

常见有毒蘑菇毒素检测方法研究进展

高洁^{1,2}, 王楠², 谢瑞彬², 陈爱亮^{2*}, 檀建新^{1*}

(¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001

²中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 北京 100089)

摘要 蘑菇是倍受人们喜爱且具有丰富营养的大型真菌。蘑菇种类繁多,部分蘑菇含有蘑菇毒素,人们误食后会发生食物中毒。据统计,全世界每年接近 100 人因误食野生毒菇而丧生,其中中国和欧洲的死亡人数至少占 50% 以上。蘑菇中毒已成为我国最严重的食品安全问题,占有食物中毒死亡人数的一半。研究蘑菇毒素的灵敏、快速检测技术,对引起食物中毒的毒源鉴定以及后续对患者的对症治疗具有重要意义。本文综述了常见有毒蘑菇的毒素种类、性质,介绍化学显色法、免疫法及质谱-色谱联用技术等蘑菇毒素检测方法,为研发针对有毒蘑菇的更简便、快捷的检测方法提供思路。

关键词 毒蘑菇; 检测; 毒素; 鉴定

文章编号 1009-7848(2022)09-0406-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.041

蘑菇,又名蕈,是一种几千年来倍受人们喜爱的大型真菌,是重要的食品和药品来源。蘑菇子实体中含有多种矿物质、植物蛋白以及维生素等,备受美食界推崇。在某些国家,蘑菇甚至被称为“meat for the poor”。此外,蘑菇在医药^[1-4]与化妆品^[5-7]领域也有广泛的应用价值。传统分类中,蘑菇分为可食用、经处理可食用、几乎不能食用和有毒蘑菇^[8]。目前中国记录在册的有毒蘑菇有 480 多种,其中 30 多种野生菌毒性极强,能够致死,且毒素无法被高温降解。此外,每年仍在不断发现新的蘑菇种^[9]。有毒蘑菇按毒理机制可以分为 7 类,包括急性肝功能衰竭、急性肾功能衰竭、横纹肌溶解症、肠胃炎、中枢神经系统疾病、溶血和光敏性皮炎^[10]。在上述临床综合征中,几乎所有导致急性肝衰竭、急性肾衰竭和横纹肌溶解症的有毒蘑菇都具有致死性。

许多蘑菇在形态学上非常相近,人们往往难以区分食用野生菌与含毒素的野生菌,导致误食毒蘑菇中毒事件时有发生,且经常引起大规模中毒。有资料显示,2010—2018 年,我国云南省共报告毒蘑菇中毒事件 2 222 起,病例 9 686 例,其中死亡 225 例^[11]。2012—2017 年,我国江西省共报告

毒蕈中毒 120 起病例,463 例中毒,其中死亡 19 例^[12]。2015—2018 年,我国四川省报道共计 8 566 起病例,其中死亡 7 例^[13]。其典型的特点是时间和空间的集中,以家庭为单位,高死亡率以及农民占病例的多数^[14]。在空间上,大多发生在中国南部地区。在时间上,一年四季均有发生,如:罗海波等^[15]整理了 2004—2013 年中国大陆的重大食物中毒事件,得出第 3 季度是食物中毒高发期,7 月死亡人数最多的结论。中国疾病预防控制中心的专业人员通过网络系统收集 2021 年中国的蘑菇中毒信息,进行流行病学调查。同样发现中毒事件集中在 6 月至 10 月,在 8 月达到高峰^[16]。2019 年 Li 等^[17]调查来自 17 个省的 276 起蘑菇中毒事件,涉及 769 名患者,其中死亡病例 22 名,总死亡率 2.86%。2019 年 6 月 28 日至 7 月 15 日,中国浙江省绍兴市连续发生 3 起中毒事件,共发现 10 例不同程度的肝损害患者,其中 1 例死亡^[18]。所有患者均来自相距数十里的 3 个家庭。德阳市发生过一起夫妻共同进食野生菌致幻现象^[19]。

