

高原低氧环境对二甲双胍多次给药后在 2 型糖尿病大鼠体内药动学影响

罗林¹, 黄冬², 张晓静², 李文斌², 王荣^{1,2}

(1 兰州大学药学院, 兰州 730000; 2 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**探讨高原低氧环境对二甲双胍在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠体内多次给药后药动学参数的影响。**方法:**采用 LC-MS/MS 法, Gemini C₁₈ (75 mm × 3 mm, 3 μm) 色谱柱进行分离, 流动相为乙腈-水-甲酸 (85:15:0.1, v/v/v), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量为 2 μL, 内标为雷尼替丁。12 只 T2DM 大鼠随机分为平原组和高原组, 连续灌胃给药二甲双胍 7 d, qd, 并于 d7 给药前和给药后 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 采集血样进行检测, 使用 DAS 2.0 软件对血药浓度-时间数据进行模拟拟合以计算药动学参数。**结果:**与平原组大鼠相比, 高原低氧环境下大鼠体内二甲双胍的 T_{max} 、清除率 (CL_{Z/F}) 和平均滞留时间 (MRT) 分别延长了 29.03%, 33.25% 和 44.98% ($P < 0.05$), 同时 AUC 增加了 46.22% ($P < 0.01$)。**结论:**高原低氧环境下二甲双胍多次给药后在 T2DM 大鼠体内清除减慢。

[关键词] 高原环境; LC-MS/MS; 2 型糖尿病大鼠; 二甲双胍; 多次给药; 药动学

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)12-1253-06

Effects of high-altitude hypoxia environment on pharmacokinetics of metformin after multiple administration in type 2 diabetes mellitus rats

LUO Lin¹, HUANG Dong², ZHANG Xiao-jing², LI Wen-bin², WANG Rong^{1,2}

(1 School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2 Department of Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force, PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the effects of high-altitude hypoxia environment on the pharmacokinetic parameters of metformin after multiple administration in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Methods:** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) was used, separation was conducted by a Gemini C₁₈ (75 mm × 3 mm, 3 μm) column, the mobile phase was acetonitrile-water-formic acid (85:15:0.1, v/v/v), the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, the injection volume was 2 μL, and the internal standard was ranitidine. T2DM rats were randomly divided into plain group and plateau group, and were given continuous gavage once a day for 7 days, and on the 7th day blood samples were collected before administration and at 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h after administration for determination of drug concentration. The DAS 2.0 software was used to simulate and fit the plasma concentration-time data to calculate the pharmacokinetic parameters. **Results:** Compared with the rats in the plain group, the peak time (T_{max}), clearance rate (CL_{Z/F}) and average residence time (MRT) of metformin were prolonged by 29.03%, 33.25% and 44.98% ($P < 0.05$) in the rats under high-altitude environment, respectively. The AUC increased by 46.22% ($P < 0.01$). **Conclusion:** The elimination of metformin is slowed down in T2DM rats after multiple administration under high-altitude hypoxia environment.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (82173738)

[作者简介] 罗林, 男, 硕士研究生, 研究方向: 药动学。E-mail: windguy@163.com。

[通讯作者] 王荣, 男, 博士, 教授, 主任药师, 研究方向: 药动学。E-mail: wangrong-69@163.com。

[Key words] high altitude environment; LC-MS/MS; type 2 diabetes mellitus rats; metformin; multiple administration; pharmacokinetics

随着社会发展、国防事业的需要和旅游业的兴起等,越来越多的人前往高原地区工作与生活^[1]。高原在医学上通常是指海拔 > 2 500 m 的地区^[2],机体在高原低氧、低气压等特殊环境下会产生一系列生理性变化,这些变化影响药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄,即高原环境显著影响药物在机体内的药动学特征^[3-4]。药动学是合理用药的基础,因此研究药物在高原环境下的药动学变化具有重要意义。

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 主要特征为胰岛素抵抗合并胰岛 β 细胞功能受损,为目前的高发型糖尿病,且 T2DM 患者数逐年上升^[5-6],高原环境下糖尿病患者人群占比 4.6%^[7]。盐酸二甲双胍是经典的治疗 T2DM 的口服降糖药,一直是国内外权威指南推荐的治疗 T2DM 的首选药物,且是相关联合用药的基础用药^[8-9]。已有文献报道^[10],高原低氧环境对二甲双胍单次给药后在大鼠体内的药动学影响,但多次给药后,低氧环境对二甲双胍在 T2DM 大鼠体内的药动学影响尚未见报道。

