

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.7.05

HPLC 法同时测定大鼠血浆中 3 种 CYP 450 探针药物的浓度

李思聪^{1,2}, 袁定胜^{1,2}, 杨锐^{1,2}, 王斌^{1,2}, 李金良^{1,2}, 李旭廷^{1,2*}

(1.四川省畜牧科学研究院兽药研究所,成都 610066;2.动物遗传育种四川省重点实验室,成都 610066)

[收稿日期] 2017-02-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 07-0021-07 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了同时测定大鼠血浆中 3 种细胞色素 P450(CYP450)亚型酶(CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4)活性的 Cocktail 探针药物的高效液相色谱(HPLC)检测方法。分别取非那西丁,咪达唑仑和甲苯磺丁脲三种探针药物,制成混合探针溶液,用一种提取溶剂系统对 3 种探针药物同时提取,并用高效液相色谱法同时测定 3 种探针药物的血药浓度,并对其进行专属性、线性范围及检测限、精密度、回收率、稳定性的验证。色谱条件选用Diamonsil C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-50 mM 磷酸盐缓冲对(45:55, pH 3.2);检测波长 230 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 35 °C。结果表明:非那西丁、咪达唑仑、甲苯磺丁脲的线性范围分别为 0.10~10.0 μg/mL($r=0.9993$), 0.05~5.0 μg/mL($r=0.9999$), 0.10~50.0 μg/mL($r=0.9991$);方法回收率分别为 79.28%~87.91%, 76.43%~85.36%, 82.79%~90.61%。该 HPLC 检测方法快捷,准确,灵敏度高,可以在同一次试验中,同时测定大鼠血浆中 3 种 CYP450 亚型酶探针药物(非那西丁,甲苯磺丁脲,咪达唑仑)的浓度,各探针药物的吸收峰分离完全,无干扰,可用于开展某些受试药物对大鼠 CYP450 的 3 个主要亚型酶(CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4)调控作用的相关研究,从而为相关肝药酶代谢研究提供方法学参考。

[关键词] 细胞色素 P450;高效液相色谱法;非那西丁;甲苯磺丁脲;咪达唑仑

Simultaneous Determination of Three Probe Drugs of CYP450 in Rat Plasma by HPLC

LI Si-cong^{1,2}, YUAN Ding-sheng^{1,2}, YANG Rui^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, LI Jin-liang^{1,2}, LI Xu-ting^{1,2*}

(1. Institute of Veterinary Pharmacology, Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China;

2. Animal Breeding and Genetics Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610066, China)

Corresponding author: LI Xu-ting, E-mail: 676049640@qq.com

Abstract: To provide a methodological reference for the study of metabolism of liver enzymes, an HPLC method for simultaneously determining three cytochrome P450(CYP) (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4) probe drugs in rat plasma was established. Cocktail probe solution was prepared by mixing three specific probe drugs of CYP1A2,

基金项目: 四川省公益性科研院所基本科研业务费项目(SASA2014A13);四川省财政运行专项(SASA2014CZYX010)

作者简介: 李思聪, 硕士, 从事兽药基础研究与开发工作。

通讯作者: 李旭廷。E-mail: 676049640@qq.com

2C9 and 3A4 (phenacetin, tolbutamide and midazolam, respectively). The three drugs were extracted with one solvent system, determined in rat plasma by HPLC, and verified the specificity, linear range, detection limit, precision, recovery and stability. The isolation was performed on a Diamonsil C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol - 50 mM phosphate buffer (45 : 55; pH3.2); the detection wavelength was 230 nm; the flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 35 °C. Results showed that there were good linearity of phenacetin, midazolam and tolbutamide in the ranges of 0.10~10.0 μg/mL ($r=0.9993$), 0.05~5.0 μg/mL ($r=0.9999$), 0.10~50.0 μg/mL ($r=0.9991$). The recoveries were 79.28%~87.91%, 76.43%~85.36%, 82.79%~90.61%, respectively. The method is rapid, accurate, sensitive and suitable for simultaneously determining the concentrations of three CYP450 probe drugs (phenacetin, tolbutamide and midazolam) in rat plasma, the three drugs and the internal standard (carbamazepine) were separated well under the above HPLC conditions, which could be employed in evaluating the effects of drugs on rat's CYP450 subtype enzymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4) activities and in related studies.

