

· 化学与分析 ·

液质联用技术评估汞接触污染蟾蜍泌酥中 蟾蜍甾烯水平

牛会霞, 周婧, 马宏跃*, 钱大玮, 王佳佳

(南京中医药大学药学院, 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] 目的:运用液质联用技术研究重金属汞皮肤接触中华大蟾蜍后生理状态及泌酥中蟾蜍甾烯水平变化,为中药蟾酥品质评价提供参考。方法:配制不同质量浓度的氯化汞溶液(0.5, 0.75, 1.0 g·L⁻¹)对蟾蜍进行半静水式处理,观察其生理状态,且在 30 d 后收集蟾蜍耳后腺分泌液,进一步采用液相-质谱联用技术测定蟾蜍泌酥中游离型蟾蜍甾烯的水平,结合 Hem1 热图软件进行数据分析。结果:氯化汞接触明显影响蟾蜍泌酥中蟾蜍甾烯水平,和正常组比较,低质量浓度(0.5 g·L⁻¹)汞污染组有 20 种蟾蜍甾烯水平明显上调,其中有 12 个物质发生 1.5 倍变化。而中质量浓度(0.75 g·L⁻¹),高质量浓度(1.0 g·L⁻¹)污染组分别有 15, 13 种物质发生下调,且大部分为中低脂溶性蟾蜍甾烯(异沙蟾毒精、去乙酰华蟾毒精等)。结论:重金属汞污染对蟾蜍甾烯水平有潜在影响,且随着浓度的升高呈现明显降低趋势。

[关键词] 汞离子; 液质联用; 蟾蜍甾烯; 蟾蜍; 泌酥

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0039-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100039

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170307.1606.002.html>

[网络出版时间] 2017-03-07 16:06

Assessing Mercury Pollution Impacts on Levels of Bufadienolides Based on LC-MS/MS

NIU Hui-xia, ZHOU Jing, MA Hong-yue*, QIAN Da-wei, WANG Jia-jia

(Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese
Medicine Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal
Resources Industrialization, College of Pharmacy, Nanjing University of
Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of HgCl₂ pollution on the physiological status and bufadienolides level of toad by using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), and provide references for quality evaluation of Chinese medicine venenum bufonis. **Method:** The different concentrations of HgCl₂ solution (0.5, 0.75 and 1.0 g·L⁻¹) were prepared to treat the toad with semi-static water method, and then their physiological status was observed. Venenum bufonis was collected after 30 days. Furthermore, ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry was used to determine the level of bufadienolides in toad

[收稿日期] 20161226(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102762, 3901894, 81274199);江苏省方剂高技术研究重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目(FJGS-2015-15, ZDXM-1-14);江苏省科技厅产学研项目(BY2015008-01);江苏省六大人才高峰 C 类项目(YY-015);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

[第一作者] 牛会霞,在读硕士,从事中药效应物质基础研究, E-mail:1035225319@qq.com

[通讯作者] *马宏跃,博士,副教授,从事中药动物药与化学生物学研究, E-mail:hongyuema@126.com

venom and HemI heat map software was used for data analysis. **Result:** The results showed that HgCl₂ solution could significantly influence the bufadienolides level. As compared with normal group, 20 kinds of bufadienolides were up-regulated in low concentration (0.5 g · L⁻¹) Hg²⁺ exposure group, and there were 12 kinds of bufadienolides with 1.5 fold change. However, 15 kinds of bufadienolides in 0.75 g · L⁻¹ Hg²⁺ exposure group and 13 kinds in 1.0 g · L⁻¹ Hg²⁺ exposure group were down-regulated, and most of them were medium and low fat-soluble toad steroids (bufarenogin, dehydrated cinobufagin, etc.). **Conclusion:** These illustrated that Hg²⁺ exposure could affect the levels of bufadienolides in toad venom, showing an obvious decrease tendency with the increase of HgCl₂ solution concentration.

