

【实验研究】

LC-MS/MS法分析人血浆中利培酮浓度及健康人体的药动学研究

李 迷^{1, 2}, 夏媛媛^{2, 3*}, 王 维⁴, 刘静媛², 刘珊珊², 丁春晓^{1, 2}, 刘万卉¹, 司端运^{2, 3*}

1. 烟台大学, 山东 烟台 264005

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462

3. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100050

4. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301

摘要: 目的 建立一种简便、灵敏的液相串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中利培酮的浓度,并应用于健康人体的药动学研究。方法 血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,使用ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱分离,以60%乙腈-40%甲醇、0.1%甲酸-5%乙腈-10 mmol/L乙酸铵水溶液作为流动相,梯度洗脱;在电喷雾离子化源(ESI)正离子检测条件下,采用多反应离子监测模式(MRM)对利培酮及内标利培酮-d₄进行定量分析,检测离子对分别为 m/z 411.3→191.2、 m/z 415.3→195.2;进行专属性、系统适用性、准确度、精密度、基质效应、提取回收率、稳定性等方法学验证;8名健康成年受试者(无脱落)空腹单次口服利培酮片1 mg后,分别于给药前0 h和给药后10、20、30、45 min, 1.00、1.25、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、8.00、12.00、16.00、24.00、36.00、48.00 h采集血样至含有肝素钠的抗凝管中,分离血浆样品,进行LC-MS/MS分析。结果 建立的LC-MS/MS法专属性良好,系统适用性良好,内标与待测物之间不存在交叉影响,人血浆中利培酮的线性范围为0.1~20.0 ng/mL,定量下限(LLOQ)为0.1 ng/mL,利培酮在空腹血浆、餐后血浆及溶血血浆中经内标归一化的基质效应分别为0.991~1.00、1.00~1.01和0.994~0.999,利培酮在人血浆中的平均提取回收率为96.8%~99.7%,准确度、精密度以及稳定性等均符合有关要求。健康受试者单次口服利培酮片1 mg后,主要药动学参数 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 分别为(0.969±0.248) h、(7.83±2.24) ng/mL、(25.5±12.0) h·ng/mL、(3.31±1.74) h。结论 建立的LC-MS/MS法前处理简便快速,灵敏度高,满足生物分析的法规要求,可应用于利培酮在健康人体中的药动学研究。

关键词: 利培酮; 人血浆; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)06-1224-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.06.013

Analytical methods and application of LC-MS/MS for quantification of risperidone in human plasma

LI Mi^{1, 2}, XIA Yuanyuan^{2, 3}, WANG Wei⁴, LIU Jingyuan², LIU Shanshan², DING Chunxiao^{1, 2}, LIU Wanhui¹, SI Duanyun^{2, 3}

1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

4. TPIR pharmaceutical Responsible Co. Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: objective To establish a sensitive and simple high-performance liquid chromatographic tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of risperidone in human plasma and utilize in a pharmacokinetic study in healthy volunteers.

Methods Protein was precipitated by acetonitrile in plasma samples, and the analyte and internal standard were separated on a

收稿日期: 2021-01-17

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2019-I2M-5-020)

第一作者: 李 迷(1995—),女,硕士,研究方向为药动学。E-mail: 15340476612@163.com

*通信作者: 司端运,男,E-mail: ddysi@sohu.com

夏媛媛,女,E-mail: xiayy@tipr.com.cn

ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient procedure using 60% acetonitrile-40% methanol as the organic phase and 0.1% formic acid -5% acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate formate solution as the mobile phase at flow rate of 0.5 mL/min. Electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) detection modes were used for quantitative detection of risperidone and risperidone-D4 (internal standard). In the mode of multiple reaction monitoring of positive ions, the monitoring ion pairs of risperidone and risperidone-d4 were m/z 411.3→191.2 and m/z 415.3→195.2, respectively. The specificity, system applicability, accuracy, precision, matrix effect, extraction recovery, stability and other methodological validation were carried out. Eight healthy adult subjects (without shedding) were given risperidone tablets 1 mg orally on an empty stomach. Blood samples were collected into anticoagulant tubes containing heparin sodium 0 h before administration and 10, 20, 30, 45 min, 1.00, 1.25, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 8.00, 12.00, 16.00, 24.00, 36.00, 48.00 h after administration. Plasma samples were separated and analyzed by LC-MS/MS. **Results** The established LC-MS/MS method had good specificity and applicability, and there was no cross effect between internal standard and analyte. The linear range of risperidone in human plasma was 0.1 ~ 20.0 ng/mL, the lower limit of quantification (LLOQ) was 0.1 ng/mL. The matrix effects of risperidone normalized by internal standard in fasting plasma, postprandial plasma and hemolytic plasma were 0.991 ~ 1.000, 1.000~1.010 and 0.994 ~ 0.999, respectively. The average extraction recovery of risperidone in human plasma was 96.8% ~ 99.7%. The accuracy, precision and stability all meet the relevant requirements. The pharmacokinetic parameters, t_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} and $t_{1/2}$ were (0.969±0.248) h、(7.83±2.24) ng/mL、(25.5±12.0) h·ng/mL and (3.31±1.74) h. **Conclusion** This LC-MS/MS method was proven simple, sensitive, rapid and suitable for pharmacokinetics study of risperidone in the healthy human.

