

超高效液相色谱质谱法快速测定血浆中 6 种蘑菇毒素

李启¹, 徐峻卿¹, 钱佳清², 纪律¹

1. 丽水市疾病预防控制中心检验检测所, 浙江丽水 323000; 2. 丽水学院生态学院, 浙江丽水 323000

[摘要] 目的 建立超高效液相色谱质谱法快速测定血浆中异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽的含量。方法 取血浆样本, 以 1:3 的比例加入乙腈, 旋涡混匀 1min 后, 以 10 000 转/min、4℃离心 3min。吸取上清液, 以 0.03%氨水和乙腈进行超高效液相分离, 在电喷雾正离子模式下进行多反应监测检测。结果 一次进样 4min 即可实现血浆中异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽的分离检测。血浆中 6 种蘑菇毒素的线性范围为 40~500 μ g/L, 检出限分别为 10.0 μ g/L、10.0 μ g/L、10.0 μ g/L、6.0 μ g/L、6.0 μ g/L 和 6.0 μ g/L ($S/N=3$), 相对标准偏差为 0.60%~1.90% ($n=11$), 回收率为 90.8%~127.0%。结论 本方法可实现血浆中包括异绒白乳菇醛在内的 6 种蘑菇毒素的快速同时测定, 操作简单, 结果准确, 为中毒患者的蘑菇毒素快速确证提供技术平台。

[关键词] 蘑菇毒素; 快速测定; 血浆; 超高效液相色谱质谱法

[中图分类号] O658 **[文献标识码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.1673-9701.2024.19.002

Rapid determination of six mushroom toxins in plasma by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry

LI Qi¹, XU Junqing¹, QIAN Jiaqing², JI Lyu¹

1. Department of Laboratory, Lishui Center for Disease Control and Prevention, Lishui 323000, Zhejiang, China; 2. School of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, Zhejiang, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for rapid determination of isovelleral, α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, dihydroxy-phallotoxin and carboxy-dihydroxy-phallotoxin in plasma by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Methods** Take plasma samples and add acetonitrile solution in a 1:3 ratio. The sample was vortex mixed for 1 min, then centrifugated at 10 000r/min and 4℃ for 3min. The supernatant was injected, while 0.03% ammonia water and acetonitrile were used as mobile phases for ultra high performance liquid phase separation. Multi reaction monitoring was carried out in the positive ion mode of electric spray. **Results** The separation and detection of isovelleral, α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, dihydroxy-phallotoxin and carboxyl-dihydroxy-phallotoxin in plasma could be achieved within 4 min by one injection. The linear range of six mushroom toxins in plasma was 40-500 μ g/L, and the detection limits were 10.0 μ g/L 10.0 μ g/L, 10.0 μ g/L, 6.0 μ g/L, 6.0 μ g/L and 6.0 μ g/L ($S/N=3$), respectively. The relative standard deviations were 0.60%-1.90% ($n=11$), and the recovery rates were 90.8%-127.0%. **Conclusion** This method realizes the rapid and simultaneous determination of 6 kinds of mushroom toxins in plasma, including isovelleral. The operation is simple and the result is accurate, which provides a technical platform for the rapid confirmation of mushroom toxins in poisoned patients.

[Key words] Mushroom toxin; Rapid determination; Plasma; Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry

目前全世界已知的毒蘑菇有 400 多种, 所含毒素种类众多, 结构差异大, 单独或联合作用可引起复杂的临床表现^[1-3]。因此, 建立快速、准确、灵敏的多蘑菇毒素确证测定方法, 第一时间确定蘑菇毒素种类, 可为中毒患者的准确救治争取时间, 对降低死亡率十分重要。液相色谱-质谱法结合液相色谱

的强有效分离能力和质谱的强组分鉴定能力, 特别是超高效液相色谱质谱法 (ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS) 采用比普通液相色谱柱更小粒径和更高性能的色谱柱填充颗粒, 具有更准确和更灵敏的优势, 近年被越来越多地应用到蘑菇毒素的测定中, 尤其适用于血液、

