

实验技术与方法

超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法同时测定蟾蜍皮中8种蟾蜍毒素

缪琼惠¹,陈汝梅²,黄小芹²,林洁³

(1. 大理大学,云南大理 671000;2. 昆明医科大学,云南昆明 650500;

3. 云南省疾病预防控制中心,云南昆明 650032)

摘要:目的 建立超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法快速定性定量检测中毒患者食用剩余蟾蜍皮中8种蟾蜍毒素。方法 样品经甲醇提取后,待测液经过A CQUITY UPLC[®] HSS T₃色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)分离,以0.1%甲酸水溶液为流动相A、甲醇为流动相B进行梯度洗脱,流速0.3 mL/min,柱温35℃,进样量2 μL,经ESI正离子模式采集。结果 在10.0~1 000.0 μg/L范围内8种毒素线性关系良好, r^2 均≥0.990;检出限为0.7~2.1 μg/kg,定量限为2.5~7.0 μg/kg;三水平加标平均回收率均≥75.79%,相对标准偏差(RSD)均≤9.84%。样品中检测出蟾毒灵、去乙酰华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、伪异沙蟾毒精、蟾毒它灵,含量分别为123.8±3.1、5 920.4±1.9、680.7±3.2、671.6±9.1、1 796.6±74.9 μg/kg,和蟾蜍他灵、华蟾毒精与华蟾毒它灵均未检出。结论 该方法同时测定蟾蜍毒素中华蟾毒精、蟾毒灵、伪异沙蟾毒精、蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精、和蟾蜍他灵、华蟾毒它灵,有较强实用性、快速、可靠。

关键词:超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱;蟾蜍毒素;同时测定

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)04-0535-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.04.008

Simultaneous determination of 8 bufo toxins in toad skin by UPLC/Q-TOF-MS

MIAO Qionghui¹, CHEN Rumei², HUANG Xiaoqin², LIN Ji³

(1. Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650500, China; 3. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To establish a rapid qualitative and quantitative method for the determination of 8 bufo toxins in toad skin residual from poisoned patients by ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). **Methods** After the toad skin samples were pretreated, the sample solution was separated on A Cquity UPLC[®] HSS T₃ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) with 0.1% formic acid solution as mobile phase A and methanol as mobile phase B. The flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35℃, and the sample volume was 2 μL. **Results** The linear ranges were 10.0-1 000.0 μg/L with r^2 ≥0.990. The limits of detection were 0.7-2.1 μg/kg, and the limits of quantification were 2.5-7.0 μg/kg. The average recoveries were ≥75.79% and RSDs were ≤9.84%. The contents of bufalin, desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin, pseudobufarenogin and bufotaline were 123.8±3.1, 5 920.4±1.9, 680.7±3.2, 671.6±9.1 and 1 796.6±74.9 μg/kg, respectively, while gamabufotain, cinobufagin and cinobufotalin were not detected. **Conclusion** The method is practical, rapid and reliable for the determination of cinobufagin, bufalin, pseudobufarenogin, desacetylcinobufotalin and desacetylcinobufagin, bufotaline, gamabufotain and cinobufotalin in toad skin.

Key words: Ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time of flight mass spectrometry; bufo toxin; simultaneous determination

蟾蜍,也称蛤蟆,在我国分为中华大蟾蜍和黑眶蟾蜍两种,从其身上提取的蟾酥以及蟾衣是我国

紧缺药材。蟾酥是中华大蟾蜍和黑眶蟾蜍的干燥分泌物^[1];蟾皮是干燥全皮,辛凉、微毒,中药使用目

收稿日期:2021-12-25

作者简介:缪琼惠 女 在读研究生 研究方向为食品中有毒物质检测 E-mail:1073921736@qq.com

通信作者:林洁 男 主任技师 研究方向为食品中有毒物质检测 E-mail:linji666@163.com

的为以毒攻毒^[2]。蟾蜍皮化学成分复杂,包括蟾蜍甾二烯类、强心甾烯蟾毒类、吲哚碱类、甾醇类等。蟾蜍二烯酸内酯有结合型的蟾蜍毒素和游离型的蟾毒配基,具有清热解毒、利水消胀^[3]、抗肿瘤^[4]、抗炎与免疫调节^[5]、抗菌与抗病毒^[6]、强心^[7]等作用。

因蟾蜍皮的药用价值被广泛使用,但忽视了其毒性,因此中毒事件屡有发生。YOSHIDA等^[8]报道了11种蟾蜍毒素的麻醉作用。宋志平和王萍^[9]分析蟾蜍中毒患者发现,患者临床表现为心脏毒性及胃肠道症状,研究表明严重心动过缓是最常见的蟾蜍心脏毒作用。吉训琦等^[10]对4名蟾蜍中毒儿童研究发现,中毒患儿均有心律失常及心肌受损表现。蟾蜍毒素中毒的潜伏期较短,死亡率较高,应引起重视。加强快速检测确认毒素,可以为临床抢救争取时间。目前常用的检测方法有高效液相色谱法和液质联用技术。本研究收集到1例中毒患者烧食剩余的蟾蜍皮,经提取后,建立超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法快速定性定量检测中毒患者食用剩余蟾蜍皮中的8种蟾蜍毒素。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

