	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

## 1. OBJETIVO.

Establecer todos los parámetros necesarios para la cuantificación de los niveles séricos de fluconazol mediante la técnica de cromatografía líquida y la posterior validación de esta.

## 2. ALCANCE.

Este protocolo aplica desde la llegada de las muestras a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) con el objetivo de determinar niveles séricos de fluconazol, hasta reportar el resultado del análisis


## 3. RESPONSABILIDADES.

Es responsabilidad de los investigadores y/o equipo técnico aplicar correctamente este procedimiento acorde con las normas y recomendaciones fijadas en este documento. Además, es responsabilidad de la coordinación del Laboratorio o el investigador principal de algún proyecto si es el caso, verificar el cumplimiento de este.

## 4. GLOSARIO Y SIGLAS.

- Analito: Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis.
- Blanco de matriz biológica: Matriz biológica (normalmente sangre, plasma, suero u orina) libre de los analitos a cuantificar.
- Método Bioanalítico: Método destinado a la determinación de analitos presentes en matrices biológicas (normalmente sangre, plasma, suero u orina).
- Selectividad: Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.
- Límite de detección: Es la mínima cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.
- Validación: Obtención de pruebas documentadas de que un método es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

- Triazolico: se refiere a los compuestos químicos isoméricos con forma molecular C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub> los cuales forman un anillo pentagonal compuesto por dos carbonos y tres nitrógenos.
- Actividad antifúngica: se entiende por antifúngico o antimicótico a aquellas sustancias que son capaces de detener el crecimiento de un hongo o incluso erradicarlo.
- OQPV: Calificación de operación, certificación de verificación de desempeño.

## 5. CONTENIDO.

### 5.1 GENERALIDADES:


Una matriz biológica es un material de origen biológico que se puede muestrear y procesar de forma reproducible y en el cual se encuentra la sustancia de interés o analito. Entre estos materiales están los fluidos corporales o productos de excreción como sangre total, plasma, suero, saliva, orina, tejidos, entre otros (1).

Existen varias técnicas analíticas para el análisis de principios activos y/o de su metabolito(s) en matrices biológicas, incluyendo la cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectrofotometría, fluorometría, inmunoensayo y métodos radioisotópicos. La selección del método a utilizar dependerá de factores tales como las características fisicoquímicas del fármaco, la concentración que se desea medir, la cantidad y la naturaleza de la matriz biológica, la instrumentación disponible, el costo de cada ensayo y de las habilidades analíticas del personal del laboratorio (1).

La validación se puede definir como el establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos (2). En otras palabras, es la obtención de pruebas documentadas de que un método analítico es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

La validación de un método en el contexto bioanalítico conlleva a la aceptación de una serie de características propias derivadas de la dificultad que supone el hecho de tener que determinar analitos en muestras biológicas donde la matriz de análisis es muy compleja.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

En cromatografía líquida y cromatografía de gases, el tiempo de retención, se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima, se puede usar el tiempo de retención como un parámetro de identificación (3)

Dada la alta probabilidad de la aparición de falsos positivos y falsos negativos en este tipo de pruebas cualitativas, se hace necesario demostrar la validez a través de pruebas de desempeño (OQPV), que permitan asegurar con un alto grado de confianza la veracidad de los resultados, usando estándares de referencia.


Por su parte, El Fluconazol es un agente antimicótico de la familia de los azoles, usado en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y la meningitis criptocócica en pacientes inmunosuprimidos, y en la prevención de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas. El Fluconazol actúa inhibiendo la citocromo P450 de la enzima 14 $\alpha$ -Demetilasa. Esta inhibición previene la conversión de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana citoplasmática. Su Acción es netamente fungicida, pero puede actuar como fungistático para ciertos hongos microorganismos dependiendo de la dosis. Según la Bibliografía debido a la farmacocinética lineal del Fluconazol, la baja evidencia de toxicidad de este, a que la biodisponibilidad no se ve afectada por el consumo concomitante de alimentos y a que es un medicamento bien aceptado por los pacientes en el tratamiento de las micosis; no se recomienda realizar niveles séricos del Fluconazol, con excepción de pacientes con falla renal para los cuales se recomienda hacer un monitoreo de la función renal y los niveles del medicamento. Por tal motivo se sugiere realizar monitoreo terapéutico a este grupo de pacientes especialmente con el fin de asegurar niveles antifúngicos efectivos y evitar a su vez riesgos de toxicidad renal.

