

离子对反相高效液相色谱法测定人血浆中盐酸二甲双胍含量

张倩, 唐星

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立测定人血浆中盐酸二甲双胍含量的离子对反相高效液相色谱法。**方法** 血浆样品用乙腈沉淀蛋白, 上清液用二氯甲烷萃取其中的乙腈, 浓缩后的上清液直接进样测定。色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱; 流动相为甲醇-0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵 (体积比 35 : 65, 含庚烷磺酸钠 0.01 mol·L⁻¹); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 233 nm。**结果** 盐酸二甲双胍质量浓度在 0.02 ~ 4.00 mg·L⁻¹ 内线性关系良好 ($r=0.9968$), 日内、日间 RSD 分别 6.3% 和 12.1%, 方法的回收率在 92.4% ~ 95.0% 之间。**结论** 方法适用于盐酸二甲双胍的血药浓度测定及药代动力学研究。

关键词: 药剂学; 血药浓度测定; 离子对反相高效液相色谱法; 盐酸二甲双胍

中图分类号: R 963

文献标识码: A

盐酸二甲双胍 (1,1-二甲基双胍盐酸盐, metformin hydrochloride) 是双胍类口服降糖药, 它的降血糖作用肯定、明显, 不引起低血糖, 且可明显降低餐后高血糖, 适合 2 型糖尿病患者, 在欧洲及加拿大等国家被广泛应用已有 30 多年。由于盐酸二甲双胍的极性和水溶性较大, 因此对血样中盐酸二甲双胍进行提取和定量分析依然比较困难^[1]。作者建立了一新的离子对反相高效液相色谱法, 测定了血浆中盐酸二甲双胍的浓度。

1 仪器与试剂

Jasco PU—980 高效液相色谱仪 (配 Jasco UV—975 紫外可见检测器, 江申色谱工作站, 日本分光公司), YKH— 涡旋混合器 (江西医疗器械厂), 80—2 离心沉淀机 (上海手术器械厂)。盐酸二甲双胍对照品 (广州贝氏药业有限公司提供, 含量 99.6%), 盐酸二甲双胍片 (格华止, 中美上海施贵宝制药有限公司, 批号: 0207068, 500 mg/片), 盐酸二甲双胍缓释胶囊 (本实验室自制, 批号: 20030301, 250 mg/粒), 人空白血浆 (沈阳军区总医院血库提供), 乙腈、甲醇为色谱纯 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂), 其余试剂均为分析纯 (沈阳化学试剂厂)。

2 方法与结果

色谱条件为色谱柱 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 迪马公司产品; 流动相为甲

收稿日期: 2003-09-05

作者简介: 张倩 (1972 -), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 在读硕士; 唐星 (1964 -), 男 (汉族), 陕西商县人, 副教授, 博士硕士生导师, 主要从事药剂学及中药现代化研究, Tel: (024) 23843711-3923, E-mail: tangpharm@sina.com。

醇-0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵 (体积比 35 : 65, 含庚烷磺酸钠 0.01 mol·L⁻¹); 柱温为室温; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 233 nm; 灵敏度 0.01 AUFS; 进样量 20 μL。

2.1 对照品系列溶液配制

精密称取盐酸二甲双胍对照品 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加重蒸馏水溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 200 mg·L⁻¹ 的盐酸二甲双胍对照品的储备液。再分别精密吸取对照品储备液 0.5、0.5、1.0、2.5、5.0、5.0 mL, 分别置于 100、50、50、50、25、10 mL 量瓶中, 用重蒸馏水定容, 配成质量浓度为 1.0、2.0、4.0、10.0、40.0、100.0 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。

2.2 血浆样品处理与专属性考察

精密吸取血浆样品 1.0 mL, 置于 10 mL 具塞塑料试管中, 依次加入重蒸馏水 20 μL, 乙腈 3.0 mL, 旋涡混合 3 min, 离心 (3 000 r·min⁻¹) 10 min。精密吸取上清液 3.0 mL, 加入二氯甲烷 3.0 mL, 旋涡混合 3 min, 离心 (3 000 r·min⁻¹) 10 min。取上清液 20 μL 进样, 记录色谱图。在此条件下, 血浆中的杂质不干扰样品的测定, 盐酸二甲双胍的保留时间约为 7.0 min, 色谱图见图 1。

