

UPLC – MS/MS 法测定人体血浆中伏诺拉生浓度及其 2 种片剂生物等效性研究

文琪¹, 蔡娟¹, 孙春艳², 唐维英¹, 李莎¹, 杨敏¹, 吴强^{1*}

(1. 四川省药品检验研究院生物样本检测中心, 药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台, 成都 611731; 2. 扬子江药业集团 克服递药屏障高端制剂全国重点实验室, 泰州 225300)

摘要 目的: 建立并验证一种简便、快速、灵敏的 UPLC – MS/MS 法, 测定人体血浆中伏诺拉生浓度并用于其 2 种片剂生物等效性研究。方法: 采用单次给药、两周期、两制剂、双交叉对照试验设计进行生物等效性研究, 健康人体受试者分别在空腹和餐后条件下单剂量口服 20 mg 富马酸伏诺拉生片受试制剂或参比制剂后在不同时间点采集血浆样品。乙腈蛋白沉淀处理血浆样品后用 UPLC – MS/MS 法分析。采用 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 柱温 40 °C, 以 0.1% 甲酸水 – 0.1% 甲酸乙腈为流动相梯度洗脱。ESI 离子源, 正离子模式, 多反应离子监测 (MRM), 用于定量分析的离子对为 m/z 346.1 → 315.4, 内标化合物伏诺拉生 – d_4 为 m/z 350.1 → 316.2。结果: 线性范围为 0.30 ~ 50.00 ng · mL⁻¹ ($r > 0.9989$), 定量下限为 0.30 ng · mL⁻¹; 批内和批间精密度 RSD 均 < 5.7%, 准确度在 -2.15% ~ 0.82% 范围内; 提取回收率、选择性、基质效应、稳定性等均符合接受标准。该方法被成功应用于富马酸伏诺拉生片的生物等效性研究。受试制剂在餐后和空腹试验中 C_{max} 分别为 (29.08 ± 11.59) ng · mL⁻¹ 和 (26.87 ± 8.14) ng · mL⁻¹, AUC_{0-t} 分别为 (258.90 ± 87.71) h · ng · mL⁻¹ 和 (223.08 ± 43.27) h · ng · mL⁻¹。参比制剂在餐后和空腹试验中 C_{max} 分别为 (28.73 ± 10.25) ng · mL⁻¹ 和 (26.93 ± 8.09) ng · mL⁻¹, AUC_{0-t} 分别为 (250.33 ± 73.13) h · ng · mL⁻¹ 和 (227.56 ± 46.26) h · ng · mL⁻¹。餐后试验中, 受试制剂和参比制剂的 C_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-∞}$ 几何均值比的 90% 置信区间分别为 88.64% ~ 112.28%、96.1% ~ 108.2%、96.6% ~ 108.7%; 空腹试验中, 受试制剂和参比制剂的 C_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-∞}$ 几何均值比的 90% 置信区间分别为 94.0% ~ 106.2%、94.7% ~ 102.0% 和 95.2% ~ 102.5%。结论: 该方法具有简单、快速、灵敏度高等优点。富马酸伏诺拉生片受试制剂和参比制剂具有生物等效性。
关键词: 超高效液相串联质谱; 伏诺拉生; 生物等效性; 药代动力学; 酸相关性疾病

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)12 – 2033 – 08
doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024 – 0140

Determination of vonoprazan in human plasma by UPLC – MS/MS and study on the bioequivalence of two types of tablets

WEN Qi¹, CAI Juan¹, SUN Chun – yan²,
TANG Wei – ying¹, LI Sha¹, YANG Min¹, WU Qiang^{1*}

(1. Bioanalytical Service Center of Sichuan Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products *In Vitro* and *In Vivo* Correlation, Chengdu 611731, China; 2. Yangtze River Pharmaceutical Group, National Key Laboratory of Complex Drug Formulations for Overcoming Delivery Barriers, Taizhou 225300, China)

Abstract Objective: To develop a rapid, specific and sensitive UPLC – MS/MS method for the determination of

