

盐酸二甲双胍片人体相对生物利用度研究

殷立新¹,任进民¹,王川平¹,孙倩¹,张雪宁¹,丁翔宇² (1.河北医科大学第二医院,石家庄 050000; 2.河北医科大学药学院,石家庄 050011)

摘要:目的 考察盐酸二甲双胍片的人体相对生物利用度。方法 22名男性健康受试者,采用单剂量、随机、交叉对照试验设计,空腹口服盐酸二甲双胍片试验和参比制剂各 750mg后,采用 HPLC法检测血浆中二甲双胍经时过程的血药浓度,计算其药动学参数和相对生物利用度。结果 盐酸二甲双胍试验制剂相对于参比制剂的生物利用度为 (95.7 ±28.9)%。主要药动学参数的方差分析和双侧 *t*检验结果表明,试验制剂和参比制剂 AUC_{0-1} , C_{max} 无显著性差异 ($P > 0.05$),盐酸二甲双胍试验制剂的 AUC_{0-1} , C_{max} 的 90%的置信区间分别为 84.1% ~101.5%, 76.0% ~97.6%。结论 盐酸二甲双胍片试验和参比制剂具有生物等效性。

关键词:盐酸二甲双胍;相对生物利用度;高效液相色谱法

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)02-0133-03

Study on Relative Bioavailability of Metformin in Hydrochloride Table in Human

YIN Li-xin¹, REN Jin-m in¹, WANG Chuan-ping¹, SUN Qian¹, ZHANG Xue-ning¹, ZHANG Xue-ning¹, DING Xiang-yu² (1. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Pharmacy College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the relative bioavailability of Metformin in Hydrochloride table in healthy male volunteers. **METHODS** In a randomized two-period cross-over study, a single oral dose of 750mg Metformin in Hydrochloride table (tested and referenced preparation) were given to 22 healthy male volunteers. The plasma concentrations of Metformin in Hydrochloride were determined by HPLC method. The pharmacokinetic parameters of the two preparations and the relative bioavailability of Metformin in Hydrochloride were calculated with statistical analysis. **RESULTS** The relative bioavailability of Metformin in Hydrochloride in test were (95.7 ±28.9)%. There were no significant difference with the pharmacokinetic parameters between tested and referenced preparation ($P > 0.05$). The 90% confidence interval of AUC_{0-1} were 84.1% ~101.5%, C_{max} were 76.0% ~97.6%. **CONCLUSION** The two preparations were bioequivalent.

KEY WORDS: metformin in hydrochloride; relative bioavailability; HPLC

盐酸二甲双胍 (metformin in hydrochloride)是双胍类口服降血糖药,降血糖作用肯定,可明显降低餐后高血糖,且不易引起低血糖,并能改善胰岛素抵抗性,因此,临床广泛用于 2 型糖尿病的降糖治疗。本试验建立了高效液相色谱法测定血浆中盐酸二甲双胍浓度的分析方法,通过测定健康受试者口服盐酸二甲双胍片后的血药浓度,研究其药动学和人体相对生物利用度,并评价其生物等效性,为临床用药提供依据。

1 药品、试剂与仪器

盐酸二甲双胍片 (药都制药集团股份有限公司研制,每片 250mg,批号: 050301),盐酸二甲双胍片 (天津太平洋制药有限公司, 250mg,批号: 050101);盐酸二甲双胍对照品 (购自中国药品生物制品检定所,批号: 050306,含量 99.6%)。乙

腈 (色谱纯, J&K CHEMICA 公司,批号: L390E01);磷酸二氢钾 (分析纯,北京化工厂,批号: 930306-1);十二烷基磺酸钠 (分析纯,天津市光复精细化工所,批号: 20050321);二氯甲烷 (分析纯,天津市新通精细化工有限公司,批号: 19970906);三氯乙酸 (分析纯,天津市耀华化工厂,批号: 19910929)。试验中各种溶液配制均使用纯化水。