## 5.2 DESCRIPCIÓN

### 5.2.1 Principio del Método

El método se basa en la separación del metabolito (fluconazol), de todos los demás compuestos que estén presentes en la sangre, mediante métodos químicos como la precipitación de proteínas y procesos de filtración, y la posterior inyección a un sistema cromatográfico. La señal generada en el detector a un tiempo de retención determinado por un estándar de referencia puro, del compuesto de interés es interpretada en términos de concentración y con ello se hace una predicción de los niveles séricos del metabolito en la matriz biológica que en última instancia corresponderá a la concentración del metabolito en el paciente.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

### 5.2.2 Rango de Trabajo y disponibilidad

Los resultados estarán disponibles entre 2 a 5 días después de llegada la muestra.

El rango de trabajo está determinado por el parámetro de la linealidad, que va desde 0,625 hasta 80,0 µg/mL. Además, se debe establecer un cronograma de actividades acorde con las necesidades y disponibilidad de equipos.

### 5.2.3 Equipos, reactivos, materiales y elementos de protección

#### ✓ EQUIPOS

Tabla # 1: Equipos y su estado durante la estandarización y validación.

Equipo	Código Interno	Estado MP o OQPV
Cromatógrafo líquido	0978	OK
Balanza analítica	0676	OK
Baño ultrasonido	1071	OK
pH metro	0899	OK
Micropipetas	13007, 13014,13024	OK
Vortex	0547	OK
Centrifuga	0490	OK


\*MP: mantenimiento preventivo, OQPV: Calificación de operación, certificación de verificación de desempeño.

#### ✓ REACTIVOS

- a) Estándar Fluconazol (FCZ).
- b) Estándar Voriconazol (VCZ).
- c) Dimetilsulfóxido (DMSO).
- d) Acetonitrilo (ACN).
- e) Metanol (MetOH)
- f) Agua tipo I

#### ✓ MATERIALES

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

- a) Beakers de 250, 500 o 1000 mL.
- b) Balones volumétricos de 10,0 mL.
- c) Tubos Falcón tapa rosca.
- d) Tubos eppendorf para centrífuga.
- e) Puntas para micropipetas de 100, 200 y 1000 µL.
- f) Jeringas.
- g) Filtros y viales.

✓ **ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP)**

Tabla # 2: elementos de protección personal (EPP).


EPP	
Guantes	
Máscara	
Gafas	de protección
Bata	

#### 5.2.4 Puntos de control

Se deberá tener especial cuidado con el material de vidrio utilizado durante todo el proceso, especialmente con el que sea reutilizado, garantizando una total limpieza de este para no tener contaminaciones cruzadas. Adicionalmente, se recomienda trabajar en campanas con el fin de que todo proceso que se termine sea descartado o almacenado según necesidad y no afecte los procesos posteriores.

Al momento de preparar las soluciones madre, stock, curvas o muestras dopadas se deberá estar muy atento a las mediciones realizadas, ya sean pesos o volumetrías, verificar antes del proceso la balanza, micropipetas, pipetas volumétricas o cualquier elemento que se vaya a utilizar para realizar mediciones. Durante el proceso de la validación se tendrán como puntos de control los mismos tres niveles con los cuales se realizarán las pruebas de estabilidad, precisión y exactitud: nivel inferior (1.25), nivel intermedio (40.0µg/mL) y nivel superior (80,0µg/mL). Además, en el momento de realizar las determinaciones en pacientes se deberá preparar una curva de calibración en solución diluyente más

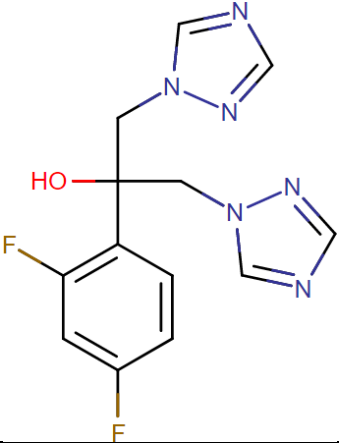
<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	IE-03-MM-0031
		VERSIÓN 01
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	16-08-2022


las soluciones a los tres niveles mencionados como control por día de trabajo.

