

健康人血浆中内源性左卡尼汀及其酰化物的浓度研究^Δ

荆凡波^{1,2*}, 曲海军¹, 朱莉¹, 王春波², 曹玉¹, 隋忠国^{1#} (1. 青岛大学医学院附属医院, 青岛市 266003; 2. 青岛大学医学院, 青岛市 266071)

中图分类号 R969.1; R971; R972 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2010)42-3965-03

摘要 目的: 探讨健康中国人食用标准饮食时血浆中内源性左卡尼汀(LC)及其酰化物浓度的变化, 对其内源性LC及其酰化物的水平作系统的研究。方法: 12名健康受试者均食用标准饮食, 分别于禁食10h后, 于0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0h时取5mL前臂静脉血, 分离血浆后, -20℃保存。采用高效液相色谱-荧光法测定血浆中LC、乙酰左卡尼汀(ALC)、丙酰左卡尼汀(PLC)的浓度。结果: 食用标准饮食时, LC、ALC、PLC 0h的血药浓度分别为(40.25±5.32)、(2.33±0.62)、(0.61±0.22)μmol·L⁻¹; 平均血药浓度分别为(40.31±5.44)、(2.34±0.47)、(0.62±0.15)μmol·L⁻¹。各时间点、不同性别受试者之间的血药浓度差异均无统计学意义(P>0.05)。结论: 本方法可用作人体内源性LC及其酰化物血浆浓度的检测。

关键词 左卡尼汀; 乙酰左卡尼汀; 丙酰左卡尼汀; 高效液相色谱-荧光法; 血浆浓度

Study on Plasma Concentrations of L-carnitine and Its Acyl Esters in Healthy Volunteers

JING Fan-bo, QU Hai-jun, ZHU Li, CAO Yu, SUI Zhong-guo (The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

JING Fan-bo, WANG Chun-bo (Medical College, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the plasma concentration of L-carnitine (LC) and its acyl esters (ALC, PLC) in the healthy Chinese volunteers given standard diet, and to study the levels of endogenous LC and its acyl esters systematically. METHODS: 12 healthy subjects given standard diet were selected. 5 mL blood sample of forearm vein was collected at 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h after 10 h of fasting. Plasma was separated and kept at -20 °C. The concentrations of LC, ALC and PLC in plasma were measured by HPLC-fluorescence method. RESULTS: The plasma concentrations of LC, ALC and PLC at 0 h were (40.25 ± 5.32) μmol·L⁻¹, (2.33 ± 0.62) μmol·L⁻¹ and (0.61 ± 0.22) μmol·L⁻¹ respectively. The mean plasma concentrations of LC, ALC and PLC were (40.31 ± 5.44) μmol·L⁻¹, (2.34 ± 0.47) μmol·L⁻¹ and (0.62 ± 0.15) μmol·L⁻¹, respectively. There was no significant difference in plasma concentration of different sex groups at different time points (P>0.05). CONCLUSION: The method can be used for the plasma concentration determination of LC and its acyl esters.

KEY WORDS L-carnitine; Acetyl-L-carnitine; Propionyl-L-carnitine; HPLC-fluorescence method; Plasma concentration

血压疾病中有着相当广泛的应用。3年来各类抗高血压药的同步性均较好, 说明抗高血压药已有稳定、规范的市场。

由表2、表3可见, 3年来DDD最大的的是硝苯地平。硝苯地平是第一代钙通道阻滞类抗高血压药, 其通过抑制钙离子内流作用, 松弛血管平滑肌, 扩张周围小动脉, 降低外周阻力使血压下降, 但钙通道阻滞药类第一代药物半衰期较短, 存在生物利用度低、量效关系难以预测、起效快、易引发反射性心动过速、心悸和头痛等不良反应。由于硝苯地平上市时间很长, 价格较低, 适用于合并多种并发症的高血压, 较其它降压药更能降低脑卒中的相对危险等众多优点, 在较长一段时间内, 对高血压的防治依然占有重要的地位。新一代钙通道阻滞药左氨氯地平为长效抗高血压药, 它与硝苯地平作用机制相似, 但半衰期延长, 副作用减少, 是更优于硝苯地平的同类药物。该药的DDD值处于4或6位, 销售金额的市场占有率在2008年排序第1, 但同步性仅为0.25, 说明价格较高, 阻碍了该药在临

