

# 盐酸比格列酮缓释微丸在犬体内的药动学与体内外相关性研究

崔新刚<sup>1\*</sup>, 王颖莹<sup>1</sup>, 梁延春<sup>1#</sup>, 陈洪轩<sup>2</sup> (1. 解放军第150中心医院, 河南 洛阳 471031; 2. 黄河科技大学医学院药理学系, 郑州 450000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1363-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.21

**摘要** 目的: 研究盐酸比格列酮(PGH)缓释微丸在犬体内的药动学和体内外相关性。方法: 将6只Beagle犬随机均分为两组, 分别ig给予受试制剂PGH缓释微丸和参比制剂PGH片, 给药剂量为0.4 mg/kg, 1周后交叉实验。分别于给药前和给药后0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、13、24、36 h取血2 ml制备血浆。采用高效液相色谱法测定其血药浓度, 3p97软件计算药动学参数, 并考察其体内外相关性。色谱柱为Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-25 mmol/L 乙酸铵水溶液-甲酸(70:30:0.2), 流速为1.0 ml/min, 柱温为30 ℃, 检测波长为240 nm, 进样量为20 μl。结果: PGH检测质量浓度的线性范围为0.1~3.2 μg/ml ( $r=0.9997$ ), 方法回收率为95.0%~101.7% (RSD为4.56%~6.77%,  $n=3$ ), 提取回收率为67.9%~70.3% (RSD为5.53%~8.72%,  $n=3$ )。受试制剂的药-时曲线符合单室模型; 受试制剂与参比制剂的 $t_{max}$ 分别为(10.59±0.37)、(2.21±0.14) h,  $t_{1/2}$ 分别为(11.75±0.55)、(6.98±0.39) h,  $c_{max}$ 分别为(2.01±0.21)、(2.35±0.33) μg/ml, AUC<sub>0-36h</sub>分别为(38.57±5.53)、(33.73±4.31) μg·h/ml; 受试制剂相对生物利用度为114.3%; 体外释药与体内吸收数据的相关系数 $r=0.9103$ 。受试制剂 $t_{max}$ 及 $t_{1/2}$ 较参比制剂明显延长,  $c_{max}$ 较参比制剂有所降低。结论: PGH缓释微丸具有缓释特征, 体外释药与体内吸收具有相关性。

**关键词** 盐酸比格列酮缓释微丸; 犬; 药动学; 生物利用度; 体外释药度

## Study of *in vivo* Pharmacokinetics and Correlation between *in vivo* and *in vitro* of Pioglitazone Hydrochloride Sustained-release Pellets in Dogs

CUI Xin-gang<sup>1</sup>, WANG Ying-ying<sup>1</sup>, LIANG Yan-chun<sup>1</sup>, CHEN Hong-xuan<sup>2</sup> (1.No.150 Central Hospital of PLA, Henan Luoyang 471031, China; 2.Dept. of Pharmacy, School of Medicine, Huanghe Science and Technology University, Zhengzhou 450000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics *in vivo* and correlation between *in vivo* and *in vitro* of Pioglitazone hydrochloride (PGH) sustained-release pellets in dogs. METHODS: 6 Beagle dogs were randomly divided into 2 groups, and they were ig given tested preparations (PGH sustained-release pellets) and reference preparations (PGH tablets) with 0.4 mg/kg, respectively. A crossover trial was conducted after 1 week. 2 ml blood sample was respectively taken before administration and after 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 24, 36 h of administration, and the plasma was collected. The plasma concentration of PGH was determined by HPLC, the pharmacokinetic parameters were calculated by using 3p97 software and the correlation between *in vivo* and *in vitro* was observed. The determination was performed on Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-25 mmol/L ammonium acetate solution-formic acid (70:30:0.2) at the flow rate of 1.0 ml/min, with the column temperature of 30 ℃, measurement wavelength of 240 nm and injection volume of 20 μl. RESULTS: The linear range of PGH quality concentration was 0.1-3.2 μg/ml ( $r=0.9997$ ), the method recovery was 95.0%-101.7% (RSD=4.56%-6.77%,  $n=3$ ) and the extraction recovery was 67.9%-70.3% (RSD=5.53%-8.72%,  $n=3$ ). The drug-time curve of the tested preparations was compatible with single-compartment model. The  $t_{max}$  of the tested preparations and reference preparations were (10.59±0.37) h and (2.21±0.14) h, respectively;  $t_{1/2}$  were (11.75±0.55) h and (6.98±0.39) h, respectively;  $c_{max}$  were (2.01±0.21) μg/ml and (2.35±0.33) μg/ml, respectively; and AUC<sub>0-36h</sub> were (38.57±5.53) μg·h/ml and (33.73±4.31) μg·h/ml, respectively. The relative bioavailability of the tested preparations was 114.3%. The coefficient  $r$  of the correlation between drug release data *in vitro* and absorption data *in vivo* was 0.9103. Compared with the reference preparations,  $t_{max}$  and  $t_{1/2}$  values of the tested preparations were obviously extended and  $c_{max}$  value was decreased. CONCLUSIONS: PGH sustained-release pellets show sustained-release property. The drug release *in vitro* and absorption *in vivo* are correlated with each other.

