

· 论著 ·

米格列奈钙片健康人体药动学研究

恽芸蕾, 高守红, 樊成辉, 缪海均 (第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] 目的 建立测定人血浆中米格列奈钙的 LC-MS/MS 法, 并应用于健康人体药动学研究。方法 30 名健康志愿者, 随机分为 3 组 (每组 10 人, 男女各半), 分别口服米格列奈钙片 5、10、20 mg, 采用非房室模型统计矩法计算药动学参数。结果 健康受试者单次给药 5、10、20 mg 后, 主要药代动力学参数分别为 C_{max} (799.5 ± 189.8)、(1 689.8 ± 348.4) 和 (3 032.9 ± 755.6) ng/ml; t_{max} (0.38 ± 0.16)、(0.43 ± 0.16) 和 (0.54 ± 0.26) h; AUC_{0-10} (1 051.3 ± 276.4)、(2 324.5 ± 481.8) 和 (5 028.8 ± 1 283.6) ng · h/ml; $AUC_{0-∞}$ (1 059.4 ± 278.2)、(2 342.8 ± 488.6)、(5 073.9 ± 1 315.9) ng · h/ml; $t_{1/2}$ (1.80 ± 0.42)、(1.68 ± 0.37) 和 (1.56 ± 0.19) h。结论 本分析方法准确、灵敏, 适用于米格列奈钙片的健康人体药动学研究。

[关键词] 米格列奈钙; LC-MS/MS; 药代动力学

[中图分类号] R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0045-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.011

Pharmacokinetics of mitiglinide calcium tablets in human healthy volunteers

YUN Yunlei, GAO Shouhong, Fan Chenghui, MIAO Haijun (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To establish a sensitive and specific LC-MS/MS method for the determination of mitiglinide calcium in human plasma, and investigate the pharmacokinetics of mitiglinide calcium tablets in healthy volunteers. **Methods** 30 healthy volunteers were randomly divided into three groups with 5 men and 5 women in each group. The volunteers in three groups were administered with single dose of mitiglinide calcium tablets 5, 10, 20 mg, respectively. The pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartment model. **Results** The main pharmacokinetics parameters of mitiglinide in volunteers who were administered with a single dose of 5, 10, 20 mg were as follows: C_{max} (799.5 ± 189.8), (1 689.8 ± 348.4) and (3 032.9 ± 755.6) ng/ml; t_{max} (0.38 ± 0.16), (0.43 ± 0.16) and (0.54 ± 0.26) h; AUC_{0-10} (1 051.3 ± 276.4), (2 324.5 ± 481.8) and (5 028.8 ± 1 283.6) ng · h/ml; $AUC_{0-∞}$ (1 059.4 ± 278.2), (2 342.8 ± 488.6) and (5 073.9 ± 1 315.9) ng · h/ml; $t_{1/2}$ (1.80 ± 0.42), (1.68 ± 0.37) and (1.56 ± 0.19) h, respectively. **Conclusion** The present method was accurate, sensitive and reproducible for the determination of mitiglinide levels in human plasma, which was suitable for pharmacokinetic study on mitiglinide tables in human.

[Key words] mitiglinide calcium; LC-MS/MS; pharmacokinetics

米格列奈是继瑞格列奈、那格列奈后第 3 个格列奈类药物, 是苯丙氨酸的衍生物。米格列奈的作用机制类似于磺酰脲, 但用药后的起效速度比磺酰脲快; 而且该药的作用持续时间不长, 仅降低糖尿病患者用餐后血糖过高而避免持续降糖引发的血糖过低, 其具有半衰期短、安全性高、体内无蓄积等特点^[1,2]。该药通过关闭胰腺 β 细胞膜上的 ATP 依赖性 K^+ 通道, 造成 Ca^{2+} 内流, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加而使细胞内含胰岛素的囊泡脱粒, 从而刺激胰岛素的分泌。国内外文献报道, 米格列奈血药浓度测定方法主要有 LC-UV、LC-MS、HPLC 和 LC-MS/MS 法^[3-8]。本研究参考了相关文献, 建立了测定血浆中

米格列奈钙浓度的 LC-MS/MS 法, 并用于健康受试者口服米格列奈钙后体内血药浓度测定和药动学研究, 为临床合理用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器 Agilent 6410A 型三重四极杆串联质谱仪, 包括 Agilent 1200 G1311A 四元泵、G1322A 真空脱气机、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱。使用的仪器还有 MassHunter 软件控制系统及数据处理器 (美国 Agilent 公司); XW-01 定时可调速旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); TGL-16G 台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂) 和北利 DT5-3 低速台式离心机; Sartorius BP211D (德国赛多利斯)。

1.2 药品与试剂 米格列奈片 (上海秀龙中药有限公司, 规格: 5 mg/粒)。内标为格列齐特 (Sigma

[作者简介] 恽芸蕾, 女, 药师。E-mail: yunyunlei@126.com.

