

## LC – MS/MS 同时测定人血浆中的利培酮和 9 – 羟基利培酮

李红霞<sup>1</sup> 杨东菁<sup>2</sup> 范 颀<sup>3</sup> 王雪芹<sup>4\*</sup> 邢向伟<sup>5</sup>

(1. 河南省肿瘤医院药剂科, 河南 郑州 450003; 2. 河南大学医学院, 河南 开封 475001; 3. 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 4. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003; 5. 河南中医学院, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 目的 采用 LC – MS/MS 法检测人血浆中的利培酮及其活性代谢产物 9 – 羟基利培酮。方法 采用 BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 流动相 A 相为乙腈、B 相为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵(甲酸调 pH3.4) 梯度洗脱 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup> 柱温 45 °C 进样量 3 μL。利培酮、9 – 羟基利培酮及盐酸丁螺环酮内标的检测离子对分别为:  $m/z$  411.42→191.19、427.45→207.18、386.43→122.27。结果 利培酮、9 – 羟基利培酮的线性范围分别为 0.66 ~ 42.24、0.65 ~ 41.60 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.997$ ,  $n=5$ ); 在人血浆基质中, 高、中、低浓度(1.3、5.2、21.12 ng·mL<sup>-1</sup>) 的日内、日间 RSD 均小于 15%; 利培酮、9 – 羟基利培酮方法的回收率分别为 89% ~ 109%、97% ~ 107%。6 份不同来源的血浆基质效应研究证实, 该样品预处理方法对血浆中的利培酮和 9 – 羟基利培酮测定无干扰。结论 所建方法处理简单、灵敏、特异性高, 定量准确, 可为利培酮制剂的临床药物动力学研究提供分析方法。

**关键词:** 利培酮; 9 – 羟基利培酮; 高效液相串联质谱法; 血药浓度

中图分类号: R969

文献标志码: A

文章编号: 1006 – 0103(2011)04 – 0369 – 03

## Determination of Risperidone and 9 – hydroxyrisperidone in human plasma by LC – MS/MS

LI Hong – xia<sup>1</sup>, YANG Dong – jing<sup>2</sup>, FAN Di<sup>3</sup>, WANG Xue – qin<sup>4\*</sup>, XING Xiang – wei<sup>5</sup>

(1. Henan Province Tumour Hospital, Zhengzhou, Henan, 450003 P. R. China; 2. Medical College of Henan University, Kaifeng, Henan, 475001 P. R. China; 3. Henan University of Science and Technology School, Luoyang, Henan, 471003 P. R. China; 4. Henan Province Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou, Henan, 450003 P. R. China; 5. Henan College of TCM, Zhengzhou, Henan, 450003 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To establish a method for determination of Risperidone and 9 – hydroxyrisperidone in human plasma by HPLC – MS/MS. **METHODS** BEH C<sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase consisted of A (acetonitrile) and B (0.01 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate) (formic acid adjust pH3.4), gradient elution at flow rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 45 °C and inject volume 3 μL. With positive ion MRM detection of Risperidone ( $m/z$  411.42→191.19) and 9 – hydroxyrisperidone ( $m/z$  427.45→207.18) using Buspirone hydrochloride ( $m/z$  386.43→122.27) as internal standard, respectively. **RESULTS** A good linearity was obtained in the range of risperidone 0.66 – 42.24 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.997$ ,  $n=5$ ) and 9 – hydroxyl – Risperidone 0.65 – 41.60 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.997$ ,  $n=5$ ) with 9 – hydroxyrisperidone's intra – day RSD and inter – day RSD were less than 15%. The recovery was within 89% – 109% and 97% – 107%. Plasma matrix effect test showed endogenous matrix had no effect on quantification of Risperidone and 9 – hydroxyrisperidone. **CONCLUSION** A rapid, sensitive and accurate LC – MS/MS method was developed for the determination of Risperidone and 9 – hydroxyrisperidone in human plasma.

**Key words:** Risperidone; 9 – Hydroxyrisperidone; LC – MS/MS; Concentration

**CLC number:** R969

**Document code:** A

**Article ID:** 1006 – 0103(2011)04 – 0369 – 03

利培酮(Risperidone)是继氯氮平后的第一个非典型抗精神病药,为 D<sub>2</sub> 拮抗剂,体内的主要代谢产物是 9 – 羟基利培酮,活性是母药的 70%<sup>[1]</sup>。现根据中国新药审批办法的相关规定<sup>[2-3]</sup>,参照文献<sup>[4]</sup>,在健康人体单剂量口服利培酮分散片后,采用 LC – MS/MS 法测定了血浆中的利培酮及 9 – 羟基利培酮,方法简单灵敏、分析时间短、实用性强,可用于其临床上的药物动力学研究。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪、Quattro Premier 串联质谱检测器(美国 Waters)。利培酮(RIP, 中国药品生物制品检定所,批号:100570 – 200401); 9 – 羟基利培酮(9 – OH – RIP, 美国 Sigma); 盐酸丁螺环酮内标(IS, 西南合成制药股份有限公司,批号:0304002); 乙腈、甲基叔丁基醚为色谱纯; 其余试剂