Key words: risperidone; human plasma; LC-MS/MS; pharmacokinetics

利培酮(risperidone, 3-[2-[4-(6-氟-1,2-苯并异噁唑-3-基)-1-哌啶基]乙基]-6,7,8,9-四氢-2-甲基-4H-吡啶并[1,2-α]嘧啶-4-酮, 结构见图1)是一种苯并噁唑类抗精神病药,它是5-羟色胺2A和多巴胺D2受体的抑制剂,属于第二代抗精神病药物^[1]。该药物的不良反应较轻,通常不影响认知功能,已成为治疗精神分裂症的一线药物^[2]。除了用于精神分裂症的治疗外,它还被推荐用于自闭症、躁郁症、伴有精神病症状的双相癫痫^[3]。利培酮口服后,通过9-羟基化、N-脱烷基和7-羟基化途径被迅速、完全吸收和初步代谢^[1]。

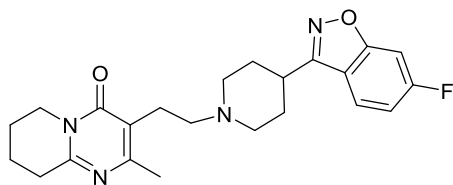


图1 利培酮的结构式

Fig. 1 Chemical structure of risperidone

利培酮的治疗指数相对较窄,治疗剂量较低(每天0.5~6.0 mg),体内浓度较低,测定生物基质中利培酮的含量需要高选择性、高灵敏度的生物分析方法^[1]。近年来,液质联用法由于具有较高的灵敏度和选择性,被广泛应用于药动学研究中。据国内外文献报道,已有多位研究者采用液质联用法测定人血浆中利培酮的含量,其中多数研究者采用液-液萃取^[4-16]或固相萃取^[17-19]对样品进行预处理,经历挥发、复溶或者活化、洗脱等操作,复杂繁琐,甲

基叔丁基醚、二氯甲烷和特丁基甲醚等提取剂对人体危害较大,且这些方式血浆用量较大(200~500 μL),一些方法^[4,15-17,20-22]灵敏度较低,最低定量限(LLOQ)大于2 ng/mL。采用蛋白沉淀法对生物样品进行前处理会更加快速、简便,已有研究者^[20-21,23-24]建立LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮含量时,选用蛋白沉淀法对血浆样品进行预处理,方便快捷,本研究在这些方法^[20-21,23-24]的基础上加以改进,建立了快速、简便、灵敏的测定人血浆中利培酮含量的LC-MS/MS方法,该方法前处理简便,血浆用量少,灵敏度高,并成功应用于健康人体的药动学研究。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

利培酮对照品(批号100570-201403,质量分数99.9%),购于中国食品药品检定研究院;利培酮-d4(批号3KHI-168-3,质量分数98.0%),购于Toronto Research Chemicals Inc.;甲醇、乙腈为色谱纯,美国Fisher公司;无水甲酸为色谱纯、乙酸铵为分析纯,天津光复科技发展有限公司;超纯水为实验室自制,BM-40纯水制备系统,电阻率>18.0 MΩ·cm。

1.2 主要仪器

日本Shimadzu公司生产的LC-20A岛津高效液相色谱仪,配有LC-20AD二元梯度泵、CTO-20A柱温箱、SIL-20AC自动进样器、DGU-20A₃脱气机;美国Applied Biosystems公司生产的Sciex TRIPLE QUAD™ 4000 Q-TRAP型三重四级杆串联质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI)以及Analyst 1.5.2数据

