



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR  
LAMOTRIGINA EN PLASMA HUMANO POR LC/MS/MS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**José Manuel Cárdenas Sánchez**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado según el tema:**

Presidente	<b>Helgi Helen Jung Cook</b>
Vocal	<b>Sofía Margarita Rodríguez Alvarado</b>
Secretario	<b>María de Lourdes Mayet Cruz</b>
1er. Suplente	<b>Luis Jesús García Aguirre</b>
2º. Suplente	<b>Lauro Misael Del Rivero Ramírez</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Centro Analítico para Estudios Biofarmacèuticos  
CAEBIO

**ASESOR**

---

Dra. Helgi Helen Jung Cook

**SUSTENTANTE**

---

José Manuel Cárdenas Sánchez

## **AGRADECIMIENTOS**

Son tantas personas a las cuales debo parte de este triunfo, de lograr alcanzar mi culminación académica, la cual es el anhelo de todos los que así lo deseamos.

### **Gracias a Dios**

Por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

### **Gracias a mis padres Beatriz y J. Manuel**

Por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación. Madre, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa. Tu esfuerzo, se convirtió en tu triunfo y el mío, TE AMO. Papá, gracias por enseñarme que las cosas más valiosas son las que uno se gana con esfuerzo propio, eres mi ejemplo y sabes que te admiro.

### **Gracias a mis hermanos**

Lupe, Fer. Gracias por sus comentarios, sugerencias y opiniones. Además de ser buenos amigos fueron la mejor compañía para compartir el mismo techo. Ale y Héctor, mis pequeños hermanos, a pesar de la distancia saben que los quiero mucho, no dejaré de luchar hasta convertirme en un buen ejemplo para ustedes.

### **Gracias a mi abuelita Emma**

Por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante. Por cuidarme en esos primeros años de mi vida, que siempre son la pauta para formar a una persona en su futuro.

### **Gracias a Dra Helgi**

Sus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecho en mi participación dentro de este proyecto de investigación.

## **Gracias a mi Familia**

Comienzo con Eder. Primo, amigo, inclusive compañero de clases y en alguna ocasión hasta confidente, gracias por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles, A la Fam. Sánchez Gonzalez, Tia Amelia, Erika, Toño y Alex, siempre fueron mi ejemplo de superación, estudio y perseverancia, los quiero muchísimo. No puedo mencionar todos los nombres de mi familia puesto que sería una tesis extra, pero obviamente a todos mis primos y tíos de la Fam. Sánchez (Martín, Miguel, David, Adderly, Eythan, Lalo), y por supuesto a la Fam. Cárdenas (Tíos Enrique, Alex, Tin, Mony, Estela, Tito, Nanche, Lalo, Mamá Tita Papá Manuel y primos) también son parte de esta alegría.

GRACIAS por darme la posibilidad de que de mi boca salga esa palabra...FAMILIA.

## **Gracias a cada uno de los maestros**

Que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

## **Gracias a mis amigos del laboratorio**

A todos ustedes, Oscar, Cuauhtemoc, Robert, Mario(s), Alex, Dulce, Janette, Nohemy, a las "Sinaloenses" Dacia (TQM), Dalmira, Citla, por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno. Mención aparte merece Rocío Rincón, gracias por enseñarme a valorar mi trabajo, a enseñarme que solo con dedicación, esfuerzo, amor por lo que haces y respeto a los demás es posible conseguir las metas que uno desee, sean cuales fueren.

## **Gracias a todos mis amigos**

Edgar, Daniel, Alex Gonzalez. Que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias, desveladas. A toda la Banda, Jorge, Ariel (a todos en general, si omito nombres es porque solo recuerdo sus apodos), como olvidar esos viernes, esos juegos de ajedrez y dominó etc. Gracias a cada uno por hacer que mi estancia en la Facultad fuera super divertida.

A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona

Y a todos aquellos, que han quedado en los recintos más escondidos de mi memoria, pero que fueron partícipes en cincelar a este J. Manuel Cárdenas Sánchez, GRACIAS.

*Reír a menudo y mucho; ganar el respeto de gente inteligente  
y el cariño de los niños, conseguir el aprecio de críticos honestos  
y aguantar la traición de falsos amigos; apreciar la belleza;  
encontrar lo mejor en los demás; dejar el mundo un poco mejor,  
sea con un niño saludable, una huerta o una condición social redimida;  
saber que por lo menos una vida ha respirado mejor porque tú has vivido.  
Eso es tener éxito.*

**Ralph Waldo Emerson**



## Contenido

<b>CAPITULO I</b> .....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
OBJETIVOS.....	2
<b>CAPITULO II</b> .....	3
GENERALIDADES.....	3
2.1 EPILEPSIA.....	3
2.1.1 Causas.....	3
2.1.2 Factores de riesgo.....	4
2.1.3 Clasificación de las Crisis Epilépticas.....	5
a. Crisis Parciales.....	5
b. Crisis Generalizadas.....	6
2.1.4 Diagnóstico.....	7
2.1.5 Pronóstico.....	8
2.1.6 Tratamiento.....	9
2.2 LAMOTRIGINA.....	9
2.2.1 Propiedades Fisicoquímicas.....	10
2.2.1.1 Descripción y Estructura Química.....	10
2.2.1.2 Solubilidad y log P.....	11
2.2.1.3 Constante de acidez (pKa) y absorción al UV.....	11
2.2.1.4 Clasificación biofarmacéutica y dosis letal 50.....	12
2.2.2 Mecanismo De Acción.....	12
2.2.3 Farmacocinética.....	13
2.2.3.1 Absorción.....	13
2.2.3.2 Distribución:.....	13
2.2.3.3 Metabolismo:.....	13
2.2.3.4 Eliminación:.....	13



2.2.4 Régimen de dosificación. ....	14
2.2.5 Interacciones farmacocinéticas. ....	15
2.2.6 Efectos adversos. ....	16
2.2.7 Precauciones y advertencias. ....	17
2.2.8 Contraindicaciones. ....	17
2.2.9 Sobredosificación. ....	17
2.2.10 Productos comerciales en México. ....	18
2.3 ESPECTROMETRIA DE MASAS. ....	18
2.3.1 El Espectrómetro de Masas ....	21
2.3.2 Sistemas de entrada de muestra. ....	23
2.3.2.1 Entrada por sonda directa ....	23
2.3.2.2 Sistemas de entrada cromatográficos ....	24
2.3.3 Fuentes de iones. ....	25
2.3.3.1 Fuentes de impacto de electrones (EI).....	27
2.3.3.2 Fuentes de ionización química (CI = Chemical ionisation) .....	29
2.3.3.3 Fuentes de ionización a presión atmosférica (API) .....	30
2.3.4 Sistemas de vacío .....	32
2.3.5 Analizadores de masa .....	35
2.3.5.1 Filtros de masas de cuadrupolo .....	37
2.3.5.2 Analizador de trampa de iones (ion trap detector).....	39
2.3.5.3 Analizador de tiempo de vuelo (TOF, time of flight) .....	41
2.3.6 Detectores .....	42
2.3.6.1 Detector de copa de Faraday .....	43
2.3.6.2 Multiplicador de electrones secundarios.....	43
2.3.7 Calibración de los espectrómetros de masas .....	46
2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS <sup>28,29.</sup> , .....	46
2.5 DATOS FARMACOCINETICOS.....	50
<b>CAPITULO III</b> .....	51
PARTE EXPERIMENTAL.....	51
3.1 SUSTANCIAS DE REFERENCIA .....	51





3.2 MATERIALES.....	51
3.3 REACTIVOS.....	51
3.4 EQUIPO .....	51
3.5 PREPARACION DE SOLUCIONES .....	52
3.5.1 Solución de ácido fórmico 10 mM + acetato de amonio 10 mM .....	52
3.5.2 Solución diluyente de metanol:agua (50:50) .....	52
3.5.3 Fase móvil: Metanol: Ácido fórmico 10 mM+ acetato de amonio 10 mM (70:30 v/v) .....	52
3.5.4 Solución de Adecuabilidad .....	52
3.5.5 Soluciones estándar de LAMOTRIGINA y PIOGLITAZONA. ....	53
3.5.6 Curva de Calibración y puntos control.....	54
3.6 METODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAMOTRIGINA EN PLASMA.....	56
3.7 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	57
3.8 CONDICIONES ESPECTROMETRO DE MASAS.....	57
3.9 VALIDACION DEL METODO ANALITICO .....	57
3.9.1 Linealidad del método. ....	58
3.9.2 Precisión y exactitud del método.....	59
3.9.2.1 Precisión.....	59
3.9.2.1.1 Repetibilidad (precisión intradía) .....	59
3.9.2.1.2 Reproducibilidad (precisión interdía). ....	60
3.9.2.2 Exactitud.....	60
3.9.3 Límite de cuantificación. ....	61
3.9.4 Selectividad.....	62
3.9.5 Recobro.....	63
3.9.6 Estabilidad de la muestra .....	64
3.9.6.1 Estabilidad en ciclos de Congelación - Descongelación. ....	64
3.9.6.2 Estabilidad a temperatura ambiente (corto plazo). ....	65
3.9.6.3 Estabilidad de Lamotrigina en el Automuestreador. ....	66
3.9.6.4 Estabilidad en condiciones de Almacenamiento a -70°C. ....	67



---

3.9.6.5 Efecto de Dilución.....	68
3.9.6.6 Estabilidad de Solución Patrón.....	69
3.9.7 Supresión Ionica.....	69
<b>CAPITULO IV</b> .....	70
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS .....	70
4.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	70
4.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO .....	71
4.3 LIMITE DE CUANTIFICACION .....	76
4.4 SELECTIVIDAD .....	77
4.5 RECOBRO .....	79
4.6 ESTABILIDADES .....	79
a. Estabilidad en congelación-descongelación.....	80
b. Temperatura ambiente .....	81
c. Estabilidad de la muestra procesada.....	82
d. Estabilidad a largo plazo .....	83
e. Efecto de dilución .....	84
f. Estabilidad de la solución patrón.....	85
4.7 SUPRESION IONICA.....	86
<b>CAPÍTULO V</b> .....	87
CONCLUSIONES.....	87
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	88
BIBLIOGRAFÍA .....	88



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Lamotrigina .....	10
Figura 2. Absorción en uv de la Lamotrigina dependientes de pH .....	11
Figura 3. Inactivación del canal de Na <sup>+</sup> , intensificada por el fármaco anticonvulsivo .....	12
Figura 4 Componentes de un espectrómetro de masas.....	22
Figura 5 Esquema de un sistema de introducción de muestra por sonda para introducir una muestra en la fuente de iones (DIP) .....	23
Figura 6 Fuente de impacto electrónico .....	28
Figura 7 Mecanismo de evaporación iónica para técnicas ESI .....	31
Figura 8 Mecanismo de evaporación iónica para técnicas APcl .....	31
Figura 9 Bombas difusoras de fraccionamiento .....	33
Figura 10 Bombas turbomoleculares.....	34
Figura 11 Espectrómetro de masas de cuadrupolo.....	38
Figura 12 Espectrómetro de masas de trampa de iones.....	40
Figura 13 Esquema del MALDI-TOF .....	42
Figura 14 (a) Multiplicador de electrones de dínodos discreto. (b) Channeltron .....	44
Figura 15 Diagrama del procedimiento de Extracción de Lamotrigina .....	56
Figura 16 Linealidad del método para cuantificar Lamotrigina en plasma.....	70
Figura 17 a) Blanco de Plasma, b) Plasma adicionado con Lamotrigina y Pioglitazona, c) Plasma adicionado con Heparina, d) Plasma adicionado con EDTA y e) Plasma con evidencia de hemólisis .....	78
Figura 18 a) Blanco de Plasma y b) Plasma adicionado con Lamotrigina y Pioglitazona.....	86



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de las Crisis Epilépticas.....	6
Tabla 2 Productos comerciales conteniendo Lamotrigina .....	18
Tabla 3 Evolución de la espectrometría de masas.....	19
Tabla 4 Fuentes de espectrometría de masas .....	26
Tabla 5 Ventajas e inconvenientes del uso de bombas turbomoleculares o difusoras.....	35
Tabla 6 Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA .....	48
Tabla 7 Parámetros farmacocinéticos en estudios de bioequivalencia de tabletas conteniendo Lamotrigina .....	50
Tabla 8 Preparación de soluciones de Lamotrigina.....	53
Tabla 9 Preparación de soluciones de Pioglitazona Estándar Interno .....	53
Tabla 10 Preparación de la curva de calibración de Lamotrigina en solución diluyente .....	54
Tabla 11 Preparación de la curva de calibración de Lamotrigina en plasma .....	54
Tabla 12 Preparación de los puntos control en solución diluyente .....	55
Tabla 13 Preparación de los puntos control en plasma.....	55
Tabla 14 Condiciones cromatográficas .....	57
Tabla 15 Condiciones del espectrómetro de masas.....	57
Tabla 16 Valores de concentración adicionada v.s concentración recuperada de lamotrigina.....	71
Tabla 17 Repetibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma.....	72
Tabla 18 Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma. Analista 1 .....	73
Tabla 19 Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma. Analista 2 .....	74
Tabla 20 Reproducibilidad del método analítico entre analistas y entre días para cuantificar Lamotrigina en plasma.....	75



---

Tabla 21 Límite de cuantificación .....	76
Tabla 22 Selectividad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma.....	77
Tabla 23 Recoboro absoluto con Lamotrigina .....	79
Tabla 24 Estabilidad de Lamotrigina en ciclos de congelación-descongelación .....	80
Tabla 25 Estabilidad de Lamotrigina a temperatura ambiente .....	81
Tabla 26 Estabilidad de la muestra procesada 42 horas.....	82
Tabla 27 Estabilidad a largo plazo .....	83
Tabla 28 Efecto de la dilución .....	84
Tabla 29 Estabilidad de la solución patrón .....	85



## CAPITULO I.

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La Epilepsia es un trastorno cerebral que involucra crisis epilépticas repetitivas y espontáneas de cualquier tipo. Las crisis epilépticas son episodios de alteración de la función cerebral que producen cambios en la atención o el comportamiento y son causadas por una excitación anormal en las señales eléctricas en el cerebro.

Se calcula que tiene una incidencia de 50 casos por cada 100 000 personas, considerándose un problema de salud pública en todo el mundo y especialmente en Latino América, Caribe y algunos países de África<sup>1,2</sup>.

Actualmente, existe una gran variedad de fármacos antiepilépticos conocidos como tradicionales y nuevos. Entre los fármacos tradicionales se encuentran la carbamazepina, la fenitoína, el fenobarbital, la primidona, la etosuccimida, el clonazepam así como el ácido valpróico, mientras que en el grupo de los fármacos nuevos se encuentran la lamotrigina, el felbamato, la gabapentina, el topiramato, la tiagabina, la vigabatrina y la oxcarbamazepina<sup>4,5</sup>.

De entre estos últimos, la lamotrigina es una fenil triazina<sup>6</sup> que ha demostrado ser equivalente en eficacia a la fenitoína<sup>7</sup> e incluso superior a la carbamazepina<sup>8</sup>. Se considera que es un antiepiléptico de amplio espectro, presentando mayor tolerancia en adultos y ancianos<sup>9</sup>. Además, este fármaco es útil en el tratamiento de niños con crisis de ausencia de reciente diagnóstico<sup>10</sup> y en trastorno bipolar con eventos de manías, hipomanías y depresión<sup>6</sup>.

También se utiliza en los adultos en monoterapia en pacientes con Crisis parciales. Se ha establecido que es importante determinar las concentraciones plasmáticas de la lamotrigina en los siguientes casos:

- a) Pacientes que no responden al tratamiento lo cual es un indicador de los niveles bajos.
- b) Pacientes con síntomas de toxicidad lo cual es indicador de niveles altos.



- c) Cuando se sospecha una falta de cumplimiento del tratamiento.
- d) Para evaluar la dosis más baja a ser usada en la terapia de mantenimiento.
- e) Cuando se administran otros medicamentos simultáneamente.

Considerando la importancia de este fármaco en la práctica clínica se llevó a cabo el presente estudio, cuyo objetivo fué:

**OBJETIVO.**

- ❖ Validar un Metodo Analítico, eficiente, confiable y robusto que permita la cuantificación de la Lamotrigina en plasma humano por LC-MS-MS.



---

## CAPITULO II. GENERALIDADES.

### 2.1 EPILEPSIA

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica, la cual se caracteriza por ataques recurrentes que son la manifestación física de descargas eléctricas excesivas, súbitas y a menudo breves, de grupos de células cerebrales. Las descargas pueden localizarse en diferentes partes del cerebro.

Los ataques pueden ir desde episodios muy breves de inatención o sacudidas musculares hasta convulsiones intensas y prolongadas (es decir, contracciones musculares violentas e involuntarias o series de contracciones). La frecuencia de los episodios es variable, desde menos de uno al año hasta varios al día.

La epilepsia es una de las afecciones reconocidas desde la antigüedad, y durante siglos ha estado rodeada por el miedo, el desconocimiento, la discriminación y la estigmatización social que persiste aún en muchos países y puede afectar a la calidad de vida de los pacientes y de sus familias.

El riesgo de muerte prematura es dos a tres veces mayor en pacientes epilépticos que en la población general.

Un ataque no hace la epilepsia (hasta un 10% de la población mundial sufre algún ataque en su vida). La epilepsia se define por dos o más ataques no provocados<sup>3</sup>.

#### 2.1.1 Causas

El tipo más frecuente es la epilepsia idiopática (6 de cada 10 casos), es decir, sin causa conocida.





La epilepsia con causas conocidas se denomina epilepsia secundaria o sintomática. Dichas causas pueden consistir en lesiones cerebrales por traumatismos o asfixia durante el parto, traumatismos craneales graves, accidentes vasculares cerebrales que priven al cerebro de oxígeno, infecciones cerebrales como la meningitis, o tumores cerebrales<sup>3</sup>.

### 2.1.2 Factores de riesgo.

Entre los principales factores de riesgo se encuentran:

- Los traumatismos craneales y las infecciones y tumores del sistema nervioso central, los cuales se asocian a la epilepsia secundaria.
- En la población más joven la epilepsia se asocia a complicaciones perinatales y afecciones congénitas, genéticas y del desarrollo.
- Las enfermedades cerebrovasculares (trastornos que afectan al cerebro y a su irrigación) son el factor de riesgo más frecuente en ancianos.
- Los antecedentes familiares de epilepsia parecen aumentar la influencia de otros factores de riesgo.

Algunas de las causas más comunes de epilepsia abarcan:

- Accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio (AIT)
- Lesión cerebral traumática
- Infecciones (incluyendo absceso cerebral, meningitis, encefalitis, neurosífilis y SIDA)
- Problemas presentes desde antes de nacer (defectos cerebrales congénitos)
- Lesiones cerca del momento del nacimiento (en este caso, las CRISIS comienzan en la lactancia o primera infancia)
- Insuficiencia renal o hepática
- Enfermedades metabólicas con las cuales los niños pueden nacer (como fenilcetonuria)
- Tumores u otras lesiones cerebrales estructurales (como hematomas o vasos sanguíneos anormales)



### 2.1.3 Clasificación de las Crisis Epilépticas

La Clasificación Internacional de las Crisis Epilépticas (Comisión para la Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE-1981)<sup>7</sup> divide las manifestaciones clínicas en crisis parciales (comienzan en un área hemisférica específica) y en crisis generalizadas (comienzan en los dos hemisferios simultáneamente).

#### a. Crisis Parciales.

Las crisis parciales son aquellas que se originan en un lugar concreto del cerebro (tienen un foco o punto de origen) y son, por tanto, de origen en el lóbulo temporal, frontal, occipital o parietal del cerebro.

Existen dos tipos de crisis parciales, las simples, si no se asocian a pérdida de contacto con el medio externo, o las complejas, si hay una alteración de la conciencia con pérdida de la capacidad de respuesta durante la crisis.

Las crisis parciales simples consisten en sensaciones o percepciones anormales de tipos visuales, auditivos, sensitivos, psíquicos u olfatorios; o en una actividad motora anormal o bizarra (movimientos clónicos, posturas tónicas, disminución del tono).

Las crisis parciales complejas se caracterizan por mirada ausente y la realización de actos más o menos complejos (automatismos manuales desorganizados u organizados: tales como desprender botones, repetir gestos de uso habitual, movimientos de deglución o chupeteo, etc.) y amnesia de lo sucedido durante la crisis y el inmediato período posterior a las crisis.

Cabe destacar que un porcentaje significativo, aproximadamente el 50% de los pacientes con crisis parciales evolucionan a formas de crisis generalizadas (fenómeno conocido como generalización secundaria) en algún momento de su padecimiento.



## b. Crisis Generalizadas

Ocurren cuando, por definición, prácticamente toda la corteza cerebral esta involucrada en el proceso epiléptico. Las crisis generalizadas pueden ser convulsivas o no convulsivas, y se clasifican en:

- Convulsivas (como son las crisis tónico-clónicas, mioclónicas o tónicas)
- No convulsivas (crisis de ausencias o crisis atónicas)<sup>3</sup>.

En la siguiente tabla se resumen los diferentes tipos de crisis así como las características representativas de cada uno de ellos.