Key words: CYP450; HPLC; phenacetin; tolbutamide; midazolam

细胞色素 P450 (CYP450) 是药物代谢过程中的关键酶, 是一个具有大量底物特异性的同工酶大家族, 负责生物体内绝大多数外源性化合物的生物转化^[1-2], 可代谢大约 25 万种外源性物质^[3]。CYP450 涉及 100 余种亚型, 其中最主要亚型是 CYP3A4 (代谢的药物占全部药物的 50%), CYP2C9 (代谢药物约占 10%) 和 CYP1A2 (代谢药物约占 4%), 是药物代谢和毒理学研究的重要指标^[1]。鉴于 CYP450 在药物代谢过程中的重要性, 国内外均把药物对 CYP450 的影响作为药物联用、食药合用、草药合用的重要依据^[4-6]。Cocktail 探针药物法是研究药物对 CYP450 酶活性影响及药物相互作用的主要手段, 通过测定特异性探针药物的血药浓度大小间接反映 CYP450 各亚型的活性情况^[7-10]。本研究采用 Cocktail 探针药物法, HPLC 同时测定大鼠血浆中 CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 的探针药物非那西丁、甲苯磺丁脲和咪达唑仑的浓度, 并对该 HPLC 法进行了方法学研究, 以期为开展某些药物对大鼠 CYP1A2, CYP2C9 和 CYP3A4 的调控作用和相关药物相互作用研究等提供方法学参考。

1 材料

1.1 仪器 UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, 美国戴安公司; WH-3 微型漩涡混合仪, 上海沪西分析

仪器厂; Eppendorf MiniSpin plus 离心机, 德国 Eppendorf 公司; CQ250 超声洗涤器, 上海超声仪器厂; MD200-1 氮吹仪, 杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 药物与试剂 非那西丁 (批号 100095-201205; 含量 98.0%), 甲苯磺丁脲 (批号 100500-200801; 含量 98.5%), 卡马西平 (批号 100142-201105; 含量 99.7%), 咪达唑仑对照品 (批号 171265-201402; 含量 99.8%), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为纯化水。

1.3 实验动物 健康清洁级 SD 雄性大鼠, 体重 200±20 g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(川)2013-24。整个试验期间, 于室温 20~24 °C 下饲养, 每天采食供给饲料及纯化水, 采血前 12 h 限饲。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-50 mM 磷酸盐缓冲对 (45 : 55, pH 3.2); 紫外检测波长 230 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱温 35 °C。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液的制备 分别取干燥至恒重的非那西丁, 咪达唑仑, 甲苯磺丁脲和卡马西平 (内标) 对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL

含 4 μg 的储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光冷藏备用。

2.2.2 Cocktail混合探针液的制备 精密称取非那西丁 40 mg, 甲苯磺丁脲 20 mg, 咪达唑仑 10 mg 至同一 EP 管中, 加入 0.2% CMC-Na 水溶液 10 mL, 涡旋混匀, 超声 10 min, 即配制成 Cocktail 混合探针液。该混合探针液于大鼠给药前新鲜配制, 配好后立即使用。

2.3 大鼠血浆样品处理 取大鼠血浆 100 μL , 加入含内标卡马西平的甲醇溶液 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL , 涡旋 30 s, 超声 10 min 后, 13000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 取上清液, 0.45 μm 滤膜过滤, 取 20 μL 进样测定。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 分别取大鼠空白血浆; 含有卡马西平, 非那西丁, 咪达唑仑及甲苯磺丁脲对照品的大鼠空白血浆样品; 大鼠灌胃 Cocktail 混合探针液后 0.5 h 尾静脉采集的血浆样品, 按照 2.3 项进行血浆样品处理; 另外取卡马西平, 非那西丁, 咪达唑仑及甲苯磺丁脲混合对照品。上述 4 个待测样品, 参照 2.1 项色谱条件, 分别取 20 μL 进样, 记录色谱图。

