

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定毒蕈中 6 种鹅膏毒肽类和鬼笔毒肽类毒素

薛康^{1,2}, 胡江涛^{1,2*}, 俞凌云^{1,2}, 刘菲^{1,2}, 马丽^{1,2}, 龚婷婷^{1,2}, 华燧^{1,2}, 陈佳玥^{1,3}

(1. 成都海关技术中心, 四川成都 600041; 2. 食品安全检测四川省重点实验室, 四川成都 600041; 3. 四川大学, 四川成都 610041)

摘要 [目的]建立一种基于超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)快速测定野生毒蕈中 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽类毒素的分析方法。[方法]将采集的四川野生毒蕈子实体低温烘干,用甲醇超声提取,40℃旋转蒸发近干,加水复溶,Oasis HLB 固相萃取小柱净化,经 Waters HSS T3 色谱柱分离,ESI 正离子模式下多反应监测(MRM)方式分析。[结果]6 种毒肽在 50~1 000 μg/kg 具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.99,方法检出限为 30 μg/kg。α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、羧基三羟鬼笔毒肽在低、中、高 3 个浓度的平均回收率在 93.1%~117.5%,变异系数(CV)在 1.49%~7.77%。[结论]该方法能准确、灵敏地测定野生毒蕈中 6 种毒肽,适用于野生菌中毒肽毒素的测定。

关键词 野生毒蕈;鹅膏毒肽;鬼笔毒肽;超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号 R 155.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)17-0182-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.17.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Rapid Determination of Six Amanitins and Phallotoxins in Poisonous Mushrooms by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

XUE Kang^{1,2}, HU Jiang-tao^{1,2}, YU Ling-yun^{1,2} et al (1. Chengdu Customs Technology Center, Chengdu, Sichuan 600041; 2. Food Safety Detection Key Laboratory of Sichuan, Chengdu, Sichuan 600041)

Abstract [Objective] To establish a method for rapid determination of 6 kinds of amanitins and phallotoxins in wild poisonous mushrooms by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). [Method] The wild mushrooms samples collected in Sichuan were dried at low temperature, the amanitins and phallotoxins in samples were extracted with methanol by ultrasonic extraction, then 40℃ rotary evaporation drying, water redissolution, purified by HLB solid phase extraction column and separated on Waters HSS T3 column, lastly detected by electrospray (ESI+) in MRM mode. [Result] The 6 kinds of amanitins and phallotoxins had good linear relationships in the range of concentration 50-1000 μg/kg with the correlation coefficient value greater than 0.99. The detection limits of 6 kinds of amanitins and phallotoxins were 30 μg/kg. The average recovery rates of α-amanitin, β-amanitin, γ-amanitin, phalloidin, phallacidin and phallisacin at 3 spiked levels were 93.1%-117.5%. The coefficients of variation were 1.49%-7.77%. [Conclusion] The method can accurately and sensitively determine 6 kinds of amanitins and phallotoxins in poisonous mushrooms, which is suitable for the detection of amanitins and phallotoxins in wild mushrooms.

Key words Wild poisonous mushrooms; Amanitins; Phallotoxins; UPLC-MS/MS

毒蕈即日常所说的毒蘑菇,是指不同类型的含有毒素的大型野生真菌,由于有些毒蕈在外观上与食用菌没有明显区别,导致误食毒蕈而引发中毒的事件时有发生,且在群体性食物中毒中,毒蕈中毒的致死率极高,其中肝损伤型毒蕈中毒致死率高达 90%~100%^[1]。据统计,我国毒蕈中毒事件中,95%是由鹅膏菌属引起的^[2]。因为鹅膏菌中含有化学性质稳定且毒性极强的鹅膏多肽类毒素,该类毒肽耐高温、干燥和酸碱环境,一般的烹调加工不会破坏其毒性,不幸误食后,毒肽就会通过消化系统进入肝脏,对肝脏造成严重的损伤,最终引发多器官功能衰竭而死亡^[3-5]。现阶段,国内外一般采用高效液相色谱法、高效液相色谱-飞行时间质谱法和高效液相色谱-串联质谱法检测毒肽毒素^[6-11],我国还没有检测毒肽毒素的国家标准。因此,该研究建立了一种利用超高效液相色谱-串联质谱法快速测定野生毒蕈中 6 种毒肽毒素的检测方法,以期野生菌毒素检测提供一种高效的检测方法。

