

文章编号:1000-582X(2009)02-0223-04

# 比格犬血浆中低浓度 $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ 的 HPLC 测定方法

皮喜田<sup>a,b</sup>, 刘洪英<sup>a,b</sup>, 肖 霄<sup>a</sup>, 彭承琳<sup>a</sup>, 郑小林<sup>a,b</sup>

(重庆大学 a. 生物工程学院; b. 微系统研究中心, 重庆 400030)

**摘要:**建立比格犬血浆中低浓度盐酸二甲双胍高效液相色谱测定方法,用于研究盐酸二甲双胍在消化道各部位的吸收情况。采用高效液相色谱法,以 dikma Diamonsil C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱为分析柱,乙腈-10.0 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(含 7.5 mmol/L 十二烷基磺酸钠, pH 为 5.5)(32:68)为流动相,柱温:30 °C,检测波长:235 nm,流速:1.0 mL/min,内标法检测。结果表明,盐酸二甲双胍与内标分离良好,回归方程  $Y = 0.6868X + (-0.0222)$   $r = 0.9995$ ,线性范围 0.05~4.0 μg/mL。方法回收率在 99.78%~107.90%,批内 RSD ≤ 3.85%,批间 RSD ≤ 5.63%。

**关键词:**高效液相色谱;盐酸二甲双胍;比格犬;血药浓度;遥控释药胶囊

中图分类号:R917

文献标志码:A

## High performance liquid chromatography determination of low concentration metformin hydrochloride in beagle dog's plasma

PI Xi-tian<sup>a,b</sup>, LIU Hong-ying<sup>a,b</sup>, XIAO Xiao<sup>a</sup>, PENG Cheng-lin<sup>a</sup>, ZHENG Xiao-lin<sup>a,b</sup>

(a. College of Bioengineering; b. Microsystems Research Center, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

**Abstract:** Our objective is to develop a method to quantify low-concentration metformin hydrochloride in beagle dog plasma using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). HPLC is conducted on a Dikma Diamonsil C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-10.0 mmol/L sodium dihydrogen phosphate (7.5 mmol/L SDS, pH 5.5)(32:68) as a mobile phase, column temperature 30 °C, detection wavelength 235 nm, and flow rate 1.0 mL/min. The internal standard method is used. The results show that the identified characteristics of metformin hydrochloride and the internal standard are distinct. The regression equation is  $Y = 0.6868X + (-0.0222)$   $r = 0.9995$  and the linear range is 0.05~4.0 μg/L. The recovery rates are within 99.78%~107.90%. The intra-precision RSD is less than 3.85%, and the inter-precision is less than 5.63%. The developed method is sensitive, accurate, rapid and simple, and can be adopted to determine low-concentration metformin hydrochloride in beagle dog plasma and in pharmacokinetic study.

**Key words:** high performance liquid chromatography; metformin hydrochloride; beagle dog; plasma concentration; remote controlled capsule

收稿日期:2008-11-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700160);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2006BA5005);中国博士后科学基金资助项目(20070420718)

作者简介:皮喜田(1976-),男,重庆大学副教授,博士,主要从事药物局部吸收研究,(Tel)023-65111931;

(E-mail)pixitian@cqu.edu.cn

欢迎访问重庆大学期刊网 <http://qks.cqu.edu.cn>

盐酸二甲双胍( $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ )是临床常用的口服降糖药,该药可以提高组织对糖的摄取,降低肝糖元异生,从而产生降低血糖的作用。为了考察盐酸二甲双胍在消化道不同部位的吸收情况,为缓释剂、滞留剂等剂型的开发提供依据,笔者采用重庆大学研制的消化道遥控释药胶囊(Remote Controlled Capsule, RCC)<sup>[1-7]</sup>在比格犬消化道的不同部位进行盐酸二甲双胍的定点释放试验,并进行血药浓度的检测。由于SSDC药仓的容积限制,一次只能装载盐酸二甲双胍约200 mg,故在检测血药浓度时,须建立一种灵敏性好,精确度高的比格犬血浆盐酸二甲双胍血药浓度检测方法。试验在综合相关文献<sup>[8-15]</sup>的基础上,建立了一种比格犬血浆盐酸二甲双胍高效液相色谱测定方法。

