

实验技术与方法

液相色谱-串联质谱法快速测定野生菌中9种蘑菇毒素

徐小民, 郑熠斌, 黄百芬, 许娇娇, 蔡增轩, 韩见龙
(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

摘要:目的 建立液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)测定野生菌中5种急性肝衰竭型(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)和4种神经-精神紊乱型(鹅膏蕈氨酸、毒蝇母、毒蝇碱和裸盖菇素)蘑菇毒素的分析方法。方法 样品经干燥后采用0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水溶液提取、乙腈沉淀蛋白质、水稀释后,采用XBridge™ BEH C₁₈柱(150 mm×3.0 mm, 2.5 μ m)分离、0.005%(V/V)甲酸水溶液-甲醇流动相体系梯度洗脱,MS/MS多反应监测(MRM)模式测定。结果 通过优化样品提取、稀释倍数和色谱条件,实现基于纯溶剂标准校正的不同野生菌中9种蘑菇毒素的定性和定量测定。样品基质中9种蘑菇毒素的检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为6~15 mg/kg和20~50 mg/kg,线性范围为0.004~2 mg/L,相关系数 r 在0.9973~0.9995之间。50、500和5000 mg/kg三水平加标平均回收率为78.6%~109.7%,相对标准偏差(RSD)为2.7%~9.0%。多起中毒事件中采集的不同野生菌毒素组成和含量差异大。结论 本方法操作简便、快速,结果准确,已应用于常见有毒野生菌中蘑菇毒素检测和中毒应急事件处置,可以为中毒病因的鉴定和患者的及时救治提供快速、准确的技术支持。

关键词:液相色谱-串联质谱;蘑菇毒素;急性肝衰竭;神经-精神紊乱;野生菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)02-0262-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.011

Fast determination of 9 mushroom toxins in wild fungus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Xiaomin, ZHENG Yibin, HUANG Baifen, XU Jiaojiao, CAI Zengxuan, HAN Jianlong
(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective To establish an analytical method for 9 mushroom toxins in wild fungus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) including 5 acute liver failure toxins (α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, phalloidin and phalloidin) and 4 psycho-neurological disorder toxins (ibotenic acid, musimol, muscarine and psilocybin). **Methods** The dried sample was extracted with 50% (V/V) methanol/water mixture containing 0.5% (V/V) formic acid, protein was precipitated with acetonitrile and diluted with water. The toxins were separated with XBridge™ BEH C₁₈ column (150 mm×3.0 mm, 2.5 μ m), gradient eluted with the mobile phase of 0.005% (V/V) formic acid aqueous solution - methanol, and measured by MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The conditions of sample extraction, dilution ratio and chromatographic separation were optimized. 9 mushroom toxins in different wild fungus could be qualitatively and quantitatively measured based on the pure solvent standard calibration. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) in sample matrix were 6-15 mg/kg and 20-50 mg/kg, respectively. The linear ranges were 0.004-2 mg/L with correlation coefficients (r) of between 0.9973-0.9995. The average recoveries at three spiking levels (50 mg/kg, 500 mg/kg and 5000 mg/kg) were 78.6%-109.7% with relative standard deviations (RSDs) of 2.7%-9.0%. The toxin compositions and contents varied greatly in the wild mushrooms sampled in some poisoning cases. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate. It has been applied to the analysis of mushroom toxins in common poisonous wild mushrooms and the disposal of poisoning emergencies. It can provide rapid and accurate technical support for the etiology identification of poisoning cases and the timely rescue of patients.

Key words: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mushroom toxins; acute liver failure; psycho-neurological disorder; wild fungus

收稿日期:2021-09-05

基金项目:浙江省自然科学基金(LGF18H260007)

作者简介:徐小民 男 主任技师 研究方向为食品卫生理化检验 E-mail: chemxuxm@163.com

通信作者:韩见龙 男 主任技师 研究方向为食品卫生理化检验 E-mail: jlhan@edc.zj.cn

有毒野生菌是引起我国食源性疾病及中毒死亡的主要致病因子^[1-2]。误食不同的有毒野生菌后,随着病情发展,患者会出现胃肠炎、精神-神经紊乱、溶血、光敏性皮炎、横纹肌溶解症、急性肝衰竭或肾衰竭型等7种临床症状,致命的主要是最后3种类型的野生菌中毒^[3],2019—2020年,我国有记载的野生菌中毒总体病死率为1.89%,其中,急性肝毒性中毒的病死率为12.6%,占总死亡人数的78.7%^[1-2]。精神-神经紊乱型中毒虽然很少有死亡病例报道,但其发病急,重症中毒会导致患者昏迷或出现幻觉^[3],也需要特别关注。不管是哪种类型的野生菌中毒,患者最初只表现为普通胃肠炎型症状,为患者及时地对症治疗带来了难度,迫切需要开发相关多组分检测技术,为病因的早期快速鉴定提供支持。

