

HPLC - MS/ESI 同时测定人血浆中米屈肼和左卡尼汀

程钢^{1,2}, 朱荣华¹, 赵瑞科¹, 李明铁³, 彭文兴^{1*}

(1. 中南大学湘雅二医院临床药学研究室, 长沙 410011;

2. 湖南省常德市第一人民医院药剂科, 常德 415003; 3. 桂林医学院, 桂林 541004)

摘要 目的:建立一种快速、准确、灵敏的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法同时测定人血浆中米屈肼和左卡尼汀的浓度。**方法:**以卡巴胆碱作为内标, 血浆样品经蛋白沉淀法处理, 用氰基色谱柱(Ultimate XB-CN, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm)进行分离, 以乙腈-30 mmol · L⁻¹醋酸铵水溶液(含0.08%甲酸)(80:20, v/v)为流动相, 流速1.0 mL · min⁻¹, 柱温40 °C, 柱后分流比为4:1, HPLC-MS/ESI⁺法选择性监测准分子离子峰[M+H]⁺(米屈肼 m/z 147.1, 左卡尼汀 m/z 162.1, 内标卡巴胆碱 m/z 147.1)。**结果:**米屈肼、左卡尼汀及内标卡巴胆碱在氰基柱上保留较好, 分离完全; 米屈肼、左卡尼汀线性范围分别为0.1~30.0 μg · mL⁻¹(r=0.9985)和0.4~12.8 μg · mL⁻¹(r=0.9994); 最低定量限分别为0.1 μg · mL⁻¹和0.4 μg · mL⁻¹; 平均萃取回收率均大于80%, 方法回收率为92%~114%; 日内日间RSD均小于12%。**结论:**本方法简便准确, 可用于同时测定人血浆中米屈肼和左卡尼汀的浓度, 考察服用米屈肼对血浆中内源性物质左卡尼汀浓度的影响。

关键词:米屈肼; 左卡尼汀; HPLC-MS; 血药浓度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)04-0609-06

Simultaneous HPLC - MS/ESI determination of mildronate and levocarnitine in human plasma

CHENG Gang^{1,2}, ZHU Rong-hua¹, ZHAO Rui-ke¹, LI Ming-tie³, PENG Wen-xing^{1*}

(1. Department of Clinical Pharmacy, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China;

2. The First People's Hospital of Changde City, Changde 415003, China; 3. Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

Abstract Objective: To establish a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of mildronate and levocarnitine in human plasma. **Methods:** Carbachol was used as the internal standard (IS). The compound and internal standard were extracted by protein precipitation using acetonitrile. The HPLC separation of the analytes was performed on a Ultimate XB-CN (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a column temperature of 40 °C. The mobile phase was acetonitrile-water (ammonium acetate; 30 mmol · L⁻¹; formic acid; 0.08%) (80:20, v/v). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and the postcolumn splitting ratio was 4:1. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) was used for determination, with positive ion SIM detection of mildronate ([M+H]⁺, m/z 147.1), levocarnitine ([M+H]⁺, m/z 162.1) and carbachol ([M+H]⁺, m/z 147.1). **Results:** Mildronate, levocarnitine and IS all could be retained well and separated completely on the Ultimate XB-CN column. The calibration curves were linear in the ranges of 0.1-30.0 μg · mL⁻¹ (r=0.9985) for mildronate and 0.4-12.8 μg · mL⁻¹ (r=0.9994) for levocarnitine; The limits of detection (LOD) were 0.1 μg · mL⁻¹ for mildronate and 0.4 μg · mL⁻¹ for levocarnitine; The average extraction recoveries for all the two analytes were above 80%; The methodology recoveries were 92%-114%; The intra-day and inter-day relative standard deviations were less than 12%. **Conclusion:** The method is accurate and simple for simultaneous determination of mildronate and levocarnitine in human plasma, and can be used to investigate the effect of administered mildronate on the plasma concentration of levocarnitine in human.

