

# Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC

E. L. Mariño, V. Albert, M. S. M. Ferrer, P. Modamio, C. F. Lastra

*Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona*

## Resumen

**Objetivo:** Desarrollo, validación y caracterización de la función del error de tres métodos analíticos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis cuantitativo de ritonavir, saquinavir y abacavir en plasma humano.

**Método:** Se han indicado los reactivos y aparatos empleados, la preparación de los diferentes estándares de referencia, el procedimiento de extracción desde la matriz biológica y las condiciones de análisis ensayadas para la puesta a punto de los tres métodos analíticos. Además, también se han descrito las metodologías de validación y de obtención de la función del error analítico.

**Resultados:** Los métodos analíticos desarrollados para ritonavir, saquinavir y abacavir en plasma humano fueron selectivos, lineales ( $r^2 > 0,99$ ), precisos (coeficientes de variación  $< 15\%$ ) y exactos (errores relativos  $< 15\%$ ) en el rango de concentraciones seleccionado. La recuperación fue mayor del 95% en todos los métodos. Los antirretrovirales estudiados fueron estables en las condiciones ensayadas de acuerdo con la rutina del laboratorio. La función del error discriminada para cada uno de los métodos analíticos validados resultó ser lineal en saquinavir ( $DE = 4,84 + 7,14 \cdot 10^{-2}C$ ) y abacavir ( $DE = -1,072 + 3,70 \cdot 10^{-2}C$ ) y no lineal en el caso de ritonavir ( $DE = 39,98 + 2,40 \cdot 10^{-5}C^2$ ).

**Conclusiones:** Se han desarrollado y posteriormente validado tres métodos analíticos, encontrándose los parámetros de validación dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos. La función del error de cada uno de los métodos validados puede emplearse como método de ponderación heteroscedástica en la estimación de parámetros mediante regresión no lineal en estudios de farmacocinética clínica de los antirretrovirales ensayados.

**Palabras clave:** Ritonavir. Saquinavir. Abacavir. HPLC. Plasma humano. Función del error analítico.

*Mariño EL, Albert V, Ferrer MSM, Modamio P, Lastra CF. Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC. Farm Hosp 2006; 30: 374-378.*

Recibido: 13-06-2006  
Aceptado: 30-10-2006

**Correspondencia:** Eduardo L. Mariño. Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Avda. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona. Fax: 93 403 57 14. e-mail: emarino@ub.edu. <http://www.ub.es/farcli/wp0.htm>

## Summary

**Objective:** Development, validation and error characterization of three analytical methods, by high performance liquid chromatography (HPLC), for the quantitative analysis of ritonavir, saquinavir and abacavir in human plasma.

**Method:** Reagents and instrumentation used, preparation of different standards, sample extraction procedure from biologic matrix, and analytical conditions assayed were detailed to set up three analytical methods. In addition, the validation and the determination of analytical error were also described.

**Results:** The analytical methods developed for ritonavir, saquinavir and abacavir in human plasma were selective, linear ( $r^2 > 0,99$ ), precise (coefficients of variation  $< 15\%$ ) and accurate (relative errors  $< 15\%$ ) over the concentration range selected. The recovery was more than 95% in all methods. Antiretroviral drugs were stable in the storage conditions assayed according to the routine laboratory. The error function discriminated for each analytical method validated was linear in saquinavir ( $SD = 4,84 + 7,14 \cdot 10^{-2}C$ ) and abacavir ( $SD = -1,072 + 3,70 \cdot 10^{-2}C$ ), and non-linear in ritonavir ( $SD = 39,98 + 2,40 \cdot 10^{-5}C^2$ ).

**Conclusions:** Three analytical methods were developed and subsequently validated, with validation parameters being within the specifications and attributes of quality established. The error function characterized for each validated method can be used as a heteroscedastic weighting method in the parameter estimation by non-linear regression analysis in clinical pharmacokinetic studies of antiretroviral drugs assayed.

