

HPLC-FD 同时测定人血浆中沙库巴曲缬沙坦 3 种成分的浓度及其应用

马妍妮^a, 严宁^b, 陈国霆^a, 张辉^b, 张文萍^{a*}(宁夏医科大学总医院, a.药剂科, b.心血管内科重症监护室, 银川 750004)

摘要: 目的 建立人血浆样品中沙库巴曲、缬沙坦及其主要代谢产物 LBQ-657 的高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FD)分析方法。方法 采用乙腈沉淀法处理血浆样品, SN-38 作为内标进行内标法定量。采用 Agilent Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 荧光检测器; 以甲醇-磷酸二氢钠缓冲液(pH 3.0)(67 : 33)为流动相; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。采用多波长法, 在 0~6 min, λ_{EX}=380 nm, λ_{EM}=430 nm, 定量检测 SN-38; 6~9.4 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=314 nm, 定量检测 LBQ-657; 9~12 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=374 nm, 定量检测缬沙坦; 12~18 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=314 nm, 定量检测沙库巴曲。5 例患者口服 100 mg 沙库巴曲缬沙坦钠片后 1.5, 3 h 分别采样, 检测血浆中沙库巴曲、缬沙坦及 LBQ-657 浓度。结果 人血浆样品中各成分在 0.1~20 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r>0.999$), 低、中、高质控血浆样品的提取回收率为 80.30%~96.45%。日内、日间精密性、准确度和稳定性均符合生物样品分析要求。结论 建立的 HPLC-FD 定量分析方法快速、灵敏、准确, 可用于人血浆中沙库巴曲、缬沙坦及其主要代谢产物 LBQ-657 的含量测定。

关键词: 沙库巴曲缬沙坦; LBQ-657; 药动学; 高效液相色谱-荧光检测法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)05-0622-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.05.008

引用本文: 马妍妮, 严宁, 陈国霆, 等. HPLC-FD 同时测定人血浆中沙库巴曲缬沙坦 3 种成分的浓度及其应用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 622-627.

Simultaneous Determination of Three Components of Sacubitril/Valsartan in Human Plasma by HPLC-FD and Its Application

MA Yanni^a, YAN Ning^b, CHEN Guoting^a, ZHANG Hui^b, ZHANG Wenping^{a*}(General Hospital of Ningxia Medical University, a. Department of Pharmacy, b. Coronary Care Unit, Yinchuan 750004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an analytical method for simultaneous determination of sacubitril, valsartan and its main metabolite LBQ-657 in human plasmas by high performance liquid chromatography-fluorescence detection(HPLC-FD). **METHODS** Precipitation method was used to treat plasma samples via acetonitrile and SN-38 applied as internal standard. Agilent Eclipse SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The chromatographic separations were accomplished using multi-wavelength with a mobile phase composed of methanol and sodium dihydrogen phosphate buffer(pH 3.0) at ratio of 67 : 33. The column temperature was maintained at 25 °C with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The injection volume was 20 μL. The multi-wavelength conditions were 0~6 min, λ_{EX}=380 nm, λ_{EM}=430 nm, for SN-38; 6~9.4 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=314 nm, for sacubitril; 9~12 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=374 nm, for valsartan; 12~18 min, λ_{EX}=255 nm, λ_{EM}=314 nm, for LBQ-657. Sacubitril and valsartan sodium tablets(dose 100 mg) was administered to 5 patients and sampling after 1.5, 3 h. HPLC-FD was used to detect concentration of sacubitril, valsartan and its main metabolite LBQ-657 in human plasma. **RESULTS** The calibration curves were linear over the range of 0.1~20 μg·mL⁻¹($r>0.999$). The extraction recovery of sacubitril, valsartan and LBQ-657 were found from 80.30% to 96.45%. According to the intra- and inter-day precisions, accuracy and stability, demonstrating that the method was confirmed to be accurate, precise and stable. **CONCLUSION** The developed method is successfully applied for determination of sacubitril, valsartan and its main metabolite LBQ-657 in human plasma.

