文章编号:1000-5404(2005)11-1117-03

论著

复方盐酸二甲双胍片中格列本脲和二甲双胍溶出度的考察

石 英,刘松青 (第三军医大学西南医院药学部,重庆 400038)

提 要:目的 考察并比较自制复方二甲双胍片中格列本脲、二甲双胍与对照药格列本脲片、二甲双胍片的溶出度。**方法** 以HPLC法测定含量,用转篮法测定溶出度,并就溶出度进行比较。**结果** 经检测制剂工艺不同的格列本脲、二甲双胍体外溶出度均符合《中国药典》2005年版的规定,但溶出参数各不相同。**结论** 经统计学处理,因制剂工艺不同,复方二甲双胍片中格列本脲溶出度有显著性差异而二甲双胍溶出度差异不显著。

关键词:格列本脲;二甲双胍;溶出度;HPLC法
中图法分类号:R313;R914.3;R977.15 **文献标识码**:A

Investigation on the dissolution rates of glibenclamide and metformin in compound metformin hydrochloride

SHI Ying, LIU Song-qing (Department of Pharmacology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the dissolution rates of glibenclamide and metformin in compound metformin hydrochloride. **Methods** The concentrations of the glibenclamide and metformin were determined by HPLC method. The rotating basket method was used to measure and compare the dissolution rates of glibenclamide and metformin between the compound metformin hydrochloride and conventional tablets. **Results** The dissolution rates of glibenclamide and metformin with different preparation came up to the standard of CHP (2005), but the dissolution parameters were different. **Conclusion** The dissolution rate of glibenclamide indicated significant difference between the compound metformin hydrochloride and the conventional tablets, and no significant difference for metformin.

Key words: glibenclamide; metformin; dissolution rate; HPLC method

复方二甲双胍片是由格列本脲和盐酸二甲双胍组成的复方制剂。格列本脲属于第2代磺酰脲类口服降糖药,主要通过刺激胰岛功能细胞的胰岛素释放而发挥急性降糖作用;二甲双胍可降低肝糖元的异生,促进组织摄取葡萄糖[1,2]。临床上将这两种降糖药组成复方制剂,用以改善Ⅱ型糖尿病患者的血糖控制。据国外文献报道,磺酰脲类药物的粒度与生物利用度有相关性,格列本脲与盐酸二甲双胍组成复方制剂后,格列本脲的粒度范围直接影响复方制剂口服生物利用度。为此本研究采用转篮法,对自行研制的复方二甲双胍片中格列本脲、二甲双胍溶出度进行考察,并与普通二甲双胍片、格列本脲片进行比较。

1 仪器与试药

ZRS-4智能溶出仪(天津大学无线电厂);waters1526高效液相色谱仪,电子天平(Sartorius, 德国);微孔滤膜及过虑装置(Millipore USA);超纯水器(Milli-Q plus USA, Millipore公司)。

格列本脲、二甲双胍标品由中国药品生物制品检定所提供;复方二甲双胍片自制(每片含格列本脲1.25 mg,二甲双胍250 mg);格列本脲片(天津药物研究院药业有限责任公司,批号:021018,2.5 mg/片);二甲双胍片(上海医药集团有限公司中华药业分工司生产,批号:031201,250 mg/片);甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.2 测定方法的建立

1.2.1 二甲双胍测定方法的建立 色谱柱:EC250/4.6N-UCLEOSIL100-5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:CH_3OH:H_2O (7:3, V/V);每100 ml流动相中加50 μl二乙胺,用H_3PO_4调pH至3.45;流速:1.0 ml/min,检测波长229 nm,柱温30 ℃,灵敏度0.02 AUFS;进样量20 μl。

精密量取储备液适量,用超纯水稀释成50.0、25.0、10.0、5.0、2.5、0.5 μg/ml系列的浓度,将各浓度标准溶液进样20 μl于高效液相色谱仪中进行分析,将二甲双胍色谱峰峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程:$A = 4.75 \times 10^4 C - 2.02 \times 10^4$, $r = 0.999\,9$, $n = 6$。结果表明二甲双胍浓度在0.5~50.0 μg/ml范围内呈良好线性关系。