床上的推广。DDD排在第2、3位的分别为ACEI类依那普利及ARB类替米沙坦, 这2个药物均作用于血管紧张素系统, 降压长效、平稳、高效, 不良反应少, DDC较低, 使得在临床上被大多数患者接受。在销售金额排序前10位的抗高血压药中, 大部分集中在钙通道阻滞药、ACEI及ARB的第2、3代产品。除硝苯地平外, 多数药同步性均<1, 说明这些药品价格较高, 但由于疗效稳定, 副作用较少, 在临床上也得到了广泛应用。

我国临床应用的抗高血压药种类繁多, 城乡地域差别很大。上述分析表明, 重庆地区20家医院抗高血压药市场倾向较为明显的药物为新型钙通道阻滞药、ACEI及ARB。抗高血压药应用总体上是合理的, 符合现代用药方式, 能根据实际症状, 选择安全、有效及价格合适的降压药, 无滥用倾向。

参考文献

- [1] 孙俊. 抗高血压临床用药研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(20): 1588.
- [2] 陈新谦, 金有豫, 汤光主编. 新编药理学[M]. 第16版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 1.
- [3] 张丽霞, 赵海燕, 张石革, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂的研究与应用进展[J]. 中国药房, 2007, 18(35): 2784.

(收稿日期: 2009-07-30 修回日期: 2010-04-07)

Δ 科技部国家科技支撑计划(2008BAI54B02)

* 主管药师。研究方向: 临床药学、药事管理。电话: 0532-82911799。E-mail: jingbf178@sina.com

通讯作者: 副主任药师。研究方向: 临床药学、药事管理。电话: 0532-82911277。E-mail: jingbf178@sina.com

外源性左卡尼汀(LC)及其酰化物——乙酰左卡尼汀(ALC)、丙酰左卡尼汀(PLC)作为药物在临床治疗中的地位和作用已经成为国内、外研究的热点,在神经系统疾病、心血管系统疾病、肝脏疾病、慢性肾病等方面均具有良好的治疗作用。由于左卡尼汀及其酰化物又是人体内源性物质,主要通过肝脏和肾脏合成,因此探讨内源性左卡尼汀及其酰化物的血浆浓度具有重要的临床应用价值。然而这方面的研究目前只有国外的报道^[1~5],且只是报道了左卡尼汀的参数,而同时考察人体内源性左卡尼汀及其酰化物的水平国内、外^[1~6]均未见报道。笔者旨在通过建立左卡尼汀及其酰化物血浆浓度的高效液相色谱-荧光法,对健康中国人内源性左卡尼汀及其酰化物的水平作一系统的研究。

1 材料

1.1 仪器

2695 高效液相色谱仪,包括 474 荧光检测器(美国 Waters 公司); AE240 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 80-2 离心机(江苏金坛市宏华仪器厂); MS1 Minishaker 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

1.2 试剂

LC 对照品(东北制药总厂,批号:060701); ALC 对照品(美国 Sigma 公司,批号:C005814); PLC 对照品(美国 Sigma 公司,批号:C005653); LC 衍生化试剂:1-氨基蒽(1-AA)(美国 Sigma 公司); 1-乙基-(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)(瑞士 Fluka 公司)。甲醇、乙腈为色谱纯,丙酮、磷酸二氢钠、氯仿等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵(34:66); 流速:1.0 mL·min⁻¹; 检测波长:248 nm(激发波长)、418 nm(发射波长); 进样量:50 μL。

2.2 受试者选择

选择健康受试者 12 名,男、女各半,无脱落。排除患有急、慢性疾病正在治疗或刚刚治愈者。年龄 18~25 周岁,平均年龄(20.1±2.30)岁。受试者的体质量按体质量指数=体质量(kg)/身高²(m²)计算,为(21.34±2.81)kg·m⁻²。体检结果均合格。试验前 2 周内未服任何药物和饮酒,禁止吸烟。试验方案经青岛大学医学院附属医院医学伦理委员会审核通过,且受试者试验前签署知情同意书。

2.3 试验设计

符合入选条件的 12 名健康受试者,随机确定试验顺序,试验前 3 d 起一直统一进食标准饮食,采血前禁食 10 h,分别于试验开始后 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 时进行采血。采血期间进标准饮食和饮水。取前臂静脉血 5 mL,置肝素试管中,3 000 r·min⁻¹离心,分离血浆后,-20℃保存、备测。使用柱前衍生化高效液相色谱-荧光法测定血浆中 LC、ALC、PLC 浓度。

2.4 衍生化试剂的配制

准确称取 1-AA 160 mg,用丙酮溶解并定容至 10 mL,得浓度为 16 mg·mL⁻¹的 1-AA 溶液;取 EDC·HCL 1 600 mg,用 0.01 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠(pH 3.5)溶解并定容至 10 mL,即得(该溶液须用前配制)。

