

中国健康志愿者左卡尼汀及其代谢产物的药代动力学研究

曹玉¹ 朱莉¹ 韩志武¹ 王春波^{2*}

(1.青岛大学医学院附属医院,山东青岛, 266003; 2.青岛大学医学院, 山东青岛, 266071)

[摘要]目的: 研究中国健康志愿者口服左卡尼汀口服液后左卡尼汀(LC)及其代谢产物乙酰左卡尼汀(ALC)、丙酰左卡尼汀(PLC)的药代动力学。方法: 建立一个用荧光衍生化高效液相色谱法同时检测血浆及尿液中 LC、ALC 和 PLC 浓度的方法, 12 名健康受试者单剂量口服盐酸左卡尼汀口服液 2g 后, 测定血浆和尿中 LC,ALC,PLC 的浓度。采用 DAS 软件进行处理, 求出药代动力学参数。结果: 受试者给药后, 主要药代动力学参数 C_{max}: (84.73 ± 25.23) μmol/L, t_{1/2β}: (60.33 ± 14.97)h, AUC(0-t): (2676.41 ± 708.33) μmol/L·h, T_{max}: (3.4 ± 0.46)h。LC、ALC、PLC 24 小时尿药累计排泄量分别为: 613.47 ± 161.72 μmol, 368.25 ± 134.77 μmol, 61.29 ± 37.75 μmol, LC24 小时累计排泄率为 6.05%。

[关键词]左卡尼汀口服液,乙酰、丙酰左卡尼汀,HPLC,中国健康人, 药代动力学

左卡尼汀(L-carnitine,LC)又叫L-肉碱,是哺乳动物能量代谢中必须的体内物质,是1905年由两位俄国科学家在肌肉提取物中首次发现的^[1],其分子结构式为 3-羟基-4-氮-三甲氨基丁酸。其主要功能是促进脂类代谢。人体内左卡尼汀(L-carnitine, LC)的来源一个是内源性的,在肝、肾和大脑中自身合成^[2],另一个是外源性的,主要来自肉类食品^[3]和临床药物。LC及其酰化物乙酰左卡尼汀(acetyl-L-carnitine, ALC)和丙酰左卡尼汀(propionyl-L-carnitine, PLC)构成人体卡尼汀群,它们在人体各器官、组织中呈不均匀分布^[4]。它们在临床多个病种的治疗中的作用日益受到重视,如慢性肾病、心血管疾病、肝脏疾病、神经系统疾病、内分泌系统疾病、肠外营养病人、男性不育症和肥胖等与LC及其代谢产物体内水平有密切关系。目前国内外对左卡尼汀及其代谢产物的研究多集中在临床应用方面,对其在体内的代谢情况相对较少。国内左卡尼汀口服液健康人体药代动力学参数至今没有报道,及其代谢产物的药代动力学也未见报道,本试验拟对中国健康志愿者单剂量口服左卡尼汀口服液后对LC以及代谢产物ALC、PLC进行药代动力学评价,了解左卡尼汀以及代谢产物在体内的吸收、分布、消除规律,为制定合理的给药方案提供确切的参数和试验依据。

材料与方 法

1.仪器与试剂

waters2695 高效液相色谱仪(美国,沃特斯公司); waters474 荧光检测器; MS1 Minishaker 振荡器,血液透析器(Haidylena, HL130HS)。

左卡尼汀口服液制剂: 东北制药总厂生产,规格: 10ml:1g,批号: 060708。

左卡尼汀标准品(东北制药总厂提供,纯度 99.5%,批号: 0609263)、乙酰左卡尼汀标准品(东北制药总厂提供,纯度 99.5%,批号: 0611105); 丙酰左卡尼汀标准品(沈阳东宇精细化工有限公司提供,纯度 99.5%,批号 060802)

