

UHPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中 5 种 CYP450 探针药物

徐优晓¹, 陈瑞杰¹, 张友婷¹, 王哲¹, 杨理会^{2*} (1.温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院药学部, 浙江 温州 325027; 2.乐清市人民医院药剂科, 浙江 乐清 325699)

摘要: 目的 采用 UHPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑的血药浓度。方法 血浆样品经乙腈沉淀, 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-含 0.1%甲酸的水, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹。检测采用电喷雾离子源, 多反应监测。非那西丁: [M+H]⁺, *m/z* 180.1→109.9; 甲苯磺丁脲: [M+H]⁺, *m/z* 271.1→91.0; 奥美拉唑: [M+H]⁺, *m/z* 346.1→135.9; 美托洛尔: [M+H]⁺, *m/z* 268.2→115.0; 咪达唑仑: [M+H]⁺, *m/z* 326.1→290.8; 内标卡马西平: [M+H]⁺, *m/z* 237.1→194.0。6 只♂ SD 大鼠, 单剂量口服灌胃 10 mg·kg⁻¹ 非那西丁, 1 mg·kg⁻¹ 甲苯磺丁脲, 10 mg·kg⁻¹ 奥美拉唑, 10 mg·kg⁻¹ 美托洛尔和 10 mg·kg⁻¹ 咪达唑仑, 分别在给药后多点尾静脉采血。用 DAS 计算药动学参数。结果 血浆中非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑在各自浓度范围内线性关系良好。日内及日间 RSD 均<15%, 提取回收率>75%, 稳定性考察结果良好。非那西丁的 AUC_{0-t} 为(5 868.30±2 062.87)ng·mL⁻¹·h; 甲苯磺丁脲的 AUC_{0-t} 为(58 056.34±15 569.16)ng·mL⁻¹·h; 奥美拉唑的 AUC_{0-t} 为(14 181.67±4 085.40)ng·mL⁻¹·h; 美托洛尔的 AUC_{0-t} 为(1 123.67±180.469)ng·mL⁻¹·h; 咪达唑仑的 AUC_{0-t} 为(946.91±322.03)ng·mL⁻¹·h。结论 该方法灵敏度高、操作方便、结果准确, 可作为 CYP450 酶活性及相关研究的测定方法。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; CYP450 酶; 探针药; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)02-0142-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.003

引用本文: 徐优晓, 陈瑞杰, 张友婷, 等. UHPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中 5 种 CYP450 探针药物[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 142-147.

Determination of Five CYP450 Probe Drugs in Rat Plasma by UHPLC-MS/MS

XU Youxiao¹, CHEN Ruijie¹, ZHANG Youting¹, WANG Zhe¹, YANG Lihui^{2*} (1.Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China; 2.Department of Pharmacy, Yueqing People's Hospital, Yueqing 325699, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UHPLC-MS/MS method for simultaneously determination of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam in rat plasma. **METHODS** The plasma sample was prepared by acetonitrile precipitation. The analytical column was Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of water (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile with gradient elution. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Detection equipped with electrospray ionization source with multiple reaction monitoring. The tandem mass ion transitions monitored were *m/z* 180.1→109.9 for phenacetin([M+H]⁺), *m/z* 271.1→91.0 for tolbutamide, *m/z* 346.1→135.9 for omeprazole ([M+H]⁺), *m/z* 268.2→115.0 for metoprolol([M+H]⁺), *m/z* 326.1→290.8 for midazolam([M+H]⁺), and *m/z* 237.1→194.0 for carbamazepine(IS, [M+H]⁺). Blood sample was collected of the tail vein at multiple time point after a single oral dose of administration of phenacetin(10 mg·kg⁻¹), tolbutamide (1 mg·kg⁻¹), omeprazole(10 mg·kg⁻¹), metoprolol(10 mg·kg⁻¹) and midazolam(10 mg·kg⁻¹) in six male SD rats. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS. **RESULTS** The calibration curve was linear over the range of curve for the five probe drugs. Intra-day and inter-day RSDs for assaying the plasma sample were both <15%, the recovery rate was >75% for the five drugs. The phenacetin AUC_{0-t} was (5 868.30±2 062.87)ng·mL⁻¹·h; the tolbutamide AUC_{0-t} was (58 056.34±15 569.16)ng·mL⁻¹·h; the omeprazole AUC_{0-t} was (14 181.67±4 085.40)ng·mL⁻¹·h; the metoprolol AUC_{0-t} was (1 123.67±180.469)ng·mL⁻¹·h; the midazolam AUC_{0-t} was (946.91±322.03)ng·mL⁻¹·h. **CONCLUSION** The methods is proved to be sensitivity, simple and accuracy, and can be used as an analytical method for the study of CYP450 enzyme activity and related research.

