DOI:10.16016/j.1000-5404.202008230

同时测定人肝微粒体中9种CYP450酶活性的LC-MS/MS方法

石忠波,赵德璋,蒋君好,谢宝刚,李 燕,于 超 400016 重庆,重庆医科大学药学院

[摘要] **目的** 建立一种同时测定人肝微粒体中9种CYP450酶活性的LC-MS/MS方法(鸡尾酒法),用于评估药物对CYP450酶活性的影响,以预判药物间发生相互作用的可能性。**方法** 使用9种不同酶的底物作为探针与人肝微粒体共同孵育,硝苯地平作为内标物质。用Agilent 1290系列液相色谱仪进行洗脱,所有代谢产物均在多反应监测模式下进行分析,并对单探针法与鸡尾酒法测定的IC_{50}值进行比较。**结果** 该LC-MS/MS方法专属性好,色谱峰分离完全且无干扰。线性关系良好,9种代谢产物在标准曲线范围内的相关系数均>0.99。方法准确度为85.34%~113.89%,日内RSD<12.49%,日间RSD<14.98%,符合相关标准。该鸡尾酒法测定的抑制剂的IC_{50}值与单个探针底物的IC_{50}值呈高度相关(R^2>0.997 8)。**结论** 该LC-MS/MS方法可同时对人肝微粒体中9种CYP450酶进行活性测定。

[关键词] 药物相互作用;CYP450酶;LC-MS/MS;鸡尾酒法

[中图法分类号] R322.47; R345; R446 [文献标志码] A

Simultaneous determination of 9 CYP450 enzymes in human liver microsomes using LC-MS/MS

SHI Zhongbo, ZHAO Dezhang, JIANG Junhao, XIE Baogang, LI Yan, YU Chao College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] Objective To develop a liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to simultaneously detect the activities of 9 CYP450 enzymes in human liver microsomes in order to anticipate the possibility of drug-drug interactions. Methods Nine different enzyme substrates were used as probes to incubate with human liver microsomes, with nifedipine as internal standard. All metabolites were eluted by Agilent 1290 series liquid chromatograph and then analyzed under multiple reaction monitoring. The IC_{50} values obtained by single substrate method and cocktail mixed substrate method were compared. Results Our established method had good specificity, and all the chromatographic peaks were completely separated without interference. The linear relationship was good. The correlation coefficients of 9 metabolites within the range of the standard curve were all greater than 0.99. The accuracy of the method was 85.34%~113.89%, the intra-day relative standard deviation (RSD) was <12.49%, and the inter-day RSD was <14.98%, which complied with the relevant standards. The IC_{50} value of the inhibitor determined by this cocktail method was highly correlated with that of a single probe substrate (R^2> 0.997 8). Conclusion Our LC-MS/MS method can quickly and simultaneously measure the activities of 9 CYP450 enzymes in human liver microsomes.

[**Key words**] drug-drug interactions; CYP450 enzyme; LC-MS/MS; cocktail

Corresponding author: YU Chao, E-mail: yucpaper@126.com

药物联合应用可能会引发药物相互作用,甚至导致严重的不良反应[1]。药物进入机体后经过吸收随着血液循环分布至全身各个器官,随后多数药物主要在肝脏进行代谢[2]。药物代谢酶CYP450主要存在于肝脏中,他们的活性很容易受到药物影响,而药物代谢性相互作用主要是由CYP450所介导的[3]。根据相关报道,约40%的药物因为体内代谢动力学参数不佳(例如可诱导或抑制药物代谢酶等)而被撤出市场[4]。

[通信作者] 于 超, E-mail:yucpaper@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

因此,评价药物对 CYP450 酶的体外抑制和诱导作用,并在此基础上预测药物相互作用,是合理用药、避免药品不良反应的关键。

随着药物相互作用的频繁发生,一种同时测定药物对多种代谢酶活性的方法具有广泛的应用前景。本研究选用非那西汀、香豆素、安非他酮、紫杉醇、双氯芬酸、美芬妥英、右美沙芬、氯唑沙宗、睾酮分别作为 CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A 的相应底物,硝苯地平作为内标物质,采用高效液相色谱串联质谱法(liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时检测 9 种代谢物(对乙酰氨基酚、7-羟基香豆素、羟基安非他酮、6-羟基紫杉醇、4-羟基双氯芬酸、4-羟基美芬妥英、右啡烷、6-羟基氯唑沙宗、7-羟基睾酮)的生成量来反映人肝微粒体中 CYP450 酶的活性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

