

# 盐酸二甲双胍缓释片人体相对生物利用度及其药代动力学研究

丁冰, 张尊建\*, 田媛, 许风国, 王骥

(中国药科大学分析测试中心, 南京 210009)

**【摘要】** 目的: 建立人血浆中盐酸二甲双胍的高效液相色谱测定方法, 考察国产盐酸二甲双胍缓释片相对于普通片的生物等效性, 并估算其药代动力学参数。方法: 血浆样品经 30% HClO<sub>4</sub> 沉淀蛋白后进行高效液相色谱分析。色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 流动相为乙腈-0.020 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (65:35), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 233 nm。临床实验方案采用双交叉试验设计, 20 名受试者分两组服用缓释片和普通片。结果: 本方法绝对回收率大于 90%。缓释片和普通片的主要药动学参数为: 单剂量时 AUC<sub>0-24</sub> 分别为 9.13 ± 2.16 和 9.53 ± 1.58 μg·h/ml; c<sub>max</sub> 分别为 1.03 ± 0.28 和 1.88 ± 0.29 μg/ml; t<sub>max</sub> 分别为 4.0 ± 0.4 和 2.4 ± 0.3 h; t<sub>1/2</sub> 分别为 6.61 ± 1.28 和 3.95 ± 1.31 h; 多剂量时 AUC<sub>ss</sub> 分别为 11.73 ± 2.26 和 5.84 ± 0.88 μg·h/ml; c<sub>max</sub> 分别为 1.15 ± 0.17 和 1.17 ± 0.17 μg/ml; c<sub>min</sub> 分别为 0.24 ± 0.11 和 0.16 ± 0.12 μg/ml; c<sub>av</sub> 分别为 0.49 ± 0.09 和 0.51 ± 0.07 μg/ml; t<sub>max</sub> 分别为 3.3 ± 0.6 和 2.0 ± 0.3 h; AUC<sub>0-24</sub> 和 AUC<sub>SS</sub> 经对数转换后方差分析和双单侧 t 检验, 均无显著性差异。结论: 本方法简便准确。试验片和参比片吸收程度生物等效。盐酸二甲双胍缓释片的相对生物利用度单剂量时为 (95.5 ± 12.7)%, 多剂量时为 (100.4 ± 10.4)%。试验片具有缓释特征。

**【关键词】** 盐酸二甲双胍; 缓释片; 高效液相色谱; 药代动力学

**【中图分类号】** R969.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)05-0438-04

二甲双胍属双胍类降糖药, 是目前世界发达国家仍在使用的唯一口服双胍类抗高血糖药物, 其降糖机理是提高外周组织和肝脏对胰岛素的敏感性, 降低胰岛素抵抗, 减少胃肠道对葡萄糖的吸收。目前国内临床上使用的为其普通片剂和胶囊剂, 常用剂量为每日 3 次, 每次 500 mg, 存在服药次数多、血药浓度波动大等缺点。美国 FDA 已批准 BMS 公司的盐酸二甲双胍缓释片上市, 商品名 Glucophage XR, 而国内市场上还没有其缓释制剂。本实验是测定国内某公司研制的盐酸二甲双胍缓释片的药动学参数, 并比较其与普通片的生物等效性。

## 1 仪器与试剂

LC-10AT VP HPLC 仪(日本岛津公司), SPD-10AT VP 检测器(日本岛津公司), 乙腈: 色谱纯(TEDIA Company Inc.), 甲醇: 色谱纯(江苏汉邦科技有限公司), 高氯酸和磷酸二氢钠: 国产分析纯, 纯净水: 自制。试验片为国内某公司研制的盐酸二

甲双胍缓释片, 规格 500 毫克/片, 批号 010319。参比片为市售北京天安联合制药有限公司生产的盐酸二甲双胍片, 规格 250 毫克/片, 批号 011101。盐酸二甲双胍对照品纯度大于 99.0%。

## 2 实验方法

### 2.1 盐酸二甲双胍血浆样品的处理方法

参考文献方法<sup>1,2</sup>, 建立血浆样品的处理方法: 精密吸取血浆样品 1.0 ml 置 10 ml 具塞离心管中, 加入 30% 高氯酸 300 μl, 涡旋 1 min, 4000 r/min 离心 15 min, 转移上清液, 再于 16000 r/min 高速离心 15 min, 移出的上清液经滤膜过滤后供 HPLC 分析测定。

