

N-乙酰基转移酶活性测定方法综述

王晓华¹, 寇佳昕^{2a}, 宋佩佩^{2a}, 刘亚琦^{2b}, 袁圆^{2b}, 王璨^{2a}, 秦红岩^{1*} (1.兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000; 2.兰州大学, a.第二临床医学院; b.第一临床医学院, 兰州 730000)

摘要: N-乙酰基转移酶(N-acetyltransferase, NAT)是人体最为重要的II相药物代谢酶,在体内药物代谢和毒物解毒方面具有重要作用。NAT的活性存在明显的种族和个体差异,其活性强弱可直接影响药物疗效和毒性反应。NAT活性测定可用于评估人体经乙酰化代谢药物的体内处置和代谢程度。通过查阅文献和相关资料,本文系统归纳了NAT的活性测定方法并对特点和优势进行了总结,可为NAT活性评估提供方法学参考,为基于NAT活性的临床个体化用药提供依据。

关键词: N-乙酰基转移酶; 活性评估; 药物代谢

中图分类号: R927.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)02-0240-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.024

引用本文: 王晓华, 寇佳昕, 宋佩佩, 等. N-乙酰基转移酶活性测定方法综述[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 240-244.

Methodological Review about the Activity Determination Assay of N-Acetyltransferase

WANG Xiaohua¹, KOU Jiabin^{2a}, SONG Peipei^{2a}, LIU Yaqi^{2b}, YUAN Yuan^{2b}, WANG Can^{2a}, Qin Hongyan^{1*}
(1.Department of Pharmacy, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2.Lanzhou University, a.Second Clinical Medical College; b.First Clinical Medical College, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: N-acetyltransferase (NAT) is an important enzyme of phase II drug metabolism of the body, it also plays a vital role in drug metabolism and noxious substances detoxification. NAT's activity differs markedly among individuals and races, which may be responsible for the different therapeutic effect and toxic reaction of certain drugs. NAT's activity can be used to evaluate the ability of acetyl metabolism and drug disposition. This review systematically summarized the methods for NAT activity assay by consulting literatures and the related information, the features as well as strengths of the described methods for NAT activity assay are also summarized here. This present review may provide methodological evidence for NAT activity evaluation, it may also provide a novel basis for personalized drug therapy in clinical.

KEYWORDS: N-acetyltransferase; activity assay; drug metabolism

N-乙酰基转移酶(N-acetyltransferase, NAT)是一类能催化乙酰基团在乙酰辅酶A和胺之间转移的酶,对人体芳胺类致癌物质的灭活和某些药物的代谢起着重要的作用。NAT是人体最为重要的II相代谢酶,可催化5-氨基水杨酸、异烟肼、普鲁卡因胺、磺胺等药物的乙酰化反应并决定其代谢速率^[1]。目前已发现NAT的多种亚型,存在于人体的主要为NAT1和NAT2^[2]。NAT等位基因的结构变异及差异表达可使人体NAT活性具有较明显的种族和个体差异。根据人群乙酰化代谢能力的强弱可将NAT分为3种代谢类型:快速乙酰化型、中间乙酰化型和慢乙酰化型^[3]。研究发现,NAT乙酰化代谢速率

是决定治疗药物疗效的关键环节之一,快速乙酰化型可使血药浓度较低,而慢乙酰化型的血药浓度往往偏高,这种差异可直接影响药物疗效并参与药物毒性反应的发生。因此,通过测定及评估NAT活性有望预测机体经乙酰化代谢药物的代谢程度,对指导临床个体化用药具有重要意义。

1 NAT活性测定原理

利用NAT可催化乙酰基团在乙酰辅酶A和胺之间进行物质转移的特性,基于酶催化的底物、产物及形成的加合物之间的含量测定已成为鉴定NAT酶活性的重要指标。目前,用于NAT1活性测定的常用底物有4-氨基苯甲酸(4-aminobenzoic

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(1606RJZA117); 甘肃省中医药管理局项目(GZK-2018-46); 甘肃省卫生行业科研计划管理基金项目(GWGL2013-25)

作者简介: 王晓华,女,副主任药师 Tel: 13519641615 E-mail: 1006991283@qq.com *通信作者: 秦红岩,女,博士,副主任药师 Tel: (0931)8596411 E-mail: candyqinhy@163.com

acid, PABA)和 4-氨基水杨酸(4-aminosalicylic acid, PAS)等;用于测定 NAT2 活性的常用底物有磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, SMZ)、5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)和咖啡因等。

