

重组,在一定程度上达到了内外兼治的效果,且治疗后疤痕减少,色素变淡,皮肤质地明显改善。像素激光结合皮下分离术后避免了单一疗法的缺点,提高了临床疗效,其见效快,效果肯定,患者感到非常满意。

二、相关解剖学研究

1. 解剖观察:选取 3 例具有面部凹陷性疤痕特征的新鲜中年男性尸体标本进行面部皮肤解剖,分别针对凹陷性疤痕部位与正常皮肤进行多处局部解剖采样。观察记录采样部位疤痕皮肤与正常皮肤的厚度、面积、色泽,结合显微观察对其进行评价。观察疤痕部位采样皮肤发现:疤痕面积大小和凹陷程度与皮下组织损伤有直接关联,最大面积多位于面部两侧 $0.40 \sim 0.80 \text{ mm}^2$,最小面积 $0.02 \sim 0.18 \text{ mm}^2$ 。疤痕部位皮肤色素沉着明显,经观察多呈红色及深红色,显微镜下显示:正常皮肤的厚度约为 $1.0 \sim 3.5 \text{ mm}$,其中眼睑部皮肤最薄 ($1.003 \pm 0.060 \text{ mm}$),鼻根部皮肤最厚 ($3.302 \pm 0.165 \text{ mm}$),其余部位,如额、三角区、下颌、面部两侧皮肤厚度均为 $1.40 \sim 2.97 \text{ mm}$ 之间。疤痕部位皮肤厚度明显变薄,比对应部位正常皮肤厚度减少 $0.30 \sim 1.10 \text{ mm}$ 不等,且减少的厚度与凹陷明显性成正比。另外显微观察发现表皮与真皮层及皮下组织血管损伤。

2. 皮下分离术解剖学机理分析:本病多由于患者自身处理不当,导致皮肤真皮层及皮下组织结构受到严重破坏及缺失,使皮肤内形成一定的空腔,内部残余组织愈合后形成畸形结构,尤其是纤维囊下沉,带动纤维束将表皮下拉形成凹陷。皮下分离术的微创方式能够在造成可控创伤的环境下,作用于疤痕深处,破坏病灶内的畸形纤维囊,切断纤维束,使表皮得到有效松解,在一定程度上能够通过皮肤自身的弹性缓解凹陷。同时激发皮肤自身再生修复功能,使其在没有其它因素限制下产生新的结缔组织,填充空腔,扩大真皮与表皮的接触面积,为表皮提供养分,帮助代谢,改善皮肤的凹陷程度。

讨论 现今导致面部皮肤出现凹陷性疤痕的原因有很多种,其中多数是由痤疮处理不当所致,最终遗留多数大小不等的凹陷性疤痕^[3]。对于这种原因造成的永久性疤痕,由于皮肤结构受到破坏,一般治疗方法和临床药物都难以产生效果,严重影响美观及人的心理、精神、生活等各方面^[4]。像素激光具有除皱、去斑、嫩肤、改善瘢痕、消除色沉、改善皮肤质地

的特性,且方便快捷、创伤微小、并发症少,世界范围应用较为广泛,技术成熟,与其它剥脱性治疗方法相比有很大的优势^[5]。但像素激光的焕肤作用只能改善皮肤质地,并不能从根本上改变已经受损的皮肤结构,所以单独使用疗程长,见效慢,疤痕远期恢复效果并不理想。皮下分离术通过手术方式能够直接作用于病灶区域,破坏损伤后形成的畸形结构,分离纤维束,松解凹陷部位紧缩的皮下纤维,造成可控创伤,促使皮肤在缺乏附加支持下产生新的结缔组织,结合像素激光真皮胶原热刺激作用,促进胶原蛋白的增长,引发弹性纤维的分泌与增殖。这两种治疗方法的结合,可以起到相互辅助的功效,患者痛苦少,疤痕恢复快,并发症少,外观改善大。

像素激光与皮下分离术的结合疗法具有微创、低痛、治疗时间短等特点,受到多数患者的青睐,患者在经过治疗后均得到了相对满意的疗效。但是,这种治疗方法存在疗程长、术后需长期服用药物、有一定的感染率等缺点,因此,选择好适应症是十分必要的。总之,像素激光结合皮下分离术经临床证实是一种安全、有效、便捷的治疗手段,同时避免了损伤性治疗产生的副作用,值得推广。

参 考 文 献

- [1] Carolyn I. Jacob, Jeffrey S. Dover, Michael S. Kaminer. Acne scarring: A classification system and review of treatment options. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001, 45(1): 109-117.
- [2] Sima Aalamiharandi, MD, Parsian Laser Clinic, Bandar Abbas, Iran; Eham Akbari, MD, Parsian Laser Clinic, Bandar Abbas, Iran; Kamran Balighi, MD, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Vahide Lajevardi, MD, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Subcision-suction method: A new highly effective treatment of atrophic acne scars and other depressed scars of the face. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011, 64(2): 14.
- [3] 顾伟程. 现代皮肤病性病治疗学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 537.
- [4] Albert E. Rivera. Acne scarring: A review and current treatment modalities. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008, 59(4): 659-676.
- [5] Elizabeth L, Tanzi, Jason R. Lupton, Tina S. Alster. Lasers in dermatology: Four decades of progress. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2003, 49(1): 1-31.

