

2.9 干扰试验 模拟工作场所现场环境,于实验通风橱配制混合气体,100 ml/min 流量采样 15 min,解吸后测定。图 1 提示本方法能将正丁腈、异丁腈与正丁醇和异丁醇同时进行分离,分离效果理想,互不干扰。

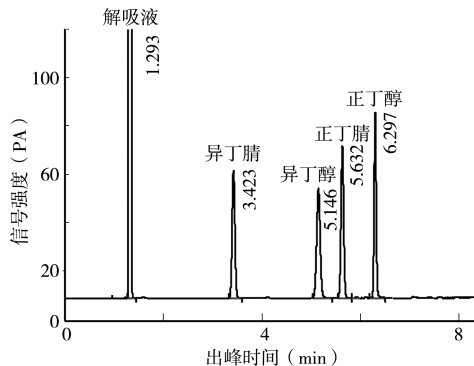


图 1 4 种物质分离色谱

3 小结

使用活性炭管采集工作场所空气中的正丁腈和异丁腈,以 10% 丙酮- CS_2 溶液解吸,用气相色谱柱分离,以 FID 检测,建立了作业场所空气中正丁腈和异丁腈的溶剂解吸-气相色谱测定法。结果表明,该方法分离效果好,准确度高,检出限低,方法各项指标均达到 GBZ/T 210.4—2008 的要求,可以满足职业卫生监测工作的需要。

参考文献

- [1] 陈冠林,陈松根,戎伟丰,等. 工作场所空气中丁腈和异丁腈测定的溶剂解吸-气相色谱法 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2022, 40 (4): 296-299.

(收稿日期: 2023-09-26; 修回日期: 2023-10-24)

超高效液相色谱-串联质谱法测定野生菌中 5 种神经精神型蘑菇毒素

Determination of 5 neuropsychiatric mushroom toxins in wild fungi by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

薛荣旋, 刘国平, 丘福保, 黄诚

(中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528400)

摘要: 于野生菌样品中加入甲醇振荡提取,加入 C18 分散剂萃取净化后上机,经 ZIC[®]-cHILIC 色谱柱分离,以 5 mmol/L 甲酸铵+0.1% 甲酸水溶液和甲醇为流动相进行梯度洗脱,结合超高效液相色谱-串联质谱进行定性、定量分析。结果显示,野生菌中蕈毒碱、光盖伞素、蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸、脱磷酸裸盖菇素在 10~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度内具有良好的线性关系,相关系数(r)均 >0.999 ,检出限 0.05~0.50 mg/kg,定量限 0.20~2.00 mg/kg。样品加标后光盖伞素平均回收率 69.0%~75.8%,其他 4 种蘑菇毒素的平均回收率 85.8%~105.7%,精密度相对标准偏差(RSD)为 1.4%~7.8%,说明该方法能满足对野生菌中 5 种神经精神型蘑菇毒素的快速检测要求。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 蕈毒碱; 光盖伞素; 蝇蕈醇; 鹅膏蕈氨酸; 脱磷酸裸盖菇素

中图分类号: R595 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2024)01-0096-04

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2024.01.033

毒蘑菇亦称毒蕈,指大型真菌的子实体食用后对人或畜禽产生毒性反应的一种真菌。我国已知蘑菇种类超过 4 000 种,其中毒蘑菇约 435 种^[1]。毒蕈种类繁多、分布广泛、形态特征复杂,所含毒素成分也不相同。除剧毒鹅膏菌外,还有部分毒蕈主要引起胃肠道与神经精神症状^[2-3],如蕈毒碱、光盖伞素、蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸、脱磷酸裸盖菇素等 5 种神经精神型蘑菇毒素,主要作用于中枢神经系统,引起视幻觉、狂笑或兴奋等神经致幻症状,少量摄入也会引起胃肠炎症状^[4]。探索建立快捷、简便、高效的检测方法图谱,可为早期快速鉴定毒物和临床救治提供支持。

