



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE HALOPERIDOL EN PLASMA Y SU
APLICACIÓN CLÍNICA”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA:

QFB. MARÍA LUISA MÁRQUEZ SERNA

MATRÍCULA: 2132800252

COMITÉ TUTORAL

TUTORA: DRA. HELGI JUNG COOK

ASESORA: M. en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

ASESORA: DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2015



“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HALOPERIDOL EN PLASMA Y SU APLICACIÓN CLÍNICA”

COMITÉ TUTORAL

Vo. Bo.

TUTOR

Dra. Helgi Jung Cook

ASESOR INTERNO

ASESOR EXTERNO

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

Dra. Iliana Elvia González Hernández

ALUMNA

QFB. María Luisa Márquez Serna

Matrícula: 2132800252



“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HALOPERIDOL EN PLASMA Y SU APLICACIÓN CLÍNICA”

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Vo. Bo.

PRESIDENTE

Dra. Irma Susana Rojas Tomé

VOCAL

SECRETARIO

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

RESUMEN

El haloperidol es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia y otros trastornos psiquiátricos. En la actualidad no se ha establecido el intervalo terapéutico para este fármaco. Se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas altas (>17ng/mL) se asocian con la aparición de reacciones adversas, incluyendo distonía, pseudoparkinsonismo, acatisia y discinesia tardía. Asimismo, se ha demostrado que el fármaco presenta un metabolismo extenso, lo cual da lugar a una gran variabilidad interindividual. A pesar del amplio uso del haloperidol, en México no existe información acerca de la relación entre los niveles plasmáticos y la respuesta terapéutica en pacientes psiquiátricos, por lo que el objetivo del presente trabajo fue validar un método selectivo y confiable para la cuantificación de haloperidol en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), para su implementación en el monitoreo terapéutico.

Para la extracción del haloperidol de plasma se empleó éter isopropílico. La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 marca Agilent; la fase móvil consistió en acetonitrilo:acetato de amonio 5mM pH 6 (90:10 v/v). La detección fue por espectrometría de masas en tándem (analizador QTrap), con ionización por electrospray. Las transiciones evaluadas para el haloperidol y la carbamazepina (estándar interno) fueron: 376→165 y 237→194 *m/z*, respectivamente. El método se validó de acuerdo a los criterios establecidos por la NOM-177-SSA-2013.

El método fue lineal en el rango de 1-40 ng/mL, con un límite de cuantificación de 1 ng/mL. Además fue selectivo, exacto (desviación < 15%), repetible (CV < 10%) y reproducible (CV < 12%), y no se encontró un efecto significativo de la matriz. Se demostró la estabilidad de las muestras plasmáticas a temperatura ambiente, durante 3 ciclos de congelación-descongelación, hasta por 2 horas en el automuestreador, y bajo condiciones de almacenamiento a $-70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 días. Se concluyó que el método desarrollado fue sensible, preciso, exacto y confiable para la cuantificación de haloperidol en plasma, lo cual lo hace apropiado para ser aplicado en la práctica clínica.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría, durante el periodo de abril del 2013 a abril del 2015. Número de registro 291405.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por concederme la oportunidad de formar parte de tan distinguida institución.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y a todo el panel de profesores por sus grandes enseñanzas académicas y personales, por su guía y aprendizaje.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) "Manuel Velazco Suárez" en especial al Laboratorio de Neuropsicofarmacología donde se desarrolló este proyecto, gracias por los recursos y la oportunidad de pertenecer a un gran y valioso equipo de trabajo.

A Laboratorios Pisa por la donación y apoyar a la investigación.

A la Dra. Helgi Jung por permitirme desarrollar este proyecto bajo tu tutela, por brindarme el tiempo y sus conocimientos, por siempre estar pendiente y confiar en mí para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Iliana por estar cada día ahí conmigo, con su gran enseñanza y apoyo, en los problemas y en los aciertos, en el laboratorio y en los convivios, gracias por fortalecer mis conocimientos y hacerme una mejor persona.

A la M. en C. Marcela por creer en mí, por orientarme cuando lo necesitaba y por estar ahí cuando tenía dudas o me sentía frustrada para no darme por vencida.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primero que nada quisiera agradecer a mis padres por apoyarme en este gran paso, por su sacrificio y cariño a lo largo de mi vida, por estar cerca de mí a pesar de la distancia.

A mi hermana Esmeralda por sus palabras y ánimos, por su apoyo incondicional y por preocuparse por mi bienestar.

A todo el resto de mi familia, por siempre estar al pendiente de mí y echarme porras.

A Rafa por compartir grandes momentos, por ser un sostén uno del otro al alejarnos de nuestro hogar, por estar ahí en las buenas y en las malas, gracias por su inmenso cariño.

A mis compañeros y amigos de la maestría por permitirme conocerlos y formar una segunda familia llena de apoyo y amistad. A Betzy, Adolfo, Cindy, Luis, Alma, Maribel, Gerardo, Daniel, Karen, Balo, Rosaura, Osvaldo, Zac y David.

A mis mejores amigas Jazell y Mayra que a pesar de la distancia nunca se olvidaron de mí, por su valiosa amistad y atender las llamadas y mensajes cuando las necesitaba.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Neuropsicofarmacología Rosy y Yadira por ayudarme en mi tesis y por compartir grandes momentos y alegrías en el laboratorio.

A mis amigos de la universidad por impulsarme a dar este paso y por ser un ejemplo a seguir, con especial cariño a Samuel, Erick, Brenda, Gil y Nacho.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS.....	5
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
Página.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 ANTECEDENTES.....	15
3 MARCO TEÓRICO.....	17
3.1 Esquizofrenia.....	17
3.1.1 Epidemiología.....	17
3.1.2 Manifestaciones clínicas.....	18
3.1.3 Clasificación de la esquizofrenia y subtipos.....	19
3.1.4 Tratamiento.....	20
3.1.4.1 Tratamiento psicosocial.....	20
3.1.4.2 Tratamiento farmacológico.....	21
3.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	22
3.2.2 Clasificación biofarmacéutica.....	23
3.2.3 Mecanismo de acción.....	23
3.2.4 Farmacocinética.....	24
3.2.5 Metabolismo.....	24
3.2.6 Dosis.....	26
3.2.7 Efectos adversos.....	26
3.2.8 Indicaciones, contraindicaciones y precauciones.....	28
3.2.9 Interacciones con otros medicamentos.....	29
3.2.10 Productos comerciales.....	31
3.3 Monitoreo terapéutico de haloperidol.....	31
3.4 Métodos analíticos para el monitoreo terapéutico.....	32
3.5 Validación de métodos bioanalíticos.....	33

3.6	Métodos analíticos para la cuantificación de haloperidol en plasma que han sido publicados.....	36
3.7	Espectrometría de masas	38
3.7.1	Espectrómetro de masas.....	38
3.7.2	Espectrometría de masas acoplado a cromatografía de líquidos (LC/MS)	39
3.7.3	Fuentes de ionización	40
3.7.4	Analizadores	42
3.7.5	Detectores.....	45
3.7.6	Consideraciones para LC-MS	46
3.7.7	Efecto de la matriz.....	47
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
5	HIPÓTESIS.....	49
6	OBJETIVOS.....	50
6.1	Objetivo general	50
6.2	Objetivos específicos.....	50
7	MATERIAL Y MÉTODOS	51
7.1	Material, reactivos, instrumentos y equipos	51
7.1.1	Sustancias de referencia.....	51
7.1.2	Materiales e Instrumentos.....	51
7.1.3	Consumibles cromatográficos.....	51
7.1.4	Reactivos	51
7.1.5	Equipos	52
7.2	Preparación de soluciones.....	52
7.3	Desarrollo y optimización del método analítico para cuantificar HAL en plasma humano	55
7.3.1	Selección de condiciones para espectrometría de masas.....	55
7.3.2	Selección de las condiciones cromatográficas.....	56
7.3.3	Estándar interno (EI).....	56
7.3.4	Selección del método de extracción	56
7.4	Procedimiento de extracción.....	57
7.5	Condiciones espectrometría de masas.....	58
7.6	Condiciones cromatográficas.....	58
7.7	Adecuabilidad del sistema	59

7.8	Validación del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma.....	59
7.8.1	Selectividad.....	59
7.8.2	Efecto de la matriz para métodos por espectrometría de masas	60
7.8.3	Efecto de acarreo	60
7.8.4	Curva de calibración	60
7.8.5	Precisión	61
7.8.6	Exactitud	62
7.8.7	Límite inferior de cuantificación (LIC).....	62
7.8.7	Estabilidad de las muestras	62
7.8.8	Recobro.....	65
7.9	Aplicación del método en la clínica	65
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
8.1	Desarrollo del método analítico para cuantificar HAL en plasma humano	66
8.1.1	Condiciones de espectrometría de masas	66
8.1.2	Condiciones cromatográficas.....	67
8.1.3	Selección de estándar interno.....	69
8.1.4	Selección del método de extracción.....	71
8.2	Validación del método para cuantificar HAL en plasma humano	71
8.2.1	Selectividad	71
8.2.2	Efecto de la matriz	74
8.2.3	Efecto de acarreo.....	75
8.2.4	Curva de calibración.....	75
8.2.5	Precisión	77
8.2.5.1	Repetibilidad.....	77
8.2.5.2	Reproducibilidad	78
8.2.6	Exactitud	79
8.2.7	Estabilidad de la muestra.....	81
8.2.7.1	Estabilidad a corto plazo	81
8.2.7.2	Estabilidad a largo plazo	81
8.2.7.3	Estabilidad de la muestra procesada.....	82
8.2.7.4	Estabilidad en el automuestreador.....	83
8.2.7.5	Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	84

8.2.7.6 Estabilidad en solución.....	85
8.2.8 Recobro	87
8.3 Aplicación del método en la clínica	89
9 CONCLUSIONES.....	91
10 PERPECTIVAS.....	92
11 REFERENCIAS.....	93

ABREVIATURAS

%	Por ciento
<	Menor que
>	Mayor que
±	Más menos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
°C	Grados Celsius
ACN	Acetonitrilo
APA	Asociación Psiquiátrica Americana
APCI	Ionización química a presión atmosférica (APCI)
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
CBZ	Carbamazepina
CE	Electroforesis capilar
CID	Disociación inducida por colisión
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CV	Coeficiente de variación
Da	Dalton
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales
EI	Estándar interno
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Factor matriz normalizado
g	Gramos
GC	Cromatografía de gases
GPC	Guía Práctica Clínica
h	Horas
H ₂ O	Agua
HAL	Haloperidol
HPLC	Siglas en inglés, High performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
HR	Haloperidol reducido

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IP3	Inositol trifosfato
Kv	Kilovolts
L/kg	Litro por kilogramo
LC	Cromatografía de líquidos
LIC	Límite inferior de cuantificación
Log P	Logaritmo del coeficiente de partición
LSC	Límite superior de cuantificación
m/z	Relación de masa/carga
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control bajo
MCD	Muestra control diluida
MCM	Muestra control media
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
MT	Monitoreo terapéutico
N	Concentración Normal
NC	No cuantificable
ND	No detectable
ng/mL	Nanogramos por mililitro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
PLC	Fosfolipasa C
psi	Libra por pulgada cuadrada
Tamb	Temperatura ambiente
TOF	Analizador de tiempo de vuelo

UPLC	Siglas en ingles Ultra performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de ultra alta- resolución)
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Acatisia:** es un trastorno del movimiento caracterizado por un sentimiento de inquietud y una necesidad imperiosa de estar en constante movimiento, así como por acciones tales como balancearse mientras se está de pie o sentado, levantar los pies como si se estuviera marchando del lugar, y cruzar y descruzar las piernas mientras se está sentado.
- **Afectividad aplanada o inapropiada:** también llamado indiferencia emocional, se refiere a una pobre reacción a un abatimiento o pérdida de la vida emocional, de manera que el individuo se torna indiferente sobre el bienestar propio o de los demás.
- **Bradicinesia:** Lentitud de los movimientos voluntarios asociada a disminución de los movimientos automáticos (como el braceo al caminar).
- **Cognición:** Capacidad del ser humano para conocer por medio de la percepción y los órganos del cerebro.
- **Comportamiento catatónico:** anormalidades motoras, que se presentan en asociación con alteraciones en la conciencia, el afecto y el pensamiento.
- **Coreoatetosis:** Es un problema con el tono muscular, generalmente en grupos grandes de músculos. El problema lleva a movimientos espasmódicos, incontrolables y lentos de la cabeza, las extremidades, el tronco o el cuello.
- **Discinesia tardía:** Es un trastorno que consiste en movimientos involuntarios. Con mucha frecuencia, los movimientos afectan la parte inferior de la cara.
- **Distonía:** es un trastorno del movimiento que causa contracciones involuntarias de los músculos. Estas contracciones resultan en torsiones y movimientos repetitivos. Puede afectar solamente un músculo, un grupo de músculos o todos los músculos. Los síntomas pueden incluir temblores, problemas en la voz o arrastrar un pie.
- **Ecolalia:** Perturbación del lenguaje que consiste en que el enfermo repite involuntariamente una palabra o frase que acaba de oír o pronunciar él mismo.
- **Ecopraxia:** repetición o imitación involuntaria de los movimientos corporales de otra persona.

- **Facies de máscara:** cara inmóvil, sin expresión con los ojos fijos y con la boca ligeramente abierta.
- **Feocromocitoma:** es el término médico usado para un tumor de la médula suprarrenal de la glándula adrenal
- **Funcionamiento premórbido:** es un índice empleado como precursor del comportamiento del inicio de síntomas agudos en la esquizofrenia. Caracteriza signos o síntomas precoces de un trastorno mental.
- **Ictericia colestásica:** Coloración amarilla de la piel y/o mucosas, causada por la presencia de un obstáculo, mecánico o funcional, de las vías biliares, que impide o dificulta la llegada de la bilis al duodeno.
- **Mutismo:** Silencio voluntario o impuesto que tiene una persona o un grupo en un momento determinado.
- **Porfiria:** son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas, generalmente hereditarias, ocasionadas por deficiencia en las enzimas que intervienen en la biosíntesis del grupo hemo (componente de la hemoglobina).
- **Pseudoparkinsonismo:** Corresponde a un cuadro de alteración motora de parkinsonismo, que no alcanza a cumplir los criterios diagnóstico del parkinsonismo puro.
- **Síndrome neuroléptico maligno:** Complicación grave del tratamiento con psicofármacos La principal característica es la hipertermia, acompañada de hipertonía muscular, alteración del nivel de conciencia e inestabilidad autonómica.
- **Temblor perioral:** movimiento rápido de los labios hacia delante y atrás.

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los antipsicóticos	21
Tabla 2. Efectos adversos asociados al haloperidol	27
Tabla 3. Descripción de los efectos adversos neurológicos más comunes	28
Tabla 4. Interacciones del haloperidol con otros fármacos	30
Tabla 5. Productos comerciales disponibles que contienen haloperidol	31
Tabla 6. Comparación entre la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de la FDA.....	34
Tabla 7. Métodos analíticos LC-MS para la cuantificación del haloperidol en plasma	37
Tabla 8. Resumen de las fuentes de ionización y el evento que sucede para ionizar.	42
Tabla 9. Tipos de analizadores usados en espectrometría de masas	43
Tabla 10. Preparación de curva de calibración de HAL (primera dilución).....	54
Tabla 11. Preparación de curva de calibración de HAL en plasma (segunda dilución)	54
Tabla 12. Preparación de muestras control (primera dilución).....	55
Tabla 13. Preparación de muestra control (segunda dilución)	55
Tabla 14. Condiciones de espectrometría de masas dependientes del flujo	58
Tabla 15. Condiciones de espectrometría de masas dependientes del analito	58
Tabla 16. Condiciones cromatográficas	58
Tabla 17. Parámetros para adecuabilidad del sistema	59
Tabla 18. Optimización de condiciones de espectrometría de masas dependientes del flujo.....	67
Tabla 19. Optimización de condiciones de espectrometría de masas dependientes del analito.....	67
Tabla 20. Resultados de FMN para efecto de la matriz blanco, hemolizada y lipémica sobre el método analítico para la cuantificación de HAL por espectrometría de masas	74
Tabla 21. Resultados de efecto de acarreo del método para la cuantificación de HAL por espectrometría de masas.....	75
Tabla 22. Valores promedio, desviación estándar y %CV de las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL.....	76

Tabla 23. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL.....	76
Tabla 24. Concentración recuperada y % desviación de las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL.....	77
Tabla 25. Repetibilidad del método para la cuantificación de HAL	78
Tabla 26. Reproducibilidad del método para la cuantificación de HAL	79
Tabla 27. Exactitud del método para la cuantificación de HAL, datos de repetibilidad	80
Tabla 28. Exactitud del método para la cuantificación de HAL, datos de reproducibilidad	80
Tabla 29. Estabilidad de HAL en plasma a corto plazo.....	81
Tabla 30. Estabilidad de HAL en plasma a largo plazo.....	82
Tabla 31. Estabilidad de HAL en muestra procesada	83
Tabla 32. Estabilidad de HAL en el automuestreador	84
Tabla 33. Estabilidad de HAL en ciclos de congelación-descongelación.....	85
Tabla 34. Estabilidad de las soluciones estándar de HAL	86
Tabla 35. Estabilidad de las soluciones estándar de CBZ	86
Tabla 36. Porcentaje de recobro de HAL en muestras control concentración baja y alta	88
Tabla 37. Porcentaje de recobro para la CBZ en muestras control	89

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del haloperidol	22
Figura 2. Biotransformación del haloperidol en humanos	25
Figura 3. Componentes del espectrómetro de masas	39
Figura 4. La producción de gotas en la interfaz de electrospray (Gaskell, 1997)	41
Figura 5. Espectrómetro de masas triple cuadrupolo.	44
Figura 6. Diagrama de flujo del método de extracción de HAL en plasma	57
Figura 7. Espectrometría de masas para el HAL por MS/MS.	66
Figura 8. Cromatograma por LC-MS/MS para HAL y el estándar interno.....	69
Figura 9. Estructura química de carbamazepina y lamotrigina.	69
Figura 10. Espectrometría de masas para CBZ por MS/MS. L.....	70
Figura 11. Selectividad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma	72
Figura 12. Selectividad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma en presencia de fármacos concomitantes	73
Figura 13. Linealidad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma humano	76

1 INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia afecta aproximadamente a 24 millones de personas en todo el mundo, la mayoría en el grupo de edad de entre 15 y 35 años. Se estima que estos pacientes tienen una esperanza de vida más corta que la población en general. El tratamiento de la esquizofrenia es complejo y requiere la utilización de terapias psicológicas para la integración social y laboral del paciente, así como el uso de medicamentos antipsicóticos. (Fraga, et al., 2010)

El haloperidol es un antipsicótico de muy potente ampliamente utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia aguda y crónica así como para el síndrome orgánico cerebral, la fase maniaca del trastorno bipolar, la psicosis atípica y en el síndrome de Gilles de la Tourette. El haloperidol bloquea de forma efectiva a los receptores dopaminérgicos D_2 en el mesocórtex y en el sistema límbico del cerebro. (Gómez, et al., 2008) (Bruton, et al., 2012)

En la actualidad no se ha definido un intervalo terapéutico para el haloperidol debido a la gran variabilidad interindividual que presenta. Además su metabolismo se ve afectado por moléculas inhibitoras o inductoras a nivel del citocromo CYP450 en sus isoformas 3A4 y 2D6. Se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas altas ($>17\text{ng/mL}$) se asocian con la aparición de reacciones adversas, incluyendo, distonía, pseudoparkinsonismo, acatasia y en tratamientos crónicos, discinesia tardía; las cuales llegan a aparecer hasta en un 60% de los pacientes. (Hiemke, et al., 2011)

En México no existe información acerca de la relación entre los niveles plasmáticos y la respuesta terapéutica en pacientes del área de psiquiatría, lo cual hace necesario el desarrollo de un método analítico suficientemente sensible selectivo, exacto y confiable para la cuantificación de este fármaco en plasma, con el fin de poder instaurar un programa de monitoreo que permita proponer un intervalo terapéutico y establecer esquemas de dosificación adecuados para los pacientes, lo cual permitiría mantener su calidad de vida.

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó el desarrollo y validación de un método analítico por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a una detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la cuantificación de haloperidol en plasma y su posterior aplicación clínica.

