

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

Raül Rigo Bonnin, Pedro Alía Ramos

Secció de Fàrmacs, 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

La ceftazidima (Figura 1) és un antibiòtic β -lactàmic de la família de les cefalosporines de tercera generació que s'administra en pacients crítics amb sèpsia, i en pacients amb infeccions osteoarticulars per *Pseudomonas aeruginosa*. En aquest tipus de pacients, a més dels problemes relacionats amb la variabilitat farmacocinètica i farmacodinàmica de la ceftazidima (CFT), cal tenir present la possibilitat de desenvolupar una resistència al fàrmac durant el temps que dura el tractament antimicrobià. Com a conseqüència d'aquestes consideracions, són varis els estudis que recomanen la individualització de la dosi de CFT mitjançant el seguiment de la seva concentració en el plasma (1-13).

En l'actualitat, el mesurament d'aquesta magnitud farmacològica es realitza emprant sistemes 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 (14-17), 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*) (18-24).

En els darrers anys s'han desenvolupat altres sistemes cromatogràfics basats en la cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UHPC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) que permeten treballar amb columnes analítiques amb farcits de partícules inferiors a 2 μm . Aquest tipus de columnes, al presentar partícules d'una grandària menor a les utilitzades en les columnes d'HPLC convencional (~3,5-5,0 μm), proporcionen una major resolució i eficàcia cromatogràfiques en un menor temps, permetent escurçar els temps de retenció. A més, aquesta menor grandària permet que es precisi un menor volum de mostra per obtenir una mateixa

relació senyal/soroll, sent aquesta característica ideal si es pretén acoblar un cromatògraf líquid d'alta resolució a un espectròmetre de masses (25–27). D'altra banda, ja que en un sistema UHPC-MS/MS els temps de retenció per separar els components d'una mostra són més curts, l'efecte que exerceixen les interferències iòniques durant el procés d'ionització es redueix considerablement permetent que l'efecte matriu sigui menor o, fins i tot, menyspreable (28, 29).

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

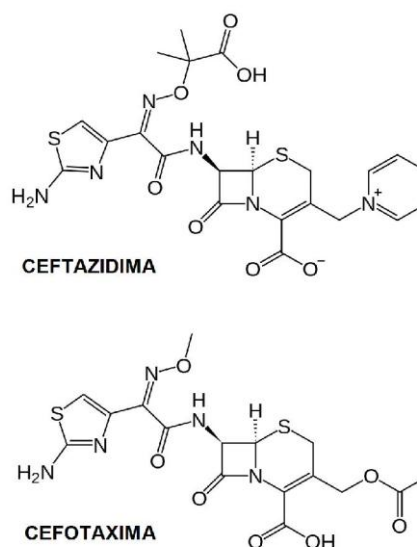


Figura 1. Estructura química de la ceftazidima i la cefotaxima (estàndard intern).

2. Material i mètodes

2.1. Productes químics

L'acetonitril, l'aigua i el metanol de qualitat HPLC-MS utilitzats són proporcionats per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya). Per altra banda, altres productes com l'àcid fòrmic i l'1,2-dicloretà s'obtenen de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya).

La ceftazidima emprada per a la preparació de materials de calibratge i de control és subministrada pel Laboratori Ramón Sala (Sant Joan Despí, Barcelona, Espanya).

La cefotaxima (Figura 1) que s'utilitza com a estàndard intern és donada pels Laboratoris Normon (Tres Cantos, Madrid, Espanya).

2.2. Material de blanc

El material de blanc es prepara a partir de 30 mostres de pacients que no estan en tractament amb CFT o cefotaxima (CEFO). Aquestes mostres s'obtenen mitjançant punció venosa i es recullen en tubs de plasma amb heparina de liti (Vacuette, Kremstünster, Àustria). Posteriorment, les mostres són centrifugades a 1200 g durant 10 minuts a (4 ± 1) °C. 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 pesades diferents, es preparen dues solucions primàries de CFT 2,0 g/L en aigua de qualitat HPLC-MS, una per als materials de calibratge i una altra per als materials de control. Seguidament, s'elaboren diferents solucions aquoses secundàries (set 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, 10, 20, 40, 80, 120 i 160 mg/L) i els materials de control (2,0, 50 i 100 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 (20 mg/L de CEFO), s'elabora una solució primària de CEFO 2,0 g/L en aigua de qualitat HPLC-MS i es realitza una dilució de la mateixa, emprant metanol de qualitat HPLC-MS 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 extracció líquid-líquid i una dilució final de l'eluat obtingut.