随着质谱技术的快速发展,越来越多基于液相色谱-串联质谱的技术方法在毒蕈理化检测领域得到广泛应用^[5]。其中最常用的是串联三重四级杆质谱^[6-7]和飞行时间质谱仪^[8-10],具有较高的灵敏度和稳定性,广泛应用于毒蕈和生物样本的检测。但是,样品的基质效应影响质谱方法的定量准确性。本研究拟采用分散固相萃取(QuEChERS)处理法,其实质为振荡萃取法、液-液萃取法初步净化、基质分散固相萃取

基金项目: 中山市科学技术局 2020 年社会公益(医疗卫生重点项目,编号: 2020B3016)

作者简介: 薛荣旋(1986—),女,副主任技师,研究方向: 食品安全检测。

净化相组合所形成的一种样品前处理方法,通过对野生菌干制品提取液进行净化,减少基质效应,可直接采用溶剂标准曲线,结合液相色谱-串联三重四极杆质谱法对蕈毒碱、光盖伞素、蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸、脱磷酸裸盖菇素等5种蘑菇毒素进行快速检测。目前未见该方法的相关文献报道,也无国家标准检测方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器 AB4000 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪,美国 AB SCIEX 公司;AL-204 电子分析天平,上海梅特勒托利多公司;Multi reax 涡旋振荡器,德国 Heidolph 公司;3-30K 超高速离心机,美国 Sigma 公司;Milli-Q Element 超纯水机,美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

1.2.1 标准试剂 蕈毒碱氯化物(CAS 2303-35-7)、光盖伞素(CAS 520-52-5)和脱磷酸裸盖菇素(CAS 520-53-6)均购自 Alta Scientific Co(美国);鹅膏蕈氨酸(CAS 2552-55-8)购自 Enzo Life Sciences, INC(美国);蝇蕈醇(CAS 2763-96-4)购自 Toronto Research Chemicals(加拿大)。

1.2.2 普通试剂 甲醇(色谱纯),德国默克公司;C18 分散剂(色谱纯),美国埃克森美孚公司;甲酸铵、甲酸均为色谱纯,上海安普公司;实验用水为符合《分析实验室用水规格和试验方法》(GB/T 6682—2008)规定的一级水。

1.3 方 法

1.3.1 标准溶液的配制 蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸分别用甲醇溶解稀释至浓度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,蕈毒碱、光盖伞素和脱磷酸裸盖菇素标准液浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。准确移取适量标准液,用甲醇配制成 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 中间液,再逐级稀释为 10~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准系列。

1.3.2 样品前处理 新鲜野生菌真空干燥后粉碎,混合均匀。准确称取均匀的样品 0.2 g(精确至 0.001 g),置 15 ml 聚丙烯刻度离心管中,准确加入 10 ml 甲醇溶液,涡旋混匀 30 min,以 10 000 r/min 离心 5 min;准确移取 1.00 ml 上清液,加入含 25 mg C18 分散萃取剂的 2 ml 离心管中,涡旋混匀,以 10 000 r/min 离心 5 min;准确吸取 100 μl 上清液加入 900 μl 甲醇,涡旋混匀,超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.3 仪器条件

1.3.3.1 液相色谱 ZIC[®]-cHILIC 色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 3 μm),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,流动相:5 mmol/L 甲酸铵+0.1%甲酸水溶液和甲醇。梯度洗脱程序:初始

浓度 70% 甲醇;0.1~2 min,10%~70% 甲醇;保持 3 min。流速 0.3 ml/min,进样体积 20 μl 。

1.3.3.2 质谱条件 离子化模式:电喷雾正离子模式;质谱扫描方式:多反应离子监测;气帘气压力 210 kPa;喷雾电压 5 500 V;离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$;雾化气压力(GS1)350 kPa;辅助加热气压力(GS2)280 kPa。目标化合物的定性、定量离子以及对应的碰撞能量见表 1。