乙腈为色谱纯; 乙酸铵, 盐酸, 丙酮, 磷酸二氢钠, 磷酸, 冰醋酸, 乙醚, 氯仿, 氢氧化钠, 磷酸二氢钾为分析纯; 超纯水; 1-氨基蒽(1-AA, sigma), 1-乙基-(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC.HCL, Fluka); 腹膜透析液(Baxter, 1.5%); 正常人血浆由青岛市血站提供。

2.试验设计:

根据 SFDA 《化学药物临床药代动力学研究的技术指导原则》的要求,选择 12 名健康志愿者,男女各半,年龄(27.7 ± 4.7)岁,体重(62.9 ± 8.8)kg,身高(167.0 ± 6.15)cm,肝肾功能及心电图正常,无药物过敏史,试验前一周及试验期间采用清淡饮食以排除饮食中左卡尼汀的干扰,禁用任何其他药物,禁烟、酒、茶,并签署知情同意书。

12 名志愿者随机确定服药顺序,单剂量 po 左卡尼汀口服液 2g^[5], 200ml 温开水送服。分别于服药前(0h)和服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0h 经静脉留置针取前臂静脉血 4mL,置肝素试管中, 3500r/min 离心,分离血浆,保存于 -20℃ 冰箱中冷冻待测。同时: 收集用药前、给药后 0~2,2~4,4~8,8~12,12~24 h 的各段尿液^[6],分别加 5ml 盐酸作为防腐剂,测量体积后留取尿样 5ml,密封, -20℃ 保存,待测。

3.色谱条件:

色谱柱 (Hypersil C₁₈, 4.6mm×200mm, 5μm); 流动相: 乙腈-0.1M 乙酸铵(34:66); 流速: 1.0ml·min⁻¹; 检测波长: Ex 248nm, Em 418nm; 进样量为 50μL.

4.样品处理:

取血浆样品 100μl, 加入乙腈 500μl, 涡旋混合 1min, 10900×g 离心 5min, 取上清液 500μl, 依次加入 pH 3.5 磷酸缓冲液 400μl, 1M 盐酸 20μl, 涡旋混合, 加入 1-AA 溶液 100μl, 然后边涡旋边缓缓加入 EDC 溶液 100μl, 混匀后避光、室温反应 30min。衍生化完成后, 用 3ml 乙醚洗涤两次, 取出乙醚相, 然后在水相中加入 pH9.1 磷酸缓冲液 800μl, 涡旋混合, 用三氯甲烷 5ml 洗涤两次, 取水相 500μl, 加 pH3.5 磷酸缓冲液 500μl, 涡旋混合, 50μl 进样分析。尿液样品处理同血浆样品处理。

5.血(尿)药浓度测定的方法学研究:

5.1 溶液的制备:

空白血浆的制备: 将 100ml 人血浆置于血液透析器内, 在 4℃ 条件下, 用 1.5%Baxter 腹膜透析液以 1.5ml·min⁻¹ 连续透析 24h, 分装冷冻贮存^[7]。空白尿液的制备: 用酸化蒸馏水 (每 100 毫升蒸馏水中含 1 毫升冰醋酸) 作为空白尿液。标准溶液的制备: 分别取标准品配制成 LC, ALC 和 PLC 分别为 LC:1000μmol·L⁻¹, ALC:100μmol·L⁻¹; PLC:40μmol·L⁻¹ 的血浆标准液和 LC:1000μmol·L⁻¹, ALC:500μmol·L⁻¹; PLC:100μmol·L⁻¹ 的尿液标准液。

5.2 选择性试验:

分别取空白血浆、标准血样和空白尿样、标准尿样, 按“4”项下方法处理分析, 得色谱图, 见图 1, 结果显示, 在测定时间范围内, 空白血浆和尿样色谱图无测定成分的干扰峰, 标准血样和尿样样品成分 LC, ALC 和 PLC 峰形良好, 分离完全。