安捷伦 1290 型液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(美国安捷伦科技有限公司);iCEN-24 型台式高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);十万分之一精密电子天平(德国赛多利斯集团);IncuShaker 系列恒温振荡器(美国精骐有限公司);超纯水净化系统(美国 MILLIPOER 公司);KQ-100B 型超声波清洗器(昆山超声仪器公司)。

1.2 药品及试剂

人肝微粒体(来自 25 个性别混合供体)购于上海瑞德肝脏疾病研究有限公司;香豆素、安非他酮、双氯芬酸、右美沙芬、氯唑沙宗、睾酮、羟基安非他酮、右啡烷、8-甲氧基补骨脂、Thiotepa、槲皮素、磺胺苯吡唑、双硫仑、酮康唑、噻氯匹定、NADPH 均购于美国 Sigma 公司;非那西汀、紫杉醇、对乙酰氨基酚、7-羟基香豆素、7-羟基睾酮、茶碱、奎尼丁购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;6-羟基紫杉醇、4-羟基双氯芬酸、6-羟基氯唑沙宗、美芬妥英、4-羟基美芬妥英购自加拿大 TRC 公司;乙腈购于美国 TEDIA 公司。

1.3 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), Agilent Eclipse Plus C18 预柱(2.1 mm×5 mm, 1.8 μm),进样量 5 μL。柱温为 40 ℃,流速为 0.2 mL/min,运行时间 10 min。流动相 A 为含 0.1%甲酸的水,B 为含 0.1%甲酸的乙腈,梯度洗脱程序见表 1。

1.4 质谱条件

在电喷雾电离(ESI)条件下,采用高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS),利用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测洗脱化合物。干气温度为 300 ℃,干气流量为 8 L/min,雾化气体压力为 35 psi,毛细血管电压为 4 000 V(ESI+)、3 500 V(ESI−)。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	V(流动相 A)/%	V(流动相 B)/%
0	95	5
2	70	30
3	70	30
5	10	90
6	2	98
7	2	98
7.1	95	5
10	95	5

1.5 样品处理

200 μL 样品中加入 380 μL 冰乙腈终止反应,加入 20 μL 内标溶液后充分振摇,在 12 000 r/min 条件下离心 15 min。吸取 200 μL 上清液,进入 LC-MS/MS 分析。

1.6 方法学考察

取 1 mg/mL 的灭活人肝微粒体 40 μL,加入 6 个不同浓度的代谢物标准溶液 20 μL,然后加入 140 μL 磷酸盐缓冲液。再加入 380 μL 冰乙腈、20 μL 内标溶液,在 12 000 r/min 条件下离心 15 min。吸取 200 μL 上清液,进行 LC-MS/MS 分析。以代谢物与内标物质响应值之比为纵坐标,代谢物的浓度为横坐标作图,绘制标准曲线。制备低、中、高 3 个不同浓度的质控样品,按上述 1.5 方法处理后,取上清液在 1 d 内测定 5 次并连续测定 3 d,进行了准确度、日内精密度和日间精密度的考察。

1.7 单探针法与鸡尾酒法的 IC_{50} 值测定

孵育体系如表 2、3 所示,分别选取茶碱、8-甲氧基补骨脂、Thiotepa、槲皮素、磺胺苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、双硫仑、奎尼丁作为 CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A 的抑制剂。取 1 mg/mL 的人肝微粒体 40 μL,加入单一底物(单探针法)或底物混合物(鸡尾酒法)20 μL,梯度浓度的单一抑制剂(单探针法)或抑制剂混合物(鸡尾酒法)20 μL,然后加入磷酸盐缓冲液 100 μL。在 37 ℃预孵育 5 min 后,加入 10 mmol/L 的 NADPH 启动反应。20 min 后,按上述 1.5 方法处理后取上清液进行 LC-MS/MS 分析。对照组不加入抑制剂。以每个样品中的相对酶活性(实验组与对照组生成代谢物的浓度之比)为纵坐标,抑制剂浓度的对数值为横坐标,使用 Prism(GraphPad Software, Version 6)绘制了每个样品中的相对酶活性与存在的抑制剂浓度的关系图,计算 IC_{50} 值。

