

UPLC-MS/MS 方法研究次乌头碱在大鼠肝微粒体 CYP450 中的体外代谢产物及代谢酶亚型

毕云枫^{1,2}, 李 雪², 皮子凤², 宋凤瑞², 刘志强²

(1. 吉林农业大学, 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022)

摘要: 次乌头碱是一种二萜类双酯型乌头碱类化合物, 广泛存在于乌头属植物中。本工作利用超高效液相色谱-串联质谱联用 (UPLC-MS/MS) 及高分辨质谱 (HRMS) 法分析确定了次乌头碱在大鼠肝微粒体 CYP450 中的代谢产物, 分别选取磺胺苯吡唑、 α -萘黄酮、奎那定、酮康唑、二乙基二硫代氨基甲酸铵作为 CYP2C、CYP1A2、CYP2D、CYP3A、CYP2E1 的特异性抑制剂, 确定了各产物的 CYP450 酶的代谢亚型。结果表明: 次乌头碱在大鼠肝微粒体中的主要代谢产物有 7 种, 分别为 15-脱氢次乌头碱、8-O-脱乙酰基-次乌头碱、2-羟基-次乌头碱、中乌头碱、1-去甲基-次乌头碱、18-去甲基-次乌头碱和羟基-8-O-脱乙酰基-次乌头碱; CYP3A 为次乌头碱的主要代谢酶, CYP2C、CYP1A2、CYP2D 和 CYP2E1 也参与了次乌头碱的代谢。

关键词: 次乌头碱; 细胞色素 P450; 代谢; UPLC-MS/MS; 特异性抑制剂探针

中图分类号: O 657. 63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2013)06-0330-08

doi: 10. 7538/zpxb. 2013. 34. 06. 0330

Analysis of Hypaconitine's Metabolites and Related Metabolic CYP Isoforms in Rat Liver Microsomal by UPLC-MS/MS

BI Yun-feng^{1,2}, LI Xue², PI Zi-feng², SONG Feng-rui², LIU Zhi-qiang²

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute
of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China)

Abstract: Hypaconitine (HA) is a diester-diterpene type aconitum alkaloid, a potential toxicity alkaloid extracted from *Aconitum longtounense* T. In this study, the hypaconitine's metabolites in rat liver microsomes were determined by UPLC-MS/MS and a high resolution mass spectrogram (HRMS) method. Sulfaphenazole, α -naphthoflavone, quinidine, ketoconazole, ammonium diethyldithiocarbamate were applied as specific inhibitors for CYP3A, CYP1A2, CYP2D6, CYP3A and CYP2E1 in rat liver microsomes. The results show that seven metabolites of hypaconitine were found and characterized in rat liver microsomal incu-

收稿日期: 2013-06-06; 修回日期: 2013-07-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81073040, 81274046); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2011CB505300, 2011CB505) 项目资助

作者简介: 毕云枫 (1976~), 男 (汉族), 吉林白城人, 博士, 酶分子生物学专业。E-mail: yunfeng5609@sohu.com

通信作者: 宋凤瑞 (1962~), 女 (汉族), 山东烟台人, 研究员, 从事天然产物质谱及代谢研究。E-mail: songfr@ciac.jl.cn

bations. These metabolites were deduced as 15-dehydrate-HA, 8-O-deacetyl-HA, 2-hydroxyl-HA, mesaconitine, 1-O-demethyl-HA, 18-O-demethyl-HA, hydroxyl-8-deacetyl-HA, respectively. Hypaconitine was mainly metabolized by CYP3A. CYP2C, CYP1A2, CYP2D and CYP2E1 were important CYP isoforms responsible for the metabolism reaction of hypaconitine.

Key words: hypaconitine; cytochrome P450; metabolism; UPLC-MS/MS; specific inhibitor probe

川乌作为重要的乌头属植物,临床上常用于祛寒、减轻风湿疼痛、治疗神经紊乱、改善心血管功能^[1-2]。川乌中 C19 的二萜类双酯型生物碱(包括乌头碱、次乌头碱、中乌头碱^[3])是其主要毒性成分,同时具有一定的生物活性。为了达到减毒增效的目的,中医在临床上将川乌或其他乌头属植物与甘草等中药同用^[4-6]。次乌头碱(hypaconitine, HA)结构与乌头碱相似,但其毒性低于乌头碱,强心功能强于乌头碱^[7],由于其稳定性较高,在川乌或其他乌头属植物的炮制品中含量较高。次乌头碱的化学结构示于图 1,小鼠口服给药的 LD₅₀ 是 0.15 mg/kg^[8]。