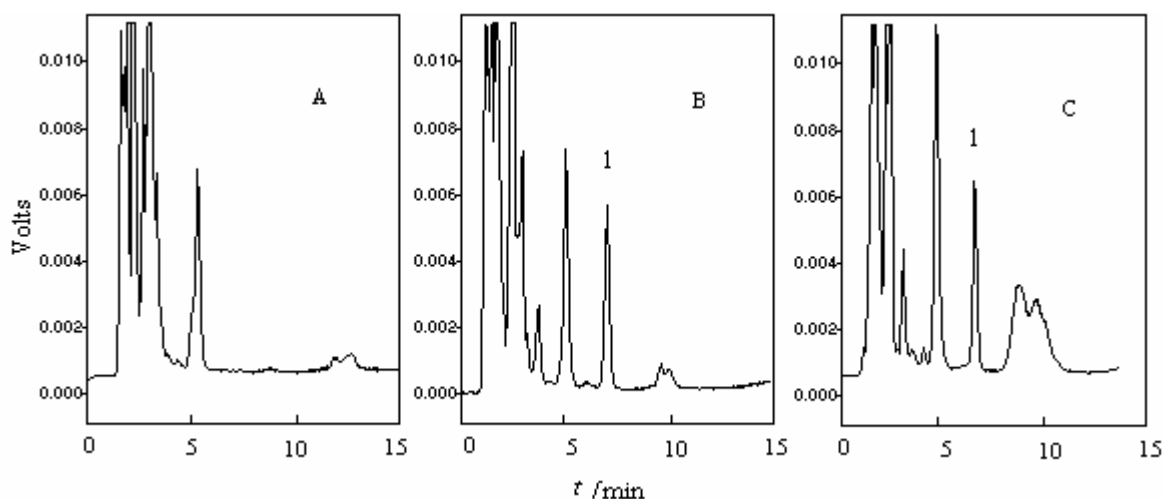


Fig. 1 Chromatogram of metformin hydrochloride

A - Blank plasma ; B - Blank plasma with metformin hydrochloride ; C - Plasma sample ;

1 - Metformin hydrochloride

2.3 标准曲线制备

精密量取空白血浆 1.0 mL, 置于 10 mL 具塞塑料试管中, 分别加入盐酸二甲双胍对照品系列溶液 20 μL, 配制成相当于质量浓度为 0.02、0.04、0.08、0.20、0.80、2.00、4.00 mg·L⁻¹ 的血浆样品, 按“2.2”条操作, 进样 20 μL, 进行 HPLC 测定。以样品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得回归方程为 $Y = 14\,286.3X + 923.7$, $r = 0.996\,8$ 。提示盐酸二甲双胍的质量浓度在 0.02 ~ 4.00 mg·L⁻¹ 内有良好的线性。信噪比 = 3 时最低检测浓度为 0.01 mg·L⁻¹。

2.4 提取回收率试验

取空白血浆 1.0 mL, 按“2.3”条方法配成低、中、高 3 个质量浓度 (分别为 0.02、0.20、4.00 mg·L⁻¹) 的质量控制 (QC) 样品, 记录色谱图中盐酸二甲双胍的峰面积, 与经过体积折算后的盐酸二甲双胍

水溶液样品所得的峰面积进行比较,求得提取回收率,结果见表1。

Table 1 Recoveries of the extract ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Concentration / (mg·L ⁻¹)	Extract recovery / %	RSD / %
0.02	69.1 ± 6.7	9.7
0.20	69.0 ± 5.7	8.2
4.00	68.5 ± 2.9	4.2

2.5 方法回收率与精密度试验

取“2.4”条QC样品,每个浓度5份,依法测定。重复5个分析批,并与标准曲线同时进行测定,以当日的标准曲线计算QC样品浓度,求得方法的回收率和日内、日间精密度,结果见表2。

Table 2 Precisions and recoveries of the method ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Added / (mg·L ⁻¹)	Within-day			Between-day		
	Found / (mg·L ⁻¹)	Recovery / %	RSD / %	Found / (mg·L ⁻¹)	Recovery / %	RSD / %
0.02	0.018 ± 0.001	92.4 ± 5.0	5.4	0.017 ± 0.002	86.6 ± 10.5	12.1
0.20	0.193 ± 0.011	95.0 ± 5.9	6.3	0.181 ± 0.019	90.3 ± 9.6	10.6
4.00	3.774 ± 0.160	94.4 ± 4.0	4.2	3.781 ± 0.243	94.5 ± 6.1	6.4

2.6 血药浓度测定

健康志愿者采用交叉自身对照实验方案,口服盐酸二甲双胍片2片和盐酸二甲双胍缓释胶囊4粒(均相当于盐酸二甲双胍1000mg),服药后于第0、0.5、1、2、3、4、6、8、12、16、24h采静脉血5mL,分离血浆,血浆按“2.2”条操作,测定盐酸二甲双胍浓度,并绘制药-时曲线,见图2。