2.5 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL,加入乙腈 500 μL,涡旋混合 1 min,10 900 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液 500 μL,依次加入 pH 3.5 磷酸缓冲液 400 μL,1 mol·L⁻¹盐酸 20 μL,涡旋混合,加入 1-AA 溶液 100 μL,边涡旋边缓慢加入 EDC 溶液 100 μL,混匀后避光、室温反应 30 min。衍生化过程完成后,用乙醚连续洗涤 2 次,每次 3 mL,取出乙醚相,在水相中加入 pH 9.1 磷酸缓冲液 800 μL,同样涡旋混合,用三氯甲烷洗涤 2 次,每次 3 mL,取水相 500 μL,加入 pH 3.5 磷酸缓冲液 500 μL,涡旋混合后取 50 μL 进样分析。

2.6 统计学处理

统计学方法采用配对 *t* 检验和 *F* 检验方法,*P*<0.05 为数据间差异具有统计学意义。

2.7 线性关系的考察

用空白血浆和对照品配制成不同浓度的标准溶液,按“2.5”项下方法处理并测定,记录色谱。以样品峰面积(*Y*)为纵坐标,样品浓度(*X*)为横坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围见表 1。

表 1 回归方程及线性范围

组分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μmol·L ⁻¹
LC	$Y=3.8317X+29.4446$	0.9975	2.5~500
ALC	$Y=16.0380X-1.8620$	0.9962	0.25~50
PLC	$Y=13.0672X-5.1151$	0.9935	0.1~20

2.8 精密度试验

在标准曲线范围内配制低、中、高 3 种浓度标准血样,每种浓度分别测定 6 次,得 LC、ALC、PLC 血浆浓度的精密度,结果 *RSD* 均<1%。衍生化标准血样的色谱见图 1。

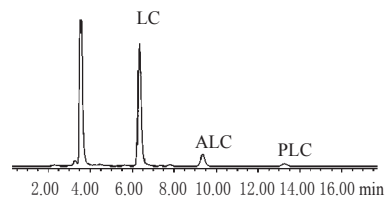


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.9 回收率试验

取低、中、高 3 种浓度的标准血样各 6 份,按“2.5”项下方法操作,计算测定浓度与理论浓度的比值,得回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果($\bar{x} \pm s$)

组分	低浓度回收率/%	<i>RSD</i> /%	中浓度回收率/%	<i>RSD</i> /%	高浓度回收率/%	<i>RSD</i> /%
LC	97.54±4.32	1.89	98.56±2.01	1.93	97.86±2.02	1.95
ALC	98.25±5.06	1.57	101.58±1.78	1.87	98.45±2.15	2.35
PLC	101.12±5.65	1.92	102.55±1.65	1.83	99.53±1.97	2.55

2.10 重复性试验

取同一浓度的标准溶液共 6 份,分别按“2.5”项下方法处理,进样测定。结果样品含量的平均值(*n*=6)为 25.11 μmol·L⁻¹,*RSD* 为 0.9%。表明此法重复性良好。

2.11 稳定性试验

取低、中、高 3 种浓度标准血样各 6 份,25℃放置,分别在 0、2.0、4.0、6.0 h 时测定,得各时间点的 LC、ALC、PLC 回收率,回收率结果范围为 98.26%~102.78% (*n*=6),表明血浆样品

室温放置6 h 稳定。

2.12 样品的测定

取受试者各时间点的血浆进行含量测定,得正常人血浆

表3 健康受试者各时间点血浆中LC、ALC、PLC的浓度($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组分	取样时间/h													
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0	6.0	8.0	12.0	24.0
LC	40.25±5.32	40.31±5.68	40.29±5.81	40.36±4.32	40.40±6.25	40.35±7.61	40.41±6.51	40.20±5.42	40.17±6.22	40.29±5.02	40.36±6.32	40.30±5.11	40.31±4.98	40.26±6.02
ALC	2.33±0.62	2.35±0.55	2.34±0.59	2.35±0.71	2.34±0.69	2.32±0.58	2.36±0.48	2.34±0.52	2.35±0.57	2.31±0.62	2.34±0.54	2.33±0.53	2.32±0.49	2.34±0.68
PLC	0.61±0.22	0.62±0.25	0.60±0.19	0.63±0.31	0.61±0.29	0.62±0.38	0.64±0.28	0.60±0.32	0.61±0.27	0.63±0.32	0.62±0.24	0.61±0.33	0.62±0.29	0.61±0.28

表4 不同性别健康受试者血浆中LC、ALC、PLC的平均浓度($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Tab 4 Mean plasma concentrations of LC, ALC and PLC ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