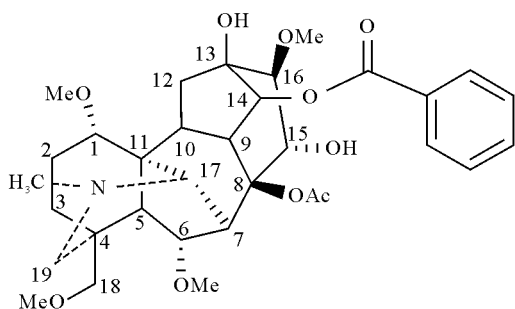


图 1 次乌头碱的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of hypaconitine (C₃₃H₄₅NO₁₀)

细胞色素 P450 (CYP450) 是一种膜结合蛋白,也是作为主要药物代谢酶^[9]的一大类同工酶,人体内几乎 75% 的药物由其代谢^[10]。CYP450 的底物包括代谢中间产物,如脂质、类固醇、激素以及外源性物质,CYP450 对药物的代谢显示出底物选择性,虽然这种选择性有时重叠^[11],但根据这种选择性可以利用 CYP450 亚型酶的特异性抑制剂探针来确定药物的代谢途径。早期药-药相互作用的确定是药物研发的一个重要部分,体内实验无法确定的药物相互作用和药物代谢途径可以通过体外研究来完成。由

于许多的药-药相互作用是在 CYP450 的催化作用下,药物诱导或抑制 CYP450 使其他药物的代谢增强或减弱所导致的,所以了解药物在 CYP450 中的代谢,并确定其代谢的亚型酶非常重要。次乌头碱在人肝微粒体中的代谢已有报道^[12],但未见在鼠肝微粒体中的报道。本工作对次乌头碱在大鼠肝微粒体 CYP450 中的孵育产物,采用 UPLC-MS/MS 法进行分离分析,通过分离的次乌头碱代谢产物的串联质谱信息确定其结构,并用特异性抑制剂探针确定其可能的代谢途径。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠(体重(200±20) g,合格证号:(吉)2008-0005,由吉林大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器 Xevo-TQ 三重四极杆质谱仪:美国 Waters 公司产品,配备 Acquity UPLC 系统, Waters Masslynx V4.1 数据工作站;Synapt G2 高分辨质谱仪:美国 Waters 公司产品,配备 Acquity UPLC 系统;Sanorius BSI10S 分析天平:北京赛多利斯有限公司产品;Optima L-100XP 制备型超速离心机:美国贝克曼库尔特有限公司产品;DY89-II 型电动玻璃匀浆机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;Eppendorf 5810R 台式高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;MDF-382E 型超低温冰箱:日本 SANYO 公司产品。

1.1.3 试剂与药材 磺胺苯吡唑、 α -萘黄酮、二乙基二硫代氨基甲酸铵、葡萄糖-6-磷酸、葡糖-6-磷酸脱氢酶、 β -NADP:美国 Sigma 公司产品;奎那定、酮康唑:日本 TCI 公司产品;甲醇、乙腈(色谱纯):美国 Fisher 公司产品;水为二次去离子水;次乌头碱和利血平对照品:由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 实验过程

1.2.1 肝微粒体制备 清洁级雄性 SD 大鼠, 保持 12 h 明暗交替, 在实验环境下适应 5 天以上。实验前动物禁食 24 h, 将所用器具、试剂置于 4 °C 预冷。动物脱臼处死, 迅速剪开心脏, 用注射器以 4 °C 生理盐水由门静脉灌注, 灌注至肝脏呈土黄色。将肝脏剪碎, 按体积比 1 : 4 加入 TMS 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L MgCl₂, 200 mmol/L 蔗糖, pH 7.5), 冰浴中匀浆。匀浆后超声分散 30 s, 于 4 °C 下 20 000 g 离心 20 min, 上清液用 4 层纱布过滤除去漂浮脂类物, 滤液于 4 °C 下 105 000 g 离心 60 min, 弃去上清液, 沉淀部分即微粒体。按初始匀浆时每克肝组织加入 1 mL 含有 20% 甘油的 Tris-HCl 储存液 (pH 7.5), 重悬微粒体, 冰浴, 玻璃匀浆管手动研磨, 使微粒体均匀分散, 分装微粒体于 -80 °C 保存。以小牛血清白蛋白为标准品, 采用 Lowry 法测定微粒体蛋白含量^[13]。