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2023KY1379); 丽水市科技计划项目 (2022GYX37, 2021ZDYF17)

通信作者: 李启, 电子信箱: liky3524@126.com

尿液等复杂生物样本中低浓度蘑菇毒素的测定,在蘑菇毒素的应急诊断确证等领域发挥着越来越重要的作用^[4-10]。但仍普遍存在生物样本前处理过程较为烦琐、同时测定蘑菇毒素种类有限等问题。本文通过简化生物样本的前处理过程,首次建立血浆中包括异绒白乳菇醛在内的 6 种蘑菇毒素的 UPLC-MS 快速测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Xevo TQ-S 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司); LQ1 multi reax 旋涡振荡器(德国 Heidolph 公司); 3-30K 低温高速离心机(美国 Sigma-Aldrich 公司); D11911 超纯水器(美国 Thermo Fisher 公司)。

异绒白乳菇醛:纯度 $\geq 99\%$; α -鹅膏毒素、 β -鹅膏毒素、 γ -鹅膏毒素、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽:纯度 $\geq 90\%$ (美国 Enzo 公司); 人工 H 血浆(北纳生物研发中心); 甲醇、乙腈:HPLC 级(德国 Merck 公司); 氨水:优级纯(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 标准溶液的配制

用甲醇分别配制浓度均为 100mg/L 的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽标准储备溶液, -20°C 保存。用甲醇稀释配制浓度为 1mg/L 的 6 种蘑菇毒素混合标准中间溶液, -20°C 保存。用 0.03% 氨水-乙腈(95:5, V/V) 配制不同浓度的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽系列混合标准溶液。

1.3 分析条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100mm \times 2.1mm, 1.7 μm); 柱温: 35°C ; 样品室温度: 4°C ; 进样体积 10 μl 。流动相 A: 0.03% (V/V) 氨水, 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱条件: 0~1.0min, 95%~80% A; 1.0~1.2min, 80%~65% A; 1.2~1.8min, 65% A; 1.8~2.2min, 65%~10% A; 2.2~3.6min, 10% A; 3.6~4.5min, 10%~95% A; 4.5~6.5min, 95% A。流速: 0.35ml/min。

质谱条件:MRM 模式,ESI⁺;离子源温度: 150°C ;毛细管电压:2.5kV;脱溶剂气温度: 600°C ;脱溶剂气流量:950L/h,见表 1。

1.4 样本前处理

取适量血浆样本,按 1:3 体积比加入乙腈,涡

表 1 6 种蘑菇毒素的 MRM 质谱条件

蘑菇毒素	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
异绒白乳菇醛	159.0	91.0 [*] /115.0	46	20/25
α -鹅膏毒素	919.4	259.1 [*] /86.1	43	38/40
β -鹅膏毒素	920.4	259.1 [*] /86.1	43	37/39
γ -鹅膏毒素	903.4	243.1 [*] /86.1	42	38/40
羧基二羟鬼笔毒肽	847.4	157.1 [*] /330.1	39	40/39
二羟鬼笔毒肽	789.4	157.1 [*] /330.1	39	40/37

注: *为定量离子对

旋振荡混匀 1min, 沉淀去除蛋白。以 10 000 转/min、 4°C 离心 3min, 吸取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜后待用。

1.5 样本检测

取血浆样本,在 1.3 条件下进行血浆中异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽的同时测定,并开展系统性能实验。

1.6 性能实验和计算方法

按 1.2 配制不同浓度的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽系列混合标准溶液,在 1.3 条件下进行分离测定。分别以 6 种蘑菇毒素浓度为横坐标,定量离子对的峰面积为纵坐标,绘制工作曲线。配制高、低两个不同加标浓度的 6 种蘑菇毒素标准溶液,考察方法回收率。配制蘑菇毒素平行样本,重复 11 次测定计算方法精密度。以基线噪声 3 倍信号对应的浓度为方法检出限。