**Tabla 1. Clasificación de las Crisis Epilépticas y medicamentos utilizados <sup>4,11</sup>.**

Tipo de CRISIS	Características	Antiepilepticos clásicos	Fármacos antiépilepticos de creación reciente
<b>CRISIS PARCIALES</b>			
Parciales simples	Diversas manifestaciones que dependen de la región de la corteza activada por la crisis convulsiva (p. ej. si la corteza motora representa al pulgar izquierdo, se producen sacudidas de dicho dedo; si la corteza somatosensorial representa al pulgar izquierdo, se producirán parestesias del pulgar izquierdo) que duran aproximadamente 20 a 60 seg. El aspecto clave es la conservación de conocimiento.	Carbamazepina, Fenitoína, Fenobabital, Pirimidona, Valproato	Gabapentina, Lamotrigina
Parciales complejas	Pérdida del conocimiento que dura de 30seg a 2 min en muchos casos aunado a movimientos propositivos como chasquear los labios o agitar la mano.	Carbamazepina, Fenitoína, Fenobabital, Pirimidona, Valproato	Gabapentina, Lamotrigina
Parciales con Crisis tónico-clónicas generalizadas de manera secundaria.	La CRISIS simple o parcial compleja evoluciona hasta CRISIS tónico-clónica, con pérdida de conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alternada con periodos de relajación ( CRISIS clónicas), que en su forma característica duran de 1 a 2 minutos.	Carbamazepina, Fenitoína, Fenobabital, Pirimidona, Valproato	Gabapentina, Lamotrigina
<b>CRISIS GENERALIZADAS</b>			
Crisis de ausencia	Inicio repentino de pérdida del conocimiento aunado a mirada fija e interrupción de las actividades que se estaban efectuando, y que dura de manera característica menos de 30 segundos.	Clonazepam, Etosuccimida, Valproato.	Lamotrigina
Crisis mioclónica	Contracción muscular breve (quizá de un segundo de duración) de tipo choque eléctrico, ya sea circunscrita a parte de una extremidad o generalizada.	Valproato	
Crisis tónico-clónica	Lo mismo que en caso de las CRISIS parciales con CRISIS tónico clónicas generalizadas de manera secundaria, salvo que no van precedidas por una CRISIS parcial.	Carbamazepina, Fenitoína, Fenobabital, Pirimidona, Valproato	



#### **2.1.4 DIAGNÓSTICO**

El electroencefalograma que es el registro eléctrico de la actividad cerebral y la presencia de descargas anormales, permite corroborar la sospecha clínica de epilepsia e identificar el inicio focal o generalizado de las crisis.

Los estudios de imagen como resonancia nuclear magnética, tomografía, angiografía y estudio de líquido cefalorraquídeo, también son utilizados para confirmar la enfermedad.

#### **Diagnóstico diferencial**

Existe un número importante de situaciones clínicas que por sus manifestaciones deben de ser diferenciadas cuidadosamente de las crisis epilépticas. Entre las más frecuentes se encuentran:

- Hipoglicemia
- Migraña
- Síncope
- Pseudocrisis
- Arritmias cardíacas
- Narcolepsia
- Isquemias cerebrales transitorias

Por lo anterior, en algunos casos se realizan también algunos análisis clínicos entre los cuales se incluyen:

- Glucemia
- Análisis del LCR (líquido cefalorraquídeo)
- Pruebas de la función renal
- Pruebas de la función hepática
- Pruebas para enfermedades infecciosas



### 2.1.5 Pronóstico

En epilepsia, se entiende como pronóstico a la probabilidad de quedar libre de crisis después de iniciar el tratamiento o tras la retirada del mismo.

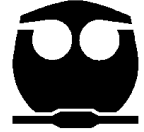
En el ámbito poblacional, el pronóstico global de la epilepsia es un dato de gran importancia para comprender los mecanismos neurobiológicos de la enfermedad que influyen en el pronóstico individual. El pronóstico global es la base para la evaluación de las estrategias de tratamiento y para la administración de recursos sanitarios.

Desde 1984 los estudios han mostrado de forma uniforme un buen pronóstico y una remisión duradera en la mayor parte de los pacientes. El riesgo de recaída después de una primera crisis se ha estimado entre el 23% y el 71%

Tras una primera crisis no provocada la probabilidad de una recaída decrece con el tiempo. Alrededor del 50% de las recurrencias tienen lugar dentro de los seis meses después de la primera crisis y del 76% al 96% dentro de los dos años.

El mayor estudio poblacional, el Estudio Nacional Inglés de Epilepsia en la Práctica General (NPGSE), confirmó este pronóstico y estableció tres puntos importantes: primero, que la mayoría de las recaídas ocurrieron dentro de los primeros 12 meses; segundo, que quienes recayeron en los primeros 12 meses presentaron un pronóstico considerablemente peor que los que recayeron después; tercero, que la probabilidad de remisión, aunque es mayor en los primeros años, se produce también después, aunque en menor medida. Así, tras nueve años de seguimiento, el 86% de los pacientes epilépticos habían logrado una remisión de tres años y el 68% una remisión de cinco años <sup>12</sup>.

En los niños la recurrencia tras una crisis solitaria no provocada es del 50%. El pronóstico de la enfermedad en los niños que habían presentado una única recurrencia fue el mismo que en aquéllos que presentaron crisis múltiples, independientemente de si fueron tratados tras la primera crisis o no.



Esto es un argumento a favor de posponer el tratamiento antiepiléptico al menos hasta que ocurra una segunda crisis. Después de un estatus epiléptico no provocado, la evolución no es peor que tras la presentación con una crisis corta. Por ello tampoco se hace necesario un tratamiento antiepiléptico tras un único estatus epiléptico no provocado. Una cuarta parte de los pacientes no presenta recurrencias y el pronóstico final de los niños no es diferente de la cohorte entera. Los hallazgos en la epilepsia de reciente diagnóstico indican que el tratamiento antiepiléptico puede ser omitido sin peligro o al menos postpuesto en el 15% de los niños, especialmente en aquéllos con tan sólo un pequeño número de crisis antes de la presentación, aquéllos con epilepsia parcial benigna y aquéllos con crisis esporádicas tónico-clónicas generalizadas. La intratabilidad real en niños con epilepsia de reciente diagnóstico se observa únicamente en el 5-15%<sup>12</sup>.

### **2.1.6 Tratamiento**

El primer tratamiento médico eficaz en el control de la epilepsia se basaba en la utilización de depresores no específicos del Sistema Nervioso Central. Sir Charles Locock introduce los bromuros en la mitad del siglo XIX y el fenobarbital fue adaptado en 1912 después de las observaciones de Hauptmann. Actualmente han surgido una serie de nuevos antiepilépticos que intentan incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios..

## **2.2 LAMOTRIGINA**

Es un antiepiléptico derivado de la feniltriazina que fue sintetizada por primera vez en 1970. En los Estados Unidos de Norteamérica, la Lamotrigina recibió su aprobación final para su su comercialización para el tratamiento de esta enfermedad el 27 de Diciembre de 1994 . En 2003 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó su uso en el tratamiento de trastorno bipolar.

La lamotrigina presenta una dosis letal 50 entre 250 >DL50 > 640 mg/Kg<sup>17</sup>.



## 2.2.1 Propiedades Fisicoquímicas

### 2.2.1.1 Descripción y Estructura Química.

- Nombre genérico: Lamotrigina
- Categoría terapéutica: Antiepiléptico
- Nombre IUPAC 6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina



**Figura 1. Estructura química de la Lamotrigina**

- Fórmula condensada: C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>.
- Peso Molecular: 256.0910 g/mol.
- Descripción: un polvo color crema o blanco con punto de fusión 177-181 °C.
- Es estable a temperatura ambiente y su almacenamiento se recomienda entre 2-8°C<sup>13</sup>.



### 2.2.1.2 Solubilidad y log P.

Es completamente soluble en acetonitrilo, en metanol y en acetato de etilo. Su solubilidad en dimetil sulfóxido (DMSO) es de 20 mg/mL a 60 °C y en HCl 0.1 M es de 4.1 mg/mL<sup>14</sup>.

Es muy poco soluble en agua (0.17 mg/mL)<sup>30</sup>.

El Coeficiente de partición octanol/agua de la Lamotrigina es de 2.54<sup>16</sup>.

### 2.2.1.3 Constante de acidez (pKa) y absorción al UV.

El pKa del compuesto es de 5.7.

En la figura 2, se puede observar el espectro de absorción al UV de la Lamotrigina, el cual presenta diferentes máximos dependiendo del pH del medio en el que se encuentre<sup>15</sup>.

pH	$\lambda_{max}$
< 4.5	268 nm
> 5.7	299 nm
> 6.8	310 nm

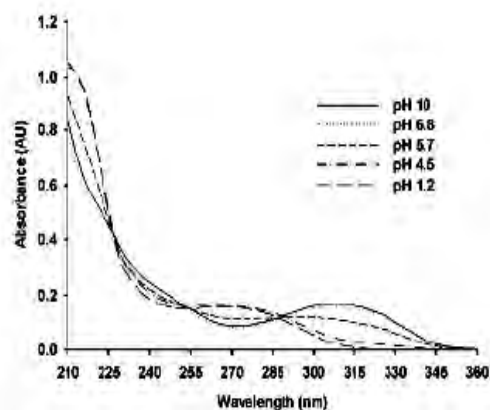


Figura 2. Absorción en UV de la Lamotrigina dependientes de pH





#### 2.2.1.4 Clasificación biofarmacéutica.

De acuerdo con la Clasificación Biofarmacéutica, la lamotrigina entra dentro de los fármacos clase II, es decir, es de alta permeabilidad y baja solubilidad<sup>16</sup>.

#### 2.2.2 Mecanismo De Acción

La lamotrigina bloquea la activación repetitiva sostenida inducida por la despolarización de las neuronas de la médula espinal *in vitro*, acción compatible con el bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje<sup>6</sup>; por este mecanismo estabiliza las membranas neuronales e inhibe la liberación presináptica de neurotransmisores, especialmente del glutamato.

La lamotrigina evita el cúmulo excesivo, rápido y repetitivo de impulsos eléctricos. De esta forma la actividad nerviosa eléctrica en el cerebro se estabiliza, previniendo ataques epilépticos y manteniendo actividad cerebral. La lamotrigina inhibe la extensión tónica de los cuartos tranceros en el modelo de crisis por electrochoque máximo.

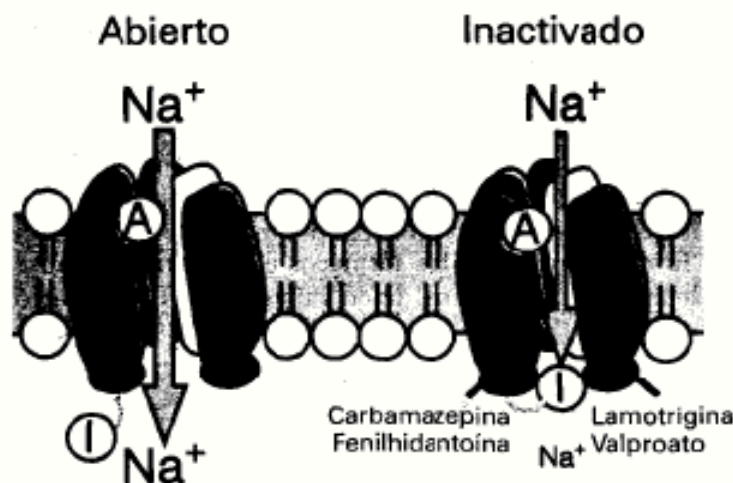


Figura 3. Inactivación del canal de  $\text{Na}^+$ , intensificada por el fármaco anticonvulsivo (lamotrigina).



### **2.2.3 Farmacocinética.**

#### **2.2.3.1 Absorción.**

La lamotrigina se absorbe en forma rápida y completa en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones plasmáticas máximas se presentan aproximadamente 2.5 horas después de la administración oral. El tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima se retarda ligeramente por la presencia de alimentos pero el grado de absorción no se modifica. La farmacocinética es lineal hasta 450 mg, que es la máxima dosis única evaluada.

Existe una gran variabilidad interindividual en las concentraciones máximas en estado estacionario, pero las concentraciones intraindividuales varían muy poco<sup>18</sup>.

#### **2.2.3.2 Distribución.**

La unión a proteínas plasmáticas es de aproximadamente 55%. Considerando que la unión es baja, es poco probable que si se desplaza de las proteínas pueda provocar efectos tóxicos.

El volumen de distribución es de 0.92 a 1.22 l/kg<sup>18</sup>.

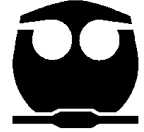
#### **2.2.3.3 Metabolismo.**

Las enzimas responsables del metabolismo de la lamotrigina son las UDP-glucuronil transferasas<sup>18</sup>.

#### **2.2.3.4 Eliminación.**

La depuración promedio en estado estable en adultos sanos es de  $39 \pm 14$  ml/min.

La depuración de lamotrigina se lleva a cabo por metabolismo con eliminación subsecuente de glucurónidos conjugados en orina. Menos del 10% es eliminado en forma inalterada en la orina.



Aproximadamente 2% del fármaco es excretado en las heces. La depuración y la vida media son independientes de la dosis. La vida media de eliminación promedio en adultos sanos es de 24 a 35 horas.

En un estudio de pacientes con síndrome de Gilbert, la depuración aparente promedio se redujo en 32% en comparación con los controles normales, pero los valores están dentro del intervalo de la población general.

La vida media de Lamotrigina se ve afectada considerablemente por los medicamentos concomitantes. Cuando se administra lamotrigina con fármacos inductores de la glucuronidación como oxcarbamazepina y fenitoína, su vida media promedio se reduce a aproximadamente 14 horas y cuando se coadministra con valproato de sodio, aumenta a un valor de 70 horas<sup>18</sup>.

#### **2.2.4 Régimen de dosificación.**

La dosis de Lamotrigina varía entre 5 a 15 mg/kg/día. El rango comúnmente utilizado va entre 300-500 mg/día. Sin embargo, una dosis de hasta 700 mg/día ha sido bien tolerada, cuando ésta se ha ido aumentando gradualmente<sup>5,19</sup>. En pacientes bajo tratamiento con valproato de magnesio, la dosis es de 150 mg/día.

Se ha propuesto un rango terapéutico de 1-4 µg/mL sin embargo algunos pacientes toleran concentraciones mayores a 10 µg/mL sin presentar toxicidad clínica. En algunos casos también se ha reportado un rango de efectividad entre 2-20 µg/mL, sin presentar toxicidad<sup>5</sup>. El rango terapéutico depende además de los medicamentos que se prescriben en conjunto, es decir, medicamentos concomitantes. Algunos autores sugieren el monitoreo terapéutico para asegurar su efectividad y evitar su toxicidad e interacciones<sup>20,21</sup>.

En adultos, las dosis orales de 200 a 500 mg/día son efectivas y bien toleradas en el tratamiento de crisis parciales. Las recomendaciones de uso son las siguientes: <sup>20,21</sup>.



### **Monoterapia:**

- Dosis inicial: 25 mg/día por 2 semanas, luego 50 mg/día por 2 semanas. Posteriormente, la dosis se incrementa en 50 mg/día cada 12 semanas hasta alcanzar la respuesta terapéutica.
- Dosis de mantenimiento: de 100 a 200 mg/día divididos en 2 tomas.

### **Terapia adyuvante,**

- Dosis inicial: 50 mg dos veces al día (100 mg/día) durante 1 a 2 semanas.
- Dosis de mantenimiento: 100 a 200 mg una o dos veces al día (200 a 400 mg/día).
- Dosis máxima: 500 mg/día.

### **2.2.5 Interacciones farmacocinéticas.**

La lamotrigina induce su propio metabolismo en un grado modesto, dependiendo de la dosis. Sin embargo, no hay evidencia de que lamotrigina afecte la farmacocinética de otros fármacos antiepilépticos y los datos sugieren que es improbable que se presenten interacciones entre lamotrigina y los fármacos metabolizados en el sistema enzimático del citocromo P-450<sup>18</sup>.

La administración conjunta de Lamotrigina con Carbamazepina o bien con oxcarbamazepina aumenta el riesgo de reacciones adversas, produciendo alteraciones en el sistema nervioso central, como son: mareos, ataxia, diplopia, visión borrosa y náuseas, lo cual sugiere que existe una interacción farmacodinámica entre estos fármacos en el sitio del receptor<sup>5,6,19</sup>.

El acetaminofén interactúa con la lamotrigina aumentando la eliminación urinaria de esta última. Se ha demostrado que en voluntarios sanos, una dosis de 500 mg de acetaminofén incrementa en un 15 % la depuración de la lamotrigina<sup>5,19,21</sup>. La rifampicina y el ritonavir, al ser inductores enzimáticos aumentan la eliminación del fármaco<sup>21</sup>.



El uso de anticonceptivos conteniendo estrógenos incrementa la depuración de Lamotrigina, por lo que las concentraciones plasmáticas se disminuyen en un 32 % y el área bajo la curva en un 52 %.

Se ha demostrado que la lamotrigina es un inhibidor débil de la dihidrofolato reductasa, encargada de la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato. La inhibición de esta enzima, puede interferir en la biosíntesis de ácidos nucleicos, por lo que no debería administrarse conjuntamente con medicamentos que inhiban el metabolismo del folato como zidovudina con cotrimoxazol o trimetoprim<sup>6,18,22</sup>.

### **2.2.6 Efectos adversos.**

Durante las primeras 8 semanas de tratamiento, se ha reportado la aparición de reacciones adversas cutáneas, que en su mayoría han sido de naturaleza leve y resolución espontánea. No obstante, también se han reportado casos aislados de erupciones cutáneas graves, rash cutáneo generalizado, eritematoso, morbidiforme (Síndrome de Stevens-Johnson), de riesgo potencial para la vida, incluyendo necrólisis epidérmica tóxica, que requirieron hospitalización y la discontinuación de la Lamotrigina<sup>5,18</sup>.

En los últimos años se han reportado numerosos casos con síndrome de Stevens-Johnson, relacionados principalmente con el aumento brusco de la dosis de lamotrigina. Estas reacciones adversas se han presentado más en niños que en adultos y el uso concomitante con ácido valpróico aumenta su incidencia<sup>5,18</sup>.

Los efectos adversos más comunes son diplopía (14%), vértigo (14%), somnolencia (13%), dolor de cabeza (12%), ataxia (11%), astenia (10%), erupciones de la piel (3%) y erupción alérgica generalizada (2.3%)<sup>5,6,19</sup>.



### **2.2.7 Precauciones y advertencias.**

Se ha encontrado que las dosis altas de Lamotrigina, pueden estar asociadas con una alta incidencia de rash cutáneo lo que obliga a suspender el tratamiento. La interrupción brusca de lamotrigina puede provocar crisis de rebote, por lo que se recomienda la reducción de las dosis en etapas durante un período de dos semanas<sup>6,18,19</sup>.

En pacientes con daño renal o hepático (cirrosis severa, hepatitis), la dosis debe de ajustarse, ya que la depuración se ve considerablemente reducida y por ende existe acumulación de los metabolitos de lamotrigina, a pesar de que la concentración plasmática sea similar a la detectada en pacientes<sup>18,23</sup>.

No se recomienda administrarlo a mujeres embarazadas, excepto en aquellos casos en que el beneficio para la madre supera el riesgo potencial para el feto. Dado que durante el embarazo, la depuración de la lamotrigina puede aumentar más del 50% y disminuir después del parto, es importante el monitoreo terapéutico antes, durante y después del embarazo.

La Lamotrigina llega a la leche materna en una proporción de 40%-45% de la concentración plasmática; los lactantes amamantados recibieron dosis equivalentes a 1.06-1.75 mg/kg/día sin que se observaran efectos adversos<sup>25,26</sup>.

### **2.2.8 Contraindicaciones.**

Hipersensibilidad o intolerancia a la lamotrigina.

### **2.2.9 Sobredosificación.**

Los signos y síntomas de sobredosis incluyen nistagmo, ataxia, mareo, somnolencia, cefalea, vómitos ó coma. El tratamiento consiste en terapia de mantenimiento adecuada, supervisión de signos vitales y lavado gástrico<sup>18</sup>.



### 2.2.10 Productos comerciales en México.

En la tabla 2 se presentan los productos comerciales conteniendo lamotrigina que están disponibles para su venta en nuestro país.

**Tabla 2. Productos comerciales conteniendo Lamotrigina<sup>17</sup>.**

Nombre comercial	Laboratorio	Lugar de Venta	Forma farmacéutica	Presentaciones
LAMICTAL DISPERSABLE	GLAXOSMITHKLINE	MEXICO	TABLETAS	5, 25, 50 o 100mg
PROTALGINE DISPERSABLE	PROBIOMED	MEXICO	TABLETAS	25 o 100mg
LAMDRA DM	BIOQUIMED	MEXICO	TABLETAS	5, 25 o 100mg
LAMDRA SBK 12 Y 24	BIOQUIMED	MEXICO	GRAGEAS DE LIBERACION PROLONGADA	10, 25, 50 o 100mg

### 2.3 ESPECTROMETRIA DE MASAS

Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga<sup>31</sup>. La espectrometría de masas es probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico la de aplicación más general en el sentido que la técnica es capaz de suministrar información sobre:

- 1.- La composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas
- 2.- Las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas
- 3.- Las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras
- 4.- La estructura y composición de superficies sólidas.



