

## 实验技术与方法

超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法  
测定尿液中的毒蕈碱

贺巍巍, 赵云峰, 陈达伟, 吴永宁

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:**目的 采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱建立固相萃取法快速分析尿液中毒蕈碱残留的检测方法。方法 样品直接经固相萃取柱富集和净化,以 HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)为分析柱,含 0.1% 甲酸的乙腈及含 0.1% 甲酸和 4 mmol/L 甲酸铵的水溶液作为流动相 A、B 进行梯度洗脱分离,外标法定量。采用正离子采集模式对样品进行快速筛查, tMSMS 采集模式定量分析。结果 毒蕈碱在 0.05 ~ 5 μg/L 范围内呈良好的线性关系,回归系数(*r*)大于 0.999,该方法的检出限和定量限分别为 0.02 和 0.05 μg/L。以空白尿液样品进行 0.05、0.1 和 0.5 μg/L 3 个水平的加标回收试验,毒蕈碱的平均回收率范围在 73.2% ~ 97.9% 之间, RSD 为 2.5% ~ 10.2%。结论 本方法简单、灵敏、准确,适用于尿液中毒蕈碱残留的快速筛查和分析测定,可满足临床中毒分析和法医鉴定的检测需求。

**关键词:**超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法; 固相萃取; 毒蕈碱; 尿液; 食物中毒; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)03-0314-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.03.008

### Determination of muscarine in human urine by ultra performance liquid chromatography four stage rod-electrostatic field orbit trap high resolution mass spectrometry

HE Wei-wei, ZHAO Yun-feng, CHEN Da-wei, WU Yong-ning

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To establish a solid phase extraction (SPE) /high-resolution benchtop Q Exactive mass spectrometry (HRMS) method for rapid analysis of muscarine in human urine. **Methods** Samples were pre-concentrated and cleaned up directly with SPE. The chromatographic analysis was performed on an HSS T<sub>3</sub> column with 0.1% formic acid and 4 mmol/L ammonium formate in water/acetonitrile as the mobile phase with gradient elution, and external standard calibration was used for quantification. **Results** The linearity was within 0.05-5 μg/L, and the coefficient of determination (*r*) was not less than 0.999 for muscarine. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.02 and 0.05 μg/L, respectively. The recoveries of the spiked samples at the levels of 0.05, 0.1, and 0.5 μg/L ranged from 73.2% to 97.9%, with the relative standard deviations (RSDs) from 2.5% to 10.2%. **Conclusion** The proposed method is rapid, simple, sensitive and specific enough for the rapid analysis of muscarine in human urine, which is sufficient to meet the requirements of clinical medicine and forensic toxicology.

**Key words:** Ultra performance liquid chromatography four stage rod-electrostatic field orbit trap high resolution mass spectrometry; solid phase extraction; muscarine; urine; poisoning; detection

自然界中的有毒蘑菇种类繁多,我国的毒蘑菇(包括怀疑有毒的)多达 421 种,归属于 39 个科、

112 个属<sup>[1]</sup>。我国因误食毒蘑菇引起的食物中毒事件和中毒死亡现象频发,值得关注<sup>[2-3]</sup>。毒蕈碱为季铵盐类生物碱,是丝盖伞属和杯伞属真菌的主要毒性成分,在部分粉褶蕈属和小菇属的真菌中也发现有此成分。毒蕈碱结构与神经递质乙酰胆碱相似,是一种非选择性的蕈毒碱型乙酰胆碱受体激动剂<sup>[4]</sup>。误食含毒蕈碱成分的毒蘑菇后约 6 h 以内即可发病,产生剧烈恶心、呕吐、腹部绞痛、腹泻及精神错乱,出汗、发冷、肌肉抽搐、脉搏减慢、呼吸困难

收稿日期:2016-02-18

基金项目:国家食品安全风险评估中心青年科研基金资助(2014020101)