1.2.2 微粒体孵育反应体系 200 μL 酶反应体系^[14], 由 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 包括 0.5 g/L 微粒体蛋白), NADPH 生产系统 (10 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸, 1 U/mL 葡糖-6-磷酸脱氢酶, 1 mmol/L NADP⁺, 4 mmol/L 氯化镁) 及终浓度 100 μmol/L 的次乌头碱组成, 于 37 °C 预孵 2 min, 加入 NADP⁺ 起始反应。37 °C 孵育反应 90 min 后加入 200 μL 冰乙醇溶液终止反应, 然后将 12 000 g 孵育混合物离心 30 min。取上清液用于 UPLC-MS/MS 分析, 每组平行 3 次。

1.2.3 确定代谢酶亚型的特异性抑制剂探针方法 利用 CYP450 酶亚型的特异性抑制剂, 确定次乌头碱的 CYP450 代谢酶亚型^[15]。具体实验条件如下: 200 μL 酶反应体系, 由 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4, 包括 0.5 g/L 微粒体蛋白), NADPH 生产系统 (3.3 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸, 0.4 U/mL 葡糖-6-磷酸脱氢酶, 1.3 mmol/L NADP⁺, 3.3 mmol/L 氯化镁) 及分别加入以下不同的特异性抑制剂的 25 μmol/L 磺胺苯吡唑 (CYP2C)、25 μmol/L α-萘黄酮 (CYP1A2)、20 μmol/L 奎那定 (CYP2D)、10 μmol/L 酮康唑 (CYP3A)、50 μmol/L 二乙基二硫代氨基甲酸铵 (CYP2E1)。于 37 °C 预孵 5 min, 然后加入次乌头碱; 于 37 °C 孵育 90 min 后, 加入 200 μL 含 0.02 g/L 利血平为内标的冰

乙醇溶液终止反应。样品处理同方法 1.2.2。每组样品平行 3 次。

1.2.4 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析条件 色谱条件: UPLC BEH RP C18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 5 mmol/L 碳酸氢铵水溶液, 用氨水调 pH 至 10.5; 洗脱条件为 0~5 min, 35%~43% A; 5~10 min, 43%~45% A; 10~15 min, 45%~50% A; 15~35 min, 50%~65% A; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 28 °C。

质谱条件: 电喷雾离子源; 正离子模式; 毛细管电压 2.5 kV; 离子源温度 350 °C; 脱溶剂气体 (N₂) 流速 800 L/h; 锥孔气 (N₂) 流速 30 L/h; 碰撞气 (Ar) 流速 0.06 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 次乌头碱代谢产物的确定

利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析次乌头碱在 CYP450 孵育体系中的代谢产物, 与空白灭活的 CYP450 反应体系比较共有 7 个新增产物峰, 其质谱全扫描总离子流图及选择离子流图示于图 2。次乌头碱及各代谢产物对应的高分辨串联质谱数据列于表 1。次乌头碱的保留时间为 28.89 min。准分子离子 [M+H]⁺ 为 m/z 616.390 6, 其 MS² 中碎裂离子为 m/z 584.357 4、556.375 6、524.319 1, 示于图 3, 它们是次乌头碱分别脱去甲氧基 (-CH₃OH), 羧甲基 (-CH₃COOH), 以及同时脱去甲氧基和羧甲基而得到的碎片离子, 这与文献^[12,16]的报道一致。

