

微探针电喷雾串联质谱方法快速检测睾酮和右美沙芬的代谢稳定性

瞿向阳^{1,2}, 刘倩^{1,3}, 张思敏¹, 朱建雄³, 黄民¹, 毕惠嫦^{1,2*}

(1. 中山大学药学院药物代谢与药动学实验室, 广东 广州 510006; 2. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515;
3. 广东联捷生物科技有限公司, 广东 东莞 523000)

摘要: 探针电喷雾电离 (probe electrospray ionization, PESI) 技术是原位电离技术的典型代表之一, 但由于其载样稳定性差, 该技术在定量分析中的应用受到很大制约。作者前期对现有 PESI 技术的定量分析性能进行改进, 开发了新型微探针电喷雾串联质谱 (micro-pen electrospray ionization tandem mass spectrometry, μ Pen-ESI-MS/MS)。本研究旨在探索其在药物代谢稳定性及 CYP450 酶活力评价中的应用。建立检测肝微粒体孵育体系中的 CYP3A4 底物睾酮与 CYP2D6 底物右美沙芬的 μ Pen-ESI-MS/MS 检测方法, 并对分析方法的线性、精密度和准确度进行考察; 并应用该分析方法检测睾酮和右美沙芬在肝微粒体孵育体系中的代谢稳定性。结果表明, 该 μ Pen-ESI-MS/MS 方法分析效率高, 一个样品的喷雾时长约为 0.3 min。在设定的定量范围内, 睾酮和右美沙芬分析方法的标准曲线线性良好 ($R^2 > 0.99$), 睾酮的批内和批间准确度为 95.9%~109.3%, 批内和批间精密度 (RSD) 为 2.4%~13.5%。右美沙芬的批内和批间准确度为 90.5%~107.3%, 批内和批间精密度 (RSD) 为 3.4%~12.1%。睾酮和右美沙芬在肝微粒体孵育体系中快速代谢 (浓度下降一半所需时间分别为 12 和 14 min)。综上, 本研究建立了睾酮及右美沙芬的代谢稳定性评价快速灵敏的 μ Pen-ESI-MS/MS 分析方法, 为药物代谢酶 CYP3A4 和 CYP2D6 的活性检测提供了新方法和新策略。

关键词: 原位电离质谱; 探针电喷雾; 微探针电喷雾串联质谱; 药物代谢稳定性评价; CYP450 酶

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1465-06

Application of micro-pen electrospray ionization tandem mass spectrometry in rapid detection of metabolic stability of testosterone and dextromethorphan

QU Xiang-yang^{1,2}, LIU Qian^{1,3}, ZHANG Si-min¹, ZHU Jian-xiong³, HUANG Min¹, BI Hui-chang^{1,2*}

(1. Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Guangdong RangerBio Technologies Co., Ltd., Dongguan 523000, China)

Abstract: Probe electrospray ionization (PESI) is one of the typical types of ambient ionization technology, but its application in quantitative analysis is limited due to its poor sampling stability. Previously, we developed a new micro-pen electrospray ionization tandem mass spectrometry (μ Pen-ESI-MS/MS) method based on PESI. In this study, a μ Pen-ESI-MS/MS method to measure testosterone and dextromethorphan in liver microsome samples was developed and validated to further applicate in evaluating drug metabolism stability and CYP450 enzyme activity. A μ Pen-ESI-MS/MS method for detecting the CYP3A4 substrate testosterone and CYP2D6 substrate dextro-

收稿日期: 2021-11-17; 修回日期: 2022-01-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82025034, 81973392); 博士后科学基金资助项目 (2020M683141); 广东省东莞市研究生联合培养 (实践) 工作站项目 (20201900300012).