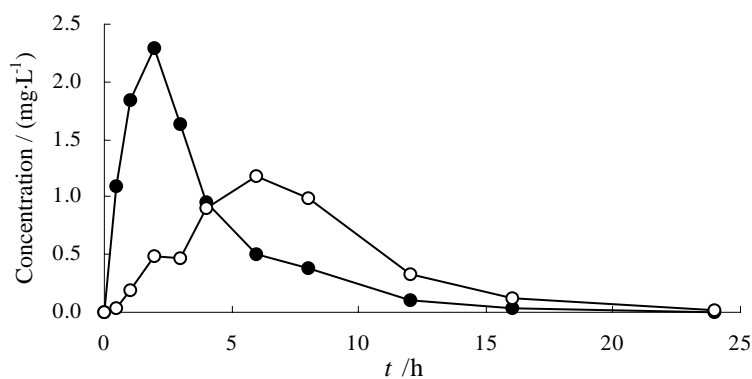


Fig.2 Plasma concentration-time curves of metformin hydrochloride after a single oral administration of 1000 mg metformin hydrochloride tablets and metformin hydrochloride sustained-release capsules

— Metformin hydrochloride tablets ; ○— Metformin hydrochloride sustained-release capsules

将受试者血药浓度-时间数据采用3P97程序拟合,据AIC最小准则,以及参考值与理论值的相关系数(R^2)等指标选择模型。结果表明,口服盐酸二甲双胍片的药-时数据符合一室药代动力学模

型，与文献报道一致^[2-5]。而且服药 24 h 后，仍可准确地测出药物的浓度，完全适用于盐酸二甲双胍的药代动力研究。

3 讨论

盐酸二甲双胍因其水溶性高、极性大，故很难被有机溶剂提取，国外文献报道的是采用固相萃取的方法进行提取^[1,2]，操作非常繁琐费时；在国内的文献报道中通常采用离子对萃取的方法^[4,5]，用十二烷基磺酸钠与血样中的盐酸二甲双胍形成离子对，然后用乙酸乙酯-正丁醇混合液提取，操作复杂且影响萃取效率的因素较多，还有的国内文献报道采用加入 3~4 倍量甲醇或乙腈沉淀蛋白后取上清液直接进样测定的方法^[5,6]，这种方法虽然简单方便，但由于对血样进行了稀释，故检测灵敏度较低。而作者实验采用乙腈沉淀蛋白，再以二氯甲烷萃取乙腈，从而使含有盐酸二甲双胍的上清液得以浓缩，提高了检测的灵敏度。

在本实验条件下，盐酸二甲双胍在 7.0 min 出峰，适用于体内分析，与内源性物质能很好的分离。而且用本方法成功的进行了盐酸二甲双胍片和盐酸二甲双胍缓释胶囊的体内血药浓度测定，结果表明样品处理简单、灵敏度高，完全适用于盐酸二甲双胍的药代动力学研究。

参考文献：

- [1] Caille G, Lacasse Y, Raymond M, *et al.* Bioavailability of metformin in tablet form using a new high pressure liquid chromatography assay method[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 1993, 14: 257.
- [2] Gusler G, Gorsline J, Levy G, *et al.* Pharmacokinetics of metformin gastric-retentive tablets in healthy volunteers[J]. *J Clin Pharmacol*, 2001, 41: 655-661.
- [3] Wang P, Ding LH, Guo ZB. Relative bioavailability and pharmacokinetics of metformin hydrochloride enteric dissolving tablets by HPLC[J]. *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2002, 22(11): 664-665.
- [4] Liu J, Shen ZF, Xie MZ. Relative bioavailability and pharmacokinetics of metformin hydrochloride enteric-soluble capsule or tablets by HPLC[J]. *Chin J Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 1994, 10(3): 165-170.
- [5] He HX, Han M, Huang P, *et al.* Study on bioequivalence of domestic metformin hydrochloride tablets[J]. *China Pharmacy (中国药房)*, 2002, 13(11): 669-671.
- [6] Fan LY, Chou YC, Tang Z. Pharmacokinetics and relative bioavailability of metformin hydrochloride capsules[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui (安徽医科大学学报)*, 1999, 34(4): 268-270.

Determination of the content of metformin hydrochloride in the human plasma by ion-paired reversed-phase HPLC

ZHANG Qian, TANG Xing

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish an IP-RPHPLC method for the determination of the drug level of metformin hydrochloride in the human plasma. **Method** Plasma was precipitated with acetonitrile and the acetonitrile in the supernatant was extracted with dichloromethane, after centrifugation, a 20 μL of the remained supernatant was injected into HPLC. A DiamonsilTM C₁₈ column was used. The mobile phase consisted of methanol and 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ (35 : 65, V : V) with 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium octanesulfonate (contained). The flow rate was 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, and the UV detector was set at 233 nm. **Results** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.02 ~ 4.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.9968$). The within-day and between-day RSD were within 6.3% and 12.1%, respectively. The recoveries of the method were within 92.4% ~ 95.0%. **Conclusions** The method is simple, reliable and suitable for the determination of metformin hydrochloride in human plasma and the study of its pharmacokinetics.

Key words: pharmaceuticals; plasma concentration; IP-RPHPLC; metformin hydrochloride