咖啡因是常用于测定 NAT2 酶活性的底物。咖啡因在体内经肝药酶 CYP1A2 催化,生成 1,7-二甲基黄嘌呤,再经 7 位脱甲基生成一个不稳定的中间产物,此产物再由 NAT2 催化生成 5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿嘧啶(5-acetamide-6-formylamino-3-methyluracil, AFMU),或经结构重排生成 1-甲基黄嘌呤(1-methylxanthine, 1X),或经黄嘌呤氧化酶作用生成 1-甲基尿酸(1-methyluric acid, 1U)^[4]。目前咖啡因的主要代谢产物,如 AFMU、1U 和 1X 已经成为 NAT2 活性测定中的主要考察指标。此外,由于 NAT2 是影响 AFMU 生成的主要代谢酶,所以通常以 AFMU 与 1X 的摩尔比作为机体乙酰化代谢程度的评价指标^[5],即 AFMU/1X 数值低者其乙酰化代谢较慢,该方法可用于评估 NAT 乙酰化代谢分型^[6]。

NAT 活性评价也可应用 PABA、PAS 或 5-ASA 作为底物,以其对应的乙酰化产物量与未被乙酰化底物量的比值作为间接反应 NAT 活性的指标。例如,应用 PABA 作为底物,检测经 NAT1 代谢生成

的乙酰对氨基苯甲酸(acetyl p-aminobenzoic acid, Ac-PABA)的量,再通过计算 Ac-PABA/PABA 的比值来评估 NAT1 活性^[7]。可见,利用 NAT 的乙酰基转移作用,通过对其乙酰化产物的固有性质进行直接检测或对乙酰化产物标记后检测,均可实现对 NAT 活性的评价。

2 NAT 活性测定方法

NAT 参与体内芳胺类致癌物质的灭活和某些治疗药物的代谢,因此,准确而快速测定并评估 NAT 活性对临床药物研究和治疗具有举足轻重的作用。目前,国内外已建立多种 NAT 活性测定方法,如 HPLC、LC-MS、毛细管电泳法、UV、荧光探针标记法等。现将常用的 NAT 活性测定方法进行简要介绍和比较,结果见表 1~2。

2.1 HPLC

HPLC 分析技术具有检测灵敏度高、所需样品量小等优点,该技术已广泛用于体内外 NAT 活性的评价。采用 HPLC 测定 NAT 底物及其代谢产物的含量并计算二者的比值,可实现对 NAT 活性的间接评价。

目前临床多用咖啡因作为反应底物,以 HPLC 测定咖啡因及其代谢产物含量,通过计算咖啡因及其代谢产物的比值进行 NAT 活性的体内评价。李

表 1 NAT 的活性测定方法及其检测指标

Tab.1 The activity determination method of NAT and its detection index

检测方法	酶	底物	代谢物	样本类型	评价指标
HPLC	NAT	2-AF、PABA	2-AAF, Ac-PABA	肝癌 HepG2 细胞	2-AAF/2-AF 比值 Ac-PABA/PABA 比值
	NAT1	PABA	Ac-PABA	幽门螺杆菌	Ac-PABA/PABA 比值
	NAT2	SMZ	Ac-SMZ	人体血样	Ac-SMZ/SMZ 比值
	NAT2	咖啡因	AFMU、1U 和 1X	人体尿样	AFMU/1X 比值 AFMU/(AFMU+1X+1U)比值
LC-MS	NAT1	PABA	Ac-PABA	人体尿样	Ac-PABA/PABA 比值
	NAT	5-ASA	Ac-5-ASA	大鼠血浆、尿液、结肠组织	Ac-5-ASA/5-ASA 比值
毛细管电泳	NAT2	咖啡因	AFMU 和 1X	大鼠	AFMU/1X 比值
UV	NAT1	PABA	Ac-PABA	皮肤角质细胞	Ac-PABA/mg 蛋白
	NAT	乙酰辅酶 A	辅酶 A	寡肽	辅酶 A 量/单位体积
荧光探针标记	NAT	乙酰辅酶 A	辅酶 A	A549、HeLa 细胞及活体小鼠	辅酶 A 量/单位体积