KEYWORDS: sacubitril/valsartan; LBQ-657; pharmacokinetics; HPLC-FD

沙库巴曲缬沙坦, 又名 LCZ696, 化学名为 [3-[(1S,3R)-1-(联苯-4-基甲基)-3-乙氧羰基-1-丁基氨基甲酰基]丙酸根-(S)-3'-甲基-2'-(戊酰基{2''-(四氮唑-5-基酸根)联苯-4'-基甲基}氨基)丁酸根]三钠盐二倍半水合物(结构式见图 1)^[1]。LCZ696 是一种血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂, 作为一种复方

制剂, 它的主要成分为脑啡肽酶抑制剂沙库巴曲和血管紧张素 II 受体拮抗剂缬沙坦^[2]。其中, 缬沙坦能够选择性作用于 AT1 受体, 抑制血管紧张素 II 和醛固酮的释放; 而沙库巴曲本身无活性, 但经机体代谢后可转化为活性物质 LBQ-657, 该物质能够抑制脏啡肽活性, 提高利钠肽等内源肽水

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2020AAC03363, 2018AAC03140)

作者简介: 马妍妮, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: mayanni2005@163.com *通信作者: 张文萍, 女, 博士, 副教授 E-mail: zhangwenping2008bs@163.com

平^[3-4]。因此, LCZ696 这种超分子复合物被认为有助于降低心血管死亡和心力衰竭住院的可能性。临床推荐用它代替血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂作为治疗慢性心力衰竭这类患者的一线药物^[5]。

沙库巴曲缬沙坦钠片用药经验有限, 测定沙库巴曲、沙库巴曲主要活性代谢产物 LBQ657 和缬沙坦的血药浓度, 是准确预测用药剂量的有力手段。

LCZ696 的分析检测方法主要有色谱法^[1,6]和质谱法^[2,7]。其中, 质谱法同时测定沙库巴曲、LBQ657 和缬沙坦报道较少, 缺乏系统的方法学研究, 并且设备昂贵, 测定过程需要加入同位素内标校正, 仪器普及率较低, 不宜推广; HPLC 是检测 LCZ696 的主流方法, 紫外检测器响应值相对偏低, 荧光检测器响应较高, 但未见血浆中药物浓度测定方法。本实验利用荧光检测器具有自动转换激发光与发射光波长的优势, 在不同时间段, 分别选用沙库巴曲、LBQ-657 和缬沙坦的最佳激发和发射波长, 建立了多波长的 HPLC-FD 方法, 在同一流动相、流速、等度洗脱条件下, 同时快速、准确、高灵敏的检测人血浆中沙库巴曲、LBQ-657 和缬沙坦的血药浓度。

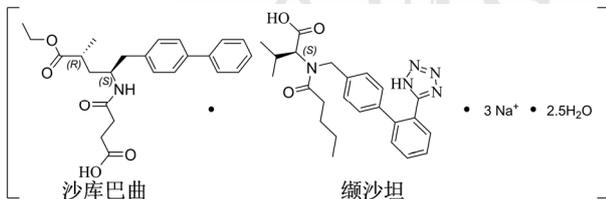


图 1 LCZ696 的结构
Fig. 1 Structure of LCZ696

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AG 5804R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); XW-80A 涡旋混合器(姜堰市康健医疗器械有限公司); KQ-500VDY 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SHA-C 型水浴恒温振荡器(金坛市华龙实验仪器厂); DV215CD 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司); ADVANTAGE A10 纯水发生器(Merck Millipore); FE-20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

对照品沙库巴曲(批号: K18J10P93277; 含量>99%)、LBQ-657(批号: E19J10K93276; 含量>99%)、

缬沙坦(批号: H12S9Z70007; 含量>99%)均购自上海源叶生物科技有限公司; 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38, 四川江源药业有限公司, 批号: 140205); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Thermo fisher scientific), 其他试剂均为分析纯。

研究对象: 在宁夏医科大学总医院住院且口服应用沙库巴曲缬沙坦片的 5 例患者。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

沙库巴曲、缬沙坦和 LBQ-657 对照品储备液的配制: 取沙库巴曲、缬沙坦和 LBQ-657 各 10 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 即得质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 沙库巴曲、缬沙坦和 LBQ-657 对照品储备液。各取适量储备液用 50% 甲醇水稀释成质量浓度分别为 0.5, 2.5, 5, 25, 50, 200, 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合系列对照品溶液, 用于方法学研究。

