

HPLC-MS/MS法研究米格列奈片在健康人体内的药代动力学

刘婷立, 冯婉玉*, 顾玲玲, 刘洋, 黎巍

(中国医科大学附属第一医院临床药理教研室, 沈阳 110001)

摘要 目的: 研究米格列奈片的药代动力学。方法: 20名健康志愿者分别单剂量口服 5 mg和 10 mg 国产米格列奈片, 用 HPLC-MS/MS法测定血药浓度, 计算药代动力学参数。结果: 口服 5 mg和 10 mg 米格列奈片后的主要药代动力学参数: C_{max} 分别为 (570.20 ± 76.37) 和 $(899.75 \pm 133.67) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; t_{max} 分别为 (0.51 ± 0.13) 和 $(0.51 \pm 0.19) \text{ h}$; AUC_{0-6} 分别为 (753.82 ± 355.17) 和 $(1848.68 \pm 441.93) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (787.74 ± 383.46) 和 $(1957.65 \pm 507.04) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ 分别为 (1.91 ± 0.13) 和 $(1.35 \pm 0.26) \text{ h}$ 。结论: 本方法适用于米格列奈片临床药代动力学的研究。

关键词: 高效液相色谱串联质谱; 米格列奈; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0225-04

Pharmacokinetics study of miglitolide tablets in healthy volunteers by HPLC-MS/MS

LIU Ting-li, FENG Wan-yu*, GU Ling-ling, LIU Yang, LI Wei

(Clinical Pharmacology Laboratory The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To study pharmacokinetics of miglitolide tablets in healthy volunteers. **Methods** A single dose 5 mg and 10 mg miglitolide tablets was given to 20 healthy volunteers. The pharmacokinetics were measured. **Results** The main pharmacokinetic of 5 mg and 10 mg test tablets were as follow: C_{max} were (570.20 ± 76.37) and $(899.75 \pm 133.67) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; t_{max} were (0.51 ± 0.13) and $(0.51 \pm 0.19) \text{ h}$; AUC_{0-6} were (753.82 ± 355.17) and $(1848.68 \pm 441.93) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ were (787.74 ± 383.46) and $(1957.65 \pm 507.04) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ were (1.91 ± 0.13) and $(1.35 \pm 0.26) \text{ h}$. **Conclusion** The methodology to determine plasma concentration and pharmacokinetic profiles of miglitolide tablets by HPLC-MS/MS were reached.

Key words HPLC-MS/MS; miglitolide; pharmacokinetics

米格列奈 (miglitolide) 是格列脲类药物中一个新型的促胰岛素分泌药, 临床上主要用于治疗 2 型糖尿病^[1,2]。目前国内外有关 HPLC-MS/MS 法对米格列奈药代动力学的报道较少。为此, 本文建立了一种简单、灵敏、快捷、准确的 HPLC-MS/MS 方法, 对米格列奈片进行药代动力学研究。

1 试剂与仪器

米格列奈片由丹东市通远药业有限公司提供, 规格为 $5 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$, 批号 060722。米格列奈对照品由丹东市通远药业有限公司提供, 纯度 99.3%, 批号为 060703。内标那格列奈, 纯度 99.3%, 由沈阳药科大学药化教研室; 甲醇、醋酸铵为色谱纯, 乙醚为分析纯, 实验用水为重蒸馏水, 所有试剂都经过

$0.22 \mu\text{m}$ 过滤膜过滤。空白血浆, 由沈阳中心血站提供。

ACQUITY Ultra Performance LCTM 超高效液相色谱仪、Waters Quattro micro API 三重四极杆串联质谱仪、配备电喷雾离子源 (ESI 源) 以及 Masslynx 4.1 数据采集软件 (美国 Waters 公司); METTLER AE200 电子分析天平 (梅特勒-托利多公司); TDL-5B 型台式低速离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司); ABBOTT 型高速离心机 (美国雅培公司); HP8453 型紫外分光光度计 (美国惠普公司); CAY-1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂)。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 ($4.6 \text{ mm} \times$

