DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.015

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0886-03

格列美脲大鼠小肠吸收的研究

张 蓉[1],卢来春[1],蒋学华[2] ([1]第三军医大学新桥医院药学部,重庆 400037;[2]四川大学华西药学院,成都 610041)

提 要:目的 研究格列美脲的小肠吸收方式。方法 利用大鼠在体肠吸收模型,以高效液相色谱法测定格列美脲在小肠吸收速率。结果 在低、高2种给药剂量下,格列美脲在大鼠小肠的平均吸收速率分别为0.2336 h^{-1}、0.2178 h^{-1}。结论 格列美脲在大鼠小肠内吸收方式可能为被动扩散。

关键词:格列美脲;小肠吸收;被动扩散;高效液相色谱法
中图法分类号:R965;R977.15 文献标识码:A

Small intestinal absorption manners of glimepiride in rats

ZHANG Rong[1], LU Lai-chun[1], JIANG Xue-hua[2] ([1]Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Pharmacology, West China College of Pharmacology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To study the small intestinal absorption patterns of glimepiride in rats. Methods A rat model of small intestinal absorption *in vivo* was employed in this study. The small intestinal absorption rate of glimepiride was detected by high performance liquid chromatography. Results At the low and high concentrations of glimepiride, the average small intestinal absorption rates were 0.233 6 h^{-1} and 0.217 8 h^{-1}, respectively. Conclusion The small intestinal absorption pattern of glimepiride might be passive diffusion.

Key words: glimepiride; small intestinal absorption; passive diffusion; high performance liquid chromatography

格列美脲(glimepiride, GM)是一种长效的磺脲类(sulphonylurea, SU)降糖药,由于其疗效好,安全,于1995年由美国食品与药物管理局(FDA)推荐用于治疗2型糖尿病[1,2]。目前,格列美脲已广泛应用于国内临床,但对其小肠吸收方式的研究国内外尚少见报道。本实验利用大鼠在体肠吸收生物模型,对格列美脲胃肠道吸收方式进行了初步研究,以期为临床合理用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与实验动物

格列美脲(四川普渡制药厂,纯度≥98.5%);酚红(上海试剂三厂);戊巴比妥(上海试剂总厂,进口分装);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其它试剂均为分析纯。Wistar大鼠(四川大学动物室)。

1.2 仪器

LC-6A高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-250紫外可见分光光度计(日本岛津);HL-2型恒流蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂);电磁搅拌器(上海南汇电讯器材厂);pHS-25酸度计(上海雷磁仪器厂);CQ250超声波清洗器(上海超声波仪器厂);电子天平(Sartorius,德国)。

1.3 样品测定方法

1.3.1 在体肠吸收生物模型的实验原理 被动扩散是消化道吸收的最重要途径,用Fink方程式可以定量描述这一过程。参照文献[3],Fink方程式经变换后,则有 $lnX = lnX_0 - Ka \cdot t$ 式中X_0为吸收前初始药量;X为吸收后剩余药量;t吸收时间。以时间t对lnX作图应为一条直线,其直线斜率为药物在小肠中的表观吸收速率常数Ka。

1.3.2 循环液中酚红样品测定方法

1.3.2.1 空白肠循环液的配制参照文献[3],配制空白肠循环液(Kerbs Ringer营养液,以下简称KR液)取氯化钠7.8 g,氯化钾0.35 g,氯化钙0.37 g,碳酸氢钠1.37 g,磷酸二氢钠0.32 g,氯化镁0.02 g,葡萄糖1.4 g,置1 000 ml容量瓶中,蒸馏水溶解稀释至刻度,即得。

1.3.2.2 酚红测定波长的选择 取空白循环溶液、格列美脲、酚红溶液,按酚红样品测定方法(2.3.2)制备后在400~700 nm范围内扫描,由扫描图谱可知,在酚红测定波长555 nm处,格列美脲及其它物质无吸收,对酚红测定无干扰。

1.3.2.3 酚红测定方法 取样品液0.5 ml,置洁净试管中,加入0.2 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH溶液5 ml,摇匀,在岛津UV-250可见分光光度计上于555 nm处测定吸收度。

