

## TurboFlow 在线净化-液相色谱-串联质谱法 快速检测人尿中鹅膏肽类毒素

方力<sup>1\*</sup>, 邱凤梅<sup>2</sup>, 余新威<sup>1</sup>

(1. 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室(舟山市疾病预防控制中心),  
浙江 舟山 316021; 2. 岱山县疾病预防控制中心, 浙江 岱山 316200)

**摘要:** 鹅膏肽类毒素是一类环状多肽类蘑菇毒素, 中毒后会造急性肝损伤, 病死率非常高。我国因误食野生毒蘑菇导致的中毒事件常有发生, 测定人尿中鹅膏肽类毒素的浓度, 可为临床早期诊断和救治提供有价值的信息。该研究建立了 TurboFlow (TF) 在线净化-液相色谱-三重四极杆质谱快速定量检测尿液中 5 种鹅膏肽类毒素 ( $\alpha$ -鹅膏毒肽、 $\beta$ -鹅膏毒肽、 $\gamma$ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽) 的新方法。尿液样品经高速离心后, 直接注入 TurboFlow 在线净化-液相色谱-串联质谱进行分析。对影响 TF 在线净化的参数如 TF 净化柱、上样溶剂、洗脱溶剂、转移流速、转移时间等进行了优化。在优化后的实验条件下, 以 TurboFlow™ Cyclone 柱 (50 mm×0.5 mm) 为净化柱, Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×2.1 mm) 为分析柱, 甲醇和 4 mmol/L 乙酸铵为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾正离子选择反应监测 (SRM) 模式下进行检测, 基质匹配外标法定量。结果表明, 鹅膏肽类毒素在 1.0~50.0  $\mu\text{g/L}$  范围内呈现良好的线性关系, 相关系数均可达到 0.997 以上。方法的检出限为 0.15~0.3  $\mu\text{g/L}$ , 定量限为 0.5~1.0  $\mu\text{g/L}$ 。在 2.0、5.0 和 10.0  $\mu\text{g/L}$  的加标水平下, 5 种鹅膏肽类毒素的日内和日间回收率分别为 87.0%~108.6% 和 86.8%~112.7%, 日内、日间相对标准偏差 (RSD) 均小于 14.5%。该检测方法准确、快速、灵敏度高、易操作, 适用于公共卫生应急检测或临床中毒病因识别检测。

**关键词:** 在线净化; 液相色谱-串联质谱法; 鹅膏肽类毒素; 蘑菇毒素; 尿液

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2021)03-0338-08

## Determination of amanita peptide toxins in human urine by TurboFlow online clean-up-liquid chromatography- tandem mass spectrometry

FANG Li<sup>1\*</sup>, QIU Fengmei<sup>2</sup>, YU Xinwei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province (Zhoushan Municipal Center for Disease Control and Prevention), Zhoushan 316021, China;  
2. Daishan Center for Disease Control and Prevention, Daishan 316200, China)

**Abstract:** Amanita peptide toxins are cyclic polypeptide mushroom toxins that can cause acute liver damage. The fatality rate associated with these toxins is very high. Monitoring the concentration of amanita peptide toxins in human urine can provide valuable information for early clinical diagnosis and treatment. Therefore, a TurboFlow online clean-up-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (TF-LC-MS/MS) method was established for the simultaneous quantitative determination of five amanita peptide toxins ( $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin,  $\gamma$ -amanitin, phalloidin, and phalloidin) in human urine. After pre-treatment with high-speed centrifugation, urine samples were analyzed using TF-LC-MS/MS. The main factors influencing

收稿日期: 2020-06-02

\* 通讯联系人. E-mail: fangli123@126.com.

基金项目: 舟山市医药卫生科技计划项目 (2020YA01); 舟山市科技计划项目 (2021C31071).

**Foundation item:** Medical and Health Science and Technology Plan Project of Zhoushan (No. 2020YA01); Science and Technology Plan Project of Zhoushan (No. 2021C31071).

purification efficiency, including the TF column, loading solution, eluting solution, transfer flow, and transfer time, were optimized in this study. Under the optimized experimental conditions, the analytes were purified using a TurboFlow™ Cyclone column (50 mm×0.5 mm) and separated on a Hypersil GOLD C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm) using the mobile phases of methanol and 4 mmol/L aqueous ammonium acetate solution with gradient elution. The analytes were detected in selected reaction monitoring (SRM) mode via positive electrospray ionization. Matrix-matched external standard calibration was used for quantitation. The linear range of the method ranged from 1.0 μg/L to 50.0 μg/L for all five amanita peptide toxins, with correlation coefficients ( $r^2$ ) higher than 0.997. The limits of detection were 0.15–0.3 μg/L and the limits of quantification (LOQs) were 0.5–1.0 μg/L for the five amanita peptide toxins in urine. The intra-day and inter-day recoveries of amanita peptide toxins were 87.0%–108.6% and 86.8%–112.7%, respectively, at the spiked levels of 2.0, 5.0, and 10.0 μg/L. The intra-day and inter-day relative standard deviations (RSDs) were less than 14.5%. The method is accurate, rapid, sensitive, easy to operate, and can satisfy the requirements of public health emergency testing or clinical poisoning testing.