表 2 NAT 活性测定方法的优缺点比较

Tab. 2 Comparison of the advantages and disadvantages of determination method of NAT's activity

方法	优点	缺点
HPLC	检测速度快、效率高、灵敏度高、操作自动化	正相高效液相色谱法样品处理繁琐、耗时长 反相高效液相色谱法分析柱使用寿命低, 成本高
LC-MS	操作简单快速, 检测耗时短且结果准确精密	对仪器要求较高, 检测成本较高
毛细管电泳	进样量少、分析速度快、分离效率高, 成本低	毛细管电极制备及处理比较复杂繁琐
UV	操作简便, 对设备要求不高、检测成本低	专属性不强, 灵敏度较低
荧光探针标记	快速、敏感、高特异性和高灵敏性	限于实验研究, 未用于临床; 探针制备过程复杂, 荧光产物稳定性差

军等^[8]收集服用咖啡因后健康志愿者的尿液,采用 HPLC 测定尿液中咖啡因代谢产物 AFMU、1U 和 1X 的相对含量,再通过计算 AFMU/(AFMU+1X+1U)比值,绘制概率分布直方图用以反映 NAT2 的体内活性。结果显示 AFMU、1U 和 1X 的最低检测限分别达到 0.20, 0.05, 0.12 μg , 结果稳定且重复性好,适用于人体 NAT2 的活性评价。此外,文献报道^[9]健康志愿者服用咖啡后 4~5 h 收集尿样,用 HPLC 测定 AFMU 与 1X 的含量并以二者的摩尔比作为 NAT 活性分型的指标,该方法灵敏、稳定,可用于 NAT 乙酰化代谢分型的评价。

SMZ 在人体主要经肝脏 NAT 进行乙酰化代谢,其代谢产物主要为乙酰磺胺二甲嘧啶(acetylsulfamethazine, Ac-SMZ),因此通过测定并计算 Ac-SMZ/SMZ 数值可间接反应肝脏 NAT 的活性。朱秀平等^[10]用 HPLC 测定了健康志愿者血中 Ac-SMZ 和 SMZ 的含量,以 Ac-SMZ/SMZ 摩尔浓度为横坐标,人数为纵坐标作百分比频数图,用以评估受试者的 NAT 乙酰化表型。该研究用乙腈直接处理血样,取离心上清液直接进样检测,测得 SMZ 和 Ac-SMZ 的平均回收率均>95%,且日内及日间精密密度均<10%;说明该方法具有样品处理简单快速、检测灵敏等特点,是体内 NAT 活性测定的一种简便方法。

高世勇等^[11]采用 HPLC 研究龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞对 NAT1 活性的影响。实验以 PABA 作为底物与 HepG2 细胞共培养,培养结束后裂解细胞,离心并收集上清液,用 HPLC 同时测定 Ac-PABA 和 PABA 的含量,应用保留时间法进行定性分析,用洗脱峰面积法进行定量分析。该方法适用于 NAT 活性体外评价,并可用于研究筛选 NAT 抑制剂。Chung^[12]以 2-氨基苻(2-aminofluorene, 2-AF)、PABA 为反应底物研究苻麻酸对 NAT 活性的影响。该研究将底物加入细胞培养液中培养一定时间后,收集并裂解培养细胞,上清液用乙酸乙酯:甲醇=95:5 进行萃取,采用 HPLC 进行检测分析,再分别以 N-乙酰化-2-氨基苻(N-acetylated-2-aminofluorene, 2-AAF)和 Ac-PABA 的量用以评估 NAT 的活性。

2.2 LC-MS

LC-MS 始于 20 世纪 70 年代,是在 HPLC 基础上联用质谱技术发展起来的检测方法。LC-MS 技术结合了色谱和质谱优势,将色谱高分离能力与

质谱的高选择性、高灵敏度及高鉴定能力等优点相结合,已广泛应用于药品、食品和环境分析等领域。

国外学者给予健康受试者口服 550 mg 的 PABA,收集给药后 10 h 内的尿液样本,应用 LC-MS 分离检测尿液样本中的 PABA 及其 4 种主要代谢物的含量。结果显示各检测物的最低检测限可达 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下,平均回收率均>97%,日内及日间精密密度均<10%^[13],说明该方法的特异性和灵敏性均显著优于 HPLC。本课题组应用 LC-MS 同时检测 5-ASA 给药后大鼠血浆、尿液及结肠组织中 5-ASA 及其代谢物乙酰 5-氨基水杨酸(Ac-5-ASA)的含量以评估 NAT 活性,该方法最低定量限达 $1.40\times 10^{-6}\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[14],且具有操作简单、检测快速、重复性好等优势,可用于评价肠道组织的 NAT 活性,也可用于 5-ASA 吸收、分布、代谢、排泄及药物相互作用研究。

