

餐时血糖调节剂米格列奈钙的 RP-HPLC 法 人肝微粒体药物浓度测定

徐君辉^{1,3}, 郑晓亮², 钱伯初²

(1 浙江大学药学院, 杭州 310031; 2 浙江省医学科学院, 杭州 310013;

3 舟山出入境检验检疫局, 舟山 316000)

[摘要] 目的: 建立人肝微粒体中米格列奈的高效液相色谱测定法。方法: 采用 Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 4.0) (43:57); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长为 210 nm; 进样量为 20 mL。结果: 米格列奈最低检测限为 2 μmol·L⁻¹; 线性范围为 5 ~ 1 000 μmol·L⁻¹ ($r=0.9999$); 最低定量浓度为 5 μmol·L⁻¹ (RSD < 5%, $n=5$); 低、中、高 3 种浓度日内、日间 RSD ($n=5$) 分别为 1.9%, 1.6%, 1.4% 和 3.8%, 4.0%, 3.8%; 绝对回收率平均为 94.4%, 相对回收率平均为 101.2%。结论: 本实验建立的人肝微粒体中米格列奈的高效液相测定方法操作简便、结果准确。

[关键词] 米格列奈; 反相液相色谱法; 人肝微粒体

[中图分类号] R927.2; R977.15 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2008)20-1780-03

Determination of mitiglinide in human hepatic microsomes by RP-HPLC

XU Jun-hui^{1,3}, ZHENG Xiao-liang², QIAN Bo-chu²

(1 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China;

2 Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

3 Zhoushan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method to determine mitiglinide in human hepatic microsomes. **Methods:** Mitiglinide was separated on a Diamonsil-C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ (adjusted to pH 4 with phosphoric acid) (43:57) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. UV detection was set at 210 nm. **Results:** The regression was linear in the concentration range of 5 ~ 1 000 μmol·L⁻¹ ($r=0.9999$). The limit of detection was 2 μmol·L⁻¹ and the lowest limit of quantification was 5 μmol·L⁻¹. Intra-day RSDs of mitiglinide in microsomal sample at three concentrations were 1.9%, 1.6%, 1.4%; and inter-day RSDs were 3.8%, 4.0%, 3.8% ($n=5$). The mean absolute recovery was 94.4% and the mean relative recovery was 101.2%. **Conclusion:** The HPLC assay was simple and accurate for the determination of mitiglinide in human hepatic microsomes.

[Key words] mitiglinide; RP-HPLC; human hepatic microsomes

米格列奈钙是最新一代治疗 2 型糖尿病的新型速效促胰岛细胞分泌胰岛素的餐时血糖调节剂, 其结构如图 1 所示。临床试验表明, 米格列奈钙在疗效和安全性方面均优于其他的降糖药^[1]。米格列奈钙作用于胰岛素分泌的第一时相, 它可使胰岛细胞上的 K⁺-ATP 通道关闭, 使细胞内 Ca²⁺ 浓度增加而使细胞外含胰岛素的囊泡脱粒, 从而刺激胰岛素的分泌^[2]。目前, 作者尚未见米格列奈钙体内代谢相关文献报道。而米格列奈钙作为一个治疗糖尿病的药物, 不可避免的会与其他药物合用。因此, 鉴定米格列奈钙的专属药物代谢酶, 对预测可能

的体内药物相互作用或多种形态酶的作用, 以及发现可能的有毒代谢物或活性代谢物, 从而指导临床安全、合理、有效用药, 避免不良反应的发生具有重要意义。为此, 本实验建立了人肝微粒体中米格列奈的 RP-HPLC 测定法, 并对其进行了初步的体外二相代谢研究。

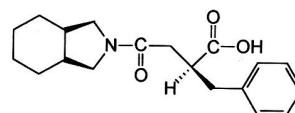


图 1 米格列奈的分子结构式

仪器与试药

LC-2010C型岛津高效液相色谱仪,含 SPD-10A紫外检测器,LC-A0AT泵,自动进样器和柱温箱,Shimadzu Class-VP 6.12版处理软件;Jouan MR1822自动高速冷冻离心机(日本日立公司);DU640核酸蛋白分析仪(贝克曼);DKZ-1型电热恒温振荡水槽(上海医用恒温设备厂)。

米格列奈钙(Mitiglinide Calcium Hydrate,由山东诚创医药技术开发有限公司提供,批号:20061208);尿嘧啶二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)、Triton X-100均为美国Sigma公司产品;其他试剂均为国产分析纯,色谱纯或生化试剂。

