

· 药物分析 ·

高效液相色谱法测定尿中咖啡因主要代谢物浓度

易 涛 卢建丰*

(广州军区武汉总医院药局 武汉 430070)

摘要 本文建立了测定尿中咖啡因 5 种主要代谢物 (AFMU、1X、1U、17X、17U) 浓度的高效液相色谱法。尿样用硫酸铵饱和后加氯仿及异丙醇混合液 (85:15) 提取 2 次, 空气流吹干, 蒸馏水溶解进样。以 Shim Pack C₁₈ 为固定相, 甲醇-乙腈-0.05% 醋酸 (10:1:89) 为流动相, 扑热息痛为内标, 流速为 1.2ml/min, 在 280nm 处定量检测。本法精确稳定可靠。用此方法测定了 120 名健康志愿者口服咖啡后的尿样, 对人体内 N-乙酰化转移酶和 CYP_{1A2} 酶活性作了初步分析。

关键词 咖啡因; HPLC; N-乙酰化转移酶; CYP_{1A2} 酶

HPLC determination of caffeine metabolites in urine

Yi Tao, Lu Jianfen

(Wuhan General Hospital of PLA Wuhan 430070)

ABSTRACT A HPLC method was developed for determination of caffeine metabolites in urine (AFMU, 1X, 1U, 17X, 17U). The sample added ammonium sulfate was extracted twice by a mixture of chloroform-isopropanol (85:15 vol/vol) and evaporated to dryness with a gentle stream of air below 25°C. HPLC analysis was carried out on Shim Pack C₁₈ column with methanol-acetonitrile-0.05% acetic acid (10:1:89 vol/vol) as the mobile phase and UV detection at 280nm. The assay procedure has been applied to determining urinary metabolites excreted after oral caffeine in a healthy sample (n=120). Caffeine metabolite ratios were used to assess the polymorphic N-acetyltransferase and CYP_{1A2} activities.

KEY WORDS Caffeine, HPLC, N-acetyltransferase, CYP_{1A2}

咖啡因在人体内代谢生成 13 种代谢物 (见表 1)。主要由 3 位去甲基化反应途径生成 1,7-二甲基黄嘌呤 [17X]、1,7-二甲基尿酸 [17U]、5-乙酰氨基-6-甲酰胺基-3-甲基尿嘧啶 [AFMU]、1-甲基黄嘌呤 [1X] 和 1-甲基尿酸 [1U] 等 5 种代谢物^[1]。(如图 1 所示) 研究表明这 5 种代谢物的不同比值可以反映 N-乙酰化转移酶 (NAT₂)、

CYP_{1A2} 酶和黄嘌呤氧化酶活性^[1-5]。国外已用于肝功能检查和支持遗传学研究。本文采用高效液相色谱法 1 次测定尿中这 5 种代谢物的浓度, 方法简便快速, 灵敏度高。

一、仪器和试剂

(一) 仪器 日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪; SPD-6AV 紫外检测器; C-R6A 积分仪。

(二) 试剂 AFMU 标准品由加拿大多伦多大学 W. Kalow 教授提供, 其它 12 种代

* 南京军区南京总医院药理科 南京 210002

谢物标准品均购自 SIGMA 公司。咖啡为市售广东产雀巢咖啡。

精密称取 5 种主要代谢物标准品,用蒸馏水超声振荡溶解,得标准储备液。浓度分别为 AFMU 10.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1U 9.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1X

10.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、17U 7.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、17X 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。精密称取扑热息痛 12.09mg,溶于 100ml 0.05% 醋酸,得内标溶液。以上溶液均置于冰箱保存。