作者简介:李红霞(1964—),女,从事医院药学工作。Email: 1102531487@qq.com

\* 通信作者( Correspondent author) Email: wangxueqin2008@126.com

为分析纯。

## 1.2 方法与结果

**1.2.1 色谱条件** 采用 Acquity Uplc™ Beh C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为乙腈、B 为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵(甲酸调 pH3.4) 梯度洗脱程序为: 0~2.2 min、A-B(30:70) 2.2~2.5 min、70%~10% B, 2.5~3.5 min、A-B(90:10), 3.5~3.8 min、10%~70% B, 3.8~5 min、70% B; 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 45 °C; 进样量 3 μL。质谱采用电喷雾电离源(ESI<sup>+</sup>) ,MRM 扫描模式; 喷雾电压 3.5 kV; 采用氮气作为雾化气和辅助气, 雾化气流量 499 L·h<sup>-1</sup> 辅助气流量 46 L·h<sup>-1</sup>; 离子源温度 110 °C; 碰撞气为氦气, 压力为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; MRM 监测离子对: RIP  $m/z$  411.42→191.19; 9-OH-RIP  $m/z$  427.45→207.18, 内标  $m/z$  386.43→122.27。

**1.2.2 溶液的制备** 分别称取适量 RIP、9-OH-RIP 和内标, 用甲醇溶解, 再用乙腈-水(1:1) 稀释制成 21.12、20.80、0.202 μg·mL<sup>-1</sup> 的贮备液, 于冰箱中冷藏。先将 RIP 和 9-OH-RIP 混合贮备液(21.12、20.80 μg·mL<sup>-1</sup>) 依次用乙腈-水(1:1) 稀释成含利培酮和 9-羟基利培酮分别为 1.056×10<sup>3</sup> 和 1.040×10<sup>3</sup> (H<sub>0</sub>)、528 和 520 (H<sub>1</sub>)、264 和 260 (H<sub>2</sub>)、132 和 130 (H<sub>3</sub>)、66 和 65 (H<sub>4</sub>)、33 和 32.5 (H<sub>5</sub>)、16.5 和 16.25 (H<sub>6</sub>) ng·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液; 再加入内标和空白血浆, 得到含 RIP 和 9-OH-RIP 42.24 和 41.60、21.12 和 20.80、10.56 和 10.40、5.28 和 5.20、2.64 和 2.60、1.32 和 1.30、0.66 和 0.65 ng·mL<sup>-1</sup> 的对照品血浆溶液。取 H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>5</sub> 作为高、中、低质控样品, H<sub>6</sub> 作为最低定量限样品(LLOQ), 于冰箱中冷藏。

**1.2.3 血浆样品的处理** 于干燥离心管中分别加 20 μL 内标溶液、H<sub>0</sub>~H<sub>6</sub> 混合对照品溶液, 用 N<sub>2</sub> 吹干, 加 0.5 mL 空白血浆, 涡旋 0.5 min, 再加 3.5 mL 甲基叔丁基醚, 涡旋 3 min, 于 3×10<sup>3</sup> r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取 3.0 mL 上清液, 于 40 °C 水浴中 N<sub>2</sub> 吹干, 加 200 μL 乙腈-水(1:1), 涡旋 2 min, 于 1.2×10<sup>4</sup> r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液进样 3 μL。

**1.2.4 方法学验证** 取 H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub> 血浆溶液质控样本, 按“1.2.3”项方法处理后, 以 LC-MS/MS 检测 RIP 和 9-OH-RIP 的浓度。RIP、9-OH-RIP 和内标的保留时间分别为 1.44、1.22、1.54 min, 峰形良好, 分析时间仅 3 min。ESI<sup>+</sup> 模式下, 利培酮的分子离子  $m/z$  411.42 产生的碎片离子中, 以  $m/z$  191.19 最强; 9-OH-RIP 的分子离子  $m/z$  427.45 产生的碎片离子中, 以  $m/z$  207.18 最强; 内

标分子离子  $m/z$  386.432 产生的碎片离子中, 以  $m/z$  122.27 最强, 因此, 选择 MRM 监测离子对为 RIP  $m/z$  411.42→191.19、9-OH-RIP  $m/z$  427.45→207.18、内标  $m/z$  386.43→122.27 进行测定。空白血浆样品经“1.2.3”项方法处理后, 无明显干扰; 6 份来自不同受试者的空白血浆基质经预处理后, 以流动相样品重建后进样, 获得的峰面积 A 与相同等浓度的流动相样品的峰面积 B 比较, 该比值以百分数表示(MF), 作为基质效应考察的指标。所有样品的 MF 为 85%~115%, 表明该法处理人血浆基质对两组份的测定均无影响(图 1)。