糖尿病属于需要长期用药的疾病,故探讨高原低氧环境对二甲双胍多次给药后在 T2DM 大鼠体内的药动学参数的影响具有一定的重要意义。

材料与方法

1 试剂

甲醇(色谱纯,批号:I1108107033)和乙腈(批号:JA107230,色谱纯)购于德国 MERCK 公司;甲酸(美国 DIMA 公司,批号:14117,色谱纯);二甲双胍对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100664-201805,纯度:99.9%);雷尼替丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y29D7C27738,纯度 \geq 98%);灭菌注射用水(四川科伦药业有限公司,批号:M21041807C);盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:ABZ4043);高糖高脂饲料(北京博泰宏达生物技术有限公司,批号:2021070601);链脲佐菌素(德国 Bio Froxx 公司,批号:EZ6789D136);血糖试纸(罗氏血糖健康医护公司);胰岛素 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20210630)等。

2 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);

API3200 三重四级杆串联质谱仪(美国应用生物系统公司);SH8200H 超声波清洗器(上海科导超声波仪器有限公司);Microfuge22R 型冷冻离心机(BECKMAN COULTER 公司);ME-240 型万分之一电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司);卓越型罗氏血糖仪(罗氏血糖健康医护公司)。

3 实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 18 只,6 周龄,体质量为 180~220 g(北京斯贝福生物技术有限公司),动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物相关实验已获中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会审批通过,审批编号:2021KYLL189。

4 LC-MS/MS 条件

色谱条件:Gemini C₁₈(75 mm × 3 mm, 3 μ m) 色谱柱,流动相为乙腈/水/甲酸(85:15:0.1, v/v/v),流速 0.4 mL·min⁻¹,进样量为 2 μ L,分析时间 3 min。

质谱条件:采用正离子多反应(MRM)模式、电喷雾离子源(ESI)进行检测,喷雾电压(IS)为 4 100 V,温度(TEM)为 350 $^{\circ}$ C。二甲双胍的碰撞能量(CE)为 28.0 psi,去簇电压(DP)为 22.0 psi;雷尼替丁的 CE 为 21.0 psi,DP 为 15.0 psi。

5 标准曲线及内标溶液的配制

二甲双胍溶液:精密称取 0.002 00 g 二甲双胍对照品,溶于甲醇,配制成浓度为 200 μ g·mL⁻¹的二甲双胍储备液,4 $^{\circ}$ C 储存备用。

雷尼替丁溶液(内标溶液):精密称取 0.002 00 g 雷尼替丁对照品,溶于甲醇,配制成浓度为 200 μ g·mL⁻¹的雷尼替丁储备液,4 $^{\circ}$ C 储存。使用前用甲醇将其稀释为 0.5 μ g·mL⁻¹的工作液。

6 血浆样品的前处理

取大鼠血浆 50 μ L 于离心管内,加入 20 μ L 的内标溶液,同时加入 150 μ L 的乙腈,涡旋震荡 60 s 后,4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后吸取上清液进样分析。

7 二甲双胍及内标雷尼替丁 MS 扫描结果

通过考察二甲双胍及内标雷尼替丁的断裂方式和 MS 扫描响应情况,确定二甲双胍用于定量分析的离子反应的质荷比为 m/z 130.20 \rightarrow 71.00(见图 1),内标雷尼替丁用于定量分析的离子反应的质荷比为 m/z 315.20 \rightarrow 176.00(见图 2)。