KEYWORDS: UHPLC-MS/MS; CYP450; probe drug; pharmacokinetics

基金项目: 温州市公益性科技计划项目(Y20150122); 乐清市社会发展与软科学(含医药卫生)项目(2016Y001)

作者简介: 徐优晓, 女, 主管中药师 Tel: (0577)88002660 E-mail: xyx@wzhealth.com *通信作者: 杨理会, 男, 副主任药师 Tel: 13905871182 E-mail: yanglihui66@126.com

细胞色素 P450(CYP450)位于细胞的内质网上,催化代谢各种内源和外源物质^[1-2]。CYP450酶活性的改变将影响药物的药动学和药效学^[3]。临床上>90%的药物被 CYP450 酶代谢^[4],抑制 CYP450 酶活性可以导致药物的血药浓度增加,而诱导 CYP450 酶活性可以导致药物的血药浓度降低,两者都能够引起药物-药物相互作用。由于 CYP450 酶活性的变化是引起药物相互作用进而导致不良反应发生的重要因素之一,因此研究 CYP450 酶活性具有重要的意义^[5-6]。

“鸡尾酒”法(Cocktail)是目前用于研究 CYP450 酶活性的方法之一^[7],该法同时给予人或实验动物几种 CYP450 酶的特异性底物(探针药),通过考察探针药的主要药动学参数变化,研究药物或者其他外源性物质对 CYP450 酶活性的作用,具有可以同时检测几种药物代谢酶活性的特点^[8-9]。近年来,Cocktail 法被广泛应用研究,取得了一定的成果^[10-12]。因此,建立一种准确和简便的方法,同时检测几种探针药的浓度,具有一定的科学应用价值^[13]。

超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)具有高选择性和灵敏度等特点,适合分析生物样品的药物浓度^[10,14-16]。本研究采用 UHPLC-MS/MS 同时检测生物样本中 5 种探针药物的浓度,并进行药动学分析,为今后相关研究的开展提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 高效液相系统和 6420 系列三重四极串联质谱仪(美国 Agilent 公司);80-2 高速离心机、Sorvall ST 16R 低温高速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 动物

SD 大鼠,♂,体质量(180~220 g),由温州医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(浙)2005-0061。

1.3 试剂

非那西丁(批号:s4187644207B14,纯度>99%)、甲苯磺丁脲(批号:017k1025;纯度>99%)均购自 Sigma 公司;奥美拉唑(批号:100760-201403;纯度>99%)、美托洛尔(批号:100084-201403;纯度>99%)、卡马西平(批号:100142-201105;纯度>99%)均购自中国药品生物制品研究院;咪达唑仑(徐州恩华药业集团有限责任公司,

批号:20140413;纯度>99%);甲醇、乙腈(德国 Merck 公司,色谱级);其他常规化学试剂均为分析纯或优级纯,实验用水为实验室自制。

2 方法

2.1 溶液的配制

分别精密称取非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑对照品 10.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,混匀,备用。

精密称取卡马西平对照品 5.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,混匀,浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;取卡马西平储备溶液(500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 100 μL ,置于 50 mL 量瓶中,用甲醇定容,浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.3 min, 30%B; 0.3~1.3 min, 30%→50%B; 1.3~1.8 min, 50%→95%B; 1.8~2.8 min, 95%B)。流速为 0.4 mL·min⁻¹,进样体积为 5 μL 。