Key words: mildronate; levocarnitine; HPLC-MS; plasma drug concentration

* 通讯作者 Tel: (0731)5292097, 13755056989; E-mail: pwx.csu@163.com

左卡尼汀(levocarnitine)是一种广泛存在于机体组织内的特殊氨基酸,它在脂肪氧化过程中起重要作用,其基本功能是运载长链脂肪酸进入线粒体内膜进行 β -氧化,从而产生能量,加速ATP的产生^[1]。米屈胍(mildronate)是左卡尼汀的结构类似物,是一种新型心脏保护药,在细胞水平改善心肌能量代谢。米屈胍能抑制左卡尼汀的生物合成,减少细胞内游离左卡尼汀的浓度,从而可抑制左卡尼汀依赖的脂肪酸氧化,使缺氧心肌的能量代谢从脂肪酸氧化转化为更有利的葡萄糖氧化,即促使糖酵解途径的厌氧性氧化,故本品具有抗缺氧效用和心脏保护活性^[2,3]。米屈胍在体内除阻断左卡尼汀生物合成外,还竞争性地影响左卡尼汀在肾脏的重吸收^[4,5]。动物实验证实,雄性Wistar大鼠长期服用米屈胍后,体内游离左卡尼汀的浓度下降,且其浓度变化与米屈胍的心肌保护作用相关^[6]。因此考察服用米屈胍后对血浆中左卡尼汀浓度的影响,有助于更好地了解米屈胍在人体内的药理作用机制。

米屈胍和左卡尼汀本身在紫外、荧光方法下都不能直接检测,测定时样本需衍生化,血样处理烦琐。目前仅查得1篇文献,应用HPLC-MS/MS法测定血浆中米屈胍的浓度^[7],文中采用左卡尼汀作为内标,但左卡尼汀为内源性物质,在血浆中浓度较高,且服用米屈胍还可能影响血浆中左卡尼汀的浓度,因此此法有待进一步改进。另外有文献报道应用HPLC-MS/MS法测定血浆中左卡尼汀的浓度^[8],但此法测定仪器成本较高,难以普及。作者目前尚未见文献报道应用HPLC-MS法同时测定血浆中米屈胍和左卡尼汀的浓度。

本文建立一种同时测定人血浆中米屈胍和左卡尼汀浓度的HPLC-MS法。该方法简便准确,适用于服用米屈胍对人血浆中左卡尼汀浓度影响的研究。

1 仪器和试剂

美国Waters HPLC-MS系统(包括Waters 2690 Alliance separations module 型高效液相色谱仪, Micromass ZQ 电喷雾质谱仪和 Masslynx NT Version 3.5 数据工作站),漩涡混合仪(上海琪特分析仪器有限公司),高速离心机(IEC Centra MP4),超声波清洗器(上海德力西实业集团沪达继电器厂),AG285 电子分析天平(瑞士METTLER TOLEDO),TDZ 4-1.8 A 低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

米屈胍胶囊:长春翔通药业有限公司,250 mg·

粒⁻¹,批号20070403;米屈胍对照品:长春翔通药业有限公司,含量为99.53%;左卡尼汀对照品:湖南一格制药有限公司,含量99.2%,批号200806102;卡巴胆碱对照品(内标):中国药品生物制品检定所,批号100361-200301;乙腈、醋酸铵、甲酸:美国Tedia company,色谱纯;水为纯净水。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 米屈胍和左卡尼汀对照品溶液 精密称取对照品米屈胍和左卡尼汀适量,分别用纯净水配成浓度为 $1.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的米屈胍储备液和浓度为 $0.99 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的左卡尼汀储备液。配制对照品溶液时,各浓度点的梯度跨度较大,为减小对照品溶液的取样误差,储备液用纯净水分别稀释成系列梯度浓度的对照品溶液,米屈胍对照品溶液的系列浓度分别为: $150.0, 37.5, 7.5, 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;左卡尼汀对照品溶液的系列浓度分别为: $96.0, 24.0, 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。所有溶液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取内标卡巴胆碱适量,用纯净水配成浓度为 $2.48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液,取储备液适量,用乙腈稀释成浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液,此溶液同时也是血样处理的蛋白沉淀剂。内标溶液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