* 通信作者 Tel: (028)64020254; E – mail: qiang.wu@scide.org

第一作者 Tel: 18289762882; E – mail: qi.wen@scide.org

vonoprazan in human plasma and its application in a bioequivalence study of two types of tablets. **Methods:** A single dose, two - cycle, two products, and self - cross controlled trial design on bioequivalence was used. Plasma samples were collected from healthy human volunteers at different time points after oral administration with the test or reference product of 20 mg fumarate vonoprazan tablets under both fasting and fed conditions, respectively. The plasma samples were treated by acetonitrile protein precipitation and then analyzed by UPLC - MS/MS. Chromatographic separation of vonoprazan was achieved using a Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column at 40 °C. The mobile phase consisted of water (containing 0.1% formic acid) for eluent A and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) for eluent B under a gradient elution. An electrospray ionization (ESI) with multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to monitor the precursor - product ion transitions of m/z 346.1→315.4 for vonoprazan and m/z 350.1→316.2 for vonoprazan - d_4 . **Results:** The rang of linearity was 0.30 - 50.00 ng · mL⁻¹ ($r > 0.9989$), and the LLOQ was 0.30 ng · mL⁻¹. Intra - and inter - day precision values were within 5.7%, and intra - and inter - day accuracy values were ranged from -2.15% to 0.82%. Recovery, specificity, matrix effect and stability met the guiding principles. This method has been successfully applied to study the bioequivalence of vonoprazan fumarate tablets. The C_{max} of the test product in postprandial and fasting tests were (29.08 ± 11.59) ng · mL⁻¹ and (26.87 ± 8.14) ng · mL⁻¹, respectively, and the AUC_{0-t} was (258.90 ± 87.71) h · ng · mL⁻¹ and (223.08 ± 43.27) h · ng · mL⁻¹, respectively. The C_{max} of the reference product in postprandial and fasting tests were (28.73 ± 10.25) ng · mL⁻¹ and (26.93 ± 8.09) ng · mL⁻¹, respectively, and the AUC_{0-t} was (250.33 ± 73.13) h · ng · mL⁻¹ and (227.56 ± 46.26) h · ng · mL⁻¹, respectively. In the postprandial trial, the 90% CIs for the geometric mean ratios of C_{max} , AUC_{0-t} and AUC_{0-∞} of the test and reference products were 88.64% - 112.28%, 96.1% - 108.2% and 96.6% - 108.7%, respectively. And in the fasting trail, the 90% CIs for the geometric mean ratios of C_{max} , AUC_{0-t} and AUC_{0-∞} of the test and reference products were 94.01% - 106.23%, 94.71% - 102.03% and 95.18% - 102.47%, respectively. **Conclusion:** This validated method has the advantages of simplicity, rapid, and high sensitivity. Test vonoprazan fumarate tablets are bioequivalent to the reference product.

Keywords: UPLC - MS/MS; vonoprazan; bioequivalence; pharmacokinetics; acid - related disorders

酸相关性疾病 (acid - related disorders, ARDs) 是消化系统疾病中常见的一类疾病, 一般是由胃酸分泌过多或对胃酸特别敏感所致。质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPIs) 可有效地抑制胃酸分泌, 是治疗胃酸相关疾病的一线药物^[1]。然而, PPIs 疗效和使用存在局限性, 如半衰期短, 夜间抑酸效果欠佳, 起效缓慢以及由于 CYP2C19 代谢导致患者疗效差异大等^[2-4]。长期服用 PPIs 会产生骨折风险增加、感染 (肺炎和艰难梭菌感染)、营养不良 (维生素 B₁₂、镁和铁吸收受损)、贫血等不良反应^[5-7]。

富马酸伏诺拉生 (vonoprazan fumarate, FNL) 是一种新型的钾竞争性酸阻滞剂 (potassium - competitive acid blockers, P - CAB), 其竞争性阻断胃 H⁺/

K⁺ - ATP 酶的钾结合位点^[8]。与 PPIs 相比, 伏诺拉生在药代动力学和药效学方面更有优势, 比如: 起效快, 抑酸作用更强和持久^[9-13], 耐受性更好^[14]。临床上用于治疗侵蚀性食道炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、消化性溃疡、胃食管反流、反流性食道炎和根除幽门螺杆菌^[15-17]。陈博伦等^[18]采用 LC - MS/MS 法测定比格犬血浆中伏诺拉生的浓度, 定量下限为 5 ng · mL⁻¹, 难以达到本试验要求目标定量下限。Tomoki 等^[19]采用蛋白沉淀后上清液氮气吹干复溶的方式进行样品前处理, 过程不够简单, 不适用于大批量样品的处理。本文旨在建立并验证一个简便、快速、灵敏的 UPLC - MS/MS 法测定人口服 FNL 片后血浆中伏诺拉生浓度并用于生物等效性研究。

1 仪器与试剂

LC-30AD 超高效液相色谱系统(岛津公司), TQ 6500 + 三重四极杆串联质谱仪(AB SCIEX 公司), Analyst 1.6.3 (AB SCIEX 公司)软件、Watson LIMS 7.5 SP1 (Thermo Fisher 公司)软件、Phoenix WinNonlin 软件(V8.0, Pharsight 公司)。

FNL 对照品(含量 99.1%, 批号 2140-010A1)和 FNL- d_4 对照品(含量 98.1%, 批号 3486-034A1)均购于 TLC 公司。受试制剂为 FNL 片(扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司, 批号 20019002, 含量 100.4%, 规格 20 mg·片⁻¹), 参比制剂为 Takecab[®] (武田药品工业株式会社公司, 批号 HH1214, 含量 102.3%, 规格 20 mg·片⁻¹)。实验用甲醇、乙腈、异丙醇均为 HPLC 级, 甲酸及乙酸铵为 LC/MS 级, 纯水为 Milli-Q 型超纯水仪制备的超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 预柱为 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH VanGuard[™] Pre-Column (5 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 柱温 40 °C, 以 0.1% 甲酸水(A) - 0.1% 甲酸乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(洗脱程序见表 1), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 进样体积 2 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