取空白溶出介质加入二甲双胍标准液(1 000 μg/ml)适量,使成为高、中、低3种不同浓度(0.5、10.0、50 μg/ml),按药物浓度测定方法进行浓度测定,3种浓度的日内和日间(5 d)RSD均未大于2.35%。

作者简介:石 英(1976-),女,四川省蓬安县人,药剂师,主要从事临床药理方面的研究。电话:(023)68765495

收稿日期:2005-03-17;修回日期:2005-04-20

取二甲双胍对照品储备液适量，用空白溶出介质稀释，得浓度分别为0.5、10.0、50.0 μg/ml的3种二甲双胍样品，按药物浓度测定方法进行浓度测定，以测得浓度与配制浓度的比值计算回收率，结果3种浓度的平均回收率均小于101.3%。

以二甲双胍色谱峰峰面积为指标，取一定浓度的二甲双胍溶出液进行的稳定性考察。结果表明：二甲双胍色谱峰峰面积在8 h内无变化，说明二甲双胍在选定的溶出介质中是稳定的，对溶出结果无影响，能满足试验要求。

1.2.2 格列本脲测定方法的建立 色谱柱 waters symmetry shieldC18 (3.9 mm×150 mm, 5 mm)；流动相：甲醇：磷酸二氢铵缓冲液(称取磷酸二氢铵1.725 g加水300 ml溶解，用H_3PO_4调pH值至3.5)(5:3 V/V)；流速1 ml/min；检测波长：274 nm；柱温：30 ℃；进样量20 μl。

取格列本脲对照品储备液适量，用甲醇超声溶解后稀释至刻度摇匀，吸取储备液适量，用0.02% Tris溶液稀释成0.5、1、2、3、4、5、10 μg/ml系列的浓度，将各浓度标准溶液进样20 μl于高效液相色谱仪中进行分析，将格列本脲峰面积(A)对浓度(C)进行回归，得回归方程：$A = 3.44 \times 10^3 C - 2.85 \times 10^2$，$r = 0.999\,9$，$n = 7$。结果表明：格列本脲浓度在0.5～10 μg/ml范围内呈良好线性关系。

取空白溶出介质加入格列本脲标准液(1 000 μg/ml)适量，使成为高、中、低3种不同浓度(1.0、3.0、10.0 μg/ml)，按药物浓度测定方法进行浓度测定，3种浓度的日内和日间(5 d)RSD均未大于3.56%。

取格列本脲对照品储备液适量，用空白溶出介质稀释，得浓度分别为1.0、3.0、10.0 μg/ml的3种格列本脲样品，按药物浓度测定方法进行浓度测定，以测得浓度与配制浓度的比值计算回收率，结果3种浓度的平均回收率均小于103.2%。

以格列本脲色谱峰峰面积为指标，取一定浓度的格列本脲溶出液进行的稳定性考察。结果表明：格列本脲色谱峰峰面积在8 h内无变化，说明格列本脲在选定的溶出介质中是稳定的，对溶出结果无影响，能满足实验要求。

2 结果

2.1 二甲双胍溶出度测定

参照《中国药典》(2005年版二部)溶出度测定法(附录XC第一法)，采用转篮法[3]。转速为100 r/min，将精密称重且片重差异合格的复方二甲双胍片和二甲双胍片各6片分别加入1 000 ml已恒温于(37.0±0.5)℃的蒸馏水介质中，分别于2.5、5、15、30、45 min定时定点取样5 ml(同时补充同温介质5 ml)，立即经0.8 μm滤膜滤过(自取样至滤过应在30 s内完成)，进行测定。结果见表1。

将以上溶出百分率数据输入计算机进行威布尔分布的计算机求解[4]，求出两种二甲双胍制剂的平均溶出参数T_{50}、t_0、m等，结果见表2。

2.2 格列本脲溶出度测定

参照《中国药典》(2005年版二部)溶出度测定法(附录XC第三法)，将精密称重且片重差异合格的复方二甲双胍片和格列本脲片各6片分别以250 ml 0.02% Tris溶液为溶出介质，温度为(37±0.5)℃，转速为75 r/min，分别于2.5、5、15、30、45 min取样2 ml立即经0.8 μm滤膜滤过(自取样至滤过应在30 s内完成)，同时补充同温等量溶出介质2 ml，样液代入标准曲线，计算药物浓度，并按标示量计算累积溶出百分率，结果见表3。