## 1 仪器与试剂

色谱系统:岛津高效液相色谱系统,包括LC20AB二元泵、CTO-10AS柱温箱、SPD-M200A检测器、LCsolution工作站(ver1.21);盐酸二甲双胍对照品(山东科源制药有限公司,批号:0701-076);内标:阿替洛尔(中国药品生物制品检定所,批号:10117-9903);乙腈、甲醇:色谱纯(天津四友精细化工有限公司);二氯甲烷:分析纯(成都化学试剂厂);磷酸二氢钠:分析纯(重庆北碚化学试剂厂);十二烷基磺酸钠(SDS):分析纯(上海化学试剂厂);空白比格犬血浆(自备)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱:dikma Diamonsil C18(150×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-10.0 mmol/L磷酸二氢钠水溶液(含7.5 mmol/L十二烷基磺酸钠,pH为5.5)(32:68);流速:1 mL/min;检测波长:235 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C;进样量:20  $\mu$ L。

### 2.2 盐酸二甲双胍贮备液制备

精密称取盐酸二甲双胍8 mg于容量瓶,用去离子水溶解,定容至100 mL,制备成浓度为80  $\mu$ g/mL, -20  $^{\circ}$ C冰箱保存。

### 2.3 内标阿替洛尔贮备液制备

称取12.5 mg阿替洛尔于容量瓶,用去离子水溶解,定容至25 mL,制成浓度为500  $\mu$ g/mL的溶液,在-20  $^{\circ}$ C冰箱保存。

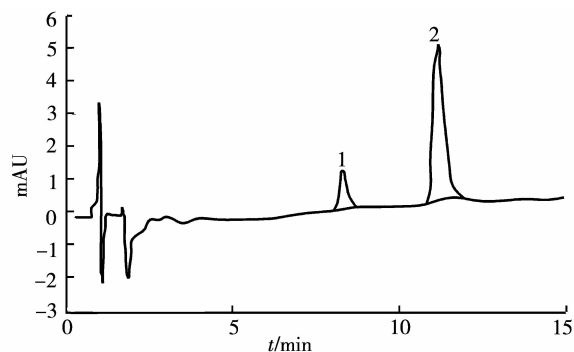
### 2.4 血样处理

精密量取含药血浆400  $\mu$ L,加入500  $\mu$ g/mL阿替洛尔溶液50  $\mu$ L、乙腈600  $\mu$ L,涡旋充分混合后,以6000 r/min转速离心10 min,取上清液,加二氯甲烷600  $\mu$ L,涡旋充分混合后,以6000 r/min转速离心10 min,取上清液进样。

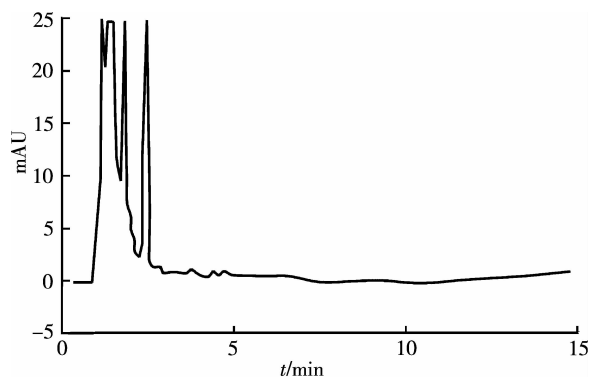
## 3 结果

### 3.1 色谱行为

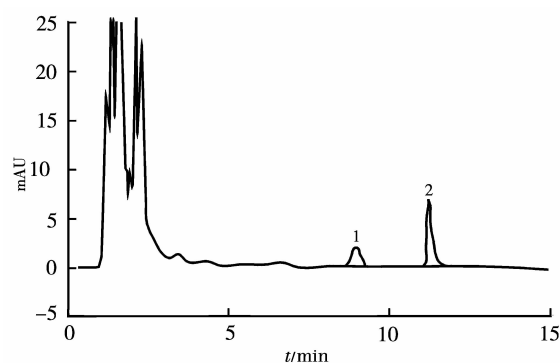
如图1所示,在上述色谱条件下,内标阿替洛尔和盐酸二甲双胍的保留时间分别为8.5 min和11.5 min。空白血浆对应处基线波动小,无杂峰出现,与杂质良好分离。



