

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Emtricitabina 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 Emtricitabina 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 Emtricitabina.

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

6. CONTENIDO.

6.1. GENERALIDADES:

La Emtricitabina es un agente sintético cuya actividad es inhibir la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos, y es utilizado en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia Humana tipo I (VIH I). Se trata de un análogo nucleósido sintético de la citosina. En el organismo, la Emtricitabina es fosforilada por enzimas celulares a Emtricitabina 5-Trifosfato, la cual inhibe la actividad de la transcriptasa reversa del VIH-I, al competir por el sustrato natural deoxycytidine 5'-triphosphato y al ser incorporado al DNA viral naciente lo que conlleva a la terminación de la cadena viral.

Se han reportado casos de efectos adversos por el uso de análogos de nucleósidos, solos o en combinación con otros antirretrovirales, debido a acidosis láctica y hepatomegalia con esteatosis, entre los que se incluyen casos fatales.

La Emtricitabina no es indicada para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B crónica (VHB) y la seguridad y su eficacia no ha sido establecida en pacientes coinfectados con VHB y VIH. Se han reportado aumento en la sintomatología en pacientes con VHB al suspender el medicamento. La función hepática deberá ser monitoreada estrechamente en pacientes con infección por el virus de la

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

Hepatitis B a los cuales se les haya suspendido el tratamiento con Emtricitabina y estén coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); además, se recomienda comenzar inmediatamente con tratamiento anti hepatitis B.

Los inhibidores de transcriptasa inversa (ITR) (nucleósidos o no nucleósidos), actúan sobre el mismo objetivo, la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima juega un papel esencial en la infección por VIH, ya que 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.

Todos los medicamentos antirretrovirales presentan efectos adversos en los pacientes que los están usando. Los efectos adversos más usuales de la Emtricitabina son dolor de cabeza, diarrea, náuseas y erupción cutánea, que pueden llegar a tener una gravedad de leve a moderada. Se ha reportado que aproximadamente el 1% de la población abandonó los estudios clínicos debido a estos efectos adversos entre los que se encuentran decoloración de la piel manifestada por hiperpigmentación de las palmas de las manos y plantas de los pies.

No se conoce antídoto para intoxicación por emtricitabine; además, que no se ha comprobado alguna concentración mínima toxica clínicamente. Si ocurre alguna sobredosis se deberán monitorear las concentraciones de Emtricitabina y suspender el tratamiento.

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 (Emtricitabine), 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 Emtricitabina.
- Estándar Isoniazida.
- Acetonitrilo (ACN).
- Ácido trifluoroacético.
- Agua tipo I.

✓ MATERIALES

- Frascos de laboratorio de 250, 500 o 1000 mL.
- Balones volumétricos de 10,0 mL.

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

- 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: 12,0 minutos

Duración de cada corrido en suero: 12,0 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 Isoniazida estándar primario. Disolver en 1.0mL 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. 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 Emtricitabina y llevar a un tubo eppendorf. Adicionar 2.0mL de agua tipo I someta a ultrasonido durante 5 minutos, para obtener una concentración conocida de 1.0mg/mL (marcar como solución madre de Emtricitabina).

Emtricitabina (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*.

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

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: Agua Tipo I 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. Adicionar 500uL de Suero.
Media	5.0	Tomar 500µL de solución 10.0µg/mL y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 500uL de suero.
Alta	10.0	Tomar 10,0µL de solución madre y llevar a tubo eppendorf. Adicionar 990uL de suero.

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

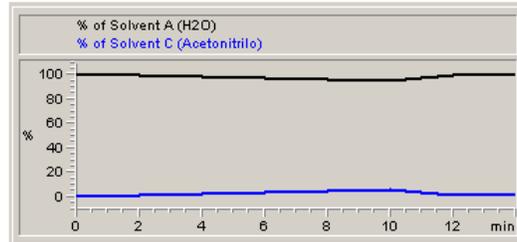
6.3.4 Preparación de la muestra de ensayo (Emtricitabina suero humano)

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

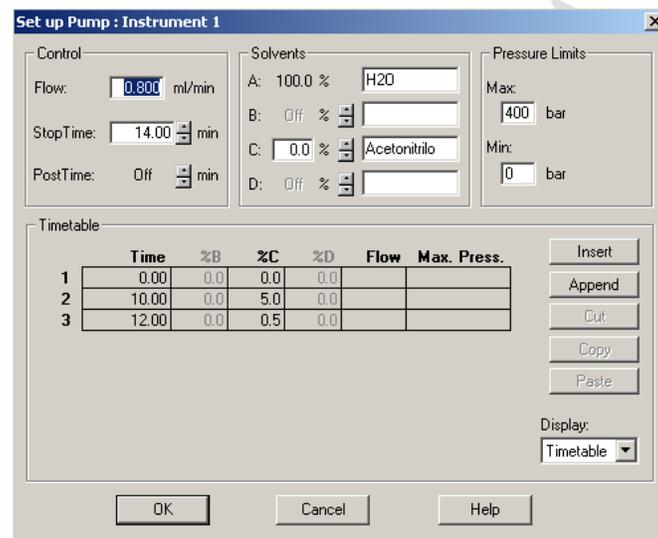
Parámetro	Características
Método	Gradiente ver figuras 1 y 2
Flujo	1.0 mL/minuto
Volumen de inyección	10,0 µL
Detección	UV; 264 nm.
Columna	C18, 150 * 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Agilent Technologies.
Pre-columna	C18, 20*4,6 mm. Agilent technologies.
Temperatura de columna	25°C
Estándar interno (IS)	Isoniazida
Unidades de concentración	µg/mL
Tiempo de retención en minutos	Isoniazida: 4.360 Emtricitabina: 6.305
Tiempo de corrido	12.0 minutos

Figura#1: Grafica %solventes vs tiempo análisis Emtricitabine

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efmtricitabina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 5 de 11



Figura#1: Método análisis Emtricitabine



	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	0.0	0.0	0.0		
2	10.00	0.0	5.0	0.0		
3	12.00	0.0	0.5	0.0		

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.

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

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

μ = valor verdadero

Criterio de aceptación

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

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.

Modelo de cálculo

Exactitud

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

Precisión

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

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

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=	

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:

	Protocolo para la medición de niveles séricos de Efmtricitabina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 9 de 11

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_{bi}).
 - Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido (S_{bi}), 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

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

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_{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.

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

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

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

Criterio de aceptación

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

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

8. CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE LOS PACIENTES:

Al momento de llegar una muestra a la CIB para análisis de niveles plasmáticos o séricos de Emtricitabina 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 calibración

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

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

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 Emtricitabina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	F-02-0017-MM
		VERSIÓN 01
CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		PÁGINA 12 de 11

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: https://s3-us-west-2.amazonaws.com/drugbank/fda_labels/DB00879.pdf?1265922807
5. DrugBank: MSDS: <http://www.drugbank.ca/system/msds/DB00625.pdf?1265922750>.
6. 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. Simple 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-Puía,, 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. Simultaneous 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.