

复方盐酸二甲双胍胶囊人体生物等效性研究

周燕文,李新春¹,石全,兰聪贤(广西医科大学第一附属医院国家药品临床研究基地,南宁 530021;1.01级硕士研究生)

摘要:目的 评价国产的复方盐酸二甲双胍胶囊(试验制剂)与市售的盐酸二甲双胍片联合格列本脲片(参比制剂)的人体相对生物利用度。方法 18名健康男性志愿者随机交叉口服试验制剂2粒(每粒含二甲双胍250mg,格列本脲1.25mg)或参比制剂盐酸二甲双胍片(250mg)2片,格列本脲片(2.5mg)1片。二甲双胍的血药浓度采用离子对高效液相色谱法(HPLC)测定,格列本脲的血药浓度采用高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)测定,计算两者的药动学参数并评价试验制剂的相对生物利用度。结果 受试者单次服用试验制剂或参比制剂后,二甲双胍的主要药动学参数如下: AUC_{0-24} 分别为 (5.90 ± 1.36) 和 $(5.95 \pm 1.35) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (6.17 ± 1.36) 和 $(6.28 \pm 1.36) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{max} 分别为 (0.82 ± 0.21) 和 $(0.82 \pm 0.14) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{max} 分别为 (1.43 ± 0.88) 和 (1.54 ± 0.98) h,相对生物利用度为 $(100.21 \pm 14.10)\%$;格列本脲的主要药动学参数如下: AUC_{0-16} 分别为 (270.28 ± 61.82) 和 $(268.70 \pm 61.99) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (287.13 ± 61.97) 和 $(284.17 \pm 67.85) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{max} 分别为 (62.83 ± 10.89) 和 $(61.44 \pm 12.11) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{max} 分别为 (2.53 ± 0.79) 和 (2.81 ± 0.75) h,相对生物利用度为 $(101.67 \pm 14.54)\%$ 。结论 经统计学分析,试验制剂与参比制剂的主要药动学参数之间差异无统计学意义,试验制剂与参比制剂生物等效。

关键词:二甲双胍;格列本脲;高效液相色谱法;高效液相色谱-质谱法;生物等效性

中图分类号:R977.15 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)04-0303-04

Studies on the pharmacokinetics and bioequivalence of domestic glyburide/metformin combination capsules in healthy volunteers

ZHOU Yan-wen, Li Xin Chun¹, Shi Quan, Lan Cong-xian(National Drug Clinical Research Base of The First Teaching Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 530021, China;¹ Graduate Student of 2001)

ABSTRACT: OBJECTIVE Investigate the bioavailability of domestic glyburide/metformin combination capsule in healthy male volunteers. **METHODS** A single oral dose of two test capsules of metformin in hydrochloride / glibenclamide (250mg/1.25mg) versus equivalent doses of reference preparations of co-administered two metformin in hydrochloride tablet (500mg) and one glibenclamide tablet (2.5mg) was given to 18 healthy male volunteers in a randomized crossover study. Plasma concentrations of metformin were determined by an ion-pair HPLC method with UV-detector and a HPLC/MS method for glibenclamide. **RESULTS** The main pharmacokinetics of metformin in test and reference were as follow: AUC_{0-24} were: $(5.90 \pm 1.36) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(5.95 \pm 1.35) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ were: $(6.17 \pm 1.36) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(6.28 \pm 1.36) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{max} were: $(0.82 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(0.82 \pm 0.14) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{max} were: (1.43 ± 0.88) h and (1.54 ± 0.98) h, the relative bioavailability was $(100.21 \pm 14.10)\%$; the main pharmacokinetics of glibenclamide of the test and reference were as follow: AUC_{0-16} were: $(270.28 \pm 61.82) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(268.70 \pm 61.99) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$: $(287.13 \pm 61.97) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(284.17 \pm 67.85) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, C_{max} were: $(62.83 \pm 10.89) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(61.44 \pm 12.11) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{max} were: (2.53 ± 0.79) h and (2.81 ± 0.75) h, the relative bioavailability was $(101.67 \pm 14.54)\%$. **CONCLUSION** The result of statistical analysis showed that two formulations were bioequivalent.

