

UPLC-MS/MS法测定人血浆中奥氮平、利培酮和帕潘立酮的浓度

丰丽蕊^{1*}, 杨博涵², 王雪芹^{2#}, 郭强² (1. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)08-1045-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.08.10

摘要 目的: 建立同时测定人血浆中奥氮平、利培酮和帕潘立酮浓度的方法。方法: 血浆样品经液-液萃取后, 以盐酸丁螺环酮为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定。色谱柱为 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈, 流动相为甲醇-0.01 mol/L 甲酸铵水溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 45 °C, 进样量为 5 μL。采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为 m/z 313.29→256.25 (奥氮平)、 m/z 411.42→191.19 (利培酮)、 m/z 427.45→207.18 (帕潘立酮) 和 m/z 386.43→122.37 (内标)。结果: 奥氮平、利培酮、帕潘立酮血药浓度分别在 0.426~108.954、0.213~54.476、0.213~54.476 ng/mL 范围内线性关系良好; 日内、日间 RSD < 20%, 方法回收率分别为 83.3%~112.9%, 90.0%~109.8% 和 95.2%~114.9%, 提取回收率分别为 65.5%~95.0%、73.9%~98.5% 和 73.6%~99.4%, 基质效应和稀释效应均不影响待测物血药浓度的测定。采用该法测得 100 例精神分裂症患者奥氮平、利培酮和帕潘立酮的血药浓度分别为 (103.3 ± 73.6)、(13.1 ± 13.1) 和 (23.2 ± 20.0) ng/mL。结论: 该方法简单、快速、灵敏、特异性高, 可用于奥氮平、利培酮和帕潘立酮血药浓度测定及药动学研究。

关键词 奥氮平; 利培酮; 帕潘立酮; 超高效液相色谱-串联质谱法; 血药浓度

Simultaneous Determination of Olanzapine, Risperidone and Paliperidone in Human Plasma by UPLC-MS/MS

FENG Lichun¹, YANG Bohan², WANG Xueqin², GUO Qiang² (1. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the concentration determination of olanzapine, risperidone and paliperidone in human plasma. METHODS: After liquid-liquid extraction, using bupirone hydrochloride as internal standard, the concentration of plasma sample was determined by UPLC-MS/MS. The determination was performed on ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.01 mol/L ammonium formate solution (gradient elution) at flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was 45 °C, and sample size was 5 μL. The electrospray ionization source was adopted for positive ion scanning under MRM mode. Ion-pairs for quantitative analysis were as follows: m/z 313.29→256.25 (olanzapine), m/z 411.42→191.19 (risperidone), m/z 427.45→207.18 (paliperidone) and m/z 386.43→122.37 (internal standard). RESULTS: The linear ranges of olanzapine, risperidone and paliperidone were 0.426-108.954, 0.213-54.476, 0.213-54.476 ng/mL, respectively. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 20%. The recoveries of them ranged 83.3%-112.9%, 90.0%-109.8% and 95.2%-114.9%, respectively. Extraction recoveries ranged 65.5%-95.0%, 73.9%-98.5% and 73.6%-99.4%, respectively. Both plasma matrix effect and dilute effect didn't influence the determination of plasma concentration. The plasma concentrations of olanzapine, risperidone and paliperidone in 100 schizophrenia patients were (103.3 ± 73.6), (13.1 ± 13.1) and (23.2 ± 20.0) ng/mL, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, sensitive and specific. It can be used for the determination of plasma concentration and pharmacodynamic study of olanzapine, risperidone and paliperidone.

