

DETERMINATION OF RISPERIDONE BY THE LC/MS METHOD

Ewa JANOWSKA

Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: Risperidone belongs to the new generation of neuroleptics. It is a benzisoxazole derivative. This drug is used in the treatment of acute and chronic schizophrenic psychoses. A method of risperidone determination in whole blood was developed in the course of carrying out an expert investigation concerning a female multi-drug intoxication. Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) with atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) was used in the analysis of risperidone in blood. Alkaline liquid-liquid extraction was used to preconcentrate risperidone from the sample. The method was validated. It was shown that the elaborated LC/MS method allowed us to quantitate risperidone within the range of therapeutic and toxic blood concentrations.

KEY WORDS: Risperidone; LC/MS method; Quantitative analysis.

Problems of Forensic Sciences, vol. LVIII, 2004, 103–111

Received 23 November 2004; accepted 3 December 2004

INTRODUCTION

Risperidone is a benzisoxazole derivative belonging to the neuroleptic class of drugs. It exhibits affinity with dopaminergic, serotonergic and histaminergic receptors [1, 4]. The drug is used in treatment of acute and chronic schizophrenic psychoses with enforced positive (productive) and negative (axial) symptoms. It has a positive influence on affective symptoms of schizophrenic disorders. Risperidone is a neuroleptic of the new generation – so-called atopic drugs, which are able to block serotonergic receptors. It is especially effective in the treatment of acute schizophrenia that is resistant to other drugs. It also acts on negative symptoms of the illness. However, it induces extrapyramidal side effects and hyperprolactinemia. The maximal daily dose of risperidone is 4–8 mg and the therapeutic concentration of the drug in serum is 10 to 90 ng/ml.

Among persons taking the drug it has been noticed that some are fast metabolisers, but others are much slower metabolisers.

It was established that the biological half-life ($T_{1/2}$) of the drug is about 3 hours in the case of fast metabolisers, and as much as 20 hours in the case of slow metabolisers [2].

The aim of the research was to elaborate a method of determination of risperidone in blood within the range of therapeutic and toxic concentrations. This was necessary in order to prepare an expert opinion concerning intoxication with several drugs, including the aforementioned xenobiotic.

CASE NOTE

A female dead body was found in the store of a mental hospital. Amitriptyline, perazine and rispolept and a glass filled with unknown fluid were found by her. Since no earlier cases of risperidone poisoning had been noted in the practice of the Institute of Forensic Research (risperidone is the active component of Rispolept), it was necessary to develop a method of its determination.

MATERIALS

A risperidone standard was obtained from rispolept tablets. Several tablets were crushed, and after addition of water, they were alkalinised to pH 13, followed by extraction with a mixture of n-heptane and isoamyl alcohol (99:1). The obtained the extract was evaporated, then the white dry residue was weighed and dissolved in an appropriate volume of methanol. Blood from a blood blank was used for the research.

METHODS

High performance liquid chromatography (HPLC)

On the basis of literature data [1, 2, 3], the HPLC method was chosen for drug determination. A LaChrom D-7000 liquid chromatograph system equipped with an L-7450 photodiode array detector by Merck/Hitachi was used. Separation was performed using a LiChroCART 125 × 4 mm column filled with LiCrospher RP Select B by Merck. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitril and water with addition of o-phosphoric acid (0.1 ml/l of water). The flow rate was set to 1 ml/min and gradient mode was applied.

Sample preparation

A 0.5 ml blank whole blood sample (not any xenobiotics) was spiked with 100 ng of risperidone, then 0.2 ml of saturated carbonate buffer (pH 13) was

added. The sample was then extracted with a mixture of n-heptane and isoamyl alcohol (99:1). After evaporation of the solvents, the extract was analysed by HPLC. The obtained results are shown in Figure 1.

