

· 论 著 ·

丹磺酰氯衍生-液相色谱-串联质谱法检测野生菌 鹅膏蕈氨酸和毒蝇母

徐小民, 蔡增轩, 许娇娇, 郑熠斌, 陈苒, 韩见龙

浙江省疾病预防控制中心理化与毒理检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 建立丹磺酰氯 (DNSCl) 衍生-液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 检测野生菌中鹅膏蕈氨酸 (IBA) 和毒蝇母 (MUS) 法, 为毒蘑菇中毒事件的病因鉴定提供技术支持。**方法** 样品用盐酸溶液超声提取 10 min, 离心后加 0.38 mL 水、0.5 mL 5% NaHCO₃ 溶液和 0.6 mL 30 mmol/L DNSCl 丙酮溶液进行双分子 DNSCl 衍生化, 于 60 °C 反应 30 min, 经乙腈稀释和沉淀无机盐后, 采用 Waters XBridge™ BEH C18 色谱柱分离, LC-MS/MS 测定 IBA 和 MUS (多反应监测模式)。**结果** 野生菌中 IBA 和 MUS 在 0.5 ~ 250 mg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数分别为 0.997 和 0.999; 检出限分别为 0.15 mg/kg 和 0.1 mg/kg。在 0.5、10、250 mg/kg 水平下 IBA 回收率为 84.5% ~ 102.0%, 相对标准偏差 (RSD) 为 4.7% ~ 8.6%; MUS 回收率为 88.6% ~ 95.4%, RSD 为 4.9% ~ 7.5%。**结论** 通过优化提取和双分子 DNSCl 衍生化反应等前处理条件, 采用 LC-MS/MS 法可以快速准确测定野生菌中的 IBA 和 MUS。

关键词: 野生菌; 鹅膏蕈氨酸; 毒蝇母; 丹磺酰氯; 液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R155.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2021) 12-1223-05

Determination of ibotenic acid and muscimol in wild mushroom by dansyl chloride derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Xiaomin, CAI Zengxuan, XU Jiaojiao, ZHENG Yibin, CHEN Qing, HAN Jianlong

Department of Physicochemical and Toxicology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To develop an analytical method of ibotenic acid (IBA) and muscimol (MUS) in wild mushroom by dansyl chloride (DNSCl) derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and to provide technical support for etiological identification of mushroom poisoning events. **Methods** The sample was extracted with hydrochloric acid solution, derived by bimolecular DNSCl, diluted and inorganic salts precipitated with acetonitrile. The extract was separated by a waters XBridge™ BEH C18 column and measured by LC-MS/MS. **Results** The limits of detection for IBA and MUS in wild mushroom were 0.15 mg/kg and 0.1 mg/kg, respectively. Good linear relationship was obtained for IBA and MUS at the range of 0.5-250 mg/kg with the correlation coefficient of 0.997 and 0.999, respectively. The average recoveries at three spiking levels were 84.5%-102.0% with relative standard deviations (RSDs, n=6) of 4.7%-8.6% for IBA. The average recoveries were 88.6%-95.4% with RSDs (n=6) of 4.9%-7.5% for MUS. **Conclusion** The optimized sample extraction and bimolecular DNSCl derivatization conditions can achieve rapid and accurate analysis of IBA and MUS in wild mushroom poisoning sample.

Keywords: wild mushroom; ibotenic acid; muscimol; dansyl chloride; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid, IBA) 和毒蝇母 (muscimol, MUS) 具有神经毒性^[1], 多存在于毒蝇

鹅膏和豹斑鹅膏等鹅膏属毒蘑菇中^[2], 中毒症状包括头晕、紧张、感知改变、肌肉抽搐和四肢麻木等, 重症者可出现昏迷^[3]。中毒事件发生时需快速检测毒素, 为病因鉴定和临床救治提供依据^[4]。IBA 是一种氨基酸, MUS 是 IBA 的脱羧衍生物, 均为极性小分子化合物, 在反相 C18 柱中分离效果较差, 采用离子对试剂可改善色谱保留能力, 但会污染质谱系

