

非那西丁和对乙酰氨基酚浓度评估肝脏储备功能*

任 瑞, 逯素梅, 马永梅, 马万山[△] (山东省千佛山医院检验科, 济南 250014)

【摘要】 目的 对非那西丁和对乙酰氨基酚浓度分析进行方法学研究, 并进行应用性验证, 以评估肝脏储备功能。方法 建立高效液相色谱法(HPLC)测定非那西丁与对乙酰氨基酚浓度, 进行标准曲线建立、精密度试验及方法回收率试验, 并用健康人血浆进行应用性验证。结果 非那西丁与对乙酰氨基酚在浓度为 0.8~40.0 μg/mL 的范围内均呈现良好的线性关系。在 5、15、25 μg/mL 样品浓度下, 非那西丁测定的日内精密度分别为 0.84%、1.09% 和 0.53%, 日间精密度分别为 1.51%、1.10% 和 1.38%; 对乙酰氨基酚测定的日内精密度分别为 0.76%、0.89% 和 0.67%, 日间精密度分别为 1.02%、1.46% 和 1.21%, 在浓度为 1~20 μg/mL 浓度范围内, 利用所建立的分光光度技术测定, 相对标准差(RSD)小于 10%, 当浓度超过 5 μg/mL, RSD<5%。结论 HPLC 简便快捷、灵敏度和准确度高, 为评估肝脏储备功能提供了一种快捷、准确的方法。

【关键词】 高效液相色谱法; 非那西丁; 对乙酰氨基酚; 肝脏储备功能

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)09-1205-03

Concentrations of phenacetin and paracetamol for assessing liver reserve function* REN Rui, LU Su-mei, MA Yong-mei, MA Wan-shan[△] (Department of Clinical Laboratory, Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong 250014, China)

【Abstract】 Objective To perform the methodological study on detecting the levels of phenacetin and paracetamol and to conduct the application verification for assessing the liver reserve function. **Methods** The high performance liquid chromatography (HPLC) method for detecting the levels of phenacetin and paracetamol was established. The standard curve was established. The precision and recovery tests were performed and the healthy plasma was adopted for conducting the application verification. **Results** Both phenacetin and paracetamol showed a good linear relationship in the concentration range of 0.8—40 μg/mL. The within-day precisions of phenacetin under 5, 15, 25 μg/mL samples were 0.84%, 1.09% and 0.53% respectively, which of paracetamol were 0.76%, 0.89% and 0.67%, respectively. The inter-day precisions of phenacetin under 5, 15, 25 μg/mL samples were 1.51%, 1.10% and 1.38%, which of paracetamol were 1.02%, 1.46% and 1.21%, respectively. RSD based on established spectrophotometric techniques is less than 10% in the range of 1—20 μg/mL. Further, It is less than 5% when the concentration is more than 5 μg/mL. **Conclusion** The HPLC method is simple, fast, highly sensitive and highly accurate. It provides a fast and accurate method for assessing the liver reserve function.

【Key words】 HPLC method; phenacetin; paracetamol; liver reserve function

肝脏储备功能检测对肝脏类疾病(如肝炎、肝硬化等)的判断极为敏感和重要,但目前肝脏储备功能评价技术和指标如吲哚氰绿(ICG)清除试验、影像学检查、¹³C-美沙西汀呼气试验等存在诸多不足,因此临床迫切需要建立灵敏度高、特异性强的肝脏储备功能评价体系^[1]。其中利用探针药物测定肝脏药物代谢酶细胞色素 P450(CYP)的活性评价肝脏储备功能备受重视^[2]。CYP 是生物体内主要的代谢酶,存在种属差异,可参与外源性(药物、前毒物、前致癌物等)及内源性物质(胆固醇、脂肪酸等)的生物转化,其同工酶 CYP1A2 是 CYP 酶系的重要家族之一,在人的肝脏呈组成型表达,可参与许多药物、毒物和自身活性物质的代谢,是临床评价肝脏储备功能的理想靶点^[3-8]。研究表明,非那西丁是 CYP1A2 酶活性的特异性底物,在肝脏经 O-脱乙基化生成对乙酰氨基酚(图 1)^[9-10]。通过测定血液中非那西丁及对乙酰氨基酚浓度用以反映 CYP1A2 活性及药物之间的相互作用,是临床评价 CYP1A2 活性的理想方法^[11-12]。本研究建立的方法简便快捷、灵敏度和准确度高,

