	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 1 de 13

Elaboró Juan David Zapata Serna	Cargo: Químico Farmacéutico.	Revisó: David Granada	Cargo: Químico.	Aprobó Luz Elena Cano Tonny Naranjo Preciado.	Cargo: Jefe Grupo MME Investigador Principal

1. OBJETIVO.

Establecer todos los parámetros necesarios para la cuantificación de los niveles séricos de Efavirenz mediante la técnica de cromatografía líquida.

2. ALCANCE.

Este protocolo será aplicado a todas las muestras que lleguen a la Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB - con el objetivo de determinar niveles séricos de Efavirenz.

3. NOTAS DE CAMBIO

N.A.

4. RESPONSABILIDAD.

Es responsabilidad de los investigadores y/o equipo técnico que tengan a su cargo el protocolo aplicar correctamente este procedimiento acorde con las normas y recomendaciones fijadas en éste documento. Además, es responsabilidad del Investigador principal velar por el cumplimiento del mismo.

5. GLOSARIO Y SIGLAS.

- Inhibidor de la transcriptasa inversa: Los inhibidores de la transcriptasa inversa son fármacos que inhiben a la polimerasa de DNA dependiente de RNA y codificada por el VIH que convierte al RNA vírico en DNA provírico, que luego se incorpora en un cromosoma de la célula hospedadora. Esta polimerasa es conocida también como transcriptasa inversa.
- SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se le llama así al conjunto de enfermedades de diferente tipo (tumores, infecciosas, entre otras), que resultan por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).


6. CONTENIDO.

6.1. GENERALIDADES:

El Efavirenz es un inhibidor no nucleósidos de la transcriptasa reversa (NNRTI) por sus siglas en inglés, y se utiliza como parte de la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART) para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo I, para infección de VIH que no haya sido tratada anteriormente; Efavirenz y Lamivudina en combinación con Zidovudina o Tenofovir es el régimen preferido basado en inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (NNRTI).

Efavirenz también se usa en combinación con otros agentes antirretrovirales como parte de un régimen profiláctico post-exposición a materiales asociados a un alto riesgo de transmisión del VIH con el fin de prevenir dicha transmisión.

El efavirenz se emplea para tratar la infección por VIH. Nunca se debe emplear solo, los especialistas en tratamiento antirretroviral lo deben administrar en combinación con otros fármacos. La decisión sobre el mejor momento para comenzar el tratamiento antirretroviral debe tomarse de acuerdo con los resultados de pruebas de laboratorio como el conteo de linfocitos T CD4, carga viral, historia clínica, resistencias a medicamentos y la preferencia del paciente

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 2 de 12

Los inhibidores de transcriptasa inversa: nucleósidos o no nucleósidos, actúan sobre el mismo objetivo: la enzima transcriptasa reversa que juega un papel esencial en la infección por VIH. Esta enzima permite la conversión del ARN del virus de inmunodeficiencia humana en ADN, aprovechando el ADN de los linfocitos T-CD4. En contraste con otros ITR que actúan directamente sobre el espacio activo de la transcriptasa inversa, los ITR no nucleósidos se adhieren a la transcriptasa inversa y evitan que el ARN del VIH se transforme en ADN. De esta manera, el virus no puede insertar su información genética en las células sanas y se evita su duplicación.

El efavirenz es ineficaz contra el VIH tipo 2, porque la transcriptasa inversa de este tipo del virus posee una estructura distinta a la del VIH-1, lo que le confiere una resistencia intrínseca a los medicamentos de la familia de los ITRNN.3 En tanto que todos los antirretrovirales de la familia ITRNN poseen una estructura similar, las mutaciones del VIH que producen la resistencia al efavirenz suelen producir también cepas resistentes a otros fármacos del mismo grupo, como la nevirapina y la delavirdina. La mutación más común al efavirenz es conocida como K103N, que también es común en el caso de tratamientos prolongados con base en algún fármaco de la familia ITRNN.

Los medicamentos contra el VIH no curan la infección por ese virus ni el SIDA, pero el uso diario de una combinación de ellos (llamada régimen de tratamiento del VIH) ayuda a las personas seropositivas a tener una vida más larga y sana. Esos medicamentos también reducen el riesgo de transmisión del virus.

Todos los medicamentos antirretrovirales presentan efectos adversos en los pacientes que los están usando, aunque el Efavirenz es generalmente bien tolerado puede presentar sintomatologías no deseadas tales como erupciones cutáneas, náusea, las cuales pueden desaparecer a los pocos días de haber iniciado el tratamiento. Debido a que el efavirenz tiene la capacidad de penetrar en el sistema nervioso central, algunos de los efectos colaterales más comunes de este medicamento suelen ser de índole neurológica. Los estudios al respecto indican que esta sustancia puede producir jaqueca, mareos, pérdida de la concentración, insomnio, pérdida de la memoria. Los efectos colaterales del efavirenz suelen aminorar en la medida que el organismo se adapte al medicamento, aunque en casos muy raros los efectos pueden ser mayores. Se ha señalado que algunos pacientes bajo tratamiento con efavirenz pudieron presentar depresión grave, desarrollo de conductas agresivas, conductas suicidas o intentos de suicidio, ideas paranoides y manías.

