

LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮的浓度

楼江^{1*}, 严伟¹, 王刚¹, 王飞¹, 王峰², 李焕德^{2#} (1. 杭州市第一人民医院药学部, 杭州 310006; 2. 中南大学湘雅二医院临床药学研究室, 长沙 410011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)26-3639-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.26.11

摘要 目的: 建立同时测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮浓度的方法。方法: 血浆样品经液-液萃取后, 以AF2672为内标, 采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定。色谱柱为Xtimate™ C₁₈, 流动相为乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)(37:63, V/V, pH=3.2), 流速为0.25 mL/min, 柱温为40 ℃, 进样量为6 μL。采用电喷雾电离源, 以多反应离子监测进行正离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 411.26→191.02(利培酮)、*m/z* 427.21→206.91(9-羟基利培酮)、*m/z* 418.00→175.95(内标)。结果: 利培酮、9-羟基利培酮血药浓度分别在0.2~50.0、1.0~200.0 ng/mL 范围内线性关系良好(*r*分别为0.999 7、0.998 7); 日内、日间RSD<15%, 方法回收率分别为92.42%~104.81%、94.51%~100.57%, 基质效应分别为98.33%~107.09%、91.05%~105.80%, 提取回收率分别为78.11%~92.62%、76.32%~85.09%。采用该法测得78例精神分裂症患者体内利培酮和9-羟基利培酮的血药浓度分别为(13.58±8.31)、(25.62±15.52)ng/mL。结论: 该方法操作简便、专属性强、灵敏度高, 可用于口服利培酮患者的常规治疗药物监测和急性中毒分析。

关键词 液相色谱-串联质谱法; 利培酮; 9-羟基利培酮; 血药浓度

Determination of Risperidone and 9-hydroxyrisperidone in Human Plasma by LC-MS/MS

LOU Jiang¹, YAN Wei¹, WANG Gang¹, WANG Fei¹, WANG Feng², LI Huande² (1. Dept. of Pharmacy, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China; 2. Clinical Pharmacy Research Institute, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of risperidone (RIS) and 9-hydroxyrisperidone (9-OH-RIS) in human plasma. METHODS: After liquid-liquid extraction of plasma sample, using AF2672 as internal standard (IS), LC-MS/MS was adopted. The determination was performed on Xtimate™ C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% formic acid) (37:63, V/V, pH=3.2) at the flow rate of 0.25 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and the sample size was 6 μL. The ESI was equipped and quantitative analysis was operated in positive ion and MRM mode. The mass transition ion-pairs were followed as *m/z* 411.26→191.02 for RIS, *m/z* 427.21→206.91 for 9-OH-RIS and *m/z* 418.00→175.95 for IS. RESULTS: The linear range of RIS was 0.2-50.0 ng/mL (*r*=0.999 7) and 9-OH-RIS was 1.0-200.0 ng/mL (*r*=0.998 7). RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 15%, and the method recoveries were 92.42%-104.81% and 94.51%-100.57%; matrix effects were 98.33%-107.09% and 91.05%-105.80%; extraction recoveries were 78.11%-92.62% and 76.32%-85.09%, respectively. The plasma concentrations of RIS and 9-OH-RIS in 78 schizophrenic patients were (13.58±8.31) and (25.62±15.52) ng/mL. CONCLUSIONS: The developed method is simple, sensitive and specific, which is suitable for routine drug monitoring and acute toxic analysis in patients receiving risperidone.

KEYWORDS LC-MS/MS; Risperidone; 9-hydroxyrisperidone; Plasma concentration

利培酮为苯并异噁唑衍生物, 是精神分裂症的一线治疗药物, 口服吸收迅速, 经细胞色素 P₄₅₀ 酶代谢, 9-羟基利培酮是其活性代谢物, 与利培酮的药理作用相似, 临床上常把利培酮及9-羟基利培酮称为利培酮总活性物^[1]。相关研究发现, 利培酮及9-羟基利培酮药动学的个体差异较大, 给予相同剂量后, 部分患者可能出现催乳素升高、代谢紊乱等不良反应, 可能与其血药浓度有关^[2-4]。利培酮总活性物在精神分裂症患者中的治疗窗

较窄(20~60 ng/mL)、个体间差异大, 建议对服用利培酮的患者进行血药浓度监测, 再根据监测结果及时调整剂量, 以提高其临床疗效并减少不良反应的发生^[5-7]。目前, 国内外已有研究报道人血浆中利培酮及9-羟基利培酮的分析方法。Jones T等^[8]采用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮的浓度, 由于此方法具有样品前处理复杂、分析时间较长、灵敏度低等缺点, 尚无法满足临床血药浓度监测的需求; 有研究采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮的浓度, 虽具有良好的专属性和灵敏度, 但存在线性范围过窄或定量下限过高等缺点, 不适用于精神病患者常规治疗药物监测或急性