**Key words:** online-cleanup; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); amanita peptide toxins; mushroom toxins; urine

我国山区众多,野生菌类资源丰富、种类繁多,因误食野生毒蘑菇中毒事件时有发生,并可引起严重甚至致命的中毒。鹅膏肽类毒素是一类环状多肽类毒素,由该毒素引起的中毒占毒蘑菇中毒死亡病例的90%以上<sup>[1]</sup>。根据氨基酸的组成和结构,常见鹅膏肽类毒素分为鹅膏毒肽、鬼笔毒肽和毒伞肽三大类。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(phalloacidin)和二羟鬼笔毒肽(phalloidin);毒伞素为单环七肽,致命性相对较弱,相关研究较少<sup>[2]</sup>。鹅膏肽类毒素具有强烈的肝毒性,其中鹅膏毒肽的口服半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)可达0.1 mg/kg,单个毒蘑菇中亦可能含有该毒素剂量;鬼笔毒肽是一种速效毒素,能专一性地与细胞中的肌丝蛋白结合,进而打破肌丝蛋白与肌球蛋白之间聚合和解聚的动态平衡,动物静脉或腹腔注射实验,2~5 h内死亡<sup>[3]</sup>。

鹅膏肽类毒素引起的蘑菇中毒往往有一定的潜伏期,一般为6~24 h,在极端情况下最长可达36 h,然后才出现临床中毒症状<sup>[4]</sup>。有研究表明毒蘑菇摄取后约30 h内血清中可检测到鹅膏毒肽;摄取后约72 h内尿液中可检测到鹅膏毒肽<sup>[5]</sup>。因此,与血液样本相比,尿液样本更适合用于鹅膏类蘑菇毒素中毒事件检测。有文献报道最早在毒蘑菇摄入后

90 min 就发现尿液中存在毒素<sup>[6]</sup>。尽管鹅膏肽类毒素在毒蘑菇中浓度很高,但生物样品中相关毒素的检出浓度非常低,在μg/L甚至更低水平<sup>[3,7]</sup>。因此,开发建立一种高灵敏度、快速定量检测尿液中鹅膏肽类毒素的方法也显得十分必要。

目前,关于尿液中鹅膏肽类毒素的检测方法主要有酶联免疫法<sup>[8]</sup>、高效液相色谱法<sup>[6,9]</sup>、毛细管电泳法<sup>[10]</sup>及液相色谱-串联质谱法<sup>[3,5,11-15]</sup>。酶联免疫法是一种快速筛选方法;液相色谱、毛细管电泳配合紫外或二极管阵列检测器存在检测灵敏度相对较低的问题;液相色谱-串联质谱法是目前的主流方法,具有选择性好、灵敏度高等优势。当前关于生物样品中鹅膏肽类毒素残留检测的前处理手段主要有蛋白质沉淀<sup>[11]</sup>、固相萃取<sup>[3,5,12-14]</sup>、免疫亲和提取法<sup>[15]</sup>等。常规固相萃取小柱净化法存在溶剂消耗量大、使用成本高等缺陷;蛋白质沉淀法存在净化效果差等缺陷,这些前处理方法均在离线状态下进行,费时费力。与传统的净化方法相比,TurboFlow (TF)在线净化通过扩散溶解、尺寸排阻等技术将蛋白质等生物大分子物质过滤掉,保留目标小分子化合物;并通过与串联质谱联用大大简化样品前处理过程,实现在线净化功能的同时,也保证了检测方法的灵敏度<sup>[16,17]</sup>。目前该技术已应用于尿液中β-激动剂<sup>[18]</sup>、全氟化合物<sup>[19]</sup>、多环芳烃代谢物<sup>[20]</sup>、紫外线吸收剂<sup>[21]</sup>等典型污染物的检测。Helfer等<sup>[13]</sup>首

先利用 TF 在线净化技术,开展尿液中鹅膏毒肽类的检测,但该研究采用两根 TurboFlow 柱串联净化,增加了使用成本,且未涉及鬼笔毒肽的检测。徐小民等<sup>[22]</sup>采用在线 ODS 微柱结合单六通阀切换技术,实现了尿液中痕量  $\alpha$ -鹅膏毒肽的检测,也未涉及鬼笔毒肽的检测。魏佳会等<sup>[3]</sup>报道毒蘑菇中毒病人尿液样本中存在鬼笔毒肽类毒素。