HITACHI L-6200A 三元梯度泵 (日本日立公司); 785A 紫外可见检测器 (Applied Biosystem 公司); CT22 色谱信号采集器 (南京千谱软件公司);南京千谱色谱工作站。TG332A 型微量分析天平 (湘仪天平仪器厂)。LDZ5-2 型离心机 (北京医用离心机厂)。GZ-20G-II 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

作者简介:殷立新,女,副主任药师,从事临床药学和药动学研究。在专业杂志发表论文 70 余篇。通讯地址:河北省石家庄市和平西路 215 号河北医科大学第二医院,联系电话: 0311 - 87222778; E-mail: bambooylx@163.com

2 方法

2.1 受试者选择

22名男性健康受试者,年龄(20.7±0.6)岁,体重(64.0±5.5)kg,身高(174±5)cm。受试前体检及血、尿常规、心、肝、肾功能等检查均正常。受试前两周及试验期间未服用任何药物,受试者均无烟酒嗜好,了解所进行试验的目的、方法和意义,对可能发生的不良反应表示理解并书面签署知情同意书。

2.2 试验与给药方案

试验方案经河北医科大学第二医院伦理委员会审核批准后执行。全部试验在I期临床试验病房在医生、护士监护下进行。22名受试者随机分为2组,按标准的2×2交叉试验方案设计,每组受试者前后两次空腹口服受试制剂或参比制剂250mg×3,试验用剂量与盐酸二甲双胍片临床常用治疗量一致。于清洗期后两组互换,清洗期为一周。受试者于试验前1d晚8时起禁食,次日8:00am空腹口服药物,200mL温开水送服,4h后统一进标准餐一份,8h后进标准餐一份。

2.3 血样采集及处理

参考文献报道^[1]并根据预试验结果,分别在服药前取空白血样,于服药后0.5,1,1.5,2,2.5,3,4,5,6,8,10,12,24h分别自上肢静脉取血3mL,注入肝素化管中,放置30min后离心,转速3000r·min⁻¹,时间10min,分离血浆,置-40℃冰箱保存待测。

2.4 血浆中盐酸二甲双胍的HPLC测定方法

2.4.1 色谱条件 色谱柱为Diamondsil C₁₈,5μm,4.6mm×250mm。流动相为0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液pH3.5(含0.003mol/L十二烷基磺酸钠和0.4%三乙胺)-乙腈(78:22)。检测波长:232nm。流速1.0mL·min⁻¹。进样量为20μL。柱温:33℃。理论塔板数按盐酸二甲双胍计算不低于2000,主峰与杂质峰的分离度均大于1.5。

2.4.2 血浆样品处理 取血浆样品0.5mL,加入10%三氯乙酸沉淀剂0.3mL,漩涡1min,10000r·min⁻¹离心5min,取上清液于另一干净离心管中,加入二氯甲烷0.1mL,漩涡1min,10000r·min⁻¹离心3min,取水层20μL进样测定。记录主峰峰面积,用标准曲线法计算出血浆样品的盐酸二甲双胍浓度(μg·mL⁻¹)。

2.4.3 血浆样品标准曲线制备 精密称取盐酸二甲双胍对照品40.3mg至100mL量瓶中,纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。取贮备液5.0mL至10mL量瓶中,纯化水定容,摇匀,作为1号工作液,依次倍比稀释得2,3,4,5,6,7,8,9号工作液。相应浓度为200.50,100.25,50.12,25.06,12.53,6.26,3.13,1.57,0.78μg·mL⁻¹。

取空白血浆0.5mL,分别加入1~9号盐酸二甲双胍标准工作液20μL,制得浓度依次为8.02,4.01,2.00,1.00,0.50,0.25,0.12,0.063,0.031μg·mL⁻¹血浆模拟样品,按血

浆样品处理方法处理后,进行测定。记录色谱峰面积,由样品峰面积A对样品浓度C进行直线回归,得回归方程,A=4.706×10⁴C+21.994(r=0.9998,n=9)。