### 5.2.5 Descripción del analito

**Tabla #3: Cuadro descripción del fluconazol y sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas**

Fluconazol (7-10)	
<b>Figura 1:</b> <b>Estructura química, Tomada de (7)</b>	
<b>Formula química</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O
<b>CAS</b>	86386-73-4
<b>Peso molecular</b>	306.2708 g/mol
<b>pKa</b>	1,76
<b>pKb</b>	2,56
<b>Solubilidad</b>	Dimetilsulfoxido (DMSO) 61,0 mg/L y en agua < 1,0mg/mL
<b>Matriz en que se encuentra</b>	Suero y plasma
<b>Rango terapéutico</b>	Entre 4,0 – 20,0 µg/mL


<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

<b>Absorción</b>	<p>Las propiedades farmacocinéticas de fluconazol son comparables después de la administración por vía intravenosa (IV) y oral (PO). En voluntarios sanos, la biodisponibilidad del fluconazol administrado por vía oral se mide por encima del 90%. Se absorbe ampliamente en el tracto gastrointestinal cuando se toma una dosis oral. La absorción oral no se ve afectada por la ingesta de alimentos con fluconazol, pero puede aumentar el tiempo hasta la concentración máxima. se alcanza Tmax (o el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima) en un estudio clínico de pacientes sanos que recibieron 50 mg / kg de fluconazol fue de 3 horas</p> <p>Las concentraciones plasmáticas máximas (Cmáx) en voluntarios sanos y en ayunas se producen entre 1 y 2 horas después de la</p>
------------------	--

<b>Fluconazol (7-10)</b>	
	<p>dosis. Las concentraciones en estado estacionario se alcanzan entre 5 y 10 días después de las dosis orales de 50-400 mg administradas una vez al día. La administración de una dosis de carga en el primer día de tratamiento con fluconazol, o el doble de la dosis diaria habitual, conduce a concentraciones plasmáticas cercanas al estado estacionario para el segundo día. El AUC medio (área bajo la curva) fue de 20,3 en voluntarios sanos que recibieron 25 mg. de fluconazol.</p>


<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	

<b>Distribución</b>	<p>Se dice que el volumen aparente de distribución es similar al volumen de distribución del agua corporal total. Un estudio clínico de voluntarios sanos a los que se les administró 50 mg / kg de fluconazol fue de 39L, basado en un peso corporal de 60 kg.</p> <p>El fluconazol muestra una penetración sustancial en muchos fluidos corporales, que es una propiedad que lo convierte en un tratamiento ideal para las infecciones fúngicas sistémicas, especialmente cuando se administra durante un tiempo más prolongado.</p> <p>El fluconazol se encuentra en altas concentraciones en el estrato córneo y la dermis-epidermis de la piel, además del sudor. Se encuentra que el fluconazol se acumula especialmente bien en el estrato córneo, lo cual es beneficioso en infecciones fúngicas superficiales. Se encontró que las concentraciones de saliva y esputo de fluconazol son similares a las concentraciones plasmáticas. En pacientes diagnosticados con meningitis micótica, los niveles de fluconazol (líquido ceforraquídeo) se miden en aproximadamente el 80% de los niveles plasmáticos correspondientes. Por lo tanto, fluconazol cruza la barrera hematoencefálica. Las meninges son cada vez más permeables al fluconazol en estados de inflamación, lo que facilita el tratamiento de la meningitis.</p> <p>La unión a proteínas del fluconazol es baja y se estima que es del 11 al 12%.</p>
<b>Metabolismo</b>	<p>El fluconazol se metaboliza mínimamente en el hígado. El fluconazol es un inhibidor de CYP2C9, CYP3A4 y CYP2C19. Se detectaron dos metabolitos en la orina de voluntarios sanos que tomaban una dosis radiomarcada de 50 mg de fluconazol; un metabolito glucuronidado en el resto hidroxilo (6.5%) y un metabolito de N-óxido de fluconazol (2%).</p> <p>El mismo estudio indicó que no se observaron signos de escisión metabólica de fluconazol, lo que sugiere una diferencia en el metabolismo en comparación con otros agentes de la misma clase de fármacos, que se metabolizan fuertemente en el hígado.</p>
<b>Excreción</b>	<p>En voluntarios normales, el fluconazol se elimina principalmente por excreción renal, con aproximadamente el 80% de la dosis administrada medida en la orina como fármaco inalterado.</p>

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---



	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>VERSIÓN 01</b>
		<b>16-08-2022</b>

