

四级杆串联质谱分析苯嘧磺隆污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平

周婧 王洪兰 马宏跃* 闫文丽 龚艳 钱珺 段金廛 吴启南*

(南京中医药大学药学院,江苏省中药资源产业化协同创新中心,南京 210023)

摘要 研究了除草剂苯嘧磺隆皮肤接触污染对中华大蟾蜍分泌蟾酥化学品质的影响。蟾酥样品经甲醇提取,以乙腈-1%甲酸水溶液为流动相,液相色谱(反相 C_{18} 柱)分离、串联质谱(LC-MS/MS)分析检测。质谱条件为:MRM 模式,脱溶剂温度 500°C ,碰撞电压 30 eV ,锥孔电压为 30 V 。结果表明,建立的 LC-MS/MS 测定方法对 6 种蟾蜍甾烯标准物质的检出限为 $0.42\sim 4.86\text{ ng/mL}$,相关系数 $R^2=0.9953\sim 0.9992$,日内和日间 RSD 为 $3.8\%\sim 6.8\%$ 和 $4.0\%\sim 8.8\%$;加样回收率为 $96.9\%\sim 109.6\%$,相对标准偏差为 $2.0\%\sim 8.1\%$ 。应用此方法检测了 36 种蟾蜍甾烯化合物,有 20 余种化合物自身质谱积分面积在苯嘧磺隆污染前后发生改变,苯嘧磺隆皮肤接触污染可以改变蟾蜍耳后腺蟾酥毒素的表达模式。本方法可应用于蟾蜍甾烯类物质检测。

关键词 中药资源学;蟾蜍;苯嘧磺隆;蟾酥

1 引言

蟾酥为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺的干燥分泌物。以往研究显示,蟾酥化学质量差异较大^[1-2],不同产地商品中蟾蜍甾烯类成分含量相差数倍至数十倍。其原因除了遗传因素外,环境影响尤为重要。据调查,中药材蟾酥主要来自于野生蟾蜍,蟾蜍皮肤具有通透性,对环境重金属、农药、生活(工业)污水敏感^[3],是环境科学研究的前哨物种。污染物能在蟾蜍体内蓄积和放大,但是污染物对蟾蜍耳后腺分泌物形成的影响研究甚少。

蟾酥主要含有强心苷类蟾蜍甾烯化合物,其含量测定方法大体可分为有 LC-UV 和 LC-MS 两类。MS 在蟾蜍甾烯定性鉴别和定量灵敏度方面均显著优于 UV 方法。已有学者采用 Q-TOF 和 LTQ-Orbitrap 对多种蟾蜍甾烯的质谱二级裂解模式进行特征和含量分析^[3-10]。在此基础上,本研究采用四级杆串联质谱对蟾酥中 36 种蟾蜍甾烯进行检测,以质谱积分面积表示每种蟾蜍甾烯化合物在不同样本组间的相对含量(化合物自身比较)并结合数学模式识别方法,评估苯嘧磺隆污染前后蟾蜍分泌蟾酥化学性质的变化。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

Waters Xevo-TQ 三重四极杆质谱仪,配备 Acquity UPLC 系统(包括四元泵溶剂系统、在线脱气机和自动进样器),同时配有 Waters Masslynx V4.1 数据工作站(美国 Waters 公司);低温超高速离心机(美国 Thermo 公司);离心浓缩仪、冷冻干燥仪(Labconco 公司);EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司);电子分析天平(上海精密仪器厂);蟾蜍甾烯标准品 Cinobufotalin, Resibufagenin, Gamabufotalin, Hellebrigenin, Cinobufagin 和 Bufotalin 按文献[1]报道方法分离制备,高效液相色谱鉴定纯度大于 95%;苯嘧磺隆(丁贝生物公司)。中华大蟾蜍(捕于南京周边)。

2.2 苯嘧磺隆污染蟾蜍的分组与取样

中华大蟾蜍 30 只,产地为江苏省,均分成 3 组,组间个体无显著差异。配制苯嘧磺隆低剂量组(0.15 g/L),高剂量组(0.3 g/L)及正常组(0 g/L)。中华大蟾蜍饲养在含或不含苯嘧磺隆的水溶液中。用分析天平称取苯嘧磺隆 0.15 和 0.30 g ,加到 1 L 盛有隔夜自来水的烧杯中,搅拌,使之充分溶解。待蟾蜍取食完毕后,将上述配好的药液倒入蟾蜍培养箱中,培养 2 天后,倒掉培养箱中原液,把培养箱冲洗

2015-01-15 收稿;2015-06-14 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 81102762, 3901894, 81274199),江苏省中药资源产业化过程协同创新中心基金(No. ZDXM-1-14),江苏省六大人才高峰 C 类(No. YY-015),江苏高校优势学科建设工程资助项目(No. PAPD) 资助