处理软件;3K15型高速冷冻离心机,德国Sigma公司;17R型高速冷冻离心机,Thermo Scientific公司;TARGIN™ VX-II型和TARGIN™ MINI-A型漩涡混合器,北京踏锦科技有限公司;XS105型电子天平,瑞士METTER TOLEDO公司;Turbo Vap LV型样品浓缩仪,美国Caliper公司;BM-40型纯水制备系统,北京中盛茂源科技发展有限公司。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS定量分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温为40℃;流动相A为60%乙腈-40%甲醇溶液(体积比60:40),流动相B为0.1%甲酸-5%乙腈-10 mmol/L乙酸铵水溶液;体积流量为0.5 mL/min;梯度洗脱条件为:0~0.2 min, 30%A;0.2~2.0 min, 30%~90%A;2.1~3.5 min, 90%A;3.5~3.6 min, 90%~30%A;3.6~5.0 min, 30%A;进样器温度为6℃。

2.1.2 质谱条件 在ESI正离子检测条件下,采用多反应离子监测模式(MRM)对利培酮及内标利培酮-d4进行定量分析。质谱源参数如下:卷帘气为68.95 kPa;碰撞气为82.74 kPa;喷雾电压为2 000 V;源温度500℃;雾化气(Gas1)为413.68 kPa;辅助气(Gas2)为275.79 kPa。化合物参数如下:监测离子对分别为 m/z 411.3→191.2、 m/z 415.3→195.2;利培酮和利培酮-d4的去簇电压分别为35、50 V,碰撞能量均为40 eV,入口电压均为10 V,碰撞出口电压均为12 V。

2.2 溶液配制

2.2.1 工作液的配制 精密称取适量利培酮对照品,用甲醇溶解稀释得到系列标准工作液(质量浓度分别为2、4、10、20、100、200、400 ng/mL)和质控工作液(质量浓度分别为2、6、40、320 ng/mL)。精密称取利培酮-d4对照品,用甲醇溶解稀释得到4 ng/mL的内标工作液。

2.2.2 系统适应性溶液的配制 吸取25 μL 10 ng/mL标准工作液,加入500 μL内标工作液,500 μL超纯水和975 μL乙腈,混匀备用。

2.2.3 人血浆校正标样及质控样品的配制 精密吸取475 μL空白血浆,加入25 μL系列标准工作液或质控工作液,得到质量浓度范围为0.1~20.0 ng/mL的血浆标准曲线样品,以及质量浓度为0.1、0.3、2.0、16.0 ng/mL的血浆质控样品。

2.3 血浆样品处理方法

精密吸取50 μL血浆样品,加入50 μL内标工作

液、100 μL乙腈,漩涡混匀1 min后,4℃、12 000 r/min离心10 min,吸取上清液100 μL于内插管中,4℃、12 000 r/min离心10 min,进样5 μL进行LC-MS/MS分析。

2.4 方法学验证

本研究严格按照2020年版中国药典《生物样品定量分析方法验证指导原则》^[25]中的相关规定,对建立的LC-MS/MS方法进行方法学验证,评价该方法的准确可靠性。

2.4.1 专属性试验 利培酮及内标利培酮-d4在ESI源正离子条件下信号较强,主要生成 $[M+H]^+$ 离子,分别为 m/z 411.3和 m/z 415.3。选择性对 $[M+H]^+$ 离子进行二级质谱全扫描,利培酮及内标利培酮-d4生成的主要产物离子分别为 m/z 191.2和 m/z 195.2。

随机取6名健康志愿者的空白空腹血浆,除不加内标溶液(改加同等体积的甲醇)外,其余按“2.3”项中步骤处理后进行LC-MS/MS分析,空白血浆样品色谱图见图2(A);LLOQ样品色谱图见图2(B);健康受试者空腹口服1 mg利培酮片后2 h的血浆样品色谱图见图2(C)。利培酮和内标的色谱保留时间分别为2.51、2.50 min,人空白血浆中利培酮的干扰在1.66%~4.75%,利培酮-d4的干扰在0.042 5%~0.394%,表明人血浆中的内源性物质不干扰分析物和内标物的定量分析。

2.4.2 系统适应性试验 吸取双样本系统适应性溶液样品,每份溶液连续进样3针,分别计算6个待测物和内标保留时间的RSD值,计算6个待测物与内标峰面积比值及其RSD值。

6针系统适应性样品中待测物保留时间的RSD在0.00~0.296%,内标保留时间的RSD在0.00~0.322%,待测物与内标进样峰面积比的RSD在0.488%~2.64%,说明本方法的系统适应性良好,适于进行相应批次的样品分析。