野生菌中所含的毒素不同是导致临床症状差异的主要原因。导致急性肝衰竭的蘑菇毒素主要

为鹅膏毒肽和鬼笔毒肽等环状多肽类毒素,鹅膏毒肽主要包括 α -鹅膏毒肽(α -amanitin)、 β -鹅膏毒肽(β -amanitin)和 γ -鹅膏毒肽(γ -amanitin)3种,鬼笔毒肽主要为羧基二羟鬼笔毒肽(Phalloidin)和二羟鬼笔毒肽(Phalloidin)^[3-4],毒性最强的 α -鹅膏毒肽对人的半数致死量(LD₅₀)为0.1 mg/kg^[5]。含此类毒素的野生菌包括有毒的鹅膏菌、环柄菇和盔孢伞等3大类^[5]。导致精神-神经紊乱型中毒的蘑菇毒素主要为鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid)、毒蝇母(Musimol)、毒蝇碱(Muscarine)和裸盖菇素(Psilocybin)等,多存在于有毒鹅膏菌、丝盖伞、斑褶菇、裸盖菇和裸伞属等野生菌中^[3,5]。导致溶血型中毒的毒素包括鹿花菌素等,主要存在于鹿花菌中^[3]。引起横纹肌溶解症、急性肾衰竭或普通胃肠炎症状的毒素虽然也有报道,但其结果目前还没有被重现和确证^[3,6]。本方法主要针对急性肝衰竭和神经-精神紊乱型中毒的9种蘑菇毒素开展检测方法研究,其结构式^[7,8]见图1。

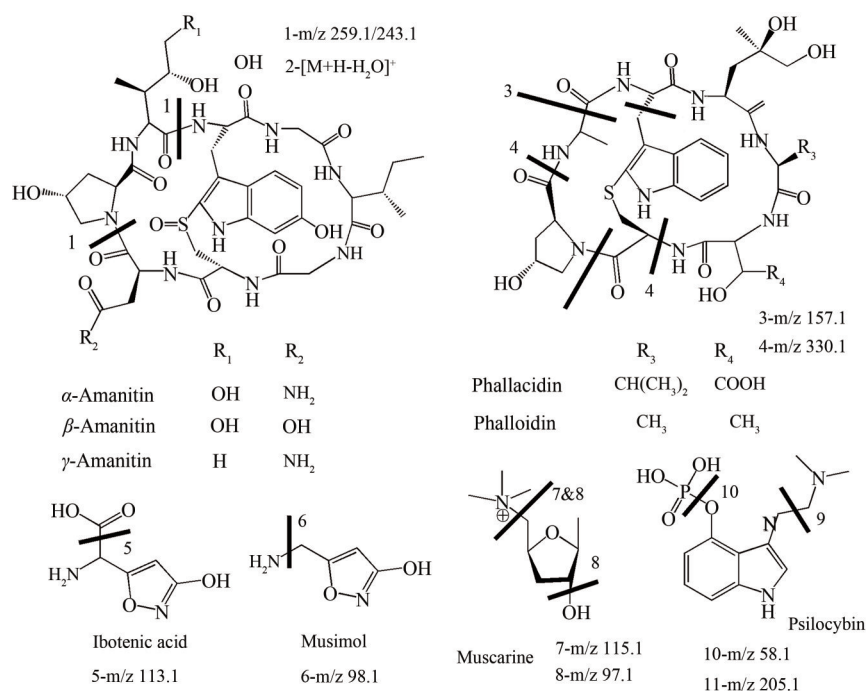


图1 9种蘑菇毒素的化学结构式与二级质谱碎裂途径

Figure 1 Chemical structures and fragmentation pathways of nine mushroom toxins by MS/MS

野生菌中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的检测主要包括液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)^[9]、液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(Liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, LC-QTOF/MS)^[4,7,10]和液相色谱-串联质谱法(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[11-13]。鹅膏蕈氨酸和毒蝇母极性较强,文献采用亲水色谱柱分离 LC-MS/MS 检测^[14],或者丹磺酰氯衍生化后测定^[15-16],亲水色谱柱分离或衍生化测定的方法,均不适合与其它

几种毒素的同时测定。毒蝇碱主要采用亲水色谱柱分离 LC-MS/MS 检测^[17],裸盖菇素采用反相 C18 柱分离后 LC-MS/MS 检测^[18]。样品前处理多采用 HLB(多肽类蘑菇毒素)^[7,10,12]和阴离子交换(鹅膏蕈氨酸)^[14]等固相萃取净化以及氮吹或减压浓缩等技术。HPLC 法适用于野生菌中高含量多肽类蘑菇毒素的测定,但不适用于毒蝇碱等缺乏紫外或荧光官能团的毒素测定。LC-QTOF/MS 主要用于毒素的定性鉴定。LC-MS/MS 法是多类多种蘑菇毒素同时定性定量测定较理想的方法。有文献报道了野生菌中