*通讯作者 Tel: 86-20-39943470, Fax: 86-20-39943000, E-mail: bihchang@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1650

methorphan in the liver microsome incubation system were developed, and the linearity, precision and accuracy of the method was validated. The validated method was further used to detect the metabolic stability of testosterone in the liver microsome incubation system. The results showed that the μ Pen-ESI-MS/MS had high efficiency with 0.3 min spraying time of each sample. The standard curve of the testosterone and dextromethorphan has good linearity ($R^2 > 0.99$), the intra- and inter-batch accuracy of testosterone and dextromethorphan was 95.9%–109.3% and 90.5%–107.3%, respectively; the intra- and inter-batch precision was acceptable with RSD values of 2.4%–13.5% and 3.4%–12.1%. The half-lives of testosterone and dextromethorphan in the liver microsome incubation system were 12 min and 14 min, respectively. This study provided a rapid and sensitive μ Pen-ESI-MS/MS method for the assay of testosterone and dextromethorphan in liver microsome samples, and provided a new strategy for the evaluation of drug metabolism stability and CYP3A4/CYP2D6 activity.

Key words: ambient ionization mass spectrometry; probe electrospray ionization; micro-pen electrospray ionization tandem mass spectrometry; drug metabolism stability evaluation; cytochrome P450

质谱 (mass spectrometry, MS) 技术由于极高的灵敏度及专属性, 已成为生物化学^[1]、药学^[2]、医学^[3]等领域的重要分析工具。由于质谱只能对离子进行分析, 因此对待测物分子进行电离是质谱分析的前提。电喷雾离子化 (electrospray ionization, ESI) 是质谱分析最常用的离子化技术之一, 可与高效液相色谱或毛细管电泳等分离手段联用。在最常用的反相色谱分离过程中只有分子型化合物能够具有较好的保留行为, 但在电喷雾过程中离子型化合物具有更高的离子化效率, 因此如何平衡好分离和离子化效率始终是一个挑战。随着质谱技术的发展, 针对于简单体系的物质分析, 直接质谱分析技术已经成为了研究的热点^[4]。

原位电离质谱 (ambient ionization mass spectrometry, AIMS) 是指在大气压条件下, 无需样品处理或仅需极少的样品前处理过程, 无需液相分离, 直接将样品中的待测物进行离子化后引入质谱进行分析的直接质谱分析技术^[5]。该技术大大提高了样品的分析速度, 使质谱的高通量分析特性得到最大程度的发挥。探针电喷雾离子化 (probe electrospray ionization, PESI) 是原位离子化的典型代表之一^[6]。然而, 现有的探针电喷雾离子化技术在应用过程中存在液体样品的载样量小, 样品易挥发; 同时由于液体表面张力不同所致的载样量差异大、稳定性差等缺点, 极大地限制了 PESI 在质谱定量分析中的应用^[7]。作者基于现有的 PESI 技术, 设计了新型电喷雾离子源-微探针电喷雾 (micro-pen electrospray ionization, μ Pen-ESI) 离子源。作者对探针表面进行激光蚀刻, 以保证探针表面具有可控的载样体积; 以毛细作用为载样原理, 在探针末端施加高电压实现电喷雾。 μ Pen-ESI 与质谱搭建, 形成 μ Pen-ESI-MS/MS 分析体系。作者前期对 μ Pen-ESI-MS/MS 的定性定量分析性能进行了系统确证, 提示该技术具有快速定量检测的优越性能。

在药物研发过程, 对药物代谢稳定性及代谢酶活性的评价是新药研发过程中的重要内容之一^[8]。可通过肝微粒体、肝脏 S9、原位肝灌注等模型来进行评价^[9,10]。细胞色素 P450 酶系 (cytochromes P450, CYP450) 是肝微粒体混合功能氧化酶系的主要成员, 在内源和外源物质的代谢中发挥重要作用, 例如 CYP3A4 (大鼠为 CYP3A1/2)、CYP2D6 (大鼠为 CYP2D2)、CYP2C9 等均为药物 I 相代谢的重要代谢酶^[9]。通过检测 CYP450 酶探针底物的代谢稳定性可间接反映代谢酶的活性。因此, 建立 CYP450 酶底物药物的快速定量检测分析方法对评价 CYP450 酶底物药物的代谢稳定性及 CYP450 酶的活性尤为重要。

因此, 本研究旨在建立和验证检测肝微粒体孵育体系中的 CYP3A4 底物睾酮与 CYP2D6 底物右美沙芬的 μ Pen-ESI-MS/MS 检测方法, 并应用于检测睾酮和右美沙芬在肝微粒体孵育体系中的代谢稳定性, 为药物代谢酶 CYP3A4 和 CYP2D6 活性评价提供新方法和新策略。