本研究利用 TF-LC-MS/MS 系统,建立了直接进样快速测定尿液中 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽的检测方法。该方法简便、快速、结果准确可靠,不需要复杂前处理,可用于中毒病人尿液的快速定性定量分析,为判定公共卫生中毒事件原因和临床准确识别毒蘑菇中毒提供了技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Transcend II 在线净化-液相色谱系统(美国 Thermo 公司); TSQ Vantage 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo 公司); Microfuge 20R 型微量高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司); Milli-Q (18.2 M $\Omega$ ) 超纯水处理系统(德国 Merck 公司)。

甲酸(LC-MS 级)、乙酸铵(色谱纯)、乙腈(色谱纯)购自德国 CNW 公司;超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制得。 $\alpha$ -鹅膏毒肽、 $\beta$ -鹅膏毒肽、 $\gamma$ -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽标准品购自美国 Alexis 公司,标准纯度  $\geq 90\%$ 。尿液由健康志愿者提供。

### 1.2 样品制备

取充分混合后的尿样 1 mL 于 2 mL 聚丙烯离心管中,在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,以 15 000 r/min 的转速离心 10 min,取适量上清液于进样瓶中。

### 1.3 标准溶液的配制

鹅膏肽类毒素标准溶液用甲醇溶液稀释,配成质量浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。用 0.1% (v/v, 下同) 甲酸水溶液配制成 1、2、5、10、20 和 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  的纯溶剂标准系列;用空白尿液基质配制成 1、2、5、10、20 和 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  的尿液基质标准系列。

### 1.4 TF 净化及色谱分离条件

富集净化柱: TurboFlow<sup>TM</sup> Cyclone 色谱柱(50 mm $\times$ 0.5 mm, 60  $\mu\text{m}$ ), 上样泵的流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为甲醇, 流动相 C 为水, 流动相 D 为乙腈, 进样量为 50  $\mu\text{L}$ , 在线净化梯度洗脱程序见表 1 (Loading pump), TF 连接图见图 1。

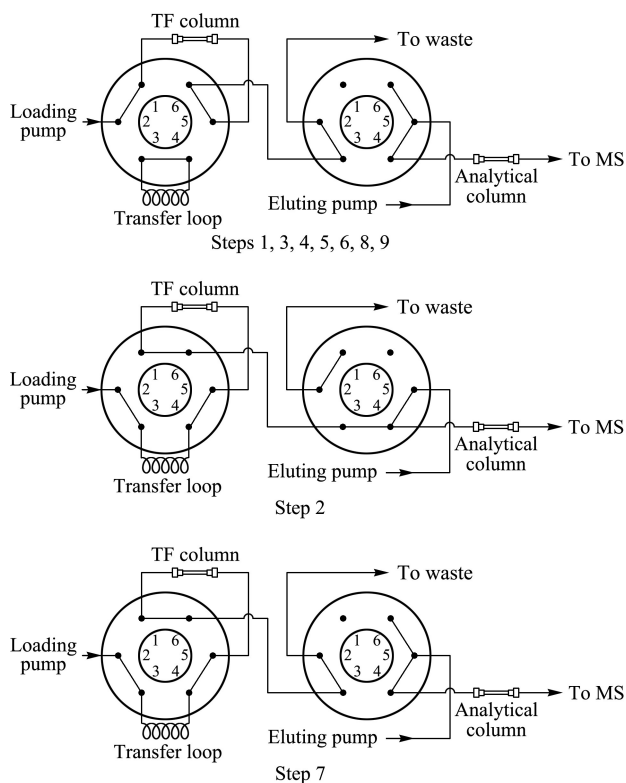


图 1 在线净化流路连接示意图

Fig. 1 Schematic diagram of flow route in the online clean-up mode

TF: TurboFlow online clean-up.