表 2 人肝脏微粒体孵育体系实验条件

孵育体系条件	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A
探针底物(μmol/L)	非那西汀(200)	香豆素(50)	安非他酮(200)	紫杉醇(100)	双氯芬酸(100)	美芬妥英(400)	右美沙芬(50)	氯唑沙宗(200)	睾酮(100)
抑制剂(μmol/L)	茶碱(0.5~500)	8-甲氧基补骨脂(0.005~5)	Thiotepa(0.5~500)	槲皮素(0.05~500)	磺胺苯吡唑(0.05~50)	噻氯匹定(0.05~50)	奎尼丁(0.001~1)	双硫仑(0.5~500)	酮康唑(0.001~0.5)
缓冲液(mmol/L)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
微粒体(mg/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
孵育时间(min)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
内标(ng/mL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
NADPH(mmol/L)	10	10	10	10	10	10	10	10	10

表 3 人肝脏微粒体孵育体系(200 μL 体系)

试剂	体积/μL
人肝脏微粒体	40
探针底物	20
抑制剂	20
磷酸盐缓冲液	100
NADPH	20

2 结果

2.1 专属性

对 9 种代谢物进行特异性多反应监测,通过对离子源电离模式、碰撞能量等条件进行优化,表 4 描述了 9 种代谢物的质谱条件优化结果。使用高效液相色谱进行梯度洗脱,所有代谢产物在 10 min 内洗脱,并在各自的 MRM 通道中分离。9 种代谢物的 MRM 色谱图如图 1 所示。

2.2 标准曲线与检测限

9 种代谢物的标准曲线如表 5 所示,标准曲线在各代谢物的浓度范围内呈良好的线性关系(R^2 > 0.99)。检测限、定量限如表 5 所示(n=5)。

2.3 准确度、精密度考察

表 6 显示 9 种代谢物的准确度在 85%~115%范围内,满足生物样本测定要求。如表7所示,日内和日间精密度均小于 15%,表明方法满足生物样本测定要求。

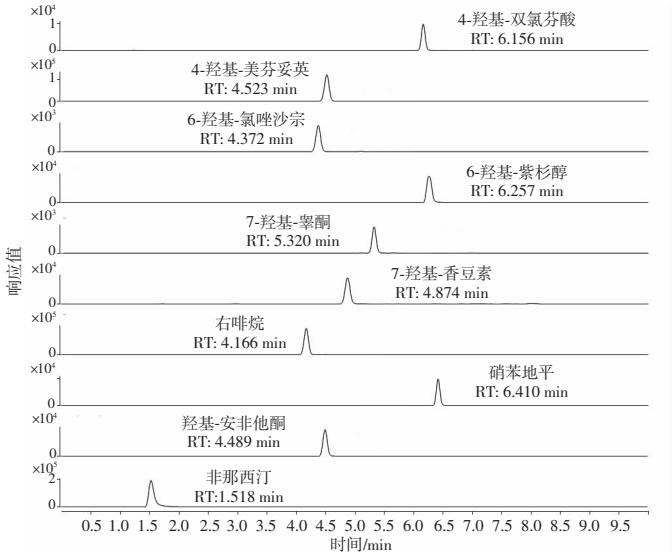


图 1 9 种代谢物及内标的多反应监测色谱分析

2.4 单探针法与鸡尾酒法测定的 IC_{50} 值比较

通过比较单探针法和鸡尾酒法得到的各 CYP 亚型的 IC_{50} 值,验证了该方法的有效性。抑制曲线如图 2 所示,单探针法与鸡尾酒法测定的 IC_{50} 值相似(表 8),且具有较强的相关性(图 3)。表明鸡尾酒法同时测定 CYP 亚型的活性是可靠的。

表 4 9 种代谢物及内标的质谱条件参数

酶	底物	代谢物	电离方式	多反应扫描监测(m/z)	保留时间/min	碰撞能量/eV
CYP1A2	非那西汀	对乙酰氨基酚	ESI+	152.1>110.1	3.2	21
CYP2A6	香豆素	7-羟基香豆素	ESI+	163.1>107.0	4.8	25
CYP2B6	安非他酮	羟基安非他酮	ESI+	256.1>238.1	4.4	5
CYP2C8	紫杉醇	6-羟基紫杉醇	ESI+	892.3>607.5	6.2	20
CYP2C9	双氯芬酸	4-羟基双氯芬酸	ESI+	312.0>266.0	6.1	13
CYP2C19	美芬妥英	4-羟基美芬妥英	ESI+	235.1>150.1	4.5	25
CYP2D6	右美沙芬	右啡烷	ESI+	258.0>157.0	4.1	37
CYP2E1	氯唑沙宗	6-羟基氯唑沙宗	ESI−	184.0>120.0	4.3	21
CYP3A	睾酮	7-羟基睾酮	ESI+	305.2>269.3	5.3	17
内标	硝苯地平		ESI+	346.9>314.9	6.4	13

