

中图分类号: R927.2; R975 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0063-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.013



# 高效液相色谱法同时测定富马酸伏诺拉生中活性成分含量及成盐率研究\*

王玲兰<sup>1</sup>, 龚翠云<sup>1</sup>, 朱跃芳<sup>2△</sup>, 朱婧<sup>1</sup>, 陈莉<sup>2</sup>, 宿亮<sup>1</sup>

(1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000; 2. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412000)

**摘要:**目的 建立同时测定富马酸伏诺拉生中活性成分含量的高效液相色谱法,并评估其成盐率。方法 色谱柱为 Agilent 5 TC - C<sub>18</sub>(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 2.5 μm),流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8) - 乙腈 - 甲醇(17:7:6, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL。结果 伏诺拉生和富马酸质量浓度分别在 100~300 μg/mL 和 34~102 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r = 1.000\ 0, 0.999\ 9, n = 5$ );检测限分别为 0.4, 0.5 ng,定量限分别为 1.0, 1.4 ng;精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率分别为 100.40%, 100.22%, RSD 分别为 0.39%, 0.35% ( $n = 9$ )。9 批样品中伏诺拉生含量为 74.16%~75.83%,富马酸含量为 24.55%~25.81%,成盐率为 98.17%~101.79%。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确可靠,可用于富马酸伏诺拉生中活性成分及盐基的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法;富马酸伏诺拉生;含量测定;成盐率

## Simultaneous Determination of Active Ingredients and Salt - Forming Rate in Vonoprazan Fumarate by HPLC

WANG Linglan<sup>1</sup>, GONG Cuiyun<sup>1</sup>, ZHU Yuefang<sup>2</sup>, ZHU Jing<sup>1</sup>, CHEN Li<sup>2</sup>, SU Liang<sup>1</sup>

(1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000; 2. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou, Hunan, China 412000)

**Abstract: Objective** To establish a high - performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of the active ingredients in vonoprazan fumarate, and to evaluate its salt - forming rate. **Methods** The chromatographic column was Agilent 5 TC C<sub>18</sub> (2) column (250 mm × 4.6 mm, 2.5 μm), the mobile phase was 0.05 mol / L phosphate buffer (pH 6.8) - acetonitrile - methanol (17:7:6, V / V / V), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of vonoprazan and fumaric acid were 100 - 300 μg / mL and 34 - 102 μg / mL ( $r = 1.000\ 0, 0.999\ 9, n = 5$ ). The limits of detection were 0.4 ng and 0.5 ng, respectively. The limits of quantification were 1.0 ng and 1.4 ng, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were lower than 2.0%. The average recoveries of vonoprazan and fumaric acid were 100.40% and 100.22% with RSDs of 0.39% and 0.35% ( $n = 9$ ), respectively. Among the nine batches of samples, the content of vonoprazan was in the range of 74.16% - 75.83%, the content of fumaric acid was in the range of 24.55% - 25.81%, and the salt - forming rate of vonoprazan fumarate was in the range of 98.17% - 101.79%. **Conclusion** This method is simple, reproducible, accurate, and reliable, which can be used for the simultaneous determination of the active ingredients and base in vonoprazan fumarate.

**Key words:** HPLC; vonoprazan fumarate; content determination; salt - forming rate

富马酸伏诺拉生曾用名富马酸沃诺拉赞,化学名为 1 - [5 - (2 - 氟苯基) - 1 - (吡啶 - 3 - 基磺酰基) - 1H - 吡咯 - 3 - 基] - N - 甲基甲胺富马酸盐,是一种新型钾离子竞争性酸阻滞剂(P - CAB),主要用于治疗反流性食管炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、幽门螺杆菌的根除治疗等酸相关疾病<sup>[1-4]</sup>。其抑酸效果迅速、有效、持续,能规避传统质子泵抑制剂(PPIs)对酸不稳定且个体差异大等缺点<sup>[5-10]</sup>。富马酸伏诺拉生由 1 分子伏诺拉