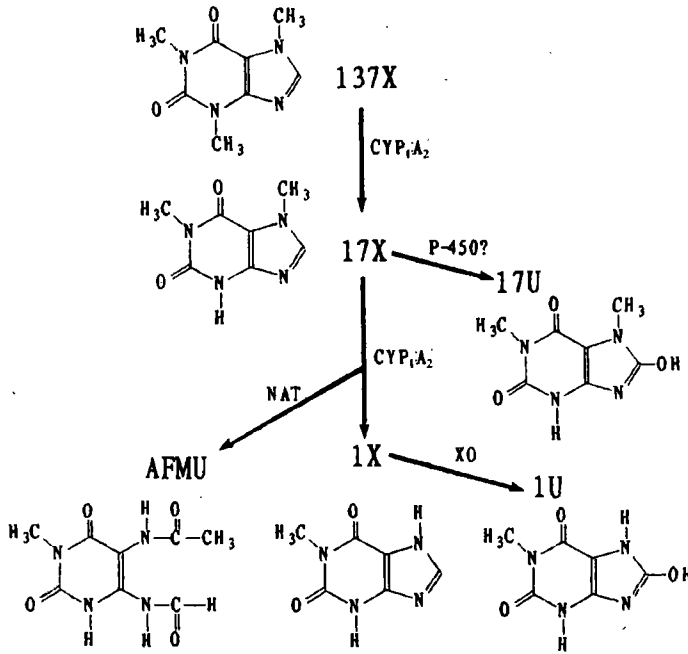


图 1 咖啡因体内主要代谢途径

表 1 咖啡因 13 种代谢物及内标的保留时间

代谢物	英文全称	保留时间(min)
AFMU	5 - Acetyl amino - 6 - formyl amino - 3 - methyluracil	4.40
3U	3 - Methyluric acid	4.98
7U	7 - Methyluric acid	6.45
7X	7 - Methylxanthine	6.97
1U	1 - Methyluric acid	7.74
3X	3 - Methylxanthine	8.27
37U	3, 7 - Dimethyluric acid	8.59
1X	1 - Methylxanthine	9.95
内标(扑热息痛)		12.26
37X	3, 7 - Dimethylxanthine[Theobromine]	13.10
17U	1, 7 - Dimethyluric acid	20.24
17X	1, 7 - Dimethylxanthine[Paraxanthine]	21.40
13X	1, 3 - Dimethylxanthine[Theophylline]	23.81
137U	1, 3, 7 - Trinethyluric acid	31.65

二、实验方法

(一) 色谱条件 日本岛津 Shim Pack CLC-ODS 柱 5 μ m; 预柱(大连中科院化学物理研究所); 流动相: 甲醇-乙腈-0.05% 醋酸(10:1:89); 流速 1.2ml/min; 检测波长 280nm; 进样量 20 μ l。

(二) 样品处理 尿样解冻后精取 200 μ l, 加入 20 μ l 内标和 150mg 硫酸铵, 旋涡振荡 3min, 再加入 6ml 提取液(氯仿:异丙醇=85:15), 旋涡振荡 2min, 3000g 离心 5min, 吸取下层提取液。向残余液中再加入 4ml 提取液, 旋涡振荡 1min, 3000g 离心 5min, 吸取下层提取液。合并两次提取液, 室温(25 $^{\circ}$ C)下空气流吹干, 用 1ml 蒸馏水溶解, 直接进样或于 -40 $^{\circ}$ C 保存待测。

(三) 标准曲线的绘制 精取 5 种代谢物的标准储备液各 20 μ l、40 μ l、60 μ l、80 μ l、100 μ l, 再加入内标 20 μ l 和空白尿 50 μ l, 按样品处理项下操作。以摩尔浓度(μ mol/L)为纵坐标, 代谢物对内标的峰高比为横坐标, 绘制标准曲线。

(四) 咖啡因 5 种主要代谢物的尿中浓度测定 120 名健康志愿者, 男性 59 人, 女性 61 人, 平均年龄 34a(18~67a), 平均体重 59.8kg, 肝肾功能正常。实验前一天禁用含有咖啡因的食物和饮料。实验当天 8:30 口服咖啡 1 杯(5g, 100ml), 13:00 留取尿样 5ml, 加入维生素 C 200mg 调为酸性, 于 -70 $^{\circ}$ C 保存直至分析。结果见表 2。

表 2 120 名志愿者口服咖啡后 4~5 小时尿中主要代谢物的浓度(μ mol/l)

代谢物	平均浓度	最小值	最大值	变异系数(%)
AFMU	67.20	5.70	370.98	88.72
1U	54.69	8.00	219.96	73.05
1X	57.32	6.10	207.02	75.17
17U	39.73	5.56	147.51	77.72
17X	51.30	11.09	135.62	51.42

三、实验结果

(一) 色谱行为 本实验色谱条件下各代谢物之间, 以及代谢物与尿中杂质的分离度均较好, 在 AFMU、1U、1X、17U 和 17X 峰位上没有尿中杂质干扰。如图 2 所示。