分析柱: Hypersil GOLD  $\text{C}_{18}$  色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ , 美国 Thermo 公司), 流动相 A 为 4 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 为甲醇, 流速为 0.3 mL/min, 梯度洗脱见表 1 (Eluting pump)。

### 1.5 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描方式, 选择反应监测(SRM)模式; 喷雾电压为 3.0 kV; 汽化温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子传输毛细管温度为 325  $^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气压(sheath units)为 45 arb, 辅助气压(arbitrary units)为 15 arb, 这两种雾化气均为高纯氮气, 碰撞气为高纯氩气, 压力为 0.2 Pa (1.5 mTorr)。使用前调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。5 种鹅膏肽类毒素的检测参数见表 2。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱、质谱条件优化

国内外很多文献已证实反相色谱柱适合鹅膏肽类毒素的分离与检测<sup>[3,5,14,15]</sup>。本实验采用由 4 mmol/L 乙酸铵与甲醇组成的流动相体系, 比较了 Hypersil GOLD  $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ )

表1 在线净化与色谱分离梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient elution procedures of online clean-up and chromatographic separation

Step No.	Start time/min	Step time/min	Function	Loading pump					Eluting pump		
				Flow rate/(mL/min)	$\varphi(0.1\% \text{ FA})/\%$	$\varphi(\text{MeOH})/\%$	$\varphi(\text{H}_2\text{O})/\%$	$\varphi(\text{ACN})/\%$	Flow rate/(mL/min)	$\varphi(4 \text{ mmol/L CH}_3\text{COONH}_4)/\%$	$\varphi(\text{MeOH})/\%$
1	0.0	1.0	loading	1.5	100	0	0	0	0.3	95	5
2	1.0	1.0	transferring	0.1	80	0	0	20	0.2	95	5
3	2.0	2.0	washing	1.5	0	0	90	10	0.3	80	20
4	4.0	1.5	washing	1.5	0	0	0	100	0.3	60	40
5	5.5	1.0	washing	1.5	0	100	0	0	0.3	40	60
6	6.5	0.5	washing	1.5	0	0	0	100	0.3	10	90
7	7.0	2.0	filling the loop	1.5	80	0	0	20	0.3	10	90
8	9.0	0.2	equilibrating	1.5	100	0	0	0	0.3	95	5
9	9.2	1.8	equilibrating	1.5	100	0	0	0	0.3	95	5

FA: formic acid aqueous solution.

表2 鹅膏肽类毒素的质谱检测参数

Table 2 Detection parameters of amanita peptide toxins

Analyte	Scan mode	Precursor ion ( $m/z$ )	Product ion ( $m/z$ )	S-lens/V	CE/eV
$\alpha$ -Amanitin	ESI <sup>+</sup>	919.6	259.0 <sup>*</sup> / 86.0	180	33/48
$\beta$ -Amanitin	ESI <sup>+</sup>	920.6	259.0 <sup>*</sup> / 86.0	180	32/46
$\gamma$ -Amanitin	ESI <sup>+</sup>	903.6	243.0 <sup>*</sup> / 86.0	180	37/54
Phalloidin	ESI <sup>+</sup>	847.6	157.0 <sup>*</sup> / 329.9	160	50/28
Phalloidin	ESI <sup>+</sup>	789.6	157.0 <sup>*</sup> / 330.0	160	45/33

\* Quantitative ion.

和 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 两根小粒径反相色谱柱对目标物的色谱分离效果的影响。结果显示,两根 C<sub>18</sub> 柱均能较好地实现 5 种毒素的分离,但是 Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 产生的系统压力明显低于 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>。因此本研究采用 Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 柱分离待测组分,能较好地实现目标分析物的色谱分离,见图 2。

实验中分别取 1.0 mg/L 鹅膏肽类毒素标准溶液,以流动注射方式在电喷雾正离子模式下优化目标毒素的质谱参数,选择干扰小、信噪比大的离子对作为定性或定量离子对。优化后的透镜电压、碰撞能量,选择的定性和定量离子见表 2。鉴于目标毒素的定量、定性离子质量数较小(见表 2),本研究考察了空白尿样对目标物定量、定性离子通道的影响。从图 2b 可见,所选的定量、定性离子通道在目标物出峰时间附近未见明显色谱峰干扰,各离子通道本底基线也相对较低。

## 2.2 在线净化条件优化

TF 在线净化程序一般包括上样与净化、洗脱、LC 分离、色谱柱淋洗与再生等步骤。需要对 TF 净化柱、上样溶剂、洗脱溶剂、转移流速和转移时间等参数进行优化。

### 2.2.1 TF 净化柱的选择

为了选择最佳的在线 TF 净化柱,考察了 3 种具有不同化学修饰基团的 TF 净化柱。本研究选择了两种聚合物级的 TF 净化柱 Cyclone (50 mm×0.5 mm) 和 Cyclone-P (50 mm×0.5 mm) 和一种硅胶基 TF 净化柱 XL-C<sub>18</sub> (50 mm×0.5 mm)。在最佳液相色谱条件下,将 5 种毒素混合标准溶液注入 TF 净化柱中,比较目标物在色谱柱上的保留能力。结果发现,Cyclone 柱对 5 种目标毒素的保留效果最好。TF 净化柱可重复使用,实际进样 100 针后目标物的色谱峰响应未见明显降低。