**KEYWORDS** Pioglitazone hydrochloride sustained-release pellets; Dogs; Pharmacokinetics; Bioavailability; Release *in vitro*

盐酸吡格列酮为胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物, 其可以增加胰岛素敏感性, 降低血糖。该类药物能竞争性激活过

\* 药师, 硕士。研究方向: 药剂学、药动学。电话: 0379-64169466。E-mail: cuixingang5207@163.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 0379-64169467。E-mail: liangyanchun150@163.com

氧化物酶增殖体受体, 调节胰岛素反应性基因的转录, 增加外周组织葡萄糖转运体1及葡萄糖转运体4等的转录和蛋白合成, 增加基础葡萄糖的摄取和转运, 从而改变胰岛素耐受及发挥降血糖作用<sup>[1]</sup>。

缓释微丸胶囊为多单元结构, 其释药行为较为平稳, 稳定的释药行为使其生物利用度相对提高, 药物毒副作用减小<sup>[2]</sup>。

笔者设计了盐酸比格列酮(PGH)缓释微丸胶囊,希望通过考察PGH缓释微丸的体外释药特性及体内外相关性,证明其具备缓释特征,旨在为临床治疗2型糖尿病提供每日只需服药1次、治疗效果良好的缓释制剂。本文考察了PGH缓释微丸在犬体内的释药过程,研究了其药动学参数和生物利用度,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1120型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);LG-15W型高速微量离心机(北京医用离心机厂)。

### 1.2 药品与试剂

PGH缓释微丸胶囊(解放军第150中心医院制剂中心,批号:13080601,规格:每粒15mg);PGH片(杭州中美华东制药有限公司,批号:130610,规格:每片15mg);PGH对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100634-201202,纯度:99%);其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

Beagle犬6只,♂,质量为(10±2)kg,由南京亚东实验动物研究中心饲养,实验动物使用许可证号:SCXK(苏)2007-0013。本实验已通过实验动物伦理委员会同意。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub>(250mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇-25mmol/L乙酸铵水溶液-甲酸(70:30:0.2),流速:1.0ml/min;柱温:30℃;检测波长:240nm;进样量:20μl。

### 2.2 血浆样品的处理与分析<sup>[8]</sup>

取血浆样品100μl,加入蛋白沉淀剂乙腈200μl,涡旋混合3min,以离心半径为8.4cm、12000r/min离心15min,取上清液进样测定,记录峰面积,计算PGH含量。

### 2.3 方法专属性考察

取空白血浆、空白血浆+PGH对照品、血浆样品(给药后4h),按“2.2”项下方法处理后,进样测定,记录色谱。结果表明,PGH与血浆中杂质分离良好,PGH保留时间为11.98min。色谱图见图1。