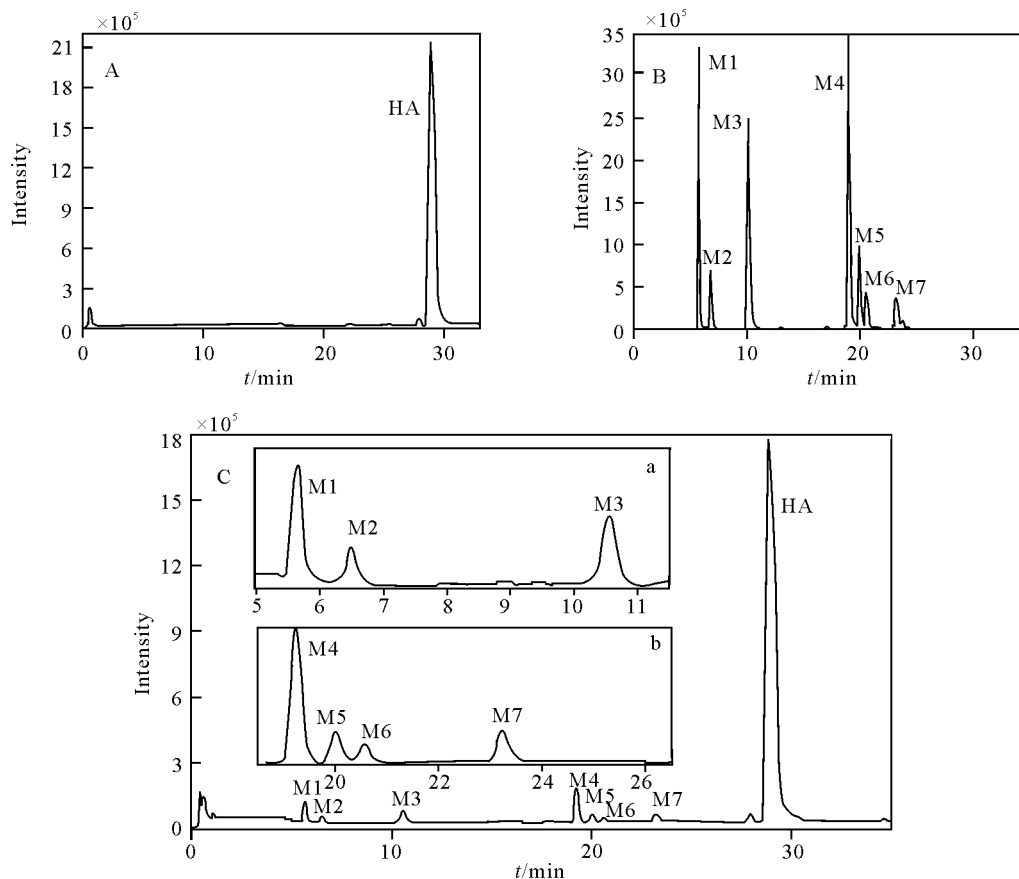
次乌头碱在大鼠肝微粒体中代谢产物的质谱碎裂离子示于图 4。

代谢产物 M2 的保留时间为 6.46 min。准分子离子 [M+H]⁺ 为 m/z 614.379 8, 比次乌头碱的准分子离子低 2 u, 所以推测 M2 为次乌头碱的脱氢代谢产物。M2 的 [M+H]⁺ 离子在 MS² 中的主要碎片离子为 m/z 582、554、522, 比对应的次乌头碱的 MS² 碎片离子 (m/z 584、556、524) 低 2 u, 进一步说明 M2 应该为次乌头碱的脱氢代谢产物。而此乌头碱分子中只有 15 位 C 原子上有 1 个羟基, 所以 M2 为 15-脱氢次乌头碱。

代谢产物 M3 的保留时间为 10.54 min。准分子离子 [M+H]⁺ 为 m/z 574.370 1, 比原型药

物次乌头碱低了 42 u, 推测 M3 为次乌头碱的脱乙酰基(-COCH₃)代谢产物。M3 的[M+H]⁺ 在 MS² 中的碎片离子为 *m/z* 542, 比次乌头碱

的[M+H]⁺ 离子在 MS² 中对应的碎片离子 *m/z* 584 低 42 u, 结合文献^[17] 中乌头碱的代谢过程, 确定 M3 为 8-O-脱乙酰基-次乌头碱。



注: A. 次乌头碱在空白灭活的大鼠肝微粒体中孵育体系的质谱总离子流图;

B. 次乌头碱代谢产物在大鼠肝微粒体中孵育反应的选择离子流图;

C. 次乌头碱在大鼠肝微粒体中孵育反应的总离子流图, a、b 为对应的放大部分

图 2 次乌头碱代谢产物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of hyaconitine and its metabolites

表 1 次乌头碱在大鼠肝微粒体中代谢产物的 UPLC-MS/MS 数据

Table 1 UPLC-MS/MS data of hyaconitine and its metabolites after incubation with rat liver microsomes and NADPH

代谢物	<i>t</i> /min	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	分子式	MS ² 主要碎片离子	Identification
HA	28.89	616.390 6	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	584, 556, 524	Hyaconitine
M1	5.65	590.367 7	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	572, 558, 540	2-Hydroxyl-8-deacetyl-HA
M2	6.46	614.379 8	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₀	582, 554, 522	15-Dehydrate-HA
M3	10.54	574.370 1	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	556, 542	8-O-Deacetyl-HA
M4	19.24	632.397 1	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	572, 540	2-Hydroxyl-HA
M5	19.99	602.373 0	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₀	570, 556, 542	1-O-Demethyl-HA
M6	20.54	632.397 1	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	572, 540	Mesaconitine
M7	23.23	602.405 3	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₀	570, 556, 542	18-O-Demethyl-HA