(二) 标准曲线方程

$$\text{AFMU} \quad y = -0.0139 + 0.5886x$$

$$r = 0.9999$$

$$1U \quad y = 0.0757 + 0.5954x$$

$$r = 0.9998$$

$$1x \quad y = 0.0032 + 1.5220x$$

$$r = 0.9998$$

$$17U \quad y = 0.0153 + 1.3770x$$

$$r = 0.9995$$

$$17x \quad y = 0.1341 + 2.4810x$$

$$r = 0.9999$$

(三) 回收率和精密度 精取 5 种代谢物的标准储备液各 20 μ l、40 μ l、60 μ l, 再分别加入内标 20 μ l 和空白尿 50 μ l, 按样品处理项下操作。测定结果代入标准曲线中计算回收量, 得到相对回收率。同法一天做 5 次, 得日内差异。同法间隔一天做 5 天, 得日间差异。结果见表 3。

表 3 咖啡因 5 种主要代谢物的相对回收率和精密度

代谢物	平均回收率(%)	CV(%)	日内差异(%)	日间差异(%)
AFMU	97.71	4.67	1.09	1.13
1U	87.54	4.33	1.29	1.57
1X	101.94	4.86	1.87	2.12
17U	101.01	3.20	2.19	2.52
17X	92.07	1.50	1.16	1.05

(四) N-乙酰化转移酶活性分析 采用 AFMU/(AFMU+1X+1U) 的摩尔浓度比值作为 NAT₂ 酶活性指标^[2,4]。以比值作频谱图, 可见 NAT₂ 酶活性呈明显二态分布(如图 3 所示), 快慢代谢者临界点(antimode)为 0.25。快代谢者 100 人, 占 83.3%; 慢代谢者 20 人, 占 16.7%。

