

基于SCIEX QTRAP®系统对毒蘑菇中6种蘑菇毒素的检测方案

Detection of 6 Mushroom Toxins in Poisonous Mushrooms Based on SCIEX QTRAP® System

程龙¹, 林佳², 赵祥龙¹, 刘冰洁¹, 郭立海¹Cheng Long¹, Lin Ji², Zhao Xianglong¹, Liu Bingjie¹, Guo Lihai¹¹ SCIEX应用支持中心; ² 云南省疾病预防控制中心¹ SCIEX China; ² Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention

引言

我国野生菌类资源丰富、种类繁多，毒蘑菇约有100多种。每年因误食野生毒蘑菇中毒事件，时有发生，以春夏季最为多见，严重可致人死亡。引起中毒的毒蘑菇毒素类型较多，其中主要毒素为鹅膏肽类毒素。它是一类环状多肽类毒素，根据氨基酸的组成和结构，可分为鹅膏毒肽类（Amatoxins）、鬼笔毒肽类（Phallotoxins）、毒伞肽类（Virotoxins）三大类。鹅膏毒肽为双环八肽，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）；鬼笔毒肽为双环七肽，主要包括羧基二羟鬼笔毒肽（phalloidin）、二羟鬼笔毒肽（phalloidin）和羧基三羟鬼笔毒肽（phallisacin）；毒伞素为单环七肽，致命性相对较弱，相关研究较少^[1-4]。鹅膏毒肽类毒素引起的中毒，致死率高，由该毒素引起的中毒占毒蘑菇中毒死亡病例的90%以上。它的中毒症状在大量细胞被破坏后才出现，当

中毒症状出现时，大部分的毒素都已进入靶器官，尿液和血浆中浓度较低，常规的检测方法无法检出。建立快速、准确检测尿液和血液中毒蘑菇毒素的确证检测方法，帮助疑似中毒病人的尽早诊断，降低死亡率具有非常重要意义。

本方案运用SCIEX QTRAP®系统对野生菌中6种常见的蘑菇毒素进行快速测定，并建立起6种蘑菇毒素的专属数据库，用于日常快速筛查，特别适合于毒蘑菇中毒的确证分析。一次进样分析仅需7 min。具有灵敏度高、快速、简便、选择性好的特点。

SCIEX QTRAP®系统是将三重四极杆质谱技术与线性加速离子阱技术相结合；不仅具有这两类质谱的所有扫描模式，还提供多种独特的复合功能。其质量分析器可在两类质谱的工作模式之间进行瞬时切换，故可智能化的实现一针进样，同时获得不同扫描模式下的数据。本实验应用QTRAP系统的MRM-IDA-EPI的扫描模式（如图1），实现一针进样，同时进行定性或定量分析。

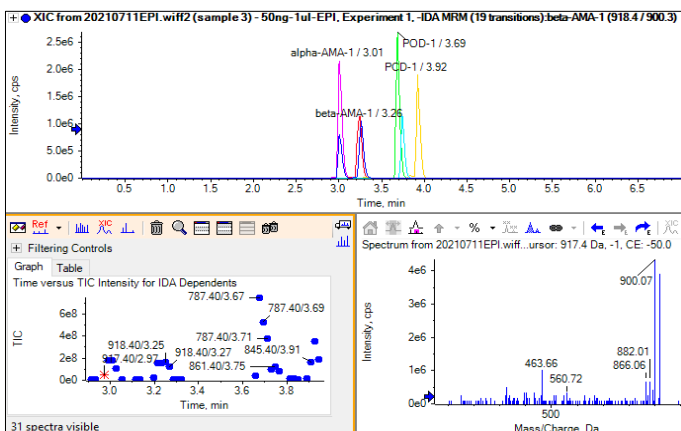


图1. MRM-IDA-EPI扫描模式下的6种蘑菇毒素的色谱图以及二级EPI质谱图

实验方法特点:

1. 建立LC-MS/MS方法，7 min完成检测，快速高效，省时省力，可以快速筛查并定量野生菌中蘑菇毒素。
2. 化合物种类齐全，涵盖了常见的 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基三羟鬼笔毒肽6种蘑菇毒素；
3. 检测方法简单高效，一针进样，应用QTRAP系统的MRM-IDA-EPI复合扫描模式同时获得MRM数据以及增强型高灵敏度的二级全谱数据（EPI）（见图1）；
4. 强大的定性功能：QTRAP®系统的EPI模式，即增强型离子阱扫描模式，可得到灵敏度更高（与三重四极杆相比可提高两个数

量级以上)，且不同能量碎裂的全质量范围的二级碎片谱。软件通过与标准品的谱库自动比对，帮助更准确的筛查和定性；

5. 卓越的定量功能：QTRAP® 系统具有与三重四极杆质谱完全一致的定量性能，同时，拥有出色的系统重现性和稳定性。线性各浓度点准确度均在85 - 110%之间，且r均大于0.999，线性相关性良好，定量准确。

实验方法

1. 色谱条件

- a) 色谱柱：Phenomenex Luna Omega Polar C18 (100×2.1mm, 1.6 μm)，或性能相当者。
- b) 流动相：A为0.005%甲酸水溶液，B为甲醇，梯度洗脱程序(表1)。
- c) 流速：400 μL/min。
- d) 柱温：40 °C。

表1. 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	95	5
4	5	95
5.5	5	95
5.6	95	5
7	95	5

2. 质谱方法

扫描方式：MRM-IDA-EPI

离子源：ESI源

离子源参数：

电压 IS：4500 V (-) 源温度 TEM：650 °C

气帘气 CUR：30 psi 碰撞气CAD：Medium

雾化气 GS1：45 psi 辅助气GS2：60 psi

6种蘑菇毒素的MRM参数列表2：

序号	化合物	母离子 Q1	子离子 Q3	DP (V)	CE (V)	RT (min)
1	β-鹅膏毒肽	918.4	900.3	-190	-44	3.28
		918.4	205.1	-190	-67	
		918.4	463.2	-190	-64	
2	α-鹅膏毒肽	918.4	561.2	-190	-53	3.04
		917.4	899.4	-190	-36	
		917.4	560.2	-190	-53	
3	γ-鹅膏毒肽	917.4	463.2	-190	-54	3.27
		917.4	865.4	-190	-38	
		901.4	883.3	-190	-36	
4	羧基二氢鬼笔毒肽	901.4	849.4	-190	-45	3.96
		901.4	544.3	-190	-53	
		845.4	771.3	-160	-51	
5	二氢鬼笔毒肽	845.4	827.4	-160	-42	3.72
		845.4	809.4	-160	-43	
		845.4	783.4	-160	-49	
6	羧基三氢鬼笔毒肽	787.4	743.3	-210	-45	3.77
		787.4	582.2	-210	-51	
6	羧基三氢鬼笔毒肽	861.4	787.3	-160	-50	3.77
		861.4	825.4	-160	-43	

实验结果

1. 定性实验结果

1.1 蘑菇毒素标准谱库建立

QTRAP® 系统的EPI扫描模式，利用碰撞池的多能量碎裂功能以及离子阱质量分析器的阱集功能，可得到更全质量范围的二级碎片谱，根据其二级碎片全谱信息，建立蘑菇毒素标准谱库，可用于野生菌中蘑菇毒素的快速筛查以及定性确证。

1.2 定性实验结果

SCIEX 系统搭载全新OS软件，提供强大的数据分析和结果报告功能。其快捷的数据处理功能，可以自动根据化合物的保留时间和二级碎片谱图进行目标化合物筛查和定性。如图2，根据软件结果显示，在野生菌样本中检测出α-鹅膏毒肽，其保留时间和二级

碎片离子比率满足要求，且实测二级谱图与数据库匹配Purity得分分为99.0分，即便在复杂基质中的低浓度化合物仍可得到高灵敏度的二级碎片全谱，基于样本实测二级全谱与标准品谱库的自动比对，可帮助更好的排判假阳性和假阴性，保证定性结果的准确无误。