KEYWORDS Olanzapine; Risperidone; Paliperidone; UPLC-MS/MS; Plasma concentration

奥氮平(Olanzapine)是新型的非典型抗精神病药, 其化学名为 2-甲基-4-(4-甲基-1-哌嗪)-10H-噻吩并[2, 3-b][1, 5]苯并二氮杂卓。与传统抗精神病药比较, 奥氮平引发椎体外系或其他不良反应的概率更低, 故成为临床一线抗精神病药, 主要用于治疗精神分裂症^[1-4]。利培酮(Risperidone)是继氯氮平之后开发出的另一个非典型抗精神病药, 帕潘立酮(Paliperidone)是其代谢产物,

* 硕士研究生。研究方向: 药理学、药动学。电话: 0371-63388129。E-mail: 561309157@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0371-63388129。E-mail: 244852539@qq.com

同时也可用于精神病的治疗。帕潘立酮是强有力的多巴胺D₂受体拮抗药, 可有效改善患者精神分裂症的阳性和阴性症状, 且较少引发运动功能抑制、强直性昏厥及锥体外系反应等, 耐受性良好^[5-7]。在临床上, 奥氮平和利培酮联合应用的情况较多, 但鲜有同时测定其血药浓度的相关报道。因此, 本研究建立了同时测定人血浆中奥氮平、利培酮和帕潘立酮的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法, 以为治疗药物监测、药动学及生物等效性研究、临床用药方案的调整提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC™超高效液相色谱仪、Quattro Premier XE串联质谱检测器(美国Waters公司);TD5A-WS型离心机(长沙湘麓离心机厂);Microfuge 22R型高速离心机(美国贝克曼公司);HGC-24A型氮吹仪(天津市恒奥科技有限公司);XR 205SM-DR型电子天平(瑞士Precisa公司)。

1.2 药品与试剂

奥氮平对照品(批号:100948-200801,供含量测定用)和利培酮对照品(批号:100570-200401,供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供;帕潘立酮对照品(日本TCI公司,批号:P1897,纯度:>98%);盐酸丁螺环酮对照品(DLHT,内标,西南合成制药股份有限公司,批号0304002,纯度:>99.5%)。甲基叔丁基醚、甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

1.3 空白血浆

空白血浆来自于郑州大学第一附属医院的健康受试者。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:甲醇(A相)-0.01 mol/L 甲酸铵水溶液(B相,用甲酸调节pH值至3.5),梯度洗脱(0~1.5 min, 70% B→10% B; 1.5~2.5 min, 10% B; >2.5~2.6 min, 10% B→70% B; >2.6~4 min, 70% B);流速:0.2 mL/min;柱温:45 °C;进样量:5 μL。

采用电喷雾电离源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测;喷雾电压:3.50 kV;雾化气(氮气)流量:499 L/h,辅助气(氮气)流量:46 L/h;离子源温度:110 °C,碰撞气(氩气)流速:0.2 mL/min;用于定量分析的离子对分别为 m/z 313.29→256.25(奥氮平)、 m/z 411.42→191.19(利培酮)、 m/z 427.45→207.18(帕潘立酮)、 m/z 386.43→122.37(内标);用于定性分析的离子对分别为 m/z 313.29→198.24(奥氮平)、 m/z 411.42→110.55(利培酮)、 m/z 427.45→110.68(帕潘立酮)、 m/z 386.43→109.43(内标)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液 精密称取奥氮平、利培酮、帕潘立酮对照品各适量,用甲醇溶解并稀释,配制成奥氮平、利培酮、帕潘立酮质量浓度分别为53.2、51.1、50.8 μg/mL的对照品贮备液,于2~8 °C下冷藏保存,备用。

2.2.2 对照品标准工作液 取奥氮平对照品贮备液适量,用甲醇稀释,得质量浓度分别为10.64、21.28、42.56、85.12、170.24、340.48、680.96、1 361.92、2 723.84 ng/mL的奥氮平标准工作液。取利培酮、帕潘立酮对照品贮备液各适量,用80%甲醇稀释,得质量浓度分别均为5.32、10.64、21.28、42.56、85.12、170.24、340.48、680.96、1 361.92 ng/mL的标准工作液,于2~8 °C下冷藏保存,