内标 SN-38 溶液的配制: 精密称取 SN-38 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 DMSO 溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标储备液。再以 50% 甲醇水稀释, 配成 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作液, 分装后立即于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2 血浆样品处理

取 100 μL 待测血浆样品, 置 1.5 mL 离心管中, 依次加入内标工作液 20 μL , 乙腈 300 μL , 涡旋混合 5 min, 在 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 取上清液, 进样 20 μL 。

2.3 色谱条件

Agilent Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 荧光检测器; 以甲醇-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 3.0)(67 : 33) 为流动相; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 20 μL 。采用多波长法, 在 0~6 min, $\lambda_{\text{EX}}=380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=430 \text{ nm}$, 定量检测 SN-38; 6~9.4 min, $\lambda_{\text{EX}}=255 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=314 \text{ nm}$, 定量检测 LBQ-657; 9~12 min, $\lambda_{\text{EX}}=255 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=374 \text{ nm}$, 定量检测缬沙坦; 12~18 min, $\lambda_{\text{EX}}=255 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=314 \text{ nm}$, 定量检测沙库巴曲。

2.4 专属性试验

分别制备空白血浆+沙库巴曲对照品、空白血浆+缬沙坦对照品、空白血浆+LBQ-657 对照品、患者口服沙库巴曲缬沙坦 3 h 后的血浆样品, 按“2.2”项下方法处理, 进样测定, 结果表明, 沙

库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 及内标的保留时间分别为 15.6, 9.6, 7.9, 4.6 min, 且色谱峰峰形良好, 空白血浆中的内源性物质对检测无干扰, 结果见图 2。

2.5 标准曲线的制备

取 100 μL 人空白血浆, 加入混合系列对照品溶液适量, 配制成血浆浓度分别为 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 40, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品, 按“2.2”项下方法处理, 进样测定峰面积。以待测物与内标的峰面积比为纵坐标(y), 待测物浓度为横坐标(x), 进行线性回归。3 个待测物在“2.1”项下的浓度范围内线性关系良好, 结果见表 1。

2.6 精密性与准确度

取空白血浆配制低、中、高 3 个浓度的质控样品(0.25, 4, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及定量限(0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)溶液, 按“2.2”项下方法处理后测定。考察方法的日内与

日间精密性, 以日内、日间 RSD 和 RE 分别表示精密性和准确度, $\text{RE}(\%) = (\text{实测值} - \text{理论值}) / \text{理论值} \times 100\%$, $\text{RSD}(\%) = \text{实测值的平均值} / \text{标准偏差} \times 100\%$, 结果见表 2。沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 低、中、高 3 个浓度水平的质控样品的日内和日间 RSD 均 < 15%, RE 均 < 15%。该结果表明本法测定人血浆中沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 的准确度与精密性可满足临床测定的要求。

2.7 提取回收率

同“2.6”项下方法配制低、中、高 3 个质控浓度的血浆样品($n=6$), 按“2.2”项下方法处理后测定, 以提取后峰面积除以未经提取直接进样获得的色谱峰面积, 计算沙库巴曲、缬沙坦和 LBQ-657 的提取回收率, 提取回收率 $\text{RSD}(\%) = \text{提取后样本测定所得的分析物峰面积} / \text{未经提取样本测定所得的分析物峰面积} \times 100\%$, 结果见表 3。