En un tub tipus Eppendorf d'1,5 mL, s'afegeixen 50 µL de cada calibrador, control o mostra de plasma i 50 µL de la solució de treball d'estàndard intern (20 mg/L de CEFO en metanol). La mescla s'agita breument (5 segons) en un agitador tipus vòrtex i, posteriorment, s'addicionen 250 µL d'acetonitril de qualitat HPLC-MS fred. Després de l'agitació de la mescla resultant en un vòrtex durant 3 minuts, el tub se centrifuga durant 5 minuts a 12000 g a (4 ± 1) °C. A continuació, 250 µL del sobrenedant es transfereixen a un nou tub tipus Eppendorf que conté 250 µL d'aigua de qualitat HPLC-MS, s'agita la barreja durant 5 segons, s'afegeixen 250 µL d'1,2-dicloretà, s'agita la solució en un vòrtex durant 3 minuts i se centrifuga el tub durant 5 minuts a 12000 g a (4 ± 1) °C. Finalment, 100 µL de l'eluat (líquid corresponent a la fase orgànica que es troba a la part superior) es dilueixen amb 900 µL d'aigua de qualitat HPLC-MS, 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® acoblat 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 50 °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 al 2 es realitza una elució isocràtica amb una composició de la fase mòbil A del 95 %. Seguidament, entre els minuts 2 i 3, la composició de la fase mòbil A decreix gradualment del 95 % al 5 % (gradient lineal). Finalment, es reequilibra la columna analítica durant un minut emprant la composició inicial de la fase mòbil A (95 %). Les mostres 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 a la CFT i la CEFO, els ions precursors generats que donen un major senyal són els formats pels adductes $[M-H]^+$. S'utilitza nitrogen com a gas de nebulització i de desolvatació, i argó com a gas de col·lisió. La CFT i la CEFO 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): CFT, 547,0→467,9 (transició utilitzada per a la quantificació) i 547,0→396,1 (transició emprada per a la confirmació); CEFO, 456,0→395,8 (transició per a la quantificació) i 456,0→324,1 (transició per a la confirmació). Per a cada un dels fàrmacs en estudi, seguint els criteris de la guia C50-A (30) 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 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 *dwel time*) per a cada una de les transicions MRM és 100 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 450 °C. Els fluxos del gas de desolvatació, del gas de col·lisió i l'aplicat en el con són 850 L/h, 0,20 mL/min i 50 L/h, respectivament. Els potencials de con aplicats són 25 V per a la CFT i 23 V per a la CEFO, mentre que les energies de col·lisió emprades per ambdós fàrmacs són 12 i 10 eV per a les transicions de quantificació i confirmació, respectivament.

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 (30-32).

Les propietats metrològiques estudiades són 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 (recuperació i efecte matriu). Per altra banda, també es realitza un estudi de l'estabilitat de les diferents magnituds farmacològiques.

2.8.1. Calibratge

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 CFT 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, excloent 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_{CFT} / A_{CEFO}) · C_{CEFO} (eix d'ordenades; Y) enfront als valors de la concentració de CFT (eix d'abscisses; X); sent A_{CFT} l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la CFT; A_{CEFO} , l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la CEFO (estàndard intern); i C_{CEFO} , el valor de la concentració de CEFO en la solució de treball de l'estàndard intern.

Seguint els criteris de l'EMA (31), per als materials de calibratge, les diferències percentuals relatives entre els valors de la concentració de CFT calculades i teòriques han d'estar compreses entre $\pm 15\%$, i entre $\pm 20\%$ a valors propers al límit de quantificació.

2.8.2. Selectivitat

Per a l'estudi de la selectivitat es processen 10 mostres de pacients que no estan en tractament amb CFT o CEFO però sí que prenen, de manera individual o combinada, altres antibiòtics com penicil·lines (amoxicil·lina i piperacil·lina), cefalosporines (cefuroxima, cefepima i ceftriaxona), monobactàmics (aztreonam) o inhibidors de la β -lactamasa (àcid clavulànic i tazobactam). Tres pacients estan en tractament amb amoxicil·lina/àcid clavulànic; dos amb piperacil·lina/tazobactam; dos amb aztreonam; un amb ceftriaxona; un amb cefepima i un amb cefuroxima. Tots els pacients presenten un valors de la concentració d'antibiòtic en el plasma per sobre de la concentració inhibidòria mínima del patògen.