[**Key words**] Hg²⁺; LC-MS/MS; bufadienolides; *Bufo bufo gargarizans*; secrete Bufonis Venenum

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍的耳后腺或皮肤腺分泌的白色浆液,经收集加工而成。现代药理研究表明其具有抗肿瘤、强心、镇痛、抗炎等作用。蟾酥化学成分复杂,其中蟾蜍甾烯类及吲哚生物碱类被认为具有抗肿瘤和强心的有效成分^[1]。作为传统中药,商品蟾酥质量差异较大,研究发现不同产地蟾酥药材化学成分存在明显变化,北方相对较高,推测与不同地区水质相关^[2-4]。研究表明重金属通过与生物大分子的特殊结构进行配位结合,使其丧失生物活性,从而影响机体正常活动。另外,蟾蜍皮肤具有通透性,研究发现一定浓度的重金属、农药等均对蟾蜍肝脏中的活性酶有极大影响^[5]。但重金属污染对蟾蜍泌酥中化学成分影响研究较少。

课题组前期研究发现,在除草剂苄嘧磺隆及重金属铅的暴露下,蟾蜍耳后腺分泌物蟾蜍甾烯的水平发生明显改变^[6]。故推测环境污染有可能干预蟾蜍分泌物蟾蜍甾烯的水平。鉴于此,本文采用液质联用技术,通过半静水式处理,探讨重金属汞污染对蟾蜍泌酥品质的影响,以期为中药蟾酥质量评价研究提供实验参考。

1 材料

Sciex QTRAP 5500 型液质联用仪(美国 AB 公

司),D3024 型低温超高速离心机(美国 Scilogex 公司),CentriVap 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司),FreeZone 2.5 升型冷冻干燥仪(美国 Labconco 公司),EPED-T 型超纯水系统(南京易普易达科技发展有限公司),FA2004 型电子分析天平(上海精密仪器厂),蟾酥药材,产地为江苏省盐城市,经南京中医药大学中药鉴定教研室周婧老师鉴定为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 的耳后腺或皮肤腺分泌的白色浆液,经收集加工而成。标本存放于本实验室。

2 方法和结果

2.1 重金属汞污染处理及取样 取中华大蟾蜍 40 只,称重,随机平均分成 4 组。第 1 天用胶布包裹镊子挤压蟾蜍耳后腺取酥,然后饲养于不同质量浓度汞溶液及空白隔夜自来水中(汞质量浓度分别为 0.5,0.75,1.0 g · L⁻¹),每 3 d 更换饲养液,饲养 30 d。第 31 天蟾蜍称质量,取酥并冷冻干燥,记录冻干前后蟾酥的质量。

随着汞溶液浓度的升高及污染时间的延长,蟾蜍自发活动程度降低,死亡率有升高趋势。见表 1。重金属汞污染对中华大蟾蜍的蟾酥产量没有显著影响,与正常组比较,低剂量、中剂量污染组蟾酥量略有升高,而高剂量组略有下降。

表 1 不同浓度汞污染对蟾蜍存活率及泌酥的影响(x ± s, n = 10)

Table 1 Effect of mercury pollution on toad survival and production of Bufonis Venenum (x ± s, n = 10)

组别	剂量/g · L ⁻¹	蟾蜍体重/g	鲜品重/mg	干品重/mg	产酥量/mg · g ⁻¹	存活率/%
空白	-	66.19 ± 13.21	43.87 ± 21.24	20.18 ± 11.54	0.31 ± 0.19	80
汞	0.50	69.24 ± 15.01	57.36 ± 14.17	24.48 ± 9.26	0.35 ± 0.22	50
	0.75	71.40 ± 10.54	47.97 ± 19.14	23.51 ± 14.27	0.32 ± 0.24	60
	1.00	68.89 ± 14.33	41.87 ± 9.78	19.25 ± 8.83	0.28 ± 0.11	40

2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取干燥蟾酥 2 mg,精密加入色谱甲醇 1 mL,封口膜密封,冰水浴超声提取 30 min,12 000 r · min⁻¹离心 30 min,取上清液作为供试品溶液。取空白组蟾酥混合样本,同

法制得质量控制样品。

2.3 色谱条件 Phenomenex Synergi Fusion 反相 C₁₈ 色谱柱(2 mm × 50 mm, 2.5 μm),柱温 35.0 °C,流速 0.4 mL · min⁻¹,进样量 2 μL,流动相 0.1% 甲酸