* 通讯作者 Tel: (024) 83282155 E-mail: emulh_b@126.com

150 mm, 5 μ m) (大连依利特公司); 流动相: 5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵水溶液 - 甲醇 (35: 65 *v/v*); 流速: 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 质谱条件 离子源: ESI源; 检测方式: 正离子检测; 扫描方式: 多反应监测 (MRM) 方式, 定量分析时的离子反应分别为 m/z 316.2 $\rightarrow$ m/z 298.2 (米格列奈) 和 m/z 318.2 $\rightarrow$ m/z 166.0 (那格列奈, 内标物), 扫描时间为 0.10 s; 毛细管电压: 2.50 kV; 锥孔电压: 20 V; 去溶剂气: N₂; 去溶剂气温度: 350 $^{\circ}$ C; 源温度: 110 $^{\circ}$ C; 去溶剂气流速: 400 L $\cdot$ h⁻¹; 碰撞诱导解离 (CID) 电压分别为 10 eV 和 11 eV。

2.3 样品处理 精密吸取受试者血浆 200 μ L, 依次加入甲醇 50 μ L, 1080 ng $\cdot$ mL⁻¹ 那格列奈水溶液 (内标物) 50 μ L, 涡流 30 s, 加入 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 的盐酸 200 μ L, 涡流 30 s, 再加入乙醚 3 mL, 涡流 30 s, 振荡 10 min, 离心 10 min (3500 r $\cdot$ min⁻¹), 吸取有机层, 40 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干, 残渣用水 - 甲醇 (35: 65) 混合溶液 100 μ L 溶解, 涡流 30 s, 取上清液, 进样 10 μ L。

2.4 受试对象 20 名健康受试者 (男女各 10 人), 平均年龄分别为 (21.3 $\pm$ 0.8) 和 (22.4 $\pm$ 1.0) 岁, 体重分别为 (61.5 $\pm$ 5.89) 和 (57.4 $\pm$ 4.62) kg, 身高分别为 (171.7 $\pm$ 5.6) 和 (165.1 $\pm$ 3.8) cm。在试验

前, 受试者均经血尿常规、心电图、肝肾功能、血压检查, 各项指标均属正常。受试者在试验前 2 周和试验期间未服用其他任何药物, 实验期间禁烟、酒及含咖啡因等饮料。试验在 I 期临床试验室进行, 并观察药物不良反应情况。本研究经本院医学伦理委员会批准。签署知情同意书。

2.5 给药方案与血样采集 本研究为单剂量给药试验。20 名健康志愿者按照随机原则分为 2 组。禁食 12 h 后分别空腹服用受试制剂 5 mg 和 10 mg 用温开水 220 mL 送服。服药后 2 h 后统一饮水 220 mL, 4 h 统一进标准餐。在服药前 (0 h) 和服药后 0.083, 0.167, 0.25, 0.33, 0.417, 0.5, 0.583, 0.75, 1.5, 2, 3, 4, 6 h 取前臂静脉血 3~5 mL, 置于肝素化试管中, 5000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待测。

2.6 数据处理 数据经 3P97 程序处理, 并求算主要药代动力学参数。

3 结果

3.1 色谱 - 质谱行为 在选定的色谱条件下, 米格列奈与内标那格列奈峰形良好, 分离完全, 其保留时间分别为 1.00, 1.57 min 左右。色谱图见图 1, 质谱扫描图见图 2。