表 5 9 种代谢物的标准曲线方程及相关系数($n=5$)

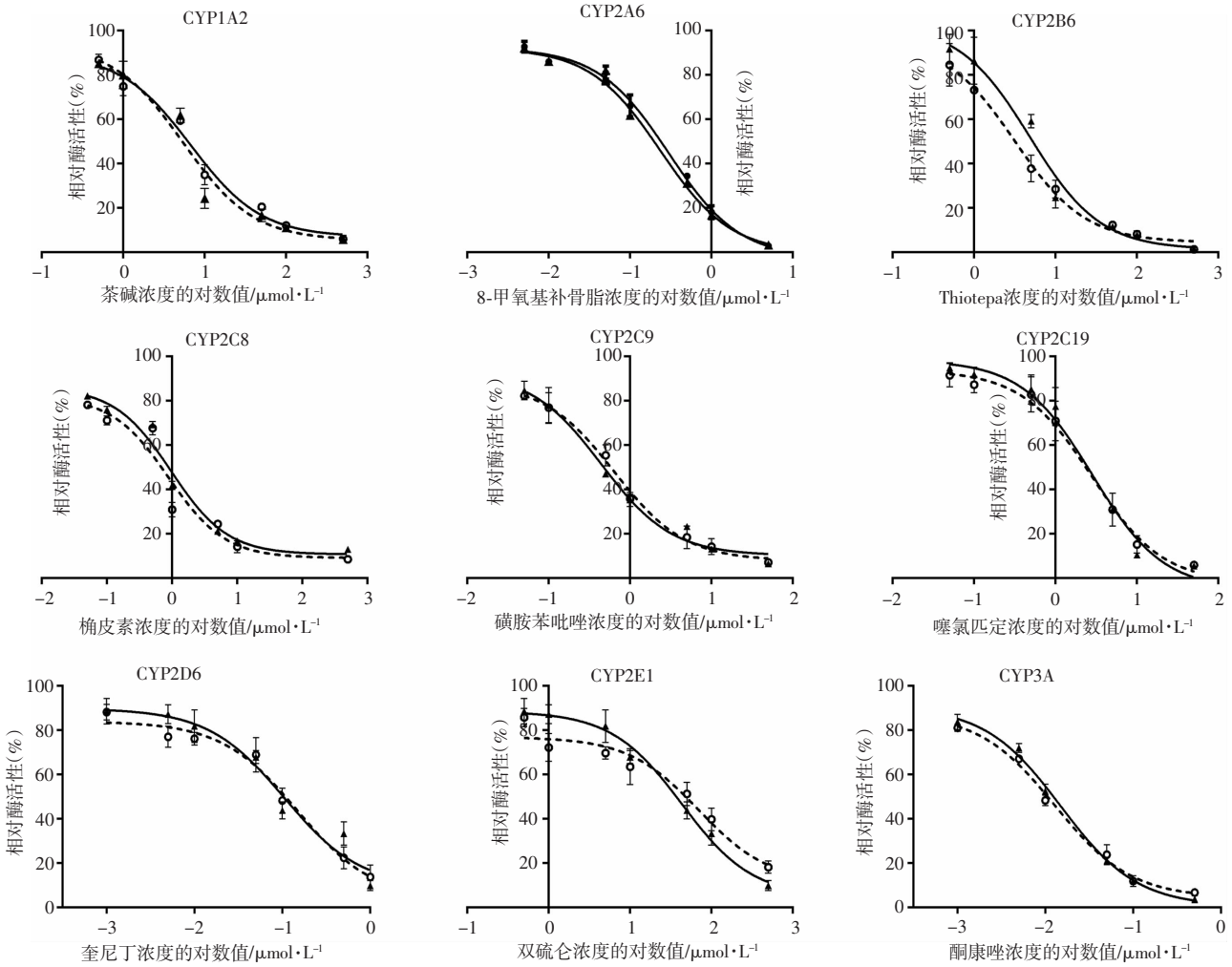
酶	代谢物	标准曲线	相关系数(R^2)	范围/μmol·L^{-1}	检测限/nmol·L^{-1}	定量限/nmol·L^{-1}
CYP1A2	对乙酰氨基酚	Y=0.985 1X+0.001 5	0.999 8	0.01~10	5	10
CYP2A6	7-羟基香豆素	Y=0.263 6X+0.000 4	0.995 7	0.01~10	2.5	10
CYP2B6	羟基安非他酮	Y=11.196 3X+0.019 4	0.998 8	0.01~10	1.5	10
CYP2C8	6-羟基紫杉醇	Y=0.034 8X+0.000 3	0.999 4	0.1~100	1	100
CYP2C9	4-羟基双氯芬酸	Y=2.174 2X+0.001 9	0.998 8	0.01~10	1	10
CYP2C19	4-羟基美芬妥英	Y=2.402 4X+0.002 4	0.999 6	0.1~100	10	100
CYP2D6	右啡烷	Y=0.007 6X+0.000 2	0.999 3	0.01~10	0.5	10
CYP2E1	6-羟基氯唑沙宗	Y=0. 508 3X+0.000 1	0.999 3	0.1~100	10	100
CYP3A	7-羟基睾酮	Y=0.119 3X+0.002 7	0.999 6	0.01~10	2	10