### 2.2 色谱系统适用性试验

色谱柱: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 0.02 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.0)-乙腈 (65:35); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 233 nm。在上述色谱条件下, 测得服药前空白血浆、盐酸二

甲双胍甲醇溶液、受试者服药后血浆样品的 HPLC 色谱图见图 1, 血浆中的内源性物质不干扰分析。

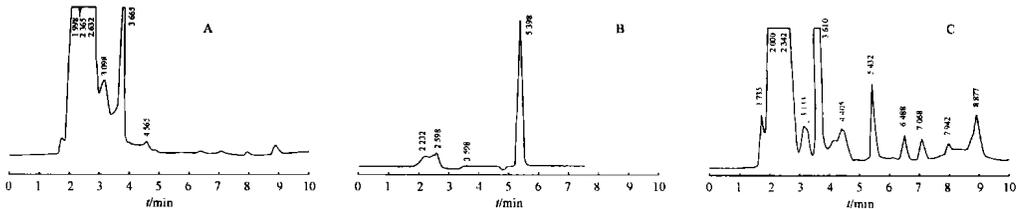


Fig 1. Chromatograms of blank plasma(A), standard metformin solution(B) and volunteers' plasma(C)

### 2.3 标准曲线的制备

精密吸取 1.0 mg/ml 盐酸二甲双胍甲醇溶液适量, 置 10 ml 具塞离心管中, 分别加入空白血浆 1.0 ml, 涡旋混合, 制成含盐酸二甲双胍 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0  $\mu\text{g/ml}$  的血浆样本, 按上述血浆样品处理方法处理, 进样 20  $\mu\text{l}$  分析, 记录盐酸二甲双胍峰面积。重复 5 次。以峰面积(Y)对浓度(X,  $\mu\text{g/ml}$ ) 进行线性回归。得回归方程:  $Y = 139473X - 7025$ ,  $r = 0.9995$ 。试验表明, 盐酸二甲双胍血浆浓度在 0.1 ~ 4.0  $\mu\text{g/ml}$  范围内线性关系良好。

### 2.4 绝对回收率试验

精密吸取 1.0 mg/ml 盐酸二甲双胍甲醇溶液适量, 置 10 ml 具塞离心管中, 分别加入空白血浆 1.0 ml, 涡旋混合, 制成含盐酸二甲双胍 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{g/ml}$  3 种浓度的血浆样本各 5 份, 按上述血浆样本处理方法处理, 进样 20  $\mu\text{l}$  分析, 记录盐酸二甲双胍峰面积( $A_s$ )。另分别取含盐酸二甲双胍对照品 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{g/ml}$  的甲醇溶液, 进样 20  $\mu\text{l}$  分析, 记录盐酸二甲双胍峰面积( $A_r$ )。绝对回收率( $\text{Rec}\%$ ) =  $(A_s/A_r) \times 100\%$ 。结果见表 1。试验表明此方法的回收率良好, 高中低浓度回收率均大于 90%。

Tab 1. Recovery of metformin from plasma ( $n=5$ )

Added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery(%)	RSD(%)
0.5	101.01	3.81
1.0	99.17	2.75
2.0	99.59	4.39

### 2.5 精密度试验

精密吸取 1.0 mg/ml 盐酸二甲双胍甲醇溶液适量, 置 10 ml 具塞离心管中, 分别加入空白血浆 1.0 ml, 涡旋混合, 制成含盐酸二甲双胍 0.5, 1.0,

试验测得血浆中盐酸二甲双胍的检测限为 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 。

2.0  $\mu\text{g/ml}$  3 种浓度的血浆样本。按上述血浆样本处理方法处理, 并进行色谱分析, 考察日内变异和日间变异。结果见表 2。试验表明血浆样品分析的精密度良好, RSD 均小于 10%。

Tab 2. Precision of the method with determination of metformin ( $n=5$ )

Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Within day		Between days	
	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
0.5	64758 $\pm$ 1712	2.64	59998 $\pm$ 2393	4.35
1.0	117015 $\pm$ 6434	5.50	115157 $\pm$ 2425	2.11
2.0	250491 $\pm$ 15469	6.18	240805 $\pm$ 14535	6.04

### 2.6 志愿受试者选择

20 名男性健康志愿受试者, 常规体检及生化检验结果证明肝肾功能均正常, 心电图正常, 精神状态良好。受试前 2 周及实验期间未服用其它药物, 试验期间戒烟、酒和油腻食物, 饮食统一。受试者对试验目的与要求完全了解, 并签署知情同意书。试验经伦理委员会同意后进行。