2.4.2 线性范围和检测限 取 6 只试管并分别精确加入一定量的非那西丁, 甲苯磺丁脲, 咪达唑仑对照品储备液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下挥干甲醇溶液, 残留物中再分别精密加入含内标卡马西平的甲醇储备液 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL 和大鼠空白血浆 100 μL , 使各组分中药物浓度分别为非那西丁 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 甲苯磺丁脲 0.10, 1.00, 2.00, 5.00, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 咪达唑仑 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 涡旋 30 s, 超声 10 min 后, 13000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 取上清液, 0.45 μm 滤膜过滤, 按 2.1 项下条件进样 20 μL , 测定分析, 以各组分探针药物的浓度为横坐标, 探针药物和内标的峰面积比为纵坐标进行线性回归, 得非那西丁、甲苯磺丁脲、咪达唑仑的回归方程。

2.4.3 精密度试验 分别取非那西丁 0.50, 5.00, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 咪达唑仑 0.10, 0.50, 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甲苯磺丁脲 5.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度的标准血浆样品, 各取 5 份, 按 2.3 项下方法进行血浆样品处

理, 按 2.1 项下条件测定, 于同 1 d 内进样 5 次测定, 求得日内 RSD; 连续测定 5 d, 求得日间 RSD。

2.4.4 回收率试验 分别取非那西丁 0.50, 5.00, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甲苯磺丁脲 5.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 咪达唑仑 0.10, 0.50, 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度的标准血浆样品, 各 5 份, 按 2.3 项下方法进行血浆样品处理, 按 2.1 项下条件测定, 用已求得的标准曲线回归方程计算浓度, 并以测定值的平均值与配制的理论浓度比较, 计算相对回收率。

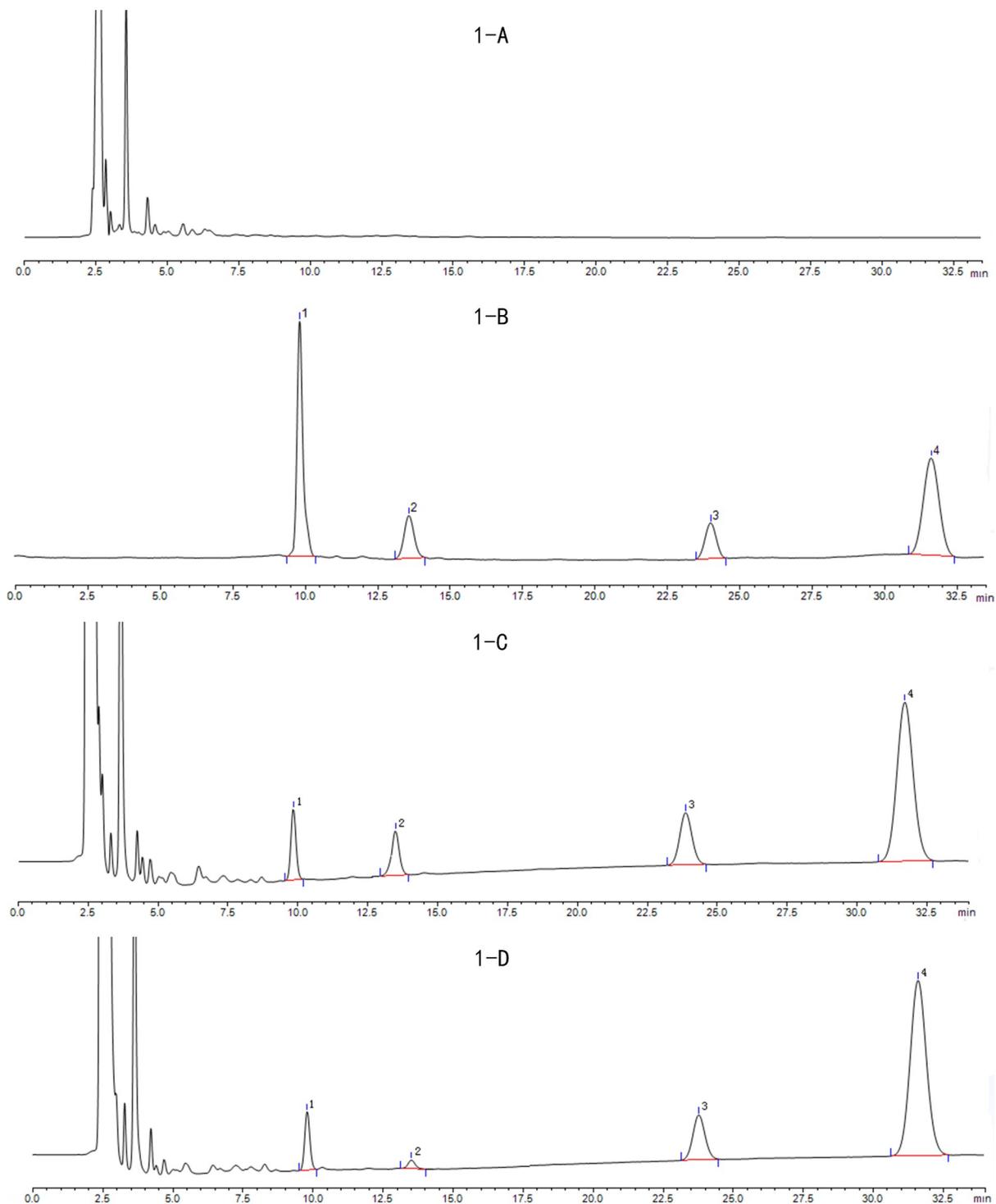
2.4.5 稳定性试验 分别配制含 3 个探针药物的低、中、高浓度的标准血浆样品, 于室温放置 24 h, -20°C 冻存 30 d, 反复冻融 3 次。按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 记录探针药峰面积和内标峰面积, 计算样品浓度及 RSD。

