 <p>Corporación para Investigaciones Biológicas La Ciencia al Servicio de la Vida</p>	<p><b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b></p>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<p><b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b></p>		<p><b>PÁGINA 1 de 13</b></p>

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

**1. OBJETIVO.**

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

**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 (tumoraes, infecciosas, entre otras), que resultan por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

**6. CONTENIDO.**

**6.1. GENERALIDADES:**

La Zidovudina o AZT fue el primer medicamento aprobado para el tratamiento de pacientes infectados con el VIH, la AZT es un inhibidor de nucleósidos de transcriptasa reversa y es considerado el eje básico de la terapia antiretroviral, El compuesto es un potente inhibidor de la replicación del VIH, Este fármaco es un antimetabolito de ADN viral ya que afecta al funcionamiento de los ácidos nucleicos. Es inhibidor de la polimerasa de DNA de la enzima transcriptasa inversa(reversa) o HIV-RT del VIH, exclusivo de células virales, por lo que no afecta a células humanas (selectividad), terminando así la cadena de síntesis de ADN a partir de ARN. La AZT mejora la función inmunológica, parcialmente invierte la disfunción neurológica inducida por el VIH, y mejora ciertas otras anomalías clínicas asociadas con el SIDA. Su principal efecto tóxico es la supresión dependiente de la dosis de la médula ósea, dando lugar a anemia y leucopenia.

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.

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 2 de 11</b>

La AZT puede causar efectos adversos graves como daños en el hígado, toxicidad en la sangre y desórdenes musculares, además de otros efectos leves como náuseas, dolor de cabeza, cambios en la grasa corporal y decoloración de los dedos de las manos y pies. Otros efectos adversos más severos incluyen anemia, supresión de la médula ósea, los cuales pueden ser superados usando tratamientos con eritropoyetina o la darbeopoyetina. Estos efectos indeseados podrían ser causados por la sensibilidad de la  $\gamma$ -ADN polimerasa en la mitocondria de la célula. La AZT ha estado trabajando adicionalmente o sinérgicamente con muchos agentes anti-VIH; sin embargo, el acyclovir y la ribavirina disminuyen los efectos de la AZT. Fármacos que inhiben la glucuronidación hepática, tales como indometacina, el ácido acetil salicílico (Aspirina) y la Trimetoprima, disminuyen el índice de eliminación e incrementan la toxicidad.

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 (Zidovudina), 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 0.15625 hasta 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 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 Lamivudina (3TC).
- Estándar Zidovudina (AZT).
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Acetonitrilo (ACN).
- Metanol (MeOH).
- Agua tipo I.

#### ✓ MATERIALES

- Frascos de laboratorio de 250, 500 o 1000 mL.
- Balones volumétricos de 10,0 mL.
- Tubos Falcón tapa rosca.
- Tubos eppendorf para centrífuga.
- Puntas para micropipetas de 100, 200 y 1000  $\mu\text{L}$ .
- Jeringas.
- Filtros y viales.

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 3 de 11</b>

✓ **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 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 (0.3125µg/mL), nivel medio (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.

**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: 13,0 minutos  
 Duración de cada corrido en suero: 13,0 minutos  
 Corridos de ensayo: 3 (45 minutos Aprox).

**6.3.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:**

- ✓ Preparación de la solución de estándar interno (IS)  
 Pesar 1.0mg de Lamivudina estándar primario. Disolver en 1.0mL de Metanol, 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 Zidovudina y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 1.0mL de Metanol someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 1.0mg/mL (marcar como solución madre de Zidovudina).

Zidovudina (µg/mL)	PREPARACIÓN
20.0	Tomar 10µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 990uL 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*.
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*.

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 4 de 11</b>

\* Solución diluyente: Acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (12:88) 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	0.3125	Tomar 500µL de solución de 0.625µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de Suero.
Media	10.0	Tomar 500µL de solución 10.0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicione 500uL de suero.
Alta	20.0	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 (Lamivudina en suero humano)


Tomar 150µL de muestra y adicionarlos a un tubo eppendorf para sedimentación que contenga: 1uL de solución estándar interno (IS) de Lamivudina 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 150 µL del sobrenadante y adicionarle 150 µL de agua tipo I, inyectar 50 µL en el sistema cromatográfico.