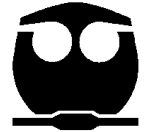
La ubicuidad de la espectrometría de masas (MS = Mass spectroscopy) se ilustra en la Tabla 3, que muestra el desarrollo de la técnica desde 1920. Es interesante observar que todas las aplicaciones que se indican todavía se utilizan en los laboratorios modernos<sup>31</sup>.

**Tabla 3. Evolución de la espectrometría de masas**

Desarrollo	Fecha aproximada	Aplicación
Comportamiento de los iones en campos magnéticos descritos.	1920	Determinación de la abundancia isotópica de un elemento.
Doble enfoque.	1935	Se alcanza la resolución de masas elevadas.
Primer espectrómetro de masas comercial.	1950	Análisis cuantitativo de productos del petróleo.
Fuente de chispa.	1955	Análisis cuantitativo elemental.
Teoría que describe la fragmentación de especies moleculares.	1960	Identificación y análisis estructural de moléculas complejas.
Acoplamiento de los espectrómetros de masas con los cromatógrafos.	1965	Análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas.
Espectrómetros de masas de tándem.	1970	Análisis de alta velocidad de mezclas complejas.
Nuevas técnicas de ionización.	1970	Gran capacidad para la elucidación de estructuras.
Transformada de Fourier aplicada a la espectrometría.	1980	Resolución de masas y relaciones señal-ruido mejoradas.
Fuentes mejoradas para especies no volátiles.	1980	Análisis de moléculas y superficies poliméricas.

En primer lugar, debe señalarse que los pesos atómicos y moleculares utilizados en la bibliografía de espectrometría de masas, y en este capítulo, difieren de los utilizados en la mayoría de los otros métodos analíticos, ya que los espectrómetros de masas discriminan entre la masa de los isótopos, mientras que otros instrumentos analíticos generalmente no lo hacen. Por tanto, se revisarán brevemente algunos términos relacionados con los pesos atómicos y moleculares.





Los pesos atómicos y moleculares se expresan generalmente en términos de unidades atómicas de masa (uma). La unidad atómica de masa se basa en una escala relativa en la que la referencia es el isótopo del carbono  $^{12}\text{C}$ , al cual se le asigna una masa de exactamente 12 umas<sup>31</sup>. Así, el uma se define como 1/12 de la masa de un átomo neutro de  $^{12}\text{C}$ . Los espectroscopistas de masas también llaman al uma dalton. Estas definiciones nos llevan a que 1 uma, o 1 dalton, de carbono sea igual a:

$$1 \text{ uma} = 1 \text{ dalton} = 1/12 \cdot (12 \text{ g } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C} / 6.0221 \times 10^{23} \text{ átomos } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C}) \\ = 1.66054 \times 10^{-24} \text{ g/átom } ^{12}\text{C} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ kg/átom } ^{12}\text{C}$$

El peso atómico de un isótopo, tal como el  $^{35}\text{Cl}$ , se puede relacionar con el átomo de referencia  $^{12}\text{C}$  por comparación de las masas de los dos isótopos. Esta comparación revela que el isótopo cloro 35 tiene una masa que es 2.91407 veces mayor que la masa del isótopo del carbono.

Así, la masa atómica del isótopo del cloro es:

$$\text{masa atómica } ^{35}\text{Cl} = 12.0000 \text{ dalton} \times 2.91407 = 34.9688 \text{ dalton}$$

Debido a que 1 mol de  $^{12}\text{C}$  pesa 12.0000 g, el peso atómico del  $^{35}\text{Cl}$  es 34.9688 g/mol.

En espectrometría de masas, a diferencia de lo que ocurre normalmente en química, se está a menudo interesado en la masa exacta  $m$  de los isótopos de un elemento o en la masa exacta de los compuestos que contienen un grupo particular de isótopos. Así, se puede tener la necesidad de distinguir entre las masas de compuestos tales como:

$$^{12}\text{C } ^1\text{H}_4 \text{ m} = 12.000 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 16.031 \text{ dalton}$$

$$^{13}\text{C } ^1\text{H}_4 \text{ m} = 13.00335 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 17.035 \text{ dalton}$$

$$^{12}\text{C } ^1\text{H}_3 \text{ } ^2\text{H}_1 \text{ m} = 12.000 \times 1 + 1.007825 \times 3 + 2.0140 \times 1 = 17.037 \text{ dalton}$$

Normalmente, en espectrometría de masas, las masas exactas se expresan con tres o cuatro decimales, ya que los espectrómetros de masas de alta resolución tienen esta precisión<sup>31</sup>.



En algunos contextos, se usa el término masa nominal, que implica una precisión de un número entero en una medida de masa. Así, las masas nominales de los tres isómeros antes citados son 16, 17 y 17 daltons, respectivamente.

El peso atómico o el peso atómico promedio ( $A$ ) de un elemento en la naturaleza viene dada por la ecuación

$$A = A_1 p_1 + A_2 p_2 + \dots + A_n p_n$$

donde  $A_1, A_2, \dots, A_n$  son las masas atómicas en daltons de los  $n$  isótopos de un elemento y  $p_1, p_2, \dots, p_n$  son las abundancias de estos isótopos en la naturaleza. El peso atómico químico es, naturalmente, el peso que interesa a los químicos en la mayoría de las ocasiones. El peso molecular promedio o químico de un compuesto es por tanto la suma de los pesos atómicos químicos para los átomos que aparecen en la fórmula del compuesto. Así, el peso molecular químico de  $\text{CH}_4$  es  $12.01115 + 4 \times 1.00797 = 16.0434$  daltons.

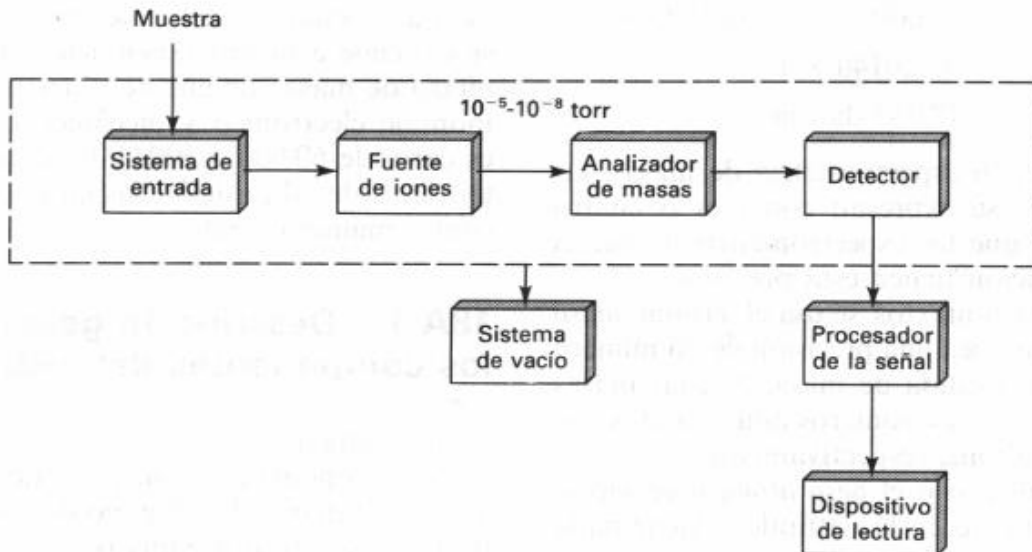
Otro término que se utiliza a lo largo de este capítulo es la relación masa/carga de un ion atómico o molecular. Este término se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ion  $m$  por el número de cargas  $z$  que tiene el ion.

Así, para  $^{12}\text{C}_1\text{H}_4^+$ ,  $m/z = 16.035/1 = 16.035$ . Para  $^{13}\text{C}_1\text{H}_4^{2+}$ ,  $m/z = 17.035/2 = 8.518$ .

### 2.3.1 El Espectrómetro de Masas

Los fundamentos de las medidas espectrales de masas son sencillos y fácilmente comprensibles; aunque desafortunadamente, esta simplicidad no se extiende a la instrumentación. Un espectrómetro de masas de alta resolución típico es un montaje electrónico y mecánico complejo que es caro tanto en términos de adquisición inicial como en operación y mantenimiento<sup>31</sup>.

El diagrama de bloques de la Figura 4 muestra los componentes principales de los espectrómetros de masas. El objetivo del sistema de entrada es de introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrómetro de masas, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo, el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas o líquidas<sup>31</sup>.



**Figura 4. Componentes de un espectrómetro de masas**

La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones.

Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinadas en un único componente. En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas.

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, dependiendo de la naturaleza del analizador de masas.

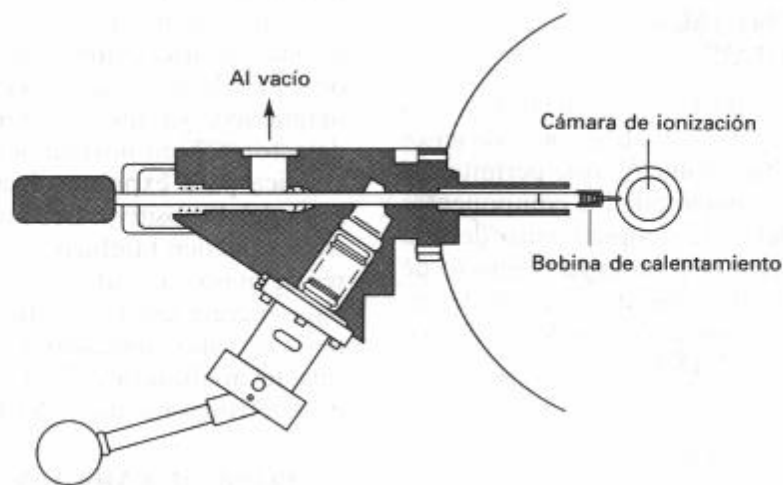
Un espectrómetro de masas contiene un detector (para iones) que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada de varias maneras. Un hecho característico de los espectrómetros de masas es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones ( $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  torr) en todos los componentes del instrumento excepto el procesador de señal y dispositivo de lectura.



En las siguientes secciones, se describen primero los sistemas de entrada, los sistemas de vacío y los diferentes tipos de fuentes de iones.

### 2.3.2 Sistemas de entrada de muestra

La finalidad del sistema de entrada es la de permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. Los espectrómetros de masas más modernos están equipados con dos tipos de entradas capaces de acomodar diversos tipos de muestras, que incluyen sistemas de entrada, de sonda directa y entradas cromatográficas<sup>31</sup>.



**Figura 5. Esquema de un sistema de introducción de muestra por sonda para introducir una muestra en la fuente de iones (DIP).**

#### 2.3.2.1 Entrada por sonda directa

Los líquidos y sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte de muestra o sonda, el cual se inserta a través de una cámara intermedia de vacío (véase Figura 5). La cámara intermedia está diseñada para limitar el volumen de aire que puede entrar en la región de ionización durante la inserción de la sonda. Las sondas se utilizan también cuando la cantidad de muestra es limitada. Por tanto, los espectros de masas se pueden obtener a menudo con una cantidad de muestra tan pequeña como unos pocos nanogramos.



En una sonda, la muestra se pone generalmente en la superficie de un vidrio o en un tubo capilar de aluminio, un alambre fino o una copa pequeña y la sonda se coloca a unos pocos milímetros de la fuente de ionización y de la rendija que conduce al espectrómetro<sup>31</sup>.

La baja presión del área de ionización y la proximidad de la muestra a la fuente de ionización a menudo hace posible la obtención de espectros de compuestos inestables térmicamente antes que se descompongan. La baja presión proporciona también una mayor concentración de compuestos relativamente no volátiles en el área de ionización, de modo que, la sonda permite el estudio de materiales no volátiles tales como carbohidratos, esteroides, especies organometálicas y sustancias poliméricas de bajo peso molecular. El requisito principal de la muestra es que alcance una presión parcial de al menos  $10^{-8}$  torr antes que empiece a descomponerse.

### **2.3.2.2 Sistemas de entrada cromatográficos**

Los espectrómetros de masas a menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o de líquidos de alta resolución que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas. El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas requiere la utilización de sistemas de entrada especiales, algunos de los cuales se describen a continuación.

#### ***Cromatografía de gases / Espectrometría de masas.***

Algunos fabricantes de instrumentos ofrecen equipos de cromatografía de gases que pueden acoplarse directamente con distintos tipos de espectrómetros de masas de barrido rápido. El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Desde finales de los años setenta han aparecido en el mercado diversos espectrómetros de masas diseñados específicamente como detectores para cromatografía de gases<sup>31</sup>.



### ***Cromatografía HPLC / Espectrometría de masas.***

Un problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes relativamente grandes de disolvente de la primera y los requerimientos de vacío de la última.

Para resolver este problema se han desarrollado diversas interfaces. Algunas de las técnicas de acoplamiento se utilizaron durante un tiempo y hoy están en desuso, como la DLI =Direct Liquid Inlet o la Moving Belt (cinta móvil)<sup>31</sup>.

#### **2.3.3 Fuentes de iones**

Históricamente, los iones para análisis de masas se producían por bombardeo de los componentes de muestras gaseosas con electrones de elevada energía. A pesar de ciertas desventajas, esta técnica todavía tiene una gran importancia y es en la que se basan la mayor parte de las bibliotecas de espectros.

Sin embargo, durante las dos últimas décadas se han desarrollado varias nuevas fuentes de iones que ofrecen ciertas ventajas sobre la clásica fuente de haz de electrones<sup>31</sup>.

La Tabla 4 da un listado de estas nuevas fuentes y de las fechas aproximadas en las que empezaron a utilizarse. Normalmente, la mayoría de los espectrómetros de masas comerciales están equipados con accesorios que permiten el uso de varias de estas fuentes intercambiables.



Tabla 4. Fuentes de espectrometría de masas

Nombre	Abreviatura	Tipo	Agente ionizante	Fecha de utilización ininterrumpida
Ionización por electrones	EI	Fase gas	Electrones energéticos	1920
Ionización química	CI	Fase gas	Iones reactivos	1965
Ionización por campo	FI	Fase gas	Electrodo de elevado potencial	1970
Desorción por campo	FD	Desorción	Electrodo de elevado potencial	1969
Bombardeo con átomos rápidos	FAB	Desorción	Átomos energéticos	1981
Espectrometría de masas de iones secundarios	SIMS	Desorción	Iones energéticos	1977
Desorción por láser	LD	Desorción	Haz de láser	1978
Desorción por plasma	PD	Desorción	Fragmentos de fisión de elevada energía del $^{252}\text{Cf}$	1974
Desorción térmica		Desorción	Calor	1979
Ionización electrohidrodinámica	EHMS	Desorción	Campo elevado	1978
Ionización por termovaporización	ES		Cargas positivas aplicadas sobre finas gotitas de la disolución de la muestra	1985

Nótese que las fuentes que se indican en la Tabla 4 pertenecen a dos categorías. La primera corresponde a las *fuentes de fase gas* en las que la muestra es primero volatilizada y a continuación los componentes gaseosos son ionizados de diversas maneras. La segunda categoría de fuentes es la de *fuentes de desorción* en la que se prescinde de la vaporización de la muestra y en consecuencia, esta técnica requiere siempre la utilización de una sonda de muestra. En este caso, la energía se transmite a la muestra sólida o líquida, de maneras muy diversas produciendo la ionización y la transferencia directa de iones de la fase condensada al estado gaseoso iónico. La mayor ventaja de la ionización por desorción es que permite el examen de moléculas no volátiles y térmicamente inestables tales como las que se encuentran normalmente en bioquímica. Las fuentes de iones se clasifican a menudo en *duras* o *blandas*. La fuente dura más importante es la fuente de impacto de electrones, que se discute a continuación. Las fuentes duras comunican energías elevadas a los iones formados de manera que se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados. La relajación de estos iones produce una gran cantidad de fragmentación y resultan espectros de masas complejos.

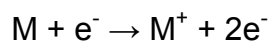


Por el contrario, las fuentes blandas, tales como las fuentes de ionización química y la de desorción, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación, y los espectros son sencillos. Ambos tipos de espectros son útiles. Los espectros sencillos de las fuentes blandas permiten la determinación exacta del peso molecular del analito, mientras que los modelos espectrales más complejos de las fuentes duras a menudo permiten una identificación inequívoca del mismo. A continuación se hace una pequeña descripción de las fuentes más utilizadas actualmente<sup>31</sup>.

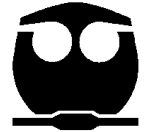
### 2.3.3.1 Fuentes de impacto de electrones (EI)

Las tres primeras fuentes que se indican en la Tabla 4 requieren la volatilización de la muestra antes de la ionización. Por tanto, las fuentes de fase gas tan sólo se pueden usar para compuestos estables térmicamente que tengan puntos de ebullición menores de aproximadamente 500 °C. En la mayoría de los casos, las fuentes gaseosas están limitadas a compuestos con pesos moleculares menores de aproximadamente 103 daltons<sup>31</sup>.

La Figura 6 muestra el diagrama de una fuente de iones de impacto de electrones sencilla. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de tungsteno o renio y son acelerados por un potencial de aproximadamente 70 V que se aplica entre el filamento y el ánodo. Como se muestra en la Figura 6, las trayectorias de los electrones y las moléculas están en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente, donde colisionan y tiene lugar la ionización. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas. La ionización por impacto de electrones no es muy eficaz y sólo alrededor de una molécula entre un millón experimenta la reacción primaria:

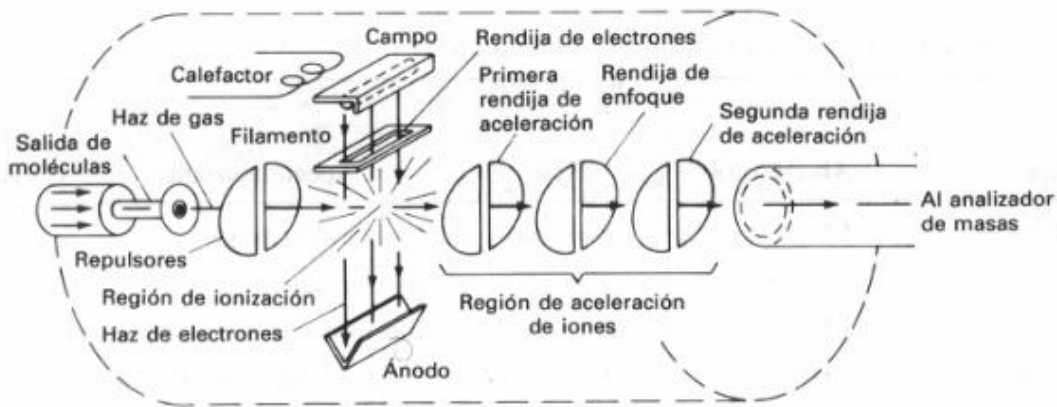






Donde M representa la molécula de analito y  $M^+$  es su *ion molecular*. Como indica el punto, el ion molecular es un *ion radical* que tiene el mismo peso molecular que la molécula. Los iones positivos producidos en un impacto de electrones son atraídos a través de la rendija hacia la primera placa de aceleración mediante una pequeña diferencia de potencial (normalmente 5 V) que se aplica entre esta placa y los repulsores que se muestran en la Figura 6.

En los instrumentos de sector magnético, se aplican potenciales elevados ( $10^3$  a  $10^4$  V) a las placas aceleradoras, que permiten a los iones adquirir sus velocidades finales antes que entren en el analizador de masas<sup>31</sup>.



**Figura 6. Fuente de impacto electrónico.**

Con el objeto de formar un número significativo de iones gaseosos en una proporción reproducible, es necesario que los electrones generados por el filamento de la fuente sean acelerados por un potencial mayor de unos 50 V. La pequeña masa y la alta energía cinética de los electrones resultantes produce aumentos muy pequeños en la energía traslacional de las moléculas con las que chocan. Sin embargo, estas moléculas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados. La subsecuente relajación tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación, que da lugar a un gran número de iones positivos de varias masas que son menores que (y en ocasiones mayores que) la del ion molecular. Estos iones se llaman *iones descendientes o hijos*.

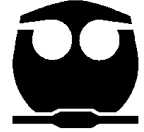


### 2.3.3.2 Fuentes de ionización química (CI = Chemical ionisation)

Los espectrómetros de masas más modernos están diseñados para poder intercambiar esta fuente con la de impacto de electrones. En ionización química, las moléculas gaseosas de la muestra son ionizadas por colisión con los iones producidos por el bombardeo con electrones de un exceso de un gas reactivo. Normalmente se utilizan iones positivos, pero la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente con analitos que contienen átomos muy electronegativos<sup>32</sup>. La ionización química es probablemente el segundo de los procedimientos más comunes para la producción de iones en espectrometría de masas.