<b>Fluconazol (7-10)</b>	
	<p>Aproximadamente el 11% de la dosis se excreta en la orina como metabolitos. Un estudio de una dosis de fluconazol radiomarcada de 50 mg reveló que el 93,3% de la dosis se encontró excretada en la orina.</p> <p>Una nota sobre insuficiencia renal</p> <p>La farmacocinética de fluconazol se ve significativamente afectada por la disfunción renal. Es posible que sea necesario reducir la dosis de fluconazol en pacientes con función renal disminuida. Un tratamiento de hemodiálisis de 3 horas reduce las concentraciones plasmáticas de fluconazol en aproximadamente un 50%</p>

### 5.2.6 Desarrollo del método

Se realizó una revisión de lo reportado en la literatura científica mundial sobre las técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de fluconazol en la matriz biológica, se elaboró un resumen de las condiciones cromatográficas de diferentes fuentes. Todas estas realizadas con diferentes fases móviles y preparaciones de muestra como precipitación de proteínas, extracción en fase solida (SPE) etc.


De acuerdo con dicha revisión, para este estudio se realizará la cuantificación de fluconazol en la matriz biológica por HPLC y se empleará para la preparación de muestras la precipitación de proteínas.

La metodología analítica a emplear para la cuantificación de fluconazol en la matriz biológica será evaluada y ajustada a las condiciones de la CIB y será validada por la Unidad de Micología Medica y Experimenta (MME) de la CIB.

La validación se realizará verificando si los resultados cumplen con las especificaciones estadísticas establecidas en las guías de validación de métodos bioanalíticos y con la flexibilidad que corresponde sin comprometer aspectos de calidad (2-6).

✓ Al iniciar el día de trabajo se deberá garantizar que el equipo y la columna estén en óptimas

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

condiciones por lo cual se realizará un lavado del sistema cromatográfico, purgando los canales del cromatógrafo y lavando la columna y la precolumna si es preciso.

Se procederá a realizar corridos de ensayo hasta optimizar los corridos cromatográficos.

### 5.3 TIEMPOS DE ANÁLISIS:

Preparación de curva de calibración, solución buffer y solución diluyente: 45 minutos

Preparación de biomuestras (1 bloque): 60 minutos

Duración de cada corrido en solución diluyente: 20,0 minutos

Duración de cada corrido en suero: 20,0 minutos

Corridos de ensayo: 3 (60 minutos)

#### 5.3.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

✓ Preparación de la solución de estándar interno (IS)

El estándar interno corresponde a una molécula que se asemeja en estructura, o actividad, o características fisicoquímicas. Para este caso vamos a utilizar como estándar control el fluconazol ya que cumple con estas características:


Pesar 2,0mg de voriconazol estándar primario. Disolver en 1,0mL de DMSO, para alcanzar una concentración de 2,0mg/mL. Agitar en vortex durante dos minutos y llevar a ultrasonido durante 5 minutos. Tomar 100 µL de esta solución y disolverlos en 900 µL de agua tipo I para una concentración final de 200 µg/mL. Esta solución final es utilizada como estándar interno (IS) para todos los ensayos.

✓ Preparar la curva de calibración en solución diluyente, plasma o en suero como se indica a continuación:

Pesar 8,0 mg de estándar primario de fluconazol y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 1,0mL de DMSO someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 8,0mg/mL (marcar como solución madre de fluconazol).

Tabla # 5: Preparación curva de calibración para análisis de fluconazol.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

Fluconazol (µg/mL)	PREPARACIÓN
80,0	Tomar 10µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 990uL de solución diluyente*.
40,0	Tomar 500µL de solución 80,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
20,0	Tomar 500µL de solución 40,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
10,0	Tomar 500µL de solución 20,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
5,0	Tomar 500µL de solución 10,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
2,5	Tomar 500µL de solución 5.0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
1,25	Tomar 500µL de solución 2.5µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.
0,625	Tomar 500µL de solución 1.25µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.

\* Solución diluyente: Acetonitrilo: H2O (18:82) o Suero según corresponda.

### 5.3.2 Preparación de las muestras de Control de Calidad

Prepare muestras de suero cargado a tres concentraciones diferentes (baja, media y alta) como se indica a continuación:


Tabla # 6: Preparación muestras de control para evaluar la calidad del método bioanalítico.