Seguint els criteris de l'EMA (31), es considera que els diferents antibiòtics no interfereixen en el mesurament de la magnitud farmacològica en estudi quan:

- En el temps de retenció de la CFT, 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 CFT amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (CEFO), 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 CFT 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 CFT 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 7; 160 mg/L) seguint l'ordre següent: LOQ – Calibrador 7 – Calibrador 0 – Calibrador 0 – Calibrador 0.

Seguint els criteris de l'EMA (31), es considera que no existeix contaminació per arrossegament quan:

- En el temps de retenció de la CFT, 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 CFT amb un valor que correspon al límit de quantificació.
- En el temps de retenció de l'estàndard intern (CEFO), 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 CFT 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; 10 mg/L) es dilueix 5, 10 i 20 vegades amb el material de blanc (calibrador 0; 0 mg/L). Cada una de les diferents solucions diluïdes es processen 15 vegades en un únic dia, així com 15 vegades durant 28 dies utilitzant una única sèrie per dia.

La guia C50-A del CLSI-IFCC (30) 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, l'EMA (31) 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 $S/N \geq 5$.

2.8.5. Interval de mesura (linealitat)

Seguint els criteris de l'EMA (31) i del CLSI EP6-A (32), per a l'estudi de la linealitat de l'interval de mesura, un material de valor elevat (calibrador 7; 160 mg/L) es dilueix amb el 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 160, 120, 80, 40 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 (31), 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 Y) enfront als valors teòrics esperats (eix X). Per considerar la linealitat de l'interval de mesura, s'apliquen els criteris de la guia CLSI EP6-A (32) 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 intra- i interdiari es fan servir 4 mostres amb diferents valors de la magnitud farmacològica en estudi: un material de valor baix amb un valor corresponent al LOQ i els tres materials de control (2,0, 50 i 100 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 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 28 dies, utilitzant una única sèrie per dia.

Seguint els criteris de l'EMA (31), els valors del CV i δ 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 del procés cromatogràfic depèn de la pèrdua dels components en estudi 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 de l'EMA (31) i els procediments emprats per Matuszewski et al. (33) i Viswanathan et al. (34). Per dur-ho a terme, s'utilitzen tres tipus de mostres diferents amb un valor de 2,0, 50 i 100 mg/L en el cas de les magnituds relacionades amb la CFT i a un valor de 20 mg/L en el cas de les magnituds relacionades amb la CEFO. Per a cada un dels fàrmacs, aquests tres tipus de mostres són: solucions primàries de CFT o CEFO diluïdes en la fase mòbil (Mostres A); sis mostres de plasma de pacients diferents que no contenen cap dels fàrmacs i a les que se'ls hi afegeix CFT o CEFO després del procés d'extracció (Mostres B); i les mateixes 6 mostres a les quals se'ls hi afegeix CFT o CEFO abans del procés d'extracció (Mostres C).

Emprant les àrees dels pics cromatogràfics obtingudes després de processar totes aquestes mostres, el percentatge de recuperació (RE), d'efecte matriu (ME) i d'eficiència del procés cromatogràfic (PE) per a la CFT es calcula com:

$$RE_{CFT} (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostreC})_{CFT}}{(\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CFT}} \cdot 100$$

$$ME_{CFT} (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CFT}}{(\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CFT}} \cdot 100$$

$$PE_{CFT} (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostresC})_{CFT}}{(\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CFT}} \cdot 100$$

Seguint els criteris del CLSI (30) i l'EMA (31), una vegada realitzats aquests càlculs, els valors dels percentatges de recuperació, d'efecte matriu i d'eficiència del procés cromatogràfic obtinguts per a la CFT han de ser independents dels valors de la magnitud en estudi (ha d'existir una diferència percentual màxima del 15% per a cada un d'ells) i reproduïbles (han de presentar un coeficient de variació $\leq 15\%$).