### 2.2.2 上样溶剂的选择

上样溶剂的组成会影响目标毒素在 TF 净化柱上的保留能力。本研究比较了 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸与甲醇组成的不同比例混合溶液作为上样溶液对目标毒素的色谱峰强度的影响。从图 3a 中可见,尽管上样液中含有机溶剂有助于从样品中去除不需要的杂质,但随着上样液中含有机相甲醇含量的不断增加,目标毒素的色谱峰强度随之不断下降,这表明有机相甲醇的存在,降低了目标毒素在 TF 柱的保留,因此本研究采用 0.1% 甲酸水溶液作为上样溶液。

### 2.2.3 洗脱溶剂的选择

高有机强度洗脱溶剂可在 TF 净化柱上获得令人满意的分析物回收率,但在分析柱上无法产生尖锐的色谱峰。因此,对洗脱溶剂进行了优化,以同时实现目标物的定量洗脱和所需的峰锐度。本研究考察了乙腈和 0.1% 甲酸组成的不同比例混合物作为洗脱溶剂对目标毒素色谱峰强度的影响。由图 3b 可见,当乙腈的比例从 5% 变为 20% 时,5 种目标毒素的回收率随乙腈比例的上升而升高。当洗脱溶剂中乙腈比例超过 20% 时,目标毒素的回收率未见明



