



# Kwantitatieve bepaling van de antipsychotica risperidon, 9-hydroxyrisperidon en haloperidol in serum met behulp van vloeistofchromatografie tandem massaspectrometrie-

A. Chahbouni, S.M. Bosman, R.M. Vos, A. Sinjewel en A.J. Wilhelm

Laboratorium Klinische Farmacologie en Apotheek, Vrije Universiteit Medisch Centrum, Amsterdam, Nederland.

## Samenvatting

Een kwantitatieve LC-MS/MS methode is ontwikkeld voor het bepalen van de geneesmiddelconcentratie (TDM) van risperidon, 9-hydroxyrisperidon en haloperidol in serum. Aan 20 µL serum wordt 175 µL acetonitril met de interne standaarden methylrisperidon en broomperidol toegevoegd. Na 60 seconden vortexen worden de monsters 10 minuten gecentrifugeerd bij 10000 rpm. Na centrifugatie wordt 5 µL van het supernatant op de kolom geïnjecteerd. De chromatografische scheiding is tot stand gekomen op een Xbridge Shield RP18 (3.2µm, 100 x 2.1mm). De detectie heeft plaatsgevonden met behulp van een massaspectrometer Quattro micro API in de ESI+ modus. De kalibratiecurven voor risperidon, 9-OH-risperidon en haloperidol zijn respectievelijk lineair van 2–65 µg/L, 5–160 µg/L en 1–40 µg/L. De variatiecoëfficiënten voor reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid van risperidon, 9-OH-risperidon en haloperidol zijn allen kleiner dan 7%. De bepalingsgrenzen zijn voor risperidon, 9-OH-risperidon en haloperidol vastgesteld op respectievelijk 0.5 µg/L, 2.5 µg/L en 0.4 µg/L.

## Sleutelwoorden:

*antipsychotica; risperidon; paliperidon; haloperidol; LC-MS/MS; TDM*

## 1. Inleiding

Antipsychotica zijn geneesmiddelen die psychotische verschijnselen kunnen verminderen of doen verdwijnen. De eerste antipsychotica zijn ontwikkeld in de jaren vijftig van de vorige eeuw, dit zijn de klassieke antipsychotica en tot deze categorie behoort haloperidol (4-[4-(4-chlorofenyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-1-(4-fluorofenyl-butan-1-on)), zie fig 1. De klassieke antipsychotica verminderen de werking van de signaalstof dopamine in de hersenen, waardoor de kans op psychosen afneemt [1].

Nieuwere antipsychotica hebben naast de dopamine-receptoren ook invloed op de serotoninereceptoren in de hersenen. Tot deze atypische antipsychotica behoort risperidon (4-[2-[4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)-1-piperidyl]ethyl]-3-methyl-2,6-diazabicyclo[4.4.0]deca-1,3-dien-5-on), zie fig 1.

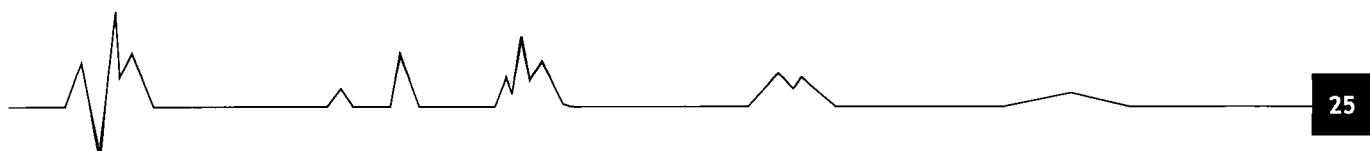
Risperidon wordt door CYP2D6 omgezet tot 9-hydroxy-risperidon (3-[2-[4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)-1-piperidyl]ethyl]-7-hydroxy-4-methyl-1,5-diazabicyclo[4.4.0]deca-3,5-dien-2-on), deze heeft in zekere mate dezelfde farmacologische activiteit als risperidon en is tegenwoordig verkrijgbaar onder de merknaam paliperidon.

Vanwege het smalle therapeutische bereik, grote variatie in kinetiek en wisselende therapietrouw is het van belang om geneesmiddelconcentratie te bepalen. De therapeutische en toxische waarden zijn in tabel 1 weergegeven. Om de geneesmiddelconcentratie te bepalen is er een analyse-methode ontwikkeld m.b.v. LC-MS/MS voor haloperidol, risperidon en de bijbehorend metaboliet 9-hydroxyrisperidon in serum.