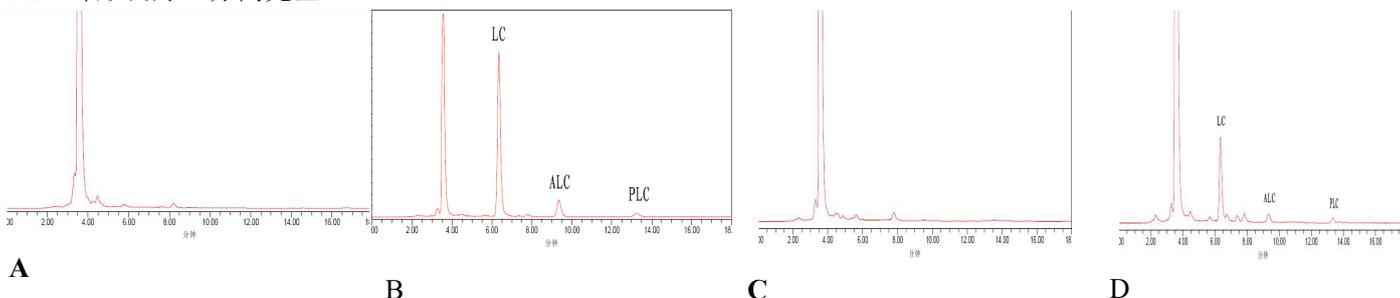


图 1: 空白血浆(A)、标准血浆(B)及空白尿样(C)、标准尿样(D)色谱图

5.3 标准曲线:

用空白血浆及空白尿样稀释混合标准液的不同浓度的标准溶液, 按“4”方法处理, 以样品 7 次峰面积的均值 (Y) 为纵坐标, 样品浓度 (μmol·L⁻¹) 为横坐标作线性回归。得血清及尿样样品的线性回归方程。见表 1。

表 1: LC、ALC 和 PLC 血浆及尿液浓度回归方程与线性范围

组分		回归方程	相关系数 r	线性范围/μmol·L ⁻¹
LC	血浆	$Y=26.31062X+22.53629$	0.998 2	2.5~500
	尿液	$Y=27.54841X+30.6576$	0.997 6	2~1000
ALC	血浆	$Y=19.26067X+6.716380$	0.998 0	0.25~50
	尿液	$Y=18.85477X+4.70837$	0.998 5	1~500
PLC	血浆	$Y=6.08251X+1.59046$	0.992 7	0.1~20
	尿液	$Y=6.00967X+1.44269$	0.991 5	0.2~100

5.4 精密性、回收率、稳定性试验:

结果表明, 日内 (RSD%<5.81) 和日间精密性 (RSD%<6.50), 方法回收率 (RSD%<8.01) 及提取回收率 (RSD%<7.44) 均能满足血(尿)浓度测定方法学要求, 样品室温放置 8h、-20℃放置 14d、冷藏放置 7d 稳定, 经精密性、回收率、稳定性试验均能满足血(尿)浓度测定方法学要求。

6. 数据处理

列出受试者给药后各时间点血浆中的浓度, 并绘出血药浓度-时间曲线, 采用 DAS2.0 软件和 Excel 进行数据处理, 计算各药动学参数, 采用梯形法计算 AUC 值, 达峰时间 (T_{max})、达峰浓度 (C_{max}) 为实测值。