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.12.007

基金项目: 浙江省基础公益类科技计划 (LGF18H260007)

作者简介: 徐小民, 博士, 主任技师, 主要从事食品安全理化检验工作

通信作者: 韩见龙, E-mail: jlhan@cdc.zj.cn

统^[5-6]。有研究采用毛细管电泳或亲水作用色谱柱有效分离 IBA 和 MUS, 但 IBA 和 MUS 分子量小, 易受样品基质干扰, 并且在用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 检测时, IBA (159→113) 或 MUS (115→98) 均只有一个离子通道, 定性确证困难^[7-9]。有研究进一步采用丹磺酰氯 (dansyl chloride, DNSCl) 对氨基的单分子衍生化和羧基的乙基化反应实现了 2 种毒素的准确测定, 但 2 步衍生化反应操作烦琐^[10]。本研究拟利用 IBA 或 MUS 异噁唑环上的羟基与氨基的 DNSCl 反应活性, 建立双分子 DNSCl 一步衍生法, 并对样品提取、衍生化反应和色谱分离条件等进行优化。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

LCMS-8060 液相色谱-串联四极杆质谱仪 (日本岛津公司); 超纯水装置 (美国 Millipore 公司)。IBA (95%)、MUS (98%)、DNSCl、碳酸氢钠 (NaHCO₃)、盐酸和甲酸铵 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 丙酮和乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸 (色谱纯, 美国 ROE Scientific 公司)。除非特别说明, 试剂和溶剂均为分析纯。野生菌样品在浙江地区采集得到。

1.2 LC-MS/MS 条件

XBridge™ BEH C18 色谱柱 (3.0 mm×150 mm, 2.5 μm, 美国 Waters 公司), 柱温 30 ℃; 进样体积 2.0 μL; 流速 0.4 mL/min; 流动相: 10 mmol/L 甲酸/6 mmol/L 甲酸铵水溶液 (A); 乙腈 (B); 梯度洗脱程序: 0~6.0 min, 40%B~90%B; 6.0~8.5 min, 90%B; 8.5~9.0 min, 90%B~40%B; 9.0~12.5 min, 40%B。

电喷雾离子源正离子模式 (ESI⁺); 脱溶剂管、MS 接口和加热块温度分别为 250 ℃、300 ℃和 400 ℃; 接口电压: 4 kV; 碰撞气: 氩气 (270 kPa); 加热气: 空气, 10 L/min; 雾化气和干燥气: 氮气, 流速分别为 3 L/min 和 10 L/min。采用多反应监测模式 (multiple reaction monitoring, MRM), 见表 1。IBA-2DNS 和 MUS-2DNS 的子离子扫描范围均为 m/z 100~700, 碰撞能量均为 23 eV。

1.3 样品前处理

新鲜野生菌匀浆, 混匀, 称取 1 g 样品于 15 mL 具塞试管中, 加 9 mL 0.05 mol/L 盐酸溶液混匀, 室温超声提取 10 min, 加提取溶剂定容到 10 mL, 混匀, 以半径 8.46 cm, 10 000 r/min 离心 2 min, 取 0.02 mL 上清液于 2 mL 刻度离心管中, 加 0.38 mL 水、0.5 mL 5%NaHCO₃ 溶液和 0.6 mL

表 1 IBA 和 MUS 双分子 DNS 衍生化的 MRM 条件

毒素	分子量	衍生产物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
IBA	158	IBA-2NDS	625	391 ^a /346	23/20
MUS	114	MUS-2DNS	581	347 ^a /234	23/26

注: a 表示定量离子。

30 mmol/L DNSCl 丙酮溶液 (81 mg DNSCl+9 mL 丙酮, 超声溶解, 定容至 10 mL), 混匀、密封试管, 于 60 ℃反应 30 min。冷却至室温, 加 50 μL 50% 盐酸中和, 用丙酮定容至 1.5 mL, 混匀。取 0.15 mL 反应液, 加 0.85 mL 乙腈混匀, 经 0.22 μm 膜过滤后, LC-MS/MS 测定。