方法与结果

人肝微粒体的制备

人肝组织来源于肝肿瘤切除病人,取肿瘤边缘正常肝组织,由浙江大学附属医院提供。按文献方法,采用钙沉淀法制备人肝微粒体^[3],在 -80°C 条件下保存。以Lowery法测定微粒体蛋白浓度。

2 色谱条件

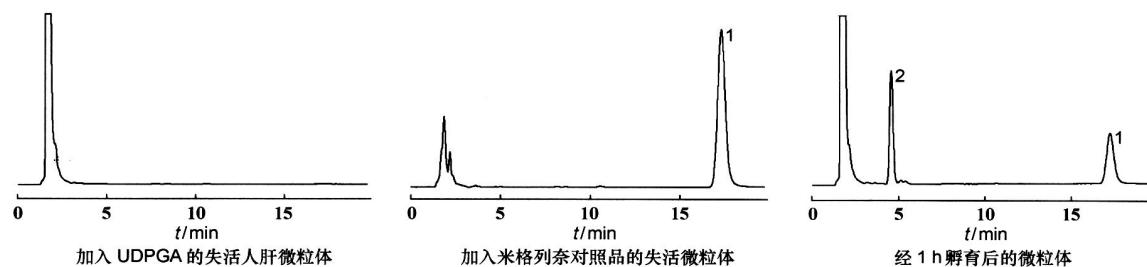
色谱柱: Diamonsil- C_{18} 柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.02 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 缓冲液(pH 4.0)(43:57);流速:1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;紫外检测波长:210 nm;进样量:20 μL 。在上述色谱条件下,米格列奈与其代谢物峰形良好,保留时间分别为4.5和16.8 min,见图2,微粒体中杂质不干扰样品测定。

标准溶液的配制

精密称取米格列奈钙对照品适量,置10 mL量瓶中,用甲醇溶解定容成100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液作为储备液。并用甲醇逐步稀释制成0.5, 1, 5, 10, 25和50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液作为标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

测定方法

取人肝微粒体适量,用二相代谢缓冲液(50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.04% Triton X-100)稀释成1 mg蛋白 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液,取此混悬液196 μL ,加一定浓度的米格列奈甲醇溶液2 μL 混匀。于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵育5 min,然后加入2 μL UDPGA(3 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.5磷酸缓冲液配制)启动反应。孵育一定时间后加200 μL 冰冷的乙腈终止反应。13 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液20 μL 进样。色谱图见图2。



1:米格列奈, 2:米格列奈葡萄糖醛酸结合物

图 2 HPLC 色谱图

线性关系

取不同浓度米格列奈钙甲醇溶液,加到失活的微粒体悬浮液中,使反应液中的米格列奈的最终浓度分别为5, 10, 50, 100, 250, 500和1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按“4”项下方法进行色谱分析,记录米格列奈的峰面积。以米格列奈的浓度(x , mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,米格列奈的对应峰面积(y)为纵坐标线性回归,得线性方程为: $y = 8\,683.2x - 5\,121.1$ ($r = 0.9999$, $n = 7$)。米格列奈钙在5~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。最低检测浓度为2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$),最低定量浓度为5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($RSD < 5\%$, $n = 5$)。

精密度和回收率

取不同浓度米格列奈钙甲醇溶液,加到失活的微粒体悬浮液中,使反应液中的米格列奈的最终浓度分别为10, 50和250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按“4”项下方法进行色谱分析,记录米格列奈的峰面积。带入标准曲线求出样品浓度,将求得的浓度与已知加入浓度相比,计算血清中米格列奈的相对回收率及日内、日间精密度。结果见表1。另取标准储备液适量,用流动相制成相应浓度的米格列奈溶液,进样得峰面积,将两组峰面积进行比较,计算米格列奈在人肝微粒体中的绝对回收率。结果见表1。

表 1 血清中米格列奈的回收率和日内、

浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	日间精密度 $n = 5$			
	绝对回收 率 / %	相对回收 率 / %	日内 RSD / %	日间 RSD / %
10	99.0	102.6	1.5	4.8
50	92.8	100.1	1.6	4.0
250	91.6	99.8	1.4	3.8

稳定性考察

取按“4”项下方法制备的浓度分别为 15, 50 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品, 在 4 条件下放置 0, 4, 12, 24 和 48 h 后进样分析。结果表明, 4 保存条件下该底物均稳定。