Para llevar a cabo experimentos de ionización química, es necesario modificar el área de ionización del haz de electrones que se muestra en la Figura 8 poniendo una bomba de vacío y reduciendo la anchura de la rendija que conduce al analizador de masas. Estas medidas permiten mantener unas presiones de gas reactivo de alrededor de 1 torr en el área de ionización mientras se mantiene la presión en el analizador por debajo de  $10^{-5}$  torr. Con estos cambios, se introduce un reactivo gaseoso en la región de ionización en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de  $10^3$  a  $10^4$ . Debido a esta elevada diferencia de concentraciones, el haz de electrones reacciona casi exclusivamente con las moléculas de reactivo.

Uno de los reactivos más comunes es el metano, que reacciona con electrones de elevada energía para dar varios iones como  $\text{CH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3^+$  y  $\text{CH}_2^+$ . Los dos primeros predominan y representan alrededor del 90% de los productos de reacción. Estos iones reaccionan rápidamente con moléculas de metano adicionales siguiendo un esquema de reacciones que dan el ion  $(M + 1)^+$  o el ion  $(M - 1)^+$  de la muestra. Una gran variedad de reactivos, tales como propano, isobutano y amoníaco, se utilizan para la ionización química y cada uno de ellos produce un espectro diferente con un analito dado<sup>33</sup>.



### 2.3.3.3 Fuentes de ionización a presión atmosférica (API)

La Ionización a Presión Atmosférica (API) es una técnica de ionización blanda que, al actuar a presión atmosférica, y no en alto vacío como es lo habitual en otras técnicas, consigue un altísimo rendimiento. Como interfase para HPLC, tiene la virtud de aceptar todo el flujo procedente de un cromatógrafo líquido de alta presión convencional, hasta 1 a 4 mL/min., lo que incide favorablemente sobre la sensibilidad del proceso LC-MS. En general, ionizan la muestra a presión atmosférica, eliminan el disolvente, se ioniza el analito y se traslada los iones al MS. En las figuras 7 y 8 se muestra el mecanismo de evaporación iónica para técnicas a presión atmosférica<sup>31</sup>.

Las dos ionizaciones API más comúnmente utilizadas son el “Electrospray, (ESI)”, y la “Ionización Química a Presión Atmosférica, APci”<sup>32</sup>.

En la ionización ESI se aplica una tensión de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el contraelectrodo. Por efecto del intenso gradiente de campo eléctrico presente, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar estas gotas por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño, que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial, momento en que los iones escapan a la fase gaseosa denominándose a este proceso evaporación iónica. Una característica de esta técnica es que al producir una enorme abundancia de iones con carga múltiple, pueden determinarse masas moleculares de moléculas muy grandes como proteínas<sup>32</sup>.

## ATMOSPHERIC PRESSURE

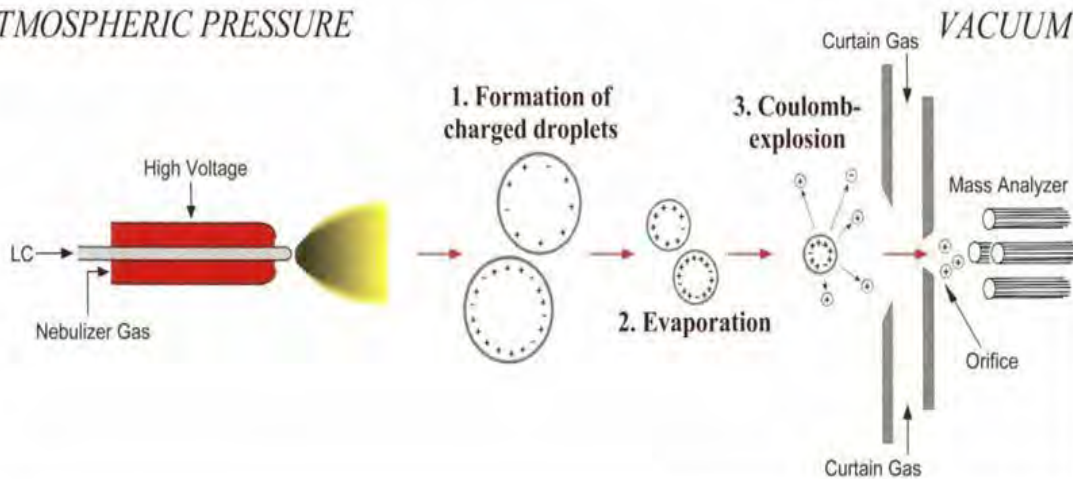


Figura 7. Mecanismo de evaporación iónica para técnicas ESI.

En la ionización APci el procedimiento de formación del spray es el mismo pero ahora lo que se produce es una fuerte descarga en la fuente que produce un plasma de iones reactivos del disolvente que origina el mecanismo de ionización de la muestra por ionización química (CI), normalmente por adición o cesión de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones  $(M+H)^+$  positivos, y  $(M-H)^-$  negativos.

## ATMOSPHERIC PRESSURE

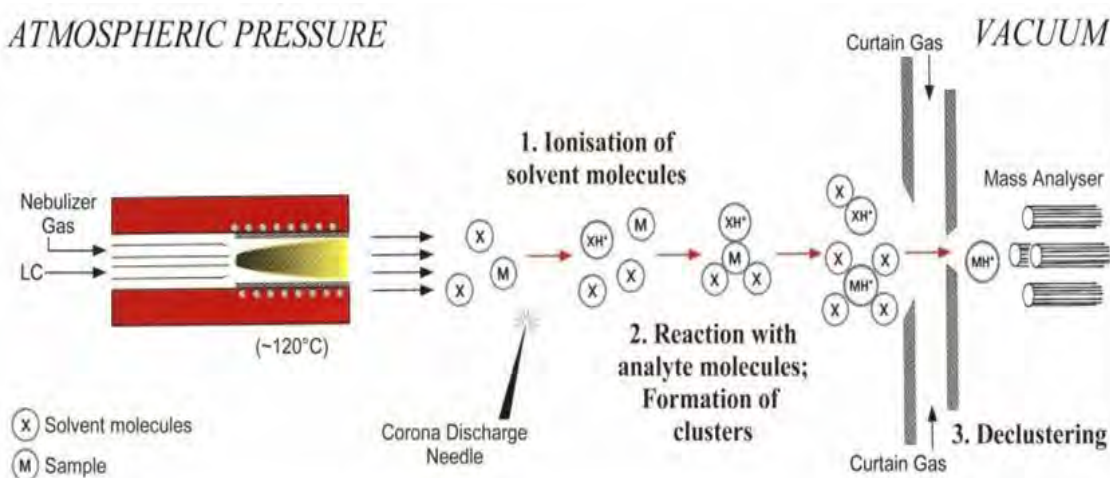


Figura 8. Mecanismo de evaporación iónica para técnicas APci.



### 2.3.4 Sistemas de vacío

Para que el proceso descrito, que se verifica en el interior del espectrómetro de masas, pueda realizarse con éxito, debe hacerse en un ambiente de alto vacío, donde el recorrido libre medio de las moléculas y de los iones formados sea consistente con la longitud de la trayectoria que deben recorrer en su camino hasta el detector. En otras palabras, si un ión formado en la fuente de ionización debe recorrer una trayectoria de un metro para alcanzar el detector, el interior del espectrómetro por donde debe volar el ión debe estar evacuado a un vacío suficiente para asegurar la ausencia de colisiones en su camino.

Los principales tipos de bombas que se utilizan para conseguir el alto vacío en espectrometría de masas son las difusoras y las turbomoleculares sin olvidar las mecánicas o rotatorias que son las que se necesitan para hacer los vacíos preliminares que requieren las difusoras y las turbomoleculares para empezar a trabajar<sup>31</sup>.

El principio de funcionamiento de las bombas difusoras de fraccionamiento se muestra en la figura 9. El aceite depositado en la parte inferior de la bomba es calentado por una placa calefactora. Al producirse la ebullición, los vapores de aceite suben por las “chimeneas” concéntricas hasta encontrarse con una salida lateral escapando en forma de chorro supersónico, yendo a chocar contra las paredes laterales refrigeradas por un circuito de agua, donde condensarán, volviendo a caer al depósito inferior. En su camino hacia la pared atraparán moléculas de aire o cualquier gas presente en el ambiente a evacuar, reduciendo poco a poco la presión. En ciclos sucesivos, el aceite se va fraccionando, quedando la parte más ligera o volátil en la zona exterior, y la más pesada en el interior. Los componentes ligeros que quedan en la zona exterior son fácilmente eliminados por la bomba rotativa de apoyo, mientras que la fracción más pesada y pura del aceite se va concentrando en la zona interior<sup>31</sup>.

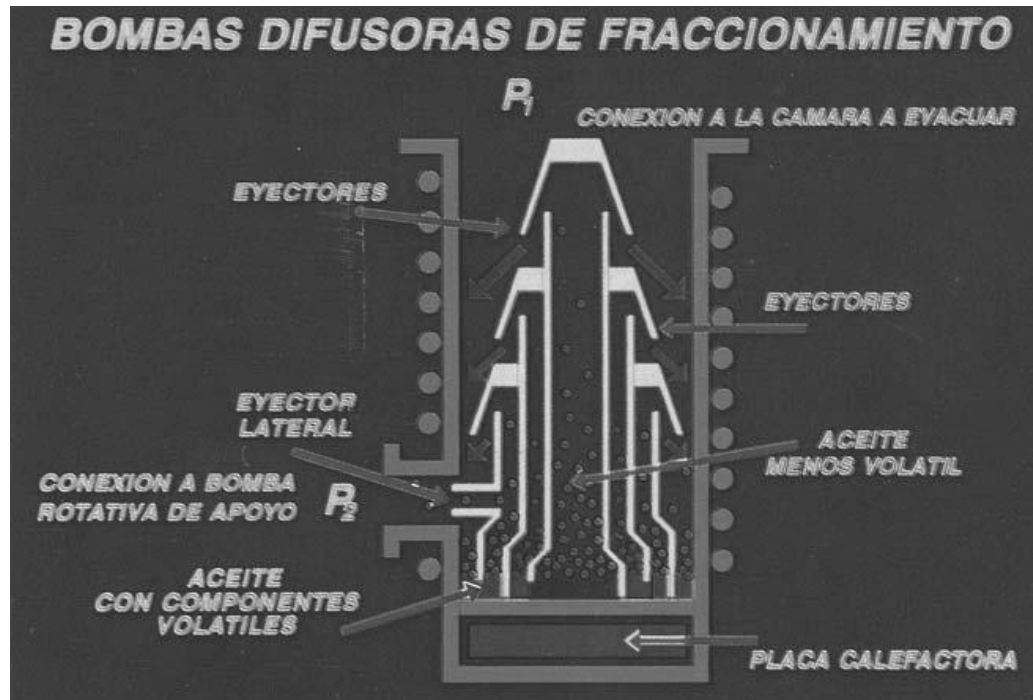
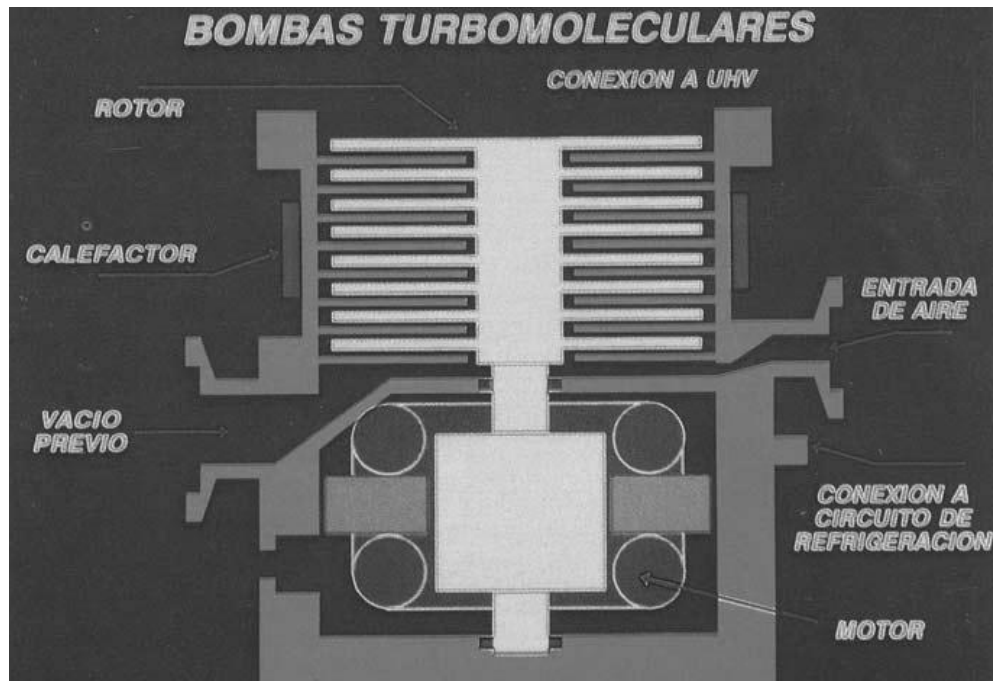


Figura 9. Bombas difusoras de fraccionamiento

En cuanto al funcionamiento de las bombas turbomoleculares, figura 10, las aspas del rotor de la bomba están girando a gran velocidad. Cuando las moléculas gaseosas, procedentes de la cámara que se está evacuando a alto vacío, chocan con las aspas, reciben un componente adicional de velocidad en dirección a la cámara inferior, esta cámara está a su vez evacuada por una bomba rotativa mecánica. Si la velocidad de las astas del rotor es del mismo orden que la velocidad de agitación térmica de las moléculas a evacuar, el proceso será muy eficiente, y se conseguirá una buena relación de compresión entre la zona de prevacío y la de alto vacío<sup>31</sup>.



**Figura 10. Bombas turbomoleculares**

En la Tabla 5 podemos ver un resumen de las principales ventajas e inconvenientes de estos dos sistemas de bombeo. En cuanto al peligro potencial de contaminación por el aceite de vacío de las bombas difusoras, hoy en día no es un factor a tener muy en cuenta, ya que la utilización de aceites especiales y de sistemas de protección automática contra accidentes de vacío, suministro de corriente eléctrica, o fallos del circuito de refrigeración, hacen de este sistema de bombeo un método muy seguro<sup>31</sup>.



**Tabla 5. Ventajas e inconvenientes del uso de bombas turbomoleculares o difusoras**

<b>BOMBAS DIFUSORAS</b>	<b>BOMBAS TURBOMOLECULARES</b>
<b>VENTAJAS</b>	<b>VENTAJAS</b>
* Costo reducido	* Alcanza régimen rápidamente
* Mantenimiento casi nulo	* Posicionado en ángulo
* Relación de compresión alta	* Menor necesidad de refrigeración
<b>DESVENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
* Riesgo de contaminación	* Caras
* Posicionado vertical	* Costo de averías
* Alcanza la situación de régimen con lentitud	* Riesgo de daño/contaminación
* Mayor necesidad de refrigeración	* Vibraciones
	* Incompatible con gases corrosivos
	* relación de compresión baja

Otro tipo de bombas menos utilizadas son las iónicas, las de sublimación de titanio y las criogénicas todas ellas utilizadas para conseguir condiciones de ultra-alto vacío.

En todos los equipos de masas de estos servicios los vacíos están en torno a  $10^{-6}$  torr.

### 2.3.5 Analizadores de masa

Para la separación de iones con diversas relaciones masa/carga son posibles varios métodos. Idealmente, un analizador debería ser capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían permitir el paso del suficiente número de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles. Sin embargo, estas dos propiedades no son totalmente compatibles y siempre se debe llegar a un compromiso en el diseño.





La capacidad de un espectrómetro de masas de distinguir entre masas se expresa normalmente en términos de su resolución  $R$ , que se define como:

$$R = m/\Delta m$$

donde  $\Delta m$  es la diferencia entre dos picos adyacentes que están resueltos y  $m$  es la masa nominal, masa sin decimales, del primer pico (a veces se utiliza en su lugar la masa media de los dos picos). Dos picos se consideran que están separados si la altura del valle entre ellos no es más que un porcentaje de su altura (a menudo un 10%). Así, un espectrómetro con una resolución de 4000 podrá resolver picos que tengan valores de  $m/z$  de 400,0 y 400,1 (o 40,00 y 40,01).

La exactitud de la masa mide la proximidad del valor registrado de  $m/z$  a su verdadero valor.

$$\Delta m_{\text{exact}} = m_{\text{verdadera}} - m_{\text{medida}} \text{ (miliunidades de masa, mmu)}$$
$$\text{ppm}_{\text{exact}} = (\Delta m_{\text{exact}}/m_{\text{medida}}) \cdot 10^6 \text{ (partes por millón, ppm)}$$

La resolución que se necesita en un espectrómetro de masas depende en gran parte de su aplicación. Por ejemplo para diferenciar entre iones de la misma masa nominal tales como  $\text{C}_2\text{H}_4^+$ ,  $\text{CH}_2\text{N}^+$ ,  $\text{N}_2^+$  y  $\text{CO}^+$  (todos ellos con 28 daltons de masa nominal pero con masas exactas de 28.0313, 28.0187, 28.0061 y 27.9949 daltons, respectivamente) se necesita un instrumento con una resolución de varios miles. Por otro lado, los iones de bajo peso molecular que difieren en una unidad de masa o más [por ejemplo,  $\text{NH}_3^+$  ( $m = 17$ ) y  $\text{CH}_4^+$  ( $m = 16$ )] pueden distinguirse con un instrumento que tenga una resolución inferior a 50. Los espectrómetros comerciales son asequibles con resoluciones que van desde aproximadamente 500 a 500 000<sup>31</sup>.



### 2.3.5.1 Filtros de masas de cuadrupolo

Los espectrómetros de masa de cuadrupolo ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido bajos (esto es,  $< 100$  ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real. Los analizadores de cuadrupolo son actualmente los de utilización más frecuente<sup>31</sup>.

Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores  $m/z$  transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral.

Debido a que los cuadrupolos funcionan por eliminación selectiva de iones, se llaman a menudo filtros de masas, en vez de analizadores de masas.

La Figura 11 muestra un diagrama simplificado de un espectrómetro de masas de cuadrupolo. La parte más importante del instrumento es el conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras.

Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180 grados. Las barras cilíndricas son normalmente de 6 mm de diámetro y raramente tienen más de 15 cm de longitud. Están sujetas rígidamente sobre soportes cerámicos construidos con precisión que proporcionan una buena estabilidad mecánica aunque cambie la temperatura.

Para entender la capacidad de filtración de un cuadrupolo, es necesario considerar el efecto de los potenciales de corriente continua y de corriente alterna sobre la trayectoria de los iones cuando pasan a través del canal entre las barras<sup>31</sup>.

Para que un ion atraviese el cuadrupolo hasta el detector, debe tener una trayectoria estable en los dos planos formados por cada par de electrodos opuesto. El ión debe de ser suficientemente pesado para no ser eliminado por el filtro de paso de masa elevada en uno de los planos y suficientemente ligero para no ser eliminado por el filtro de masa baja en el otro plano. El cuadrupolo total transmite una banda de iones que tienen un intervalo limitado de valores de  $m/z$ . El centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente alterna y continua<sup>31</sup>.

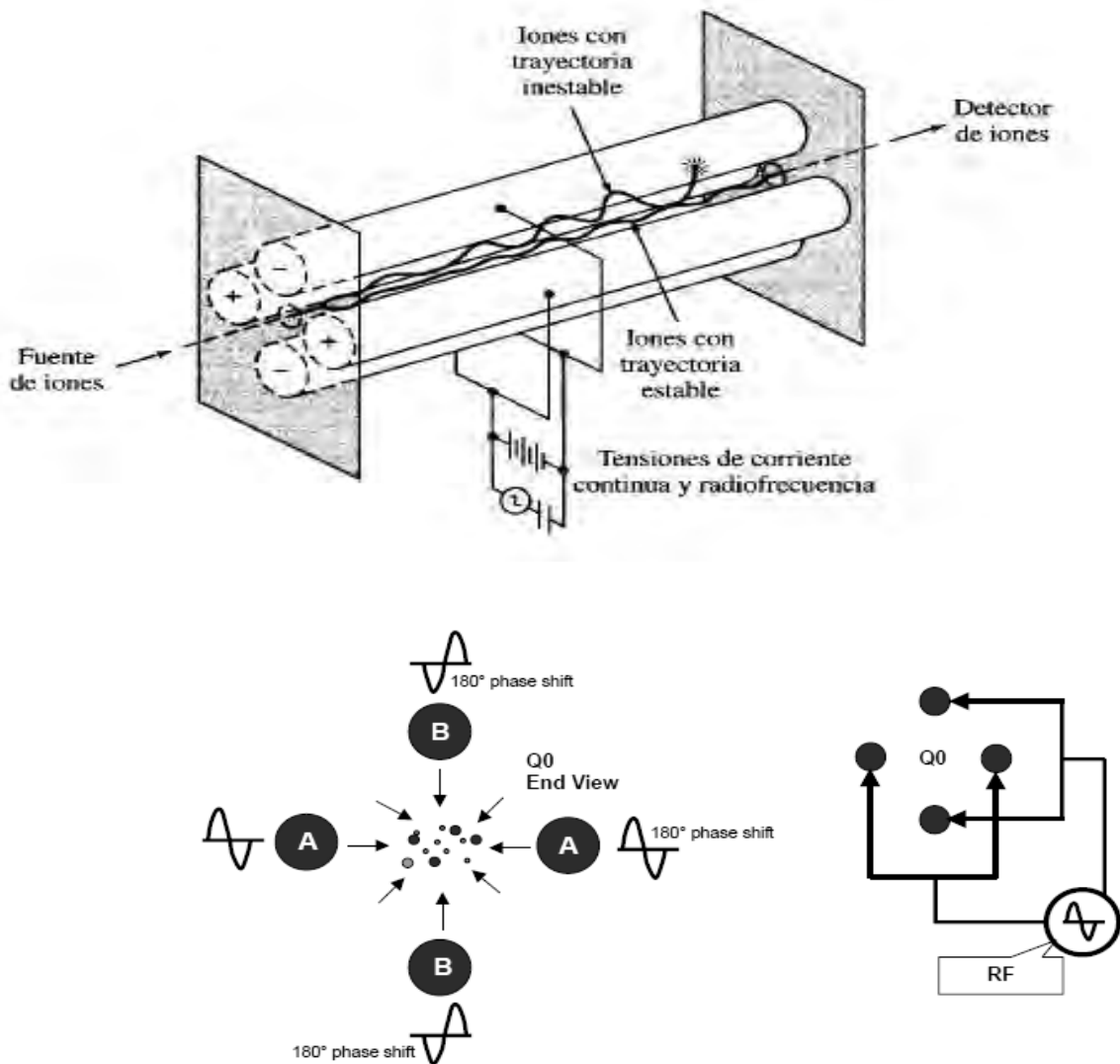


Figura 11. Espectrómetro de masas de cuadrupolo



La aplicación a cada par de barras opuestas de un voltaje y una radiofrecuencia posibilita un control de la trayectoria de los iones. Esto permitirá al ión  $m/z$  seguir una trayectoria rectilínea y cruzar el túnel alcanzando el detector, mientras que las demás masas, al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras.