材料与方法

药品和试剂 睾酮 (纯度 $\geq 97\%$, 批号: MAYA-CR-2218, 嘉兴思诚化工有限公司); 右美沙芬 (纯度 $\geq 97\%$, 批号: 0426-RA-0012, 广州佳途科技股份有限公司); 还原型辅酶 II (纯度为 98%, 批号: A10103, 上海源叶生物科技有限公司); HPLC 级甲醇 (安徽时联特种溶剂股份有限公司); 乙二醇四乙酸 (分析纯)、磷酸氢二钾 (分析纯)、磷酸二氢钾 (分析纯)、氢氧化钠 (分析纯)、盐酸 (浓度为 36%, 分析纯)、六水合氯化镁 (分析纯), 广州化学试剂厂; BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 科技公司)。

仪器 Thermo LTQ XL 质谱仪、Type 16700 mixer 涡旋混合器、酶标仪 (美国 Thermo Fisher 科技公司);

TG16-W 高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); R200D 电子分析天平 (德国 Sartorius AG 公司); 5417-R 低温高速离心机、微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); Optimal L-100XP 超速离心机、超速离心管 (美国 Beckman Coulter 公司); 水浴锅 (力辰科技有限公司); 玻璃匀浆管 (南京建成生物工程研究所)。

实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 (220 ± 20 g, 由广东省医学实验动物中心提供), 动物生产许可证号: SCXK (粤) 2018-0002, 动物使用许可证号: SYXK (粤) 2016-0112。实验方案和伦理申请由中山大学 (东校区) 实验动物中心批准, 批准号: 东-C2020-0302XS。

μ Pen-ESI 的搭建 在长为 3.5 cm, 直径为 0.6 cm 的不锈钢针上, 采用激光蚀刻使其表面具有凹槽, 槽长约为 1.0 cm, 槽宽 0.46 mm, 以控制载样量。凹槽末端打磨成弧形, 即为微探针 (μ Pen)。直流高压施加在 μ Pen 的末端, 形成微探针电喷雾离子源 (μ Pen-ESI)。

质谱条件 由 Thermo LTQ XL 质谱仪以正离子扫描模式, 采用选择反应监测 (selected reaction monitoring, SRM) 方式进行检测, 各质谱参数信息如下: 睾酮: m/z 289 \rightarrow 97; 喷雾电压: 3.5 kV; 毛细管温度: 250 $^{\circ}$ C; 透镜电压: 250 V; 碰撞能: 28 V。右美沙芬: m/z 272 \rightarrow 215; 喷雾电压: 3.0 kV; 毛细管温度: 250 $^{\circ}$ C; 透镜电压: 127 V; 碰撞能: 25 V。

睾酮储备液与工作液的配制 取适量睾酮精密称定, 加入适量甲醇溶解, 配制成 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。用甲醇将上述储备液梯度稀释至浓度为 1.0×10^2 、 2.0×10^2 、 5.0×10^2 、 1.0×10^3 、 2.0×10^3 、 5.0×10^3 和 $1.0 \times 10^4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的睾酮标准曲线工作液, 配制成终浓度为 $1.0 \sim 1.0 \times 10^2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准曲线样本溶液。再精密量取适量上述睾酮储备液, 用甲醇梯度稀释至浓度为 7.5×10^3 、 1.5×10^3 、 3.0×10^2 和 $1.0 \times 10^2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高中低及定量下限 4 个浓度水平的睾酮质控溶液, 配制成终浓度 75、15、3.0 和 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高中低及定量下限的质控溶液。另取睾酮储备液配制成浓度为 $1 \times 10^4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液。

右美沙芬储备液与工作液的配制 取适量右美沙芬精密称定, 加入适量甲醇溶解, 配制成 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。用甲醇将上述储备液梯度稀释至浓度为 5.0 、 1.0×10^1 、 2.0×10^1 、 5.0×10^1 、 1.0×10^2 、 2.0×10^2 和 $4.0 \times 10^2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的右美沙芬标准曲线工作液, 配制成终浓度为 $5.0 \times 10^{-2} \sim 4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准曲线样本溶液。再精密量取适量上述右美沙芬储备液, 用甲醇梯度稀释至浓度为 3.0×10^2 、 7.5×10^2 、 1.5×10^3 和 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高中低及定量下限 4 个浓度水平的右美沙芬质控工作液, 配制成终浓度 3.0、0.75、0.15 和 $5.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

