

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

## 1. OBJETIVO.

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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

**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.

**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.

## 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, 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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

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. 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 Isoniazida es el medicamento de elección para el tratamiento de pacientes con tuberculosis, enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Debido a su eficacia y bajo costo, es el medicamento más importante en la lucha contra la infección pulmonar contagiosa más prevalente actualmente en el mundo. Puede ser usada sola o en combinación con otros medicamentos tales como Rifampicina, Piracinamida, Etionamida o Etambutol para el tratamiento de la Tuberculosis.

La Isoniazida actúa inhibiendo el proceso de síntesis de ácido micólico en la pared micobacteriana y solo es efectiva en la fase de replicación celular de la micobacteria,

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

momento en el cual la producción de material básico de la pared celular es esencial. Sin embargo, su efecto podría tardarse un par de replicaciones celulares antes de comenzar a mostrar resultados. Se han reportado casos de hepatotoxicidad lo cual está muy asociado a la edad del paciente y al consumo frecuente de alcohol, además, a problemas renales, problemas en el sistema nervioso central y problemas de visión. Por tal motivo se sugiere realizar un monitoreo terapéutico permanente de este medicamento con el fin de asegurar niveles del medicamento efectivos y evitar a su vez riesgos de toxicidad.

## 5.2 DESCRIPCIÓN

### ✓ **Principio del Método**

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

### 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 0,078125 hasta 20,0 µg/mL (78,125 hasta 20000,0 ng/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               |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

|                   |                     |    |
|-------------------|---------------------|----|
| 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 Isoniazida (INH).
- b) Estándar Emtricitabina (FTC).
- c) Ácido Trifluoroacético (TFA)
- d) Dimetilsulfóxido (DMSO).
- e) Acetonitrilo (ACN).
- f) Buffer Acetato de amonio (0.5 M pH 8.20)
- g) Agua tipo I

✓ **MATERIALES**

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

|            |
|------------|
| <b>EPP</b> |
| Guantes    |
| Máscara    |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

|                     |
|---------------------|
| 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.

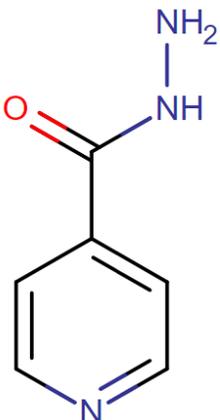
Durante el proceso de la validación se tendrán como puntos de control los mismos tres niveles con los cuales se realizarán las pruebas de estabilidad, precisión y exactitud: nivel inferior (0.15625), nivel intermedio (10.0µg/mL) y nivel superior (20,0µg/mL). Además, en el momento de realizar las determinaciones 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.

### 5.2.5 Descripción del analito

**Tabla #3: Cuadro descripción de la isoniazida y sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas**

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

| Isoniazida (7-13)                                  |  |
|--|--|
| <b>Figura 1: Estructura química, Tomada de (7)</b> |   |
| <b>Formula química</b>                             | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O   |
| <b>CAS</b>   | 54-85-3  |
| <b>Peso molecular</b>                              | 137.1393 g/mol   |
| <b>pKa</b>   | 1,82   |
| <b>Solubilidad</b>                                 | Dimetilsulfoxido (DMSO) >28mg/mL y en agua 34,9mg/mL   |
| <b>Matriz en que se encuentra</b>                  | Suero y plasma   |
| <b>Rango terapéutico</b>                           | Entre 1,0 a 5,0 µg/mL  |
| <b>Absorción</b>                                   | Fácilmente absorbido después de la administración oral; sin embargo, puede sufrir un metabolismo significativo de primer paso. La absorción y la biodisponibilidad se reducen cuando la isoniazida se administra con alimentos   |
| <b>Distribución</b>                                | Volumen de distribución (Vd) = ND y fijación a proteínas plasmáticas < 10%   |
| <b>Metabolismo</b>                                 | Principalmente hepático. La isoniazida es acetilada por la N-acetil transferasa a N-acetilisoniazida; luego se biotransforma en ácido isonicotínico y monoacetilhidrazina. La monoacetilhidrazina se asocia con hepatotoxicidad mediante la formación de un metabolito intermedio reactivo cuando N-hidroxilado por el sistema de citocromo P450 oxidasa mixta. La tasa de acetilación está determinada genéticamente. Los acetiladores lentos se caracterizan por una relativa falta de N-acetiltransferasa hepática. |
| <b>Excreción</b>                                   | Del 50 al 70 por ciento de una dosis de isoniazida se excreta en la orina dentro de las 24 horas   |
| <b>Toxicidad</b>                                   | DL50 100 mg / kg (Humano, oral). Las reacciones adversas incluyen erupción cutánea, pruebas de función hepática anormales, hepatitis, neuropatía periférica, efectos leves del sistema nervioso central (SNC). In vivo, la isoniazida  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br>Nombre: Juan David Zapata Serna<br>Cargo: DT de Asuntos Regulatorios<br>Fecha: 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br>Nombre: Alejandra Zuluaga<br>Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico<br>Fecha: 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br>Nombre: Alejandra Zuluaga<br>Cargo: Coordinadora IPS Diagnóstico<br>Fecha: 15-11-2022 |
|---|--|--|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>15-11-2022</b>    |