结 果

1. 受试者血浆及尿液中 LC、ALC 及 PLC 的浓度：

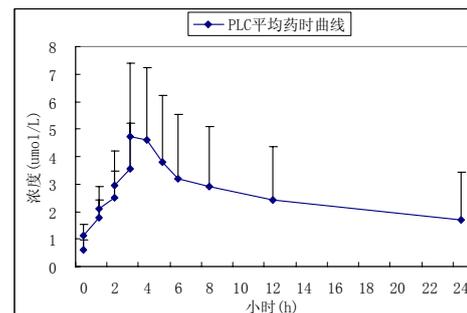
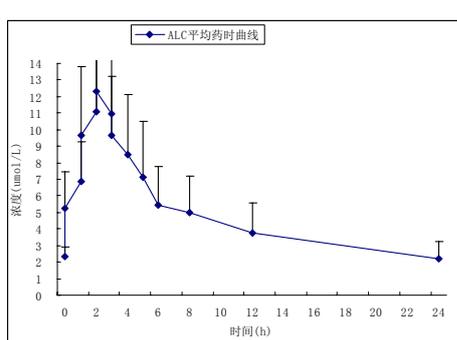
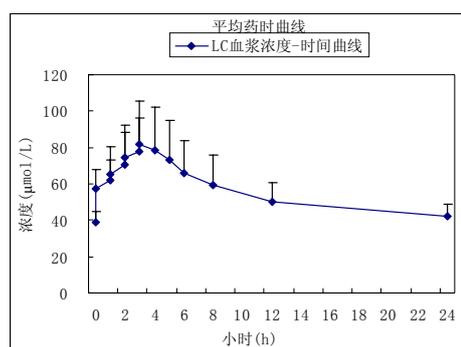
取受试者 0 点的血浆进行含量测定，得正常人血浆中的 LC、ALC、PLC 的浓度，结果见表 2：

表 2：健康受试者血浆中 LC、ALC、PLC 的浓度

	浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	LC	ALC	PLC
正常人	39.14±5.38	2.36±0.56	0.61±0.36
男性	41.53±6.03	2.49±0.66	0.68±0.39
女性	36.76±4.01	2.24±0.45	0.55±0.36

2. 平均血药浓度-时间曲线：

12 名受试者服用单剂量 LC 后的 LC、ALC、PLC 的平均血药浓度-时间曲线见图 2；由图可见服药后 LC、ALC、PLC 分别在 3.4h、2.4h、3.8h 后达到高峰，后缓慢递减，24 小时基本递减到服药前的水平。



C: PLC

A: LC

B: ALC

图 2：12 名健康受试者 po2g 左卡尼汀口服液后左卡尼汀(A)、乙酰左卡尼汀(B)、丙酰左卡尼汀(C)的平均血药浓度-时间曲线

2. 药代动力学参数：

12 名受试者口服单剂量左卡尼汀口服液后 LC 及 ALC、PLC 主要药动学参数详见表 3：

表 3：12 受试者口服单剂量左卡尼汀口服液 2g 后 LC、ALC、PLC 主要药动学参数：

参数	LC	ALC	PLC
t1/2 α (h)	1.66±1.20	6.33±6.39	3.10±3.93
t1/2 β (h)	60.33±14.97	35.90±28.86	25.74±30.33
V1/F(L)	116.56±38.29	615.42±261.91	1163.47±1707.57
CL/F(L/h)	4.03±1.10	74.85±69.80	332.24±444.09
AUC(0-t)($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{h}$)	1354.41±324.97	119.54±55.84	57.98±48.52
AUC(0- ∞)($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{h}$)	2676.41±708.33	166.20±77.41	155.57±264.22
Ka(1/h)	0.78±0.91	18.55±19.75	0.93±0.68
t1/2Ka(h)	0.99±0.83	0.56±0.60	1.23±0.88
Tmax(h)	3.4±0.46	2.4±0.66	3.8±0.79
Cmax($\mu\text{mol}/\text{L}$)	84.73±25.23	12.89±5.52	5.08±3.08

4. LC、ALC、PLC 的血药浓度相关性分析

将 LC、ALC、PLC 血药浓度数据进行相关性分析，结果 LC 和 ALC、LC 和 PLC、ALC 和 PLC 的相关系数分别为 0.8626，0.8368，0.5361。可见 ALC 与 LC 的浓度呈高正相关关系，PLC 与 LC 的浓度变化呈高正相关关系，ALC 与 PLC 的浓度变化成显著正相关关系。