1 材料与与方法

1.1 仪器 UPLC lclass-XEVOTQ-XS 超高效液相色谱-串

联质谱联用仪(美国 Waters 公司);3H20RI 离心机(中国赫西);AE240 电子天平(瑞士梅特勒);XW-80A 旋涡混合器(中国 HUXI);B8510E-DTH 超声波清洗器(美国必能信);Mili-Q Integral 3 超纯水仪(美国 Millipore 公司);ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm,美国 Waters 公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵、氯仿, HPLC 级,美国 Fisher 公司。标准品:α-鹅膏毒肽(α-amanitin,纯度≥90%,瑞士 Alex);β-鹅膏毒肽(β-amanitin,纯度≥90%,瑞士 Alex);γ-鹅膏毒肽(γ-amanitin,纯度≥90%,瑞士 Alex);羧基三羟鬼笔毒肽(phallisacin,50 μg/mL,上海安谱实验科技有限公司);羧基二羟鬼笔毒肽(phallacidin,纯度≥95%,瑞士 Alex);二羟鬼笔毒肽(phalloidin,纯度≥90%,瑞士 Alex)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制。

1.3.1.1 α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽标准储备液的配制。分别精确称取 α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽、羧基二羟鬼笔 5 种标准物质 1 mg,精确至万分之一,甲醇定容至 10 mL,浓度为 100 μg/mL。-20℃存储。

1.3.1.2 鹅膏毒肽和鬼笔毒肽混合标准使用液的配制。分

基金项目 四川省科技计划项目(2019YFS0482)。

作者简介 薛康(1989-),男,山东济宁人,工程师,硕士,从事理化检验工作。*通信作者,研究员,硕士,从事理化检验工作。

收稿日期 2020-11-14;修回日期 2021-03-22

别准确吸取 1.0 mL 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储备液以及 2.0 mL 羧基三羟鬼笔毒肽标准溶液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,浓度为 10 mg/L。

1.3.1.3 6 种毒肽混合标准系列的配制。分别吸取 50、100、200、400、600、1 000 μ L,用初始流动相定容至 10 mL,配制成浓度为 50、100、200、400、600、1 000 μ g/L 的标准系列工作液。

1.3.2 样品前处理。

1.3.2.1 提取。将新鲜野生菌样品烘干(烘干温度小于 50 $^{\circ}$ C)并打成粉末,精密称取干燥粉末 0.2 g,置于 50 mL 离心管中,加入甲醇 10 mL,振荡涡旋 1 min,超声提取 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min 后,移取上清液于另一离心管中。残渣中再加入 10 mL 甲醇,涡旋混合均匀,再次超声提取 10 min 后以 10 000 r/min 离心,合并上清液。40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发近干,加 2 mL 水溶解,洗涤 3 次,得提取液。

1.3.2.2 净化。分别用 2 mL 甲醇和纯水淋洗活化 Prime Oasis HLB 固相萃取柱(3 mL,60 mg),再将以上提取液过柱,用 2 mL 含 5% 甲醇的水溶液淋洗 2 次,最后用 2 mL 甲醇-乙腈混合溶液($V:V=3:2$)洗脱。将洗脱液在 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮吹近干,用 1 mL 初始流动相[甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(0.1% 甲酸)=90:10]溶解定容,溶液过 0.2 μ m 滤膜后,待上机测定。

1.3.3 分析条件。

1.3.3.1 色谱条件。色谱柱为 HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.8 μ m,Waters 公司);流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液, B 为甲醇溶液;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样量 1.0 μ L;洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间 Time min	流速 Flow rate mL/min	流动相 A Mobile phase A//%	流动相 B Mobile phase B//%
0.00	0.300	90	10
0.20	0.300	90	10
3.00	0.300	40	60
3.50	0.300	50	50
4.00	0.300	50	50
5.00	0.300	60	40
5.50	0.300	90	10
7.00	0.300	90	10