作者简介:贺巍巍 女 助理研究员 研究方向为食品安全分析检测  
E-mail: heweiwei@cfsa.net.cn

通信作者:赵云峰 男 研究员 研究方向为食品污染物分析及暴露评估  
E-mail: zhaoyf@cfsa.net.cn

或牙关紧闭,头晕眼花,神志不清等症状及体征<sup>[4-5]</sup>。尽管因误食含毒蕈碱的毒蘑菇很少致命,但快速发现和识别毒蘑菇的中毒因子,开展临床中毒治疗以及法医鉴定至关重要。尿液、血浆或血清是蘑菇中毒最有价值的生物样品材料,而尿液与血浆或血清相比,具有更长的最佳检测时间(72 h)<sup>[6-8]</sup>。另外,摄入的毒蕈碱能迅速以原型成分排泄到尿液中<sup>[9-12]</sup>。因此,尿液是快速发现和识别毒蕈碱中毒较为合适的生物样品材料。

目前,毒蕈碱在蘑菇和尿液中的检测方法主要有毛细管电泳-质谱联用法(CE-MS)<sup>[12]</sup>,气相色谱-质谱联用法(GC-MS)<sup>[13]</sup>和高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)<sup>[10-12,14-15]</sup>等。鉴于毒蕈碱低分子量、高极性的结构特点,HPLC-MS较其他仪器对此类成分具有更好的灵敏度和选择性。然而,在HPLC-MS检测分析中,尿液等复杂生物样品往往产生一定的基质效应,因此,去除干扰和降低基体效应对试验整体结果至关重要。固相萃取柱(SPE)以其高效的富集能力和净化效果被广泛应用于尿液等生物样品分析<sup>[16-17]</sup>。本课题组将SPE应用于尿液样品中毒蕈碱的富集和净化,建立了尿液中毒蕈碱的超高效液相色谱-高分辨质谱的检测方法。另外,本课题组在试验中首次发现毒蕈碱在色谱分析过程中存在明显的溶剂效应,在不同比例的溶剂系统体系下表现为不同的色谱行为。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Thermo Scientific Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统、Dionex UltiMate 3000 快速高效液相色谱系统均购自美国 Thermo Fisher,固相萃取装置(美国 Supelco),涡旋混合器,氮吹浓缩仪,MCX、MAX、HLB、WAX 和 WCX 固相萃取柱均购自美国 Waters(60 mg/3 ml)。

乙腈、甲醇均为色谱纯,甲酸、甲酸铵均为 HPLC 级,毒蕈碱标准品(11413,美国 Sigma,纯度 > 98%),试验用水为超纯水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品前处理

准确移取 0.5 ml 的尿液样品于 HLB 固相萃取小柱上(小柱预先用 3 ml 甲醇和 3 ml 水淋洗),待尿液样品完全通过柱床后,用 1 ml 水淋洗小柱,然后用 2 ml 的乙腈溶液洗脱,收集洗脱液,40 °C 下用氮气吹干;加入 0.5 ml 水涡旋振荡溶解,用 0.22 μm 水相滤膜过滤,滤液待超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析。

#### 1.2.2 标准溶液配制

准确称取毒蕈碱标准品 5.0 mg(精确至 0.1 mg)于 25 ml 容量瓶中,以甲醇定容,配制成 200 mg/L 的标准储备溶液,置于 -18 °C 贮存。用水逐级稀释标准储备溶液,并配制成 1 mg/L 和 100 μg/L 浓度的标准工作液,置于 4 °C 贮存。

#### 1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 4 mmol/L 甲酸铵的水溶液, B 为含 0.1% 甲酸的乙腈。梯度洗脱程序:0 ~ 2 min, 2% B; 2 ~ 5 min, 2% ~ 50% B; 5 ~ 6 min, 50% ~ 100% B; 6 ~ 9 min, 100% ~ 2% B。进样量 5 μl,流速 200 μl/min,柱温 40 °C。