5. 尿药排出量及累积排出率：

计算 12 名受试者服用 2g 左卡尼汀口服液后左卡尼汀尿药排出量及累积排出率数据以及乙酰左卡尼汀、丙酰左卡尼汀尿药排出量，结果表明服药前正常受试者尿液中也能检测到 LC、ALC、PLC，24 小时的 LC、ALC 和 PLC 尿药排出量分别为 $613.47\pm 161.72\mu\text{mol}$ ， $368.25\pm 134.77\mu\text{mol}$ 和 $61.29\pm 37.75\mu\text{mol}$ 。24 小时 LC 累积排出率为 6.05%。

讨 论

本实验在文献^[7,8]的基础上采用采用 1-AA 对 LC, ALC 和 PLC 进行衍生化, 文献分别采用乙醚 5ml 和氯仿 5ml 洗涤两次, 本试验采用乙醚 3ml、2ml 洗涤两次, 氯仿 4ml 洗涤一次即可达到排除杂志的干扰, 样本衍生化后检测灵敏度高, 可有效降低检出限, 色谱峰分离良好, 背景干扰少, 在实验采用的色谱条件下, 在室温条件下即可完成, 可以同时检测血浆和尿液中 LC、ALC 和 PLC 的浓度, 能在 18min 内完成色谱分析。同时其精密度、回收率、稳定性均能达到药物检测的要求。

本试验通过检测受试者零点的血浆来得出中国健康人 LC、ALC、PLC 平均血浆浓度分别为 $39.14 \pm 5.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.36 \pm 0.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.61 \pm 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果表明中国人平均血浆浓度为比国外报道结果低^[9], 分析可能与饮食习惯有关, 因为左卡尼汀主要的饮食来源是肉类(特别是瘦肉)和乳制品, 在蔬菜与水果里的含量可以忽略不计, 中国人的饮食中肉食相对较少, 而国外肉食偏多。可能是导致平均血浆浓度降低的原因。我们同时考察了性别之间血浆 LC、ALC 和 PLC 的水平, 正常男性和女性平均血浆 LC、ALC 和 PLC 的浓度分别为 41.53 ± 6.03 , 2.49 ± 0.66 , $0.68 \pm 0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 36.76 ± 4.01 , 2.24 ± 0.45 , $0.55 \pm 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可能与大多数女性较男性由于减肥而偏重于素食有关。

本单次给药药动学试验结果显示, 口服 2g 左卡尼汀口服液后, 左卡尼汀血浆浓度在正常人基线水平上缓慢升高, 24 小时后又回落到基线水平, 主要药动学参数 $t_{1/2\alpha}$: $1.66 \pm 1.20 \text{h}$, $t_{1/2\beta}$: $60.33 \pm 14.97 \text{h}$, $\text{AUC}(0-t)$: $1354.41 \pm 324.97 \mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{h}$, $\text{AUC}(0-\infty)$: $2676.41 \pm 708.33 \mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{h}$, T_{max} : $3.4 \pm 0.46 \text{h}$, C_{max} : $84.73 \pm 25.23 \mu\text{mol} / \text{L}$, 结果与国外报道相似^[5], 试验中 $t_{1/2\beta}$ 和 AUC 的变异系数(标准差/均值)均小于 50%, 说明该药体内代谢的个体差异较小, 临床用药较安全。文献报道^[5] 单剂量口服左卡尼汀口服液的生物利用度为 $15.9 \pm 4.9\%$, 说明左卡尼汀口服吸收是不完全的, 给药 2g 后血浆浓度最大值为 $70-80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5] 本试验口服 2g 左卡尼汀后, t_{max} 值为 $3.4 \pm 0.46 \text{h}$, 达峰浓度 C_{max} $84.73 \pm 25.23 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献结果一致。