1.3.3.2 质谱条件。电喷雾 ESI 正离子模式;多反应监测(MRM);离子源温度 150 $^{\circ}$ C;毛细管电压 2.83 kV;脱溶剂温度 550 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流量 1 000 L/h;其他质谱参数见表 2。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化 鹅膏毒肽属双环八肽,鬼笔毒肽是一类环状七肽,其支链上有较多的羟基和甲基,容易接受电子而被离子化,故常采用正离子模式进行分析^[6,12]。分别将 6 种毒肽的标准品用甲醇稀释成 500 ng/mL,质谱仪直接进样,在 ESI 正离子 MS1Scan 模式下,发现 6 种毒肽都有较强的 M+1 离子峰的出现,因此选定 M+1 为母离子,在 Daughter Scan 模式下,分别找到每种毒肽的 2 个最佳子离子。最后优化锥孔电压、碰撞能、脱溶剂气流量、脱溶剂气温度等质谱参数,使离子化效率更高、离子强度最大。具体 6 种毒肽的母离子和子离子见表 2。

表 2 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的质谱条件参数

Table 2 Mass spectrum condition parameters of 6 kinds of amanitins and phallotoxins

目标物 Target	保留时间 Retention time//min	目标离子对 Target ion pair(m/z)	锥孔电压 DP//V	碰撞能量 CE//eV
α -鹅膏毒肽 α -amanitin	2.95	919.32/85.95*	66	80
		919.32/339.08		56
β -鹅膏毒肽 β -amanitin	2.92	920.50/85.95*	48	66
		920.50/259.05		34
γ -鹅膏毒肽 γ -amanitin	3.21	903.52/85.95*	46	74
		903.52/243.00		40
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	3.83	789.00/85.95*	32	68
		789.00/330.00		52
羧基二羟鬼笔毒肽 Phalloacidin	3.89	847.48/85.88*	30	74
		847.48/156.99		76
羧基三羟鬼笔毒肽 Phallisacin	3.66	863.26/157.07*	54	78
		863.26/173.96		80

注:* 为定量离子对

Note: * is quantitative ion pair

2.2 色谱条件的优化 试验选择了 UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.8 μ m),此色谱柱是与 100% 水相兼容的 C₁₈ 柱,对保留和分离极性有机小分子具有较为理想的效果。该试验选择研究了 4 组流动相(A 组水-乙腈;B 组水-甲醇;C 组 0.1% 甲酸水-甲醇;D 组 5 mmol/L 乙酸铵(0.1% 甲酸)-甲醇)的分离效果,试验表明,甲醇的分离效果比乙腈好,且使用 5 mmol/L 乙酸铵(0.1% 甲酸)作为水相时,目标物的离子峰强度较高,峰形较好。6 种毒肽的标准提取离子

图详见图 1。

2.3 样品前处理方法的优化 由于野生菌中成分复杂,脂肪、磷脂、肽类等杂质含量较高,该试验采用了先溶剂提取、再固相萃取柱净化的方法,先后比较了甲醇、水、乙腈 3 种溶剂的提取效果,结果表明,甲醇的提取效果较好,回收率高。

试验考察了在使用 HLB 固相萃取柱净化过程中,5% 甲醇-氯仿和 5% 甲醇-水淋洗液的淋洗效果,结果表明,5% 甲醇-氯仿淋洗液对 HLB 小柱中吸附的脂肪、磷脂等杂质具有