2 ANTECEDENTES

El haloperidol fue sintetizado por Bert Hermans en el año de 1958 en los laboratorios Janssen en Bélgica. Con su descubrimiento inició una nueva familia química, las butirofenonas. Los estudios preclínicos realizados con haloperidol se publicaron entre 1959 y 1960, en donde se observó que la molécula, etiquetada como *R1625*, al ser inyectada en ratones provocaba un estado de excitación momentáneo y después generaba un estado cataléptico y una sedación similar a la de la clorpromazina. Poco después de este descubrimiento, se realizaron los estudios clínicos en humanos y como los resultados fueron positivos, los psiquiatras belgas encargados decidieron continuar estudiando el fármaco. La primera publicación sobre el haloperidol apareció en la revista *Acta Neurologica Psychiatrica Belgica* en el año de 1958 (Divry, et al., 1958). En ella los autores confirman que el haloperidol es un “potente sedante en casos de agitación. En el año de 1969, Janssen obtuvo la patente en Estados Unidos y a partir de ese año ha sido utilizado ampliamente como tranquilizante. (López & Álamo, 2007)

Desde su introducción, la experiencia clínica ha sugerido que el haloperidol es un antipsicótico eficaz y particularmente benéfico para quienes experimentan alucinaciones agudas y delirios, sin embargo, su eficacia es variable. A pesar del desarrollo de una nueva generación de antipsicóticos atípicos, el haloperidol sigue siendo prescrito frecuentemente a nivel mundial. (Irving, et al., 2012)

Actualmente el haloperidol está indicado en la esquizofrenia aguda y crónica, en el trastorno esquizoafectivo, en la fase maniaca del trastorno bipolar, en las depresiones con síntomas psicóticos, en las demencias, en el síndrome confesional agudo (delirium), en el síndrome de Gilles de la Tourette y en las psicosis secundarias a patologías neurológicas. (Gómez, et al., 2008)

El grupo experto de monitoreo terapéutico de fármacos AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmacologie und Pharmakopsychiatrie) clasifica al haloperidol como un fármaco recomendado altamente para monitoreo terapéutico. Existe evidencia del intervalo terapéutico de este fármaco a través de estudios clínicos controlados, en los

cuales se ha demostrado que a concentraciones plasmáticas terapéuticas (5-17ng/mL) existen altas probabilidades de respuesta por parte del paciente, mientras que ante concentraciones plasmáticas subterapéuticas la respuesta es similar a la del placebo, y a concentraciones mayores a las del límite superior del intervalo terapéutico hay un aumento en el riesgo de que aparezcan efectos adversos. (Baumann, et al., 2004) (Hiemke, et al., 2011)

Para evaluar la relación entre la respuesta terapéutica y las concentraciones de haloperidol en plasma, es importante contar con una técnica sensible, selectiva bien caracterizada y totalmente validada para dar resultados fiables que pueden ser interpretados satisfactoriamente. En la literatura se describen diversos métodos analíticos que se han desarrollado para tal fin, entre los que se incluyen los métodos colorimétricos (Van Den Bossche & Haemers, 1969) (Mohamed, et al., 2003), los fluorométricos (Baeyens & De Moerloose, 1977), la electroforesis capilar (Wu, et al., 1999), la cromatografía de gases (GC), con detección de captura de electrones (Tyndale & Inaba, 1990), la cromatografía de líquidos (LC) con detección ultravioleta-visible (UV/Vis) (Walter, et al., 1998), (Jain, et al., 2011) con detección electroquímica (Chang, et al., 1991) y de arreglo de diodos (Trabelsi, et al., 2002) (Titier, et al., 2003). Algunos métodos llegan a reportar límites de cuantificación de hasta 1 ng/mL, y los tiempos de análisis varían entre 5 y 25 minutos. Recientemente se han empleado técnicas de cromatografía de gases (GC) y líquidos (LC) acopladas a espectrometría de masas (MS). Los métodos analíticos para la cuantificación de haloperidol por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplados a espectrometría de masas (LC-MS) y a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), han reportado límites de cuantificación de hasta 0.1 ng/mL, con alta sensibilidad y selectividad además de tiempos de análisis incluso menores a 5 minutos. (Hoja, et al., 1997) (Arinobu, et al., 2002) (Yun, et al., 2005) (Singh & Sharma, 2005). Lo que hace de esta técnica una de las más apropiadas y confiables para la cuantificación de haloperidol en plasma.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico y grave, clasificado dentro del grupo de los trastornos psicóticos. Desde el punto de vista psicopatológico, es esencialmente un trastorno del pensamiento con manifestaciones en diferentes áreas como la del afecto, la percepción, la motivación, la conducta y la actividad motora. (Secretaría de Salud, 2009)

El término psicosis se refiere a un síndrome no específico caracterizado por delirio (creencias falsas), alucinaciones (percepciones sensoriales falsas no compartidas por otros), pérdida de contacto con la realidad y conducta extraña. Este síndrome puede ser el resultado de una amplia gama de enfermedades, que incluye los dos trastornos psiquiátricos principales la esquizofrenia y los trastornos relacionados con la esquizofrenia. (OMS, 2009)

El conocimiento de la esquizofrenia ha cambiado drásticamente en las últimas décadas. El descubrimiento del efecto antipsicótico de algunos fármacos a finales de la década de los años 50 del siglo pasado abrió la puerta a la investigación de la etiología neurobiológica de este trastorno. (Secretaría de Salud, 2009)

El término de esquizofrenia fue introducido por el psiquiatra suizo Bleuler en 1911, aunque este trastorno ya había sido caracterizado con anterioridad por Kraepelin en 1896, quien lo designó con el término: "demencia precoz", debido a que la mayoría de las personas afectadas sufrían deterioro cognitivo grave y del comportamiento en edades tempranas de la vida (antes de los 40 años de edad), de manera similar a las demencias experimentadas por las personas ancianas. (Kaplan, et al., 1996)

3.1.1 Epidemiología

La esquizofrenia es la psicosis primaria más común. Es un trastorno que empieza normalmente en la adolescencia; afecta más o menos por igual a ambos sexos, pero el comienzo tiende a ser más tardío en las mujeres, quienes también suelen tener una mejor evolución y desenlace. Las encuestas epidemiológicas notifican una

prevalencia puntual de 0.4%. La esquizofrenia afecta a alrededor de 7 por cada mil habitantes de la población adulta, la mayoría en el grupo de edad entre 15 y 35 años. Aunque la incidencia es baja (3-10,000), la prevalencia es alta debido a la cronicidad. (OMS, 2009)

Según cifras de la OMS, la esquizofrenia afecta a aproximadamente 24 millones de personas en todo el mundo. Se trata de un trastorno tratable y la terapia es más eficaz en sus etapas iniciales. Sin embargo, más 50% de las personas con esquizofrenia no reciben la atención adecuada y 90% de las personas con esquizofrenia no tratada se encuentran en países en desarrollo. (OMS, 2015)

En México son pocos los estudios epidemiológicos realizados sobre el tema de las enfermedades mentales, se cuenta con datos de que muestran que de 1996 al 2000, 34,813 personas demandaron este tipo de atención, con una clara tendencia al incremento de casos anuales de 54% ($p < 0.001$). Además, se observó que en el año 2000 el riesgo de padecer esquizofrenia fue 1.54 veces mayor en relación que en 1996. (Fraga, et al., 2010)

En cuanto a la mortalidad de la esquizofrenia, el suicidio y la lesión suponen el 30%-40% del exceso de mortalidad en los pacientes y también se estima que estos pacientes tienen una esperanza de vida más corta que la población en general, siendo la enfermedad cardiovascular la causa principal de muerte. Los propios fármacos antipsicóticos pueden incrementar el riesgo de enfermedades cardiovasculares en quienes reciben este tratamiento; este riesgo puede ser mayor con algunos psicóticos de segunda generación. (Buckley, 2009)

3.1.2 Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico de la esquizofrenia incluye diversos síntomas que se clasifican como se indica a continuación: (DSM-IV, 2000)

- a) Síntomas positivos. Se refiere a las alucinaciones, tales como escuchar voces, delirios paranoides, y percepciones exageradas o distorsionadas, creencias y comportamientos.

- b) Síntomas negativos. Consisten en una pérdida o disminución de la capacidad de iniciar planes, hablar, expresar emociones, o encontrar placer.
- c) Síntomas cognitivos. Estos síntomas incluyen discurso confuso y desordenado, problemas de memoria, problemas con el pensamiento lógico, y dificultad para prestar atención y tomar decisiones.

Los síntomas positivos parecen reflejar un exceso o distorsión de las funciones normales, mientras que los síntomas negativos parecen reflejar una disminución o pérdida de las funciones normales. (DSM-IV, 2000).

Los síntomas generalmente aparecen por primera vez en la edad adulta temprana. Los hombres a menudo experimentan síntomas alrededor de los 20 años de edad, mientras que las mujeres por lo general muestran los primeros signos de la enfermedad entre los 20 y los 30 años. (APA, 2015)

El curso de la esquizofrenia incluye remisiones y exacerbaciones, aunque en algunos pacientes persiste un estado psicótico grave. Los factores asociados a un mal pronóstico incluyen: un funcionamiento premórbido pobre, mayor duración de la psicosis no tratada, mayor gravedad de la enfermedad y mayor número de recaídas. (Ulloa, et al., 2011)

3.1.3 Clasificación de la esquizofrenia y subtipos

De acuerdo al Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV, 2000), editado por la Asociación Psiquiátrica Americana (APA), y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-IO, 1995) en su apartado de trastornos mentales y del comportamiento, la esquizofrenia se clasifica dentro de los trastornos psicóticos. Los subtipos particulares de esquizofrenia se basan en el cuadro clínico que motivó la evaluación o el ingreso y, por tanto, pueden cambiar con el tiempo. Los subtipos son:

- a) Tipo paranoide: consiste en la presencia de claras ideas delirantes o alucinaciones auditivas, en el contexto de una conservación relativa de la capacidad cognoscitiva y de la afectividad.

- b) Tipo desorganizado: se caracteriza por el lenguaje y el comportamiento desorganizados así como por la afectividad aplanada
- c) Tipo catatónico: se caracteriza por una alteración psicomotora marcada que puede incluir inmovilidad, actividad motora excesiva, negativismo extremo, mutismo, peculiaridades del movimiento voluntario, ecolalia o ecopraxia.
- d) Tipo indiferenciado: La característica es la presencia de síntomas positivos y negativos, pero que no cumplen los criterios para los tipos paranoide, desorganizado o catatónico.
- e) Tipo residual: presenta ausencia de ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje desorganizado y comportamiento catatónico o gravemente desorganizado y hay manifestaciones continuas de la alteración como síntomas negativos. (DSM-IV, 2000)

3.1.4 Tratamiento

El tratamiento de la esquizofrenia es complejo y requiere la utilización de terapias farmacológicas, además de un abordaje psicológico y programas de ayuda para la integración social y laboral del paciente, así como el uso de medicamentos antipsicóticos. (Fraga, et al., 2010)

3.1.4.1 Tratamiento psicosocial

El tratamiento psicosocial tiene como objetivos incrementar el conocimiento acerca de la enfermedad, promover la adaptación a la misma, mejorar el funcionamiento psicosocial, reducir la comorbilidad y prevenir las recaídas. Las estrategias para este tratamiento incluyen la psicoeducación, la psicoterapia y la rehabilitación, que se aplican en programas integrales de tratamiento. (Ulloa, et al., 2011)

En nuestro país, un estudio aleatorizado en pacientes adultos con esquizofrenia mostró que la combinación de farmacoterapia con un programa de tratamientos psicosociales incrementaba la adherencia al tratamiento, disminuía la gravedad de los síntomas y mejoraba el funcionamiento global de los pacientes, además de disminuir las recaídas. (Ulloa, et al., 2011)

3.1.4.2 Tratamiento farmacológico

En el caso de la esquizofrenia la meta del tratamiento antipsicótico es maximizar el restablecimiento funcional mediante la disminución de la gravedad de los síntomas positivos y su influencia en la conducta, mejorar los síntomas negativos, reducir la abstinencia social y aliviar la disfunción cognitiva. El tratamiento antipsicótico continuo reduce las tasas de recaída de un 80% en pacientes sin farmacoterapia, hasta aproximadamente un 15%. (Bruton, et al., 2012)

El gran avance en la investigación del tratamiento farmacológico de la esquizofrenia, ha permitido la disponibilidad y uso de nuevos y diferentes fármacos, los cuales se clasifican dentro de tres grupos básicos: antipsicóticos típicos, atípicos y agonistas parciales dopaminérgicos. Todos ellos actúan principalmente sobre los sistemas dopaminérgicos. En la práctica clínica los antipsicóticos se clasifican en: antipsicóticos de primera generación o convencionales, y antipsicóticos de segunda generación o atípicos (Tabla 1). (OMS, 2009)

Tabla 1. Clasificación de los antipsicóticos (OMS, 2009)

Primera generación				Segunda Generación	
Fenotiacinas	Butirofenonas	Difenilbutil piperidinas	Tioxantenos	Benzamidas sustituidas	Amisulprida Aripiprazol Clozapina Olanzapina Risperidona Quetiapina Sertindol Ziprasidona Zotepina
Clorpromazina					
Levomepromazina					
Promazina					
Periciazina	Haloperidol		Flupentixol		
Pipotiazina	Benperidol	Pimozida	Zuclopentixol	Sulpirida	
Flufenazina					
Perfenazina					
Proclorperazina					
Trifluoperazina					

De acuerdo con la Lista Modelo de los Medicamentos Esenciales de la OMS, los medicamentos esenciales para los trastornos psicóticos son la clorpromazina, la flufenazina (decanoato o enantato) y el haloperidol.

La Asociación Americana de Psiquiatría y la Society of Critical Care Medicine recomiendan el uso de haloperidol como agente de primera línea para el tratamiento del delirio (Mayer, et al., 2011). En México, el haloperidol es uno de los medicamentos de elección para el tratamiento de la esquizofrenia, tal como lo indica la Guía de Práctica Clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) para el Diagnóstico y Tratamiento de Esquizofrenia. (Secretaria de Salud, 2009)

3.2 Haloperidol

El haloperidol es un antagonista del receptor de dopamina D_2 , utilizado para el tratamiento de esquizofrenia aguda y crónica y otros trastornos psiquiátricos en todo el mundo. (Yun, et al., 2005)

3.2.1 Propiedades fisicoquímicas (Szczepanik, 1985) (Gennaro, 2003) (Jain, et al., 2011)

El haloperidol es una amina terciaria que pertenece a la serie de compuestos de derivados de la butifерona.

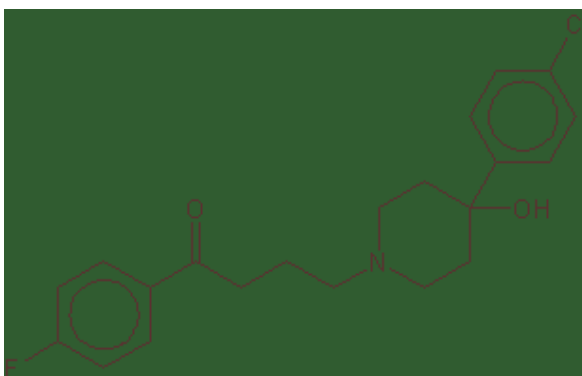


Figura 1. Estructura química del haloperidol

- Descripción: Polvo microcristalino o amorfo, blanco a débilmente amarillento; inodoro; sensible a la luz y no higroscópico.
- Nombre químico: 4-[4-(p-clorofenil)-4 - hidroxipiperidino]-4'-fluorobutirofenona]

- Fórmula molecular: $C_{21}H_{23}ClFNO_2$
- Peso molecular: 375.86g/mol
- Punto de fusión 149-153 °C
- pH: 2.8 a 3.6
- pKa: 8.3
- log P: 4.3
- Solubilidad: Es soluble en disolventes como el ácido acético glacial, cloroformo, benceno y alcohol, pero casi insoluble en agua (14 mg/L a 25 °C).

3.2.2 Clasificación biofarmacéutica

Con base a los datos disponibles, se incluye en los medicamentos que no podrían ser asignados a una clase específica del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, de acuerdo a los datos disponibles. El haloperidol tiene una solubilidad baja y una permeabilidad baja/alta a una dosis de 2 y 5mg, por lo que se podría encontrar en las clases II y IV, en este último caso debido a los efectos del metabolismo de primer paso. (Lindenberga, et al., 2004) (Wu & Benet, 2005)

3.2.3 Mecanismo de acción

Debido a su acción dopaminérgica central, el haloperidol está clasificado como un agente neuroléptico potente. El haloperidol bloquea de forma efectiva a los receptores dopaminérgicos en el mesocórtex y en el sistema límbico del cerebro. Es un antagonista de los receptores D_2 , pero también se puede unir a los receptores D_1 . Bloquea la acción dopaminérgica en las rutas nigroestriatales, lo cual podría explicar la alta frecuencia con la que aparecen efectos extrapiramidales-motores (disonias, pseudiparkinsonismo). Tiene propiedades antihistamínicas y anticolinérgicas menores al unirse a receptores H_{T_2} , H_1 de la histamina y a los receptores adrenérgicos α_2 en el cerebro por lo que se pueden presentar efectos adversos como los cardiovasculares y anticolinérgicos (hipotensión, boca seca o constipación), aunque son poco frecuentes comparados con neurolépticos menos potentes como la clorpromazina. En un proceso normal, la dopamina que es liberada de neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el mesencéfalo hasta el prosencéfalo, interacciona con receptores

postsinápticos de tipo D₁ y D₂ y con autoreceptores presinápticos D₂ y D₃. En el caso específico del receptor D₂, la dopamina permite a través del acoplamiento con proteínas Gi inhibir la adenilatociclase y con Gq la activación de la fosfolipasa C (vía PLC-IP₃-Ca⁺²); el haloperidol bloquea esta activación. (Bruton, et al., 2012) (Katzung, 2001)

3.2.4 Farmacocinética

Después de una administración oral, el haloperidol se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, pero el metabolismo hepático de primer paso disminuye su biodisponibilidad, la cual es de 40 a 75%. En el tiempo para alcanzar la concentración máxima en suero después de la administración por vía oral se ha observado una alta variabilidad (1.7 a 6.1 horas) así como en la vida media de eliminación (14.5 a 36.7 horas). Por vía intramuscular el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima es de 33.8 minutos y la vida media de eliminación es de 20 horas. El volumen aparente de distribución es de aproximadamente 20 L/kg, lo que concuerda con su alta lipofiliidad. Después de una administración por vía intravenosa las concentraciones séricas siguen un comportamiento bicompartimental. El haloperidol se distribuye en varios tejidos y tiene una unión extensa a proteínas (aproximadamente del 92%). La fracción libre del haloperidol en el plasma humano es de 7.5 a 11.6%. (Roh, et al., 2001) (Gennaro, 2003) (NIH, 2009)

3.2.5 Metabolismo

El haloperidol se metaboliza extensamente en el hígado, y solo 1% de la dosis administrada se excreta de forma inalterada en orina. Las vías de biotransformación han sido ampliamente caracterizadas ampliamente (Figura 2). Estas incluyen 1) glucuronidación del alcohol (entre 50-60%), ; 2) reducción del grupo carbonil por la carbonil reductasa citosólica; 3) oxidación de haloperidol reducido para formar nuevamente haloperidol; 4) N-desalquilación que conduce a la formación de 4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidina (CPHP); 5) deshidratación del alcohol a 4-(4-clorofenil)-1-[4-(4-fluorofenil)4-oxobutil]-1,2,3,6-tetrahidropiridina (HPTP); 6) oxidación de la fracción piperidin-4-ol del haloperidol que corresponde al metabolito 4-(4-clorofenil)-1-[4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil]-piridina (HPP+); y 7) oxidación del piperidin-4-ol del haloperidol reducido que corresponde al metabolito 4-(4-clorofenil)-1-[4-(4-fluorofenil)-

4-hidroxi[4-(4-clorofenil)butil]piridina(RHPP+). La formación de metabolitos por reducción y oxidación ocurre en un 23%, así como N-desalquilación y formación de metabolitos de piridinio entre 20-30%. (Kalgutkar, et al., 2003)

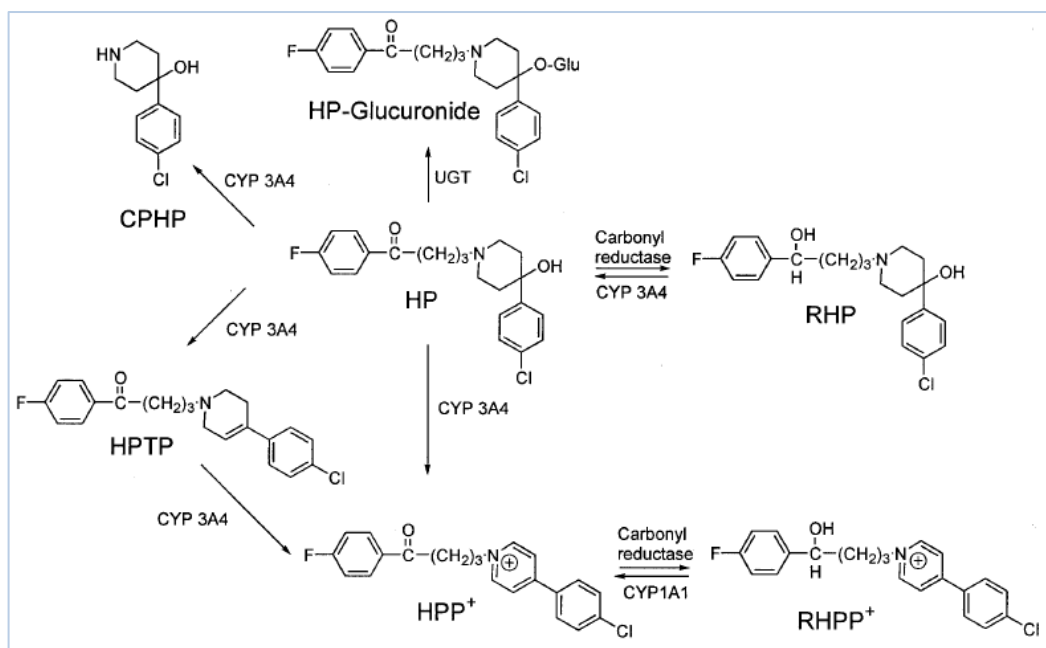


Figura 2. Biotransformación del haloperidol en humanos

El metabolito glucurónico es inactivo, mientras que el haloperidol reducido tiene efectos farmacológicos significativos (por ejemplo, de alta afinidad de unión a los sitios de unión a receptores opioides de tipo sigma y para los receptores de dopamina D₂ y D₃) Las concentraciones de haloperidol y haloperidol reducido parecen correlacionarse con la respuesta clínica y con los efectos adversos. (Brockmöller, et al., 2002)

Varios estudios señalan que el citocromo CYP2D6 participa en el metabolismo de haloperidol a CPHP, HPTP, y HPP+, mientras que otros reportes indican que esta vía es casi exclusivamente catalizada por CYP3A4 (Kalgutkar, et al., 2003). Algunos estudios han investigado la contribución del CYP2D6 en el metabolismo del haloperidol en voluntarios sanos y pacientes. Aunque datos de estudios *in vitro* sugieren una menor participación de CYP2D6 en la biotransformación de haloperidol en seres humanos, varios trabajos encuentran un efecto de la actividad de CYP2D6

sobre la farmacocinética del haloperidol. (Brockmöller, et al., 2002) (Panagiotidis et al. 2007) (Gassó et al. 2013)

La razón de la discrepancia entre las investigaciones *in vitro* e *in vivo* podría ser consecuencia del polimorfismo del CYP2D6 en el metabolismo del haloperidol; por ejemplo, se ha demostrado que existe una marcada diferencia interindividual entre los efectos adversos, síntomas extrapiramidales, y el fenotipo/genotipo metabolizador de CYP2D6. (Brockmöller, et al., 2002) (López, et al., 2004)

3.2.6 Dosis

El haloperidol puede administrarse por vía oral, intravenosa o intramuscular. Para el tratamiento de la esquizofrenia aguda se prefiere la vía intramuscular en dosis de 2 a 5mg, administrada cada 60 minutos hasta lograr el control de los síntomas psicóticos, para continuar con la terapia de mantenimiento a través de la administración por vía oral (0.75 a 15 mg al día). En el caso de una unidad de cuidados intensivos se administran de 1 a 2 mg de haloperidol por vía intravenosa cada 15 minutos hasta un máximo de 20 mg (Secretaria de Salud, 2009). Se ha demostrado que una dosis de haloperidol superior a 10 mg/día por lo general no es de beneficio adicional al tratamiento de la esquizofrenia aguda. Sin embargo, es importante mencionar que las variaciones interindividuales en la farmacocinética del haloperidol son considerables. (Brockmöller, et al., 2002)

3.2.7 Efectos adversos

La OMS en su publicación “Tratamiento farmacológico de trastornos mentales en la atención de salud” del año 2009 menciona los efectos adversos asociados al haloperidol (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos adversos asociados al haloperidol (OMS, 2009)

Efectos adversos frecuentes	Efectos adversos graves
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acatisia ▪ Efectos extrapiramidales distónicos ▪ Efectos extrapiramidales parkinsonianos ▪ Visión borrosa ▪ Estreñimiento ▪ Transpiración reducida ▪ Sequedad de boca ▪ Congestión nasal ▪ Mareos ▪ Somnolencia ▪ Hipotensión ortostática ▪ Fotosensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Discinesia tardía ▪ Distonía tardía ▪ Agranulocitosis ▪ Ictericia colestásica ▪ Síndrome neuroléptico maligno ▪ Íleo paralítico ▪ Alteraciones en el electrocardiograma (prolongación del intervalo QT) ▪ Crisis convulsivas ▪ Síndrome similar al lupus eritematoso sistémico ▪ Disfunción de los mecanismos de regulación de la temperatura.