Tab. 1 The program of LC gradient elution

t/min	流动相比例(ratio of mobile phase)/%	
	流动相 A(mobile phase A)	流动相 B(mobile phase B)
0.00	80	20
1.50	40	60
1.51	5	95
2.40	5	95
2.41	80	20
3.50	停止(stop)	

采用电喷雾电离(ESI)正离子化, 喷雾电压为 5 500 V, GS1 和 GS2 气压为 310.3 kPa, 气帘气气压为 241.3 kPa, 喷雾温度为 450 °C。FNL 和 FNL- d_4 用于定量分析的离子对为 m/z 346.1 → 315.2 和 m/z 350.2 → 316.3, FNL 和 FNL- d_4 的碰撞电压(CE)分别为 14、15 V, 入口电压(EP)分别为 12、8 V, 去簇电压(DP)、碰撞室出口电压(CXP)均为

20、10 V。FNL 和 FNL- d_4 化学结构及 MRM 模式下离子碎片见图 1。

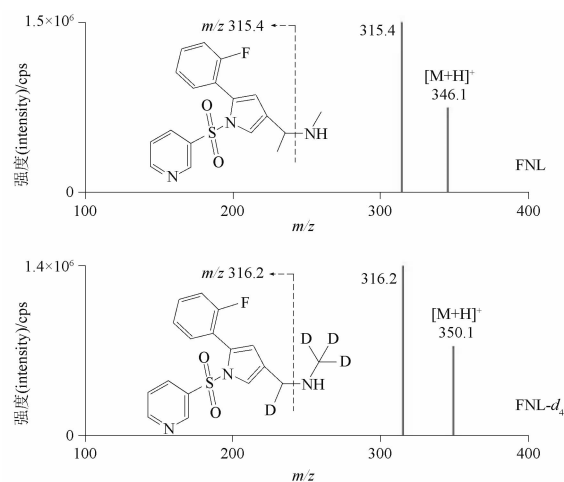


图 1 FNL 和 FNL- d_4 化学结构及 MRM 模式下离子碎片

Fig. 1 The chemical structures and Ionic fragments in MRM mode of FNL and FNL- d_4

2.2 溶液制备

精密称取适量 FNL 和 FNL- d_4 对照品, 根据校正因子折算其质量后, 加入适量甲醇各配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的储备液, 于 -20 °C 条件下保存。

工作液由 50% 甲醇溶液序列稀释储备液得到。标准曲线工作液浓度为 6、12、36、100、240、500、800、1 000 ng·mL⁻¹; 质控工作液浓度为 6、18、80、400、750 ng·mL⁻¹; 内标工作液浓度为 70 ng·mL⁻¹。

2.3 血浆样品采集

本试验通过南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)伦理委员会批准(登记号为 CTR20201301; 备案号为 202000167-01), 于江苏省中医院 I 期临床试验研究室进行, 采用单次给药、两周期、两制剂、双交叉对照试验设计进行生物等效性研究。招募 18 岁及以上男性和女性健康受试者共 48 名(餐后试验和空腹试验各 24 名)。受试者在空腹或高脂餐后状态下口服受试制剂(T, 20 mg)或参比制剂(R, 20 mg)1 片, 7 d 清洗期后进行第二周期交叉服药。空腹采血时间点为给药前 1 h 内(0 h)和服药后 0.25、0.5、0.75、1、1.33、1.67、2、2.33、2.67、3、3.5、4、6、8、12、24、36 和 48 h; 餐后采血时间点为给药前 1 h 内(0 h)和服药后 0.33、0.67、1、1.33、1.67、2、2.33、2.67、3、3.33、3.67、4、4.5、5、6、8、12、24、36 和 48 h。

室温白光条件下采集静脉血于含有肝素钠抗凝剂的采血管中,在 1 h 内于 2 000 g (离心预设温度 4 $^{\circ}C$)离心 10 min 后将血浆取出置于冻存管中,储存于 -70 $^{\circ}C$ 冰箱中待分析。

2.4 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL , 加入内标工作液 (70 $ng \cdot mL^{-1}$) 20 μL , 涡旋混匀后, 加入乙腈 380 μL , 1 300 $r \cdot min^{-1}$ 混匀提取 5 min, 再 4 $^{\circ}C$, 2 120 g 离心 10 min, 取上清液 100 μL , 加入 10% 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 溶液 100 μL , 涡旋混匀后, 取 2 μL 进样分析。