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.

6.2. DESCRIPCIÓN.

6.2.1 Principio del Método

El método se basa en la separación del metabolito (Efavirenz), 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 patrón puro del compuesto es interpretada en términos de concentración y con ello se hace una predicción de los niveles séricos del metabolito en el paciente.

6.2.2 Rango de Trabajo

El rango de trabajo está determinado por el parámetro de la linealidad, que va desde 0.078125 hasta 10.0 µg/mL. Además, se debe establecer un cronograma de actividades acorde con las necesidades y disponibilidad de equipos. En todo caso el proceso de cuantificación requiere una disponibilidad diaria en la cual se cumplan día a día y en la semana diferentes actividades relacionadas con la estandarización del proceso.


6.2.3 Equipos, reactivos, materiales y elementos de protección

✓ EQUIPOS

- Sistema HPLC: bomba cuaternaria, detector de UV con longitud de onda variable y arreglo de diodos, desgasificador, automuestreador, compartimiento termostatzado de columnas.
- Balanza analítica (0,0001 g de precisión).
- Baño ultrasonido.
- pH metro (0,05 pH de precisión).
- Micropipetas.
- Vortex.
- Centrífuga.

✓ REACTIVOS

- Estándar de Efavirenz (EFV).
- Estándar Posaconazol (PCZ).

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 3 de 12

- c) Dimetilsulfóxido (DMSO).
- d) Acetonitrilo (ACN).
- e) Agua tipo I.

✓ **MATERIALES**

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

✓ **ELEMENTOS DE PROTECCIÓN**

- a) Caretas.
- b) Guantes.
- c) Gafas de laboratorio.
- d) Bata de laboratorio.

6.2.4. 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 campañas 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 (0.15625µg/mL), nivel medio (5.0µg/mL) y nivel superior (10.0µg/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.

6.3. Desarrollo del método

- ✓ 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.

6.3.1 TIEMPOS DE ANÁLISIS:

Preparación de curva de calibración, solución buffer y solución diluyente: 30 minutos

Preparación de muestras (1 bloque): 40 minutos

Duración de cada corrido en solución diluyente: 8,0 minutos

Duración de cada corrido en suero: 8,0 minutos

Corridos de ensayo: 3 (30 minutos Aprox).


6.3.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

- ✓ Preparación de la solución de estándar interno (IS)

Pesar 1.0mg de Posaconazol estándar primario. Disolver en 1.0mL de Dimetilsulfóxido, para alcanzar una concentración de 1.0mg/mL. Agitar en vortex durante dos minutos y llevar a ultrasonido durante 5 minutos. 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 2.0 mg de estándar primario de Efavirenz y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 2.0mL de Dimetilsulfóxido someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 1.0mg/mL (marcar como solución madre de Efavirenz).

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 4 de 12

Efavirenz (µg/mL)	PREPARACIÓN
10.0	Tomar 10µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 990uL 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 2.5.0µg/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: Acetonitrilo: Agua Tipo I (60:40) o Suero según corresponda.

6.3.3 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:


CONCENTRACIÓN (µg/mL)		PREPARACIÓN
Baja	0.15625	Tomar 500µL de solución de 0.625µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de Suero.
Media	5.0	Tomar 500µL de solución 10.0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de suero.
Alta	10.0	Tomar 10,0µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicione 990uL de suero.

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

6.3.4 Preparación de la muestra de ensayo (Efavirenz suero humano)

Tomar 150µL de muestra y adicionarlos a un tubo eppendorf para sedimentación que contenga: 1uL de solución estándar interno (IS) de Posaconazol y 149µL de acetonitrilo. Agitar en vortex durante 30 segundos y posteriormente llevar a centrifuga a 14100 gravedades a 25°C durante 15.0 minutos. Filtrar e inyectar 10 µL en el sistema cromatográfico.

Parámetro	Características
Método	Isocratico 40:60 Agua Tipo I: Acetonitrilo
Flujo	1.0 mL/minuto
Volumen de inyección	10,0 µL
Detección	UV; 250 nm.
Columna	C18, 150 * 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Agilent Technologies.
Pre-columna	C18, 20*4,6 mm. Agilent technologies.
Temperatura de columna	25°C
Estándar interno (IS)	Posaconazol
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempo de retención en minutos	Posaconazol: 4.360 Efavirenz: 6.305
Tiempo de corrido	8.0 minutos

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 5 de 12

7. Parámetros de la Validación

7.1. 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 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.

7.2. 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 del mismo.

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 0.078625µg/mL hasta los 10µg/mL. Tomar como mínimo cinco muestras patrón distribuidas a lo largo del rango, junto con el blanco.


Determinación de la función respuesta

Representar o graficar las respuestas de los patrones de calibrado en función de la concentración y hacer un análisis visual. Obtener los parámetros característicos de la curva de calibración, esto es, el coeficiente de correlación, la ecuación de la curva, así como el error relativo porcentual (ER%) de cada uno de los patrones que forman la curva de calibración.