质谱:采用 HESI 离子化方式,喷雾电压为 3.5 kV,毛细管温度 325 °C,加热器温度 300 °C,鞘气 35.25 MPa,辅助气 1.75 MPa;tMSMS 扫描模式采用正离子采集,分辨率采用 70 000 FWHM, 4 Da 的质核比范围,碰撞能量(NCE)50%。

#### 1.2.4 方法的线性

以水作为溶剂,将 100 μg/L 浓度的毒蕈碱标准工作液逐级稀释配制成 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 μg/L 的系列标准溶液,按本试验的色谱和质谱条件进行测定。

#### 1.2.5 检出限与定量限

在空白尿液样品中分别添加 0.01、0.02、0.05、0.1 μg/L 4 个水平的毒蕈碱标准溶液,按已建立的方法测定,以最接近 3 倍信噪比的加标水平进行计算,3 倍信噪比对应的加标水平为检出限,10 倍信噪比对应的加标水平为定量限。

#### 1.2.6 准确度与精密度

以空白尿液样品加标的回收率表示方法的准确度,以回收率的相对标准偏差(RSD)表示方法的精密度。在 0.05 ~ 0.5 μg/L 范围内添加 3 个不同浓度(0.05、0.1 和 0.5 μg/L)的毒蕈碱标准溶液后,摇匀,放置 2 h,按照 1.2.1 进行样品前处理,每个浓度水平 6 份平行样品,分别计算其回收率和相对标准偏差。

#### 1.2.7 样品的稳定性试验

空白尿液样品收集于健康志愿者,阳性质控样品通过在空白尿液样品中添加不同浓度(0.1、5 μg/L)的毒蕈碱标准溶液制备。上述样品均置于 -18 °C 贮存。样品的稳定性试验由阳性质控样品在不同的储存时间(1、2、3、4 周)下测定毒蕈碱的浓度变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定条件的选择

#### 2.1.1 色谱条件优化

色谱柱的优化:本研究考察了 UPLC BEH C<sub>18</sub>、HSS T<sub>3</sub> 和 BEH HILIC 3 种色谱柱对于毒蕈碱的分析效果。结果显示毒蕈碱分子量较低,水溶性较好,UPLC BEH C<sub>18</sub>、HSS T<sub>3</sub> 和 BEH HILIC 3 种色谱柱在各自最优的洗脱程序上对毒蕈碱的保留时间分别为 1.21、2.32 和 4.56 min。基于 HSS T<sub>3</sub> 柱能够对毒蕈碱具有一定的保留行为,且保留时间较为适中,而 HILIC 色谱柱虽具有更好的色谱保留,但为维持稳定的保留时间,往往需要较长的柱平衡时间。因此,综上所述,选择 HSS T<sub>3</sub> 柱作为毒蕈碱的色谱分离。

流动相的优化:本研究比较了纯水、含 4 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液作为流动相 A,以及乙腈和含 0.1% 甲酸的乙腈作为流动相 B 的效果。结果表明,在 ESI<sup>+</sup> 电离模式下,0.1% 甲酸有利于毒蕈碱的离子化,提高毒蕈碱的响应值,而在流动相中加入 4 mmol/L 甲酸铵溶液有助于维持流动相梯度洗脱中 pH 值的稳定。综上所述,本研究以含 4 mmol/L 甲酸铵和 0.1% 甲酸的水溶液作为流动相 A,含 0.1% 甲酸的乙腈作为流动相 B。

#### 2.1.2 毒蕈碱的色谱结果

当测定样品的复溶溶剂与初始流动相差异较大时,部分化合物(尤其是早出峰的物质)峰形拖尾,变宽,甚至开裂,此现象被称为溶剂效应,会严重影响后期目标化合物的定性和定量。本研究发现毒蕈碱在不同比例的复溶溶剂中具有不同的色谱结果,即出现不同保留时间的两峰。因此,本研