Realizar el proceso de extracción por duplicado como se indica a continuación en: (preparación de la muestra de ensayo).

CONCENTRACION (µg/mL)		PREPARACIÓN
Alta	80,0	Tomar 10,0µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicione 990uL de suero.
Media	40,0	Tomar 500µL de solución 80,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de suero.
Baja	1,25	Tomar 500µL de solución de 2,5 µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de Suero.

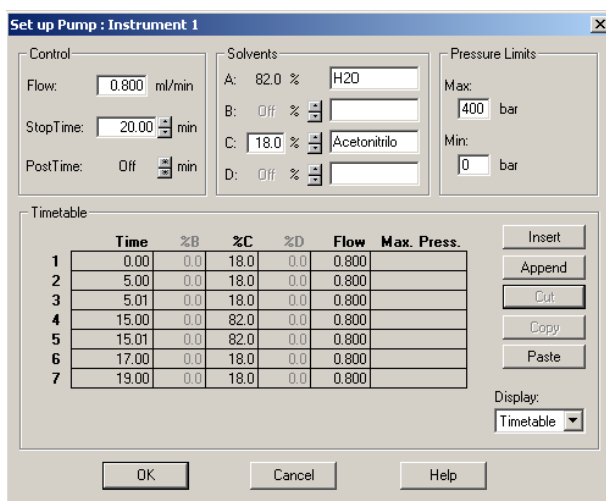
**5.3.3 Preparación de la muestra de ensayo (fluconazol en suero humano)** Tomar 150µL de muestra y adicionarlos a un tubo eppendorf para sedimentación que contenga: 0,5uL de solución

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>


estándar interno (IS) de voriconazol y 150µL de acetonitrilo. Agitar en vortex durante 30 segundos y posteriormente llevar a centrifuga a 14100 gravedades a 25°C durante 15.0 minutos. Filtrar el sobrenadante e inyectar 50 µL en el sistema cromatográfico.

<b>Tabla 7. Condiciones cromatográficas para la determinación sérica de fluconazol.</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Características</b>
Método	Gradiente: Ver figuras 2 y 3
Flujo	0,8 mL/minutos
Volumen de inyección	50 µL
Detección	UV; 210 nm.
Columna	Eclipse PLUS C18, 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm.
Precolumna	C18, 20 x 4,6 mm.
Temperatura de columna	25°C
Estándar interno (IS)	Voriconazol (VCZ)
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempo de retención (min)	PCZ: 8,125 ITZ: 21,810
Tiempo de corrido (min)	22.0 min



Figura#2 Método Gradiente Fluconazol.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

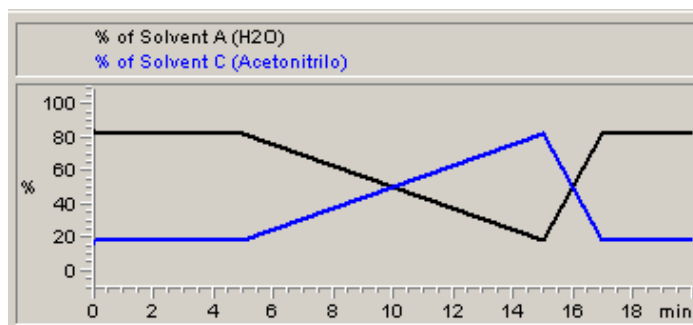


Figura #3 Grafico gradientes

## 5.4 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN


### 5.4.1 Selectividad – Especificidad

La selectividad se refiere a la capacidad del método para producir una respuesta para el analito de interés distinguible de todas las otras respuestas de los demás componentes de una mezcla potencialmente compleja (ICH Q2A, 1995). Un método analítico es específico para una sustancia determinada si garantiza que la magnitud medida es debida solamente a la sustancia objeto del análisis y si permite su cuantificación a partir de un parámetro fisicoquímico característico de la misma.

### 5.4.2 Procedimiento a seguir

- Analizar seis muestras blanco de la matriz biológica, las cuales deberán pertenecer a individuos distintos que no deben haber recibido tratamiento con el medicamento en cuestión.
- Aquellas muestras blanco que presenten una interferencia significativa ( $\geq 20\%$ ) de la respuesta del límite de cuantificación, deberán ser rechazadas.
- Si el número de muestras rechazadas es mayor al 10% del total de muestras blanco estudiada se debe analizar un nuevo lote de muestras.
- Comparar los cromatogramas representativos de dichos blancos con cromatogramas correspondientes al límite de cuantificación para examinar las señales obtenidas de cada caso.
- Evaluar la presencia de picos interferentes de un analito o metabolitos entre si y sobre el estándar interno en caso de que se utilice.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

✓ **Criterio de aceptación**

Las respuestas de los picos interferentes en los tiempos de retención de los analitos deberán ser menores del 20% de la respuesta del límite de cuantificación.