误食毒蕈中毒发病率、致死率高,医疗花费大^[20]。防止毒蘑菇中毒是一个全球性问题^[21-23],建立蘑菇样本以及人血浆和尿液的蘑菇毒素检测方法,对于食物中毒源的鉴定和患者的对症治疗具有重要意义。本文综述常见有毒蘑菇毒素的分类以及部分毒素常用的检测方法,总结各种方法的优势与不足。

收稿日期: 2021-09-16

基金项目: 科技部重点研发计划项目(2019YFC1604700)

作者简介: 高洁(1998-),女,硕士生

通信作者: 檀建新 E-mail: jianxintan@sina.com

陈爱亮 E-mail: ailiang.chen@gmail.com

1 常见有毒蘑菇毒素

世界上比较常见的毒蘑菇种类有鹅膏菌属 (*Amanita*)、裸盖菇属 (*Psilocybe*)、鬼伞属 (*Coprinopsis*)、牛肝菌属 (*Boletus*)、类脐菇属 (*Omphalotus*)、鹿花菌属 (*Gyromitra*)、丝膜菌属 (*Cortinarius*)、杯伞属 (*Clitocybe*)、红菇属 (*Russula*) 等^[24]。一种毒蘑菇可能含有许多种毒素,目前人类已经发现的毒素就有 100 多种,表 1 总结了一些常见的毒素及其中毒类型。

2 蘑菇毒素的检测方法

目前常用的蘑菇毒素的分析方法包括化学显色法、薄层分析法、免疫分析法、酶联寡核苷酸检测法和色谱-质谱联用法,对于不同样品(干菇、鲜菇、熟菇、血液或尿液等),适用方法也有所不同。

2.1 化学显色法 (Chemical staining method)

化学显色法是一种以毒素与试剂特异性结合发生颜色反应为基础,判断样品中是否含有该毒素的检测方法,在毒素检测中应用较早。在 1909 年就有学者开始分离纯化鹅膏毒素,1941 年 Wieland 等^[37]提出了鉴定鹅膏毒素的浓盐酸显色法,pauly 试剂能在弱酸性环境下和鹅膏毒肽发生显色反应呈现红棕色,浓盐酸显色法利用这个特点鉴定鹅膏毒肽。

Wieland 等^[38]还报道了另一种灵敏迅速的检测鹅膏毒肽的方法,称为点迹法。取一滴蘑菇汁液滴在纸上,在晾干后的印记上滴加浓 HCl,如果样品中含有鹅膏毒肽,5~10 min 内就可以发生显色反应,印记变为浅蓝色。这种方法既可用于检测新鲜蘑菇子实体,也可用于检测干菇中的鹅膏毒肽。Block 等^[39]对点迹法进行了改良使检测的灵敏度达到了能检测 0.1 g 样品中的毒素。

Schumacher 等^[40]提出了在蘑菇样本中检测奥来毒素的方法,将样本浸泡在 5 倍体积的水里,充分研磨,放置 10 min 后过滤,在 HCl 环境下向滤液中加入等体积的 3% 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,若样本中含有奥来毒素则变为蓝黑色。这种方法不仅能用于蘑菇样品,还能用于呕吐物的检测。此外,还有用其它显色反应鉴别有毒蘑菇的报道,如加 KOH 变金黄色鉴别鳞柄白毒鹅膏菌,加硫酸后毒鹅膏菌变青紫色,豹斑毒鹅膏菌变橙黄色等^[41]。

化学显色法反应迅速,结果直观,适用于研究人员采摘样品时的快速检测。但是特异性不高、假阳性率高、灵敏度低,不能对毒素进行定量的检测,限制了这种方法的广泛应用。

2.2 薄层层析法 (Thin layer chromatography, TLC)