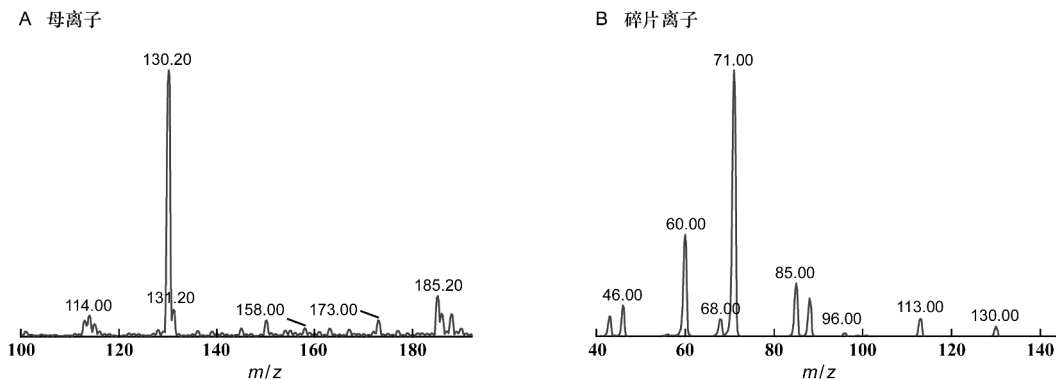


图 1 二甲双胍扫描质谱图

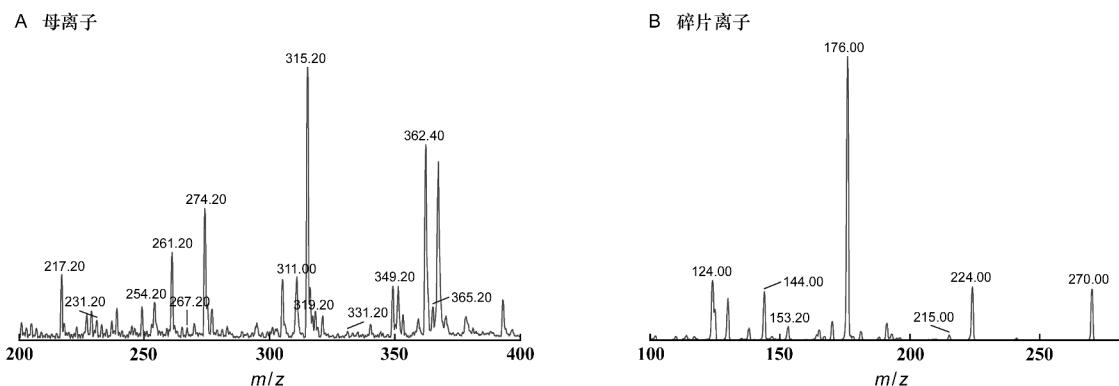


图 2 雷尼替丁扫描质谱图

8 方法学考察

8.1 专属性 取大鼠空白血浆、空白血浆配制的二甲双胍对照品及二甲双胍给药后大鼠血浆样品,按“6”项方法处理后上样分析。结果见图 3,血浆中的

杂质对二甲双胍和内标雷尼替丁的测定无明显干扰,二甲双胍和内标的保留时间分别为 0.80,0.83 min,表明该方法选择性好、专属性强。

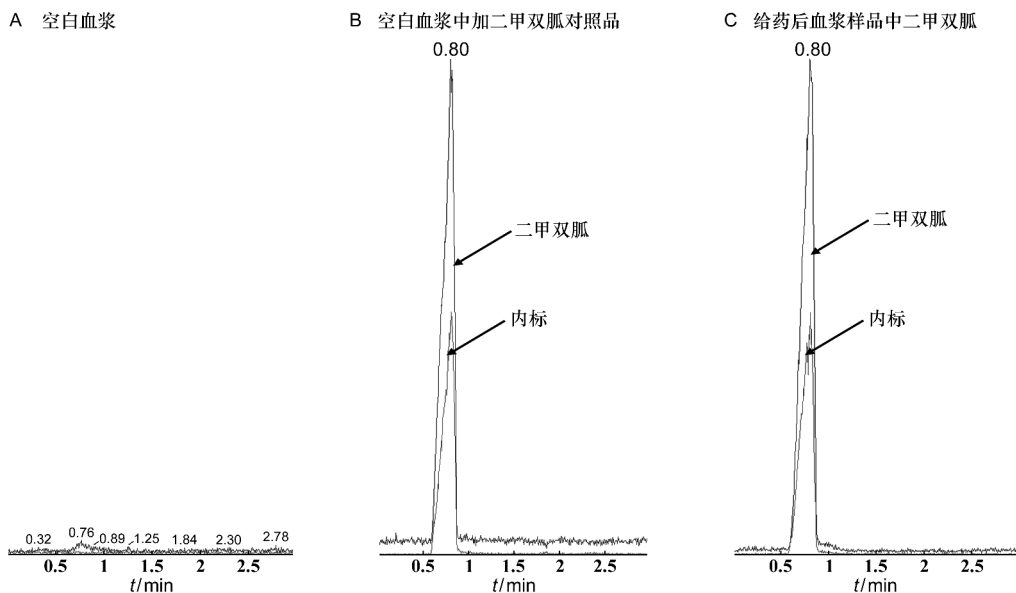


图 3 二甲双胍及内标色谱图



8.2 线性范围 使用大鼠空白血浆将二甲双胍储备液依次稀释成浓度为 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆溶液, 即二甲双胍标准曲线溶液。通过“6”项方法处理血浆样品并上样分析。以待测物浓度为横坐标, 待测物的峰面积与内标峰面积比值为纵坐标, 得二甲双胍在大鼠血浆中的标准曲线。

方程为: $Y=0.00163X+0.00265$ ($r=0.9990$, 权重为 $1/X^2$)。结果表明, 二甲双胍血浆浓度在 0.025 ~ 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 定量下限为 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 信噪比 (S/N) > 10。

8.3 精密度及准确度 分别配制浓度为 0.05, 2, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的二甲双胍质控样品, 按“6”项方法处理后并上样分析。结果如表 1 所示: 血浆中二甲双胍的日内、日间准确度在 98.32% ~ 102.60% 之间, 精密度 RSD 值在 0.88% ~ 5.37% 之间, 符合方法学要求。

表 1 大鼠血浆中二甲双胍分析方法的精密度与准确度 $n=5$

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	批内		批间	
	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%
0.05	98.32	4.27	102.60	5.37
2	99.84	2.81	99.26	1.74
16	100.63	0.88	99.38	1.91

