

超高效液相色谱-串联质谱法测定毒蘑菇中 5 种强毒性蘑菇毒素含量

许欣欣*, 陈春晓, 仲岳桐, 陈慧玲, 吕昭颖, 姜 杰

(深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法快速检测毒蘑菇中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽 5 种强毒性蘑菇毒素含量的分析方法。**方法** 样品经甲醇/水(3:7, *V:V*)混合液超声提取, 离心后取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, C_{18} 色谱柱分离, 超高效液相色谱-串联质谱仪上采用多反应监测正离子模式测定, 外标法定量检测。**结果** 蘑菇样本中检测出 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽 4 种蘑菇毒素, 浓度分别为 164、198、33、2208 mg/kg。**结论** 本方法快速简便、准确, 可用于因蘑菇毒素引起的食物中毒应急检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 蘑菇毒素; 鹅膏毒肽; 鬼笔毒肽

Determination of 5 kinds of virulent mushroom toxins in poisonous mushroom by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

XU Xin-Xin*, CHEN Chun-Xiao, ZHONG Yue-Tong, CHEN Hui-Ling, LV Zhao-Ying, JIANG Jie

(Shenzhen Center for Disease Control & Prevention, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid determination of 5 highly toxic mushroom toxins including α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, phalloidin, phalloidin in poisonous mushrooms by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Ultrasonic extraction of methanol/water (3:7, *V:V*) mixture was performed. After centrifugation, the supernatant was separated by 0.22 μm microporous filtration membrane, and separated by C_{18} chromatographic column. It was determined by multi-reaction monitoring positive ion mode using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer, and external standard method for quantitative detection. **Results** Four kinds of mushroom toxins were detected in the mushroom sample, namely, α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, and phalloidin, with concentrations of 164, 198, 33, and 2208 mg/kg, respectively. **Conclusion** This method is rapid, simple and accurate, and is suitable for emergency detection of food poisoning caused by mushroom toxin.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mushroom toxins; amatoxin; phallotoxin

基金项目: 深圳市三名工程项目(SZSM201811070)

Fund: Supported by the Sanming Project of Shenzhen (SZSM201811070)

*通讯作者: 许欣欣, 副主任技师, 主要研究方向为食品中有机污染物。E-mail: xxx210@qq.com

*Corresponding author: XU Xin-Xin, Associate Chief Technician, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, No.8, Longyuan Road, Nanshan District, Shenzhen 518055, China. E-mail: xxx210@qq.com

1 引 言

据报道全球大型真菌数约 14000 种^[1], 我国报道的有 3800 种以上^[2], 其中有毒蘑菇 435 种^[3]。毒蘑菇又称毒蕈或毒菌, 是指大型真菌的子实体食用后对人或畜禽产生中毒反应的物种。毒蘑菇中的蘑菇毒素按照结构和中毒机制可分为环型多肽、色胺类化合物、毒蝇碱、异恶唑衍生物、鹿花菌素、鬼伞素及奥来毒素七大类^[4]。其中环型多肽类毒素中的鹅膏毒肽(又称毒伞肽, 有 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽和 γ -鹅膏毒肽 3 种同分异构体)和鬼笔毒肽(羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽), 因其含量高, 化学性质稳定, 耐酸碱等特性, 成为蘑菇中毒事件中引起中毒的主要因素, 小鼠半数致死量(LD_{50})分别为 0.3~0.7 mg/kg 和 1.5~3 mg/kg^[5]。鹅膏毒肽可强烈抑制细胞 RNA 聚合酶的活性, 从而阻碍了蛋白质的合成, 引起多种脏器细胞特别是肝、肾细胞的坏死, 9~12 d 内死亡, 死亡率高达 90%。鹅膏毒肽毒性比鬼笔毒肽强 20 倍, 鬼笔毒肽毒性低但起效快, 鹅膏毒肽起效在服用后的 15 h 左右, 但羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽却可在 2~5 h 内引起死亡。