1.4 方法优化试验

1.4.1 优化超声提取时间

分别测定样品超声提取 5、10、20 和 30 min 时 IBA 和 MUS 的回收率, 选择回收率较高时对应的超声提取时间。

1.4.2 优化双分子 DNSCl 衍生化反应条件

分别选择 NaHCO₃ 浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、8%、10% 和 12%, DNSCl 体积为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.8 mL, 反应时间为 10、20、30、40 和 60 min (分别在室温和 60 ℃), 选择 DNSCl 反应效率较高时对应的反应条件。每个反应条件平行测定 3 次。其他条件同 1.3。

1.4.3 优化色谱分离条件

分别采用 10 mmol/L 甲酸-乙腈、6 mmol/L 甲酸铵-乙腈和 10 mmol/L 甲酸/6 mmol/L 甲酸铵-乙腈等流动相组合进行色谱分析。其他条件同 1.2。

1.5 方法学验证

1.5.1 标准曲线绘制

采用 50% 乙腈/水分别配制浓度为 100 μg/mL 的 IBA 和 MUS 单一标准储备溶液。用水逐级稀释后配制浓度为 0.1 μg/mL 和 10 μg/mL 的混合标准使用液。吸取适量混合标准使用液, 用水配制成 IBA 和 MUS 浓度均为 0.01~5 μg/mL 混合标准系列溶液。每个含 300 μL 纯水的 2 mL 离心管中添加 100 μL 的 0.01~5 μg/mL 混合标准系列溶液 (1~500 ng, 相当于野生菌中浓度为 0.5~250 mg/kg), 加 0.5 mL 5% NaHCO₃ 溶液和 0.6 mL 30 mmol/L DNSCl 丙酮溶液, 混匀、密封试管, 之后操作同野生菌样品。在优化的分析条件下测定, 以定量离子对峰面积为纵坐标, 标准溶液质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。以 3 倍信噪比时的样品添加浓度为方法检出限, 以 10 倍信噪比时的样品添加浓度为方法定量限。

1.5.2 基质效应 在 10 mg/kg 的添加水平下评估野生菌样品（以假褐云斑鹅膏菌为空白基质）的基质效应。基质效应值=100×（基质中峰面积/纯溶剂中峰面积）。该值接近 100% 表示无基质效应，大于或小于 100% 表示基质增强或抑制效果。

1.5.3 日内和日间精密度检测 在空白基质中按 0.5、10 和 250 mg/kg 3 个浓度水平添加，进行日内和日间精密度检测。每个添加水平进行 6 次平行试验。

2 结果

2.1 实验条件优化

2.1.1 样品超声提取时间 以 0.05 mmol/L 盐酸溶液为提取剂，发现超声提取 10 min 后，IBA 和 MUS 的回收率均超过 95%。因此本试验超声提取时间选择 10 min。

2.1.2 双分子 DNSCI 衍生化反应条件 随着 NaHCO₃ 浓度的增加，IBA 和 MUS 响应值先增加后降低，当 NaHCO₃ 浓度为 5% 时（pH=8.5），IBA 和 MUS 的 DNSCI 反应效率最高，见图 1。DNSCI 体积增加到 0.6 mL 时，IBA 和 MUS 的 DNSCI 反应效率最高，见图 2。衍生化温度为 60 ℃ 时反应效率明显高于室温；大于 60 ℃ 时丙酮挥发太快，影响衍生化反应的稳定性；60 ℃ 反应 30 min 时，IBA 和 MUS 均达到最大响应值，见图 3。因此选择 NaHCO₃ 浓度 5%、DNSCI 体积 0.6 mL、反应温度 60 ℃、反应时间 30 min 为双分子 DNSCI 衍生化反应条件。