Dit artikel beschrijft de validatiemethode van de bepaling van risperidon, 9-OH-risperidon en haloperidol. De validatieparameters dienen te voldoen aan de eisen die in tabel 2 zijn weergegeven, deze zijn conform de interne procedure voor validaties [2,3].

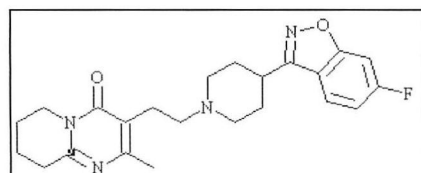
Tabel 1. Therapeutische waarden

Geneesmiddel	Therapeutische grens (µg/L)	Toxische waarde (µg/L)
Risperidon	3 – 40	Som: > 400
9-OH-risperidon	20 – 80	
Haloperidol	3 - 15	> 50

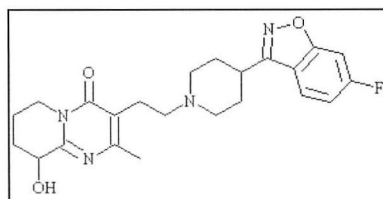


Tabel 2. Validatieparameters met bijbehorende eisen

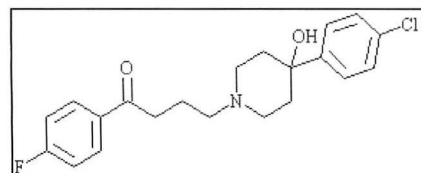
Parameter	Eis
Lineariteit	Geen significante Lack of Fit
VC% herhaalbaarheid	< 10
VC% reproduceerbaarheid	< 10
Juistheid (%)	85 - 115
Juistheid LOQ (%)	80 - 120



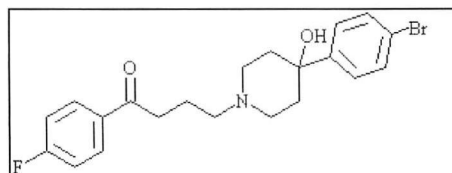
Risperidon



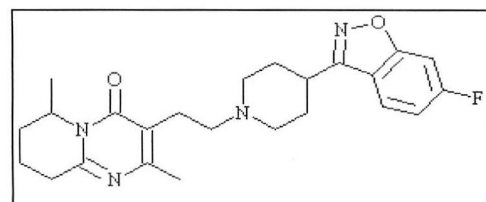
9-oh-Risperidon



Haloperidol



Broomperidol



Methylrisperidon

Fig 1. Chemische structuren van risperidon, 9-OH-risperidon, haloperidol, broomperidol en methylrisperidon

## 2. Materiaal en Methode

### 2.1 Chemicaliën en reagentia

De referentiestoffen risperidon (RSP), 9-hydroxyrisperidon (9-OH-RSP), methylrisperidon (MRSP) en de interne standaard broomperidol (BPR) zijn aangeschaft bij Janssen Pharmaceutica (Beerse, België). De referentiestof haloperidol (HAL) is aangeschaft bij BUFA (Uitgeest, Nederland). Methanol en acetonitril (HPLC-kwaliteit) zijn ingekocht bij Biosolve (Valkenswaard, Nederland).

Ammoniumacetaat (pro analyse) en mierenzuur (pro analyse) zijn aangeschaft bij VWR international (Merck). Water voor het LC-systeem is afkomstig uit een Millipore Synergy<sub>uv</sub> systeem.

Het blanco serum en de validatie controles (QC's) voor RSP, 9-OH-RSP zijn aangeschaft bij de Stichting Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelanalyse en Toxicologie (KKGTT) (Den Haag, Nederland).

### 2.2 Standaarden en controles

De stockoplossingen van RSP, 9-OH-RSP en HAL zijn gemaakt door ca. 20 mg nauwkeurig in te wegen en op te lossen in 50.0 mL acetonitril. Vanuit de stockoplossingen zijn vervolgens werkoplossingen gemaakt.

Een zespunts kalibratielij van de analieten is gemaakt door blankoserum te spiken met de werkoplossingen. De QC<sub>1</sub> voor RSP en 9-OH-RSP is verkregen door de QC<sub>2</sub> (KKGTT controle 2008, onverdund) 1:1 te verdunnen.

De onverdunde en de verdunde KKGTC QC controles zijn vervolgens gespikeerd met haloperidol. De haloperidol werkoplossing die gebruikt is voor het spiken van de QC's heeft plaatsgevonden d.m.v. een aparte inweging. De interne standaarden MRSP en BRP zijn opgelost in acetonitril en hebben respectievelijk een concentratie van 4 µg/L en 10 µg/L. De LOQ is verkregen door vervolgens QC\_1 tienmaal door te verdunnen. In tabel 3 zijn de verkregen standaarden, QC's en LOQ's met bijbehorende concentratie weergegeven.