高、中、低及定量下限的质控溶液。另取右美沙芬储备液配制成浓度为 $4.0 \times 10^2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的反应底物工作液。

磷酸盐缓冲液的配制 称取磷酸氢二钾 21.6 g、磷酸二氢钾 3.5 g、乙二胺四乙酸 0.56 g, 置于 2 L 烧杯中, 加入 1 L 超纯水进行溶解。用盐酸或氢氧化钠调节溶液 pH 至 7.4, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

NADPH 液的配制 取适量还原型辅酶 II (NADPH) 精密称定, 用磷酸盐缓冲液配制成浓度为 $1.0 \times 10^2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NADPH 溶液用于启动反应, 现配现用。

肝微粒体孵育体系缓冲液的配制 取适量六水合氯化镁, 加入适量的磷酸盐缓冲液配制成每升含 5.0 mmol 氯化镁的肝微粒体孵育体系缓冲液, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

肝微粒体提取 大鼠断头处死后, 立即取出肝脏置于预冷的磷酸盐缓冲液中, 洗涤至无血色后按 1:4 (肝脏/磷酸盐缓冲液, g/v) 加入磷酸盐缓冲液。在冰浴条件下, 用玻璃匀浆管制成肝组织匀浆液, 3 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min。取上清, 12 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min。再将上清液转移至超速离心管中, 100 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 60 min 后, 弃上清液, 缓慢加入少量磷酸盐缓冲液洗涤沉淀, 弃洗液, 再加入适量磷酸盐缓冲液, 使肝微粒体均匀分散。BCA 蛋白定量后, 用磷酸盐缓冲液稀释成浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝微粒体溶液, 分装, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

肝微粒体孵育体系和样品前处理 取 5 μ L 肝微粒体溶液, 加入 2.5 μ L 睾酮或右美沙芬工作液, 再加入 232.5 μ L 的肝微粒体孵育体系缓冲液及 10 μ L 反应启动液置于 1.5 mL EP 管中, 混匀, 即为肝微粒体孵育体系。将 4 $^{\circ}$ C 预冷的乙酸乙酯 1 mL 加入到肝微粒体孵育体系中, 涡旋 2 min, 2 500 \times g 离心 10 min, 转移 800 μ L 上清液于另一 EP 管中, 并于真空干燥箱中挥干后, 用 200 μ L 甲醇复溶, 涡旋混合 1 min 后, 15 000 \times g 离心 5 min, 取 180 μ L 上清进样分析。

线性关系、精密度与准确度考察 按照“肝微粒体孵育体系和样品前处理”的操作过程, 使用灭活肝微粒体, 分别配制睾酮和右美沙芬的标准曲线样品和质控样品, 参照 2020 版《中国药典》四部通则中“生物样品定量分析方法验证指导原则”相关要求, 以浓度为横坐标, 物质响应值为纵坐标, 绘制标准曲线, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求线性方程。并依据线性方程分别计算 4 个浓度质控样品的实测值, 考察方法的准确度、批间精密度与批内精密度。准确度表示为: (测得值/真实值) \times 100%, 精密度为实测值的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

睾酮与右美沙芬代谢稳定性检测 分别取睾酮与右美沙芬的工作液 2.5 μL 置于 1.5 mL EP 管中, 再加入 232.5 μL 肝微粒体孵育体系缓冲液及 5 μL 肝微粒体溶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 5 min, 再加入 10 μL 反应启动液。在启动反应 5、10、15、30、45、60、90 和 120 min 后, 取各时间点的样品, 按照“肝微粒体孵育体系和样品前处理”中样品前处理过程进行处理, 进样分析。以反应时间为横坐标, 待测物浓度为纵坐标, 绘制代谢稳定性曲线图。

数据处理 使用 Xcalibur 2.2 将数据导出至 Microsoft Excel 2019 软件, 对数据进行分析与计算, 然后使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行作图。