4种多肽类和3种神经-精神紊乱型蘑菇毒素的检测方法,但需要采用分步提取2次仪器进样分析,操作较繁琐^[7],急性肝衰竭型和神经-精神紊乱型9种蘑菇毒素的同时提取和测定的方法未见报道。本研究拟通过优化样品前处理和色谱分离条件,建立野生菌中9种蘑菇毒素的LC-MS/MS快速定性定量检测技术,为野生菌中毒素组成和含量水平研究、为相关中毒事件的应急处置等提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

根据中毒事件线索,采集野生菌样品,切成小块,于40℃烘箱鼓风干燥至恒重,粉碎、混合均匀,置于-20℃保存。以不含本文所述9种蘑菇毒素的假褐云斑鹅膏菌为空白基质开展方法学验证。

1.1.2 主要仪器与试剂

液相色谱-串联质谱仪(日本岛津,LCMS-8060);超纯水装置(美国Millipore);高速离心机(德国Sartorius, Sartorius 1-14);高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,HC-3018);旋涡混合器(江苏太仓华利达实验设备有限公司,WH-861)。

甲醇和乙腈为色谱纯(美国TEDIA公司);甲酸为分析纯(美国ROE Scientific公司); 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(纯度>90%,美国Alexis公司);鹅膏蕈氨酸和毒蝇母(纯度>95%,美国Sigma-Aldrich公司);毒蝇碱(纯度>98%,加拿大TRC公司);裸盖菇素(纯度>95%,天津阿尔塔公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别准确称取9种蘑菇毒素标准品于10 mL

容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制质量浓度为100 mg/L的单一标准储备液,于-20℃避光保存;分别移取1 mL标准储备液,用水稀释并配制质量浓度为10 mg/L的混合标准使用液;移取适量混合标准使用液,用水配制质量浓度为0.004~2 mg/L的系列标准溶液。

1.2.2 样品前处理

准确称取均匀的样品约0.2 g(精确至0.001 g),置于15 mL聚丙烯刻度离心管中,加入8 mL含0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水溶液,涡旋混匀1 min,超声提取10 min,待冷却至室温后,用提取液定容至10 mL,混匀,以10 000 r/min离心2 min,移取0.2 mL上清液,加入0.1 mL水和0.7 mL乙腈,涡旋混匀,以10 000 r/min离心2 min,移取0.05 mL上清液,加入0.95 mL水,涡旋混匀,过0.22 μ m滤膜后,上机测定。

1.2.3 仪器条件

液相色谱:XBridge™ BEH C₁₈柱(150 mm×3.0 mm,2.5 μ m,美国Waters公司);柱温35℃;流动相:(A)0.005%甲酸水溶液和(B)甲醇。梯度洗脱程序:0~2.0 min,5% B;2.0~6.0 min,5%~90% B;6.0~7.0 min,90% B;7.0~7.5 min,90%~5% B;7.5~12.0 min,5% B。流速0.4 mL/min。进样体积5 μ L。

串联质谱:电喷雾离子源正离子模式监测(ESI⁺);离子源接口电压:4.5 kV;雾化气、干燥气和加热气分别为氮气、氮气和空气,流量分别为3.0、10和10 L/min;碰撞气:氩气;脱溶剂管、接口和加热块温度分别为250、250和400℃;多反应监测(Multiple-reaction monitoring, MRM)模式,具体参数见表1。

表1 9种蘑菇毒素的MRM条件、线性范围、LOD和LOQ

Table 1 MRM parameters, linear ranges, LODs and LOQs of the 9 mushroom toxins

序号	蘑菇毒素	母离子/(m/z)	子离子 [±] /(m/z)	碰撞能/eV	线性范围/(mg/L)	r	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
1	α -鹅膏毒肽	919.4	259.1/901.4	45/29	0.01~2	0.9995	15	50
2	β -鹅膏毒肽	920.4	259.1/902.4	44/26	0.01~2	0.9987	15	50
3	γ -鹅膏毒肽	903.4	243.1/885.4	43/26	0.004~1	0.9993	6	20
4	羧基二羟鬼笔毒肽	847.4	157.1/330.1	55/41	0.004~1	0.9992	6	20
5	二羟鬼笔毒肽	789.4	157.1/330.1	55/39	0.004~1	0.9990	6	20
6	鹅膏蕈氨酸	159.1	113.1	15	0.01~1	0.9973	15	50
7	毒蝇母	115.1	98.1	14	0.01~1	0.9983	15	50
8	毒蝇碱	174.1	115.1/97.1	16/19	0.004~1	0.9991	6	20
9	裸盖菇素	285.1	58.1/205.1	30/18	0.01~2	0.9988	15	50