**5.4.3 Curva de calibración (linealidad)**

La curva de calibración de un método analítico es la relación existente entre la respuesta instrumental que produce un determinado analito y las concentraciones de este.

✓ **Procedimiento a seguir**

• **Preparación de la curva de calibración**

Realizar tres curvas de calibración con muestras patrón preparadas en la misma matriz que las muestras a cuantificar añadiendo concentraciones conocidas del/los analitos(s) y sometiéndolas al proceso de extracción y análisis.

Definir el rango de concentraciones en las cuales se va a trabajar. El rango vendrá determinado por las concentraciones esperadas en las muestras. En este caso el rango va desde los 0.25µg/mL hasta los 16.0µg/mL. Tomar como mínimo cinco muestras patrón distribuidas a lo largo del rango, junto con el blanco.

• **Determinación de la función respuesta**

Representar o graficar las respuestas de los patrones de calibrado en función de la concentración y hacer un análisis visual.


Obtener los parámetros característicos de la curva de calibración, esto es, el coeficiente de correlación, la ecuación de la curva, así como el error relativo porcentual (ER%) de cada uno de los patrones que forman la curva de calibración.

✓ **Modelo de cálculo**

$$ER\% = \left[ \frac{x^* - x_I}{x_i} \right]$$

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---



	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

establecido.

Realizar este procedimiento con cada una de las matrices que valla a utilizar.

✓ **Modelo de cálculo**

$$\%R = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100\%$$

$\bar{x}$ = valor medio

$\mu$ = valor verdadero

✓ **Criterio de aceptación**

La recuperación no es un parámetro relevante, está ligado a la sensibilidad y al límite de cuantificación, preferiblemente próxima al 100%, por lo tanto, al momento de realizar ensayos de precisión y exactitud inter laboratorio (transferencia de método), se deberá realizar este parámetro en cada uno de los equipos con el fin de determinar la capacidad de recuperación del método en cada uno de estos.

#### 5.4.5 Exactitud y precisión

La exactitud es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico (valor nominal).

La precisión es el grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio. La precisión y la exactitud deben valorarse a dos niveles: INTRAENSAYO e INTERENSAYO.

✓ **Procedimiento a seguir**


- Preparar una curva de calibración por cada día de trabajo, con la cual se estimarán las concentraciones de las muestras cargadas a tres concentraciones diferentes (alta, media y baja del rango de linealidad establecido) en la matriz biológica. Esto se debe realizar por triplicado.

Los niveles de concentración se establecen de la siguiente forma:

- Nivel bajo: inferior o igual a tres veces el límite de cuantificación
- Nivel medio: mitad del rango de concentración
- Nivel superior: entre el 75-100% del patrón de calibrado de mayor concentración.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---



	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

✓ **Modelo de cálculo**

• **Exactitud**

$$ER\% = \left( \frac{\text{Concentración media determinada} - \text{Concentración teórica}}{\text{Concentración teórica}} \right) \times 100$$

$$CV(\%) = \left( \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Concentración media determinada}} \right) \times 100$$

**Tablas 9 y 10 para Precisión y Exactitud Ínter ensayo.**


Realizar una tabla que corresponda a cada uno de los tres ensayos.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA	Relación de áreas	Concentración determinada	ER (%)
ALTA			
	Media		
	%CV		
MEDIA			
	Media		
	%CV		
BAJA			
	Media		
	%CV		

✓ **Precisión y Exactitud Ínter ensayo**

(n = 9, 3 ensayos)

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

<b>PRECISIÓN Y EXACTITUD INTERENSAYO</b> (n=9, 3 ensayos)		
Concentración teórica		Concentración determinada
	Media=	
	CV=	
	ER=	
	Media=	
	CV=	
	ER=	
	Media=	
	CV=	
	ER=	

✓ **Criterio de aceptación**

Error Relativo Porcentual (ER%): =  $\pm 15\%$

Coefficiente de Variación (%CV)  $\leq 15\%$

Para las concentraciones baja, media y alta.