	LC	ALC	PLC
正常人	40.31±5.44	2.34±0.47	0.62±0.15
男性	42.12±6.15	2.46±0.78	0.69±0.19
女性	38.26±4.25	2.21±0.58	0.52±0.25

处理,结果时间因素和受试者因素的 F 值均<标准 F 值,即 P 值均>0.05,说明各时间点和受试者之间的LC、ALC、PLC的浓度差异无统计学意义。将不同性别受试者之间的血浆浓度进行组间 t 检验,结果不同性别之间的LC、ALC、PLC的浓度差异也无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

本试验在文献基础上建立了同时检测血浆中内源性的LC、ALC、PLC的方法,结果表明线性关系良好;并通过专属性、精密度、回收率、稳定性等方法学考查,表明该方法专属性强,检测快速、灵敏、稳定,符合本研究的要求,可以用来作为人体内源性左卡尼汀及其酰化物的血浆浓度的检测方法。

受试者试验前3 d和试验期间饮食以清淡饮食为主(不含肉类和乳制品),最大限度减少了外源性左卡尼汀对试验结果的干扰,使血浆浓度的测定结果能准确地反映内源性左卡尼汀的水平。

本试验通过检测12名受试者24 h时间点的血浆来得出健康中国人LC、ALC、PLC平均血浆浓度,通过试验结果发现各受试者之间和不同性别之间内源性左卡尼汀的血浆浓度差异无统计学意义,并且内源性左卡尼汀的血浆浓度保持稳定,没有时间节律的变化。因此在临床的给药方案中可以不考虑血浆浓度变化、个体差异等因素的影响。

国外文献报道^[1~9],白种健康人LC、ALC、PLC平均血浆浓度分别为50、6、1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,Angsten等^[7]报道白种健康人血浆中LC的含量约为ALC的30倍、PLC的80倍。本试验中健康中国人的结果略低于国外报道,分析可能与饮食习惯和种族的差异有关。因为已经有研究证明,空腹血浆LC水平与机体瘦体重呈正相关^[8],并且左卡尼汀主要的饮食来源是肉类(特别是瘦肉)和乳制品,中国人的饮食中肉食相对较少,而国外肉食偏多,可能是导致其平均血浆浓度偏低的原因。

健康中国人LC、ALC、PLC平均血浆浓度男性略高于女性,但数据差异无统计学意义,可能与大多数女性较男性偏重于素食有关。另根据Takiyama等^[9]报道,血浆LC水平与年龄和性别有关,女性体内的雌二醇能降低血浆LC水平,从而使血浆LC在性别间出现差异。

中各时间点的LC、ALC、PLC的浓度,并对各时间点平均值男、女性别之间进行比较,结果见表3、表4。

将12名受试者各时间点血浆浓度采用 F 检验进行统计学

左卡尼汀单次或多次给药的体内药动学国外已有报道,但国内目前还没有这方面的试验报道,致使左卡尼汀制剂的说明书中缺乏药动学的数据支持。因此,左卡尼汀制剂在中国人体内的药动学研究就显得尤为迫切。本试验的取样方案、检测方法以及最后得出的试验数据可以为进一步的药动学研究提供参考和依据。

参考文献

- [1] Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, *et al.* Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects[J]. *J Inherit Metab Dis*, 1999, 22(3):302.
- [2] Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, *et al.* Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(7):1 166.
- [3] Wiley V, Carpenter K, Wilcken B. Newborn screening with tandem mass spectrometry: 12 months' experience in NSW Australia[J]. *Acta Paediatr Suppl*, 1999, 88(432):48.
- [4] Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism[J]. *J Child Neurol*, 1999, 14(Suppl 1):4.
- [5] Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals [J]. *Biochem J*, 2002, 361(25):417.
- [6] 曹玉,朱莉,孙永旭,等. 衍生化HPLC法检测血浆、尿液左卡尼汀及其代谢产物[J]. *山东医药杂志*, 2008, 48(10):95.
- [7] Angsten G, Cederblad G, Meurling S. Reference ranges for muscle carnitine concentration in children[J]. *Ann Clin Biochem*, 2003, 40(4):404.
- [8] Pace S, Longo A, Toon S, *et al.* Pharmacokinetics of propionyl-L-carnitine in humans: evidence for saturable tubular reabsorption[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2000, 50(5):441.
- [9] Takiyama N, Matsumoto K. Age- and sex-related differences of serum carnitine in a Japanese population[J]. *J Am Coll Nutr*, 1998, 17(1):71.

(收稿日期:2010-07-02 修回日期:2010-08-24)