

通微应用案例—HPLC-UV 助力毒蘑菇中鹅膏肽类毒素的检测

1、背景介绍

毒蘑菇又称毒蕈，是指人或畜禽食用大型真菌的子实体后能产生中毒反应的物种。我国毒蘑菇约有 430 余种，可致死的 40 余种，且分布广泛。据中国疾病预防控制中心的统计报告显示，毒蘑菇中毒事件占总中毒事件数的 18.59% (495/2663)；毒蘑菇等造成的死亡人数占总中毒死亡人数的 50.17% (602/1200)，毒蘑菇中毒已经成为中国地区食物中毒或死亡事件中最主要的因素之一。在中国，毒蘑菇中毒按致病类型可分为急性肝损害型 (Acute liver failure)、急性肾衰竭型 (Acute renal failure)、神经精神型 (Psychoneurological disorder)、胃肠炎型 (Gastroenteritis)、溶血型 (Hemolysis)、横纹肌溶解型 (Rhabdomyolysis) 和光敏性皮炎型 (Photosensitive dermatitis) 等 7 种主要类型。含有鹅膏肽类毒素的鹅膏属 (*Amanita*)、环柄菇属 (*Lepiota*) 和盔孢伞属 (*Galerina*) 中的一些种类是引起急性肝损害型的主要类群，约占蘑菇中毒致死率的 95% 以上。鹅膏肽类毒素主要是鹅膏毒肽 (Amatoxins) 是一种双环八肽，包括 α -鹅膏毒肽 (α -amanitin, α -AMA)、 β -鹅膏毒肽 (β -amanitin, β -AMA) 和 γ -鹅膏毒肽 (γ -amanitin, γ -AMA) 等；鬼笔毒肽 (Phallotoxins) 是一种双环七肽，有羧基三羟鬼笔毒肽 (Phallisin, PSC)、羧基二羟鬼笔毒肽 (Phalloidin, POD) 和二羟鬼笔毒肽 (Phalloidin, POD) 等；毒伞肽 (Virotoxins) 一种单环七肽。鹅膏毒肽对人类的致死量约为 0.1~1.5 mg/kg，甚至更低。鹅膏毒肽可直接作用于肝脏细胞核，使细胞迅速坏死，造成严重的肝脏损害，导致患者死亡。部分可造成肝脏损害的剧毒蘑菇 (图 1 和图 2)：



图 1

鹅膏属 (*Amanita*) 的致命鹅膏 (*Amanita exitialis* Zhu L. Yang & T.H. Li)



图 2

环柄菇属 (*Lepiota*) 的肉褐鳞环柄菇 (*Lepiota brunneoincarnata* Chodat & C. Martín)

本实验采用高效液相色谱-紫外法 (HPLC-UV) 检测了蘑菇中毒事件中中毒蘑菇中的鹅膏毒肽和鬼笔毒肽, 助力蘑菇中毒事件的处置。

2、样品制备

(1) **样本制备:** 新鲜蘑菇样本置于鼓风干燥箱中, 在 45 °C 下鼓风干燥 18 h 后, 密封于聚乙烯材质包装袋内, 避免交叉污染, 做好防腐措施, 常温下干燥密封保存, 用于物种鉴定和毒素检测等工作。

(2) **品种鉴定:** 毒蘑菇样本经 DNA 提取, ITS 的聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和测序, 通过 BLAST 比对鉴定, 确定蘑菇样本的品种和归属。

(3) **毒素检测:** 称取 0.3 g 毒蘑菇干粉于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 甲醇:超纯水 (7:3), 超声提取 30 min, 涡旋提取 10 min, -1 °C 下 9500 r/min 离心 5 min, 移取上清液于棕色进样小瓶中, 待 HPLC-UV 检测分析。