✓ **Precisión y exactitud Inter-Laboratorio:**

Si aplica, se deberá seguir el mismo procedimiento de la precisión y exactitud inter e intra ensayo

✓ **Criterio de aceptación**

Los mismos criterios anteriores:

Error Relativo Porcentual (ER%): =  $\pm 15\%$

Coefficiente de Variación (%CV)  $\leq 15\%$

Para las concentraciones baja, media y alta.


**5.4.6 Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración de un analito que podemos determinar con una precisión y exactitud adecuadas.

✓ **Procedimiento a seguir**

- Preparar una curva de calibrado en suero que incluya tres niveles de concentración que se

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

suponen cercanos al límite de cuantificación.

- De esta curva de calibrado a concentraciones bajas extrapolar a concentración cero la ecuación, para obtener el valor medio de la señal ruido ( $Y_{bl}$ ).
- Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido ( $S_{bl}$ ), construir una recta tomando como ejes de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas.

Ecuación para determinar límite de cuantificación y límite de detección

$$CL = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{m * n^{1/2}}$$

Dónde:

$C_L$  = Concentración de analito en el límite de cuantificación o detección.

$K$  = Constante que usualmente se considera igual a 10 para el LC e igual a 3 para el LD

$Y_{bl}$  = Señal ruido correspondiente al valor del intercepto de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración de analito cercanas al límite de cuantificación esperado

$m$  = Pendiente de la curva de calibrado en suero obtenida en el estudio de la linealidad de analito.

$S_{bl}$  = Desviación estándar de la señal ruido correspondiente al valor del intercepto al extrapolar las desviaciones estándar de las respuestas a concentraciones cercanas al límite de cuantificación versus concentración.

$n$  = 3 número de réplicas.

#### 5.4.7 Estabilidad


Es un requerimiento básico la demostración de la estabilidad de la muestra y de los patrones durante el tiempo comprendido entre su preparación y la finalización del análisis.

#### ✓ Procedimiento a seguir

- **Estabilidad de las soluciones patrón.**

Evaluar la estabilidad de las soluciones patrón a concentraciones diferentes (alta, media y baja) y bajo diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente, nevera, congelador etc.).

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

- **Estabilidad durante el proceso de congelación / descongelación.**

Preparar tres muestras (baja, media y alta) y someterlas al proceso de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  o a la temperatura que estarán almacenadas las muestras analíticas. Una vez congeladas, se dejan descongelar hasta llegar a la temperatura ambiente. Realizar este proceso tres veces, realizándose el análisis por triplicado. (Tener en cuenta las condiciones reales en que se harán los bioanálisis, éstos deben definir qué criterio seguir)

- **Estabilidad del procesado de la muestra.**

Tomar tres alícuotas de cada una de las muestras patrón y mantenerlas a temperatura ambiente, o a la temperatura de trabajo, durante un periodo de tiempo igual o superior al que las muestras permanecerán a esta temperatura durante los análisis rutinarios (1, 2, y 3 días). Analizar comparando el valor obtenido con el teórico.

Así mismo, es aconsejable, trabajar la estabilidad tanto de las soluciones patrón como del analito en suero en el inyector automático.

El diseño de la estabilidad dependerá de las necesidades que se tengan en cada método bioanalítico. Además, se recomienda verificar la estabilidad a largo plazo, según la necesidad de método (5, 15 o 30 días).

✓ **Modelo de cálculo**

$$\%R = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100\%$$

$\bar{x}$  = valor medio

$\mu$  = valor verdadero

$\bar{X}$

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---


	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

Tabla 11: Estabilidad ciclos de congelación y descongelación de las muestras en suero o plasma.

Estabilidad después de varios ciclos de Congelación/Descongelación						
Concentración Teórica	Área BASAL	Ciclo de congelación / descongelación	Área	Recuperación relativa basal (%)	%CV	Promedio % CV
BAJA		Primero				
		Segundo				
		Tercero				
MEDIA		Primero				
		Segundo				
		Tercero				
ALTA		Primero				
		Segundo				
		Tercero				

#### ✓ Criterio de aceptación

CV(%) < 20% Aunque según FDA tiene un criterio de aceptación de hasta  $\pm$  el 20% de variación en este parámetro, nuestro laboratorio aceptará una variación máximo del 10%.