8.4 基质效应 分别配制浓度为 0.05, 2, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的二甲双胍质控样品, 按“6”项方法处理后上样分析, 其响应值与相同浓度的二甲双胍甲醇溶液比较, 比值分别为 90.51%, 93.06%, 98.90%, RSD 分别为 2.95%, 2.71%, 0.60% ($n=5$)。该结果表明待测物受基质效应干扰程度低, 符合要求。

表 2 大鼠血浆中二甲双胍基质效应 $n=5$

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	基质效应/%	RSD/%
0.05	90.51	2.95
2	93.06	2.71
16	98.90	0.60

基质效应为 5 次测定的平均值

8.5 加样回收率 分别配制浓度为 0.05, 2, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的二甲双胍质控样品, 按“6”项方法处理后上样分析, 测定待测物峰面积为 A_1 ; 另取大鼠空白血浆同法处理后, 配制相同浓度的样品, 测定待测物峰面积为 A_2 。提取回收率/% = $A_1/A_2 \times 100\%$ 。

结果表明, 二甲双胍在 0.05, 2, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的提取回收率分别是 95.90%, 96.24%, 97.33%, RSD 值分别是 3.29%, 3.09%, 2.72% ($n=5$)。

表 3 大鼠血浆中二甲双胍回收率 $n=5$

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
0.05	95.90	3.29
2	96.24	3.09
16	97.33	2.72

8.6 稳定性 分别配制浓度为 0.05, 2, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的二甲双胍质控样品, 以室温放置 24 h, -80 °C 反复冻融 3 次及 -80 °C 放置 10 d 考察样品的稳定性。按照“6”项方法处理并分析, 经上述条件保存后, 二甲双胍的准确度 (RE) 在 98.80% ~ 100.4% 以内, 精密度 RSD 在 0.18% ~ 2.31% 之间, 符合分析要求 ($n=5$)。

表 4 大鼠血浆中二甲双胍稳定性 $n=5$

条件	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	RSD/%
室温 24 h	0.05	100.40	1.85
	2	99.64	0.71
	16	99.00	0.70
-80 °C 冻融 3 次	0.05	101.20	2.31
	2	99.84	1.02
	16	100.02	0.18
-80 °C 放置 10 d	0.05	98.80	2.17
	2	100.36	0.61
	16	100.13	0.28