2.5 数据处理

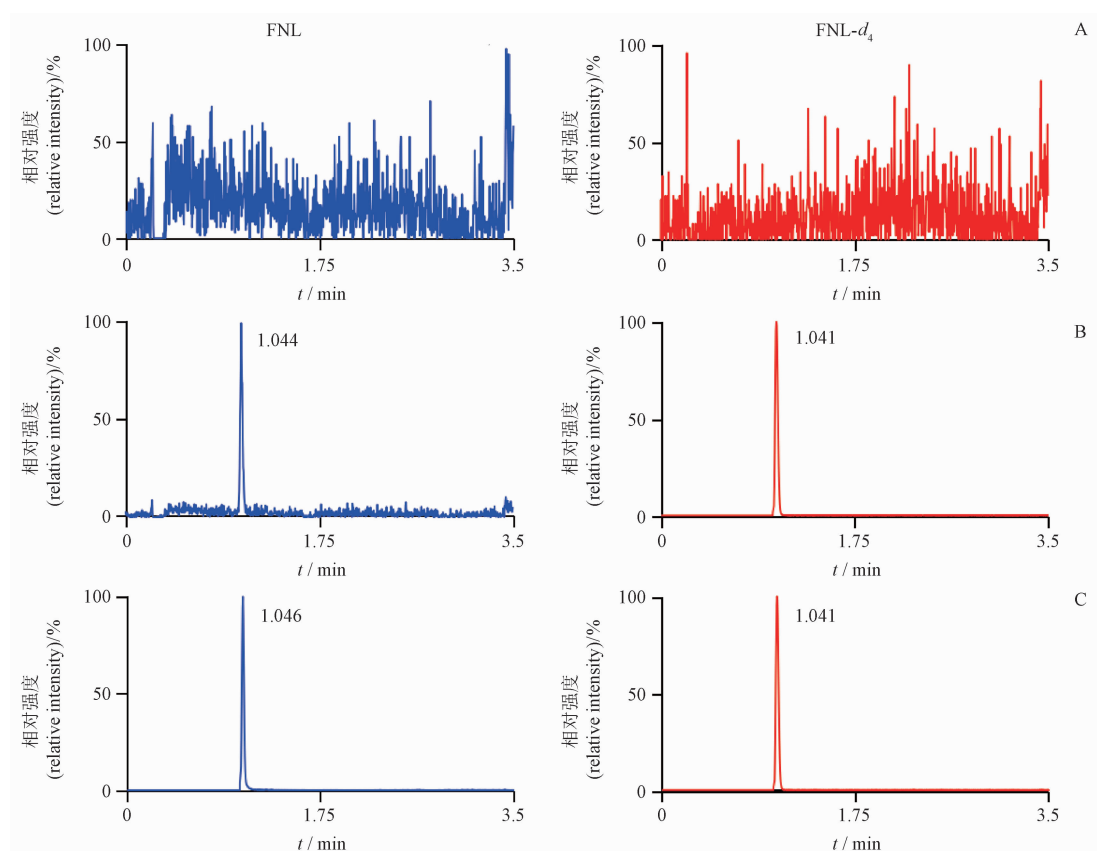
使用 WinNonlin 软件 (ver 8.2) 采用非房室模型对临床样品中伏诺拉生的血药浓度数据进行药代动力学参数计算, 经对数转换后, 采用多因素方差分析 (ANOVA)、双单侧 t 检验和 90% 置信区间进行统计分析, 评价和判断 2 种制剂的生物等效性。

2.6 方法学验证

本文中方法学验证按照 2020 年版《中华人民共和国药典》四部附录 9012——生物样品定量分析方法验证指导原则进行^[20]。

2.6.1 选择性 取 6 个批次不添加待测物和内标的空白血浆, 6 个批次空白血浆制备的定量下限血浆样品, 按照“2.4”项下方法进行样品预处理后按“2.1”项条件进行分析, 考察空白基质中内源性化合物对待测物和内标的影响。如图 2 所示, FNL 和 FNL- d_4 的保留时间分别约为 1.044 和 1.041 min, 结果表明空白基质中的内源性化合物对待测物和内标均无干扰。

此外, 当 FNL (1 000 $ng \cdot mL^{-1}$) 和 FNL- d_4 (70 $ng \cdot mL^{-1}$) 单独添加至空白基质中时, 待测物通道最大峰面积和内标通道最大峰面积小于该批次有效标准曲线定量下限样品中待测物平均峰面积的 5.46% 和 0.04%, 均符合规定标准, 待测物和同位素内标互不干扰。



A. 空白血浆样品 (blank plasma sample) B. 定量下限血浆样品 (LLOQ plasma sample) C. 口服给药 1.25 h 后的血浆样品 (plasma sample after oral administration for 1.25 h)

图 2 代表性 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 Typical UPLC-MS/MS chromatograms