**Key words:** Ritonavir. Saquinavir. Abacavir. HPLC. Human plasma. Analytical error function.

## INTRODUCCIÓN

La implantación de una terapéutica farmacológica exige la selección adecuada de medicamentos y la programación de pautas posológicas que garanticen la máxima efectividad con un mínimo riesgo de aparición de efectos adversos. En este sentido y en el caso concreto de la infec-

ción crónica por el VIH, actualmente el tratamiento de inicio se basa en combinaciones de al menos tres fármacos antirretrovirales -2 inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (AN) más 1 inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NN) o 2 AN más 1 inhibidor de la proteasa (IP)-. Por otro lado, la baja biodisponibilidad de algunos antirretrovirales, la aparición de resistencias o de interacciones con otros fármacos, pueden originar importantes variaciones interindividuales<sup>1,2</sup>.

De todos es conocido el continuo cambio y avance tecnológico en el que estamos inmersos y su incidencia directa, entre otros, en la aportación de nuevas e incluso más poderosas aproximaciones analíticas para la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de fármacos, así como de las metodicas de cálculo para el tratamiento matemático de las mismas<sup>3,4</sup>. Todo ello ha permitido y permite la aplicación de los principios farmacocinéticos a la práctica clínica, apoyándose en la aceptable correlación que se establece para diversos grupos farmacológicos entre las concentraciones plasmáticas y su efectividad o seguridad.

En la actualidad se recurre a los métodos de regresión no lineal (RNL), siendo en este caso una buena opción el empleo de la función del error del método analítico como alternativa válida a otros métodos de ponderación<sup>5</sup>.

El objetivo del presente trabajo ha sido el desarrollo y validación de tres métodos analíticos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la determinación de ritonavir, saquinavir y abacavir en plasma humano, y posteriormente el establecimiento de la función del error analítico para cada uno de los antirretrovirales ensayados.

## MÉTODO

### Reactivos

Abacavir, ritonavir y saquinavir fueron donados por GlaxoSmithKline (Stevenage, Reino Unido), Abbott Laboratorios (Chicago, EE.UU.) y Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania), respectivamente. Los reactivos empleados fueron acetato de etilo, acetonitrilo calidad HPLC (Carlo Erba), ácido bórico (Probus), hexano, dietiléter, sodio hidróxido, potasio dihidrógeno fosfato, potasio cloruro y di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Panreac). El agua calidad HPLC se obtuvo mediante el sistema Milli-Q Plus<sup>®</sup>. El plasma humano libre de fármaco fue cedido por el Hospital General de Granollers.

### Aparatos y condiciones cromatográficas

La determinación de ritonavir y saquinavir se realizó mediante un cromatógrafo líquido Kontron<sup>®</sup> modelo 420 (Kontron Instruments) y en el caso de abacavir se empleó un Waters<sup>®</sup> modelo 600 (Waters Cromatografía), ambos equipados con inyector de muestras automático, detector

espectrofotométrico de longitud de onda variable y sistema automático de integración y registro de datos. El *software* utilizado para el tratamiento de los datos fue el SofKontron 450 y el Millennium versión 2.15.01.

El análisis cromatográfico de los tres antirretrovirales se realizó a temperatura ambiente con una columna Luna C18 fase reversa, 5  $\mu$ m, 150  $\times$  4,6 mm (Phenomenex<sup>®</sup>) y una precolumna C18 ODS, Octadecyl, 4  $\times$  3,0 mm (Phenomenex<sup>®</sup>). El detector UV-visible se monitorizó a una longitud de onda fija de 210 nm en ritonavir, a 240 nm en saquinavir y 285 nm en el caso de abacavir. El eluyente orgánico de la fase móvil fue acetonitrilo en los tres métodos, mientras que el acuoso fue tampón fosfato (54%, v/v) ajustado a pH 5 (70 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en ritonavir y saquinavir, mientras que en abacavir se empleó agua calidad HPLC (83%, v/v). La elución en los tres métodos de análisis fue isocrática y se realizó a un flujo de 1 ml/min.