Modelo de cálculo

$$ER\% = \left[\left(\frac{x_i^* - x_l}{x_i} \right) \right]$$

Siendo x_l los valores teóricos y x_i^* los valores experimentales estimados por aplicación de la ecuación que define la curva de calibración. (Si es una recta: $x_i^* = \frac{(y_i - a)}{b}$).

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 7 de 12

Procedimiento a seguir

- Preparar una curva de calibración por cada día de trabajo, con la cual se estimaran 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


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

Tablas 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)

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 8 de 12

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%): = ± 15%
 Coeficiente de Variación (%CV) ≤ 15%
 Para las concentraciones baja, media y alta.

7.5. Precisión y exactitud Inter-Laboratorio:

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%): = ± 15%
 Coeficiente de Variación (%CV) ≤ 15%
 Para las concentraciones baja, media y alta.


7.6. Límite de cuantificación

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

Procedimiento a seguir

- Preparar una curva de calibrado en suero que incluya tres niveles de concentración que se suponen cercanos al límite de cuantificación.
 - De esta curva de calibrado a concentraciones bajas extrapolar a concentración cero la ecuación, para obtener el valor medio de la señal ruido (Y_{bl}).
 - Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido (S_{bl}), construir una recta tomando como ejes de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas.
- Ecuación para determinar límite de cuantificación y límite de detección

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

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 9 de 12

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_{bi} = 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_{bi} = 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.

7.7. Estabilidad

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

Procedimiento a seguir

Estabilidad de las soluciones patrón.

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

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, 5 y 10 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

 <p>CIB Corporación para Investigaciones Biológicas La Ciencia al Servicio de la Vida</p>	<p align="center">Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</p>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 10 de 12

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%.


8. CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE LOS PACIENTES:

Al momento de llegar una muestra a la CIB para análisis de niveles plasmáticos o séricos de Efavirenz 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 (0.15625ng/mL), medio (5.0ng/mL) y alto (10.0ng/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.

Curva de calibrado


Concentración teórica del patrón de calibrado (µg/mL)	Relación de áreas	Concentración determinada (µg/mL)	ER (%)	Curva de calibrado
0.078125				$y = bx + a$ b = a = r =
0.15625				
0.3125				
0.625				
1.25				
2.5				
5.0				
10.0				

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 11 de 12

Muestras patrón de control de calidad

Concentración teórica (µg/mL)	Relación de áreas	Concentración determinada (µg/mL)	ER (%)
0.15625	Media %CV		
5.0	Media %CV		
10.0	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.

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efavirenz mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 12 de 12

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Validación de Métodos en Bioanálisis. Pag. 209 – 248. 2001.
2. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluations and Research (CDER). December 1998.
3. ICH Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures: definitions and terminology, 1 June 1995.
4. DrugBank, FDA Label: http://www.drugbank.ca/system/fda_labels/DB00625.pdf?1265922814
5. DrugBank: MSDS: <http://www.drugbank.ca/system/msds/DB00625.pdf?1265922750>.
6. D Simple and rapid method for the simultaneous determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and nevirapine in human plasma using liquid chromatography, Bregt S. Kappelhoff,*, Hilde Rosing, Journal of Chromatography B, 792 (2003) 353–362.
7. A fast and reliable reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of selected anti-retroviral and lumefantrine in human plasma, Betty Maganda, Olivier Heudi, Journal of Chromatography B, 919– 920 (2013) 52– 60
8. Quantitative determination of efavirenz (DMP 266), a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Agnes I. Veldkamp,*, Rolf P.G. van Heeswijk, Journal of Chromatography B, 734 (1999) 55–61
9. Simultaneous determination of efavirenz, rifampicin and its metabolite desacetyl, rifampicin levels in human plasma, Deirdre Foxa,*, Robert O’Connorb,, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 56 (2011) 785– 791.
10. S imple and rapid quantification of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors nevirapine, delavirdine, and efavirenz in human blood plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, Naser L. Rezk*, Richard R., Journal of Chromatography B, 774 (2002) 79–88.
11. An efficient HPLC method for the quantitative determination of atazanavir in human plasma suitable for bioequivalence and pharmacokinetic studies in healthy human subjects, Adrienne C. Müller, Isadore Kanfer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010) 113–118
12. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma, Geetha Ramachandran a, A.K. Hemanth Kumara, Journal of Chromatography B, 835 (2006) 131–135.
13. Determination of efavirenz in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, María Sarasa-Nacenta,*, Yolanda López-Puá,, Journal of Chromatography B, 763 (2001) 53–59.
14. Development and validation of analytical method for quantitation of Emtricitabine, Tenofovir, Efavirenz based on HPLC, Arun Ramaswamy a, Anton Smith Arul Gnana Dhas, Arabian Journal of Chemistry (2014)
15. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid Chromatography, G. Aymard, M. Legrand, N. Journal of Chromatography B, 744 (2000) 227–240.
16. S imultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography, Michele L. Turner, Kedria Reed-Walker, Journal of Chromatography B, 784 (2003) 331–341
17. An isocratic liquid chromatography method for determining HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and protease inhibitor concentrations in human plasma, Dennis R. Weller a, Richard C., Journal of Chromatography B, 848 (2007) 369–373.