^2 = 0,9944$) para CFT, $y = 0,1756 \cdot x + 0,1759$ ($r^2 = 0,9953$) para MEM) y $y = 0,3947 \cdot x + 0,1750$ ($r^2 = 0,9995$) para PIP. Las diferencias porcentuales relativas obtenidas, entre las concentraciones de masa de los antibióticos calculadas y teóricas, están comprendidas entre 1,5 y 15,0% para todos los materiales de calibración. Estos porcentajes cumplen con el criterio establecido por la EMA ($\pm 15\%$ y $\pm 20\%$ a valores cercanos al LLOQ).

Selectividad

De acuerdo con la EMA¹³, un procedimiento de medida debe ser capaz de diferenciar los componentes de interés y sus PI de potenciales interferentes que puedan existir en la muestra (por ejemplo, fármacos concomitantes). A diferencia de otros estudios publicados^{9,10,12}, se ha llevado a cabo un estudio de la selectividad procesando muestras de pacientes que están en tratamiento con otros fármacos. En nuestro caso, en ninguna de las muestras de pacientes procesadas se han obtenido picos interferentes en los tiempos de retención de la CFT, MEM, PIP y sus PI, indicando que el procedimiento de medida desarrollado presenta una adecuada selectividad.

Contaminación por arrastre

La guía de la EMA¹³ describe que, durante el desarrollo y validación de un procedimiento de medida, la contaminación por arrastre –si es que existe– debe eliminarse o, en su defecto, minimizarse. En contraste con la bibliografía publicada⁹⁻¹², se ha realizado un estudio de la contaminación por arrastre. En nuestro caso, en los tres materiales de blanco procesados, no se han obtenido picos cromatográficos en los tiempos de retención de la CFT, MEM, PIP y sus PI, por lo que se puede descartar la existencia de una contaminación por arrastre.

Límite de cuantificación

Los LLOQ intraserials obtenidos son 0,55 mg/l ($CV = 15,6\%$; $S/N = 7,8$) para la CFT, 0,54 mg/l ($CV = 16,1\%$; $S/N = 6,9$) para el MEM y 0,58 mg/l ($CV = 15,4\%$; $S/N = 8,1$) para la PIP; mientras que los LLOQ interdiarios son, para la CFT, el MEM y la PIP, 0,51 mg/l ($CV = 17,3\%$; $S/N = 5,2$), 0,50 mg/l ($CV = 18,1\%$; $S/N = 5,5$) y 0,54 mg/l ($CV = 16,9\%$; $S/N = 5,6$), respectivamente (tablas 4 y 5).

Estos resultados son similares a los descritos en la bibliografía^{8,9,12}. En cambio, en otros estudios^{10,11}, los LLOQ son inferiores a los obtenidos en el presente estudio, hecho que no es de extrañar si se tiene en cuenta que estos han empleado procedimientos de extracción más «limpios» (extracción en fase sólida o extracción líquido-líquido).

Tabla 3 Valores de recuperación, factor de efecto matriz y factor de efecto matriz normalizado para la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma

Antibiótico	Recuperación (%)			Factor de efecto matriz (%)			Factor de efecto matriz normalizado (%)		
	2,0 mg/l	3,00 mg/l	30,0 mg/l	2,0 mg/l	3,00 mg/l	30,0 mg/l	3,00 mg/l	30,0 mg/l	120 mg/l
Ceftazidima	-	68,0 (13,2)	72,0 (14,9)	-	132,3 (8,6)	133,3 (9,9)	100,9 (8,9)	101,9 (13,0)	105,5 (4,2)
[D ₃]-Ceftazidima	69,3 (13,7)	-	-	131,3 (5,1)	-	-	-	-	-
Meropenem	-	55,7 (10,1)	56,2 (9,3)	-	133,6 (9,5)	137,5 (6,8)	102,0 (11,6)	105,1 (11,1)	107,1 (11,2)
[D ₆]-Meropenem	53,4 (12,0)	-	-	131,6 (7,5)	-	-	-	-	-
Piperacilina	-	67,2 (14,0)	69,8 (5,9)	-	121,5 (11,8)	122,8 (6,7)	100,2 (5,8)	102,2 (11,9)	103,3 (11,8)
[D ₅]-Piperacilina	67,6 (4,5)	-	-	121,2 (10,0)	-	-	-	-	-

En paréntesis se indican los coeficientes de variación (CV) obtenidos entre las diferentes muestras de pacientes.