* 药师。研究方向: 药动学、临床药学。电话: 0571-56007191。
E-mail: jianglou5855@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 药动学、临床药学。电话: 0731-4436720。E-mail: lihuande1953@126.com

中毒的定量分析^[9-11]。为此,本研究在已有文献的基础上,建立了新的LC-MS/MS法,用于利培酮及9-羟基利培酮的常规血药浓度监测和急性中毒分析,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Acquity™型高效液相色谱系统、Micromass Quattro Premier XE型质谱检测器和Masslynx V4.1工作软件(美国Waters公司);AG285型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);3-18K型低温高速冷冻离心机(美国Sigma公司);MTN-2088D型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);XW-80A型涡旋振荡器(上海琪特分析仪器有限公司);TDZ5-WS型低速离心机(长沙市平凡仪器仪表有限公司)。

1.2 药品与试剂

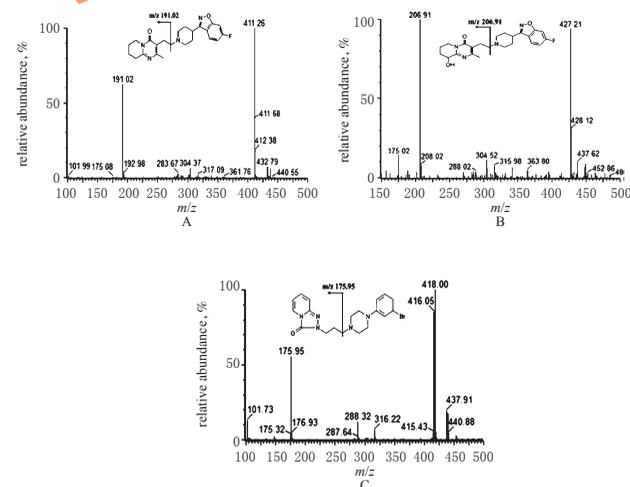
利培酮对照品(批号:107K47006,纯度:≥98%)、9-羟基利培酮对照品(批号:038K47152,纯度:≥98%)均购自美国Sigma公司;AF2672对照品(内标,意大利Angelini公司,批号:RS01107,纯度:99.9%);甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵均为色谱纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Xtimate™ C₁₈(150 mm×2.1 mm, 3 μm);流动相:乙腈-10 mmol/L乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)(37:63, V/V, pH=3.2);流速:0.25 mL/min;柱温:40℃;进样量:6 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。碰撞气:氦气;毛细管电压:300 V;锥孔气体流速:50 L/h;干燥气体流速:600 L/h;用于定量分析的离子对分别为 m/z 411.26→191.02(利培酮)、 m/z 427.21→206.91(9-羟基利培酮)、 m/z 418.00→175.95(内标),质谱特征离子图见图1。



A. 利培酮; B. 9-羟基利培酮; C. 内标

A. risperidone; B. 9-hydroxyrisperidone; C. internal standard

图1 质谱特征离子图

Fig 1 Mass spectrograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 利培酮标准工作液 精密称取利培酮对照品5.0 mg,用甲醇溶解并定容至50 mL,得质量浓度为100.0 μg/mL的利培酮对照品贮备液;取上述贮备液适量,用甲醇稀释,得质量浓度分别为1.0、0.1 μg/mL的利培酮标准工作液,置于4℃冰箱中保存,备用。

2.2.2 9-羟基利培酮标准工作液 精密称取9-羟基利培酮对照品6.0 mg,用甲醇溶解并定容至100 mL,得质量浓度为60.0 μg/mL的9-羟基利培酮对照品贮备液;取上述贮备液适量,用甲醇稀释,得质量浓度分别为6.0、0.6 μg/mL的9-羟基利培酮标准工作液,置于4℃冰箱中保存,备用。

2.2.3 内标溶液 精密称取内标对照品2.0 mg,用甲醇溶解并定容至100 mL,得质量浓度为20.0 μg/mL的内标贮备液;取上述贮备液2.0 mL,用甲醇定容至100 mL,得质量浓度为0.4 μg/mL的内标溶液,置于4℃冰箱中保存,备用。