2.4.3 内标与待测物之间相互干扰 制备只含有内标、不含有待测物的control-0样品,以及只含有待测物(校正曲线最高质量浓度)、不含有内标的定量上限(ULOQ)样品,进行LC-MS/MS分析,考察内标与待测物相互干扰情况。

control-0样品中待测物的干扰为1.16%,ULOQ样品中内标的干扰为0.129%,表明内标与待测物之间不存在交叉影响。

2.4.4 残留 为考察进样残留情况,按曲线最高浓度、空白人血浆样品的顺序进样分析,考察残留

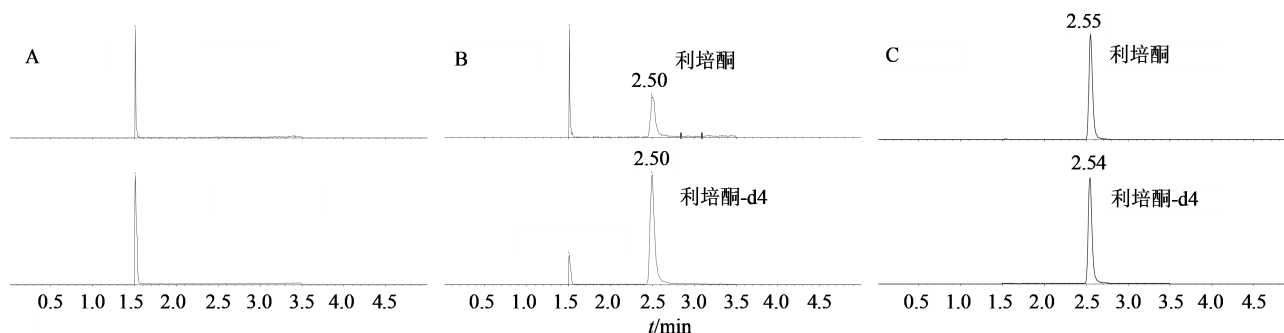


图2 人空白血浆(A)、人空白血浆加入0.1 ng/mL利培酮(B)、健康受试者口服1 mg利培酮片2 h血浆样品(C)色谱图
Fig. 2 Representative chromatogram of blank human plasma sample(A), simulated biological sample with analytes (0.1 ng/mL) in blank human plasma(B), and plasma sample of 2 h after oral risperidone of 1 mg (C)

情况。

空白血浆样品中利培酮的残留为1.90%~7.02%,利培酮-d4的残留为0.016 8%~0.139%,人血浆中干扰组分的响应低于当批次LLOQ待测物响应的1/5,内标响应的1/20,表明该方法不存在残留干扰,不影响待测物的含量测定。

2.4.5 线性范围和定量下限 配制并处理标准曲线样品进行LC-MS/MS分析,以待测物质量浓度为横坐标,待测物与内标物峰面积比值为纵坐标,采用加权最小二乘法(权重为 $1/x^2$)进行回归运算,考察3个分析批,每批每个浓度校正对照品样品双样本。按照“2.3”项中步骤配制并处理LLOQ样品,进行LC-MS/MS分析,考察3个分析批,每批6个样本,计算批内和批间的精密度以及准确度。

利培酮质量浓度在0.1~20.0 ng/mL,线性关系良好,对应校正曲线举例为 $y=0.233x+0.00283$ ($r=0.9998$)。LLOQ样品的代表性色谱图见图2(B),在LLOQ浓度下利培酮色谱峰的信噪比(S/N)>10,准确度均值在标示值的±20%以内,日内、日间精密度(RSD)在±20%以内,表明本方法测定人血浆中利培酮的LLOQ可以达到0.1 ng/mL。

2.4.6 准确度和精密度 按照“2.3”中步骤配制并处理质量浓度为0.3、2.0、16.0 ng/mL的质控样品,进行LC-MS/MS分析。连续考察3个分析批,每批、每个浓度6个样本。应用当批标准曲线计算各质控样品的浓度,考察分析方法的准确度和精密度。

结果见表1,准确度均值在标示值的±15%以内,日内、日间精密度(RSD)在±15%以内,表明该方法测定人血浆中利培酮浓度的精密度及准确度均良好。

2.4.7 基质效应和提取回收率 使用6个不同来源人空白空腹血浆,考察利培酮在0.3、2.0、16.0 ng/mL质量浓度水平的基质效应和提取回收率,每个浓度

表1 LC-MS/MS法测定利培酮的准确度与精密度($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 1 Accuracy and precision of risperidone determined by LC-MS/MS ($\bar{x}\pm s, n=18$)

质量浓度/(ng·L ⁻¹)	准确度%			日内RSD%			日间RSD%
	1批	2批	3批	1批	2批	3批	
0.1	103	98	100	3.60	2.35	3.39	6.35
0.3	106	101	103	3.33	1.92	0.86	6.20
2.0	104	104	99	2.13	1.54	2.38	6.99
16.0	99	98	93	1.69	1.38	1.64	8.97