表 6 9 种代谢物的准确度($n=5$)

酶	代谢物	高浓度		中浓度		低浓度	
		浓度/μmol·L^{-1}	RSD	浓度/μmol·L^{-1}	RSD	浓度/μmol·L^{-1}	RSD
CYP1A2	对乙酰氨基酚	8	91.81%	0.4	110.59%	0.02	85.34%
CYP2A6	7-羟基香豆素	8	96.30%	0.4	93.34%	0.02	104.43%
CYP2B6	羟基安非他酮	8	94.35%	0.4	101.95%	0.02	98.19%
CYP2C8	6-羟基紫杉醇	80	111.30%	4	106.89%	0.2	111.34%
CYP2C9	4-羟基双氯芬酸	8	108.52%	0.4	113.45%	0.02	87.97%
CYP2C19	4-羟基美芬妥英	80	86.15%	4	106.36%	0.2	110.72%
CYP2D6	右啡烷	8	86.28%	0.4	89.07%	0.02	101.77%
CYP2E1	6-羟基氯唑沙宗	80	111.62%	4	113.89%	0.2	101.00%
CYP3A	7-羟基睾酮	8	102.43%	0.4	109.85%	0.02	88.79%

表 7 9 种代谢物的日内、日间精密度 RSD 值($n=5$)

酶	代谢物	日内精密度			日间精密度		
		低浓度	中浓度	高浓度	低浓度	中浓度	高浓度
CYP1A2	对乙酰氨基酚	7.29%	9.90%	6.05%	8.59%	9.36%	11.87%
CYP2A6	7-羟基香豆素	3.66%	10.51%	4.23%	10.38%	11.12%	9.46%
CYP2B6	羟基安非他酮	8.61%	5.94%	5.56%	8.57%	8.35%	7.99%
CYP2C8	6-羟基紫杉醇	8.33%	6.97%	2.32%	6.21%	13.98%	10.50%
CYP2C9	4-羟基双氯芬酸	11.16%	8.59%	5.04%	12.18%	10.15%	10.07%
CYP2C19	4-羟基美芬妥英	9.18%	4.93%	2.98%	13.61%	11.42%	6.19%
CYP2D6	右啡烷	7.23%	5.04%	4.70%	14.98%	6.50%	6.75%
CYP2E1	6-羟基氯唑沙宗	12.49%	10.34%	3.50%	14.27%	11.91%	8.52%
CYP3A	7-羟基睾酮	8.28%	3.87%	3.19%	12.88%	10.04%	13.19%