[通讯作者] 缪海均。Tel: (021) 81886191, E-mail: haijunmiao@126.com.

公司)。甲醇、乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯),醋酸铵(美国天地公司,色谱纯),乙酸乙酯、正己烷(CALEDON 公司,色谱纯),纯净水,盐酸(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 色谱条件 色谱柱(迪马公司):Dikma Inertsil ODS-3, 2.1 mm × 50 mm, 5 μm; 流动相:甲醇-10 mmol/L 醋酸铵(65:35), 流速 0.25 ml/min, 进样量 10 μl, 分析时间 2.5 min; 柱温 40 °C。

1.4 质谱检测条件 采用 ESI 离子源、正离子检测, 选择 MRM 工作方式进行一/二级质谱分析。质谱检测工作参数如下:干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 10 L/min, 雾化气压力 35 psi, 毛细管电压 4 000 V, MS₁ 温度 100 °C, MS₂ 温度 100 °C, 毛细管出口电压 125 V, 碰撞能量 16。

用于定量分析的离子反应分别为 m/z 316.2 → m/z 298.2 (米格列奈), m/z 324.2 → m/z 126.9 (内标格列齐特)。

1.5 血浆样品处理 取血浆 200 μl 置于 10 ml 具塞玻璃离心管内, 加入 20 μl 内标溶液(200 ng/ml) 混匀, 加入 1 mol/L HCl 100 μl 酸化, 涡旋混合 30 s, 加入 3 ml 乙酸乙酯正己烷(98:2) 提取液, 涡旋混合 3 min, 于 3 500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于 45 °C 离心浓缩仪氮气流下吹干, 残渣用甲醇:水(55:45) 100 μl 溶解, 于 12 000 r/min 高速离心 10 min, 吸取上清液 10 μl 进样, 以米格列奈和内标的峰面积比, 内标法定量分析。

1.6 受试者 30 例健康受试者(男、女各 15 名), 年龄(23.93 ± 1.60)岁、身高(169.27 ± 9.71)cm、体重(60.13 ± 8.89)kg、体重指数均在 19~24, 女性尿妊娠试验均阴性, 血常规、尿常规、粪常规、肝功能和心电图等检查均正常, 无心血管系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、中枢神经系统、代谢系统的明确病史或其他显著疾病, 无药物与食物过敏史, 无烟、酒嗜好或滥用药(毒)品史, 筛选前 2 周内未服用过其他药物, 入选前 3 个月内未参加过其他药物的临床试验且无献血史。受试者在试验前均签署知

情同意书。本临床试验方案经上海长征医院医学伦理学委员会审核批准, 在试验过程中受其指导。

1.7 试验设计 30 例健康受试者随机分成 3 组, 每组 10 人, 于正式试验前 1 d 入住 I 期临床试验病房, 隔夜禁食 12 h 后, 空腹给药。按不同剂量组分别每人口服米格列奈钙片 5、10、20 mg, 用 50 g 葡萄糖粉溶于 200 ml 的温水中送服。服药 2 h 后可以饮水, 4 h 和 10 h 后统一进食清淡的午餐及晚餐。于给药前(0 h)和给药后 5、10、15、20、30 和 45 min, 1、2、3、4、6、8 和 10 h 由肘静脉取血 4 ml, 肝素抗凝, 血样 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆于另一具塞试管中, 于 -20 °C 冰箱中冷冻保存至测定。详细记录服药时间、采样准确时间, 临床医生及研究者随时观察药物不良反应(事件)并记录。从开始进入试验至试验结束, 要求受试者禁烟、酒、茶、咖啡等, 服药后避免长时间静卧或剧烈运动。

1.8 数据处理 采用统计矩法计算药动学参数, C_{max} 和 t_{max} 均采用实测值; AUC 采用梯形面积法计算; λ_z 为末端相消除速率常数, 用末端相浓度对数与时间回归直线求得; $t_{1/2} = 0.693/\lambda_z$ 。