较好的洗脱效果,但回收率较差。综合考虑,该试验采用5% 甲醇-水作为淋洗液。

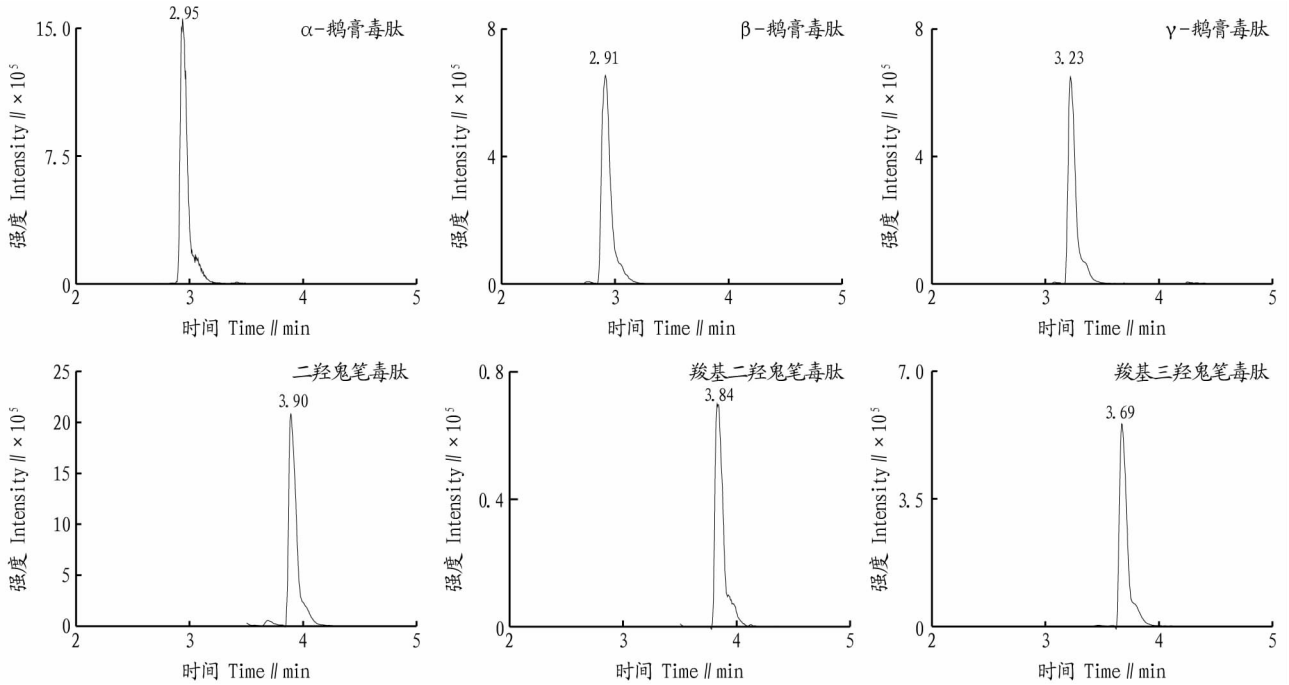


图 1 6种毒肽标准提取离子图

Fig. 1 Standard extraction ion (XIC) diagram of 6 kinds of toxic peptides

2.4 线性范围与检出限 6种毒肽的线性方程、线性范围和 (LOD),6种毒肽的检出限为 30 μg/kg。线性相关系数见表 3。以 3 倍信噪比 ($S/N \geq 3$) 估算检出限

表 3 6种毒肽线性方程、线性范围、相关系数和检出限

Table 3 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients and detection limits of 6 toxic peptides

目标物 Target	线性方程 Linear equations	线性范围 Linear ranges//μg/kg	相关系数 Correlation coefficients	检出限 Detection limits//μg/kg
α-鹅膏毒肽 α-amanitin	$y = 58.357 2x - 894.893$	50~1 000	0.995 9	30
β-鹅膏毒肽 β-amanitin	$y = 74.442 6x - 672.377$	50~1 000	0.996 7	30
γ-鹅膏毒肽 γ-amanitin	$y = 57.552 7x - 1 379.65$	50~1 000	0.996 6	30
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	$y = 44.539 2x - 1 410.03$	50~1 000	0.999 1	30
羧基二羟鬼笔毒肽 Phalloacidin	$y = 147.924x + 453.172$	50~1 000	0.995 3	30
羧基三羟鬼笔毒肽 Phallisacin	$y = 95.147 7x + 233.785$	50~1 000	0.999 5	30

2.5 方法回收率和精密度 取 1 份样品,分别对 6 种毒肽进行低(50 μg/kg)、中(200 μg/kg)、高(600 μg/kg)浓度加标试验,结果发现(表 4),平均回收率分别为 α-鹅膏毒肽 99.5%~117.5%,β-鹅膏毒肽 93.4%~107.0%,γ-鹅膏毒肽 94.2%~110.1%,二羟鬼笔毒肽 108.5%~119.8%,羧基二羟鬼笔毒肽 93.5%~109.7%,羧基三羟鬼笔毒肽 93.1%~106.5%;6 次平行测定,变异系数(CV)在 1.49%~7.77%。