究采用不同比例的溶剂系统对毒蕈碱标准进行溶解分析测定。水、乙腈和甲醇是较为常见的液相分析溶剂。在不同比例的乙腈水或甲醇水溶液(0%、2%、10%、20%、40%、60%、80%、90%)条件下溶解等量毒蕈碱标准,按仪器分析条件测定,结果如图 1 所示,在不同比例的乙腈水溶剂下,毒蕈碱具有不同的色谱保留情况(保留时间随之改变)。其中,随着乙腈或甲醇比例的增加,毒蕈碱在 HSS T<sub>3</sub> 柱上的保留逐渐从 2.32 到 1.50 min(乙腈)或 1.27 min(甲醇)漂移,而当乙腈比例达到 60% 以上时,毒蕈碱在 2.32 min 上的保留消失,仅出现 1.50 min 的保留,在甲醇水溶液中毒蕈碱在 2.32 min 上的保留一直存在,但含量逐渐降低。同样的现象也发生在 BEH HILIC 色谱柱上。为了确定不同溶剂比例下出现的色谱峰是由于溶剂效应所引起,而非毒蕈碱在不同溶剂下所存在的构象问题,本试验进一步通过<sup>1</sup>H 核磁共振谱(NMR)研究毒蕈碱在重水、40% 重水/氘代甲醇、80% 重水/氘代甲醇下的结构行为。毒蕈碱在 3 种不同溶剂情况下展示相同的结构特征,证实毒蕈碱不存在不同溶剂比例下的构象问题。杨维<sup>[18]</sup>曾在生物样本氨基酸的分析中,也发现亮氨酸和异亮氨酸在不同溶剂比例下出现两个不同的保留色谱峰。由于溶剂效应而引起的毒蕈碱保留时间不同,增加了目标化合物的定性识别难度,容易在分析检测中出现误判。因此,为了克服溶剂效应所出现的两个保留色谱峰行为,本研究选择水作为毒蕈碱液相分析的溶解和复溶溶剂,主要是由于毒蕈碱在此溶剂下 HSS T<sub>3</sub> 色谱柱上仅出现单一保留色谱峰(2.32 min),且较乙腈或甲醇具有更理想的保留结果,见图 1~3。

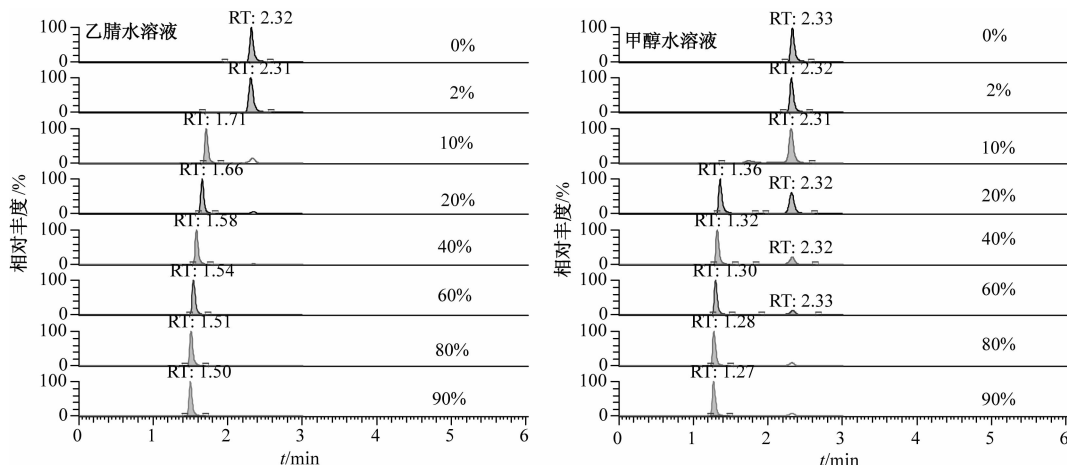


图 1 不同比例的乙腈水或甲醇水溶液条件下溶解毒蕈碱在 HSS T<sub>3</sub> 色谱柱上的离子色谱图

Figure 1 Ion chromatograms for muscarine in HSS T<sub>3</sub> column under the dissolution conditions from different concentration of acetonitrile/water or methanol/water