2.3 血浆样品处理

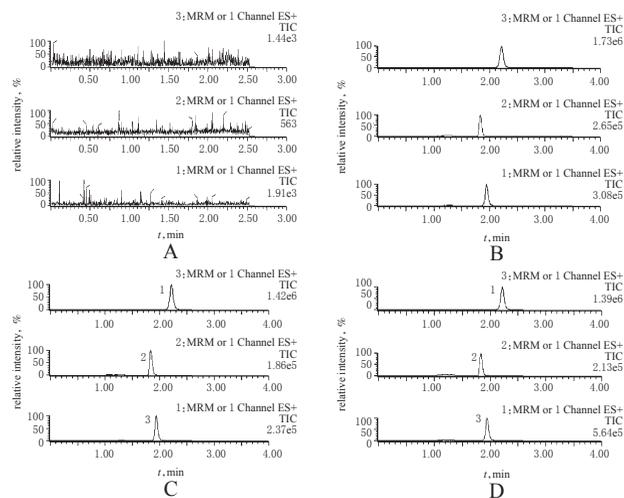
采用液-液萃取法。取血样适量,以离心半径14.98 cm、转速3 000 r/min离心5 min,取上清液300 μL置于2.0 mL EP管中,加入氨水20 μL及内标溶液50 μL,充分摇匀后,加萃取剂乙酸乙酯1 200 μL,涡旋振荡2 min,静置1 min,取上清液1 000 μL,于常温下以氮气流吹干,残渣用甲醇100 μL复溶,涡旋混匀后,于4℃下以离心半径6.35 cm、转速12 000 r/min离心5 min,吸取上清液60 μL至进样瓶中,备测。

2.4 方法学考察

根据2015年版《中国药典》^[12]对该方法的专属性、线性、精密度、回收率和稳定性等进行考察。

2.4.1 专属性考察 取不同来源的空白血浆6份,除不加内标外,其余按“2.3”项下方法操作,进样分析,得色谱图2A;将适量利培酮及9-羟基利培酮对照品及内标对照品用甲醇稀释,进样分析,得色谱图2B;将一定质量浓度的利培酮及9-羟基利培酮标准工作液加至空白血浆中,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,得色谱图2C;取服用利培酮12 h后患者的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,得色谱图2D。结果显示,血浆中利培酮、9-羟基利培酮和内标色谱峰峰形良好,分离完全,且不受内源性物质的干扰,其保留时间分别为1.94、1.84和2.22 min。

2.4.2 标准曲线的绘制和定量下限的考察 取空白血浆8份,加入不同质量浓度的利培酮、9-羟基利培酮标准工作液各适量,振荡摇匀,配制成利培酮质量浓度为0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL和9-羟基利培酮质量浓度为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、200.0 ng/mL的标准血浆样品,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、待测物与内标峰面积的比值(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为:利培酮 $y=2.479 \times 10^{-2}x -$



A. 空白血浆; B. 利培酮+9-羟基利培酮+内标; C. 空白血浆+利培酮+9-羟基利培酮+内标; D. 患者服用利培酮12 h后的血浆样品+内标; 1. 内标; 2. 9-羟基利培酮; 3. 利培酮

A. blank plasma; B. risperidone + 9-hydroxyrisperidone + internal standard; C. blank plasma + risperidone + 9-hydroxyrisperidone + internal standard; D. plasma sample of patients 12 h after receiving + internal standard; 1. internal standard; 2. 9-hydroxyrisperidone; 3. risperidone

图2 典型色谱图

Fig 2 Representative chromatograms

7.029×10^{-4} ($r=0.9997$), 9-羟基利培酮 $y=4.157 \times 10^{-3}x + 1.042 \times 10^{-3}$ ($r=0.9987$)。结果表明,利培酮、9-羟基利培酮血药浓度分别在0.2~50.0、1.0~200.0 ng/mL范围内线性关系良好,定量下限分别是0.2、1.0 ng/mL。

2.4.3 精密度与准确度试验 配制利培酮低、中、高质量浓度(0.5、5.0、40.0 ng/mL)和9-羟基利培酮低、中、高质量浓度(2.0、20.0、160.0 ng/mL)的质控样品,按“2.3”项下方法处理后,平行测定5次,考察日内精密度;连续测定4 d,根据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度,考察日间精密度。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,计算方法回收率,考察准确度。结果显示,各质控样品日内、日间RSD<15%,方法回收率分别为92.42%~104.81%、94.51%~100.57%,符合相关指导原则的基本要求^[12],详见表1。

表1 精密度与准确度试验结果($\bar{x} \pm s$)