2.6 野生菌样品检测 按上述方法对采集到的 10 个四川野生菌样品进行前处理和检测。在 4 号和 6 号样品中检出了 α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽和二羟鬼笔毒肽 3 种毒蕈毒素,具体结果见表 5,谱图见图 2 和图 3。

3 结论

该研究基于超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS/MS),采用甲醇提取,HLB 固相萃取柱净化,HSS T3 色谱柱分离,电喷雾 ESI 正离子模式和多反应监测(MRM)方式对 6 种毒蕈毒素的目标离子进行监测,外标法定量,建立

表 4 方法的回收率和变异系数

Table 4 Recoveries and variable coefficient of the method (n=6)

目标物 Target	加标量 Add scalar μg/kg	实测值 Measured value//μg/kg	回收率 Recovery %	变异系数 CV//%
α-鹅膏毒肽 α-amanitin	50	49.74	99.5	1.49
	200	234.95	117.5	
	600	613.03	102.2	
β-鹅膏毒肽 β-amanitin	50	52.13	104.3	1.85
	200	214.00	107.0	
	600	560.43	93.4	
γ-鹅膏毒肽 γ-amanitin	50	55.03	110.1	1.97
	200	215.77	107.9	
	600	565.05	94.2	
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	50	55.69	111.4	6.00
	200	239.61	119.8	
	600	650.83	108.5	
羧基二羟鬼笔毒肽 Phalloacidin	50	54.29	108.0	7.77
	200	187.98	93.5	
	600	658.25	109.7	
羧基三羟鬼笔毒肽 Phallisacin	50	46.54	93.1	6.29
	200	213.07	106.5	
	600	559.05	93.2	

表 5 实际野生菌中 6 种毒肽的检测结果

Table 5 Detection results of 6 kinds of amanitins and phallotoxins in wild mushrooms

mg/kg

样品 Sample	α -鹅膏毒肽 α -amanitin	β -鹅膏毒肽 β -amanitin	γ -鹅膏毒肽 γ -amanitin	二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	羧基二羟 鬼笔毒肽 Phallacidin	羧基三羟 鬼笔毒肽 Phallisacin
4 号 No. 4	181.99	128.69	—	—	—	—
6 号 No. 6	130.48	44.29	—	49.42	—	—