2.3 毛细管电泳法

毛细管电泳技术是从 20 世纪 80 年代开始迅速发展起来的一种高效分离技术,该技术以石英毛细管为分离介质,以高压电场为驱动力,利用待测物在电场中所带电荷、质量、体积以及形状等淌度不同导致迁移速度的不同而实现有效分离。毛细管电泳技术具有分析速度快、进样量少、成本低等优点,已被广泛应用于生命科学、临床医学和环境科学等研究领域。

国外学者在毛细管电泳缓冲液中加入十二烷基硫酸钠作为胶束相,用胶束毛细管电泳法检测了咖啡因及其主要代谢产物,如 1X、1,7-二甲基黄嘌呤和可可碱等的含量。结果显示该方法可在 2 min 内实现所有待检测物的有效分离,最低检测限<1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[15]。文献报道,以咖啡因作为探针药物,同时比较 HPLC 与毛细管电泳法在测定尿液中咖啡因及其代谢物的分析效率,结果发现二者分离效率无明显差异,检测限也比较接近^[16]。毛细管电泳法不需要对样品进行复杂的前处理,因此可极大缩短分析时间,简化分析流程。

毛细管电色谱技术是指在毛细管中填充高效液相的固定相,该方法兼具电泳和液相色谱的分离机制。文献报道^[17]以 3-(1,8-萘二甲酰基)丙基改良性甲硅烷基硅胶作为毛细管固定相的毛细管电色谱方法,可成功分离咖啡因及其 2 种代谢物。该方法用含 80%甲醇的 4.0 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液为电泳液,待测物在 3.5 min 内即可实现完全分离,

且检测限达 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见,毛细管电色谱技术测定 NAT 活性具有重复性好且分离时间短的优势。

2.4 UV

UV 是通过测定被测物在一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法。分光光度法因其具有操作简便、检测成本低等优点,已运用于 NAT 活性评价之中。

根据 NAT 可将乙酰辅酶 A 中的乙酰基进行转移而使辅酶 A 暴露出巯醇基团的原理,将辅酶 A 中巯醇基团与特定物质反应生成指示剂并进行检测,可用于评价 NAT 活性。高世勇等^[18]报道以巯基试剂 2-硝基苯甲酸标记游离的辅酶 A,然后用 UV 进行测定,可用来间接反映 NAT 的活性。Riddles 等^[19]将细胞质液、乙酰辅酶 A、细胞反应液混合进行生化反应,以二甲氨基苯甲醛作为显色剂,通过测定 450 nm 波长处的吸光值以定量辅酶 A 含量,通过计算单位时间内单位体积细胞反应液中辅酶 A 的含量用于评价 NAT 的活性。

研究显示, NAT 在皮肤角化细胞中表达较丰富。Bonifas 等^[20]用正常皮肤角质细胞制备细胞裂解液,以 PABA 为反应底物,加入同位素标记的乙酰辅酶 A 共孵育,反应液加入 4-二甲基氨基苯甲醛后测定 420 nm 波长处的吸光值,定量剩余的非乙酰化芳基胺。该研究以反应结束时 PABA 的添加量与剩余芳基胺含量之差作为 Ac-PABA 含量;以每分钟反应时间内每毫克蛋白质中含有 Ac-PABA 的量来评价 NAT1 活性。

