

# LC-MS/MS 测定人血浆中沙库巴曲缬沙坦及其代谢物含量

## LCMSMS-706

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪与三重四极杆质谱仪联用检测人血浆中沙库巴曲缬沙坦及其代谢物的方法。结果显示该方法线性良好，标准曲线相关系数大于 0.99，方法准确度及精密度均可满足临床日常检验需求，可为相关从业人员提供参考。

**关键词：** 沙库巴曲缬沙坦 代谢物 三重四极杆液质联用仪

沙库巴曲缬沙坦 (LCZ696) 是一种血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 和脑啡肽抑制剂 (NEPi)，不仅有利于通过降低射血分数 (HFrEF) 治疗心力衰竭 (HF)，而且可能对高血压有一定调节作用。沙库巴曲缬沙坦由沙库巴曲 (NEPi 的非活性前药) 和缬沙坦 (众所周知的 ARB) 组成，摩尔比为 1:1。口服给药后，沙库巴曲缬沙坦迅速吸收并分解为沙库巴曲和缬沙坦，而沙库巴曲可迅速转化为 LBQ657 (NEPi 的活性代谢物)。有报道接受腹膜透析的终末期肾病患

者中沙库巴曲缬沙坦的药代动力学缬沙坦的定量下限 (LLOQ) 为 1 ng/mL，沙库比林和 LBQ657 的测定 LLOQ 为 50 ng/mL (参考 HPLC-RF 检测方法)。由于患者代谢水平差异、生物基质干扰、浓度范围宽等原因，需开发一种专属性更好、灵敏度更佳、线性范围更宽的检测方法。

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8060 建立了一种灵敏、稳定的测定血浆中沙库巴曲缬沙坦及其代谢物的方法，能够更好的契合临床需求。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20AR <sub>5</sub>
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30ACMP
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-8060
色谱工作站：	LabSolutions Ver.5.99		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack GISS C18 50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm; P/N: 227-30048-02; 岛津 (上海) 实验器材有限公司		
流动相：	A-0.1% 甲酸水溶液; B- 甲酸 / 甲醇 / 乙腈 (2:500:500,v/v)		
流速：	0.3 mL/min	柱温：	40°C
进样体积：	1 μL	洗针方式：	外壁洗针
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 65%，时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pump	B.Conc	80
2.00	Pump	B.Conc	98
3.00	Pump	B.Conc	98
3.01	Pump	B.Conc	65
3.80	Control	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+	接口温度：300℃
雾化气流速：3.0 L/min	干燥气流速：10 L/min
加热模块温度：400℃	加热气流速：15 L/min
D L 温度：180℃	扫描模式：多反应监测 (MRM)
MRM 参数：见表 2	

表 2 MRM 优化参数

No.	名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	缬沙坦	137863-60-6	436.00	291.10*	-20.0	20.0	-12.0
2	缬沙坦 -d9	/	445.00	300.20*	-21.0	-20.0	-14.0
3	沙库巴曲	149709-62-6	412.25	266.15*	-20.0	-20.0	-16.0
4	沙库巴曲 -d4	/	416.25	266.15*	-20.0	-20.0	-16.0
5	代谢物 -LBQ657	149709-44-4	384.20	266.15*	-19.0	-30.0	-11.0
6	代谢物 -LBQ657-d4	/	388.20	266.15*	-19.0	-30.0	-16.0

\* 代表定量离子对。

### 1.3 校准曲线样品制备

以 50% 甲醇配制标准贮备液 (1.0 µg/mL)，以血浆基质配制校准曲线样品浓度为 8~8000 ng/mL (缬沙坦)、2~2000 ng/mL (沙库巴曲)、30~30000 ng/mL (沙库巴曲代谢物 LBQ675)。

### 1.4 样品前处理

取 50 µL 血浆，加入 150 µL 内标工作液 (空白样品加甲醇)，涡旋混匀后于 4℃、13000 rpm 离心 5 min。转移 50 µL 上清液至另一干净的聚丙烯管中，加入 50 µL 流动相 B 稀释，室温下涡旋 1 min 后上机测定。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 典型图谱