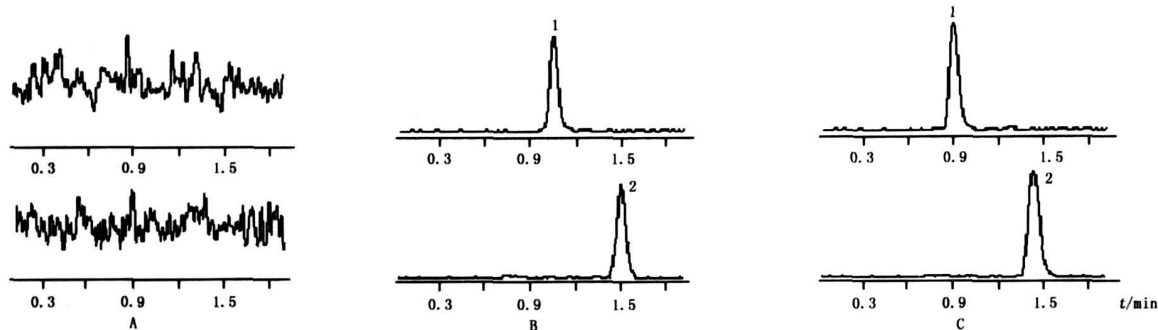


图 1 空白血浆(A)、空白血浆 + 米格列奈 + 那格列奈(B)、受试者口服 5 mg 米格列奈片 0.167 h 的血浆样品(C) 色谱图。

Fig 1 Chromatograms of blank plasma(A), blank plasma + mitiglinide + internal standard(B), a plasma sample from a healthy volunteer 0.167 h after an oral dose of 5 mg mitiglinide tablets(C)

1. 米格列奈(mitiglinide) 2. 内标(internal standard)

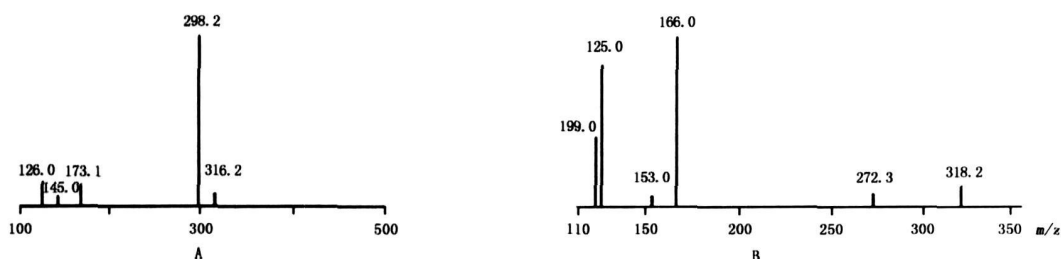


图 2 米格列奈(A)和内标(B)的质谱图

Fig 2 Product ion mass spectra of deprotonated ions obtained from mitiglinide(A) and the internal standard (B)

3.2 对照品溶液的配制 精密称取米格列奈对照品 10.8 mg 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品溶液, 浓度为 $108 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4°C 冰箱保存。

3.3 线性关系和最低定量浓度 取空白血浆 200 μL 加入米格列奈对照品溶液, 配制成浓度为 1.08, 5.4, 10.8, 54, 270, 1080, 3240, 5400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 按“样品处理”项下处理进样, 以米格列奈浓度 (X) 对米格列奈峰高与内标峰高的比值 (Y) 作图。用加权 ($W = 1/X^2$)^[3] 进行回归分析, 求得的直线回归方程:

$$Y = 4.9 \times 10^{-3} X + 5.4 \times 10^{-5} \quad r = 0.9972$$

最低定量浓度为 $1.08 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 提取回收率与精密度 空白血浆配制相当于米格列奈浓度为 2.16, 1080, 4320 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆对照品各 6 份, 连续测定 3 d 计算日内、日间变异。另取空白血浆 200 μL 除不加内标外按“样品处理”项下处理, 向获得的上清液中加入内标溶液和相应浓度的系列对照品溶液各 50 μL , 涡流混合, 40°C 氮气流下吹干, 残渣用水-甲醇 (35:65) 混合溶液 100 μL 溶解进样, 分别测其峰面积。两组峰面积进行比较, 计算米格列奈的提取回收率, 结果见表 1。