### Preparación de soluciones madre, patrones de calibrado y patrones de control de calidad

Las soluciones madre de ritonavir y saquinavir (50  $\mu$ g/ml) se preparaban en metanol: agua (50/50, v/v). En abacavir (200  $\mu$ g/ml) el disolvente empleado fue agua calidad HPLC. Los patrones de calibrado se obtenían diluyendo las soluciones madre con un volumen adecuado de plasma libre de fármaco hasta obtener los niveles de concentración de la curva de calibrado dentro del rango seleccionado (200-2.500 ng/ml para ritonavir, 100-2.500 ng/ml para saquinavir y 50-2.500 ng/ml para abacavir). Los patrones de control de calidad se preparaban a partir de una pesada y solución madre distintas a las utilizadas para preparar los patrones de calibrado.

### Tratamiento de muestras

Previamente al análisis, las muestras de los tres antirretrovirales se sometían a un proceso de extracción líquido-líquido. En el caso de ritonavir y saquinavir el procedimiento empleado fue el siguiente: en un tubo de vidrio se mezclaba 1 ml de plasma que contenía una concentración conocida de principio activo con 1 ml de tampón borato 0,1 M, ajustándose a pH 10 con NaOH 0,1 M. A continuación se extraía con 5 ml de una mezcla de acetato de etilo-hexano (50/50, v/v), agitándose durante 10 min en un mezclador rotatorio. La fase acuosa se descartaba y la orgánica se transfería a un nuevo tubo para ser evaporada a sequedad en corriente de nitrógeno y a temperatura de 40 °C. El residuo seco se reconstituía con 260  $\mu$ l de fase móvil, de los que se inyectaban en el cromatógrafo 200  $\mu$ l. En abacavir al ml de plasma con principio activo se le añadían 8 ml de una mezcla de acetato de etilo-dietiléter (75/25, v/v) y se agitaba durante 10 min en un mezclador rotatorio. La fase orgánica transferida al nuevo tubo se

evaporaba a sequedad en corriente de nitrógeno y a 40 °C. En este caso el residuo seco se reconstituía con 140 µl de fase móvil y se inyectaban 80 µl.

### Validación de los métodos analíticos

El protocolo de validación de los métodos analíticos incluyó la realización de los ensayos de linealidad, precisión y exactitud intra- e interdía, recuperación y estabilidad<sup>6</sup>.

El ensayo de linealidad consistió en el análisis cromatográfico de cinco replicados de los mismos niveles de concentración de principio activo que para el cálculo de la curva de calibrado (patrones de calibrado). Dichos niveles distribuidos a lo largo del rango fueron 200, 400, 800, 1.250 y 2.500 ng/ml para ritonavir; 100, 250, 500, 1.000 y 2.500 ng/ml para saquinavir y 50, 100, 250, 1.000 y 2.500 ng/ml para abacavir. La linealidad se verificó mediante el tratamiento estadístico de los datos a través del coeficiente de correlación ( $r^2$ ), del error estándar de la pendiente y del análisis de la varianza (F) de la curva de regresión, ajustada por el método de los mínimos cuadrados.

Los ensayos de precisión y exactitud se basaron en el análisis de patrones de control de calidad de cada antirretroviral a tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del rango establecido. Se preparaban cinco replicados para cada nivel de concentración. Para el ensayo intradía, las muestras se analizaban el mismo día y para el interdía dicho análisis se repetía durante cinco días diferentes. La precisión se verificó mediante el coeficiente de variación porcentual (CV%) de la serie de medidas y la exactitud mediante el error relativo porcentual respecto al valor teórico (ER%).

La recuperación (medida de la eficacia del proceso de extracción) para cada uno de los antirretrovirales se estableció comparando la respuesta del área de los patrones de control de calidad extraídos con los no extraídos (concentración de estándar puro) y que representaban el 100% de la recuperación.

