

of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats[J]. *Gastroenterol*, 2001, 121(3):685

[8] Muhlbauer M, Weiss TS, Thasler WE. LPS mediated NFkappaB activation varies between activated human hepatic stellate cells from different donors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(1):191

[9] Saile B, Matthes N, El Amouche H, et al. The bcl, NF kappaB and p53/p21/WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 2001, 80(8):554

[10] Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, et al. Persistent activation of nuclear factor KB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IKB family proteins[J]. *Hepatology*, 1999, 30:761

[11] Kawada N, Klein H, Decker K. Endotoxin-mediated contractility of hepatic stellate cells[J]. *Biochem J*, 1992, 285(Pt 2):367

[12] Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(8):1517

[13] Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure activity relationship

[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(3):468

[14] Sveglia B, Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, et al. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells[J]. *Liver*, 2001, 21(1):1

[15] Rim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4):1235

[16] Natarajan K, Singh S, Burke TR, et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-KB[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:9090

[17] Lu B, Wang L, Medan D, et al. Regulation of Fas (CD95)-induced apoptosis by nuclear factor kappaB and tumor necrosis factor alpha in macrophages[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283(3):C831

[18] Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor kappa B and suppresses acute inflammation[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2000, 7(2):99

(收稿日期:2005-05-16; 修回日期:2005-08-29)

(本文编辑 狄亚敏)

文章编号:1008-9926(2005)06-0407-03 中图分类号:R969.1 文献标识码:A

咖啡因探针法测定正常人肝脏N-乙酰化转移酶活性^①

李 军^②, 彭向前^③, 张 鉴, 徐济萍

(^②山东省立医院临床药理中心 山东 济南 250021; ^③山东大学药学院 山东 济南 250012)

摘要:目的 建立一套测定咖啡因的3种主要代谢物5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)、1-甲基黄嘌呤(1X)和1-甲基尿酸(1U)的高效液相色谱法,探讨咖啡因代谢物在N-乙酰化酶活性评价中的意义。方法 采用反相高效液相色谱梯度洗脱法测定尿液内咖啡因代谢产物AFMU、1U和1X的相对含量,计算AFMU/(AFMU+1X+1U)比值,绘制概率分布直方图,确定正常人快、慢乙酰化代谢表型的截点(临界点)。结果 受试者可明显划分为快乙酰化者和慢乙酰化者,快、慢乙酰化代谢表型的临界点为0.26,快、慢乙酰化表型之比73:17。结论 本方法简便、准确、快速,适合于尿中咖啡因代谢物的测定及N-乙酰化转移酶活性的研究。

关键词:咖啡因代谢物; 高效液相色谱; N-乙酰化转移酶; 多态性; 代谢探针

Determination of Activity of N-acetyltransferase Using Caffeine as a Metabolic Probe^①

LI Jun^②, PENG Xiang Qian^③, ZHANG Jian, XU Ji-Ping

(^②The Center of Clinical Pharmacology, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, Shandong China)

(^③School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong China)

ABSTRACT: Aim To establish a HPLC method for determining three major metabolites of caffeine, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil(AFMU), 1-methylxanthine(1X) and 1-methyluric acid(1U), and evaluate the function of caffeine as a metabolic probe for acetylator phenotyping. **Methods** The contents of metabolites of caffeine in the urine was determined by RP-HPLC method. The acetylator's status was phenotyped by measuring the AFMU/(AFMU+1X+1U).

① 基金项目:山东省自然科学基金, No. Q99C05

② 作者简介:李 军(1963),男,山东菏泽人,副主任药师。研究方向:临床药理学。Tel:(0531)85186488

Frequency distribution histograms were drawn to determine the slow and fast acetylate phenotype status among people. **Results** The frequency distribution histograms indicated two distinct groups, the cut of point is 0.26, the ratio of the fast acetylator to the slow acetylator was 73/17. **Conclusion** The method is simple, accurate and quick, suitable for the determination of metabolites of caffeine in urine. The method is used to assay the activities of N-acetyltransferase.