6样本;使用3个不同来源人空白餐后血浆,3个不同来源人空白溶血血浆,考察利培酮在0.3、16.0 ng/mL质量浓度水平的基质效应,每个浓度3个样本。基质效应样品按各自空白样品处理,取上清液吹干后,再使用对应浓度的对照品溶液复溶后进样分析,测得待测物峰面积(A_a)和内标峰面积(A_{is})。对照品溶液进样测得待测物峰面积(B_a)和内标峰面积(B_{is})。配制0.3、2.0、16.0 ng/mL的质控血浆样品,按“2.3”项方法处理,每个浓度平行6样本,进样后得到测物峰面积(C_a)和内标峰面积(C_{is})。

内标归一化基质效应因子=(A_a/B_a 均值)/(A_{is}/B_{is} 均值)

待测物提取回收率= C_a/A_a

内标提取回收率= $C_{is}/A_{is}\times 100$

对于6个受试者的空腹血浆样本,利培酮在0.3、2.0、16.0 ng/mL 3个质量浓度水平上的内标归一化基质效应因子分别为1.000、1.000、0.991,对于3个受试者的餐后血浆样本,利培酮在0.3、16.0 ng/mL 2个质量浓度水平上的内标归一化基质效应因子分别为1.01、1.00,对于3个受试者的溶血血浆样本,利培酮在0.3、16.0 ng/mL 2个质量浓度水平上的内标归一化基质效应因子分别为0.994、0.999,基质效应的精密度均小于3.61%,说明基质效应不会对样品的分析产生影响。利培酮在0.3、2、16 ng/mL 3个浓

度水平上的平均提取回收率分别为99.7%、98.6%、96.8%，总体回收率的RSD为1.93%；内标的平均回收率为96.7%，说明回收率较高，不会对样品的分析产生影响。

2.4.8 稳定性 配制0.3、16.0 ng/mL的含药血浆，考察利培酮血浆样品室温放置5、20 h稳定性，-70℃至室温反复拿取46次稳定性，-70℃至室温冻融1次稳定性，-70℃至室温冻融3次稳定性，-20℃冻存66 h稳定性，-70℃冻存74 d稳定性，处理后于进样器内(6℃)放置24、48 h稳定性，沉淀处理后上清液室温放置4 h稳定性，处理方式同“2.3”项，每个考察项各浓度均为3样本。配制0.3、16 ng/mL质量浓度水平的含药全血，到各稳定性考察时间时4℃、2 000 g离心10 min后分离50 μL血浆，按“2.3”方法处理，考察利培酮全血室温放置1、2 h稳定性，每个时间各浓度3样本。

利培酮的含药血浆在不同贮存条件下稳定性良好，准确度在94.4%~113%，结果见表2。含药全血的稳定性结果见表3，表明以上稳定性考察项均符合相关指导原则要求。

2.5 人体药动学研究

临床试验经武汉市传染病医院伦理委员会批准(受理编号:GCP-ICT-2018-19.01)，8名健康成年受试者(无脱落)空腹单次口服利培酮片1 mg后，分别于给药前0 h和给药后10、20、30、45 min、1.00、1.25、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、8.00、12.00、16.00、24.00、36.00、48.00 h采集血样至含有肝素钠的抗凝管中，4℃、2 000×g离心10 min，获得的血浆样品存放至-70℃冰箱保存备用。

血浆样品按“2.3”方法处理后进样分析，采用Phoenix WinNonlin 7.0软件非房室模型计算药动学参数。利培酮的平均血药浓度-时间曲线见图4，平均药动学参数见表4。

结果显示，健康受试者口服1 mg利培酮片后，血药浓度于1 h左右达到峰值，随后逐渐下降，至服药后12 h已降低至峰浓度的1/10以下；与药物在体内暴露量相关的 C_{max} 、 AUC_{0-12} 值分别为(7.83±2.24) ng/mL、(25.5±12.0) h·ng/mL，半衰期为(3.31±1.74)h，消除速度适中。

3 讨论

本研究在建立测定人血浆中利培酮含量的LC-MS/MS法时，对色谱条件进行了优化。在方法建立初期，分别考察了Symmetry® C₁₈和Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈色谱柱，发现Agilent

表2 LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮的稳定性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Stability of risperidone in human plasma determined by LC-MS/MS($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