KEY WORDS: metformin; glibenclamide; HPLC/ESI; HPLC/MS; pharmacokinetics; bioequivalence

二甲双胍和格列本脲均为临床常用的降糖药,盐酸二甲双胍为双胍类抗糖尿病药物,主要作用于胰岛外组织,抑制肠吸收葡萄糖,增加外周组织对葡萄糖的利用,减少肝糖元异生,从而达到降低血糖的作用,同时还具有降低胰岛素抵

抗的作用。格列本脲为磺酰脲类抗糖尿病药物,其主要作用为刺激胰岛素分泌;盐酸二甲双胍和格列本脲的复方制剂最先由 Bristol-Myers Squibb 公司研制,于 2000 年 8 月由 FDA 批准在美国上市,商品名“Gluconance”。两种组分的作用机

作者简介:周燕文,女,硕士,主任药师。

制不同,联合应用可起到协同的作用,可有效地发挥控制血糖作用^[1-2]。本研究的目的是研究青岛化工学院药物研究所研制的复方盐酸二甲双胍胶囊在健康人体的药动学特性,并对其与已上市制剂的生物等效性作出评价。鉴于国外上市的复方盐酸二甲双胍制剂未获进口,本生物利用度试验的对照药选用市售的二种单药联合用药。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

受试制剂:复方盐酸二甲双胍胶囊(青岛化工学院药物研究所,批号:20030517,规格:每片含盐酸二甲双胍250mg,格列本脲1.25mg);参比制剂:盐酸二甲双胍片(北京天安联合制药有限公司,批号:030205,规格:250mg/片),格列本脲片(天津药物研究院药业责任有限公司,批号:020959,规格:2.5mg/片)。

乙腈、甲醇(均为色谱纯,美国Tedia公司);甲酸(色谱纯,天津科密欧化学试剂开发中心);十二烷基磺酸钠(分析纯,上海陆都化学试剂厂);三乙胺(分析纯,天津博迪化工有限公司);水为自制超纯水或重蒸馏水,其他试剂均为国产分析纯(AR)。盐酸二甲双胍对照品(含量为99.2%,济南开发区科隆生物技术开发中心,批号:000707);格列本脲对照品(含量为100.7%,济南开发区科隆生物技术开发中心,批号:000601)。

1.2 主要仪器

日本岛津HPLC-10A系统,Waters 2487紫外检测器,CTO-10AVP柱温箱,SCL-10AVP系统控制器,CLASS-VP液相工作站;美国Waters公司2690高效液相色谱系统,ZQ质谱检测器,Masslynx 5.1质谱工作站。METTLER TOLEDO AG285天平。

1.3 方法

本试验为随机、开放的交叉试验。18名男性健康受试者,年龄(21.22±1.23)岁,身高(169.44±3.74)cm,体重(59.33±4.14)kg,体重指数(BMI)(17.50±1.0)kg·m⁻²,无药物过敏史和药物依赖史,无慢性病史,2周内未服用任何可能影响本品吸收、代谢的药物。受试期间统一清淡饮食,不使用除试验(参比)制剂以外的任何药物,禁烟、酒及含咖啡因的饮料。研究方案经本院医学伦理委员会审批。受试者试验前签署知情同意书。

18名受试者,按体重配对(9对),抽签随机分为A、B两组,按1,2,3...18顺序编号。受试者禁食过夜(至少10h),次日早上两组受试者分别空腹服用试验制剂或参比制剂,剂量为:试验药:2粒(每粒含二甲双胍250mg,格列本脲1.25mg),对照药:2片盐酸二甲双胍(250mg)和1片格列本脲片(2.5mg)。均以200mL 20%的葡萄糖水送服,服药后1h内饮用150mL 20%的葡萄糖水,2h后进食统一早餐(100g面包一个,50g蛋糕一个);4h后进食午餐,统一食物(低脂肪饮食)。经7d清洗期,受试者分别交叉口服参比制剂或试验制剂。