Los efectos extrapiramidales son los más frecuentes, pudiendo aparecer en más de 60% de los pacientes, e incluyen: distonías (2-63%), acatisias (10-20%) y efectos parkinsonianos (temblor, rigidez y bradiscinesia), las manifestaciones clínicas de estos efectos se presentan en la tabla 3. Por lo anterior, una dosis del fármaco guiada a través de las concentraciones séricas puede ayudar a reducir el número de pacientes que sufren de tales efectos debido a sobredosis.

Alrededor de uno de cada cinco personas que recibieron haloperidol en los ensayos aleatorios sufrió algún tipo de distonía aguda; aproximadamente una de cada seis personas presentó acatisia, y una de cada tres personas sufrió pseudoparkinsonismo. (Irving, et al., 2012)

En la tabla 3 se describen los efectos neurológicos adversos más comunes asociados con el haloperidol, su manifestación, tiempo de inicio, mecanismo propuesto y posible tratamiento.

Tabla 3. Descripción de los efectos adversos neurológicos más comunes (Bruton, et al., 2012)

Reacción	Manifestación	Tiempo de inicio e información sobre el riesgo	Mecanismo propuesto	Tratamiento
Distonía aguda	Espasmo de músculos de la lengua, la cara, el cuello y el dorso	Tiempo: 1 a 5 días Quienes presentan más riesgo son los pacientes jóvenes que nunca han recibido antipsicóticos.	Antagonismo agudo de dopamina	Antiparkinsonianos
Acatisia	Inquietud subjetiva; "agitación"	Tiempo: 5 a 60 días	Desconocido	Reducir o cambiar de fármaco; clonazepam, propranolol más eficaz que antiparkinsonianos
Parkinsonismo	Bradiscinesia, rigidez, temblores variables, facies de máscara, marcha arrastrante	Tiempo: 5 a 30 días Los ancianos tienen más riesgo	Antagonismo de dopamina	Reducción de la dosis; cambiar medicación; antiparkinsonianos
Síndrome maligno neuroléptico	Rigidez extrema, fiebre, presión arterial inestable, mioglobinemia; puede ser mortal	Tiempo: semanas-meses Puede persistir por días después de suspendido el medicamento	Antagonismo de dopamina	Suspender de inmediato antipsicóticos; cuidados de apoyo; dantroleno y bromocriptina
Temblores periorales ("síndrome del conejo")	Temblores periorales (puede ser una variante tardía del parkinsonismo)	Tiempo: meses o años de tratamiento	Desconocido	Antiparkinsonianos
Discinesia tardía	Discinesia bucofacial, raras veces coreoatetosis o distonía generalizada.	Tiempo: meses o años de tratamiento. Ancianos con riesgo cinco veces mayor	Supersensibilidad de receptor dopamina postsináptico, regulación por incremento.	Puede ser reversible con el reconocimiento oportuno y la suspensión de fármaco. La prevención es crucial.

3.2.8 Indicaciones, contraindicaciones y precauciones

El haloperidol está indicado en la esquizofrenia aguda y crónica, en el trastorno esquizoafectivo, en la fase maniaca del trastorno bipolar, en las depresiones con síntomas psicóticos, en la demencias, en el síndrome confesional agudo (delirium), en el síndrome de Gilles de la Tourette y en las psicosis secundarias a patologías neurológicas. (Gómez, et al., 2008)

Este fármaco está contraindicado en los siguientes casos: alteración de la conciencia por depresión del SNC, depresión de médula ósea, feocromocitoma, porfiria y enfermedad de los ganglios basales. Se debe tener precaución en: enfermedad cardiovascular y vascular cerebral, enfermedad respiratoria, parkinsonismo, epilepsia,

infecciones agudas, gestación y lactancia, alteración renal y hepática, antecedente de ictericia, leucopenia, hipotiroidismo, miastenia *gravis*, hipertrofia prostática, glaucoma de ángulo cerrado; también en hemorragia subaracnoidea y alteraciones metabólicas como hipopotasemia, hipocalcemia o hipomagnesemia y también en grupos de edad avanzada, niños y adolescentes. Es importante evitar la retirada brusca; los pacientes deben permanecer en supino y hay que vigilar la presión arterial durante 30 minutos tras la inyección intramuscular. (OMS, 2004)

3.2.9 Interacciones con otros medicamentos

En la tabla 4 se mencionan los fármacos con los cuales el haloperidol tiene interacciones; en algunos casos, la interacción es potencialmente peligrosa y la administración simultánea de los fármacos implicados debería evitarse, o sólo administrarse con precaución y una vigilancia adecuada. Las demás interacciones no suelen tener consecuencias graves. (OMS, 2004) (Besag & Berry, 2006)

Tabla 4. Interacciones del haloperidol con otros fármacos

Fármacos	Efecto de la interacción
Ácido valproico Fenitoína*	Antagoniza el efecto anticonvulsivante (reduce el umbral convulsivo)
Alcohol Clonacepam Diacepam	Potencia el efecto sedante
Amitriptilina*	Aumenta la concentración plasmática de amitriptilina; puede aumentar el riesgo de arritmias ventriculares
Carbamazepina*	Antagoniza el efecto anticonvulsivante (reduce el umbral convulsivo); se acelera el metabolismo del haloperidol (disminuye la concentración plasmática)
Clomipramina*	Aumenta la concentración plasmática de clomipramina; posibilidad de aumento del riesgo de arritmias ventriculares
Codeína Morfina	Potencia los efectos hipotensor y sedante
Dopamina Efedrina Epinefrina Isoprenalina	Antagonismo de la acción en la presión
Enalapril Éter* (anestésico) Halotano* Ketamina* Nifedipina Óxido nitroso Tiopental* Verapamilo	Potencia el efecto hipotensor
Etosuximida*	Antagonismo (reduce el umbral convulsivo)
Fenobarbital*	Antagoniza el efecto anticonvulsivante (reduce el umbral convulsivo); acelera la metabolización del haloperidol (disminuye la concentración plasmática)
Levodopa*	Antagonismo de los efectos de la levodopa
Litio	Aumenta el riesgo de efectos extrapiramidales y la posibilidad de neurotoxicidad
Metildopa	Potencia el efecto hipotensor; aumenta el riesgo de efectos extrapiramidales
Metoclopramida	Aumenta el riesgo de efectos extrapiramidales
Procainamida* Quinidina*	Aumenta el riesgo de arritmias ventriculares
Rifampicina*	Acelera el metabolismo del haloperidol (reduce la concentración plasmática de haloperidol)
Ritonavir*	La concentración plasmática de haloperidol puede verse aumentada

* Interacciones potencialmente peligrosas

3.2.10 Productos comerciales

En la tabla 5 se indican los productos comerciales disponibles en México que contienen haloperidol como principio activo. (COFEPRIS, 2008)

Tabla 5. Productos comerciales disponibles que contienen haloperidol

Nombre comercial	Laboratorio	Forma farmacéutica	Concentración/ Presentación
DUFREN	PSICOFARMA	Solución inyectable	5 mg/mL
HALOBAX	BAXTER	Tabletas	5 mg
HALOPERIL	PSICOFARMA	Tabletas	5 mg y 10 mg
HISPADOL	Farmacéutica Hispanoamericana	Tabletas	5 mg y 10 mg
KEPSIDOL	KENER	Tabletas	5 mg
PERIDOL	PROTEIN	Tabletas	5 mg
PULSIT	KENER	Solución inyectable	5 mg/mL
TRENPE	PISA	Solución inyectable	5 mg/mL

3.3 Monitoreo terapéutico de haloperidol

Mientras que los principales avances en el manejo farmacológico de las enfermedades psiquiátricas se han producido en las más reciente décadas, las altas tasas de cumplimiento deficiente y una considerable variabilidad genética en el metabolismo de agentes psicotrópicos, han ocasionado que la aplicación práctica de estos tratamientos se dificulte. Una herramienta que permite minimizar tales problemas ha sido el uso del monitoreo terapéutico (MT). (Mitchell, 2000)

El MT permite al médico ajustar la dosis de un fármaco de acuerdo a las características individuales del paciente. Ante la existencia de una relación entre la concentración plasmática de un fármaco y los efectos terapéuticos y adversos, el MT permite alcanzar una máxima eficacia terapéutica con efectos adversos mínimos (respuesta farmacoterapéutica eficaz y segura). En el caso del haloperidol, el grupo experto en el MT de fármacos AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmacologie und Pharmakopsychiatrie) lo clasifica como un fármaco altamente recomendado para MT. Existe evidencia del intervalo terapéutico de este fármaco gracias a la información obtenida a través de estudios clínicos controlados, en los cuales se ha demostrado que a concentraciones plasmáticas terapéuticas existen altas probabilidades de respuesta por parte del paciente, mientras que ante

concentraciones plasmáticas subterapéuticas la respuesta es similar a la del placebo, y a concentraciones por arriba del límite superior del intervalo terapéutico, hay un aumento en el riesgo de que aparezcan efectos adversos. (Baumann, et al., 2004) (Hiemke, et al., 2011) Se ha determinado que una ocupación de receptores D₂ por haloperidol en el estriado mayor al 78% se relaciona con la aparición de efectos adversos, y la ocupación del receptor se relaciona significativamente con los niveles plasmáticos de este fármaco. Estudios concuerdan que dosis altas se asocian con una mayor incidencia de efectos extrapiramidales. (Kapur, et al., 2000)

El monitoreo terapéutico del haloperidol es altamente recomendable dada la posibilidad de que se presenten interacciones con otros fármacos, la variabilidad en la farmacocinética, además del estrecho intervalo terapéutico que presenta. Para el haloperidol, el monitoreo terapéutico busca alcanzar el intervalo terapéutico que va de 5 a 17 ng/mL. Concentraciones menores a los 5 ng/mL podría conducir a una falta de respuesta terapéutica, mientras que con concentraciones superiores a los 17 ng/mL podría aumentar el riesgo de aparición de efectos adversos. (Genta, et al., 1999) (Mitchell, 2000)

3.4 Métodos analíticos para el monitoreo terapéutico

La práctica de monitoreo terapéutico de fármacos requiere la orquestación de varias disciplinas, incluyendo la farmacocinética, la farmacodinamia, y el análisis cuantitativo de muestras biológicas en el laboratorio. Es importante establecer objetivos analíticos en el monitoreo terapéutico mediante la determinación de la naturaleza del problema a resolver, la selección de la matriz apropiada para la cuantificación del fármaco y la metodología para resolver el problema. De igual forma, es necesario el desarrollo de esquemas analíticos válidos, que se realicen de manera competente con la calidad apropiada con el fin de que puedan ser interpretados dentro del marco del problema. (Ghiculescu, 2008) (Kang & Lee, 2009)

La validación de los métodos analíticos se está convirtiendo en una consideración universalmente importante. La industria farmacéutica ha realizado un esfuerzo a nivel mundial con el fin de armonizar los conceptos utilizados en la validación. Resulta

crítico garantizar la exactitud y especificidad de los ensayos utilizados por el laboratorio para la medición de la concentración de fármaco en suero. Históricamente, los laboratorios de análisis de fármacos desarrollaron sus procedimientos de ensayo usando una variedad de métodos analíticos partiendo de radioinmunoensayos hasta HPLC u otras técnicas. (Kang & Lee, 2009)

3.5 Validación de métodos bioanalíticos

El término validación se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado. La validación de métodos bioanalíticos es crucial para cuantificar a los fármacos y/o sus metabolitos durante los estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos así como en los estudios clínicos. En estos métodos se debe demostrar que a través de ellos se puede detectar y/o cuantificar la molécula en la matriz biológica de interés. Para ello, se deben cumplir con al menos los siguientes parámetros: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad y estabilidad. (NOM-177-SSA1-2013) (FDA, 2013)

Actualmente, la NOM-177-SSA1-2013 es la norma que precisa los requerimientos para validar un método bioanalítico en México estableciendo las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, y el apartado 9 se refiere a la validación de métodos bioanalíticos. Sin embargo, existen otros documentos que pueden contribuir a la validación, como es el caso de la guía de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos.

En la tabla 6 se comparan los parámetros a evaluar entre la NOM-177-SSA1-2013 y la guía de validación de la métodos bioanalíticos de la FDA.

Tabla 6. Comparación entre la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de la FDA

Parámetro	NOM-177-SSA1-2013		GUIA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS 2013, FDA	
	Condiciones de la prueba	Criterios de aceptación	Condiciones de prueba	Criterios de aceptación
Selectividad	Evaluación individual de al menos 6 unidades de matriz biológica (normal, lipémica y hemolizada). Considerar posibles interferencias (Ej.: fármacos de uso común o metabolitos)	Respuesta analítica de la interferencia próxima al tiempo de retención debe ser <20% del LIC del analito y <5% para el EI.	Se analiza muestras blanco de la matriz biológica obtenidas de al menos 6 fuentes. Considerar posibles interferencias (Ej.: fármacos de uso común o metabolitos)	No deben de presentarse interferencias. La interferencia se compara y asegura con el límite inferior de cuantificación.
Efecto de la matriz para métodos de espectrometría de masas	Analizar 6 muestras blanco extraídas de matriz, adicionadas con el analito y EI en solución.	Para cada unidad se debe de obtener un FMN. El %CV del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe de ser mayor que el 15%.		En el caso de procedimientos basados en LC-MS/MS, las medidas apropiadas deben ser adoptadas para garantizar la falta de efectos de la matriz en toda la aplicación del método.
Efecto de acarreo para métodos de espectrometría de masas	Realizar al menos 3 inyecciones de la misma muestra blanco, una antes y dos después de una inyección del LSC.	Respuesta analítica de la interferencia próxima al tiempo de retención debe ser <20% del LIC del analito y <5% para el EI.		
Límite de cuantificación	Concentración más baja, por quintuplicado.	Se incluye dentro de las pruebas de exactitud y precisión. % CV ≤ 20% % desviación ≤ 20%	Concentración más baja, por quintuplicado.	La respuesta del analito en el límite de cuantificación debe ser de al menos 5 veces la respuesta del blanco. El pico del analito debe de ser identificable y reproducible. % CV ≤ 20%, exactitud dentro del 20% de la concentración nominal.
Curva de calibración	Caracterizar por lo menos 6 concentraciones distintas en el intervalo establecido. Definir modelo matemático para relación concentración respuesta. Evaluar mínimo 3 curvas de calibración.	La relación concentración/respuesta debe de ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo. Concentración recuperada entre ±15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, para el LIC puede ser ±20%.	Caracteriza al menos 6 concentraciones distintas que cubran el intervalo esperado, incluir LIC. Definir un modelo matemático simple para la relación concentración respuesta.	El 15% de desviación de la concentración nominal y 20% de desviación para el LIC..
Precisión Repetibilidad	Analizar en un mismo día por quintuplicado LIC, MCB, MCM, MCA y MCD.	El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, y para el LIC del 20%.		El CV% no debe ser mayor que el 15%, y para el LIC del 20%. La precisión se subdivide en:
Precisión Reproducibilidad	Analizar por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD.	El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, y para el LIC del 20%.	Analizar por quintuplicado al menos 3 niveles de concentración.	- Precisión de repetición (una sola serie de análisis) - Precisión de repetibilidad (mide la precisión con el tiempo, y puede implicar diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios).
Exactitud	De los de repetibilidad y reproducibilidad calcular	El valor promedio del % de desviación no debe ser	Analizar por quintuplicado al menos	El valor promedio de los datos debe estar dentro

Tabla 6 (continuación). Comparación entre la NOM-177-SSA1-2013 y la Guía de la FDA

	la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación)	mayor que el 15%, y para el LIC del 20%.	3 niveles de concentración.	del $\pm 15\%$ del valor nominal y para el LIC hasta dentro del $\pm 20\%$.		
Estabilidad	Evaluar por triplicado la respuesta del analito de las concentraciones MCB y MCA, después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones de ensayo:	La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.	Evaluar por triplicado la respuesta del analito de las concentraciones baja y alta.			
	Estabilidad a corto plazo: A temperatura y tiempo de procesamiento de las muestras.		Estabilidad a corto plazo (sobre la mesa): Cubrir las condiciones de manipulación de laboratorio que se esperan para las muestras.			
	Estabilidad a largo plazo: Mantener a las condiciones y por el tiempo de almacenamiento de las muestras.		Estabilidad a largo plazo: Condiciones de almacenamiento por un tiempo igual o superior al tiempo entre la fecha de la primera toma de muestras y la fecha del último análisis de la muestra.			
	Estabilidad de la muestra procesada: Muestra procesada bajo condiciones de almacenamiento.		Estabilidad muestra procesada: Se analiza muestras procesadas bajo condiciones de almacenamiento, y también se incluye el tiempo de residencia en el inyector automático.			
	Estabilidad en el automuestreador: Muestra procesada a temperatura del inyector o automuestreador.		Estabilidad de ciclos congelación-descongelación: Mínimo 3 ciclos de congelación-descongelación (imitar las condiciones de manipulación de muestras)			
	Estabilidad de ciclos congelación-descongelación: Congelación de las muestras por 12h, descongelarlas a Tamb y volver a congelar 12h, al menos 3 ciclos.		Estabilidad en solución: Analizar al menor una muestra por triplicado de una solución de referencia principal y de una solución de trabajo, por un tiempo igual o mayor al de almacenamiento.		Las soluciones serán consideradas estables si la desviación si la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que el 10%.	Estabilidad en solución: Analizar soluciones stock del fármaco y el estándar interno. Justificar la duración de los valores de la soluciones stock almacenadas.
Recobro			Comparación de los resultados analíticos de las muestras extraídas a tres concentraciones (bajo, medio y alto) con estándares no extraídos que representan una recuperación del 100%.	Recuperación de la sustancia analizada no tiene que ser 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del estándar interno debe ser consistente, preciso y reproducible.		

FMN: Factor matriz normalizado, LIC: Límite inferior de cuantificación, MCB: Muestra control bajo, MCM: Muestra control media, MCA: Muestra control alta, MCD: Muestra control diluida, Tamb: Temperatura ambiente.

La validación de métodos bioanalíticos cuyo objetivo sea la determinación cuantitativa de los fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos juega un papel significativo en la evaluación e interpretación de farmacocinética, farmacodinamia, toxicología, biodisponibilidad y bioequivalencia y la comparabilidad estudios. Es vital garantizar la generación de datos de alta calidad durante el descubrimiento y desarrollo de fármacos, la validación asegura que la cuantificación del analito o analitos en los fluidos biológicos es reproducible, fiable y adecuada para su uso y aplicación. (Viswanathan , et al., 2007) (Shah, 2007). También es importante enfatizar que cada técnica analítica tiene sus propias características, que pueden variar de analito a analito y en estos casos, puede ser necesario desarrollar para cada analito, especificaciones de criterios de validación. Por otra parte, la adecuación de la técnica también puede ser influida por el objetivo del estudio. (Viswanathan , et al., 2007)

3.6 Métodos analíticos para la cuantificación de haloperidol en plasma que han sido publicados

En la siguiente tabla se resume información de métodos analíticos por cromatografía de líquidos acoplados a espectrometría de masas empleados para la cuantificación de haloperidol en plasma.