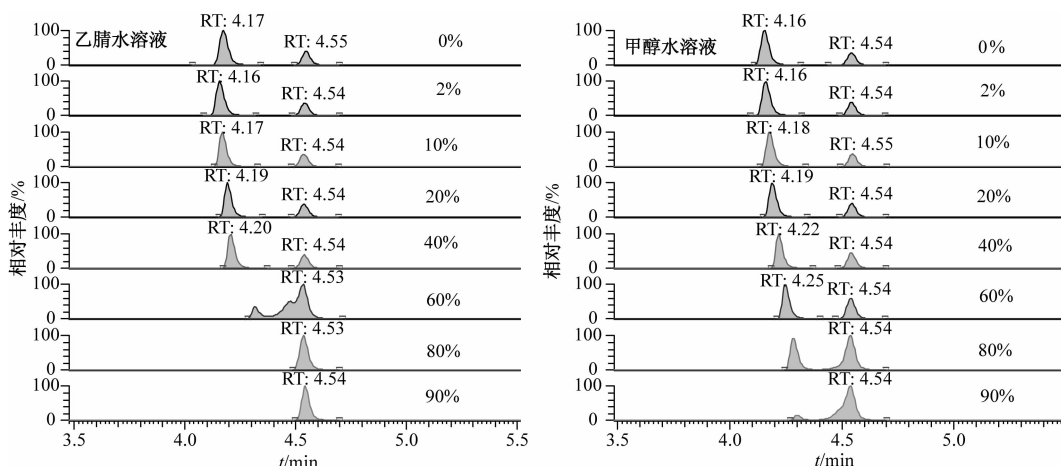
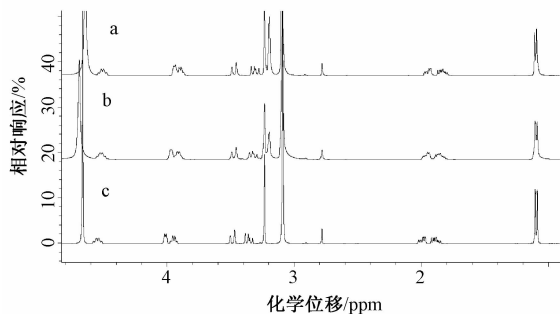


图2 不同比例的乙腈水或甲醇水溶液条件下溶解毒蕈碱在 BEH HILIC 色谱柱上的离子色谱图

Figure 2 Ion chromatograms for muscarine in BEH HILIC column under the dissolution conditions from different concentration of acetonitrile/water or methanol/water



注:a. 80% 重水/氘代甲醇; b. 40% 重水/氘代甲醇; c. 重水

图3 毒蕈碱在不同溶剂下的<sup>1</sup>H NMR 图谱

Figure 3 <sup>1</sup>H NMR spectra for muscarine from the different solvents

### 2.1.3 质谱条件优化

Full Scan、tSIM 和 tMSMS 是四级杆/静电场轨道阱高分辨串联质谱(Q Exactive MS/MS)中3种常用的定量扫描模式。其中 Full Scan 和 tSIM 模式是以目标化合物的精确母离子进行定量,而 tMSMS 模式是先通过四级杆选择指定目标化合物的母离子,而后经过高能碰撞(HCD)池进行碎片裂解,以精确碎片离子进行定量。毒蕈碱的分子量较低,即使一级质谱全扫描使用了高分辨,但复杂的基质仍对毒蕈碱的分析产生一定影响,而二级质谱则相较于一级质谱具有更好的选择性,这与文献所报道的相符<sup>[19]</sup>,因此,本研究选择 tMSMS 作为毒蕈碱的定量扫描模式。在 tMSMS 扫描模式下,NCE 将会影响化合物的响应,通过质谱优化获得毒蕈碱的最佳碰撞能量为 50%。综合上述优化分析,毒蕈碱的母离子  $m/z$  174.15 先被四级杆采集,而后经 HCD 池,在 50% 碰撞能量下裂解,采集二级质谱图(见图 4),获得二级碎片离子 ( $m/z$  174.148 73、115.075 60、97.065 27 等),本研究以毒蕈碱的二级质谱碎片  $m/z$  174.148 73 作为定量离子。