结果

1 睾酮与右美沙芬的 $\mu\text{Pen-ESI-MS/MS}$ 质谱

在施加高电压后, $\mu\text{Pen-ESI}$ 表面凹槽内的液体在高电压驱动下, 形成稳定的电喷雾, 睾酮与右美沙芬在正离子模式下, 通过 SRM 扫描由质谱进行检测。如图 1 所示, 睾酮的准离子分子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$ m/z 289, 其生成的碎片离子为 m/z 97; 右美沙芬的准离子分子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$ m/z 272, 其生成的碎片离子为 m/z 215。睾酮和右美沙芬的样品喷雾时长小于 0.3 min。

2 线性关系

通过已建立的 $\mu\text{Pen-ESI-MS/MS}$ 方法, 在 $1.0\sim 1.0\times 10^2$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性范围内, 睾酮的线性良好 ($R^2 \geq 0.99$)。在 $5.0\times 10^{-2}\sim 4.0$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性范围内, 右美沙芬的线性良好 ($R^2 \geq 0.99$), 检测结果均满足 2020 版《中国药典》四部通则中“生物样品定量分析方法验证指导原则”中的相关规定, 具体内容见表 1。

Table 1 Linear regression equation of dextromethorphan and testosterone

| Analyte | Linear range | Weight factor | Representative standard curve | Correlation coefficient |
|------------------|---|---------------|-------------------------------|-------------------------|
| Testosterone | $1.0\sim 1.0\times 10^2$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $1/X^2$ | $Y = 124.9 \times X - 13.92$ | 0.993 5 |
| Dextromethorphan | $5.0\times 10^{-2}\sim 4.0$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $1/X^2$ | $Y = 13.88 \times X + 178.4$ | 0.994 9 |

Table 2 Intra- and inter-batch accuracy and precision of testosterone. QC: Quality control; RSD: Relative standard deviation

| QC level $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Intra-batch | | | Inter-batch | | |
|--|--|-------|------------|--|-------|------------|
| | Mean \pm SD/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/% | Accuracy/% | Mean \pm SD/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/% | Accuracy/% |
| 1.0 | 1.1 ± 0.1 | 8.7 | 109.3 | 1.1 ± 0.1 | 13.5 | 106.9 |
| 3.0 | 2.9 ± 0.2 | 7.2 | 97.2 | 3.0 ± 0.3 | 11.1 | 101.4 |
| 15 | 16 ± 0.4 | 2.4 | 107.3 | 16 ± 1.1 | 7.2 | 103.7 |
| 75 | 73 ± 5.7 | 7.9 | 96.9 | 72 ± 5.0 | 6.9 | 95.9 |

Table 3 Intra- and inter-batch accuracy and precision of dextromethorphan

| QC level $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Intra-batch | | | Inter-batch | | |
|--|--|-------|------------|--|-------|------------|
| | Mean \pm SD/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/% | Accuracy/% | Mean \pm SD/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/% | Accuracy/% |
| 5.0×10^{-2} | $5.4\times 10^{-2} \pm 1.9\times 10^{-3}$ | 3.4 | 107.3 | $4.6\times 10^{-2} \pm 5.6\times 10^{-3}$ | 12.1 | 92.5 |
| 0.15 | $0.15 \pm 1.3\times 10^{-2}$ | 8.9 | 100.5 | $0.16 \pm 1.4\times 10^{-2}$ | 8.8 | 103.4 |
| 0.75 | $0.68 \pm 5.4\times 10^{-2}$ | 8.0 | 90.5 | $0.75 \pm 6.8\times 10^{-2}$ | 9.2 | 99.5 |
| 3.0 | 3.1 ± 0.16 | 3.8 | 90.7 | 3.2 ± 0.13 | 4.1 | 92.3 |