2.2 样本的预处理 血浆解冻放至室温后精密量取 $300 \mu\text{L}$,置 1.5 mL Ep管中,加入内标溶液(蛋白沉淀剂) 1 mL ,涡旋振荡 2 min ,超声($120 \text{ W}, 40 \text{ kHz}$) 5 min , $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取上清液 $10 \mu\text{L}$ 进样分析。

2.3 色谱与质谱条件

色谱条件:氰基色谱柱(Ultimate XB-CN, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),以乙腈- $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液(含 0.08% 甲酸)($80:20, v/v$)为流动相,用前经 $0.45 \mu\text{m}$ 纤维素微孔滤膜过滤,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,柱后分流比为 $4:1$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

质谱条件:采用质谱电喷雾电离源正离子模式(ESI⁺)将样品离子化,选择性离子监测(selected ion monitoring, SIM)准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z 147.1(米屈胍), m/z 162.1(左卡尼汀), m/z 147.1(内标)。ESI毛细管喷嘴电离电压: 0.45 kV ;锥孔电压: 25 V (左卡尼汀), 21 V (米屈胍), 19 V (内标);萃取电压: 2.0 V ;离子源温度: $120 \text{ }^\circ\text{C}$;去溶剂气温度: $300 \text{ }^\circ\text{C}$;锥孔气流: $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$;去溶剂气流: $500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。米屈胍、左卡尼汀和内标的分子结构

式见图 1,在选定的条件下各物质总离子流色谱图见图 2,保留时间分别为:12.7 min(米屈胍),10.0 min(左卡尼汀),7.4 min(内标);质谱扫描图见图 3。

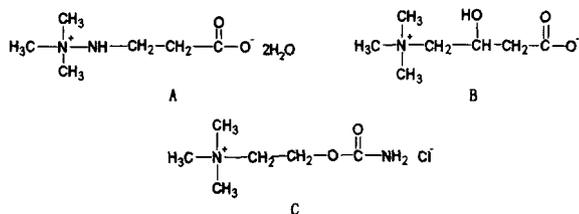


图 1 米屈胍(A)、左卡尼汀(B)和内标(C)的分子结构式
 Fig 1 The chemical structures of mildronate (A), levocarnitine (B) and internal standard (C)

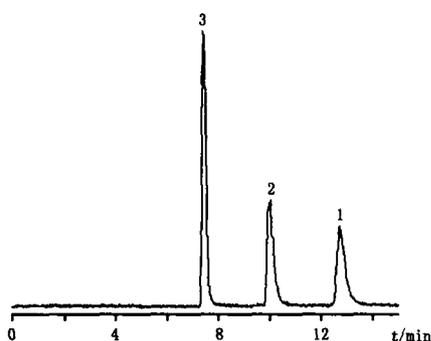


图 2 总离子流色谱图
 Fig 2 The total ion chromatogram
 1. 米屈胍 (mildronate) 2. 左卡尼汀 (levocarnitine) 3. 内标 (internal standard)

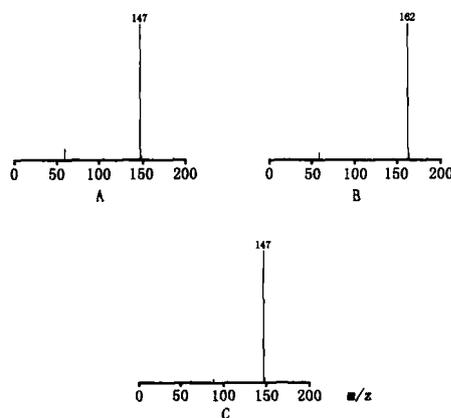


图 3 标准血样的质谱扫描图
 Fig 3 The mass scan spectra of standards in control human plasma
 A. 米屈胍 (mildronate) B. 左卡尼汀 (levocarnitine) C. 内标 (internal standard)

2.4 方法的专属性 空白血浆、对照品、空白血浆 + 对照品、受试者实际血样的典型色谱图见图 4。结果表明血浆中其他杂质不干扰样品中米屈胍、左卡尼汀和内标的分离测定。