2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI)三重四极杆质谱仪用于质谱检测。扫描范围 m/z 100~1 500,毛细管电压为 1.6 kV,离子源温度为 150 °C,脱溶剂气温度为 500 °C,锥孔气流量为 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量为 800 L·h⁻¹,氦气流量为 0.15 mL·h⁻¹。离子分析碎片和优化参数见表 1,质谱图见图 1。

表 1 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑和卡马西平 MRM 的优化参数

Tab. 1 Optimized parameter of MRM for phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam

化合物	母离子	碰撞电压/V	碰撞能/eV	子离子
非那西丁	180.1	122	24	109.9
甲苯磺丁脲	271.1	120	36	91.0
奥美拉唑	346.1	108	44	135.9
美托洛尔	268.2	130	17	115.0
咪达唑仑	326.1	170	44	290.8
卡马西平	237.1	140	18	194.0

2.4 样品处理

取血浆 100 μL 于 1.5 mL EP 管中,加入 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡马西平溶液 20 μL ,再加入乙腈 300 μL ,旋涡混匀振荡 30 s 后,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。将上清液(5 μL)注入 UHPLC-MS/MS

系统中进行分析。

2.5 药动学试验

选取 SD 大鼠(180~220 g), 适应性饲养 1 周。给药前禁食 12 h, 分别以灌胃非那西丁($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、甲苯磺丁脲($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、奥美拉唑($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、美托洛尔($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和咪达唑仑($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。灌胃给药后, 分别于 0.083, 0.166, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 进行尾静脉取血。每次均采血 0.3 mL, 注入肝素化的试管, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血浆 100 μL , $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备测。

3 结果

3.1 方法专属性

空白血浆(来源于 6 个不同生物样品)、血浆标准品以及血浆样品, 经分析测定的色谱图见图 2。

由图可见, 在本实验条件下, 5 种探针药物与内标能完全分离, 血浆中内源性物质无干扰; 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑和内标卡马西平的保留时间分别为 1.05, 2.62, 0.56, 0.46, 0.79, 1.84 min。

3.2 标准曲线制备

取空白血浆 100 μL , 分别加入非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑, 将其配成混合血浆对照液, 其中非那西丁和甲苯磺丁脲浓度为 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 500, 5 000, 10 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 奥美拉唑浓度为 250, 500, 1 000, 2 500, 5 000, 10 000, 25 000, 50 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 美托洛尔和咪达唑仑浓度为 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后按照“2.4”项下方法操作, 用 UHPLC-MS/MS 测定出待测物的峰

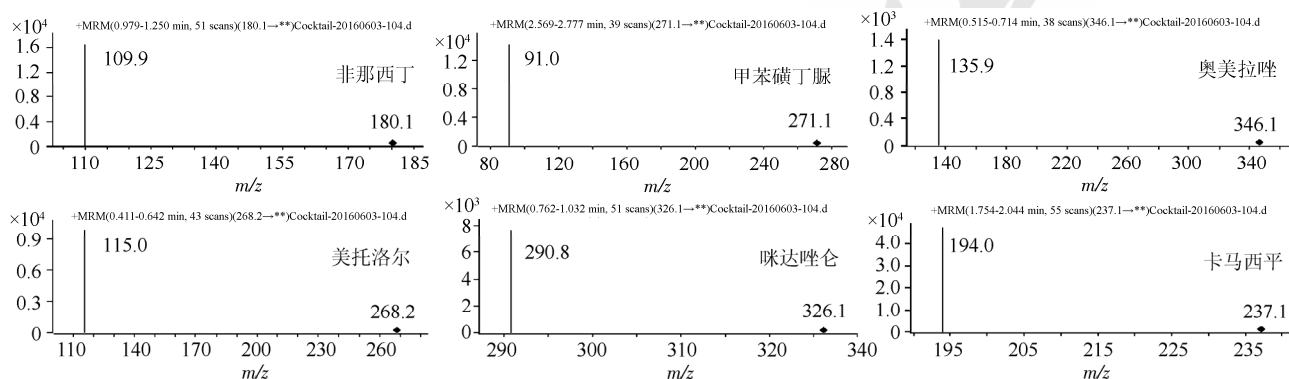


图 1 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑和卡马西平母离子和子离子扫描质谱图

Fig. 1 Full scan product ion of precursor ions of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam

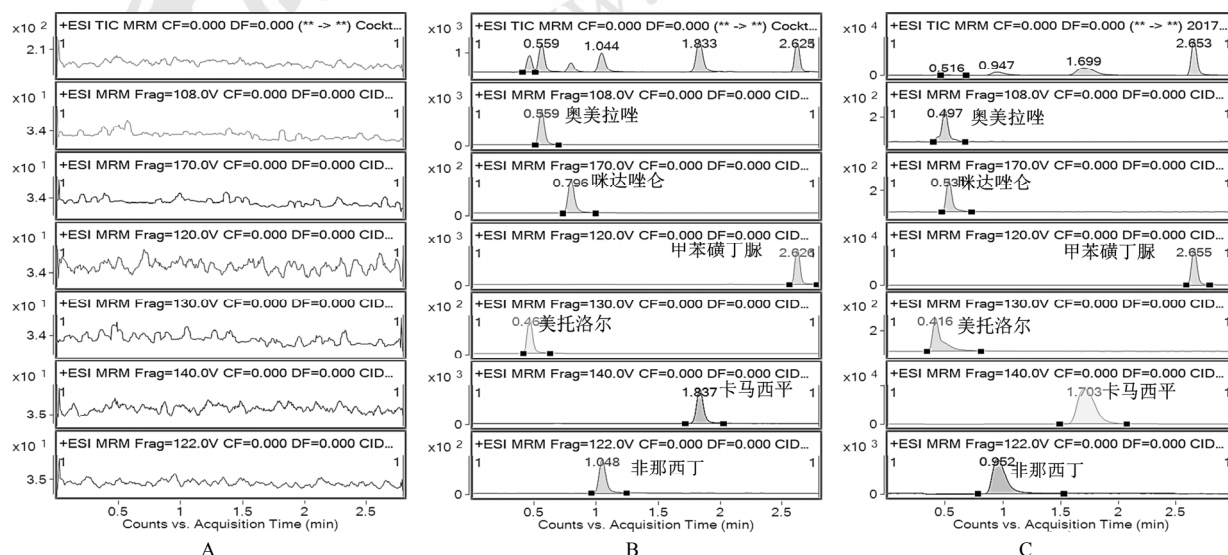


图 2 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑超高效液相串联质谱图

A—空白血浆; B—空白血浆+对照品; C—血浆样品。

Fig. 2 The UHPLC-MS/MS chromatograms of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam in rat plasma A—blank plasma; B—blank plasma + standard; C—plasma sample.

面积 A 及其内标的峰面积 A_i , 以峰面积 A/A_i 的比值为纵坐标 y , 待测物的浓度(C)为横坐标 x , 绘制标准曲线, 求回归方程。非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑在各自浓度范围内线性关系良好, 非那西丁和甲苯磺丁脲的定量下限(LLOQ)为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 奥美拉唑的 LLOQ 为 $250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 美托洛尔和咪达唑仑的 LLOQ 为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其回归方程及相关系数见表 2。

表 2 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑标准曲线

Tab. 2 Regression equation for phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam

药 物	回归方程	r^2
非那西丁	$y=0.443 \ 4x+0.048 \ 3$	0.998 8
甲苯磺丁脲	$y=0.531 \ 2x+0.045 \ 9$	0.998 8
奥美拉唑	$y=0.408 \ 9x+0.115 \ 9$	0.992 5
美托洛尔	$y=0.302 \ 0x+0.062 \ 9$	0.990 7
咪达唑仑	$y=0.179 \ 4x+0.037 \ 5$	0.995 9

3.3 精密度试验

取空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 分别加入 LLOQ 浓度, 低、中、高不同浓度的非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑工作液 $10 \mu\text{L}$, 加入内标物卡马西平 $20 \mu\text{L}$, 按“2.4”项下方法操作后, 连续测定 3 d, 计算日间及日内的精密度标准偏差。5 种探针药物日内及日间 RSD 均 $<15\%$, 结果见表 3。