2 结果

2.1 色谱条件优化

本研究比较 ACQUITY UPLC HSS T3 (100mm \times 2.1mm, 1.8 μm) 和 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100mm \times 2.1mm, 1.7 μm) 两种色谱柱对异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽等 6 种蘑菇毒素分离测定的影响。谱图显示 α -鹅膏毒素、 β -鹅膏毒素、 γ -鹅膏毒素、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽在两种色谱柱上得到的分离效果和响应强度差别不大,但异绒白乳菇醛在 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱上得到的分离效果更好,响应更强,故选择 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱作为色谱柱。

本研究分别考察了水-甲醇、0.2% 甲酸水-甲醇、0.5% 甲酸水-甲醇、0.03% 氨水-甲醇、水-乙腈、0.2% 甲酸水-乙腈、0.5% 甲酸水-乙腈、0.03% 氨水-乙腈等

8 种流动相体系对 6 种蘑菇毒素分离测定的影响。谱图显示流动相体系的水相采用碱性溶剂 0.03% 氨水, 有机相采用乙腈时, 得到的 6 种蘑菇毒素信号响应更强, 色谱峰对称无拖尾, 分离效果比酸性溶剂甲酸水、中性溶剂水和甲醇更好, 故选择 0.03% 氨水-乙腈作为流动相体系。

2.2 系统性能

2.2.1 最佳测定条件 通过参数优化, 得到 6 种蘑菇毒素的最佳色谱和质谱条件, 见 1.3。以流动相为基质, 配制浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽的混合标准溶液, 在上述最佳测定条

件下实现 6 种蘑菇毒素的一次进样 4min 内基线分离, 见图 1。

2.2.2 线性范围和灵敏度 分别绘制 6 种蘑菇毒素的工作曲线, 见表 2。结果表明异绒白乳菇醛在 20~400 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内呈线性关系, α -鹅膏毒素、 β -鹅膏毒素、 γ -鹅膏毒素、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽在 2~500 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内呈线性关系, 相关系数均 >0.999 。根据 1.6 性能实验和计算方法得到异绒白乳菇醛的检出限为 1.0 $\mu\text{g/L}$, α -鹅膏毒素和 γ -鹅膏毒素的检出限为 0.2 $\mu\text{g/L}$, β -鹅膏毒素的检出限为 0.4 $\mu\text{g/L}$, 羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽的检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ (S/N=3)。