2.6.2 标准曲线及定量范围 以 19:1 的体积比向空白血浆中加入标准曲线工作液得到血浆样品(质量浓度为 0.30、0.60、1.80、5.00、12.00、25.00、40.00、50.00 ng · mL⁻¹)。按照“2.4”项下方法进行样品预处理后按“2.1”项下条件进行分析,以待测物与内标峰面积比值 Y 为纵坐标,待测物浓度 X 为横坐标,权重为 $1/X^2$,进行线性回归。回归方程:

$$Y = 0.074833X + 0.000686 \quad r = 0.9980$$

所有分析批标准曲线均符合规定标准。表明 FNL 在 0.30 ~ 50.00 ng · mL⁻¹ 线性关系良好,定量下限为 0.30 ng · mL⁻¹。

2.6.3 精密度和准确度 以 19:1 的体积比向空白血浆中加入质控工作液得到血浆样品,质控血浆样品浓度为 0.30(定量下限质控样品)、0.90(低浓度质控样品)、4.00(几何中浓度质控样品)、20.00(中浓度质控样品)、37.50 ng · mL⁻¹(高浓度质控样品)。3 d 配制的不同批次的上述各浓度质控血浆样品溶液平行制备 6 份预处理后进样分析,考察批内和批间精密度和准确度。精密度 RSD ≤ 15.0% (对于定量下限质控样品, RSD ≤ 20.0%);准确度的相对偏差(Bias, %)在 ± 15.0% 之间(对于定量下限质控样品, Bias 在 ± 20.0% 之间)。结果符合规定标准,见表 2。

表 2 精密度和准确度

Tab. 2 Precision and accuracy results

理论浓度 (nominal concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	批内 (within-run) (n = 6)			批间 (between-run) (n = 18)		
	检测浓度 (measured concentration)/ (mean ± SD, ng · mL ⁻¹)	RSD/ %	Bias/ %	检测浓度 (measured concentration)/ (mean ± SD, ng · mL ⁻¹)	RSD/ %	Bias/ %
	0.30	0.30 ± 0.02	5.7	0.00	0.30 ± 0.02	5.0
0.90	0.90 ± 0.02	2.1	0.00	0.90 ± 0.02	2.1	0.00
4.00	3.94 ± 0.07	1.7	-1.50	3.98 ± 0.07	2.2	-0.50
20.00	19.57 ± 0.23	1.2	-2.15	19.82 ± 0.39	2.0	-0.90
37.50	37.81 ± 0.28	0.73	0.83	37.74 ± 0.58	1.5	0.64

2.6.4 提取回收率 低(0.90 ng · mL⁻¹)、中(20.00 ng · mL⁻¹)、高(37.50 ng · mL⁻¹) 3 个浓度的质控血浆样品,按照“2.4”项条件下进行样品预处理后,得到提取回收率供试溶液;空白血浆提取后的上清液中加入 FNL 和 FNL - d₄ 制备得到低、中、高 3 个浓度的质控样品,得到提取回收率

参比样品。比较各浓度提取回收率供试溶液和提取回收率参比样品中 FNL 和 FNL - d₄ 峰面积考察提取回收率。

如表 3 所示,低、中、高 3 个浓度下质控浓度水平的平均提取回收率均 > 50.0% 且 RSD < 15%,符合标准规定。

表 3 人血浆中 FNL 和 FNL - d₄ 提取回收率和基质效应Tab. 3 Recovery and matrix effect of FNL and FNL - d₄ in human plasma

成分 (component)	理论浓度 (nominal concentration)/(ng · mL ⁻¹)	提取回收率 (recovery)		基质效应 (matrix effect)	
		平均值 (mean)/%	RSD/%	平均值 (mean)/%	RSD/%
FNL	0.90	101.6	2.1	0.97	1.8
	20.00	94.6	1.7	1.0	0.77
	37.50	98.5	1.9	0.99	1.4
FNL - d ₄	70.00	98.7	3.7	/	/

2.6.5 基质效应 6 个批次的空白血浆提取后的上清液中加入 FNL 和 FNL - d₄ 制备得到低(0.90 ng · mL⁻¹)、中(20.00 ng · mL⁻¹)、高(37.50 ng · mL⁻¹) 3 个

浓度的质控样品作为基质样品;另以不含基质成分的纯溶液制备与上述具有 FNL 和 FNL - d₄ 相同浓度的溶液作为参比溶液,以各浓度的质控样品与参比

溶液的比值计算基质效应。如表 3 所示,对于不同来源的 6 个批次血浆质控样品,内标归一化基质效应因子的 RSD < 1.8%,符合标准规定。此外,2% 溶血血浆和 2% 高脂血浆基质制备低、中、高 3 个浓度的测定浓度与理论浓度的偏差在 $\pm 15.0\%$ 之间 (RSD < 15.0%),满足指导原则要求。

2.6.6 稳定性 按照实际样品在测定过程中所涉及到的稳定性要求进行考察。低(0.90 ng · mL⁻¹)、高(37.50 ng · mL⁻¹)浓度质控血浆样品,放置于考察条件一段时间后,用新鲜制备标准曲线样品测定浓