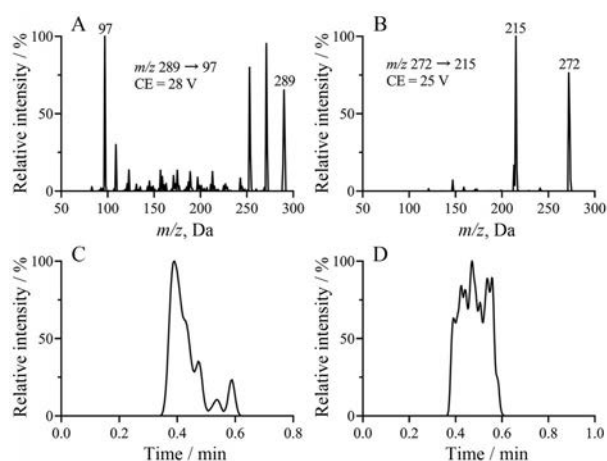


Figure 1 MS/MS product ion spectrum of testosterone (A), dextromethorphan (B) and chromatograms of testosterone (C), dextromethorphan (D)

3 精密度与准确度

睾酮的批内与批间精密度与准确度的结果如表 2 所示, 右美沙芬的批内与批间精密度与准确度的结果如表 3 所示。

结果显示在标准曲线范围内, 二者的精密度、准确度良好。均符合 2020 版《中国药典》四部通则中“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关规定。

4 睾酮与右美沙芬的代谢稳定性评价

睾酮与右美沙芬的代谢稳定性曲线如图 2 所示。结果表明, 在本研究中的条件下, 睾酮和右美沙芬迅速代谢, 其浓度下降一半的时间分别约为 12 和 14 min。

讨论

2007 年, Hiraoka 团队^[6]用实心针开发了 PESI 技

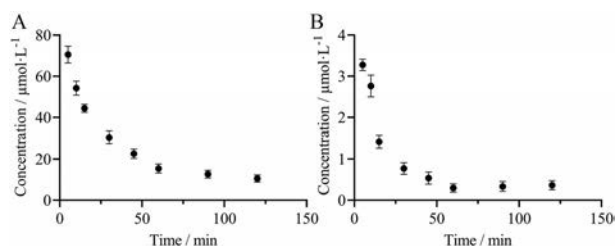


Figure 2 The concentration-time plot of testosterone (A) and dextromethorphan (B) to represent their metabolic stability

术, 该技术的主要优点包括: 无需毛细管作为液体通路, 避免了传统以毛细管为基础的电喷雾离子源和纳流喷雾离子源中常见的堵塞问题^[11]; 且具有样品量少, 对盐的耐受程度高等特点^[12], 在定性分析和半定量分析中具有巨大优势^[13,14]。然而, 由于PESI的探针为非亲水表面, 探针直径较小, 因此对液体样品的载样量少, 样品易挥干。同时, 不同待测样品由于基质差异, 其液体表面张力不同, 导致载样量偏差较大, 无法满足定量分析的要求。本课题组基于现有的PESI技术进行改进, 对探针表面进行激光蚀刻, 以保证探针表面具有可控的载样体积, 研发并验证了 μ Pen-ESI-MS/MS技术。

CYP450酶系的主要功能是进行内源性或外源性物质的生物转化(代谢), 其在药物代谢中发挥着重要作用。CYP3A4/5、CYP2D6、CYP2C9等是参与药物代谢主要的CYP450酶, 其中临床上60%以上的药物经CYP3A4代谢, 20%以上的药物经CYP2D6代谢^[15]。代谢稳定性一般用来描述化合物代谢的速度和程度, 先导化合物代谢稳定性的研究是药物研发早期的重要环节, 其代谢稳定性可用于预测化合物的体内清除率^[16]。药物研发过程中, 通常使用肝微粒体代谢清除速率体外模型检测先导化合物在肝微粒体孵育下的清除速率, 从而预测体内清除速率^[17]。代谢稳定性是影响小分子生物利用度的重要因素, 也是影响药代动力学性质的主要因素之一。统计数据表明, 40%研发失败的新药是由于化合物的药代动力学性质不佳所致^[18]。为了降低新药研发的失败率, 提升研发效率, 在药物研发早期阶段, 快速灵敏的分析方法是快速评价先导化合物成药性的关键。