注:第一个为定量离子

2 结果

2.1 样品制备和提取

实验发现,即使是-20℃冷冻保存,未烘干的野

生菌中的蘑菇毒素也会缓慢降解。为便于获得均匀的试样,以便于保存、保证实验结果的稳定性和准确性,本文需要将新鲜野生菌制成干制品后提

取。中毒事件发生时,为快速鉴定病因,可以10倍干制品的质量称取新鲜野生菌后测定,剩余蘑菇鼓风烘干、粉碎、混匀后准确定量测定毒素含量。

鹅膏毒肽类、鬼笔毒肽类、鹅膏蕈氨酸、毒蝇母、毒蝇碱和裸盖菇素等蘑菇毒素同时提取和检测未见报道。这些毒素属于极性化合物,均易溶于水,文献采用甲醇^[11]、50%(V/V)甲醇-水^[19]、0.5%(V/V)盐酸水溶液^[12]或0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水^[4]等提取新鲜或干制野生菌中的鹅膏毒肽和鬼笔毒肽,50%(V/V)甲醇-水^[14]和0.1%(V/V)甲酸水^[20]等提取干制品中鹅膏蕈氨酸和毒蝇母,采用乙腈提取新鲜野生菌中毒蝇碱^[17]。为实现干制品中9种蘑菇毒素的同时提取,试验分别采用甲醇、0.5%(V/V)盐酸水溶液、50%(V/V)甲醇-水和0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水提取。甲醇多用于新鲜样品的提取^[11],对于干制品,甲醇只有60%~70%的提取效率,结果偏低;0.5%(V/V)盐酸提取液对色谱保留较弱的鹅膏蕈氨酸和毒蝇母的测定存在干扰;50%(V/V)甲醇-水和0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水的提取效率均高于90%,但加入甲酸后的提取效果略好,最终选择0.5%(V/V)甲酸50%(V/V)甲醇-水为提取溶剂。

2.2 样品稀释与基质效应

野生菌基质复杂,即使采用固相萃取技术净化后,仍然需要采用基质匹配的标准工作溶液校正才能获得蘑菇毒素的定量检测结果^[12]。固相萃取及后续的氮吹浓缩等操作费时,不利于中毒事件快速应对,且蘑菇毒素是特定野生菌天然存在的毒素,无法获得用于制备基质匹配标准工作溶液的空白基质,文献报道纯溶剂稀释技术可以有效改善农药等LC-MS/MS测定时的基质效应^[21]。文献报道溶液中乙腈含量超过70%能有效沉淀蛋白质^[16],本文采用70%乙腈沉淀蛋白质和无机盐后,实验尝试采用溶剂稀释技术以消除基质效应,实现野生菌中蘑菇毒素的纯溶剂标准定量校正和快速测定。

以不含上述毒素的肾毒性假褐云斑鹅膏菌为空白基质,按1.2.2样品前处理操作,分别取乙腈沉淀蛋白质后的提取液0.25、0.125和0.05 mL,添加10 mg/L的混合标准使用液20 μ L,用水定容到1 mL后测定,相当于每克野生菌干粉分别用溶剂稀释1 000、2 000和5 000倍。以5%甲醇水的纯溶剂标准校正,基质效应 $ME(\%)=100 \times (\text{样品基质中蘑菇毒素的峰面积})/(\text{纯溶剂中的峰面积})$,大于或小于100%分别表示基质增强或基质抑制^[16],结果见图2。9种蘑菇毒素采用LC-MS/MS法测定时,在样品基质中主要表现为基质抑制,5 000倍稀释

时,所有组分的基质效应均在90%~100%之间,基质抑制得到有效的控制,可以采用纯溶剂标准溶液校正以获得准确的定量结果。

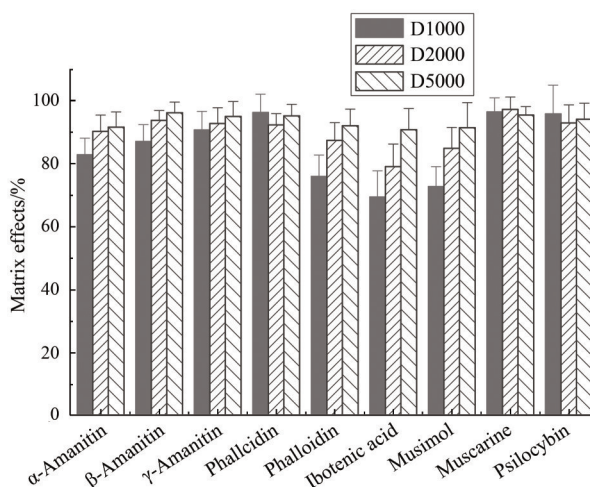
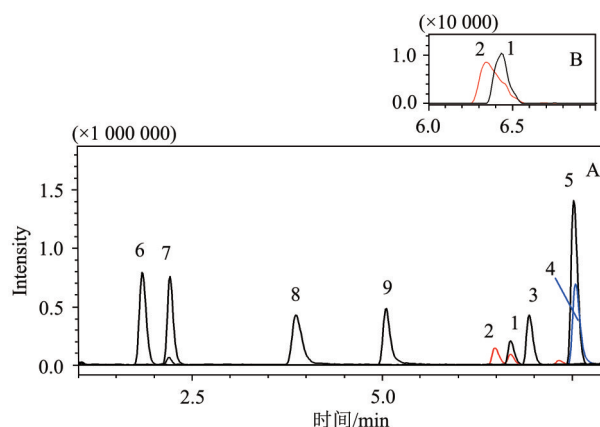