G6550-UPLC/Q-TOF 检测仪(美国 Agilent Technologies), ACQUITY UPLC[®] HSS T₃ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(Waters),天平(d=0.1 mg),SCO-5201S 超声波清洗机,3-18K 高速离心机。

生物碱对照品:华蟾毒精(CAS:470-37-1)、蟾毒灵(CAS:465-21-4)、伪异沙蟾毒精(CAS:17008-69-4)、蟾毒它灵(CAS:471-95-4)、去乙酰华蟾毒它灵(CAS:4099-30-3)、去乙酰华蟾毒精(CAS:4026-95-3)、和蟾蜍他灵(CAS:465-11-2)、华蟾毒它灵(CAS:1108-68-5)均购于成都德思特生物技术有限公司,纯度≥98%。甲醇、甲酸均为色谱纯,试验用水为超纯水。

1.1.2 样品来源

云南省某地疾控中心送检的中毒样品为中毒患者食用剩余蟾蜍皮肤。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制

标准储备液的配制:精确称取一定量的华蟾毒精、蟾毒灵、伪异沙蟾毒精、蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精、和蟾蜍他灵、华蟾毒它灵至10.0 mL比色管中,用甲醇溶解并定容至10 mL,配置成浓度分别为140.0、142.0、143.0、140.0、114.0、125.0、152.0和110.0 μg/mL的标准储备

液,-40℃冰箱储存。

标准工作液的配制:配制浓度为10.0 μg/mL的混合标准溶液,逐级稀释成浓度为1.0 μg/mL的标准工作液,-20℃保存。

混合标准系列的配制:分别吸取0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL标准工作液配制成浓度为10、20、50、100、200、500、1 000 μg/L的混合标准系列。

1.2.2 样品溶液制备

准确称取样品0.5 g,加入10.0 mL甲醇,称重后涡旋混匀,超声提取30 min,放至室温,用甲醇补足失重,充分摇匀后转入离心机,以10 000 r/min离心10 min,取上清液过0.22 μm滤膜,待上机。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱(HSS T₃, 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相A:0.1%甲酸水溶液,流动相B:甲醇;柱温:35℃,流速:0.3 mL/min,洗脱梯度为:0 min,95%A;0~1.0 min,95%A;1.0~1.5 min,70%A;1.5~4.5 min,5%A;4.5~6.0 min,5%A;6.1~7.0 min,95%A。

质谱:采用Dual AJS电喷雾电离正离子(positive electrospray ionization, ESI+)模式,毛细管电流:4.396 μA;毛细管电压:4 000 V;雾化器温度:350℃;雾化气流:35 psi;干燥气流速:13.0 L/min;鞘气流速:12.0 L/min;鞘流气温度:280℃;参比离子为m/z 121.050 873、m/z 922.009 798,扫描范围m/z 50~1 000。8种毒素的特征谱库见表1。

1.2.4 定性定量方法

使用1.2.3条件采集样品和标准溶液数据导入定性分析软件中,使用MassHunter PCDL Manager建立的特征图库,检出样品的色谱峰保留时间偏差≤±0.2 min,质谱的精确分子量与谱库一致,则判定样品存在目标物。样品使用外标法定量分析。在定量分析软件B.06.00版本进行,以[M]⁺H作为定量离子进行定量。

2 结果

2.1 提取试剂选择

为了提高提取效率,综合试验条件及相关文献,本研究比较甲醇、60%甲醇水和纯水作为提取溶剂对样品提取效率的差异^[11]。按照1.2.3条件检测,样品中5种蟾蜍毒素的提取总量分别为9.35、6.76、5.95 mg/kg。结果表明,甲醇的提取效率最好,故后续试验选用甲醇作为提取溶剂。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱选择

本研究比较了ACQUITY UPLC[®] HSS T₃(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)^[12-13]。

表1 8种化合物的特征谱参数

Table 1 Characteristic spectrum parameters of the 8 compounds

化合物	分子式	保留时间/min	相对分子量	碰撞电压/eV	碎片离子(m/z)
华蟾毒精	$C_{26}H_{34}O_6$	3.622	442.55	40	365.210 33/347.199 60*
蟾毒灵	$C_{24}H_{34}O_4$	3.399	386.53	40	369.241 89/351.233 06*
伪异沙蟾毒精	$C_{24}H_{32}O_6$	2.209	416.51	40	363.194 34/381.204 86*
蟾毒它灵	$C_{26}H_{36}O_6$	2.805	444.56	40	349.215 47/367.225 56*
去乙酰华蟾毒它灵	$C_{24}H_{32}O_6$	2.605	416.51	40	363.194 34/381.204 86*
去乙酰华蟾毒精	$C_{24}H_{32}O_5$	3.088	400.51	40	239.104 874/295.165 69*
和蟾蜍他灵	$C_{24}H_{34}O_5$	2.203	402.52	40	385.236 55/253.195 49*
华蟾毒它灵	$C_{26}H_{34}O_7$	2.976	458.54	40	363.194 33/381.204 80*

注:带“*”表明为定性离子

使用 C_{18} 色谱柱,峰形稍宽,8种化合物色谱图分离不理想;使用 HSS T_3 色谱柱时基线较低,峰形较 C_{18} 好,但两种色谱柱8种物质的离子化程度相差不大,综合比较选用 HSS T_3 色谱柱。