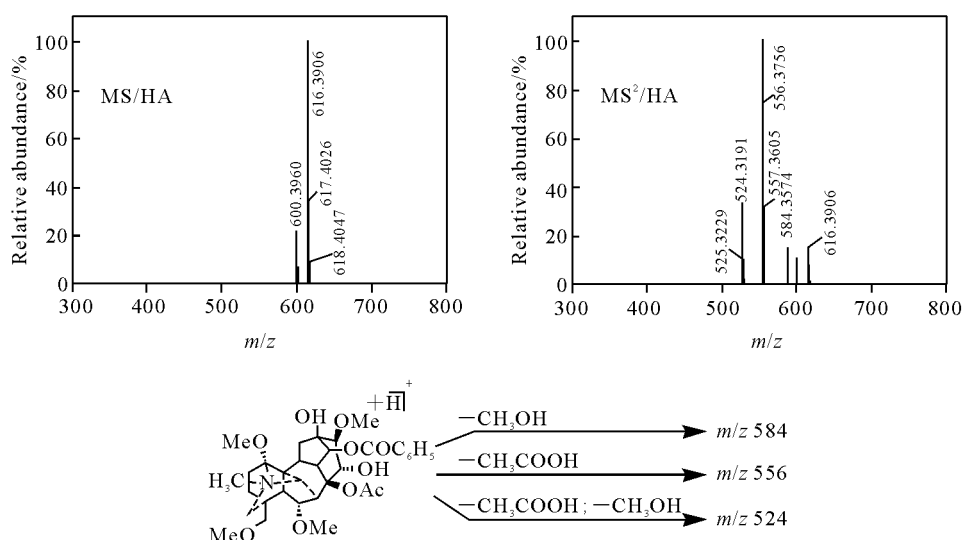


图 3 次乌头碱的高分辨质谱图及其可能的碎裂途径

Fig. 3 HRMS spectra of $[M+H]^+$ ion at m/z 616 of hyaconitine and its fragmentation pathways proposed