ER(%) Aunque según FDA tiene un criterio de aceptación de hasta  $\pm$  el 20% de error en este parámetro, nuestro laboratorio aceptará un error máximo del 10%.

#### 5.4.8 Cuantificación de muestras de los pacientes:

Al momento de llegar una muestra a la CIB para análisis de niveles plasmáticos o séricos de Voriconazol se deberá verificar: el estado, si conserva la cadena de frio, si se encuentra debidamente identificada y si su empaque se encuentra en buenas condiciones.

Luego se da inicio a la etapa bioanalítica, se procederá a la preparación de las muestras según el procedimiento bioanalítico anteriormente validado. Durante esta usará la curva de calibración correspondiente a la validación, además se utilizarán tres muestras control por duplicado, las cuales corresponden a los tres niveles determinados en la validación como bajo (0.25 $\mu$ g/mL), medio (8.0 $\mu$ g/mL) y alto (10 $\mu$ g/mL), correspondiendo esto a los controles utilizados durante el procesamiento de la muestra en estudio; tanto la curva como los controles se deberán preparar por cada lote de preparación de muestras. Con este procedimiento se lleva un control de la precisión y exactitud del método bioanalítico.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

**Tabla 12: Curva de calibrado**


Concentración teórica del patrón de calibrado (µg/mL)	Relación de áreas	Concentración determinada (µg/mL)	ER (%)	Curva de calibrado
0.125				
0.25				
0.5				$y = bx + a$
1.0				b =
2.0				a =
4.0				r =
8.0				
16.0				

**Tabla 13: Muestras patrón de control de calidad**

Concentración teórica (µg/mL)	Relación de áreas	Concentración determinada (µg/mL)	ER (%)
<b>0.25</b>	<b>Media %CV</b>		
<b>8.0</b>	<b>Media %CV</b>		
<b>16.0</b>	<b>Media %CV</b>		

Por último, con una regresión lineal se hará una predicción de la cantidad de metabolito en sangre o la concentración sérica de este. Y se procederá a elaborar un informe donde se consigne toda la información y el resultado de la prueba.


<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

## 6. DOCUMENTOS REFERENCIA:

1. Shargel, L., B. Andrew, and S. Wu-Pong, Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 2005: Appleton & Lange Reviews/McGraw-Hill, Medical. Pub. Division
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Validación de Métodos en Bioanálisis. Pag. 209 – 248. 2001.
3. Farmacopea de los estados unidos de América, USP 41 NF 36(2018), Cromatografía <621>, pág. 6802
4. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation (CDER). Guidance. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. U.S Department of Health and Human Services. May 2018.
5. ICH Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures: definitions and terminology, 1 June 1995.
6. EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011
7. DrugBank: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00196>
8. Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Jean-Baptiste Gordien.
9. High-performance liquid chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients, Journal of Chromatography B, 663 (1995) 345-351, C.H.W. Koks a'
10. An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study, Journal of Chromatography B, 852 (2007) 174–179, Sung-Su Kim.

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---

	<b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SERICOS DE FLUCONAZOL MEDIANTE CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b>	<b>IE-03-MM-0031</b>
	<b>VERSION 01</b>	
	<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>	<b>16-08-2022</b>

## 7. LISTADO DE FORMATOS

- ✓ Fólder con las hojas de trabajo de los pacientes.
- ✓ Fólder con el reporte de la medición de niveles séricos de los pacientes (resultados).
- ✓ Registro magnético de los pacientes (software victrix).
- ✓ Base de datos para cálculo de concentraciones sanguíneas.

## 8. CONTROL DE CAMBIO:

FECHA	RESPONSABLE	CAMBIO
05-08-2022	Juan Zapata	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Se modifica en el nombre del documento la palabra extracción por cuantificación.</li> <li>✓ En el Item 5.4.8 Cuantificación de muestras de los pacientes, se modifica: se debe preparar una curva de calibración en solución diluyente, por: Durante esta usará la curva de calibración correspondiente a la validación</li> </ul>

<b>ELABORÓ/CTUALIZÓ</b> <b>Nombre:</b> Juan David Zapata <b>Cargo:</b> DT de asuntos regulatorios <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>REVISÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022	<b>APROBÓ</b> <b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga <b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico <b>Fecha:</b> 05-08-2022
---	---	---