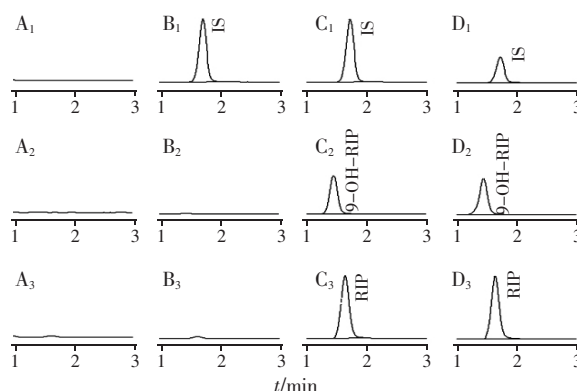


图 1 空白血浆(A)、空白血浆+内标(B)、空白血浆+内标+RIP+9-OH-RIP(C)、血浆样品(D)溶液的 LC-MS 图

Fig 1 LC-MS chromatograms of blank plasma solution (A), blank plasma + IS solution (B), blank plasma + IS + RIP + 9-OH-RIP solution (C) and sample plasma solution (D) (1.  $m/z$  386.43→122.27; 2.  $m/z$  427.45→207.18; 3.  $m/z$  411.42→191.19)

**1.2.5 标准曲线及定量下限** 以盐酸丁螺环酮为内标, 目标组分的峰面积与内标峰面积的比值对相应的质量浓度(ng·mL<sup>-1</sup>) 做标准曲线。结果表明: RIP 和 9-OH-RIP 血浆浓度的回归方程分别为:  $Y_{\text{RIP}} = 0.194X - 0.010$  ( $r = 0.997$ );  $Y_{9\text{-OH-RIP}} = 0.088X - 0.010$  ( $r = 0.997$ ) 线性范围分别为 0.66~42.24、0.65~41.60 ng·mL<sup>-1</sup>。以标准曲线的最低点浓度作为最低定量限, 且要求该浓度与理论值的偏差在 ±20% 范围内。计算得 RIP、9-OH-RIP 的最低定量限为 0.66、0.65 ng·mL<sup>-1</sup>。

**1.2.6 提取回收率及准确度** 对血浆样品中 RIP 和 9-OH-RIP 高、中、低及最低定量限质控样品进样分析后, 目标组分的峰面积与流动相样品进样分析后目标组分的比较, RIP 和 9-OH-RIP 的平均提取回收率为 88.1%、70.1%; 平均方法回收率分别为 101.0%、102.5% (表 1)。

**1.2.7 重复性及精密度试验** 对血浆样品中待测成分的高、中、低及最低定量限质控样品处理后, 重复进

样6次,计算得 $RSD \leq 4.9\%$ ;方法的日内精密度分别为:利培酮的 $RSD \leq 5.40\%$ 、9-羟基利培酮的 $RSD \leq 6.19\%$ ;日间精密度分别为:利培酮的 $RSD \leq 7.03\%$ 、9-羟基利培酮的 $RSD \leq 11.04\%$ (表2)。

表1 血浆中利培酮和9-羟基利培酮的回收率( $n=5$ )

Table 1 Recovery of Risperidone and 9-hydroxyrisperidone in the plasma ( $n=5$ )

| Components | $C/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 方法回收率  |          | 提取回收率 |          |
|------------|-----------------------------------|--------|----------|-------|----------|
|            |                                   | 回收率/%  | $RSD/\%$ | 回收率/% | $RSD/\%$ |
| RIP        | 1.32                              | 88.95  | 7.23     | 96.41 | 7.53     |
|            | 5.28                              | 105.35 | 4.38     | 87.20 | 3.27     |
|            | 21.12                             | 108.58 | 3.74     | 80.55 | 8.30     |
| 9-OH-RIP   | 1.30                              | 97.41  | 12.76    | 78.84 | 4.19     |
|            | 5.20                              | 103.31 | 6.10     | 67.47 | 6.26     |
|            | 20.80                             | 106.87 | 2.41     | 64.12 | 7.25     |