稳定性考察项	标示质量浓度/(ng·L ⁻¹)	测定质量浓度/(ng·L ⁻¹)	准确度/%	RSD/%
室温放置5 h	0.3	0.309±0.003	103	1.12
	16.0	15.100±0.300	94	1.99
室温放置20 h	0.3	0.328±0.008	109	2.47
	16.0	16.300±0.252	102	1.54
-70℃至室温反复拿取46次	0.3	0.309±0.010	103	3.09
	16.0	15.200±0.115	95	0.76
-70℃至室温冻融1次	0.3	0.327±0.005	109	1.40
	16.0	16.300±0.058	102	0.35
-70℃至室温冻融3次	0.3	0.326±0.007	109	2.13
	16.0	16.500±0.153	103	0.92
-20℃冻存66 h	0.3	0.327±0.006	109	1.84
	16.0	16.400±0.252	103	1.53
-70℃冻存74 d	0.3	0.340±0.004	113	1.23
	16.0	16.900±0.231	105	1.37
处理后进样器6℃放置24 h	0.3	0.317±0.003	106	0.84
	16.0	15.400±0.208	96	1.35
处理后进样器6℃放置48 h	0.3	0.320±0.005	107	1.60
	16.0	16.300±0.252	102	1.54
沉淀处理后上清液室温放置4 h	0.3	0.326±0.002	109	0.64
	16.0	16.500±0.115	103	0.70

表3 利培酮在人全血中的稳定性($n=3$)

Table 3 Stability of risperidone in human blood ($n=3$)

标示质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	室温放置时间	RSD/%	与0 h比准确度/%
0.3	0 h	1.55	/
	1 h	1.53	102
	2 h	4.99	91
16.0	0 h	1.92	/
	1 h	2.52	100
	2 h	2.21	91

ZORBAX Eclipse C₁₈色谱柱峰形较为对称。

在流动相的选择中，有机相分别考察了甲醇和60%乙腈-40%甲醇，水相分别考察了5%乙腈-10 mmol/L甲酸铵溶液、10 mmol/L甲酸铵溶液(含0.05%甲酸)和0.1%甲酸-5%甲醇-10 mmol/L乙酸铵水溶液，结果发现，当流动相组合为60%乙腈-40%甲醇和0.1%甲酸-5%甲醇-10 mmol/L乙酸铵溶液时峰形较好，既不拖尾也无前沿。

在内标的选择上，选择了待测物的稳定同位素标记物为内标，其色谱保留行为、稳定性、基质效应、回收率以及质谱条件等与待测物相似，内标的

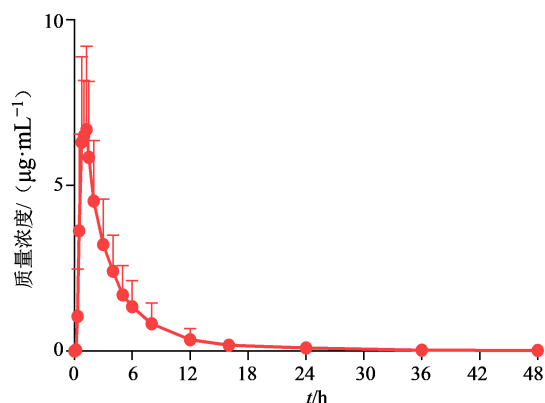


图4 8名健康受试者口服利培酮片1 mg后的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curve after oral administration risperidone (1 mg) in eight healthy adult volunteers

表4 健康受试者口服利培酮片1 mg后的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of risperidone after oral administration of risperidone (1 mg) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

参数	单位	利培酮
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	7.83 ± 2.24
$t_{\max}$	h	0.969 ± 0.248
AUC_{0-t}	$\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	25.5 ± 12.0
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	26.5 ± 12.8
MRT_{0-t}	h	3.78 ± 1.41
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	4.40 ± 1.97
V_d	L	392 ± 540
CL	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	93.4 ± 121
$t_{1/2}$	h	3.31 ± 1.74

选择对于保证测定结果的准确性尤为重要。

查阅文献^[23]发现,健康志愿者口服1 mg利培酮后,达峰浓度为 $(4.99 \pm 1.26) \text{ ng/mL}$,本研究设定的线性范围为 $0.1 \sim 20.0 \text{ ng/mL}$,既能满足实际测样的高浓度需求,又避免了对样品再进行稀释处理;所有受试人体的 $\text{AUC}_{0-t}/\text{AUC}_{0-\infty}$ 的比例均大于80%,也满足实际测样的低浓度需求,保证能够实施完整的人体生物样本浓度研究。