表 1 5 种蘑菇毒素的质谱检测条件

| 蘑菇毒素 | 保留时间 (min) | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 碰撞能量 (eV) | 解簇电压 (eV) |
|---------|---------------|------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| 蕈毒碱 | 1.97 | 175.1 | 57.0 [*] /116.1 | 33/24 | 80 |
| 光盖伞素 | 2.20 | 285.1 | 205.1 [*] /58.1 | 23/54 | 88 |
| 蝇蕈醇 | 2.92 | 115.2 | 97.9 [*] /67.9 | 18/28 | 50 |
| 鹅膏蕈氨酸 | 3.27 | 159.7 | 115.0 [*] /131.9 | 36/24 | 110 |
| 脱磷酸裸盖菇素 | 3.27 | 204.8 | 160.0 [*] /58.0 | 25/29 | 60 |

注:*,定量离子。

2 结 果

2.1 色谱条件优化 蕈毒碱为氧代杂环季盐,易溶于水 and 乙醇;光盖伞素为色胺类毒素,性质相对稳定,具有较高的热稳定性和水溶性;鹅膏蕈氨酸是一种异噁唑衍生物,蝇蕈醇是其脱羧后形成的生物胺类物质;脱磷酸裸盖菇素为二甲氨基胺^[11]。以上 5 种蘑菇毒素为极性化合物,多采用亲水色谱柱进行分离,以增强目标物的色谱保留能力。实验中采用 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准中间液,分别用甲醇、乙腈、超纯水、0.1%甲酸水作为定容液稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 上机。以 0.1%甲酸水作为定容液响应明显较低,超纯水的峰形较差,甲醇和乙腈响应强度均可,后续根据流动相选择。色谱分离中水相分别采用 5 mmol/L 甲酸铵、0.1%甲酸水、5 mmol/L 甲酸铵+0.1%甲酸水,有机相为纯甲醇、纯乙腈、甲醇+乙腈(4+6)、甲醇+乙腈(1+9)等,对比了 ZIC[®]-cHILIC 和 TSKgel Amide-80 两种氨基色谱柱分离条件。TSKgel Amide-80 柱的色谱保留参数较差,保留时间 1 min;5 mmol/L 甲酸铵、0.1%甲酸水两种水相各有优劣,因此将两者结合起来蘑菇毒素的分离度和峰形均有所改善。有机相为纯乙腈,色谱柱为 ZIC[®]-cHILIC 柱时 5 种蘑菇毒素的响应值最高,但分离度和峰形半峰宽等不如纯甲醇。鹅膏蕈氨酸和脱磷酸裸盖菇素在总离子流图中保留时间一致,采用质谱离子抽提可以分开。结合实验室仪器和目标化合物响应强度和分离比等各项指标,最终选择纯甲醇作为有机流动相,5 种蘑菇毒素总离子流图见图 1。

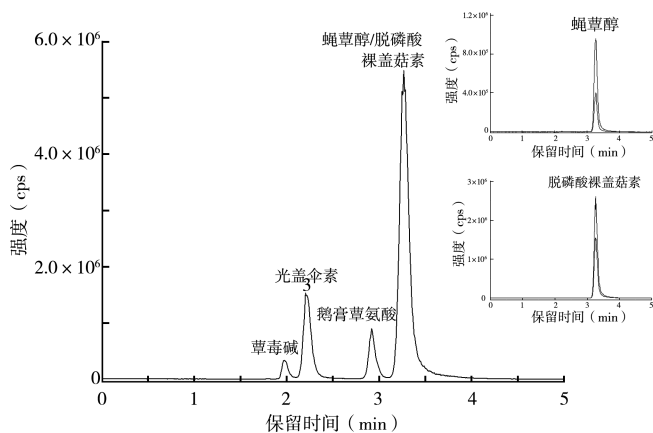


图1 5种蘑菇毒素的总离子流图

2.2 前处理提取和净化条件的选择和优化 5种蘑菇毒素属于极性化合物,在水、甲醇和乙腈中都有较好的溶解度。在实验过程中,考虑C18分散剂适用于萃取有机提取溶液,分别对比了纯甲醇、纯乙腈、0.1%甲酸-甲醇和0.1%甲酸-乙腈4种溶液的样品提取