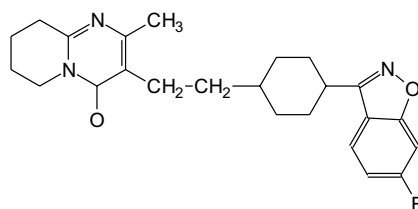


Fig. 1. Molecular structure of risperidone.

The sensitivity of the applied HPLC method was insufficient for detection of risperidone at 100 ng/ml concentration in blood, and so liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) was used.

Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS)

A liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer of an Agilent Technologies HP-1100 Series with quadrupole mass analyser was applied in the research. Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in positive mode was used. Chromatographic separation was achieved on a LiChro-CART 125 × 4 column filled with Purospher 60 RP-18e. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitril and water with addition of formic acid (1 ml/l). A flow rate of 1 ml/min was used. Gradient elution was as follows: 0 min – 0% AcCN, 20 min – 100% AcCN, 25 min – 0% AcCN.

The instrument was operated in selected ions monitoring mode (SIM). The monitored pseudomolecular ions $[M+H]^+$ were: (m/z) 411 for risperidone and 371 for thioridazine, which was used as an internal standard. Integration of peaks and other calculations were performed according to instrument settings.

A reference chromatogram of a blood sample with risperidone and thioridazine (ISTD) is shown in Figure 2.

The extraction procedure described above was applied to blood samples that were analysed by the LC/MS method. The recovery of risperidone was 88%. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for the drug were respectively 0.5 ng/ml and 1 ng/ml. The calibration curve was linear in the concentration range of 10–500 ng/ml. Intra-day repeatability was calculated for two target concentrations of risperidone: 20 and 100 ng/ml in five replicates. All analyses were performed the same day. Results are presented in Table I.

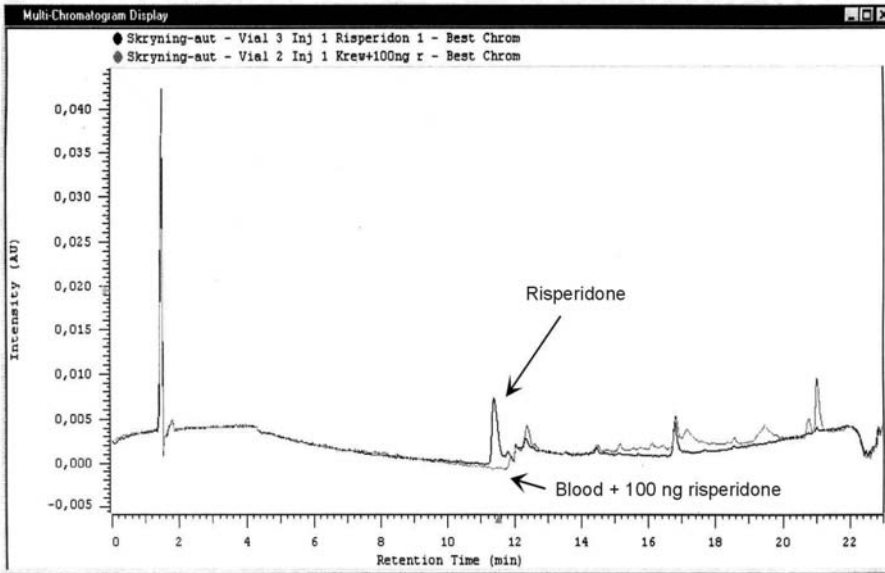


Fig. 2. Reference chromatogram of blood spiked with risperidone at a concentration of 100 ng/ml.