表1 二甲双胍片的累积溶出百分率(%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The percentage of accumulated dissolution rate of metformin (%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Sample	Time (t/min)				
	2.5	5	15	30	45
Compound metformin hydrochwride tablets	54.22±1.62	84.77±1.66	85.53±1.70	86.00±1.72	86.43 ±3.25
Metformin hydrochlride tablets	39.77±3.55	84.92±2.52	88.03±0.62	88.65±0.79	89.26±0.68

表2 二甲双胍威布尔拟合方程及参数

Tab 2 Weibull's simulated equation and parameters of metformin

Sample	Equation	R	τ	to	m	T_{50}
Metformin hydrochlride tablets	Y=0.632 2+0.042 23X	0.999 5	2.500 0	0.531 4	0.042 2	2.500 0
Compound metformin hydrochwride tablets	Y=0.593 7+0.026 99X	0.999 8	2.500 0	0.552 3	0.027 0	2.500 0

表3 格列本脲的累积溶出百分率(%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The percentage of accumulated dissolution rate of glibenclamide (%，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Samples	Time (t/min)				
	2.5	5	15	30	45
Compound metformin hydrochwride tablets	17.09±2.98	52.42±2.07	86.83±2.66	94.39±1.54	96.71±4.40
Glibenclamide tablets	16.85±2.48	31.46±1.16	58.95±1.99	74.99±2.43	79.39±2.25

将以上溶出百分率数据输入计算机进行威布尔分布的计算机求解[4]，求出两种格列本脲制剂的平均溶出参数T_{50}、t_0、m等，结果见表4。

表4 格列本脲威布尔拟合方程及参数

Tab 4 Weibull's simulated equation and parameters of glibenclamide

Sample	Equation	R	τ	to	m	T_{50}
Compound metformin hydrochwride tablets	Y=−0.806 0+0.557 78X	0.998 7	2.29	2.23	0.55	4.48
Glibenclamide tablets	Y=−1.636 4+0.571 16X	0.998 6	1.60	5.13	0.57	10.83

3 讨论

按《中国药典》(2005年版)格列本脲片项下要求，其45 min的溶出量应不低于70%，本实验所测两种格列本脲片的溶出度均符合要求，由于盐酸二甲双胍与格列本脲的极性相差较大，本制剂中两药含量相差也大(每片含格列本脲1.25 mg，二甲双胍250 mg)很难采用同一溶出介质对其溶出行为进行评价，我们参照《中国药典》(2005年版二部)相关方法，建立了相应的溶出度测定条件。并以国内已经上市的单一品种作为参

照制剂,采用威布尔参数的比较方式对本室自制复方制剂的两种成份进行溶出度评价。分析结果表明,复方二甲双胍片中二甲双胍的溶出特性与普通二甲双胍片相似,而格列本脲的溶出特性与普通格列本脲片差异,复方二甲双胍片中格列本脲的溶出速率快于普通片。

口服药物进入胃肠道后,必须经过崩解、溶出才能被机体吸收,溶出速度在一定程度上能反映药物的吸收情况,可作为固体制剂的质量控制指标。测定药物的溶出度,研究药物的溶出曲线并计算出若干溶出参数,对控制药品质量尤其对难溶性药物来讲显得尤为重要。据文献报道,磺酰脲类药物的粒度与生物利用度有相关性,格列本脲与盐酸二甲双胍组成复方制剂后,格列本脲的粒度范围直接影响复方制剂口服生物利用度。因此,国外已上市同品种对其格列本脲的粒度进行了限定:5% 不得大于 6 μm,50% 不得大于 10 μm,75% 不得大于 21 μm 以保证制剂的生物利用度,我们自行研制的复方二甲双胍片采用先将格列本脲溶解后加入二甲双胍混合干燥制粒压片方法,与常规粉末直接压片法比较,理论上使格列本脲呈"超微粒度"状态,这可能是本实验复方二甲双胍片中格列本脲溶出度高于普通格列本脲片的原因,这也再次证明了含格列本脲的制剂必须考虑微粉化工艺、固定原料药的粒度,并订入原料药内控标准,以保证质量的一致性。

参考文献:

[1] 简龙海, 李丽敏, 丁　黎, 等. 盐酸二甲双胍/格列本脲复方片剂在人体的药代动力学[J]. 中国药理学报, 2004, 20(3): 334 - 337.