1.4 样品采集

均于服药前和服药后20,40min,1.0,1.5,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,8.0,12.0,16.0,24.0h抽取静脉血6mL。不同时间点血样置含有肝素的试管中,立即离心分离血浆,置-20℃冰箱中保存至测定。

2 测定方法

2.1 血样预处理

参照文献建立血浆中二甲双胍浓度^[3-5]、格列本脲浓度^[6-10]测定方法。二甲双胍血样的预处理:精密吸取血浆0.5mL置10mL刻度离心管中,加入30%的高氯酸0.2mL,漩涡震荡2min,离心(10000r/min)10min;取上清液20μL进样分析。格列本脲血样的预处理:取0.5mL血浆,加入0.5mol/L HCl 0.2mL,振匀,采用固相萃取方法处理。萃取步骤:1mL甲醇活化固相萃取柱[Waters Oasis HLB 1mL(10mg)],1mL水平衡,全部转移已酸化血样至萃取小柱,5%的甲醇水1mL冲洗,再用洗脱液(2%的氨水-甲醇=20:80)1mL洗脱,收集洗脱液,自动进样10μL。

2.2 色谱条件

二甲双胍测定色谱条件: Lichrospher C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm,大连依利特科学仪器有限公司),柱温40℃;流动相:3mmol·L⁻¹十二烷基磺酸钠(含5%三乙胺,用磷酸调pH值4.0)-乙腈(65:35),流速1.0mL/min;检测波长:232nm。

格列本脲测定色谱-质谱条件:色谱条件:Waters Xtra MS C₁₈柱(150mm×2.1mm,3.5μm,Waters公司),保护柱:phenomenex C₁₈ ODS(4mm×3mm ID, No: Ajo-4287),柱温:40℃,流动相:乙腈-0.2%甲酸(60:40),流速:0.2mL/min;质谱条件:毛细管电压:3.0kV,一级锥孔电压:41V,二级锥孔电压:3V,去溶剂温度:250℃,离子源温度:150℃,去溶剂气流速:350L/h。格列本脲采用选择碎片离子扫描(SIR)为369(A+H),以SIR离子流强度定量。

2.3 色谱图及保留时间

空白血样、二甲双胍对照品标准液加入空白血样和受试者服药后二甲双胍色谱图,保留时间约为4.4min左右。图2分别为空白血样、格列本脲对照品标准液加入空白血样和受试者服药后格列本脲选择离子色谱图,保留时间约为4.4min左右。见图1。

2.4 线性范围及检测限

二甲双胍标准曲线:用空白血浆将二甲双胍对照品标准贮备液稀释成0.03,0.05,0.10,0.25,0.5,0.75,1.00,1.50μg·mL⁻¹的系列浓度溶液,按上述血样处理方法处理并测定,以二甲双胍峰面积对浓度进行线性回归。血浆中二甲双胍在0.03~1.50μg·mL⁻¹浓度范围线性良好,回归方程为:A=41296.49C(μg·mL⁻¹)-176.64,r²=0.9993,最低检测浓度为0.01μg·mL⁻¹。

格列本脲标准曲线:准确吸取空白血浆0.5mL于1.5mL塑料离心管中,加入格列本脲对照品标准溶液,配成2.5,5.0,10.0,20.0,40.0,80.0,160.0ng/mL的浓度系列,漩涡振荡1min,混匀,余照“血浆样品的处理”项下操作,测定格列