Con objeto de determinar la influencia de la temperatura en la estabilidad de los principios activos, desde su generación hasta su cuantificación, se prepararon patrones de control de calidad, los cuales se almacenaron a diferentes temperaturas. En concreto se analizaron patrones sobre los que se había aplicado tres ciclos de congelación/descongelación y patrones que habían estado almacenados durante tres meses a -20 °C. Además, debido a que previo a la manipu-

lación de muestras de pacientes infectados con el VIH se realiza una inactivación del virus a 57 °C y durante una hora, también se realizó dicho ensayo con objeto de conocer la estabilidad de los antirretrovirales a esa temperatura.

### Determinación del error analítico

Para la determinación de la función del error de cada uno de los métodos analíticos previamente validados se preparaban un mínimo de tres curvas de calibrado. Los patrones de calibrado se analizaban siguiendo el procedimiento de extracción y análisis desarrollado. Esta metodología se repitió durante seis días diferentes. Cada día y para cada patrón de la curva se obtenían los valores de las concentraciones experimentales y se determinaba la media y la desviación estándar. Posteriormente mediante análisis de regresión múltiple se buscaba la mejor funcionalización entre los valores de las desviaciones estándar (variable considerada como dependiente) y las concentraciones teóricas de la curva de calibrado (variable independiente). De esta forma el análisis se iniciaba con el polinomio de tercer grado, cuya ecuación general es:  $DE = A_0 + A_1 \cdot C + A_2 \cdot C^2 + A_3 \cdot C^3$ , donde la DE corresponde a la desviación estándar y C a los valores de concentración teóricos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cromatograma

Los tiempos de retención aproximados fueron de 8,3 min para ritonavir, de 6,4 min para saquinavir y 6,1 min para abacavir, observándose una respuesta para el antirretroviral cuantificable y distinguible de posibles interferencias que pudieran estar presentes en la muestra<sup>3,4</sup>.

### Ensayo de validación

Los resultados del ensayo de linealidad para los tres métodos analíticos desarrollados muestran una buena correlación entre el área y la concentración dentro del rango estudiado (Tabla I).

Los resultados de los ensayos de precisión y exactitud intra- e interdía para cada uno de los antirretrovirales se muestran en la tabla II. Respecto a la precisión intradía, el valor máximo de CV correspondió al patrón de control

**Tabla I.** Ensayo de linealidad para la cuantificación de ritonavir, saquinavir y abacavir en plasma humano

Antirretroviral	Curva de calibrado	$r^2$	Error estándar de la pendiente	F ratio	p
Ritonavir	$y = -0,383 + 0,012 C$	0,9900	$2,9 \cdot 10^{-4}$	1.784,1	0,0000
Saquinavir	$y = 0,076 + 0,017 C$	0,9933	$3,3 \cdot 10^{-4}$	2.653,9	0,0000
Abacavir	$y = 0,016 + 0,009 C$	0,9993	$5,1 \cdot 10^{-5}$	30.324,8	0,0000

$r^2$ : coeficiente de correlación; p: probabilidad.

de calidad de menor concentración (400 ng/ml) en ritonavir (10,1%), mientras que en saquinavir (9,5%) y abacavir (8,1%) correspondió al de mayor concentración, esto es a 1.000 y 2.500 ng/ml, respectivamente. Respecto a la precisión interdía, en los tres antirretrovirales se obtuvo un valor máximo de CV en el patrón de control de calidad de menor concentración (Tabla II).

Con relación a la exactitud intradía, el máximo ER en valor absoluto fue para el patrón de control de calidad de menor concentración en ritonavir (400 ng/ml, ER% de 4,9) y también en saquinavir (250 ng/ml, ER% de 7,0) y para el de concentración intermedia en abacavir (1.000 ng/ml, ER% de 3,0). En la exactitud interdía el máximo ER en valor absoluto se obtuvo en el patrón de control de calidad de concentración intermedia en ritonavir (1.250 ng/ml, ER% 5,0%) y saquinavir (500 ng/ml, ER% de 2,9) y en el de menor concentración en el caso de abacavir (250 ng/ml, ER% de 5,2).