Tabla 7. Métodos analíticos LC-MS para la cuantificación del haloperidol en plasma

Referencia	Técnica, Ionización	Analitos, Transición haloperidol	Extracción	Fase móvil, flujo	Columna	% Recobro HAL	Límites de detección
(Hoja, et al., 1997)	LC-MS/MS, ESI	HAL HR 376.2→165 5 m/z	Líquido-líquido Hexano: alcohol isoamílico (99:1 v/v) Cambio de pH básico-ácido-básico, 3 extracciones	Formiato de amonio 2mM: ACN (55:45 v/v; pH 3) 50µl/min	Nucleosil® C18 5µm 150 x1mm	58%	0.050ng
(Arinobu, et al., 2002)	LC-MS, ESI	HAL HR CPHP 376.0 m/z	Sin extracción, o pretratamiento. A la muestra se le adiciona fase móvil	Gradiente H ₂ O destilada con 0.09 % de ácido fórmico y acetato de amonio 20 mM (fase A) por 5 min, después gradiente de 100% a 20% de fase A (80% fase B; acetonitrilo) por 20 minutos. 0.3mL/min	Columna polimérica MSpak GF-310 4B®, 4.6x50 mm (Showadenko)	64.4-76.1%	5-10 ng
(Yun, et al., 2005)	LC-MS, ESI	HAL 376.3 m/z	Líquido-líquido pH básico Hexano: alcohol isoamílico (99:1 v/v)	Gradiente Acetato de amonio 0.04M (A) y metanol (B). 60% B a 0min 80% B a 15 min 100% B de 25 a 32 min. 0.4mL/min	Bondapak® C18 3.9 x 150 mm	NR	0.05 ng
(Singh & Sharma, 2005)	LC-MS, ESI	HAL 375.9 m/z	Líquido-líquido Hexano: diclorometano 70:30 v/v	Acetato de amonio 1mM pH 3: acetonitrilo 70:30 v/v 0.2 mL/min	Xterra MS® C18 3.5 µm 2.1x100 mm mantenida a 40°C	90%	0.7 ng
(Juenke, et al., 2013)	UPLC-MS/MS, ESI	HAL Tiotixeno, Flupenazina Perpenazina 376.18→165.06 m/z	NA Solución de precipitación acetonitrilo:metanol 50:50 v/v	Gradiente H ₂ O (0.1 % de ácido fórmico): acetonitrilo 70% H ₂ O en 1 min 55% H ₂ O a 1.3 min 10% H ₂ O a 1.55 min 0.65mL/min	Waters Acquity UPLC HSS T3® 1.8 µm, 2.1x50 mm, a 25°C	96-101%	1 ng

HAL: Haloperidol, HR: Haloperidol reducido, CPHP: 4-(4-clorofenil)-4-hidroxi piperidina, NR: No registrado

3.7 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares (y atómicas) según su masa. El principio básico de la MS es la generación de iones a partir de cualquiera de los compuestos inorgánicos u orgánicos por algún método adecuado, para separar estos iones por su relación de masa/carga (m/z) y para detectarlos cualitativamente y cuantitativamente por sus respectivos m/z y abundancia. (Pavia, et al., 2009)

3.7.1 Espectrómetro de masas

En su forma más simple, el espectrómetro de masas tiene cinco componentes (Figura 3). El primer componente del espectrómetro de masas es la entrada de la muestra cuyo objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrómetro de masas. La entrada de la muestra puede ser por sonda directa o por sistemas cromatográficos como lo son cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC) o incluso electroforesis capilar (CE) cuando se busca analizar una mezcla compleja. Un hecho característico del espectrómetro de masas es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener baja presión, la cual va desde unos pocos milímetros de mercurio en una fuente de ionización química hasta unos pocos micrómetros de mercurio en el analizador de masas y regiones del detector. Posteriormente la muestra es conducida a la fuente de iones, en donde las moléculas de la muestra se transforman en iones en fase gaseosa. Los iones son acelerados por un campo electromagnético. A continuación, el analizador de masas separa los iones de la muestra en función de su relación m/z . Finalmente los iones, se cuentan por el detector, el cual convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y registrada por el sistema de datos, obteniéndose un gráfico donde se observa los iones detectados en función de su relación m/z . (Pavia, et al., 2009)

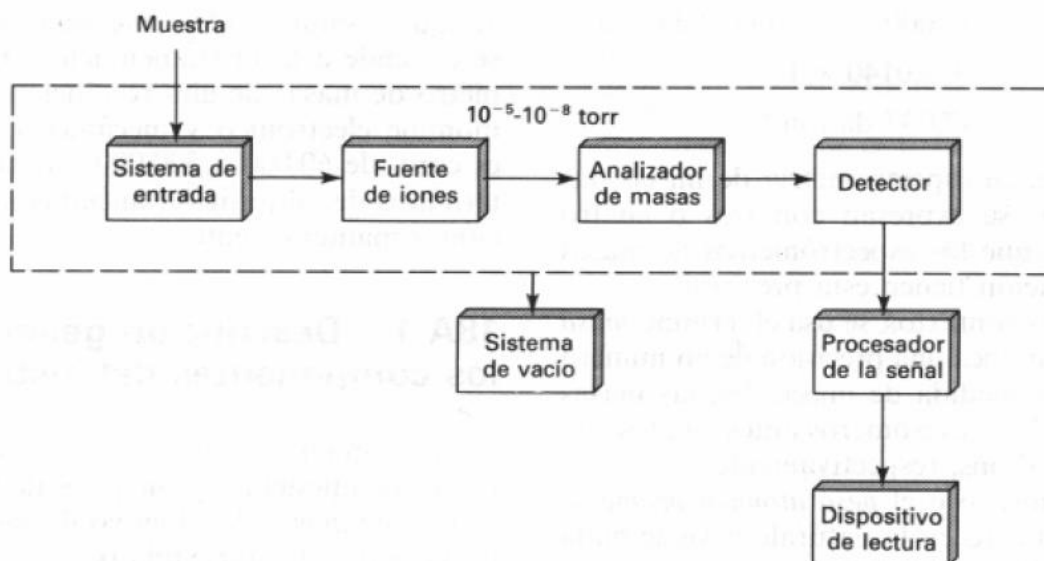


Figura 3. Componentes del espectrómetro de masas

3.7.2 Espectrometría de masas acoplado a cromatografía de líquidos (LC/MS)

El acoplamiento de MS a técnicas cromatográficas siempre ha sido deseable debido a la naturaleza sensible y altamente específica de la MS en comparación con otros detectores cromatográficos. Primero se realizó el acoplamiento de MS a GC y después a LC gracias a al desarrollo de la fuente de iones por electropray (ESI), la cual es compatible con la corriente líquida continua del cromatógrafo. (Pitt, 2009)

La cromatografía de líquidos se utiliza para compuestos que no son volátiles. En espectrometría de masas existe la necesidad de eliminar el disolvente de elución. Para hacer frente a este problema, se utilizan diferentes métodos; entre éstos se puede mencionar aquellos dispositivos que vaporizan selectivamente el disolvente de elución antes de que entre a la fuente de ionización o aquellos que permiten reducir el flujo del líquido que se introduce en la interfaz con el fin de obtener un flujo que se pueda bombear directamente a la fuente. Estos flujos se pueden obtener con la utilización de columnas capilares en HPLC o con columnas clásicas fraccionando el flujo hacia el detector y los desechos. Además las fuentes de ionización como ESI, ionización química a presión atmosférica (APCI) o fotoionización, pueden tolerar caudales de alrededor de 1 mL/min sin necesidad de una división de flujo. (Hoffmann & Strooband, 2007)

La técnica de LC-MS se puede aplicar a una amplia gama de moléculas biológicas; además, el uso de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y la utilización de isótopos estables como estándares internos, permiten desarrollar ensayos altamente sensibles y precisos, aunque en algunos métodos se requiere la optimización para minimizar los efectos de la matriz. (Pitt, 2009)

La técnica de MS/MS resulta en una mejor especificidad, proporcionando fragmentos moleculares característicos (huellas dactilares) generados por una disociación del ion molecular, en un proceso que se llama disociación inducida por colisión (CID). La alta especificidad de la detección MS/MS hace posible la separación de los compuestos de interés de sus posibles interferencias por LC, lo cual también conduce a un ahorro importante del tiempo de análisis. Además, la técnica de MS/MS puede medir múltiples iones o transiciones para determinar diversos fármacos de manera simultánea. Sin embargo, la LC-MS/MS tiene sus propias limitaciones debido a que estos equipos requieren una gran inversión de capital inicial y la necesidad de analistas altamente capacitados para operar de manera adecuada y mantener los sistemas. (Yang & Wang, 2008)

Existen varias tecnologías disponibles tanto para la ionización como para el análisis de los iones, lo que da como resultado diferentes tipos de espectrómetros de masas con combinaciones distintas de estos dos procesos. En la práctica, algunas configuraciones son mucho más versátiles que otras, y en las siguientes descripciones se aborda la fuente de iones ionización por electrospray por ser la utilizada en la realización este proyecto y analizadores de masas susceptibles de ser utilizados en los sistemas de LC-MS.

3.7.3 Fuente de ionización : Ionización por electrospray (ESI)

En 1980 Fenn desarrolló la técnica de ESI como una fuente de iones robusta y capaz de acoplarse con LC, y demostró su aplicación en un número importante de moléculas. La ESI funciona bien con moléculas moderadamente polares y es por tanto muy adecuada para el análisis de muchos metabolitos, xenobióticos y péptidos.

Las muestras líquidas se bombean a través de un capilar de metal que se mantiene a de 3 a 5 kV, y es nebulizada en la punta del capilar para formar una fina pulverización de gotitas cargadas. El capilar es generalmente ortogonal a la entrada del espectrofotómetro de masas, o fuera del eje de dicha entrada con el fin de minimizar la contaminación. El aerosol se inicia en una “tensión de inicio” que, para una fuente dada, depende de la superficie de las gotitas; cuando se rompe la tensión superficial, la forma de la gota cambia a un "cono de Taylor" y de esta forma aparece el aerosol. Las gotitas se evaporan rápidamente por la aplicación de calor y nitrógeno, y la carga eléctrica residual en las gotas se transfiere al analito. Los analitos ionizados se transfieren entonces en el alto vacío del espectrómetro de masas a través de una serie de pequeñas aberturas y voltajes (Figura 4). La fuente de iones y la óptica de iones posteriores pueden funcionar para detectar iones positivos o negativos, y se puede cambiar entre estos dos modos dentro de una serie de análisis. (Gaskell, 1997) (Hoffmann & Strooband, 2007) (Pitt, 2009)

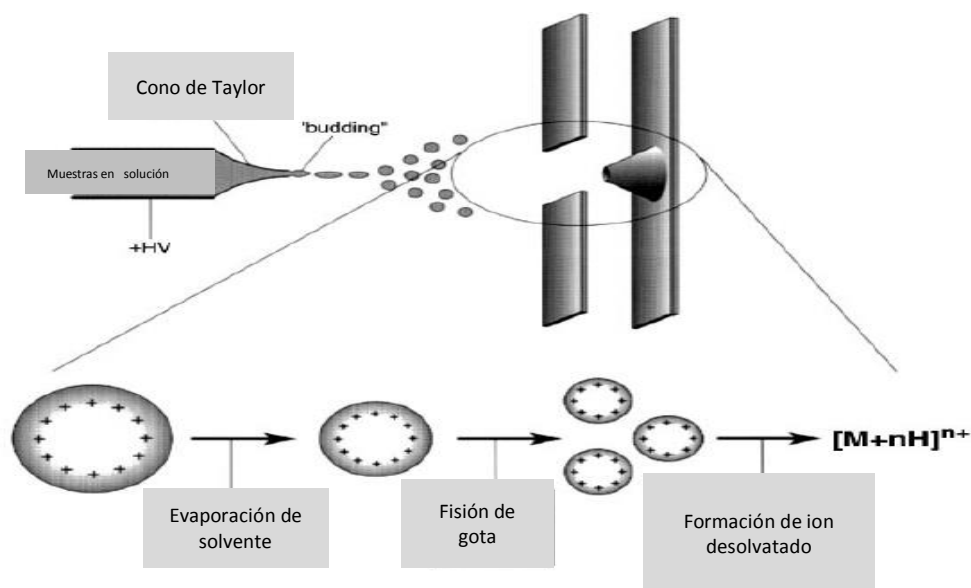


Figura 4. La producción de gotas en la interfaz de electrospray (Gaskell, 1997)

Además de la técnica ya mencionada, existen otras fuentes de ionización con una gran variedad de aplicaciones, la siguiente tabla las menciona estas fuentes y el evento con el cual realizan la ionización.

Tabla 8. Resumen de las fuentes de ionización y el evento que sucede para ionizar. (Chiu & Muddiman, 2008)

Fuente de ionización	Evento
Ionización por electrospray (ESI)	Evaporación de gotas cargadas
Ionización por nanoelectrospray (nanoESI)	Evaporación de gotas cargadas
Ionización química a presión atmosférica (APCI)	Descarga de corona y la transferencia de protones
Desorción por láser asistida por matriz (MALDI)	Absorción de fotones/ Transferencia de protones
Desorción/ionización en silicón (DIOS)	Absorción de fotones/ Transferencia de protones
Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Desorción de iones / Transferencia de protones
Ionización eléctrica (EI)	Rayo de electrones / Transferencia de electrones
Ionización química (CI)	Transferencia de protones

3.7.4 Analizadores

Una vez que se han producido los iones en fase gaseosa, éstos deben ser separados de acuerdo con sus masas. La propiedad física de los iones que se mide por un analizador de masas es su relación de masa-carga (m/z) en lugar de su masa sola. Como hay una gran variedad de fuentes, se han desarrollado varios tipos de analizadores de masas (Tabla 5). De hecho, la separación de iones de acuerdo con su proporción de masa-carga se puede basar en principios diferentes. Todos los analizadores de masas utilizan campos eléctricos y magnéticos estáticos o dinámicos que pueden ser solos o combinados; la mayoría de las diferencias básicas entre los diversos tipos de analizadores de masas consisten en la manera en que se utilizan estos campos para conseguir la separación. (Hoffmann & Strooband, 2007)

Tabla 9. Tipos de analizadores usados en espectrometría de masas

Tipo de analizador	Símbolo	Principio de separación
Sector eléctrico	E ó ESA	Energía cinética
Sector magnético	B	Impulso (momentum)
Cuadrupolo	Q	m/z (trayectoria de estabilidad)
Trampa iónica	IT	m/z (frecuencia de resonancia)
Tiempo de vuelo	TOF	Velocidad (tiempo de vuelo)
Transformada de Fourier de resonancia ciclotrón de iones	FTICR	m/z (frecuencia de resonancia)
Transformada de Fourier Orbitrap	FT-OT	m/z (frecuencia de resonancia)

A continuación, se describirá brevemente dos de los analizadores más comunes: trampa de iones y cuadrupolo.

a) Trampa iónica

Los analizadores de trampa de iones utilizan tres electrodos hiperbólicos para atrapar iones en un espacio tridimensional mediante el uso estático de radiofrecuencia y voltajes. Los iones son entonces expulsados secuencialmente de la trampa sobre la base de sus valores de m/z para crear un espectro de masas.

Alternativamente, un ion específico se puede aislar en la trampa por la aplicación de una tensión de excitación, mientras que el resto de los iones es expulsado. Se puede introducir un gas inerte en la trampa para inducir la fragmentación. Una característica interesante de estos analizadores es la capacidad para fragmentar y aislar iones varias veces en sucesión antes de obtener el espectro final. (Pitt, 2009)

b) Cuadrupolo

El analizador de tipo cuadrupolo es un dispositivo que utiliza la estabilidad de las trayectorias en los campos eléctricos oscilantes para separar a los iones de acuerdo con sus relaciones m/z . El analizador cuadrupolo consta de un conjunto de cuatro varillas paralelas (Figura 6). La combinación de voltajes constantes y variables (radio frecuencia) permite la transmisión de una banda estrecha de valores de m/z a lo largo del eje de las varillas. La aplicación de voltaje a cada par de barras opuestas así como de una radiofrecuencia, posibilita un control de la trayectoria de los iones. Mediante la variación de los voltajes con el tiempo, es posible explorar una gama de

valores de m/z , lo que resulta en un espectro de masas. Los iones pueden ser fragmentados a través de colisiones con un gas inerte tal como el nitrógeno o el argón, en un proceso llamado disociación inducida por colisión. Una celda de colisión es un cuadrupolo que ha sido diseñado para mantener una presión baja del gas de colisión, necesaria para la disociación y así transmitir la mayor parte de los fragmentos de iones que se producen. Una configuración particularmente útil del espectrómetro de masas se obtiene por la colocación de una celda de colisión entre dos analizadores de masas de cuadrupolo. Esta combinación se llama un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y es un ejemplo de MS en tándem (MS/MS), en el que dos o más etapas de análisis de masas se aplican de forma independiente (Figura 6). La ventaja de MS/MS es el gran aumento en la especificidad del análisis sobre el análisis de MS en una etapa. (Hoffmann & Strooband, 2007) (Pitt, 2009)

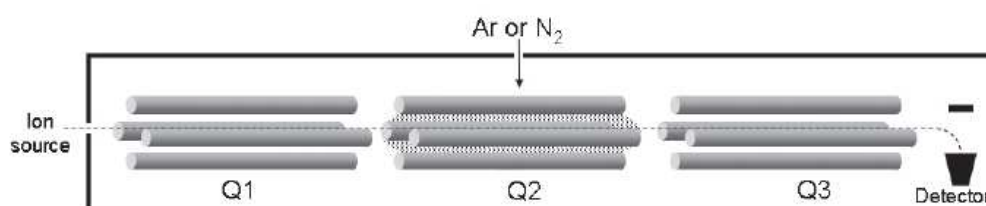


Figura 5. Espectrómetro de masas triple cuadrupolo. Q1 y Q3 actúan como filtros de masas y se pueden fijar de forma independiente. Q2 es una celda de colisión que contiene un gas inerte a baja presión

c) Analizadores híbridos

Se han desarrollado MS en tándem que utilizan combinaciones de diferentes analizadores. Dos configuraciones que son particularmente útiles para LC-MS se describen a continuación. El tercer cuadrupolo de un cuadrupolo triple MS puede ser sustituido por un analizador de TOF para producir un espectrómetro híbrido de tiempo de vuelo y cuadrupolo (QTOF). Los instrumentos QTOF se han utilizado ampliamente en el campo de la proteómica, pero son más limitados en sus funciones de escaneo que los instrumentos de triple cuadrupolo. También es posible diseñar instrumentos en los que el tercer cuadrupolo funciona en un modo diferente, donde los iones son

atrapados y luego expulsados secuencialmente sobre la base de sus valores m/z . Esto se conoce como una trampa de iones lineal y la configuración general se refiere a menudo como un instrumento QTrap. El cuadrupolo final puede ser conmutado entre el modo de trampa de iones y el modo convencional del cuadrupolo por lo que el instrumento combina características útiles de ambos analizadores. Cuando se utiliza en modo de trampa de iones, la sensibilidad en barrido de iones se mejora considerablemente, y la fragmentación adicional puede ser inducida dentro de la trampa de iones permitiendo una etapa adicional de fragmentación y análisis de masas. (Pitt, 2009)

3.7.5 Detectores

Los iones pasan a través del analizador de masas y luego se detectan y se transforman en una señal utilizable por un detector. Los detectores son capaces de generar una corriente eléctrica a partir iones incidentes, la cual es proporcional a su abundancia. Actualmente existen varios tipos de detectores. La elección del detector depende del diseño del instrumento y las aplicaciones analíticas que van a realizarse, ya que es posible emplear una variedad de enfoques que se utilizan para detectar los iones. Sin embargo, la detección de iones se basa siempre en su carga, su masa o su velocidad. Algunos detectores se basan en la medición de la corriente de carga directa que se produce cuando un ion golpea una superficie y se neutraliza (copa de Faraday). Otros (se basan en la transferencia de energía cinética de los iones incidentes por la colisión con una superficie que a su vez genera electrones secundarios, que se amplifican aún más para dar una corriente electrónica electromultiplicador o detectores de iones electro-ópticos). Los progresos en la espectrometría de masas han dado lugar a la aparición de nuevas fuentes de ionización y analizadores que permiten el estudio de los analitos con muy alta masa molecular. (Hoffmann & Strooband, 2007)

3.7.6 Consideraciones para LC-MS

Las fuentes de iones actuales son capaces de manejar una amplia gama de flujos y composiciones de fase móvil para separaciones por LC, y a menudo pueden ser acopladas directamente al espectrómetro de masas. Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar la calidad de los datos de MS y una cierta modificación de la separación por LC puede ser deseable para mejorar el rendimiento del ensayo. En el caso del flujo, ESI generalmente puede manejar flujos de hasta 1 mL/min, pero caudales más bajos de 0.05 a 0.2 mL/min resultan en una mejora en la sensibilidad. Las columnas con 1.0 o 2.1 mm de diámetro son muy adecuadas para el acoplamiento directo a MS además la disminución en el consumo de fase móvil es un beneficio secundario útil. (Annesley, 2007) (Pitt, 2009)

Con respecto a la fase móvil, los disolventes típicos utilizados en LC de fase reversa y normal (por ejemplo, agua, acetonitrilo, metanol, etanol, cloroformo) son compatibles con ESI. Cabe señalar que la calidad del disolvente (incluyendo agua) que es adecuado para una separación por LC convencional no siempre puede ser adecuado para una separación por LC-MS. Por ejemplo, en HPLC-UV el disolvente puede ser transparente a UV, pero puede contener trazas de compuestos que afectan a la calidad de las mediciones de LC-MS. Se debe evitar el uso de soluciones amortiguadoras que contengan iones inorgánicos tales como fosfato y acetato de sodio ya que causan supresión iónica significativa, puede crear aductos de sodio y potasio, y pueden contaminar rápidamente la fuente de ionización. Éstas han sido sustituidas por soluciones amortiguadoras que son más compatibles con MS, tales como las basadas en acetato de amonio, formiato de amonio o bicarbonato de amonio. Aun así, estas soluciones pueden causar supresión iónica, por lo que la concentración del amortiguador debe ser la mínima necesaria para producir una separación cromatográfica satisfactoria. En LC convencional con detección UV se requiere de una separación adecuada de los picos cromatográficos del analito debido a la naturaleza no específica del detector, especialmente cuando se usan longitudes de onda por debajo de 250 nm. En contraste, si los picos tienen señales independientes como lo es en MS, la separación cromatográfica completa no es indispensable. Por lo tanto, la resolución mejora y se pueden utilizar columnas más

cortas en ensayos de LC-MS, lo que en consecuencia disminuye los tiempos de análisis, aunque los efectos de supresión iónica puede ser una limitante. (Annesley, 2007) (Pitt, 2009)

3.7.7 Efecto de la matriz

La detección de LC-MS/MS ha demostrado ser una técnica potente de elección para la determinación cuantitativa de fármacos y metabolitos en fluidos biológicos. Sin embargo, el aumento en la selectividad al utilizar LC-MS/MS ha sido cuestionada debido a la supresión o incremento en la ionización causado por la matriz de la muestra y/o las interferencias de los metabolitos. El impacto de los efectos de la matriz en la exactitud, la precisión y en la robustez de los métodos bioanalíticos es de creciente preocupación en la industria farmacéutica. El efecto de la matriz se produce cuando el analito o analitos de interés coeluyen con componentes de la matriz alterando la eficacia de la ionización en la interfaz del electrospray. El efecto es el resultado de la competencia entre los componentes de la matriz no volátiles y los iones del analito por el acceso a la superficie de la gota para la transferencia a la fase de gas.