2 结果

2.1 方法的专属性 将一定浓度的标准溶液和内标溶液进样, 在 ESI 电离方式下进行产物离子全扫描分析(图 1-A、1-B); 分别选择性对 m/z 316.2 (米格列奈) 和 m/z 324.2 (内标格列齐特) 进行产物离子全扫描分析(图 1-C、1-D); 米格列奈和内标格列齐特生成的主要碎片离子分别为 m/z 298.2 和 m/z 126.9, 将以上碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。在本试验的色谱条件下, 米格列奈的保留时间约 1.8 min, 内标格列齐特的保留时间约 1.3 min。

观察了来自 6 份不同受试者的空白血浆, 样品和内标峰形良好, 血浆中的杂质不干扰样品和内标峰检测, 本法具有较高的专属性。空白血浆、米格列奈和内标、空白血浆中添加米格列奈和内标以及受试者服药后的血浆样本色谱图见图 2。

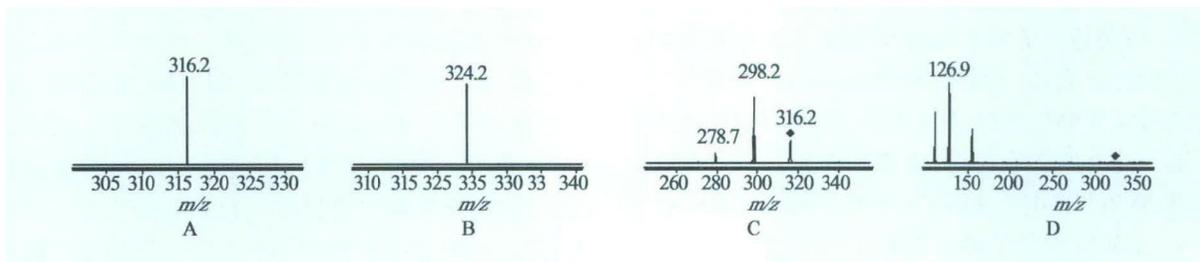


图 1 米格列奈 LC-MS/MS 质谱图

A. 米格列奈 SIM 全扫描质谱图; B. 内标格列齐特 SIM 全扫描质谱图;
C. 米格列奈产物离子扫描质谱图; D. 内标格列齐特产物离子扫描质谱图

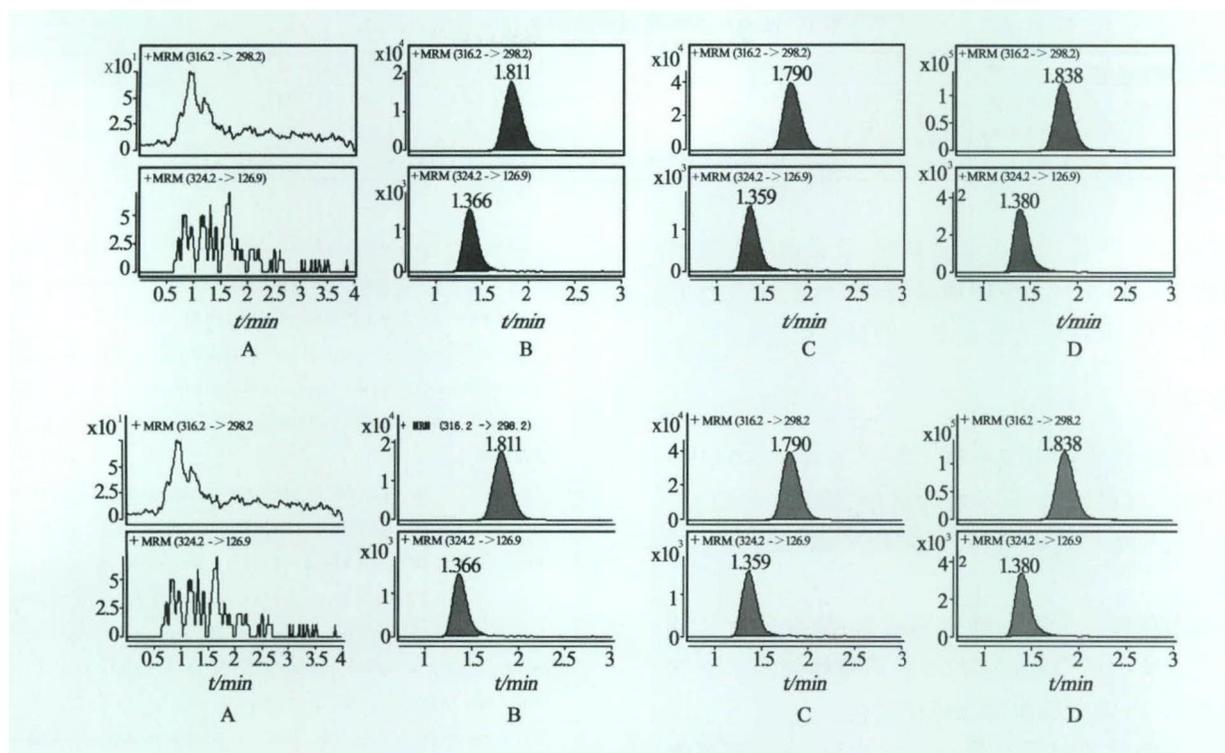


图2 米格列奈 LC-MS/MS 色谱图

A. 空白人血浆质谱图; B. 米格列奈(100 ng/ml)和内标质谱图;
C. 空白人血浆加米格列奈(200 ng/ml)和内标质谱图; D. 受试者口服米格列奈片10 min后血浆样品图

2.2 标准曲线及最低定量浓度 精准配制含米格列奈1.0、2.0、10.0、20.0、100.0、200.0、1000.0、2000.0和4000.0 ng/ml的标准血浆样品。按上述血浆样品预处理步骤操作,每种浓度各平行制作5份样品,并进行LC-MS/MS分析。以米格列奈对照品与内标峰面积的比值对相应的浓度($\mu\text{g/L}$)进行加权($1/c^2$)线性回归,得加权标准曲线方程: $Y = 26.3994c + 0.0205$, $r^2 = 0.9961$ ($n = 5$),线性范围1.0~4000.0 ng/ml。配制浓度1.0 ng/ml的样品6份,进行最低定量限检测,结果为 0.900 ± 0.068 , RSD为7.6%,说明本法测定血浆中米格列奈的最低定量限为1.0 ng/ml。