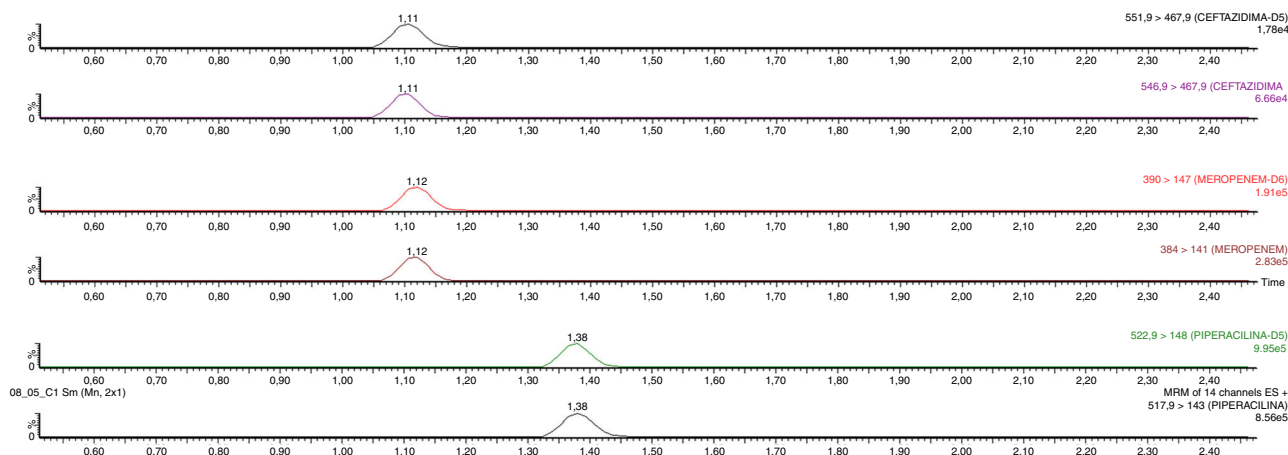


Fig. 2 Cromatogramas MRM obtenidos para la ceftazidima, el meropenem, la piperacilina y sus correspondientes patrones internos en el material de control que presenta una concentración de 3,00 mg/L.

Tabla 4 Valores de imprecisión y sesgo intraserales obtenidos en el sistema de medida Acquity® UPLC® -TQD® para la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma

Antibiótico	Material cercano al LLOQ			Material de control 1			Material de control 2			Material de control 3		
	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)
Ceftazidima	0,55	15,6	10,2	3,22	8,5	7,3	31,1	5,5	3,7	128	2,3	6,7
Meropenem	0,54	16,1	8,6	3,06	8,1	2,0	30,5	5,8	1,7	122	3,4	1,7
Piperacilina	0,58	15,4	16,0	3,33	7,5	11,0	31,5	5,3	5,1	130	2,0	8,5

CV: coeficiente de variación; LLOQ: límite de cuantificación; δ_r : sesgo relativo; \bar{x} : media.

Tabla 5 Valores de imprecisión y sesgo interdiarios obtenidos en el sistema de medida Acquity® UPLC® -TQD® para la concentración de masa de ceftazidima, meropenem y piperacilina en el plasma

Antibiótico	LLOQ			Material de control 1			Material de control 2			Material de control 3		
	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)	\bar{x} (mg/l)	CV (%)	δ_r (%)
Ceftazidima	0,51	17,3	2,4	3,36	10,8	12,0	33,4	7,7	11,3	129	5,0	7,3
Meropenem	0,50	18,1	0,8	3,22	10,1	7,3	30,9	7,4	3,0	126	4,9	4,6
Piperacilina	0,54	16,9	8,4	3,13	8,9	4,3	31,5	6,7	5,0	124	3,5	3,3

LLOQ: límite de cuantificación; CV: coeficiente de variación; δ_r : sesgo relativo; \bar{x} : media.

Imprecisión y sesgo

Los valores de imprecisión y sesgo intraserales e interdiarios obtenidos (tablas 4 y 5) no superan los requisitos metrologícos para la imprecisión y el sesgo relativo (en valor absoluto) establecidos por la EMA¹³ y el CLSI^{14,15} ($\leq 15\%$ y $\leq 20\%$ a valores cercanos al LLOQ), y son similares o inferiores a los obtenidos en publicaciones previas⁸⁻¹². Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de medida desarrollado es preciso y veraz.

Eficiencia del proceso cromatográfico (recuperación y efecto matriz)

Los valores de RE, ME y n-ME obtenidos se muestra en la tabla 3. Aunque se obtienen valores de RE relativamente

bajos, la utilización de los PI seleccionados permite compensar la pérdida de los antibióticos durante el proceso de extracción de la muestra, con independencia de cuál sea el valor de la magnitud, y con una imprecisión aceptable ($\leq 15\%$). En cuanto a los valores de ME, se puede observar que existe una sobreexpresión iónica para todos los antibióticos, que es compensada por la utilización de los PI. Los resultados obtenidos son similares a los publicados por otros autores^{8,9,12}.