药时曲线的数据结果可以看出随着体内 LC 血浆浓度的增高, ALC、PLC 也随之增高, 相关关系分析结果 ALC 与 LC、PLC 与 LC 的浓度变化呈高相关关系, ALC 与 PLC 的浓度变化成显著相关关系。说明随着 LC 在体内的吸收过程中, 发生了左卡尼汀乙酰化和丙酰化的过程, 有一部分 LC 代谢成为 ALC 和 PLC。国外也有证据证明了这一点^[10,11], 也有文献证明了口服 PLC 后, 有一部分 PLC 转化成为 LC 和 ALC, 而且是一个可逆的过程^[8]。本试验进一步证明了三者之间的关系。

Rebouche^[11] 研究发现口服左卡尼汀吸收后的 LC 仅有口服剂量的 6.3% 在尿中以原型代谢, 剩余的被合并到内源性的卡尼汀群。口服后未吸收的左卡尼汀在胃肠内会被细菌降解为三甲胺(TMA)和 γ -丁基甜菜碱(GBB)。本试验结果表明口服 2g 左卡尼汀口服液后 24 小时的尿药排出量为 $613.47 \pm 161.72 \mu\text{mol}$, 尿液回收率为 6.05%, 比文献报道相似, 同时也分别检测出 ALC、PLC 的 24 小时尿药排出量分别为 $368.25 \pm 134.77 \mu\text{mol}$ 和 $61.29 \pm 37.75 \mu\text{mol}$ 。

试验期间, 12 名受试者无一例发生不良反应, 其血液、生化及心电图检查均未见异常, 通过左卡尼汀及其代谢产物的药代动力学研究, 为进一步研究卡尼汀群在体内的吸收、分布、代谢以及临床用药提供了依据。

参考文献:

- [1] Janos K, Charles H. Generic disorders of carnitinemetabolism and their nutritional management[J]. Annu Rev Nutr, 1998, 18: 179-206.
- [2] Angsten G, Cederblad G, Meurling S. Reference ranges for muscle carnitine concentration in children[J]. Ann Clin Biochem, 2003, 40 (4): 404-410.
- [3] 林锋. 左卡尼汀在全肠外营养中的应用[J]. 中华胃肠外科杂志, 2003, 3(1): 42-44.
- [4] Angelini C, Vergani L, Martinuzzi A. Clinical and biochemical aspects of carnitine deficiency and insufficiency: transport defects and inborn errors of oxidation[J]. Crit Rev Clin Lab Sci 1992; 29 (3-4): 217-42.
- [5] Sahajwalla CG, Helton ED, Purich ED, et al. Multiple-dose pharmacokinetics and bioequivalence of L-carnitine 330mg tablet versus 1g chewable tablet versus enteral solution in healthy adult male volunteers. J Pharm Sci 1995; 84 (5): 627-33.
- [6] 徐先彬, 刘 蕾, 李可欣, 等. HPLC 法测定喷昔洛韦在健康人血浆浓度及其药代动力学研究[J]. 中国临床药理学杂志, 第 23 卷, 第 2 期, 2007 年 3 月(总第 106 期): 147-150.
- [7] 孙永旭, 陆丛笑, 唐启令, 等. 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

[J]. 中国药学杂志 2007.42(18):1425-1428.

[8] Longo A, Bruno G, Curti S, et al. Determination of L-carnitine acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine in human plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivitization with 1-aminoanthracene. *J Chromatogr B Bi.omed Appl* 1996; 686 (2): 129-39.

[9] LAURENCE VERNEZ, MICHAEL DICKENMANN, JURG STEIGER, et al. Effect of L-carnitine on the kinetics of carnitine, acylcarnitines and butyrobetaine in long-term haemodialysis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21: 450-458.

[10] Gudjonsson H, Li B, Shug AL, et al. In vivo studies of intestinal carnitine absorption in rats. *Gastroenterology* 1985; 88 (6):1880-7.

[11] Rebouche CJ. Quantitative estimation of absorption and degradation of a carnitine supplement by human adults. *Metabolism* 1991; 40 (12): 1305-10.