为非那西丁试验研究肝脏 CYP1A2 在体内的药物代谢活性提供了一种准确、快捷的方式。



图 1 非那西丁在肝脏的 O-脱乙基反应

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康成年人新鲜外周血。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 非那西丁(AR, Sigma 公司);对乙酰氨基酚(AR, Sigma 公司);高锰酸钾(AR, 国药集团化学试剂公司);重铬酸钾(AR, 国药集团化学试剂公司);甲醇(色谱纯, Merck 公司)。

* 基金项目:山东省科技攻关项目(2009GG10002005);山东省医药卫生科研项目(2007HW116)。

作者简介:任瑞,女,本科,在读硕士,主要从事临床检验诊断学。△ 通讯作者, E-mail: mwsqianyi@163.com。

1.2.2 仪器 Alliance 2695 型高效液相色谱仪(2998UV 检测器)(美国 Waters 公司);Pico 型微量台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Stratos 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TW12 型恒温水浴槽(德国 Julabo 公司);Xbridge C18 色谱柱(美国 Waters 公司)。

1.3 标准溶液配制

1.3.1 非那西丁标准溶液配制 准确称取非那西丁对照品 80.0 mg,移入 100 mL 容量瓶中,用甲醇:水(45:55)溶解并稀释至刻度,浓度为 0.8 mg/mL,置于冰箱中保存。

1.3.2 对乙酰氨基酚标准溶液配制 准确称取对乙酰氨基酚对照品 80.0 mg,移入 100 mL 容量瓶中,用甲醇:水(45:55)溶解并稀释至刻度,浓度为 0.8 mg/mL,置于冰箱中保存。

1.3.3 色谱条件 分析柱是 Waters Xbridge C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇:水(45:55);流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长 254 nm;柱温为室温;灵敏度是 0.102AU FS。

1.3.4 标准曲线制备 按照上述色谱条件分别分析非那西丁标准溶液(0.8 mg/mL)和对乙酰氨基酚标准溶液(0.8 mg/mL),结果表明 2 份组分在流动相为甲醇:水(45:55)条件下能得到完全分离。准确取非那西丁标准溶液(0.8 mg/mL)和对乙酰氨基酚标准溶液(0.8 mg/mL)各 5 mL,混合,移入 100 mL 容量瓶中并定容,所得溶液非那西丁和对乙酰氨基酚浓度均为 40 μg/mL,然后依次配制 32、24、16、8、7.2、6.4、5.6、4.8、4.0、3.2、2.4、1.6、0.8 μg/mL 系列浓度的溶液,利用自动进样器依次进样,进样量 10 μL,采集谱图,记录保留时间。分别以对非那西丁和对乙酰氨基酚的峰高对相应浓度进行线性回归,得回归方程。

1.3.5 精密度试验 按上述方法配制含非那西丁和对乙酰氨基酚浓度为 5、15、25 μg/mL 的样品,分别按样品浓度测定方法测定日内、日间精密度。

1.3.6 方法回收率试验 取健康人血浆,配制不同浓度的非那西丁和对乙酰氨基酚混合溶液,测定浓度与实际浓度之比即为方法回收率。

2 结果

2.1 标准曲线建立 采用高效液相色谱法(HPLC)分析,图 2 所示,非那西丁与对乙酰氨基酚得到很好的分离,二者保留时间分别为 7.67 min 和 3.03 min。采集系列不同浓度下非那西丁的 HPLC 色谱图,记录保留时间和峰面积。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标做非那西丁标准曲线(图 3),回归方程为:峰面积=36 816×(浓度)-36 146($r=0.999 9$)。进样量 10 μL 情况下,在浓度为 0.8~40.0 μg/mL 范围内均呈现良好的线性关系。对乙酰氨基酚标准品在不同浓度下标准曲线(图 4),回归方程为:峰面积=36 352×(浓度)-34 785($r=0.999 9$)。进样量 10 μL 情况下,在浓度 0.8~40.0 μg/mL 范围内均呈现良好的线性关系。