Per altra banda, per tal de conèixer si l'estàndard intern (CEFO) és capaç de compensar la possible pèrdua d'analític durant el procés d'extracció de la mostra i el possible efecte matriu ocasionat en la font d'ionització, es calculen el percentatge de recuperació normalitzat (n-RE), el d'efecte matriu normalitzat (n-ME) i el d'eficiència del procés cromatogràfic normalitzat (n-PE) utilitzant les següents fórmules:

$$n-RE (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostreC})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostreC})_{CEFO}}{(\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CEFO}} \cdot 100$$

$$n-ME (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostresB})_{CEFO}}{(\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CEFO}} \cdot 100$$

$$n-PE (\%) = \frac{(\text{Mitjana Àrees MostresC})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostresC})_{CEFO}}{(\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CFT} / (\text{Mitjana Àrees MostresA})_{CEFO}} \cdot 100$$

A l'igual que per al cas de la CFT, seguint els criteris del CLSI (30) i l'EMA (31), una vegada realitzats aquests càlculs, els valors obtinguts dels percentatges de recuperació, d'efecte matriu i d'eficiència del procés cromatogràfic normalitzats han de ser independents dels valors de la magnitud en estudi (ha d'existir una diferència percentual màxima del 15% per a cada un d'ells) i reproduïbles (han de presentar un coeficient de variació $\leq 15\%$).

2.8.8. Estabilitat

Seguint els criteris del CLSI (30) i l'EMA (31), s'estudia l'estabilitat de la concentració de massa de CFT i CEFO en les solucions primàries, l'estabilitat de la concentració de massa de CFT en el plasma a curt i llarg termini, així com l'estabilitat de la concentració de massa de CFT en l'extracte de les mostres de plasma dins del mostrejador del sistema cromatogràfic.

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

- Solucions primàries de CFT i CEFO, 10 vegades, (5 ± 3) °C i 1, 3 i 7 dies, per a l'estudi de l'estabilitat de les solucions primàries;
- Tres materials de control (2,0, 50 i 100 mg/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 (2,0, 50 i 100 mg/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 (2,0, 50 i 100 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:

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

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 o nominal assignat a les distintes mostres i n és el nombre de vegades que s'han processat les mostres ($n = 10$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (30) i l'EMA (31), es considera que la magnitud en estudi és estable 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'UHPC que ens ha permès optimitzar la resolució i eficàcia cromatogràfiques i obtenir uns pics cromatogràfics simètrics, unes relacions senyal/soroll elevades i un reduït temps de retenció. En referència a les fases mòbils avaluades, la utilització d'aigua juntament amb acetonitril en lloc de metanol com a component orgànic de la fase mòbil, permet obtenir una major separació cromatogràfica i una major sensibilitat en el detector de

l'espectròmetre de masses. Per altra banda, el fet d'afegir àcid fòrmic —en una proporció de volum del 0,1 %— en lloc d'acetat o formiat 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, per tal d'afavorir una millor resolució cromatogràfica entre els pics de CFT i CEFO i poder escurçar els temps cromatogràfic, s'ha fet servir un gradient d'elució lineal. En referència a les columnes d'UHPC C₁₈ en fase reversa avaluades (Acquity UPLC[®] BEH 2,1 x 50 mm, 1,7 µm; Acquity UPLC[®] BEH 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Acquity UPLC[®] HSS T3 2,1 x 50 mm, 1,8 µm i Acquity UPLC[®] HSS T3 2,1 x 100 mm, 1,8 µm; totes elles de Waters), la que emprava partícules

híbrides amb ponts d'etilè o BEH (acrònim de l'anglès *Ethylene Bridged 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 unes millors condicions cromatogràfiques.

En les condicions cromatogràfiques descrites en aquest treball, els temps de retenció per a la CFT i CEFO són 1,76 i 2,03 minuts, respectivament (Figura 2). El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives) és 4,0 minuts. El temps de processament per a 20 mostres, incloent el temps necessari per a la seva preparació, és inferior a 2 hores.