**Tabel 3. Standaarden, QC's en LOQ's van RSP, 9-OH-RSP en HAL.**

Index	Concentratie (µg/L)		
	RSP	9-OH-RSP	HAL
Standaard 1	2.1	5.0	1.3
Standaard 2	4.2	10.1	2.5
Standaard 3	8.3	21.2	5.1
Standaard 4	16.6	42.3	10.2
Standaard 5	33.2	80.7	20.3
Standaard 6	66.4	161	40.6
QC_1	4.9	25.4	8.5
QC_2	9.8	50.7	25.5
LOQ	0.49	2.54	0.43

### 2.3 Chromatografie

Voor de chromatografische scheiding is een Alliance HPLC 2795 separations module (Waters Ltd., Watford, UK) met een ontgasser en gradiënpomp gebruikt. De temperatuur van de autosampler en kolommen zijn respectievelijk 10 °C en 55 °C.

De scheiding heeft plaatsgevonden op een XBridge™ RP18 kolom (3.5 µm, 100 x 2.1mm). Eluens A is milli Q water met 0.1% mierenzuur en 2 mM ammoniumacetaat. Eluens B is methanol en bevat eveneens 0.1% mierenzuur en 2 mM ammoniumacetaat. Het debiet tijdens de analyse is 0.50 mL/min. Het injectievolume is 5 µL. De gradiënt die gebruikt is tijdens de analyse is weergegeven in tabel 4.

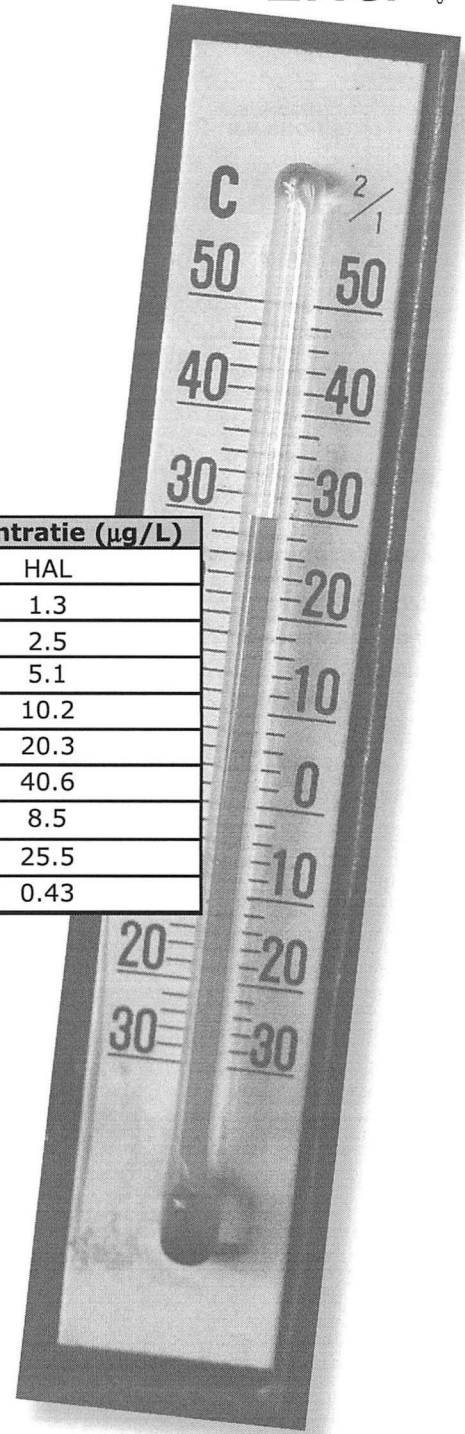
**Tabel 4. Gradiënt tijdens de analyse**

Tijd (min)	Mobiele fase A (%)	Mobiele fase B (%)	Debiet (mL/min)
0.00	65	35	0.500
1.00	0	100	0.500
2.00	65	35	0.500

### 2.4 Massaspectrometer

De Quattro micro tandem massaspectrometer (Micromass, Manchester, UK) is voorzien van een Z-spray ionenbron. Het instrument is tijdens de analyse in de electrospray positieve modus, de Quattro micromass is direct gekoppeld aan het LC-systeem. De analieten worden gedetecteerd door multiple reaction monitoring (MRM). Het vacuüm

wordt door een Edwardspomp (E2M28, Watford, UK) verzorgd. De ionenbrontemperatuur is 120 °C en de desolvatietemperatuur is 350 °C. De desolvatiegassnelheid van stikstof is 800 L/hr. De overgangen (transitions) van RSP, 9-OH-RSP, HAL, MRSP en BRP en de bijbehorende potentialen zijn in tabel 5 weergegeven.