2.5 应用 选取 SD 雄性大鼠 8 只 (体重 200 ± 20 g), 按照 10 mL/kg B.W. 灌胃给药 Cocktail 混合探针液, 灌胃后 0.083, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 4, 24 h 尾静脉取血, 每次取血量 0.2 mL。血样采集后置于肝素抗凝的试管中, 4000 r/min 离心 5 min 分离得到血浆, 按照 2.3 项下方法进行血浆处理, 按 2.1 项色谱条件, 各取 20 μL 进样, 记录色谱图和峰面积。

3 结果与分析

3.1 专属性试验 在上述色谱条件下测得色谱图如图 1 所示, 分别为空白血浆 (图 1-A), 卡马西平、非那西丁、咪达唑仑及甲苯磺丁脲混合对照品 (图 1-B), 含卡马西平、非那西丁、咪达唑仑及甲苯磺丁脲对照品的大鼠空白血浆 (图 1-C), 大鼠灌胃 Cocktail 混合探针液后 0.5 h 血浆样品 (图 1-D)。从图 1 可见, 非那西丁, 咪达唑仑及甲苯磺丁脲与内标卡马西平, 空白血浆中的内源性物质分离良好。

3.2 线性范围和检测限 探针药物中, 非那西丁的回归方程为: $Y=0.7878X-0.0306$, $r=0.9993$; 甲苯磺丁脲的线性方程为: $Y=0.6372X+0.0751$, $r=0.9991$; 咪达唑仑的线性方程为: $Y=0.975X-0.0087$, $r=0.9999$ 。线性范围分别为: 非那西丁 0.10 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 甲苯磺丁脲 0.10 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 咪达唑仑 0.05 ~ 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最低定量限 (S/N=10) 非那西丁、甲苯磺丁脲均为 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 咪达唑仑为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



1-A:空白血浆 (blank plasma) ; 1-B:探针药物+卡马西平 (probe drugs+carbamazepine) ;

1-C:空白血浆+探针药物+卡马西平 (blank plasma +probe drugs+carbamazepine) ;

1-D:大鼠给予探针药物后 0.5 h 血浆+卡马西平 (plasma after rat administration of probe drugs +carbamazepine)

1. 非那西丁 (phenacetin) ; 2. 咪达唑仑 (midazolam) ; 3. 卡马西平 (carbamazepine) ; 4. 甲苯磺丁脲 (tolbutamide)

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

3.3 精密度的试验 表1精密度的试验结果表明,不同浓度非那西丁、咪达唑仑、甲苯磺丁脲日内、日间精密度的 *RSD* 均小于 7%,精密度的良好。

3.4 回收率的试验 表1回收率的试验结果表明,不同浓度非那西丁、咪达唑仑、甲苯磺丁脲回收率的均值均在 75% 以上,回收率的稳定。

3.5 稳定性的试验 表2稳定性的试验结果表明,含 3 种探针药物低、中、高浓度的标准血浆样品经室温存放 24 h, -20 °C 冻存 30 d, 反复冻融 3 次后,非那西丁、甲苯磺丁脲、咪达唑仑的低、中、高浓度 *RSD* 均小于 9%,血浆样品的稳定性良好。

