

定 此法出峰较快 实际操作过程相对简单 所需样本量较少 , 十几分钟分析过程即可完成 标准曲线具良好的线性关系 特异性强 准确 精密 具较高回收率 可在临床药物动力学研究和血药浓度监测中应用。

参考文献

- (1) 许耕川,袁向亮,沈立松. HPLC 法测定血清甲氨蝶呤浓度的方法建立及其与荧光偏振法的比较 (J). 检验医学 2010, 25(9): 701-704.
- (2) Alnaim L. Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy (J). J

Oncol Pharm Pract 2007, 13(4): 207-221.

- (3) 吴先闯,宋晓勇,张永州. HPLC 法与 EMIT 法检测血检中甲氨蝶呤浓度的比较研究 (J). 中国药师 2012, 15(11): 1598-1600.
- (4) 张媛媛,徐康康. 三种检测方法测定甲氨蝶呤血药浓度的比较分析 (J). 安徽医药 2014, 18(2): 357-360.
- (5) 张春燕,顾健. 反相高效液相色谱法同时测定人血浆中亚叶酸、5-甲基四氢叶酸及甲氨蝶呤的浓度及临床应用 (J). 中国药理学杂志, 2010, 45(7): 543-547.

HPLC 测定血浆中的游离肉碱

谢根英¹, 韩筱兰¹, 张贤华² (1. 厦门市海沧医院 厦门 361026; 2. 厦门大学医学院 厦门 361026)

摘要: 目的 建立血浆中游离肉碱的测定方法。方法 用高效液相色谱 (HPLC) 测定各患者的血浆游离肉碱, 并进行比较。结果 方法线性范围为 $2 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 最低检测浓度为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 总分析时间为 9.248min。肉碱的平均保留时间 (8.467 ± 0.042) min。高、中、低 3 种浓度的平均回收率为 98.7%。批内批间 RSD 分别为 4.8% 和 10.9% ($n=5$)。结论 HPLC 法测定血浆游离肉碱浓度灵敏、可靠、简便, 适用于快速检测肉碱缺乏症病人的临床筛选工作。

关键词: HPLC; 左旋肉碱

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2017)05-0920-0241-02

Determination of Carnitine in Serum by HPLC

XIE Gen-ying¹, HAN Xiao-lan¹, ZHANG Xian-hua² (1. Xiamen Municipal Haicang Hospital, Xiamen 361026, China; 2. Medical college of Xiamen university Xiamen 361026, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of the concentration of carnitine in serum by HPLC. **METHODS** Determinate free plasma carnitine by HPLC method for each patient and run a comparison between them. **RESULTS** The linear range in this method was $2 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; the Minimum detection concentration was $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and total analysis time for 9.248min. Also, Carnitine average retention time was 8.467min (plus or minus 0.042). High, medium and low concentration of three kinds of the average recovery was 98.7%. Batch inside batch respectively between RSD was 4.8% and 10.9% ($n=5$). **CONCLUSION** The determination of the concentration of carnitine in serum by HPLC will be sensitive, reliable and convenient, and it will be applicable to the rapid detection for clinical screening work of patients with carnitine deficiency.

KEY WORDS: HPLC; L-carnitine

左旋肉碱 (L-carnitine, 左卡尼汀) 广泛存在于机体组织, 具有多种生理、生化活性, 主要功能是参与游离脂肪酸的代谢, 产生细胞所需要的能量。它在体内以游离形式或同酰基结合形式存在。缺乏时将产生能量供应障碍及脂肪酸代谢的各种中间酸性产物累积中毒。近几年来, 临床上用于治疗多种疾病, 获得较好的疗效。为配合临床开展研究, 我们对

HPLC 法测定血浆中游离肉碱的含量进行了探讨。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 LC-20AD 高效液相色谱仪 (LC Solution 色谱工作站 (日本岛津公司); AL104 型电子分析天平 (METTLER TOLEDO 公司); KQ-100B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 1-15 型离心机 (Sigma 公司); G560 型涡旋仪 (美国 Scientific Industries 公司); 2HWY-211B 型恒温培育箱 (上海智城分析仪器制造有限公司); $10 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$, $1000 \mu\text{L}$ 微量移液器 (Eppendorf)。

作者简介: 谢根英。职称: 主任药师。联系电话: 0592-6883135, 13328778185

对-溴苯甲酰甲基溴化物(PBPB, HPLC 纯) 购自 Sigma 公司; 甲醇、乙腈、异丙醇均为 HPLC 纯; 10% 氢氧化四丁基铵, 磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氧化银、柠檬酸、三乙醇胺均为分析纯; 左旋肉碱(纯度 98%) 标准品购自 Signa 公司。水为双蒸馏水。

1.2 血样采集与处理 血浆样本共 22 例。标本采集后即刻以 $6000r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min, 吸取 $300\mu\text{L}$, -20°C 保存待用。

1.3 衍生化试剂配制与衍生化反应

1.3.1 衍生化试剂配制: 称取 40mg PBPB 加入乙腈 1.0mL 及 10% 氢氧化四丁基铵 $200\mu\text{L}$, 摇匀后 4°C 保存待用。标准肉碱储备液浓度为 $3.2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 配制如下: 精密称取 16.0m 肉碱标准品, 置于 5mL 容量瓶中, 加甲醇适量, 摇匀后加甲醇至刻度, 4°C 保存备用。肉碱工作液用空白血浆将肉碱储备液依次稀释至 $2, 4, 6, 8, 16, 32\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4°C 保存备用。