备用。

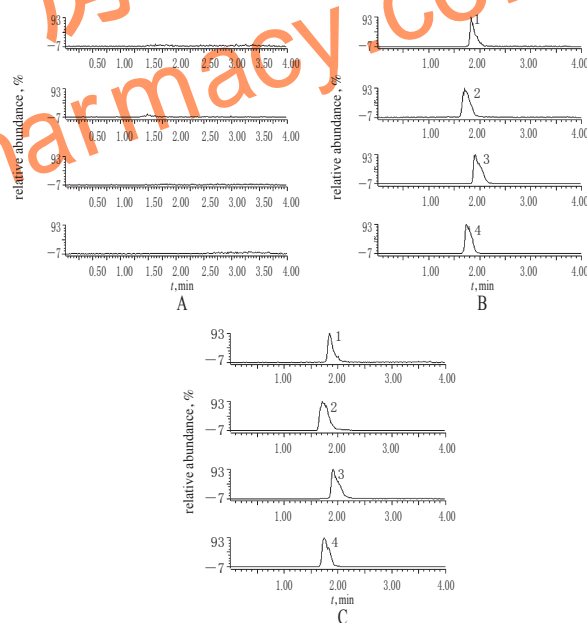
2.2.3 内标溶液 精密称取内标对照品适量,用甲醇溶解并稀释,配制成质量浓度为49.9 μg/mL的内标贮备液。取内标贮备液适量,用80%甲醇稀释,得质量浓度为20 ng/mL的内标溶液,于2~8 °C下冷藏保存,备用。

2.3 血浆样品处理

取内标溶液20 μL,用氮气流吹干,加入空白血浆0.5 mL和氨水10 μL,涡旋混匀0.5 min;加入萃取剂(甲基叔丁基醚)3.5 mL,涡旋混匀3 min,920×g离心10 min;取上清液3.0 mL,于40 °C水浴中以氮气流吹干,残渣用80%甲醇100 μL复溶,涡旋混匀2 min,12 870×g离心10 min,吸取上清液5 μL,进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取6份来自于不同受试者的空白血浆,经“2.3”项下方法处理后,进样分析,得色谱图1A;配制含奥氮平、利培酮和帕潘立酮的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,得色谱图1B;患者血浆样品按“2.3”项下方法处理后,进样分析,得色谱图1C。结果显示,奥氮平、利培酮、帕潘立酮和内标的保留时间分别为1.70、1.92、1.74和1.84 min,血浆中的内源性物质对测定无明显干扰。



A.空白血浆;B.空白血浆+内标+待测物;C.患者服药后的血浆样品+内标;1.内标;2.奥氮平;3.利培酮;4.帕潘立酮

A. blank plasma; B. blank plasma + internal standard + components under test; C. plasma sample of patients after medication + internal standard; 1. internal standard; 2. olanzapine; 3. risperidone; 4. paliperidone

图1 典型色谱图

Fig 1 Representative chromatograms

2.4.2 标准曲线的绘制和定量下限(LLOQ)的考察 取空白血浆0.5 mL,加入相应质量浓度的标准工作液,分别配制成奥氮平质量浓度为0.426、0.851、1.702、3.405、6.810、13.619、27.239、54.477、108.954 ng/mL,利培酮和

帕潘立酮质量浓度均为0.213、0.426、0.851、1.702、3.405、6.810、13.619、27.238、54.476 ng/mL的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度(x)为横坐标、待测物与内标的峰面积比值(y)为纵坐标,用加权法(加权系数 $w=1/x$)进行线性回归,得回归方程分别为: $y_{\text{奥}}=0.522\ 875x_{\text{奥}}-0.912\ 338$ (奥氮平, $r=0.994\ 2, n=6$)、 $y_{\text{利}}=5.404\ 218x_{\text{利}}+0.044\ 818$ (利培酮, $r=0.999\ 1, n=6$)、 $y_{\text{帕}}=3.048\ 315x_{\text{帕}}+0.294\ 351$ (帕潘立酮, $r=0.998\ 7, n=6$)。结果表明,奥氮平、利培酮和帕潘立酮血药浓度分别在0.426~108.954、0.213~54.476、0.213~54.476 ng/mL范围内线性关系良好,其LLOQ分别为0.426、0.213、0.213 ng/mL。