图2 稀释1 000、2 000和5 000倍时野生菌中各蘑菇毒素的基质效应(n=6)

Figure 2 Matrix effects (n=6) of the mushroom toxins in wild mushroom diluted with 1 000, 2 000 and 5 000 fold(n=6)

2.3 色谱条件优化

鹅膏蕈氨酸属于氨基酸,毒蝇母是其脱羧后形成的生物胺类物质,毒蝇碱为季铵盐类蘑菇毒素,三者极性很强,文献主要采用亲水色谱柱^[14,17],以增强其色谱保留能力,其他6种蘑菇毒素文献多采用反相C18柱分离^[12-13,18]。为实现9种蘑菇毒素的同时测定,实验采用150 mm的C18柱,如图3A所示,按最佳色谱分离条件,最早出峰的鹅膏蕈氨酸保留时间为1.8 min,而毒蝇碱为3.2 min,3种强极性组



注:1- α -鹅膏毒肽、2- β -鹅膏毒肽、3- γ -鹅膏毒肽、4-羧基二羟鬼笔毒肽、5-二羟鬼笔毒肽、6-鹅膏蕈氨酸、7-毒蝇母、8-毒蝇碱、9-裸盖菇素

图3 9种蘑菇毒素在最优条件(A)和 α -鹅膏毒肽/ β -鹅膏毒肽在水相为0.02%(V/V)甲酸-水溶液(B)时的色谱图

Figure 3 Chromatograms for 9 mushroom toxins under the optimized conditions (A) and for α -Amanitin and β -Amanitin with water phase of 0.02% (V/V) formic acid (B)

分在 C18 柱中得到有效分离。

α -鹅膏毒肽的分子量只比 β -鹅膏毒肽少 1 个质量数,文献采用氨水^[11]或醋酸铵溶液^[10,19]作为水相,实现 LC-MS/MS 测定时两者的有效色谱分离,以消除 α -鹅膏毒肽的同位素峰对 β -鹅膏毒肽测定的干扰。但实验发现,在氨水或醋酸铵溶液作为水相流动相时,毒蝇碱不出峰,毒蝇碱需要在酸性溶液中才能获得有效分离,而 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽在较高浓度的酸性溶液中分离效果不佳(图 3B, 0.02%(V/V)甲酸-水溶液),以甲醇为有机相,实验尝试采用 0.1%、0.02%、0.01% 和 0.005%(V/V)甲酸-水溶液为水相,发现随着甲酸浓度的降低, α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽的分离度逐渐提高,不过,当其浓度低于 0.005%(V/V)时,毒蝇碱和裸盖菇素的分离效果和响应信号逐渐变差。实验最终采用 0.005%(V/V)甲酸-水溶液为水相,9 种蘑菇毒素的分离效果见图 3A,羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽虽然色谱峰重叠,但两者母离子分别为 m/z 847.4 和 789.4,质量数差异大,可以通过表 1 所述串联质谱的特征离子通道来有效分离。

2.4 二级质谱特征离子

如图 1 和表 1 所示, α -和 β -鹅膏毒肽类二级质谱特征离子 m/z 259.1 为碎裂途径 1 所示的羟脯氨酸和二羟基异亮氨酸组成的二肽, γ -鹅膏毒肽特征离子 m/z 243.1 则来自于羟脯氨酸和单羟基异亮氨

酸组成的二肽,另一组特征离子来自于鹅膏毒肽脱水后的离子碎片。鬼笔毒肽类的特征离子主要来自于碎裂途径 3 和 4 所示的特征碎片。鹅膏蕈氨酸和毒蝇母的特征离子分别来自于 $[M+H-HCOOH]^+=113.1$ 和 $[M+H-NH_3]^+=98.1$ 的碎片。毒蝇碱的二级质谱特征离子来自于碎裂途径 7 和 8 所示的 $[M-N(CH_3)_3]^+=115.1$ 和 $[M-N(CH_3)_3-H_2O]^+=97.1$,来自季铵盐部分的特征离子 m/z 57.1 响应值超过 m/z 115.1 和 97.1 两个离子的 5 倍,考虑到中毒样品中其含量较高,为保证检测结果在线性范围内,选择响应值低的两个特征离子通道开展定性定量检测。裸盖菇素的二级质谱特征离子来自于三甲胺和 $[M+H-H_2PO_3]^+=205.1$ 的碎片。

