



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Desarrollo y validación de un método analítico de  
cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a  
espectrometría de masas para la determinación de  
clonazepam en plasma humano**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Juan Alejandro ALMERCÓ FRANCO

**ASESORES**

Mg. Norma Angélica CARLOS CASAS  
Q.F. Luis Alberto LÓPEZ AVILA (Co-asesor)

Lima, Perú

2013

## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló y validó una técnica analítica, basada en la metodología de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tandem (UPLC-MS/MS), para la determinación de clonazepam en plasma humano. La cuantificación se realizó mediante el método de estándar interno. Las muestras contaminadas con clonazepam se sometieron a un proceso extracción en fase sólida previamente a su análisis. La separación se realizó en una columna con un tamaño de partícula de 1,7 $\mu$ m, mediante elución en gradiente y a 50°C. La detección fue operada en modo de ionización positiva por electrospray, y con monitorización de fragmentos múltiple (MRM), siendo las transiciones establecidas de m/z 316  $\rightarrow$  270 para clonazepam y m/z 314  $\rightarrow$  268 para el estándar interno. Los tiempos de retención fueron de 1,24 y 1,30 min para el clonazepam y el estándar interno respectivamente. El límite de cuantificación (LLOQ) fue establecido en 2,5ng/mL y el límite de detección (S/N > 3) fue de 0,05 ng/mL. El método resultó ser lineal en el rango de 2,5 a 100 ng/mL ( $r^2 = 0,999$ ; curva de calibración  $y = 0,699x + 0,140$ ). El %CV (Precisión) y la desviación del valor nominal de concentración (% Exactitud) fueron menores de 15% en todos los niveles de concentración. El porcentaje de recuperación y el efecto matriz de la muestra fueron de 81,48% y 0,26% respectivamente. La variación de la concentración en los ensayos de estabilidad fue menor de 15%. De esta manera se demostró que el método es altamente rápido y sensible, habiendo cumplido con las exigencias dadas por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA, siendo el método potencialmente aplicable a estudios de monitorización de niveles plasmáticos, perfil farmacocinético y estudios de bioequivalencia del clonazepam.

**PALABRAS CLAVE:** Clonazepam, validación, UPLC, MS/MS, plasma humano

## SUMMARY

In this work, an analytical methodology based on ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry technique (UPLC-MS/MS) for the determination of clonazepam in human plasma clonazepam was developed and validated. Quantification was accomplished with the internal standard method. Clonazepam -contaminated samples were subjected to solid phase extraction process prior to analysis. The separation was performed in a column with a particle size of 1,7 $\mu$ m, by gradient elution and at 50 °C. Detection was operated in the positive electrospray ionization mode, and with multiple reaction monitoring (MRM), being the transitions at m/z 316  $\rightarrow$  270 for clonazepam and at m/z 314  $\rightarrow$  268 for the internal standard established. Retention times were 1,24 and 1,30 min for the internal standard and clonazepam respectively. High specificity was obtained using the MRM method for detecting clonazepam. The lower limit of quantification (LLOQ) was established in 2.5ng/mL and the limit of detection (S/N> 3) was 0,05 ng/mL. The method proved to be linear in the range of 2.5 to 100 ng/mL ( $r^2= 0,999$ ; calibration curve  $y = 0,699x + 0,140$ ). The %CV (precision) and the deviation from nominal concentration (% accuracy) were under 15% at all concentration levels. The percent recovery and the sample matrix effects were 81,48% and 0,26% respectively. The variation of the concentration in stability testing was less than 15%. Thus it was demonstrated that the method is fast and highly sensitive, having fulfilled the requirements given by the Guidance for Bioanalytical Method Validation of the FDA, being a potentially applicable method to monitoring plasma levels studies, pharmacokinetic profile, and bioequivalence studies of clonazepam.

**KEY WORDS:** Clonazepam, validation, UPLC, MS/MS, human plasma.