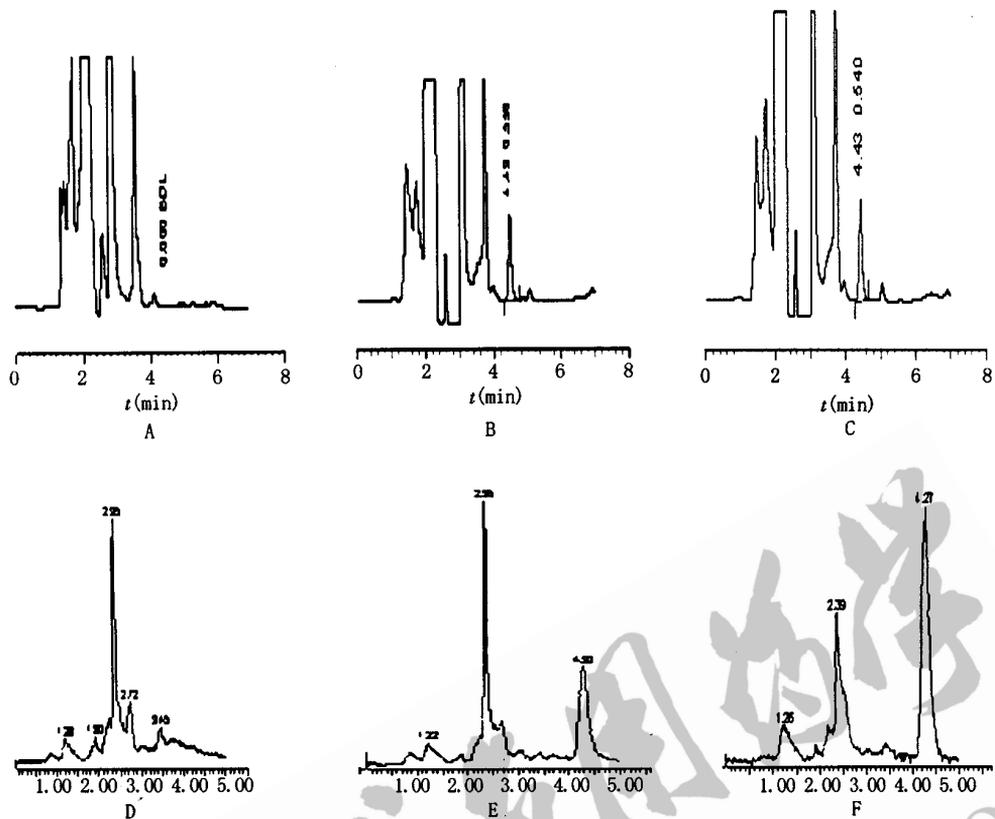


图 1 人血浆中二甲双胍和格列本脲 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of setformin and glibenclamide in human plasma

A. 空白血浆; B. 空白血浆中加入二甲双胍; C. 志愿者服药后; D. 空白血浆; E. 空白血浆中加入格列本脲; F. 志愿者服药后

A. Blank plasma; B. Blank plasma with Metformin; C. Plasma sample; D. Blank plasma; E. Blank plasma with glibenclamide; F. Plasma sample

本药的峰面积。当 $S/N \geq 3$ 时, 血浆中格列本脲最低检测浓度为 0.5 ng/mL 。血浆中格列本脲在 $2.5 \sim 160.0 \text{ ng/mL}$ 浓度范围内线性良好, 回归方程为: $A = 723.6161C - 1158.7747$, $r = 0.9990$ 。

2.5 回收率及精密度

二甲双胍: 配制相当于血浆样品浓度为 $0.05, 0.25, 0.80 \mu\text{g/mL}$ 的标准管, 按“样品处理”项下操作, 测定峰面积, 按回归方程计算实测浓度, 分别在同 1 d 内测定 5 次和每天 1 次连续测定 5 d, 分别考察方法的日内、日间精密度和回收率 (表 1)。日内 RSD 为 $3.01\% \sim 10.14\%$ ($n=5$); 日间 RSD 为 $4.94\% \sim 7.71\%$ ($n=5$)。回收率在 $97.50\% \sim 108.00\%$ ($n=5$)。