空白血浆、基质校准曲线 (LLOQ)、临床样品 MRM 谱图如下图所示。

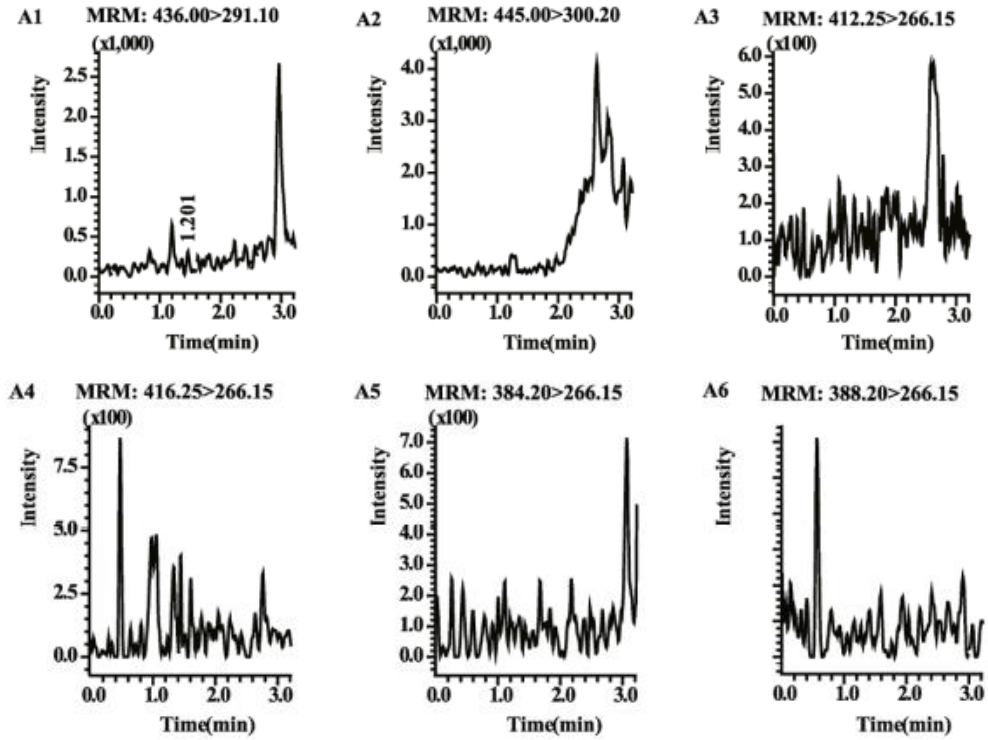


图 1. 空白血浆 (A1~A6: 缬沙坦, 缬沙坦 -d9, 沙库巴曲, 沙库巴曲 -d4, 代谢物 -LBQ657 and 代谢物 -LBQ657-d4 )

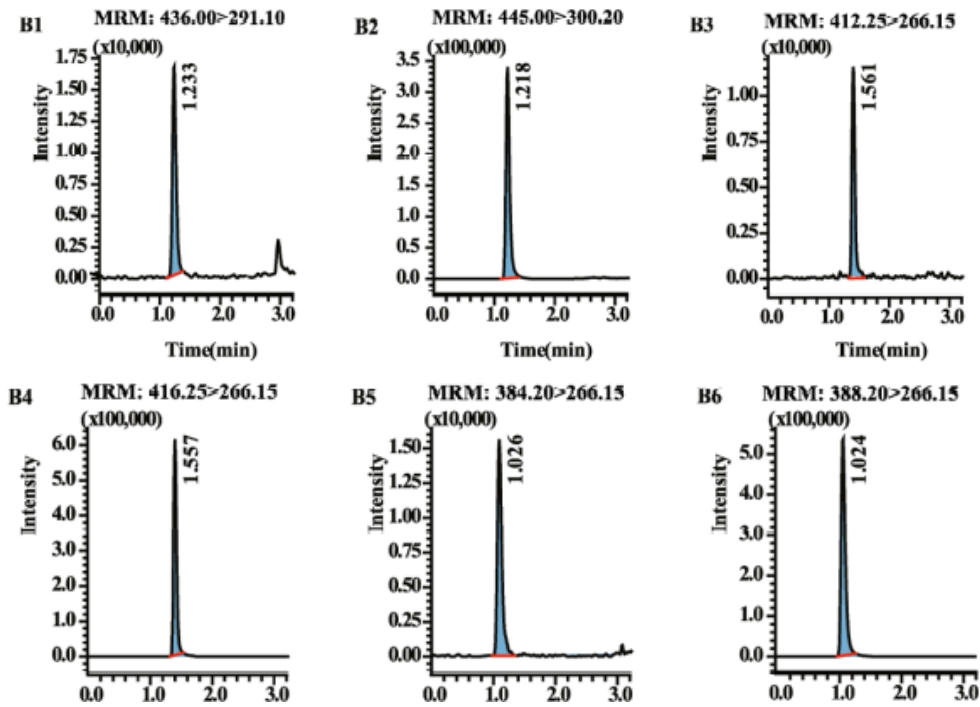


图 2 LLOQ 样品 (B1~B6: 缬沙坦, 缬沙坦 -d9, 沙库巴曲, 沙库巴曲 -d4, 代谢物 -LBQ657 and 代谢物 -LBQ657-d4 )