1.3.2.4 酚红标准曲线的制备 取酚红约100 mg,精密称

作者简介:张 蓉(1973-),女,重庆市人,主管药师,主要从事心血管药理学方面的研究。电话:(023)68774720
通信作者:卢来春,电话:(023)68755401
收稿日期:2003-10-17;修回日期:2004-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定, 置 100 ml 量瓶中, 用 1% Na_2CO_3 溶液溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即得 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的酚红贮备液。精密量取酚红贮备液适量, 用蒸馏水稀释成浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的酚红对照品溶液, 按样品测定方法, 自"取样品液 0.5 ml"起, 依法操作, 测定吸收度。以吸收度 A 为纵坐标, 浓度 C($\mu g \cdot ml^{-1}$)为横坐标进行线性回归, 方程如下: $A = 0.01541 \times C - 0.0085$, $n = 6$, $r = 0.9999$, $P < 0.001$。

1.3.2.5　回收率实验　　精密量取酚红贮备液不同量, 用蒸馏水稀释成高、中、低浓度(2.5、20、60 $\mu g \cdot ml^{-1}$)的酚红对照品溶液, 按样品制备方法, 自"取样品液 0.5 ml"起, 依法操作, 测定吸收度。标准曲线计算浓度, 以测得量与加入量之比计算回收率。酚红高、中、低浓度得回收率分别为(101.72±1.14)%、(99.92±2.18)%、(100.21±1.18)%。

1.3.2.6　精密度实验　　精密量取酚红贮备液适量, 用 Kerb's Ringer 营养液稀释成低、中、高浓度(2.5、20.0、60.0 $\mu g \cdot ml^{-1}$)的酚红对照品溶液, 按样品测定方法测定。以 1 d 内测定的 5 次结果, 计算日内精密度, 5 d 内测定的 5 次结果计算日间精密度。结果见表 1。结果表明: 日内 RSD≤2.23%, 日间 RSD≤4.52%。

1.3.3　循环溶液中格列美脲的 HPLC 法测定

1.3.3.1　色谱条件　　对测定波长和流动相的选择, 确定色谱条件为:

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ)

流动相: 甲醇—磷酸盐缓冲液(65∶35, V/V), pH=3.5; 流速: 0.8 $ml \cdot min^{-1}$; 检测波长: 244 nm; 进样量: 20 μl。

表 1　酚红样测定精密度实验结果($n=5$)

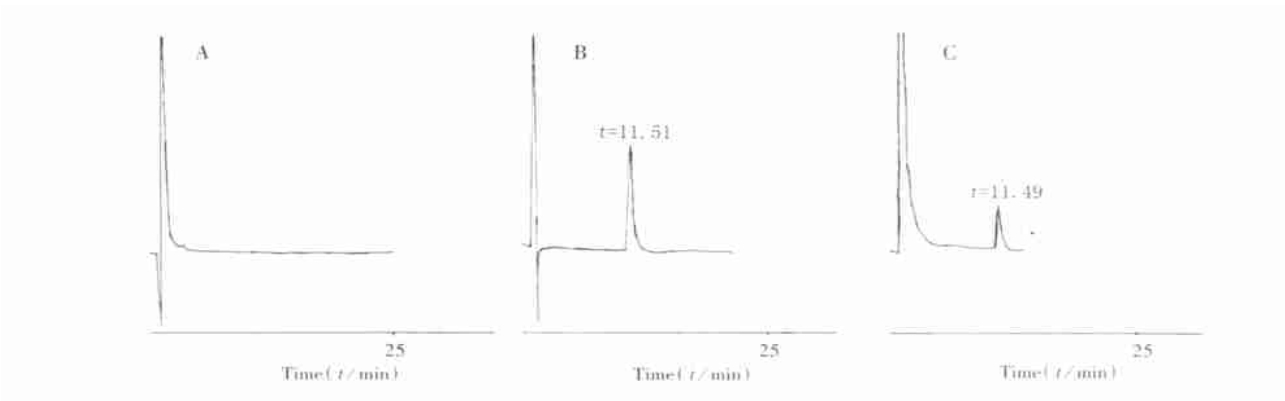
Tab 1　Within-day and inter-day RSD of phenol red concentration determination ($n=5$)