(收稿日期: 2013-02-07)

高效液相色谱-质谱法测定左卡尼汀的 药动学及生物利用度

张卫 苏东晖 钟华玉 蒋银送

【摘要】 目的 建立测定人血浆中左卡尼汀(L-carnitine, LC)浓度的方法,并研究其药动学特性及生物利用度。方法 采用双周期随机交叉试验设计^[1]。运用高效液相色谱-质谱法(LCMS)检测血浆中药物血药浓度^[2]。采用 DAS Ver 2.0 药动学软件对血药浓度时间数据进行处理,计算药代动力学参数。T_{max}: C_{max}、AUC_{0-24 h} 及 AUC_{0-∞} 经对数转换后进行方差分析及双单侧 t 检验,进行生物利用度评价。结果 参比制剂的主要药动学参数 T_{1/2α} 为 (2.06 ± 1.20) h; T_{1/2β} 为 (59.80 ± 10.50) h; T_{max} 为 (3.23 ±

作者单位: 529000 广东省江门市第二人民医院药剂科

0.42) h; AUC(0-∞) 为(2518.3 ± 310.65) μmol/(L·h); AUC(0-t) 为(1311.54 ± 218.32) μmol/(L·h); C_{max} 为(83.5 ± 23.40) μmol/L。试验制剂的相对生物利用度为(98.1 ± 11.6)%。结论 该检测方法准确、灵敏、简便。符合血浆样品的测定要求,可以应用于血药浓度的测定和药代动力学研究。

【关键词】 左卡尼汀; 高效液相色谱质谱法(LCMS); 生物利用度; 药动学

High performance liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of pharmacokinetics and bioavailability ZHANG Wei, et al. Pharmacy Department, the Second People's Hospital Jiangmen, Guangdong 529000, the P. R. China.

【Abstract】 **Objective** To establish the determination of human plasma concentration of L-carnitine (L-carnitine, LC), and study its pharmacokinetic characteristics and bioavailability. **Methods** A randomized crossover study of two-cycle design^[1]. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) detection in plasma drug plasma concentration^[2]. DAS Ver 2.0 pharmacokinetics software processed to calculate the pharmacokinetic parameters of the plasma concentration-time data. T_{max}, C_{max}, AUC 0~24 h and AUC 0-∞ by logarithmic transformation analysis of variance and two one-sided t-test, evaluation of bioavailability. **Results** Reference preparation pharmacokinetic parameters T_{1/2α} (2.06 ± 1.20) h; T_{1/2β} (59.80 ± 10.50); T_{max} (3.23 ± 0.42) h; AUC (0-∞) (2518.3 ± 310.65) μmol/L⁻¹ oh; AUC (0-t) (1311.54 ± 218.32) μmol/L⁻¹ o h; C_{max} (83.5 ± 23.40) μmol/L⁻¹. The relative bioavailability of the test preparation (98.1 ± 11.6)%. **Conclusions** The detection method is accurate, sensitive and easy. Determination of plasma samples requirements can be applied to the determination of plasma concentration and pharmacokinetic studies.

【Key words】 Levocarnitine; High performance liquid chromatography mass spectrometry (LCMS); Bioavailability; Pharmacokinetics

左卡尼汀(LCN),是广泛存在于人体内的一种氨基酸。主要用于控制血透并发症的左卡尼汀缺乏和心脑血管疾病的治疗,参与心肌脂肪代谢过程,保护缺血心肌、改善心肌能量代谢^[3]。适用于慢性肾衰长期血透病人因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症,临床表现如心肌病、骨骼肌病、心律失常、高脂血症以及低血压和透析中肌痉挛等。

仪器与试剂

1. 仪器: Waters2695 高效液相色谱仪(美国, waters), LG16-W 高速离心机(北京医用离心机厂), XW-80A 涡旋仪(上海精科实业有限公司); FA2104 BF-2000M 电热恒温箱(北京八方世纪科技技术有限公司); F7HPS 血液透析器(德国, 批号 TBB05100); 486 紫外检测器。