KEY WORDS: Caffeine metabolites; HPLC; N-acetyltransferase; Polymorphism; Metabolic probe

N-乙酰基转移酶(N-acetyltransferase, NAT2)是一种肝细胞非微粒体酶,与底物分子中极性较大的基团结合,催化乙酰基从乙酰辅酶A转移形成乙酰化衍生物,结合通常使药物失活且易排泄。NAT2催化胍苯达嗪、氨苯砜、异烟肼、咖啡因和磺胺类等物质的乙酰化代谢,其活性也直接影响致癌原物质在体内代谢和毒性反应的强弱,且催化速率有明显个体差异,表现出多态性^[1]。

本文通过测定咖啡因3种主要代谢产物,采取不同的代谢物比率及组合反映NAT2在体内的活性,5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)的形成与NAT2的活性成正比,慢代谢者AFMU形成少,快代谢者AFMU形成多,而3者(AFMU+1X+1U)的总量却没有明显变化,用AFMU/(AFMU+1X+1U)就可以反映NAT2的活性^[2]。根据AFMU/(AFMU+1X+1U)比值,绘制概率分布直方图,探讨乙酰化代谢表型在正常人的分布规律,为经乙酰化代谢的药物临床应用提供依据,对临床个体化合理用药有重要意义。

1 材料

1.1 仪器与试剂 10AVP型高效液相色谱仪, SCL-10AVP中央控制器, LG-10ATVP高压泵, SIL-10ADVP自动进样器, SPD-10AVP紫外可见检测器, CLASS-VP.5.0色谱数据工作站(均为日本Shimadzu公司); VP-COD柱(4.6mm×150mm, 5 μ m)、C₁₈预柱(均为岛津Shim-pack); 雀巢咖啡(东莞雀巢有限公司, 批号20030801); 咖啡因粉(乐山中西制药有限责任公司, 批号010522-2); 5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)(加拿大多伦多大学药理系提供); 1-甲基黄嘌呤(1X, Sigma公司, 批号84H4055); 1-甲基尿酸(1U, Sigma公司, 批号37H2522); 醋酸、乙腈均为色谱纯。实验用水为重蒸去离子水。

1.2 色谱条件 VP-ODS柱(4.6mm×150mm, 5 μ m), C₁₈预柱流动相: 乙腈(A相), 0.05%醋酸(B相), 0~24min流动相B的比例从2.5%线性增加至8%; 流速: 1ml/min; 柱温 25℃; 检测波长: 280nm; 进样量: 20 μ l。

1.3 受试者 遵照自愿原则, 选择90例健康志愿者作为实验组, 其中男59例, 女31例, 年龄(22.9±6.8)岁。签署知情同意后, 进行病史询问和体格检查, 包括心电图、血压及肝功能等检查, 检查结果正常者被选入受试对象。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取AFMU、1U和1X对照品适量, 用水制成20 μ g·ml⁻¹对照品溶液。

2.2 线性关系 精密量取AFMU、1U和1X对照品溶液, 用空白尿分别稀释浓度为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、16.0 μ g·ml⁻¹的标准工作液, 按上述色谱条件分别进样, 测定峰面积。以浓度X(μ g·ml⁻¹)对峰面积Y作线性回归, 得标准曲线。其回归方程:

$$\text{AFMU: } Y = 41\,967.65X - 25\,222.26, \quad r = 0.999\,2, \quad n = 5$$

$$\text{1U: } Y = 82\,030.75X - 40\,470.06, \quad r = 0.999\,1, \quad n = 5$$

$$\text{1X: } Y = 30\,245.89X - 3\,879.50, \quad r = 0.999\,8, \quad n = 5$$

结果表明, AFMU、1U和1X在0.5~16.0 μ g·ml⁻¹范围内有良好的线性关系。

2.3 回收率及精密度试验 分别取线性关系项下配制的AFMU、1U和1X高、中、低3种浓度的标准工作液(浓度分别为2.0、8.0、12.0 μ g·ml⁻¹)500 μ l, 置1ml带塞离心管中, 10000r/min离心5min, 取上清液, 按上述色谱条件直接进样。另分别取AFMU、1U和1X对照品溶液配制成高、中、低3种浓度的对照品溶液(浓度分别为2.0、8.0、12.0 μ g·ml⁻¹)500 μ l, 依上述条件进行离心和进样。标准工作液测定值与相同浓度对照品溶液进样测定值之比计算方法回收率($n = 5$); 同日和连续5d各处理5份样品, 求得其日内RSD和日间RSD。结果AFMU、1U和1X的平均回收率分别为98.15%、99.88%和100.23%; 平均日内RSD为3.56%、3.26%和2.22%; 平均日间RSD为3.67%、3.13%和2.28%。3种代谢物回收率均在98%以上, 日内和日间误差均小于4%。

2.4 最低检测限 在上述色谱条件下, 当信噪比为3:1时对最低检测线进行测定, 结果表明, AFMU、1U和1X的最低检测限分别为0.20、0.05、0.12 μ g·

mL^{-1} 。

2.5 样品收集及处理 受试者在取样前3d内禁用含咖啡因的食物和饮料。实验当天上午9:00预留空白尿样后口服1标准杯咖啡(每杯加120mg咖啡因和3g咖啡共含咖啡因约215mg^[2])，下午14:00留取尿样10ml至样品瓶中(样品瓶中预先加入维生素C 200mg)，于20℃保存直至分析。取尿样500 μL 置1ml带塞离心管中，按回收率及精密度项下离心，取上清液，按上述色谱条件直接进样20 μL 。