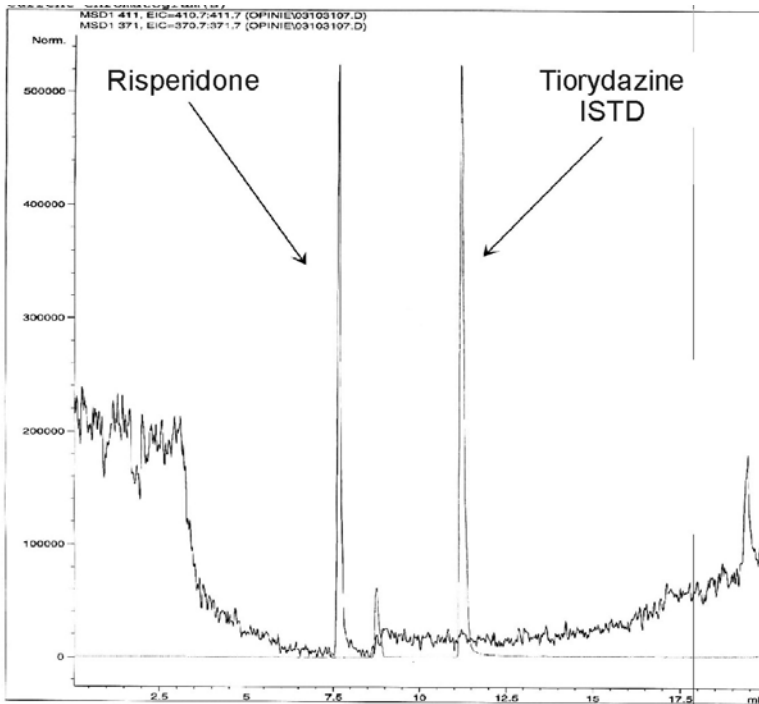


Fig. 3 Chromatogram of blood sample spiked with risperidone and thioridazine obtained in LC/MS assay.

TABLE I. INTRAGROUP REPEATABILITY FOR RISPERIDONE ASSAY IN BLOOD BY LC/MS

Target concentration [ng/ml]	Determined mean concentration \pm <i>SD</i> [ng/ml]	<i>CV</i> [%]
20	17.8 \pm 3.4	7.5
100	94.3 \pm 8.9	1.6

Inter-day precision was established for spiked blood samples with the same concentration of risperidone. Samples were studied on three different days. The obtained results are shown in Table II.

This validated method was used in analysis of blood collected from a deceased woman. The concentration of risperidone in the specimen was 30 ng/ml.

The blood sample was also analysed for perazine and amitriptyline – drugs found near the dead woman. Perazine was determined by the LC/MS method and amitriptyline by the HPLC method. The blood concentrations were as follow: perazine – 2600 ng/ml, amitriptyline 4000 ng/ml and its metabolite nortriptyline at a concentration of 400 ng/ml. Established concentrations of risperidone were within the therapeutic range, whereas amitriptyline and perazine concentrations were within ranges encountered in fatal poisonings.

TABLE II. INTERGROUP REPEATABILITY FOR RISPERIDONE ASSAY IN BLOOD BY LC/MS

Target concentration [ng/ml]	Determined mean concentration \pm <i>SD</i> [ng/ml]			Mean concentration [ng/ml]	<i>CV</i> [%]
	Day I	Day II	Day III		
20	18.9	17.6	16.1	17.2 \pm 4.7	6.2
100	98.3	94.8	92.5	95.2 \pm 4.2	2.3

Phenothiazine derivatives (Perazine) and tricyclic antidepressant drugs (Amitriptyline) administered simultaneously with risperidone can increase its concentration in the blood as a result of interaction.

SUMMARY

The performed research led to the following conclusions:

1. The applied procedure of liquid-liquid extraction of risperidone from blood is efficient and allows high recovery – as much as 88%.
2. The elaborated and validated method of risperidone determination in blood by LC/MS may be successfully used for assaying the drug in therapeutic and toxic concentration ranges.

References:

1. Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 6th Biomedical Publications, Foster City 2002.
2. Borison R. L., Diamond B., Pastiraja A. [et al.], Pharmacokinetics of risperidone in chronic schizophrenic patients, *Psychopharmaceutical Bulletin* 1994, vol. 30, pp. 193–194.
3. Price M. C., Hoffman D. W., Therapeutic drug monitoring of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in serum with solid extraction and high-performance liquid chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring* 1997, vol. 19, pp. 333–337.
4. Wostenborghs R., Lorreyne W., Van Rompaey F. [et al.], Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma, urine and animal tissues by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1992, vol. 583, pp. 223–330.
5. Kostowski W., Farmakologia. Podstawy farmakoterapii, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.