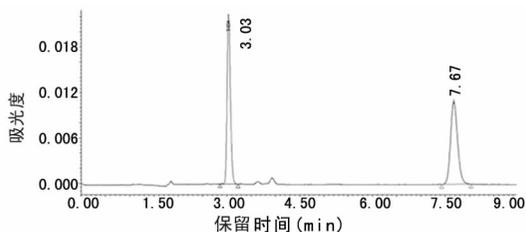


图 2 非那西丁与对乙酰氨基酚 HPLC 色谱图

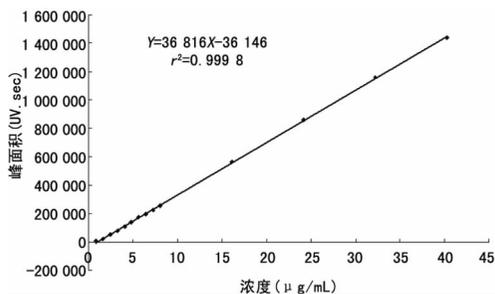


图 3 非那西丁标准品浓度-HPLC 峰面积标准曲线

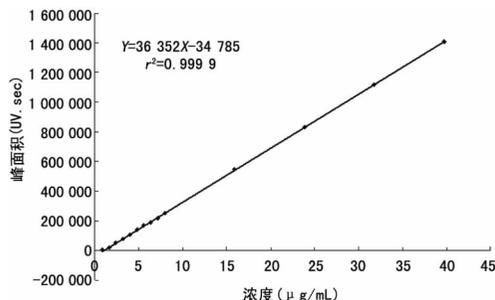


图 4 对乙酰氨基酚标准品浓度-HPLC 峰面积标准曲线

2.2 精密度试验 按上述方法配制含非那西丁和对乙酰氨基酚浓度为 5、15、25 μg/mL 的样品,分别按样品浓度测定方法测定日内、日间精密度,结果见表 1。

表 1 非那西丁、对乙酰氨基酚精密度试验结果(%,n=6)

浓度(μg/mL)	非那西丁		对乙酰氨基酚	
	日内精密度	日间精密度	日内精密度	日间精密度
5	0.84	1.51	0.76	1.02
15	1.09	1.10	0.89	1.46
25	0.53	1.38	0.67	1.21

2.3 方法回收率试验 取健康人血浆,配制不同浓度的非那西丁和对乙酰氨基酚混合溶液,利用建立的 HPLC 测定回收率见表 2。在浓度为 1~20 μg/mL 范围内利用所建立的 HPLC 进行测定,精密度均小 5.00%,测定准确,重复性好。

表 2 HPLC 技术测定回收率

PHN	浓度(μg/mL)	PRL	HPLC	
			PHN/PRL 回收率(%)	精密度(%)
1.0	1.0	1.0	96.3/97.6	2.27
2.0	4.0	4.0	98.5/99.3	2.32
5.0	5.0	5.0	99.4/98.1	1.61
5.0	10.0	10.0	99.3/100.4	1.89
10.0	10.0	10.0	99.2/99.8	1.21
15.0	10.0	10.0	100.3/100.8	0.96
10.0	20.0	20.0	100.1/99.9	1.10
25.0	20.0	20.0	99.6/100.3	0.78

注:PHN 为对氨基苯乙醚,PRL 为对氨基苯酚。

3 讨论

非那西丁在 CYP1A2 酶催化下经 O-脱乙基化生成对乙酰氨基酚,通过测定血液中非那西丁及对乙酰氨基酚浓度可评估肝脏储备功能状态。CYP1A2 酶是各种因素导致肝脏疾病的

共同易损靶点,因此,其特异性底物非那西丁是临床评估肝脏储备功能的一种理想探针药物^[13]。非那西丁有本身肝外代谢极少;检测终产物体现了生物转化的连续性;受胃肠吸收、肾脏排泄功能的影响小;对人体影响小、测定简便、价格低廉等优点^[14]。

一般而言,服用安全剂量范围内的非那西丁一定时间后,受药物生物利用度和稀释效应等因素的影响,血液中的非那西丁和对乙酰氨基酚浓度均为微克级,需借助 HPLC、液相色谱-串联质谱法等现代仪器分析技术才能准确测定血液中药物及代谢产物水平与比值。

本研究建立 HPLC 测定非那西丁和对乙酰氨基酚浓度用于肝脏储备功能的评估,避免了杂质的干扰,缩短了分析时间,提高了灵敏度和特异度。HPLC 作为一种高效、快速的分离、分析技术,以其灵敏度高、选择性好,可分析微量组成甚至微量样品等特点,成为医药分析领域应用最广、发展最快的现代分析技术之一^[15]。

采用 HPLC 测定,非那西丁和对乙酰氨基酚能够得到良好的分离度和线性关系,且简便快捷、灵敏度和准确度高,为研究 CYP1A2 在体内的药物代谢活性、评估肝脏储备功能提供了一种快捷、准确的方法。

参考文献

[1] 郭震,陈辉,钱群. 肝癌术前肝脏储备功能评估的相关研究进展[J]. 临床外科杂志,2014,22(1):67-69.