3.4 回收率试验

取空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 分别加入低、中、高不同浓度的非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑混合工作液 $10 \mu\text{L}$, 在工作液中分别都加入内标物卡马西平 $20 \mu\text{L}$, 配成低、中、高浓度的样品, 每个浓度平行操作 6 份, 按“2.4”项下方法操作后, 记录峰面积 A_1 , 再选取对应浓度的对照品溶液进样, 获得峰面积 A_2 , 计算绝对回收率。将 5 种探针药物的峰面积 A_1 与内标峰面积 A_2 的比值带入标准曲线中, 计算出药物浓度, 与理论浓度相比较, 计算相对回收率。5 种探针药物的血浆样品绝对回收率和相对回收率均 $>75\%$, 见表 4。

3.5 基质效应

取空白血浆, 按“2.4”项下方法操作, 离心后获得上清液, 加入对照品溶液, 配制低、中、高 3 种浓度的血浆样品进样分析($n=6$), 记录下峰面积 A_b 。同时进行空白对照, 方法如上, 记录峰面积 A_w , 代入计算公式($A_b/A_w \times 100\%$), 求出基质效应, 结果见表 4。

表 3 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的日间、日内精密度($n=6$)

Tab. 3 The intraday and interday precision of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam($n=6$)

药物	加入量/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度 RSD/%	
		日内	日间
非那西丁	50	8.44	2.51
	100	4.62	4.19
	2 500	6.08	2.96
	8 000	7.42	1.58
甲苯磺丁脲	50	2.51	9.99
	100	3.27	6.93
	2 500	3.88	4.37
	8 000	6.08	4.75
奥美拉唑	250	7.64	2.23
	500	3.47	1.46
	10 000	3.84	9.09
	40 000	1.17	6.72
美托洛尔	10	11.52	8.01
	25	7.30	7.30
	500	3.82	2.56
	1 600	8.26	6.84
咪达唑仑	10	5.10	10.20
	25	7.16	7.16
	500	3.57	2.10
	1 600	7.20	6.42

表 4 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的回收率与基质效应($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 The extraction efficiency and matrix effect of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

药品	加入量/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对回收率/%	绝对回收率/%	基质效应/%
非那西丁	100	102.88 ± 0.06	92.29 ± 4.77	106.62 ± 5.51
	2 500	103.22 ± 1.01	95.40 ± 2.89	101.54 ± 3.07
	8 000	105.84 ± 0.04	92.51 ± 1.21	98.34 ± 1.29
甲苯磺丁脲	100	103.34 ± 0.06	91.20 ± 7.45	101.71 ± 8.30
	2 500	105.18 ± 0.02	94.13 ± 2.88	94.13 ± 3.88
	8 000	104.72 ± 0.08	95.80 ± 1.75	100.60 ± 1.83
奥美拉唑	500	101.43 ± 0.10	91.16 ± 4.06	93.12 ± 4.17
	10 000	105.36 ± 0.04	95.86 ± 3.26	96.96 ± 3.30
	40 000	108.50 ± 0.07	95.57 ± 3.25	94.64 ± 3.32
美托洛尔	25	100.85 ± 0.08	95.34 ± 3.59	96.56 ± 3.36
	500	103.82 ± 0.04	93.65 ± 12.69	102.29 ± 13.8
	1 600	95.60 ± 0.08	92.20 ± 2.38	97.62 ± 2.52
咪达唑仑	25	98.91 ± 0.07	102.63 ± 2.18	102.00 ± 2.16
	500	101.53 ± 0.04	96.44 ± 3.38	97.99 ± 3.31
	1 600	104.98 ± 0.08	99.13 ± 5.37	99.72 ± 5.14

3.6 稳定性试验

取低、中、高不同浓度的非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑血浆样品各 24 份(每份 100 μL), 预处理后分成 4 组, 分别于室温放置 6 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏放置 12 h、反复冻融 3 次、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻 30 d, 测定血浆样本浓度, 考察样本在不同环境下的稳定性, 结果见表 5。