效率,以纯甲醇的提取效率最高,因此采用纯甲醇提取野生菌干制品。

野生菌种类繁多,基质复杂,在液质仪器上基质效应明显。文献报道^[9],以固相萃取小柱净化后仍需采用基质曲线进行校正以获得定量结果;也有采用5000倍溶剂稀释技术消除基质效应^[7],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。综合各方面因素,尝试采用分散萃取剂进行前处理提取液的净化和10倍稀释以消除基质效应。

吸取1 ml 甲醇提取液加入含有0、10、25、50、100、200和400 mg C18分散剂的离心管中,净化后稀释10倍上机测试。结果显示,在50 mg/kg加标浓度,脱磷酸裸盖菇素和鹅膏蕈氨酸2种毒素在6种前处理中均能满足方法学要求;蝇蕈醇、草毒碱和光盖伞素3种毒素在含有25 mg C18分散剂的离心管中响应最高,其中光盖伞素的加标回收率较低,平均回收率为69.0%。结果见表2。

表2 不同前处理方式对5种蘑菇毒素平均回收率的影响[%]

| 蘑菇毒素 | 净化剂含量[mg/(100 μg·L)] | | | | | |
|---------|----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| | 0 | 10 | 25 | 100 | 200 | 400 |
| 草毒碱 | 67.9 | 82.3 | 85.8 | 65.5 | 59.5 | 59.0 |
| 光盖伞素 | 50.8 | 58.3 | 69.0 | 64.4 | 58.6 | 62.2 |
| 蝇蕈醇 | 85.3 | 75.8 | 85.8 | 81.8 | 75.9 | 78.2 |
| 鹅膏蕈氨酸 | 98.4 | 99.6 | 100.4 | 99.8 | 88.2 | 92.6 |
| 脱磷酸裸盖菇素 | 101.7 | 100.8 | 102.3 | 103.9 | 97.6 | 99.1 |

2.3 加标回收率和精密度 依照实验设计的前处理方法和仪器条件,在阴性野生菌干制品中加入25.0、50.0、100 mg/kg 3个水平的加标浓度进行回收试验,每个加标水平平行测定6次,外标法定量,结果见表3。甲醇溶剂配制工作曲线进行定量分析,C18分散剂净化处理后的光盖伞素加标平均回收率较低(69.0%~75.8%),其他4种蘑菇毒素的平均回收率85.8%~105.7%,精密度相对标准偏差(RSD)1.4%~7.8%。表明本实验方法准确度和精密度基本能满足检测分析的要求。

表3 5种蘑菇毒素加标回收率($\bar{x} \pm s$)

| 蘑菇毒素 | n | 浓度(mg/kg) | | |
|---------|---|-----------|-----------|-----------|
| | | 25.0 | 50.0 | 100.0 |
| 草毒碱 | 6 | 90.2±3.4 | 85.8±4.5 | 92.5±6.8 |
| 光盖伞素 | 6 | 70.8±5.8 | 69.0±4.0 | 75.8±5.6 |
| 鹅膏蕈氨酸 | 6 | 105.7±2.4 | 100.4±4.4 | 102.0±1.4 |
| 蝇蕈醇 | 6 | 89.8±3.0 | 85.8±2.7 | 90.2±2.1 |
| 脱磷酸裸盖菇素 | 6 | 100.2±3.6 | 102.2±1.8 | 98.3±7.8 |

2.4 线性范围和检出限、定量限 取1.00 μg/ml混合标准中间液用甲醇逐级稀释成10.0~500.0 μg/L

的标准系列溶液,草毒碱、光盖伞素、鹅膏蕈氨酸、蝇蕈醇、脱磷酸裸盖菇素的线性方程相关系数(r)均>0.999。以3倍信噪比($S/N=3$)计算5种蘑菇毒素的检出限0.05~0.50 mg/kg,以10倍信噪比($S/N=10$)计算定量限0.20~2.00 mg/kg。见表4。