### 2.7 试验设计

采用双交叉试验设计, 清洗期 7 天。

单剂量研究: 20 名受试者随机分成两组, 分别口服缓释片 2 片或普通片 4 片, 用 200 ml 温开水送服, 服药后 2 h 自由进水, 服药 3 h 后统一进餐。采血时间: 普通片为服药前及服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 15, 24 h; 缓释片为服药前及服药后 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10, 12, 15, 24 h。

多剂量研究: 用单剂量研究的受试者继续进行多剂量研究。试验组于每日晨 7:00 口服缓释片 2 片, 参照组于每日 7:00 和 19:00 各口服普通片 2 片, 空腹 200 ml 温开水送服; 连续 6 d。从第 4 天起, 每天早上服药前(7:00)取血 4 ml。第 6 天只服药 1 次。

## 2.8 数据分析

以非房室依赖型方法估算受试者的主要药代动力学参数  $t_{1/2}$ , MRT,  $c_{\max}$  和  $t_{\max}$  为实测值,  $AUC_{0-24}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  和  $AUC_{SS}$  由实测血药浓度经梯形积分法估算。所得参数经对数转换进行方差分析和双单侧  $t$  检验, 取  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 血药浓度-时间数据

20 名受试者口服盐酸二甲双胍缓释片和普通片后平均血浆药物浓度-时间数据, 单剂量见图 2, 多剂量见图 3。

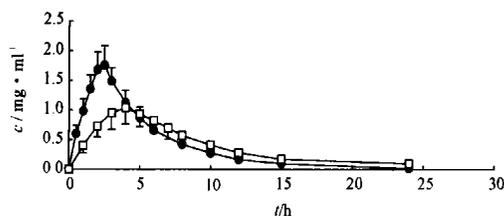


Fig 2. Mean drug plasma concentration-time curve of metformin in 20 volunteers after a single dose oral administration

—●— reference; —□— test

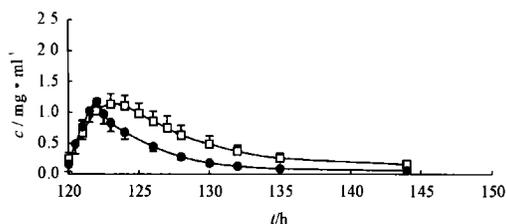


Fig 3. Mean drug plasma concentration-time curve of metformin in 20 volunteers after multiple doses oral administration

—●— reference; —□— test

### 3.2 稳态研究中连续3次的谷浓度数据

Tab 3 Mean drug plasma concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 72, 96, 120 h of metformin in 20 volunteers

	72 h	96 h	120 h
Test	0.27 ± 0.08	0.29 ± 0.09	0.24 ± 0.11
Reference	0.22 ± 0.21	0.25 ± 0.16	0.16 ± 0.12

### 3.3 药动学参数

### 3.4 等效性研究

以国产盐酸二甲双胍片为参比制剂, 以血浆中盐酸二甲双胍浓度为测定指标, 按面积法 ( $AUC_{0-24}$  和  $AUC_{SS}$ ) 估算, 测得盐酸二甲双胍缓释片的相对生物利用度单剂量时为 (95.5 ± 12.7)%; 多剂量时为 (100.4 ± 10.4)%。两种制剂的  $AUC_{0-24}$  和  $AUC_{SS}$

经对数转换后的方差分析和双单侧  $t$  检验表明, 在  $\alpha=0.05$  时无显著性差异。故试验制剂和参比制剂吸收程度生物等效。

Tab 4. Pharmacokinetic parameters of metformin in 20 volunteers after oral administration

Parameters	Test	Ref
Single dose		
$c_{\max}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1.03 ± 0.28	1.88 ± 0.29
$t_{\max}$ (h)	4.0 ± 0.4	2.4 ± 0.3
MRT (h)	10.12 ± 1.22	5.78 ± 0.94
$t_{1/2}$ (h)	6.61 ± 1.28	3.95 ± 1.31
$AUC_{0-24}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	9.13 ± 2.16	9.53 ± 1.58
$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	10.09 ± 2.42	10.08 ± 1.78
Multiple doses		
$c_{\max}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1.15 ± 0.17	1.17 ± 0.17
$t_{\max}$ (h)	3.3 ± 0.6	2.0 ± 0.3
$c_{\min}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.24 ± 0.11	0.16 ± 0.12
$C_{\text{av}}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.49 ± 0.09	0.51 ± 0.07
$AUC_{SS}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	11.73 ± 2.26	5.84 ± 0.88
DF	1.85 ± 0.26	1.98 ± 0.26