薄层层析法是能快速分离少量物质,且对其进行定性分析的一项重要试验技术,早期多用于分离、纯化毒蘑菇毒素。Wieland 等^[42]最早将化学显色法与纸层析法结合应用于毒蘑菇毒素检测。以正丁醇-丙酮-水 (30:3:5, 体积比) 作展开剂,如果待测样品中含有毒肽,肉桂醛溶液在浓盐酸环境下会与鬼笔毒肽反应显浅蓝色,与鹅膏毒肽反应则显深紫色。Sullivan 等^[43]首次将硅胶 G 作为吸附剂,以甲醇-甲基乙基酮 (1:1, 体积比) 作展开剂,1% 桂皮醛甲醇溶液作显色剂,用于鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的分离定性检测。

此外,还有以醋酸乙酯、异丙醇和 25% 氨水 (45:35:20, 体积比) 为展开剂,以 2,4-二硝基苯肼或对二甲氨基苯醛为显色剂检测毒蘑菇中的蟾蜍毒素;以丁醇、乙酸和水 (12:3:5, 体积比) 为分离相,分离光盖伞素与光盖伞辛的方法^[38]。

这种方法成本低、设备投资少、操作简单,能够快速分离并定性蘑菇毒素,一般实验室都可以完成。但存在前处理繁琐,所需时间过长,灵敏度低,提取液中杂质过多,干扰物质和色素的影响较大等问题。

2.3 免疫分析法 (Immunoassay method, IA)

免疫法是利用同位素及荧光物质等各种标记物标记抗原或抗体,进行抗原-抗体特异性结合的反应,通过对反应复合物中标记物的测定进行检测。1959 年,Behringer 等^[44]最先将免疫法应用到鹅膏毒肽的研究中。他们将蛋白质和鹅膏毒素 (Amatoxin, AMA) 中的 β -鹅膏毒肽 (β -amanitin) 联接,作为抗原注射到动物体内使其发生免疫反应从而制备抗体。但是因为联接产物的毒性过大造成了小鼠死亡,结果无法获得抗体。1975 年,Fiume 等^[45]用同样的方法,将鹅膏毒肽和牛血清白蛋白进行联结,作为抗原注射进大鼠体内,成功得到了 β -鹅膏毒肽的抗体,且对血清中毒素检测的灵敏度可达 500 pg/mL。同年 Faulstich 等^[46]将牛血清