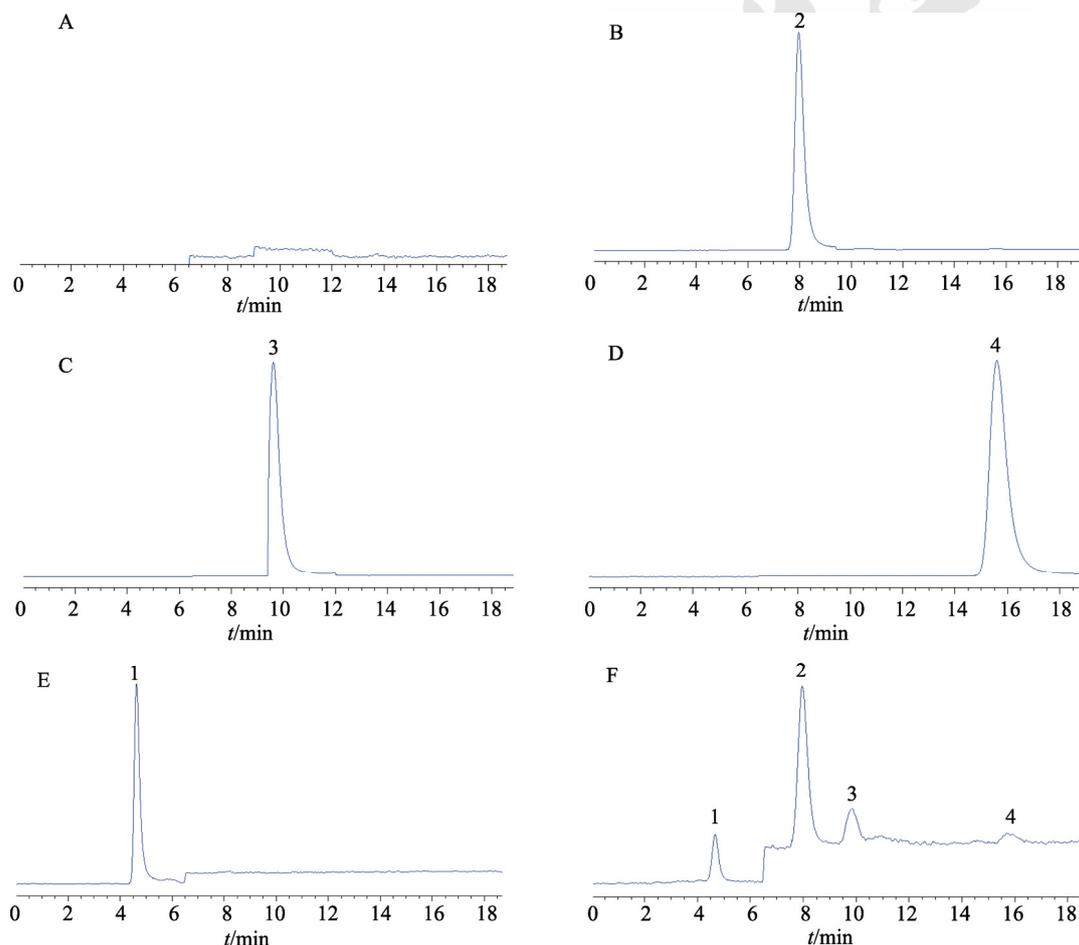


图 2 人血浆中沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 和 SN-38 HPLC 色谱图

A-人空白血浆; B-空白血浆+LBQ-657 对照品溶液; C-空白血浆+缬沙坦对照品溶液; D-空白血浆+沙库巴曲对照品溶液; E-空白血浆+SN-38 内标溶液; F-给药后的血浆样品; 1-SN-38; 2-LBQ-657; 3-缬沙坦; 4-沙库巴曲。

Fig. 2 Representative HPLC chromatograms of sacubitril, valsartan, LBQ-657 and SN-38 in the plasma of human

A-blank plasma of human; B-blank plasma+LBQ-657; C-blank plasma+valsartan; D-blank plasma+sacubitril; E-blank plasma+SN-38; F-plasma samples after oral administration; 1-SN-38; 2-LBQ-657; 3-valsartan; 4-sacubitril.

