 <p>Corporación para Investigaciones Biológicas La ciencia al servicio de la vida</p>	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

1. OBJETIVO.

Establecer todos los parámetros necesarios para la cuantificación de los niveles séricos de etionamida 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 etionamida, 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. GLOSARIOS 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.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

Validación: Obtención de pruebas documentadas de que un método es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

Micobacteria: Es el único género de la familia de bacterias Mycobacteriaceae. Este género está formado por bacilos aerobios inmóviles no esporulados con un tamaño de entre 0.2 a 0.6 x 1 a 10µm, algunos de los cuales son altamente patógenos y pueden causar enfermedades graves en los mamíferos como lo son la Lepra y la tuberculosis. La mayoría de estas especies viven libremente en la tierra y en el agua; sin embargo, el mayor hábitat para algunos es el tejido de huéspedes infectados de sangre caliente.

Hepatotoxicidad: En general se refiere a un daño en el hígado, por lo general se asocia al uso de medicamentos hepatotóxicos o que puedan generar esta condición en el hígado, incluso usándolos en dosis terapéuticas algunos medicamentos tienen esta particularidad.

OQPV: Calificación de operación, certificación de verificación de desempeño. 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, fluorimetría, 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

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

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.


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, La etionamida hace parte de los antimicobacterianos de segunda línea. Pertenece al grupo de las piridinas y sus derivados (derivado del ácido isonicotínico), ya que contiene en su estructura un anillo piridínico y con actividad sobre varias micobacterias entre ellas: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, y *M. avium-intracellulare*.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de ácido micólico, componente fundamental de la pared celular bacteriana y solo es efectiva en la fase de replicación celular de la micobacteria, momento en el cual, la producción de material básico de la pared celular es esencial. Sin embargo, su efecto podría tardarse un par de replications celulares antes de comenzar a mostrar resultados. Es recomendado para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar cuando los antituberculosos de primera elección han fallado en la terapia. Además, es altamente usado en el tratamiento de la lepra. Este medicamento generalmente se suministra en combinación con otros antimicobacterianos como rifampicina, pirazinamida o etambutol para el tratamiento de la tuberculosis.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

La etionamida, al igual que la protonamida y la pirazinamida, son derivados del ácido nicotínico relacionado a la isoniazida, por lo cual, se cree que la etionamida presenta una transformación intracelular y actúa igual que la isoniazida. Puede considerarse bacteriostático o bactericida dependiendo de la concentración utilizada que llega al sitio de infección y de la susceptibilidad del agente patógeno.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad antigua que ha cobrado la vida de un sinnúmero de personas a través del tiempo. Se ha encontrado evidencia patológica en momias egipcias. La OMS estima que cada año hay alrededor de 9 millones de casos nuevos y que 1.5 millones mueren anualmente por TB, lo que la convierte en la segunda causa principal de muerte después del VIH/AIDS.

Como todos los medicamentos, puede provocar efectos secundarios, entre ellos molestias digestivas, somnolencia, mareo, dolor de cabeza y en ocasiones hepatitis o elevación de las enzimas hepáticas. Entre los efectos secundarios sobre el sistema endocrinológico se ha detectado en ocasiones la aparición de ginecomastia, pérdida del cabello, acné, impotencia, ciclo menstrual irregular e hipotiroidismo.


Se recomienda hacer un seguimiento a las concentraciones del medicamento en sangre, como herramienta para la toma de decisiones que ayuden a una buena terapia farmacológica y la disminución de eventos adversos y falla terapéutica.

5.2 DESCRIPCIÓN

✓ **Principio del Método**

El método se basa en la separación del metabolito (etionamida), 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

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

matriz biológica que en última instancia corresponderá a la concentración del metabolito en el paciente.

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 0,15625 hasta 20,0 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 liquido	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 etionamida (ETH).
- b) Estándar voriconazol (VCZ).
- c) Acetonitrilo (ACN)
- d) Ácido trifluoroacético (TFA).
- e) Dimetilsulfóxido (DMSO)

✓ MATERIALES

- a) Beakers de 250, 500 o 1000 mL.
- b) Balones volumétricos de 10,0 mL.
- c) Tubos Falcón tapa rosca.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

- d) Tubos eppendorf para centrifuga.
- e) Puntas para micropipetas de 100, 200 y 1000 μ L.
- 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.