2.1.3 色谱分离条件 在 MUS-2DNS 保留时间 8.2 min 前（7.8 min）有一个小的干扰峰。尝试采用甲酸-乙腈，甲酸铵-乙腈和甲酸/甲酸铵-乙腈等流动相组合，发现甲酸/甲酸铵-乙腈的组合能有效分离 MUS-2DNS 和干扰峰。在 10 mmol/L 甲酸/6 mmol/L 甲酸铵-乙腈的条件下可以得到基线分离。见图 4。

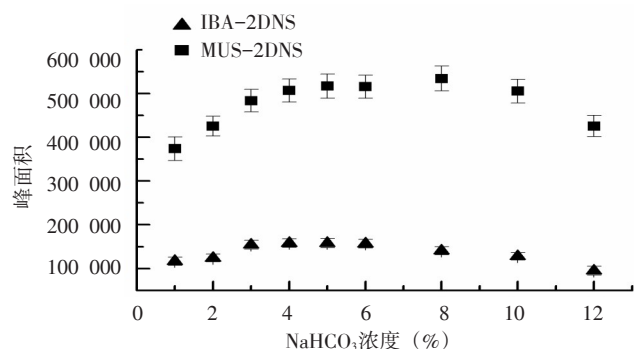


图 1 不同 NaHCO₃ 浓度下 IBA 和 MUS 双分子 DNSCI 衍生化反应效率

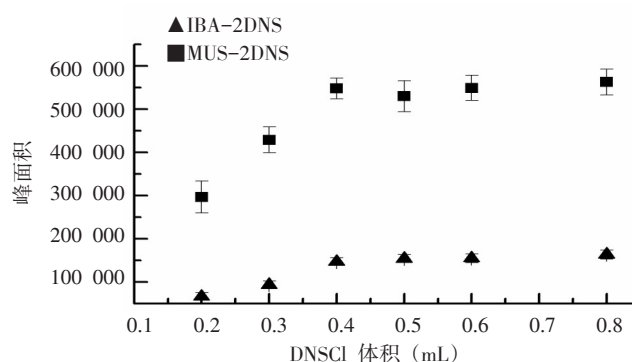


图 2 不同 DNSCI 体积下 IBA 和 MUS 双分子 DNSCI 衍生化反应效率

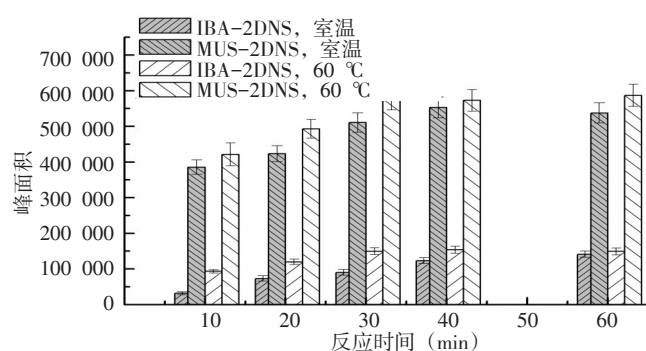


图 3 不同温度和时间下 IBA 和 MUS 双分子 DNSCI 衍生化反应效率

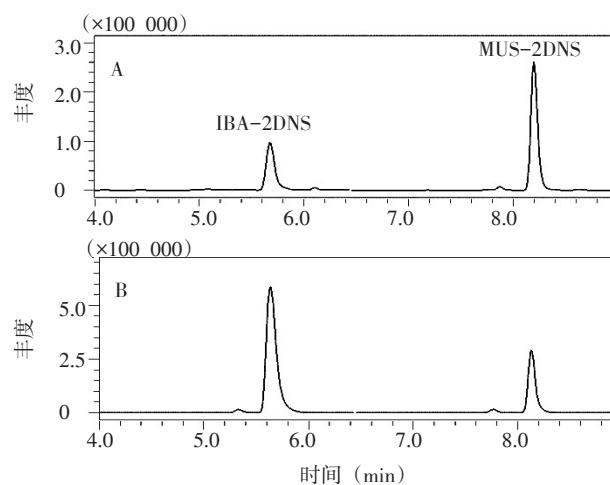


图 4 IBA-2DNS、MUS-2DNS 标准溶液 (A) 和阳性样品 (B) 色谱图

2.2 二级质谱条件 IBA-2DNS 和 MUS-2DNS 的产物离子扫描质谱及碎裂途径见图 5。m/z 625.2 和 581.2 分别为两者的 [M+H]⁺ 峰。m/z 234.1 和 170.1 的峰来自于 DNS 衍生化基团。m/z 391.1 和 424.1 的峰分别属于两者的特征离子 [M+H-DNS]⁺。m/z 346.1 的峰属于 IBA-2DNS 的特征离子 [M+H-DNS-COOH]⁺。

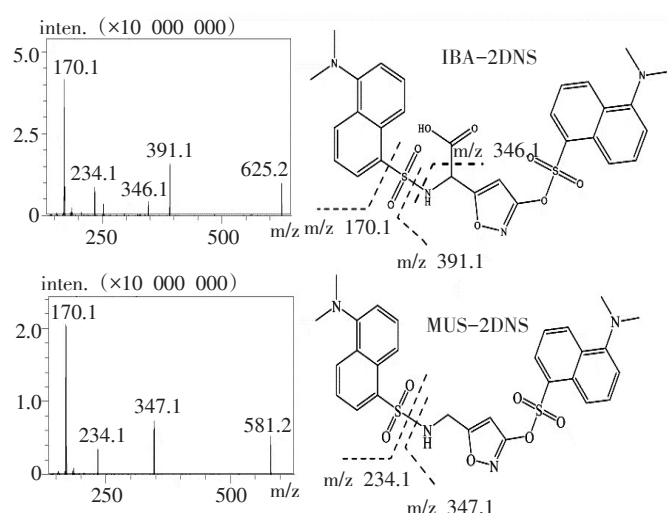


图5 IBA-2DNS和MUS-2DNS的子离子扫描质谱及碎裂途径