* E-mail: hongyuema@126.com; qnwyjs@163.com

干净 给蟾蜍喂食 待取食完毕后 加入药液 如此反复 培养半个月。抓取蟾蜍 称体重。用包裹胶布的镊子挤压蟾蜍耳后腺 使蟾酥喷溅到载玻片上 将鲜酥刮至 EP 管中 冷冻干燥 记录冻干前后蟾酥的重量。

2.3 供试品溶液的制备

将干燥后的蟾酥样本于研钵中研磨成粉末(未过筛) 每个样本准确称取 10 mg 置于玻璃试管中 分别准确加入 5 mL 甲醇 保鲜膜封口 超声提取 30 min 冷却后经 0.22 μm 滤膜过滤 作为供试品溶液。

2.4 色谱/质谱条件

ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35.0 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.4 mL/min; 进样量 5 μL ; 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0 ~ 2 min, 20% ~ 30% B; 2 ~ 6 min, 30% ~ 35% B; 6 ~ 9 min, 35% ~ 60% B; 9 ~ 10 min, 60% ~ 95% B; 10 ~ 11 min, 95% B; 11 ~ 11.20 min: 95% ~ 20% B。

离子源为电喷雾离子源(ESI) 正离子模式检测; 质量扫描范围为 MS^1 : 20 ~ 1974 Da, MS^2 : 2 ~ 2048 Da; 扫描速率为 M1 : 100 ~ 2000 amu/s, M2 : 100 ~ 10000 amu/s; 毛细管电压为 3.00 kV; 锥孔电压为 30.00 V; 离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气体流速为 998 L/h; 脱溶剂温度 500 $^{\circ}\text{C}$ 。参考文献 [8 ~ 15] 总结蟾蜍甾烯化合物的分子离子和子离子 经 UPLC-MS/MS 预测 选取 36 种化合物(表 1) 其响应较强、干扰较小的两对子离子可用于定性分析 目标化合物检测离子对碰撞电压(CE) 统一设置为 30 eV, 可以满足蟾酥生药中蟾蜍甾烯的测定。

表 1 蟾蜍甾烯化合物信息表

Table 1 Bufadienolides detected by UPLC-MS/MS and multi-reactions monitoring(MRM) technology

化合物 Compounds	保留时间 Retention time (min)	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	化合物 Compounds	保留时间 Retention time (min)	MS (m/z)	MS/MS (m/z)
Resibufogenin	8.11	385	367	Dehydratedcinobufagin	10.29	425	365
Bufalin	6.88	387	255	Cinobufagin	8.14	443	365
Resibufagin	5.07	399	363	Bufotalin	4.91	445	349
12 β -Hydroxylresibu- fogenin	3.67	401	365	19-Oxo-cinobufagin	5.27	457	361
19-Oxo-bufalin	4.03	401	365	Cinobufaginol	3.36	459	363
Desacetylcinobufagin	4.98	401	365	12 β -Hydroxylcinobufagin	4.67	459	381
Marinobufagin	5.53	401	365	Cinobufotalin	5.53	459	363
Gamabufotalin	2.19	403	349	19-Oxo-cinobufotalin	3.74	473	377
19-Hydroxylbufalin	2.81	403	349	Bufalin-3-succinate-arginine ester	4.39	643.3	275.1
Desacetylbufotalin	3.23	403	349	Bufalin-3-adipate-arginine ester	6.28	671.4	303.2
1 β -Hydroxylbufalin	3.67	403	367	Resibufogenin-3-pimelate-arginine ester	8.04	683.4	317.2
Telocinobufagin	4.59	403	349	Resibufogenin-3-suberate-arginine ester	8.52	697.4	331.1
19-Oxo-desacetyl- cinobufagin	2.64	415	333	Cinobufagin-3-succinate-arginine ester	6.14	699.3	275.1
Bufotalinin	3.57	415	333	Cinobufaginol-3-succinate-arginine ester	3.25	715.4	275.1
Arenobufagin	1.97	417	399	Telocinobufagin-3-suberate-arginine ester	3.88	715.4	331.2
Hellebrigenin	2.82	417	399	Gamabufotalin-3-suberate-arginine ester	5.42	715.4	331.2
Desacetylcinobufotalin	3.05	417	335	Cinobufagin-3-adipate-arginine ester	7.62	727.4	303.2
Hellebrigenin-3-suber- ate-arginine ester	3.79	729.4	331.2	Cinobufagin-3-suberate-arginine ester	8.53	755.4	331.2