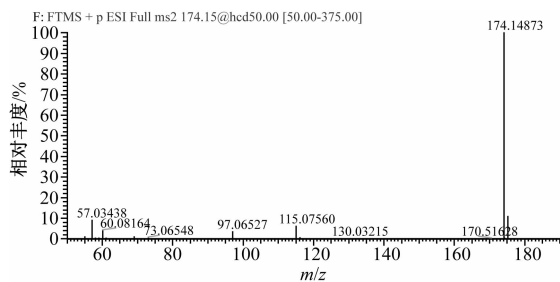


图4 毒蕈碱的二级质谱碎片离子图

Figure 4 Mass spectrum of the fragment ion for muscarine

### 2.1.4 样品前处理方法的优化

文献报道毒蕈碱的富集和净化所采用的固相萃取柱主要有反相 HLB 柱<sup>[14]</sup>、强阴离子交换 MAX 柱<sup>[15]</sup>和弱阳离子交换 X-CW 柱等<sup>[10]</sup>。本研究选择 5 种固相萃取柱 (HLB、WAX、MAX、WCX 和 MCX) 进行预筛选试验,5 种固相萃取柱的淋洗和洗脱程序见文献<sup>[20]</sup>。以 100  $\mu\text{g/L}$  的毒蕈碱标准溶液进行考察 5 种萃取柱对毒蕈碱的吸附性能,结果发现,HLB 柱对于毒蕈碱的吸附效果最好,回收率能达到 95% 以上,而 WCX 柱次之,回收率在 90% 左右,但 WAX、MAX 和 MCX 柱对毒蕈碱的吸附效果较差,回收率低于 70%。因此,本研究采用 HLB 柱作为毒蕈碱的富集和净化。

### 2.2 方法学验证结果

#### 2.2.1 方法的线性范围、检出限和定量限

采用建立的方法测定,毒蕈碱在 0.05 ~ 5  $\mu\text{g/L}$  的浓度范围内呈良好的线性关系,线性方程为  $y = 8.64136e^{+006}x - 42691.4$ ,相关系数 ( $r$ ) 为 0.999 8。毒蕈碱在尿液样品中的检出限和定量限分别为 0.02 和 0.05  $\mu\text{g/L}$ 。本研究以超高效液相色谱-高分辨质谱作为毒蕈碱的分析检测,并采用 tMSMS 采集模式,其精确的分析质量数降低了尿液基质中的干扰,从而提高了检测信噪比。因此,与文献比

较<sup>[10-12]</sup>,具有更好的检出限和定量限,能够满足临床中毒分析和法医鉴定。

### 2.2.2 方法的精密度和准确度

方法的精密度和加标回收率结果见表1。毒蕈碱在尿液0.05~0.5 μg/L的加标浓度范围内的加标回收率在73.2%~97.9%之间,RSD范围为2.5%~10.2%,符合痕量分析的要求。

表1 毒蕈碱在尿液样品中的加标回收率试验结果(n=6)

Table 1 Results of spiked recovery for muscarine in urine samples

加标水平/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
0.05	73.2	10.2
0.1	86.1	5.7
0.5	97.9	2.5

### 2.3 实际样品测定

采用本文所建立的分析方法,对空白尿液样品和阳性质控样品进行检测,结果显示空白尿液样品中未检出毒蕈碱,2份阳性质控样品检出毒蕈碱的浓度分别为0.086和5.06 μg/L,而在对阳性质控样品的稳定性试验中,样品在放置时间达4周后,毒蕈碱测定结果未发生明显变化,表明毒蕈碱在尿液样品中4周内保持稳定。