3、仪器条件

仪器:	通微 EasySep [®] 3030 二元梯度高效液相色谱仪
色谱柱:	Halo C ₁₈ 柱 (4.6×250 mm, 5 μm)
流动相:	A: 乙腈-20 mmol/L 醋酸铵水溶液 (10:90); B: 乙腈-20 mmol/L 醋酸铵水溶液 (24:76), 用甲酸调节 pH = 3.0; 梯度洗脱
流速:	1.0 mL/min
检测波长:	308 nm (鹅膏毒肽) 和 290 nm (鬼笔毒肽)
柱温:	40 °C
进样量:	20 μL

4、测试结果

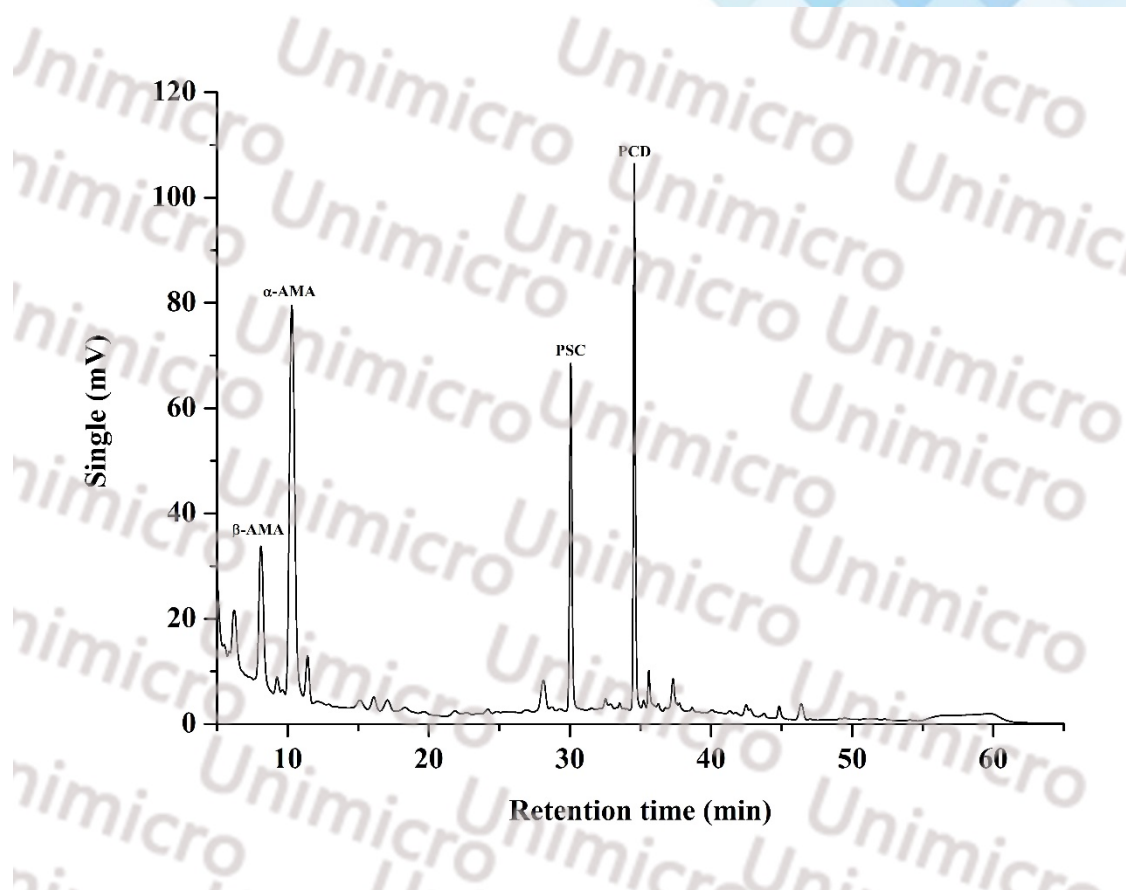


图 3 2019 年发生在云南省某地致命鹅膏 *A. exitialis* 中毒事件分析结果

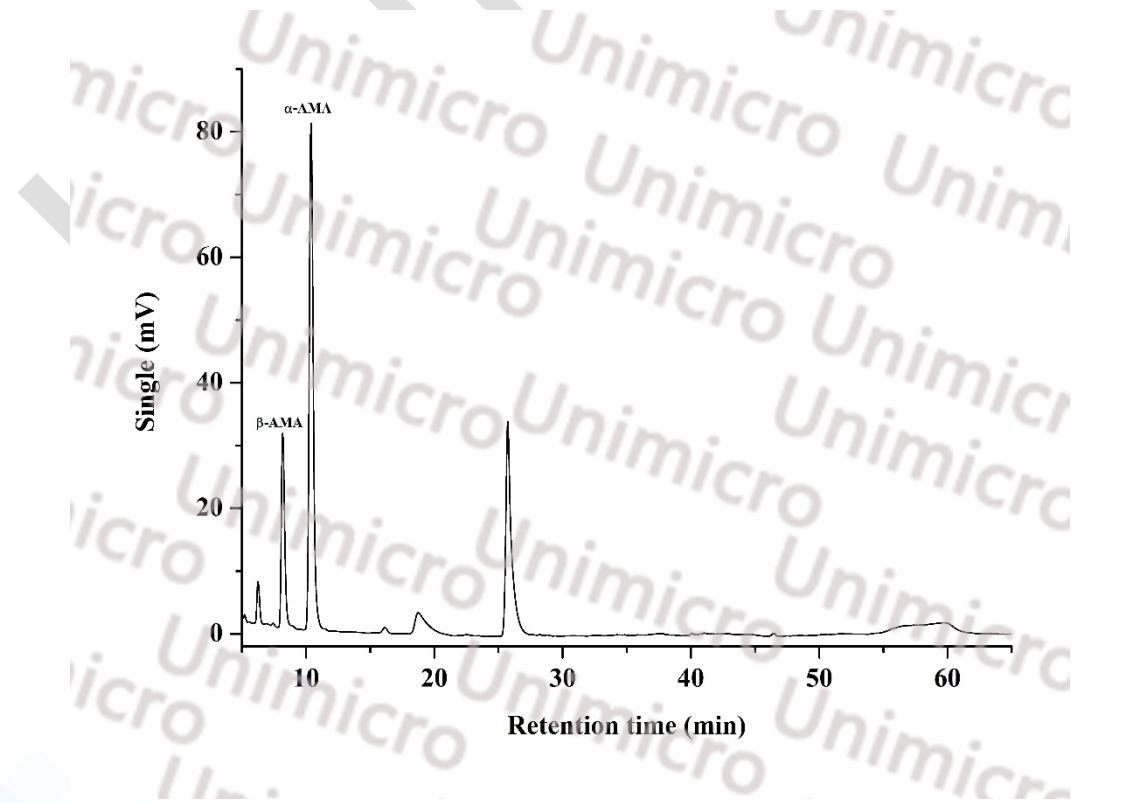


图 4 2020 年发生在宁夏省某地肉褐鳞环柄菇 *L. brunneoincarnata* 中毒事件分析结果

5、结论

采用通微 EasySep® 3030 液相色谱系统，配备 UV 检测器，可以实现毒蘑菇中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的检测分析，对于蘑菇中毒事件的处置和毒蘑菇成分研究具有一定的意义。

6、配置要求

推 荐 配 置	通微 EasySep® 3030 二元梯度高效液相色谱仪 (配自动进样器和柱温箱)
	通微 EasySep® 3030 UV 紫外检测器
	美国 Halo C18 柱 (4.6×250 mm, 5 μm)
	通微 Unimicro ChromStation 色谱工作站

注：EasySep® 3030 HPLC-UV 经宁夏省计量科学院检定，符合《JJG 705-2014 液相色谱仪》检定规程。

最后，上海通微提醒广大居民不要采食任何野生蘑菇！