2.5 数据处理

采用 Waters 公司的 MarkerLynx XS 软件进行数据的组间比较 用偏最小方差判别分析(PLS-DA) 模型对正常对照组和污染组进行模式识别 利用有监督的 OPLS-DA 模型排除与样品分类无关的信息 得到变量权重值(Variable important in projection, VIP)。标记的为 $\text{VIP} > 1$ 的变量 具有统计学意义 其中 $p[1]$ 绝对值越大 对组间差异的贡献度越大; $p(\text{corr})$ 绝对值越大 分析结果的置信度越高。同时筛选含量差异为 1.5 倍以上的甾体物质为组间差异标志物。实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 结果与讨论

3.1 蟾蜍甙烯类化合物的质谱检测

采用多反应检测模式(MRM)对蟾酥中蟾蜍甙烯水平进行测定。蟾蜍甙烯在阳离子模式下的质谱信号相应优于阴离子模式。基于文献报道^[3~7]和本研究组研究确证,共收集了30余种蟾蜍甙烯类化合物的离子对信息用于MRM模式检测(表1)。蟾蜍甙烯类化合物具有相同的6-元内酯环甙体母核,母核上有羟基、醛基、环氧基、乙酰基等基团取代,在二级质谱碎裂时产生有规律性的裂解特征。图1是UPLC-Q-TOF测定蟾酥总离子流图,图2为蟾酥中含量较高3种质控成分质谱二级碎裂图谱。如Resibufogenin, $[M+H]^+$ 385, $[M+H-H_2O]^+$ 367, $[M+H-2H_2O]^+$ 349, $[M+H-2H_2O-C_5H_4O_2]^+$ 253; Cinobufagin, $[M+H]^+$ 443, $[M+H-CH_2CO]^+$ 401, $[M+H-HOAc]^+$ 383, $[M+H-HOAc-H_2O]^+$ 365, $[M+H-HOAc-2H_2O]^+$ 347。3种蟾蜍甙烯MS/MS图均显示,母离子脱去 H_2O (18 Da)和CO(28 Da)是一种显著的裂解特征;当蟾蜍甙烯存在乙酰基取代时,母离子可以脱去HOAC(60 Da)或 $C_5H_4O_2$ 。使用不同的离子对信息(母离子/子离子)可以区分蟾蜍甙烯化合物;对于具有相同离子对信息的物质,根据其色谱保留时间不同,进一步区分。图3为蟾酥中代表性化合物的离子流提取色谱图。

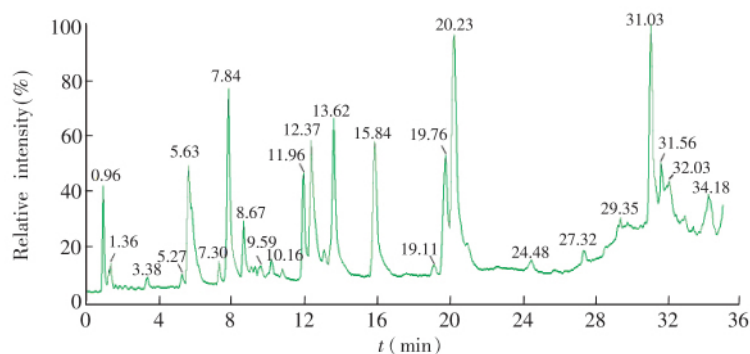


图1 UPLC-Q-TOF测定蟾酥的总离子流图

Fig. 1 Total ion current (TIC) chromatogram of Venenum Bufonis (Chansu) by UPLC-Q-TOF