| Isoniazida (7-13) |   |
|-------------------|---|
|                   | reacciona con piridoxal para formar una hidrazona y, por lo tanto, inhibe la generación de fosfato de piridoxal. La isoniazida también se combina con fosfato de piridoxal; dosis altas interfieren con la función de la coenzima de este último. |

### 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 isoniazida 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 sólida (SPE) etc.

De acuerdo con la revisión anterior para este estudio se realizará la cuantificación de isoniazida 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 isoniazida en la matriz biológica será evaluada y ajustada a las condiciones de la CIB y será validada por la Unidad de Micología Médica y Experimental (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 bioanalítico 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: 45 minutos

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

Preparación de biomuestras (1 bloque): 60 minutos

Duración de cada corrido en solución diluyente: 13,0 minutos

Duración de cada corrido en suero: 13,0 minutos

Corridos de ensayo: 3 (50 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 posaconazol ya que cumple con estas características:

Pesar 3,0mg de Emtricitabina estándar primario. Disolver en 3,0mL de Agua tipo I, para alcanzar una concentración de 1,0mg/mL. Agitar en vortex durante dos minutos y llevar a ultrasonido durante 5 minutos. Tomar 100  $\mu$ L de esta solución y disolverlos en 900  $\mu$ L de agua tipo I para una concentración final de 100  $\mu$ g/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 3,0 mg de estándar primario de Isoniazida y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 3,0mL de agua tipo I, someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 1,0mg/mL (marcar como solución madre de isoniazida).

Tabla # 4: Preparación curva de calibración para análisis de isoniazida.

| Isoniazida ( $\mu$ g/mL) | PREPARACIÓN  |
|--------------------------|--|
| 20,0                     | Tomar 10 $\mu$ L de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 990uL de solución diluyente*.            |
| 10,0                     | Tomar 500 $\mu$ L de solución 20,0 $\mu$ g/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*. |
| 5,0                      | Tomar 500 $\mu$ L de solución 10,0 $\mu$ g/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*. |
| 2,5                      | Tomar 500 $\mu$ L de solución 5,0 $\mu$ g/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.  |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

|          |   |
|----------|---|
| 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*.    |
| 0,3125   | Tomar 500µL de solución 0.625µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.   |
| 0,15625  | Tomar 500µL de solución 0.3125µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*.  |
| 0,078125 | Tomar 500µL de solución 0.15625µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de solución diluyente*. |

\* Solución diluyente: Buffer acetato de amonio (0.5 M pH 8.20) 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 # 5: Preparación muestras de control para evaluar la calidad del método bioanalítico.

| CONCENTRACIÓN (µg/mL) |         | PREPARACIÓN  |
|-----------------------|---------|--|
| Alta                  | 20,0    | Tomar 10,0µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicione 990uL de suero.         |
| Media                 | 10,0    | Tomar 500µL de solución 20,0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de suero.      |
| Baja                  | 0,15625 | Tomar 500µL de solución de 0,3125µg/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 (Isoniazida en suero humano)

Tomar 300µL de muestra y adicionarlos a un tubo eppendorf para sedimentación que contenga: 1uL de solución estándar interno (IS) de emtricitabina y adicionar 30µL de ácido trifluoroacético. 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 10 µL en el sistema cromatográfico.

**Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la determinación sérica de isoniazida.**

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

| Parámetro                 | Características   |
|---------------------------|---|
| Método                    | Isocrático 15:85 (acetonitrilo: agua)                     |
| Flujo                     | 1,2 mL/minutos  |
| Volumen de inyección      | 10 µL   |
| Detección                 | UV; 275 nm.   |
| Columna                   | Eclipse PLUS C18, 250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm. |
| Precolumna                | C18, 20 x 4,6 mm.   |
| Temperatura de columna    | 30°C  |
| Estándar interno (IS)     | Emtricitabina(FTC)  |
| Unidades de concentración | µg/mL   |
| Tiempo de retención (min) | INH: 4,3<br>FTC: 6,3                                      |
| Tiempo de corrido (min)   | 8.0 min   |

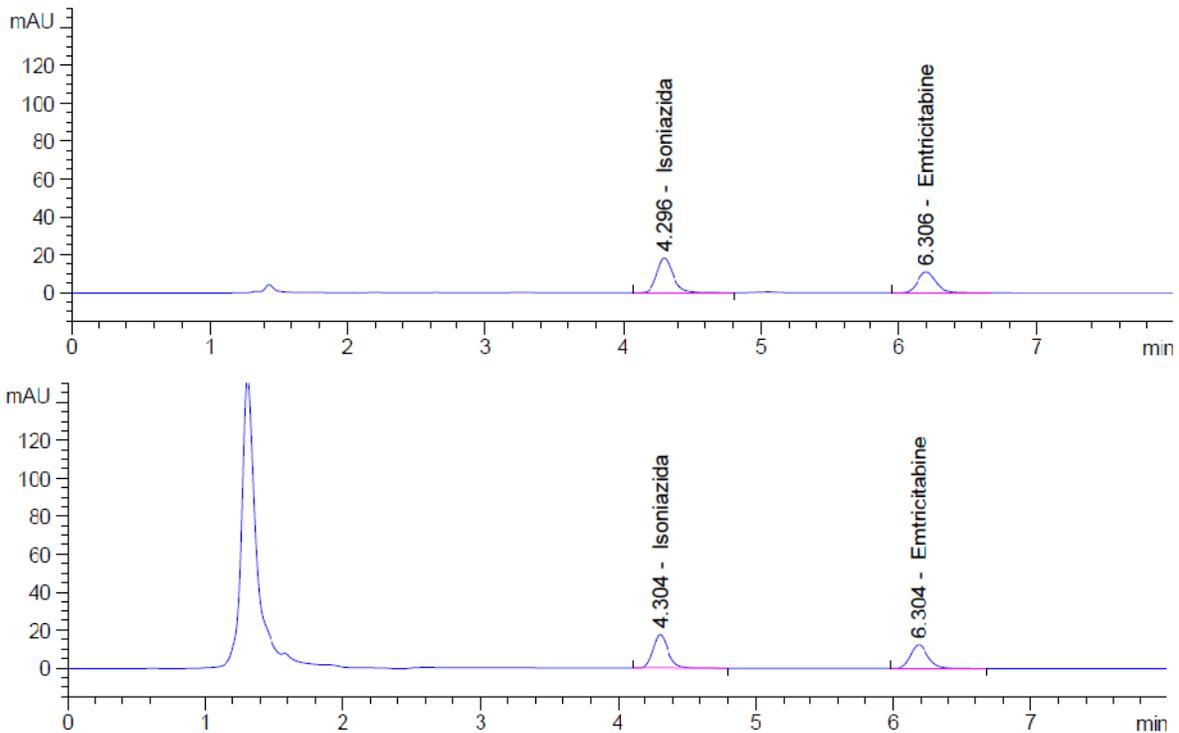


Figura 2: Cromatograma típico isoniazida: A) curva de isoniazida en solución diluyente, B) Curva de isoniazida en solución matriz (suero o plasma)