表 1 线性范围、回归方程及相关系数

Tab. 1 Linear ranges, regression equations and correlation coefficients

待测物	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	相关系数 r
沙库巴曲	0.1~60	$y=2\ 288.87x+86.50$	0.999 6
缬沙坦	0.1~60	$y=940.08x-276.31$	0.999 5
LBQ-657	0.1~60	$y=3\ 136.64x-256.71$	0.999 5

表 2 日内和日间精密度的、准确度试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of intra-day and inter-day precision and accuracy test($n=6$)

待测物	理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	RSD/%	
			日内精密度	日间精密度
沙库巴曲	0.1	11.80	3.28	4.60
	0.25	2.62	4.22	4.27
	4	-7.88	3.65	3.66
	50	-6.86	2.15	2.05
缬沙坦	0.1	-1.82	4.44	8.55
	0.25	-6.35	7.16	12.95
	4	-7.44	1.95	2.38
	50	-7.18	1.86	1.93
LBQ-657	0.1	-9.22	8.43	12.65
	0.25	-10.51	6.15	8.03
	4	-12.20	2.45	3.59
	50	-6.54	4.04	3.88

表 3 沙库巴曲、缬沙坦和 LBQ-657 平均提取回收率($n=6$)

Tab. 3 Average extraction recoveries of sacubitril, valsartan and LBQ-657($n=6$)

待测物	理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率/%	RSD/%
沙库巴曲	0.25	80.54 \pm 7.04	8.75
	4	81.32 \pm 1.94	2.38
	50	86.66 \pm 8.96	10.33
缬沙坦	0.25	80.79 \pm 6.18	7.65
	4	81.61 \pm 5.24	6.42
	50	87.90 \pm 7.87	8.95
LBQ-657	0.25	96.45 \pm 2.42	2.51
	4	81.72 \pm 3.51	4.29
	50	86.48 \pm 9.00	10.41
SN-38	10	80.30 \pm 9.50	11.82

2.8 稳定性考察

自动进样器放置稳定性: 3 个质控浓度的血浆样品处理后在自动进样器中(4 °C)放置 36 h 后, 考察其在自动进样器中放置后浓度有无变化。冻融、室温放置、长期储存稳定性: 3 个质控浓度的血浆质控样品从-70 °C 至室温冻融 3 次、室温(25 °C)放置 4 h、-70 °C 放置 30 d 后制备并用新制备的标准曲线进行测定, 与理论浓度进行比较。结果表

明, 血浆样品在-70 °C 放置及处理后的血浆在室温放置稳定性良好, 结果见表 4~7。

表 4 血浆样品制备后于自动进样器放置 36 h 的稳定性($n=3$)

Tab. 4 Stability of plasma sample post-treatment in auto-sampler for 36 h ($n=3$)

理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LBQ-657		缬沙坦		沙库巴曲	
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%
0.25	0.249	-0.2	0.241	-3.6	0.280	11.8
	0.246	-1.7	0.225	-10.0	0.279	11.5
	0.259	3.7	0.269	7.5	0.277	10.8
4.0	3.856	-3.6	3.614	-9.6	3.703	-7.4
	3.849	-3.8	3.718	-7.1	3.726	-6.9
	3.857	-3.6	3.641	-9.0	3.855	-3.6
50	44.566	-10.9	46.459	-7.1	44.320	-11.4
	45.783	-8.4	47.428	-5.1	45.451	-9.1
	45.703	-8.6	47.171	-5.7	45.815	-8.4

表 5 血浆样品前处理过程中放置 4 h 的稳定性($n=3$)

Tab. 5 Stability of plasma sample storage at room temperature for 4 h($n=3$)

理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LBQ-657		缬沙坦		沙库巴曲	
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%
0.25	0.240	-4.2	0.268	7.1	0.255	1.8
	0.236	-5.7	0.257	2.8	0.223	-11.0
	0.253	1.1	0.249	-0.3	0.241	-3.7
4.0	3.883	-2.9	3.553	-11.2	3.919	-2.0
	3.907	-2.3	3.656	-8.6	3.817	-4.6
	3.797	-5.1	3.739	-6.5	3.892	-2.7
50	46.668	-6.7	45.219	-9.6	45.533	-8.9
	46.752	-6.5	45.369	-9.3	45.194	-9.6
	46.349	-7.3	47.235	-5.5	47.705	-4.6

表 6 血浆样本反复冻融 3 次的稳定性($n=3$)

Tab. 6 Stability of plasma sample of three freeze-thaw cycles($n=3$)