针对蘑菇毒素的检测早期主要是采用纸层析法和薄层层析法^[6,7]。1980 年开始, 高效液相色谱法^[8,9]被广泛用于毒蘑菇和中毒者血浆、尿液中肽类毒素的检测。当含量较低时, 高效液相色谱法容易产生假阴性结果, 不利于毒素异构体的检出, 而此类异构体对于多肽类蘑菇毒素的生物合成或代谢研究意义重大。高效液相色谱-质谱联用技术的应用^[10-16], 对蘑菇毒素的色谱和质谱指纹图谱检测提供了条件, 更适用于低含量水平的蘑菇毒素的定量检测。除此之外还有放射免疫法^[17]、酶联免疫法^[18]、傅里叶变换红外光谱法^[19]。

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法, 分析采集的蘑菇样本, 首先判定其是否为毒蘑菇, 随后进一步确证蘑菇毒素的种类并测定含量, 快速且准确地将结果反馈给医务人员, 为救治患者提供了科学的依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪 器

API QTRAP 6500 四极杆串联质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司); Shimadzu 20ADXR UPLC 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); XS-205DU 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司); MS3 型漩涡振荡器(德国 IKA 公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); E300H 超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); 0.22 μ m

微孔滤膜(上海 ANPLE 公司)。

2.1.2 试 剂

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 乙酸铵(分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 标准品 α -鹅膏毒肽(α -amanitin)、 β -鹅膏毒肽(β -amanitin)、 γ -鹅膏毒肽(γ -amanitin)、羧基二羟鬼笔毒肽(phalloidin)、二羟鬼笔毒肽(phalloidin)(纯度 $\geq 90\%$, HPLC 级别, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。

2.1.3 样品来源

采样员于患者家中采集未经烹饪的鲜蘑菇样品, 该蘑菇为野外生长蘑菇。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

取采集的 2 朵新鲜蘑菇, 每朵剪一半, 放入研磨仪匀浆处理。准确称取 2.00 g 匀浆后的蘑菇样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入甲醇水混合提取液(甲醇:水=3:7, $V:V$)10 mL, 涡旋混匀, 超声提取 15 min。将提取液进行离心 5 min, 转速为 10000 r/min。上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤, 滤液供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

2.2.2 仪器条件

(1)色谱条件

采用 DIKMA Leapsil C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 2.7 μ m), 以乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相梯度洗脱(见表 1); 流速: 0.40 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样体积; 5 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Mobile phase gradient elution conditions

时间/min	5 mmol/L 乙酸铵水溶液/%	乙腈/%
2.0	80	20
3.0	1	99
7.0	1	99
7.1	80	20
8.0	80	20
9.0	80	20

(2)质谱条件

离子源为 ESI(+), 采用多反应监测(multiple reaction monitor, MRM)方式定量, 利用保留时间和定性与定量离子丰度比值进行定性。质谱条件具体为: 喷雾电压; 5000 V; 气帘气压力; 40 psi; 源内气; 55 L/min; 辅助气; 55 L/min; 碰撞气; 流速中等; 离子源温度; 550 $^{\circ}$ C; 驻留时间; 100 ms; 入口电压(entrance potential, EP); 10 V; 碰撞池出口电压(collision cell exit potential, CXP); 15 V。去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞气能量(collision energy, CE)、3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽碎片离子信息见表 2。

表 2 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽 MRM 信息
Table 2 Parameters of multiple reaction monitoring detection for 3 kinds of amanitins and 2 kinds of phallotoxins

化合物名称(英文)	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞气能量/V
α -鹅膏毒肽	941.3	746.4*	200	70
	941.3	923.3	200	65
β -鹅膏毒肽	942.3	747.4*	200	65
	942.3	924.3	200	65
γ -鹅膏毒肽	925.3	730.5	170	60
	925.3	895.0*	170	60
	925.3	686.3	170	75
	925.3	907.1	170	60
羧基二羟鬼笔毒肽	869.3	795.4*	200	70
	869.3	797.4	200	70
二羟鬼笔毒肽	811.3	767.4*	230	65
	811.3	783.4	230	65
	811.3	739.4	230	70