其线性检测范围:0.031~8.02μg·mL⁻¹,最低检测浓度为0.031μg·mL⁻¹(S/N>3)。

2.4.4 方法的专属性 由血浆样品按本法分离测定所得的色谱图表明,空白样品中内源性物质不干扰盐酸二甲双胍的分析,通过与空白血样添加对照品(盐酸二甲双胍)色谱图比较,确证9.1min色谱峰为盐酸二甲双胍峰,色谱峰分离良好,不影响定量的准确性。

2.4.5 方法学评价 取空白血浆0.5mL,分别加入盐酸二甲双胍工作液20μL,配制相当于血药浓度约为0.063,1.00,4.01μg·mL⁻¹的血浆模拟样品,按血浆样品处理方法处理后进样分析,进行回收率及日内、日间精密度测定。结果见表1。

表1 日内、日间精密度和回收率试验结果(n=5)

Tab 1 Results of within-day and between-day precision test and recovery test (n=5)

Concentration /μg·mL ⁻¹	Recovery /%	With-in-day RSD/%	Between-day RSD/%
0.063	92.7±3.87	6.3	3.6
1.00	90.5±2.49	2.3	10.1
4.01	95.7±1.42	1.3	4.2

2.4.6 稳定性及质量控制 精密量取空白血浆0.5mL,制成盐酸二甲双胍浓度为1.00μg·mL⁻¹的血浆模拟样品,考察上述样品在避光条件下室温放置8h,冻存13d及经2次冻融循环的稳定性。结果表明,盐酸二甲双胍在上述条件下均较稳定。

测定每批受试者血样时,随行建立标准曲线,并配制高、中、低三个浓度的质控样品与待测样品同时测定,只有质控样品测定结果的偏差小于20%,该批样品测定结果被看作有效并进行药动力学计算。

2.5 数据处理和统计分析

将试验所得盐酸二甲双胍血药浓度-时间数据,用非房室模型计算药动力学参数,求得个体参数后计算平均值。C_{max},t_{max}为实测值,运用梯形法计算0~24h药-时曲线下面积(AUC₀₋₂₄);以末端相血药浓度数值的对数对时间进行线性回归,求得斜率Ke,t_{1/2β}=0.693/Ke;AUC_{0-∞}=AUC₀₋₂₄+C_{24h}/Ke;相对生物利用度F=AUC_{0-∞(T)}/AUC_{0-∞(R)}×100%。

用孙瑞元等编制的DAS软件对C_{max},AUC_{0-∞}经对数转换后进行多因素方差分析及双侧t检验,并计算90%置信区间,来判断和评价两种制剂的生物等效性;t_{max}用非参数法分析,观察是否具有显著性差异。

3 结果

3.1 血药浓度-时间曲线

22名健康受试者分别口服单剂量750mg试验制剂和参

比制剂后,盐酸二甲双胍血药浓度平均值见表 2。

表 2 受试者口服试验药与参比药后不同时间血药浓度 ($n=22, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 The serum drug concentrations after oral test and reference preparation ($n=22, \bar{x} \pm s$)

Time	Test	Reference
/h	/μg·mL ⁻¹	/μg·mL ⁻¹
0	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
0.5	1.01 ±0.39	1.09 ±0.46
1	1.44 ±0.52	1.73 ±0.61
1.5	1.71 ±0.56	2.06 ±0.80
2	1.85 ±0.68	2.13 ±0.71
2.5	1.87 ±0.55	2.00 ±0.62
3	1.85 ±0.53	1.99 ±0.69
4	1.57 ±0.46	1.70 ±0.64
5	1.16 ±0.38	1.28 ±0.44
6	0.87 ±0.31	0.91 ±0.33
8	0.52 ±0.21	0.64 ±0.24
10	0.30 ±0.13	0.31 ±0.12
12	0.20 ±0.10	0.18 ±0.09
24	0.042 ±0.016	0.045 ±0.015

3.2 药动学参数

22名健康受试者分别口服单剂量 750 mg 试验制剂和参比制剂后的盐酸二甲双胍血药浓度数据,用非房室模型计算药动学参数、运用梯形法计算 0~24 h 药时曲线下面积 (AUC_{0-t})见表 3。由表 3 可知,两种制剂的主要药动学参数相似。与参比制剂比较,盐酸二甲双胍的相对生物利用度为 (95.7 ± 28.9) % ,差异在 $\pm 20\%$ 以内。