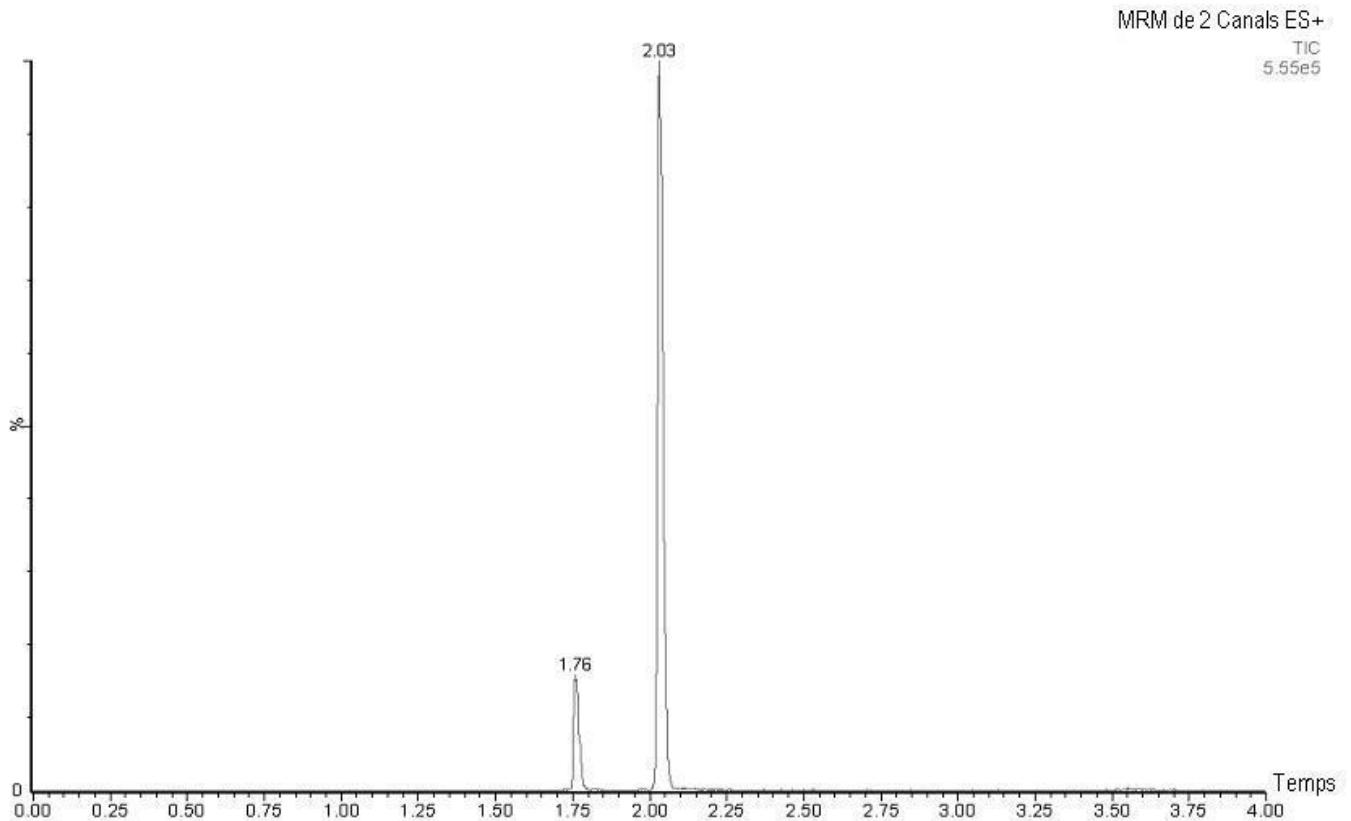


Figura 2. Cromatograma MRM representatiu obtingut en un pacient que presenta una concentració de massa de ceftazidima en el plasma de 5,2 mg/L.

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 10 mg/L de CFT i CEFO —s'han dissolt diferents quantitats de CFT i CEFO en àcid fòrmic-acetonitril-aigua (50:50:0,1 v/v/v)—. Tant per a la CFT com per a la CEFO, s'ha observat que la major sensibilitat analítica s'obté quan s'utilitza la ionització mitjançant electroesprai en mode positiu (ESI⁺), sent els ions més abundants, els corresponents als adductes [M–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. La CFT i la CEFO 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 de la CFT i la CEFO 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: 547,0→467,9 per a la CFT i 456,0→395,8 per a la CEFO, i l'altra transició és emprada per a

la confirmació: 547,0→396,1 i 456,0→324,1 per a la CFT i la CEFO, respectivament.

3.3. Preparació i tractament de les mostres

La precipitació de proteïnes i l'extracció líquid-líquid no són els procediments de preparació de mostres més idonis per obtenir recuperacions acceptables i per prevenir els efectes matrius que es poden 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 fred seguida d'una extracció líquid-líquid amb 1,2-dicloroetà i una dilució subsegüent de l'extracte orgànic amb aigua, ens ha permès, per una banda, obtenir recuperacions i efectes matrius acceptables i similars als publicats per altres autors (18, 20, 21, 23, 24) i, per un altra, simplificar altres procediments d'extracció descrits en la bibliografia (19, 22).