表1 常见蘑菇毒素

Table 1 Common mushroom toxins

中文名	外文名	化学式	含该毒素的有毒蘑菇	中毒类型	临床表现	LD ₅₀ 值/ mg·kg ⁻¹
环形多肽类毒素	Amatoxins	C ₃₉ H _{5x} N _x O _x S ^[22]	鹅膏属,如:灰花纹鹅膏、淡红鹅膏、致命鹅膏	多脏器损害型	抑制RNA聚合酶,损害心、肝、肾、脑等脏器;导致胆汁淤积 ^[26-27]	0.3~0.6 或 >20 ^[25]
鬼笔毒肽	Phallotoxins	C _x H _x N _x O ₅				1.5~4.5 ^[29-30]
毒伞素	virotoxins	C _x H _x N ₈ O ₅ S				2.5 ^[26]
奥来毒素	Orellanine	C ₁₀ H ₁₀ O ₆ N ₂	丝膜菌属、尖顶丝膜菌、黄杯伞及史密斯鹅膏	急性肾衰竭型	口腔干燥、呕吐、顽固腹泻、寒战、发热、头痛、神智丧失等。	2.2~90 ^[30]
鹿花菌素(甲基胍化合物)	Gyromitrin	C ₄ H ₈ N ₂ O	鹿花菌属	急性溶血型、急性肾衰竭型	眩晕、抽搐、呕吐、腹痛等 ^[31]	1.24 ^[29]
胃肠刺激毒素	Gastrointestinal irritants ^[33]	-	大青褶伞、毒粉褶菌、毒红菇、虎斑菇、红网牛肝菌等	肠胃炎型	恶心、呕吐、腹泻等	-
卟啉毒素(光过敏性物质)	Porphyrin(s)	C ₂₀ H ₁₄ N ₄	胶陀螺(猪嘴蘑)	光过敏性皮炎型	面部肌肉抽搐,火烧样发热,手指和脚趾疼痛,皮肤出现颗粒状斑点,疼痛,皮肤发痒	-
2-氨基-4,5-己二烯酸	2-Amino-4,5-hexadienoic acid	C ₆ H ₉ NO ₂	角鳞白鹅膏、假褐云斑鹅膏、拟卵盖鹅膏菌	急性肾衰竭型	恶心、呕吐、出汗、发烧或肝大、少尿、脸部及下肢浮肿等	10 ^[34]
环丙-2-烯羧酸	Cycloprop-2-ene carboxylic acid	C ₄ H ₄ O ₂	红菇属,如亚稀褶红菇	横纹肌溶解型	呕吐、腹泻,随后出现酱油色尿、肌肉胀痛、肾功能衰竭等 ^[35]	2.5
鬼伞毒素(双硫仑样毒素)	Coprine	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	墨汁鬼伞	神经精神型	有致幻作用,进食同时饮酒,引起心律失常、呼吸急促、出汗、胸痛、恶心和呕吐等	-
毒蝇碱	Muscarine	C ₉ H ₂₀ NO ₂	杯伞属、丝盖伞属、粉褶蕈属、类脐菇属和小菇属,如:黄丝盖菌、污白丝盖菌、白霜杯菌	神经精神型	神经致幻作用、多流涎、流泪大汗、尿频、尿急、腹泻及呕吐,并且常伴有瞳孔缩小、支气管黏液分泌增多和支气管痉挛等	0.23~150 ^[34]
色胺类毒素	光盖伞素 Psilocybin	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ N ₂ P	裸盖伞属、斑褶伞属、锥盖伞属和裸伞属,如:光盖菌、花褶伞、柠檬黄伞	神经精神型	表现为狂笑不止、意识障碍、谵妄和幻觉、运动功能亢进等 ^[33]	-
光盖伞辛	Psilocin	C ₁₂ H ₁₆ ON ₂				
异噁唑衍生物	鹅膏蕈氨酸 Ibotenic acid	C ₅ H ₆ N ₂ O	毒蝇鹅膏菌、豹斑毒鹅膏菌	神经精神型	引起肌肉痉挛、眩晕、深睡、奇异的梦境,醒来后会兴奋多语等	45 ^[34]
蝇蕈醇	Muscimol	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂				

白蛋白与 β -鹅膏毒肽结合注射到兔体内获得了抗血清。1988年Faulstich等^[47]又一次改进了这种方法,将白蛋白替换为胎球蛋白作为 α -鹅膏毒肽的载体,降低了对动物的毒性并且提高了免疫性。

2.3.1 放射免疫检测技术(Radioimmunoassay,RIA) 放射免疫检测法(Radioimmunoassay,RIA)是用具有放射性的同位素物质标记抗原或者抗体,根据检测到的射线的量对样品中的待测物抗原或抗体进行定性或定量检测的方法。

1986年,Andres等^[48]将放射免疫检测技术用于有毒蘑菇的毒素检测,即用125I标记 α -鹅膏毒肽的衍生物aldamanitin,其衍生物是无毒的,能够作为抗原来检测患者体液中的鹅膏毒肽。其在人体尿液中的灵敏度检出限为1 mg/mL,在人类血液中的检出限0.1 mg/mL。

虽然放射免疫分析法灵敏度高,特异性强,但由于放射性元素在人体内的活性周期比较短,且涉及到了放射性物质,不利于操作者的身体健康,测定完成之后的放射性材料的处理方法也很复杂,因此这种方法没有被广泛推广。