2.3 精密度与准确度 分别配制成相当于米格列奈浓度为2.0、20.0、200.0和2000.0 ng/ml的血浆质控样品,按血浆样品处理依法操作,进行精密度试验。结果表明,米格列奈的上述4个浓度批内及批间变异均 $<15\%$,测定的准确度在85%~115%。

2.4 回收率试验 取空白血浆,配制成相当于米格列奈浓度为2.0、20.0、200.0和2000.0 ng/ml的血浆质控样品,按血浆样品处理依法操作,同时配制相当于米格列奈浓度为2.0、20.0、200.0和2000.0 ng/ml的标准溶液样品,按同法操作,计算方法回收率。4个浓度米格列奈血浆样品回收率 $>90\%$ (95.04%~96.17%), RSD $<5\%$ (0.2%~2.0%),

表明该法的准确性符合生物样品分析要求。

2.5 稳定性考察和质控 本试验考察了米格列奈血浆样品经样品处理后室温放置的稳定性、血浆样品经历3次冷冻与解冻循环稳定性和血浆样品长期冷冻条件下的稳定性。配制米格列奈浓度为2.0、20.0、200.0和2000.0 ng/ml的血浆质控样品,按血浆样品前步骤同法操作,每一浓度水平进行3样本分析,结果处理后的血浆样品室温放置24 h、经3次冻融试验、放置 -20°C 冰箱冷冻保存30 d后的稳定性均良好。

2.6 米格列奈钙健康人体药-时曲线和药动学参数 3组健康受试者分别单次口服米格列奈钙片5、10、20 mg的平均血药浓度-时间曲线见图3,主要的药代动力学参数详见表1。

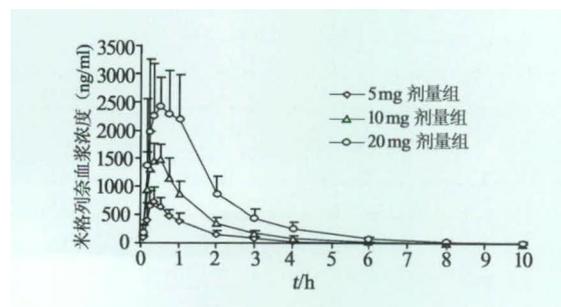


图3 受试者单次口服米格列奈钙片后的平均血药浓度-时间曲线

表 1 单次给药后米格列奈的药动学参数

剂量组 (mg)	C_{max} (ng/ml)	t_{max} (h)	AUC_{0-10} (ng · h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng · h/ml)	$t_{1/2}$ (h)
5	799.5 ± 189.8	0.38 ± 0.16	1 051.3 ± 276.4	1 059.4 ± 278.2	1.80 ± 0.42
10	1 689.8 ± 348.4	0.43 ± 0.16	2 324.5 ± 481.8	2 342.8 ± 488.6	1.68 ± 0.37
20	3 032.9 ± 755.6	0.54 ± 0.26	5 028.8 ± 1 283.6	5 073.9 ± 1 315.9	1.56 ± 0.19