3.4. Procediment de validació

3.4.1. Calibratge

Totes les corbes de calibratge que s'han realitzat durant el procediment de validació han sigut lineals dins de l'interval (0,58-160) mg/L. Un exemple d'equació obtinguda per a la corba

de calibratge és $Y = 0,096 \cdot X - 0,133$ (coeficient de determinació; $r^2 = 0,9953$). Les diferències percentuals relatives obtingudes, entre els valors de la concentració de CFT calculades i teòriques, estan compreses entre 5,7 i 11,8 % 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 (5,9-18,8) %.

3.4.2. Selectivitat

Per a totes les mostres de pacients processades no s'observen cromatogrames amb pics interferents. En el temps de retenció de la CFT, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són $\leq 2,5$ % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté CFT amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció de la CEFO, aquests valors d'àrea són $\leq 1,1$ %.

3.4.3. Contaminació per arrossegament o residualitat

No s'observa una contaminació per arrossegament. En el temps de retenció de la CFT, per als tres materials de blanc, els valors de l'àrea sota la corba dels pics cromatogràfics són $\leq 4,2$ % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic en la mostra que conté CFT amb un valor que correspon al LOQ. En el temps de retenció de la CEFO, aquests valors d'àrea són $\leq 2,2$ %.

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

El LOD és 0,21 mg/L amb una *S/N* de 6,9, mentre que el LOQ és 0,58 mg/L (*S/N* = 14,8; *CV* = 17,2 %).

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

Valor teòric de la magnitud farmacològica (mg/L)	Intradiari (n = 15)			Interdiari (n = 15)		
	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV (%)	δ_r (%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV (%)	δ_r (%)
0,50 (LOQ)	0,57 \pm 0,09	15,8	14,0	0,58 \pm 0,10	17,2	16,0
2,0 (QC1)	2,09 \pm 0,18	8,6	4,5	2,14 \pm 0,21	9,8	7,0
50,0 (QC2)	53,5 \pm 3,14	5,8	7,0	54,2 \pm 3,59	6,6	8,4
100 (QC3)	104 \pm 3,72	3,6	4,0	105 \pm 4,41	4,2	5,0

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.

3.4.5. Interval de mesura (linealitat)

L'interval de mesura és lineal entre (0,58–160) mg/L ($Y = 0,940 \cdot X + 0,980$; $r^2 = 0,998$). Les diferències relatives percentuals entre els valors mesurats obtinguts i els seus corresponents valors teòrics són $\leq 11,7$ %. Per altra banda, els diferents *CV* obtinguts són $\leq 13,3$ %.

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, PE, n-RE, n-ME i n-PE obtinguts es mostren a les Taules 2, 3 i 4. Tot i que s'obtenen valors de RE relativament baixos, la utilització de la CEFO com estàndard intern permet compensar la pèrdua de CFT 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 una sobre-expressió iònica per a la CFT, la qual és compensada per la utilització de la CEFO com a estàndard intern.

L'avaluació de l'efecte matriu és un dels estudis més importants que s'han de dur a terme 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 (35-38). Idealment, s'hauria de fer servir el propi component en estudi —també anomenat *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 (30, 31, 39). 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'ha utilitzat la CEFO —cefalosporina de tercera generació que presenta unes propietats i una estructura química similars a la CFT— com a primera i única opció d'estàndard intern. Encara que en el nostre procediment cromatogràfic desenvolupat, la CFT i CEFO no elueixen simultàniament, fet que podria portar a una falta de compensació de l'efecte matriu i d'altres característiques, els resultats obtinguts per a l'eficiència del procés cromatogràfic posen de manifest que la selecció de la CEFO com a estàndard intern ha sigut encertada.

3.4.8. Estabilitat

La concentració de massa de ceftazidima en el plasma és estable 3 dies a (5 \pm 3) °C (*PD* = -11,4 %) i 6 mesos a (-75 \pm 3) °C (*PD* = -8,4 %). Per altra banda, dins del mostrejador del sistema cromatogràfic, la concentració de massa de CFT en l'extracte de les mostres de plasma és estable 12 hores a (4 \pm 1) °C (*PD* = -14,7 %). En les solucions primàries de CFT i CEFO la seva concentració de massa és estable durant 3 dies si aquestes es conserven a (5 \pm 3) °C (*PD* = -13,9 % i -12,2 % per a la CFT i CEFO, respectivament). Els valors negatius dels *PD* indiquen una descomposició o degradació de la CFT o la CEFO al llarg del temps.