Drug concentration ($\mu g \cdot ml^{-1}$)	Within-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
2.50	2.23	4.52
20.0	0.98	2.34
60.0	1.97	3.33

1.3.3.2　格列美脲供试品溶液的配制　　取格列美脲不同量, 分别用空白循环溶液配成每 100 ml 约含格列美脲 600、1 200 μg 的循环溶液, 分别作为低、高剂量供试液。

1.3.3.3　方法可行性考察　　分别取空白循环溶液、格列美脲对照品溶液及供试品溶液, 进样, 在上述色谱条件下分离测定, 色谱图分别见图 1 中 A、B、C。

由色谱图可见, 格列美脲对照品贮备液在约 11.5 min 处出峰, 供试品溶液的主峰保留时间与对照品一致。其它共存组分在此条件下无干扰。



A: Blank chromatograph　　B: Standard chromatograph　　C: Sample chromatograph

图 1　格列美脲 HPLC 色谱图

Fig 1　Glimepiride chromatogram

1.3.3.4　标准曲线的制备　　取格列美脲对照品约 10 mg, 精密称定 10.00 mg, 置 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得格列美脲(400.0 $\mu g \cdot ml^{-1}$)的贮备液, 并稀释为 160.0、64.0、25.6、10.2 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的系列浓度的溶液, 置 4 ℃冰箱中保存。分别于 0.5 ml Kerb's Ringer 营养液中精确加入格列美脲的系列浓度的溶液 25 μl, 得 20.0、8.0、3.2、1.28、0.512 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的标准溶液, 振荡, 混匀。用 0.45 μ 的微孔滤膜过滤后, 取 20 μl 进样, 记录不同浓度标准液的 A, 以 A 值为纵坐标, 以格列美脲浓度 C 为横坐标, 直线回归, 标准曲线方程为 $A = -3834.9 + 32109.3 \times C$ ($n=5$), ($r=0.9999$, $P<0.001$)。结果表明: 浓度在 0.512~20.0 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 范围内, 格列美脲浓度 C 与峰面积 A 有良好的线性关系。

1.3.3.5　回收率实验　　精密称取对照品一定量, 用空白循环溶液稀释配制得 18.0、7.2、0.72 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 3 种不同浓度的格列美脲供试品溶液, 进样 20 μl, 在上述色谱条件下分离测定, 记录色谱图与格列美脲峰面积, 标准曲线计算浓度。以测定浓度与加入浓度之比计算回收率。

结果表明: 格列美脲低、中、高浓度的回收率分别为: (101.67±2.68)%、(98.77±2.31)%、(102.14±0.89)%。

1.3.3.6　精密度实验　　精密量取格列美脲适量, 用 Kerb's Ringer 营养液稀释成低、中、高 3 种浓度(0.512、8.0、20.0 μg/ml)的对照品溶液, 按样品测定方法测定。以 1 d 内测定的 5 次结果, 计算日内精密度, 5 d 内测定的 5 次结果计算日间精密度, 结果见表 2。结果表明: 日内 RSD≤1.78%, 日间 RSD≤2.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

39%。

表2 格列美脲精密度实验结果($n=5$)

Tab 2 Within-day and inter-day RSD of glimepiride concentration determination ($n=5$)

Drug concentration ($\mu g \cdot ml^{-1}$)	Within-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
0.512	1.78	2.39
8.0	1.20	1.57
20.0	0.96	1.52

1.3.3.7 稳定性实验 取高、低两种浓度的格列美脲供试品溶液,置37 ℃水浴中,分别于0、1.0、2.0、4.0 h取样,进行测定,以峰面积为指标,结果表明:格列美脲在37 ℃肠循环液中4 h内稳定,对药物的测定结果无影响。

2 结果

2.1 动物实验设计

取健康雄性wisrar大鼠10只,采用随机数字表法分为高、低2个剂量组。取供试液100 ml(100 ml KR溶液含格列美脲一定量,酚红约2 mg),加入循环装置的三角烧瓶中。将实验前禁食12 h,体质量约为200 g的雄性Wistar大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠溶液($40 mg \cdot kg^{-1}$),麻醉后固定,沿腹中线打开腹腔(约2.5 cm长),采用直径适当的玻璃管做胃肠道插管,将玻璃管与蠕动泵的胶管连接,组成循环回路。开动蠕动泵,用37 ℃的生理盐水,以$5 ml \cdot min^{-1}$的流速循环约10 min,直至肠内容物洗净。实验开始前自上述三角烧瓶中取样1 ml(0.5 ml×2份)作为格列美脲和酚红零时间的样品,并补加酚红1 ml,其后于15、30、60、90、120、150、180 min取样各1次(0.5 ml×2份),同时补加酚红1 ml。