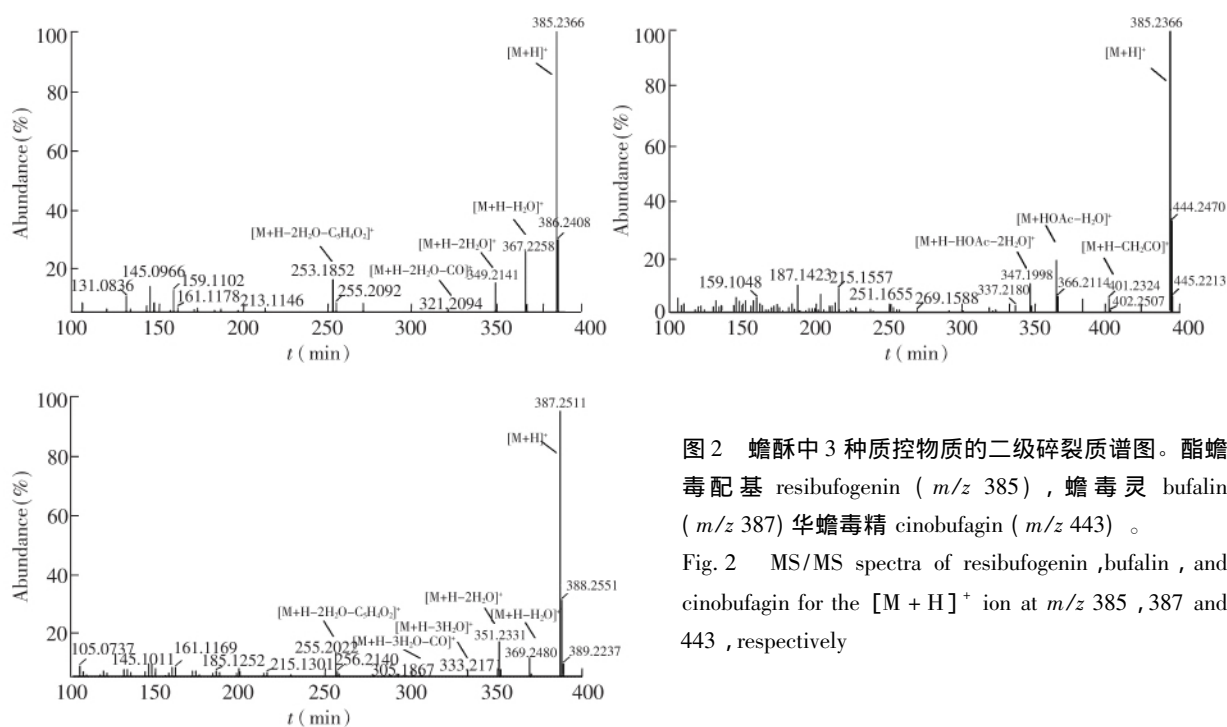


图2 蟾酥中3种质控物质的二级碎裂质谱图。酯蟾毒配基 resibufogenin (m/z 385), 蟾毒灵 bufalin (m/z 387) 华蟾毒精 cinobufagin (m/z 443)。

Fig. 2 MS/MS spectra of resibufogenin, bufalin, and cinobufagin for the $[M+H]^+$ ion at m/z 385, 387 and 443, respectively