注; *为定量离子。

2.2.3 标准溶液的配制

分别准确称取适量(精确至 0.01 mg) 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 5 种标准物质于 5 个 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至 10.0 mL,充分混匀。折算为 100%纯品的质量,配制浓度为 100 mg/L 的单一标准储备液,-20 ℃下保存。分别移取各单一标准储备液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至 10 mL,配成浓度为 10 mg/L 的混合标准中间液,-20 ℃下保存。临用前用基质液定容,混匀,配成质量浓度分别为 10、20、50、100、200、500 μ g/L 混合基质标准液。

3 结果与分析

3.1 样品前处理方法的优化

3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽均易溶于水,化学性质均比较稳定,耐高温、耐干燥和耐酸碱,一般的烹调加工不能破坏其毒性。本研究针对鲜蘑菇的提取液进行比较,比较了甲醇、乙腈、甲醇:水(3:7, *V*:*V*)混合液和纯水 4 种提取液,发现甲醇:水(3:7, *V*:*V*)混合液和纯水提取效率较高。为了提高分析速度,鲜蘑菇样品经提取后,可不进行固相萃取小柱净化,用甲醇:水(3:7, *V*:*V*)混合液提取后的样品溶液色谱峰型优于纯水提取液,故本研究选用甲醇:水(3:7, *V*:*V*)混合液提取液。蘑菇中毒事件后,如果无法得到鲜蘑

菇样本,针对患者呕吐物、血浆等生物样品或烹饪后蘑菇,可以选用纯水提取,正己烷脱脂,用 HLB 固相萃取柱净化,再分析。

3.2 色谱与质谱条件的优化

本研究选择 BEH C₁₈、HSS T₃C₁₈、Leapsil C₁₈ 3 种色谱柱进行比较,结果发现 Leapsil C₁₈ 因其低柱压设计,使色谱柱能在高流速下实现快速分离,大大缩短分析时间,分析同分异构体时有较高的分离度且适合在超高效液相色谱-串联质谱仪器上使用。在优化流动相的过程中,发现有机相选用乙腈的分离效果优于甲醇。水相比较纯水、5 mmol/L 乙酸铵水溶液和 0.5%甲酸水溶液,结果发现 5 mmol/L 乙酸铵水溶液能较好地使目标化合物完全分离,且峰型良好。3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽分子中均含有胺基、羟基和羰基等易电离产生正离子,比较负离子和正离子模式,结果发现正离子模式下响应较高。经过色谱与质谱条件优化后,标准物质的碎片离子色谱图,峰型良好,响应高,见图 1。

3.3 线性范围与检出限

在上述分析条件下,以峰面积为纵坐标,以浓度(μ g/L)为横坐标进行线性回归,测定 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽在 10~500 μ g/L 的浓度范围内具有良好线性关系,相关系数(*r*)为 0.9992~0.9996,以 3 倍信噪比计算检出限(limit of detection, LOD)为 0.01 mg/kg,结果见表 3。