本研究建立测定人血浆中利培酮含量的LC-MS/MS法时,直接用乙腈沉淀蛋白对血浆样品进行预处理,与文献^[4-24]方法相比,简单快速,血浆用量少(仅需 $50 \mu\text{L}$),灵敏度高,精密度和准确度均良好,LLQ可达 0.1 ng/mL ,提取回收率较高,并完成了完整的方法学验证,符合《中国药典》2020年版生物样品定量分析方法验证指导原则的相关要求,并

成功应用于临床健康受试者空腹口服利培酮片1 mg后的人体药动学研究,且为利培酮临床用药的进一步研究以及仿制药的一致性评价提供了可靠的分析方法。

此外,将本研究所获得的平均药动学参数 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 与已有研究资料进行比较发现,同等剂量(1 mg)下,结果基本一致^[23]。与2 mg剂量下的结果相比^[9,26], $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 基本一致,而 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 约呈2倍(剂量比)关系,后续可深入研究利培酮在人体内的暴露量与剂量之间的相关关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Prasad T R, Joseph S, Kole P, et al. Enantioselective supercritical fluid chromatography - tandem mass spectrometry method for simultaneous estimation of risperidone and its 9-hydroxyl metabolites in rat plasma [J]. Bioanalysis, 2017, 9(22):1739-1750.
- [2] Feng Z, Zhang Y, You X, et al. Effects of risperidone on blood levels of interleukin-6 in schizophrenia: A meta-analysis [J]. Medicine, 2020, 99(15): e19694.
- [3] Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D, et al. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(2): 167-173.
- [4] 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]. 中国临床药理学杂志, 2010, 19(5): 279-282.
Jia J Y, Zhang M Q, Lu X P, et al. Determination of the concentration of risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by LC-MS/MS [J]. Chin J Clin Pharm, 2010, 19(5): 279-282.
- [5] 楼江, 严伟, 王刚, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮及9-羟基利培酮的浓度 [J]. 中国药房, 2017, 28(26): 3639-3642.
Lou J, Yan W, Wang G, et al. Determination of the concentration of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by LC-MS/MS [J]. J China Pharm, 2017, 28(26): 3639-3642.
- [6] 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.
Li H X, Yang D J, Fan D, et al. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by LC-MS/MS [J]. West China J Pharm Sci, 2011, 26(4): 369-371.
- [7] 段小涛, 陈笑艳, 张逸凡, 等. 液相色谱-串联质谱法测