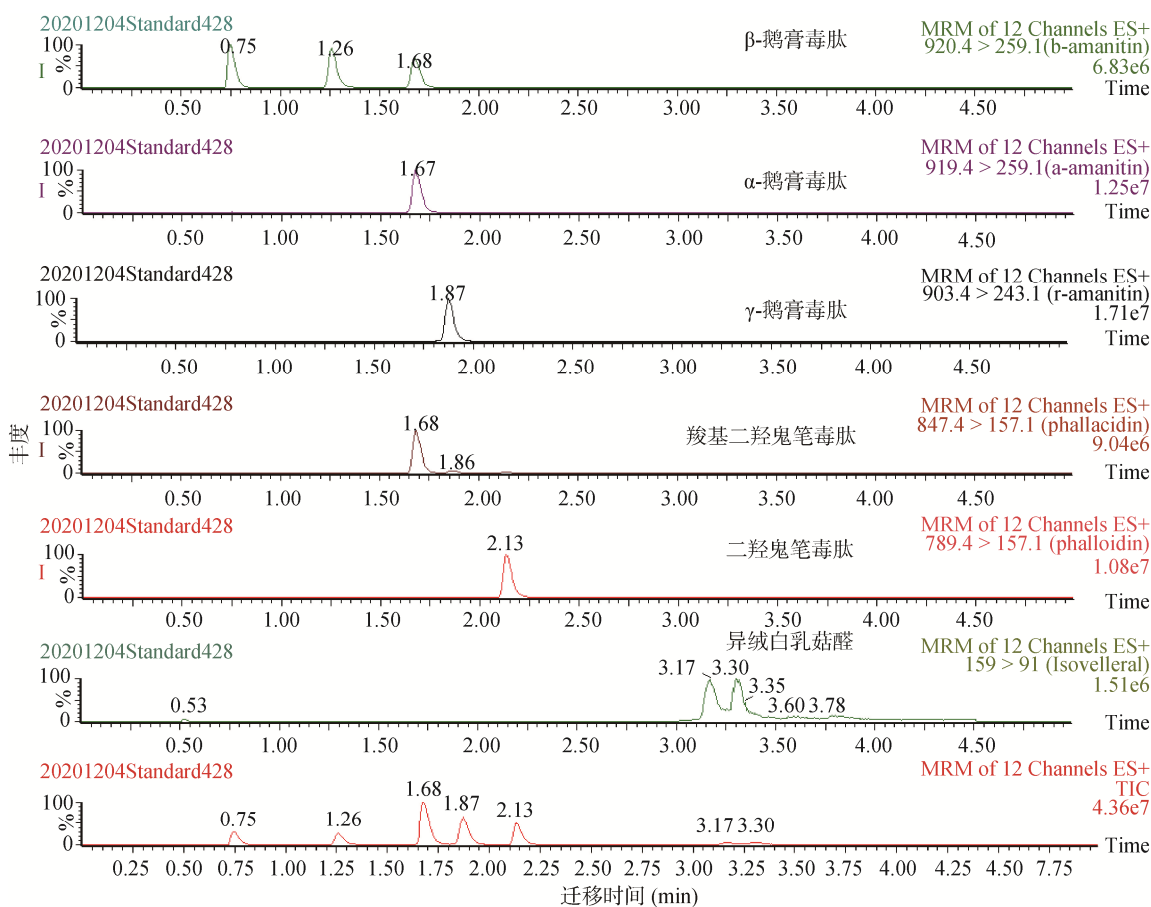


图 1 6 种蘑菇毒素的 UPLC-MS 谱图

表 2 6 种蘑菇毒素的线性范围、相关系数和检出限

蘑菇毒素	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	回归方程	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/L}$)
异绒白乳菇醛	20~400	$y=205.213x+56565.70$	0.9997	1.0
α -鹅膏毒素	2~500	$y=495.612x+3001.23$	0.9994	0.2
β -鹅膏毒素	2~500	$y=452.784x+3637.11$	0.9997	0.4
γ -鹅膏毒素	2~500	$y=652.912x+5411.33$	0.9992	0.2
羧基二羟鬼笔毒肽	2~500	$y=2332.900x+13885.20$	0.9993	0.1
二羟鬼笔毒肽	2~500	$y=2585.840x+4161.67$	0.9990	0.1

2.2.3 回收率和精密度 根据 1.6 性能实验和计算方法，配制高、低两个不同加标浓度的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽标准溶液，考察方法回收率，得到 6 种蘑菇毒素的回收率为 93.7%~101.0%。200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液平行 11 次进样检测，考察方法精密度，得到相对标准偏差为 0.62%~3.31% ($n=11$)，见表 3。

表 3 6 种蘑菇毒素的加标回收率和精密度

蘑菇毒素	加标量 (ng)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
异绒白乳菇醛	400	99.6	2.17
	40	101.0	
α -鹅膏毒素	200	98.1	1.31
	5	99.9	
β -鹅膏毒素	200	98.8	3.31
	5	99.6	
γ -鹅膏毒素	200	98.1	0.82
	5	100.0	
羧基二羟鬼笔毒肽	200	98.7	0.62
	5	98.8	
二羟鬼笔毒肽	200	98.2	1.98
	5	93.7	