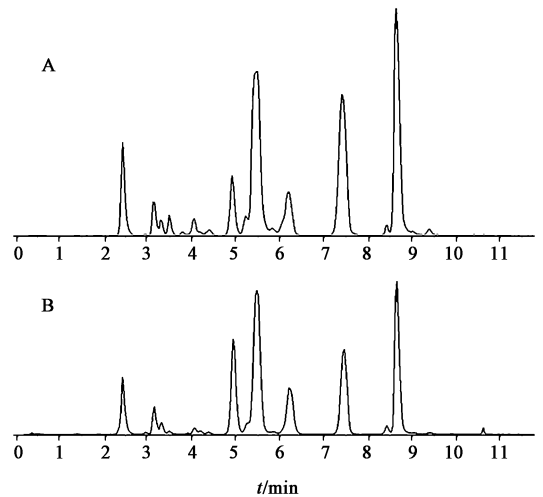
水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 20% ~ 30% B; 2 ~ 6 min, 30% ~ 35% B; 6 ~ 9 min, 35% ~ 60% B; 9 ~ 10 min, 60% ~ 95% B; 10 ~ 11 min, 95% B; 11 ~ 11.20 min, 95% ~ 20% B; 11.20 ~ 12 min, 20% B); 检测波长 296 nm。

2.4 质谱条件 正离子模式下电喷雾离子源 (ESI) 检测, 质量扫描范围 (m/z , MS1 20 ~ 1 974, MS2 2 ~ 2 048), 扫描时间 (M1 100 ~ 2 000 $\text{amu} \cdot \text{sec}^{-1}$, M2 100 ~ 10 000 $\text{amu} \cdot \text{sec}^{-1}$), 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 锥孔电压 30.00 V, 毛细管电压 3.00 kV。各蟾蜍甾烯化合物的母离子和子离子、方法学考察参见文献[7-8], 选用此方法对蟾蜍甾烯进行检测。

2.5 数据处理 采用 AB Software Analysis 1.5.2 软件进行数据提取, excel 进行 t 检验统计处理, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 表示具有统计学意义, 同时筛选含量差异为 1.5 倍以上的甾烯物质为组间差异标志物。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。此外采用 Heml 软件进行聚类分析。

2.6 游离型蟾蜍甾烯类成分的质谱检测 在上述色谱-质谱条件下, 蟾酥的代表性 UPLC-QTRAP 总离子流见图 1 所示, 与空白组相比, 高浓度汞污染组色谱峰响应强度明显降低。对于甾烯类物质, 在二级质谱中 $[M + H]^+$ 被打碎成不同的子离子, 产生有规律性的裂解特征, 一般脱去 H_2O , $2\text{H}_2\text{O}$, CO 等中性分子, 结合文献报道及课题组前期研究, 对游离

型蟾蜍甾烯的特异性二级裂解碎片进行验证, 部分离子信息见表 2^[7-8]。用混合的空白蟾酥样品作为质控样品, 以评估仪器检测的稳定性、可靠性, 参考标准为当 $n = 5$ 时, $\text{RSD} < 5\%$ 。从质控样品中随机选出蟾毒灵 (387), 日蟾毒它灵 (403), 华蟾毒精 (443) 共 3 个母离子, RSD 分别为 4.6%, 3.2%, 1.9%, 均 $< 5\%$, 说明基于本实验的液质联用技术的分析方法是可重复的、稳定的。



A. 空白组; B. $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 汞污染组

图 1 蟾酥的 UPLC-QTRAP 总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatogram of toad venom by UPLC-MS/MS