1.3.2 衍生化反应操作: 吸取血浆 $100\mu\text{L}$, 加入乙腈: 甲醇 (9:1) 1mL, 进行蛋白沉淀, 摇匀后分别加入磷酸二氢钠-氧化银混合物 400mg, 及磷酸二氢钾 400mg, 涡旋 5min, 于 $4000r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min, 取上清液 $320\mu\text{L}$, 加入衍生化试剂 $40\mu\text{L}$, 摇匀, 70°C 温育 1.5h 后, 流水迅速冷却, 离心, 取上清液 $20\mu\text{L}$ 进样。

1.4 色谱条件 采用 Hypersil-C₁₈ (250mm × 4.6mm, $5\mu\text{m}$) 色谱柱; 流动相: 甲醇-乙腈-异丙醇 (含 $4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙醇胺, $1.6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸) = 35:20:45, 用前均经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤; 流速 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 260nm, 柱温 25°C , 进样 $20\mu\text{L}$ 。

1.5 数据处理 所有色谱数据均按峰面积由 Agilent 提供的软件“化学工作站”(Version A.09.01) 自动进行定量计算。

表 1 患者血浆肉碱浓度

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
左卡尼汀溶度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.3604	10.573	0.80945	3.29799	-0.2467	1.14608	0.3599	4.06337
试管编号	9	10	11	12	13	14	15	16
左卡尼汀溶度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	-0.54333	3.71227	-0.2115	2.62136	1.825609	0.50417	-0.1334	4.41592
试管编号	17	18	19	20	21	22		
左卡尼汀溶度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.854787	0.711068	1.09689	-1.49293	1.09062	0.704316		

3 讨论

3.1 目前肉碱的测定方法有多种⁽¹⁻³⁾ 酶法、HPLC 法、LC-MS 法、质谱法等。单纯酶法不如放射性同位素酶法敏感性高, 但后者有放射污染。质谱法精确度好、灵敏度高, 但需要昂贵的仪器。本文采用乙腈、甲醇沉淀蛋白, PBPB 衍生剂与肉碱生成对紫外吸收敏感的 p-苯酰溴酯化物, 可以避免肉碱极性、保留时间短的缺点, 也可以避免质谱法对样品测定时应尽量无水的要求。

3.2 左卡尼汀广泛存在于机体组织 样品检测结果中出现负数, 是因为该患者血清中左卡尼汀的含量低于基线水平。

2 结果

2.1 色谱分离 图 1 为患者血浆样本、肉碱标准品、空白血浆加肉碱标准品的色谱分离图。肉碱平均保留时间为 $(8.467 \pm 0.042)\text{min}$ 。总分析时间为 9.248min。肉碱在 $2 \sim 32\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, $r^2 > 0.9993$ ($n = 6$), 回归方程为: $Y = 2073.5X + 4814.6$ 。肉碱在血浆中的最低检测浓度 ($S/N \geq 3$) 为 $2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

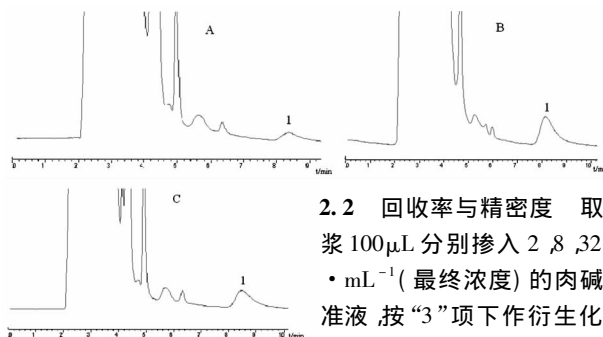


图 1 血浆中肉碱的色谱图

A. 患者血浆; B. $32\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肉碱标准品; C. 空白血浆加 $16\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准品

2.2 回收率与精密度 取血浆 $100\mu\text{L}$ 分别掺入 $2, 8, 32\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (最终浓度) 的肉碱标准液, 按“3”项下作衍生化反应进行回收率测试, 结果表明回收率为 94.1% ~ 103.6%, 平均 98.7%。日内和日间的精密度 (RSD) 测定结果分别为 4.8% 和 10.9% ($n = 5$)。

2.3 样品的稳定性 对置于室温下 ($25 \sim 30^\circ\text{C}$) 的肉碱样品, 每隔 2h 进行 1 次测定, 连续测定 12h 以观察其稳定性。结果表明, 肉碱-溴苯甲酰甲酯衍生物非常稳定, 12h 的峰面积变化 (RSD) $< 9.98\%$ 。

2.4 患者肉碱血浆浓度测得值 22 例血浆样品的肉碱浓度 (见表 1)。

3.3 从样品测定的结果可以看出 患者肉碱的含量呈显著差异。

参考文献

(1) 赵亚明, 李任, 王得新, 等. 高效液相色谱法检测血浆左旋肉碱方法的建立 (J). 中国临床神经科学, 2006, 14(5): 528.
 (2) 冯一, 张顺国, 徐远飞, 等. HPLC 法测定血清肉碱的研究 (J). 营养学报, 2006, 28(2): 177.
 (3) 唐凌峰, 姜辉, 商学军, 等. 精浆左旋肉碱与精子密度、活力和活率关系的研究 (J). 中国男科学杂志, 2008, 14(8): 704.