2.5 线性关系考察

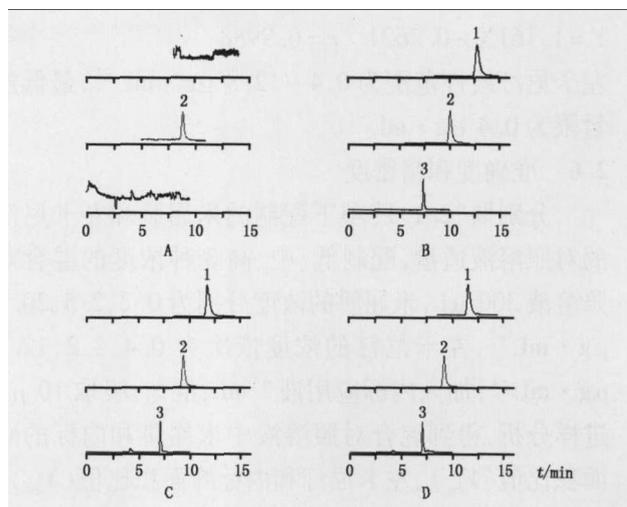


图 4 典型色谱图
 Fig 4 Typical chromatograms
 A. 空白血样 (blank plasma) B. 对照品溶液 (米屈胍: $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 左卡尼汀: $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [pure water solution of mildronate ($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and levocarnitine ($6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)] C. 空白血浆 + 对照品 (米屈胍: $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 左卡尼汀增加值: $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [bank plasma spiked with mildronate ($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and levocarnitine (added concentration; $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)] D. 服药后第 3 d 受试者实际血样 (米屈胍: $6.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 左卡尼汀: $5.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [a human plasma sample after 3 days of oral mildronate ($6.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); levocarnitine: $5.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)]
 1. 米屈胍 (mildronate) 2. 左卡尼汀 (levocarnitine) 3. 内标卡巴胆碱 (carbachol, internal standard)

分别取“2.2.1”项下配制的米屈胍对照品溶液和左卡尼汀对照品溶液适量,加入 9 个 Ep 管中,用氮气流吹干后,再加入人空白血浆 $300 \mu\text{L}$ 配制混合对照品血浆,使血浆中米屈胍的浓度分别为 $0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 左卡尼汀浓度的增加值依次为 $0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中对照品血浆后 3 管中未加入左卡尼汀,同时取空白血样 $300 \mu\text{L}$ 。所有样本按“2.2”项下方法操作。

以米屈胍浓度 $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,米屈胍与内标峰的面积比值 Y 为纵坐标,权重因子 $W = 1/X$,作线性回归,得回归方程 ($n = 9$):
 $Y = 0.8050X + 0.006095 \quad r = 0.9985$
 米屈胍线性范围为 $0.1 \sim 30.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低定量限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

以左卡尼汀浓度的增加值 $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,标准血样中左卡尼汀和内标峰面积比值与空白血样中的左卡尼汀和内标峰面积比值的差值 Y 为纵坐标,权重因子 $W = 1/X^2$,做线性回归,得回归方程 ($n = 6$):

$$Y = 1.161X - 0.2621 \quad r = 0.9988$$

左卡尼汀线性范围为 0.4 ~ 12.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低定量限为 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 准确度和精密度

分别取“2.1.1”项下配制的米屈胂和左卡尼汀的对照溶液适量, 配制低、中、高 3 种浓度的混合对照溶液 300 μL , 米屈胂的浓度分别为 0.2, 2.5, 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 左卡尼汀的浓度依次为 0.4, 3.2, 12.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入内标应用液 1 mL, 混匀, 吸取 10 μL 进样分析, 得到混合对照溶液中米屈胂和内标的峰面积比值 (Y_{mc}), 左卡尼汀和内标峰面积比值 (Y_{cc})。