2.6 咖啡因3种代谢物的分离情况 在上述色谱条件下咖啡因3种代谢物之间具有良好的分离度见图1(A)；从受试者尿样色谱图见图1(C)可以看到在AFMU、IU和1X峰位上没有尿中杂质干扰，而且代谢物与杂质的分离度较好。

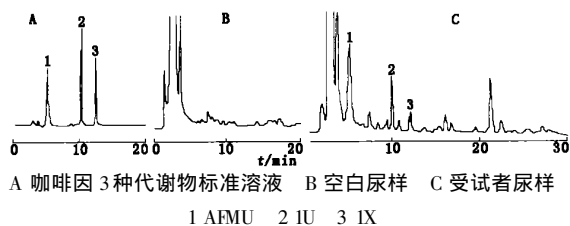


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms

2.7 数据处理 90名受试者服用咖啡因4h后(AFMU+1X+IU)/17U的平均值为4.27。根据AFMU/(AFMU+1X+IU)的比值(反映NAT2的活性)，绘制概率分布直方图，根据健康志愿者的直方图分布确定截点(临界点)及各组人群快、慢乙酰化代谢表型分布特点。

2.8 结果 受试者AFMU/(AFMU+1X+IU)从0.04到0.83，概率分布直方图显示临界点为0.26，见图2。箭头示截点位置。结果与Nortariann等^[3]报道的基本一致，人群呈明显多态性双峰分布。受试者可明确划分为快慢代谢者，快乙酰化代谢表型个体频率为81.11%(73/90)，慢乙酰化代谢表型个体频率为18.88%(17/90)。

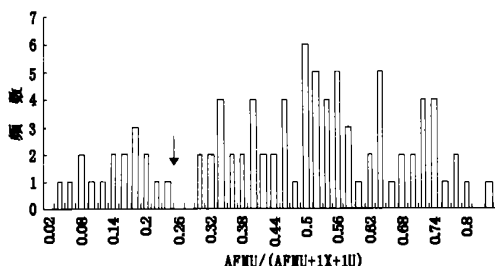


图2 概率分布直方图(截点为0.26)

Fig 2 Frequency distribution histograms (cut of point is 0.26)

3 讨论

3.1 咖啡因5种代谢物水溶性较大，常规提取方法提取率不高，本方法集样品的前处理、分离及分析测定于一体，大大简化了操作步骤，缩短了分析时间，避免了传统HPLC方法样品前处理过程引入的误差；采用有机相递增梯度洗脱大大改善了保留时间较长物质的峰形及测定精度。

3.2 本方法以咖啡因为探针药物的表型测定具有方便、准确和快速的特点且可克服提取及分析过程对表型测定的干扰。

3.3 尿样直接进样对于预柱及分析柱的寿命有一定的影响，因此我们在AFMU出峰后又延长了流动相冲洗的时间，同时加大了乙腈的比例，使尿中的杂质得到进一步清除。

3.4 AFMU的性质不稳定，尤其是在碱性条件下易转变为5-乙酰氨基-6-氨基-3-甲基尿嘧啶(5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil, AAMU)，因此尿样保存时必须用维生素C调为酸性^[4]，尿样处理时尽量在低温下操作，并尽量缩短处理时间。

3.5 由于药物遗传代谢的多态性，某些个体正常剂量可因慢代谢而导致蓄积，血浓度增加，产生毒性治疗，而另有部分个体由于快代谢而产生无效治疗。因此，测定不同人群乙酰化代谢表型可预测人体经乙酰化代谢的药物的体内处置、代谢的程度和强度，有助于制定和调整临床个体化剂量方案，在获得有效治疗的同时尽量减少不良反应的发生机率。

参考文献:

[1] Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I, et al. Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 1998, 23(4): 501

[2] 卢建丰, 易涛, 曹晓梅, 等. 测定咖啡因代谢物评价N-乙酰转移酶、CYP1A2和黄嘌呤氧化酶活性[J]. *药学学报*, 1997, 32(11): 813

[3] Notarianni LJ, Dobrocky P, Godlewski G, et al. Caffeine as a metabolic probe: NAT2 phenotyping[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1996, 41(3): 169

[4] 刘丽娟, 李军, 郭瑞臣, 等. 肝病患者药物代谢酶细胞色素P₄₅₀酶1A2、多态性N-乙酰化酶、黄嘌呤氧化酶活性的变化[J]. *中国医院药学杂志*, 2000, 20(4): 212

(收稿日期: 2005-04-28; 修回日期: 2005-06-24)

(本文编辑 狄亚敏)