

Fast, Sensitive Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Escitalopram in Human Plasma by Liquid Chromatography- Electrospray, Tandem Mass Spectrometry

Mohammed I. BELUDARI ¹*, Siva S.R. LINGAREDDYGARI ¹, China B. DARA ¹,
Sreenivasulu MUNNA ¹, Madhusudhana C. CHALLA ¹ & Vanitha P. KARNAM ²

¹ Department of Pharmaceutical Analysis, Santhiram College of Pharmacy, Nandyal, A. P. India

² Department of Pharmaceutical Analysis, SSJ College of Pharmacy,
Gandipet, Hyderabad, Telangana, India

SUMMARY. A simple, reproducible and fast (1.5 min chromatogram) bioanalytical method of liquid chromatography and tandem with mass detector (LC/MS-MS) was developed and validated to determine escitalopram (ESP) in human plasma using liquid-liquid extraction technique. Imipramine (IMP) was used as internal standard (IS) and K2 EDTA was used as anti-coagulant. Analytes were extracted by methyl-*tert*-butyl ether (MTBE) and subsequent separation on a Luna 3 μ m C18, 100 \times 4.60 mm column using acetonitrile:10 mM ammonium formate pH 4.5 (90:10 v/v) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min and 30 \pm 3o C column oven temperature. Analytes were monitored with electrospray ionization in positive multiple reaction mode (MRM) for both ESP and IMP using quadrupole MS/MS spectrometer. ESP and IMP were detected with proton adducts at m/z 324.20 \rightarrow 110.13 for ESP and 280.8/86.0 for IMP. ESP and IMP were eluted at 0.655 and 0.745 min, respectively. The method was validated over a linear ($r^2 = 0.9979$) concentration range of 306.022 to 199205.354 pg/mL. The inter-day and intra-day precisions were found to be less than 15% and the accuracy was all within $\pm 15\%$ (at LLOQ $\pm 20\%$). The developed LC-MS/MS method was fully validated for all the other parameters as per FDA guidelines like selectivity, matrix effect, recovery and stability as well. Due to the high degree of sensitivity, very less time consuming, easy extraction procedure and low requirement of sample volume, the method will be applicable for therapeutic drug monitoring.

RESUMEN. Se desarrolló y validó un método bioanalítico simple, reproducible y rápido (cromatograma de 1,5 minutos) de cromatografía líquida en tándem con detector de masa (LC/MS-MS) para determinar el escitalopram (ESP) en plasma humano utilizando la técnica de extracción líquido-líquido. Se usó imipramina (IMP) como estándar interno (IS) y K2 EDTA como anticoagulante. Los analitos se extrajeron con metil-*tert*-butil éter (MTBE) y posterior separación en una columna Luna 3 μ m C18, 100 \times 4.60 mm usando acetonitrilo: formiato de amonio 10 mM pH 4.5 (90:10 v/v) como fase móvil a una velocidad de flujo 1 mL/min y temperatura de horno de columna de 30 \pm 3 °C. Los analitos se monitorizaron con ionización por electropulverización en modo de reacción múltiple positiva (MRM) tanto para ESP como para IMP usando un espectrómetro de cuadrupolo MS/MS. ESP e IMP se detectaron con aductos de protones a m/z 324.20 \rightarrow 110.13 para ESP y 280.8/86.0 para IMP. ESP e IMP eluyeron a 0.655 y 0.745 min, respectivamente. El método fue validado en un rango de concentración lineal ($r^2 = 0.9979$) de 306.022 a 199205.354 pg/mL. Se encontró que las precisiones interdía e intradía eran inferiores al 15% y la precisión estaba dentro de $\pm 15\%$ (en LLOQ $\pm 20\%$). El método LC-MS/MS desarrollado fue completamente validado para todos los demás parámetros según las pautas de la FDA, como selectividad, efecto de matriz, recuperación y estabilidad también. Debido al alto grado de sensibilidad, mucho menos tiempo, procedimiento de extracción fácil y bajo requerimiento de volumen de muestra, el método es aplicable para el monitoreo terapéutico de drogas.

KEY WORDS: ammonium formate, escitalopram, human plasma, imipramine, methyl-*tert*-butyl ether.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: bmdishaq@yahoo.com