2.5 荧光探针标记法

Terai 等^[21]利用探针标记原理,基于内分泌光诱导电子转移策略,将发光镧系元素复合物作为 NAT 探针,该探针可使 NAT 催化的 *N*-乙酰基转移反应增加近 100 倍荧光并用于检测。该检测方法敏感、均匀、快速,可用于重组细胞或细胞裂解液样品,首次实现了基于探针标记的 NAT 活性检测。随后,国外学者研发了一种高特异性、高灵敏性检测 NAT2 活性的近红外荧光探针。该方法以芳香胺基作为 NAT 底物,芳香胺基可被 NAT2 特异性乙酰化导致其荧光淬灭作用被抑制,通过检测波长 790 nm 处乙酰化芳香胺基的荧光强度可评价 NAT2 活性的高低^[22]。文献作者应用该方法对小鼠体内荧光强度进行检测实现了 NAT2 活性的体内评价。可见,近红外荧光探针检测 NAT2 活性具有高度特异性和灵敏性,适用于 NAT 活性的体内外的评价。

3 讨论与展望

NAT 在体内药物代谢和毒物解毒方面具有重要作用,现代研究发现 NAT 基因多态性与多种疾病的发生密切相关,NAT 有望成为药物作用新靶点用于特定疾病的治疗^[23]。NAT 的活性可准确反映 NAT 的功能,鉴于 NAT 在药物代谢中的重要作用,NAT 活性检测已成为评估治疗药物疗效和预测药物不良反应的重要手段。NAT 功能评估对于调整和制订个体化用药方案,增加药物治疗的合理性和精准性具有重要意义。

HPLC 是目前测定 NAT 活性应用最广泛的方法之一,该方法具有检测速度快、效率高、灵敏度高、操作自动化等优点。然而,正相 HPLC 对检测样品的前处理要求较高,导致样品处理过程操作繁琐,耗时较长。以咖啡因及其代谢产物的萃取为例,液-液萃取法需酸化样本以减少生物降解和提高产物的萃取回收率^[24-25],而固相萃取法所需的萃取柱造价高,使用寿命短,给实验室样本前处理带来较大的经济压力^[26]。反相 HPLC 直接进样与梯度洗脱法则省略了样品前处理过程,极大地简化了操作步骤。但生物样品直接进样会影响分析柱的使用寿命,需要在实验中延长流动相冲洗时间来清除杂质,一定程度上也增加检测分析时间。

LC-MS 操作简单快速且准确精密,待测化合物多数无需经过衍生化处理,直接进样即可获得准确的定性和定量检测,极大缩短了分析时间,提高了分析的灵敏度和准确性^[27]。然而,LC-MS 对仪器要求较高,导致检测成本增加,很难普及使用。毛细管电泳法具有分离效率高,检测成本低等优点,但毛细管电极的制备及处理过程比较复杂繁琐。UV 操作简单,对仪器设备要求不高,但其专属性不强,灵敏度较低,使其应用受到一定限制。近年来开发的荧光标记探针可特异性用于体内外 NAT2 活性检测及评估。目前所研发的荧光标记探针仅限于基于小动物的实验研究,并不能大规模应用于临床;且荧光标记探针制备过程复杂,荧光产物的稳定性易受体内多种因素影响,使其应用极大受限。

综上所述,现有的 NAT 活性测定方法各有优势,研究者可根据实验目的和实验条件选择适宜的 NAT 活性测定方法。然而,现有的 NAT 活性测定方法仍存在问题有待深入研究。首先,NAT 在人体分布广泛,同一组织常同时存在 NAT1 和 NAT2 的表达,而现有的 NAT 测定方法仅能通过选择性

测定某种底物和其代谢物的含量用以评估 NAT1 或 NAT2 的活性, 不能实现对 NAT 亚型活性的同时测定。建立同时测定 NAT 亚型活性的方法是目前 NAT 活性评价中急需解决的重要问题。此外, 随着生物大数据平台的建立, 适合于大样本分析的 NAT 活性高通量测定方法将是其方法学研究的一个重点。

