



## Simultaneous Determination of Five Rat CYP450 Probe Drugs by UPLC-MS/MS Method

Yan-Li WEI<sup>1</sup>, Hong-Jian DU<sup>1</sup>, Yi-Ping LIN<sup>1</sup>, Mei-Ling WU<sup>1</sup>,  
Xiao-Qian YING<sup>1</sup>, Ming-Xing DING<sup>1</sup> & Huan-jie HUANG<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, Zhejiang, PR China

<sup>2</sup> The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, PR China

**SUMMARY.** A rapid and sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of phenacetin (CYP1A2), bupropion (CYP2B6), losartan (CYP2C9), metoprolol (CYP2D6) and midazolam (CYP3A4) in rat plasma was developed and validated. After precipitating plasma protein with acetonitrile, the probe drugs and the internal standard (diazepam) were separated on an Acquity UPLC BEH C18 chromatography column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) using gradient elution with a mobile phase of acetonitrile and 0.1% formic acid in water at a flow rate of 0.4 mL/min. The detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring (MRM) mode to monitor the precursor-to-product ion transitions of  $m/z$  180.0→109.9 for phenacetin,  $m/z$  240.0→184.1 for bupropion,  $m/z$  423.1→207.2 for losartan,  $m/z$  268.1→115.8 for metoprolol,  $m/z$  326.0→290.9 for midazolam and  $m/z$  285.1→93.0 for diazepam (IS) using a positive electrospray ionization interface. The method was validated over a concentration range of 1.0-200 ng/mL for each probe drug. Total time for each chromatograph was 2.0 min. The intra- and inter-day precision and accuracy of the quality control samples at low, medium, and high concentration levels exhibited relative standard deviations (RSD) < 13.6% and the accuracy values ranged from -12.8% to 14.3%. The method was also successfully applied to the pharmacokinetic study of the five CYP probe drugs in rats.

**RESUMEN.** Un método de cromatografía ultra líquida en tándem con espectrometría de masas rápido y sensible (UPLC-MS/MS) para la determinación simultánea de fenacetina (CYP1A2), bupropión (CYP2B6), losartán (CYP2C9), metoprolol (CYP2D6) y midazolam (CYP3A4), fue desarrollado y validado en plasma de rata. Después de la precipitación de las proteínas plasmáticas con acetonitrilo, los medicamentos y el patrón interno (diazepam) se separaron en una columna de cromatografía Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm) usando gradiente de elución con una fase móvil de acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico en agua a una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. La detección se realizó en un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo mediante el modo de control de reacción múltiple (MRM) para monitorizar las transiciones de iones precursor a producto de  $m/z$  180,0→109,9 para fenacetina,  $m/z$  240,0→184,1 para el bupropión,  $m/z$  423,1→207,2 para losartan,  $m/z$  268,1→115,8 para metoprolol,  $m/z$  326,0→290,9 para midazolam y  $m/z$  285,1→93,0 para diazepam (IS), utilizando una interfaz de ionización por electrospray positivo. El método fue validado en un intervalo de concentración de 1,0 a 200 ng/mL para cada fármaco sonda. El tiempo total para cada corrida cromatográfica fue de 2,0 min. La precisión intra- e inter-día y la precisión de las muestras de control de calidad a bajo, medio y altos niveles de concentración exhibieron desviaciones estándar relativas (RSD) < 13,6% y los valores de precisión oscilaron entre -12,8 y 14,3%. El método también se aplicó con éxito para el estudio farmacocinético de las cinco drogas de sonda CYP en ratas.

**KEY WORDS:** cocktail, CYP, plasma, resveratrol, UPLC-MS/MS.

\* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: wfyhuanghj@163.com