2.3 基质效应检测结果 在最优化条件下,野生菌样品中 IBA-2DNS 和 MUS-2DNS 的基质效应测定值分别为 91.9% 和 101.8%, 相对标准偏差 (RSD, $n=3$) 小于 4.8%, 表现为轻微的基质效应, 可采用纯溶剂标准校正样品中毒素含量。

2.4 方法学参数

2.4.1 线性范围、检出限和定量限 野生菌基质中, IBA 和 MUS 在 0.5 ~ 250 mg/kg 浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数分别为 0.997 和 0.999。IBA 和 MUS 的检出限分别为 0.15 mg/kg 和 0.1 mg/kg, 定量限分别为 0.5 mg/kg 和 0.3 mg/kg。

2.4.2 回收率和精密度 IBA 日内平均回收率为 84.5% ~ 102.0%, RSD 为 4.7% ~ 8.6%; 日间平均回收率为 83.8% ~ 109.4%, RSD 为 5.3% ~ 9.1%。MUS 日内平均回收率为 88.6% ~ 95.4%, RSD 为 4.9% ~ 7.5%; 日间平均回收率为 86.9% ~ 96.1%, RSD 为 5.3% ~ 8.8%。见表 2。

表2 野生菌中 IBA 和 MUS 的平均回收率和精密度 ($n=6$)

毒素	加标浓度 (mg/kg)	日内		日间	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
IBA	0.5	102.0	8.6	109.4	9.1
	10	84.5	4.7	83.8	5.9
	250	92.7	5.0	91.2	5.3
MUS	0.5	88.6	7.5	86.9	8.8
	10	95.4	4.9	96.1	5.3
	250	93.4	5.2	95.0	5.5

2.5 中毒样品检测 在 2 起疑似神经毒性蘑菇中毒

事件患者剩余的野生菌中检出 IBA 含量分别为 1 226 mg/kg 和 248 mg/kg, MUS 含量分别为 225 mg/kg 和 71.6 mg/kg。