表3 格列美脲的大鼠在体小肠吸收动力学参数

Tab 3 Results of the absorption kinetics of glimepiride in rat small intestines *in vivo*

	No	Dose (μg)	Ka (h^{-1})	$T_{1/2}$ (h)	Absorption fraction (%)	Correlation (r)
	1	584	0.223	3.11	45.8	0.983
Lower	2	564	0.273	2.54	53.7	0.982
dose	3	583	0.252	2.75	48.0	0.991
group	4	600	0.245	2.85	50.3	0.995
	5	594	0.175	3.96	36.5	0.985
	Mean	—	0.233 6	3.042	46.86	0.987 2
	1	1 176	0.234	2.962	39.2	0.968
Upper	2	1 230	0.209	3.316	44.7	0.963
dose	3	1 154	0.196	3.536	44.9	0.988
group	4	1 192	0.212	3.269	44.2	0.992
	5	1 174	0.238	2.912	39.4	0.982
	Mean	—	0.217 8	3.199	42.48	0.978 6

2.2 实验结果

计算各时间点的剩余药量($X_{剩余}$)。以$X_{剩余}$值的对数和取样时间t作图,利用公式$\ln X_{剩余} = \ln X_0 - Ka \times t$,求出表观吸收速率常数Ka,吸收半衰期$t_{1/2}$。格列美脲的吸收药动学参数见表3。结果表明:在低、高2种给药剂量下,格列美脲在大鼠小肠的平均吸收速率分别为$0.233\ 6\ h^{-1}$、$0.217\ 8\ h^{-1}$,其平均相关系数分别为0.9872、0.9786,故格列美脲的吸收方式可能为被动扩散。

3 讨论

研究药物小肠吸收的方法很多,主要有体内法、在体法和离体法,本实验参照文献[3~6],采用大鼠在体小肠吸收法。实验中不损伤大的血管和神经,药物透过上皮细胞后即被血液运走。通过直接测定药物在小肠腔内的药物浓度的消失来计算药物的小肠表观吸收速率,其特点是能真实的反映药物在消化道内的变化。

温度对本实验结果的影响较大,尤其在寒冷的冬季,因此,在实验中,应采取措施使供试液保持在37 ℃左右,同时,用温水浸泡的棉纱敷在实验大鼠的腹部,对其保湿保温。

由于酚红不被小肠吸收,当小肠吸收水分后,酚红被浓缩,可以用来校正小肠中水的吸收量,以准确的计算药物的吸收量。

采用大鼠在体肠吸收模型得到格列美脲的大鼠小肠吸收方式为被动扩散,其吸收半衰期约为3.2 h。提示本品在小场内吸收缓慢,制备普通制剂即可满足临床要求。

参考文献:

[1] Campbell R K. Glimepiride: role of a new sulfonylurea in the treatment of type2 diabetes mellitus[J]. Ann Pharmacother, 1998, 32(10): 1044—1052.

[2] Dhindsa P, Davis K R, Donnelly R. Comparison of the micro- and macrovascular effects of glimepiride and gliclazide in metformin-treated patients with Type 2 diabetes: a double-blind, crossover study[J]. Br J Clin Pharmacol, 2003, 55(6): 616—619.

[3] 陆 彬. 药剂学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 131—135.

[4] 陈 军, 易以木. 脱氧胆酸对胰岛素聚乳酸纳米粒在大鼠小肠吸收的影响[J]. 中国临床药学杂志, 2002, 11(6): 343—346.

[5] 王淑丽, 陈济民. 苏子油乳剂小肠吸收动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(1): 1—4.

[6] 刘 璐, 崔景斌, 方洪壮. 替硝唑大鼠小肠吸收的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 4—6.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net