[2] 李国昌,陈卫军,蒲宇红. 细胞色素 P450 酶系与药物的代谢[J]. 农垦医学,2004,26(1):26-29.

[3] Chae YH, Yun CH, Guengerich FP, et al. Roles of human hepatic and Pulmonary cytochrome P450 enzymes in the metabolism of the environmental carcinogen 6-Nitrochrysene[J]. Cancer Res, 1993, 53(9):2028-2034.

[4] 杨秀芬,曾繁典. 人类细胞色素 P450 与免疫:对药物代谢、疾病的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2001,17(2):146-149.

[5] 王潇,刘华,白洁. 细胞色素 P450 调节肝脏药物代谢的途径[J]. 生物技术通报,2009,25(7):39-41.

(上接第 1024 页)

生儿缺血缺氧性脑病预后的影响[J]. 临床儿科杂志,2006,24(3):188-190.

[3] 鲍秀兰. 新生儿行为与 0~3 岁潜能开发指南[M]. 北京:中国商业出版社,2001:66-100.

[4] 沈晓明,金星明. 发育与行为儿科学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2005:22-47.

[5] 朱华,彭珉娟,杨涛毅,等. 神经行为发育监测及早期干预对高危儿智能发育影响的研究[J]. 四川医学,2013,34(12):1780-1783.

[6] 鲍秀兰. 重视高危儿的发育风险和早期科学干预对策[J]. 中国儿童保健杂志,2011,19(5):393-394.

[7] 李德乐,施玉麒,高建慧,等. 规范管理和早期干预对高危儿智能的影响[J]. 中国儿童保健杂志,2007,15(4):401-402.

[8] 李明. 高危新生儿随访中的神经发育评估及其意义[J]. 中国新生儿科杂志,2009,24(6):324-327.

[6] Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, et al. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase super family[J]. Xenobiotica, 1998, 28(12):1129-1165.

[7] Rifkind AB. CYP1A in TCDD toxicity and in physiology- With particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates [J]. Drug Metabol Revi, 2006, 38(1/2):291-335.

[8] Schwarz M, Appel KE. Carcinogenic risks of dioxin; mechanistic considerations[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2005, 43(1):19-34.

[9] 张瑞娟,李允武,金芝贵,等. HPLC 法测定非那西丁和对乙酰氨基酚的血浓度[J]. 北方药学,2012,9(1):47.

[10] 胡云珍,姚彤炜. 细胞色素 P4501A 的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2003,38(4):246-250.

[11] Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the 'cocktail approach' for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo[J]. J Clin Pharm Ther, 2003, 28(3):157-165.

[12] Dahl ML. Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics-Useful aid to prescribing [J]. Clinl Pharmacokinet, 2002, 41(7):453-470.

[13] 顾而立,贺平,王虹,等. 非那西丁代谢试验与¹³C-美沙西丁呼气试验在正常志愿者中的重复性和相关性[J]. 肝脏,2012,17(12):849-853.

[14] Huang W, Qu ZQ, Li XD, et al. The effect of transcatheter arterial chemoembolization on CYP1A2 activity in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Pharm Ther, 2008, 33(5):489-493.

[15] El-Kommos ME, Emara KM. Determination of phenyltoloxamine salicylamide, caffeine, paracetamol, codeine and phenacetin by HPLC[J]. Talanta, 1989, 36(6):678-679.

(收稿日期:2014-11-19 修回日期:2015-01-19)

[9] Aderson LM, Shinn C, Fullilove MT, et al. The effectiveness of early childhood development programs A systematic review[J]. Am J Prey Med, 2003, 24(Suppl 3):32-46.

[10] 李乔红,邹永蓉,龚放,等. 新生儿缺血缺氧性脑病早期干预治疗与预后分析[J]. 检验医学与临床,2007,4(9):816-817.

[11] 中华医学会科学会新生儿组. 新生儿缺血缺氧性脑病诊断依据和临床分度[J]. 中国实用儿科杂志,2006,15(6):379-380.

[12] 邹为英. 关于新生儿缺血缺氧性脑病的临床观察与护理分析[J]. 中国医药指南,2013,11(15):338-339.

[13] 李红梅,吴静,黄健兰. 新生儿缺血缺氧性脑病实施早期干预治疗的疗效与预后分析[J]. 中国妇幼保健,2010,25(23):3291-3293.

(收稿日期:2014-11-29 修回日期:2015-01-20)