3.7 药动学试验

按“2.5”项下方法采集血样, 测定大鼠灌胃给药后各个时间点的血药浓度, 并绘制平均药-时曲线, 见图 3。通过 DAS 软件(3.0 版)分析每只大鼠血浆中 5 种探针药物浓度的时间数据, 用非房室模型估算药动学参数; 并计算药动学参数, 结果见表 6。

4 结论

在方法学建立时, 笔者对流动相的选择进行了全面考察, 比较了甲醇-水和乙腈-水, 发现甲醇-水作为流动相, 分析的噪音较高, 对低浓度的样

表 5 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的稳定性试验结果($n=6$)

Tab. 5 Stability test results of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam($n=6$)

药物	加入 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	室温, 6 h		4 $^{\circ}\text{C}$, 12 h		反复冻融试验		-80 $^{\circ}\text{C}$, 30 d	
		RSD/%	RE	RSD/%	RE	RSD/%	RE	RSD/%	RE
非那西丁	100	1.11	5.68	0.99	7.08	5.99	2.06	5.29	1.24
	2 500	2.37	2.13	0.10	0.40	0.28	0.68	5.23	1.23
	8 000	1.01	2.44	0.57	9.10	2.70	9.45	5.59	6.35
甲苯磺丁脲	100	3.97	9.45	0.86	7.38	6.64	6.13	4.68	1.05
	2 500	5.84	4.51	0.32	0.68	2.64	0.02	6.09	9.73
	8 000	1.58	8.62	9.02	2.93	5.09	0.05	3.32	-1.79
奥美拉唑	500	0.14	5.34	0.12	5.31	6.31	1.08	1.12	2.32
	10 000	1.88	-3.75	6.75	10.55	2.91	12.58	8.22	1.98
	40 000	2.72	2.53	3.82	1.42	0.31	3.90	3.64	0.60
美托洛尔	25	9.62	0.59	3.36	2.07	3.19	-4.98	4.70	7.69
	500	4.16	4.16	0.84	1.65	1.52	5.72	4.74	9.58
	1 600	5.84	2.44	7.95	-2.19	3.57	5.94	6.71	4.35
咪达唑仑	25	6.36	-0.59	9.80	-1.92	7.71	2.38	5.66	-8.89
	500	2.57	5.98	0.01	4.60	6.54	1.09	2.90	2.54
	1 600	3.43	7.20	3.95	8.35	3.36	1.28	4.67	8.17