### 2.3.5.2 Analizador de trampa de iones ( ion trap detector)

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones que en general son cuadrupolos pero en el espacio que lo que hacen es manipular iones y permitir hacer masas/masas<sup>32</sup>.

La Figura 12 muestra la sección longitudinal de una trampa de iones sencilla asequible comercialmente. Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de  $m/z$  circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo.

Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas los iones quedan atrapados en el interior de la trampa mediante la aplicación de los voltajes y radiofrecuencias adecuados, pudiéndose de esta forma hacer experimentos con ellos. Se sacan los iones que no interesan de la trampa y dejamos el que nos interesa estudiar que chocaría con el He y así se haría el masas/masas.

Los espectrómetros de trampa de iones son robustos y compactos, sin embargo sufre de limitaciones en cuanto a su capacidad de resolución y otras relacionadas con la alta probabilidad de que puedan producirse interacciones ión molécula durante el prolongado tiempo de residencia de los iones en la cavidad<sup>31</sup>.

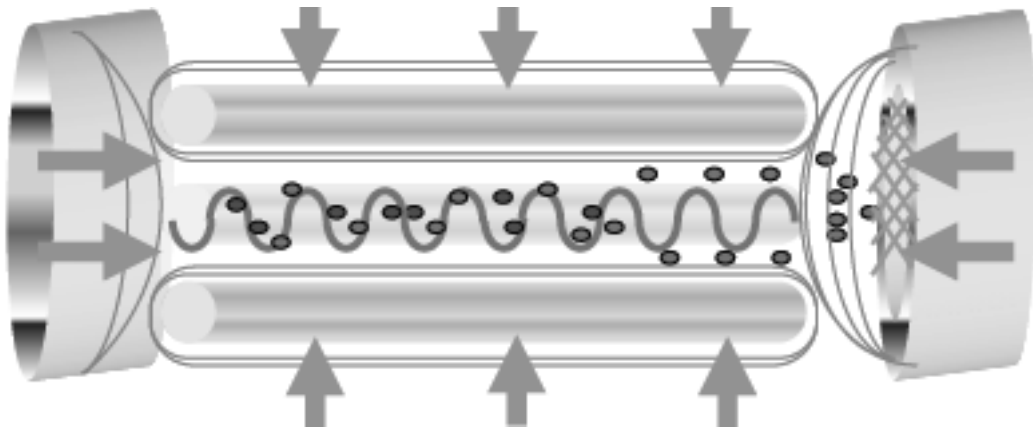
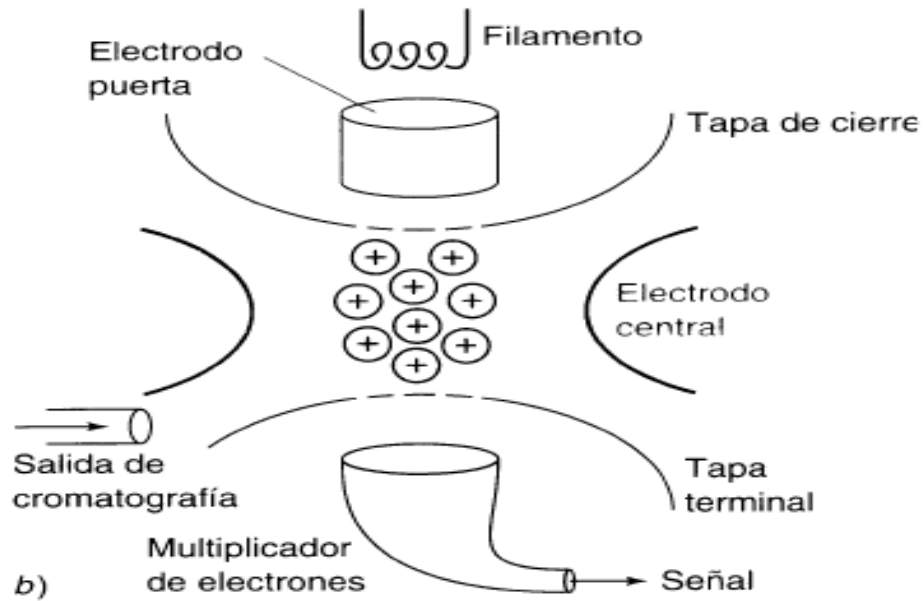
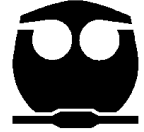


Figura 12. Espectrómetro de masas de trampa de iones



### 2.3.5.3 Analizador de tiempo de vuelo (TOF, time of flight)

En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Estos impulsos tienen normalmente una frecuencia de 10 a 50 kHz y un tiempo de vida de 0,25  $\mu$ s. Los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico de  $10^3$  a  $10^4$  V que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan entonces a un *tubo analizador* de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo.

Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típicos están entre 1 y 30  $\mu$ s. Desde el punto de vista de la resolución y reproducibilidad, los instrumentos que utilizan separadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como los de cuadrupolo<sup>33</sup>. Sin embargo, algunas ventajas compensan parcialmente estas limitaciones como son la simplicidad y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas.

Varios fabricantes de instrumentos ofrecen actualmente instrumentos de tiempo de vuelo que en la actualidad se emplea rutinariamente en el campo del análisis de biomoléculas, desde azúcares de menos de 1000 Da, hasta proteínas de más de 300KDa, empleando técnicas de ionización por desorción con láser tipo MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight), (Figura 13)<sup>31</sup>.

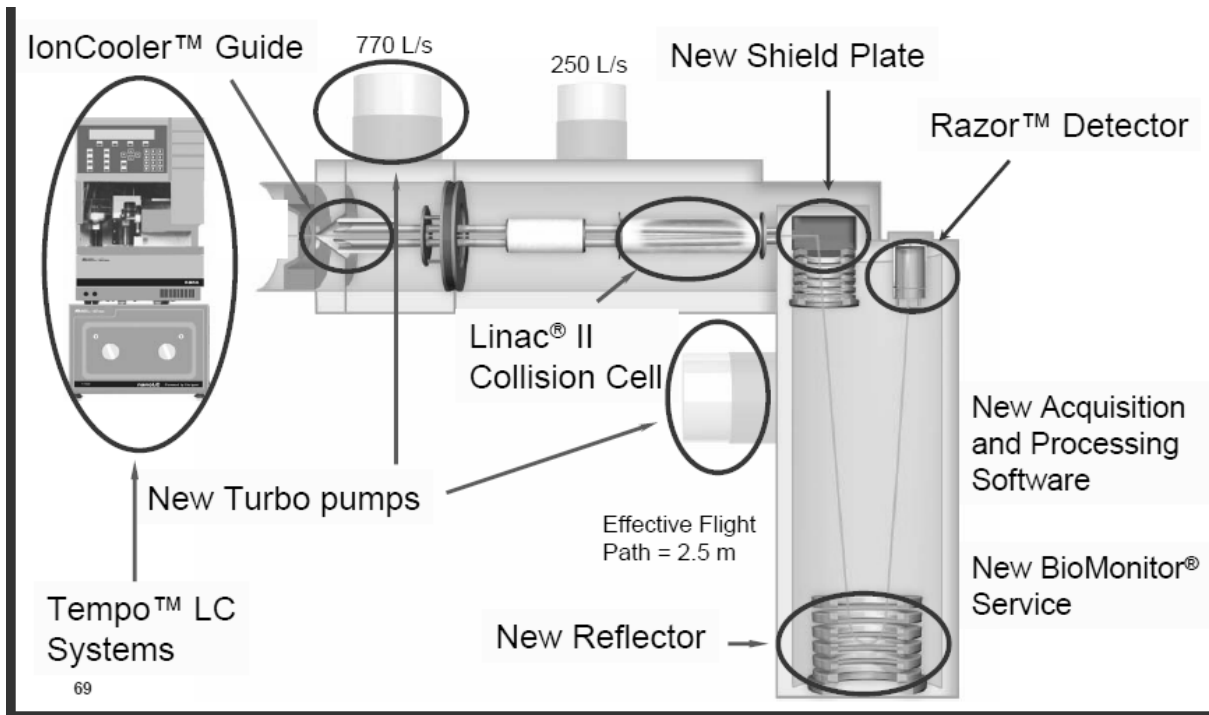


Figura 13. Esquema del MALDI-TOF

### 2.3.6 Detectores

Comercialmente son asequibles varios tipos de detectores para espectrómetros de masas. En los primeros años predominaban los multiplicadores de electrones de detección puntual situados en el ambiente de alto vacío del espectrómetro. Mas tarde fueron apareciendo nuevos desarrollos para detección puntual, como los detectores "Channeltron" de bajo costo y uso general, y los sistemas de conversión fotónica mas sofisticados, sensibles y duraderos. También han aparecido sistemas de detección simultánea, tales como baterías de micromultiplicadores multicanal (Microchannel Plate o Multichannel Multiplier Array Detector), combinadas normalmente con posterior centelleo o conversión fotónica, cuya aportación a los nuevos desarrollos instrumentales en Espectrometría de Masas ha sido importante<sup>31</sup>.



### 2.3.6.1 Detector de copa de Faraday

Consiste en un simple electrodo, normalmente en forma de copa o caja, que recibe el impacto de los iones a detectar. Los iones se neutralizan por transferencia de electrones, y la señal se mide como una corriente analógica igual o superior a la corriente iónica original, dependiendo de la forma del electrodo.

Es un detector de baja sensibilidad y gran sencillez. Puede trabajar a presiones relativamente altas, del orden de  $10^{-4}$  mbar, y posee una gran linealidad de respuesta. La mínima corriente detectable es del orden de  $10^{-14}$  A<sup>31</sup>.

### 2.3.6.2 Multiplicador de electrones secundarios

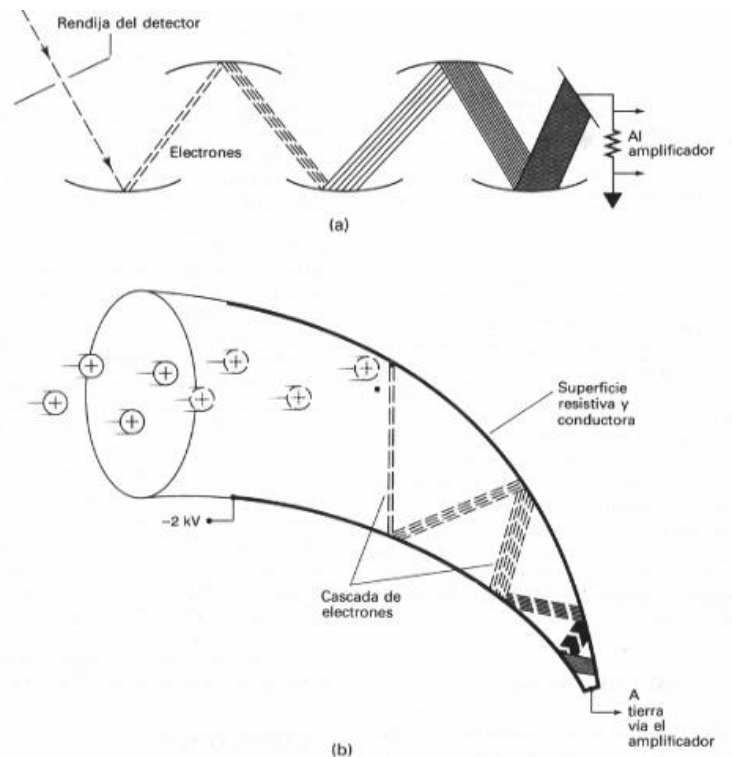
Uno de los detectores que han sido más utilizados en espectrometría de masas, es el multiplicador de electrones de dínodos. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. Su funcionamiento puede verse en la figura 14a.

El ión a detectar choca con el primer dínodo, provocando la emisión de un elevado número de electrones, que van a incidir sobre el segundo dínodo. El proceso de multiplicación se repite sucesivamente en los demás dínodos, obteniéndose al final del sistema una amplificación de señal del orden de  $10^6$  a  $10^8$ . Es un detector mucho más sensible que el de copa de Faraday, con una señal mínima detectable del orden de  $10^{-18}$  A. Requiere alta tensión y un mayor vacío para operar, del orden de  $10^{-6}$  mbar o mejor<sup>31</sup>.



### Detector "Channeltron"

Este detector es uno de los más utilizados hoy en día en espectrometría de masas para uso general. Es similar al multiplicador de electrones clásico, con la principal diferencia de que no tiene múltiples dínodos discretos, sino que está formado por un tubo de vidrio en forma de corneta, a veces terminado en forma de espiral o caracol (figura 14b), cuyo interior está recubierto por un óxido de plomo semiconductor de composición y características especiales<sup>31</sup>.



**Figura 14. (a) Multiplicador de electrones de dínodos discreto. (b) Channeltron**

Si se desea detectar iones positivos, se aplica un potencial negativo en la boca del detector para que los iones procedentes del espectrómetro de masas, desviados de su trayectoria por una placa repulsora con potencial positivo sean atraídos a su interior y choquen con la cara interna, produciendo la emisión de un cierto número de electrones<sup>33</sup>.



El final del tubo del detector se sitúa a un potencial cercano a tierra, con lo que existirá un gradiente continuo de potencial desde la boca al fondo del detector. Debido a esto, los electrones arrancados en el impacto inicial del ion volarán en la dirección de los potenciales menos negativos, hacia potencial cero, produciéndose una gran cantidad de impactos en el camino, en cada uno de los cuales se multiplicará el número de electrones, con lo que se puede conseguir un efecto multiplicador del orden de  $10^8$ . Al final del recorrido del tubo multiplicador se encuentran un cono colector con la electrónica de preamplificación y amplificación asociada.

Si se desean detectar iones negativos, en principio basta con cambiar el signo de los potenciales aplicados a la placa repulsora y a la boca del channeltron. Por tanto, este detector es susceptible de ser empleado tanto para detectar iones positivos como negativos<sup>31</sup>.

Otra ventaja de los "Channeltron" es que pueden exponerse a presión atmosférica sin ningún problema, siempre que el alto voltaje haya sido desconectado, lo que permite romper vacío en el sistema sin complicaciones.

La vida de un detector "Channeltron", aunque superior a la de los multiplicadores de díodos discretos, es también limitada y depende de la carga total acumulada, es decir, del voltaje aplicado y del número de iones detectados. A medida que la superficie interior se va agotando, se va haciendo necesario incrementar el alto voltaje aplicado para conseguir una señal adecuada. Cuando este fenómeno se acelera, es síntoma evidente de que el final de la vida útil del detector se acerca.



### 2.3.7 Calibración de los espectrómetros de masas

Con el fin de disponer de picos de masas conocidas se utilizan sustancias de referencia, de espectro bastante complejo pero muy bien conocido, para realizar la calibración de la escala de masas del espectrómetro. Lo que se hace es ajustar las distintas lentes y rendijas de la fuente para conseguir los valores óptimos de los iones fragmento del compuesto de referencia de los cuales se conoce su masa exacta así como las abundancias relativas de cada uno. A este proceso se le denomina “TUNE” (sintonía).

Las sustancias de referencia más utilizadas son heptacosá (perfluoroterbutilamina) para la calibración de las masas en equipos de baja resolución y el PFK (perfluorkeroseno) para los de alta<sup>31</sup>.

## 2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS<sup>28,29</sup> . ,

El término validación se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. Entre las normas que establecen los parámetros para realizar la validación de un método bioanalítico se encuentran la NOM-177-SSA1-1998 (México) y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (EUA). En la NOM-177-SSA1-1998 se establecen las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, y el apartado 9 se refiere a la validación de métodos bioanalíticos, la desventaja que tiene es que el desarrollo de algunas pruebas no es claramente descrito. La guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (mayo 2001) es un documento especializado en el tema.

En la tabla 6 se describen los parámetros a evaluar en la validación, de acuerdo a lo establecido en las normas de la SSA y de la guía FDA. Las muestras a analizar se deben preparar en la matriz biológica, a excepción de las utilizadas en la recuperación absoluta y en la estabilidad de la solución estándar, ya que éstas deben prepararse en solución.



Algunas de las discrepancias entre la norma y la guía se describen a continuación:

La NOM-177 no establece los criterios para elegir los puntos control, únicamente indica que tienen que ser uno bajo, uno medio y uno alto, y se deben encontrar dentro del rango de trabajo. En cambio la guía de la FDA es más específica, ya que indica que uno de los puntos control debe estar dentro de 3 veces el límite de cuantificación (nivel bajo), otro cerca de el valor medio del rango (nivel medio) y otro cerca del límite superior (nivel alto).

En caso de que se diluya la muestra, la guía de la FDA indica que se debe demostrar su precisión y exactitud para que tengan validez los resultados. En cambio, la NOM-177 indica que es permitido realizar una dilución de la muestra si se utiliza la misma matriz biológica.

En la guía de la FDA se describe más claramente como realizar las pruebas de estabilidad de las muestras plasmáticas, de las soluciones estándar y de las muestras preparadas.

Adicionalmente, la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA exige preparar un mayor número de muestras en cada prueba en comparación a la NOM-177-SSA1-1998, con lo cual se tiene una menor variabilidad de los datos.

Por lo anteriormente descrito decidimos realizar la validación de acuerdo a los lineamientos descritos en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER)<sup>28</sup>.

**Tabla 6.** Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de los métodos bioanalíticos de la FDA

Prueba	NOM-177-SSA1-1998 (SSA, México)		Guía para la validación de Métodos Analíticos (FDA, EUA)	
	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
SELECTIVIDAD	Muestras blanco de la matriz biológica en por lo menos 6 voluntarios. Evaluar posibles interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente).	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.	Muestras blanco de la matriz biológica en por lo menos 6 fuentes. Evaluar posibles interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente).	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.
EXACTITUD	Usar datos de repetibilidad y reproducibilidad	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 15$ del valor nominal de concentración	3 puntos control por quintuplicado	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 15$ del valor nominal de concentración
PRECISIÓN Repetibilidad	3 puntos control por quintuplicado (mismo día)	%CV no debe ser mayor que el 15%	3 puntos control por quintuplicado	%CV no debe ser mayor que el 15%
PRECISIÓN Reproducibilidad	3 puntos control por duplicado, durante 3 días	%CV no debe ser mayor que el 15%	3 puntos control por quintuplicado	%CV no debe ser mayor que el 15%
RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)	3 puntos control por triplicado, en solución y en la matriz biológica	No necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.	3 puntos control, en solución y en la matriz biológica	No necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.
LINEALIDAD	Usar mínimo 5 concentraciones (que incluya los puntos extremos excepto el cero). Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta.	Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.	Usar mínimo 6 concentraciones, incluir el límite de cuantificación. Elegir el modelo matemático más simple, que describa la relación concentración-respuesta	El %desv abs debe ser menor a el 15%, a excepción en el LC, en el cual el % desv abs debe ser menor al 20%. Al menos 4 de 6 muestras deben cumplir con este criterio.
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Concentración más baja, por quintuplicado	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 20$ del valor nominal, %CV no mayor que el 20%	Preparar la concentración más baja, por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 20$ del valor nominal, %CV no mayor del 20%. Debe ser mínimo 5 veces la respuesta del blanco

NOTA: %CV = coeficiente de variación, %desv abs = porcentaje de desviación absoluta, NE: no especificado, LC =límite de cuantificación



**Tabla 6 cont.** Comparación de los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-1998 y la guía de validación de la métodos bioanalíticos de la FDA

	NOM-177-SSA1-1998 (SSA, México)		Guía para la validación de Métodos Analíticos (FDA, EUA)	
Prueba	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
LÍMITE DE DETECCIÓN	Determinar la concentración más baja en la matriz biológica, que puede distinguirse del ruido.	Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo	-	-
ESTABILIDAD	3 puntos control por duplicado.	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 15$ del valor nominal de concentración	Puntos control bajo y alto, por triplicado	El valor promedio debe estar dentro del $\pm 15$ del valor nominal de concentración
	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 2 ciclos de congelación antes de analizar las muestras	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 3 ciclos de congelación antes de analizar las muestras	
	-	-	<u>Estabilidad a corto plazo.</u> Mantenerlas a temperatura ambiente de 4 a 42 horas, y posteriormente analizarlas	
	<u>Almacenamiento.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Estabilidad a largo plazo.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio	
	<u>Otros.</u> Evaluar otros factores a los que puede ser sometidas las muestras.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad	<u>Estabilidad de la solución estándar.</u> Evaluar la solución estándar de los analitos y del estándar interno a temp. ambiente durante 6 horas. Si van a ser almacenadas para su posterior uso evaluar su estabilidad.	
	-	-	<u>Estabilidad de la muestra procesada.</u> Debe evaluarse el tiempo de residencia en el automuestreador.	
TOLERANCIA	Evaluar la tolerancia del método a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (p ej. pH, disolventes, fase móvil).	Debe cumplir los criterios de exactitud y precisión	-	-

NOTA: %CV = coeficiente de variación, %desv abs = por ciento de desviación absoluta, NE: no especificado, LC =límite de cuantificación



## 2.5 DATOS FARMACOCINETICOS

De acuerdo a datos farmacocinéticos reportados en estudios previos se decidió desarrollar un método analítico cuyo rango nos permitiera aplicarlo a estudios de Farmacocinética y Bioequivalencia.