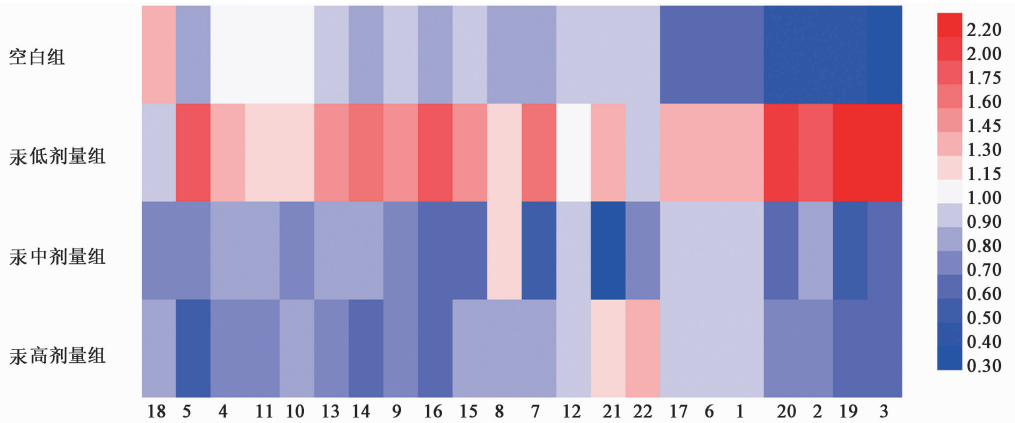
表 2 游离型蟾蜍甾烯类化合物的质谱特征

Table 1 Mass spectrum characteristics of free type bufadienolides

No.	$[M + H]^+$	分子式	MS/MS 碎片	名称
1	385.24	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4$	367.23, 349.22, 253.20	脂蟾毒配基
2	387.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$	369.24, 351.23, 255.21	蟾毒灵
3	399.21	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$	381.21, 335.20, 353.21	脂蟾毒精
4	401.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$	383.29, 365.20, 355.20	12β -羟基脂蟾毒配基
5	401.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$	383.23, 337.24, 319.23	19-氧-蟾毒灵
6	401.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$	365.21, 347.20, 323.20	去乙酰华蟾毒精
7	403.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	385.24, 349.22, 367.23	日蟾毒它灵
8	403.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	385.24, 349.22, 367.23	去乙酰蟾毒它灵
9	403.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	385.28, 349.26, 339.22	远华蟾毒精
10	403.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	385.24, 349.22, 253.19	19-羟基蟾毒灵
11	403.25	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	367.25, 339.22, 253.18	1β -羟基-蟾毒灵
12	417.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	399.22, 363.25, 353.20	噻根草配基
13	417.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	399.22, 371.22, 335.20	沙蟾毒精
14	417.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	399.28, 381.23, 363.20	去乙酰华蟾毒它灵
15	417.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	399.22, 335.20, 363.20	异沙蟾毒精
16	417.23	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	381.24, 371.21, 335.25	伪异沙蟾毒精
17	419.26	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_6$	401.25, 383.20, 365.21	噻根草醇
18	425.24	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_5$	383.22, 365.21, 347.20	去乙酰华蟾毒精
19	443.24	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$	417.23, 363.20, 351.20	华蟾毒精
20	445.26	$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$	385.24, 367.23, 349.21	蟾毒它灵
21	457.22	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7$	415.21, 379.19, 333.18	19-氧-华蟾毒精
22	473.22	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8$	431.21, 395.19, 377.18	19-氧-华蟾毒它灵

2.7 不同浓度重金属汞污染对中华大蟾蜍分泌蟾酥的化学成分的影响 不同浓度重金属汞污染后, 蟾酥中主要蟾蜍甾烯物质的峰面积见表 3。将标准化处理过的数据导入 HemI 软件进行聚类分析, 见图 2。不同颜色代表甾烯物质相对含量的高低, 从蓝色到红色, 含量逐渐升高。根据图直观发现, 低浓度汞污染后, 大部分蟾蜍甾烯出现上调趋势, 而中、高浓度汞污染后, 蟾蜍甾烯出现下调趋势。通过计算不同污染组与空白组的比值, 筛选倍数相差 1.5