表 3 22 名受试者口服盐酸二甲双胍试验制剂和参比制剂后药动学参数比较 ($n=22, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of pharmacokinetic parameters in 22 volunteers between test and reference of Metformin Hydrochloride ($n=22, \bar{x} \pm s$)

Parameters	Test	Reference
$t_{1/2\beta}$ /h	2.65 ±1.18	2.46 ±0.72
t_{max} /h	2.39 ±0.78	2.17 ±0.78
C_{max} /(μg·mL ⁻¹)	2.14 ±0.57	2.52 ±0.77
AUC_{0-24} /(μg·h·mL ⁻¹)	12.14 ±3.43	13.24 ±3.84
$AUC_{0-\infty}$ /(μg·h·mL ⁻¹)	14.33 ±3.32	14.74 ±3.78

3.3 生物等效性研究

用孙瑞元等编制的 DAS 软件对 C_{max} , AUC_{0-} 经对数转换后进行多因素方差分析及双单侧 t 检验,并计算 90% 置信区间,结果见表 4。 t_{max} 用非参数法统计分析,受试药与参比药

比较无显著性差异 ($P>0.05$)。根据药物制剂生物利用度和生物等效性试验指导原则, AUC_{0-t} [$\ln$]值 90% 的置信区间在 80% ~ 125% 内; C_{max} [$\ln$]值 90% 置信区间为 70% ~ 143% 内,则可认为生物等效,根据本试验结果,故判定两种制剂生物等效。

表 4 AUC_{0-t} 和 C_{max} 的统计分析结果

	T ₁	T ₂	90% Confidential interval/%
$\ln C_{max}$	2.854	6.966	76.0% ~ 97.6%
$\ln AUC_{0-t}$	2.637	5.524	84.1% ~ 101.5%

4 讨论

本实验血药浓度测定方法参考文献报道^[2-3]并加以改进而建立,采用三氯乙酸沉淀蛋白质并用二氯甲烷脱脂的方法测定人血浆中盐酸二甲双胍的浓度,血浆内源性杂质完全干扰盐酸二甲双胍的测定,本方法具有灵敏度高,干扰少,样品处理简单的特点,精密度和准确性较好,适合血浆样品的含量测定。

试验制剂与参比制剂在体内均能迅速吸收。 t_{max} 为 2.3 h 左右, $t_{1/2\beta}$ 为 2.5 h 左右,本研究结果药动学参数 $t_{1/2\beta}$, t_{max} , C_{max} , AUC_{0-24} 和 $AUC_{0-\infty}$ 与文献报道基本一致^[4]。本研究结果表明,两种制剂的盐酸二甲双胍的主要药动学参数均无显著性差异,故可认为两种制剂在人体内药动学过程相似,与参比制剂比较,盐酸二甲双胍片的相对生物利用度为 (95.7 ± 28.9) % ,差异在 $\pm 20\%$ 以内,符合规定。

经方差分析、双单侧 t 检验及 90% 可信限统计分析证明,试验制剂与参比制剂具有生物等效性。

参考文献

[1] QU B, HANG T J, JIANG L. Determination of plasma metformin HCl concentration by ion-pair HPLC and its application to pharmacokinetics[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2004, 13 (7): 637-640.

[2] CHENG C L, CHOU C H. Determination of metformin in human plasma by high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection[J]. J Chromatogr B, 2001, 762 (1): 51-58.

[3] KAH H Y, KOK K P. Simple high performance liquid chromatographic method for the metformin in human plasma[J]. J Chromatogr B, 1998, 710 (1): 243-246.

[4] BONIFIGI A R, MANFRINI S, GREGORIO F. Determination of plasma metformin by a new cation-exchange technique[J]. Ther Drug Monit, 1999, 21: 330-334.

收稿日期: 2006-08-11