2.4.3 精密度试验 分别配制奥氮平 LLOQ 浓度(0.426 ng/mL)血浆样品和低、中、高质量浓度(0.851、3.405、54.478 ng/mL,下同)的质控样品,利培酮 LLOQ 浓度(0.213 ng/mL)血浆样品和低、中、高质量浓度(0.426、1.702、27.238 ng/mL,下同)的质控样品,帕潘立酮 LLOQ 浓度(0.213 ng/mL)血浆样品和低、中、高质量浓度(0.426、1.702、27.238 ng/mL,下同)的质控样品,每浓度取6样本分析,连续测定3 d,根据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度。结果显示,LLOQ浓度血浆样品的日内、日间RSD<20%,各质控样品的日内、日间RSD<15%,详见表1。

表1 精密度试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of precision tests($\bar{x} \pm s$)

待测物	理论质量浓度, ng/mL	日内精密性($n=6$)		日间精密性($n=3$)	
		实测质量浓度, ng/mL	RSD, %	实测质量浓度, ng/mL	RSD, %
奥氮平	0.426	0.455±0.076	16.8	0.421±0.088	18.7
	0.851	0.835±0.151	14.1	0.739±0.137	14.6
	3.405	3.335±0.363	10.9	3.280±0.400	12.2
	54.478	56.222±3.012	5.4	54.828±5.774	10.5
利培酮	0.213	0.232±0.022	9.7	0.201±0.112	14.3
	0.426	0.431±0.041	9.7	0.479±0.062	12.8
	1.702	1.694±0.162	9.3	1.883±0.204	10.5
	27.238	28.244±0.546	1.9	28.126±3.526	12.5
帕潘立酮	0.213	0.209±0.030	12.6	0.222±0.152	13.3
	0.426	0.453±0.033	7.7	0.461±0.055	11.0
	1.702	1.729±0.114	6.3	1.823±0.133	7.1
	27.238	28.888±0.822	2.9	27.386±2.804	10.2

2.4.4 回收率试验 分别配制奥氮平、利培酮、帕潘立酮低、中、高质量浓度质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,记录峰面积;配制相应质量浓度的混合对照品溶液,进样测定,记录峰面积。将两者的峰面积进行比较,计算提取回收率;将质控样品的实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,计算方法回收率。结果显示,奥氮平、利培酮、帕潘立酮的提取回收率分别为65.5%~95.0%、73.9%~98.5%和73.6%~99.4%(RSD<15%),方法回收率分别为83.3%~112.9%、90.0%~109.8%和95.2%~114.9%(RSD<15%),详见表2。

2.4.5 基质效应 取空白血浆适量,按“2.3”项下方法处理后,分别加入相应质量浓度的待测物标准工作液各5

表2 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

待测物	理论质量浓度, ng/mL	实测质量浓度, ng/mL	提取回收率		方法回收率	
			提取回收率, %	RSD, %	方法回收率, %	RSD, %
奥氮平	0.851	0.835±0.151	76.9±11.4	14.9	98.1±14.8	14.1
	3.405	3.335±0.363	84.0±11.0	13.1	97.9±10.7	10.9
	54.478	5.222±3.012	79.3±9.3	11.8	103.2±5.5	5.4
利培酮	0.426	0.444±0.033	86.7±11.8	13.6	101.7±8.1	7.8
	1.702	1.693±0.161	83.8±9.9	11.8	99.2±9.2	9.3
	27.238	28.244±0.542	84.9±8.0	9.4	103.7±2.0	1.9
帕潘立酮	0.426	0.451±0.032	88.3±11.1	12.6	106.7±8.2	7.7
	1.702	1.729±0.111	81.7±8.1	9.9	101.7±6.5	6.3
	27.238	28.886±0.822	84.3±4.2	5.0	106.0±3.0	2.9