2. 试剂: 左卡尼汀标准品(常州兰陵制药有限公司, 批号 1108291) 左卡尼汀对照品(USP, 批号: 1359903)、L-氨基蕙(1-AA)(Sigma 公司)、乙腈(色谱纯)、异丙醇(色谱纯)(天津四友生物医学技术公司)、腹膜透析液(Baxter, 1.5%)、柠檬酸(分析纯)(鑫科股份合肥工业大学化学试剂厂),其余试剂均为分析纯。

方法与结果

1. 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil C18 柱(4.6 mm × 200 mm 5 μm); 流动相: 乙腈 0.1 mol/L 乙酸铵(34:66)、柠檬酸缓冲液(6.4 × 10⁻³ mol/L, pH = 5.0); 流速: 1.2 ml/min, 检测波长: 260 nm, 进样量: 20 μl; 柱温: 40 °C。

2. 贮备液和标准血样的制备: 空白血浆: 取健康人血浆 50 ml 装入 F7HPS 血液透析器(德国, 批号 TBB05100)中, 用 1.5% 腹膜透析液 4 000 ml, 在 4 °C 条件下, 以 1.0 ml/min。速率进行连续透析 24 小时, 除去血浆中的 LC, ALG 和 PLC。透析完成后, 空白血浆按每份 10 ml 分装, 于 -20 °C 冷冻贮存。标准血样: 精密称取左卡尼汀标准品 9.885 mg, 用超纯水溶解定容至 10 ml, 制成浓度为 5 mmol/L 贮备溶液。用贮备液加空白血浆稀释配制血浆左卡尼汀系列标准液: 5, 10, 25, 50,

100, 250, 500 μmol/L。冷藏保存。

3. 血样预处理: 血浆样品经蛋白沉淀预处理后, 通过 L-氨基蕙(1AA) 将样本衍生化, 并通过固相萃取^[4]。固相萃取柱先用甲醇 5.0 ml 和纯化水 5.0 ml 活化处理, 取血清 1.0 ml, 加磷酸盐缓冲液 2.0 ml 混匀, 上固相柱, 调节流速 2~4 ml/min, 用纯化水 3.0 ml 清洗, 弃去水溶液。再用纯甲醇 1.0 ml 洗脱, 收集洗脱液, 40 °C 水浴氮气吹干后, 残余物用 1 ml 加入流动相 40 μl, 快速振荡数秒溶解残留物, 吸取 20 μl 进样测定, 记录色谱和峰面积。

4. 线性关系考察: 准确吸取不同浓度的左卡尼汀对照品溶液 0.1 ml, 在 50 °C 水浴上通氮气吹干, 加空白血浆 0.2 ml 涡旋混合 2 min, 使血浆中含左卡尼汀浓度依次为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μg·ml 照“方法 3”项下方法处理并进样, 记录色谱。以左卡尼汀与内标的峰面积比(Y)为纵坐标, 以左卡尼汀浓度(c)为横坐标进行线性回归, 求得左卡尼汀血浆样品的线性回归方程为: Y = 0.02861X + 0.01190 相关系数 r = 0.9980 线性范围为 2.0~500 μmol/L。标准曲线见图 1。

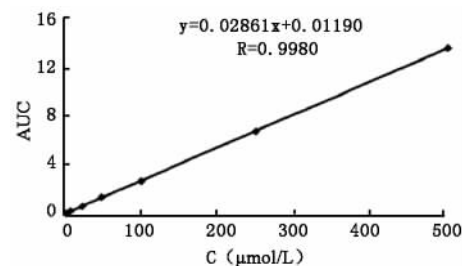


图 1 左卡尼汀血浆标准曲线图

5. 精密度试验: 取 0.2 ml 空白血浆, 加入左卡尼汀对照品溶液制备成低、中、高浓度(25、100、500 μmol/L)的标准血浆样品, 照“方法 3”项下方法处理, 分别在同日内测定 5 次考察日内精密度; 每日测定 5 次, 连续测定 3 d 考察日间精密度, 结果见表 1。

表 1 左卡尼汀血浆日内精密度和日间精密度的结果

浓度($\mu\text{mol/L}$)	日内		日间	
	测得值($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)	测得值($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)
25	25.93 \pm 0.39	3.86	25.20 \pm 0.28	3.13
100	101.57 \pm 2.09	2.42	100.18 \pm 2.10	2.58
500	503.11 \pm 15.32	3.62	504.16 \pm 16.56	3.29

6. 回收率试验: (1) 提取回收率: 取空白血浆 0.2 ml 加入左卡尼汀对照品溶液制备成低、中、高浓度 (25、100、500 $\mu\text{mol/L}$) 的标准血浆样品, 各 6 份, 照“方法 3”项下方法处理, 进样测定, 重复 3 次, 记录峰面积 (Ar); 另取对应浓度的左卡尼汀对照品溶液, 直接进样, 记录峰面积 (As)。以峰面积之比 (Ar/As) 计算提取回收率。见表 2。