表 1 探针药物的精密度和回收率结果

Tab 1 The precisions and recoveries of probes

探针药物 (probe drug)	理论浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ (concentration) / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	精密度的 (precision), <i>RSD</i> / %		回收率 / % (recovery) / %
		日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	
非那西丁 (phenacetin)	0.50	4.8	5.2	79.28±3.67
	5.00	3.6	3.9	83.56±3.13
	10.0	2.8	3.1	87.91±2.58
咪达唑仑 (midazolam)	0.10	6.5	6.7	76.43±3.79
	0.50	5.6	5.9	80.90±2.42
	1.00	3.9	4.4	85.36±2.61
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	5.0	4.0	4.2	82.79±3.23
	25.0	2.5	2.4	84.09±2.57
	50.0	2.1	2.2	90.61±2.48

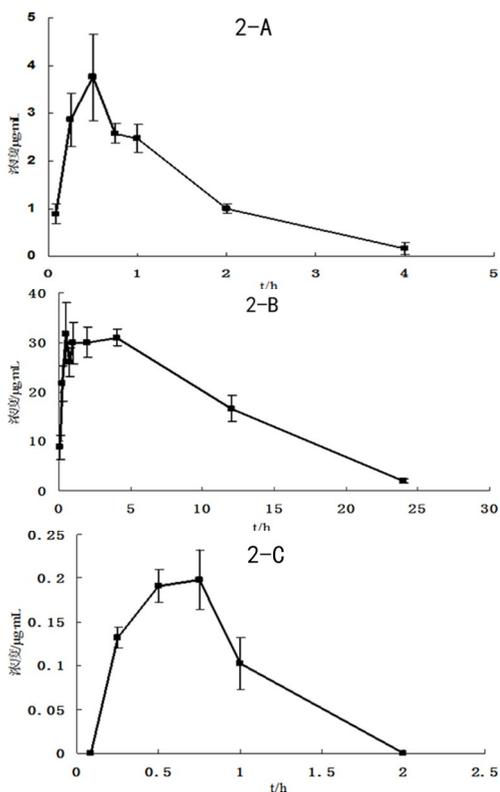
表 2 探针药物的稳定性考察

Tab 2 Stabilization determination of probes

探针药物 (probe drug)	浓度 (concentration) / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	室温放置 24 h (room temperature)		-20 °C 冷冻 30 d (freeze-stored)		反复冻融 3 次 (freezing and thawing)	
		平均值 (mean) / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	<i>RSD</i> / %	平均值 (mean) / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	<i>RSD</i> / %	平均值 (mean) / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	<i>RSD</i> / %
非那西丁 (phenacetin)	0.50	0.39±0.03	6.84	0.40±0.03	7.15	0.39±0.03	7.42
	5.00	4.19±0.22	5.21	4.07±0.22	5.47	4.10±0.23	5.55
	10.0	8.75±0.32	3.66	8.77±0.30	3.42	8.68±0.34	3.89
咪达唑仑 (midazolam)	0.10	0.075±0.01	7.22	0.073±0.01	8.43	0.074±0.01	8.13
	0.50	0.40±0.03	6.27	0.39±0.02	5.92	0.39±0.03	6.87
	1.00	0.86±0.04	4.64	0.85±0.04	5.24	0.84±0.05	5.49
甲苯磺丁脲 (tolbutamide)	5.0	4.04±0.15	3.78	3.94±0.18	4.54	3.89±0.18	4.69
	25.0	21.54±0.55	2.56	20.85±0.65	3.14	20.25±0.57	2.82
	50.0	44.64±1.06	2.37	45.03±1.21	2.68	44.97±1.05	2.33

3.6 应用 由图 2 所得均值药-时曲线所示,本测试方法可用于同时测定大鼠体内非那西丁、甲苯磺

丁脲、咪达唑仑的血药浓度,可用来评价药物对 CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4 的影响。



2-A: 非那西丁 (phenacetin); 2-B: 甲苯磺丁脲 (tolbutamide);
2-C: 咪达唑仑 (midazolam)

图 2 大鼠灌胃 3 种探针药物后的血浆浓度
均值-时间曲线图

Fig 2 Concentration-time curves of the 3 probe drugs
in rat plasma after administration