度与理论浓度的偏差应在 $\pm 15.0\%$ 以内。如表 4 所示,FNL 血浆样品在室温白光条件下放置 48 h、在 -20 °C 和 -70 °C 条件下放置 35 d、反复冻融 6 次均稳定;经前处理后的血浆样品在自动进样器内(8 °C)放置 51 h 稳定。此外,FNL 全血样品在室温白光条件下放置 2 h 稳定、精密度和准确度样品进样完成后在自动进样器内(8 °C)放置 18 h 稳定。FNL 和 FNL-d₄ 储备液在室温白光条件下放置 48 h 稳定,在 -20 °C 条件下放置 22 d 稳定;工作液在室温白光条件下放置 45 h 稳定,在 4 °C 条件下放置 21 d 稳定。

表 4 血浆样品稳定性(n=6)

Tab. 4 Stability of FNL in human plasma

储存条件 (storage conditions)	理论浓度 (nominal concentration)/(ng · mL ⁻¹)	检测浓度 (measured concentration)/(mean ± SD, ng · mL ⁻¹)	RSD/ %	Bias/ %
48 h 短期放置稳定性 (48 h short-term stability), 10 ~ 30 °C	0.90 37.50	0.88 ± 0.03 37.12 ± 0.31	3.6 0.83	-2.22 -1.01
6 次冻融循环稳定性 (6 cycles freeze-thaw stability), -20 °C	0.90 37.50	0.89 ± 0.01 37.53 ± 0.20	1.2 0.54	-1.11 0.08
6 次冻融循环稳定性 (6 cycles freeze-thaw stability), -70 °C	0.90 37.50	0.89 ± 0.02 37.48 ± 0.37	2.0 1.0	-1.11 -0.05
35 d 长期放置稳定性 (35 d long-term stability), -20 °C	0.90 37.50	0.89 ± 0.01 37.59 ± 0.49	0.88 1.3	-1.11 0.24
35 d 长期放置稳定性 (35 d long-term stability), -70 °C	0.90 37.50	0.90 ± 0.02 37.33 ± 0.35	2.5 0.94	0.00 -0.45
51 h 自动进样器放置稳定性 (51 h auto-sampler stability), -70 °C	0.90 37.50	0.90 ± 0.03 38.18 ± 0.53	3.4 1.4	0.00 1.81

2.6.7 其它 用空白血浆以 1:2 体积比稀释稀释质控(90.00 ng · mL⁻¹)血浆样品,测定浓度与理论浓度偏差范围在 $\pm 15.0\%$ 之间 (RSD < 15.0%),表明血浆样品稀释 3 倍结果可靠。定量上限样品进样后的空白样品中,待测物和内标残留分别小于在定量下限样品中 FNL 峰面积平均值的 20.0% 和 FNL-d₄ 峰面积平均值的 5.0%,残留不会影响样品定量。分析批最大连续进样 230 针样品,质控样品精密度和准确度均符合标准。

2.7 试验样品再分析

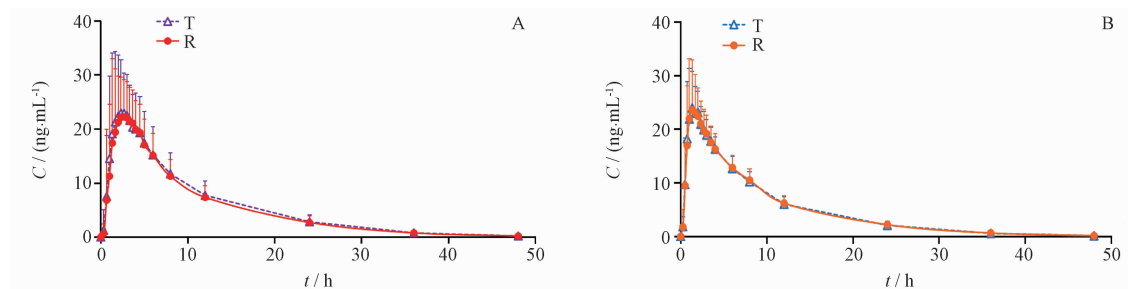
在 1 920 个有效样品中选择在 C_{max} 附近和消除相样品的 198 个未知样品进行试验样品再分析 (ISR),同一受试者的 ISR 在其 2 个周期样品检测完成后开展。以重分析浓度与首次测定浓度的差值除以二者均值计算偏差,要求至少 2/3 的 ISR 样品的偏

差在 $\pm 20.0\%$ 以内。结果显示,192 个样品的偏差范围为 -5.5%~5.9%,通过率为 100%。

3 药代动力学参数与生物等效性评价

健康人体受试者空腹和餐后服用受试制剂和参比制剂后的平均血药浓度-时间曲线见图 3,主要药代动力学参数见表 5。

餐后试验和空腹试验各 24 例受试者纳入生物等效性数据集 (BES),按照“2.5”项下进行生物等效性分析。如表 6 所示,餐后试验中和空腹试验中,受试制剂和参比制剂的 C_{max}、AUC_{0-t}、AUC_{0-∞} 几何均值比 90% 置信区间分别为: 88.64%~112.28% 和 94.01%~106.23%、96.06%~108.20% 和 94.71%~102.03%、96.60%~108.65% 和 95.18%~102.47%,均在 80.00%~125.00%^[21],受试制剂和参比制剂生物等效。