2.2.2 流动相选择

本研究就有机相比较了甲醇^[14]和乙腈^[15],试验发现使用甲醇和乙腈作为有机相时8种化合物的离子化程度差异不明显。使用甲醇作为有机相时,目标物质出峰时间较乙腈晚,色谱图保留时间更稳定,而乙腈出峰相对较早,峰形较差,有分叉,时间不稳定,因此选择甲醇作为有机相。

对于水相选择,本研究比较纯水、0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液,发现使用纯水时目标物质的响应稍低,0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液目标物响应差距不明显,考虑流动相加入盐,时间久可形成结晶,易导致仪器管道及色谱柱的堵塞,因此选用 0.1% 甲酸水溶液-甲醇作为流动相。

2.2.3 洗脱梯度选择

适合的洗脱梯度有利于目标物的分离也可提高化合物的响应^[16-17]。通过色谱柱和流动相种类的选择,目标物质的色谱峰仍不能完全分离,通过不断调整流动相的梯度,使目标物质充分分离,最终确定使用的流动相梯度为:流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为甲醇;洗脱梯度为:0 min,95%A;0~1.0 min,95%A;1.0~1.5 min,70%A;1.5~4.5 min,5%A;4.5~6.0 min,5%A;6.1~7.0 min,95%A。

2.3 质谱条件的优化

2.3.1 一级质谱参数的优化

结合文献^[18]和目标物质的分子结构特征,分别在正离子和负离子模式下对8种化合物进样,发现正离子模式下8种目标物质的响应更好,选用 ESI+模式进行试验。通过离子源参数连续优化可明显提高物质的响应。因鞘气温度、鞘气流速和喷

嘴电压对化合物响应有较大影响,首先考虑优化,其余离子源参数依次进行。经反复试验证明在毛细管电流:4.396 μ A;毛细管电压:4 000 V;雾化器温度:350 $^{\circ}$ C;雾化气流:35 psi;干燥气流速:13.0 L/min;鞘气流速:12.0 L/min;鞘流气温度:280 $^{\circ}$ C;参比离子为 m/z 121.050 873、 m/z 322.048 121、 m/z 922.009 798,扫描范围 m/z 50~1 000,目标化合物离子化程度最高。

利用一级质谱条件,进样对照品溶液,连续进样6次,得到目标物准确的保留时间和精确的质量数,利用8种化合物对照品稳定的出峰时间和精确的质量数建立标准特征谱库,用以查找化合物。调整质量偏差 ≤ 5 ppm,保留时间偏差 $\leq \pm 0.2$ min。比较 $[M^+H]^+$ 、 $[M^+Na]^+$ 、 $[M^+K]^+$ 等3种母离子的加和状态,研究以 $[M^+H]^+$ 作为母离子。在积分器选择中,使用 Agile MassHunter Qualitative B.06.00 积分器查找,上述8种化合物均能找到且保留时间稳定,总离子流色谱图峰型好,后续试验采用上述参数。

综合使用上述色谱和质谱条件,得到8种目标物质标准物质的色谱图(图1)和质谱图(图2)。

2.3.2 二级质谱参数的优化

使用由一级质谱得到的精确质量数和稳定的保留时间,选择 Q-TOF 下,保持一级质谱最优参数不变,选择采样模式为 Targeted MS/MS, Acquisition 下面的目标化合物列表,输入由一级质谱得到的精确质量数和保留时间。通过不断调整碰撞电压和 ISO. Width 得到8种化合物的二级质谱,确定物质碎片离子。在使用碰撞电压为 40 V,ISO. Width 为 Medium(~ 4 m/z)时发现全部可能的化合物,得到的8种化合物的二级质谱图中母离子峰度较低,子离子的相对峰度较高且响应稳定,干扰较少,后续试验确定碰撞电压为 40 V,ISO. Width 为 Medium(~ 4 m/z)。