El porcentaje de recuperación medio fue del 87% para ritonavir, del 90% para saquinavir y del 94% para abacavir. El límite de cuantificación se estableció en 200, 100 y 50 ng/ml para ritonavir, saquinavir y abacavir, respectivamente<sup>3,4</sup>.

En relación a los ensayos de estabilidad, los patrones de control de calidad almacenados a -20 °C durante tres meses permanecieron estables, obteniéndose valores de recuperación mayores del 96% respecto a la concentración inicial en todos los antirretrovirales ensayados. Por otro lado, tras tres ciclos de congelación/descongelación, los porcentajes de recuperación fueron mayores del 95% en todos los antirretrovirales. Finalmente las muestras sometidas durante 1 hora a 57 °C mostraron una recuperación mayor del 95,5%.

Los resultados obtenidos en los ensayos de validación confirman que los métodos analíticos desarrollados han sido convenientemente validados y podrán utilizarse para la determinación de una manera fiable y reproducible de

concentraciones plasmáticas, que se incluyan dentro de los rangos seleccionados, de ritonavir, saquinavir y abacavir.

### Función del error analítico

Las funciones del error analítico seleccionadas fueron las siguientes:  $DE = 39,98 + 2,40 \cdot 10^{-5}C^2$  para ritonavir,  $DE = 4,84 + 7,14 \cdot 10^{-2}C$  para saquinavir y  $DE = -1,072 + 3,70 \cdot 10^{-2}C$  para abacavir. Se observa que la función discriminada fue lineal en los métodos de análisis de saquinavir y también en el de abacavir, mientras que en ritonavir esta fue no lineal. Este hecho constata que la función del error analítico no se puede predecir *a priori*, siendo necesario determinarlo de forma individual para cada principio activo, método de análisis y técnica utilizados.

En el apartado de introducción se hacía referencia al empleo de los métodos de RNL en el tratamiento farmacocinético de niveles plasmáticos. En la actualidad, ya se piensa que no es discutible, el hecho de que es necesario recurrir para el análisis numérico, tanto en investigación formal como en cualquier otra situación, a las metodicas de RNL. En dichas metodicas, de indudable utilización, no sólo como clásicamente en temas de farmacocinética y bioquímica, se presentan tres problemas. El primero, la elección del algoritmo de búsqueda, el segundo, el establecimiento de los valores o estimas iniciales de los parámetros de búsqueda y el tercero, la elección de la metodica de ponderación (*weighting method*) de los resultados iniciales, que ahora no serán transformados, tal y como se hacía con las antiguas metodicas de regresión lineal (RL).

La problemática referente al método de ponderación es de singular importancia y puede llegar a tener, con facilidad, trascendencia clínica. En este sentido, basta citar la variación de hasta siete veces, que experimentó la semivida de eliminación de paracetamol, dependiendo de cuál fuera el sistema de ponderación utilizado<sup>7</sup>. Existen para

**Tabla II.** Ensayos de precisión y exactitud intra- e interdía para la cuantificación de ritonavir, saquinavir y abacavir en plasma humano

Antirretroviral	Intradía				Interdía		
	Concentración teórica (ng/ml)	Concentración experimental (ng/ml)	CV (%)	ER (%)	Concentración experimental (ng/ml)	CV (%)	ER (%)
Ritonavir	400	380,6	10,1	4,9	388,2	5,7	3,0
	1.250	1.296,3	8,4	-3,7	1.312,1	3,4	-5,0
	2.500	2.469,3	4,8	1,2	2.446,9	1,2	2,1
Saquinavir	250	267,4	3,8	-7,0	252,8	4,1	-1,1
	500	490,5	6,9	1,9	514,4	3,4	-2,9
	1.000	983,0	9,5	1,7	978,6	0,8	2,1
Abacavir	250	248,4	6,5	0,7	262,9	6,2	-5,2
	1.000	1.029,8	7,2	-3,0	997,6	5,1	-0,2
	2.500	2.471,1	8,1	1,2	2.487,8	5,9	0,5