表2 利培酮与9-羟基利培酮的日内、日间精密度与回收率

Table 2 Recovery, inter-day precision and intra-day precision of RIP and 9-OH-RIP in the plasma

| Components | $C/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 日内( $n=5$ ) |          | 日间( $n=15$ ) |          |
|------------|-----------------------------------|-------------|----------|--------------|----------|
|            |                                   | 回收率/%       | $RSD/\%$ | 回收率/%        | $RSD/\%$ |
| RIP        | 1.32                              | 92.9        | 1.86     | 96.7         | 7.03     |
|            | 5.28                              | 106.3       | 4.24     | 103.0        | 5.62     |
|            | 21.12                             | 104.8       | 5.40     | 102.5        | 4.55     |
| 9-OH-RIP   | 1.30                              | 4.49        | 87.7     | 98.3         | 11.04    |
|            | 5.20                              | 101.1       | 4.55     | 103.3        | 4.30     |
|            | 20.80                             | 104.5       | 6.19     | 103.0        | 5.52     |

**1.2.8 样品的稳定性及系统的稳定性** 将血浆样品中高、中、低浓度的待测成分分为5组。第1组为新鲜配制组,立即按“1.2.3”项方法操作;第2组为短期室温稳定性组,将配制好的血样于室温放置10 h后按“1.2.3”项方法操作;第3组为反复冻融组,将在 $-20^\circ\text{C}$ 条件下冷冻的血样取出,于室温复融后再行冷冻,反复3次后处理测定;第4组为 $-20^\circ\text{C}$ 冷冻储存组,将配制好的血样放置在 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱中冰冻20 d后处理测定;第5组为样品处理、复溶后,于室温放置10 h后进样。其 $RSD$ 均小于11.75%,表明血浆样品稳定性良好,可满足生物样品的分析。将贮备液分别放置0、4、7、20 d后,分别稀释成含相当于血浆中 $21.12\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  RIP和 $20.80\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  9-OH-RIP的溶液,进样测定,根据测定成分与内标峰面积及比值变化情况评价贮备液的稳定性, RIP和9-OH-RIP的面积和比值的 $RSD$ 均小于4.28%,说明贮备液稳定性较好。

**1.2.9 样品的采集与测定** 10名健康男性受试者单剂量口服利培酮分散片(每片1 mg),分别于服药前(0 h)和服药后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、5、8、11、14、24、48、72、96 h,由静脉采5 mL血,肝素钠抗凝,于 $3.5 \times 10^3\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血浆,分离

后的血浆样品置已标记好的试管中,于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。RIP分散片的主要药动学参数分别为: RIP的 $t_{1/2} = 3.588 \pm 1.686\text{ h}$ ,  $C_{\max} = 14.034 \pm 6.544\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $T_{\max} = 1.361 \pm 0.713\text{ h}$ ,  $AUC_{0-1} = 66.017 \pm 46.785\text{ ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 9-OH-RIP的 $t_{1/2} = 17.916 \pm 4.012\text{ h}$ ,  $C_{\max} = 8.529 \pm 3.632\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $T_{\max} = 4.542 \pm 4.192\text{ h}$ ,  $AUC_{0-1} = 196.901 \pm 61.787\text{ ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。平均药-时曲线见图2。

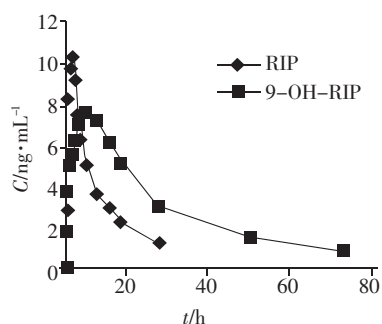


图2 单剂量口服利培酮分散片后利培酮和9-羟基利培酮的平均药-时曲线( $n=10$ )

Fig 2 The mean plasma concentration-time curve of RIP and 9-OH-RIP after a single oral administration of Risperidone dispersible tablets ( $n=10$ )

## 2 讨论

曾考察乙醚、乙酸乙酯、乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚提取溶剂。结果表明:甲基叔丁基醚作为提取溶剂,待测成分与内源性物质得到了充分的分离,提取回收率较高,方法精密度、重复性和稳定性均较好,适合大批量血浆样品的检测。利培酮和9-羟基利培酮含有碱性氨基基团,在流动相中加入适量甲酸,可提高离子化效率、增加响应、优化峰形。在待测成分被色谱分离完全洗脱下来后,用梯度洗脱,进一步清除了色谱柱上的残留物,同时减小了残留基质对液质联用系统的污染,缩短了分析时间。

## 参考文献:

- [1] Heykants J, Huang L, Mannens G, et al. The pharmacokinetics of risperidone in humans: a summary [J]. J Clin Psychiatry, 1994, 55(5): 13-18.
- [2] 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2005: 2-10.
- [3] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录XIX B.
- [4] Meulder MD, Remmerie BMM, Vries RD, et al. Validated LC-MS/MS method for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine [J]. J Chromatography B, 2008, 870: 8-16.

收稿日期: 2010-11-15