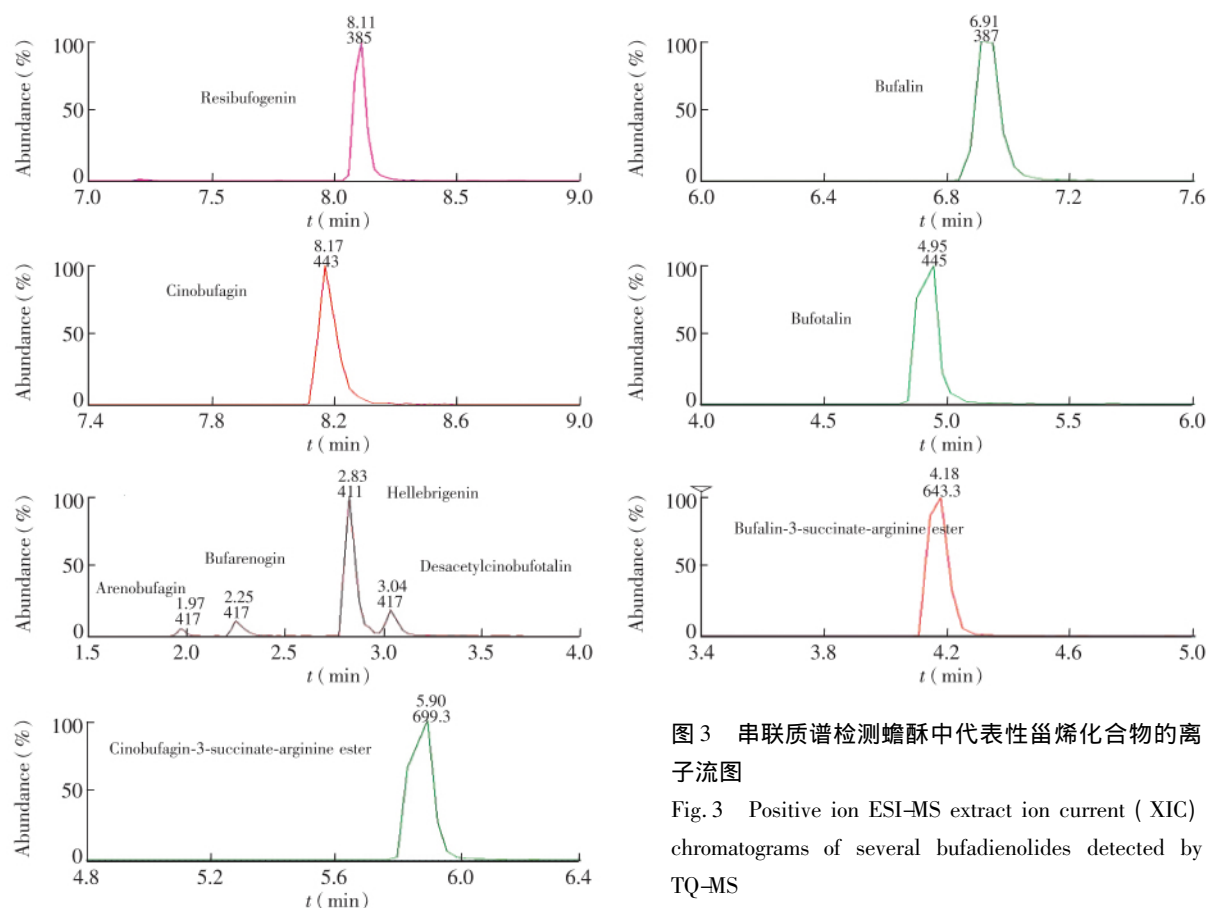


图 3 串联质谱检测蟾酥中代表性甾萜化合物的离子流图

Fig. 3 Positive ion ESI-MS extract ion current (XIC) chromatograms of several bufadienolides detected by TQ-MS

3.2 蟾蜍甾萜类化合物测定方法学考察

配制不同浓度的混标物的甲醇溶液(16, 80, 400, 2000 和 10000 ng/mL), 以峰面积为纵坐标(y), 标准品溶液质量浓度(ng/mL)为横坐标(x) 绘制标准曲线。由表 2 可知, 所有测试标准化合物在测试浓度内具有良好的线性关系($R^2 = 0.9953 \sim 0.9992$)。按信噪比(S/N)为 3 计算检出限(LOD)为 0.42 ~ 4.86 ng/mL, 按 $S/N = 10$ 计算定量限(LOQ)为 1.41 ~ 16.20 ng/mL。对于日内精密度考察, 将混合标准品溶液(2000 ng/mL)连续进样 6 次分析, 以峰面积计算 RSD 为 3.8% ~ 6.8%; 3 天连续测定的日间精密度 RSD 为 4.0% ~ 8.8%, 表明仪器测定结果稳定。进一步将蟾酥样品溶液于 4°C 条件下存放 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h, 测定蟾酥中 6 种蟾蜍甾萜的含量标准偏差在 2.4% ~ 8.4%, 说明待测试的蟾酥样品溶液在 4°C 存放条件下质量稳定。对于加样回收率测试, 准确称取已知含量的蟾酥粉末 2 mg, 加入 1 mL 混合标准溶液(浓度 2000 ng/mL), 1 mL 甲醇, 按 2.3 节制备供试品溶液测定, 计算得 6 种标准甾萜化合物的加标回收率在 96.9% ~ 109.6% 之间, 相对标准偏差 RSD 在 2.0% ~ 8.1% 之间。

表 2 代表性蟾蜍甾萜含量测定方法学考察

Table 2 Calibration curves, linear ranges, sensitivity, precision, stability and accuracy of 6 standard compounds

标准物质 Standard substance	标准曲线 Linear equation	R^2	检出限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)	线性范围 Linear range	精密度 Precision (%)		稳定性 Stability (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
						日内 Intra-day ($n=6$)	日间 Inter-day ($n=6$)			
Cinobufotalin	$y = 1.1112x - 93.228$	0.9988	2.29	7.66	16 ng ~ 10 μg	5.5	4.8	2.4	96.9	7.5
Resibufagenin	$y = 0.2553x + 214.59$	0.9979	4.86	16.20	16 ng ~ 10 μg	4.1	4.7	8.4	106.6	6.1
Gamabufotalin	$y = 0.5065x + 75.415$	0.9996	4.53	15.12	16 ng ~ 10 μg	5.9	4.2	2.1	109.6	8.1
Hellebrigenin	$y = 4.2222x + 870.01$	0.9979	0.52	1.73	16 ng ~ 10 μg	3.8	4.0	4.9	101.5	6.6
Cinobufagin	$y = 0.7020x + 424.92$	0.9991	4.57	15.25	16 ng ~ 10 μg	6.8	8.8	6.1	98.2	2.0
Bufotalin	$y = 1.9898x + 1144.1$	0.9992	0.42	1.41	16 ng ~ 10 μg	6.5	6.5	3.7	103.5	4.3