理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LBQ-657		缬沙坦		沙库巴曲	
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%
0.25	0.234	-6.5	0.267	7.0	0.214	-14.4
	0.249	-0.6	0.350	40.2	0.213	-14.7
	0.260	3.9	0.285	14.2	0.225	-9.8
4.0	3.686	-7.8	3.406	-14.9	3.648	-8.8
	3.419	-14.5	3.528	-11.8	3.401	-15.0
	3.702	-7.4	3.554	-11.2	3.600	-10.0
50	44.530	-10.9	46.811	-6.4	46.872	-6.3
	46.570	-6.9	47.441	-5.1	44.531	-10.9
	48.833	-2.3	45.648	-8.7	45.129	-9.7

表 7 血浆样本-70℃冻存 30 d 的稳定性

Tab. 7 Stability of plasma sample frozen storage at -70℃ for 30 d

理论浓度/ μg·mL ⁻¹	LBQ-657		缬沙坦		沙库巴曲	
	实测浓度/ μg·mL ⁻¹	RE/ %	实测浓度/ μg·mL ⁻¹	RE/ %	实测浓度/ μg·mL ⁻¹	RE/ %
0.25	0.231	-7.7	0.227	-9.3	0.276	10.4
	0.242	-3.4	0.211	-15.7	0.242	-3.0
	0.228	-8.9	0.222	-11.4	0.276	10.4
4.0	3.531	-11.7	3.817	-4.6	3.691	-7.7
	3.484	-12.9	3.798	-5.0	3.753	-6.2
	3.413	-14.7	3.840	-4.0	3.612	-9.7
50	50.304	0.6	46.940	-6.1	46.265	-7.5
	45.506	-9.0	46.678	-6.6	46.390	-7.2
	46.230	-7.5	47.348	-5.3	47.484	-5.0

2.9 人血浆样品中沙库巴曲、缬沙坦及 LBQ-657 含量的测定

选取在宁夏医科大学总医院接受治疗的 5 例慢性心力衰竭患者作为研究对象,连续 3 d 口服沙库巴曲缬沙坦钠片(100 mg),沙库巴曲、缬沙坦及 LBQ-657 均达到稳态,于第 4 天给药后 1.5 h 和 3 h 静脉采血 2.5 mL,置于 5 mL 肝素化试管中,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆,置于-20℃冰箱冷冻储存备用,作为血浆样品。测定时,取血浆样品按“2.2”项下方法处理,进样测定,由标准曲线方程计算各待测物的血药浓度,见表 8。由表 8 可知,沙库巴曲由于代谢较快,浓度迅速下降,在 1.5 h 之后几乎测不到,血中以其代谢产物 LBQ-657 和缬沙坦为主。

表 8 患者血浆中待测物的含量测定

Tab. 8 Determination of the content of the substance measured in the patients' plasma

病例 编号	采样时间/h	待测物浓度/μg·mL ⁻¹		
		LBQ-657	缬沙坦	沙库巴曲
1	1.5	0.25	0.21	0
	3	0.68	0.47	0
2	1.5	0.38	0.11	0
	3	0.68	0.23	0
3	1.5	1.01	0.53	0.09
	3	0.81	0.25	0
4	1.5	0.27	0.11	0
	3	0.46	0.01	0
5	1.5	0.82	0.01	0
	3	0.85	0.10	0

3 讨论

3.1 方法学选择

目前多采用 LC-MS/MS 测定人血浆中 LCZ696 的浓度,此方法灵敏度高,但实验成本明

显高于 HPLC-FD 法。因 LCZ696 及代谢产物具有较好的荧光吸收。故本研究建立了 HPLC-FD 测定人血浆中 LCZ696 及代谢产物的分析方法,结果表明,该方法灵敏,简便,准确性高,选择性强,可满足生物样品分析的要求,可用于人体内 LCZ696 及代谢产物血药浓度的测定。

3.2 荧光检测波长的选择

分别取沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 和内标 SN-38 对照品溶液,测定其在 200~500 nm 内的紫外光谱,结果沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 的最大吸收峰为 255 nm,SN-38 在 381 nm 处也有较强吸收,因此,确定激发波长为 255 nm。以 255 nm 作为激发波长测量沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 和内标 SN-38 在 200~500 nm 内的荧光发射光谱,结果沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 和内标 SN-38 的最大吸收分别为 314, 374, 314, 430 nm。