表4 5种蘑菇毒素的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

| 蘑菇毒素 | 线性方程 | 相关系数(r) | 检出限(mg/kg) | 定量限(mg/kg) |
|---------|---|-------------|------------|------------|
| 草毒碱 | $Y=3.40 \times 10^3 X + 7.56 \times 10^4$ | 0.999 1 | 0.50 | 2.00 |
| 光盖伞素 | $Y=1.73 \times 10^4 X - 4.33 \times 10^4$ | 0.999 8 | 0.25 | 1.00 |
| 鹅膏蕈氨酸 | $Y=9.36 \times 10^3 X + 3.02 \times 10^4$ | 0.999 8 | 0.50 | 2.00 |
| 蝇蕈醇 | $Y=1.97 \times 10^4 X + 3.20 \times 10^5$ | 0.999 7 | 0.10 | 0.40 |
| 脱磷酸裸盖菇素 | $Y=6.22 \times 10^4 X + 1.37 \times 10^6$ | 0.999 3 | 0.05 | 0.20 |

2.5 基质效应评价 野生菌提取后的溶液中含有较多极性化合物,如多糖、氨基酸等,这些物质改变电雾滴的表面张力,导致进入三重四级杆质谱仪的离子增加或减少,即产生基质效应,影响鹅膏毒素的离子化效率和定量结果的准确性。本研究采用分散固相QuEChERS净化剂,可直接作用于有机溶剂提取液,

选择性地保留基质干扰成分而达到净化目的, 实现溶剂工作曲线的直接定量分析。

采用本实验建立的最优条件, 对野生灰肉红菇和橙红牛肝菌进行曲线加标验证, 测定分析物在同浓度加标空白基质提取液和纯溶剂标准溶液中的离子信号强度, 计算二者比值进行评价: $ME(\%) = (B/A - 1) \times 100\%$, A 、 B 分别为溶剂和基质标准曲线斜率。 $ME > 50\%$ 为强基质效应, $20\% \sim 50\%$ 为中等基质效应, $< 20\%$ 为弱基质效应^[12]。结果表明, 不同样品基质对目标化合物存在不同程度的影响, 5 种神经精神型蘑菇毒素的 ME 为 $7.0\% \sim 18.0\%$, 说明在设定的实验条件下, 样品的基质效应较弱, 能够满足方法学要求。

2.6 实际样品的检测 应用本方法对一起食用野生菌中毒事件的样品进行检测, 样品来源于中毒病例食用的剩余野生菌样品。结果检出 2 种蘑菇毒素, 分别为蕈毒碱 74.2 mg/kg 、蝇蕈醇 55.3 mg/kg , 其他 3 种毒素未检出。

本研究应用 C18 分散剂净化结合超高效液相色谱-串联质谱仪, 建立快速检测野生菌中的蕈毒碱、光盖伞素、鹅膏蕈氨酸、蝇蕈醇、脱磷酸裸盖菇素 5 种蘑菇毒素的方法。本方法能够准确地对野生菌中可能含有的 5 种神经精神型蘑菇毒素进行定性和定量分析, 适用于蘑菇中毒等突发公共卫生事件的应急检测及风险评估, 为临床病因鉴定提供基础和技术支撑。

参考文献

[1] 图力古尔, 包海鹰, 李玉. 中国毒蘑菇名录 [J]. 菌物学报,

2014, 33 (3): 517-548.

