

Desarrollo de un método de Extracción en Fase Sólida (SPE) para la determinación de Amikacina en plasma humano por HPLC-MS/MS

Claudia Valeria Cruz Saucedo^{a*}, Adolfo Caballero Quintero^b, Elizabeth Orozco Beltrán^c y Elida Marcela Aguilar Bravo^{d*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León Av. Universidad s/n Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L. México.

^b Fiscalía General de Justicia del Estado de Nuevo León. Melchor Ocampo 470 PTE, Centro, 64000 Monterrey, N.L. México.

*vale taz21@hotmail.com

Palabras clave: Amikacina, SPE, HPLC-MS/MS

Introducción

La Amikacina es un aminoglucósido usado para el tratamiento de infecciones hospitalarias severas causadas por bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos y de gran importancia clínica debido a su patrón de toxicidad y a su estrecha ventana terapéutica¹. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) ha sido el método de elección para la cuantificación de diferentes fármacos. La Amikacina, altamente polar, sin cromóforos para absorción UV o grupos fluorescentes, requiere de técnicas más sensibles para su cuantificación en distintas matrices biológicas². La HPLC acoplada a Espectrometría de Masas-Masas (HPLC-MS/MS) ha permitido aumentar la sensibilidad de las técnicas Cromatográficas y la Extracción en Fase Sólida mejora el aislamiento, purificación y concentración de analitos como nuestro fármaco de interés³. En la SPE las sustancias iónicas básicas pueden retenerse en columnas intercambiadoras de cationes, si se encuentran en su forma ionizada, es decir, el pH del medio es dos unidades menor que el valor del pKa de la base. La extracción se consigue incrementando el valor del pH del la solución de elución por encima del pKa, aumentando así la fuerza iónica⁴.

Parte experimental

Se establecieron las condiciones Cromatográficas y de Espectrometría de Masas-Masas para la determinación de Amikacina en plasma humano, usando como estándar interno Kanamicina B. Se desarrolló un método de SPE, para el cual se utilizaron cartuchos de intercambio catiónico y una estación de vacío de 24 posiciones utilizando 5 mm Hg de vacío. Se evaluó: acondicionamiento, equilibrio, carga de muestra, lavado y elución, por duplicado distintos sistemas de matriz enriquecida, a una concentración de 2 y 20 µg de Amikacina y 2 µg de Kanamicina B. Se seleccionó el sistema con mayor porcentaje de recuperación del analito en matriz biológica comparada con su respuesta en solución (Figura 1), así como la mejor respuesta del analito en su análisis por HPLC-MS/MS.

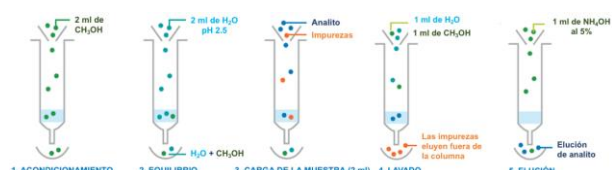


Figura 1. Sistema de SPE seleccionado para Amikacina y Kanamicina B en plasma humano.

Resultados y discusión

Las condiciones Espectrométricas obtenidas fueron: Monitoreo de Reacción Múltiple con Ionización por Electropray (ESI⁺), las transiciones monitoreadas fueron 586.3, 425.2, 264.3, 163 y 484.3, 324.2, 205.1 m/z, para Amikacina y Kanamicina B, respectivamente. Con una energía de colisión de 35 y 30 V.

Las condiciones cromatográficas obtenidas fueron: columna Luna NH₃, 3 µm, 100 Å, 50 x 4.6 mm, Fase móvil A: agua al 0.2% de ácido fórmico, Fase móvil B: Acetonitrilo al 0.2% de ácido fórmico, volumen de inyección de 5 µL, temperatura en la columna 40 °C, flujo de 800 µL/min, elución isocrática al 10% de Fase móvil B.

Para HPLC, las moléculas exhiben una mejor respuesta a una mayor proporción de Fase móvil acuosa acidificada. La columna cromatográfica seleccionada tiene grupos amino unidos a la superficie de la sílice que sirven como intercambiadores de aniones débiles, teniendo selectividad polar en condiciones de fase reversa. En la SPE, la separación de ciertos componentes de una muestra se realiza mediante su distribución en dos fases: una estacionaria y otra móvil. En nuestro análisis por SPE se seleccionó el cartucho en función de las características de las moléculas, tomando en cuenta la solubilidad (log P de Amikacina -7.4), polaridad, capacidad de ionización (pKa de Amikacina 9.7), ya que de la selección del absorbente (intercambiador catiónico), así como el pH de la muestra (7.8), solvente y pH de elución (11.73), dependieron los porcentajes de recuperación del analito.

Conclusiones

Se desarrolló un método selectivo como tratamiento de muestra previo a su análisis por HPLC-MS/MS, para la identificación y cuantificación de Amikacina, usando como estándar interno Kanamicina B.

Referencias

1. Cristea S. *et al.*. Antimicrob. Agents Chemother. 2017. doi:10.1128/AAC.01282-17.
2. Silvestro L.; Tarcomnico I.; Savu S. R. HPLC-MS/MS of Highly Polar Compounds. www.intechopen.com (revisado el 27 de febrero del 2018).
3. Young, M.; Early, M.; Mallet, C.; Krol, J. 2001. J.A.O.A.C Inter. 84 (5): 1608-1613.
4. Majors, R. LCGC North America. 2001. 19 (7): 678-687.