El Rango evaluado para el presente proyecto fue de 50 a 4500 ng/mL, el cual nos permite aplicarlo a estudios Farmacocinéticos debido a que el Límite de Cuantificación se encuentra por debajo del 10% del C<sub>max</sub> y el Límite Superior de la Curva esta por encima del C<sub>max</sub> (en estudios de dosis única de 200mg)<sup>34</sup>.

**Tabla 7. Parámetros Farmacocinéticos en Estudios de Bioequivalencia de tabletas conteniendo Lamotrigina (200mg)**

Producto (País)	Tratamiento (dosis 200mg)	ABC <sub>0-t</sub> (µg.h/L)	C <sub>max</sub> (µg/mL)	T <sub>max</sub> (h)
UKPAR (Reino Unido)	Prueba	130.36 ± 34.47	3.16 ± 0.41	1.93 ± 0.97
	Referencia	125.89 ± 29.25	3.01 ± 0.48	2.34 ± 1.37
	IC 90%	99.05 - 106.75	101.52 – 110.08	--
Actavis Lamotrigine Alpharma (Países Bajos)	Prueba	129.90 ± 32.41	2.70 ± 0.46	2.45 ± 1.35
	Referencia	133.35 ± 28.09	2.87 ± 0.57	2.72 ± 2.74
	IC 90%	100.376 - 107.153	100.41 – 111.31	--
Lamotrigine Bristol (Reino Unido)	Prueba	113.150 ± 21.39	3.40 ± 0.54	1.89 ± 1.12
	Referencia	114.531 ± 20.82	3.28 ± 0.56	2.03 ± 1.44
	IC 90%	95.90 – 102.34	96.81 – 110.55	--



---

### CAPITULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL.

##### 3.1 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

- Lamotrigina. Lote: LT0010304.
- Pioglitazona clorhídrico estándar interno Lote: YA5-0890.

##### 3.2 MATERIALES

- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 16 x 100 mm.
- Tubos de vidrio de 16 x 100 mm.
- Pipetas Pasteur de plástico.
- Micropipetas Brand.
- Puntas para micropipetas Brand.
- Repipeteador Brand
- Puntas para repipeteador Brand.
- Vasos de precipitado de 100 y 250 mL.
- Matraces volumétricos de 10, 500 y 1000 mL.
- Probetas de 100, 500 y 1000 mL Kimax.
- Placas de 96 pozos (wellplates) de 500  $\mu$ L Agilent.
- Cubierta de silicón para placas de 96 pozos Agilent.

##### 3.3 REACTIVOS

- Agua HPLC.
- Matriz biológica (plasma).
- Metanol HPLC J.T. Baker.
- Acido Fórmico RA J.T. Baker.
- Acetato de amonio RA Tecsiquim.
- Éter Anhídrico J.T. Baker.
- Diclorometano J.T. Baker.

##### 3.4 EQUIPO

- Agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II.
- Centrifuga refrigerada Hettich UNIVERSAL 32R.
- Cromatógrafo Líquidos Agilent 1100 acoplado a un Espectrómetro de Masas-Masas API 3000.
- Balanza Analítica Ohaus Explorer E12140.
- Bomba de vacío.
- Sistema de filtración Supelco.





### **3.5 PREPARACION DE SOLUCIONES**

#### **3.5.1 Solución de ácido fórmico 10 mM + acetato de amonio 10 mM**

Depositar en un matraz volumétrico de 1000 mL, 429  $\mu$ L de ácido fórmico, llevar a la mitad del volumen con agua HPLC. Adicionar 0.7718 g de acetato de amonio y mezclar. Completar el volumen y llevar al aforo con agua HPLC.

#### **3.5.2 Solución diluyente de metanol:agua (50:50)**

Mezclar 50 mL de metanol HPLC con 50 mL de agua HPLC y transferir a un frasco de vidrio y mezclar.

#### **3.5.3 Fase móvil: Metanol: Ácido fórmico 10 mM+ acetato de amonio 10 mM (70:30 v/v)**

Colocar 1 L de metanol en un frasco de 1000 mL y en otro frasco 1 L de la solución preparada en el punto 3.5.1. Filtrar por membrana de 0.45  $\mu$ m.

Programar el equipo para que realice la mezcla (70:30 v/v)

#### **3.5.4 Solución de Adecuabilidad**

Mezclar 75  $\mu$ L de una solución de lamotrigina, (100  $\mu$ g/mL) con 62.5  $\mu$ L de una solución de pioglitazona (100  $\mu$ g/mL) aforar a 25 ml con la solución de agua:metanol 50/50. La concentración final es de 0.3  $\mu$ g/mL de lamotrigina y 0.250  $\mu$ g/mL de pioglitazona.



### 3.5.5 Soluciones estándar de LAMOTRIGINA y PIOGLITAZONA.

**TABLA 8 Preparación de soluciones de Lamotrigina**

Solución	Preparación	Concentración (µg/ml)
<b>Stock</b>	Pesar el equivalente a 0.010g de estándar de LAMOTRIGINA, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con AGUA:MeOH (50:50)	1,000
<b>A</b>	De la solución stock tomar una alícuota de 1.0 mL, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL y diluir con AGUA:MeOH (50:50)	100
<b>B</b>	Tomar una alícuota de 1.0 mL de la solución A, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL y diluir con AGUA:MeOH (50:50)	10

**TABLA 9 Preparación de soluciones de Pioglitazona Estandar Interno**

Solución	Preparación	Concentración (µg/ml)
<b>Stock</b>	Pesar el equivalente a 0.010g de estándar de PIOGLITAZONA, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con Metanol HPLC	1,000
<b>A</b>	Tomar del stock de una alícuota de 0.1 mL y transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y diluir con AGUA:MEOH(50:50)	10
<b>B</b>	Tomar de la solución A una alícuota de 500 µL y transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y diluir con AGUA:MEOH(50:50)	0.5



### 3.5.6 Curva de Calibración y puntos control

#### Curva de calibración en solución

**Tabla 10. Preparación de la curva de calibración de Lamotrigina en solución diluyente**

Concentración inicial de Lamotrigina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Alícuota de la solución de Lamotrigina ( $\mu\text{L}$ )	Número de dilución resultante en solución diluyente	Volumen del diluyente metanol:agua (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final de Lamotrigina ( $\mu\text{g/mL}$ )
100	450	1	0.550	1	45
100	350	2	0.650	1	35
100	300	3	0.700	1	30
100	250	4	0.750	1	25
100	200	5	0.800	1	20
100	150	6	0.850	1	15
100	100	7	0.900	1	10
10	100	8	0.900	1	1
10	50	9	0.950	1	0.5

#### Preparación de la curva de calibración en Plasma.

A partir de las diluciones resultantes en solución diluyente números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 de la tabla 10, preparar los puntos de la curva de calibración en plasma como se muestra en la tabla 11.

**Tabla 11. Preparación de la curva de calibración de Lamotrigina en plasma**

Alícuota de la solución de Lamotrigina (mL)	Concentración inicial de Lamotrigina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Número de dilución resultante en solución diluyente metanol:agua	Volumen de Plasma (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final de Lamotrigina ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.100	45	10	0.900	1	4.5
0.100	35	11	0.900	1	3.5
0.100	30	12	0.900	1	3
0.100	25	13	0.900	1	2.5
0.100	20	14	0.900	1	2
0.100	15	15	0.900	1	1.5
0.100	10	16	0.900	1	1
0.100	1	17	0.900	1	0.1
0.100	0.5	18	0.900	1	0.05



### Preparación de los Puntos Control en Solución

A partir de la solución de 100 µg/mL de lamotrigina en solución diluyente, preparar las soluciones 19 y 20, de la solución de lamotrigina de 10 µg/mL en solución diluyente, preparar la solución número 21, de acuerdo con la siguiente tabla:

**Tabla 12. Preparación de los puntos control en solución diluyente**

Concentración inicial Lamotrigina (µg/mL)	Alícuota de la solución de Lamotrigina (µL)	Número de dilución resultante en solución diluyente	Volumen diluyente (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final Lamotrigina (µg/mL)
100	375	19	0.625	1	37.5
100	225	20	0.775	1	22.5
10	150	21	0.850	1	1.5

### Preparación de los Puntos Control en Plasma

A partir de las diluciones resultantes en solución diluyente números 19, 20 y 21 de la tabla 12 preparar los puntos control en plasma como se indica en la tabla 13; completar el volumen con plasma y mezclar:

**Tabla 13. Preparación de los puntos control en plasma**

Alícuota de la solución de Lamotrigina (mL)	Concentración inicial Lamotrigina (µg/mL)	Número de dilución resultante en solución	Volumen de plasma (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final Lamotrigina (µg/mL)
0.100	37.5	22	0.9	1	3.75
0.100	22.5	23	0.9	1	2.25
0.100	15	24	0.9	1	0.15



### 3.6 METODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAMOTRIGINA EN PLASMA.

Para llevar cabo la extracción del fármaco se utilizó un método líquido/líquido, empleando una mezcla de éter/diclorometano. En la figura 15 se describe la metodología utilizada:

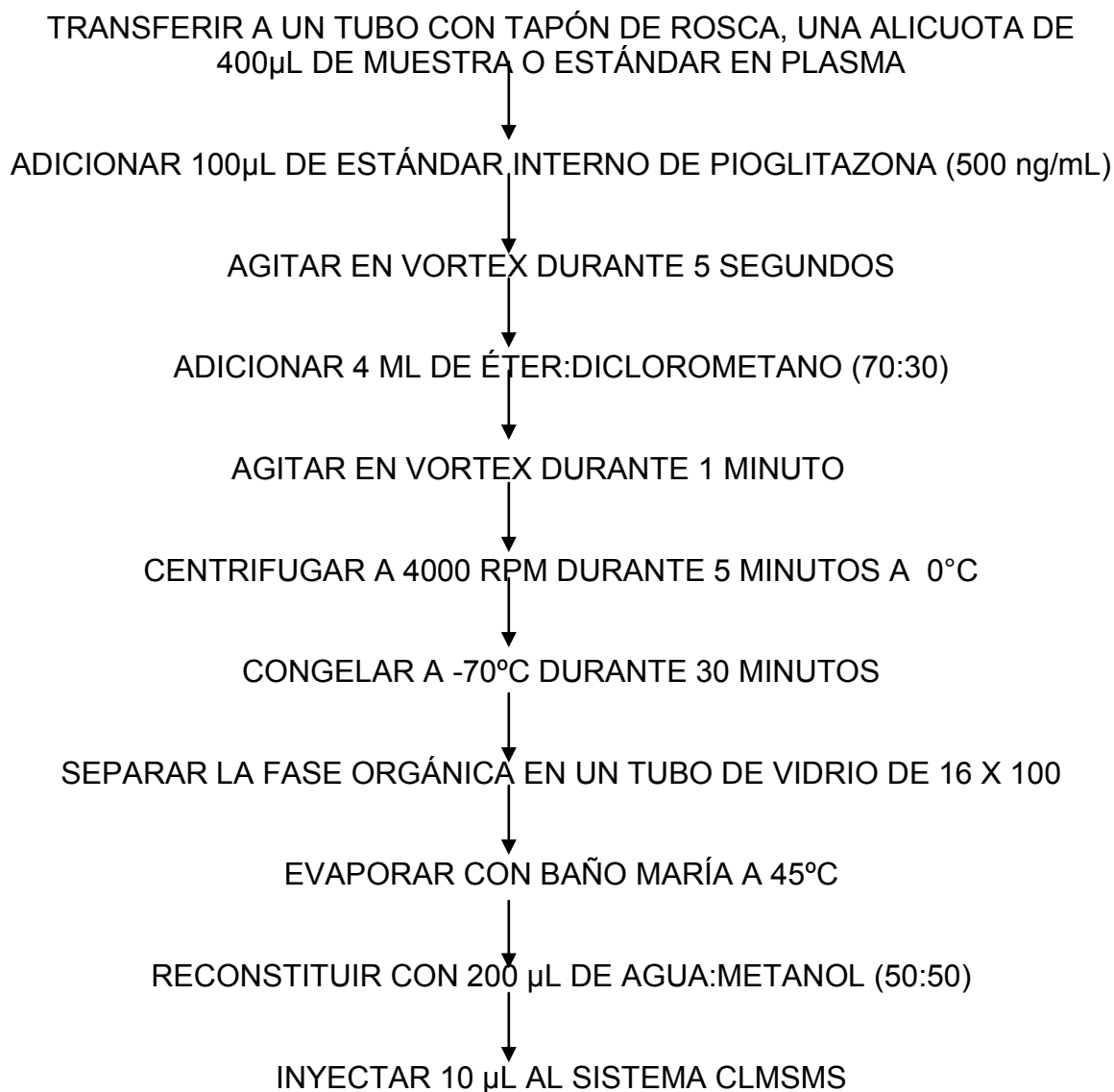


Figura 15. Diagrama del procedimiento de extracción de Lamotrigina



### 3.7 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tabla 14. Condiciones Cromatográficas

Parámetro	Condición
Columna	Eclipse plus C18 (75 x 4.6 mm) clave: C-117
Pre columna	Kit Security Guard Cartridge con Filtros C18
Fase móvil	Metanol : Ácido fórmico 10 mM + acetato de amonio 10 mM (70:30 v/v)
Flujo	1.3 mL
Temperatura del automuestreador	10°C
Temperatura de la columna	Ambiente
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de corrida	3.2 min

### 3.8 CONDICIONES ESPECTROMETRO DE MASAS.

- Fuente de ionización: Turbo ionspray en modo positivo (ES<sup>+</sup>), donde los iones serán monitoreados por Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Tabla 15. Condiciones del espectrómetro de masas

Compuesto	Ión precursor	Ión producto	Declustering Potencial DP	Focusing Potencial FP	Entrance Potencial EP	Collision Exit Potencial CXP
Lamotrigina	256.167	211.0	71	190	55	6
Pioglitazona	357.1	134.2	56	230	39	24

### 3.9 VALIDACION DEL METODO ANALITICO

La validación del método analítico se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos en la FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER)



### 3.9.1 Linealidad del método.

Para determinar la linealidad del método se prepararon tres curvas de calibración de Lamotrigina en plasma en un único día a concentraciones de 0.05, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.5  $\mu\text{g/mL}$ , para cada curva de calibración se incluyó una muestra blanco de la matriz biológica, así como una muestra blanco de plasma + Estándar Interno, estas muestras no se emplearon en la determinación de la linealidad, pero sirvieron para evaluar la no interferencia.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo al método de extracción descrito en la **Figura 15** y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo las condiciones referidas en el punto **3.6**.

Con los datos obtenidos se determinó el modelo matemático que mejor describiera la relación entre la concentración y la respuesta, verificando que fuese continua y reproducible a lo largo del intervalo de trabajo, resultando ser una regresión Lineal con una ponderación de  $1/x^2$ .

Se calculó además el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto de las tres curvas en forma global.

#### Criterios de aceptación

El método es lineal si el coeficiente de correlación  $r$  es igual o mayor a 0.98 en cada una de las curvas y además en la curva global.

Los valores de CV% y el % de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración son menor o igual al 15%, con excepción del punto más bajo de la curva de calibración, donde este valor debe ser menor o igual al 20%



### 3.9.2 Precisión y exactitud del método

#### 3.9.2.1 Precisión.

Para evaluar la precisión del método, se determinó tanto la repetibilidad (precisión intradía) como la reproducibilidad (precisión interdías). Para ello se analizaron tres concentraciones conocidas de Lamotrigina en plasma, diferentes a los de la curva patrón, pero incluidas dentro del rango lineal, en un nivel bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75 µg/mL), en tres días distintos.

El coeficiente de variación se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

##### 3.9.2.1.1 Repetibilidad (precisión intradía)

Para evaluar la repetibilidad del método se procesaron por quintuplicado muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75 µg/mL). Los resultados del factor de respuesta se interpolaron en la ecuación derivada por la regresión lineal para obtener los valores de “concentración recuperada”

Las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción descrito y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo las condiciones referidas en el punto 3.7

De cada nivel de concentración se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

#### Criterio de aceptación

El valor máximo del CV% aceptado para cada nivel de las muestras control es del 15 %.





### 3.9.2.1.2 Reproducibilidad (precisión interdía).

Para evaluar la reproducibilidad del método se procesaron por triplicado muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ) durante tres días y dos analistas. Los resultados del factor de respuesta se interpolaron en la curva de calibración de cada día del análisis y se obtuvieron de esa manera los valores de “concentración recuperada”. Para cada determinación (reproducibilidad diaria) se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

Las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción descrito y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo las condiciones referidas en el punto **3.7**

Para evaluar la reproducibilidad entre analistas, el analista 1 y 2 analizaron por triplicado las muestras control en sus tres niveles a lo largo de tres diferentes días.

#### Criterio de aceptación

El valor máximo del CV% aceptado para cada nivel de las muestras control es del 15.0%.

### 3.9.2.2 Exactitud

La exactitud se determinó calculando la desviación absoluta (% DEA). Para ello se tomaron los valores promedio de las determinaciones de cada nivel de concentración (tanto de los datos de repetibilidad como de los de reproducibilidad).

De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada y posteriormente se determinó el valor promedio en cada uno de los niveles de concentración.



Con los valores promedio se obtuvo el % desviación absoluta empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left( \frac{\text{Concentración No minimal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración No minimal}} \right) \times 100$$

### **Criterio de aceptación**

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe estar dentro del  $\pm 15 \%$  del valor nominal.

### **3.9.3 Límite de cuantificación.**

Para determinar la sensibilidad del método analítico se estableció como el límite de cuantificación la concentración de  $0.05 \mu\text{g/mL}$ . Para ello se prepararon por quintuplicado muestras de la matriz biológica cargada con esta concentración de Lamotrigina.

Las muestras fueron procesadas empleando el método descrito previamente.

Los valores se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada y a partir de esos datos se determinó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar absoluta (% DEA).

### **Criterios de aceptación**

El punto tiene validez si la Desviación Absoluta del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las cinco muestras cae dentro del  $\pm 20 \%$  con respecto a su valor nominal (%DEA) y posee un CV menor o igual a  $20 \%$ .



### 3.9.4 Selectividad.

Con la finalidad de evaluar la No Interferencia de sustancias endógenas del plasma y algunos anticoagulantes, así como en plasmas con evidencia de hemólisis; se procesaron las siguientes muestras:

- 6 blancos de plasma provenientes de diferentes lotes de plasma (donadores).
- 1 muestra blanco del pool de plasma sin Estándar Interno (PIOGLITAZONA)
- 1 muestra de matriz biológica cargada con Heparina, a una concentración de aprox 9 UI/mL sin estándar interno (PIOGLITAZONA)
- 1 muestra de matriz biológica cargada con EDTA, a una concentración de aprox 1 mg/mL sin estándar interno (PIOGLITAZONA)
- 1 muestras de matriz biológica con evidencia de Hemólisis sin Estándar Interno (PIOGLITAZONA)
- 1 muestra blanco del pool de plasma cargado con Estándar Interno (PIOGLITAZONA) 1 muestra de matriz biológica cargada con la concentración mas baja de la Curva de Calibración (C1) con Estándar Interno (PIOGLITAZONA)
- 1 muestra de matriz biológica con evidencia de hemólisis cargada con la concentración mas baja de la Curva de Calibración (C1) con Estándar Interno (PIOGLITAZONA)

#### Criterios de aceptación

No debe observarse interferencia en el tiempo de retención del pico del analito de interés (Lamotrigina), y del estándar interno (Pioglitazona) con respecto a los otros componentes probados.