4 讨论与小结

在 CYP450 探针药物选择中, CYP1A2 主要的探针药物有咖啡因^[11-12]、茶碱^[13] 和非那西丁^[14-16], 本研究 CYP1A2 探针药物筛选时发现茶碱与血浆内源性物质有干扰, 咖啡因属于国家管制类药物, 购买不便, 故选用非那西丁作为 CYP1A2 探针底物; CYP2C9 探针药物主要有甲苯磺丁脲^[14,16] 和华法林^[17], 然而 Holbrook AM 等^[18] 报道华法林容易和多种食物及药物相互作用而导致严重不良反应, 因此选用甲苯磺丁脲作为 CYP2C9 探针底物; 咪达唑仑是评价 CYP3A4 代谢活性的常用探针药物, 其既可静脉用药, 也可口服给药, 吸收快速且完全, 不良反应轻微, 满足安全、快速、特异性强等检测要求, 而且与众多的 CYP3A4 底物有着良

好的相关性^[19]。综上所述, 本实验选择非那西丁、甲苯磺丁脲、咪达唑仑作为大鼠 CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4 的探针药物。

本研究曾对 3 种探针药物及内标卡马西平进行全波长扫描, 各药物在 230 nm 均有较大紫外吸收; 采用甲醇-50 mM 磷酸盐缓冲对 (65 : 35) 作为流动相^[20], 结果咪达唑仑与非那西丁出峰时间重叠, 将甲醇浓度逐步降低, 咪达唑仑与非那西丁逐渐分离, 但甲苯磺丁脲保留时间也随之延后, 降至 35% 时, 其保留时间超过 60 min, 最终确定甲醇浓度在 45% 时, 可有效缩短检测时间; 当流动相 pH 大于 3.5 时, 甲苯磺丁脲具有明显的拖尾现象, pH 3.0 时, 咪达唑仑也出现拖尾, 通过优化, 流动相 pH 调为 3.2。故最终确定流动相为甲醇-50 mM 磷酸盐缓冲对 (45 : 55; pH 3.2), 检测波长 230 nm, 在该条件下 3 种探针药物及内标分离完全, 峰形良好, 无杂质峰干扰, 血浆内源性物质对 3 种探针药物及内标的分离测定均无干扰。通过方法学考察表明该 HPLC 检测方法灵敏度高, 专属性好, 重现性好, 准确性高, 稳定可靠, 可用于生物样本分析研究。动物实验表明, 用该 HPLC 检测法研究药物在体内代谢具有较好的灵敏度, 可以满足动物实验的要求。

本研究建立的方法, 可在同一色谱条件下测定 3 种 CYP450 亚型酶探针药物的浓度, 因而可对各亚型酶的活性进行同时测定, 可同时获取经多个代谢途径的信息, 且操作简便, 快捷, 成本较低。为研究药物对 CYP450 活性的影响, 本方法对于评价药物的安全性、预测代谢性药物相互作用以及指导临床合理用药具有积极的意义。

参考文献:

- [1] Frye Reginald F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes [J]. *Molecular interventions*, 2004, 4(3): 157-162.
- [2] 吴永章, 刘力, 杨志强, 等. 细胞色素 P450 与兽药的研发应用 [J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(1): 46-48.
WU Yong-zhang, LIU Li, YANG Zhi-qiang, *et al.* Research, development and application of cytochrome P450 and veterinary drugs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2007, 41(1): 46-48.