格列本脲: 配制相当于血浆样品浓度为 $5.0, 20.0, 90.0 \text{ ng/mL}$ 的标准管, 按“样品处理”项下操作, 测定峰面积, 按回归方程计算实测浓度, 分别在同 1 d 内测定 5 次和每天 1 次连续测定 5 d, 分别考察方法的日内、日间精密度和回收率 (表 2)。日内 RSD 为 $2.80\% \sim 8.50\%$ ($n=5$); 日间 RSD 为 $4.89\% \sim 13.19\%$ ($n=5$)。回收率在 $99.58\% \sim 106.50\%$ ($n=5$)。

3 结果

3.1 血药浓度

18 名志愿者单次服用试验制剂和参比制剂后二甲双胍血药浓度-时间曲线图见图 2, 格列本脲血药浓度-时间曲线图见图 3。

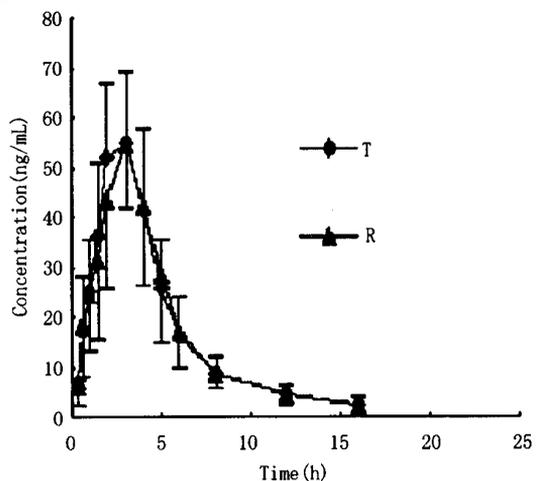


图 2 18 例男性志愿者口服受试制剂 (T) 和参比制剂 (R) 后格列本脲血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of metformin after a single oral in 18 healthy volunteers

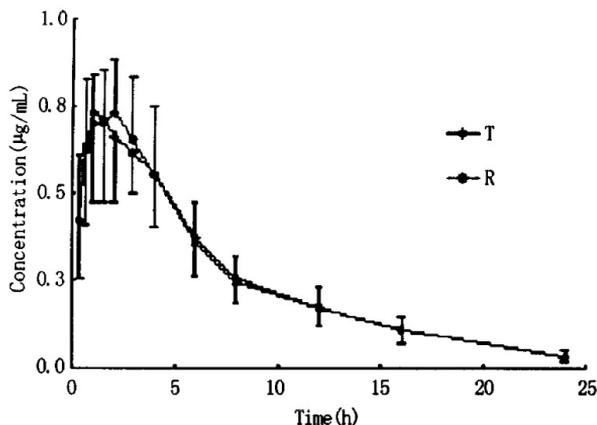


图 3 18例男性志愿者口服受试制剂(T)和参比制剂(R)后二甲双胍血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of glibenclamide after a single oral in 18 healthy volunteers

表 1 单次服用试验制剂或参比制剂的二甲双胍药代动力学参数

Tab 1 The pharmacokinetic parameters of metformin after a single oral in healthy volunteers

组别	AUC_{0-24} ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	C_{max} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	相对生物利用度 (%)
试验制剂	5.90 ± 1.36	6.17 ± 1.36	0.82 ± 0.21	1.43 ± 0.88	5.86 ± 1.73	100.21 ± 14.10
参比制剂	5.95 ± 1.35	6.28 ± 1.36	0.82 ± 0.14	1.54 ± 0.98	5.44 ± 1.27	