分析方法在酶动力学参数测定中的应用

利用上述所建的分析方法, 测定了人肝微粒体中米格列奈的酶动力学参数 ($n = 3$)。米格列奈的浓度范围为 20 ~ 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按“4”项下操作, 微粒体蛋白浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育时间 30 min。动力学参数的计算用 GraphPad 软件进行非线性回归, 以 Michaelis-Menten 方程计算, 如图 3。得 K_m 为 (357 \pm 25.8) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{max} 为 (0.063 \pm 0.010) $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ 蛋白 $^{-1}$, CL_{int} 为 (0.18 \pm 0.04) $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ 蛋白 $^{-1}$ 。

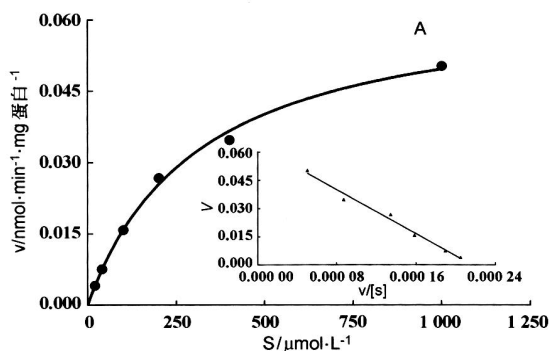


图 3 人肝微粒体中米格列奈葡萄糖酸化的酶动力学

讨论

实验考查了乙腈-水、乙腈-0.5%乙酸水和乙腈-KH₂PO₄ 缓冲液等流动相条件。发现当以乙腈-水、乙腈-0.5%乙酸水为流动相时米格列奈峰形拖尾严重, 柱效较差。而改用乙腈-KH₂PO₄ 缓冲液时峰形和柱效都较好, 说明流动相中适当的离子强度对改善米格列奈的色谱行为非常关键。通过条件摸索, 最后选用的流动相条件为乙腈-0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 4.0) (43-57), 在该条件下底物和代谢物分离良好且内源物不干扰测定。

本实验建立的 HPLC 方法, 简便、专属性强、灵敏以及准确性和重复性好, 能用于米格列奈的体外二相代谢研究。

【作者简介】 徐君辉 (1978 -), 男, 硕士研究生。联系电话: (0571) 86971871, E-mail: sailing001xjh@yahoo.com.cn

【通讯作者】 钱伯初 (1939 -), 男, 研究员, 硕士生导师, 中国药理学会理事, 主要从事抗老年病药物开发研究。联系电话: (0571) 88215627, E-mail: qianbochu@yahoo.com.cn

【参考文献】

- [1] 陈小勇, 彭润涛, 江宇. 治疗糖尿病新药米格列奈 [J]. 中国医药情报, 2004, 10 (2): 28 - 31.
- [2] OHNOTA H, KITAMURA T, KNUKAWA M. A rapid- and short-acting hypoglycemic agent KAD-1229 improves postprandial hyperglycemia and diabetic complications in streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1996, 71 (4): 315 - 323.
- [3] YU LS, YAO TW, ZENG S. *In vitro* metabolism of zolmitriptan in rat cytochromes induced with α -naphthoflavone and the interaction between six drugs and zolmitriptan [J]. *Chin Biol Interact*, 2003, 146 (3): 263 - 272.

编辑: 周卓 接受日期: 2008 - 04 - 17

欢迎订阅和投稿中国科技核心期刊《中国药师》杂志

《中国药师》杂志由国家食品药品监督管理局主管, 月刊, 大 16 开, 132 页, 国内外公开发行, 2009 年每期定价 15 元, 邮发代号 38-325, 国内统一刊号 CN 42-1626/R, 国际标准刊号 ISSN 1008-049X, 是我国第一本面向工作在不同岗位上的全体药师的专业期刊, 也是广大临床医师的询药指南。杂志辟有研究论文、继续教育、药学进展、药学与临床、研究报告、药品监管、综述与专论、社会药学、科技交流、医药信息等栏目。编辑部开发运行了界面友好更为实用的远程稿件处理系统, 作者与编审者沟通便捷, 稿件审理及刊发大为提速。杂志已连续 6 年承办国家级刊授继续教育项目, 成为广大药师、医师学术交流和继续教育之必备。杂志用户中心 <http://www.tgzgys.org>; 电子信箱 acjpe077@public.wh.hb.cn, tg@zgys.org; 编辑部地址: 武汉市兰陵路 2 号; 邮编 430014; 电话: (027) 82778580, 82835077。