2.5 方法学考察

2.5.1 检出限、定量限和线性范围

以 3 倍信噪比对应的含量为检出限(Limit of detection, LOD)、10 倍信噪比对应的含量为定量限(Limit of quantitation, LOQ),各蘑菇毒素的结果见表 1,野生菌中 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽和毒蝇碱的 LOD 和 LOQ 均分别为 6 和 20 mg/kg,其他 5 种毒素的 LOD 和 LOQ 均分别为 15 和 50 mg/kg。各毒素的 LOD 值均低于文献报道的引起中毒的 46~500 mg/kg(干样)之间的最低浓度(表 2),基于 LC-MS/MS 的高灵敏度,即使是经过 5000 倍的稀释,方法检出限仍能满足要求。

表 2 文献报道的野生菌中蘑菇毒素含量

Table 2 Reported contents of mushroom toxins in wild mushrooms

序号	蘑菇毒素	含量/(mg/kg)	蘑菇种类	检测方法
1	α -鹅膏毒肽	500~8080	鹅膏菌(<i>A. phalloides</i> , <i>A. exitialis</i> , <i>A. bisporigera</i> , <i>A. fuliginea</i> , <i>A. fuliginoides</i> , <i>A. pallidorosea</i> , <i>A. rimosa</i> , <i>A. subjunquillea</i> , <i>A. virosa</i>)	HPLC ^[9,19,22]
2	β -鹅膏毒肽	390~4170		
3	γ -鹅膏毒肽	310		
4	羧基二羟鬼笔毒肽	140~2710		
5	二羟鬼笔毒肽	220~2870		
6	鹅膏蕈氨酸	182~1998	鹅膏菌(<i>A. muscaria</i>)	LC-MS/MS ^[15]
7	毒蝇母	46~1203	丝盖伞(<i>Inocybe serotina</i>) 裸盖菇(<i>Psilocybe cubensis</i>)	LC-MS/MS ^[17] LC-MS/MS ^[18,23]
8	毒蝇碱	324 ^a		
9	裸盖菇素	180~6300		

注:^a鲜样

野生菌中 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽和毒蝇碱的线性范围均为 20~5 000 mg/kg,鹅膏蕈氨酸和毒蝇母的均为 50~5 000 mg/kg,其他毒素的均为 50~10 000 mg/kg,相关系数 r 在 0.997 3~0.999 5 之间(表 1)。引起中毒的野生菌中毒素含量(表 2)均在所建立的方法线性范围以内,通过调整最佳稀释倍数,不仅可以消除基质效应,实现纯溶剂标准定量校正的目的,还可以一次测定,直接得到中毒样品中毒素的准确含量,进一

步简化了实验操作。

2.5.2 准确度和精密性

在空白野生菌中添加 50、500 和 5000 mg/kg 3 个浓度水平,测定准确度(回收率)和精密性(相对标准偏差,RSD, $n=6$),结果见表 3。回收率为 78.6%~109.7%,RSD 为 2.7%~9.0%。制备上述三个浓度水平的质控样,测定日间(连续 3 d, $n=3$)回收率和 RSD,结果见表 4。日间回收率为 75.0%~109.2%,RSD 为 1.9%~11.4%。

表3 野生菌中蘑菇毒素三水平加标回收率和RSD($n=6$)Table 3 Recoveries and RSDs of the toxins in wild mushroom at three spiking levels ($n=6$)

蘑菇毒素	50 mg/kg		500 mg/kg		5 000 mg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
α -鹅膏毒肽	85.8	6.9	94.2	3.9	95.0	4.0
β -鹅膏毒肽	87.4	6.0	93.2	4.4	94.9	3.0
γ -鹅膏毒肽	92.0	4.4	90.9	4.5	96.6	4.8
羧基二羟鬼笔毒肽	78.6	6.7	95.5	5.7	98.7	5.1
二羟鬼笔毒肽	79.0	7.6	90.3	3.9	97.7	4.1
鹅膏蕈氨酸	109.7	9.0	93.9	5.2	94.3	6.7
毒蝇母	107.5	7.8	93.6	4.5	96.5	6.0
毒蝇碱	86.8	4.3	91.7	2.7	96.5	4.8
裸盖菇素	81.7	4.1	90.8	4.5	94.4	5.1

2.6 野生菌中蘑菇毒素的测定

应用本方法,开展了多次误食有毒野生菌中毒事件的应急检测,在引起单纯胃肠炎、肾毒性或横

纹肌溶解症中毒的野生菌中均未检出上述9种蘑菇毒素,说明方法具有很高的特异性。

表4 野生菌中蘑菇毒素的日间回收率和RSD($n=3/d$,连续3 d)Table 4 Inter-days' accuracy and RSDs of the toxins in wild mushroom ($n=3$ per day, 3 d).