注：“—”表示未检出

Note: “—” means not detected

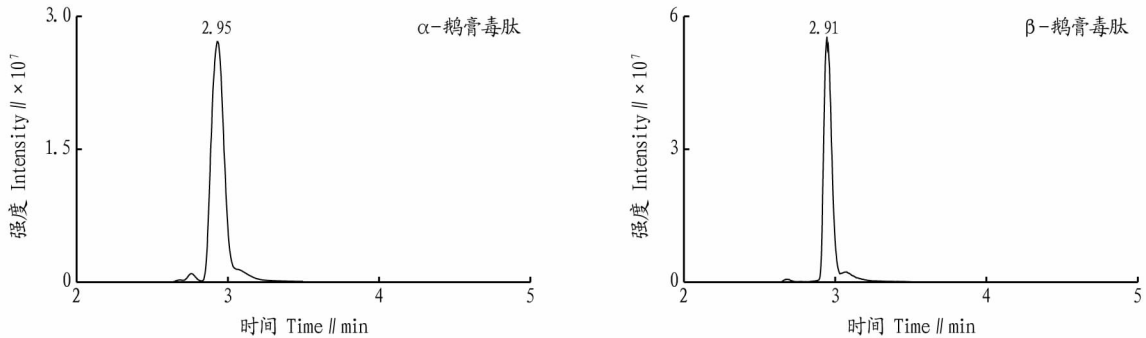


图 2 4 号毒蕈样品毒肽图谱

Fig. 2 Toxin peptide map of No. 4 poisonous mushroom

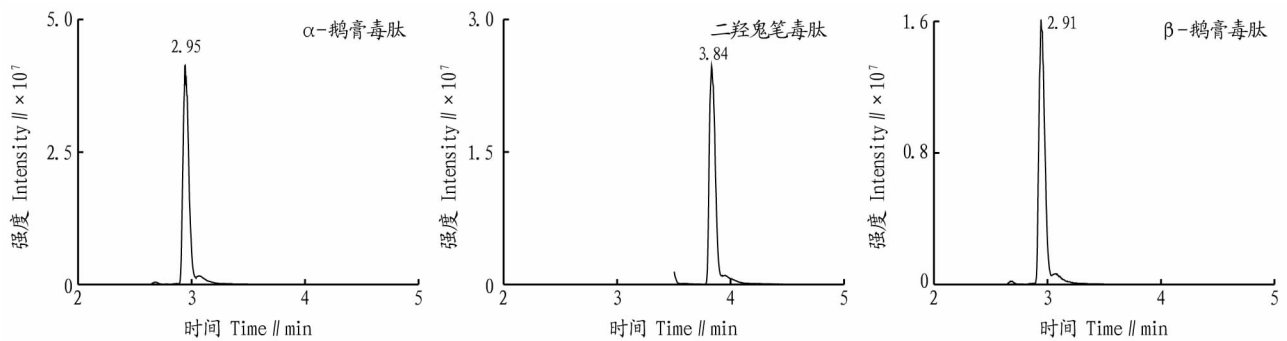


图 3 6 号毒蕈样品毒肽图谱

Fig. 3 Toxin peptide map of No. 6 poisonous mushroom

了 6 种毒蕈毒素的快速、准确、选择性好的测定方法。该方法与传统的色谱法的检测时间(20 min)相比,大大缩短了检测时间,同时具备更高的准确度、灵敏度和特异性,适用于野生菌中毒肽毒素的测定。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 赵春艳, 王婷婷, 邵丽梅, 等. 鹅膏菌肽类毒素的研究进展[J]. 中国食用菌, 2014, 33(4): 9-11, 13.
- [4] 陈作红, 胡劲松, 张志光, 等. 我国 28 种鹅膏菌主要肽类毒素的检测分析[J]. 菌物系统, 2003, 22(4): 565-573.
- [5] 杜秀菊, 杜秀云. 毒蕈毒素及其应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 7172-7174.

- [6] 刘阳, 栾杰, 林佳. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定云南野生致命鹅膏菌中的毒伞肽和毒肽毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 3756-3761.
- [7] 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.
- [8] 刘思洁, 方赤光. 蕈菌毒素检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 754-760.
- [9] 包海鹰, 图力古尔, 李玉. 7 种鹅膏菌属真菌肽类毒素的 HPLC 分析(英文)[J]. 菌物研究, 2005, 3(1): 13-16.
- [10] 周贻兵, 李磊, 吴玉田, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定野生蘑菇中的 3 种鹅膏毒肽[J]. 现代预防医学, 2018, 45(22): 4144-4147.
- [11] 崔婉霞, 王冉冉, 王庆国, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测毒蕈中 5 种鹅膏多肽类毒素[J]. 疾病预防控制通报, 2018, 33(5): 84-87.
- [12] 曹福祥, 张志光, 梁宋平. 反相高效液相色谱法分离纯化 α -鹅膏毒肽[J]. 分析化学, 2003, 31(5): 562-565.

(上接第 157 页)

- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-137.
- [12] 张伟, 许璐. 简析竹芋科植物在温室内的种植技术[J]. 南方农机, 2018, 49(9): 93.

- [13] 王男男, 王殿武, 陈延华, 等. 竹芋专用长效肥料氮磷钾释放规律研究[J]. 黑龙江农业科学, 2016(10): 46-50.
- [14] 曹广信, 张晓磊, 杨阳, 等. 竹芋科植物在温室内的种植技术[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(12): 175-177.
- [15] 王男男, 王殿武, 陈延华, 等. 固体酸调配营养液对竹芋生长和地上部对养分吸收的影响[J]. 北方园艺, 2016(19): 96-100.