分别取“2.1.1”项下配制的米屈胂和左卡尼汀对照品溶液适量, 以氮气流吹干, 加入人空白血浆 300 μL 配制低、中、高 3 种浓度的混合对照品血浆, 米屈胂的浓度分别为 0.2, 2.5, 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 左卡尼汀浓度的增加值依次为 0.4, 3.2, 12.8 $\mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} , 同时取空白血样 300 μL 。每种浓度样本各 5 份, 所有样本按“2.2”项下方法操作后, 进样分析, 每天每份样本测 1 次, 连续测定 3 d, 计算米屈胂和内标峰面积比值 (Y_m) 以及左卡尼汀和内标峰面积比值与空白血样中的左卡尼汀和内标峰面积比值的差值 (Y_c), 分别代入相应标准曲线方程, 以日内测得的各物质的实测浓度计算日内 RSD, 不同日测得的各物质的浓度计算日间 RSD; 以实测浓度与理论浓度计算方法回收率; 米屈胂的提取回收率 (R_e) 按 $R_e = Y_m/Y_{mc} \times 100\%$ 计算, 左卡尼汀的提取回收率 (R_e) 按 $R_e = Y_c/Y_{cc} \times 100\%$ 计算^[8]。左卡尼汀和米屈胂高、中、低 3 种浓度的日内日间变异、提取回收率和方法回收率结果见表 1。由表可知, 左卡尼汀和米屈胂的日内日间 RSD 均小于 11%; 提取回收率均大于 81%, 方法回收率在 94% ~ 111% 之间。

表 1 精度度和回收率
Tab 1 Precision and recoveries

化合物 (compound)	浓度 (concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度 (precision), RSD/%		提取回收率 (extraction recoveries)/%	方法回收率 (methodology recoveries)/%
		日内 (intra-day) (n = 5)	日间 (intra-day) (n = 15)		
左卡尼汀 (levocarnitine)	0.4*	8	11	81	106
	3.2*	5	9	86	106
	12.8*	4	6	88	97
米屈胂 (mildronate)	0.2	1	7	82	111
	2.5	2	2	87	99
	20.0	2	2	84	94

* 浓度的增加值 (added concentration)

2.7 稳定性 按“2.6”项下方法配制低、中、高 3 种浓度米屈胂和左卡尼汀的混合对照品血浆及空白血浆, 所有样本按“2.2”项下方法处理。进行 4 次冻融稳定性试验 (-70 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$)、室温放置稳定性试验 (25 $^{\circ}\text{C}$, 8 h) 和长期冷冻放置稳定性试验 (-70 $^{\circ}\text{C}$, 30 d), 以实测浓度的 RSD 计算左卡尼汀和米屈胂的稳定性。结果表明, 米屈胂高、中、低 3 种浓度的 RSD (n = 5) 均小于 11%; 左卡尼汀高、中、低 3 种浓度的 RSD (n = 5) 均小于 13%, 表明左卡尼汀和米屈胂血样的稳定性均较好。

2.8 质量控制试验 按“2.6”项下方法配制低、中、高 3 种浓度的混合对照品血浆及空白血浆, 作为质控样本, 在未知样品测定过程中, 随行测定。质控样品均匀分布在未知样品测试顺序中, 以考察分析方法的准确性。结果表明 3 种浓度质控样品的测定值与理论值的偏差均小于 13%, 符合体内药物分析的要求。

2.9 多剂量口服米屈胂对人血浆中左卡尼汀浓度的影响

2.9.1 受试者 健康志愿者 8 名, 男女各 4 名, 于试验前统一体格检查, 肝、肾功能正常且无急、慢性疾病及家族遗传病史。试验前 2 周内无用药史, 3 月内未参加其他新药临床实验, 志愿者在试验前 2 周及试验期内禁烟酒。试验前签定书面知情同意书, 试验方案通过中南大学湘雅二医院伦理委员会批准。

2.9.2 试验方案 8 名受试者每天口服米屈胂胶囊, 一日 3 次 (每天于 7:00, 15:00, 23:00 服药), 每次 500 mg (250 mg \cdot 粒⁻¹ \times 2 粒), 连续服药 13 d, 于第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13 d 的 18:00 点空腹采血样。其中在第 1 d 采集的血样为空白血样, 用于测定左卡尼汀在人血浆中浓度的基础值。采样时取肘静脉血 4 mL, 肝素抗凝, 3000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 取血浆置 Ep 管 -70 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存待测定。