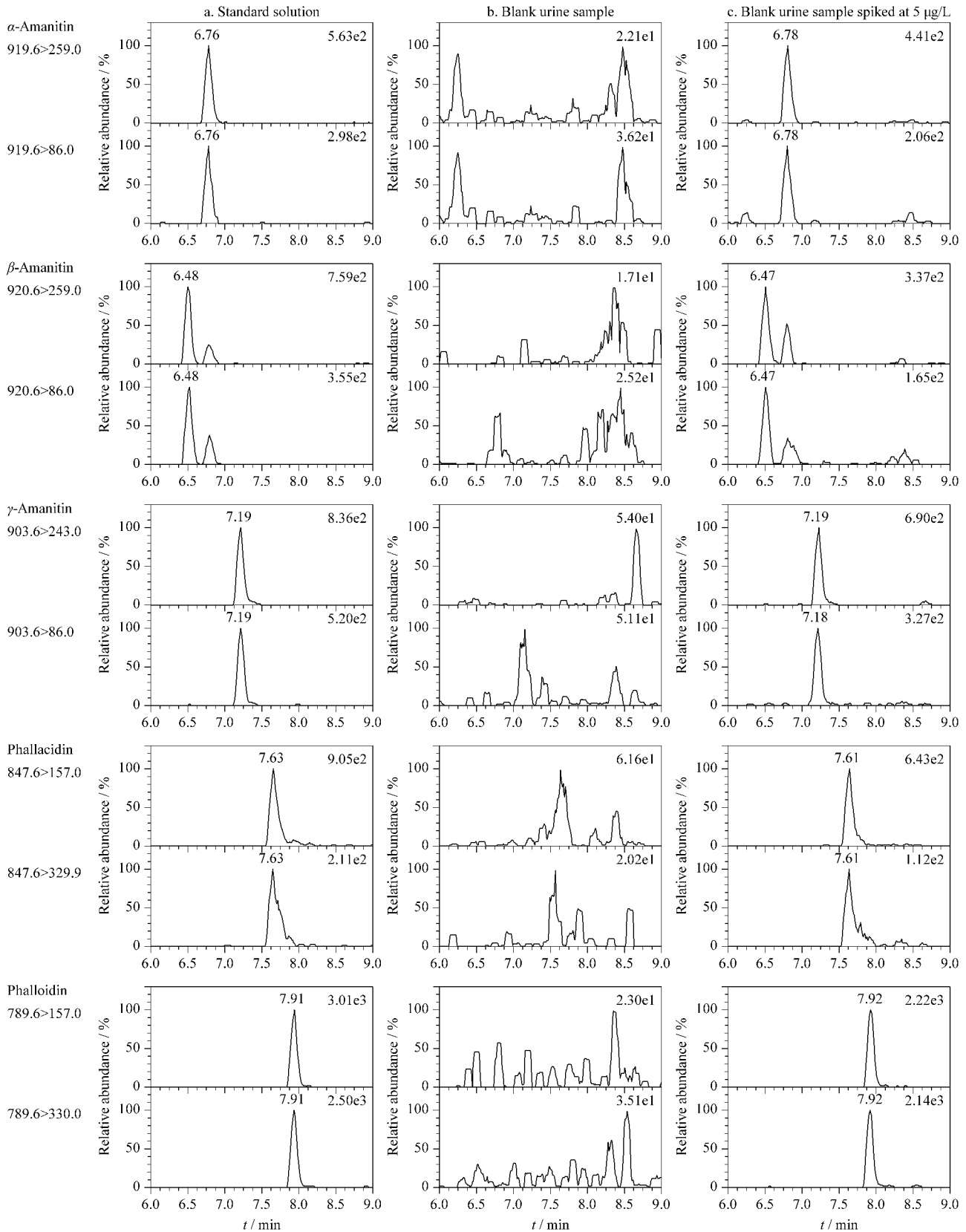


图 2 标准溶液、空白尿样及加标尿样中 5 种鹅膏肽类毒素的 SRM 色谱图

Fig. 2 SRM chromatograms of the five amanita peptide toxins in a standard solution, a blank urine sample and a spiked urine sample

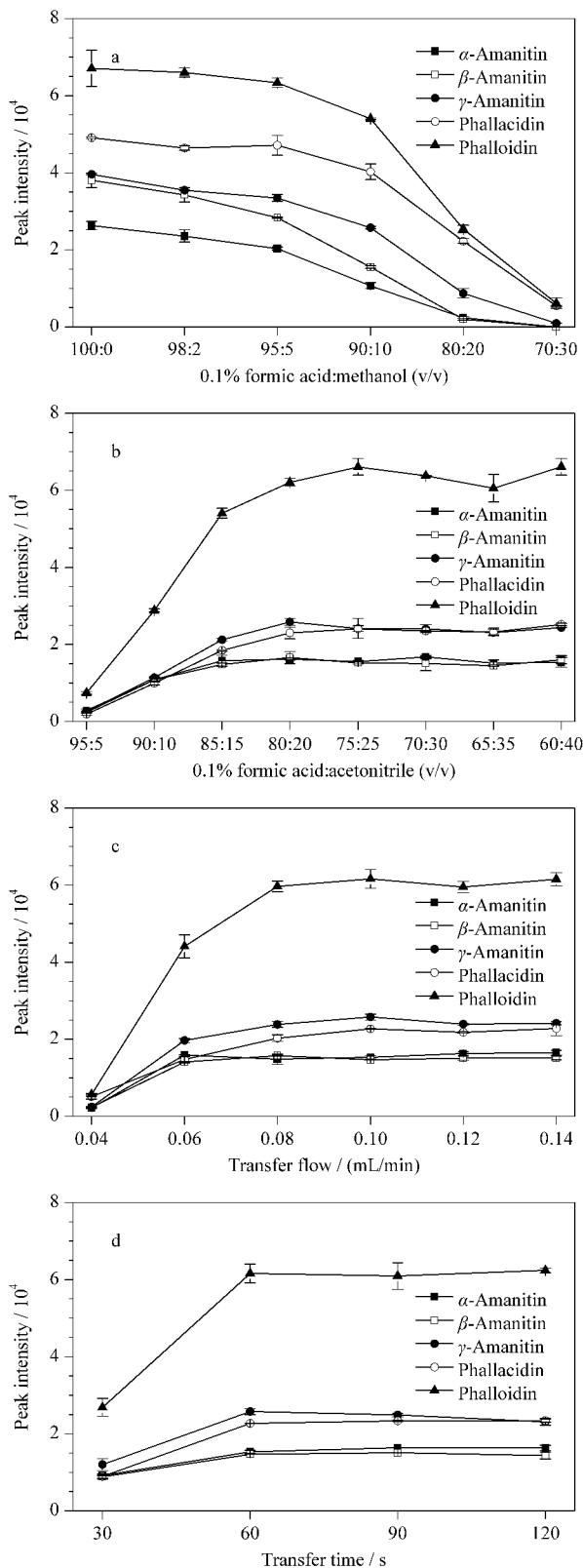


图3 在线净化条件对目标物色谱峰响应的影响 ( $n=3$ )

Fig. 3 Effect of online purification conditions on peak intensities of amanita peptide toxins ( $n=3$ )

a. loading solution; b. eluting solution; c. transfer flow; d. transfer time.

显升高。研究表明 20% 的乙腈足以完全将目标物从 TF 净化柱上洗脱下来,且目标毒素色谱峰形尖锐对称。因此,选择乙腈-0.1% 甲酸 (20:80, v/v) 作为洗脱溶剂。