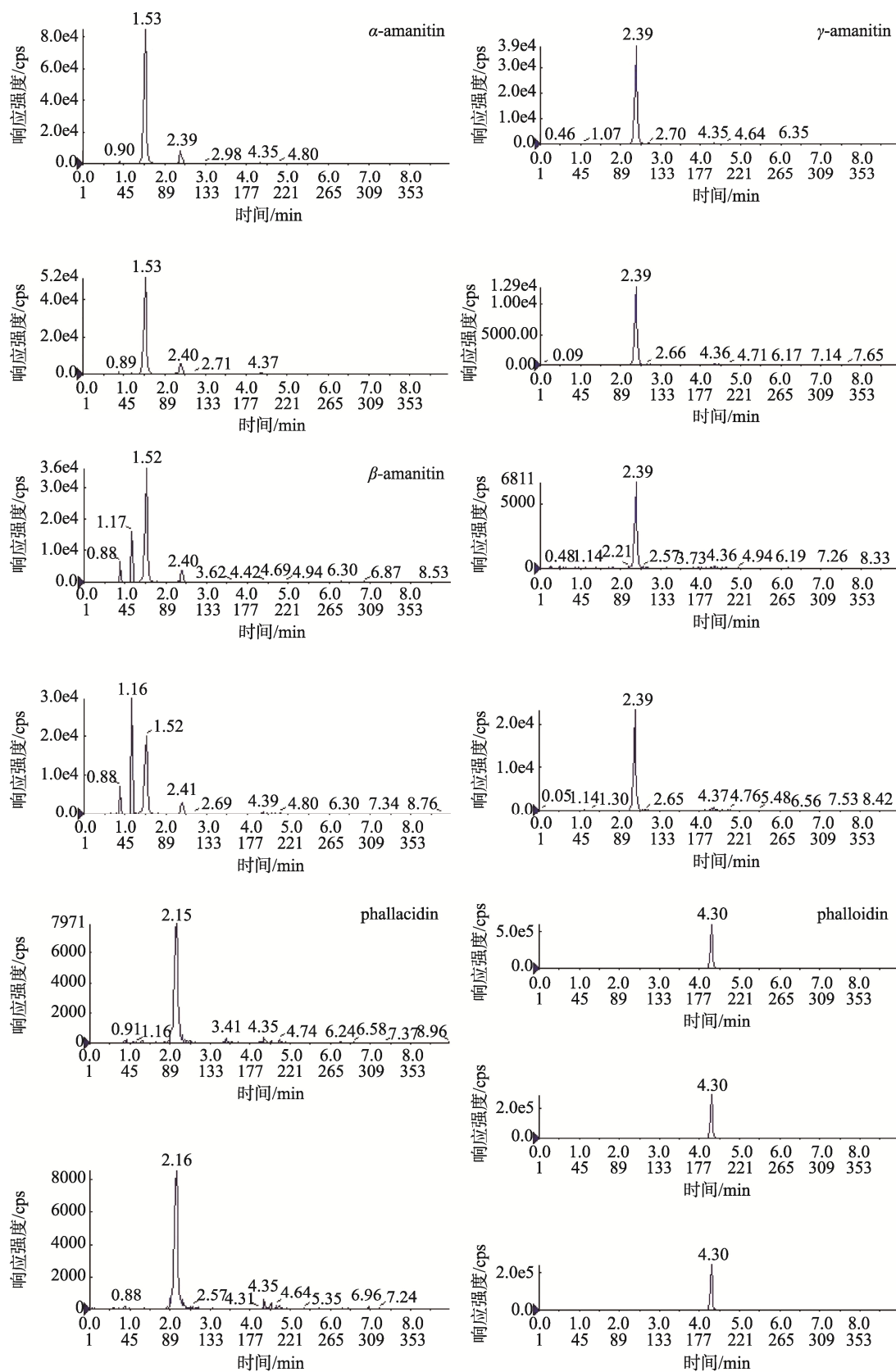


图 1 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽碎片离子色谱图

Fig.1 Fragment ion chromatograms for 3 kinds of amanitins and 2 kinds of phallotoxins

表 3 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽的标准曲线、线性范围及检出限
Table 3 Linear regression equations, linear range and limits of detection of 3 kinds of amanitins and 2 kinds of phallotoxins