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

待测物	理论质量浓度, ng/mL	日内精密度(n=5)			日间精密度(n=4)		
		实测质量浓度, ng/mL	RSD, %	方法回收率, %	实测质量浓度, ng/mL	RSD, %	方法回收率, %
利培酮	0.5	0.48±0.03	6.63	96.03	0.49±0.04	8.26	98.02
	5.0	5.03±0.38	7.47	100.15	5.24±0.34	6.47	104.81
	40.0	36.96±1.18	3.19	92.42	38.80±2.32	5.99	97.05
9-羟基利培酮	2.0	1.95±0.22	11.12	97.57	2.01±0.20	9.77	100.57
	20.0	18.90±1.74	9.23	94.51	19.44±2.08	10.70	97.24
	160.0	152.80±3.66	2.40	95.58	156.00±5.76	8.26	97.52

2.4.4 基质效应和提取回收率试验 分别配制利培酮低、中、高质量浓度(0.5、5.0、40.0 ng/mL)和9-羟基利培酮低、中、高质量浓度(2.0、20.0、160.0 ng/mL)的质控样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,得相应色谱峰面

积(A_1);取空白血浆适量,按“2.3”项下方法处理后,加入相应质量浓度的利培酮和9-羟基利培酮标准工作液,使最终质量浓度与前者对应,进样分析,得相应色谱峰面积(A_2);以甲醇为溶剂,配制上述质量浓度的利培酮、9-羟基利培酮对照品溶液,进样分析,得相应色谱峰面积(A_3)。各样品平行测定5次,基质效应($\%$)= $A_2/A_3 \times 100\%$,提取回收率($\%$)= $A_1/A_2 \times 100\%$ 。结果显示,利培酮的基质效应为98.33%~107.09%,提取回收率为78.11%~92.62% (RSD<15%, n=5);9-羟基利培酮的基质效应为91.05%~105.80%,提取回收率为76.32%~85.09% (RSD<15%, n=5),这表明,在“2.1”项色谱与质谱条件下,可忽略基质效应的影响^[12],且提取回收率较为稳定,详见表2。

表2 基质效应与提取回收率试验结果(n=5)

Tab 2 Results of matrix effect and extraction recovery tests(n=5)

待测物	理论质量浓度, ng/mL	基质效应, %	提取回收率, %
利培酮	0.5	107.09	78.11
	5.0	98.33	92.62
	40.0	103.95	81.88
9-羟基利培酮	2.0	105.80	76.32
	20.0	91.05	85.09
	160.0	97.74	77.68
内标	50.0	100.62	80.94

2.4.5 稳定性试验 配制利培酮低、中、高质量浓度(0.5、5.0、40.0 ng/mL)和9-羟基利培酮低、中、高质量浓度(2.0、20.0、160.0 ng/mL)的质控样品,分别考察其室温或自动进样器中放置0、1、2、6、12 h,经反复冻融(-20℃~室温)0、1、2、3、4次,-80℃冷冻保存0、10、20、40、60 d等条件下的稳定性。结果显示,各质控样品在上述条件下稳定性良好,RSD<15% (n=3)。

2.5 临床应用

采用上述LC-MS/MS法测定78例精神分裂症患者血浆中利培酮、9-羟基利培酮的浓度。其中,男、女各39例,平均年龄为(35.29±15.76)岁,口服利培酮的平均剂量为(4.62±1.09)mg。

所有患者连续服药7 d后(此时血药浓度已达稳态),于第8天晨起采集静脉血4 mL,经低速离心后,按“2.3”项下方法处理,进样分析。结果显示,78例患者体内利培酮的血药浓度为1.7~46.2 ng/mL,平均血药浓度为(13.58±8.31)ng/mL;9-羟基利培酮的血药浓度为5.6~109.7 ng/mL,平均血药浓度为(25.62±15.52)ng/mL;总活性物血药浓度为(39.24±25.76)ng/mL。其中,总活性物血药浓度在治疗窗(20~60 ng/mL)内的有53例,高于治疗窗的有19例,低于治疗窗的有6例。通过对利培酮及9-羟基利培酮血药浓度的监测,当患者血药浓度高于或低于治疗窗时,医师可及时进行剂量调整,有助于实现个体化给药。

3 讨论

LC-MS/MS法是将HPLC的强分离能力与质谱的高

专属性和高灵敏度相结合的定量分析方法,但在使用过程中仍需选择合适的色谱、质谱条件以及前处理方法,以便快速定量分析待测物。

3.1 流动相的选择

相关研究发现,在流动相中加入少量的乙酸铵和甲酸可增加流动相的极性,改善色谱峰峰形,提高待测物的分离效果^[13]。本课题组曾分别考察了单用5、10、15、20 mmol/L 乙酸铵溶液和混合不同浓度的甲酸对待测物色谱行为的影响,结果发现将10 mmol/L 乙酸铵溶液与0.1%甲酸混合作为水相(pH=3.2)时,利培酮、9-羟基利培酮和内标的分离度良好,且不受血浆内源性物质的干扰,保留时间也较短。此外,流速可以影响待测物色谱峰的保留时间和峰形,流速过大,会产生较大的柱压;流速太小,则易引起色谱峰拖尾、变宽或保留时间延长^[13]。本研究经调整后,将流速设定为0.25 mL/min,分离效果及峰形均较好。