Estabilidad

Las diferentes magnitudes farmacológicas son estables 3 días a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ($PD \leq -13,7\%$) y 6 meses a -80°C ($PD \leq -8,4\%$). Por otro lado, dentro del muestreador del sistema cromatográfico, estas son estables un máximo de 12 h a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ($PD \leq -14,4\%$). Los valores negativos de las PD indican

una descomposición o degradación de los antibióticos a lo largo del período de almacenamiento de las muestras. La reducida estabilidad de las magnitudes relacionadas con los antibióticos en estudio es un hecho conocido¹⁷⁻¹⁹, principalmente, en los extractos de las muestras y a temperatura ambiente. Por ello, es importante que los extractos se mantengan a temperatura de refrigeración durante un período de tiempo inferior a 12 h.

Aplicación clínica

Las concentraciones de masa de CFT, MEM y PIP en el plasma obtenidas para los pacientes críticos con sepsis se muestran en la [tabla 2](#). A las 48 h del inicio del tratamiento, todos los valores fueron consistentes con la situación clínica de los pacientes (es decir, disminución o ausencia de fiebre, remisión de la infección, etc.) observada por los clínicos. Pese a ello, estos valores fueron claramente superiores a 4 veces la CMI del patógeno en cuestión y, en consecuencia, la dosis del antibiótico administrada fue reducida y mantenida hasta erradicar completamente la infección⁴⁻⁷. A las 72 h del inicio del tratamiento, los valores de la concentración de CFT, MEM y PIP disminuyeron y continuaron estando por encima de 4 veces la CMI ([tabla 2](#)).

Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado y validado un procedimiento de medida basado en la UHPLC-MS/MS que permite la medición simultánea de la concentración de masa de CFT, MEM y PIP en el plasma. Teniendo en cuenta el tiempo de análisis y las propiedades metroológicas obtenidas, este podría ser útil para la realización de estudios PK/PD y para la monitorización farmacoterapéutica de estos antibióticos en diferentes tipos de pacientes, particularmente, en pacientes críticos con sepsis, posibilitando así una mejor comprensión de la eficacia de estos fármacos en este tipo de pacientes.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Abdul-Aziz MH, Sulaiman H, Mat-Nor MB, Rai V, Wong KK, Hasan MS, et al. Beta-lactam infusion in severe sepsis (BLISS): a prospective, two-centre, open-labelled randomised controlled trial of continuous versus intermittent beta-lactam infusion in critically ill patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2016;42:1535-45.
2. Roberts JA, Abdul-Aziz MH, Davis JS, Dulhunty JM, Cotta MO, Myburgh J, et al. Continuous versus intermittent beta-lactam infusion in severe sepsis: a meta-analysis of individual patient data from randomized trials. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194:681-91.
3. Ulldemolins M, Vaquer S, Llauredó-Serra M, Pontes C, Calvo G, Soy D, et al. Beta-lactam dosing in critically ill patients with septic shock and continuous renal replacement therapy. *Crit Care.* 2014;18:227.
4. Bruck F, Roberts M, Peake S, Lipman J, Roberts JA. Does beta-lactam pharmacokinetic variability in critically ill patients justify therapeutic drug monitoring? A systematic review. *Ann Intensive Care.* 2012;2:35-46.
5. Roberts JA, Ulldemolins M, Roberts MS, McWhinney B, Ungerer J, Paterson DL, et al. Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:332-9.
6. Roberts JA, Norris R, Paterson DL, Martin JH. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;73:27-36.
7. Sime FB, Roberts MS, Peake SL, Lipman J, Roberts JA. Does beta-lactam pharmacokinetic variability in critically ill patients justify therapeutic drug monitoring? A systematic review. *Ann Intensive Care.* 2012;2:35.
8. Carlier M, Stove V, de Waele JJ, Verstraete AG. Ultrafast quantification of β -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J Chromatog B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;978-979:89-94.
9. Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Frenich AG, Rodríguez Maresca MA, Martínez Vidal JL. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;89:203-12.
10. Colin P, de Bock L, T'jollyn H, Boussey 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.
11. 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.
12. Ashman MJ, Wildschut ED, Tibboel D, Mathot RA. Microanalysis of β -lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetic studies in neonates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:75-80.
13. European Medicines Agency Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009). London, UK: EMA, 2011 [consultado 30 Jun 2016]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
14. Clinical and Laboratory Standard Institute. Liquid Chromatography-mass spectrometry methods; approved guideline. CLSI C62-A. Wayne, PA: CLSI, 2014.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Mass spectrometry in the clinical laboratory: General principles and guidance; approved guideline. CLSI C50-A. Wayne, PA: CLSI, 2010.
16. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sallstad J, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and

- implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res.* 2007;24:1962–73.
17. Zander J, Maier B, Zoller M, Döbbeler G, Frey L, Teupser D, et al. Effects of biobanking conditions on six antibiotic substances in human serum assessed by a novel evaluation protocol. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:265–74.
 18. Carlier M, de Waele JJ, Verstraete AG, Stove V. Exploration of the preanalytical stability of β -lactam antibiotics in plasma and blood (Implications for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies). *Clin Chem Lab Med.* 2015;53:e227–30.
 19. Van Krimpen PC, van Bennekom WP, Bult A. Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm Weekbl Sci.* 1987;S9:1–23.