REFERENCES

- [1] TURIJÁN-ESPINOZA E, SALAZAR-GONZÁLEZ R A, URESTI-RIVERA E E, et al. A pilot study of the modulation of sirtuins on arylamine *N*-acetyltransferase 1 and 2 enzymatic activity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(2): 188-199.
- [2] GRANT D M. Structures of human arylamine *N*-acetyltransferases [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(6): 465-470.
- [3] WANG P, SHEHU AI, LU J, et al. Deficiency of *N*-acetyltransferase increases the interactions of isoniazid with endobiotics in mouse liver [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 145(1): 218-225.
- [4] NEHLIG A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(2): 384-411.
- [5] AL-AHMAD M M, AMIR N, DHANASEKARAN S, et al. Studies on *N*-acetyltransferase (NAT2) genotype relationships in emiratis: confirmation of the existence of phenotype variation among slow acetylators [J]. *Ann Hum Genet*, 2017, 81(5): 190-196.
- [6] CHEN Y, ZHOU H H. Progress in the research of caffeine metabolism and its application *in vivo* [J]. *Pro Physiol Sci*, 2010, 41(5): 256-260.
- [7] BUTCHER N J, ILETT K F, MINCHIN R F. Substrate-dependent regulation of human arylamine *N*-acetyltransferase-1 in cultured cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 57(3): 468-473.
- [8] LI J, PENG X Q, ZHANG J, et al. Determination of five metabolites of caffeine in urine to assess three drug-metabolizing biotransformation enzyme activities by HPLC with direct injection method [J]. *Chin J Clin Pharm Therap*(中国临床药理学与治疗学), 2005, 10(7): 768-771.
- [9] CAO X M, LU J F, JIANG Y H, et al. Determination of caffeine metabolites of AFMU, 1X and their application in *N*-acetyltransferase phenotyping [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 1997, 32(8): 486-489.
- [10] ZHU X P, LU J F, CAO X M, et al. A new method for determination of sulfamethazine and *N*-acetylsulfamethazine in plasma and application in *N*-acetyltransferase phenotyping [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 1997, 32(4): 227-229.
- [11] GAO S Y, SU Y J, JI Y B. Study on the effect of solanine on *N*-acetyltransferase 1 activity and enzyme kinetics in HepG 2 cell [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(8): 589-594.
- [12] CHUNG J G. Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamine *N*-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients [J]. *Microbios*, 1998, 93(375): 115-127.
- [13] NORTJE C, JANSEN VAN RENSBURG P, COOKE C, et al. The simultaneous detection and quantification of *p*-aminobenzoic acid and its phase 2 biotransformation metabolites in human urine using LC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(10): 1211-1224.
- [14] RAO Z, QIN H Y, SHAO Y Y, et al. Development of LC-MS/MS method for determination of mesalazine and *N*-Ac-5-ASA in rat plasma, urine and colon [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2014, 49(14): 1252-1257.
- [15] ZHAO Y, LUNTE C E. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 688(2): 265-274.
- [16] RODOPOULOS N, NORMAN A. Determination of caffeine and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1994, 54(4): 305-315.
- [17] NAKASHIMA K, YAMAMOTO K, AL-DIRBASHI O Y, et al. Semi-micro column HPLC of triazolam in rat plasma and brain microdialysate and its application to drug interaction study with itraconazole [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 30(6): 1809-1816.
- [18] GAO S Y, JI Y B. Research advance of arylamine *N*-acetyltransferase [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2008, 24(1): 1-4.
- [19] RIDDLES P W, BLAKELEY R L, ZERNER B. Reassessment of Ellman's reagent [J]. *Meth. Enzymol*, 1983(91): 49-60.
- [20] BONIFAS J, SCHEITZA S, CLEMENS J, et al. Characterization of *N*-acetyltransferase 1 activity in human keratinocytes and modulation by para-phenylenediamine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(1): 318-326.
- [21] TERA I, KIKUCHI K, URANO Y, et al. A long-lived luminescent probe to sensitively detect arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) activity of cells [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(16): 2234-2236.
- [22] GUO T, CUI L, SHEN J, et al. A highly sensitive long-wavelength fluorescence probe for nitroreductase and hypoxia: selective detection and quantification [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(92): 10820-10822.
- [23] WU Y M, LUO Z Y. Research progress on polymorphism of *N*-acetyltransferase 2 [J]. *Med Recap*(医学综述), 2010, 16(7): 972-975.
- [24] BEGAS E, KOUVARAS E, TSAKALOF A, et al. *In vivo* evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(2): 190-200.
- [25] CASTORENA-TORRES F, MENDOZA-CANTU A, DE LEON M B, et al. CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 156(3): 331-339.
- [26] CAUBET M S, ELBAST W, DUBUC M C, et al. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 27(1-2): 261-270.
- [27] CHEN F, HU Z Y, PARKER R B, et al. Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS and clinical application [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(6): 1-11.

收稿日期: 2018-04-24
(本文责编: 李艳芳)