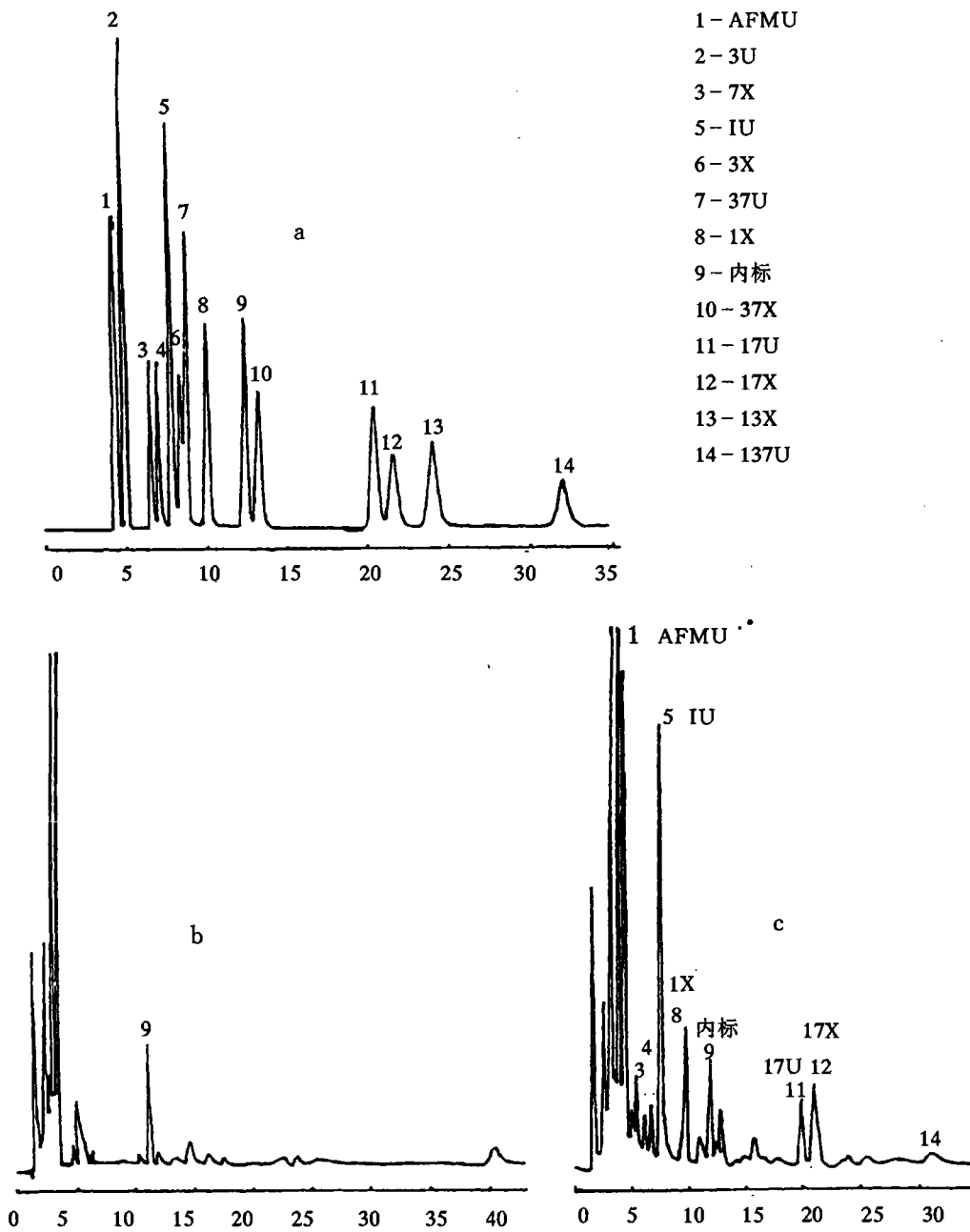


图 2 HPLC 色谱图

a. 咖啡因 13 种代谢物及内标

b. 健康志愿者 4~5 小时空白尿(加内标)

c. 健康志愿者饮用咖啡后 4~5 小时尿(加内标)

(五) CYP_{1A2} 酶活性分析 采用 (AFMU+17U+17X)/17U 的摩尔浓度比值作为 CYP_{1A2} 酶活性指标^[1]。以比值的对数值作频谱图,可见 CYP_{1A2} 酶活性呈良好的对数正态分布(如图 4 所示)。这与国外文献报道一致^[4]。

四、讨论

(一) 色谱柱选择 AFMU 极性较其它 4

种代谢物大。国外一般将 AFMU 转化为 5-乙酰胺基-6-氨基-3-甲基尿嘧啶 [AAMU]。采用特殊的凝胶排斥色谱柱分析^[6,7],其它代谢物采用谱通 ODS 柱。本文经过比较,采用岛津 Shim Pack CLC-ODS 柱一次分析 5 种代谢物。既保证了良好的分离效果,又避免了两次分析的烦琐及其引起的误差。