蘑菇毒素	50 mg/kg		500 mg/kg		5 000 mg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
α -鹅膏毒肽	85.3	6.7	91.3	4.8	96.7	3.8
β -鹅膏毒肽	86.2	7.9	93.6	4.0	96.7	4.7
γ -鹅膏毒肽	92.6	5.4	94.0	5.2	97.4	5.4
羧基二羟鬼笔毒肽	75.0	8.2	94.5	4.9	93.9	6.5
二羟鬼笔毒肽	80.3	7.0	93.1	4.1	98.0	6.2
鹅膏蕈氨酸	107.0	9.7	96.3	4.8	96.5	3.4
毒蝇母	109.2	8.1	91.7	4.5	95.8	5.1
毒蝇碱	85.7	5.6	94.0	1.9	95.3	3.4
裸盖菇素	82.0	11.4	87.7	5.2	94.8	4.0

根据方法检出限,各阳性野生菌中蘑菇毒素含量见表5,野生菌品种依据形态学鉴定,并通过与文献报道的毒素组成和含量水平验证。实验中收集到的引起致命肝毒性中毒的野生菌包括裂皮鹅膏、灰花纹鹅膏、黄盖鹅膏、褐鳞环柄菇、毒环柄菇等。裂皮鹅膏中检出3种鹅膏毒肽和2种鬼笔毒肽,含量最高的毒素为 α -鹅膏毒肽,其次为 β -鹅膏毒肽, γ -鹅膏毒肽虽有检出,但含量较低。灰花纹鹅膏中检出3种鹅膏毒肽和二羟鬼笔毒肽共4种毒素,含

量最高的也是 α -鹅膏毒肽。黄盖鹅膏中检出上述5种毒素,但含量最高的是 β -鹅膏毒肽。肝毒性的环柄菇中只检出鹅膏毒肽,鬼笔毒肽类未检出,且两种毒环柄菇毒素差异大,褐鳞环柄菇中检出含量最高的是 α -鹅膏毒肽,而毒环柄菇中检出含量最高的是 γ -鹅膏毒肽, γ -鹅膏毒肽在其它野生菌中未检出或者含量较低,容易被忽视,在应对毒环柄菇类中毒事件时,需要特别关注 γ -鹅膏毒肽的含量。

表5 野生菌中蘑菇毒素组成和含量(mg/kg)

Table 5 Composition and contents of the mushroom toxins in wild mushroom (mg/kg)

野生菌	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9
裂皮鹅膏-1	9574	4540	85.2	1346	899	ND	ND	ND	ND
裂皮鹅膏-2	4065	1836	34.2	541	419	ND	ND	ND	ND
裂皮鹅膏-3	5984	2483	45.5	757	596	ND	ND	ND	ND
灰花纹鹅膏	8223	2419	156	ND	1110	ND	ND	ND	ND
黄盖鹅膏	3635	4481	7.6	1135	1127	ND	ND	ND	ND
褐鳞环柄菇-1	1136	614	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
褐鳞环柄菇-2	1470	888	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
毒环柄菇	406	ND	1883	ND	ND	ND	ND	ND	ND
豹斑鹅膏	ND	ND	ND	ND	ND	2307	491	ND	ND
茶褐丝盖伞	ND	ND	ND	ND	21.4	ND	ND	2087	ND
喜粪裸盖菇	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	544
热带紫褐裸伞	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1165

注:^a为1- α -鹅膏毒肽、2- β -鹅膏毒肽、3- γ -鹅膏毒肽、4-羧基二羟鬼笔毒肽、5-二羟鬼笔毒肽、6-鹅膏蕈氨酸、7-毒蝇母、8-毒蝇碱、9-裸盖菇素; ND为未检出

导致神经-精神紊乱型中毒的野生菌包括豹斑鹅膏、茶褐丝盖伞、喜粪裸盖菇和热带紫褐裸伞等,毒素组成和含量见表5。豹斑鹅膏中检出鹅膏蕈氨酸和毒蝇母,临床表现为神经中毒症状,重症会快速导致患者昏迷。茶褐丝盖伞中检出高浓度的毒蝇碱(2 087 mg/kg)及少量二羟鬼笔毒肽(21.4 mg/kg),分析以往中毒案例,二羟鬼笔毒肽的含量不足以导致急性肝损伤,此类野生菌主要表现为毒蝇碱引起的神经中毒症状。喜粪裸盖菇和热带紫褐裸伞中均检出裸盖菇素,此类野生菌主要为精神迷幻类中毒症状。

3 小结

基于高比例稀释技术消除野生菌中蘑菇毒素检测的基质效应,通过优化色谱条件,结合 LC-MS/MS 联用技术的高灵敏度特性,建立了基于纯溶剂标准校正的多类野生菌中急性肝衰竭和神经-精神紊乱型 2 大类 9 种蘑菇毒素的快速检测技术,明确了常见有毒野生菌中蘑菇毒素的组成和含量水平。本方法具有操作简便、抗干扰能力强、野生菌和毒素适用范围广等优势,能满足野生菌中蘑菇毒素的多组分筛查和定量测定要求,为相关中毒事件的快速病因鉴定及患者救治提供了关键检测技术支撑。