2.7 安全性评价 整个药试期间,受试者无严重不良反应(事件)发生;经物理检查、实验室检查及心电图检查,均未发生有临床意义的异常改变。

3 讨论

本研究建立的血浆米格列奈钙浓度 LC-MS/MS 测定方法,样品经液-液萃取后进样,具有灵敏度高、准确性高和精密度好等特点,适用于临床药动学的研究。

因米格列奈的降血糖作用较弱,故在禁食 12 h 后给药试验中用 200 ml 含 50 g 葡萄糖的温水送服米格列奈,以避免低血糖反应的发生。

健康受试者口服米格列奈钙片后,具有口服吸收迅速、体内代谢较快的特点;其药代动力学参数 C_{max} 与 AUC 与给药剂量呈正相关;其主要药代动力学参数与文献报道相一致^[7,8]。

【参考文献】

- [1] Kumashiro N, Yoshihara T, Kanazawa Y, *et al.* Long-term effect of combination therapy with mitiglinide and once daily insulin glargine in patients who were successfully switched from intensive insulin therapy in short-term study [J]. *Endocr J*, 2007, 54(1): 163-166.
- [2] Sunaga Y, Gonoi T, Shibasaki T, *et al.* The effects of mitiglinide

(KAD-1229) a new antidiabetic drug, on ATP-sensitive-K channels and insulin secretion; comparison with the sulfonylureas and nateglinide [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 431(1): 119.

- [3] Lushan Y, Su Z. Determination of mitiglinide in rat plasma by high performance liquid chromatography with UV detection [J]. *Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2006, 834(1-2): 204-207.
- [4] Jin HW, Yu QX. SPE and LC-ESI-MS for quantitative analysis of mitiglinide in human plasma in a bioequivalence study [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(11-12): 1715-1719.
- [5] Liang J, Tian Y, Zhang Z, *et al.* High-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry determination of mitiglinide in human plasma and its pharmacokinetics [J]. *J Mass Spectrom*, 2007, 42(2): 171-177.
- [6] Cai S, Huo TG, Feng WY, *et al.* Quantitative determination of mitiglinide in human plasma by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 868, 83-87.
- [7] Zhang Y, Ding L, Tian Y, *et al.* Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the quantification of mitiglinide in human plasma: validation and its application to pharmacokinetic studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(8): 873-878.
- [8] 赵秀丽, 王淑民, 武峰, 等. 米格列奈钙片在健康人体内的药代动力学 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2010, 9(26): 53-55.

【收稿日期】 2013-01-31 【修回日期】 2013-10-15

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 41 页)

- [10] Anderson LE, Advani VR. Chloroplast and cytoplasmic enzymes. Three distinct isoenzymes associated with the reductive pentose phosphate cycle [J]. *Plant Physiol*, 1970, 45: 583.
- [11] Briggs WR, Christie JM. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 204.
- [12] Joh K, Arai Y, Mukai T, *et al.* Expression of three mRNA species from a single rat aldolase A gene, differing in their 5' non-coding regions [J]. *J Mol Biol*, 1986, 190: 401.
- [13] Maire P, Gautrons S, Hakim V, *et al.* Characterization of three optional promoters in the 5'-region of the human aldolase A gene [J]. *J Mol Biol*, 1987, 197: 425.
- [14] Kai GY, Jiang JH, Zhao DL, *et al.* Isolation and expression profile analysis of a new cDNA encoding 5- α -taxadienol-10- β -hydroxylase from *Taxus media* [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2006, 15: 1.
- [15] Zhou LM, Zuo Z, Moses S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45: 1345.

- [16] Jaakola L, Pirttila AM, Halonen M, *et al.* Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 19: 201.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406.
- [18] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal-W-improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4673.
- [19] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17, 1244.
- [20] Fan W, Zhang Z, Zhang Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum* [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(6): 975.

【收稿日期】 2012-12-19 【修回日期】 2013-10-29

【本文编辑】 李睿旻