(a) 盐酸二甲双胍+阿替洛尔水溶液



(b) 空白血浆



(c) 空白血浆+盐酸二甲双胍+阿替洛尔

图1 色谱图

### 3.2 线性关系试验

用空白血浆和标准贮备液分别配置成0.05、0.065、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0  $\mu$ g/mL盐酸二甲双胍血浆溶液,然后按照上述血样处理方法处理后进样检测。以样品峰面积与内标峰面积之比(Y)对浓度(X)进行回归,计算得出回归方程为 $Y = 0.6868X + (-0.0222)$   $r = 0.9995$ ,说明在0.05~

4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围线性关系良好。标准曲线如图 2 所示。

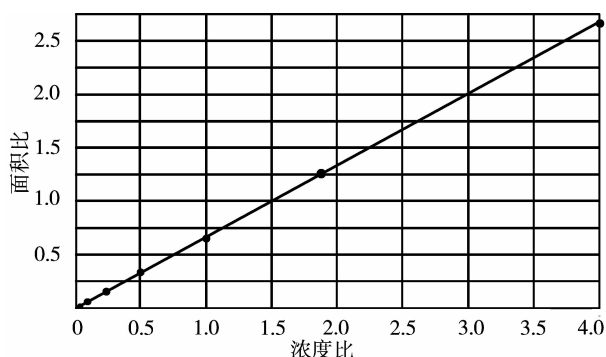


图2 标准曲线

### 3.3 回收率试验

用比格犬空白血浆和标准贮备液分别制备浓度为 0.05、1.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 种样品,按“2.4”方法处理,同时用相应的药物对照品溶液作为标准管,以经过处理后样品的药物峰面积与标准管峰面积之比考察绝对回收率;以血浆样品峰面积代入回归方程计算,得到的药物浓度与理论浓度之比考察方法回收率,结果见表 1。

表1 回收率结果 ( $n=5$ )

名称	加入量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	标准差/%
绝对回收率	0.05	90.93 $\pm$ 4.47	5.07
	1.00	99.34 $\pm$ 4.21	4.55
	4.00	97.45 $\pm$ 2.37	2.36
方法回收率	0.05	107.90 $\pm$ 3.10	1.94
	1.00	101.76 $\pm$ 2.86	1.95
	4.00	99.78 $\pm$ 2.38	1.59

### 3.4 精密度试验

制备 0.05、1.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 种浓度血样。在 1 d 内的不同时间,将样品按照制备标准曲线的方法处理、测定后,得到批内精密度;在连续的 5 d 内每天将样品按照制备标准曲线的方法处理、测定后,得到批间精密度,结果见表 2。

表2 批内、批间精密度结果 ( $n=5$ )

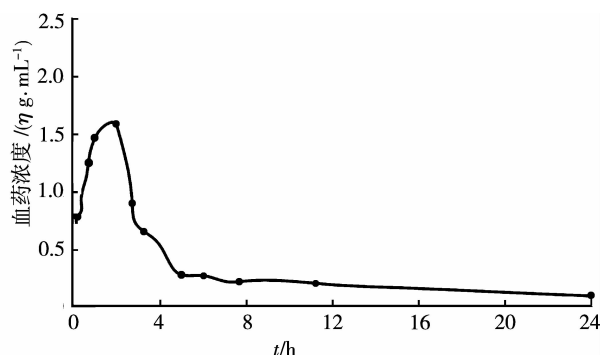
名称	加入量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测得量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	标准差/%
批内精密度	0.05	0.0517 $\pm$ 0.0014	1.79
	1.00	0.9711 $\pm$ 0.0277	2.53
	4.00	4.2278 $\pm$ 0.2510	3.85
批间精密度	0.05	0.0505 $\pm$ 0.0017	2.52
	1.00	0.9666 $\pm$ 0.0277	2.27
	4.00	4.1036 $\pm$ 0.3533	5.63

### 3.5 稳定性试验

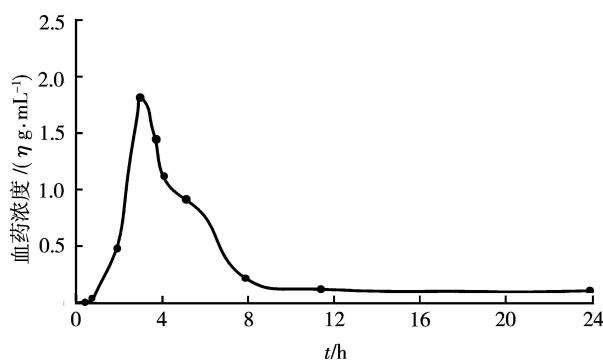
将 0.05、1.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度含药血样各 5 份分别放置在室温和冻融条件下,然后按照“2.4”方法处理后测定,以考察样品的放置稳定性。结果在室温下,低、中、高 3 种浓度的样品可稳定保存 6 h。冻融条件下,低浓度血浆样品在 15 d 内含量没有下降;中、高浓度血浆样品在 10 d 内含量没有下降,12 d 测定,分解超过 10%。内标放置稳定性:阿替洛尔储备液在室温不稳定,只能保存约 4 h,在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冻存环境下放置 15 d 仍然稳定。