El efecto de la matriz es causado por numerosos factores, incluyendo a los fosfolípidos endógenos, entre otros compuestos, y los modificadores de la fase móvil. Además, diferentes fuentes de plasma de la misma especie pueden producir diferentes resultados en la validación del método, en parámetros tales como la pendiente de la curva de calibración y la precisión. Es necesario llevar a cabo experimentos adicionales a los parámetros de validación normalmente previstos para métodos bioanalíticos con el fin de demostrar la ausencia de efecto de la matriz de "lote a lote" o de "muestra a muestra" y confirmar así la selectividad del método. Los documentos de orientación actuales tanto de la FDA como de la NOM-177-SSA1-2013 en México, indican la evaluación de éste parámetro como parte del desarrollo y validación de métodos bioanalíticos por LC-MS/MS. (Chambers, et al., 2007) (Kang, 2012)

Debido a que los efectos de la matriz por lo general pueden derivarse de los compuestos endógenos extraídos de la matriz de la muestra, existe la posibilidad de eliminarlos a través de dos maneras. Las condiciones cromatográficas se pueden optimizar para separar el pico del analito del pico de la matriz que causa la supresión/incremento de iones, y/o se puede mejorar la limpieza de la muestra. Por ejemplo, los efectos de matriz podrían ser eliminados cambiando el método de preparación de la muestra, precipitado de proteínas, o bien, modificando el método de la extracción, por ejemplo, se puede optar por un procedimiento de extracción en fase sólida. La dilución de la muestra puede ser otra manera de reducir los efectos de la matriz. El incremento o supresión de la ionización por la presencia de compuestos exógenos o de otros analitos en los procedimientos con múltiples analitos por lo general requiere la modificación del sistema cromatográfico o al menos la calibración independiente para cada analito. (Patel, 2001)

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del amplio uso del haloperidol como antipsicótico, en México no existe información acerca de la relación entre los niveles plasmáticos y la respuesta terapéutica en pacientes del área de psiquiatría. El intervalo terapéutico que se ha propuesto para el haloperidol es de 5 a 17 ng/mL. Las concentraciones plasmáticas menores a los 5 ng/mL podrían estar asociadas a una falta de respuesta terapéutica, mientras que las concentraciones superiores a los 17 ng/mL podrían aumentar el riesgo de aparición de efectos adversos. (Genta, et al., 1999) (Mitchell, 2000) (Baumann, et al., 2004)

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” se lleva a cabo el monitoreo terapéutico de fármacos como fenitoina, valproato y carbamazepina, sin embargo este no es el caso del haloperidol, por lo que con la perspectiva de establecer la relación entre los niveles plasmáticos de este fármaco y la respuesta terapéutica, es necesario contar con un método analítico confiable, selectivo y sensible que pueda garantizar la monitorización.

5 HIPÓTESIS

Si se cuenta con un método analítico preciso, exacto y selectivo será factible la cuantificación en plasma de haloperidol en muestras de pacientes psiquiátricos.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de haloperidol en plasma por medio de LC-MS/MS para la posterior aplicación clínica en el monitoreo terapéutico.

6.2 Objetivos específicos

- I. Establecer las condiciones de ionización del haloperidol así como seleccionar el ion fragmento idóneo para la cuantificación del fármaco.
- II. Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de haloperidol.
- III. Elegir un estándar interno para el análisis del haloperidol.
- IV. Seleccionar el método de extracción con el cual se obtenga mayor recobro del haloperidol contenido en plasma.
- V. Validar el método analítico de acuerdo a las especificaciones establecidas por la NOM-177.
- VI. Aplicar el método analítico en muestras de plasma de pacientes bajo tratamiento con haloperidol.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material, reactivos, instrumentos y equipos

7.1.1 Sustancias de referencia

- Haloperidol (HAL) estándar de referencia (donado por farmacéutica PISA[®])
- Carbamazepina (CBZ) estándar secundario (Sigma Aldrich[®], USA)

7.1.2 Materiales

- Tubos de ensayo de vidrio de 16x100 mm
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 16x100 mm
- Pipetas pasteur de vidrio
- Micropipetas de 200 y 1000 μ L (Biohit[®])
- Puntas para micropipetas
- Repipeteador Multipette plus (Eppendorf[®])
- Punta para repipeteador Multipette plus
- Vasos de precipitado de 100 y 250 mL
- Matraces volumétricos de 10 y 500 mL
- Probetas de 50 y 100 mL

7.1.3 Consumibles cromatográficos

- Microviales
- Camisas para microviales
- Membranas de filtración 0.45 μ m (Millipore[®])
- Sistema de filtración para disolventes HPLC
- Columna cromatográfica Eclipse XDB C18 3.5 μ m 2.1 x 100 mm (Agilent[®])
- Precolumna Hypersil ODS C18 5 μ m de 4 x 10 mm (ThermoScientific[®])

7.1.4 Reactivos

- Agua grado HPLC (Milli Q[®])
- Metanol, grado HPLC (J.T. Baker[®])
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC (Riedel-de Haën[®])
- Éter iso-propílico, GR (J.T. Baker[®])

- Acetato de amonio $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Fermont)
- Ácido fórmico CH_2O_2 (Fluka)
- Fosfato de sodio Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich)
- Plasma humano proveniente del banco de sangre del INNN, con pruebas serológicas negativas a: Anti T Cruzi ELISA, ANTI-VIH + 2 ELISA, Ags HB ELISA, ANT-VHC ELISA, ANTI-T Pallidum ELISA y rastreo de anticuerpos irregulares. Filtrado antes de ser utilizado con papel filtro Whatman del No. 4 y después por el No. 42.

7.1.5 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas-masas (MS/MS) AB Sciex 3200 QTRAP
- Vórtex vertical multipulso (Glas-Col)
- Centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Evaporador con corriente de N_2 y baño maría (Thermolyne)
- Ultracongelador REVCO a $-70^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (Kendro Laboratory Products)
- Potenciómetro (Beckman)
- Baño de ultrasonido (Branson)

7. 2 Preparación de soluciones

▪ **Acido fórmico 0.1 N**

Se tomaron 385 μL de ácido fórmico (pureza 98%) y se transfirieron a un matraz de 100 mL. Se aforó con agua grado HPLC.

▪ **Hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N**

Se pesaron 2.06 g de NaOH (pureza 97%) y se colocaron en un matraz volumétrico de 250 mL. Se aforó al volumen con agua HPLC.

▪ **Solución amortiguadora de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 5 mM, pH=6**

Se pesaron 193.7 mg de acetato de amonio (pureza 99.5%) y se colocaron en una matraz volumétrico de 500 mL; se aforó al volumen con agua HPLC. Después se transfirió a un vaso de precipitado de 500 mL y se ajustó a pH 6 en un potenciómetro con ácido fórmico 0.1 N.

- **Solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 0.5 M, pH=10.7**
Se pesaron 7.1 g de Na_2HPO_4 y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL. Se llevó al volumen con agua grado HPLC y se ajustó el pH con NaOH 0.2N.
- **Fase móvil ACN: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM, pH=6 (90:10 v/v)**
Para preparar 500 ml de fase móvil, se mezclaron 450 mL de ACN con 50 mL de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM pH 6.
- **Preparación de soluciones stock**
 - Solución stock haloperidol (HAL): se pesó 1 mg de HAL el cual se disolvió en metanol grado HPLC y se aforó a 10mL con el mismo disolvente (Concentración 100000 ng/mL).
 - Solución stock de carbamazepina (CBZ, estándar interno, EI): se pesaron 10 mg de CBZ los cuales se disolvieron en metanol grado HPLC y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente (Concentración de 1mg/mL).
- **Soluciones estándar de HAL**
 - Solución estándar 1 (10 000 ng/mL): de la solución stock se tomó 1mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
 - Solución estándar 2 (1000 ng/mL): de la solución estándar 1 se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
 - Solución estándar 3 (100 ng/mL): de la solución estándar 2 se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
- **Soluciones estándar de CBZ**
 - Solución estándar 1 (100 000 ng/mL): de la solución stock de 1 mg/ml se tomó 1mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
 - Solución estándar 2 (10 000 ng/mL): de la solución estándar 1 se tomó 1mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
 - Solución estándar 3 (500 ng/mL): de la solución estándar 2 se tomaron 0.5 mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.
 - Solución estándar 4 (200 ng/mL): de la solución estándar 2 se tomaron 0.2 mL y se aforó a 10 mL con metanol grado HPLC.

- **Preparación de la curva de calibración de HAL en solución**

Con base en los intervalos de concentraciones plasmáticas reportados en pacientes en estudios de monitoreo terapéutico, se propuso el intervalo de trabajo para la curva de calibración de 1 a 40 ng/mL. En la tabla 10 se muestra su preparación.

Para la primera dilución se utilizaron las soluciones estándar de HAL 2 y 3.

Tabla 10. Preparación de curva de calibración de HAL (primera dilución)

ID	Concentración inicial [HAL] (ng/mL)	Alícuota de la solución de HAL (µL)	Alícuota fase móvil (µL)	Concentración final [HAL] (ng/mL)
C1	100	100	900	10
C2	100	200	800	20
C3	1000	50	950	50
C4	1000	100	900	100
C5	1000	150	850	150
C6	1000	200	800	200
C7	1000	300	700	300
C8	1000	400	600	400

Fase móvil: ACN: CH₃COONH₄ 5mM (sin ajuste de pH) 90:10 v/v

Tabla 11. Preparación de curva de calibración de HAL en plasma (segunda dilución)

ID	Concentración inicial [HAL] (ng/mL)	Alícuota de la solución de HAL (µL)	Alícuota de plasma (µL)	Concentración final [HAL] (ng/mL)
C1	10	100	900	1
C2	20	100	900	2
C3	50	100	900	5
C4	100	100	900	10
C5	150	100	900	15
C6	200	100	900	20
C7	300	100	900	30
C8	400	100	900	40

Tabla 12. Preparación de muestras control (primera dilución)

ID	Concentración inicial [HAL] (ng/mL)	Alícuota de la solución de HAL (μ L)	Alícuota fase móvil (μ L)	Concentración final [HAL] (ng/mL)
MCB	100	300	700	30
MCM	1000	180	820	180
MCA	1000	350	650	350

MCB: Muestra control baja, MCM: Muestra control media, MCA: Muestra control alta
Fase móvil: ACN:CH₃COONH₄ 5mM (sin ajuste de pH) 90:10 v/v

Tabla 13. Preparación de muestra control (segunda dilución)

ID	Concentración inicial [HAL] (ng/mL)	Alícuota de la solución de HAL (μ L)	Alícuota de plasma (μ L)	Concentración final [HAL] (ng/mL)
MCB	30	100	900	3
MCM	180	100	900	18
MCA	350	100	900	35

MCB: Muestra control baja, MCM: Muestra control media, MCA: Muestra control alta

7.3 Desarrollo y optimización del método analítico para cuantificar HAL en plasma humano

Tomando como punto de partida las condiciones cromatográficas previamente reportadas en la literatura y la experiencia en el laboratorio donde se desarrolló este proyecto, se desarrolló el método analítico para la cuantificación de HAL en plasma humano. Para ello se evaluaron las siguientes condiciones:

7.3.1 Selección de condiciones para espectrometría de masas

Se realizó un proceso de optimización de los parámetros del instrumento para lograr la mejor sensibilidad y desempeño del espectrómetro de masas (tuning) para el ion molecular del HAL y el EI. Este procedimiento se llevó a cabo por medio de la infusión directa al detector de una solución de HAL de 100 ng/mL o CBZ de 100 ng/mL en metanol. Asimismo, se realizó un escaneo con el fin de obtener el patrón de fragmentación de cada uno de los analitos con el fin de identificar al fragmento

mayoritario que permitiera una mejor detección. Una vez establecido el fragmento mayoritario, se determinó la energía de colisión óptima.

7.3.2 Selección de las condiciones cromatográficas

Se evaluaron y establecieron las condiciones del sistema cromatográfico; tales como la columna cromatográfica, composición de la fase móvil y flujo.

- a. Columna: La selección de la columna estuvo orientada a la elección de la mejor opción de trabajo con el fin de lograr una separación cromatográfica adecuada. Se evaluó la respuesta del HAL en las siguientes columnas cromatográficas:
 - Eclipse Plus C18, 4.5 x 150 mm 5 µm (Agilent)
 - Eclipse XDB C18 2.1 x 100 mm 3.5 µm (Agilent)
- b. Fase móvil: Debido a la naturaleza básica de la molécula de HAL se evaluaron soluciones amortiguadoras de formiato de amonio y acetato de amonio a concentraciones de 5 mM, las cuales son adecuados para la ionización por espectrometría de masas por ser volátiles, en diferentes proporciones con acetonitrilo. (Dolan, 2012)

7.3.3 Estándar interno (EI)

Debido a que el estándar interno es útil para asegurar la confiabilidad de los resultados, es importante que tenga un comportamiento similar al del analito tanto en el procedimiento de extracción como durante el análisis. La selección del estándar interno estuvo basada en aquel que presentara recobro constante, tiempo de retención corto, buena ionización y respuesta constante a las condiciones establecidas. Se evaluó a los fármacos lamotrigina y carbamazepina como posibles estándares internos.

7.3.4 Selección del método de extracción

Como se aprecia en literatura (Tabla 7), la mayoría de los casos el tratamiento de la muestra biológica para la cuantificación del HAL en la mayoría de los casos consisten en métodos de extracción líquido-líquido por lo que se tomó como opción por ser un procedimiento simple, accesible y económico en comparación con otros procedimientos como la extracción en fase sólida. Los disolventes de extracción

evaluados fueron éter isopropílico, hexano:diclorometano en proporción 70:30 (v/v) y alcohol iso-propílico. (Singh & Sharma, 2005) (Jain, et al., 2011)

7.4 Procedimiento de extracción

El procedimiento de extracción se muestra en el siguiente diagrama:

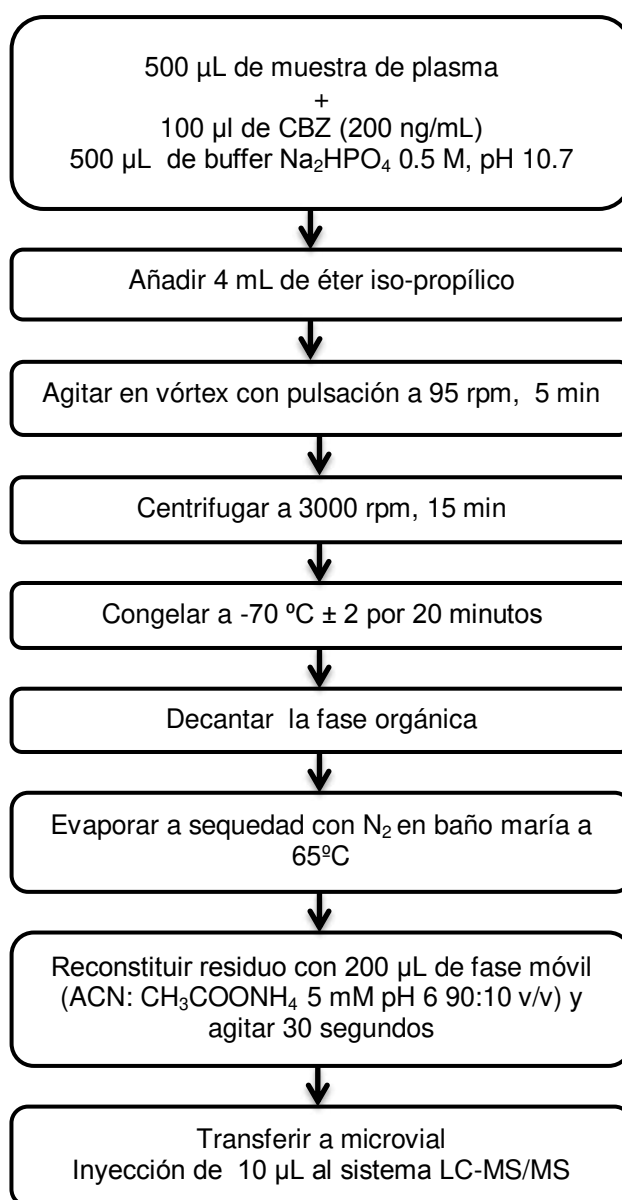


Figura 6. Diagrama de flujo del método de extracción de HAL en plasma

7.5 Condiciones espectrometría de masas

Tabla 14. Condiciones de espectrometría de masas dependientes del flujo

Parámetro	Valor
Curtain gas	45
Collision gas	Medium
IonSpray voltaje	5500
Source temperature	500 °C
Ion source gas 1 (GS1)	35.0
Ion source gas 2 (GS2)	32.0

Tabla 15. Condiciones de espectrometría de masas dependientes del analito

Compuesto	Ion precursor m/z	Ion fragmento m/z	Declustering Potencial (volts)	Collision Energy (volts)	Entrance Potencial (volts)	Collision Exit Potencial (volts)
Haloperidol (HAL)	376.0	165.0	48.0	32.0	8.0	6.0
Carbamazepina (CBZ)	237.1	194.1	43.0	22.0	4.0	3.0

Fuente de ionización: Turbo spray en modo positivo, donde los iones serán monitoreados por Multiple Reaction Monitoring (MRM).

7.6 Condiciones cromatográficas

Tabla 16. Condiciones cromatográficas

Parámetro	Condición
Columna	Eclipse XDS-C18 3.5 µm 2.1x100 mm (Agilent)
Precolumna	Hypersil ODS C18 5 µm de 4 x 10 mm
Fase móvil	ACN: CH ₃ COONH ₄ 5 mM pH 6(90:10 v/v)
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Temperatura de columna	Temperatura ambiente
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de análisis	4 min
Respuesta medida	Área relativa (área analito/área estándar interno)

7.7 Adecuabilidad del sistema

Al inicio de cada corrida analítica inyectó por quintuplicado la solución correspondiente a la concentración de 10ng/mL de HAL en solución, elegida por ser una concentración intermedia que no sature el sistema y que tenga buena respuesta. El sistema se considera adecuado si cumple con los siguientes criterios:

Tabla 17. Parámetros para adecuabilidad del sistema

Parámetro	Criterio
Área de pico HAL	CV < 7%
Relación área HAL/CBZ	CV < 7%
Tiempo de retención	CV < 2%, 2 min ± 15 segundos

7.8 Validación del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma

Para evaluar la confiabilidad de método se siguieron los lineamientos que marca la NOM-177-SSA1-2013 los cuales son: selectividad, efecto de la matriz, efecto de acarreo, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y estabilidad.

7.8.1 Selectividad

La selectividad del método se determinó analizando diferentes muestras de la matriz biológica, las cuales fueron:

- Muestras blanco de plasma humano de 6 voluntarios diferentes
- Muestras blanco de plasma obtenidas de la mezcla de los plasmas de los 6 voluntarios
- Muestras de plasma humano hemolizado
- Muestras de plasma humano lipémico
- Muestras de plasma humano adicionadas con fármacos concomitantes como lo fueron: amitriptilina, fluoxetina y valproato de magnesio.

Criterios de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor del 20% para el límite inferior de cuantificación (LIC) del analito y del 5% para el EI.

7.8.2 Efecto de la matriz para métodos por espectrometría de masas

Para analizar el efecto de la matriz se prepararon por sextuplicado muestras blanco de plasma normal, plasma hemolizado y plasma lipémico. Posteriormente se les adicionó el HAL y el EI en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente. Esta determinación se realizó con la MCB y la MCA.

Para cada unidad se obtuvo un factor de matriz normalizado (FMN) por el estándar interno, conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{\left[\frac{\text{Respuesta del analito en la matriz}}{\text{Respuesta del estándar interno en la matriz}} \right]}{\frac{\text{Respuesta del analito en la solución}}{\text{Respuesta del estándar interno en la solución}}}$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación (CV) del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe de ser mayor al 15%.

7.8.3 Efecto de acarreo

Se realizaron 3 inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de la inyección del límite superior de cuantificación (LSC).

Criterios de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor del 20% para el LIC del analito y del 5% para el EI.

7.8.4 Curva de calibración

Para determinar la linealidad del método se preparó por triplicado la curva de calibración de HAL en el rango de concentración de 1 a 40 ng/mL así como el blanco de plasma y el blanco con EI.

Las muestras se procesaron de acuerdo al método propuesto y se inyectaron. Para cada curva de calibración se determinó el área de la respuesta del HAL y EI, se estableció el modelo matemático a utilizar para establecer la relación concentración-respuesta. Se calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Para cada uno de los puntos se calculó la concentración recuperada y se obtuvo el porcentaje de desviación respecto a la concentración nominal.

Criterio de aceptación: Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben de estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el LIC ya que éste puede ser menor o igual al 20%. El coeficiente de correlación para cada curva deber ser igual o mayor a 0.99.

7.8.5 Precisión

a. Repetibilidad

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado las siguientes muestras: LIC, MCB, MCM, MCA. Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración y se calculó promedio, desviación estándar y el %CV. El coeficiente de variación se calculó con la siguiente formula:

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

Criterio de aceptación: El %CV del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto en el LIC, el cual deber ser menor o igual al 20%.

b. Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado en tres días diferentes, las muestras control (MCB, MCM y MCA) y el LIC dentro del intervalo establecido. Para cada muestra control se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración, con ello se calculó el promedio, la desviación estándar y el CV % para cada nivel de concentración utilizando los datos de los 3 días de análisis.

Criterio de aceptación: El %CV del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto en el LIC, el cual deber ser menor o igual al 20%.

7.8.6 Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal (% desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

Criterio de aceptación: El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto en el LIC, el cual deber ser menor o igual al 20%.

7.8.7 Límite inferior de cuantificación (LIC)

El LIC se estableció como la menor concentración cuantificable por el sistema con el método analítico desarrollado con precisión y exactitud.

Criterio de aceptación. Concentración que permita cuantificar al HAL en plasma dentro de los niveles esperados en el monitoreo terapéutico de este fármaco.

Su validación se encuentra dentro de las pruebas de exactitud y precisión, el LIC es evaluado junto con las muestras control.