倍且含量相对较高的成分作为组间有明显差异的化学标志物。和空白组比较, 汞溶液污染组蟾酥的化学水平明显不同, 低浓度组有 20 种成分上调, 其中有 12 种成分发生 1.5 倍上调。而中、高浓度污染组分别有 15, 13 种成分发生下调。另外发现汞污染处理后, 高脂溶性蟾蜍甾烯(脂蟾毒配基, 华蟾毒精, 蟾毒灵, 蟾毒它灵)水平明显上调 1.5 倍, 而含有羟基侧链的中低脂溶性蟾蜍甾烯普遍下调。见表 3。



图中成分标号与表 2 相同

图 2 不同处理组蟾蜍甾烯水平变化热效应

Fig 2 Heat map showing levels of bufadienolides in different groups

表 3 重金属汞污染蟾蜍分泌蟾酥中游离型蟾蜍甾烯的响应度 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \times 10^5$)

Table 3 Responsivity of mercury pollution on the levels of free type bufadienolides ($\bar{x} \pm s, n = 10, \times 10^5$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	脂蟾毒配基	华蟾毒精	蟾毒灵	蟾毒它灵	脂蟾毒精	去乙酰华蟾毒精
空白	-	1.93 ± 0.169	0.249 ± 0.022 3	1.62 ± 0.189	44.5 ± 36.2	10.2 ± 7.54	2.52 ± 2.64
汞	0.5	12.7 ± 1.32 ¹⁾	1.38 ± 1.22 ¹⁾	6.43 ± 0.755	196 ± 16.1	20.1 ± 1.37	4.87 ± 1.97 ¹⁾
	0.75	3.78 ± 0.331 ¹⁾	0.359 ± 0.026 9	2.89 ± 0.351 ¹⁾	61.7 ± 44.8	14.1 ± 10.8	3.96 ± 1.01
	1.0	3.50 ± 1.94	0.412 ± 0.26 ¹⁾	2.68 ± 0.213	72.0 ± 3.90 ¹⁾	14.6 ± 1.21	3.14 ± 1.51
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	19-氧-华蟾毒精	噁根草配基	沙蟾毒精	去乙酰华蟾毒它灵	异沙蟾毒精	伪异沙蟾毒精
空白	-	1.36 ± 3.05	701 ± 22.1	2.35 ± 0.154	1.68 ± 0.199	11.6 ± 7.57	2.78 ± 0.224
汞	0.5	1.87 ± 4.74	761 ± 24.7	4.49 ± 0.394 4	2.24 ± 0.362	18.2 ± 1.47	6.15 ± 0.588 ¹⁾
	0.75	0.527 ± 0.791 ¹⁾	688 ± 282	1.58 ± 0.102	2.24 ± 0.289	7.63 ± 4.60	2.18 ± 0.158
	1.0	1.71 ± 3.70 ¹⁾	712 ± 193	2.32 ± 0.177	1.55 ± 0.113 ¹⁾	10.0 ± 9.20	2.20 ± 1.34
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	远华蟾毒精	19-羟基蟾毒灵	1β-羟基-蟾毒灵	12β-羟基脂蟾毒配基	19-氧-蟾毒灵	去乙酰华蟾毒精
空白	-	125 ± 10.3	151 ± 97.9	541 ± 212	507 ± 263	0.313 ± 0.0355	0.101 ± 0.078 2
汞	0.5	212 ± 175 ¹⁾	176 ± 12.1	660 ± 243	654 ± 359	0.734 ± 0.012 3 ¹⁾	0.065 0 ± 0.008 25
	0.75	109 ± 51.4	109 ± 88.5	446 ± 165	390 ± 179	0.289 ± 0.276	0.053 8 ± 0.037 6
	1.0	96.0 ± 53.6	112 ± 83.4 ¹⁾	401 ± 138	375 ± 177 ¹⁾	0.226 ± 0.164 ¹⁾	0.062 0 ± 0.006 99
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	噁根草醇	19-氧-华蟾毒它灵	日蟾毒它灵	去乙酰蟾毒它灵		
空白	-	5.02 ± 2.37	0.076 6 ± 0.023 6	1.69 ± 0.204	0.660 ± 0.066 6		
汞	0.5	5.64 ± 2.05	0.069 8 ± 0.045 5	2.50 ± 0.265	0.141 ± 0.237		
	0.75	3.31 ± 2.16	0.055 8 ± 0.021 3	1.27 ± 0.812	0.654 ± 0.064 5		
	1.0	3.07 ± 2.32	0.106 0 ± 0.057 3	1.31 ± 0.109 ¹⁾	0.506 ± 0.353 ¹⁾		