## 4 实际应用

使用消化道定点施药系统,在成年健康比格犬胃部定点释放盐酸二甲双胍 200 mg,然后在 24 h 内按照上述方法测定其血浆中盐酸二甲双胍浓度。测定完成 10 d 后,在同一只比格犬的小肠进行同样一次药物定点释放,随后在 24 h 内测定其血药浓度,结果见图 3。



(a) 在胃部释放药物



(b) 在小肠释放药物

图3 比格犬释放盐酸二甲双胍后的血药浓度-时间曲线

## 5 讨论

### 5.1 色谱柱的选择

考察 Waters 和 dikma 的色谱柱,通过不同配比流动相试验后,采用的是 dikma Diamonsil C18 柱,

效果较好,且成本相对低廉。试验中发现,当连续进样数个之后,色谱柱柱压明显上升,影响出峰时间。清洗二元泵泵头和色谱柱柱头后,压力恢复正常。可能是狗血浆中杂质较多,按照“2.4”方法处理后,仍有杂质在二元泵泵头和色谱柱柱头的滤网堆积,使柱压升高。

## 5.2 流动相的选择

曾使用过文献[12]报道的流动相,效果不是很理想,可能是仪器及色谱柱等差异所致。经过反复尝试不同配比流动相,最终确立乙腈-磷酸二氢钠-SDS 方案及其配比。

## 5.3 实际应用的效果

通过消化道定点释放药丸在比格犬的胃部和小肠释药后得到的血药浓度-时间曲线来看,可以达到检测低浓度血药浓度的目的。

上述方法灵敏性好,精确度高,操作简单快速,成本低廉,适用于比格犬血浆中低浓度盐酸二甲双胍测定及药代动力学研究,此方法的建立为使用SSDC 进行一些新剂型的开发、验证提供了测定方法。

## 参考文献:

[1] 皮喜田,彭承琳,郑小林,等.用于人体药物吸收研究的定点释放药丸系统研制[J].中国生物医学工程学报,2004,23(6):579-582.  
PI XI-TIAN, PENG CHENG-LIN, ZHENG XIAO-LIN, et al. A site-specific delivery capsule for human drug absorption studies [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2004, 23(6): 579-582.

[2] IAN R WILDING, DAVID V PRIOR. Remote controlled capsules in human drug absorption studies [J]. Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2003, 20(6): 405-431.

[3] 皮喜田,彭承琳,郑小林,等.用于药物吸收研究的消化道定点释放药丸系统研究进展[J].北京生物医学工程,2005,24(3):230-232.  
PI XI-TIAN, PENG CHENG-LIN, ZHENG XIAO-LIN et al. Progress of site specific delivery capsule for human drug absorption studies [J]. Beijing Biomedical Engineering, 2005, 24(3): 230-232.

[4] 刘洪英,郑小林,皮喜田,等.消化道定位药物释放技术及其在新药开发中的应用[J].中国药理学杂志,2005,40(13):970-972.  
LIU HONG-YING, ZHENG XIAO-LIN, PI XI-TIAN, et al. Application of site-specific drug delivery technology (SSDDT) in new drug development [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(13): 970-972.

[5] IAN R WILDING. Development of a new engineering-based capsule for human drug absorption studies [J]. Pharmaceutical Science & Technology Today, 2000, 3(11): 385-391.

[6] IAN R WILDING. In search of a simple solution for complex molecules [J]. Scrip Magazine, 2001, 5: 9-11.

[7] PI XI-TIAN. Development of a site-specific delivery capsule for human drug absorption studies [C] // Proc of the International Conference on Biomedical Engineering. Kuala Lumpur, Malaysia: IFMBE, 2004.

[8] WANG Y W, TANG Y B, GU J K, et al. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 808(2): 215-219.