生与 1 分子富马酸结合而成<sup>[11-14]</sup>,但盐基过量会直接影响药物的纯度,游离活性成分过量将影响药物在体内的吸收与分布<sup>[15-17]</sup>。故有必要建立监测药物反离子含量的分析方法进行药物成盐率研究,以评价不同批次原料药成盐率的差异。目前,有关富马酸伏诺拉生的报道均集中在有关物质方面<sup>[18-23]</sup>,仅针对其活性成分及杂质进行了含量测定,尚未见富马酸含量测定及成盐率研究相关报道。本研究中建立了同时测定富马酸

\*基金项目:湖南省自然科学基金[2022JJ80049]。

第一作者:王玲兰,女,硕士研究生,高级工程师,研究方向为药品质量及质量标准,(电子信箱)254579719@qq.com。

△通信作者:朱跃芳,女,大学本科,主任药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)1062582981@qq.com。

伏诺拉生中富马酸和伏诺拉生含量的高效液相色谱法,并对多批次原料药的成盐率进行评估,为其质量控制提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);MS105DU型电子天平(精度为0.01 mg),DSC3型差示扫描量热仪,均购自梅特勒-托利多公司;KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为400 W,频率为40 kHz)。

### 1.2 试剂

富马酸伏诺拉生(千金湘江药业股份有限公司,批号分别为20181101,20181102,20181103,20190101,20190102,20190103,20190401,20190402,20190403);伏诺拉生对照品(美国Quality Control Chemicals公司,批号为20-AUG-17-40,含量为99.6%);富马酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111541-201803,含量为99.9%);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Spectrum公司);磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);磷酸氢二钠(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司);水为屈臣氏饮用纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.8)-乙腈-甲醇(17:7:6, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

伏诺拉生对照品溶液:避光操作。取伏诺拉生对照品100 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相适量,超声20 min使溶解,加流动相定容,摇匀,作为伏诺拉生对照品贮备液。精密量取贮备液5 mL,置50 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容,制成每1 mL约含200 μg伏诺拉生的溶液,摇匀,即得。

富马酸对照品溶液:避光操作。取富马酸对照品

17 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相适量,超声20 min使溶解,加流动相定容,摇匀,作为富马酸对照品贮备液。精密量取贮备液10 mL,置50 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容,制成每1 mL约含68 μg富马酸的溶液,摇匀,即得。

供试品溶液:避光操作。取样品27 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加流动相适量,超声20 min使溶解,加流动相定容,摇匀,即得。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:取空白溶剂(流动相)、伏诺拉生对照品溶液、富马酸对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件依次进样测定。结果供试品溶液色谱中,富马酸及伏诺拉生色谱峰均无杂质峰干扰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:分别精密量取伏诺拉生及富马酸对照品贮备液各适量,加流动相逐级稀释为质量浓度分别为100,160,200,240,300 μg/mL的伏诺拉生系列标准溶液及34,54.4,68,81.6,102 μg/mL的富马酸系列标准溶液,按2.1项下色谱条件依次进样测定,分别以伏诺拉生及富马酸质量浓度( $X$ , μg/mL)对峰面积( $Y$ )进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{伏} = 208471.8890X_{伏} - 9239.0140$  ( $r = 1.0000, n = 5$ )和 $Y_{富} = 22211X_{富} + 9228.5$  ( $r = 0.9999, n = 5$ )。结果表明,伏诺拉生和富马酸的质量浓度分别在100~300 μg/mL和34~102 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取线性关系考察项下质量浓度分别为100 μg/mL的伏诺拉生标准溶液和34 μg/mL的富马酸标准溶液,加流动相稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比( $S/N$ )为3时的含量为检测限、 $S/N$ 为10时的含量为定量限。结果伏诺拉生检测限为0.4 ng,定量限为1.0 ng;富马酸检测限为0.5 ng,定量限为1.4 ng。

精密度试验:取2.2项下伏诺拉生及富马酸对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果伏诺拉生、富马酸峰面积的RSD分别