3.2 质谱条件的选择

LC-MS/MS法根据离子化接口方式的不同,分为ESI和大气压化学电离(APCI),ESI适用于分析强极性且热不稳定的化学物质,APCI则适用于分析挥发性中等或弱极性的小分子化合物。前期预试验发现,待测物在ESI下的电离效果优于APCI,因为待测物和内标化合物中均含有氮原子,故选择ESI、在正离子条件下进行离子化。而MRM模式能同时检测待测物的母离子及其碎片离子信息,专属性及灵敏度均优于单离子监测(SIM)和选择反应监测(SRM),故最终选择ESI,以MRM模式扫描,正离子方式检测。

3.3 前处理方法的选择

血浆样品分析前需要对其进行前处理,以排除内源性物质和蛋白分子的干扰。目前,常用的前处理方法主要包括蛋白沉淀、固相萃取和液-液萃取等^[14]。固相萃取耗时、复杂,且成本较高,故未予以考虑。本研究曾采用甲醇和乙腈作为蛋白沉淀剂,但发现基质效应干扰大且提取回收率较低;试验过程中曾尝试使用叔丁基甲醚、二氯甲烷作为萃取剂,基质效应的影响仍较大;而采用乙酸乙酯-二氯甲烷(3:1, V/V)萃取时,提取回收率则较低;最后选用乙酸乙酯作为萃取剂,结果显示提取回收率较为稳定,且基质效应不影响待测物的定量分析。

综上所述,本研究建立了同时测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮浓度的LC-MS/MS法,该方法具有操作简便、灵敏度高、分析效率高等特点,可用于口服利培酮患者的常规治疗药物监测和急性中毒分析。

参考文献

[1] Mannens G, Huang ML, Meuldermans W, et al. Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans

[J]. *Drug Metab Dispos*, 1993, 21(6):1134-1141.

- [2] 周双浆,张立刚,魏立和,等. 第二代抗精神病药治疗首发精神分裂症患者QTc间期变化的相关因素分析[J]. 国际精神病学杂志, 2016, 43(5):788-790.
- [3] Maayan L, Correll CU. Weight gain and metabolic risks associated with antipsychotic medications in children and adolescents[J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2011, 21(6):517-535.
- [4] 姚鹏,张德伦,沈宁平,等. 利培酮致不良反应142例分析[J]. 中国药房, 2014, 25(4):358-360.
- [5] Hiemke C. Consensus guideline based therapeutic drug monitoring (TDM) in psychiatry and neurology[J]. *Curr Drug Deliv*, 2016, 13(3):353-361.
- [6] Schäfer A, Hiemke C, Baumann P. Consensus guideline for therapeutic drug monitoring in psychiatry: 2004: bibliometric analysis of citations for the period 2004-2011[J]. *Nord J Psychiatry*, 2016, 70(3):202-207.
- [7] Ji SM, Shang DW, Wang XP, et al. Population pharmacokinetics of risperidone based on meta-analysis and its application in therapeutic drug monitoring of Chinese schizophrenic patients[J]. *J Clin Pharm Sci*, 2014, 23(2):75-82.
- [8] Jones T, van Breda K, Charles B, et al. Determination of risperidone and 9-Hydroxyrisperidone using HPLC, in plasma of children and adolescents with emotional and behavioural disorders[J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(9):929-934.
- [9] 王玉梅,王丹,张义华,等. 利培酮分散片的人体生物等效性[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(12):1092-1095.
- [10] 贾晶莹,张梦琪,陆晓佩,等. LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮及其代谢物9-羟基利培酮的浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2010, 19(5):279-282.
- [11] 李红霞,杨东菁,范颀,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.
- [12] 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, 2015:363-368.
- [13] Tan QY, Zhu RH, Li HD, et al. Simultaneous quantitative determination of paracetamol and its glucuronide conjugate in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.027.
- [14] 李好枝. 体内药物分析[M]. 2版. 北京:中国医药科技出版社, 2011:82-110.

(收稿日期:2016-11-02 修回日期:2017-02-13)

(编辑:张元媛)