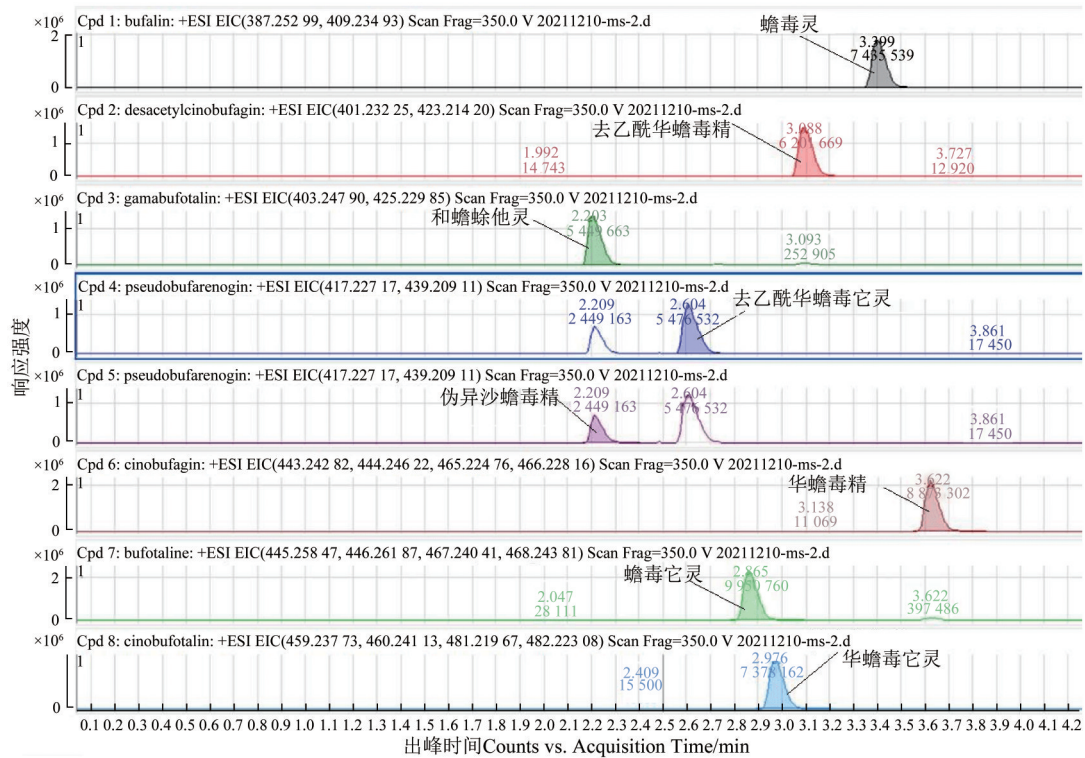


图1 8种蟾蜍毒素混合标准色谱图

Figure 1 Chromatograms of 8 bufotoxins

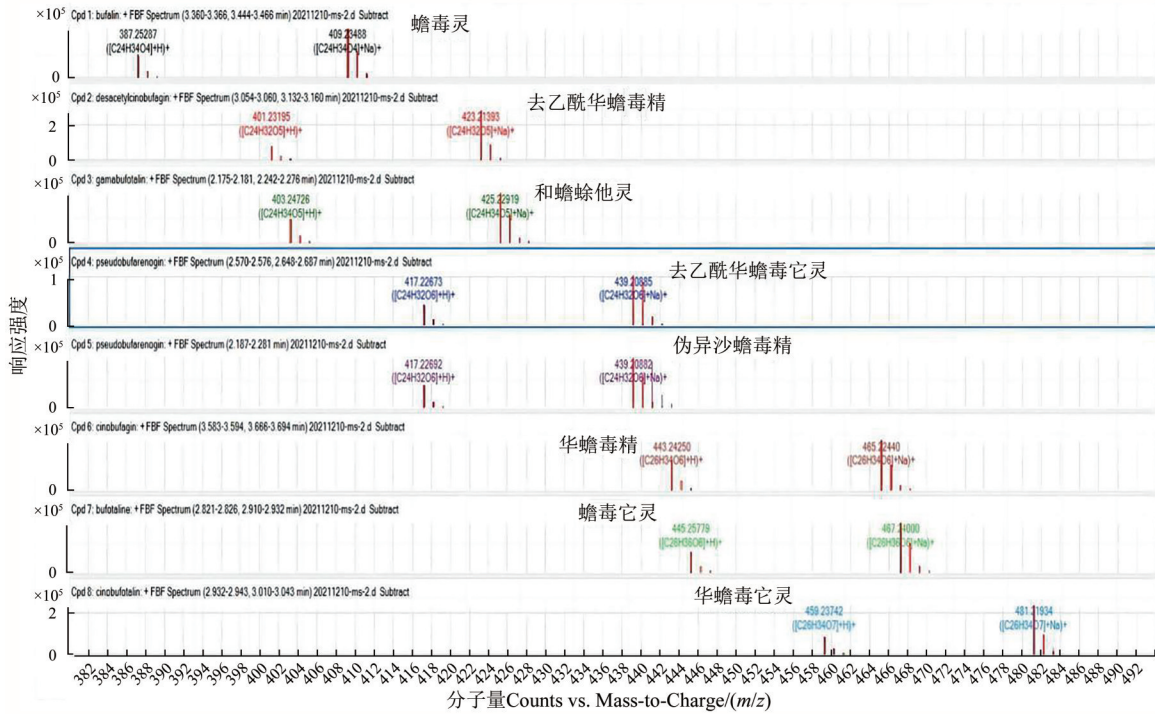


图2 8种蟾蜍毒素混合标准质谱图

Figure 2 Mixed mass spectrometry of 8 bufotoxins

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围与检出限

用浓度为 1.0 μg/mL 的混合标准工作液, 甲醇配成浓度为 10、20、50、100、200、500、1 000 μg/L 的混合标准系列。按 1.2.1 所述方法进行测定, 得到 8 个目标化合物的线性方程; 以 3 倍信噪比(S/N)确

定检出限(Limit of detection, LOD), 10 倍信噪比确定定量限(Limit of quantitation, LOQ), 结果见表 2。8 种生物碱毒素在线性范围内线性关系良好($r^2 \geq 0.990$)。

2.4.2 回收率

分别精确称取 24 份 0.1 g 蟾蜍皮, 分成高、中、

表 2 8 种物质的线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of 8 kinds of substances