2.3 血浆样本

2.3.1 线性范围和敏感度 以血浆为基质配制异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽系列混合标准溶液。根据 1.4 对血浆样本进行前处理，根据 1.5 进行样本检测。工作曲线结果显示血浆中 6 种蘑菇毒素在 40~500 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内均呈线性关系，相关系数均 >0.999 。根据 1.6 性能实验和计算方法得到异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒素和 β -鹅膏毒素的检出限为 10.0 $\mu\text{g/L}$ ， γ -鹅膏毒素、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽的检出限为 6.0 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$)，见表 4。

2.3.2 回收率和精密度 以血浆为基质配制成高、低两个不同加标浓度的异绒白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽标准溶液，考察血浆样本中该方法的回收

率，结果见表 5。根据 1.6 性能实验和计算方法得到 6 种蘑菇毒素的回收率为 90.8%~127.0%。100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液平行 11 次进样考察血浆样本中该方法的精密度，得到 6 种蘑菇毒素的相对标准偏差为 0.60%~1.90% ($n=11$)。

表 5 血浆中 6 种蘑菇毒素的加标回收率和精密度

蘑菇毒素	加标量 (ng)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
异绒白乳菇醛	90	98.7	1.90
	12	98.6	
α -鹅膏毒素	80	90.8	1.25
	8	91.2	
β -鹅膏毒素	80	101.5	1.20
	8	99.6	
γ -鹅膏毒素	90	97.7	1.60
	12	106.2	
羧基二羟鬼笔毒肽	80	99.1	0.62
	12	114.4	
二羟鬼笔毒肽	80	101.1	0.60
	16	127.0	

3 讨论

食用毒蘑菇中毒患者大多没有毒蘑菇样本留存，因此通过鉴定毒蘑菇判断中毒的毒素种类较为困难。据报道，毒蘑菇中毒事件未能进行毒蘑菇鉴定和毒素检测的占同期毒蘑菇中毒事件数的 92.59%^[11]；中毒者的症状多在食用毒蘑菇后 12h、甚至几天后才出现，此时大部分的毒素已进入靶器官，尿液和血液等生物样本中毒素浓度很低，仅为 ng/ml 数量级，极难被测出^[9]。此时通过蘑菇毒素中毒患者的血浆样本第一时间确定蘑菇毒素种类，对及时救治中毒患者、降低死亡率至关重要^[11-12]。

1949 年，Wieland 等^[13]最早采用点迹法对鹅膏肽类蘑菇毒素进行测定，之后各地逐步发展出毛细管电泳法、液相色谱法等其他测定方法。近年来质谱检测技术的出现为蘑菇毒素的测定带来更高敏感度和准确度，优势明显。张秀尧等^[9]采用 UPLC-MS 方

表 4 血浆中 6 种蘑菇毒素的线性范围、相关系数、检出限

蘑菇毒素	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	回归方程	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/L}$)
异绒白乳菇醛	40~500	$y=90.526x+1587.96$	0.9996	10.0
α -鹅膏毒素	40~500	$y=164.574x+205.10$	0.9990	10.0
β -鹅膏毒素	40~500	$y=77.072x-653.95$	0.9990	10.0
γ -鹅膏毒素	40~500	$y=358.468x-5538.00$	0.9990	6.0
羧基二羟鬼笔毒肽	40~500	$y=144.188x-1570.55$	0.9990	6.0
二羟鬼笔毒肽	40~500	$y=3790.850x-186276.00$	0.9990	6.0

