

文章编号: 1008-9926(2009)02-0152-04 中图分类号: R927. 2; 969. 1 文献标识码: A

## 高效液相色谱法研究人体内格列齐特片药动学和生物等效性

王晓波, 姚文, 李忠亮, 隋森, 宋晓楠, 袁荣刚

(解放军第 210 医院 国家药物临床研究机构 辽宁 大连 116021)

**摘要:**目的 研究健康人口服格列齐特片后的药动学和生物等效性。方法 19 个健康受试者采用随机分组自身交叉对照试验设计,口服格列齐特片 80mg 后用 HPLC 法测定血浆中格列齐特浓度,以 DAS 软件计算其药动学参数和评价生物等效性。结果 在选定的色谱条件下格列齐特与内标及血浆杂质分离良好,在 0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性良好。相对回收率 > 95.58%,日内和日间 RSD < 10.7%。格列齐特片受试制剂和参比制剂的主要药动学参数:  $T_{\text{max}}$  分别为 (1.85  $\pm$  0.49) h 和 (1.65  $\pm$  0.46) h,  $C_{\text{max}}$  分别为 (11.107  $\pm$  3.184)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 (11.439  $\pm$  3.388)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $t_{1/2}$  分别为 (1.63  $\pm$  0.28) h 和 (1.57  $\pm$  0.42) h;  $\text{AUC}_0-t$  分别为 (38.9  $\pm$  9.6)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 (37.4  $\pm$  10.4)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 用面积法 ( $\text{AUC}_0-t$ ) 估算的格列齐特片相对生物利用度为 (105.7  $\pm$  12.8) %。结论 用 HPLC 法测定血浆中格列齐特浓度,杂质无干扰,定量限低,重复性好,准确度高。受试的格列齐特片与参比的格列齐特片生物等效。

**关键词:**格列齐特片; HPLC; 药动学; 生物等效性

## Determination of Gliclazide Tablets in Human Plasma by HPLC: Application to Bioequivalence and Pharmacokinetics Study

WANG Xiao-Bo, YAO Wen, LI Zhong-Liang, SU IMiao, SONG Xiao-Nan, XI Rong-Gang

(State Agency of Drug Clinical Trials, The 210th Hospital of PLA, Dalian 116021, Liaoning China)

**ABSTRACT:** **Aim** To study the pharmacokinetics of gliclazide tablets in human plasma. **Methods** Nineteen volunteers were given the gliclazide tablets by oral administration with 2-way crossover design. The concentration of gliclazide in plasma was determined by HPLC and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS software. **Results** The calibration curve was linear in the range from 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The relative recovery exceeded 95.58%. The intra and inter-day RSD was less than 10.7%. The main pharmacokinetic parameters  $t_{1/2}$ ,  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{max}}$  and  $\text{AUC}_0-t$  for the test preparations were (1.63  $\pm$  0.28) h, (11.107  $\pm$  3.184)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (1.85  $\pm$  0.49) h and (38.9  $\pm$  9.6)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Those for the reference preparations were (1.57  $\pm$  0.42) h, (11.439  $\pm$  3.388)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (1.65  $\pm$  0.46) h and (37.4  $\pm$  10.4)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The relative bioavailability of the test preparations was (105.7  $\pm$  12.8) %. **Conclusion** The HPLC method for determination of gliclazide in plasma was proved to be sensitive accurate and convenient. The reference and test preparations are bioequivalent.

**KEY WORDS:** gliclazide tablets; HPLC; pharmacokinetic; bioequivalence

格列齐特是第二代磺脲类降血糖药,其机理是选择性地作用于胰岛  $\beta$  细胞,促进胰岛素分泌,并提高进食葡萄糖后的胰岛素释放,使肝糖生成和输出受到抑制,用于治疗非胰岛素依赖性糖尿病。为了研究河南京豫药业有限公司生产的格列齐特片的药动学特性和相对生物利用度,通过测定人血浆中格列齐特的浓度,并以市售同类药四川美大康药业股份有限公司生产的格列齐特片作对照,分析了 19 名健康志愿者分别口服两种制剂后格列齐特血药浓

度,比较格列齐特在两种制剂中的药动学特性,并对格列齐特片进行生物等效性评价,为临床用药提供参考依据。

### 1 材料与方法

**1.1 试药** 受试药格列齐特片(规格:80mg/片,河南京豫药业有限公司,批号:20061022);参比制剂格列齐特片(规格:80mg/片,四川美大康药业股份有限公司,批号:070201)。格列齐特对照品(申办单位

作者简介:王晓波(1961-),男,黑龙江五常人,博士,博士生导师,主任药师。研究方向:药理学。Tel: (0411) 85841066; E-mail: wxbbenson0653@sina.com

提供),格列吡嗪对照品(含量:99.0%,中国药品生物制品检定所,内标);乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸二氢钠、磷酸等试剂为分析纯。