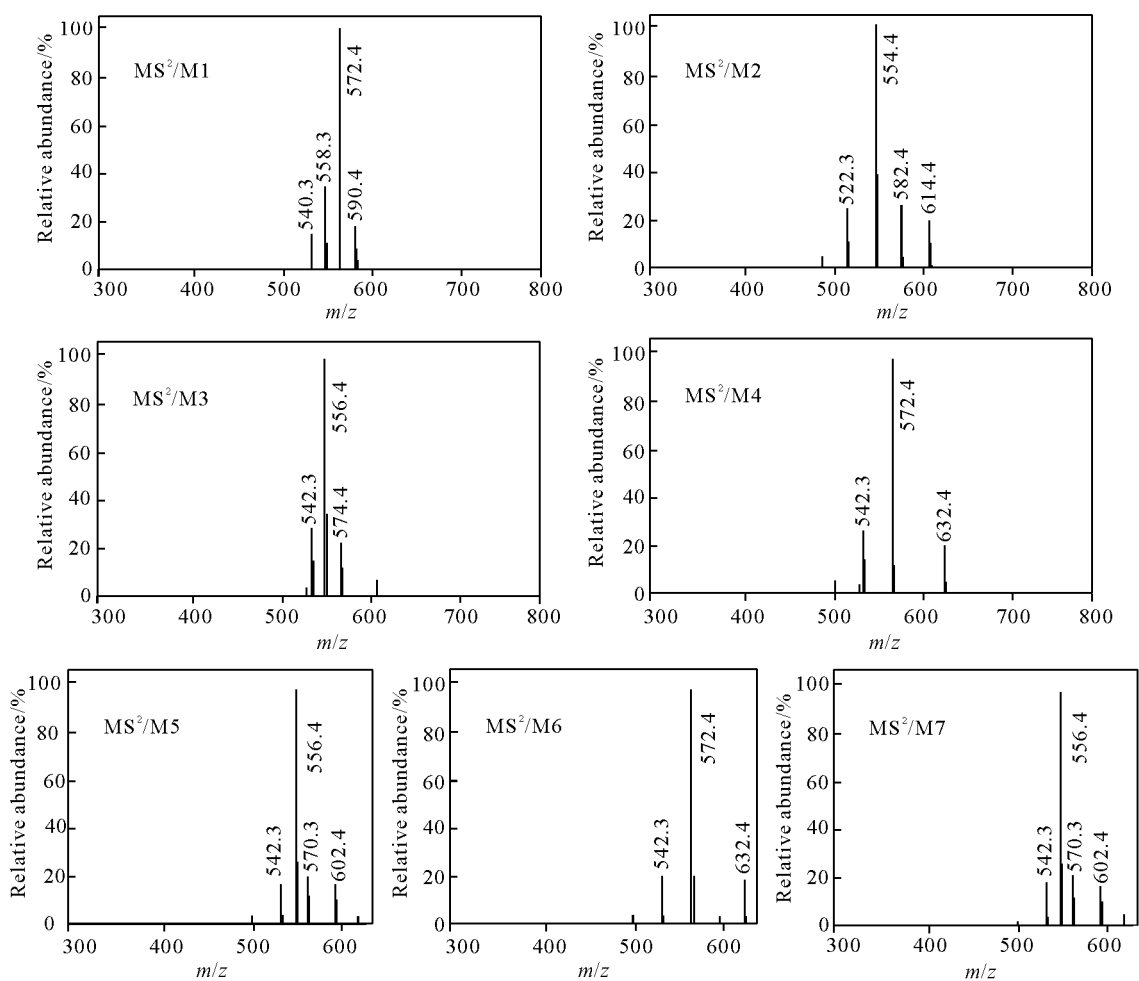


图 4 次乌头碱在大鼠肝微粒体中代谢产物的 ESI-MS² 谱图

Fig. 4 MS² spectra of the metabolites of hyaconitine after incubation with rat liver microsomes

代谢产物 M4 和 M6 的保留时间分别为 19.24 和 20.55 min。准分子离子 $[M+H]^+$ 均为 m/z 632, 比原型药物次乌头碱的 $[M+H]^+$ 离子大 16 u, 推测二者为次乌头碱的羟基化 (+OH) 代谢产物。M4 和 M6 的 MS^2 碎裂离子均为 m/z 572 和 540, 结合文献^[12]中次乌头碱的代谢过程, 确定 M4 为 2-羟基-次乌头碱, M6 为中乌头碱。

代谢产物 M5 和 M7 的保留时间分别为 19.99 和 23.23 min。准分子离子 $[M+H]^+$ 均为 m/z 602, 比原型药物次乌头碱的 $[M+H]^+$ 离子小 14 u, 推测二者为次乌头碱的去甲基化代谢产物。M5 和 M7 的 $[M+H]^+$ 离子在 MS^2 中的碎片离子均为 m/z 570 和 542, 结合文献^[12,19], 确定 M5 为 1-去甲基-次乌头碱, M7 为 18-去甲基-次乌头碱。

代谢产物 M1 的保留时间为 5.65 min。准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 590.367 7, 比原型药物次乌头碱的 $[M+H]^+$ 离子低 26 u, 推测为次乌头碱羟基化 (m/z 616 \rightarrow 632) 后的脱乙酰基产物 (m/z 632 \rightarrow 590)。M1 与 M4 和 M6 在 MS^2 中具有相同的碎片离子 m/z 572 和 540, 进一步说明 M1 为 M4 或 M6 的进一步代谢产物。经离子选择质量数为 590 的色谱峰只有 1 个峰, 所以推断 M1 为 2-羟基-8-O-脱乙酰基-次乌头碱, 或为 3-羟基-8-O-脱乙酰基-次乌头碱。

2.2 特异性抑制剂探针方法确定次乌头碱的 CYPs 代谢酶亚型

为了确定次乌头碱的 CYPs 代谢酶亚型, 利用 CYP450 酶的特异性抑制剂及 UPLC-MS/MS 方法, 在某一亚型 CYP450 酶的特异性抑制剂作用下, 次乌头碱的代谢产物产生率减少或未见该产物产生, 表明此亚型的 CYP450 酶催化此产物的生成。加入特异性抑制剂后的产物与未加抑制剂组的产物相比, 如果 $p < 0.05$, 则认为差异显著(数据未列出), 即为 CYP450 代谢亚型酶。结果表明, 所有代谢产物均可由 CYP3A 代谢, 此外, 各代谢产物还可通过 CYP2C、CYP2D、CYP2E1 和 CYP1A2 所代谢。加入 CYP1A2 的特异性抑制剂 α -萘黄酮前后代谢产物的总离子流图示于图 5, 从图中可以看出, 代谢产物 M4 的峰面积比未加 α -萘黄酮前降低非常明显, 说明产物 M4 可以被 CYP1A2 所代谢, 而其它产物峰则没有明显变化。次乌头碱在 CYP450 中的