9 药动学研究

18 只大鼠随机分为空白组 (6 只) 和模型组 (12 只), 模型组大鼠高糖高脂饲料饲养 4 周后, 腹腔注射 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 按体重给药 (bw) 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 建立 T2DM 大鼠模型, 空白组给予普通饲料。当大鼠空腹血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 且出现胰岛素抵抗时, 则表明模型建立成功。将造模成功的 12 只 T2DM 大鼠随机分为平原组和高原组, 每组 6 只。平原组大鼠、高原组大鼠分别于中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 (甘肃兰州, 海拔 1 500 m)、全军高原重点实验室 (玉树巴塘, 海拔 4 010 m) 开展实验。2 组大鼠连续灌胃 (ig) 给予 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ bw 二甲双胍 7 d, qd, 并于 d 7 给药前和给药后 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 眼眶取血, 4 °C 条件下 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液于

-80 ℃ 保存。2 组实验结束后,高原组血浆样品放置于大量干冰中,陆路转运至兰州,与平原组样品同时测定分析。

10 数据处理

将所得血药浓度-时间数据用 DAS 2.0 软件分析计算药动学参数。采用 SPSS 21.0 软件统计处理数据,结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间实验采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

结 果

1 平均血药浓度-时间曲线

采用 LC-MS/MS 分析方法测定多次 *ig* 给予二甲双胍后二甲双胍在 T2DM 大鼠体内的血药浓度,其平均血药浓度-时间曲线见图 4。

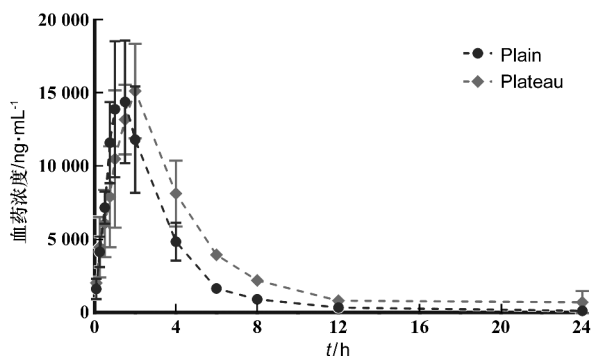


图 4 大鼠 *ig* 给予 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 二甲双胍的平均血药浓度-时间曲线图 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

2 药动学参数比较研究

采用 DAS 2.0 药动学软件拟合计算各组大鼠二甲双胍在体内的药动学参数,结果见表 5。

表 5 多次给药平原组与高原组 T2DM 大鼠二甲双胍药动学参数 $\bar{x} \pm s, n = 6$

参数	$80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, ig$	
	平原组大鼠	高原组大鼠
$AUC_{(0-1)} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	51.68 ± 8.73	75.57 ± 2.55^b
$AUC_{(0-\infty)} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	51.83 ± 8.63	75.80 ± 2.69^b
$MRT_{(0-1)} / \text{h}$	3.45 ± 0.74	5.00 ± 0.92^a
$MRT_{(0-\infty)} / \text{h}$	3.50 ± 0.78	5.17 ± 1.01
$t_{1/2\alpha} / \text{h}$	2.34 ± 0.66	2.59 ± 0.71
T_{\max} / h	1.29 ± 0.42	1.67 ± 0.47^a
$C_{\max} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	15.15 ± 4.00	15.55 ± 2.02
$CL_{z/F} / \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	1.58 ± 0.24	1.06 ± 0.04^a
$V_{z/F} / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	5.34 ± 1.69	3.92 ± 0.97

与平原组大鼠相比, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

与平原组相比,二甲双胍在高原组大鼠体内 T_{\max} 增加 [$(1.29 \pm 0.42) \text{ h}$ vs $(1.67 \pm 0.47) \text{ h}$], C_{\max} , $t_{1/2\alpha}$ 无明显变化 [$(15.15 \pm 4.00) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $(15.55 \pm 2.02) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(2.34 \pm 0.66) \text{ h}$ vs $(2.59 \pm 0.71) \text{ h}$], $CL_{z/F}$ 减慢 [$(1.58 \pm 0.24) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs $(1.06 \pm 0.04) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$], $MRT_{(0-1)}$ 显著延长 [$(3.45 \pm 0.74) \text{ h}$ vs $(5.00 \pm 0.92) \text{ h}$], $AUC_{(0-1)}$ 明显增加 [$(51.68 \pm 8.73) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ vs $(75.57 \pm 2.55) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$]。结果表明:在高原环境下,二甲双胍多次给药后在大鼠体内清除减慢,生物利用度显著增加。