前期作者对 μ Pen-ESI-MS/MS的定性与定量的分析性能进行了系统考察, 提示该技术可用于快速定量检测分析。本研究通过 μ Pen-ESI-MS/MS分析技术, 对SD大鼠肝微粒体中的CYP3A1/2(人CYP3A4)经典底物睾酮和CYP2D2(人CYP2D6)底物右美沙芬的浓度及代谢稳定性进行检测^[19], 用以评价 μ Pen-ESI-MS/MS技术在药物代谢稳定性及代谢酶活性评价的适用性。结果显示, μ Pen-ESI-MS/MS对肝微粒体溶液

中的睾酮和右美沙芬的分析速度快, 线性、准确度与精密度结果均符合2020版《中国药典》“生物样品定量分析方法验证指导原则”的相关要求。睾酮与右美沙芬的代谢稳定性评价结果显示, 二者的衰减趋势是典型的酶促反应。因此, μ Pen-ESI-MS/MS技术可为药物筛选阶段稳定性的检测提供了新方法和新策略。

作者贡献: 瞿向阳负责实验部分设计、实验实施、结果分析与统计、撰写论文; 张思敏负责部分实验的实施; 刘倩负责部分实验的设计与指导; 朱建雄、黄民和毕惠娟负责研究思路的提出、实验设计以及修订论文。

利益冲突: 本文所有作者之间不存在利益冲突。

References

- [1] Noor Z, Ahn SB, Baker MS, et al. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics—a review [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: 1620-1638.
- [2] Goodwin RJA, Takats Z, Bunch J. A critical and concise review of mass spectrometry applied to imaging in drug discovery [J]. *Slas Discov*, 2020, 25: 963-976.
- [3] Zhang X, Li Q, Xu Z, et al. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review [J]. *RSC Adv*, 2020, 10: 3092-3104.
- [4] Gachumi G, Purves RW, Hopf C, et al. Fast quantification without conventional chromatography, the growing power of mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 8628-8637.
- [5] Feider CL, Krieger A, DeHoog RJ, et al. Ambient ionization mass spectrometry: recent developments and applications [J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 4266-4290.
- [6] Hiraoka K, Nishidate K, Mori K, et al. Development of probe electrospray using a solid needle [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 3139-3144.
- [7] Yoshimura K, Chen LC, Asakawa D, et al. Physical properties of the probe electrospray ionization (PESI) needle applied to the biological samples [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44: 978-985.
- [8] Thompson TN. Early adme in support of drug discovery: the role of metabolic stability studies [J]. *Curr Drug Metab*, 2000, 1: 215-241.
- [9] Asha S, Vidyavathi M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs – a review [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2010, 160: 1699-1722.
- [10] Ackley DC, Rockich KT, Baker TR. Metabolic stability assessed by liver microsomes and hepatocytes [M] // Yan Z, Caldwell GW, Eds. *Optimization in Drug Discovery: in vitro Methods*. Totowa: Humana Press, 2004: 151-162.
- [11] Kuo CP, Shiea J. Application of direct electrospray probe to analyze biological compounds and to couple to solid-phase microextraction to detect trace surfactants in aqueous solution [J]. *Anal Chem*, 1999, 71: 4413-4417.

- [12] Mandal MK, Chen LC, Hashimoto Y, et al. Detection of biomolecules from solutions with high concentration of salts using probe electrospray and nano-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2010, 2: 1905-1912.
- [13] Mandal MK, Yoshimura K, Saha S, et al. Biomolecular analysis and biological tissue diagnostics by electrospray ionization with a metal wire inserted gel-loading tip [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 987-992.
- [14] Mandal MK, Saha S, Yoshimura K, et al. Biomolecular analysis and cancer diagnostics by negative mode probe electrospray ionization [J]. *Analyst*, 2013, 138: 1682-1688.
- [15] Danielson PB. The cytochrome p450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans [J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3: 561-597.
- [16] Wang J, Liu H. Lead compound optimization strategy (1) — changing metabolic pathways and optimizing metabolism stability [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1521-1531.
- [17] Clarke SE, Jeffrey P. Utility of metabolic stability screening: comparison of *in vitro* and *in vivo* clearance [J]. *Xenobiotica*, 2001, 31: 591-598.
- [18] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 711-715.
- [19] Shang F, Feng S, Chen Q, et al. *In vitro* inhibitory effects of jiawei foshou san capsule on activity of cytochrome p450 enzymes in rat and human liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 926-930.