代谢产物结构及其代谢途径示于图 6。

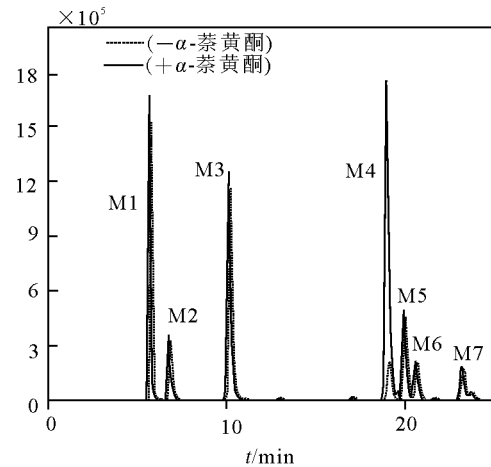


图 5 CYP1A2 的特异性抑制剂 α -萘黄酮对代谢产物代谢速率影响的总离子流图

Fig 5 Effects of CYP1A2 inhibitor on the formation rate of hyaconitine metabolites in the CYP450

3 结论

超高效液相色谱-串联质谱联用法 (UPLC-MS/MS) 由于具有高灵敏度、高选择性等特点, 在药物分析等领域得到了广泛应用^[18-19]。本工作利用 UPLC-MS/MS 及高分辨质谱 (HRMS) 分析方法确定了次乌头碱在大鼠肝微粒体 CYP450 中的 7 种体外代谢产物及其代谢酶亚型。其中, M1 为羟基-8-O-脱乙酰基-次乌头碱; M2 为 15-脱氢次乌头碱; M3 为 8-O-脱乙酰基-次乌头碱; M4 为 2-羟基-次乌头碱; M5 为 1-去甲基-次乌头碱; M6 为中乌头碱; M7 为 18-去甲基-次乌头碱。乌头类生物碱的毒性主要由于 C8 位的乙酰基, C1、C6、C16 和 C18 位的甲氧基^[20], M3 和 M1 的 C8 位水解脱乙酰基, 使其比原型药物次乌头碱的毒性大大降低。M5 和 M7 也脱去了对应的造成毒性的官能团。因此次乌头碱在大鼠微粒体中的代谢可起到降低毒性, 得到低毒性化合物的作用。研究结果还表明, 次乌头碱在肝脏中通过 CYP450 酶的作用, 发生去甲基化、羟基化和脱乙酰化等作用, 产生极性较原型药物有很大提高的产物。因此次乌头碱经肝脏微粒体代谢后, 可起到减毒、增效、增大药物极性的作用。此外, 利用特异性抑制剂探针方法确定了次乌头碱的代谢酶亚型, 为进一步研究含有次乌头碱的药物与其他药物联合用药时的药物相互作用提供了依据。

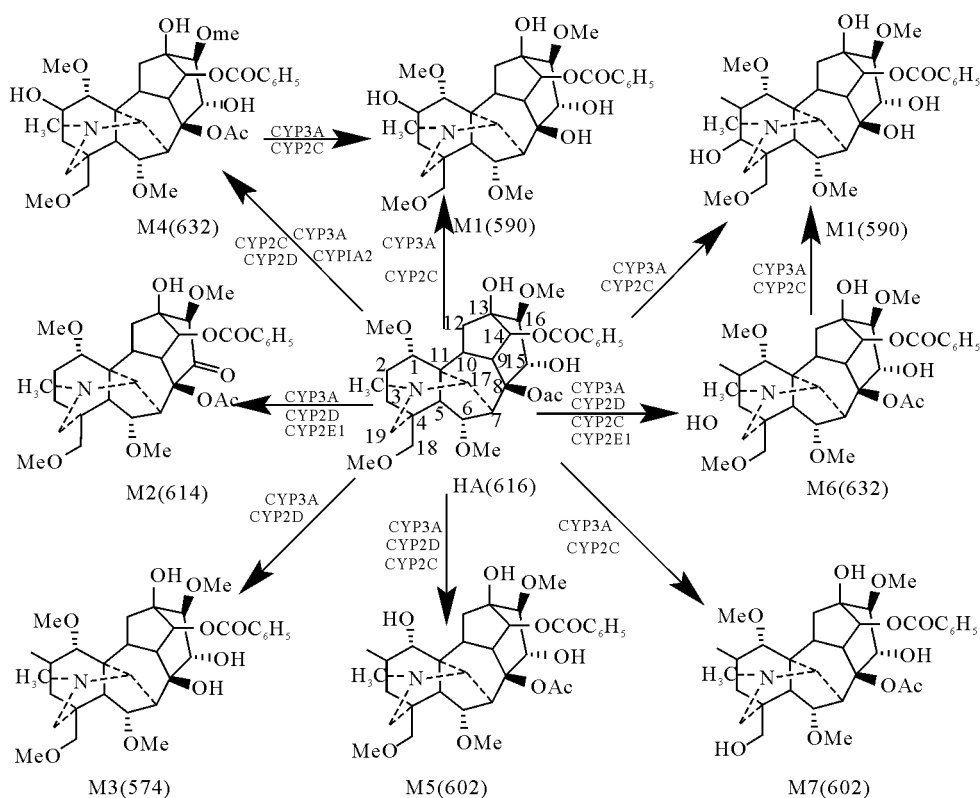


图 6 次乌头碱在大鼠肝微粒体中的可能代谢途径

Fig. 6 Proposed metabolic pathways of hyaconitine in the CYP450

参考文献:

- [1] LIN J S, CHANG Y, YANG C, et al. Zhi-fuzi, a cardiotoxic Chinese herb, a new medical treatment choice for portal hypertension [J]. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 2007, 232(4): 557-564.
- [2] WANG L, ZHANG D, QU X, et al. Experimental research on cardiotoxic effect of active compound from raw and processing aconite roots[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(5): 596-599.
- [3] LU G, DONG Z, WANG Q, et al. Toxicity assessment of nine types of decoction pieces from the daughter root of *Aconitum Carmichaeli* (Fu zi) based on the chemical analysis of their diester diterpenoid alkaloids[J]. *Planta Medica*, 2010, 76(8): 825-830.
- [4] 贺金, 方艳伟, 李永民. 四逆汤对大鼠心肌缺血损伤的保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(7): 638-640.
HE Jin, FANG Yanwei, LI Yongmin. Protective effect of Sini decoction on acute myocardial ischemia in rats[J]. *China journal of traditional Chinese medicine and pharmacy*, 2008, 23(7): 638-640 (in Chinese).
- [5] YANG L H, WEI D, SHANG L Q, et al. Protective effect of aqueous extract of SiniTang on injured cardiac muscle cell induced by hypoxia-reoxygenation[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2005, 20(6): 338-341.
- [6] LIU Y, WU W K, CHEN C, et al. Effect of delayed preconditioning induced by Sini decoction on myocardial cell apoptosis and its mitochondrial mechanism[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(15): 1269-1272.
- [7] ZHANG S F. The relationship between toxicity and curable effect induced by diester diterpenoid alkaloids and intervention of liquiritin[D]. Beijing, Beijing University of Chinese Medicine, 2007.
- [8] GUTSER U T, FRIESE J, HEUBACH J F, et al. Mode of antinociceptive and toxic action of alkaloids of *Aconitum* species [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1998, 357(1): 39-48.
- [9] DENISOV I L, MAKRISS T M, SLIGAR S G, et al.

- Structure and chemistry of cytochrome P450[J]. *Chem Rev*, 2005, 105(6): 2 253-2 277.
- [10] WANG J F, CHOU K C. Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism[J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11(4): 342-346.
- [11] HOUSTON J B, KENWORTHY K E. In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model[J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(3): 246-254.
- [12] YE L, WANG T, YANG C H, et al. Microsomal cytochrome P450-mediated metabolism of hypoaconitine, an active and highly toxic constituent derived from *Aconitum* species[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 204(1): 81-91.
- [13] LOWRY O H, ROSEBOROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [14] OTTEN J N, HINGORANI G P, HARTLEY D P, et al. An in vitro, high throughput, seven CYP cocktail inhibition assay for the evaluation of new chemical entities using LC-MS/MS[J]. *Drug Metab Lett*, 2011, 5(1): 17-24.
- [15] DUHAMEL M C, TRONCY E, BEAUDRY F. Metabolic stability and determination of cytochrome P450 isoenzymes' contribution to the metabolism of medetomidine in dog liver microsomes [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24 (8): 868-877.
- [16] WANG Y, LIU Z Q, SONG F R, et al. Electro-spray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconite[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(22): 2 075-2 082.
- [17] WANG Y G, WANG S Q, LIU Y X, et al. Characterization of metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of aconitine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 844 (2): 292-300.
- [18] 卢艳芬,徐丽君,王辉,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中的 7 种 β 2-兴奋剂[J]. *质谱学报*, 2012, 33(5):280-285.
- LU Yanfen, XU Lijun, WANG Hui, et al. Simultaneous determination of 7 kinds of β 2-agonist in feed by UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2012, 33 (5): 280-285(in Chinese).
- [19] 郭巧珍,杜振霞. UPLC-MS/MS 测定二苯甲烷二异氰酸酯[J]. *质谱学报*, 2011, 32 (2): 112-116.
- GUO Qiaozhen, DU Zhenxia. Determination of diphenylmethane diisocyanate by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2011, 32 (2):112-116(in Chinese).
- [20] AMERI A. The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system[J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 56(2): 211-235.