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

## 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.
- 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.

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|



|   |   |  |
|---|---|--|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b>                       |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b><br><br><b>15-11-2022</b> |

| Parámetro | Recta 1 | Recta 2 | Recta 3 |
|-----------|---------|---------|---------|
| a         |         |         |         |
| b         |         |         |         |
| r         |         |         |         |
| R2        |         |         |         |

- **Criterio de aceptación**

El ER% de cada uno de los patrones presentes en las curvas de calibración no deberá ser superior al  $\pm 15\%$  de la concentración nominal, excepto para el límite de cuantificación que podrá ser como máximo del 20%. Este criterio deberá cumplirse para al menos 2/3 de los patrones de calibración de cada una de las curvas, incluyendo el límite superior e inferior del rango.

#### 5.4.3 Recuperación

La recuperación, se define como la eficacia en la extracción del analito a partir de la matriz biológica.

- ✓ **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

$\mu$ = 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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

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
- 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**

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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

**Tablas 8 y 9 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)

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

✓ **Criterio de aceptación**

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

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

Para las concentraciones baja, media y alta.

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

✓ **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.

✓ **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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

$m$  = 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.**

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  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

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

Tabla 10: 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 ± 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 ± el 20% de error en este parámetro, nuestro laboratorio aceptará un error máximo del 10%.

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

#### 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 isoniazida 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.

**Tabla 11: 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 12: Muestras patrón de control de calidad**

| Concentración teórica (µg/mL) | Relación de áreas | Concentración determinada (µg/mL) | ER (%) |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------|
| <b>0.25</b>                   | <b>Media</b>      |                                   |        |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>VERSIÓN 01</b>    |
|   |   | <b>15-11-2022</b>    |

|            |              |  |  |
|------------|--------------|--|--|
|            | <b>%CV</b>   |  |  |
| <b>8.0</b> | <b>Media</b> |  |  |
|            | <b>%CV</b>   |  |  |
| 16.0       | <b>Media</b> |  |  |
|            | <b>%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.

## 6. DOCUMENTOS DE 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/DB00951> recuperado el 23-01-2020
8. Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. Drugs. 2002; 62:2169\_83.

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|

|   |   |                      |
|---|---|----------------------|
|  | <b>INSTRUCTIVO DE ENSAYO PARA LA MEDICIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE ISONIAZIDA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)</b> | <b>IE-03-MM-0035</b> |
|   | <b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>  | <b>15-11-2022</b>    |

9. F. Fahimi, Isoniazid, rifampicin and pyrazinamide plasma concentrations 2 and 6 h post dose in patients with pulmonary tuberculosis, INT J TUBERC LUNG DIS 17(12):1602–1606, © 2013 The Union
10. Jian Xu, Oral Bioavailability of Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, and Pyrazinamide in a 4-Drug Fixed-Dose Combination Compared with the Separate Formulations in Healthy Chinese Male Volunteers, Clinical Therapeutics/Volume 35, Number 2, 2013
11. Elizabeth C. Barroso, Serum Concentrations of Rifampin, Isoniazid, and Intestinal Absorption, Permeability in Patients with Multidrug Resistant Tuberculosis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 81(2), 2009, pp. 322–329
12. E. Calleri, Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
13. Gilman's, & Goodman. (2018). The Pharmacological Basis of Therapeutics. United States of America: McGraw-Hill Education.

## 7. 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.

## 8. ANEXOS: NA

## 9. CONTROL DE CAMBIO:

| FECHA | RESPONSABLE | CAMBIO |
|-------|-------------|--------|
|       |             |        |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>ELABORÓ/ACTUALIZÓ</b><br><b>Nombre:</b> Juan David Zapata Serna<br><b>Cargo:</b> DT de Asuntos Regulatorios<br><b>Fecha:</b> 11-11-2022 | <b>REVISÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 | <b>APROBÓ</b><br><b>Nombre:</b> Alejandra Zuluaga<br><b>Cargo:</b> Coordinadora IPS Diagnóstico<br><b>Fecha:</b> 15-11-2022 |
|--|---|---|