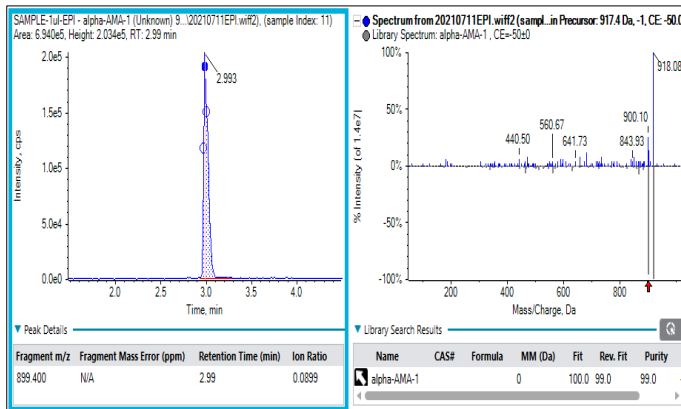


图2. 阳性检出样品的α-鹅膏毒肽色谱图及实测二级谱图与数据库匹配情况

2. 定量实验结果

2.1 6种蘑菇毒素的提取离子流色谱图:

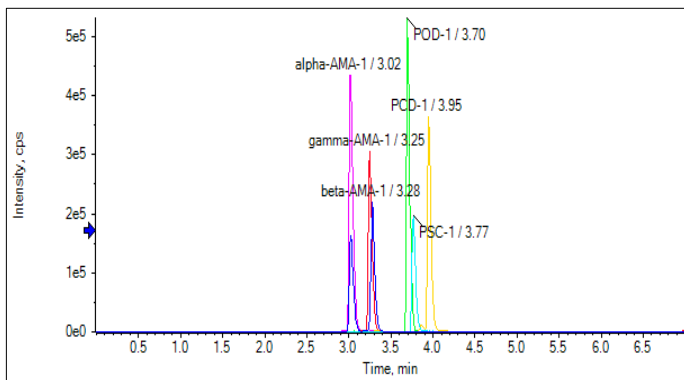


图3. 6种蘑菇毒素提取离子流图。

2.2 线性范围、回归方程、回归系数以及检出限:

6种蘑菇毒素在0.1~200 ng/mL均具有良好的线性，其回归系数 $r > 0.999$ ，详见表3。

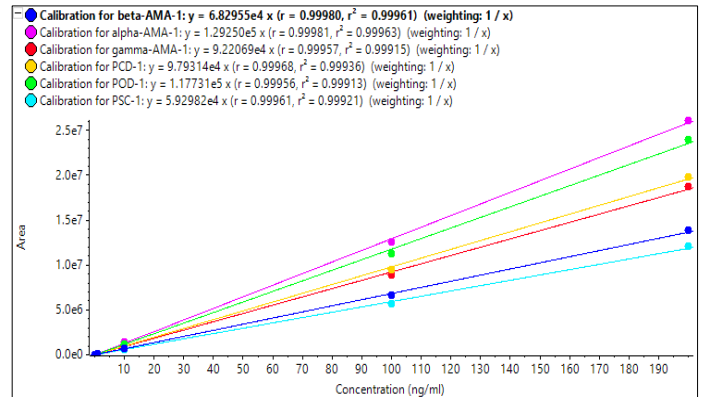


图4. 6种蘑菇毒素的标准曲线。

表3. 6种蘑菇毒素的线性范围、回归曲线、回归系数。

化合物名称	线性范围 (ng/mL)	回归方程	回归系数r
β-鹅膏毒肽	0.1-200	$y = 6.82955e4 x$	$r = 0.99980$
α-鹅膏毒肽	0.1-200	$y = 1.29250e5 x$	$r = 0.99981$
γ-鹅膏毒肽	0.1-200	$y = 9.22069e4 x$	$r = 0.99957$
羧基二氢鬼笔毒肽	0.1-200	$y = 9.79314e4 x$	$r = 0.99968$
二氢鬼笔毒肽	0.1-200	$y = 1.17731e5 x$	$r = 0.99956$
羧基三氢鬼笔毒肽	0.1-200	$y = 5.92982e4 x$	$r = 0.99961$