A. 餐后组 (postprandial test) B. 空腹组 (fasting test)

图 3 餐后和空腹试验伏诺拉生平均血药浓度-时间曲线 (n = 24)

Fig. 3 Mean concentration - time curves under fed and fasting conditions

表 5 餐后和空腹试验伏诺拉生药代动力学参数 (mean ± SD, n = 24)

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of FNL in postprandial and fasting tests

参数 (parameters)	餐后试验 (postprandial test)		空腹试验 (fasting test)	
	T	R	T	参比制剂 R
T_{max}/h	2.39 ± 0.93	2.49 ± 1.07	1.51 ± 0.46	1.61 ± 0.62
$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	29.08 ± 11.59	28.73 ± 10.25	26.87 ± 8.14	26.93 ± 8.09
$AUC_{0-t}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	258.90 ± 87.71	250.33 ± 73.13	223.08 ± 43.27	227.56 ± 46.26
$AUC_{0-\infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	266.07 ± 88.07	256.64 ± 74.54	229.04 ± 42.98	232.92 ± 47.54
$T_{1/2}/h$	7.44 ± 1.17	7.35 ± 1.17	7.17 ± 1.20	7.32 ± 1.27

注 (note): T_{max} 以中位数表示 (T_{max} was expressed as the median)

表 6 餐后和空腹口服富马酸伏诺拉生片后伏诺拉生生物等效性结果

Tab. 6 Bioequivalence analysis of FNL after oral dose the test or reference product under postprandial and fasting conditions

试验 (test)	参数 (parameter)	几何平均值 (geometric mean)		几何均值比 (geometric mean ratio)/%	几何均值比 90% 置信区间 (90% confidence intervals)/%	个体内变异系数 (individual coefficient of variation) RSD/%	试验把握度 (power)/%
		T	R				
餐后 (postprandial)	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	27.00	27.06	99.76	88.64 ~ 112.28	24.2	86.47
	$AUC_{0-t}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	244.54	239.86	101.95	96.06 ~ 108.20	12.0	>99.99
	$AUC_{0-\infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	252.11	246.09	102.45	96.60 ~ 108.65	11.9	>99.99
空腹 (fasting)	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	25.87	25.88	99.93	94.01 ~ 106.23	12.4	>99.99
	$AUC_{0-t}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	218.77	222.54	98.30	94.71 ~ 102.03	7.5	>99.99
	$AUC_{0-\infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	224.97	227.79	98.76	95.18 ~ 102.47	7.5	>99.99

4 讨论

本试验建立了简便、快速、灵敏的 UPLC - MS/MS 法测定人血浆中伏诺拉生的浓度。本试验中, 比较 0.1% 甲酸水 - 0.1% 甲酸乙腈和 0.1% 甲酸水 - 0.1% 甲酸甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 由于乙腈比甲醇的洗脱能力更强, 使用 0.1% 甲酸乙腈作为流动相 B 可使待测物的色谱峰峰形更好。另外, 当流动相中含有低浓度乙酸铵时可使化合物响应增高。

本试验采用甲醇 - 异丙醇 - 水 - 甲酸 - 10 mol · L⁻¹ 乙酸铵 (40:40:20:0.5:0.05, v/v) 作为洗针液, 洗脱程序设置抽吸前后洗针可以有效地降低样品针残留。采用同位素化合物作为内标, 减少样品前处理及分析过程中带来的误差, 结果更加准确可靠。采用乙腈蛋白沉淀方法进行预处理, 线性范围为 0.30 ~ 50.00 ng · mL⁻¹, 具有灵敏度高, 基质效应小, 选择性好, 检测效率高等优点, 适合高通量检测人血

浆中伏诺拉生的浓度,为富马酸伏诺拉生片的生物等效性研究提供了一种可靠的分析方法。

文献报道,日本健康男性空腹口服给药伏诺拉生 20 mg 时, C_{\max} 为 $(25.0 \pm 5.6) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\max} > 2 \text{ h}$, $t_{1/2}$ 在 5.1 ~ 8.7 h, 第一天和第七天重复给药无显著差别^[21-22]。在本试验中,餐后试验和空腹试验 t_{\max} 在 1.51 ~ 2.49 h, 餐后达峰时间比空腹晚,因此,食物可延缓伏诺拉生的吸收。餐后给药受试制剂和参比制剂的 C_{\max} 分别为 29.08 和 28.73 $\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{\max} 在受试者之间的体内 RSD 为 24.2%。空腹给药受试制剂和参比制剂的 C_{\max} 分别为 26.87 和 26.93 $\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{\max} 在受试者之间的体内 RSD 为 12.4%。因此,该药物制剂非高变异。在餐后和空腹状态下的 C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 经对数转换后几何均值比的 90% 置信区间均符合规定标准,即在吸收速度、程度上均无差异。因此,认为伏诺拉生受试制剂和参比制剂在空腹和餐后状态下生物等效。