3 讨论

本研究通过优化样品提取、双分子 DNSCI 衍生化反应条件、液相色谱流动相等检测条件,建立了野生菌中 IBA 和 MUS 的快速测定方法,可为相关中毒事件的处置提供技术支撑。

IBA 和 MUS 属于极性小分子化合物,若采用甲醇溶液提取,对后续 DNSCI 衍生化反应效率有影响 [8, 11]。本研究发现,采用 0.05 mmol/L 盐酸溶液为提取剂,结合超声波提取方法,不仅可以避免使用有机溶剂,还保证了后续 DNSCI 衍生化效率和反应的稳定性。另外,为避免反应过程中丙酮挥发,需在加热前用封口膜密封反应管,保证结果的准确性。

有文献报道 $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中的 DNSCI 能与酚羟基反应,提高酚类物质的 LC-MS/MS 检测灵敏度 [12-14], 脂肪族羟基则没有 DNSCI 反应活性 [15]。通过优化反应体系的 pH 值,实验发现 IBA 或 MUS 异噁唑环上的羟基与氨基一样具有 DNSCI 反应活性,能形成分子量更大的双分子 DNSCI 反应产物 IBA-2DNS 和 MUS-2DNS。野生菌基质中含有大量与 IBA 和 MUS 分子量相近的氨基酸或生物胺类,但此类基质大部分只有单分子 DNSCI 反应活性,可以利用 IBA-2DNS 和 MUS-2DNS 分子量的明显差异消除干扰。在 0 ~ 30 h 内,2 种毒素的衍生产物仪器响应值变化低于 10%,说明衍生产物在 30 h 内稳定。

对于氨基酸和其他化合物的单分子 DNSCI 反应产物,只能找到 DNS 的特征离子 (m/z 156.1、170.1、171.1、234.1) [10], 它们不是被测物的特征片段。对于双分子 DNSCI 反应产物,可以找到包含被分析物结构信息的特征离子,定性准确性更高。

参考文献

[1] GOVORUSHKO S, REZAEI R, DUMANOV J, et al. Poisoning associated with the use of mushrooms: a review of the global pattern and main characteristics [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 128: 267-279.

[2] LI H, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Mushroom poisoning outbreaks—China, 2019 [J]. China CDC Weekly, 2020, 2 (2): 19-24.

[3] MOSS M J, HENDRICKSON R G. Toxicity of muscimol and ibotenic acid containing mushrooms reported to a regional poison control center from 2002-2016 [J]. Clin Toxicol (Phila), 2019, 57: 99-103.

[4] 章铁哲, 孙承业, 李海蛟, 等. 一起蘑菇致急性中毒事件的现场调查与鉴定 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25 (8): 1012-1015.

- [5] LUMPERT M, KREFT S. Catching flies with *Amanita muscaria*: traditional recipes from Slovenia and their efficacy in the extraction of ibotenic acid [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187: 1-8.
- [6] XU X M, CAI Z X, ZHANG J S, et al. Analysis of monofluoroacetic acid in urine by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and preparation of the positive sample by the bioconversion from monofluoroacetamide to monofluoroacetic acid *in vitro* [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1027: 131-138.
- [7] 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: 242-247.
- [8] GONMORI K, HASEGAWA K, FUJITA H, et al. Analysis of ibotenic acid and muscimol in *Amanita* mushrooms by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Forensic Toxicol*, 2012, 30: 168-172.
- [9] HASEGAWA K, GONMORI K, FUJITA H, et al. Determination of ibotenic acid and muscimol, the *Amanita* mushroom toxins, in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Forensic Toxicol*, 2013, 31: 322-327.
- [10] TSUJIKAWA K, KUWAYAMA K, MIYAGUCHI H, et al. Determination of muscimol and ibotenic acid in *Amanita* mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 430-435.
- [11] 伍福仙, 张志清, 王瑾, 等. 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法检测毒蘑菇中4种常见毒素含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10 (22): 7656-7664.
- [12] MARTINS R S, ANTUNES N J, COMERLATTI G, et al. Quantification of estradiol cypionate in plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: application in a pharmacokinetic study in healthy female volunteers [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170: 273-278.
- [13] WANG Z, YU J, YAO J, et al. Simultaneous identification and quantification of bisphenol A and 12 bisphenol analogues in environmental samples using precolumn derivatization and ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41: 2269-2278.
- [14] 赵昂, 张航, 姚迪, 等. 超快速液相色谱-串联质谱法检测人血清中雌酮、雌二醇及雌三醇的方法学研究 [J]. *中国科技论文*, 2016, 11 (18): 2062-2068.
- [15] GUO K, LI L. Differential ¹²C-/¹³C-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 3919-3932.