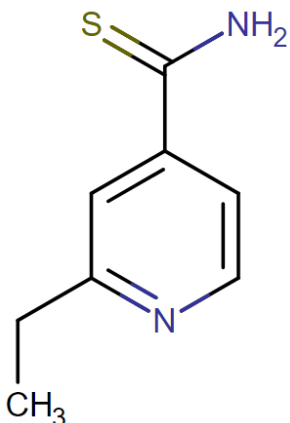
Durante el proceso de la validación se tendrán como puntos de control los mismos tres niveles con los cuales se realizarán las pruebas de estabilidad, precisión y exactitud: nivel inferior (0.15625), nivel intermedio (10.0 μ g/mL) y nivel superior (20,0 μ g/mL). Además, en el momento de realizar las determinaciones en pacientes se deberá preparar una curva de calibración en solución diluyente más las soluciones a los tres niveles mencionados como control por día de trabajo.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---


	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

5.2.5 Descripción del analito

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

Etionamida (7-10)	
Figura 1: Estructura química, Tomada de (7)	
Formula química	C ₈ H ₁₀ N ₂ S
CAS	536-33-4
Peso molecular	166.243g/mol
pKa	1,88
Solubilidad	Dimetilsulfoxido (DMSO) = 34mg/mL y en agua 1,0mg/mL
Matriz en que se encuentra	Suero y plasma
Rango terapéutico	Entre 1,0 a 5,0 µg/mL
Absorción	Esencialmente absorbido completamente después de la administración oral y no sometido a ningún metabolismo apreciable de primer paso. Biodisponibilidad aproximadamente 100%.
Distribución	La etionamida se distribuye ampliamente en el cuerpo, con un volumen promedio de distribución después de la administración oral de 93,5 L en voluntarios sanos
Metabolismo	Hepático y extenso. Metabolizado al sulfito de metabolito activo, y varios metabolitos inactivos. Se ha demostrado que el metabolito sulfóxido tiene actividad antimicrobiana contra Mycobacterium tuberculosis.
Excreción	Menos del 1% de la dosis oral se excreta como etionamida en la orina. La etionamida se metaboliza ampliamente en metabolitos activos e inactivos.
Toxicidad	Los síntomas de sobredosis incluyen convulsiones, náuseas y vómitos.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

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 etionamida 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 la revisión anterior para este estudio se realizará la cuantificación de etionamida 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 etionamida 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 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: 30 minutos

Preparación de biomuestras (1 bloque): 40 minutos

Duración de cada corrido en solución diluyente: 15,0 minutos


Duración de cada corrido en suero: 15,0 minutos

Corridos de ensayo: 3 (50 minutos)

5.3.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

✓ Preparación de la solución de estándar interno (IS)

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

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 posaconazol ya que cumple con estas características:

Pesar 4,0mg de voriconazol estándar primario. Disolver en 4,0mL de DMSO, para alcanzar una concentración de 1,0mg/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 100 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 5,0 mg de estándar primario de etionamida y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 5,0mL de DMSO, someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 1,0mg/mL (marcar como solución madre de etionamida).

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

Etionamida (µg/mL)	PREPARACIÓN
20,0	Tomar 20µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 980uL 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: H2O: ACN 70:30 o Suero según corresponda.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

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.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)		PREPARACIÓN
Alta	20,0	Tomar 20,0µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicione 980uL de suero.
Media	10,0	Tomar 500µL de solución 20,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de suero.
Baja	0,125	Tomar 500µL de solución de 0,25µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de Suero.


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

5.3.3 Preparación de la muestra de ensayo (Etionamida en suero humano)

Tomar 150µL de muestra y adicionarlos a un tubo eppendorf para sedimentación que contenga: 1uL de solución estándar interno (IS) de voriconazol y adicionar 149µL de ACN. 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.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para la determinación sérica de etionamida.	
Parámetro	Características
Método	H2O: ACN 70:30
Flujo	1,0 mL/minutos
Volumen de inyección	50 µL
Detección	UV; 275 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)	ETH: 3,23 VCZ: 12,6
Tiempo de corrido (min)	15.0 min

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

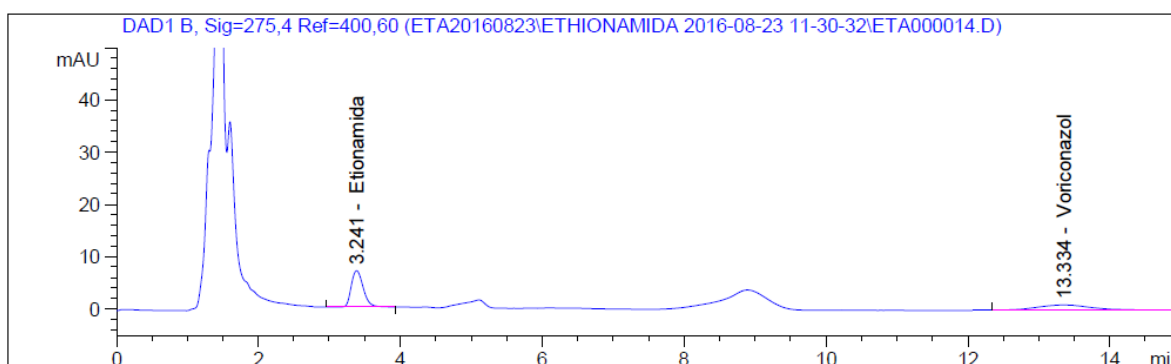
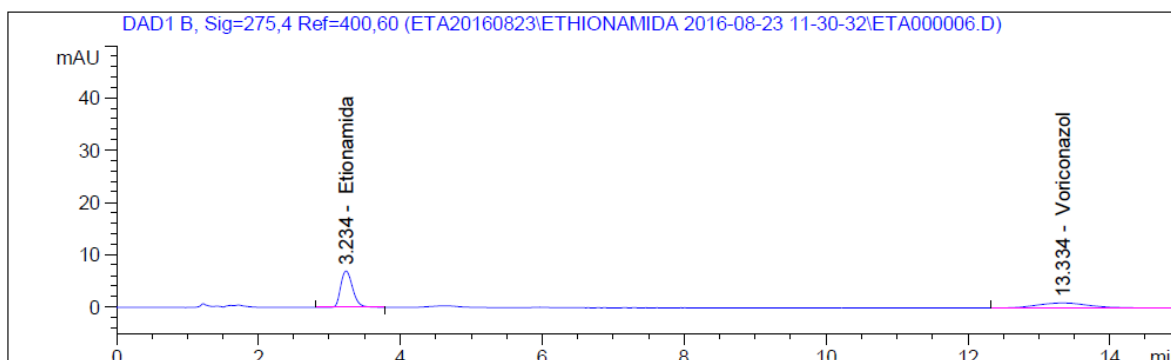