讨 论

T2DM 属于血糖代谢异常的慢性疾病,需要长期使用降糖药物以维持血糖的平衡。因此监测药物长期使用的体内代谢过程就尤为重要^[11],研究高原环境下降糖药物多次给药后药动学如何变化,可为高原 T2DM 患者合理用药提供一定参考。

二甲双胍是 T2DM 的首选药物,因而我们考察了 T2DM 大鼠连续 *ig* 给药二甲双胍 7 d 后,其在大鼠体内的药动学变化。结果表明与平原组相比,高原 T2DM 大鼠组 AUC 增加, $MRT_{(0-1)}$ 和 T_{\max} 延长, $CL_{z/F}$ 降低,提示多次给药后,二甲双胍在 T2DM 大鼠体内存在蓄积,清除减慢。

二甲双胍口服经小肠吸收后,不经肝脏代谢,以原形的形式经肾脏排泄。高原低氧环境引起的二甲双胍蓄积可能是由缺氧导致肾组织损伤^[14-15]、肾功能受损所致;同时缺氧也可能引起介导二甲双胍代谢的转运体表达发生变化,延缓其在体内代谢转运过程^[16]。同时机体组织处于高糖环境下,可能会对药物在体内的生物转化有所影响^[17]。

[参 考 文 献]

- [1] 李梦馨,黄雅倩,李永平. 高原缺氧脑损伤分子机制的研究进展[J]. 中外医学研究, 2022, 20(2): 177-180.
- [2] 崔强,王洪瑾,李毅,等. 富氢盐水对高原环境下烧伤小鼠肠道损伤的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 10-17.
- [3] WENBIN L, RONG W, HUA X, et al. Effects on pharmacokinetics of propranolol and other factors in rats after acute exposure to high altitude at 4,010 M[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(1): 27-36.
- [4] HUI L, RONG W, ZHENG-PING J, et al. Effects of high altitude exposure on physiology and pharmacokinetics [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17(6): 559-565.
- [5] SANCHEZ-RANGEL E, INZUCCHI SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1586-1593.
- [6] ZHOU TT, XU X, DU MF, et al. A preclinical overview of met-

- formin for the treatment of type 2 diabetes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1227 - 1235.
- [7] 张泽鑫, 罗樱樱, 刘林, 等. 拉萨地区藏族成年人糖尿病前期及糖尿病患病率初步调查分析[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(8): 567 - 571.
- [8] HOSTALEK U, GWILT M, HILDEMANN S. Therapeutic use of metformin in prediabetes and diabetes prevention[J]. *Drugs*, 2015, 75(10): 1071 - 1094.
- [9] KAWANAMI D, TAKASHI Y, TANABE M. Significance of metformin use in diabetic kidney disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4239.
- [10] 年永琼. 模拟高原低氧对盐酸二甲双胍和对乙酰氨基酚药代动力学特征的影响[D]. 西宁: 青海大学, 2019.
- [11] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315 - 409.
- [12] 刘艳琴, 张璇, 彭莹莹, 等. 稳定同位素稀释-液相色谱串联质谱法测定血清中的 25-羟基维生素 D2 和 25-羟基维生素 D3 含量[J]. *分析仪器*, 2021(6): 32 - 38.
- [13] 付信珍, 谢则平, 李志, 等. 大鼠血浆中大麻二酚超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测及代谢动力学研究[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(9): 1513 - 1518.
- [14] CARGILL KR, CHIBA T, MURALI A, *et al*. Prenatal hypoxia increases susceptibility to kidney injury[J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0229618.
- [15] ULLAH MM, BASILE DP. Role of renal hypoxia in the progression from acute kidney injury to chronic kidney disease[J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(6): 567 - 580.
- [16] MARUTHUR NM, TSENG E, HUTFLESS S, *et al*. Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(11): 740 - 751.
- [17] KARSLIOGLU FRENCH E, DONIHI AC, KORYTKOWSKI MT. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic syndrome: review of acute decompensated diabetes in adult patients[J]. *BMJ*, 2019, 365: l1114.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022 - 08 - 24