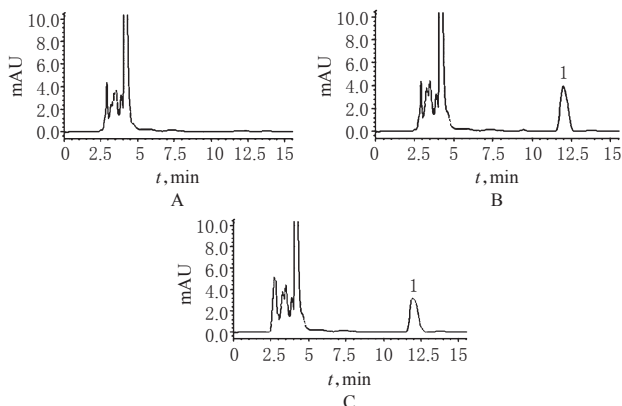


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+PGH对照品;C.血浆样品;1.PGH

Fig 1 HPLC chromatography

A. blank plasma; B. blank plasma+PGH control substance; C. plasma sample; 1. PGH

### 2.4 标准曲线的绘制<sup>[9]</sup>

精密称取PGH对照品10mg,置于50ml量瓶中,用流动相溶解稀释至刻度,摇匀,制备成200μg/ml的贮备液。分别精密吸取贮备液适量于10ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制备成质量浓度分别为5、10、20、40、60、90、120、160μg/ml的对照品溶液。于离心管中分别加入不同质量浓度的PGH对照品溶液2μl,然后依次加入98μl空白血浆,涡旋混合3min,制备成PGH质量浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.8、2.4、3.2μg/ml的血浆样品,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=90.974c+1.7331$ ( $r=0.9997$ , $n=8$ )。结果表明,PGH检测质量浓度的线性范围为0.1~3.2μg/ml。

### 2.5 回收率试验<sup>[9]</sup>

2.5.1 方法回收率 于离心管中加入高、中、低质量浓度的PGH对照品溶液各2μl,再加入98μl空白血浆,制备成PGH质量浓度分别为2.4、0.8、0.2μg/ml的血浆样品,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算含量和方法回收率。结果显示,高、中、低质量浓度血浆样品的方法回收率分别为101.7%、97.5%、95.0%,RSD分别为4.56%、4.85%、6.77%( $n=3$ )。

2.5.2 提取回收率 于离心管中加入高、中、低质量浓度的PGH对照品溶液各2μl,再加入98μl空白血浆,制备成PGH质量浓度分别为2.4、0.8、0.2μg/ml的血浆样品,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录峰面积。另于离心管中加入高、中、低质量浓度的PGH对照品溶液各2μl,再加入98μl流动相溶液,制备成PGH质量浓度分别为2.4、0.8、0.2μg/ml的流动相样品,进样测定,记录峰面积。以相对应的质量浓度血浆样品峰面积与流动相样品峰面积比值计算提取回收率。结果显示,高、中、低质量浓度血浆样品的提取回收率分别为70.3%、68.5%、67.9%,RSD分别为5.53%、6.17%、8.72%( $n=3$ )。

### 2.6 精密度试验<sup>[9]</sup>

于离心管中加入高、中、低质量浓度的PGH对照品溶液各2μl,再加入98μl空白血浆,配成PGH质量浓度分别为2.4、0.8、0.2μg/ml的血浆样品,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算含量。同日内测定5次,考察日内精密度;每日测定1次、连续测定5d,考察日间精密度。结果显示,平均日内RSD为4.33%( $n=5$ ),平均日间RSD为6.97%( $n=5$ )。

### 2.7 药动学研究

将6只犬随机分为受试制剂(PGH缓释微丸胶囊)组和参比制剂(PGH片)组,每组3只,按人临床常用剂量进行换算给药剂量为0.4mg/kg。用药前不需禁食,给药期间自由饮水,给药后4h统一进食。于给药前和给药后0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、13、24、36h由犬前腿静脉取血约2ml,分别置于涂有肝素的EP管中,以离心半径为8.4cm、4500r/min离心15min,取上层血浆,-20℃保存备用<sup>[7-9]</sup>,1周后交叉实验。取血浆样品按“2.2”项下方法处理后进样测定,代入回归方程计算血药浓度,绘制药-时曲线,见图2。