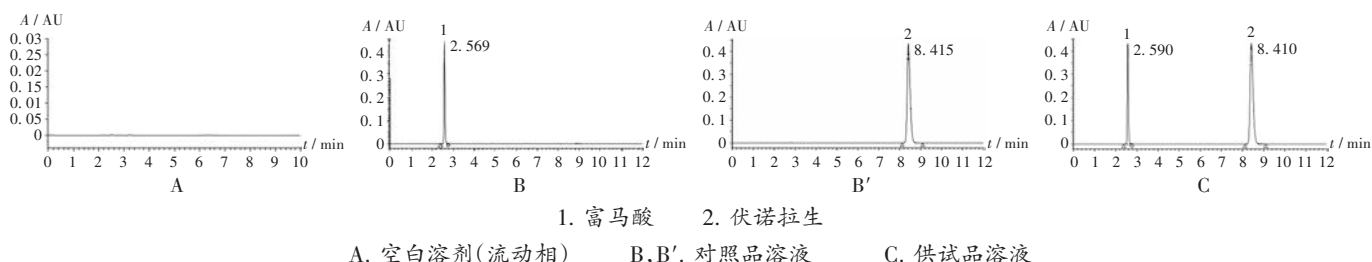


图1 高效液相色谱图

1. Fumaric acid 2. Vonoprazan

A. Blank solvent (mobile phase) B, B'. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

为0.48%和0.26% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

**稳定性试验:**取2.2项下对照品溶液和供试品溶液各适量, 分别于室温下放置0, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液中伏诺拉生和富马酸的峰面积最大变化率均为1.13%, 对照品溶液中伏诺拉生和富马酸的最大峰面积变化率分别为1.42%和1.19%, 表明供试品溶液和对照品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

**重复性试验:**取样品适量, 精密称定, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 共6份, 按2.1项下色谱条件依次进样测定, 按外标法以峰面积计算含量。结果伏诺拉生和富马酸的平均含量分别为74.87%, 24.65%, *RSD*分别为0.57%, 0.55% ( $n=6$ ), 表明方法重复性良好。

**加样回收试验:**取样品适量, 精密称定, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 精密量取富马酸和伏诺拉生对照品贮备液各适量, 加流动相稀释并定容, 摇匀, 滤过, 分别作为相对限度浓度80%, 100%, 120%的加样回收试验溶液, 每个浓度各平行制备3份。按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算伏诺拉生及富马酸的含量, 将理论值与测得值进行比较, 并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果 ( $n=9$ )

Tab. 1 Results of the recovery test ( $n=9$ )

理论值( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		测得值( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		<i>RSD</i> (%)	
伏诺拉生	富马酸	伏诺拉生	富马酸	伏诺拉生	富马酸	伏诺拉生	富马酸	伏诺拉生	富马酸
156.53	52.58	157.64	52.92	100.71	100.65				
157.86	53.01	157.82	53.02	99.97	100.02				
157.82	53.01	158.16	53.15	100.22	100.26				
201.21	67.62	201.27	67.51	100.03	99.84				
200.67	67.41	200.74	67.29	100.03	99.82	100.40	100.22	0.39	0.35
200.93	67.51	202.05	67.77	100.56	100.39				
239.31	80.42	240.46	80.47	100.48	100.06				
239.25	80.37	240.32	80.44	100.45	100.09				
239.03	80.32	241.86	80.98	101.18	100.82				

**耐用性试验:**考察了流速(0.8, 1.2 mL/min), 柱温(25, 35 °C), 检测波长(225, 235 nm), 流动相比例[磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇(17:6:7, 17:7:6,  $V/V/V$ )], 磷酸盐浓度(0.04, 0.06 mol/L), 流动相pH(磷酸盐pH为6.6, 7.0), 色谱柱[Wondasil  $C_{18}$ 柱、Agilent 5 TC -  $C_{18}$ (2)柱]对样品中伏诺拉生和富马酸含量的影响。结果显示, 色谱条件微调后, 伏诺拉生和富马酸含量与标准条件对比最大变化值分别为0.78%和0.33%, 表明方法耐用性良好。

#### 2.4 样品中富马酸和伏诺拉生含量测定

取不同研究阶段富马酸伏诺拉生, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 按外

标法以峰面积计算伏诺拉生和富马酸的含量, 以富马酸与伏诺拉生的摩尔比计算成盐率。成盐率(%) = (富马酸含量 / 116.07) / (伏诺拉生含量 / 345.39) × 100%。结果见表2。

表2 样品中富马酸和伏诺拉生含量及成盐率测定结果(%)

Tab. 2 Determination results of fumaric acid and vonoprazan content and salt-forming rate in samples (%)