7.8.7 Estabilidad de las muestras

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el HAL permanece estable en plasma, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico. Para documentar la estabilidad del HAL se llevaron a cabo las siguientes pruebas: estabilidad a corto y largo plazo, en muestras procesada, en automuestreador, en ciclos de congelación-descongelación y en solución.

Las respuestas de las muestras control se interpolaron en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas fueron comparadas contra la concentración nominal y además contra las muestras control de referencia (recién preparadas). Se determinó las condiciones de temperatura y tiempo en la que el HAL permanece estable en plasma.

$$\% \text{ desviación} = \left[\frac{\text{Concentración prueba} - \text{Concentración nominal o de referencia}}{\text{Concentración nominal o de referencia}} \right] \times 100$$

Donde la *concentración prueba* es el promedio de la concentración de las muestras sometidas a la condición de estabilidad de cada nivel de concentración, la *concentración nominal* es el valor teórico y la *concentración referencia* es la concentración promedio obtenida de las muestras preparadas el día del análisis (recién preparadas).

Criterio de aceptación: La concentración promedio obtenida de cada nivel de concentración debe de estar dentro del 15% de la concentración nominal.

a. Estabilidad a corto plazo

Se prepararon por triplicado dos series de las muestras control MCB y MCA (3 y 35 ng/mL). Una de las series fue procesada inmediatamente y fue considerada como las 0 horas (muestra de referencia). La otra serie se mantuvo sobre la mesa de trabajo, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Terminado este tiempo se procesó de igual manera que la primera serie.

b. Estabilidad a largo plazo

Se prepararon las muestras control de concentración baja y alta por triplicado cada una. Dichas muestras fueron almacenadas durante un periodo de 30 días en el ultracongelador a $-70^{\circ}\text{C} \pm 2$. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se descongelaron y se analizaron. Las muestras se compararon con muestras control de referencia.

c. Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon las muestras control de concentración baja y alta por triplicado cada una. Dichas muestras fueron almacenadas durante un periodo de 48 horas en refrigeración a $0^{\circ}\text{C} \pm 2$. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se analizaron y se compararon con muestras control de referencia.

d. Estabilidad en el automuestreador

Se prepararon dos series de las muestras control de concentración baja y alta por triplicado. Las dos series se reconstituyeron, una serie se inyectó inmediatamente a un tiempo cero (muestras de referencia), la segunda serie se mantuvo en el automuestreador por 2 h a temperatura ambiente.

e. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se preparó una serie de las muestras control de concentración baja y alta por triplicado

Esta serie se almacenó en congelación a -70°C por 24 h. Después de este tiempo se descongelaron las muestras temperatura ambiente (1er ciclo). Posteriormente se volvieron a almacenar a -70°C por otro periodo de 24 h hasta completar tres ciclos. El día del análisis se preparó una segunda serie que serviría de referencia.

f. Estabilidad en solución

Se inyectaron por triplicado las siguientes soluciones de HAL: la solución estándar 1 de referencia principal (mayor concentración) de 10000 ng/mL y la solución estándar 3 de trabajo (menor concentración) de 100 ng/mL, las cuales fueron almacenadas durante 2 meses en refrigeración a $0^{\circ}\text{C} \pm 2$ con protección contra la luz. De igual manera para el estándar interno (CBZ) se seleccionaron las soluciones estándar 1 y 4 (100000 ng/ml y 200 ng/mL) las cuales fueron almacenadas por 8 meses en refrigeración a $0^{\circ}\text{C} \pm 2$. El valor promedio de las respuestas analíticas de las soluciones en estudio se comparó con el valor promedio obtenido por el análisis por triplicado de las soluciones recién preparadas.

Todas las soluciones seleccionadas se evaluaron a una dilución apropiada (20 ng/mL para HAL y 100 ng/mL para CBZ) teniendo en cuenta la linealidad del método.

Criterio de aceptación: Las soluciones son consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no es mayor que 10%.

7.8.8 Recobro

El recobro de las muestras plasmáticas se evaluó comparando la respuesta de las concentraciones MCB y MCA en plasma preparadas por quintuplicado, contra la respuesta de blancos de plasma adicionados con soluciones de la misma concentración.

El porcentaje de recobro de cada nivel de concentración se calculó comparando el promedio de las respuestas obtenido de las muestras extraídas con la respuesta obtenida en los blancos adicionados con solución.

$$\%Recobro = \left(\frac{\text{Promedio de área de muestras extraídas de plasma}}{\text{Promedio de área de blancos cargados con solución}} \right) \times 100$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100%, pero debe ser constante y reproducible. (FDA, 2013)

7.9 Aplicación del método en la clínica

El método analítico para la cuantificación de HAL en plasma por LC-MS/MS se aplicó en muestras reales de pacientes del INNN proporcionadas por el laboratorio de Neuropsiquiatría experimental del mismo Instituto, las cuales fueron tomadas en pacientes con diagnóstico de algún tipo de esquizofrenia tratados con haloperidol a la dosis terapéutica recomendada. La toma de muestra se realizó en el estado estacionario.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo del método analítico para cuantificar HAL en plasma humano

8.1.1 Condiciones de espectrometría de masas

Se establecieron las condiciones óptimas de ionización dependientes del flujo y del HAL, posteriormente se evaluó la fragmentación del ion molecular del HAL, encontrando que el ion fragmento más abundante y estable fue el correspondiente a la transición $376 \rightarrow 165$ m/z (Figura 7); esta transición corresponde a la reportada por Hoja et al., y Juenke et al., para la cuantificación de HAL (Tabla 7). Las condiciones óptimas se muestran en las tablas 18 y 19.

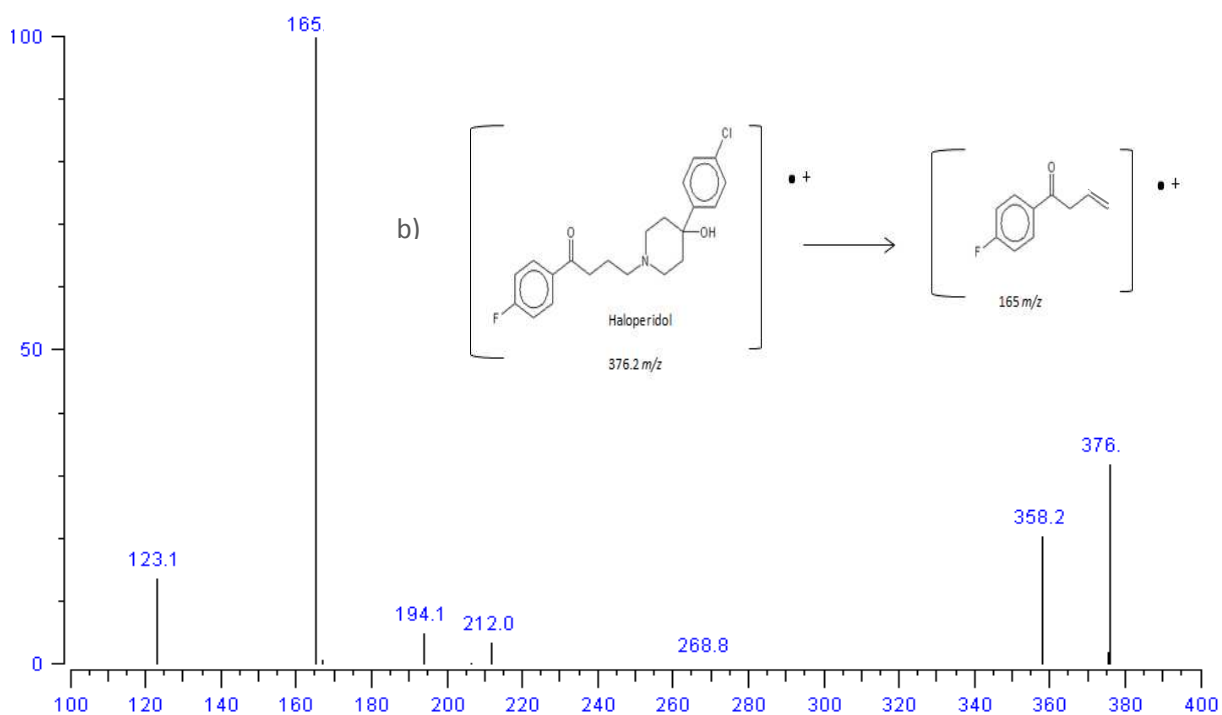


Figura 7. Espectrometría de masas para el HAL por MS/MS. Los picos hacen referencia fragmentación del HAL, b) Estructura de ion molecular y fragmento mayoritario del HAL

Tabla 18. Optimización de condiciones de espectrometría de masas dependientes del flujo

Parámetro	Valor
Curtain gas	45 psi
Collision gas	Medium
IonSpray voltaje	5500 V
Source temperature	500 °C
Ion source gas 1 (GS1)	35.0 psi
Ion source gas 2 (GS2)	32.0 psi

Tabla 19. Optimización de condiciones de espectrometría de masas dependientes del analito

Compuesto	Ion precursor <i>m/z</i>	Ion fragmento <i>m/z</i>	Declustering Potencial (volts)	Collision Energy (volts)	Entrance Potencial (volts)	Collision Exit Potencial (volts)
Haloperidol (HAL)	376.0	165.0	48.0	32.0	8.0	6.0
Carbamazepina (CBZ)	237.1	194.1	43.0	22.0	4.0	3.0

Fuente de ionización: Turbo spray en modo positivo, donde los iones serán monitoreados por Multiple Reaction Monitoring (MRM).

8.1.2 Condiciones cromatográficas

a. Columna

Para cada columna se buscaron las condiciones cromatográficas óptimas para la separación del HAL y el estándar interno cambiando la proporción de la fase móvil y flujo. La columna seleccionada fue la Eclipse XDB C18 3.5 µm 2.1 x 100 mm (Agilent) ya que esta permitía una mejor resolución de las señales del HAL y la CBZ. Ésta columna se eligió también esta columna por tener un menor diámetro interno con el fin de obtener señales mejor definidas y disminuir el flujo hacia el detector, para así facilitar la volatilización y la ionización de la muestra. Además, se utilizó una precolumna Hypersil ODS C18 5 µm de 4 x 10mm (ThermoScientific) para la protección de la columna y del detector contra las impurezas de las muestras provenientes de la matriz.

b. Fase móvil

Se evaluaron dos soluciones amortiguadoras: acetato de amonio 5 mM y formiato de amonio 5 mM con el fin de establecer con cuál de ellas se obtenía una buena separación cromatográfica así como una respuesta adecuada del analito, seleccionándose a la solución de acetato de amonio como la más adecuada para el análisis.

El otro componente de la fase móvil que se eligió para la separación cromatográfica fue el acetonitrilo. Con el fin de elegir la composición de la fase móvil, se realizó una corrida cromatográfica empleando el siguiente gradiente de elución: solución amortiguadora de acetato de amonio 5 mM 98% y 2% de ACN a 2% solución amortiguadora y 98% de ACN en un tiempo de 10 minutos. A partir de esta corrida cromatográfica, fue posible verificar que la aparición de la señal correspondiente al HAL se presentó con una mayor proporción de acetonitrilo, por lo que posteriormente se evaluaron diferentes proporciones de ACN:acetato de amonio 5mM. Considerando tanto el tiempo de retención como la definición de las señales correspondientes al HAL y la CBZ, la proporción de la fase móvil seleccionada fue ACN:acetato de amonio 5 mM 90:10 (v/v). Además, con el fin de mantener a los analitos ionizados antes de ser introducidos al sistema cromatográfico y así facilitar el proceso de ionización, el pH del de la solución amortiguadora de la fase móvil se ajustó a un valor de 6.

La velocidad de flujo se seleccionó de tal forma que el tiempo de retención así como la simetría de las señales de los analitos fueran adecuadas. Se estableció el flujo en 0.6 mL/min, con el cual los tiempos de retención fueron de 0.6 minutos para el estándar interno y de 2.0 minutos para el HAL (Figura 8). Comparando con métodos como los reportados por Hoja et al., Singh & Sharma y Juenke et al., en este método los tiempos de retención así como el tiempo de análisis resultaron menores.

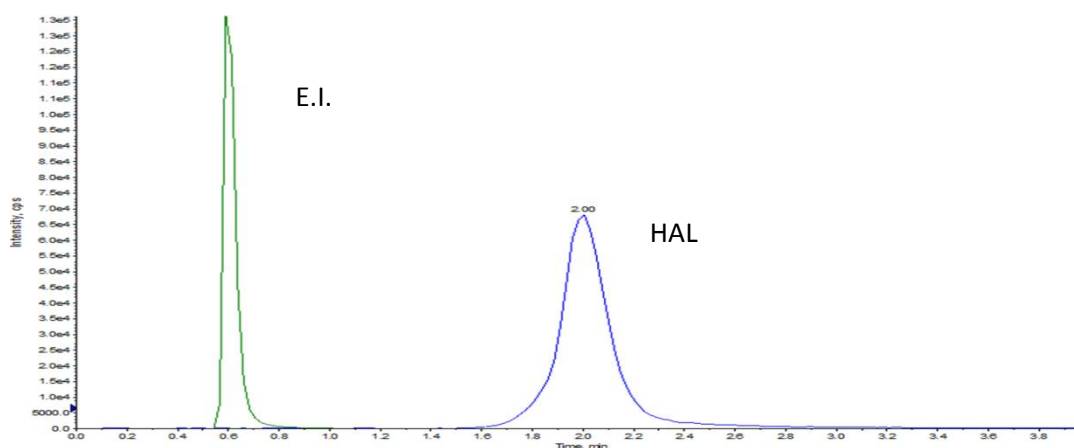


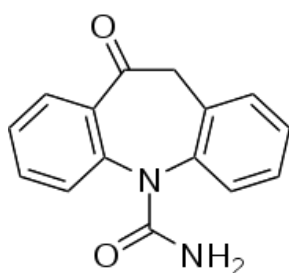
Figura 8. Cromatograma por LC-MS/MS para HAL y el estándar interno. Fase móvil ACN:acetato de amonio 5 mM 90:10 (v/v)

Finalmente las condiciones para la separación cromatográfica fueron:

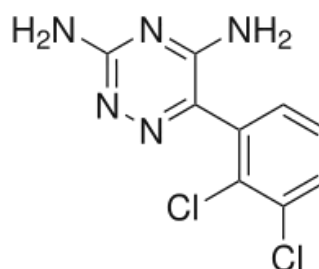
- Columna: Eclipse XDB C18 3.5 μ m 2.1 x 100mm (Agilent)
- Fase móvil: ACN:acetato de amonio 5mM pH 6 (90:10 v/v)
- Flujo: 0.6mL/min
- Tiempo de análisis: 4 minutos

8.1.3 Selección de estándar interno

Para seleccionar el estándar interno se probaron compuestos que tuvieran propiedades fisicoquímicas similares al HAL, principalmente su estructura química y solubilidad. Los estándares internos que se probaron fueron la lamotrigina y la carbamazepina. (Figura 9)



Carbamazepina



Lamotrigina

Figura 9. Estructura química de carbamazepina y lamotrigina.

Se eligió la carbamazepina como estándar interno debido a que su recobro fue cercano al 90%, además de que la precisión fue adecuada, presentó un tiempo de retención corto (0.6 min) y principalmente por obtener una respuesta constante en la detección por espectrometría de masas, aspecto que no se observó con la respuesta de la lamotrigina.

En la figura 10 se muestra el patrón de fragmentación de la carbamazepina (CBZ), encontrando que el ion fragmento más abundante y estable fue el correspondiente a la transición $237.1 \rightarrow 194.3$ m/z .

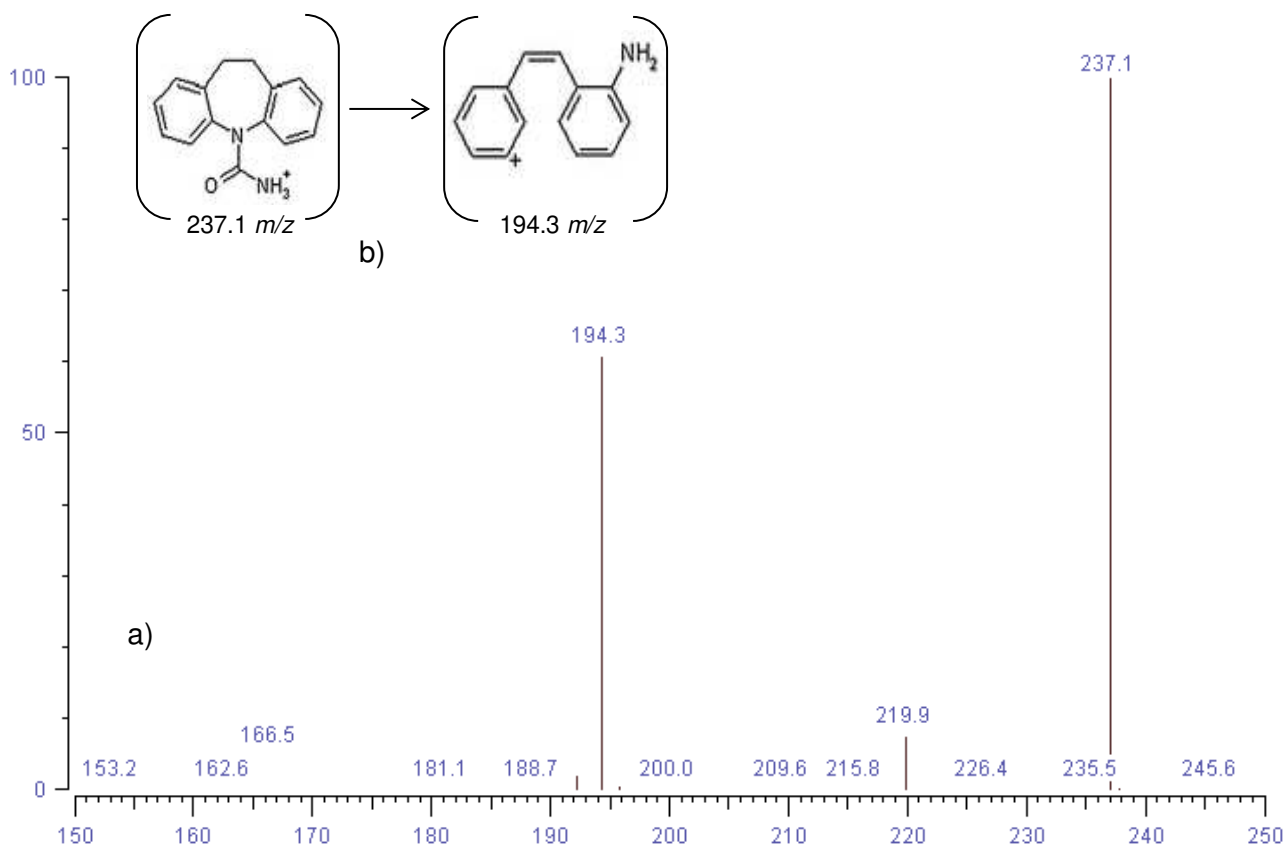


Figura 10. Espectrometría de masas para CBZ por MS/MS. Los picos hacen referencia fragmentación de CBZ, b) Estructura de ion molecular y fragmento mayoritario del CBZ

8.1.4 Selección del método de extracción

Se optó por un método de extracción líquido-líquido con éter iso-propílico debido a que además de obtenerse un recobro constate del HAL, se obtuvieron muestras limpias, en las que a simple vista no se observaban restos del plasma, a diferencia de lo que se observó empleando la mezcla hexano:diclorometano 70:30 (v/v) y con el alcohol iso-propílico. La limpieza de las muestras es un factor sumamente importante ya que los contaminantes provenientes de la matriz biológica pueden disminuir o suprimir la ionización de los analitos durante el análisis.

8.2 Validación del método para cuantificar HAL en plasma humano

8.2.1 Selectividad

En la figuras 10 y 11 se muestran los cromatogramas correspondientes a las pruebas de selectividad.

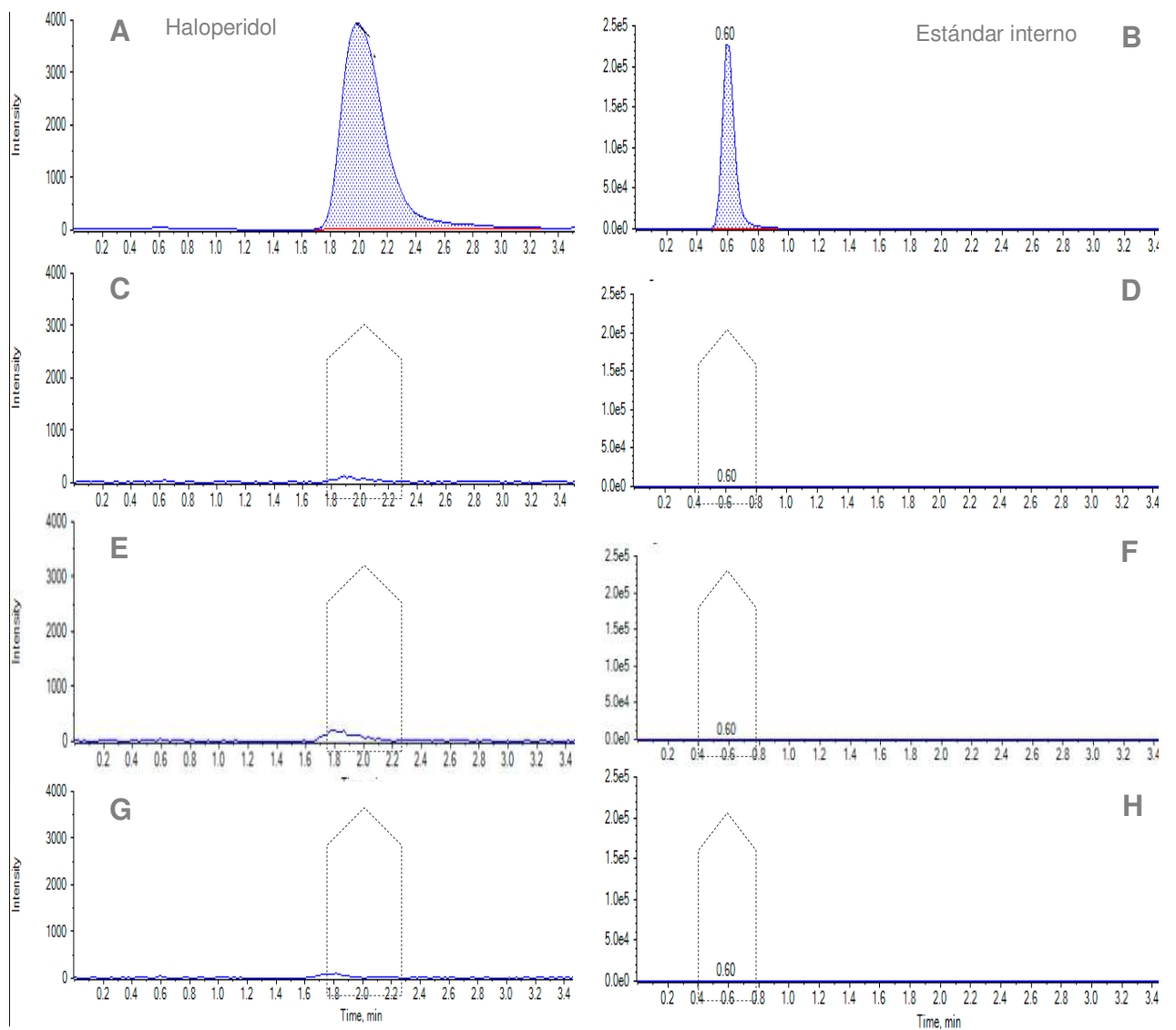


Figura 11. Selectividad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma

Cromatograma de la respuesta de HAL y EI. **A** límite inferior de cuantificación de la curva de calibración (1 ng/mL de HAL), **B** estándar interno (100 ng/mL de CBZ), **C** y **D** blanco de la mezcla de plasma de seis voluntarios, **E** y **F** blanco de plasma hemolizado, **G** y **H** blanco de plasma lipémico.