Figura 2: Cromatograma típico etionamida: A) curva de etionamida en solución diluyente, B) Curva de etionamida en solución matriz (suero o plasma)

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.

✓ **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.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

- 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.

✓ **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.

5.4.2 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 analito(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 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta los 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

✓ **Procedimiento a seguir**

Comparar la respuesta del analito extraído en una muestra biológica con la respuesta de la misma cantidad de analito sin extraer (recuperación del 100%).

Determinar la recuperación a tres concentraciones distintas (baja, media y alta) estimarán el rango 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

μ = 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.

✓ **5.4.4 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

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

- Nivel superior: entre el 75-100% del patrón de calibrado de mayor concentración.

✓ **Modelo de cálculo**

- **Exactitud**

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

- **Precisión**

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

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)

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

PRECISIÓN Y EXACTITUD INTERENSAYO (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.

✓ **5.4.5 Límite de cuantificación**

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

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

✓ **Procedimiento a seguir**

- Preparar una curva de calibrado en suero que incluya tres niveles de concentración que se 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 abcisas las concentraciones estudiadas.

Ecuación para determinar límite de cuantificación y límite de detección

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

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.


✓ **5.4.6 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.**

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

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.).

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

Preparar tres muestras (baja, media y alta) y someterlas al proceso de congelación a -20°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

μ = valor verdadero

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

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

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 ± el 20% de variación en este parámetro, nuestro laboratorio aceptará una variación máxima del 10%.

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

✓ **5.4.7 Cuantificación de muestras de los pacientes:**

Al momento de llegar una muestra a la CIB para análisis de niveles plasmáticos o séricos de etionamida se deberá verificar: el estado, si conserva la cadena de frío, 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 etapa se deberá preparar una curva de calibración en solución diluyente, además se utilizarán tres muestras control por duplicado, las cuales corresponden a los tres niveles determinados en la validación como bajo (0.25µg/mL), medio (8.0µg/mL) y alto (10µg/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.

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 - 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---


	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	VERSIÓN 01
		01-02-2023

Tabla 12: Curva de calibrado

Concentración teórica del patrón 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 (%)
0.25	Media		
	%CV		
8.0	Media		
	%CV		
16.0	Media		
	%CV		

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.

5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Shargel, L., B. Andrew, and S. Wu-Pong, Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 2005: Appleton & Lange Reviews/McGraw-Hill, Medical. Pub. Division
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Validación de Métodos en Bioanálisis. Pag. 209 – 248. 2001.
- Farmacopea de los estados unidos de América, USP 41 NF 36(2018), Cromatografía <621>, pág. 6802

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---

	INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACION DE NIVELES SERICOS DE ETIONAMIDA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)	IE-03-MM-0032
		VERSIÓN 01
	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS	01-02-2023

- 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.
- ICH Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures: definitions and terminology, 1 June 1995.
- EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011
- DrugBank: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00609> recuperado el 28-04-2020
- Improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ethionamide in serum, Journal of Chromatography, 563 (1991) 412-475 Biomedical Applications Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, CHARLES A. PELOQUIN.
- Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis, Springer International Publishing Switzerland 2014, Abdullah Alsultan • Charles A. Peloquin
- Gilman's, & Goodman. (2018). The Pharmacological Basis of Therapeutics. United States of America: McGraw-Hill Education.

6. LISTA DE REGISTROS

- ✓ 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.

7. ANEXOS: N/A

8. CONTROL DE CAMBIO:

FECHA	RESPONSABLE	CAMBIO

ESTE DOCUMENTO IMPRESO ES UNA COPIA NO CONTROLADA
Para ver el documento controlado ingrese <https://n9.cl/292ol>

ELABORÓ/ACTUALIZÓ Nombre: Juan David Zapata Serna Cargo: DT de asuntos regulatorios Fecha: 31-01-2023	REVISÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 1 – 02 - 2023	APROBÓ Nombre: Alejandra Zuluaga Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico Fecha: 01-02-2023
--	--	---