份,进样分析,得峰面积 A ;以流动相代替空白血浆进行上述操作,进样分析,得峰面积 B ,基质效应(MF)= $A/B \times 100\%$ 。结果显示,奥氮平、利培酮、帕潘立酮和内标的MF分别为85.0%~106.9%、93.0%~102.1%、93.6%~101.7%和96.5%~100.3%,均在85.0%~115.0%范围内,表明在“2.1”项色谱与质谱条件下,基本可忽略基质效应的影响^[8-9]。

2.4.6 稳定性试验 分别配制奥氮平、利培酮、帕潘立酮低、中、高质量浓度质控样品各5份,分别考察其新鲜配制后,室温放置10 h后再处理、处理后室温放置10 h、经历3次冷冻-解冻循环(-20~25℃)、-20℃放置10 h等条件下的稳定性。结果显示,各样品在上述条件下稳定性均良好,RSD<15%($n=5$)。

2.4.7 稀释效应 在空白血浆中分别加入奥氮平、利培酮和帕潘立酮对照品贮备液各适量,使其血药浓度分别为其线性范围上限的2倍,再用空白血浆稀释1倍,按“2.3”项下方法处理后,根据当日标准曲线计算各待测物的实测质量浓度,各样品平行操作5次,其RSD<15%,表明血药浓度测定不受样品稀释的影响^[8-9]。

2.5 临床应用

采用上述UPLC-MS/MS法测定100例精神分裂症患者血浆中奥氮平、利培酮和帕潘立酮的浓度。纳入的患者均处于精神分裂症及其他有严重阳性或阴性症状精神病急性期和维持期,且单用或联合使用奥氮平及利培酮治疗。患者年龄12~79岁,平均年龄(41.3±25.1)岁,其中男性55例,女性45例;单次口服奥氮平的剂量为5~20 mg/d,单次口服利培酮的剂量为4~8 mg/d。

所有患者连续服药3 d后(药品说明书指出,此时血药浓度已达稳态),于第4天晨起空腹静脉采血5 mL,经肝素钠抗凝后,920×g离心10 min,取上清液,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图(对于超出线性范围上限的血浆样品,分别进行稀释后再进样测定)。结果显示,100例患者体内奥氮平、利培酮和帕潘立酮的血药浓度分别为(103.3±73.6)、(13.1±13.1)和(23.2±20.0)ng/mL。

3 讨论

本研究对不同内标化合物进行筛选。结果发现,DLHT为抗精神失常药,具有与待测物类似的药理作用,

且与利培酮和帕潘立酮的结构类似;同时,其分子结构中含有碱性氨基基团,化学稳定性良好;加之其定量、定性离子对的质谱响应较强,故最终选择DLHT作为内标。

在流动相优化过程中,笔者发现待测物均含有碱性氨基基团,故在流动相中适量加入甲酸,以提高其离子化效率、增强质谱响应、优化色谱峰形。使用梯度洗脱,可进一步清除色谱柱上的残留物质,保证后续检测结果的准确性;同时,可减小残留物质对UPLC-MS/MS系统的污染,缩短样品分析时间。

在定性、定量离子对的选择过程中,笔者发现,在ESI正离子模式下,奥氮平[M+1]峰(m/z 313.29)产生的碎片离子以 m/z 256.25最强、 m/z 198.24次之,利培酮[M+1]峰(m/z 411.42)产生的碎片离子以 m/z 191.19最强、 m/z 110.55次之,帕潘立酮[M+1]峰(m/z 427.45)产生的碎片离子以 m/z 207.18最强、 m/z 110.68次之,内标[M+1]峰(m/z 386.43)产生的碎片离子以 m/z 122.37最强、 m/z 109.43次之。因此,选择响应最强的离子对定量,次强的离子对定性。在本试验优化的色谱与质谱条件下,奥氮平、利培酮、帕潘立酮和内标的保留时间分别为1.70、1.92、1.74和1.84 min,各待测物色谱峰形良好,分析时间仅为4 min。