És àmpliament conegut que, a temperatura ambient, les magnituds farmacològiques relacionades amb els antibiòtics β -lactàmics presenten una reduïda estabilitat (22, 40-44). Aquesta característica pren una gran importància si les mostres —els

extractes de les mostres— es deixen a temperatura ambient dins del mostrejador del sistema cromatogràfic per al seu processament, donat que es podria produir una ràpida degradació o descomposició del fàrmac. Per evitar aquest problema,

s'haurien de prendre diferents precaucions com, per exemple, treballar a temperatures de refrigeració dins del mostrejador o, en el seu defecte, processar un número reduït de mostres per sèrie analítica.

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

Mostra	RE (%)			n-RE (%)		
	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
1	64,4	71,1	73,2	90,4	99,9	102,8
2	75,9	78,9	80,1	92,1	95,8	97,2
3	66,8	70,2	72,9	92,3	97,0	100,7
4	73,2	76,6	79,7	91,8	96,1	100,0
5	65,2	68,8	72,1	87,9	92,7	97,2
6	61,4	65,1	68,4	93,9	99,5	104,6
\bar{x} (%)	67,8	71,8	74,4	91,4	96,8	100,4
<i>s</i> (%)	5,6	5,1	4,6	2,0	2,6	3,0
CV (%)	8,2	7,1	6,2	2,2	2,7	3,0
	\bar{x} global (%)	71,8		\bar{x} global (%)	96,8	
	<i>s</i> global (%)	5,1		<i>s</i> global (%)	2,6	
	CV global (%)	7,1		CV global (%)	2,7	

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 basat en la UHPC-MS/MS.

Mostra	ME (%)			n-ME (%)		
	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
1	101,4	105,3	111,1	89,3	92,8	97,9
2	105,9	117,2	120,9	92,7	102,5	105,8
3	118,8	122,5	125,0	98,0	101,1	103,1
4	112,5	115,7	120,7	90,6	93,2	97,2
5	115,3	117,9	120,1	106,0	108,4	110,4
6	124,3	128,8	132,2	110,8	114,8	117,8
\bar{x} (%)	113,0	117,9	121,7	97,9	102,1	105,4
<i>s</i> (%)	8,4	7,8	6,9	8,8	8,6	7,9
CV (%)	7,4	6,6	5,7	9,0	8,4	7,5
	\bar{x} global (%)	117,5		\bar{x} global (%)	101,8	
	<i>s</i> global (%)	8,1		<i>s</i> global (%)	8,5	
	CV global (%)	6,9		CV global (%)	8,4	

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

Taula 4. Percentatges d'eficiència del procés cromatogràfic i d'eficiència del procés cromatogràfic normalitzats obtinguts per al sistema de mesura basat en la UHPC-MS/MS.

Mostra	PE (%)			n-PE (%)		
	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	2,0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
1	65,3	74,9	81,3	80,8	92,7	100,7
2	80,4	92,5	96,8	85,4	98,1	102,8
3	79,4	86,0	91,1	90,4	98,0	103,8
4	82,4	88,6	96,2	83,2	89,6	97,2
5	75,2	81,1	86,6	93,1	100,5	107,3
6	76,3	83,8	90,4	104,0	114,3	123,2
\bar{x} (%)	76,5	84,5	90,4	89,5	98,9	105,8
s (%)	6,1	6,1	5,9	8,5	8,6	9,1
CV (%)	7,9	7,2	6,5	9,5	8,7	8,6
	\bar{x} global (%)	83,8		\bar{x} global (%)	98,1	
	s global (%)	8,2		s global (%)	10,7	
	CV global (%)	9,7		CV global (%)	10,9	

PE, percentatge d'eficiència del procés cromatogràfic; n-PE, percentatge d'eficiència del procés cromatogràfic normalitzat; \bar{x} , mitjana aritmètica; s, desviació estàndard; CV, coeficient de variació.

4. Conclusions

En aquest treball s'ha desenvolupat un procediment de mesura i validat un sistema de mesura basat en la UHPC-MS/MS que permet el mesurament de la concentració de massa de ceftazidima en el plasma. Tenint en compte el temps d'anàlisi i les propietats metrològiques del sistema de mesura validat, aquest podria ser útil per a la realització d'estudis farmacocinètics i per a la monitorització farmacoterapèutica de CFT en diferents tipus de pacients, particularment, en pacients crítics amb sèpsia, i en pacients amb infeccions osteoarticulars per *Pseudomonas aeruginosa*, possibilitant una millor comprensió de l'eficàcia d'aquest fàrmac.