化合物	线限范围/($\mu\text{g/L}$)	回归方程	r^2	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
华蟾毒精	10~1 000	$y=6\ 727.35x-31\ 480.97$	0.996	1.8	5.6
蟾毒灵	10~1 000	$y=7\ 513.25x+4\ 175.32$	0.997	1.0	3.4
伪异沙蟾毒精	10~1 000	$y=3\ 495.84x-1\ 692.74$	0.996	1.2	4.0
蟾毒它灵	10~1 000	$y=7\ 490.32x-8\ 082.97$	0.993	1.5	5.1
去乙酰华蟾毒它灵	10~1 000	$y=3\ 380.32x+7\ 602.85$	0.990	1.2	4.0
去乙酰华蟾毒精	10~1 000	$y=6\ 020.78x-7\ 709.06$	0.994	2.1	7.0
和蟾蜍他灵	10~1 000	$y=7\ 252.78x+5\ 734.62$	0.997	0.7	2.5
华蟾毒它灵	10~1 000	$y=8\ 599.87x-14\ 427.02$	0.994	1.3	4.5

低 3 个浓度组,每组 6 个平行样品,分别加入 1.0 mL 浓度为 10、100、500 $\mu\text{g/L}$ 的混合对照品溶液至蟾蜍样品中,按 1.2.1 所述分析条件进行测定。计算得

到 8 种物质的加样回收率及相对标准偏差 (RSD),见表 3。平均回收率均 $\geq 75.79\%$, RSD 均 $\leq 9.84\%$,说明此方法测定此 8 蟾蜍毒素准确可靠。

表 3 8 种物质的回收率 ($n=6$)Table 3 Recoveries of 8 kinds of compounds ($n=6$)

化合物	样品本底值/($\mu\text{g/kg}$)	加标量 10 $\mu\text{g/L}$				加标量 100 $\mu\text{g/L}$				加标量 500 $\mu\text{g/L}$			
		加标量检测值/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%	RSD /%	加标量检测值/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%	RSD /%	加标量检测值/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%	RSD /%
华蟾毒精	0	100	99.30	99.30	9.60	1 000	1 009.75	100.98	3.38	5 000	4 849.77	97.00	6.85
蟾毒灵	25.25	100	102.17	75.79	9.09	1 000	1 008.14	97.55	8.11	5 000	4 982.43	99.49	2.06
伪异沙蟾毒精	124.50	100	232.12	107.62	5.73	1 000	1 050.31	92.58	9.84	5 000	5 017.71	97.86	2.34
蟾毒它灵	0	100	94.51	94.51	6.95	1 000	958.28	95.83	6.78	5 000	4 953.98	99.08	2.58
去乙酰华蟾毒它灵	102.72	100	202.87	100.14	4.96	1 000	1 047.47	94.47	7.42	5 000	5 029.38	98.53	2.24
去乙酰华蟾毒精	1 204.26	100	1 307.03	102.77	2.06	1 000	2 043.65	83.94	4.81	5 000	6 002.39	95.96	1.25
和蟾蜍他灵	0	100	95.88	95.88	8.34	1 000	963.23	96.32	5.56	5 000	4 947.60	98.95	2.30
华蟾毒它灵	350.94	100	439.46	88.51	6.22	1 000	1 171.53	82.06	9.73	5 000	5 155.48	96.09	5.35

2.4.3 精密度和稳定性

取蟾蜍皮按照 1.2.2 所述试验步骤进行测定,重复 6 次,计算得出 8 种物质的 RSD 均小于 5.63%,说明此方法精密度较好。将 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准液分别在 4、8、12、24、36、48 h 按照方法测定,显示 RSD 均小于 3.72%,说明 8 种化合物标 48 h 内稳定。

2.5 实际样品检测

将收集到的样品按照 1.2.3 方法对样品进行测定 ($n=6$),得到离子流色谱图(图 3)和质谱图(图 4)。样品上机时间为 7 min,检测时间短,效率高。本次食物中毒样品中检测出蟾毒灵、去乙酰华蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、伪异沙蟾毒精、蟾毒它灵,含量分别为 123.8 ± 3.1 、 $5\ 920.4 \pm 1.9$ 、 680.7 ± 3.2 、 671.6 ± 9.1 、 $1\ 796.6 \pm 74.9$ $\mu\text{g/kg}$,和蟾蜍他灵、华蟾毒精与华蟾毒它灵均未检出。分析未检出的原因有:首先可能由于样品中集中物质含量很低,

低于检出限;其次本研究收集到的样品为经火烧过的蟾蜍皮,火烧的过程导致蟾蜍毒素破坏;再次样品含量较低,在前处理过程中破坏、沉淀或降解;最后蟾蜍有多个品种,每种蟾蜍其毒素种类及含量有差异,本研究使用的蟾蜍品种可能不含有和蟾蜍他灵、华蟾毒精与华蟾毒它灵。