- [3] Lewis D F, Watson E, Lake B G. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacokinetics [J]. *Mutation Research/reviews in Mutation Research*, 1998, 410(3): 245-270.
- [4] 陆兔林, 苏联麟, 季德, 等. CYP450 酶与中药代谢相互作用及酶活性测定的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(18): 3524-3529.
LU Tu-lin, SU Lian-lin, JI De, *et al.* Interaction between CYP450 enzymes and metabolism of traditional Chinese medicine as well as enzyme activity assay [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(18): 3524-3529.
- [5] 侯健, 孙娥, 宋捷, 等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(15): 2774-2780.
HOU Jian, SUN E, SONG Jie, *et al.* Relationship between hepatic drug-metabolizing enzymes CYP450 and traditional Chinese medicine-induced hepatotoxicity [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(15): 2774-2780.
- [6] Lin Z, Guo S, Yang C, *et al.* *In vivo* effects of scutellarin on the activities of CYP1A2, CYP2C11, CYP2D1, and CYP3A4/2 by cocktail probe drugs in rats [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(7): 537-541.
- [7] D D Breimer, J H Schellens. A 'cocktail' strategy to assess *in vivo* oxidative drug metabolism in humans [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1990, 11(6): 223-225.
- [8] 王亮, 郭姣, 石忠峰, 等. "Cocktail" 探针药物法的研究思路与应用 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(11): 30-34.
WANG Liang, GUO Jiao, SHI Zhong-feng, *et al.* Research Route and Utilization of Cocktail Probe Drugs [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 12(11): 30-34.
- [9] 候丛颂, 杨志宏, 孙晓波. "cocktail" 探针药物法及其在研究中药对细胞色素 P450 影响中的应用进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3): 445-450.
HOU Cong-song, YANG Zhi-hong, SUN Xiao-bo. Progress of "cocktail" probe substrates approach and its application in studies of traditional Chinese materia medica on cytochrome P450 system [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2013, 27(3): 445-450.
- [10] 阎克里, 赵丽, 朱秀卿, 等. HPLC 法同时测定人血浆中咪达唑仑和阿曲库铵的浓度 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(8): 1348-1351.
YAN Ke-li, ZHAO Li, ZHU Xiou-qing, *et al.* HPLC determination of midazolam and atracurium in human plasma [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2009, 29(8): 1348-1351.
- [11] 武琴园, 魏玉辉, 张进文, 等. 六味地黄丸对大鼠肝 CYP1A2 及肠道 P-gp 活性的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33(1): 37-41.
WU Qin-yuan, WEI Yu-hui, ZHANG Jin-wen, *et al.* Effect of Liuwei Dihuang Pill on the activity of liver CYP1A2 and P-gp in rat intestines [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2011, 33(1): 37-41.
- [12] Yin S, Cheng Y, Li T, *et al.* Effects of notoginsenoside R1 on CYP1A2, CYP2C11, CYP2D1, and CYP3A4/2 activities in rats by cocktail probe drugs [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 54(2): 231.
- [13] Xia CH, Sun J G, Wang G J, *et al.* Herb-drug interactions; *in vivo* and *in vitro* effect of Shenmai injection, a herbal preparation, on the metabolic activities of hepatic cytochrome P450 3A1/2, 2C6, 1A2, and 2E1 in rats [J]. *Planta Med*, 2010, 76(3): 245-250.
- [14] He X M, Zhou Y, Xu M Z, *et al.* Effects of long-term smoking on the activity and mRNA expression of CYP isozymes in rats [J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(10): 1725-1731.
- [15] Zhuang Z, Tang M, Zheng Y, *et al.* Effect of Dimethoate on the Activity of Hepatic CYP450 Based on Pharmacokinetics of Probe Drugs [J]. *Pharmacology*, 2015, 95(5/6): 243-250.
- [16] Wang X S, Hu X C, Chen G L, *et al.* Effects of vitexin on the pharmacokinetics and mRNA expression of CYP isozymes in rats [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(3): 366-372.
- [17] Halladay Jason S, Delarosa Erlie Marie, Tran Daniel, *et al.* High-throughput, 384-well, LC-MS/MS CYP inhibition assay using automation, cassette-analysis technique, and streamlined data analysis [J]. *Drug Metabolism Letters*, 2011, 5(3): 220-230.
- [18] Holbrook A M, Pereira J A, Lab IR ISR, *et al.* Systematic Overview of Warfarin and Its Drug and Food Interactions [J]. *Arch Intern Med* 2005, 165(10): 1095-1106.
- [19] Wang B, He F, Lin Y, *et al.* Effect of recombinant human thyllolisin-alpha, an immuno-modulating peptide with 28 amino acids, on the activity of cytochrome P450s [J]. *Drug Metab Lett*, 2007, 1(3): 199-204.
- [20] Liu Y, Jiao J J, Zhang C L. A Simplified Method to Determine Five Cytochrome P450 Probe Drugs by HPLC in a Single Run [J]. *Biol. Pharm. Bull*, 2009, 32(4): 717-720.

(编辑:侯向辉)