由PGH缓释微丸药-时曲线可知,PGH缓释微丸在体内符合单室模型。采用3p97软件对血药浓度数据进行处理,计算主要药动学参数,结果见表1。

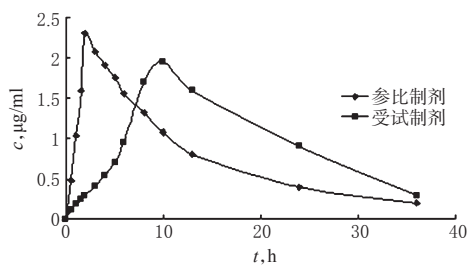


图2 两种制剂在犬体内的药-时曲线

Fig 2 Drug-time curves of 2 kinds of preparations in dogs

表1 两种制剂在犬体内的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of 2 kinds of preparations in dogs( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

药动学参数	受试制剂	参比制剂
$K_e, h^{-1}$	$0.059 \pm 0.004$	$0.099 \pm 0.011$
$t_{1/2}, h$	$11.746 \pm 0.548$	$6.983 \pm 0.394$
$t_{lag}, h$	$1.211 \pm 0.087$	$0.349 \pm 0.025$
MRT, h	$19.338 \pm 1.256$	$15.778 \pm 0.997$
$c_{max}, \mu g/ml$	$2.010 \pm 0.211$	$2.345 \pm 0.332$
$t_{max}, h$	$10.591 \pm 0.374$	$2.213 \pm 0.143$
CL/F, L/(h·kg)	$0.021 \pm 0.001$	$0.036 \pm 0.003$
$AUC_{0-36h}, \mu g \cdot h/ml$	$38.565 \pm 5.533$	$33.732 \pm 4.314$
$AUC_{0-\infty}, \mu g \cdot h/ml$	$41.149 \pm 5.724$	$38.252 \pm 4.907$

按公式计算受试制剂(T)与参比制剂(R)的相对生物利用度(F): $F = AUC_{0-36h(T)} / AUC_{0-36h(R)} \times 100\%$ 。

通过对以上数据进行处理,从药-时曲线、药动学参数及相对生物利用度来看,受试制剂PGH缓释微丸胶囊的达峰时间 $t_{max}$ 为 $(10.591 \pm 0.374)$  h,较参比制剂延长;峰浓度 $c_{max}$ 为 $(2.010 \pm 0.211)$   $\mu g/ml$ ,较参比制剂降低;半衰期 $t_{1/2}$ 为 $(11.746 \pm 0.548)$  h,较参比制剂延长;平均滞留时间MRT为 $(19.338 \pm 1.256)$  h,较参比制剂延长。这些参数充分证明了受试制剂具有良好的缓释特征。受试制剂的相对生物利用度达114.3%,表明受试制剂与参比制剂生物利用度相近。

### 2.8 体外累积释放度考察

按照2010年版《中国药典》释放度测定方法规定采用篮法<sup>[9]</sup>。转速为100 r/min,温度为 $(37 \pm 1)$   $^{\circ}C$ ,以0.1 mol/L的盐酸溶液900 ml为溶出介质。称取PGH缓释微丸适量,投入转篮中,自样品与溶出介质接触开始计时,分别于2、4、6、8、10、13、24 h取溶出液5 ml,并立刻补充同体积等温新鲜溶出介质,每个取样操作在30 s内完成。取样溶液经0.45  $\mu m$ 微孔滤膜滤过,取滤液进样测定PGH含量,并计算累积释放度( $F_d$ )。结果显示,2、4、6、8、10、13、24 h时的 $F_d$ 分别为1.60%、6.20%、13.60%、25.50%、45.50%、64.50%、91.00%。