为验证检测方法的准确性及稳定性,采集 2 件蟾衣商品(A、B),按照 1.2.2 的样品前处理及 1.2.3 检测方法进行检测,色谱图见图 5。样品 A 检出蟾毒灵、和蟾蜍他灵、去乙酰华蟾毒它灵、伪异沙蟾毒精、华蟾毒精、蟾毒它灵和华蟾毒它灵,含量分别为 706.3、1 979.7、1 584.8、1 781.4、1 636.3、1 300.9 和 4 641.9 $\mu\text{g/kg}$;样品 B 检出蟾毒灵、和蟾蜍他灵、伪异沙蟾毒精、华蟾毒精、蟾毒它灵和华蟾毒它灵,含量分别为 248.4、233.0、511.6、1 044.6、726.6 和 1 274.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

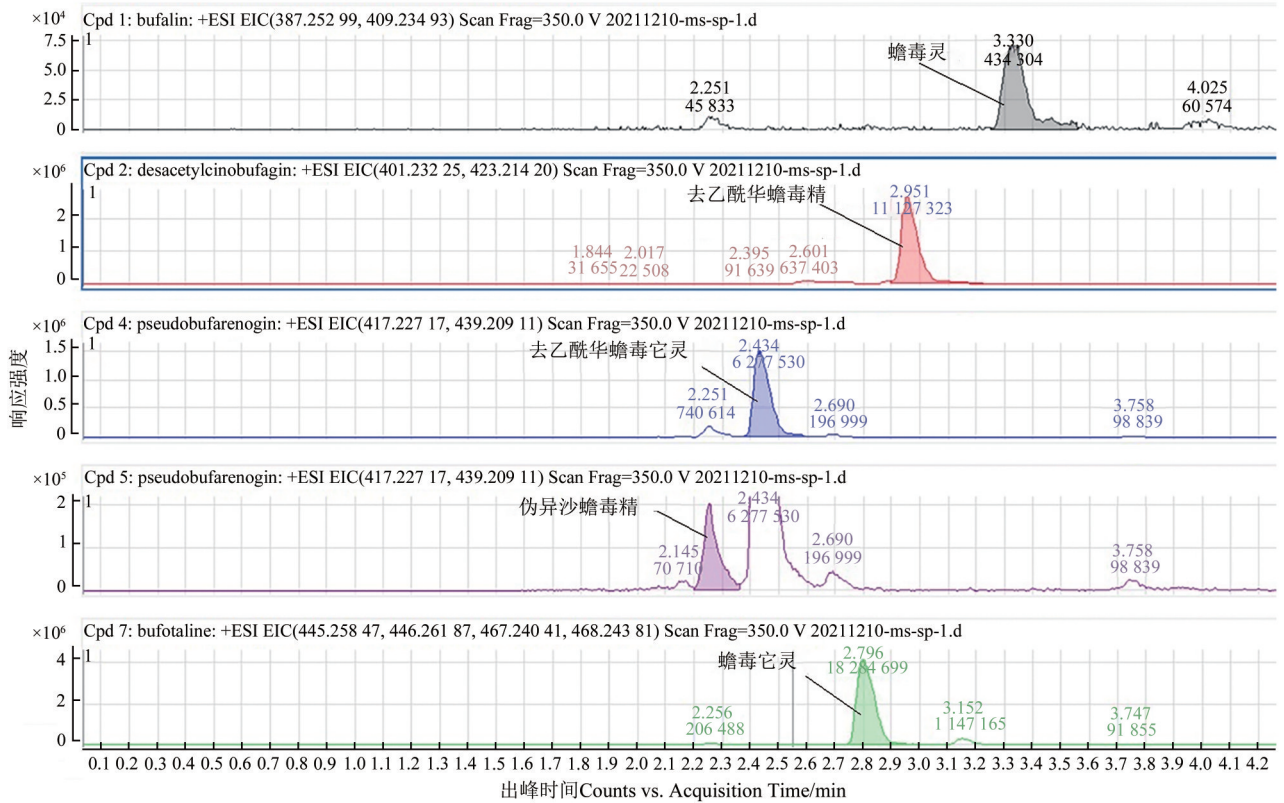


图3 样品离子流色谱图

Figure 3 Ion flow chromatogram of samples

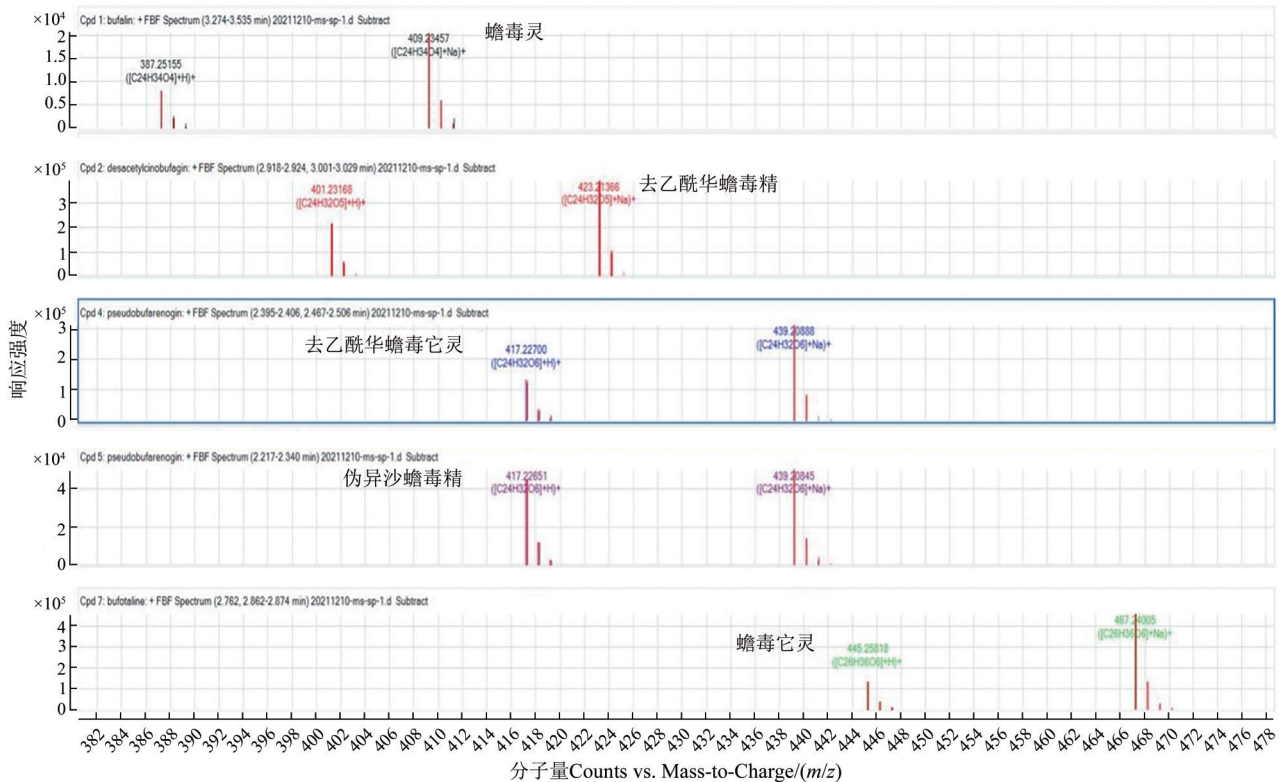


图4 样品质谱图

Figure 4 Quality spectrum of samples

3 小结

此方法用于同时检测蟾蜍类生物样品中的华蟾毒精、蟾毒灵、伪异沙蟾毒精、蟾毒它灵、去乙酰

华蟾毒它灵、去乙酰华蟾毒精、和蟾蜍他灵、华蟾毒它灵,快速、可靠、具有较强实用性,可以为突发蟾蜍生物碱中毒案件患者的临床性治疗提供科学

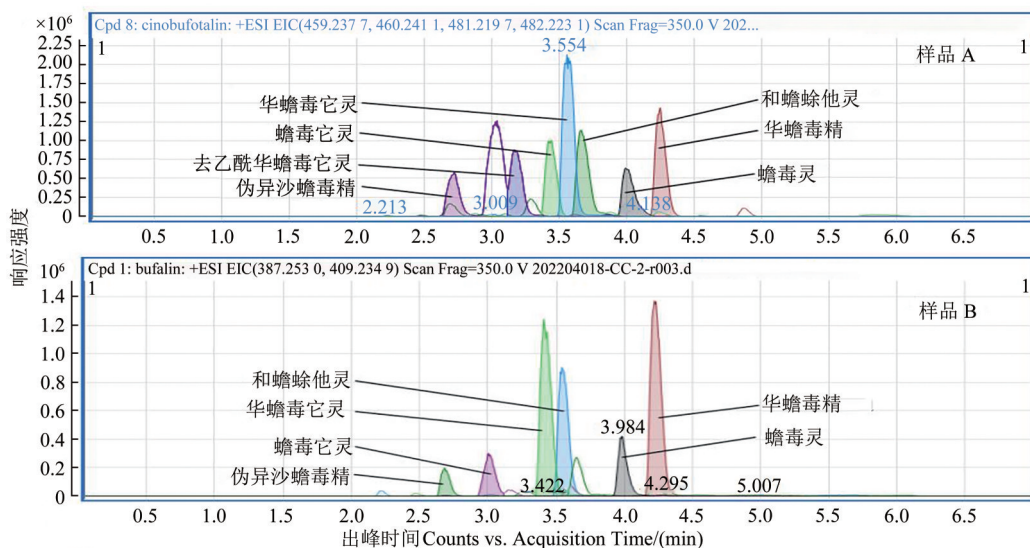


图5 样品A、B色图谱

Figure 5 Chromatogram of sample A and B

依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典—一部: 2020年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 401.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China - Part 1: 2020 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 401.
- [2] 喻昌燕, 孟令杰, 姜念, 等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1206-1220.
YU C Y, MENG L J, JIANG N, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Bufonis corium [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(4): 1206-1220.
- [3] 张瑜. 蟾皮中吲哚烷胺类生物碱化学成分及抗炎活性机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
ZHANG Y. The chemical and anti-inflammatory activity mechanism research of indolealkylamines in toad skin [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2020.
- [4] 曹伟, 刘聪燕, 陈彦, 等. 蟾皮活性组分的分离与体外抗肿瘤活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 17-20.
CAO W, LIU C Y, CHEN Y, et al. Separation and *in vitro* antitumor activity investigation of active constituents from toad skin [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(24): 17-20.
- [5] ZHAKEER Z, HADEER M, TUERXUN Z, et al. Bufalin inhibits the inflammatory effects in asthmatic mice through the suppression of nuclear factor-kappa B activity [J]. Pharmacology, 2017, 99(3-4): 179-187.
- [6] 王元清, 严建业, 罗堃, 等. 蟾皮提取物抑菌活性与稳定性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 120-122.
WANG Y Q, YAN J Y, LUO K, et al. Study on antibacterial activity and stability of extracts from skin of bufo bu fo [J]. Food & Machinery, 2011, 27(5): 120-122.