Si existe alguna interferencia, esta no deberá de exceder el 20% de la respuesta del Limite de Cuantificación (0.05 µg/mL) para el analito de interés (Lamotrigina) y del 5% de la respuesta del estándar interno (Pioglitazona).



### 3.9.5 Recobro.

Para esta prueba se procesaron e inyectaron por triplicado muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ). A la vez se prepararon por triplicado puntos control en solución a las mismas concentraciones (considerando el factor de concentración correspondiente al tratamiento de la muestra) y las muestras se inyectaron en el cromatógrafo.

El cálculo de recobro se hizo obteniendo una relación de áreas entre las muestras control extraídas y las muestras control en solución de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recobro} = (\text{Promedio de áreas en plasma} / \text{Promedio de áreas en solución}) * 100$$

### Criterios de aceptación

El porcentaje de esta relación no necesariamente es del 100 %, pero debe ser consistente y reproducible en cada nivel del rango establecido.



### 3.9.6 Estabilidad de la muestra.

La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, para poder evaluar estas condiciones se efectuaron las siguientes pruebas:

- Ciclos de congelación – descongelación
- Temperatura ambiente
- Estabilidad en automuestreador
- Condiciones de almacenamiento a (-70° C)
- Efecto de la Dilución
- Estabilidad de la Solución Patrón

#### 3.9.6.1 Estabilidad en ciclos de Congelación - Descongelación.

Para esta prueba de estabilidad, se prepararon muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ), a un nivel suficiente para alicuotar por triplicado en tres o cuatro sesiones diferentes. Estas muestras se almacenaron en congelación a -70 °C al menos por 24hrs. Después de este tiempo las muestras fueron retiradas del congelador y se descongelaron ( 1er ciclo). Posteriormente se volvieron a almacenar a -70 °C por un periodo mínimo de 12 horas en dos ocasiones mas (2do y 3er ciclo).

Al concluir el 3er ciclo, las muestras fueron procesadas por triplicado en cada nivel bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ). asimismo se preparó una curva de calibración y muestras control en plasma por triplicado a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto, las cuales fueron empleadas como referencia.



Los valores de respuesta se interpolaron en la curva de calibración en plasma y se calculó la concentración recuperada.

Para cada nivel se calculó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar absoluta (% DEA)

### **Criterios de aceptación**

Las muestras se consideran estables si la Desviación Absoluta (%DEA) del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras control para cada nivel caen dentro del  $\pm 15$  % con respecto al valor promedio de las muestras control de referencia, preparados el día de análisis y poseen un CV menor o igual a 15 %.

#### **3.9.6.2 Estabilidad a temperatura ambiente (corto plazo).**

Se prepararon por triplicado muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ), dichas muestras permanecieron 18 horas a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo.

Al término de este periodo se preparó una curva de calibración y muestras control en plasma por triplicado a los tres niveles bajo, medio y alto (referencia) y se analizaron empleando el método descrito. Los valores de respuesta se interpolaron en la curva de calibración en plasma y se calculó la concentración recuperada.

Se calculó para cada nivel de muestras control el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar absoluta (% DEA)

### **Criterios de aceptación**

Las muestras se consideran estables si la Desviación Absoluta (%DEA) del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras control para cada nivel caen dentro del  $\pm 15$  % con respecto al valor promedio de las muestras control de referencia, preparados el día de análisis y poseen un CV menor o igual a 15 %.



### 3.9.6.3 Estabilidad de Lamotrigina en el Automuestreador.

Para sustentar esta prueba se prepararon dos series de puntos control en plasma por triplicado a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ), así como una curva de calibración en plasma. Dichas muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción indicado en la Figura 15.

Una curva de calibración así como una de las series de puntos control en plasma bajo, medio y alto procesadas (referencia) fueron inyectadas en el sistema cromatográfico. La otra serie de puntos control permanecieron en el automuestreador a una temperatura de aprox  $10^{\circ}\text{C}$  durante un período de 42 horas para posteriormente inyectarse al sistema cromatográfico.

Los valores de cada respuesta se interpolaron en la curva de calibración en plasma y se calculó la concentración recuperada.

Se calculó para cada nivel de muestras control el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar absoluta (% DEA)

#### Criterios de aceptación

Las muestras se consideran estables si la Desviación Absoluta (%DEA) del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras control para cada nivel caen dentro del  $\pm 15\%$  con respecto al valor promedio de las muestras control de referencia, preparados el día de análisis y poseen un CV menor o igual a  $15\%$ .



#### **3.9.6.4 Estabilidad en condiciones de Almacenamiento a -70°C.**

Se preparará volumen suficiente de muestras control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ), dichas muestras fueron almacenadas durante un periodo de 137 días en el congelador a -70 °C. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se descongelaron y se analizaron por triplicado.

El día de análisis se preparó una curva de calibración así como otra serie de puntos control en plasma a los tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0.15, 2.25 y 3.75  $\mu\text{g/mL}$ ) (referencia) y se analizaron,

Los valores de cada respuesta se interpolaron en la curva de calibración en plasma y se calculó la concentración recuperada.

Para cada nivel se calculó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar absoluta (% DEA)

#### **Criterios de aceptación**

Las muestras se consideran estables si la Desviación Absoluta (%DEA) del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras control para cada nivel caen dentro del  $\pm 15\%$  con respecto al valor promedio de las muestras control de referencia, preparados el día de análisis y poseen un CV menor o igual a 15 %.





### 3.9.6.5 Efecto de Dilución:

Se evaluó el efecto de la dilución para cuantificar a aquellas muestras que su concentración pudieran estar por arriba del rango de la curva de calibración.

Esta prueba se realizó de la siguiente manera: se prepararon seis puntos control alto en plasma al doble de su concentración, 7.5  $\mu\text{g/mL}$  (MCA\*2) para ser diluidos 1:2 y seis puntos control con la concentración normal (3.75  $\mu\text{g/mL}$ ), se analizaron e interpolaron en una curva de calibración preparada el día del análisis.

Se tomó la mitad de la alícuota de muestra cargada (MCA\*2) y se diluyó con la otra mitad de alícuota con plasma libre de fármaco, Las muestras se trataron de la misma forma que el procedimiento de la **Figura 15**.

Las muestras se analizaron y se inyectaron al sistema cromatográfico bajo las condiciones referidas en el punto **3.7** con las siguientes condiciones:

- Sin dilución
- Dilución 1 : 2

### Criterios de aceptación

No existe efecto en la dilución si la Desviación Absoluta del valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras diluidas caen dentro del  $\pm 15\%$  con respecto al valor de referencia (%DEA) y poseen un CV menor o igual a 15 %.



### 3.9.6 Estabilidad de Solución Patrón

Para evaluar la estabilidad de lamotrigina y pioglitazona en solución a la concentración de la MCB en solución (adecuabilidad), se prepararon soluciones patrón, se inyectaron por sextuplicado y se mantuvieron en refrigeración a 6°C. Las soluciones mantenidas en refrigeración fueron inyectadas 17 días posteriores a su preparación.

Los valores promedio de la respuesta de la solución de la primera determinación preparada, se compararon con los valores promedio de la respuesta de la solución después de los 17 días y se calculó la desviación absoluta.

#### Criterio de aceptación

Las muestras se consideran estables en solución si la Desviación Absoluta del valor promedio de las áreas de la solución en refrigeración cae dentro del  $\pm 15\%$  con respecto al valor de inicial (%DEA) y poseen un CV menor o igual a 15 %.

### 3.9.7 Supresión Ionica

La prueba de supresión de iones, para los analitos lamotrigina y el estándar interno pioglitazona se realizó de la siguiente manera: Se realizó la extracción de dos muestras blanco y se preparó una mezcla en fase móvil de lamotrigina y pioglitazona a una concentración de 45  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Se conectó la bomba de infusión al splitter del turbo ionspray, se cargó la jeringa con la mezcla de lamotrigina/pioglitazona y se infundieron a una velocidad de 50  $\mu\text{L/min}$ . Por otro lado las muestras blanco de plasma se inyectaron a través del sistema cromatográfico preparado con las condiciones de rutina del método, así como muestras adicionadas con lamotrigina/pioglitazona.

#### Criterio de aceptación

La línea base no debe presentar inflexiones negativas en los tiempos de retención de los compuestos por cuantificar.



## CAPITULO IV RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 4.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En la figura 1 se muestran los resultados de la respuesta obtenida para la relación de áreas del analito entre el estándar interno contra la relación de la concentración del analito entre el estándar interno, la ecuación global de acuerdo con la ponderación matemática ( $1/x^2$ ) realizada por el software Analyst para el cálculo de la concentración recuperada fue:  $y = 0.0108x - 0.000375$ , con un coeficiente de correlación de 0.9979.

Los resultados de la tabla 16, muestran que el método analítico para cuantificar lamotrigina en plasma fue lineal en el rango de concentraciones de 0.05 a 4.5  $\mu\text{g/mL}$ , ya que para el modelo matemático que describe la relación entre la concentración recuperada contra concentración adicionada, todos los valores de coeficiente de correlación fueron iguales o mayores que 0.9962, el valor global para la pendiente (m) fue de 1.0230 para la ordenada al origen fue de -0.0261

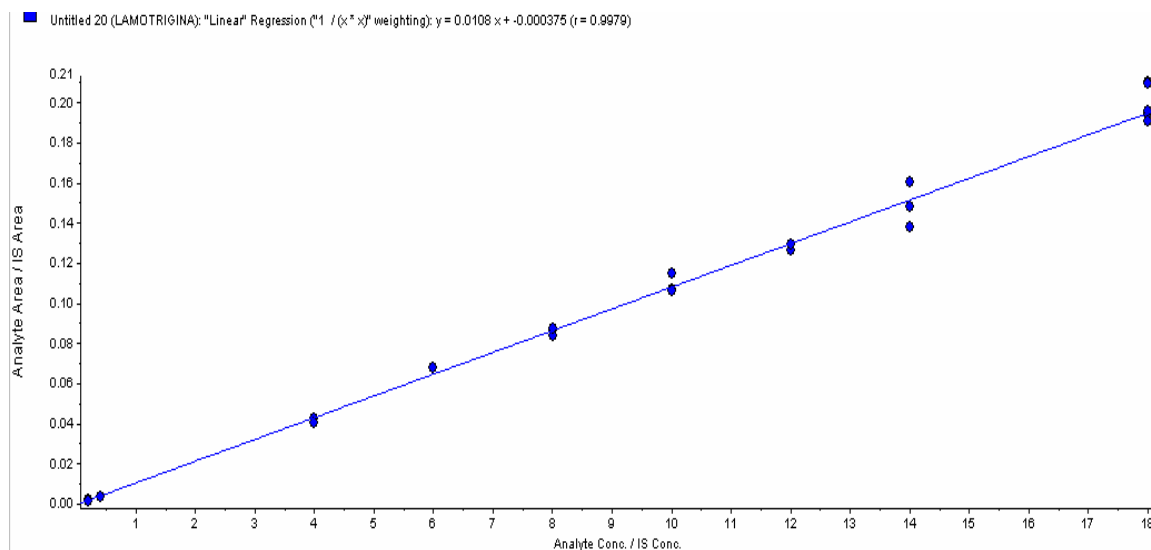


Figura 16. Linealidad del método para cuantificar Lamotrigina en plasma



Tabla 16. Valores de Concentración adicionada V.S Concentración recuperada de Lamotrigina.

CONC. ADICIONADA (µg/mL)	0.05	0.05	0.1	1.0	1.5	2.0	2.5	3	3.5	4
CONCENTRACIONES RECUPERADAS	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)									
	0.051	0.051	0.093	0.917	1.552	1.979	2.620	2.881	3.373	4.7
	0.050	0.052	0.092	0.987	1.583	1.951	2.485	2.933	3.731	4.5
	0.053	0.049	0.090	0.946	1.588	2.050	2.484	3.020	3.216	4.5
Medio	0.051	0.051	0.092	0.950	1.574	1.993	2.530	2.945	3.440	4.6
E.	0.002	0.002	0.002	0.035	0.020	0.051	0.078	0.070	0.264	0.1
%	2.976	3.015	1.666	3.702	1.239	2.560	3.093	2.385	7.673	2.8
DEA	2.667	1.333	8.333	5.000	4.956	0.333	1.187	1.844	1.714	2.5

Curva	m	b	r
1	1.0403	-0.0507	0.9977
2	1.0033	0.0025	0.9987
3	1.0255	-0.0301	0.9962
Global	1.0230	-0.0261	0.9974

#### 4.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

La precisión del método se estableció mediante el cálculo del coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas.

La exactitud se determinó calculando la desviación absoluta (%DEA).



En la tabla 17 se presentan los resultados de repetibilidad (coeficiente de variación) y exactitud (desviación absoluta %) del método analítico, en los que se puede apreciar que el coeficiente de variación fue igual o menor a 4.801% y la desviación absoluta en cada uno de los niveles de concentración fue igual o menor a 8.117%.

**Tabla 17. Repetibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma.**

<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRACIÓN RECUPERADA</b>		
	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>1</b>	0.142	2.146	3.366
<b>2</b>	0.142	2.280	3.708
<b>3</b>	0.145	2.184	3.424
<b>4</b>	0.137	2.152	3.467
<b>5</b>	0.141	2.152	3.263
<b>Promedio</b>	0.141	2.183	3.446
<b>D. E.</b>	0.003	0.056	0.165
<b>C. V. %</b>	2.037	2.581	4.801
<b>Concentración adicionada (µg/mL)</b>	0.15	2.25	3.75
<b>% DEA</b>	5.733	2.987	8.117



En la tabla 18 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método para el Analista 1 en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de análisis se encontró en el rango de 4.862 a 6.342%, mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 2.593%.

**Tabla 18. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma. Analista 1**

DÍA	RÉPLICA NÚMERO	CONCENTRACIÓN RECUPERADA		
		Control bajo 0.15 µg/mL	Control medio 2.25 µg/mL	Control alto 3.75 µg/mL
1	1	0.142	2.146	3.366
	2	0.142	2.280	3.708
	3	0.145	2.184	3.424
2	1	0.135	2.225	3.629
	2	0.146	2.334	3.749
	3	0.140	2.307	3.763
3	1	0.161	2.375	3.786
	2	0.142	2.516	4.072
	3	0.162	2.361	3.598
<b>Promedio</b>		0.146	2.303	3.677
<b>D. E.</b>		0.009	0.112	0.209
<b>C. V. %</b>		6.342	4.862	5.694
<b>Concentración adicionada (µg/mL)</b>		0.15	2.25	3.75
<b>% DEA</b>		2.593	2.360	1.941



En la tabla 19 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método para el Analista 2 en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de análisis se encontró en el rango de 2.894 a 5.660%, mientras que la desviación absoluta fue igual o menor a 4.723%

**Tabla 19. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma. Analista 2**

DÍA	RÉPLICA NÚMERO	CONCENTRACIÓN RECUPERADA		
		Control bajo 0.15 µg/mL	Control medio 2.25 µg/mL	Control alto 3.75 µg/mL
1	1	0.147	2.140	3.439
	2	0.159	2.243	3.506
	3	0.153	2.114	3.415
2	1	0.151	2.255	3.564
	2	0.160	2.244	3.625
	3	0.145	2.219	3.571
3	1	0.155	2.212	3.682
	2	0.171	2.081	3.808
	3	0.168	2.218	3.546
Promedio		0.157	2.192	3.573
D. E.		0.009	0.063	0.121
C. V. %		5.660	2.894	3.400
Concentración adicionada (µg/mL)		0.15	2.25	3.75
% DEA		4.370	2.588	4.723



En la tabla 20 se muestran los resultados de la reproducibilidad entre analistas en donde se observa que el CV máximo es de 6.811 % y la DEA es de 3.332 %. De acuerdo a los criterios establecidos que indican que el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15% y que el valor promedio debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración, los resultados obtenidos demuestran que el método es preciso y exacto ya que cumple con dichos criterios.

**Tabla 20. Reproducibilidad del método analítico entre analistas y entre días para cuantificar Lamotrigina en plasma**

ANALISTA	DÍA	REPLICA NÚMERO	CONCENTRACIÓN RECUPERADA		
			Control bajo 0.15 µg/mL	Control medio 2.25 µg/mL	Control alto 3.75 µg/mL
<u>1</u>	1	1	0.142	2.146	3.366
		2	0.142	2.28	3.708
		3	0.145	2.184	3.424
	2	1	0.135	2.225	3.629
		2	0.146	2.334	3.749
		3	0.14	2.307	3.763
	3	1	0.161	2.375	3.786
		2	0.142	2.516	4.072
		3	0.162	2.361	3.598
<u>2</u>	1	1	0.147	2.14	3.439
		2	0.159	2.243	3.506
		3	0.153	2.114	3.415
	2	1	0.151	2.255	3.564
		2	0.160	2.244	3.625
		3	0.145	2.219	3.571
	3	1	0.155	2.212	3.682
		2	0.171	2.081	3.808
		3	0.168	2.218	3.546
<b>Promedio</b>			0.151	2.247	3.625
<b>D. E.</b>			0.010	0.105	0.175
<b>C. V. %</b>			6.811	4.683	4.814
<b>Concentración adicionada (µg/mL)</b>			0.15	2.25	3.75
<b>% DEA</b>			0.889	0.114	3.332





### 4.3 LIMITE DE CUANTIFICACION

El Limite de Cuantificación se estableció como la concentración más baja dentro del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$ .

El valor obtenido para Lamotrigina fue de 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . En este nivel la precisión intradía fue de 7.618% y la desviación absoluta fue de 12.667% (Tabla 21)

Tabla 21. Límite de cuantificación

RÉPLICA	CONCENTRACIÓN RECUPERADA $\mu\text{g/mL}$
1	0.041
2	0.044
3	0.041
4	0.049
5	0.046
6	0.041
Promedio	0.044
Desv. Est.	0.003
C. V. %	7.618
Concentración Adicionada	0.05
% DEA	12.667



#### 4.4 SELECTIVIDAD

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos con a) blanco de plasma, b) plasma adicionado con lamotrigina y pioglitazona, c) plasma adicionado con heparina, d) plasma adicionado con EDTA y e) plasma con evidencia de hemólisis (figura 17)

**Tabla 22. Selectividad del método analítico para cuantificar Lamotrigina en plasma**

<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Respuesta (cps)</b>
<b>Lamotrigina</b>	0.05 µg/mL	0.94	12100
<b>Pioglitazona (EI)</b>	500 ng/mL	2.25	6620000
<b>Heparina</b>	8.9375 Unidades USP/mL	n/a	Sin respuesta
<b>EDTA</b>	1.08 mg/mL	n/a	Sin respuesta
<b>Blancos de Plasma</b>	n/a	n/a	Sin respuesta
<b>Plasma hemólizado</b>	n/a	n/a	Sin respuesta

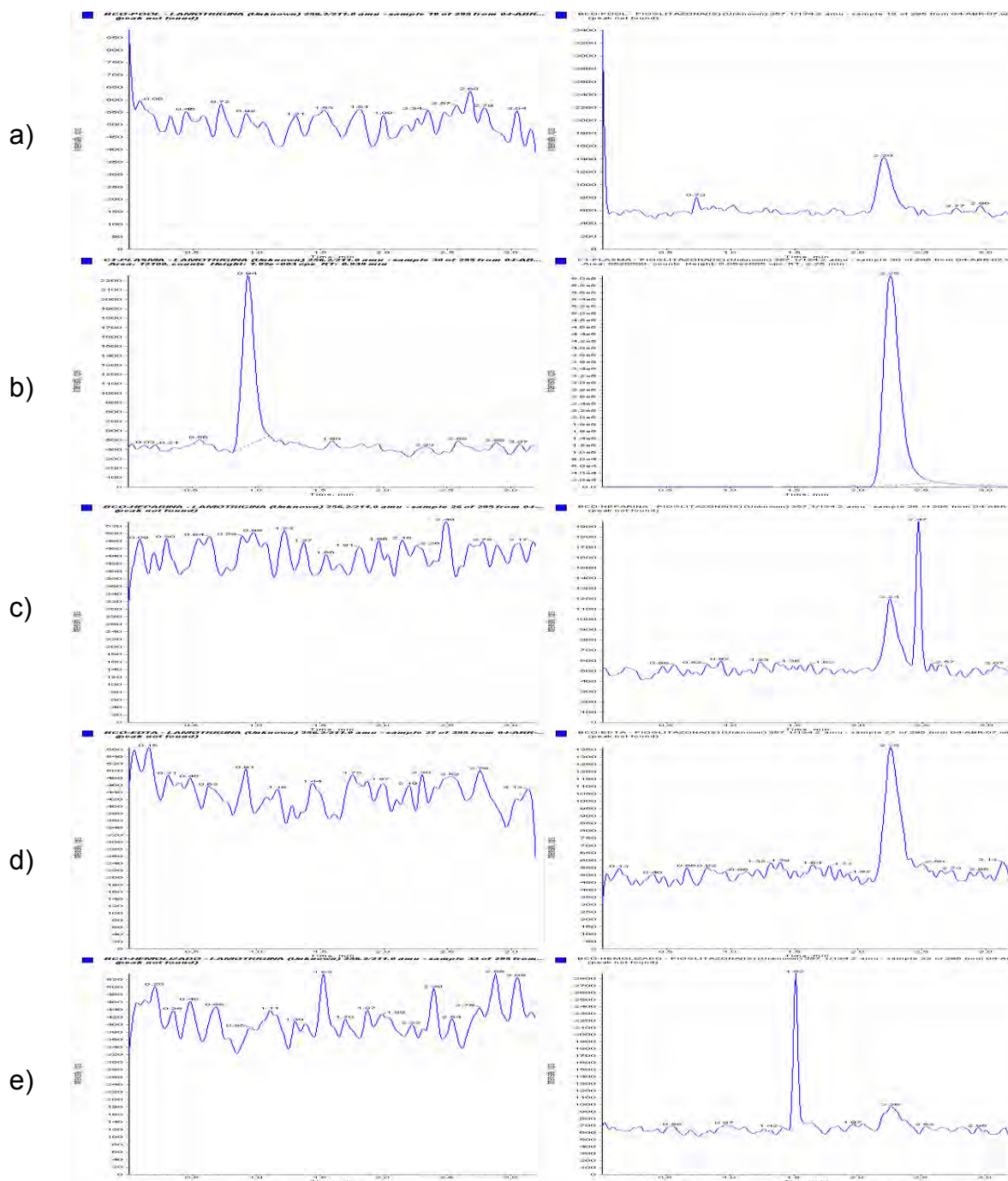


Figura 17. Cromatogramas de las siguientes muestras (izq Lamotrigina, der Pioglitazona SI):  
a)Blanco de Plasma, b) Plasma adicionado con Lamotrigina y Pioglitazona, c) Plasma adicionado con Heparina, d) Plasma adicionado con EDTA y e) Plasma con evidencia de hemólisis



Dado que no se encontraron interferencias de componentes endógenos del plasma y algunos anticoagulantes, así como en plasmas con evidencia de hemólisis o lipémico, que interfirieran en la región cromatográfica del analito, se demuestra que el método es selectivo.