### 3 小结

本试验建立以固相萃取柱净化的超高效液相色谱-高分辨质谱检测尿液中毒蕈碱的方法。结果表明,通过高分辨质谱的tMSMS扫描模式能够快速进行尿液中毒蕈碱的定性筛查和定量检测,有效降低了假阳性结果出现的可能性,并对毒蕈碱的色谱保留行为进行分析。本研究建立的方法灵敏度高,定量限为0.05 μg/L,能够满足临床中毒诊断分析。

### 参考文献

- [1] 卯晓岚. 中国毒菌物种多样性及其毒素[J]. 菌物学报, 2006, 25(3):345-363.
- [2] 卫生部办公厅. 卫生部办公厅关于2012年全国食物中毒事件情况的通报[Z]. 2013.
- [3] 刘志涛, 吴少雄, 万蓉, 等. 2005—2013年云南省野生蕈中毒的时空分布[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(6):547-551.
- [4] Lurie Y, Wasser S, Taha M, et al. Mushroom poisoning from species of genus *Inocybe* (fiber head mushroom): a case series with exact species identification[J]. Clin Toxicol, 2009, 47(6):562-565.
- [5] Maki T, Takahashi K, Shibata S. Isolation of vomiting principles

from the mushroom *Rhodophyllus rhodopolius* [J]. J Agric Food Chem, 1985, 33(6):1204-1205.

- [6] Rentsch K M. Laboratory diagnostics in acute poisoning: critical overview[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(10):1381-1387.
- [7] Ishii A, Tada M, Kusano M, et al. Simple and sensitive determination of  $\alpha$  and  $\beta$ -amanitin by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Forensic Toxicol, 2014, 32(2):342-346.
- [8] Gonmori K, Minakata K, Suzuki M, et al. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin, and phalloidin in urine[J]. Forensic Toxicol, 2012, 30(1):179-184.
- [9] Roberts B. A practical treatise on materia medica and therapeutics [Z]. 1908.
- [10] Merova B, Ondra P, Stankova M, et al. Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric[J]. J Chromatogr B, 2011, 879(25):2549-2553.
- [11] Tomkova J, Ondra P, Valka I. Simultaneous determination of mushroom toxins  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry[J]. Forensic Sci Int, 2015, 251(1):209-213.
- [12] Ginterova P, Sokolova B, Ondra P, et al. Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2014, 125(1):242-247.
- [13] 林信, 段志敏, 王玉萍, 等. GC/MS-SIM 定性定量分析云南野生毒蝇菌中的毒蝇碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9):1988-1989.
- [14] Yoshioka N, Akamatsu S, Mitsuhashi T, et al. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry [J]. Forensic Toxicol, 2014, 32(1):89-96.
- [15] Chung W C, Tso S C, Sze S T. Separation of polar mushroom toxins by mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2007, 45(1):104-111.
- [16] 刘慧燕. 固相萃取-气质联用仪检测尿液中多种内源性固醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1):310-314.
- [17] 胡小键, 张海婧, 王肖红, 等. 固相萃取液相色谱串联质谱法检测尿中双酚类和卤代双酚类物质[J]. 分析化学, 2014, 42(7):1053-1056.
- [18] 杨维. 基于LC-MS-MS技术的肺癌血浆代谢组学研究[D]. 北京:北京协和医学院中国医学科学院, 2013.
- [19] Kumar P, Rubies A, Centrich F, et al. Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometry: application to determination of synthetic hormones in animal urine [J]. Anal Chim Acta, 2013, 780(1):65-73.
- [20] Waters. OASIS 样品萃取产品 [EB/OL]. [2015-08-01]. [http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=zh\\_CN&cid=513209&lid=1529729](http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=zh_CN&cid=513209&lid=1529729).