### 2.9 体内外相关性<sup>[10]</sup>

体外释放度只有与体内生物利用度之间有良好的相关性,才可以通过调节药物体外释放行为来控制其在体内的释药情况。通过比较 $F_d$ 及体内吸收分数( $F_a$ ),可以判断体外释放度与体内生物利用度间的相关性。体内实验各时间点的 $F_a$ 用Wagner-Nelson法计算: $F_a = (c_t + K_e \times AUC_{0-36h}) / (K_e \times AUC_{0-\infty}) \times 100\%$ ,式中 $c_t$ 为 $t$ 时间的血药浓度; $K_e$ 为消除速率常数。结果显示,给药后2、4、6、8、10、13、24 h后的 $F_a$ 分别为11.21%、22.08%、39.82%、72.68%、90.66%、92.01%、102.59%。

以 $F_a$ 对 $F_d$ 进行线性回归,得回归方程为 $F_a = 1.010 8F_d + 25.782$  ( $r = 0.910 3$ )。结果表明,PGH缓释微丸的 $F_a$ 和 $F_d$ 相关性良好。

## 3 讨论

试验过程中,通过紫外扫描可知PGH在240 nm波长处有较大吸收,且血浆中杂质在此波长时无紫外吸收,所以本实验最终选取240 nm波长为检测波长。为了能更好地将杂质峰与主药峰分离开,并获得良好的峰形,笔者对流动相条件进行了大量试验摸索和筛选,确定流动相条件为甲醇-25 mmol/L乙酸铵水溶液-甲酸(70:30:0.2)。结果发现,在此流动相条件下,主药峰与杂质峰能较好分离,且峰形较好。

关于血浆样品制备及提取方法,本文通过查阅相关文献及研究,最终确定为Beagle犬用药前不需禁食,给药期间自由饮水,给药后4 h统一进食;于给药前和给药后0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、13、24、36 h由前腿静脉取血约2 ml。血浆样品分别置于涂有肝素的EP管中,以离心半径为8.4 cm、4 500 r/min离心15 min,取上层血浆,−20  $^{\circ}C$ 保存备用。对所提取血浆中药物质量浓度进行检测,结果发现,笔者所选用血样提取方法可靠、效果较好。

与参比制剂相比,PGH缓释微丸显示出良好的缓释特征,且体外释药与体内吸收具有相关性。

## 参考文献

- [1] 倪洪岗,李雪梅.比格列酮对初诊2型糖尿病强化治疗的影响[J].中国药师,2006,9(9):877.
- [2] 陈盛君,朱家璧.缓控释微丸制剂的研究进展[J].国外医学药学分册,2004,31(3):177.
- [3] 张毕奎,李焕德,邓航,等.柱前衍生HPLC法结合固相萃取测定血浆中卡托普利[J].药物分析杂志,2002,22(1):27.
- [4] 于翠霞,樊宏伟,朱余兵,等.盐酸吡格列酮片的血药浓度测定及其健康人体内的药动学研究[J].中国药师,2010,13(4):480.
- [5] 李珍,唐世新,张进萍,等.固相萃取-高效液相色谱法测定人血浆中吡格列酮浓度及其药动学[J].中国医院药学杂志,2003,23(11):653.
- [6] 方瑜,潘振华,曹德英.厄贝沙坦胃滞留渗透泵片的制备及其在犬体内的药动学研究[J].中国药房,2013,24(1):44.
- [7] 范文源,吴正红,平其能,等.丙硫氧嘧啶缓释片与普通片的犬体内药动学及生物利用度比较[J].中国新药与临床杂志,2005,24(7):515.
- [8] 尹飞,刘宏飞,师双双,等.盐酸氨溴索缓释混悬剂在犬体内的生物等效性研究[J].中国药房,2014,25(5):420.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XC.
- [10] 陈洪轩,游国叶,陈志鹏,等.卡托普利脉冲微丸制备及大鼠体内药动学研究[J].中国药学杂志,2012,47(18):1 219.

(收稿日期:2014-11-03 修回日期:2014-12-20)

(编辑:邹丽娟)