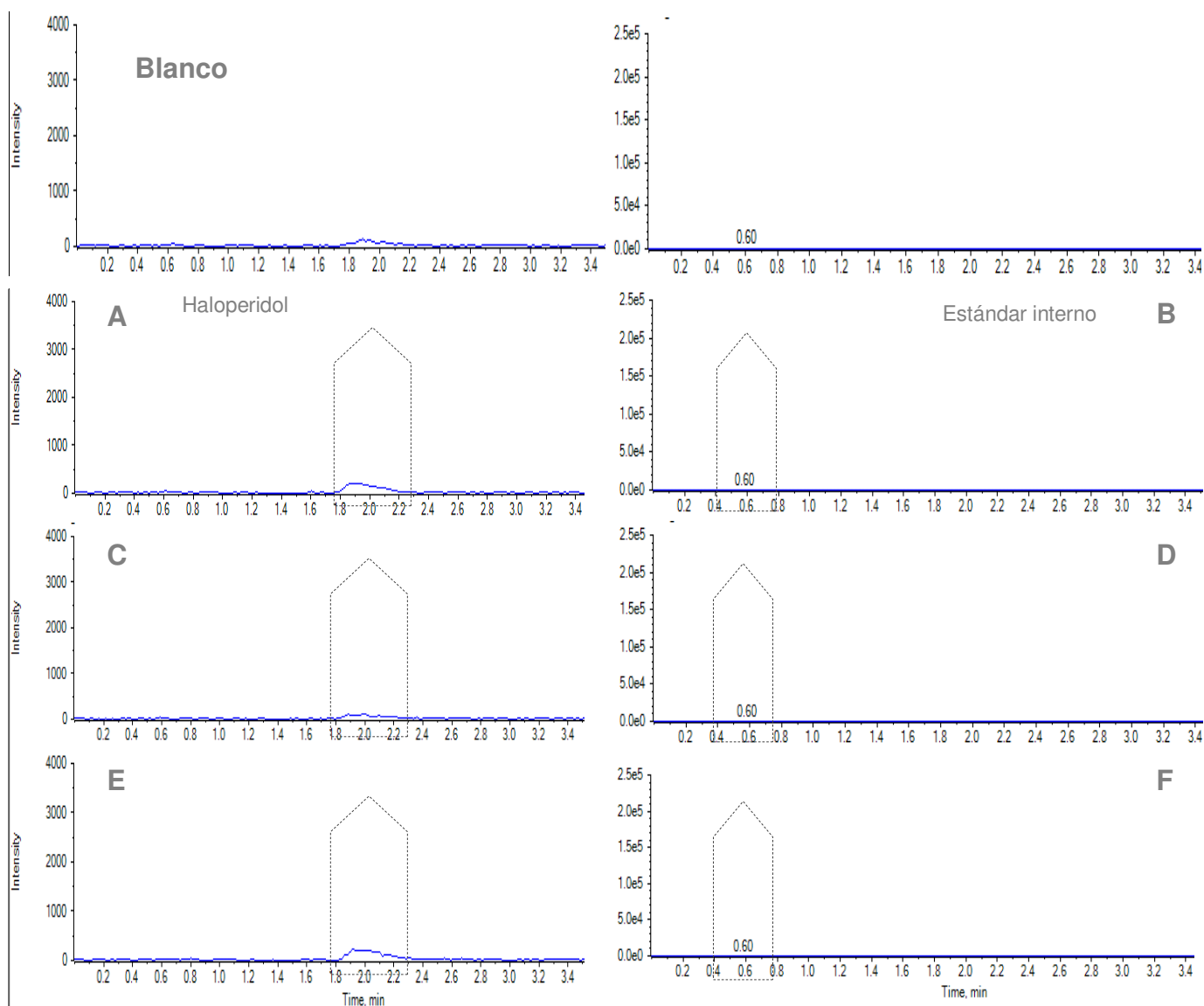


Figura 12. Selectividad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma en presencia de fármacos concomitantes

Cromatograma de la respuesta de HAL y EI. **A** y **B** plasma adicionado con amitriptilina **C** y **D** blanco adicionado con fluoxetina, **E** y **F** blanco adicionado con valproato de magnesio.

No se detectaron interferencias significativas, ya que las señales correspondientes al tiempo de retención del HAL, fueron inferiores al 20% de la respuesta del LIC. Lo

anterior se cumplió para las diferentes muestras blanco evaluadas: las provenientes de seis voluntarios diferentes así como en la mezcla de los mismos; plasma hemolizado y plasma lipémico. En el caso de la adición de fármacos que se utilizan concomitantemente en terapia con HAL, tampoco se observaron interferencias significativas en la respuesta de HAL y del EI.

En conclusión, el método es selectivo debido a que las respuestas analíticas de las interferencias próximas al tiempo de retención fueron menores al 20% respecto a la respuesta del límite inferior de cuantificación para el haloperidol y también menor del 5% para el estándar interno.

8.2.2 Efecto de la matriz

En la tabla 20 se muestra el factor de matriz normalizado (FMN) por el estándar interno para las diferentes muestras de plasma que fueron evaluadas: plasma normal, plasma lipémico y plasma hemolizado, así como el coeficiente de variación del FMN para las muestras control de concentración baja y alta. Debido a que el coeficiente de variación del FMN resultó ser menor al 15% para los tres tipos de plasma, es posible concluir que no existe un efecto de matriz considerable que modifique la respuesta analítica para la cuantificación de HAL en plasma por espectrometría de masas.

Tabla 20. Resultados de FMN para efecto de la matriz blanco, hemolizada y lipémica sobre el método analítico para la cuantificación de HAL por espectrometría de masas

Réplica	FMN MATRIZ BLANCO		FMN MATRIZ HEMOLIZADA		FMN MATRIZ LIPEMICA	
	MCB	MCA	MCB	MCA	MCB	MCA
1	1.05	1.05	0.96	1.01	1.03	1.03
2	1.08	1.05	1.05	1.01	1.03	1.02
3	1.24	1.09	1.03	1.05	1.03	1.02
4	1.06	1.09	1.01	1.06	1.09	1.05
5	1.01	1.07	1.01	1.01	0.98	1.07
6	1.03	1.09	1.04	1.03	1.00	1.05
Promedio	1.08	1.07	1.02	1.03	1.03	1.04
Desviación estándar	0.08	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02
%CV FMN	7.7	1.8	3.1	2.0	3.6	1.9

8.2.3 Efecto de acarreo

La tabla 21 muestra las respuestas obtenidas con la inyección de 3 blancos, donde el blanco 1 corresponde al analizado antes del LSC y los blancos 2 y 3 después de este. Las respuestas analíticas obtenidas de las interferencias próximas al tiempo de retención tanto para el HAL como para el EI se compararon con las respuestas analíticas obtenidas en el LIC. Para el HAL, la respuesta obtenida fue menor al 20% y para el estándar interno (CBZ) la respuesta fue menor al 5%, lo que se demuestra que en este método no existe efecto de acarreo de los analitos.

Tabla 21. Resultados de efecto de acarreo del método para la cuantificación de HAL por espectrometría de masas

Muestra	Respuesta (área)		% de respuesta respecto a LIC	
	HAL	EI	HAL	% EI
LIC 1ng/mL	1.41E+05	1.04E+06	NA	NA
Blanco 1	1.98E+03	1.43E+03	1.4 %	0.1 %
LSC 40ng/ml	3.66E+06	1.35E+06	NA	NA
Blanco 2	5.20E+03	2.41E+03	3.7 %	0.2 %
Blanco 3	3.35E+03	1.26E+03	2.3 %	0.1 %

NA: No aplica

8.2.4 Curva de calibración

La figura 11 muestra la linealidad del método analítico con el promedio de la relación de áreas (HAL/EI) de las tres curvas en función de la concentración en un intervalo de 1 a 40 ng/mL. Con los resultados obtenidos de las tres curvas, se calculó la relación de áreas promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación. Los resultados se muestran en la tabla 22.

Para cada curva se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Los resultados se muestran en la tabla 23.

La ecuación global de acuerdo a la ponderación matemática (1/x) realizada por el software Analyst MultiQuant® para el cálculo de la concentración recuperada fue: $y = 0.08258 x + 0.04653$, con un coeficiente de correlación de 0.99414.

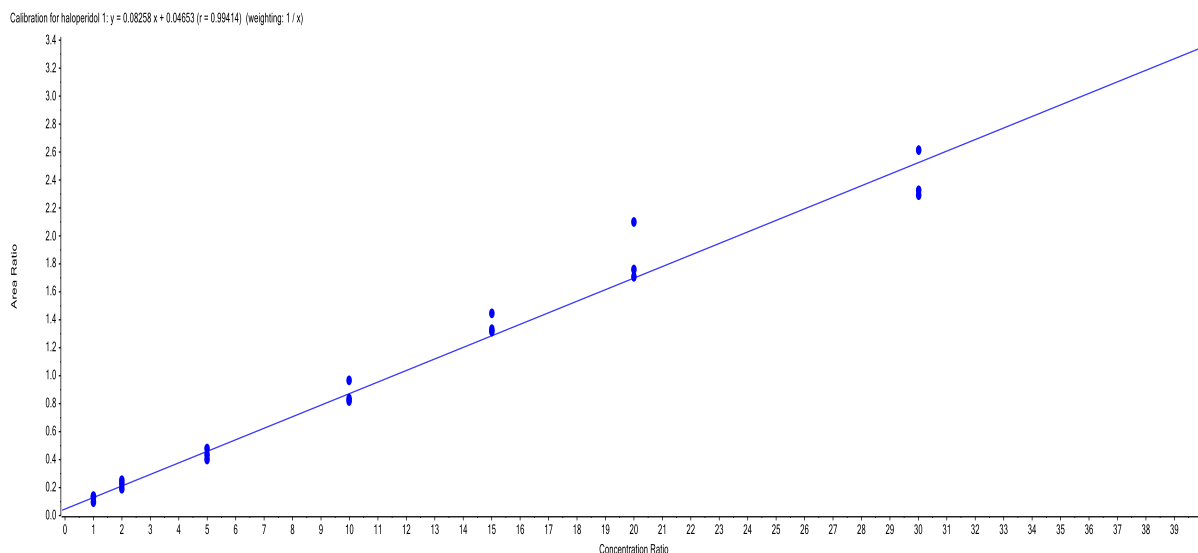


Figura 13. Linealidad del método analítico para la cuantificación de HAL en plasma humano

Tabla 22. Valores promedio, desviación estándar y %CV de las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas (HAL/EI)			Promedio	Desviación estándar	% CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
1	0.14	0.12	0.10	0.12	0.02	17.3
2	0.23	0.23	0.19	0.22	0.03	11.6
5	0.44	0.48	0.40	0.44	0.04	8.9
10	0.84	0.97	0.82	0.88	0.08	9.3
15	1.32	1.45	1.33	1.37	0.07	5.3
20	2.10	1.76	1.70	1.85	0.21	11.5
30	2.29	2.61	2.32	2.41	0.18	7.3
40	2.97	3.32	3.56	3.28	0.30	9.0

Tabla 23. Pendiente, intercepto, ecuación de la recta y coeficiente de correlación para las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Pendiente	0.07758	0.0856	0.08276
Intercepto	0.06218	0.05281	0.01409
Ecuación de la recta	$y = 0.07758x + 0.06218$	$y = 0.08560x + 0.05281$	$y = 0.08276x + 0.01409$
Coefficiente de correlación	0.99687	0.99852	0.99849

Los datos obtenidos de la regresión lineal se utilizaron para obtener la concentración recuperada y el % de desviación con respecto a la concentración nominal para cada uno de los puntos de la curva. (Tabla 24).

Tabla 24. Concentración recuperada y % desviación de las tres curvas de calibración para la cuantificación de HAL

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)			% Desviación		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1	0.9	0.9	1.0	14.0	14.0	1.0
2	2.2	2.1	2.1	8.0	3.0	5.0
5	4.9	5.0	4.7	2.2	0.4	5.8
10	10.2	10.7	9.8	2.0	7.0	2.3
15	16.6	16.3	15.9	10.7	8.7	6.0
20	22.0	19.9	20.4	15.0	0.5	2.0
30	29.6	29.9	27.9	1.3	0.3	7.0
40	38.7	38.2	41.2	3.2	4.5	3.0

El método analítico para cuantificar HAL en plasma, de acuerdo a la NOM- 177-SSA1-2013, es lineal en un rango de concentración de 1 a 40 ng/mL debido a que el coeficiente de correlación para cada una de las rectas es mayor al valor de 0.99, el % de desviación no supera el 20% para el límite inferior de cuantificación y no supera el 15% para los demás puntos.

8.2.5 Precisión

8.2.5.1 Repetibilidad

De los datos que se presentan en la tabla 25 se observa que el método analítico es repetible ya que el CV en cada muestra control es menor a 15% y en el límite inferior de cuantificación es menor a 20%.

Tabla 25. Repetibilidad del método para la cuantificación de HAL

Muestra	Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada(ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Desviación estándar	%CV
LIC	1	1.04	0.98	0.12	11.7
		1.15			
		0.92			
		0.86			
		0.94			
MCB	3	2.80	2.74	0.13	4.9
		2.94			
		2.62			
		2.71			
		2.63			
MCM	18	17.06	15.94	0.65	4.1
		15.67			
		15.39			
		15.87			
		15.72			
MCA	35	33.58	32.95	0.88	2.7
		33.14			
		31.46			
		33.61			
		32.99			

8.2.5.2 Reproducibilidad

En la tabla 26 se reportan los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar HAL en plasma en tres días de análisis. En ella se puede observar que el método es reproducible ya que el coeficiente de variación obtenido de las concentraciones determinadas de las muestras control para los tres días de análisis fue menor al 15% y para el LIC menor al 20%.

Tabla 26. Reproducibilidad del método para la cuantificación de HAL

Día	LIC 1 ng/mL	MCB 3 ng/mL	MCM 18 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	1.04	2.80	17.06	33.58
	1.15	2.94	15.67	33.14
	0.92	2.62	15.39	31.46
	0.86	2.71	15.87	33.61
	0.94	2.63	15.72	32.99
2	0.82	3.05	17.69	30.17
	0.81	3.03	17.70	31.59
	0.86	2.82	17.92	33.89
	0.90	2.56	16.51	34.81
	0.96	2.78	18.05	35.28
3	0.95	2.89	16.88	32.09
	0.94	2.87	16.74	32.86
	0.92	2.79	16.77	31.30
	1.03	2.78	17.71	30.57
	0.89	2.90	16.08	30.91
Promedio	0.93	2.81	16.78	32.55
Desviación estándar	0.09	0.14	0.89	1.54
%CV	9.5	5.1	5.3	4.7

8.2.6 Exactitud

Las tablas 27 y 28 muestran los resultados de cada nivel de concentración de las muestras control así como del límite de cuantificación obtenidos de los datos de repetibilidad y reproducibilidad y su correspondiente % de desviación con respecto al valor nominal (exactitud) así como el promedio del % de desviación. El método es exacto ya que el valor promedio del % de desviación no supera el 15% y en el límite inferior de cuantificación no supera el 20%.

Tabla 27. Exactitud del método para la cuantificación de HAL, datos de repetibilidad

Réplica	LIC 1 ng/mL	% Desviación LIC	MCB 3 ng/mL	% Desviación MCB	MCM 18 ng/mL	% Desviación MCM	MCA 35 ng/mL	% Desviación MCA
1	1.04	4.1	2.80	6.5	17.06	5.2	33.58	4.1
2	1.15	14.8	2.94	1.9	15.67	12.9	33.14	5.3
3	0.92	8.0	2.62	12.7	15.39	14.5	31.46	10.1
4	0.86	14.5	2.71	9.7	15.87	11.8	33.61	4.0
5	0.94	6.2	2.63	12.3	15.72	12.7	32.99	5.7
Promedio % desviación	-	9.5	-	8.8	-	11.4	-	5.8

Tabla 28. Exactitud del método para la cuantificación de HAL, datos de reproducibilidad

Día	LIC 1 ng/mL	% Desviación LIC	MCB 3 ng/mL	% Desviación MCB	MCM 18 ng/mL	% Desviación MCM	MCA 35 ng/mL	% Desviación MCA
1	1.04	4.1	2.80	6.5	17.06	5.2	33.58	4.1
	1.15	14.8	2.94	1.9	15.67	12.9	33.14	5.3
	0.92	8.0	2.62	12.7	15.39	14.5	31.46	10.1
	0.86	14.5	2.71	9.7	15.87	11.8	33.61	4.0
	0.94	6.2	2.63	12.3	15.72	12.7	32.99	5.7
2	0.82	17.6	3.05	1.7	17.69	1.7	30.17	13.8
	0.81	19.0	3.03	1.0	17.70	1.7	31.59	9.7
	0.86	14.1	2.82	5.9	17.92	0.4	33.89	3.2
	0.90	9.8	2.56	14.6	16.51	8.3	34.81	0.5
	0.96	4.3	2.78	7.2	18.05	0.3	35.28	0.8
3	0.95	4.8	2.89	3.7	16.88	6.2	32.09	8.3
	0.94	6.5	2.87	4.4	16.74	7.0	32.86	6.1
	0.92	8.5	2.79	7.1	16.77	6.8	31.30	10.6
	1.03	3.0	2.78	7.4	17.71	1.6	30.57	12.7
	0.89	10.9	2.90	3.3	16.08	10.7	30.91	11.7
Promedio % desviación	-	9.7	-	6.6	-	6.8	-	7.1

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 se ha demostrado que el método, respecto a lo anterior es preciso y exacto.

8.2.7 Estabilidad de la muestra

8.2.7.1 Estabilidad a corto plazo

El HAL fue estable en plasma humano hasta por 2 horas a temperatura ambiente (temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra) con valores de CV del 3% y con una desviación menor al 15% respecto a concentración nominal. (Tabla 29)

Tabla 29. Estabilidad de HAL en plasma a corto plazo

Muestras de referencia, tiempo 0 h		
Replica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.79	31.57
2	2.90	32.7
3	2.79	32.54
Promedio	2.83	32.27
Desviación estándar	0.07	0.61
% CV	2.34	1.89
Muestras mantenidas por 2 h a temperatura ambiente		
Replica	MCB 3ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.81	30.62
2	2.75	33.33
3	2.66	31.43
Promedio	2.74	31.79
Desviación estándar	0.08	1.39
%CV	2.74	4.38
% Desviación de referencia	3.1	1.5
% Desviación de concentración nominal	8.7	9.2

8.2.7.2 Estabilidad a largo plazo

Se observa en la tabla 30 que las muestras de plasma conteniendo HAL fueron estables durante al menos 1 mes mantenidas a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ posteriores a su preparación, ya que la desviación no fue mayor al 15% con respecto al valor de la concentración nominal.

Tabla 30. Estabilidad de HAL en plasma a largo plazo

Muestras de referencia		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	3.10	35.09
2	2.96	34.31
3	3.08	35.36
Promedio	3.04	34.92
Desviación estándar	0.08	0.55
%CV	2.52	1.56
Muestras largo plazo, tiempo 1 mes		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.631	35.58
2	2.642	36.34
3	2.519	37.91
Promedio	2.597	36.61
Desviación estándar	0.068	1.19
%CV	2.62	3.24
% Desviación de referencia	14.7	4.8
% Desviación de concentración nominal	13.4	4.6

8.2.7.3 Estabilidad de la muestra procesada

La tabla 31 muestra los resultados de la estabilidad de la muestra procesada para el HAL donde se encontró que el valor promedio de la concentración de las muestras procesadas y almacenadas por 48 h está dentro del 15% del valor nominal, lo que demuestra que el HAL es estable en una muestra procesada hasta por 48 h almacenada a una temperatura de $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Tabla 31. Estabilidad de HAL en muestra procesada

Muestras de referencia		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.79	31.57
2	2.90	32.7
3	2.79	32.54
Promedio	2.83	32.27
Desviación estándar	0.07	0.61
%CV	2.34	1.89
Muestras procesada y almacenadas 48 h		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	3.055	36.51
2	3.067	32.5
3	3.036	36.47
Promedio	3.05	35.16
Desviación estándar	0.02	2.30
%CV	0.51	6.55
% Desviación de referencia	8.0	9.0
% Desviación de concentración nominal	1.7	0.5

8.2.7.4 Estabilidad en el automuestreador

La tabla 32 muestra los resultados de la estabilidad de las muestras en el automuestreador para el HAL donde se encontró que la desviación con respecto al valor nominal es menor al del 15%, lo que demuestra que el HAL en solución de reconstitución en los viales del automuestreador es estable durante un período de 2 horas a temperatura ambiente.