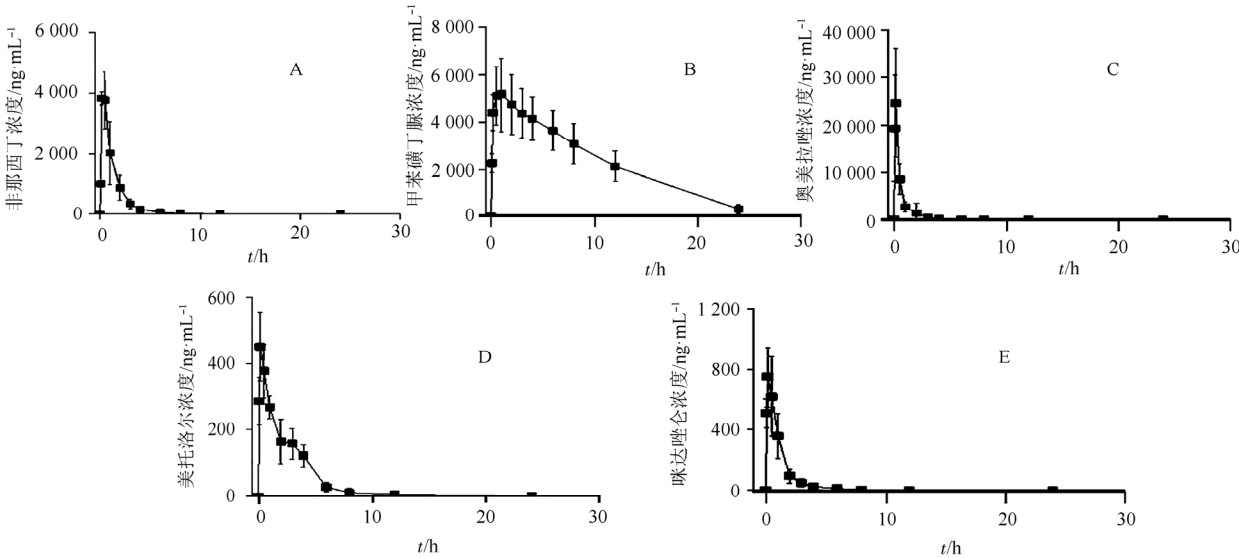


图 3 5 种探针药物的浓度-时间曲线

A-非那西丁; B-甲苯磺丁脲; C-奥美拉唑; D-美托洛尔; E-咪达唑仑。

Fig. 3 Mean plasma concentration- time curve of five probe drugs

A-phenacetin; B-tolbutamide; C-omeprazole; D-metoprolol; E-midazolam.

表 6 非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的主要药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 6 Main pharmacokinetics parameters of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol and midazolam($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分析药物	药动学参数					
	$T_{1/2}/\text{h}$	$T_{\max}/\text{h}$	$\text{CL}/\text{F}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{AUC}_{0-4}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$
非那西丁	2.66 ± 2.28	0.30 ± 0.18	1.87 ± 0.60	$4\,181.74 \pm 574.90$	$5\,868.30 \pm 2\,062.87$	$5\,871.11 \pm 2\,065.19$
甲苯磺丁脲	6.99 ± 1.10	0.70 ± 0.27	0.02 ± 0.00	$5\,332.69 \pm 1\,568.87$	$58\,056.34 \pm 15\,569.16$	$64\,276.87 \pm 15\,555.53$
奥美拉唑	0.66 ± 0.39	0.12 ± 0.00	0.75 ± 0.20	$24\,671.01 \pm 11\,508.79$	$14\,181.67 \pm 4\,085.40$	$14\,181.667 \pm 4\,085.40$
美托洛尔	3.02 ± 2.63	0.30 ± 0.18	0.90 ± 0.13	462.70 ± 97.74	$1\,123.67 \pm 180.469$	$1\,131.01 \pm 190.89$
咪达唑仑	1.37 ± 0.16	0.23 ± 0.25	1.14 ± 0.31	750.53 ± 202.62	946.91 ± 322.03	946.91 ± 322.03

品有较大的干扰。而以乙腈-水作为流动相,背景噪音较低,同时被检测 5 种探针药物的 LLOQ 均达到药动学考察的要求。并且在水中加入少量的甲酸(0.1%甲酸最优)改变流动相的 pH 值,通过提高离子化效率,峰型得到明显改善。

血浆样本处理预试验中,比较了乙酸乙酯萃取、甲醇沉淀和乙腈沉淀法。乙酸乙酯萃取操作复杂,耗时;蛋白沉淀操作简便、回收率高、重复性好。因此本研究采用蛋白沉淀法对样品进行处理。进一步对沉淀剂中的甲醇和乙腈进行比较,发现后者的沉淀效果更好,色谱峰不受干扰,峰型良好,因此采用乙腈沉淀法。

本研究采用 UHPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的浓度。有文章报道,采用 HPLC 对大鼠体内 CYP450 酶活性进行检测,该法样品处理较为复杂,样品分析时间需>10 min^[17-18]。而本研究采用的方法操作方便、灵敏度高、专属性强、检测周期短,仅需 3 min 即可满足生物样品的分析要求。

此前已有文献采用非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑中的部分药物,与其他探针药物如咖啡因(CYP1A2)、右美沙芬(CYP2D6)、氯唑沙宗(CYP2E1)组成“Cocktail”进行 CYP450 酶活性研究,并报道了其药动学参数^[18-20]。但较多采用静脉给药,并无灌胃后相关药动学数据。有文献虽采用 Cocktail 法通过大鼠灌胃探针药进行研究^[21],但给药剂量和探针药组成不完全相同,因此药动学参数存在一定的差异。本研究不仅可以提供简便、灵敏的测定方法,更为体内 CYP450 酶活性研究提供了基础实验数据。