Tabla I. Condiciones cromatográficas para la determinación sérica de Zidovudina.	
Parámetro	Características
Método	Isocratico 88:12 Agua tipo I : Acetonitrilo
Flujo	0.8 mL/minuto
Volumen de inyección	50,0 µL
Detección	UV; 275 nm.
Columna	C18, 150 * 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Agilent Technologies. Ref. eclipse XDB C18
Pre-columna	C18, 20*4,6 mm. Agilent technologies.
Temperatura de columna	25°C
Estándar interno (IS)	Lamivudina.
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempo de retención en minutos	Lamivudina: 11.358 Zidovudina: 3.275
Tiempo de corrido	13 minutos

## 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.

 <b>CiB</b> Corporación para Investigaciones Biológicas <i>La Ciencia al Servicio de la Vida</i>	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	<b>F-02-0017-MM</b>
		<b>VERSIÓN 01</b>
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 5 de 11</b>

**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  $0.15625\mu\text{g/mL}$  hasta los  $20\mu\text{g/mL}$ . 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**

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

Siendo  $x_i$  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:  $x_i^* = \frac{(y_i - a)}{b}$ ).

CONCENTRACIÓN	Relación de áreas			Concentración experimental			%R		
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3
<b>Media</b> <b>[ER%]</b>									

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 6 de 11</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.

#### **7.3. 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) dentro del 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 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.

#### **7.4. 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 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.

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 7 de 11</b>

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)

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

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 8 de 11</b>

#### **Criterio de aceptación**

Error Relativo Porcentual (ER%): =  $\pm 15\%$   
 Coeficiente de Variación (%CV)  $\leq 15\%$   
 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%): =  $\pm 15\%$   
 Coeficiente de Variación (%CV)  $\leq 15\%$   
 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

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

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.

#### **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.



 <p><b>CiB</b> Corporación para Investigaciones Biológicas La Ciencia al Servicio de la Vida</p>	<p><b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b></p>	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
<p><b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b></p>		<p><b>PÁGINA 9 de 11</b></p>

**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

$\mu$ = valor verdadero

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 Zidovudina 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.

	<b>Protocolo para la medición de niveles séricos de Zidovudina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b>	F-02-0017-MM
		<b>VERSIÓN 01</b>
<b>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS</b>		<b>PÁGINA 10 de 11</b>

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 (0.3125ng/mL), medio (10ng/mL) y alto (20ng/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
0.15625				$y = bx + a$ $b =$ $a =$ $r =$
0.3125				
0.625				
1.25				
2.5				
5.0				
10.0				
20.0				

#### Muestras patrón de control de calidad

Concentración teórica (µg/mL)	Relación de áreas	Concentración determinada (µg/mL)	ER (%)
0.3125	Media %CV		
10.0	Media %CV		
20.0	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.

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

## 9. BIBLIOGRAFÍA

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/drugs/DB00495>
5. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography B*, 791 (2003) 137–147, Naser L. Rezk\*, Richard R. Tidwell, Angela D.M. Kashuba.
6. Validation of high-performance liquid chromatography methods for determination of zidovudine, stavudine, lamivudine and indinavir in human plasma, Department of Clinical Pharmacology. Hospital, Institute "Pedro Kouri". La Havana, Cuba, A. Tárinas, R. D. Tápanes, G. Ferrer, J. Pérez
7. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B*, 744 (2000) 227–240, G. Aymard, M. Legrand, N. Trichereau, B. Diquet\*
8. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 816 (2005) 121–129, C.P.W.G.M. Verweij-van Wissena,b,\*, R.E. Aarnoutsea,b, D.M. Burgera,b.
9. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 831 (2006) 258–266, Stefania Notari a, Alessio Bocedi a, Giuseppe Ippolito a, Pasquale Narciso
10. Simultaneous quantitative determination of zidovudine and nevirapine in human plasma using isocratic, reverse phase high performance liquid chromatography, Department of Pharmacy, Shri G. S. Institute of Technology & Science (SGSITS), Vibhuti Kabra1 , Vivek Agrahari , Chandrabose Karthikeyan and Piyush Trivedi.
11. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 903–908, Bin Fan, James T. Stewart.