3.3 不同浓度苯噻磺隆污染对中华大蟾蜍分泌蟾酥的化学质量的影响

在上述色谱-质谱条件下,蟾蜍甾烯通过质谱响应的积分面积进行相对定量(表3)。与正常组相比较,苯噻磺隆污染组的蟾蜍分泌蟾酥的化学质量明显不同,苯噻磺隆低剂量组中,7种游离型蟾蜍甾烯、2种结合型蟾蜍甾烯水平发生1.5倍上调,6种游离型蟾蜍甾烯、3种结合型蟾蜍甾烯的水平发生1.5倍下调。在苯噻磺隆高剂量组,9种游离型蟾蜍甾烯、2种结合型蟾蜍甾烯水平发生1.5倍上调,3种游离型蟾蜍甾烯、4种结合型蟾蜍甾烯的水平发生1.5倍下调。

表3 苯噻磺隆污染对蟾蜍分泌蟾酥中游离和结合型蟾蜍甾烯的水平(质谱积分面积)的影响($n=10$)

Table 3 Effects of bensulfuron pollution on the the levels of free and conjugated type bufadienolides ($n=10$)

物质名称 Substances	保留时间 Retention time (min)	正常 Normal	低剂量 Group 1 (150 mg/L)	高剂量 Group 2 (300 mg/L)
Arenobufagin	1.97	400 ± 347	428 ± 231	284 ± 187
Gamabufotalin	2.19	10237 ± 6350	15690 ± 9540	11106 ± 6500
19-Hydroxylbufalin	2.81	306 ± 202	440 ± 265	627 ± 746
Hellebrigenin	2.82	61511 ± 33850	67302 ± 34840	80923 ± 66080
Desacetylcinobufotalin	3.05	6072 ± 7497	2425 ± 3630	9525 ± 7263
Desacetylbufotalin	3.23	1470 ± 2800	1003 ± 804	2440 ± 3190
Cinobufaginol	3.36	949 ± 1860	359 ± 337	346 ± 166
Bufotalinin	3.57	295 ± 44	190 ± 126	379 ± 303
12β-Hydroxylresibufogenin	3.67	453 ± 724	470 ± 331	289 ± 259
1β-Hydroxylbufalin	3.67	201 ± 177	300 ± 282	345 ± 251
19-Oxo-cinobufotalin	3.74	476 ± 407	282 ± 208	808 ± 571
19-Oxo-bufalin	4.03	820 ± 1006	1408 ± 1250	1465 ± 1890
Telocinobufagin	4.59	11071 ± 11840	7673 ± 11460	20107 ± 6860
12β-Hydroxylcinobufagin	4.67	578 ± 521	797 ± 556	637 ± 495
Bufotalin	4.91	76136 ± 18540	88778 ± 27900	89949 ± 31420
Desacetylcinobufagin	4.98	880 ± 285	1678 ± 450	760 ± 334
Resibufagin	5.07	1694 ± 2740	1167 ± 744	600 ± 478
19-Oxo-cinobufagin	5.27	1292 ± 120	1416 ± 985	841 ± 369
Marinobufagin	5.53	1823 ± 3830	1642 ± 1590	1711 ± 2210
Cinobufotalin	5.53	34355 ± 47910	27599 ± 37060	41907 ± 19070
Monohydroxylbufotalin	5.54	1359 ± 1976	968 ± 1261	1425 ± 810
Bufalin	6.88	188067 ± 45080	254317 ± 69510	188541 ± 43090
Resibufogenin	8.11	31700 ± 24206	40091 ± 9980	24305 ± 14960
Cinobufagin	8.14	46589 ± 14281	55477 ± 13400	41362 ± 11980
Dehydratedcinobufagin	10.29	8926 ± 672	1186 ± 716	778 ± 599
Bufalin-3-succinate-arginine ester	4.39	190452 ± 179920	303980 ± 123860	216499 ± 126360
Bufalin-3-adipate-arginine ester	6.28	7301 ± 7695	8575 ± 4140	2920 ± 1104
Resibufogenin-3-pimelate-arginine ester	8.04	29110 ± 30140	35783 ± 21190	13207 ± 10052
Resibufogenin-3-suberate-arginine ester	8.52	74177 ± 100970	63978 ± 48880	41585 ± 17970
Cinobufagin-3-succinate-arginine ester	6.14	134376 ± 92190	172825 ± 169160	109803 ± 133270
Cinobufaginol-3-succinate-arginine ester	3.25	4348 ± 10110	1867 ± 2427	3588 ± 5530
Telocinobufagin-3-suberate-arginine ester	3.88	44906 ± 41830	36016 ± 16640	42717 ± 40230
Gamabufotalin-3-suberate-arginine ester	5.42	81760 ± 81410	45857 ± 42060	142804 ± 122110
Cinobufagin-3-adipate-arginine ester	6.83	301 ± 220	539 ± 596	261 ± 313
Hellebrigenin-3-suberate-arginine ester	3.79	11752 ± 15530	2995 ± 1760	21601 ± 29620
Cinobufagin-3-suberate-arginine ester	8.53	12370 ± 19410	8248 ± 4950	10264 ± 7140