2.3.2 酶联免疫吸附技术(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA) 酶联免疫吸附法(ELISA)是目前实验室比较常用的定性、定量的生物学检测方法。属于固相酶免疫分析法。这种方法以抗原和抗体间的特异性结合来实现对靶标物质的检测。在检测时,只有靶标物质可以和固相的载体结合,利用特定的酶标记物将反应扩大,可以依据显色的深浅程度来判断靶标含量的多少。这种方法灵敏度高而且具有较好的特异性,因此在生命、食品、医学等领域都被广泛应用^[49]。瑞士的Bühlmann Laboratories公司2000年率先研发出了能够检测鹅膏毒肽的ELISA试剂盒^[50],成为目前临床广泛使用的方法。为了更进一步提高对有毒蘑菇检测的特异性,Zhang等^[51]利用重组蛋白和噬菌体显示技术制备了鹅膏毒肽高特异性的scFv抗体,利用这种单链抗体建立了一种表面等离子体共振(SPR)传感器免疫检测方法,该方法检测鹅膏毒肽的灵敏度为77.48 ng/mL,检出限(LODs)的值为1.91 ng/mL。研究还发现,得到的抗体对与鹅膏类似物的交叉反应率较低。

2020年,Morita等^[52]日本学者针对光盖伞素

和光盖伞辛制备了两个单克隆抗体。对这些单抗的生化特性进行表征并将其应用于竞争性ELISA。用这种方法测定光盖伞素和光盖伞辛交叉反应率分别为2.8%(或<0.5%),该方法能用于干蘑菇样品,能用于鉴定含致幻毒素的蘑菇产品的开发。

免疫法操作十分简单,但1种抗体只与1种毒素特异性结合,然而在实际应用中1种有毒蘑菇往往含有很多种毒素,这种方法会漏检其它毒素,限制了它的应用。此外,ELISA检测还可能由于蘑菇毒素的其它代谢物,如葡萄糖醛酸苷类、硫酸盐或羟基化产物,它们存在于尿液中,并被抗体捕获可能出现假阳性结果。

2.3.3 侧流免疫层析技术(Lateral flow immunoassay,LFIA) LFIA又被称为流动免疫检测技术,侧流层析试纸检测是一种在特殊制备的试纸条上发生的抗原-抗体特异性识别的过程。试纸条上通常划有检测线(T线)和控制线(C线),待测物在层析条上通过毛细作用移动,靶标会在T线发生特异性反应,剩余标记物在C线处发生免疫反应。依靠胶体金、荧光染料等材料能够实现结果的可视化或荧光快速检测^[53]。基于LFIA试纸条检测方法主要有竞争免疫层析法和双抗夹心法。

由于传统检测鹅膏毒肽的方法步骤繁琐或设备昂贵,Bever等^[54]以ELISA为基础,将制备好的单克隆抗体mAbs应用到了LFIA上,研发出了竞争免疫层析法。结果表明这种检测方式的特异性和灵敏度都很好,并且从提取到检测全过程可以在10 min内完成,结果可以直接读取,并且估计的保质期至少为一年。其中对 α -鹅膏毒肽以及 γ -鹅膏毒肽的检出限均能达到10 ng/mL。用该方法对110种野生蘑菇种鉴定出6种含AMA物种,得到的检测结果与液相色谱的检测结果较为一致。这种方法实现了快速、简便、灵敏的检测野生蘑菇种鹅膏毒肽的目的,可用于大批量样品的检测。

ELISA需要借助专业的设备和试剂,且耗费的时间较长。LFIA通过将ELISA使用的所有免疫试剂转移到试纸条上来解决这些问题。于ELISA相比测流免疫层析法虽然具有价格低廉,检测迅速、使用方法简便、结果直观、可一次性使用、携带

方便、适用于现场检测等优点,但在实际应用中也存在缺陷。如 T、C 线划膜不能精确定量,反应在试纸上发生,反应不充分会导致灵敏度降低等。

2.4 酶联寡核苷酸检测法 (Enzyme Linked Oligonucleotide Assay, ELONA)