OZNACZANIE RISPERIDONU WE KRWI METODĄ LC/MS

Ewa JANOWSKA

WSTĘP

Risperidon jest lekiem z grupy neuroleptyków, pochodną benzoksazolu. Wykazuje on powinowactwo do receptorów dopaminergicznych, serotonergicznych oraz histaminergicznych [1, 4]. Lek ten jest stosowany w leczeniu ostrych i przewlekłych psychoz schizofrenicznych przebiegających zarówno z nasilonymi objawami pozytywnymi (wytwórczymi), jak i negatywnymi (osiowymi). Korzystnie wpływa na zaburzenia afektywne w przebiegu schizofrenii. Risperidon należy do neuroleptyków nowej generacji, tzw. leków atypowych, które wykazują zdolność blokowania receptorów serotonergicznych. Jest on szczególnie skuteczny w ostrych postaciach schizofrenii opornych na inne leki, działa też na objawy negatywne tej choroby. Wywołuje jednak zaburzenia pozapiramidowe i hiperprolaktynemię. Maksymalna dawka dzienna risperidonu wynosi 4–8 mg, a stężenie terapeutyczne tego leku w surowicy mieści się w zakresie od 10 do 90 ng/ml.

Wśród osób przyjmujących risperidon zauważono, że u części z nich następuje szybki metabolizm tego leku, natomiast u pozostałych proces ten jest znacznie wolniejszy. Wykazano, że u pacjentów szybko metabolizujących lek biologiczny okres półtrwania ($T_{1/2}$) wynosi około 3 godziny, natomiast u pozostałych osób okres ten może trwać nawet do 20 godzin [2].

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania risperidonu we krwi w zakresie stężeń terapeutycznych i toksycznych. Było ono konieczne w celu przeprowadzenia ekspertyzy dotyczącej zatrucia różnymi lekami, w tym także wspomnianym ksenobiotykiem.

OPIS PRZYPADKU

Zwłoki kobiety odkryto w pomieszczeniach gospodarczych szpitala psychiatrycznego. Przy denatce znaleziono tabletki leków: Amitryptyliny, Perazyny i Rispoletu oraz szklankę z płynem.

W związku z tym, że w praktyce Instytutu Ekspertyz Sądowych nie notowano wcześniej przypadków zatrucia risperidonem (składnik aktywny leku Rispolett), niezbędne stało się opracowanie metody oznaczania tego leku.

MATERIAŁ

Wzorzec risperidonu uzyskano z tabletek leku Rispolett. Tabletki rozdrobniono, dodano do nich wody, następnie zalkalizowano do pH 13 i poddano ekstrakcji mieszaniną n-heptanu i alkoholu izoamyłowego (99:1). Ekstrakt odparowano, a uzyskaną białą substancję poddano osuszeniu i odważono, po czym rozpuszczono ją w metanolu.

Do badań stosowano krew uzyskaną ze stacji krwiodawstwa.

METODY

Wysokosprawną chromatografią cieczą (HPLC)

Dzięki danym zawartym w literaturze przedmiotu [1, 2, 3] wybrano metodę HPLC do oznaczenia tego leku. Zastosowano chromatograf cieczowy La Chrom D-700 System z detektorem diodowym L-7450 firmy Merck/Hitachi. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 × 4 mm z wypełnieniem LiChrospher RP Select B firmy Merck. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu o-fosforowego (0,1 ml/l wody). Przepływ fazy wynosił 1ml/min; odbywał się on przy programowanym gradiencie składu.

Przygotowanie próbek krwi

Do 0,5 ml krwi (nie zawierającej żadnych ksenobiotyków) dodano 100 ng risperidonu, a następnie 0,2 ml nasyconego buforu węglanowego (pH 13) i poddano ekstrakcji mieszaniną n-heptanu i alkoholu izoamyłowego (99:1). Po odparowaniu rozpuszczalników ekstrakt badano metodą HPLC. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 1.