#### 2.2.4 转移流速的选择

转移步骤就是将分析物从 TF 柱转移洗脱到分析柱。较低的转移洗脱流速可能导致峰展宽和保留时间更长。较高的转移流速可加快分析物的转移,但可能会增加色谱柱的压力。在优化实验中,在转移时间为 60 s 的条件下,比较了转移流速 0.06、0.08、0.10、0.12 和 0.14 mL/min 对 5 种目标毒素峰强度的影响。从图 3c 可见,当传输流速为 0.06 mL/min,目标毒素色谱峰强度非常小,这表明目标物转移不完全,部分目标物仍保留在 TF 净化柱。随着转移流速的不断增大,峰面积也随之增加,当转移流速到达 0.10 mL/min 后,目标物的峰强度未出现显著增加。这表明当转移流速到达 0.10 mL/min 时,目标物已完全从 TF 柱转移至分析柱。因此,最优转移流速设定为 0.10 mL/min。

#### 2.2.5 转移时间的选择

转移时间和转移流速都决定了目标物的洗脱完全与否。本研究在 0.10 mL/min 的转移流速下,测试了 30、60、90 和 120 s 的转移时间对目标毒素的色谱峰响应的影响。如图 3d 所示,转移时间为 30 s 时,5 种鹅膏肽类毒素的色谱峰强度均很小,这表明目标物转移不完全。当转移时间为 60 s 时,鹅膏肽类毒素转移到分析柱的比例已超过 90%,且色谱峰形良好。当转移时间增加为 90 或 120 s 时,目标毒素的峰强度虽略有提高,但是更长的转移时间将导致更长的分析时间,且更多杂质将随目标毒素一起洗脱出来。因此,本研究选择 60 s 为最佳转移时间。

#### 2.3 基质效应评估

本研究采用基质匹配标准曲线的斜率与纯溶剂标准曲线斜率的百分比来评价检测方法基质效应 (matrix effect, ME)。评价可按 (基质匹配标准曲线斜率/纯溶剂标准曲线斜率-1)  $\times$  100% 公式进行。低于 100% 表示存在基质抑制效应,高于 100% 表示存在基质增强效应,绝对值越大则基质效应越强,如恰好为 100% 则表示不存在基质效应。从表 3 可知,鹅膏类毒素在尿液基质中均呈现一定的基质抑制作用,基质效应在 -31.6% ~ -52.7% 之间,采用基质匹配标准曲线测定实际样品,可在一定程度上弥补基

质效应对目标毒素定量检测的影响。

## 2.4 标准曲线及检出限

按 1.3 节方法配制标准溶液并测定,以鹅膏肽类毒素的质量浓度为横坐标,目标物峰面积为纵坐标,绘制基质标准曲线,在 1.0~50  $\mu\text{g/L}$  浓度范围,线性相关性良好,相关系数均大于 0.997。在本实验条件下,以 3 倍信噪比所对应的质量浓度为检出限,10 倍信噪比所对应的质量浓度为定量限,得出尿液基质中二羟鬼笔毒肽的方法检出限和定量限分别为 0.15  $\mu\text{g/L}$  和 0.5  $\mu\text{g/L}$ ,其他鹅膏肽类毒素的检出限和定量限分别可达到 0.3  $\mu\text{g/L}$  和 1.0

$\mu\text{g/L}$ 。结果见表 3。

## 2.5 方法的回收率与精密度

本研究以尿液为研究对象,考察检测方法的回收率和精密度。准确移取空白尿液 1.0 mL,设定 3 个添加水平 2.0、5.0 和 10.0  $\mu\text{g/L}$ ,根据上述方法进行检测,每组样品 6 个平行,连续测试 3 天,测定日内、日间回收率以及日内、日间相对标准偏差 (RSD)。由表 4 可知,尿液基质中鹅膏肽类毒素的日内和日间回收率分别为 87.0%~108.6% 和 86.8%~112.7%;日内、日间 RSD 均小于为 14.5%,可满足检测分析的要求。

表 3 5 种鹅膏肽类毒素的回归方程、相关系数、基质效应、检出限和定量限

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, matrix effects, LODs, and LOQs of the five amanita peptide toxins

Toxin	Linear range/( $\mu\text{g/L}$ )	Solvent		Urine				
		Curve	$R^2$	Curve	$R^2$	ME/%	LOD/( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ/( $\mu\text{g/L}$ )
$\alpha$ -Amanitin	1.0-50.0	$y=918.615x-191.188$	0.9994	$y=578.167x-298.264$	0.9990	-37.1	0.3	1.0
$\beta$ -Amanitin	1.0-50.0	$y=1018.51x-34.4314$	0.9970	$y=481.957x-61.4861$	0.9998	-52.7	0.3	1.0
$\gamma$ -Amanitin	1.0-50.0	$y=1371.64x-126.402$	0.9996	$y=915.107x-172.278$	0.9990	-33.3	0.3	1.0
Phalloidin	1.0-50.0	$y=1794.66x-587.165$	0.9994	$y=942.94x-126.634$	0.9999	-47.5	0.3	1.0
Phalloidin	1.0-50.0	$y=4240.93x+3.11143$	0.9992	$y=2899.95x+548.874$	0.9995	-31.6	0.15	0.5

ME=(the slope of matrix-matched standard curve/the slope of solvent standard curve-1) $\times$ 100%;  $y$ : peak area of amanita peptide toxin;  $x$ : mass concentration of amanita peptide toxin.