5. Bibliografia

- (1) World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2a. Geneve; 2001: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_Strat.pdf>. (Consultat: 2014-11-26).
- (2) Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645-54.
- (3) Kasiakou SK, Sermaides GJ, Michalopoulos A, Soteriades ES, Falagas ME. Continuous versus intermittent intravenous administration of antibiotics: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Infect Dis* 2005;5:581-9.
- (4) Ariza J, Euba G, Murillo O. Orthopedic device-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:380-90.
- (5) Moriyama B, Henning SA, Neuhauser MM, Danner RL, Walsh TJ. Continuous-infusion beta-lactam antibiotics during continuous venovenous hemofiltration for the treatment of resistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* 2009;43:1324-37.
- (6) Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:546-53.
- (7) Roberts JA, Uldemolins 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.
- (8) MacGowan A. Revisiting Beta-lactams — PK/PD improves dosing of old antibiotics. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:470-6.
- (9) Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Álvarez-Rocha L, Asensio Á, Calbo E, Cercenado E, et al. GEIH-SEIMC; SEFH; SEMPSPH. Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document. *Farm Hosp* 2012;36:e1-30.
- (10) 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 Int Care* 2012;2:35-46.

- (11) Sinnollareddy MG, Roberts MS, Lipman J, Roberts JA. Beta-lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and strategies for dose optimization: a structured review. *Clin Exp Pharm Physiol* 2012;39:489-496.
- (12) Gray A, Dryden M, Charos A. Antibiotic management and early discharge from hospital: an economic analysis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2297-302.
- (13) Titécat M, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Migaud H, Courcol RJ, *et al.* Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop Traumatol Surg Res* 2013;99:653-8.
- (14) Ehrlich M, Daschner FD, Kümmerer K. Rapid antibiotic drug monitoring: Meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by high-performance liquid chromatography-integrated sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;751:357-63.
- (15) Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five beta-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.
- (16) McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JP. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:2039-43.
- (17) Verdier MC, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 beta-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.
- (18) 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.
- (19) Tomar MS, Patni AK, Arora R, Thudi NR, Shrivastav VK, Iyer S, *et al.* A pharmacokinetic drug interaction study of ceftazidime with clavulanic acid in healthy male Indian subjects. *Clin Res Regul Aff* 2011;28:49-53.
- (20) 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.
- (21) Zhang J, Chen XY, Dai XJ, Zhang YF, Liu K, Li Z, *et al.* Simultaneous determination of ceftazidime and tazobactam in human plasma with sequential positive and negative ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Chinese J Pharm Anal* 2012;32:20-5.
- (22) Colin P, De Bock L, T'jollyn 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.
- (23) Sime FB, Roberts MS, Roberts JA, Robertson TA. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;960:134-44.
- (24) Carlier M, Stove V, De Waele JJ, Verstraete AG. Ultrafast quantification of β -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;978-979:89-94.
- (25) 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* 2005;825:134-43.
- (26) Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of Application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006;68:908-18.
- (27) Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006;1103:94-101.
- (28) Van De Steene JC, Lambert WE. Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:713-8.
- (29) Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B* 2007;852:22-34.
- (30) 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, 2007.
- (31) European Medicines Agency. Guideline on validation of bioanalytical methods. 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: 2014-11-26).
- (32) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. EP6-A. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- (33) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:3019-30.
- (34) 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.
- (35) Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328-34.
- (36) Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B* 2007;852:22-34.
- (37) Sauvage FL, Gaulier JM, Lachâtre G, Marquet P. Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected reaction-monitoring mode for drug analysis. *Clin Chem* 2008;54:1519-27.
- (38) Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2010;56:1234-44.
- (39) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2001.
- (40) 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.
- (41) Baririan N, Chanteux H, Viaene E, Servais H, Tulkens PM. Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:651-8.
- (42) Servais H, Tulkens PM. Stability and compatibility of ceftazidime administered by continuous infusion to intensive care patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2643-7.
- (43) Van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A. Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm Weekbl* 1987;9:1-23.
- (44) Zhou M, Notari RE. Influence of pH, temperature and buffers on the kinetics of ceftazidime degradation in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 1995;84:534-8.