W próbie krwi zawierającej 100 ng/ml risperidonu, którą analizowano metodą HPLC, nie potwierdzono jego obecności, dlatego też zastosowano do badań metodę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC/MS).

Metoda chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC/MS)

Do badań użyto chromatografu cieczowego połączonego z detektorem w postaci kwadrupolu serii 1100 firmy Agilent Technologies. Zastosowano chemiczną jonizację pod ciśnieniem atmosferycznym (APCD) i monitorowano jony dodatnie. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART 125 × 4 mm z wypełnieniem Purospher 60 RP-18e. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (1 ml/l). Przepływ fazy wynosił 1ml/min. Odbywał się on przy programowanym gradiencie składu: 0 min – 0% AcCN, 20 min – 100% AcCN, 25 min – 0% AcCN.

Detektor pracował w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). Monitorowano następujące jony pseudomolekularne $[M+H]^+$: (m/z) 411 dla risperidonu oraz 371 dla tiorydazyny, którą stosowano jako wzorzec wewnętrzny. Integracja wysokości pików oraz inne obliczenia wykonywane były automatycznie przez program obsługujący chromatograf.

Na rycinie 2 przedstawiono chromatogram próby krwi z dodatkiem risperidonu i tiorydazyny (wzorzec wewnętrzny).

Próbki krwi do badania metodą LC/MS wyosabniano wyżej opisaną metodą ekstrakcji. Stwierdzono, że jej wydajność wynosi 88%. Wykazano, że granica wykrywalności (LOD) dla risperidonu metodą LC/MS we krwi jest równa 0,5 ng/ml, a granica oznaczalności (LOQ) 1 ng/ml. Sporządzono krzywą kalibracji i ustalono, że zakres liniowości mieści się w granicach od 10 do 500 ng/ml. Wyznaczono także powtarzalność wewnątrzgrupową dla dwóch stężeń risperidonu – 20 i 100 ng/ml, analizując każde

w pięcioelementowej serii. Próbki krwi z dodatkiem ksenobiotyku badano w ciągu jednego dnia. Wyniki zestawiono w tabeli I.

Powtarzalność międzygrupową wyznaczono dla takich samych stężeń risperidonu dodawanych do prób krwi. Próby badano w trzech różnych dniach. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli II.

Tak zwalidowaną metodę zastosowano do analizy próby krwi pobranej od denatki na obecność risperidonu i wykazano jego obecność w stężeniu 30 ng/ml.

Próbę krwi badano także na obecność perazyny i amitryptyliny – leków znalezionych przy zmarłej kobiecie. Perazynę oznaczano metodą LC/MS, a amitryptylinę metodą HPLC. We krwi stwierdzono obecność: perazyny w stężeniu 2600 ng/ml i amitryptyliny w stężeniu 4000 ng/ml.

Wykazane stężenie risperidonu mieści się w zakresie stężeń terapeutycznych, natomiast stwierdzone stężenia amitryptyliny i perazyny spotykane są w przypadkach śmiertelnych zatruc tymi lekami.

Pochodne fenotiazyn (perazyna) i trójpierscieniowe leki antydepresyjne (amitryptylina) podawane równocześnie z risperidonem wywołują interakcję polegającą na zwiększeniu stężenia tego leku we krwi.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że:

1. Zastosowana procedura wyosabniania risperidonu z krwi metodą ekstrakcji ciecz-ciecz jest zadawalająca i pozwala na uzyskanie wysokiej wydajności tego procesu wynoszącą 88%.
2. Opracowaną i zwalidowaną metodę oznaczania tego ksenobiotyku metodą LC/MS można stosować z powodzeniem do oznaczania risperidonu we krwi zarówno w zakresie stężeń terapeutycznych, jak również toksycznych.