表 2 单次服用试验制剂或参比制剂的格列本脲药代动力学参数

Tab 2 The pharmacokinetic parameters of glibenclamide after a single oral in healthy volunteers

组别	AUC_{0-16} ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	C_{max} ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	相对生物利用度 (%)
试验制剂	270.28 ± 61.82	287.13 ± 61.97	62.83 ± 10.89	2.53 ± 0.79	4.17 ± 0.86	101.67 ± 14.54
参比制剂	268.70 ± 61.99	284.17 ± 67.85	61.44 ± 12.11	2.81 ± 0.75	4.42 ± 1.28	

4.3 以 $AUC_{(0-m)}$ 计算, 受试制剂中二甲双胍的相对生物利用度为 (100.21 ± 14.10)%; 格列本脲的相对生物利用度为 (101.67 ± 14.54)%。主要药动学参数 C_{max} , $AUC_{(0-m)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ 经对数转化后, 进行方差分析、双单侧 t 检验及 90% 置信区间计算无显著性差异, 表明受试制剂与参比制剂生物等效。

参考文献

[1] Blonde L, Rosenstock J, Mooradian AD, et al. Glyburide/metformin combination product is safe and efficacious in patients with type 2 diabetes failing sulphonylurea therapy [J]. Diabetes Obes Metab 2002, 4(6): 368-375.

[2] 杜小莉, 张翠莲. 降血糖新药——格列本脲和盐酸二甲双胍复合片 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(11): 869-871.

[3] Cheng CL, Chou CH. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection [J]. J Chromatogr B 2001, 762: 51-58.

[4] 范鲁雁, 仇益群, 汤震. 盐酸二甲双胍胶囊的药动学与相对生物利用度研究 [J]. 安徽医科大学学报, 1999, 34(4): 268.

[5] 杨敏, 余细勇, 欧晓鹏, 等. 中成药中格列本脲人体血浆浓度测定方法及药代动力学特性 [J]. 中药新药与临床药理, 2002

3.2 药动学参数

单次服用试验制剂或参比制剂的二甲双胍和格列本脲的药动学参数分别见表 1、表 2。

4 讨论

4.1 有关格列本脲的测定方法国内报道多用 HPLC 法测定, 但由于本次试验使用的格列本脲剂量很小 (2.5mg), 其最强吸收波长接近于末端吸收, 易被杂质干扰, UV 检测法的灵敏度无法满足其测定需要。本试验建立的 HPLC-MS 测定受试者血浆中格列本脲浓度的方法, 采用选择碎片离子扫描 (SR) 为 369(A+H), 以 SR 离子流强度定量, 具有较高的准确度、灵敏度和专一性, 能满足体内低浓度药动学和生物利用度研究的需要, 为临床上的药物浓度监测、药动学分析提供了一种新的途径。

4.2 本研究口服试验制剂二甲双胍 500mg 格列本脲 2.5mg 后的二甲双胍和格列本脲药动学参数与文献报道的基本一致^[4,5]。在试验期间, 18 名受试者均没有观察到不良反应的发生。

(02), 77.

[6] Tiller PR, Land AP, Jarline I et al. Application of liquid chromatography-mass spectrometry analyses to the characterization of novel glyburide metabolites formed *in vitro* [J]. J Chromatogr A, 1998, 794: 15-25.

[7] Valdes Santurio JR, Gonzalez Porto E. Determination of glibenclamide in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B 1996, 682: 364-370.

[8] Kirchheiner J, Brockmoller J, Meineke I et al. Impact of CYP2C9 and ino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers [J]. Clin pharmacol & Ther 71(4): 286-296.

[9] Niopas I, Daftisios AC. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal 2002, 28: 653-657.

[10] Stepensky D, Friedman M, Srour W, et al. Preclinical evaluation of pharmacokinetic-pharmacodynamic rationale for oral CR metformin formulation [J]. J Controlled Release 2001, 71: 107-115.

收稿日期: 2005-09-04