CV(%):  $(DE/media) \times 100$ ; ER(%):  $[(concentración\ experimental - concentración\ teórica)/concentración\ teórica] \times 100$ .

intentar resolver esta problemática diferentes alternativas, de las cuales algunos investigadores, como ocurre en el caso de nuestro grupo, consideramos que es una buena opción emplear la función del error analítico de la metodología previamente validada, ya que este método nos explica, al menos, parte del error global que puede estar afectando a nuestro estudio experimental<sup>8,9</sup>. Otros autores<sup>10-12</sup> también emplean la función del error del método analítico como método de ponderación en el análisis farmacocinético de las concentraciones plasmáticas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Española de Farmacia Hospitalaria la ayuda económica concedida para la realización del trabajo que se presenta. Los autores también agradecen a los laboratorios farmacéuticos que nos proporcionaron los principios activos puros, en concreto a GlaxoSmithKline, Abbott Laboratorios y Roche Diagnostics GMBH, así como al Hospital General de Granollers por la donación del plasma.

## Bibliografía

1. Ventura-Cerdá JM, Alós-Almiñana M. Programa de atención farmacéutica a pacientes VIH con tratamiento antirretroviral: metodología y documentación. *Farm Hosp* 2004; 28 (Supl. 1): 72-9.
2. Iribarren JA, Labarga P, Rubio R, Berenguer J, Miró JM, Antela A, et al. por el Grupo de Estudio de Sida (GESIDA) y por el Consejo Asesor Clínico (CAC) del Plan Nacional sobre el SIDA (PNS) del Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC). Recomendaciones de GESIDA/PNS respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Diciembre 2005). [Citado en 30-06-06]. Disponible en: [http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/DcyRc\\_Recomendaciones-TAR-GESIDA-PNS.pdf](http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/DcyRc_Recomendaciones-TAR-GESIDA-PNS.pdf)
3. Albert V, Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. Determination of saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography and the analytical error function. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 114: 33-44.
4. Ferrer SM, Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. Determination of abacavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and the analytical error function. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 862-5.
5. Mariño-Hernández EL, Fernández-Lastra C, Modamio-Charles P. Desarrollo y tendencias recientes en farmacocinética clínica. *Farm Hosp* 1998; 22: 197-204.
6. Modamio P, Mariño EL. Análisis y control de muestras en matriz biológica. Validación de métodos bioanalíticos. Ejemplo práctico. En: Salazar Macian R, editor. Análisis y control de medicamentos. 1ª ed. L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona): Romargraf; 2005. p. 689-718.
7. Clements JA, Prescott LF. Data point weighting in pharmacokinetic analysis: Intravenous paracetamol in man. *J Pharm Pharmacol* 1976; 28: 707-9.
8. Jansat JM, Lastra CF, Mariño EL. Comparative study of different weighting methods in non-linear regression analysis: Implications in the parametrization of carbastine after intravenous administration in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36: 340-4.
9. Jelliffe R, Bayard D, Milman M, Van Guilder M, Schumitzky A. Achieving target goals most precisely using nonparametric compartmental models and "multiple model" design of dosage regimens. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 346-53.
10. Aumente-Rubio MD, Pérez-Suanes A, Panadero-Ruz MD, Álvarez-Aguilar J. Caracterización del modelo de error del ensayo TDx ciclosporina monoclonal en sangre total. *Farm Hosp* 1996; 20: 181-4.
11. Bondareva IB, Sokolov AV, Tischenkova IF, Jelliffe RW. Population pharmacokinetic modelling of carbamazepine by using the iterative Bayesian (IT2B) and the nonparametric EM (NPEM) algorithms: Implications for dosage. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26: 213-23.
12. Vinks AA, Den Hollander JG, Overbeek SE, Jelliffe RW. Population pharmacokinetic analysis of nonlinear behaviour of piperacillin during intermittent or continuous infusion in patient with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 541-7.