○代表单探针法;▲代表鸡尾酒法

图 2　通过单探针法与鸡尾酒法获得的抑制曲线

表 8　单探针法与鸡尾酒法测得的 IC_{50} 值

酶	底物	抑制剂	IC_{50}/μmol·L^{-1}		比值(鸡尾酒法/单探针法)
			单探针法	鸡尾酒法	
CYP1A2	非那西汀	茶碱	6.77	5.38	0.79
CYP2A6	香豆素	8-甲氧基补骨脂	0.24	0.30	1.25
CYP2B6	安非他酮	Thiotepa	3.15	4.83	1.53
CYP2C8	紫杉醇	槲皮素	0.97	0.88	0.91
CYP2C9	双氯芬酸	磺胺苯吡唑	0.64	0.44	0.69
CYP2C19	美芬妥英	噻氯匹定	2.80	2.84	1.01
CYP2D6	右美沙芬	奎尼丁	0.15	0.11	0.73
CYP2E1	氯唑沙宗	双硫仑	69.64	43.49	0.63
CYP3A	睾酮	酮康唑	0.01	0.01	1.25

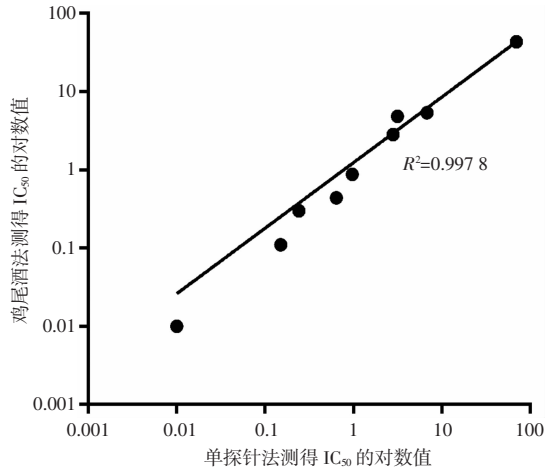


图 3 通过单探针法与鸡尾酒法测得 IC_{50} 值的相关性

3 讨论

当两种或两种以上药物同时或者先后顺序用药时会增加药物相互作用的风险。有益的药物相互作用会提高疗效,而不利的药物相互作用会增加不良反应发生的风险。临床常见的药物相互作用主要出现在药动学方面,即药物在吸收、分布、代谢和排泄方面的相互影响,代谢相互作用主要是由 CYP450 同工酶引起的,这最具有临床意义,也是重点关注的问题[1]。

细胞色素 P450(简称 CYP450)代表着一个很大的可自身氧化的亚铁血红素蛋白家族,属于单氧酶的一类,因其在 450 nm 有特异吸收峰而得名[5]。药物进入机体后主要经过肝脏中 CYP450 酶系代谢,体内大部分代谢性相互作用都是基于 CYP 机制。细胞色素 P450 在外源性化合物的生物转化中起主要作用,在肝脏中表达的主要 CYPs 有 9 种:CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A,它们负责 90%以上药物的代谢,也是导致药物相互作用的主要原因。近年来,基于细胞色素 P450 的药物相互作用被广泛研究[6-8]。因此,评估人类 CYP450 在药物开发、临床药物应用或毒理学领域的活性至关重要。

鸡尾酒法可快速检测药物对 CYP450 活性的影响[9],评估药物间是否会发生相互作用[10]。该方法允许在单个实验中快速地测量多个 CYP 亚型的活性,增加样品的吞吐量,降低药品开发成本和劳动力[11]。因此,我们建立了一种快速的 LC-MS/MS 方法,用于使用底物探针鸡尾酒同时对人肝微粒体中的 9 种主要细胞色素 P450 进行活性测定。根据文献选择 9 种 CYP 亚型相应的底物,优化了 LC-MS/MS 条件。结果显示,该鸡尾酒方法的专属性较强。

选择 6 个不同浓度的代谢物标准品溶液制作标准曲线,结果表明,产物在所选浓度范围内线性关系良好,方法学考察可行性好,准确度在 85%~115%范围内,日内、日间精密度均小于 15%,表明该 LC-MS/MS 方法满足生物样本测定要求。

IC_{50} 值为抑制剂对酶活性的半数抑制浓度,据此可初步了解药物对代谢酶是否有强抑制作用。本实验通过比较单探针法与鸡尾酒法测定的 IC_{50} 值差异,来判断该鸡尾酒方法是否真实有效[12]。由实验结果可知,单探针法与鸡尾酒法得到的 CYP450 酶抑制曲线相似,两种方法测得的 IC_{50} 值也具有相似性,与之前文献[13-14]报道的数据一致。将两种方法得到的 IC_{50} 的对数值进行线性分析,二者具有较强的相关性。结果表明在该实验系统中,在较宽的浓度范围内,可以准确地获得 IC_{50} 值,故此鸡尾酒方法可用于同时评估药物对人肝微粒体中 9 种 CYP450 酶的活性。

综上,我们建立了一种快速的 LC-MS/MS 方法,用于使用底物探针鸡尾酒同时对人肝微粒体中的 9 种主要细胞色素 P450 进行活性测定。该方法灵敏度高、专属性强、方法学考察可行性好,可节约时间、人力以及药品成本。因此,可将该方法用于评估药品对 CYP450 活性的抑制作用,以评估药物相互作用发生的可能性。

参考文献:

[1] TANNENBAUM C, SHEEHAN N L. Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2014, 7(4): 533-544. DOI: 10.1586/17512433.2014.910111.