- [7] 周钊, 杨届. 蟾蜍的药用价值研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(11): 203-204.
- ZHOU F, YANG J. Research progress on the medicinal value of bufonid [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 31(11): 203-204.
- [8] YOSHIDA S, KAMANO Y, SAKAI T. Studies on the surface anesthetic activity of bufadienolides isolated from ch'an su [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1976, 24(8): 1714-1717.
- [9] 宋志平, 王萍. 蟾蜍中毒的心电图特点及处理[J]. 西南军医, 2020, 22(2): 165-168.
SONG Z P, WANG P. The electrocardiogram characteristics and management of bufonid poisoning [J]. Journal of Military Surgeon in Southwest China, 2020, 22(2): 165-168.
- [10] 吉训琦, 冯小伟, 陈玉雯, 等. 儿童服食蟾酥导致心脏毒性临床救治体会[J]. 海南医学, 2015, 26(5): 741-742.
JI X Q, FENG X W, CHEN Y W, et al. Clinical experience in treating cardiac toxicity caused by bufonid ingestion in children [J]. Hainan Medical Journal, 2015, 26(5): 741-742.
- [11] 刘小英, 刘昕, 陈笑天, 等. HPLC法同时测定不同产地蟾酥中的5种活性成分[J]. 中草药, 2013, 44(6): 760-762.
LIU X Y, LIU X, CHEN X T, et al. Determination of five active components in Venenum Bufonis from different habitats by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(6): 760-762.
- [12] 王子月, 王洪兰, 周婧, 等. 利用UPLC-TQ-MS比较蟾酥鲜品和蟾酥商品化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3967-3973.
WANG Z Y, WANG H L, ZHOU J, et al. Comparison of chemical composition between fresh and processed Bufonis Venenum by UPLC-TQ-MS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(20): 3967-3973.
- [13] 曹月婷. 蟾酥质量产地差异性及其原因研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
CAO Y T. Studies on the quality differences and its causes of Chansu from different origins [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [14] 曹月婷, 崔可可, 吴纪恒, 等. 中华大蟾蜍毒液中蟾毒配基类成分的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9):

- 1850-1856.
CAO Y T, CUI K K, WU J H, et al. Correlative study of bufogenin constituents in venom of *Bufo bufo gargarizans* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(9): 1850-1856.
- [15] 王兆基, 粟晓黎, 刘秋铭, 等. 毒性中药蟾酥质量检测方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(6): 1027-1030.