[9] MARLICE A. S M, ALCENIR DE S S, OLIVIA W P, et al. Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic studies [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 852: 308-316.

[10] KOLTE B L, RAUTB B, DEO A A, et al. Simultaneous determination of metformin in combination with rosiglitazone by reversed phase liquid chromatography [J]. J Chromatogr Sci, 2004, 42(2): 27-31.

[11] NIOPAS I, DAFTSIOS A C. A validated high performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. Pharm Biomed Anal, 2002, 28(324): 653-657.

[12] 魏敏吉,张慧琳,康子胜.一种快速灵敏测定人血清中二甲双胍含量的方法[J].中国临床药理学杂志,2003,19(6):443-446.  
WEI MIN-JI, ZHANG HUI-LIN, KANG ZI-SHENG. Rapid and sensitive method for the determination of metformin in human serum [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2003, 19(6): 443-446.

[13] 秦峰,熊志立,孙苏亚,等.盐酸二甲双胍缓释片人体药代动力学及生物利用度 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 258-262.  
QIN FENG, XIONG ZHI-LI, SUN SU-YA, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of sustained release tablets of metformin hydrochloride compared with its regular tablets in healthy volunteers [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(3): 258-262.

- [10] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [11] 艾希珍, 马兴庄, 于立明, 等. 弱光下长期亚适温和短期低温对黄瓜生长及光合作用的影响[J]. 应用生态学报, 2004(11):2091-2094.  
AI XI-ZHEN, MA XING-ZHUANG, YU LI-MING, et al. Effect of long term suboptimal temperature and short-term low temperature under low light density on cucumber growth and its photosynthesis [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15 (11):2091-2094.
- [12] 杨广东, 朱祝军, 计玉妹. 不同光强和缺镁胁迫对黄瓜叶片叶绿素荧光特性和活性氧产生的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(1):115-118.  
YANG GUANG-DONG, ZHU ZHU-JUN, JI YU-MEI. Effect of light intensity and magnesium deficiency on chlorophyll fluorescence and active oxygen in cucumber leaves[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2002, 8(1):115-118.
- [13] HEMANS C, VERBRUGGEN N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Ambipopsis thaliana*[J]. Journal of Experiment Botany, 2005, 56(418):2153-2161.
- [14] 毛伟华, 龚亚明, 宋兴舜, 等. 黄瓜 cDNA 芯片的构建及其在黄瓜缺镁胁迫下基因差异表达研究中的应用[J]. 园艺学报, 2006, 33(4):767-772.  
MAO WEI-HUA, GONG YA-MING, SONG XING-SHUN, et al. Construction of cucumber cDNA microarray and its application in the study of response of cucumber plants to magnesium deficiency stress[J]. Acta Horticulture Sinica, 2006, 33(4):767-772.
- [15] FARQUHAR G D, SHARKEY T D. Stomata conductance and photosynthesis[J]. Annual Review of Physiology, 1982, 33:317-345.
- [16] 郑小林, 钟炳辉, 陈荣清. 钾、钠离子对富钾植物离体叶片气孔运动的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(2):320-323.  
ZHENG XIAO-LIN, ZHONG BING-HUI, CHEN RONG-QING. Effect of K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> on isolated leaves stomata movement of rich potassium plants[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2004, 24(2):320-323.

(编辑 陈移峰)

(上接第 226 页)

- [14] 叶敏, 付强, 朱珠. 人血浆中盐酸二甲双胍 HPLC 测定法[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4):310-312.  
YE MIN, FU QIANG, ZHU ZHU. Study on determination of metformin in human plasma by HPLC assay[J]. Chin Pharm J, 2006, 41(4):310-312.
- [15] 祝德秋, 崔岚, 沈金芳. HPLC 法测定人血浆中盐酸二甲双胍浓度[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(18):1587-1589.  
ZHU DE-QIU, CUI LAN, SHEN JIN-FANG. Determination of metformin hydrochloride in human plasma by HPLC [J]. Chinese Journal of New Drugs 2006, 15(18):1587-1589.
- [16] 姜嫣嫣, 毛丹卓, 黄容琴, 等. 一种改进的 HPLC 法测定人血浆中盐酸二甲双胍浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 13(6):338-341.  
JIANG YAN-YAN, MAO DAN-ZHUO, HUANG RONG-QIN et al. An improving HPLC method for determination of metformin hydrochloride in human plasma[J]. 2004, 13(6):338-341.

(编辑 陈移峰)