2.3 方法重现性:

使用不同空白基质考察实验的重现性，添加浓度0.5 ng/ml、5 ng/ml、50 ng/ml，连续进样6针，所有化合物RSD值均小于5%，表明样品在Turbo V™离子源作用下，在复杂基质中，仍然具有良好的重现性。

化合物名称	0.5 ng/ml RSD%(n=6)	5 ng/ml RSD%(n=6)	50 ng/ml RSD%(n=6)
β-鹅膏毒肽	4.11	3.04	2.72
α-鹅膏毒肽	4.30	2.31	0.90
γ-鹅膏毒肽	4.09	3.63	2.13
羧基二氢鬼笔毒肽	3.60	3.38	1.30
二氢鬼笔毒肽	4.04	3.36	3.12
羧基三氢鬼笔毒肽	3.40	2.66	1.62

实际样品的检测:

对云南省内某地区一批野生菌样品进行检测,在某样品中检测出羧基二羟鬼笔毒肽,其色谱图见图5。经测试含量0.64 $\mu\text{g/g}$,同时通过QTRAP进行定性确证,二级谱库搜库对比评分为99.5分,进一步阳性确证,快速完成定性定量工作。

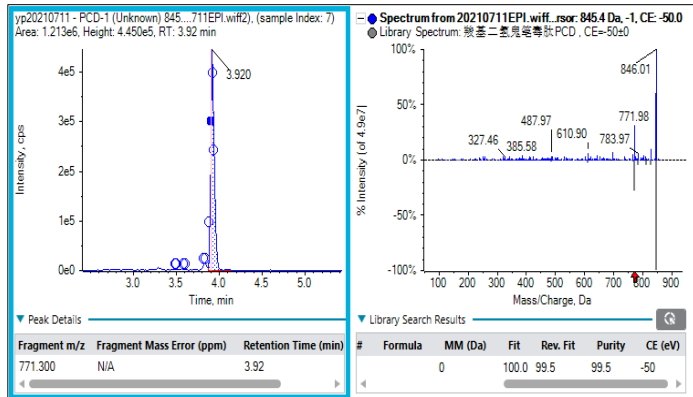


图5. 某批次样品中检测出羧基二羟鬼笔毒肽的色谱图以及二级数据库匹配情况

总结

1. 本文基于SCIEX QTRAP®系统MRM-IDA-EPI模式建立野生菌中6种蘑菇毒素的测定的LC-MS/MS方法。实现一针进样,同时得到高质量的MRM和EPI数据,定量和定性一针完成,省时省力。
2. 7 min梯度,简便快速,灵敏度高,定量准确。线性范围0.1~200 ng/mL各浓度点准确度均在85-110%之间,且 $r > 0.999$,线性相关性良好。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息,请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标,也包括相关的标识、标志的所有权,归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在和美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14587-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: SCIEX-China

3. SCIEX Turbo V™离子源设计和主动排废功能带来高离子化效率和卓越的抗污染能力,确保在日常工作大批量样本检测过程中,仍可以保证稳定的高灵敏度和重现性。
4. QTRAP® 质谱EPI扫描模式,可获得全质量范围的二级碎片谱,根据其二级碎片全谱信息,建立蘑菇毒素专有标准谱库,用于日常快速定性筛查确证。

参考文献

- [1] BJS202008 蘑菇中 α -鹅膏蕈毒肽等6种蘑菇毒素的测定.
- [2] 肖绍震,林锋,傅武胜,等. 血浆和尿液中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):319-325.
- [3] 周贻兵,李磊,吴玉田,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中蘑菇毒肽的含量[J]. 期刊论文, 2019, 55(12).
- [4] 陈作红,胡劲松. 食品科学, 2014, 35(8):11.