将上述不同组别的蟾蜍甾烯的含量数据导入 MassLynx V4.1 software (Waters Corp., Milford, USA)

软件,进行数据的主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。由于蟾蜍耳后腺分泌的蟾酥的化学质量存在较大的组内差别,采用无监督的PCA方式不能对正常组蟾酥和苯嘧磺隆污染组蟾酥进行组间的分离。进一步采用有监督的PLS-DA统计方法进行了组间的区分(图4)。其中变量权重值(Variable important in projection, VIP) > 1的变量,具有统计学意义,其中 $p[1]$ 绝对值越大,对组间差异的贡献度越大; $p(\text{corr})$ 绝对值越大,分析结果的置信度越高,同时变量指标平均含量差异发生1.5倍以上改变的甙体物质为组间差异标志物,总计16种差异标志物。可见,苯嘧磺隆污染会使蟾酥毒素的表达模式发生改变。

4 结论

蟾蜍耳后腺的分泌物是蟾蜍受到外界刺激,合成并分泌的具有自我保护作用的毒性物质。作为常用抗肿瘤中药,其化学质量波动常影响临床用药的有效性与安全性。采用建立的蟾酥甙体质谱检测方法对不同剂量除草剂苯嘧磺隆污染蟾酥的蟾酥质量评价。结果表明,正常组和苯嘧磺隆组中大部分甙体物质可以被定性检测和相对定量分析,苯嘧磺隆污染组中多种蟾酥甙体表达模式出现明显改变,进一步加大了蟾酥的质量不稳定性,增加用药风险。虽然苯嘧磺隆污染影响蟾酥甙体表达的原因尚不清楚,推测苯嘧磺隆可能抑制或刺激了蟾蜍耳后腺中合成蟾酥甙体的相关酶系,使得蟾酥甙体生物合成受到影响。总之,本文所建立的四级杆串联质谱测定蟾酥甙体类成分的方法具有灵敏、快速、稳定的特点,能有效满足不同条件下蟾蜍耳后腺分泌物中蟾酥甙体成分的质量评价要求。

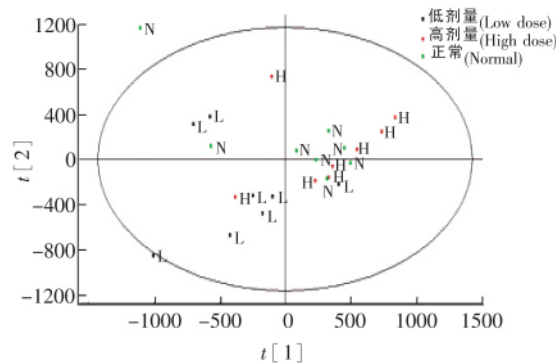


图4 不同污染组蟾酥泌酥中蟾酥甙体类物质的 PLS-DA 分组图

Fig. 4 Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plot of bufadienolide levels between the normal and polluted groups.

References

- Zhang P, Cui Z, Liu Y, Wang D, Liu N, Yoshikawa M. *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53(12): 582-586
- Ye M, Guo H Z, Han J, Guo D A. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 838(2): 86-95
- DONG Ai-Hua, JIA Xiu-Ying, MA Xiao-Mei. *Chinese J. Zoology*, **2003**, 38(6): 24-27
董爱华, 贾秀英, 马小梅. *动物学杂志*, **2003**, 38(6): 24-27
- Ye M, Guo D A. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **2005**, 19(13): 1881-1892
- HE Jing, LI Yan, SI Nan, ZHAO Hai-Yu, BIAN Bao-Lin, WANG Hong-Jie. *Acta Pharm. Sin.*, **2014**, 49(10): 1446-1450
贺晶, 李艳, 司南, 赵海誉, 边宝林, 王宏洁. *药学学报*, **2014**, 49(10): 1446-1450
- Jing J, Ren WC, Li C, Bose U, Parekh HS, Wei MQ. *Biomed. Chromatogr.*, **2013**, 27(6): 685-687
- Hu Y, Yu Z, Yang Z J, Zhu G, Fong W. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2011**, 56(2): 210-220
- Wang Y M, Li Z Y, Wang J J, Wu X Y, Gao H M, Wang Z M. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2015**, 17(4): 364-76
- Wang S, Peng C, Jiang P, Fu P, Tao J, Han L, Huang H, Chang W, Li L, Zhang W, Liu R. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 15(967): 255-63
- HAN Ling-Yu, SI Nan, LIU Jun-Qiu, ZHAO Hai-Yu, YANG Jian, BIAN Bao-Lin, WANG Hong-Jie. *Acta Pharm. Sin.*, **2014**, 49(2): 244-248
韩玲玉, 司南, 刘俊秋, 赵海誉, 杨健, 边宝林, 王宏洁. *药学学报*, **2014**, 49(2): 244-248
- Li X, Guo Z, Wang C, Shen A, Liu Y, Zhang X, Zhao W, Liang X. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 92: 105-113
- Gao H Zeh M, Leitner A, Wu X, Wang Z, Kopp B. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, 131(2): 368-76
- Ma H, Zhou J, Shang E, Zhang J, Lu W, Zhan Z, Qian D, Duan J, Fan X. *Toxicol. In Vitro.*, **2013**, 27(1): 396-401
- Li X, Guo Z, Wang C, Shen A, Liu Y, Zhang X, Zhao W, Liang X. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 92: 105-113
- Jing J, Ren W C, Li C, Bose U, Parekh H S, Wei M Q. *Biomed. Chromatogr.*, **2013**, 27(6): 685-687