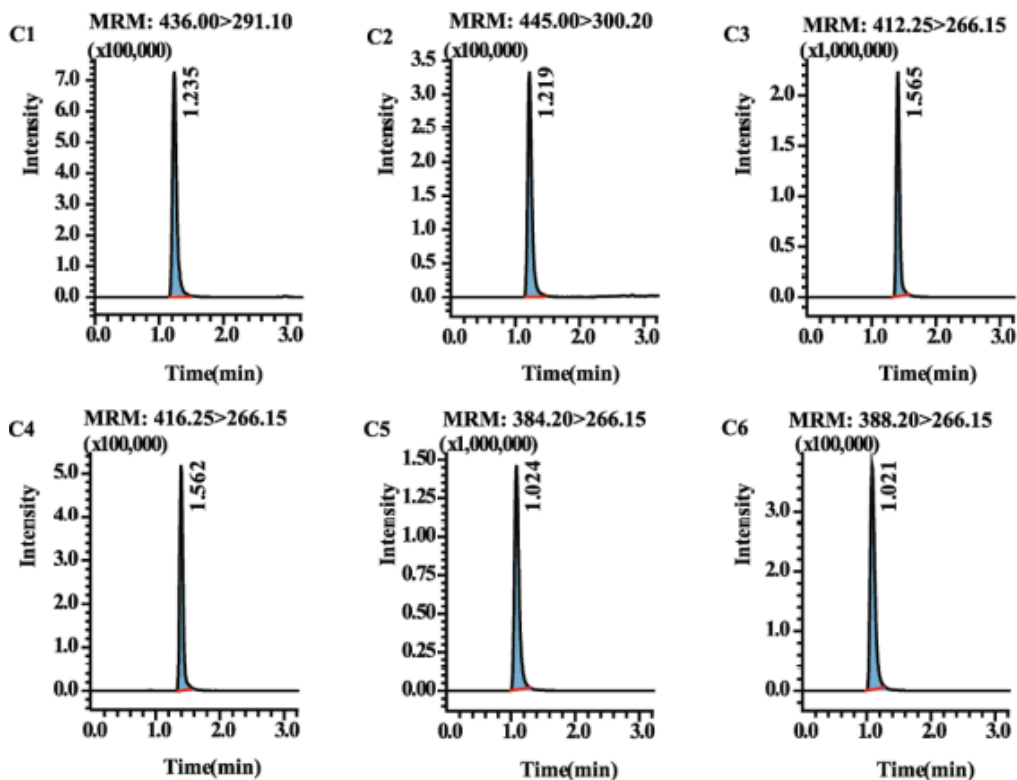


图3 真实样品 (C1~C6: 缬沙坦, 缬沙坦-d9, 沙库巴曲, 沙库巴曲-d4, 代谢物-LBQ657 and 代谢物-LBQ657-d4)

## 2.2 线性关系

使用空白血浆配制基质校准曲线, 按 1.2 中的分析条件进行分析, 内标法制作校准曲线, 得到校准曲线信息如下:

表3 校准曲线信息

No.	化合物	标准曲线	判定系数 $r^2$	准确度 (%)
1	缬沙坦	$Y = (0.00606)X + (0.000099)$	0.9995	94.9-105.9
3	沙库巴曲	$Y = (0.01004)X + (0.000805)$	0.9987	90.6-108.5
5	代谢物-LBQ657	$Y = (0.00100)X + (0.001824)$	0.9995	91.8-112.7

## 2.3 精密度实验

按 1.4 中的前处理方法对空白血浆添加 LLOQ、低、中、高浓度标准品作为 LLOQ、低、中、高浓度质控品, 按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析, 每个样品平行制备 6 份, 批内准确度在 89.3 %~110.5 % 之间, 批内精密度在 1.6 %~6.9 % 之内, 表明该方法重复性良好, 满足临床测定需求。

表 4 质控样品精密度结果 (n=6)

No.	化合物	浓度 (ng/ml)	准确度与精密度 (日内)		准确度与精密度 (日间)	
			RE %	CV %	RE %	CV %
1	缬沙坦	8.00	110.5	2.5	104.0	5.9
		24.00	90.8	2.7	89.2	3.8
		200.00	92.5	4.4	89.5	3.8
		6000.00	100.0	1.6	99.8	1.8
2	沙库巴曲	2.00	98.5	6.9	97.0	6.4
		6.00	91.0	4.7	90.3	3.2
		50.00	89.4	4.9	88.0	3.4
		1500.00	93.9	2.1	95.3	2.2
3	代谢物-LBQ657	30.00	98.7	3.1	100.0	4.5
		90.00	90.7	3.1	89.7	2.8
		750.00	89.3	1.7	88.1	2.0
		22500.00	93.3	2.8	97.1	2.4