参考文献

- [1] LI H J, ZHANG H S, ZHANG Y Z, et al. Mushroom Poisoning Outbreaks-China, 2020 [J]. China CDC Weekly, 2021, 3(3): 41-45.
- [2] LI H J, ZHANG H S, ZHANG Y Z, et al. Mushroom poisoning outbreaks—China, 2019 [J]. China CDC Weekly, 2020, 2(2): 19-24.
- [3] 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 and Chemical Toxicology, 2019, 128: 267-279.
- [4] 魏佳会, 吴剑峰, 陈佳, 等. 12 种剧毒鹅膏菌的肽类毒素成分鉴定及其相对含量差异比较研究 [J]. 分析化学, 2017, 45(6): 817-823.
WEI J H, WU J F, CHEN J, et al. Identification and content difference of toxic peptides in 12 kinds of lethal *Amanita* species. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(6): 817-823.
- [5] GARCIA J, COSTA V M, CARVALHO A, et al. *Amanita phalloides* poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment [J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 86: 41-55.
- [6] FU X Y, FU B, HE Z M, et al. Acute renal failure caused by *Amanita oberwinklerana* poisoning [J]. Mycoscience, 2017, 58(2): 121-127.
- [7] YOSHIOKA N, AKAMATSU S, MITSUHASHI T, et al. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry [J]. Forensic Toxicology, 2014, 32(1): 89-96.
- [8] KAMATA T, KATAGI M, TSUCHIHASHI H. Metabolism and toxicological analyses of hallucinogenic tryptamine analogues being abused in Japan [J]. Forensic Toxicology, 2010, 28(1): 1-8.
- [9] KAYA E, YILMAZ I, SINIRLIOGLU Z A, et al. Amanitin and phallotoxin concentration in *amanita phalloides* var. *alba* mushroom [J]. Toxicon, 2013, 76: 225-233.
- [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 W J, HE B Y, 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. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(4): 500-508.
- [11] 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 X M, ZHANG J S, CAI Z X, et al. Determination of amanitins and phallotoxins in wild mushrooms by online liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(6): 613-619.
- [12] XU X M, CAI Z X, ZHANG J S, et al. Screening of polypeptide toxins as adulteration markers in the food containing wild edible mushroom by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Food Control, 2017, 71: 393-402.
- [13] JANSSON D, FREDRIKSSON S Å, HERRMANN A, et al. A concept study on identification and attribution profiling of chemical threat agents using liquid chromatography-mass spectrometry applied to *amanita* toxins in food [J]. Forensic Science International, 2012, 221(1-3): 44-49.
- [14] 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 Toxicology, 2012, 30(2): 168-172.
- [15] 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]. Journal of Chromatography B, 2007, 852(1-2): 430-435.
- [16] XU X M, ZHANG J S, HUANG B F, et al. Determination of ibotenic acid and muscimol in plasma by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with bimolecular dansylation [J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1146: 122128.
- [17] XU F, ZHANG Y Z, ZHANG Y H, et al. Mushroom poisoning from *inocybe serotina*: A case report from Ningxia, northwest China with exact species identification and muscarine detection [J]. Toxicon, 2020, 179: 72-75.
- [18] GOTVALDOVÁ K, HÁJKOVÁ K, BOROVIČKA J, et al. Stability of psilocybin and its four analogs in the biomass of the

- psychotropic mushroom *Psilocybe cubensis* [J]. Drug Testing and Analysis, 2021, 13 (2): 439-446.
- [19] TANG S S, ZHOU Q, HE Z M, et al. Cyclopeptide toxins of lethal amanitas: Compositions, distribution and phylogenetic implication[J]. Toxicon, 2016, 120: 78-88.
- [20] STØRMER F C, KOLLER G E, JANAK K. Ibotenic acid in *Amanita muscaria* spores and caps [J]. Mycologist, 2004, 18 (3): 114-117.
- [21] JIAO W T, XIAO Y, QIAN X S, et al. Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 210: 26-34.
- [22] Hu J S, Zhang P, Zeng J, et al. Determination of amatoxins in different tissues and development stages of *Amanita eitialis* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92 (13): 2664-2667.
- [23] KAMATA T, NISHIKAWA M, KATAGI M, et al. Liquid chromatography-mass spectrometric and liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of hallucinogenic indoles psilocin and psilocybin in “magic mushroom” samples [J]. Journal of Forensic Sciences, 2005, 50 (2): 1-5.

(上接第261页)

- 卢江(国家食品安全风险评估中心)
- 匡华(江南大学食品学院)
- 朱心强(浙江大学医学院)
- 刘弘(上海市疾病预防控制中心)
- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨方(福州海关技术中心)
- 杨钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 赵云峰(国家食品安全风险评估中心)
- 赵贵明(中国检验检疫科学研究院)
- 钟凯(科信食品与营养信息交流中心)
- 姜毓君(东北农业大学食品学院)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐娇(国家卫生健康委员会食品标准与监测评估司)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)