研究阶段	批号	含量		成盐率
		伏诺拉生	富马酸	
小试	20181101	74.93	24.72	98.17
	20181102	75.45	25.81	101.79
	20181103	74.37	24.55	98.23
中试	20190101	75.64	25.42	100.00
	20190102	74.83	24.71	98.26
	20190103	74.16	24.88	99.83
工艺验证	20190401	75.15	25.21	99.82
	20190402	75.83	25.33	99.40
	20190403	75.20	25.55	101.10

#### 2.5 富马酸伏诺拉生差示扫描量热曲线测定

取不同研究阶段样品各1批(批号分别为20181101<小试>、20190101<中试>、20190401<工艺验证>), 取5 mg, 精密称定, 置铝盘中, 设置参数为氮气流速20 mL/min, 升温速率10 °C/min, 测试温度60~230 °C。结果显示, 样品熔融峰值范围为207.57~208.37 °C, 焓变值(归一化值)范围为-210.25~-204.44 J/g, 熔化时能量变化基本一致。详见图2。

### 3 讨论

#### 3.1 流动相选择

伏诺拉生为弱碱性化合物, 解离常数( $pK_a$ )为9.3; 富马酸为弱酸性化合物,  $pK_{a1}$ 为3.02,  $pK_{a2}$ 为4.38。对于离子型化合物, 为获得良好的峰形和保留时间的稳定, 流动相pH需结合化合物 $pK_a$ 考虑。本研究中比较了不同pH流动相, 如pH 3.0磷酸盐缓冲液-乙腈<sup>[19]</sup>、pH 6.0磷酸盐缓冲液-乙腈<sup>[20]</sup>、pH 6.8磷酸盐缓冲液-乙腈<sup>[23]</sup>, 最终选择pH 6.8磷酸盐缓冲液-乙腈作为流动相。试验中发现未知杂质干扰富马酸检测, 经反复试验, 发现pH 6.8磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇(17:7:6,  $V/V/V$ )为流动相时分离效果较好, 杂质不干扰检测, 保留时间合适, 色谱峰峰形良好。故最终选择2.1项下流动相。

#### 3.2 提取溶剂及提取方法选择

富马酸伏诺拉生难溶于甲醇、水和乙腈<sup>[2]</sup>, 本研究中对不同提取溶剂和提取方法进行了考察。采用水作为提取溶剂时加样回收率偏低, 不符合要求; 采用甲醇或乙腈作为提取溶剂时会产生较大空白溶剂峰, 干扰富马酸检测, 故最终选择流动相作为提取溶剂。考察了

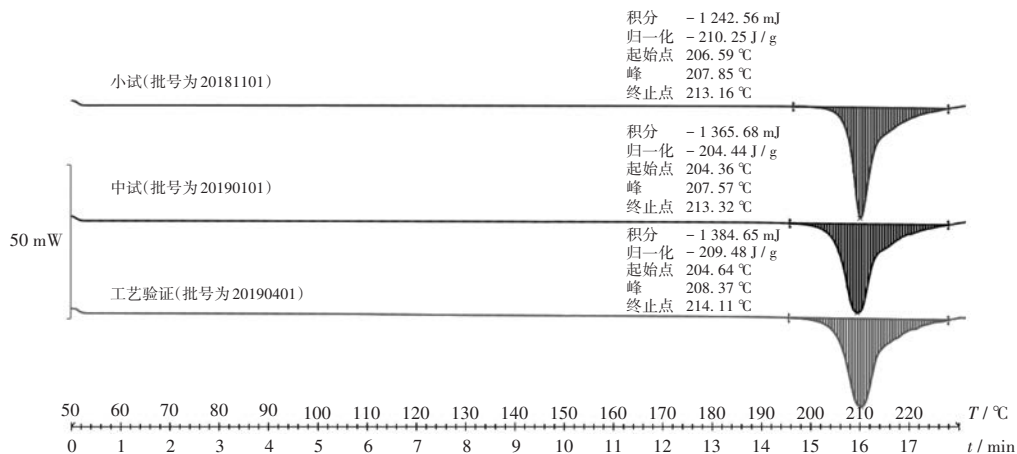


图2 富马酸伏诺拉生差示扫描量热曲线

Fig. 2 Differential scanning calorimetry curves of vonoprazan fumarate

超声和振摇2种提取方法,并对比了不同超声时间(10, 20, 30 min)。结果显示,超声与振摇结果无显著差异,延长超声时间,测定结果基本无变化,故最终选择超声提取20 min。