3.5 稳定性考察 配制浓度分别为 2.16, 1080, 4320 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 置 -20°C 冰箱保存, 用以考察血浆样品 21 d 内的稳定性, 结果见表 2。

3.6 药动学测定结果 20 名受试者分别单剂量口服 5 mg 和 10 mg 受试制剂后的平均药物浓度-时间

表 1 提取回收率及精密度 ($\text{mean} \pm \text{SD}$)

Tab 1 Extraction recovery and precision of methocarbamol in serum

$C / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%		提取回收率 (extraction recovery) /%	RSD /%
	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)		
2.16	5.2	14.1	75.8 ± 3.5	4.6
1080	4.0	11.6	83.7 ± 0.7	0.8
4320	5.0	11.4	83.2 ± 0.6	0.7

表 2 21 d 稳定性 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 2 The results of stabilization

$C / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	时间 (time) / d			
	1	2	3	21
2.16	2.332 ± 0.15	2.156 ± 0.15	1.81 ± 0.86	2.054 ± 0.18
1080	1053.2 ± 38.32	1060.6 ± 41.85	910.57 ± 429.43	1169.6 ± 33.28
4320	4012 ± 183.91	4058.6 ± 255.37	3446.57 ± 1591.17	4556.4 ± 255.13

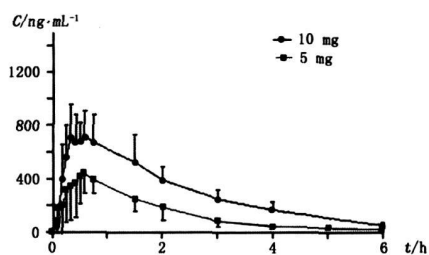


图 3 20 名受试者单剂量口服 5 mg 和 10 mg 受试制剂后的平均药物浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of miglitolide following 10 mg and 5 mg single doses in healthy volunteers

间曲线如图 3 主要药动学参数及不同性别受试者药代动力学参数比较见表 3。

表 3 20 名受试者单剂量口服米格列奈片后的主要药代动力学参数 ($\text{mean} \pm \text{SD}$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of 20 healthy volunteers after oral administration of miglitolide tablets

参数 (parameters)	剂量 (dose) / mg	男性 (male)	女性 (female)	总体 (all)
$t_{\text{max}} / \text{h}$	5	0.57 ± 0.12	0.45 ± 0.13	0.51 ± 0.13
	10	0.53 ± 0.21	0.48 ± 0.18	0.51 ± 0.19
$C_{\text{max}} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	5	531.93 ± 48.15	608.47 ± 84.53	570.20 ± 76.37
	10	829.97 ± 123.23	969.53 ± 113.34	899.75 ± 133.67
$\text{AU}_{0-6} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	5	753.82 ± 355.17	924.69 ± 270.09	839.25 ± 110.80
	10	1675.34 ± 407.98	2022.03 ± 444.82	1848.68 ± 441.93
$\text{AU}_{0-\infty} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	5	787.74 ± 383.46	956.23 ± 281.83	871.98 ± 29.46
	10	1748.63 ± 455.54	2166.66 ± 511.58	1957.65 ± 507.04
$t_{1/2} / \text{h}$	5	1.21 ± 0.17	1.18 ± 0.08	1.19 ± 0.13
	10	1.23 ± 0.11	1.48 ± 0.32	1.35 ± 0.26
$\text{MRT}_{0-t} / \text{h}$	5	1.63 ± 0.23	1.55 ± 0.09	1.59 ± 0.93
	10	1.77 ± 0.11	2.04 ± 0.29	1.90 ± 0.20
$\text{MRT}_{0-\infty} / \text{h}$	5	1.86 ± 0.36	1.75 ± 0.14	1.80 ± 0.26
	10	2.01 ± 0.19	2.44 ± 0.03	2.22 ± 0.32
$\text{CL} / \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	5	125.98 ± 52.28	98.32 ± 47.40	112.15 ± 49.25
	10	100.04 ± 23.40	80.44 ± 0.18	90.24 ± 22.60
V_d / L	5	12.86 ± 5.20	10.00 ± 4.75	11.43 ± 0.17
	10	10.51 ± 2.00	10.08 ± 2.08	10.30 ± 1.94