表 4 方法的回收率和精密度

Table 4 Recovery and precision of the method

Toxin	Spiked level/( $\mu\text{g/L}$ )	Intra-day ( $n=6$ )		Inter-day ( $n=3$ )	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
$\alpha$ -Amanitin	2.0	101.5	9.8	107.1	5.5
	5.0	100.5	7.4	106.0	4.3
	10.0	102.9	5.6	104.4	1.9
$\beta$ -Amanitin	2.0	95.4	14.2	97.3	5.5
	5.0	89.2	4.0	94.4	4.3
	10.0	99.2	7.8	94.6	4.6
$\gamma$ -Amanitin	2.0	108.6	13.6	112.7	7.2
	5.0	98.1	7.7	100.4	2.5
	10.0	95.3	6.4	96.7	2.9
Phalloidin	2.0	96.0	14.5	93.5	5.6
	5.0	91.7	6.5	89.4	5.7
	10.0	93.0	4.0	87.5	4.0
Phalloidin	2.0	90.2	5.7	87.9	2.3
	5.0	87.0	2.7	86.8	2.1
	10.0	89.1	4.0	88.0	0.8

## 3 结论

本方法采用 TurboFlow 在线净化,高效液相色谱-三重四极杆质谱检测,实现了快速定性定量检测尿液中 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽。本方法检测灵敏度高、重现性好、不需要复杂前处理,总运行时间仅为 11 min,适用于毒蘑菇中毒事件快速筛查和临床中毒病因识别。

## 参考文献:

- [1] Leite M, Freitas A, Azul A M, et al. Anal Chim Acta, 2013, 799: 77
- [2] Chen Z H, Hu J S. Food Science, 2014, 35(8): 11  
陈作红, 胡劲松. 食品科学, 2014, 35(8): 11
- [3] Wei J H, Chen J, Wu B D, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2020, 48(3): 405  
魏佳会, 陈佳, 吴弼东, 等. 分析化学, 2020, 48(3): 405
- [4] Vetter J. Toxicon, 1998, 36(1): 13
- [5] Tomkova J, Ondra P, Valka I. Forensic Sci Int, 2015, 251: 209
- [6] Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M. Forensic Sci Int, 1998, 92(1): 59
- [7] Xu X M, Zhang J S, Cai Z X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(6): 613  
徐小民, 张京顺, 蔡增轩, 等. 色谱, 2017, 35(6): 613
- [8] Abuknesha R A, Maragkou A. Anal Bioanal Chem, 2004, 379: 853
- [9] Gong Q F, Wei B Y, Xiao G L, et al. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2005, 28(2): 67  
龚庆芳, 魏宝阳, 肖桂林, 等. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(2): 67
- [10] Robinson-Fuentes V A, Jaime-Sanchez J L, Garcia-Aguilar L. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(4/5): 913
- [11] Zhang X Y, Cai X X. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(1): 39  
张秀尧, 蔡欣欣等. 分析化学, 2010, 38(1): 39
- [12] Zhang S, Zhao Y F, Li H J, et al. Toxins, 2016, 8(5): 128
- [13] Helfer A G, Meyer M R, Michely J A, et al. J Chromatogr

- A, 2014, 1325: 92
- [14] Nomura M, Suzuki Y, Kaneko R, et al. *Forensic Toxicol*, 2012, 30(2): 185
- [15] Maurer H H, Schmitt C J, Weber A A, et al. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 2000, 748(1): 125
- [16] Couchman L. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(8): 892
- [17] Zhang L, Kong X H, Wang H, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(12): 1723  
张璐, 孔祥虹, 王茜, 等. *分析化学*, 2014, 42(12): 1723
- [18] Zhu W X, Yang J Z, Guo H L, et al. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34(7): 802  
祝伟霞, 杨冀州, 郭慧领, 等. *分析测试学报*, 2015, 34(7): 802
- [19] Perez F, Llorca M, Farre M, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(7): 2369
- [20] You F, Zhu L, He L, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(12): 1723  
游钊, 朱岚, 何玲, 等. *分析化学*, 2014, 42(12): 1723
- [21] Bury D, Belov V N, Qi Y L, et al. *Anal Chem*, 2018, 90(1): 944
- [22] Xu X M, Zhang J S, Cai Z X, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(11): 1281  
徐小民, 张京顺, 蔡增轩, 等. *色谱*, 2020, 38(11): 1281