- [2] 陈学国, 常靖, 邹波, 等. 常见毒蕈毒素中毒与检测技术研究进展 [J]. 刑事技术, 2020, 45 (6): 622-627.
- [3] 中国医师协会急诊医师分会, 中国急诊专科医联体, 中国医师协会急救复苏和灾难医学专业委员会, 等. 中国蘑菇中毒诊治临床专家共识 [J]. 临床急诊杂志, 2019, 20 (8): 583-598.
- [4] 楚建芝, 崔琪, 杨树德, 等. 蘑菇毒素毒性作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (24): 7925-7932.
- [5] 赵志勇, 范婷婷, 董慧, 等. 有毒鹅膏菌及其毒素的检测鉴定技术研究 [J]. 农产品质量与安全, 2020 (6): 13-21.
- [6] 徐小民, 蔡增轩, 许娇娇, 等. 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 [J]. 预防医学, 2021, 33 (12): 1223-1227.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 罗苹, 刘小红, 孔芳, 等. 基于高分辨质谱及三重四级杆质谱的蘑菇中 7 种蘑菇毒素的筛查及定量分析 [J]. 农产品质量与安全, 2022 (6): 15-20.
- [10] 林子豪, 彭名军, 周庆琼, 等. 亲水液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱法同时测定野生蘑菇中 α -鹅膏毒肽与 2 种精神紊乱型毒素 [J]. 食品科技, 2023, 48 (1): 305-309.
- [11] 代钦仙, 孟强, 陈国兵. 神经精神型有毒蘑菇及其毒素研究进展 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2022, 48 (8): 493-497.
- [12] 杨艳, 邱文倩, 李宇翔. 基于 QuEChERS 法-超高效液相色谱-串联质谱同位素标记内标法测定动物源性食品中 11 种喹诺酮类药物残留 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(2): 158-162.

(收稿日期: 2023-08-30; 修回日期: 2024-01-16)

(上接第 67 页)

hexogen by *Pelomonas aquatica* strain WS2-R2A-65 under aerobic condition [J]. Environ Technol, 2022, 43 (7): 1003-1012.

- [44] Van Aken B, Yoon JM, Schnoor JL. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2, 4, 6-trinitrotoluene, hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine, and octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5-tetrazocine by a *Phytosymbiotic Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34) [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (1): 508-517.
- [45] Fournier D, Monteil-Rivera F, Halasz A, et al. Degradation of CL-20 by white-rot fungi [J]. Chemosphere, 2006, 63 (1): 175-181.
- [46] Trott S, Nishino SF, Hawari J, et al. Biodegradation of the nitramine explosive CL-20 [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (3): 1871-1874.
- [47] Crocker FH, Thompson KT, Szecsody JE, et al. Biotic and abiotic degradation of CL-20 and RDX in soils [J]. J Environ Qual, 2005, 34 (6): 2208-2216.
- [48] Bhushan B, Halasz A, Thiboutot S, et al. Chemotaxis-mediated biodegradation of cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-

20 by *Clostridium* sp. EDB2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316 (3): 816-821.

- [49] Bhushan B, Paquet L, Spain JC, et al. Biotransformation of 2, 4, 6, 8, 10, 12-hexanitro-2, 4, 6, 8, 10, 12-hexaazaisowurtzitane (CL-20) by *Denitrifying Pseudomonas* sp. strain FA1 [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (9): 5216-5221.
- [50] 魏桐, 周阳, 杨治林, 等. 典型炸药的毒性效应及其作用机制研究进展 [J]. 含能材料, 2019, 27 (7): 558-568.
- [51] 李娴, 霍冀川, 王忠祥, 等. 废弃含能材料处理技术的现状 [J]. 化工时刊, 2008, 5 (1): 47-51.
- [52] 杨彦希, 王兴, 尹萍, 等. 三株棒状杆菌降解环三次甲基三硝胺的研究 [J]. 微生物学报, 1983, 23 (3): 251-256.
- [53] 陈琛. *Escherichia coli* 厌氧降解 TNT 的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [54] Liu ZY, Dang K, Li CZ, et al. Isolation and identification of a novel bacterium, *Pseudomonas* sp. ZyL-01, involved in the biodegradation of CL-20 [J]. AMB Express, 2020, 10 (1): 196.

(收稿日期: 2023-03-10; 修回日期: 2023-04-03)