4 讨论

国外关于米格列奈血药浓度的测定方法有采用 LC-MS^[4]法和 LC-UV 法^[5]。由于米格列奈的人体血药浓度仅为纳克级别,一般的高效液相色谱法难以准确测定,故本研究在 LC-MS 法基础上建立了 HPLC-MS/MS 法。该方法简便,灵敏、精密度高,最低定量浓度仅为 $1.08 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 低于文献 [4] 报道的结果,确保了测定血浆中的微量米格列奈片浓度的准确性和可靠性,满足生物样品分析要求,适合大批量血浆样品的分析,适用于米格列奈的人体药代动力学研究。

血浆样品前处理,国外文献曾采用己烷-异丙醇 (80:20)^[4]提取,此法预处理复杂,本研究选用乙醚为提取剂,提取率高,特异性好,操作简单,精密度符合要求,适用于米格列奈生物制品的测定。

本试验要求健康受试者在禁食 12 h 后口服米格列奈片。因此,为防止受试者出现低血糖现象,口服 5、10 mg 米格列奈片的受试者在给药后 0.1、2 h 分别统一饮用葡萄糖溶液 40 g/200 mL 和葡萄糖溶液 80 g/400 mL,在给药后 2 h 时监测受试者的血压、心率,检测受试者的血糖。并准备了葡萄糖溶液等抢救药物,以便在发生药物不良应时,可立即采取相应治疗措施。

受试者口服米格列奈片后的药代动力学参数 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 与文献 [4] 报道结果相似。本研究的 t_{max} 为 0.51 h 和 $t_{1/2}$ 为 1.19 h 说明药物口服吸收快,体内消除也快,对于糖尿病患者而言,通常是在餐后出现血糖高峰,故临床上米格列奈作为餐前服药,通常在餐前 15 min 内服药。由该药的药代动力学性质可见,药物快速吸收,达峰时间短,从而促进餐后的

胰岛素释放,快速发挥降血糖作用;药物的半衰期短,在体内快速消除,故不易引起低血糖反应。由于受试者体重存在差异,血浆中峰浓度有一定的差别,提示为保证病人用药安全,在临床应用中,要尽可能做到个体化用药。

采用方差分析法对单次给药 5 mg 和 10 mg 的健康受试者主要药代动力学参数分别进行检验分析,结果表明,两剂量健康受试者的米格列奈体内过程相近,主要药代动力学参数 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 基本一致 ($P > 0.05$)。男性和女性健康受试者的主要药代动力学参数也均无显著差异 ($P > 0.05$),在临床用药时,可无需考虑性别因素。

参考文献

- 1 Reinann F, Proks P, Ashcroft FM. Effects of mitiglinide (S 21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel *Br J Pharmacol* 2001, 132: 1542
- 2 Sunaga Y, Gono T, Shibasaki T, et al. The effects of mitiglinide KAD-1229, a new anti-diabetic drug, on ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: comparison with the sulfonylureas and nateglinide *Eur J Pharmacol* 2001, 431: 119
- 3 ZHONG Da-fang (钟大放). Some aspects in establishing standard curves in bioanalyses with the weighted least squares method (以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线若干问题). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16: 343
- 4 LIANG Jia-bi, TIAN Yuan-High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry determination of mitiglinide in human plasma and its pharmacokinetics *J Mass Spectrom*, 2007, 42: 171
- 5 YU Lu-shan, ZENG Su. Determination of mitiglinide in rat plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B*, 2006, 834: 20

(本文于 2007 年 12 月 19 日收到)