表 2 回收率试验结果 (n=6)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	测得浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 RSD(%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
低浓度	25.99	99.52		
中浓度	101.88	89.98	96.38 \pm 1.30	3.53
高浓度	500.13	101.06		

生物利用度试验方法

1. 药动学实验: 受试者于试验日的前一天晚上开始禁食 12 h, 第二天早晨 7:30 空腹开始试验。采用自身对照, 随机交叉的方法, 分别一次性口服受试药左卡尼汀片剂 400 mg/片, 用 100 ml 温开水送服服药后 2 h 给予统一的轻微早餐, 午餐统一为标准餐。前后两次给药间隔时间为一周, 服药前 (0 h) 和服药后 0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3.0 h, 3.5 h, 4.0 h, 5.0 h, 6.0 h, 8.0 h, 12.0 h, 24.0 h 前臂静脉取血 2 ml 立即加入肝素抗凝试管中, 轻轻混匀, 尽快离心 (10 900 r/min, 5 $^{\circ}\text{C}$) 10 min 分离血浆贮存 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 待分析。

2. 生物利用度与药动学结果: AUC 是评定生物利用度的最可靠的指标。为了精确测量 AUC, 多次采取血样观察到药物在体内实际上完全消除为止。血浆自冰箱中取出室温解冻, 按“方法 3”项下方法处理后测定血浆中左卡尼汀浓度, 各时间点血浆药物浓度用 DAS Ver2.0 软件自动拟合处理, 计算药动学参数^[3]。试验制剂的相对生物利用度为 (98.1 \pm 11.6) %。受试者单剂量服用左卡尼汀 (LC) 的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 由图可见服药后 LC 在 3.5 h 后达到高峰, 后缓慢递减, 24 小时基本递减到服药前的水平。药动学参数见表 3。

讨 论

左卡尼汀的测定方法有很多, 常用的有酶测定法^[5]、光

学法和高效液相色谱法。酶测定法所需试剂大多比较昂贵, 操作步骤复杂, 耗时较长。光学法虽然成本低, 但特异性差, 灵敏度低。实验采用双周期随机交叉试验设计。按《中国药典》方法: 血浆样品经蛋白沉淀预处理后, 通过 1 氨基蒽 (1AA) 将样本衍生化, 并通过固相萃取, 排除内源性的干扰。达到其灵敏度高, 特异性好的效果。运用一种灵敏度高的高效液相色谱质谱 (LCMS) 方法测定其含量, 绘制标准曲线, 测定精密度的回收率和稳定性。采用 DAS Ver 2.0 药动学软件对血药浓度时间数据进行处理, 计算药代动力学参数, T_{max} : C_{max} 、 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ 及 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 经对数转换后进行方差分析及双单侧 t 检验, 进行生物利用度评价。

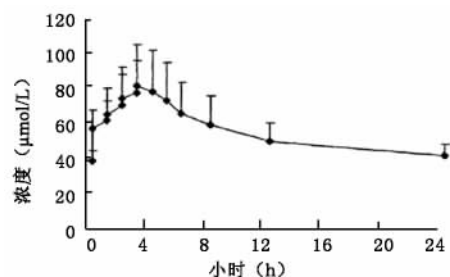


图 2 左卡尼汀血药浓度-时间曲线图

表 3 口服左卡尼汀片剂后主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

药动学参数	单位	莫西沙星
$T_{1/2\alpha}$	h	2.06 \pm 1.20
$T_{1/2\beta}$	h	59.80 \pm 10.50
$\text{AUC}(0-t)$	$\mu\text{mol/L} \cdot \text{h}$	1311.54 \pm 218.32
$\text{AUC}(0-\infty)$	$\mu\text{mol/L} \cdot \text{h}$	2518.3 \pm 310.65
T_{max}	h	3.23 \pm 0.42
C_{max}	$\mu\text{mol/L}$	83.5 \pm 23.40

参 考 文 献

- [1] 罗晨辉. 左卡尼汀咀嚼片的人体药动学及生物等效性. 中国临床药理学杂志 2009, 18(2): 8992.
- [2] 程钢. HPLC/MS/ESI 法同时测定人血浆中米屈肼和左卡尼汀的浓度. 药物分析杂志 2010(4): 609-614.
- [3] 刘惠兰, 张晓洁, 曹峰. 血液透析患者静脉尿酸左旋肉碱 (可益能) 的药代动力学研究. 中国血液净化 2003, 2(6): 298-310.
- [4] 张吟, 陈一农, 陈文发. 固相萃取-高效液相色谱法测定人血清中莫西沙星浓度. 中国医院药学杂志 2007, 27(4): 481.
- [5] 国家食品药品监督管理局. JX20060188 国家药品标准

(收稿日期: 2013-01-22)