#### 4.5 RECOBRO

El recobro se consideró como el porcentaje de lamotrigina recuperado después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, comparada con un estándar no extraído. Los resultados se presentan en la tabla 23. En ella se puede observar que el recobro absoluto promedio fue del 69.361%, el cual fue reproducible en los tres niveles de concentración.

Tabla 23. Recobro absoluto de Lamotrigina

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g/mL}$ )	ÁREAS EN SOLUCIÓN	ÁREAS EN PLASMA	% RECOBRO
<b>MUESTRAS CONTROL BAJO</b>			
0.15	53100	36400	65.694
0.15	55400	36600	
0.15	59400	37300	
PROMEDIO	55967	36767	
CV %	5.696	1.285	
<b>MUESTRAS CONTROL MEDIO</b>			
2.25	728000	536000	71.063
2.25	727000	532000	
2.25	774000	516000	
PROMEDIO	743000	528000	
CV %	3.614	2.004	
<b>MUESTRAS CONTROL ALTO</b>			
3.75	1080000	780000	71.327
3.75	1070000	762000	
3.75	1090000	769000	
PROMEDIO	1080000	770333	
CV %	0.926	1.178	
<b>RECOBRO ABSOLUTO PROMEDIO</b>			69.361
<b>C. V. %</b>			4.583



#### 4.6 ESTABILIDADES

Los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad en ciclos de congelación-descongelación, temperatura ambiente, así como la estabilidad de la muestra procesada, estabilidad a largo plazo y estabilidad de la solución patrón fueron los siguientes:

- a. Estabilidad en congelación-descongelación: En la tabla 24 se observa que la lamotrigina es estable en la matriz biológica cuando se somete a 3 ciclos de congelación-descongelación, ya que la concentración obtenida se encuentra dentro del intervalo  $\pm 15\%$  con respecto al valor de las muestras de referencia.

**Tabla 24. Estabilidad de Lamotrigina en ciclos de congelación-descongelación**

<b>Muestras de referencia</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.161	2.375	3.786
<b>Réplica 2</b>	0.142	2.516	4.072
<b>Réplica 3</b>	0.162	2.361	3.598
<b>Promedio</b>	0.155	2.417	3.819
<b>Desv. Est.</b>	0.011	0.086	0.239
<b>% CV</b>	7.271	3.547	6.250
<b>Muestras al Ciclo 3</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.151	2.443	3.93
<b>Réplica 2</b>	0.159	2.37	3.702
<b>Réplica 3</b>	0.157	2.546	3.712
<b>Promedio</b>	0.156	2.453	3.781
<b>Desv. Est.</b>	0.004	0.088	0.129
<b>% CV</b>	2.675	3.605	3.407
<b>% Desv. Abs.</b>	0.430	1.475	0.978



b. Temperatura ambiente. Como se observa en la tabla 25, la Lamotrigina es estable a temperatura ambiente por lo menos hasta 18 horas, ya que la desviación absoluta con respecto al valor de las muestras de referencia no es mayor que el 15%, tal .

**Tabla 25. Estabilidad de Lamotrigina a temperatura ambiente**

<b>Muestras de referencia</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.161	2.375	3.786
<b>Réplica 2</b>	0.142	2.516	4.072
<b>Réplica 3</b>	0.162	2.361	3.598
<b>Promedio</b>	0.155	2.417	3.819
<b>Desv. Est.</b>	0.011	0.086	0.239
<b>% CV</b>	7.271	3.547	6.250
<b>Muestras de estabilidad a 18 horas</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.157	2.306	3.763
<b>Réplica 2</b>	0.155	2.327	3.744
<b>Réplica 3</b>	0.141	2.383	3.796
<b>Promedio</b>	0.151	2.339	3.768
<b>Desv. Est.</b>	0.009	0.040	0.026
<b>% CV</b>	5.773	1.702	0.698
<b>% Desv. Abs.</b>	2.581	3.254	1.336



c. Estabilidad de la muestra procesada. Las muestras de Lamotrigina fueron estables en el automuestreador del sistema cromatografico hasta 42 horas posteriores a su preparación, ya que su desviación absoluta no fue mayor que el 15% con respecto a las muestras de referencia (Tabla 26)

**Tabla 26. Estabilidad de la muestra procesada 42 horas**

<b>Muestras de referencia</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.147	2.14	3.439
<b>Réplica 2</b>	0.159	2.243	3.506
<b>Réplica 3</b>	0.153	2.114	3.415
<b>Promedio</b>	0.153	2.166	3.453
<b>Desv. Est.</b>	0.006	0.068	0.047
<b>% CV</b>	3.922	3.150	1.366
<b>Muestras de estabilidad a 42 horas</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.158	2.154	3.357
<b>Réplica 2</b>	0.158	2.081	3.505
<b>Réplica 3</b>	0.146	2.117	3.34
<b>Promedio</b>	0.154	2.117	3.401
<b>Desv. Est.</b>	0.007	0.037	0.091
<b>% CV</b>	4.499	1.724	2.669
<b>% Desv. Abs.</b>	0.654	2.232	1.525



d. Estabilidad a largo plazo. Se observa en la tabla 27 que las muestras de plasma conteniendo Lamotrigina, fueron estables durante al menos 137 días posteriores a su preparación, ya que la desviación absoluta no fue mayor que el 15% con respecto al valor de las muestras de comparación.

**Tabla 27. Estabilidad a largo plazo**

<b>Muestras de referencia</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.16	2.247	3.719
<b>Réplica 2</b>	0.152	2.323	3.701
<b>Réplica 3</b>	0.149	2.113	3.598
<b>Promedio</b>	0.154	2.228	3.673
<b>Desv. Est.</b>	0.006	0.106	0.065
<b>% CV</b>	3.700	4.773	1.778
<b>Muestras de estabilidad a 137 días</b>	<b>Control bajo 0.15 µg/mL</b>	<b>Control medio 2.25 µg/mL</b>	<b>Control alto 3.75 µg/mL</b>
<b>Réplica 1</b>	0.155	2.159	3.433
<b>Réplica 2</b>	0.143	2.19	3.42
<b>Réplica 3</b>	0.145	2.196	3.449
<b>Promedio</b>	0.148	2.182	3.434
<b>Desv. Est.</b>	0.006	0.020	0.015
<b>% CV</b>	4.354	0.910	0.423
<b>% DEA</b>	3.905	2.065	6.498





- e. La prueba del efecto de la dilución, Los resultados de las muestras diluidas 1:2 se compararon con los resultados de la concentración más alta. En la tabla 28 se puede observar que no existe un efecto sobre los resultados obtenidos cuando las muestras son diluidas, ya que su desviación absoluta no fue mayor que el 15% con respecto al valor de las muestras sin diluir.

Tabla 28. Efecto de la dilución

<b>EFFECTO DE LA DILUCIÓN</b>	
<b>MUESTRAS CONTROL ALTAS</b>	<b>CONCENTRACIÓN 3.75 µg/mL</b>
1	3.366
2	3.708
3	3.424
4	3.467
5	3.263
6	3.253
<b>Promedio</b>	3.414
<b>Desv. Est.</b>	0.168
<b>C. V. %</b>	4.909
<b>FACTOR DE DILUCIÓN = 2</b>	
<b>CONCENTRACIÓN MUESTRAS DILUIDAS</b>	
1	3.459
2	3.408
3	3.127
4	3.555
5	3.332
6	3.676
<b>Promedio</b>	3.426
<b>Desv. Est.</b>	0.189
<b>C. V. %</b>	5.519
<b>% DEA</b>	0.371



f. Estabilidad de la solución patrón. Como se observa en la tabla 29, las muestras de Lamotrigina y Pioglitazona en solución fueron estables durante al menos 17 días posteriores a su preparación, ya que el valor de coeficiente de variación y su desviación absoluta no fue mayor que el 15% con respecto a la respuesta de las muestras preparadas el día de comparación.

**Tabla 29. Estabilidad de la solución patrón**

<b>SOLUCIÓN DE COMPARACIÓN LAMOTRIGINA</b>		<b>SOLUCIÓN DE COMPARACIÓN PIOGLITAZONA (EI)</b>
<b>1</b>	66600	7380000
<b>2</b>	59600	7140000
<b>3</b>	65900	7460000
<b>4</b>	64400	7240000
<b>5</b>	66500	7140000
<b>6</b>	67200	7120000
<b>Promedio</b>	65033	7246667
<b>Desv. Est.</b>	2930.017	143944.434
<b>C. V. %</b>	4.348	1.972
<b>SOLUCIONES EN REFRIGERACIÓN 17 DÍAS</b>		
<b>1</b>	62600	7180000
<b>2</b>	67100	7250000
<b>3</b>	64200	7190000
<b>4</b>	64700	7420000
<b>5</b>	63400	7430000
<b>6</b>	68600	7480000
<b>Promedio</b>	65100	7325000
<b>Desv. Est.</b>	1707.337	122596.900
<b>C. V. %</b>	3.527	1.821
<b>% DEA</b>	0.103	1.081



### 4.7 SUPRESIÓN IONICA

En la figura 18 se observa que tanto las condiciones de trabajo, así como empleando el método de extracción, no se presentaron inflexiones negativas en los tiempos de retención de los compuestos por cuantificar., lo cual es indicador de que no existe supresión iónica.

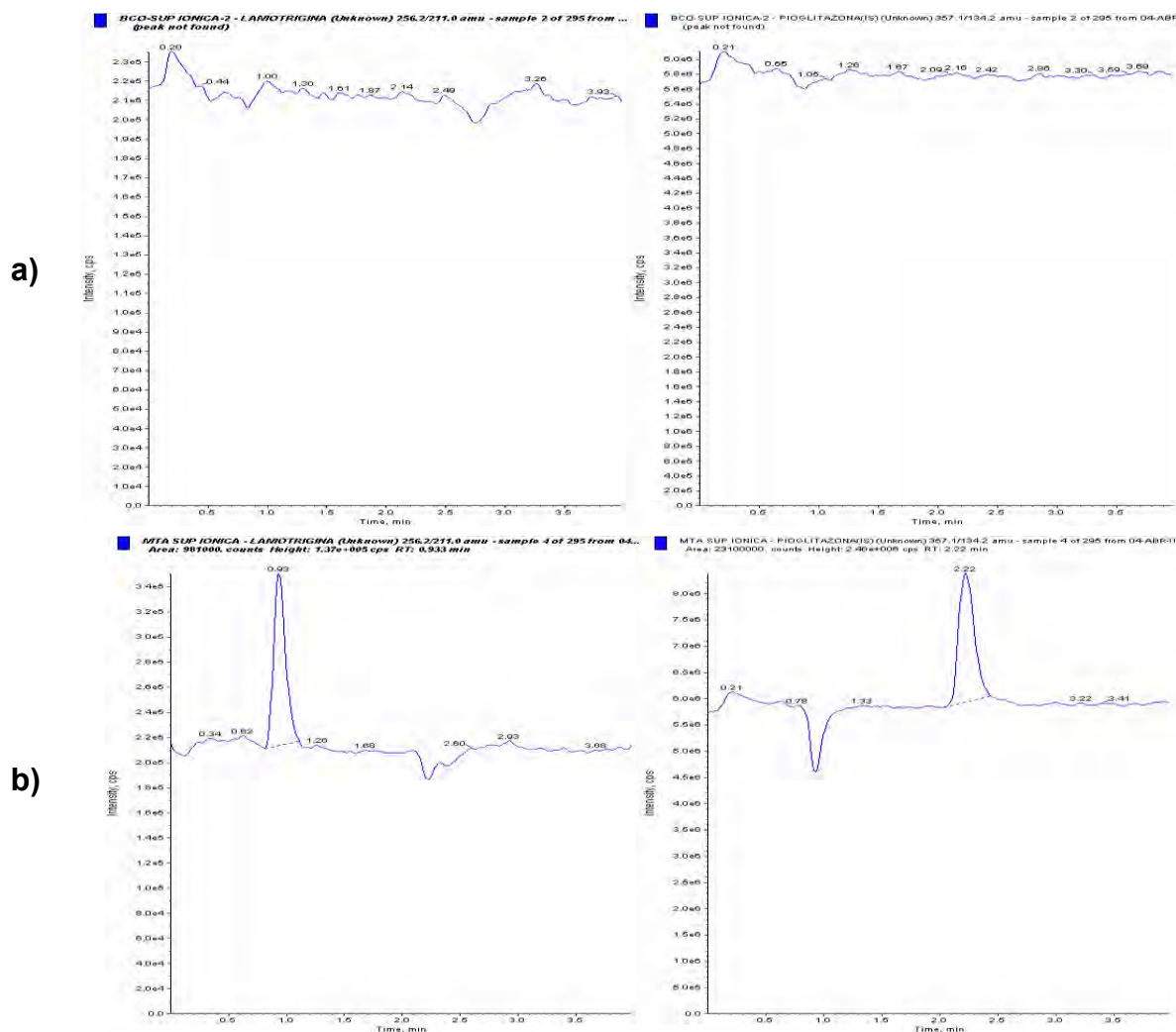


Figura 18. Cromatogramas de la Supresión Iónica (izq Lamotrigina, der Pioglitazona El)

a) Blanco de Plasma y b) Plasma adicionado con Lamotrigina y Pioglitazona.



---

## CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

- Se validó un Método Analítico sencillo, sensible, preciso, exacto y confiable, para cuantificar Lamotrigina en Plasma Humano por LC/MS/MS.
- La Pioglitazona resulto ser una molécula adecuada como estándar interno, por tener un comportamiento fisicoquímico parecido.
- El método demostró ser:
  - ✓ Lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 50 – 4500 ng/mL .
  - ✓ Sensible, ya que el Límite de Cuantificación fue de 50 ng/mL.
  - ✓ Selectivo, no se presentaron interferencias de sustancias endógenas del plasma, ni de la presencia de algunos anticoagulantes (EDTA y Heparina), así como de interferencias que puedan observarse en plasmas Lipémicos o Hemolizados.
  - ✓ La muestra analítica se mantiene estable por lo menos hasta 18 horas a temperatura ambiente, hasta 3 ciclos de congelación / descongelación, hasta 42 horas en automuestreador y tiene una estabilidad bajo condiciones de almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ , de al menos 137 días.
  - ✓ Preciso y exacto cuando se efectúa una dilución de la muestra con Plasma libre de Fármaco a razón de 1:2.
- El Método Analítico desarrollado es apropiado para llevar a cabo estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia o Farmacocinética.



---

---

## CAPÍTULO V BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bell, GS. and Sander, JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure* (2001); 10: 306–316.
- 2) Burneo, JG., Tellez-Zenteno, J. and Wiebe, S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research* (2005); 66: 63–74.
- 3) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* (1981);22:489-501.
- 4) Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición (2001). pp 491-519.
- 5) Murphy, J. *Clinical Pharmacokinetics*. American society of Health- System Pharmacist. Segunda edición (1993). pp 61-74.
- 6) Jefferson, JW. Lamotrigine in psychiatry: Pharmacology and therapeutics. *CNS Spectr.* (2005); 10(3): 224-232.
- 7) Rowan, AJ., Ramsay, RE., Collins, JF., Pryor, F., Boardman, KD., Uthman, BM., Spitz, M., Frederick, T., Towne, A., Carter, GS., Marks, W., Felicetta, J., Tomyanovich, ML; VA Cooperative Study 428 Group. New onset geriatric epilepsy: a randomized study of gabapentin, lamotrigine, and carbamazepine. *Neurology* (2005); 64(11):1868-1873.



8) Marson, AG., Al-Kharusi, AM., Alwaidh, M., Appleton, R., Baker, GA., Chadwick, DW., Cramp, C., Cockerell, OC., Cooper, PN., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Goulding, PJ., Howell, SJ., Hughes, A., Jackson, M., Jacoby, A., Kellett, M., Lawson, GR., Leach, JP., Nicolaidis, P., Roberts, R., Shackley, P., Shen, J., Smith, DF., Smith, PE., Smith, CT., Vanoli, A., Williamson, PR; SANAD Study group. The SANAD study of effectiveness of carbamazepine, gabapentin, lamotrigine, oxcarbamazepine, or topiramate for treatment of partial epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. *Lancet* (2007); 369: 1000-1015.

9) French, JA et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: Treatment of refractory epilepsy. *Neurology* (2004); 62: 1237-1261.

10) Posner, EB., Mohamed, K. and Marson, AG. A systemic review of treatment of typical absence seizures in children and adolescents with ethosuximide, sodium valproate or lamotrigine. *Seizure* (2005); 14: 117-122.

11) International League Against Epilepsy: <http://www.ilae.org>

12) Ortiz, Pedro, Sancho Jerónimo. Pronóstico de la epilepsia. *Revista del grupo de epilepsia de la Sociedad Española de Neurología*. Volumen 1, 4-8 (2009)

13) Clark. Isolation and identification of drugs. (1986).

14) Sigma–Aldrich: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

15) Cheng, C.L., Chen-His, C. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 817 (2005) 199–206.



- 16) Therapeutic System Research Laboratories: [www.tsrlinc.com](http://www.tsrlinc.com)
- 17) The Merck Index. 13th edition. Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, USA (2001).
- 18) Diccionario de especialidades Farmacéuticas . Thompson PLM. México, 2008.
- 19) Prescribing information. Drug safety information. Center for drug evaluation and research. Food and drug administration (2005).
- 20) Garnett W. Lamotrigine: Pharmacokinetics. J Child Neurol (1997); 12 Health & Medical Complete: S10-S15.
- 21) Gidal, BE. Pharmacokinetics of the new antiepileptic drugs. Am J Manag Care (2001); 7 (Suppl 7): S215-220.
- 22) Patsalos, PN. Properties of antiepileptic drugs in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. Epilepsia (2005); 46 (Suppl 9): 140-148.
- 23) Morrow, DG. Lamotrigine monograph. Health Sciences Center. University of New Mexico (2003).
- 24) Furlan, V., Demirdjian, S., Bourdon, O., Magdalou, J. and Taburet, AM. Glucoronidation of drugs by hepatic microsomes derived from healthy and cirrhotic human livers. J Pharmacol Exper Therap (1999); 289(2): 1169-1175.
- 25) Patient information sheet. Drug safety information. Center for drug evaluation and research. Food and drug administration (2006).



26) Cunnington, M. and Tennis, P. Lamotrigine and the risk of malformations in pregnancy. *Neurology* (2005); 64(6): 955-960.

27) Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS, “Cuadro Básico de Medicamentos”, <http://www.imss.gob.mx/transparencia/cuadros/medicamentos.htm>

28) NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

29) FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

30) Lamotrigine FDA label,  
[http://129.128.185.122/drugbank2/drugs/DB00555/fda\\_labels/549](http://129.128.185.122/drugbank2/drugs/DB00555/fda_labels/549)

31) Gomis Yagües, Vicente, Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química, “Técnicas instrumentales de análisis industrial Tema 5. Espectrometría de masas”, (2008).

32) Jürgen H. Gross, “Mass Spectrometry, a textbook” Ed. Springer, Germany (2004).

33) Christopher G. Herbert, Robert A.W. “Mass Spectrometry Basics” CRC Press, USA (2003).

34) The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency.  
[www.mhra.gov.uk](http://www.mhra.gov.uk)