法实现尿液和血浆中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽等 5 种蘑菇毒素的同时测定,分析时间为 9min,在尿液和血浆中的检出限 $<1\mu\text{g/L}$ 。徐小民等^[7]建立在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定蘑菇中毒患者尿液中 α -鹅膏毒肽,分析时间为 11min。方力等^[8]建立 TurboFlow 在线净化-液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定尿液中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽等 5 种蘑菇毒素,分析时间为 9min。上述 UPLC-MS 方法的前处理过程较为烦琐,对操作人员的要求较高,测定的蘑菇毒素种类也较为局限。本研究仅对血浆样本做简单前处理,以 1:3 的比例加入乙腈溶液,沉淀去除蛋白,经微孔滤膜过滤后直接进样测定,大大缩短前处理分析时间。据此建立的 UPLC-MS 方法在 4min 内即可完成血浆中异缙白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽等 6 种蘑菇毒素的分离测定,分析速度快,适用于蘑菇毒素中毒患者的毒素种类快速确证。与此同时,本研究首次完成血浆中异缙白乳菇醛的测定,拓宽蘑菇毒素的可检出种类。最终,采用本研究建立的 UPLC-MS 方法,血浆中异缙白乳菇醛、 α -鹅膏毒素和 β -鹅膏毒素的检出限为 $10.0\mu\text{g/L}$, γ -鹅膏毒素、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽的检出限为 $6.0\mu\text{g/L}$,6 种蘑菇毒素在 $40\sim 500\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内均呈线性关系,相关系数均 >0.999 ,敏感度高;血浆中 6 种蘑菇毒素的加标回收率为 $91.2\%\sim 127.0\%$,准确度高;6 种蘑菇毒素的相对标准偏差为 $0.60\%\sim 1.90\%$,重现性好。

综上,本研究建立的 UPLC-MS 方法能快速、准确、灵敏地测定蘑菇毒素中毒患者血浆中异缙白乳菇醛、 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽的含量,不仅可为 6 种蘑菇毒素的快速同时确证提供技术支持,也为医疗机构准确制定中毒患者的救治措施提供科学依据,具有实际的指导意义。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 图力古尔,包海英,李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 517-548.
- [2] 李启,雷永良,宋瑞强,等. 鹅膏肽类毒素质谱检测方法的研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22(11):

1403-1407.

- [3] 徐小民,张京顺,蔡增轩,等. 在线液相色谱-二极管阵列检测器-串联质谱法检测野生菌中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽[J]. 色谱, 2017, 35(6): 613-619.
- [4] BALDWIN M A, MCLAFFERTY F W. Liquid chromatography-mass spectrometry interface 1: Direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass-spectrometer[J]. Org Mass Spectrom, 1973, 7(9): 1111-1112.
- [5] 刘磊琦,陈镜泽,傅武胜,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定野生蘑菇中鹅膏肽类与色胺类毒素[J]. 色谱, 2023, 41(11): 976-985.
- [6] 徐小民,郑熠斌,黄百芬,等. 液相色谱-串联质谱法快速测定野生菌中 9 种蘑菇毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 262-269.
- [7] 徐小民,张京顺,蔡增轩,等. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测蘑菇中毒患者尿液中痕量 α -鹅膏毒肽[J]. 色谱, 2020, 38(11): 1281-1287.
- [8] 方力,邱凤梅,余新威. TurboFlow 在线净化-液相色谱-串联质谱法快速检测人尿中鹅膏肽类毒素[J]. 色谱, 2021, 39(3): 338-345.
- [9] 张秀尧,蔡欣欣. 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽[J]. 分析化学, 2010, 38(1): 39-44.
- [10] 阳硕,郑熠斌,郑粉双,等. 基于液相色谱-串联质谱技术快速检测 6 种蘑菇毒素及临床应用探讨[J]. 中国急救医学, 2023, 43(9): 673-678.
- [11] 周静,袁媛,郎楠,等. 中国大陆地区蘑菇中毒事件及危害分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(6): 724-728.
- [12] 朱姝,郭华,周亚娟,等. 贵州省一起灰花纹鹅膏中毒事件调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(7): 1102-1108.
- [13] WIELAND T. Über die giftstoffe des knollenblätterpilzes VII*. β -Amanitin, eine dritte komponente des knollenblätterpilzgiftes[J]. Justus Liebigs Ann Chem, 1949, 564(2): 152-160.

(收稿日期: 2024-01-02)

(修回日期: 2024-03-05)