Effect of Bensulfuron Pollution on Levels of Bufadienolides from Venom Secreted by Toad

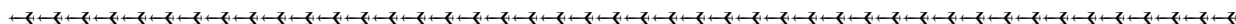
ZHOU Jing, WANG Hong-Lan, MA Hong-Yue*, YAN Wen-Li, GONG Yan, QIAN Jin, DUAN Jin-Ao, WU Qi-Nan*
(*Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, College of Pharmacy,
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

Abstract Ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to monitor the relative levels of bufadienolides in toad venom in normal and bensulfuron-polluted groups. Methanol extract of toad venom was separated by UPLC (ODS-C₁₈) using a gradient elution of water contains 0.1% formic acid and acetonitrile. Mass spectrometry was used in an ESI source operated in positive ion and MRM mode. The parameters in the source were set as follows: capillary voltage 3.0 kV; sampling cone voltage 30 V; and desolvation temperature 500°C. In this method, external calibrations of 6 standards were typically constructed ($R^2 = 0.9953 - 0.9992$). The LOD was 0.42 - 4.86 ng/mL. Intra- and inter-day precision was 3.8% - 6.8% and 4.0% - 8.8%, respectively. The recovery of standard was evaluated by spiking the standard compound into toad venom. Their average recoveries were 96.9% - 109.6%, and RSDs were 2.0% - 8.1%. This method was further employed into monitoring the levels of 36 bufadienolides. The levels of more than 20 bufadienolides were greatly different after bensulfuron pollution, suggesting that the bensulfuron pollution could change the chemical expression pattern of bufadienolides in toad venom.

Keywords Chinese resources; Toad; Bensulfuron; Venenum Bufonis

(Received 15 January 2015; accepted 14 June 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81102762, 3901894, 81274199)



《冶金分析》2016 年征订启事

国内统一刊号: CN11-2030/TF

国际标准刊号: ISSN1000-7571

国际 CODEN: YEFEEF

邮发代号: 82-157

国外代号: 1579M

京海工商广字第 8276 号

《冶金分析》是由中国钢研科技集团有限公司和中国金属学会主办的冶金领域中权威的分析技术专业期刊,其办刊宗旨是为广大冶金分析测试工作者搭建学术交流平台。自 1981 年创刊以来,《冶金分析》以高度的创新精神和严谨的科学态度,动态反映冶金领域分析测试新技术、新方法、先进经验,报导研究成果,发表综述文章,并介绍国内外冶金分析动态等。适合于冶金、矿山、石油、化工、机械、地质、环保、商检等部门技术人员和大专院校师生参考。《冶金分析》是中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库的核心库期刊、全国中文核心期刊、美国“CA”千种表中国化工类核心期刊,并为荷兰 SCOPUS 数据库、美国《剑桥科学文摘》、英国《皇家化学学会系列文摘》、中国知网(CNKI)、万方数据资源系统、中文科技期刊数据库等国内外知名数据库所收录。

多年来《冶金分析》的影响因子等重要学术评价指标在冶金工程技术类及分析测试技术类期刊中一直居于前列。据 2013 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版),本刊 2012 年度影响因子为 0.536,在“冶金工程技术”类期刊中名列第 2;在 1998 种中国科技核心期刊中,本刊综合评价总排名第 218。

《冶金分析》为月刊,大 16 开,单期页码为 80 页,定价 15.00 元,全年 12 期,180.00 元。全国各地邮局发行,如有漏订的单位和读者,请直接与编辑部联系。

欢迎订阅! 欢迎投稿! 欢迎刊登广告!

电话: 010-62182398 地址: 北京海淀区学院南路 76 号 邮编: 100081

网址: <http://journal.yejinfenxi.cn>; <http://www.chinamet.cn>

E-mail: yjfx@analysis.org.cn; yjfx@chinajournal.net.cn