**1.2 仪器** LC-10ATvp高效液相色谱仪、紫外检测器和SL-HTA自动进样器(SPD-10Avp)(日本岛津制作所);N2000色谱数据工作台软件(浙江大学智达信息工程有限公司)。

**1.3 受试者的选择** 19名(筛出1名无合法身份的受试者)男性健康受试者,年龄(20~29岁),平均(22.7±2.45)岁;身高(165~185)cm;体质量(54~80)kg,体质量指数(19~23),经体检证明肝、肾功能正常、心电图正常,均符合受试者入选要求。实验前两周及实验期间未服用其他任何药物。受试者试验前均签署知情同意书,试验期间统一饮食。本试验获解放军第210医院医学伦理委员会批准。

**1.4 试验方案** 采用双周期交叉试验设计,将19名受试者随机分成甲、乙两组(每组9或10名)。第1周期试验甲组服用格列齐特片(受试制剂)1片,乙组服用格列齐特片(参比制剂)1片;第2周期试验甲组服用格列齐特片(参比制剂)1片,乙组服用格列齐特片(受试制剂)1片,分别以250mL温开水吞服。两次试验间隔为1周。服药方法:禁食10h后清晨单次口服试验药品,按规定的剂量和方法服药。服药后4h和10h进食统一的清淡饮食。服药后受试者在室内休息,采血期间禁烟酒和含咖啡因类饮料,避免剧烈运动。

整个实验在医生监护下进行。于口服各药前0h和服药后1.0、2.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0h由前臂静脉采血5mL,并立即移入经肝素处理的试管中,离心10min(3500r/min),分离血浆,于-70℃冰箱中冷冻保存待测。

## 1.5 血药浓度测定方法

**1.5.1 样品处理** 精密量取血浆500μL,分别加入甲醇50μL、内标溶液(25μg·mL<sup>-1</sup>)50μL、乙腈500μL,涡旋混合2min,离心5min(15000r/min),取上清液20μL进样分析。

**1.5.2 标准曲线与最低检测浓度** 精密量取空白血浆500μL,加入格列齐特标准系列溶液50μL,制成血浆中格列齐特浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0μg·mL<sup>-1</sup>的血浆样品,按1.5.1项下同法操作,每一浓度进行双样本分析;以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权

最小二乘法<sup>[11]</sup>进行回归运算,求得的直线回归方程:

$$Y = 3.1019 \times 10^{-1} X - 2.21 \times 10^{-3}, r = 0.9990$$

格列齐特的线性范围为0.1~10.0μg·mL<sup>-1</sup>,定量下限为0.1μg·mL<sup>-1</sup>。

**1.5.3 回收率试验和精密度试验** 精密量取空白血浆500μL数份,加入格列齐特标准系列溶液50μL,使血浆中格列齐特浓度分别为0.2、2.0、8.0μg·mL<sup>-1</sup>,按1.5.1项下同法操作,分别计算方法回收率,提取回收率、日内RSD及日间RSD。结果见表1。

表1 精密度和方法回收率(聊±s,%)

Tab 1 Precision and recovery of the method(聊±s,%)

浓度 (μg·mL <sup>-1</sup> )	日内 RSD (n=6)	日间 RSD (n=3)	方法回收率 (n=6)	提取回收率 (n=3)
0.2127	7.5	7.1	103.53 ±1.38	81.3 ±4.9
1.8630	8.3	5.8	95.65 ±10.18	80.8 ±8.3
8.0499	7.2	10.7	95.58 ±5.78	84.4 ±5.4

**1.5.4 稳定性试验** 本试验考察了格列齐特低、中、高3种质量浓度0.2、2.0、8.0μg·mL<sup>-1</sup>的血浆样品处理前和处理后室温放置24h的RSD分别为2.7%、5.5%、4.3%和4.7%、12.0%、4.3%;经历3次冷冻解冻循环的RSD分别为8.9%、7.6%、5.1%;长期冷冻条件下30d的RSD分别为7.2%、13.4%、9.8%;储备液在4℃保存0、8、12d的RSD分别为1.8%、1.5%、1.4%。

上述结果表明,本文所建立的测定人血浆中格列齐特的分析方法符合有关规范<sup>[12]</sup>要求,可用于人体药物动力学及生物等效性试验。

**1.6 数据处理** 采用DAS2.0软件处理血药浓度-时间数据,计算各自的药动学参数,峰浓度(C<sub>max</sub>)、达峰时间(T<sub>max</sub>)用实测值表示,用梯形法计算曲线下面积(AUC)。对AUC<sub>0-12</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>及C<sub>max</sub>取对数后,进行方差分析和双单侧t检验,T<sub>max</sub>用非参数法分析,以考察2制剂的生物等效性。