REFERENCES

- [1] LV R, KONG A H. Recent progresses in cytochrome P450-catalyzed reaction mechanisms [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2009, 9(9): 1753-1756.
- [2] ZHANG Y W, FANG L, ZHENG X W, et al. Study advance on epigenetic regulation of cytochrome P450 enzymes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 293-297.
- [3] GUO R J, ZHANG R, LIU T T, et al. Progresses of NDMA C-H bond hydroxylation mechanisms catalyzed by cytochrome P450 [J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2014, 14(27): 5356-5360.
- [4] ZHANG H F, WANG Y F, LI Y. Research development of cytochrome P450 [J]. J Jilin Med Coll(吉林医药学院学报), 2005, 26(3): 174-177.
- [5] WANG C X, JIN H, ZHOU B, et al. Effects of luteolin on activities and mRNA expressions of cytochrome P450 enzymes in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药

- 学), 2018, 35(8): 1189-1193.
- [6] RUAN C J, LIU D Y, JIANG J, et al. Effect of the CYP2C19 genotype on the pharmacokinetics of icotinib in healthy male volunteers [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2012, 68(12): 1677-1680.
- [7] HOU C S, YANG Z H, SUN X B. Progress of “cocktail”probe substrates approach and its application in studies of traditional Chinese material medica on cytochrome P450 system [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2013, 27(3): 445-450.
- [8] FENG B B, ZHANG J H, XU X Y. *In vitro* evaluation of effect of “Neiyixiao” on hepatic P450 enzymatic activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(8): 1365-1372.
- [9] SUN B T, JU W Z, TAN H S. Investigation on factors influencing activity of CYP450 enzymes by Cocktail method [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(2): 558-562.
- [10] HU Z S, XU J, LI Q, et al. Simultaneous evaluation on the influence of Radix Sophora flavescens on CYP450 isoforms by cocktail probe approach in rats [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2013, 33(21): 1775-1778.
- [11] XU R A, XU Z S, GE R S. Effects of hydroxysafflower yellow on the activity and mRNA expression of four CYP isozymes in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3): 1141-1146.
- [12] GUO J J, ZHAO H, WANG J J. *In vitro* prediction of CYP-mediated inhibitory drug and drug interaction [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2009, 14(8): 841-848.
- [13] ZHAO Q, SHENTU J, XU N, et al. Phase I study of icotinib hydrochloride (BPI-2009H), an oral EGFR tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced NSCLC and other solid tumors [J]. Lung Cancer, 2011, 73(2): 195-202.
- [14] BI Y F, ZHU H B, ZHENG Z, et al. Studies on *in vitro* metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in microsomal metabolism of isofradixidin by LC-MS and specific inhibitor probes [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2013, 41(9): 1391-1395.
- [15] SONG W Y, LIU P, ZHANG Y, et al. Determination of sabarubicin and its metabolite M3 in human urine using UHPLC-MS/MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(8): 916-922.
- [16] ZHAO K, MEI S H, LI X G, et al. Uncertainty evaluation for the determination of salicylic acid in human plasma by UPLC [J]. Herld Med(医药导报), 2017, 36(7): 737-740.
- [17] HU Z S, WANG Z, ZHANG Y, L Q. Simultaneous evaluation of the influence of *Scutellaria baicalensis* Georgi on CYP450 by cocktail probe drugs [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(2): 108-110.
- [18] LIU P P, JIA T Z, XU S, et al. Application of Cocktail probe drugs for detecting influences of raw and processed phellodendri cortex on cytochrome P450 isoforms [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(10): 2065-2069.
- [19] ZHENG Q, HAO W W, HU S, XIONG W H, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetics of midazolam and phenacetin in rat plasma by LC-MS/MS [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2015, 34(5): 351-356.
- [20] ZHU H Y, CHEN X, ZHANG X H. Effects of allopurinol on cytochrome P450 isoforms in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 136-140.

收稿日期: 2018-02-24

(本文责编: 李艳芳)