Tabel 5. Transitions van RSP, 9-OH-RSP, MRSP, HAL en BPR

Component	MRM-transitions	Dwell (secs)	Entrance potential (kV)	Cone (V)	Collision (eV)
Risperidon	411.05 → 191.15	0.200	0.50	35	30
OH-risperidon	427.05 → 207.10	0.200	0.50	35	30
Haloperidol	376.00 → 165.15	0.200	0.50	35	30
Methylrisperidon	425.10 → 205.15	0.200	0.50	35	30
Broomperidol	422.00 → 123.15	0.200	0.50	35	30

## 3 Werkwijze

### 3.1 Monstervoorbewerking

De voorbereiding van de monsters vindt plaats in serum. Aan 20 µL serum wordt 175 µL acetonitril met de interne standaarden MRSP en BRP toegevoegd. Hierna volgt het schudden op een vortex (dual 34525, Sniijders) gedurende 1 minuut. Vervolgens worden de monsters 10 minuten gecentrifugeerd bij 10000 rpm. Van het supernatant wordt 5 µL in het systeem geïnjecteerd. Om de MS-bron zo min mogelijk te vervuilen, worden de eerste 40 en de laatste 30 seconden van de methode afgevoerd.

In figuur 2 is een voorbeeld chromatogram weergegeven.

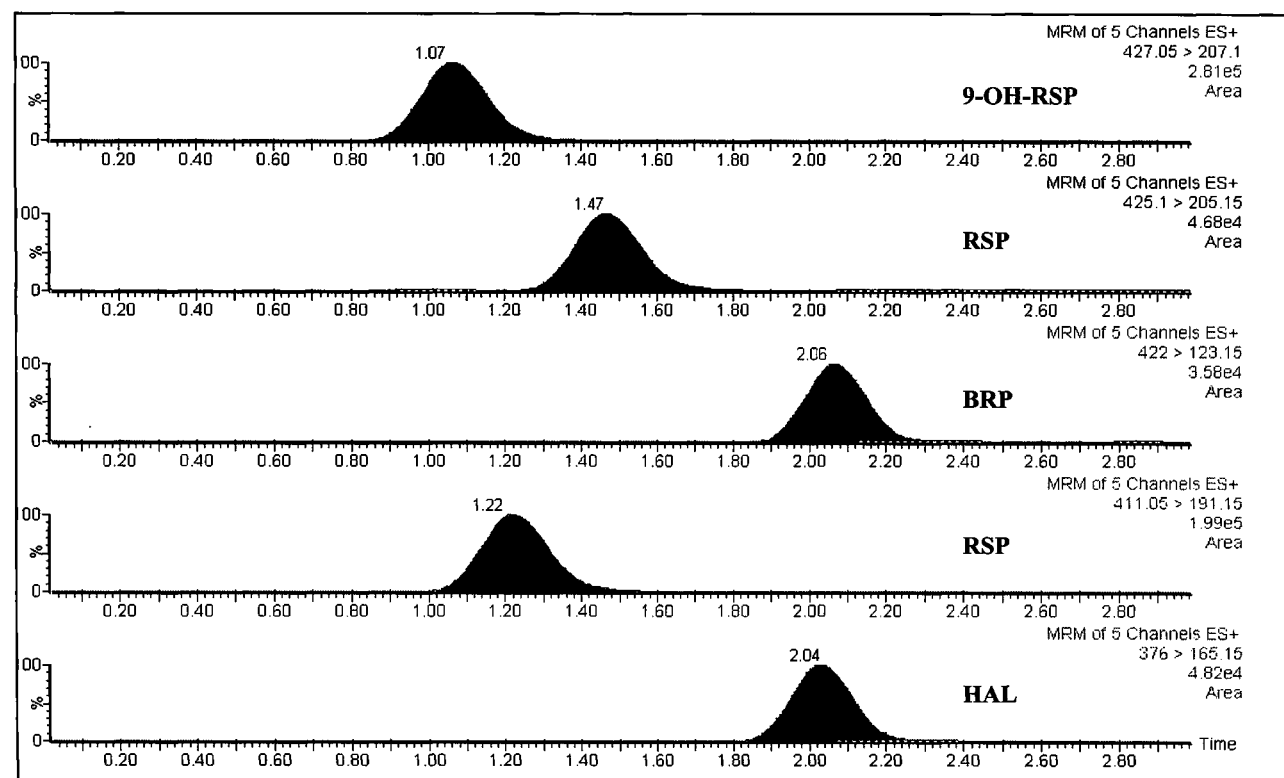


Fig 2. Chromatogram risperidon, 9-hydroxyrisperidon, haloperidol, methylrisperidon en broomperidol.