## 4 讨论

### 4.1 蛋白沉淀剂的选择

通常血浆样品处理常用有机溶媒提取法和沉淀蛋白法。由于本药为二甲双胍的盐酸盐, 水溶性强, 用有机溶媒萃取的方法提取效率低, 本试验选用沉淀蛋白法。文献<sup>1-2</sup>报道的蛋白沉淀剂有 2 种: 乙腈和高氯酸。经加入乙腈和不同浓度高氯酸的试验考察后发现: 乙腈沉淀效率低, 加入量大, 导致样品浓度下降, 检测灵敏度降低。10% 的高氯酸同样存在沉淀效率低, 加入量大的问题; 而 60% 的高氯酸加入后迅速产生凝结, 样品被包裹在沉淀物中, 导致提取回收率下降, 所以本试验选用 30% 的高氯酸作为沉淀剂。

### 4.2 缓释片与普通片的参数比较

由于国内目前尚无盐酸二甲双胍缓释片, 本实验采用普通片作为参比制剂。结果显示, 两种制剂的  $AUC_{0-24}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  经方差分析和双单侧  $t$  检验无显著性差异, 证明二者吸收程度等效, 但  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  存在显著性差异。与参比制剂相比, 试验制剂  $c_{\max}$  降低,  $t_{\max}$  延长, 其  $MRT_{0-\infty}$  为 10.12 ± 1.22 h, 比参比制剂的 5.78 ± 0.94 h 增加近 1 倍, 且试验制剂每天只服药 1 次的 DF 为 1.85 ± 0.26, 小于参比制剂每天服药 2 次的 DF 1.98 ± 0.26, 证明试验制剂具有缓释特征。

## 参考文献

- [1] Kah Hay Yuen, Kok Khiang Peh. Simple high-performance liquid chromatography method for the determination of metformin in human plasma[J]. *J. Chemotherapy B*, 1998(710): 243-246.
- [2] CHENG CL, CHOU CH. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection[J]. *Journal of Chemotherapy B*, 2001(762): 51-58.
- [3] 药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则[Z]. 中华人民共和国药典(二部). 附录 XIX B.

# Study on the Relative Bioavailability and Pharmacokinetics of Metformin Controlled-release Tablets in Human Volunteers

DING Yi-Bing, ZHANG Zun-Jian, TIAN Yuan, XU Feng-Guo, WANG Ji

Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**【ABSTRACT】** AIM: To establish a HPLC method for the study of bioavailability and pharmacokinetics of metformin in human plasma. METHOD: A simple HPLC method using ultraviolet detection was developed, which entailed the direct injection of the plasma sample after deproteinating with 30% perchloric acid. The mobile phase consisted of 0.01M potassium dihydrogen orthophosphate (pH 4.0) and acetonitrile (65:35, v/v). Analysis was run at a flow-rate of 1.0 ml/min with the detector operated at wavelength 233nm. The mean absolute recovery value was above 90%, while the within-day and between-day coefficients of variation were less than 10%. The calibration curve was linear over a concentration range of 0.1 to 4.0 μg/ml. RESULT: The method was proved to be simple, sensitive and rapid.

**【KEY WORDS】** Metformin; Controlled-release tablet; HPLC; Pharmacokinetics

## 中国药科大学学报

JOURNAL OF CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY



印刷版  
欢迎订商



光盘版  
欢迎投稿



网络版  
欢迎刊登广告

《中国药科大学学报》是由中华人民共和国教育部主管、中国药科大学主办的药学类综合刊物，主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药物生物技术、药理学、药代动力学等学科的原始研究论著。本刊突出创新成果、先导预测、科研跟踪、权威评述，具有“药学前沿”、“获奖成果”等品牌栏目，因此具有前瞻性、权威性、创新性、实用性、发行数量大、出版周期短的特点。本刊坚持以高学术品位示人，为医药科技人员报道新成果，提供新思路，应用新方法，开拓新视野架起了科技交流的桥梁。

邮发代号: 28-115 定价: 15元 全年 90元 双月刊 96页

地址: 南京童家巷 24 号 邮政编码: 210009 电话: 025-3271566 传真: 025-3271279

电子邮箱: cpuxuebao@sohu.com xuebao@cpu.edu.cn

网址: <http://zgyd.chinajournal.net.cn>

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>