### 3.3 避光与不避光对比

富马酸伏诺拉生在光照降解条件下会产生多个杂质<sup>[19]</sup>。本研究在样品制备及进样过程中使用棕色瓶和白色瓶进行了对比,以确定是否需要避光操作。结果显示,不避光条件下,样品稳定性较差,故前处理过程及进样过程中均需使用棕色瓶进行避光操作。

### 3.4 成盐率评估

经小试、中试及工艺验证,多批次样品成盐率在98.17%~101.79%范围内,无显著差异,说明样品成盐工艺稳定。富马酸含量测定结果与理论值接近,说明成盐完全。同时,差示扫描量热曲线测定中,不同研究阶段样品焓变值基本一致,说明样品成盐工艺稳定。

### 3.5 方法评价

本研究建立的方法专属性强、准确度高、稳定性好,可为富马酸伏诺拉生的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] SHAHABI P, SIEST G, MEYER UA, et al. Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation - related disorders[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014, 144(2): 134 - 161.
- [2] LI W, YANG YG, TIAN YS, et al. Preparation and *in vitro* / *in vivo* evaluation of revaprazan hydrochloride nanosuspension[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 408(1/2): 157 - 162.
- [3] SHIN JM, SACHS G. Long - lasting inhibitors of the gastric H, K - ATPase[J]. Expert Review of Clinical Pharmacology, 2009, 2(5): 461 - 468.
- [4] WOODLAND P, AMARASINGHE G, SIFRIM D. Emerging therapeutic options in GERD[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2013, 27(3): 455 - 467.
- [5] OTAKE K, SAKURAI Y, NISHIDA H, et al. Characteristics of

the Novel Potassium - Competitive Acid Blocker Vonoprazan Fumarate (TAK - 438)[J]. Advances in Therapy, 2016, 33(7): 1140 - 1157.

- [6] ECHIZEN H. The First - in - Class Potassium - Competitive Acid Blocker, Vonoprazan Fumarate: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations[J]. Clinical Pharmacokinetics, 2016, 55(4): 409 - 418.
- [7] AGARWAL V, BANSAL M. Statistical optimization and fabrication of a press coated pulsatile dosage form to treat nocturnal acid breakthrough[J]. Current Drug Delivery, 2013, 10(4): 444 - 452.
- [8] SHAHABI P, SIEST G, MEYER UA, et al. Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation - related disorders[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014, 144(2): 134 - 161.
- [9] 魏 婷, 都赛飞, 刘 斌, 等. 质子泵抑制剂预防药物性消化道损伤的临床指南 / 共识、系统评价 / Meta 分析再评价[J]. 中国药房, 2021, 32(17): 2122 - 2128.
- [10] 贺金凯, 贺翠婷, 刘 鹰, 等. 质子泵抑制剂泮托拉唑的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(26): 3732 - 3735.
- [11] 陈 琰, 焦红梅. 基于富马酸伏诺拉生的幽门螺杆菌根除治疗方案的现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(20): 2506 - 2509.
- [12] 郑 益, 王文彬, 单春燕. 富马酸伏诺拉生片联合兰索拉唑治疗胃食管反流性咽喉病的临床效果[J]. 中国医药导报, 2022, 19(24): 103 - 106.
- [13] 马 原, 孙 倩, 王 爽, 等. 富马酸伏诺拉生片治疗复发性反流性食管炎患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(15): 1735 - 1738.
- [14] 杜雨晗, 靳会欣, 薛朝军, 等. 基于 EVIDEM 医疗机构多准则循证决策框架评估伏诺拉生与艾普拉唑[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(9): 940 - 944.
- [15] 赵 莹, 赵 晶. 伊托必利联合富马酸伏诺拉生片治疗胃食管反流病的疗效及对患者 CGRP、5 - HT 水平变化的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(1): 16 - 20.
- [16] 日本修订含富马酸伏诺拉生药品说明书增加肝损害、过敏及休克的风险提示[J]. 中国医药导刊, 2020, 22(11): 767.