- 定人血浆中的利培酮[J]. 药学报, 2006(7): 684-688.
- Duan X T, Chen X Y, Zhang Y F, et al. Determination of risperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin, 2006(7): 684-688.
- [8] 刘文荣, 庄绪慧, 王文艳, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中4种非典型抗精神分裂药物及2种代谢物[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2019, 32(1): 31-37.
- Liu W R, Zhuang X H, Wang W Y, et al. Determination of 4 atypical anti-schizophrenics and 2 metabolites in human plasma by LC-MS/MS [J]. J Yan Tai Univ: Nat Sci Engin Edit, 2019, 32(1): 31-37.
- [9] 邹小娟. 建立LC-MS/MS法测定血浆中利培酮和硫普罗宁的浓度及应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- Zhou X J. Establishment of LC-MS/MS method to determine the concentration of risperidone and tiopronin in plasma and its application [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012.
- [10] 张现化, 杨 丽, 熊 歆, 等. HPLC/MS/MS法同时测定人血浆中利培酮及其活性代谢产物浓度[A]// 第二届全国治疗药物监测学术年会会议指南[C]. 北京: 中国药理学治疗药物监测研究专业委员会, 2012: 1.
- Zhang X H, Yang L, Xiong X, et al. Simultaneous determination of risperidone and its active metabolites in human plasma by HPLC/MS/MS [A]// Guidelines for the Second National Therapeutic Drug Monitoring Academic Conference [C]. Beijing: Professional Committee of Therapeutic Drug Monitoring Research of Chinese Pharmacological Society, 2012: 1.
- [11] 郑巧玲, 蔡骅琳, 李焕德. UPLC-MS/MS法同时检测人血浆中利培酮, 9-羟基利培酮, 谷氨酸及 γ -氨基丁酸含量的方法学研究[A]// 湖南省药学会会员代表大会暨学术年会[C]. 北京: 中国医药协会; 长沙: 湖南省医药协会, 2008.
- Zheng Q L, Cai H L, Li H D. UPLC-MS/MS method for simultaneous detection of risperidone, 9-hydroxyrisperidone, glutamic acid and gamma-aminobutyric acid in human plasma [A]// Member Representative Conference and Academic Annual Meeting of Hunan Pharmaceutical Association [C]. Changsha: Chinese Pharmaceutical Association; Hunan: Hunan Pharmaceutical Association, 2008.
- [12] 张 莉. 人血浆中利培酮及其代谢物9-羟基利培酮的LC/MS法测定[A]// 第十五次全国色谱学术报告会文集(下册)[C]. 郑州: 第十五次全国色谱学术报告会, 2005: 2.
- Zhang L. Determination of risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by LC/MS [A]// Proceedings of the 15th National Chromatography Academic Conference (Volume 2) [C]. Zhengzhou: The 15th National Chromatography Academic Conference, 2005: 2.
- [13] 丰丽蕊, 杨博涵, 王雪芹, 等. UPLC-MS/MS法测定人血浆中奥氮平、利培酮和帕潘立酮的浓度[J]. 中国药房, 2017, 28(8): 1045-1048.
- Feng L C, Yang B H, Wang X Q, et al. Determination of olanzapine, risperidone and paliperidone in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. J China Pharm, 2017, 28(8): 1045-1048.
- [14] 张现化, 杨毅恒, 杨 丽, 等. 液质联用法测定人血浆中利培酮浓度的不确定度评定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 366-371.
- Zhang X H, Yang Y H, Yang L, et al. Evaluation of uncertainty in determination of risperidone concentration in human plasma by liquid mass spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(3): 366-371.
- [15] 温预关, 廖日房, 曾转萍, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定人血浆中利培酮的浓度[J]. 广东药学院学报, 2007(5): 528-530.
- Wen Y G, Liao R F, Zeng Z P, et al. Rapid determination of risperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm, 2007(5): 528-530.
- [16] 刘 懿. 利培酮分散片健康人体药代动力学及生物等效性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- Liu Y. Study on pharmacokinetics and bioequivalence of risperidone dispersible tablets in healthy volunteers [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2012.
- [17] Khelfi A, Azzouz M, Abtroun R, et al. Determination of chlorpromazine, haloperidol, levomepromazine, olanzapine, risperidone, and sulpiride in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Inter J Anal Chem, 2018, 2018: 1-13.
- [18] Koller D, Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, et al. Simultaneous determination of six antipsychotics, two of their metabolites and caffeine in human plasma by LC-MS/MS using a phospholipid-removal microelution-solid phase extraction method for sample preparation [J]. Talanta, 2019, 198: 159-168.
- [19] Remmerie B M, Sips L L, de Vries R, et al. Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 783(2): 461-472.
- [20] 李 悦, 任方龙, 马淑君, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中利培酮和9-羟基利培酮的浓度及临床应用[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(10): 1045-1050.

- Li Y, Ren F L, Ma S J, et al. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by LC-MS/MS and its clinical application [J]. Chin J Hosp Pharm, 2018, 38(10): 1045-1050.
- [21] 徐象珍, 陈彬彬, 吕海燕. 同时检测人血浆中11种治疗精神病药物浓度的HPLC-MS/MS方法的建立 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(10): 808-816.
- Xu X Z, Chen B B, Lv H Y. Establishment of HPLC-MS/MS method for simultaneously detecting the concentrations of 11 psychiatric drugs in human plasma [J]. Chin Pharm J, 2018, 53(10): 808-816.
- [22] Alcantara G K S, Calixto L A, Rocha B A, et al. A fast DLLME-LC-MS/MS method for risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone determination in plasma samples for therapeutic drug monitoring of patients [J]. Microchem J, 2020, 156: 104894.
- [23] 段妮娜, 阳 丽, 黄志军, 等. 利培酮口腔崩解片的生物等效性研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(7): 499-503.
- Duan N N, Yang L, Huang Z J, et al. Study on the bioequivalence of risperidone orally disintegrating tablets [J]. Cent South Pharm, 2010, 8(7): 499-503.
- [24] 夏又华, 唐曦阳, 朱 艳. LC/MS/MS分析人血浆中利培酮和9-OH-利培酮的浓度 [J]. 中医药导报, 2006, 12(5): 67-69.
- Xia Y H, Tang X Y, Zhu Y. LC/MS/MS analysis of the concentration of risperidone and 9-OH-risperidone in human plasma [J]. Guid J TCM, 2006, 12(5): 67-69.
- [25] 国家药典委员会. 生物样品定量分析方法验证指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363-368.
- National Pharmacopoeia Committee. *Guidelines for Validation of Quantitative Analysis Methods for Biological Samples* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 363-368.
- [26] Huang M Z, Shentu J Z, Chen J C, et al. Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(2): 114-120.

[责任编辑 兰新新]