化合物	标准曲线	线性范围/(μg/L)	相关系数(<i>r</i>)	检出限/(mg/kg)
α-鹅膏毒肽	$Y=9.43 \times 10^3 X + 5.84 \times 10^3$	10~500	0.9996	0.01
β-鹅膏毒肽	$Y=4.41 \times 10^3 X + 3.12 \times 10^3$	10~500	0.9994	0.01
γ-鹅膏毒肽	$Y=4.17 \times 10^3 X + 6.86 \times 10^3$	10~500	0.9992	0.01
羧基二羟鬼笔毒肽	$Y=1.09 \times 10^3 X + 9.48 \times 10^3$	10~500	0.9996	0.01
二羟鬼笔毒肽	$Y=8.01 \times 10^3 X + 2.08 \times 10^3$	10~500	0.9992	0.01

3.4 精密度与回收率

取不含待测成分的空白样品在低浓度(10 μg/L)、中浓度(200 μg/L)、高浓度(500 μg/L) 3 个浓度水平上进行加标回收实验, 每个水平重复 6 次, 平均回收率为 81.9%~96.2%, 相对标准偏差为 1.7%~8.5%, 满足检测的要求。

3.5 样品检测结果

蘑菇样品采用外标法校准曲线计算含量, 当样品浓度高于校准曲线线性范围时则将其稀释至合适浓度后再进行检测, 测定结果; 蘑菇样品含有 α-鹅膏毒肽 164 mg/kg, β-鹅膏毒肽 198 mg/kg, γ-鹅膏毒肽 33 mg/kg, 羧基二羟鬼笔毒肽 2208 mg/kg, 二羟鬼笔毒肽未检出。

4 讨 论

2008~2015 年, 全国食物中毒事件共 1597 起, 涉及中毒人数 58235 人, 共死亡 1023 人^[20]。化学性、微生物性、有毒动植物和毒蘑菇中毒事件中, 致病因素的品类逐年增加, 呈多样化趋势。毒蘑菇和有毒动植物中毒致死率最高。蘑菇中毒事故中约 90%由于误食含鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的野生蘑菇所引起的。通常野生蘑菇中多含有多种毒素, 其中毒的严重程度取决于蘑菇的类型和早期的诊断治疗。深圳的气候适合蘑菇生长, 致命鹅膏、假褐云斑鹅膏、粉孢牛肝菌和丝盖伞等 4 种毒蘑菇在深圳最为常见。蘑菇辨认是十分复杂的事情, 许多毒蘑菇毒性非常强, 稍有不慎就可能危及生命。有关部门应加强食品安全知识的宣传教育。普通市民千万不要随意采摘野外生长的蘑菇, 更不要吃野蘑菇。如万一不慎误食了野蘑菇出现不适, 请立即前往正规医院就诊; 注意保存并提供误食的蘑菇实物或者照片, 方便医务人员鉴定蘑菇的种类以便确定最有效的救治措施。

参考文献

[1] Chang ST, Miles PG. Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact [M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
[2] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
Mao XL. The macro fungi in China [M]. Zhengzhou: Henan Science and

Technology Press, 2000.
[3] 图力古尔, 包海英, 李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报, 2014, 33: 517-548.
Tuli GE, Bao HY, Li Y. A revised checklist of poisonous mushrooms in China [J]. Mycosystema, 2014, 33: 517-548.
[4] 李林静, 李高阳, 谢秋涛. 毒蘑菇毒素的分类与识别研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 383-387.
Li LJ, Li GY, Xie QT. Research progress on poisonous mushroom toxins classification and recognition [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(4): 383-387.
[5] Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi-An overview [J]. Toxicon, 2003, 42(4): 339-349.
[6] 陈作红, 胡劲松. 鹅膏肽类毒素检测方法的历史与现状[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 11-16.
Chen ZH, Hu JS. Historical development and present situation of detection methods for amanita peptide toxins [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 11-16.
[7] 邓哲, 荆文光, 刘安. 薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 209-214.
Deng Z, Jing WG, Liu A. Application of thin layer chromatography in current quality standards of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2019, 25(7): 209-214.
[8] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 超高效液相色谱-二极管阵列检测法快速测定毒蘑菇中 5 种毒肽[J]. 浙江预防医学, 2016, 28(2): 214-216.
Zhang XY, Cai XX, Zhang XY, et al. Rapid determination of five toxic peptides in poisonous mushroom by ultra performance liquid chromatography diode array detection [J]. Zhejiang J Prev Med, 2016, 28(2): 214-216.
[9] 龚庆芳, 魏宝阳, 肖桂林, 等. RP-HPLC 法测定鹅膏菌中毒患者体液中的 α-amanitin[J]. 湖南师范大学(自然科学学报), 2005, 28(2): 67-69.
Gong QF, Wei BY, Xiao GL, et al. Determination of α-amanitin in amanita poisoned patients body fluid by RP-HPLC [J]. J Nat Sci Hunan Norm Univ, 2005, 28(2): 67-69.
[10] 柳洁, 丁文婕, 何碧英, 等. 超高效液相色谱-电喷雾离子化-四级杆飞行时间串联质谱指纹图谱检测毒蕈中 4 种鹅膏肽类毒素[J]. 分析化学, 2013, 41(4): 500-508.
Liu J, Ding WJ, He BY, et al. Identification of four toxin peptides from amanita in poisonous mushroom by mass spectrum fingerprint based on ultra performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time of flight-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(4): 500-508.
[11] 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.
Zhang XY, Cai XX. Rapid simultaneous determination of five amatoxins