Tabla 32. Estabilidad de HAL en el automuestreador

Muestras de referencia		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.79	31.57
2	2.90	32.70
3	2.79	32.54
Promedio	2.83	32.27
Desviación estándar	0.07	0.61
%CV	2.34	1.89
Muestras mantenidas en automuestreador 2 h a temperatura ambiente		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	2.749	31.39
2	2.861	31.39
3	2.876	31.45
Promedio	2.829	31.41
Desviación estándar	0.07	0.03
%CV	2.45	0.11
% Desviación de referencia	0.04	2.7
% Desviación de concentración nominal	5.7	10.3

8.2.7.5 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

En la tabla 33 se muestran los resultados de estabilidad de las muestras control preparadas en plasma sometidas a 3 ciclos de congelación-descongelación.

Se observa que el HAL 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 nominal y además de las muestras de referencia.

Tabla 33. Estabilidad de HAL en ciclos de congelación-descongelación

Muestras de referencia		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	3.10	35.09
2	2.96	34.31
3	3.08	35.36
Promedio	3.04	34.92
Desviación estándar	0.07677	0.54525
%CV	2.52	1.56
Muestra después de 3 ciclos congelación-descongelación		
Réplica	MCB 3 ng/mL	MCA 35 ng/mL
1	3.11	40.54
2	3.34	39.35
3	2.94	40.26
Promedio	3.13	40.05
Desviación estándar	0.20	0.62
%CV	6.48	1.55
% Desviación de referencia	2.8	14.7
% Desviación de concentración nominal	4.3	14.4

8.2.7.6 Estabilidad en solución

Los resultados de la estabilidad de las soluciones estándar principal (10 000 ng/mL) y de trabajo (100 ng/mL) para HAL se muestran en la tabla 34. Para el estándar interno (CBZ) las estabilidad de las soluciones estándar principal (100 000 ng/mL) y de trabajo (200 ng/mL) se muestran en la tabla 35.

Tabla 34. Estabilidad de las soluciones estándar de HAL

Soluciones de referencia HAL		
Réplica	Solución principal (área)	Solución de trabajo (área)
1	7.68×10^5	8.08×10^5
2	7.80×10^5	$7.99E \times 10^5$
3	7.93×10^5	8.07×10^5
Promedio	7.80×10^5	8.05×10^5
Desviación estándar	12504.80	4818.02
%CV	1.60	0.60
Soluciones de HAL en refrigeración por 2 meses		
Réplica	Solución principal (área)	Solución de trabajo (área)
1	8.15×10^5	8.74×10^5
2	8.45×10^5	8.88×10^5
3	8.67×10^5	8.90×10^5
Promedio	8.42×10^5	8.84×10^5
Desviación estándar	26325.46	8717.80
%CV	3.13	0.99
% desviación	8.0	9.8

Tabla 35. Estabilidad de las soluciones estándar de CBZ

Soluciones de referencia CBZ		
Réplica	Solución principal (área)	Solución de trabajo (área)
1	1.33×10^6	1.39×10^6
2	1.37×10^6	1.40×10^6
3	1.38×10^6	1.33×10^6
Promedio	1.36×10^6	1.37×10^6
Desviación estándar	25735.84	40501.03
%CV	1.89	2.95
Soluciones de CBZ en refrigeración por 8 meses		
Réplica	Solución principal (área)	Solución de trabajo (área)
1	1.24×10^6	1.24×10^6
2	1.27×10^6	1.24×10^6
3	1.28×10^6	1.26×10^6
Promedio	1.26×10^6	1.25×10^6
Desviación estándar	18717.19	8504.90
%CV	1.48	0.68
% desviación	7.3	9.2

De acuerdo a los resultados anteriormente mostrados, las soluciones estándar de HAL que fueron almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz durante 2 meses permanecieron estables, ya que el porcentaje de desviación de la respuesta (área) de estas muestras con respecto a las soluciones recién preparadas no superan el 10%. De igual modo, las soluciones estándar de CBZ que fueron almacenadas en refrigeración durante 8 meses fueron estables ya que el % de desviación fue menor al 10 %. Cabe mencionar que la CBZ se sometió por más tiempo a estabilidad en solución debido a que se contaba con el estándar de referencia con mayor anterioridad que el estándar de HAL.

Debido a que los fármacos que se emplean en este método son controlados y de costo elevado, resultaría muy difícil y costoso preparar una solución estándar de cada uno de los fármacos para cada día de análisis, por ello se comprobó experimentalmente que las soluciones estándar en metanol de HAL pueden ser utilizadas durante 2 meses y de CBZ en metanol pueden ser utilizadas durante 8 meses, pero se deben almacenar en refrigeración y protegidas de la luz.

8.2.8 Recobro

Para el cálculo de recobro del HAL se utilizó el promedio del área de las 5 determinaciones de MCB y MCA; los resultados del % de recobro para el HAL se presentan en la tabla 36.

El empleo de blancos cargados con solución en lugar de la solución como tal, se realizó para omitir el posible efecto de la matriz que se puede presentar en la detección por espectrometría de masas, lo cual puede verse reflejado en un aumento o supresión de la respuesta.

Tabla 36. Porcentaje de recobro de HAL en muestras control concentración baja y alta

Concentración nominal (ng/mL)	Área blancos cargados con solución	Área plasma	% recobro
MCB			
3	297400	271400	95.7
3	288900	264300	
3	278000	266800	
3	275800	272500	
3	271500	275200	
Promedio	282320	270040	
Desviación estándar	10594	4415	
%CV	3.8	1.6	
MCA			
35	2681000	2356000	85.2
35	2695000	2371000	
35	2725000	2318000	
35	2773000	2387000	
35	2818000	2236000	
Promedio	2738400	2333600	
Desviación estándar	56770	60252	
%CV	2.1	2.6	
Recobro promedio			90.4
Desviación estándar			7.4
%CV			8.2

Para el cálculo de recobro del estándar interno se utilizó el promedio del total de las determinaciones. Los resultados del % de recobro para la CBZ se presentan en la tabla 37.

Tabla 37. Porcentaje de recobro para la CBZ en muestras control

Réplica	Área blancos cargados con solución	Área plasma	% recobro
1	1493000	1231000	81.9
2	1510000	1205000	
3	1401000	1190000	
4	1407000	1164000	
5	1381000	1244000	
6	1328000	1070000	
7	1356000	1065000	
8	1364000	1087000	
9	1314000	1081000	
10	1368000	1069000	
Promedio	1392200	1140600	
Desviación estándar	64452.9	73219.9	
% CV	4.6	6.4	

Al analizar los datos de recobro tanto para el HAL como para el estándar interno, se encontró que éste resulta ser aceptable al ser mayor al 80%. El recobro para el HAL resultó ser reproducible en los dos niveles de concentración analizados, y el recobro del estándar interno demuestra ser constante. El recobro obtenido para el HAL resulta superior a lo reportado por Hoja et al., y Arinobu et al., y comparable con Singh & Sharma, sin embargo, este método ofrece la simplicidad de emplear solo un disolvente de extracción y no una mezcla.

8.3 Aplicación del método en la clínica

Se comprobó la aplicación del método analítico para la cuantificación de HAL por LC-MS/MS a través del análisis de muestras de pacientes psiquiátricos bajo tratamiento con haloperidol (Tabla 38). Los niveles del haloperidol en el estado estacionario de las dos muestras tomadas de cada paciente son similares, con excepción de 3 muestras

que no fueron cuantificables a pesar de la sensibilidad del método analítico y 2 muestras más del paciente número cinco, las cuales están por debajo del límite de cuantificación. Los resultados fueron variables con una media total 2.98 ng/mL y en la mayoría de los casos con una concentración menor a 5 ng/mL, que es la concentración mínima que se ha establecido dentro del intervalo terapéutico en poblaciones diferentes a la mexicana.

Tabla 38. Niveles plasmáticos de HAL en pacientes bajo tratamiento con este fármaco

Paciente	Muestra	Concentración HAL ng/mL	
		A	B
1		3.8	3.8
2		1.4	1.2
3		1.3	1.5
4		ND	14.2
5		NC	NC
6		3.9	5.8
7		ND	ND
8		1.9	-
9		1.6	1
NC= No cuantificable, ND: No detectable, (-) Muestra insuficiente			

9 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para cuantificar haloperidol en plasma humano por LC-MS/MS, empleando una técnica de extracción líquido-líquido la cual es rápida y sencilla.

La carbamazepina resultó ser un estándar interno adecuado debido a su comportamiento fisicoquímico similar al del haloperidol.

El método analítico desarrollado para la cuantificación de haloperidol en plasma, que fue validado de acuerdo a la NOM-177-SS1-2013, demostró ser:

- Selectivo, ya que no se presentaron interferencias de los compuestos endógenos del plasma, ni de otros fármacos que se pueden tomar concomitantemente con el haloperidol (amitriptilina, fluoxetina y valproato de magnesio).
- Lineal, preciso y exacto, en un intervalo de concentraciones entre 1 y 40 ng/mL.
- No es afectado por componentes de la matriz y no presenta efecto de acarreo.
- Las muestras analíticas demostraron ser estables hasta por 2 h a Tamb, hasta por 30 días a -70 ± 2 °C, hasta 3 ciclos de congelación-descongelación
- Las muestras procesadas fueron estables hasta por 48 h a 0 ± 2 °C y en el automuestreador por al menos 2 h a temperatura ambiente.
- Las soluciones estándar HAL fueron estables cuando se mantuvieron protegidas de la luz y en refrigeración durante 3 meses y las de CBZ por 8 meses.

El método desarrollado y validado fue adecuado y confiable para el análisis de muestras plasmáticas de pacientes bajo tratamiento con haloperidol.

10 PERSPECTIVAS

El método analítico desarrollado permitirá:

- Determinar el intervalo terapéutico del haloperidol en pacientes del área de psiquiatría del INNN.
- Comparar el intervalo terapéutico con los valores propuestos internacionalmente.
- Evaluar la variabilidad interindividual, así como la influencia de covariables que puedan afectar los niveles plasmáticos del haloperidol.

11 REFERENCIAS

Annesley, T. M. (2007). Methanol-associated matrix effects in electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 53, 1827-1834.

APA. (2015). *American Psychiatric Association*. Obtenido de <http://www.psychiatry.org/mental-health/schizophrenia>. Consultado el 15 de febrero del 2015.

Arinobu, T., Hattori, H., Iwai, M., Ishii, A., Kamazawa, T., Suzuki, O., & Seno, H. (2002). Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of haloperidol and its metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, 776, 107-113.

Baeyens, W., & De Moerloose, P. (1977). Fluorometric determination of some butyrophenones after permanganate treatment. *Pharmazie*, 32(12), 765-771.

Baumann, P., Hiemke, C., Ulrich, S., Gartner, I., Gerlach, M., Kuss, H. J., Zernig, G. (2004). The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*, 37, 243-265.

Besag, F., & Berry, D. (2006). Interactions between Antiepileptic and Antipsychotic Drugs. *Drug Safety*, 29(2), 95-118.

Brockmöller, J., Kirchheiner, J., Schmider, J., Walter, S., Sachse, C., Müller-Oerlinghausen, B., & Roots, I. (2002). The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 72(4), 438-452.

Bruton, L., Chabner, B., & Knollman, B. (2012). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12a ed.). Mc Graw Hill.

Buckley, P. (2009). Visión clínica en esquizofrenia. Consideraciones sobre la comorbilidad medica en esquizofrenia. *Toxicomanías*(56), 1-9.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z., & Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography*, 852, 22-34.

Chang, W. H., Lam, Y. W., Jann, M., & Chen, H. (1991). Pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in chinese schizophrenic patients after intravenous and oral administration of haloperidol. *Psychopharmacology*, 116, 517-522.

Chiu, C. M., & Muddiman, D. C. (2008). *What is mass spectrometry?*, American Society for Mass Spectrometry. Obtenido de <http://www.asms.org/whatisms>. Consultado en agosto del 2014.

CIE-IO. (1995). *Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud*. (10a ed.). Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud.

Divry, P., Bobon, J., & Collard, J. (1958). Nouvelle thérapeutique symptomatique de l'agitation psychomotrice. *Acta Neurologica Psychiatrica Belgica*, 58, 878-888.

Dolan, J. (2012). *Guide to HPLC and LC-MS buffer selection*. *Advanced chromatography technologies*. Obtenido de ACE HPLC Columns: www.ace-hplc.com/. Consultado el 15 de agosto del 2014.

DSM-IV. (2000). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*. Barcelona: Masson.

FDA. Guidance for industry. (2013). *Bioanalytical method validation*. U.S. Department of health and Human Services. Food and Drug Administration Obtenido de (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>)

Fraga, I., Alvarado, M. S., Saucedo, A., Velarde, L. T., & Fragoso, L. E. (2010). Esquizofrenia: un problema de salud pública en grandes dimensiones en la población mexicana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48(2), 187-188.

Fujii, T., Hatanaka, K., Sato, G., Yomi, Y., Arimoto, H., & Mitsutsaba, Y. (1996). Selective determination of haloperidol in human serum: Surface ionization mass spectrometry and gas chromatography with surface ionization detection. *Journal of Chromatography B*, 687, 395-403.

Gaskell, S. J. (1997). Electrospray : principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 677-688.

Gassó, P., Papagianni K., Mas, S., Fernández, R., Arnaiz J.A., Bernardo, M., Lafuente, A. (2013). Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*. 14(13). 1551-1563.

Gennaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia* (20a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Genta, H., Tosiyuki, S., Saburo, M., Sachiyo, M., & Kazutaka, S. (1999). Interindividual variation of plasma haloperidol concentrations and the impact of concomitant

medications: the analysis of therapeutic drug monitoring data. *Therapeutic Drug Monitoring*, 21(1), 82-86.

Ghiculescu, R., (2008). Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Australian Prescriber*, 31, 42-44.

Gómez, C., Hernández, G., Rojas, A., Santacruz, H., & Uribe, M. (2008). *Psiquiatría Clínica, diagnóstico y tratamiento en niños, adolescentes y adultos* (3a. ed.). Editorial Panamericana.

Gómez, C., Hernandez, Rojas, Santacruz, & Uribe. (2008). *Psiquiatría Clínica. Diagnostico y tratamiento en niños adolescentes y adultos* (3a. ed.). Bogotá: Editorial Medica Panamericana.

Hiemke, C., Baumann, P., Bergemann, N., Conca, A., Dietmaier, O., & Egberts, K. (2011). AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*, 44, 195-235.

Hoffmann, E., & Strooband, V. (2007). *Mass Spectrometry. Principles and Applications* (3ra ed.). England: Wiley.

Hoja , H., Marquet, P., Verneuil, B., Latfi, H., Dupuy, J. L., Pénicaut, B., & Lachatre, G. (1997). Determination of haloperidol and its reduced metabolite in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*, 688, 275-280.

Irving, C. B., Adams, C. E., & Lawrie, S. (2012). Haloperidol versus placebo for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4), 1-70.

Jain, T., Bhandari, A., Rama, V., Sharma, S., Parakh, M., & Parakh, M. C. (2011). Correlation of haloperidol levels between saliva and plasma of acutely ill schizophrenic patients. *Clinical Biochemistry*, 44, 675-680.

Juenke, J. M., Brown, P. I., Urry, F. M., Johnson-Davis, K. L., & McMillin, G. A. (2013). Simultaneous UPLC–MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma. *Clinica Chimica Acta*, 423, 32-34.

Kalgutkar, A. S., Taylor, T. J., Venkatakrisnan, K., & Isin, E. M. (2003). Assessment of the contributions of CYP3A4 and CYP3A5 in the metabolism of the antipsychotic agent haloperidol to its potentially neurotoxic pyridinium metabolite and effect of antidepressants on the bioactivation pathway. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(3), 243-249.

Kang , J. S., & Lee, M. H. (2009). Overview of therapeutic drug monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24(1), 1-10.

Kang, J. S. (2012). Obtenido de <http://www.intechopen.com/books/tandem-massspectrometry-applications-andprinciples/principles-and-applications-of-ic-ms-ms-for-the-quantitativebioanalysis-of-analytes-in-various-biol>. Consultado en agosto del 2014.

Kaplan, H. I., Sadock, B. J., & Grebb, J. A. (1996). *Sinopsis de Psiquiatría, Transtrnos esquizofrenicos* (7a ed.). Buenos Aires: Panamericana.

Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., & Remington, G. (2000). Relationship between dopamine D2 occupancy, clinical response, and side effects: A double-blind PET Study of first-episode schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 157(4), 514-520.

Katzung, B. J. (2001). *Basic and clinical pharmacology*. USA: McGraw Hill.

Lindenberga, M., Koppb , S., & Dressmana, J. (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 265-278.

COFEPRIS. (2008). Listado general de medicamentos. Ley General de Salud, Art. 26 fracción I,II y III. Obtenido de: www.cofepris.gob.mx/CAS/.../_LGS_Art_226_List_General.pdf . Consultado el 15 de enero del 2015

López, F., & Álamo, C. (2007). *Historia de la Psicofarmacología*. España: Editorial Medica Panamericana.

López, M., Guerrero, J. L., Familiae, I. M., Jung, H., Corona, T. M., & Alonso, M. E. (2004). Farmacogenómica: búsqueda de la terapia personalizada. *Revista de Neurología*, 39(11), 1063-1071.

Mayer, C., Vaerini, S., Rätz, A., Meier, C., & Guglielmo, B. G. (2011). Comparative safety of antipsychotics in the WHO pharmacovigilance database: the haloperidol case. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 33, 806-814.

Mitchell, P. B. (2000). Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49, 303-312.

Mohamed, F. A., Hussein, S. A., Mohamed, H. A., & Ahmed, S. A. (2003). The use of quercetin for spectrophotometric determination of some CNS acting drugs. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)*, 26, 15-27.

NIH. (2009). *PubChem*. (N. I. Health, Editor) Obtenido de PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3559#section=Top>. Consultado en enero del 2015.

Norma Oficial Mexicana 177. *NOM-177-SSA1-2013. Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas*. Obtenido de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013. Consultado en julio del 2014.

OMS. (2004). *Formulario Modelo OMS*. Obtenido de Portal de Información - Medicamentos Esenciales y Productos de Salud.: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/28.html#Js5422s.32>. Consultado el 15 de diciembre del 2014.

OMS. (2009). *Tratamiento farmacológico de trastornos mentales en la atención de salud*. Organización Mundial de la Salud.

OMS. (2015). Salud Mental: Esquizofrenia. Obtenido de http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/. Consultado el 15 de febrero del 2015.

Panagiotidis, G., Holger A., Lindh, J., Dahl, M.L., Sjöqvist, F. (2007). Depot haloperidol treatment in outpatients with schizophrenia on monotherapy: Impact of CYP2D6 polymorphism on pharmacokinetics and treatment outcome. *Therapeutic Drug Monitoring*. 29 (4), 417-422.

Patel, D. (2001). Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview. *International Journal of Pharma nd Bio Sciences*, 2, 559-564.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2009). *Introduction to spectroscopy* (4a. ed.). EU: Brooks Cole, Cengage, Learning.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography- mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry*, 30, 19-34.

Roh, H. K., Chung, J. Y., Oh, D. Y., Park, C. S., Svensson, J. O., Dahl, M. L., & Bertilsson, L. (2001). Plasma concentrations of haloperidol are related to CYP2D6 genotype at low, but not high doses of haloperidol in Korean schizophrenic patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52, 265-271.

Secretaría de Salud. (2009). *Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento de la Esquizofrenia en el primer y segundo nivel de atención y de especialidad. Secretaría de Salud.*

Shah, V. (2007). The History of bioanalytical method validation and regulation: evolution of a guidance document on bioanalytical methods. *The AAPS Journal*, 9(1), 45-47.

Singh, S. S., & Sharma, K. (2005). Validation of LC–MS electrospray ionisation method for quantitation of haloperidol in human plasma and its application to bioequivalence study. *Analytica Chimica Acta*, 551, 159-167.

Szczepanik, P. A. (1985). Improved gas chromatographic-mass spectrometric assay for haloperidol utilizing ammonia chemical ionization and selected-ion monitoring. *Journal of Chromatography*, 339, 321-330.

Titier, K., Bouchet, S., Péhourcq, F., Moore, N., & Molimard, M. (2003). High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Journal of Chromatography B*, 788, 179-185.

Trabelsi, H., Bouabdallah, S., Bouzouita, K., & Safta, F. (2002). Determination and degradation study of haloperidol by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 649-657.

Tyndale, R. F., & Inaba, T. (1990). Simultaneous determination of haloperidol and reduced haloperidol by gas chromatography using a megabore column with electron-capture detection: application to microsomal oxidation of reduced haloperidol. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 529, 182-188.

Ulloa, R. E., Sauer, T. R., & Apiquian, R. (2011). Evaluación y tratamiento de la esquizofrenia en niños y adolescentes: una revisión actualizada. *Salud Mental*, 34(5), 429-433.

Van Den Bossche, W., & Haemers, A. (1969). A note on the colorimetric determination of butyrophenones with 3,5-dinitrobenzoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21(8), 531-532.

Viswanathan, C. T., Basal, S., Booth, B., Destefano, A. J., Rose, M., & Sailstad, J. (2007). Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharmaceutical Research*, 24(10), 1962-1973.

Walter, S., Bauer, S., Roots, I., & Brockmüller, J. (1998). Quantification of the antipsychotics flupentixol and haloperidol in human serum by high-performance liquid

chromatography with ultraviolet detection. *Biomedical Sciences and Applications*, 720, 231-237.

Wu, C. Y., & Benet, L. Z. (2005). Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*, 22(1), 11-23.

Wu, S. M., Ku, S. M., Chen, S. H., Otsuka, K., Terabe, S., & Chin, J. (1999). Trace analysis of haloperidol and its chiral metabolite in plasma by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 846, 239-243.

Yang, Z., & Wang, S. (2008). Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Journal of Immunological Methods*, 336, 98-103.

Yun, M. H., Kwon, J. R., & Know, K. (2005). Pharmacokinetics and Bioequivalence of Haloperidol Tablet by Liquid Chromatographic Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *Archives of Pharmacal Research*, 28(4), 488-4492.