#### 2.4 基质效应、回收率实验

按 1.4 中的前处理方法对空白血浆添加低、中、高浓度标准品作为低、中、高浓度质控品，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，每个样品平行制备 6 份进行考察，结果如表 5 所示。

表 5 基质效应、回收率结果 (n=6)

No.	化合物	浓度 (ng/ml)	基质效应		回收率	
			RE %	CV %	RE %	CV %
1	缬沙坦	24.00	101.2	1.7	92.7	3.3
		200.00	101.1	2.3	92.8	3.7
		6000.00	100.7	2.5	93.7	3.4
2	沙库巴曲	6.00	105.0	3.5	99.9	3.1
		50.00	100.1	1.9	104.6	4.4
		1500.00	100.0	0.8	103.2	3.4
3	代谢物-LBQ657	90.00	104.7	3.4	83.0	2.8
		750.00	100.7	1.0	84.1	3.4
		22500.00	99.6	2.4	88.6	2.5

#### 2.5 残留及稀释稳定性实验

按 1.4 中的前处理方法，制备血浆基质质控品（2 倍 ULOQ）进行残留考察；同时以空白血浆将 2 倍 ULOQ 稀释 5 倍后进行稀释稳定性考察；每个样品平行制备 6 份。稀释稳定性及残留结果见表 6。

表 6 残留及稀释稳定性

No.	化合物	浓度 (ng/ml)	稀释稳定性		残留
			RE %	CV %	与 LLOQ 比值 %
1	缬沙坦	12000	94.4	3.2	< 9.6
2	沙库巴曲	3000	92.9	3.6	-
3	代谢物 -LBQ657	45000	94.2	3.0	-

“-”表示未观测到残留

## 2.6 稳定性实验

按 1.4 中的前处理方法，制备血浆基质低、中、高浓度质控品，每个样品平行制备 6 份，考察全血室温、血浆室温、处理后自动进样器、-80℃冻存 51 天以及反复冻融 5 次的稳定性。

表 7-1 稳定性

No.	化合物	浓度 (ng/ml)	全血 (4°C, 1.5h)		室温 (25°C, 14h)		自动进样器 (25°C, 14h)	
			RE %	CV %	RE %	CV %	RE %	CV %
1	缬沙坦	24.00	96.5	5.2	91.3	2.5	90.0	3.8
		200.00	102.3	2.3	90.0	2.1	90.5	1.4
		6000.00	100.4	0.6	99.9	1.4	102.6	1.7
2	沙库巴曲	6.00	107.7	4.9	96.8	1.8	98.5	4.8
		50.00	97.4	3.1	90.0	1.9	90.4	1.5
		1500.00	105.3	1.0	96.3	1.1	99.9	1.4
3	代谢物 -LBQ657	90.00	92.1	14.8	90.9	2.9	92.3	2.9
		750.00	99.0	2.5	88.3	2.3	87.5	0.7
		22500.00	103.2	3.6	97.2	1.9	99.6	1.4

表 7-2 稳定性

No.	化合物	浓度 (ng/ml)	冻存 (-80°C, 51d)		冻融 5 次 (-80°C, 5times)	
			RE %	CV %	RE %	CV %
1	缬沙坦	24.00	91.7	6.1	89.6	9.5
		200.00	91.0	2.7	90.5	4.7
		6000.00	95.5	2.9	96.2	2.3
2	沙库巴曲	6.00	94.0	14.3	85.5	8.5
		50.00	86.2	4.9	87.0	2.3
		1500.00	96.0	2.6	97.2	3.5
3	代谢物 -LBQ657	90.00	92.9	9.1	97.8	9.5
		750.00	89.6	3.9	89.7	3.3
		22500.00	96.4	1.7	97.1	1.6

## ■ 结论

使用岛津超高效液相色谱质谱仪建立了人血浆中沙库巴曲缬沙坦及其代谢物的测定方法，并考察了方法的专属性、线性、残留、准确度、精密度及稳定性。结果显示该方法线性良好，校准曲线相关系数大于 0.99，方法准确度、精密度、稳定性均可满足临床日常检验需求。该方法可以为临床人血浆中沙库巴曲缬沙坦及其代谢物的检测提供很好的借鉴和参考。

岛津应用云