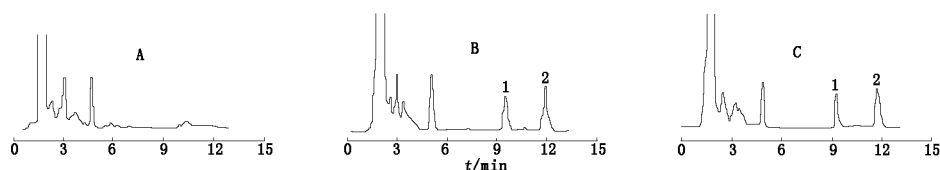
## 2 结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Diomonsil C<sub>18</sub>(200mm×4.6mm,5μm);预柱:C<sub>18</sub>保护柱;柱温:30℃;流动相:甲醇-0.01mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠缓冲液(1L溶液中加入1.0mL磷酸)(62:38,V/V);检测波长:229nm;流速:1.2mL/min。

**2.2 方法专属性** 分别精密量取6名受试者的空白血浆500μL,除不加内标外,按1.5.1项下同法操

作,进样分析,获得空白血浆样品的色谱图,如图 1A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作,得色谱图,如图 1B,其中格列齐特保留时间为 9.3min 左右,内标格列吡嗪的保留时

间为 11.7min 左右;取 1号健康受试者给药后 3.5h 采集的血浆样品,依同法操作,得色谱图,如图 1C。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物格列齐特及内标格列吡嗪的测定。



A 空白血浆 B 空白血浆 + 格列齐特 + 内标溶液 C 血浆样品 1 格列齐特 2 格列吡嗪

图 1 测定血浆中格列齐特及内标格列吡嗪的色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of gliclazide and glipizide in plasma

2.3 安全性评价 20名受试者如期完成试验,受试者服药后未见不良反应。

## 2.4 血药浓度与药动学参数

2.4.1 血药浓度-时间曲线见图 2。

2.4.2 药动学参数用 DAS 程序计算求得的受试者口服参比制剂和受试制剂的药动学参数见表 1。结果表明两种制剂中格列齐特的药动学参数基本相似。

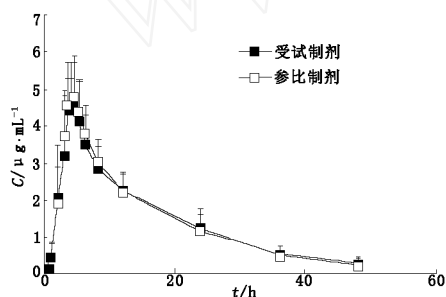


图 2 19名受试者分别口服受试和参比制剂后的平均药时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve after an oral dose of 80mg gliclazide to the tested tablet and reference tablet in 19 volunteers

表 1 19名受试者口服格列齐特片后的药动学参数(剂量:80mg)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of gliclazide following a single oral dose (80 mg) of two gliclazide formulations in 19 volunteers

参数	受试制剂	参比制剂
$C_{max}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	5.0 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 1.1
$T_{max}$ (h)	3.92 $\pm$ 0.65	4.18 $\pm$ 0.53
$t_{1/2}$ (h)	11.43 $\pm$ 3.20	10.57 $\pm$ 2.55
$AUC_{0-48}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	69.2 $\pm$ 11.4	70.8 $\pm$ 12.1
$AUC_0$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	74.2 $\pm$ 13.9	75.3 $\pm$ 13.9
F (%)	98.6 $\pm$ 14.4	

2.4.3 生物等效性评价 格列齐特片受试制剂和参比制剂中  $AUC_{0-48}$ 、 $AUC_0$  对数转换进行方差分析,并作双单侧  $t$  检验和 [1-2] 置信区间法进行生物等效性评价,两制剂间差异无统计学意义, [1-2] 置信区间分别为 92.1% ~ 103.6% 和 92.4% ~

105.1%。两制剂中格列齐特  $C_{max}$  方差分析,两制剂间差异无统计学意义, [1-2] 置信区间为 92.6% ~ 101.8%。 $T_{max}$  经非参数检验,两制剂间差异无统计学意义。

## 3 讨论

本试验采用高效液相-紫外检测方法进行测定。参照文献<sup>[3]</sup>,选用 229nm 作为检测波长,用甲醇-0.01mol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液 (1L 溶液中加入 1.0mL 磷酸) (62:38) 为流动相进行试验,结果表明,在此条件下待测物与内标物的分离度良好,内源性物质不干扰待测物与内标物的测定,可用于格列齐特片人体生物等效性的测定。

参考文献<sup>[3-5]</sup>,先后选用二氯甲烷以及乙醚作为提取溶剂,结果表明,内源性物质干扰待测物与内标物的测定。参考文献<sup>[6]</sup>,用乙腈沉淀血浆样品,内源性物质不干扰待测物与内标物的测定,结果表明,提取回收率较高,符合试验要求。