2.9.3 血样测定 据文献报道,人体内左卡尼汀血浆浓度正常值为 $4.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[9], 试验中 8 名健康受试者服药前血浆中左卡尼汀的浓度为 $(4.66 \pm 0.88) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与文献报道基本一致。试验中受试者口服米屈胂 500 mg 每次, 一日 3 次, 连续服药 13 d, 在第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 d 血浆中米屈胂的平均浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别为 9.82 ± 2.81 , 13.91 ± 2.44 , 14.78 ± 3.19 , 18.10 ± 4.33 , 16.66 ± 3.85 , 16.24 ± 3.63 , 15.97 ± 5.18 ; 内源性物质左卡尼汀的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别为 5.68 ± 0.73 , 6.27 ± 0.90 , 5.88 ± 0.81 , 5.85 ± 0.95 , 5.53 ± 0.98 , 5.60 ± 1.03 , 5.26 ± 0.67 。实验表明多次口服米屈胂并未使血浆中左卡尼汀的浓度下降, 结果如图 5 所示。人体内左卡尼汀约 75% 来自食物, 主要是肉类食品, 其余由人体生物合成^[9], 每名受试者之间或同一受试者每天之间饮食存在差异, 因此食物对体内左卡尼汀的补充作用, 可能使米屈胂降低血浆中左卡尼汀浓度的作用表现得不明显, 另外样本量、服药的疗程和剂量也可能影响实验的结果。米屈胂在体内降低血浆中左卡尼汀浓度的药理作用有待进一步研究。

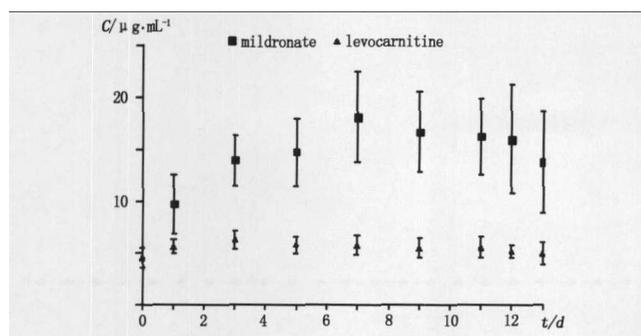


图 5 连续口服米屈胂 13 d (500 mg, t. i. d.) 米屈胂和左卡尼汀血浆浓度的改变 (血浆浓度用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示)

Fig 5 The consecutive 13 days oral administration of mildronate (500 mg, t. i. d.) induced changes of mildronate and levocarnitine concentration in human plasma ($\bar{x} \pm \text{SD}$ was used to represent the concentration in human plasma)

3 讨论

本文建立的测定方法, 将 HPLC 的强分离能力与 MS 的高灵敏度和强专属性相结合, 用乙腈沉淀血浆蛋白, 离心后上清液直接进样, 大大简化了样本处理过程, 同时取血量少, 实用性较好。

米屈胂和左卡尼汀的相对分子质量均小, 分别为 161.1 和 146.1, 都带有 NH_4^+ 和 COOH^- 基团, 为两性化合物, 极性大, 水溶性强, 内源性杂质干扰多, 严重影响血浆中浓度的测定, 选择合适的内标十分重要, 卡巴胆碱与米屈胂和左卡尼汀分子结构、物理

化学性质相似, 色谱行为、质谱行为和回收率相近, 适合作为内标用于测定人血浆中左卡尼汀和米屈胂的浓度。

米屈胂和左卡尼汀极性均较强, 在普通 C_{18} 柱上不保留, 本文选择了极性较强的氰基柱进行分离, 米屈胂、左卡尼汀和内标在氰基柱上能够很好地保留。实验结果表明, 流动相中加入适量醋酸铵, 能显著改善峰形; 加入适量甲酸, 可提高方法的灵敏度和分离效果, 并使内标的保留时间显著提前; 适当提高流动相中水相的比例, 可使左卡尼汀与米屈胂的保留时间前移, 且峰形得到改善。当流动相为乙腈 - 30 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液 (含 0.08% 甲酸) (80:20, v/v) 时, 峰形与分离度均较好, 能满足测定要求。