血浆样品前处理采用液-液萃取法,分别选用乙醚、乙酸乙酯、乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚等有机溶剂作为萃取溶剂,上清液以氮气吹干,用80%甲醇复溶,离心后进样测定,考察不同溶剂的提取回收率。结果表明,采用甲基叔丁基醚为萃取溶剂,可使待测物与内源性物质得以充分分离,并可提高方法的精密度和提取回收率。此外,在血浆样品处理过程中加入适量氨水,还可进一步提高奥氮平的提取效率,但对利培酮和帕潘立酮无明显影响。

奥氮平、利培酮和帕潘立酮血药浓度测定具有一定的难度,相关文献较少,现有文献以HPLC法居多^[10-13],UPLC-MS/MS法较少^[14-15],且并非同时测定三者血药浓度。本方法与已有文献比较,具有如下优势:(1)将提取溶剂由乙醚改为甲基叔丁基醚,并适量加入氨水使得待测物的提取效率得以提高;(2)采用MRM模式扫描,能有效排除基质干扰,且分析时间短、速度快、所需样品量少,适合大批量生物样品血药浓度的检测;(3)所选择的离子对既可定性,亦可定量,更便于临床上血药浓度监测及用药方案的调整;(4)首次建立了同时测定人体内奥氮平、利培酮和帕潘立酮血药浓度的方法。

综上所述,本试验建立的UPLC-MS/MS法简便、灵

敏、分析时间短、特异性及实用性强,可用于临床血药浓度监测及药动力学研究。

参考文献

- [1] 孙文文,程宇琪,陈娟瑜,等. 新型抗精神病药物血药浓度与临床疗效的研究进展[J]. 精神医学杂志,2014,27(4):312-315.
- [2] 欧阳红涛,陈玉祥. 非典型性抗精神病药物相关的相互作用[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(34):86-89.
- [3] 宋伟明. 抗精神病药剂型研究进展[J]. 中国药房,2003,14(8):497-498.
- [4] 马燕,李方捷,毛叶萌. 我中心奥氮平致不良反应报告分析[J]. 中国药房,2013,24(24):2235-2237.
- [5] 王崑,杨小波,闫润枢,等. 帕利哌酮缓释片和利培酮片治疗首发精神分裂症的疗效和安全性开放性观察对照研究[J]. 中外医疗,2014(17):16-18.
- [6] 余翔,廖节凤,许佳燕. 帕利哌酮缓释片与奥氮平治疗首发精神分裂症患者的对照研究[J]. 临床精神医学杂志,2011,21(4):270-271.
- [7] 杨栋,谌益华. 帕利哌酮缓释片与奥氮平治疗精神分裂症患者的对照研究[J]. 临床精神医学杂志,2012,22(4):263-264.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:363-369.
- [9] 《化学药物临床药动力学研究技术指导原则》课题研究组. 化学药物临床药动力学研究技术指导原则[S]. 2005-03-18.
- [10] 季平,袁浩宇,易红,等. RP-HPLC法测定帕潘立酮原料药在大鼠体内的血药浓度及其药动力学研究[J]. 中国药房,2013,24(17):1569-1571.
- [11] 温全胜,张传福,卢文芬,等. 精神分裂症患者奥氮平治疗的剂量、血药浓度及临床效应之间的关系研究[J]. 北方药学,2015,12(2):103-104.
- [12] 王丹逢,黄雄,朱海兵,等. 奥氮平和丙戊酸钠治疗急性躁狂发作的短期疗效与血药浓度分析[J]. 临床医学工程,2014,21(8):999-1000.
- [13] 瞿发林,过伟,陈颖,等. HPLC法同时测定人血浆中氯氮平和奥氮平浓度[J]. 解放军药学报,2015,31(3):220-223.
- [14] 李红霞,杨东菁,范岷,等. LC-MS/MS同时测定人血浆中的利培酮和9-羟基利培酮[J]. 华西药学杂志,2011,26(4):369-371.
- [15] 温预关,廖日房,王伟华. LC-ESI-MS/MS快速测定人血浆中奥氮平的浓度及临床应用[J]. 中国药理学杂志,2009,44(23):1815-1817.

(收稿日期:2016-03-24 修回日期:2016-12-20)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