收稿日期: 2021-08-06 修回日期: 2021-10-11 本文编辑: 徐文璐

(上接第 1222 页)

- [3] 肖敏, 刘洋, 陶瑞雪, 等. 妊娠贫血与顺产后出血的队列研究 [J]. *预防医学*, 2020, 32 (6): 636-640.
- [4] LI L, YU M W, WEI W Z, et al. Prevalence, risk factors and associated adverse pregnancy outcomes of anaemia in Chinese pregnant women: a multicentre retrospective study [J/OL]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2018, 18 (1) [2021-10-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29685119>. DOI: 10.1186/s12884-018-1739-8.
- [5] 漆洪波, 杨慧霞. 孕前和孕期保健指南 (2018) [J]. *中华围产医学杂志*, 2018, 21 (3): 145-152.
- [6] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学 [M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- [7] 中华医学会围产医学分会. 妊娠期铁缺乏和缺铁性贫血诊治指南 [J]. *中华围产医学杂志*, 2014, 17 (7): 451-454.
- [8] 中国医药教育协会, 临床合理用药专业委员会, 中国医疗保健国际交流促进会高血压分会, 等. 中国临床合理补充叶酸多学科专家共识 [J/CD]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2020, 12 (11): 19-37.
- [9] 杜玉娇, 李晶, 王红丽, 等. 待产女性血清维生素 B₁₂ 和叶酸水平的流行病学特征 [J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41 (8): 1359-1364.
- [10] 姜珊, 庞学红, 段一凡, 等. 2010-2012年中国孕妇贫血流行状况及相关因素 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52 (1): 21-25.
- [11] 韩娜, 王实, 刘珏, 等. 2013-2017年北京市通州区32097例孕妇孕晚期贫血发生情况及其影响因素研究 [J]. *中国生育健康杂志*, 2021, 32 (5): 447-449, 470.
- [12] 姜李媛, 朱旭红, 陈晓雯. 基于互联网的流动孕产妇健康管理系统应用及效果分析 [J]. *医院管理论坛*, 2021, 38 (5): 91-93.
- [13] AUERBACH M, ABERNATHY J, JUUL S, et al. Prevalence of iron deficiency in first trimester, nonanemic pregnant women [J]. *J Mater Fetal Neonatal Med*, 2021, 34 (6): 1002-1005.
- [14] 杨红梅, 何国琳, 史琳, 等. 川渝城市地区妊娠期铁缺乏及缺铁性贫血的现况调查及多因素分析 [J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34 (11): 840-843.
- [15] 刘海虹, 李雪兰, 王磊清, 等. 陕西地区妊娠期妇女铁缺乏和缺铁性贫血患病率调查研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47 (7): 943-946.
- [16] 叶灿, 李婷, 李雪平. 孕妇缺铁性贫血发生情况及影响因素分析 [J]. *华南预防医学*, 2020, 46 (5): 477-480.
- [17] 唐琳, 张晓璟, 唐振华. 2016年上海地区部分孕妇贫血情况调查分析 [J]. *检验医学*, 2020, 35 (2): 116-119.
- [18] 范春丽, 罗家有, 龚雯洁, 等. 妊娠期并发贫血影响因素的巢式病例对照研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38 (9): 1269-1273.

收稿日期: 2021-07-19 修回日期: 2021-10-11 本文编辑: 田田