WANG Z J, SU X L, LIU Q M, et al. Study on quality control method for Venenum Bufonis [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 31(6): 1027-1030.
- [16] 胡金祥. 白茶理化成分的分析与花色苷的结构鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
HU J X. Analysis of physical and chemical components of white tea and structural identification of anthocyanin [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [17] 寻坚兰. 琥珀酸噁唑西汀高效液相色谱分析方法开发[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
XUN J L. Developing A method for the determination of esreboxetine succinate by high performance liquid chromatography [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018.
- [18] 殷月芬, 张晓理, 陈军辉, 等. 高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析蟾酥有效成分[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(8): 623-627.
YIN Y F, ZHANG X L, CHEN J H, et al. Rapid quantification and identification of bioactive components in venenum bufonis by HPLC-DAD/ESI-TOF-MS [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2009, 44(8): 623-627.

(上接第516页)

- 邓小玲(广东省疾病预防控制中心)
卢江(国家食品安全风险评估中心)
匡华(江南大学食品学院)
朱心强(浙江大学医学院)
刘弘(上海市疾病预防控制中心)
刘长青(河北省疾病预防控制中心)
刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
孙长颢(哈尔滨医科大学)
李宁(国家食品安全风险评估中心)
李黎(中华预防医学会)
李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
杨方(福州海关技术中心)
杨钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
杨大进(国家食品安全风险评估中心)
杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
肖荣(首都医科大学公共卫生学院)
吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
何更生(复旦大学公共卫生学院)
何来英(国家食品安全风险评估中心)
何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
赵舰(重庆市疾病预防控制中心)
赵云峰(国家食品安全风险评估中心)
赵贵明(中国检验检疫科学研究院)
钟凯(科信食品与营养信息交流中心)
姜毓君(东北农业大学食品学院)
聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
徐娇(国家卫生健康委员会食品标准与监测评估司)
徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
高志贤(军事科学院军事医学研究院)
郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
黄薇(深圳市疾病预防控制中心)
黄锁义(右江民族医学院药学院)
常凤启(河北省疾病预防控制中心)
崔生辉(中国食品药品检定研究院)
章宇(浙江大学生物工程与食品学院)
章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
程树军(广州海关技术中心)
傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
赖卫华(南昌大学食品学院)
裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
樊永祥(国家食品安全风险评估中心)