单剂量口服 80mg 格列齐特片后,经检测得到的药代动力学参数与文献报道基本一致<sup>[4,7,8]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 343
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 173
- [3] 李 芩, 张 斌, 郑 永, 等. 格列齐特胶囊人体药代动力学及相对生物利用度研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(3): 307
- [4] 刘史佳, 张 军, 居文政, 等. 格列齐特片在健康人体内的药代动力学及生物等效性研究 [J]. 中国药物与临床, 2006, 6(4): 279
- [5] 王振礼, 郭金习, 曹 丹, 等. RP-HPLC 测定格列齐特缓释片的血药浓度 [J]. 安徽中医学院学报, 2006, 25(5): 50

文章编号: 1008-9926(2009)02-0155-04 中图分类号: R965. 1; R965. 2 文献标识码: A

## 褐藻多糖铁对环磷酰胺致贫血小鼠的保护作用

陈国庆, 先宏, 丛建波, 王长振, 李妍, 吴可, 孙存普

(西南大学药学院 重庆 400715; 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所 北京 100850; 北京军区联勤部药品仪器检验所 北京 100071)

**摘要:**目的 验证褐藻多糖铁 (SPIC) 的补血效果。方法 腹腔注射环磷酰胺给小鼠造模, 造成其免疫缺陷贫血, 然后灌胃给药, 检查外周血象、血清铁和转铁蛋白浓度、粒系造血祖细胞集落 (CFU-GM) 和成纤维细胞集落 (CFU-F) 培养、T 淋巴细胞增殖率。结果 SPIC 高剂量组对外周血象的恢复、粒系造血祖细胞集落和成纤维细胞集落的形成以及 T 淋巴细胞的增殖, 都有很好的效果, 而且该组的血清铁和转铁蛋白含量也与市售多糖铁胶囊组相近。结论 SPIC 不但能够给机体补充铁, 而且还能发挥其配体褐藻多糖 (SP) 的免疫调节作用, 是一种具有多重作用的补血剂。

**关键词:**褐藻多糖铁; 褐藻多糖; SP; SPIC

## Protection of Seaweed Polysaccharides Iron Complex for Anaemic Mice Induced by Cyclophosphamide

CHEN Guo-Qing, XIAN Hong, CONG Jian-Bo, WANG Chang-Zhen, LI Yan, WU Ke, SUN Cun-Pu

(School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715 China)

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850 China)

(Institute for Drug Instrument Control of Beijing Command, Beijing 100071 China)

**ABSTRACT:** **Aim** To confirm the ability of Seaweed Polysaccharides Iron Complex to produce blood. **Methods** Cyclophosphamide was injected into the venter of mice to make them immunodeficient anaemic. Drugs were given orally and WBC, RBC, HGB and PLT, concentration of iron in the serum, CFU-GM, CFU-F and multiplication of lymphocyte T were detected. **Results** A high dose of SPIC had good effect on resumption of WBC, RBC, HGB and PLT, cultivation of CFU-GM and CFU-F and multiplication of lymphocyte T. Its concentration of iron and transference in the serum was close to the group given capsules. **Conclusion** SPIC can supplement organisms with iron and exert the effect of SP. It's a good hematic of double effect.

**KEY WORDS:** seaweed polysaccharides iron complex; seaweed polysaccharides; SP; SPIC

缺铁性贫血一直严重威胁着人类健康, 已经被 WHO 界定为全球四大营养性疾病之一。目前用来预防该疾病的药物不少, 但基本都属于单纯性的补铁, 而且还存在较明显的毒副作用, 并有使用人群的限制等。开发一种毒副作用小, 利用率高和疗效显著, 老少皆宜的新型补铁剂, 一直是世界范围内的科

研工作者不断追求的目标。褐藻多糖铁 (SPIC) 是本实验室研制的一种新型补铁剂, 它是通过将褐藻多糖 (SP) 与三价铁络合而形成的高分子络合物, 含铁量约为 20%。研究表明, 褐藻多糖具有增强细胞和体液免疫功能、抗凝血、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等多种生物活性<sup>[1-6]</sup>。当褐藻多糖铁作用于机体时,

[6] S. M. Foroutan, A. Zarghi, A. Shafaati, A. Khoddam, Application of monolithic column in quantification of gliclazide in human plasma by liquid chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 42: 513

[7] 王萍, 郭振波, 丁林鸿, 等. 国产格列齐特片 ( ) 在健康人体

内的药理学研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 13(3): 145

[8] 邱相君, 黄成珂, 钱昕, 等. 格列齐特的人体生物等效性研究 [J]. *医药导报*, 2006, 25(9): 874

(收稿日期: 2008-03-07; 修回日期: 2008-10-08)

(本文编辑 魏萍)