参考文献

- [1] ROBINSON M. Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors – overview and clinical implications[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 20(Suppl 6): 1
- [2] HUNT RH, SCARPIGNATO C. Potent acid suppression with PPIs and P-CABs: what's new? [J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2018, 16(4): 570
- [3] INATOMI N, MATSUKAWA J, SAKURAI Y, *et al.* Potassium – competitive acid blockers; advanced therapeutic option for acid – related diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 168: 12
- [4] OTAKE K, SAKURAI Y, NISHIDA H, *et al.* Characteristics of the novel potassium – competitive acid blocker vonoprazan fumarate (TAK – 438)[J]. *Adv Ther*, 2016, 33(7): 1140
- [5] PERRY IE, SONU I, SCARPIGNATO C, *et al.* Potential proton pump inhibitor – related adverse effects [J]. *Annale New York Aca Sci*, 2020, 1481(1): 43
- [6] CASTELLANA C, PECERE S, FURNARI M, *et al.* Side effects of long – term use of proton pump inhibitors: practical considerations[J]. *Polish Archiv Intern Med*, 2021, 131(6): 541
- [7] YU LY, SUN LN, ZHANG XH, *et al.* A review of the novel application and potential adverse effects of proton pump inhibitors [J]. *Adv Ther*, 2017, 34(5): 1070
- [8] ABDEL – AZIZ Y, METZ DC, HOWDEN CW. Review article: potassium – competitive acid blockers for the treatment of acid – related disorders[J]. *Aliment Pharmacol Therap*, 2021, 53(7): 794
- [9] ECHIZEN H. The first – in – class potassium – competitive acid blocker, vonoprazan fumarate: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations[J]. *Clin Pharmacokin*, 2016, 55(4): 409
- [10] HAMADA S, IHARA E, IKEDA H, *et al.* Clinical characterization of vonoprazan – refractory gastroesophageal reflux disease[J]. *Digestion*, 2021, 102(2): 197
- [11] MARTINUCCI I, BLANDIZZI C, BODINI G, *et al.* Vonoprazan fumarate for the management of acid – related diseases[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(11): 1145
- [12] LAINE L, SHARMA P, MULFORD DJ, *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the potassium – competitive acid blocker vonoprazan and the proton pump inhibitor lansoprazole in US subjects[J]. *Am J Gastroenterol*, 2022, 117(7): 1158
- [13] SIMADIBRATA DM, SYAM AF, LEE YY. A comparison of efficacy and safety of potassium – competitive acid blocker and proton pump inhibitor in gastric acid – related diseases: a systematic review and meta – analysis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(12), 2217
- [14] XU W, BAI Z, SHANG Y, WANG J, *et al.* Incidence and type of adverse events in patients taking vonoprazan: a systematic review and meta – analysis[J]. *Therap Advn Gastroenterol*, 2023, 16: 1
- [15] ST ONGE E, PHILLIPS B. Vonoprazan: a new potassium – competitive acid blocker[J]. *J Pharm Technol*, 2023, 39(3): 139
- [16] GARNOCK – JONES KP. Vonoprazan: first global approval[J]. *Drugs*, 2015, 75(4): 439
- [17] YANG X, LI Y, SUN Y, *et al.* Vonoprazan: a novel and potent alternative in the treatment of acid – related diseases[J]. *Digest Diseases Sci*, 2018, 63(2): 302
- [18] 陈博伦, 乔红群, 袁艳娟, 等. LC – MS/MS 法测定比格犬血浆中沃诺拉赞浓度及其毒代动力学研究[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(9): 1660
- [18] CHEN BL, QIAO HQ, YUAN YJ, *et al.* Determination of vonoprazan in Beagle dogs by LC – MS/MS and its toxicokinetics study [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(9): 1660
- [19] YONEYAMA T, TESHIMA K, JINNO F, *et al.* A validated simultaneous quantification method for vonoprazan (TAK – 438F) and its 4 metabolites in human plasma by the liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1015 – 1016: 42
- [20] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 501, 495
- [20] ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 501, 495
- [21] SAKURAI Y, NISHIMURA A, KENNEDY G, *et al.* Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single rising TAK – 438 (vonoprazan) doses in healthy male Japanese/non – Japanese subjects[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2015, 6(6): e94
- [22] JENKINS H, SAKURAI Y, NISHIMURA A, *et al.* Randomised clinical trial: safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of repeated doses of TAK – 438 (vonoprazan), a novel potassium – competitive acid blocker, in healthy male subjects [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 41(7): 636

(本文于 2024 年 3 月 4 日收到)