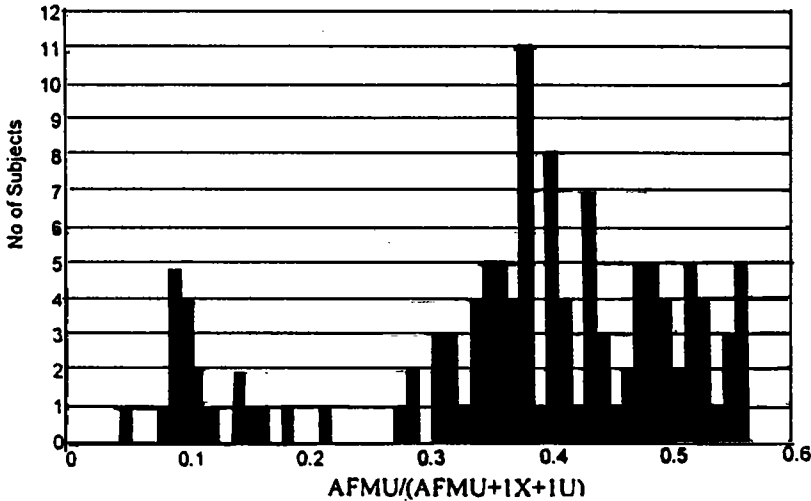


图 3 120 名健康志愿者饮用咖啡后 4~5 小时尿中 AFMU/(AFMU+1X+1U) 摩尔比值频数图

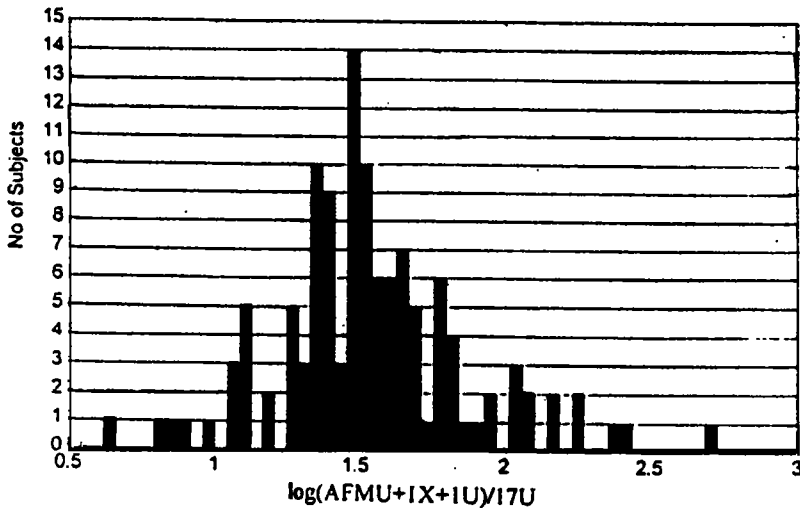


图 4 120 名健康志愿者饮用咖啡后 4~5 小时尿中 (AFMU+1X+1U)/17U 摩尔比值频数图

(二)提取方法选择 AFMU 等 5 种代谢物水溶性较大,常规提取方法提取率不高。本文采用先饱和再两次提取的方法,即先加入足量硫酸铵使尿饱和,降低代谢物在尿中的溶解度,再用比例适中的氯仿-异丙醇混合液提取。这样除 1U 回收率大于 85%,其它代谢物的回收率都在 90% 以上。

(三)稳定性 AFMU 性质不稳定,在碱性条件下易转变为 AAMU。因此尿样保存前必须调为酸性,处理时尽量在低温下尽快操作。实验表明:室温(25℃)下 12h 内 AFMU 损失小于 7%。因此在正常尿样处理时间内(4~5h)AFMU 的损失可以忽略。

(四)N-乙酰化转移酶、CYP_{1A2} 酶在体内芳香胺类、胍类和含氮杂环类的生物转化过程中起着重要作用 它们的活性高低对预测某些芳香胺类、胍类药物的毒副反应及指导用药和评价人体对某些化学致癌物质的易感性及某些癌症(膀胱癌、肺癌、乳腺癌等)病因学研究均有重要意义。本文采用 HPLC 法测定咖啡因尿中主要代谢物,精确稳定,较

为简便,为这两种酶的活性研究提供了一种新的较为可靠的方法。

参考文献

- [1] Kalow W, Tang BK. The use of caffeine for enzyme assays: A critical appraisal. *Clin Pharmacol Ther*, 1993;53:503~14
- [2] Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther*, 1983;33:591~602
- [3] Notarianni LJ, Oliver SE, Dobrocky P. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP_{1A2} activity. *Br. J. Clin Pharmacol*, 1995;39:65~9
- [4] Kalow W, Tang BK. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP_{1A2} and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther*, 1991;50:508~19
- [5] 安国升等. 人群 N-乙酰化表型研究. *临床药学*, 1993;2(4):41~3
- [6] Dobrocky P, Bennett PN, Notarianni LJ. Rapid Method for the routine determination of caffeine and its metabolite by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography B*, 1994;652:104~8
- [7] Hamelin BA, Xu K, et al. Caffeine metabolism in cystic fibrosis: Enhanced xanthine oxidase activity. *Clin Pharmacol Ther*, 1994;56:521~9

高效液相色谱法监测血清中卡马西平血药浓度 50 例分析

杨丽英 李景玉* 卢清林* 李红宇*

(北京清华大学医院 北京 100084)

摘要 卡马西平是临床上常用的抗癫痫药物,因其受个体差异的影响很大,相同的药物剂量不能产生相同的血药浓度,因而产生不同的疗效及毒副反应。本文利用高效液相色谱法(HPLC)对 50 例癫痫患者血清中卡马西平的药物浓度进行了监测和分析。

关键词 高效液相色谱;卡马西平;血药浓度

绝大多数癫痫病人需要长期用药治疗或预防。作为常用的抗癫痫药物卡马西平,其

治疗血浓度范围较小,个体差异又很大,临床上难于区分是药物的毒副反应还是癫痫发作。血药浓度监测是实现给药方案个体化的一个重要手段。为此,我们与临床结合,利用

* 河北省医学科学院 石家庄 050021