3.3 流动相的选择

在查阅文献的基础上,尝试了不同比例的流动相 I (甲醇-0.016 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液, pH 6.0)、流动相 II (甲醇-0.1%磷酸溶液)、流动相 III (甲醇-0.016 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液, pH3.0) 等,以待测成分色谱峰的峰形及分离度为考察指标,结果表明,在流动相 I 条件下,待测物的峰型出现严重拖尾且响应低,而在流动相 II 条件下,沙库巴曲和 LBQ-657 无法达到完全分离且峰形较差。只有在流动相 III [甲醇-0.016 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液, pH3.0] 条件下,待测物的分离度和峰形均良好,故选用流动相 III 为本实验的流动相体系。

3.4 检测方法的选择

文献报道同时采用高效薄层色谱法(HPTLC)、HPLC-DAD 及 HPLC-FD 3 种方法测定沙库巴曲缬沙坦钠片中沙库巴曲、缬沙坦以及缬沙坦的相关物质联苯甲基吡咯烷酮^[1]。文献中采用 HPTLC 测定沙库巴曲和缬沙坦检测限均为 10 μg·mL⁻¹; HPLC-DAD 和 HPLC-FD 测定沙库巴曲的检测限为 0.2 μg·mL⁻¹ 和 0.01 μg·mL⁻¹; HPLC-DAD 和 HPLC-FD 测定缬沙坦的检测限为 0.2 μg·mL⁻¹ 和 0.025 μg·mL⁻¹; 总时长约为 6 min。本研究中的 3 种物质的检测限均为 0.1 μg·mL⁻¹, 低于文献报道。此外,文献是外标法定量,本研究是采用内标法定量人血浆基质中的沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657, 基质不同, 难易程度不同。

4 结论

本方法灵敏度高,可同时测定沙库巴曲、缬沙坦、LBQ-657 和内标 SN-38,能够满足临床血药浓度监测的需求,LCZ696 血药浓度测定有助于指导临床合理用药,另外,还可以避免不良反应,能为适时调整剂量提供参考依据,一定程度上减轻患者经济负担。

REFERENCES

- [1] RAGAB M A A, GALAL S M, KORANY M A, et al. High performance thin-layer and high performance liquid chromatography coupled with photodiode array and fluorescence detectors for analysis of valsartan and sacubitril in their supramolecular complex with quantitation of sacubitril-related substance in raw material and tablets[J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, 56(6): 498-509.
- [2] AKAHORI M, AYALASOMAYAJULA S, LANGENICKEL T, et al. Pharmacokinetics after single ascending dose, food effect, and safety of sacubitril/valsartan(LCZ696), an angiotensin receptor and neprilysin inhibitor, in healthy Japanese subjects[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 42(3): 407-416.

- [3] GORI M, SENNI M. Sacubitril/valsartan (LCZ696) for the treatment of heart failure[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2016, 14(2): 145-153.
- [4] KATSANOS S, BISTOLA V, PARISSIS J T. Combining angiotensin II receptor I antagonism and neprilysin inhibition for the treatment of heart failure[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2016, 9(4): 513-523.
- [5] SOLOMON S D, CLAGGETT B, DESAI A S, et al. Influence of ejection fraction on outcomes and efficacy of sacubitril/valsartan (LCZ696) in heart failure with reduced ejection fraction: The prospective comparison of ARNI with ACEI to determine impact on global mortality and morbidity in heart failure (PARADIGM-HF) trial[J]. *Circ Heart Fail*, 2016, 9(3): e002744.
- [6] ZHU G F, SUN G X, SHEN Y Y. Content and impurity determination of LCZ/VST by HPLC[J]. *Guangdong Chem Ind(广东化工)*, 2018, 45(9): 91-92.
- [7] HAN Y, AYALASOMAYAJULA S, PAN W, et al. Pharmacokinetics, safety and tolerability of sacubitril/valsartan (LCZ696) after single-dose administration in healthy Chinese subjects[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 42(1): 109-116.

收稿日期: 2021-02-26

(本文责编: 沈倩)