左卡尼汀为内源性物质, 在考察方法学制备空白血浆时, 文献报道^[10] 应用血液透析器, 用腹膜透析液连续透析 24 h, 以除去血液中的左卡尼汀。但此法在除去左卡尼汀的同时, 也可能将血液中的其他内源性成分一并去掉, 致使此空白血浆与实际的血浆成分差别较大, 采用此种空白血浆进行方法学研究所得出的数据, 有可能不能准确地反映在血样测定过程中的真实情况。本文在进行方法学考察时, 空白血浆未经透析处理, 直接在空白血浆中定量加入左卡尼汀配制对照品血浆, 按“2.5”项下方法建立标准曲线。值得注意的是, 在进行测定方法研究时, 配制同一试验项目下的对照品血浆和空白血浆时, 必须使每份样本所加空白血浆的量相等, 且来源相同, 从而使同一试验项目下每份样品中内源性左卡尼汀的量相等。此法简便、准确, 也适用于其他内源性物质血浆浓度测定的方法学研究。

4 结论

本文建立了一种同时测定人血浆中米屈胂和左卡尼汀浓度的 HPLC - MS 法, 该方法简便准确, 适用于米屈胂在体内药理作用机制的研究, 考察服用米屈胂对血浆中内源性物质左卡尼汀浓度的影响。

参考文献

- Shatsky Fred. Should carnitine be added to parenteral nutrition solutions. *Nutr Clin Pract*, 2000, 15(1): 152
- Dambrova Maija, Liepinsh Edgars, Kalvinsh Ivars. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine - lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(6): 275
- Kirimoto T, Nobori K, Asaka N, et al. Beneficial effect of M ET - 88, a gamma - butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1996, 331(2): 163

- 4 Hayashi Y, Muranaka Y, Kirimoto T, *et al.* Effects of MET - 88, a gamma - butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on tissue carnitine and lipid levels in rats. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(6):770
- 5 Hayashi Y, Tajima K, Kirimoto T, *et al.* Cardioprotective effects of MET - 88, a gamma - butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on cardiac dysfunction induced by ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. *Pharmacology*, 2000, 61(4):238
- 6 Liepinsh Edgars, Vilskersts Reinis, Loca Dagnija, *et al.* Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induce an increase in gamma - butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48(6):314
- 7 LÜ YF, Hu X, Bi KS. Determination of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2007, 852(8):35
- 8 WANG Da - wei(王大为), WU Jie(武洁), HUANG Hou - cai(黄厚才), *et al.* LC - MS/MS determination of L - carnitine in dog plasma(LC - MS/MS法测定犬血浆中左卡尼汀). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(2):207
- 9 Angsten G, Cederblad G, Meurling S. Reference ranges for muscle carnitine concentration in children. *Ann Clin Biochem*, 2003, 40(4):404
- 10 SUN Yong - xu(孙永旭), LU Cong - xiao(陆丛笑), WANG Chun - bo(王春波), *et al.* Simultaneous Analysis of L - carnitine, Acetyl - L - carnitine and propionyl - L - carnitine in human plasma by HPLC(高效液相色谱法同时测定人血浆中左卡尼汀、乙酰左卡尼汀和丙酰左卡尼汀的浓度). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2007, 42(18):1425

(本文于2009年6月16日修改回)

王军志副所长率团赴德国国家疫苗及血清研究所进行学术访问

应德国国家疫苗及血清研究所(Paul Ehrlich Institute, 简称 PEI)所长 Klaus Cichutek 教授的邀请, 中检所王军志副所长、病毒一室主任董关木、菌种室副主任叶强和病毒三室副主任李长贵一行四人于2010年3月22日至25日访问了德国国家疫苗及血清研究所(PEI)。本次访问主要有三项任务: 一是两所的高层次科学研究人员相互进行学术交流; 二是参观和考察 PEI 实验室; 三是讨论协商两所之间进一步交流合作计划。

德国国家疫苗及血清研究所目前隶属于德国卫生部, 始建于1896年, 冠名于其第一任所长——1908年诺贝尔生理和医学奖获得者 Paul Ehrlich 先生。100多年来, 该所数次易址, 现址位于法兰克福附近兰根市(Langen), 于1986年建成。

详见中检所网站(www.nicbbp.org.cn)。