- and phallotoxins in human urine and plasma by ultra performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(1): 39–44.
- [12] 林信, 闵向东, 袁玥, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定云南野生小豹斑鹅膏菌中的毒蝇碱和毒蝇母[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(22): 40–42.
- Lin J, Min XD, Yuan Y, *et al.* Determination of muscarine and muscimol in amanita pantherine in Yunnan by UPLC-MS/MS [J]. *Mod Prev Med*, 2017, 44(22): 40–42.
- [13] 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.
- Li Q, Lei YL, Song RQ, *et al.* Advances in research of mass spectrometry detection methods for amanita peptide toxins [J]. *Pract Prev Med*, 2015, 22(11): 1403–1407.
- [14] 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.
- Xu XM, Zhang JS, Cai ZX, *et al.* Determination of amanitins and phallotoxins in wild mushrooms by online liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(6): 613–619.
- [15] 肖绍震, 林锋, 傅武胜, 等. 血浆和尿液 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的超高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. *食品科学*, 2018, 39(22): 312–318.
- Xiao SZ, Lin F, Fu WS, *et al.* Determination of amatoxins and phallotoxins in plasma and urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2018, 39(22): 312–318.
- [16] 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.
- Wu FX, Zhang ZQ, Wang J, *et al.* Determination of 4 kinds of common toxins in poisonous mushrooms by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(22): 7656–7664.
- [17] 韦林洪, 张军, 王承莉, 等. 免疫分析法在克伦特罗残留检测中的应用[J]. *化学试剂*, 2019, 41(7): 675–681.
- Wei LH, Zhang J, Wang CL, *et al.* Application of immunoassay in clenbuterol residue detection [J]. *Chem Reag*, 2019, 41(7): 675–681.
- [18] Butera R, Locatelli C, Coccini T, *et al.* Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: A pilot study [J]. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2004, 42(6): 901–912.
- [19] 时有明, 刘刚, 孙艳琳. 八种鹅膏菌的傅里叶变换红外光谱的差谱鉴别研究[J]. *光散射学报*, 2012, 24(2): 212–215.
- Shi YM, Liu G, Sun YL. Differential analysis of four species of amanita by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Chin J Light Scatt*, 2012, 24(2): 212–215.
- [20] 陈小敏, 杨华, 桂国弘, 等. 2008 ~ 2015 年全国食物中毒情况分析[J]. *食品安全导刊*, 2017, (25): 69–73.
- Chen XM, Yang H, Gui GH, *et al.* Analysis of food poisoning in China from 2008 to 2015 [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2017, (25): 69–73.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



许欣欣, 副主任技师, 主要研究方向为食品中有机污染物。
E-mail: xxx210@qq.com