[2] 杜小莉, 张翠莲. 降血糖新药——格列本脲和盐酸二甲双胍复合片[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(11): 869 - 871.

[3] 中华人民工和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 2005 年版二部. 北京:化学工业出版社,2005. 73.

[4] 彭永富, 董　慧. 药物溶出度 Weibull 分布的计算机求解[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(10): 606 - 608.

(编辑　汪勤俭)

(上接 1112 页)

2　结果

2.1　蓝白斑筛选重组 BacmidtLBP 及 pBacmidtLBP 的 PCR 鉴定

本实验通过转座成功获得白色菌落。经电泳发现了 1 条转座了 pFASTBACtLBP 的 Bacmid DNA 条带(3.0 kb)。

2.2　细胞转染鉴定

经 3 代病毒扩增,取细胞沉淀用 PCR 扩增出 695 bp 的 tLBP 目的基因。

2.3　病毒空斑计数及感染复数计算

病斑分析根据空斑数和病毒稀释度即得到噬斑形成单位(pfu),再除以感染细胞数即得感染复数(MOI)。

$$\text{感染复数(MOI)} = \frac{4.2 \times 10^7}{5 \times 10^6} = 8$$

2.4　重组 tLBP 蛋白 SDS-PAGE

经特异洗脱纯化后鉴定,当咪唑洗脱物浓度达到 100 mmol/L 时,其洗脱物即为特异的目的纯化蛋白产物。

3　讨论

BAC-TO-BAC 杆状病毒表达体系是近年来发展迅速的一种快速、高效、便捷的新型表达系统。通过位点特异的转座可方便地将外源基因插入到杆状病毒穿梭载体上,然后提取含有外源基因的重组 Bacmid,将其转染入昆虫细胞即可获得含有外源基因的重组病毒用于表达目的蛋白[2]。

在目前常用的昆虫宿主表达体系中,sf9 主要适用于病毒的扩增和悬浮培养用作规模化蛋白表达,sf21 由于细胞较大而适合某些蛋白的高水平表达,而 High Five 细胞是分泌性蛋白高水平表达的理想宿主细胞,其表达效率是其它昆虫细胞的 25 倍,并且该细胞能快速适应无血清培养基和悬浮培养。通常由于相对低的细胞密度与产物浓度的局限,限制了批量培养昆虫细胞和大量获得表达产物,同时,昆虫细胞培养过程中需氧量较高,而为提高氧传递率使用的搅拌、通气等手段产生的气体泡末和剪切应力又容易引起细胞的损伤和死亡[3,4]。

随着基因工程技术的不断发展,逐渐认识到昆虫细胞杆状病毒表达系统也存在一些局限性,如使用的是杆状病毒晚期启动子,重组产物的加工可能存在不完全;通过多次感染的长期连续传代后,病毒的感染能力会有下降等。这就迫切需要建立稳定的转化细胞表达系统,如新近开发的 Insect Select 系统等,它是一个简单而直接的表达系统,具有高表达的杆状病毒即刻早期蛋白启动子和快速纯化稳定转化细胞系的 Zeocin 抗性基因。该系统无需杆状病毒感染就能获得高产量的表达,免除了蓝白斑纯化和重组杆状病毒的扩增,用该系统表达的产物其分泌性和糖基化程度远优于 BEVS 表达系统[4]。因此,昆虫细胞杆状病毒表达系统将不断完善和发展,必将广泛应用于生物学、农科学以及医药学的基因工程研究和开发。

关键词: 杆状病毒;sf21 昆虫细胞;N 端脂多糖结合蛋白

中图法分类号: R37　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 王晓东, 刘友生, 张　杰, 等. 人截断型 LBP 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建[J]. 第二军医大学学报, 2001, 23(6): 637 - 640.

[2] 张　杰, 薛沿宁, 郑　莉, 等. 重组人可溶性 CD14 在昆虫细胞表达系统中的表达[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(3): 184 - 187.

[3] Donaldson M, Wood H A, Kulakosky P C, *et al*. Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 63(3): 255 - 262.

[4] 周亚竞, 张志芳, 张元兴, 等. 昆虫细胞培养研究进展[J]. 蚕业科学, 2000, 26(增刊 1): 74 - 78.

(编辑　王　红)