## 4. Validatie

### 4.1 Lineariteit

De lineariteit is bepaald door de kalibratielijn in triplo op te werken en op dezelfde dag te analyseren. De gegevens zijn statistisch verwerkt in het programma Regres en statistisch getoetst met ANOVA; er is geen significante lack of fit aangetoond. In tabel 6 zijn de gegevens van de lineariteit weergegeven.

Tabel 6. Lineariteit getoetst met ANOVA.

Analiet	Lineariteit µg/L	Parameter ( $y = a + bx$ ) <sup>1</sup>		r <sup>2</sup>
		a	b	
Risperidon	1 -20	0.0195	0.0650	0.9996
9-OH-risperidon	5 - 160	-0.0206	0.0382	0.9994
Haloperidol	1 - 20	0.0096	0.0350	0.9993

<sup>1</sup>y = Area<sub>analiet</sub>/Area<sub>interne standaard</sub>; x is de analiet concentratie

### 4.2 Herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid

De herhaalbaarheid is in zesvoud bepaald door twee controles van verschillende concentraties achtereenvolgens op één dag uit te voeren. De reproduceerbaarheid en de juistheid zijn tevens in zesvoud bepaald met behulp van dezelfde controles gedurende verschillende dagen en door diverse analisten. Mogelijke uitbijters zijn getoetst met de Dixon's-toets, voor de resultaten zie tabel 7.

De LOQ is in zesvoud uitgevoerd, voor de juistheid t.o.v. de nominale concentratie en de variatiecoëfficiënt geldt de eis ± 20% [2,3], zie tabel 7.

Tabel 7. Herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid

	Risperidon			9-OH-risperidon			Haloperidol		
	QC_1	QC_2	LOQ	QC_1	QC_2	LOQ	QC_1	QC_2	LOQ
<b>Herhaalbaarheid</b>									
Gem. (µg/L)	4.5	9.3	0.41	25.3	52.2	2.07	8.4	25.5	0.49
SD	0.1	0.3	0.04	0.9	2.0	0.11	0.2	0.8	0.03
VC (%)	2.2	3.2	9.8	3.6	3.9	5.3	2.4	3.2	7.1
Juistheid (%)	92	95	84	100	103	81	99	98	115
<b>Reproduceerbaarheid</b>									
Gem.	4.9	9.5		25.2	50.8		8.7	25.8	
SD	0.2	0.7		1.4	3.0		0.4	0.9	
VC(%)	5.1	6.9		5.4	6.0		4.2	3.4	
Juistheid(%)	100	96		99	100		102	101	



## 5. Discussie

Het is mogelijk om de ontwikkelde methode met minder patiëntenmateriaal op te zetten. Pipetteer bij de monster-voorbewerking 20  $\mu\text{L}$  in plaats van 10  $\mu\text{L}$  serum en voeg 90  $\mu\text{L}$  acetonitril toe om te onteiwitten. Men dient wel rekening te houden met de pipetteerfout, deze zal namelijk toenemen. Dit laatste is de reden om deze methode met 20  $\mu\text{L}$  te ontwikkelen.

## 6. Conclusie

De methode die in dit artikel is beschreven is gevoelig en selectief voor risperidon, 9-OH-risperidon en haloperidol in serum. Deze LC-MS/MS methode is simpel, snel in de voorbereiding en analyse en daarnaast voldoet deze aan de gestelde eisen.

### Literatuur

1. *Informatorium medicamentorum 2007*; 885-906.
2. *W.I. 7.6: Validatie van analysemethode voor geneesmiddelen.*
3. *Dadgar, D. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. J Pharm Biomed Anal 14 (1995); 23-31.*
4. *Rossen v. R, Trumple, H. Haloperidol in serum m.b.v. Triple Quad LC-MS. Extract 18-4 (2007) 5-10.*
5. *Remmerie, B.M. et al. Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. of Chrom. B, 783 (2003); 461-472.*
6. *Bhatt, J. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. RCM 20 (2006); 2109-2114.*
7. *Mercolini, L. et al. Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma. Anal Bioanal Chem 388 (2007); 235-243.*
8. *Zhang, G. et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma. RCM 21 (2007); 920-928.*