[2] MA Y L, ZHAO F, YIN J T, *et al*. Two approaches for evaluating the effects of galangin on the activities and mRNA expression of seven CYP450[J]. Molecules, 2019, 24(6): E1171. DOI:10.3390/molecules24061171.

[3] AWORTWE C, MAKIWANE M, REUTER H, *et al*. Critical evaluation of causality assessment of herb-drug interactions in patients[J]. Br J Clin Pharmacol, 2018, 84(4): 679-693. DOI:10.1111/bcp.13490.

[4] LAME M, ABRAMOV Y, MORAIS S D. The increased emphasis of ADME properties in Hit-to-Lead drug discovery [C]. IUPHAR: Proceedings of the 15th International Congress of Pharmacology, 2006: c450.

[5] JUN X U, XIN Y W, WANG Z G. The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense [J]. J Integr Agriculture, 2015, 14(9):1673-1686.

[6] DAVIS J D, BANSAL A, HASSMAN D, *et al*. Evaluation of potential disease-mediated drug-drug interaction in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis receiving dupilumab [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 104(6): 1146-1154. DOI: 10.1002/cpt.1058.

[7] NEODO A, SCHULZ J D, HUWYLER J, *et al*. Effects of ivermectin and oxantel pamoate on tribendimidine: *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 63(1): e00762-18. DOI: 10.1128/AAC.00762-18.

[8] MAMIDI R N V S, DALLAS S, SENSENHAUSER C, *et al*. *In vitro* and physiologically-based pharmacokinetic based assessment of drug-drug interaction potential of canagliflozin [J]. Br J Clin Pharmacol, 2017, 83(5): 1082-1096. DOI: 10.1111/bcp.13186.

[9] 耿培武, 王双虎, 周云芳, 等. 鸡尾酒法评价百草枯中毒对大鼠细胞色素 P450 亚型酶活性的影响[C]. 2016 年临床药学高峰论坛暨浙江省医学会临床药学分会学术会议论文汇编, 2016.
GENG P W, WANG S H, ZHOU Y F, *et al*. Effect of acute paraquat poisoning on CYP450 isoforms activity in rats by cocktail method[C]. 2016 clinical pharmacy summit forum and Zhejiang medical association clinical pharmacy branch academic conference papers compilation, 2016.

[10] NARUSHIMA K, MAEDA H, SHIRAMOTO M, *et al*. Assessment of CYP-Mediated drug interactions for evocalcet, a new calcimimetic agent, based on *in vitro* investigations and a cocktail study in humans[J]. Clin Transl Sci, 2019, 12(1): 20-27. DOI: 10.1111/cts.12588.

[11] TURPAULT S, BRIAN W, HORN R V, *et al*. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A [J]. Br J Clin Pharmacol, 2009, 68(6): 928-935. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03548.x.

[12] SMITH D, SADAGOPAN N, ZIENTEK M, *et al*. Analytical approaches to determine cytochrome P450 inhibitory potential of new chemical entities in drug discovery[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 850(1/2): 455-463. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.12.024.

[13] LIU L Y, HAN Y L, ZHU J H, *et al*. A sensitive and high-throughput LC-MS/MS method for inhibition assay of seven major cytochrome P450s in human liver microsomes using an *in vitro* cocktail of probe substrates [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(3): 437-444. DOI: 10.1002/bmc.3294.

[14] TIONG K H, YUNUS M N A, YIAP B C, *et al*. Inhibitory potency of 8-methoxypsoralen on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) allelic variants CYP2A6 15, CYP2A6 16, CYP2A6 21 and CYP2A6 22: Differential susceptibility due to different sequence locations of the mutations[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86230. DOI: 10.1371/journal.pone.0086230.

(**收稿**:2020-08-28;**修回**:2020-10-25)

(编辑 张 维)