注:与空白组比较具有显著差异¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

蟾酥作为常用抗肿瘤中药,是蟾蜍耳后腺受到外界刺激,合成并分泌的具有自我保护作用的物质,其化学品质的波动关系着临床用药的有效性 & 安全性。研究发现,不同产地不同月份的蟾酥甾烯类化合物含量存在明显变化,说明除了遗传因素外,环境因素对蟾酥品质影响尤为重要^[8]。

农药接触及重金属暴露对蟾蜍具有直接生理毒性,能明显影响蟾蜍的跳跃能力、免疫力等^[9-10],而当前环境污染对其化学成分的影响研究较少。课题组探讨了除草剂苄嘧磺隆及重金属铅暴露对中华大蟾蜍泌酥品质的影响,发现两者均使蟾蜍存活率下降,其中农药苄嘧磺隆污染使 28 种蟾蜍毒素的合成发生改变,尤其是结合型蟾蜍甾烯水平降低,推测乙酰乳酸合成酶可能涉及该类物质的侧链生物合成;高剂量铅暴露使 17 种甾烯水平发生改变,其中含量较高的中、低脂溶性甾烯水平明显下调,高脂溶性成分水平变化较小。

在前期实验基础上,本文通过研究不同浓度汞污染对蟾蜍泌酥中蟾蜍甾烯类物质水平的影响,发现低浓度汞污染组中,有 12 个成分发生 1.5 倍上调。中浓度、高浓度污染组均有 10 余种成分发生下调。进一步分析发现,中、高浓度汞溶液污染后,含有羟基侧链的蟾蜍甾烯(例如异沙蟾毒精,去乙酰华蟾毒精,1 β -羟基-蟾毒灵)普遍下调,而不含有羟基基团的高脂溶性蟾蜍甾烯(例如脂蟾毒配基、华蟾毒精、蟾毒灵)普遍上调。重金属汞污染对蟾蜍甾烯水平影响的原因尚不清楚,推测低浓度汞污染是一种刺激信号,导致蟾蜍分泌较多的自我保护性毒液,使蟾蜍甾烯水平升高,而较高浓度汞污染,对蟾蜍造成一定的毒害作用,通过影响相关酶的合成,使蟾蜍甾烯水平下调。本研究发现汞溶液污染影响蟾蜍泌酥中蟾蜍甾烯的水平,从而为中药蟾酥品质

的研究提供实验参考。

[参考文献]

- [1] 吴喜燕,高慧敏,王智民. 蟾蜍类药材化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 207-214.
- [2] 袁旭江,沈嘉茵,吴燕红. 产地对蟾酥药材质量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 75-78.
- [3] 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.
- [4] 唐哲栋,吴世福,林桂涛,等. 产地对蟾酥鲜浆成分组成影响的研究[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(6): 488-491.
- [5] 董爱华,贾秀英,马小梅. 镉对蟾蜍的 4 种器官乳酸脱氢酶同工酶的影响[J]. 动物学杂志, 2003, 38(6): 24-27.
- [6] 周婧,王洪兰,马宏跃,等. 四级杆串联质谱分析苄嘧磺隆污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平[J]. 分析化学, 2015(9): 1415-1421.
- [7] YE M, GUO D. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(3): 1881-1892.
- [8] 龚艳. 蟾酥注射液原料药质量控制体系的建立[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [9] 冯磊,戴昕鹏,张军,等. 重金属污染条件下花背蟾蜍跳跃能力与骨骼肌 ATP 酶和 AChE 活性变化研究[J]. 四川动物, 2012, 31(4): 553-556.
- [10] Lajmanovich R C, Attademo A M, Simoniello M F, et al. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum*, (Anura: Bufonidae) [J]. Water Air & Soil Pollution, 2015, 226(12): 1-12.

[责任编辑 顾雪竹]