由于毒蕈毒素毒性过高,抗体的制备比较困难,近年来发展了基于核酸适配体的有毒蘑菇毒素检测的方法。核酸适配体(Aptamer)是通过富集配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)筛选获得的能够与靶标物质特异性结合的寡核苷酸单链^[55]。能够折叠成特定的三维结构与靶分子嵌合或包被形成高亲和、高特异性的稳定复合物,部分 RNA 核酸适体与靶标物质特异性结合后的解离常数甚至能达到 pmol/L 的级别^[56]。

因此, Muszynska 等^[57]以 SELEX 技术为基础,以 α -鹅膏毒肽为靶标物质,筛选了与其特异性结合的适配体,第 5 轮的得到的适配体亲和力最高。将筛选得到的适配体固定在链霉菌亲和素-琼脂糖树脂上检测适配体与 α -鹅膏毒肽特异性结合的能力,并对得到的特异性强的 AMA1 适配体进行长度优化。证明了 AMA1 可以从水溶液中捕获 α -鹅膏毒肽。汪颖等^[58]将环氧琼脂糖凝胶 6B(Epoxy-activated sepharose 6B)作为固定靶标的亲和介质,通过 12 轮筛选得到了两条对 α -鹅膏毒肽特异性和灵敏度最好的适配体。基于筛选出的 α -鹅膏毒肽的核酸适配体,建立了酶联寡核苷酸检测法(ELONA),解离常数在 (2.919 ± 1.199) nmol/L 证明该适配体与 α -鹅膏毒肽具有高度亲和性,且检测限达到了 40 $\mu\text{g/mL}$ 。

与抗体相比,核酸适配体对靶分子具有的亲和力和特异性与抗体相当甚至更高。且核酸适配体更容易获得,制备方法简单,能够快速在体外大量制备,稳定性好,更易储存等优点。被称作“人工抗体”^[59]。但由于筛选方式在筛选过程中由于筛选方式或人工的洗脱、分离有可能遗失了性能更优良的适配体,筛选得到的适配体性能还没有达到最理想的效果,因此 ELONA 法还需要更加深入的研究。

2.5 光谱分析法(Spectral analysis method)

光谱分析法是利用物质的光谱鉴别被测物质

的化学组成的快速定性定量方法,能用于毒蕈毒素检测的有紫外光谱法、荧光光谱法、傅里叶变换红外光谱法等。利用紫外吸收光谱法检测鹅膏肽类毒素时,可以利用鬼笔毒肽与鹅膏毒肽最大吸收峰的波长不同对鹅膏毒肽和鬼笔毒肽进行鉴定^[60]。在荧光光谱下,加入鹅膏毒肽能够使溴化乙锭最大吸收峰的波长从 610 nm 处转移至 560, 525 nm 波长处,新的峰能稳定保持 15~30 min,该方法对鹅膏毒肽的检测限可以达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 。时有明等^[60]利用傅里叶变换红外光谱检测技术,测试了 17 个样品的光谱,对有毒鹅膏进行了鉴定。

光谱分析法能够快速、简便、无损、无污染的测定有毒蘑菇中的多个组分,适用性强,具有更高的准确性^[61]。但这种技术用于定量误差较大,对样品的有效信息提取效率不高,且容易受各种因素干扰。

2.6 色谱-质谱联用法 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)

在人体体液中的鹅膏毒肽代谢快、浓度低,因此检测难度大,需要用到精密仪器进行检测。用于毒蘑菇检测的常用技术有液相色谱法(liquid chromatography, LC)、质谱法(mass spectrometry, MS)和毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)等分析方法。由于有毒蘑菇的种类繁多,毒素种类也多,含有的化学成分复杂,同时从样品中分离出多种毒素比较困难。并且单一的利用保留时间比对结果容易出现假阳性,单纯的液相色谱或质谱技术会极大的限制检测的灵敏度。因此为了提高检测的灵敏度、检测范围、准确度,研究人员往往采用多种技术联用的手段。液相色谱与质谱联用能结合二者的优点,首先利用色谱技术将样品分离纯化,再通过质谱系统的组分鉴定手段,会大大缩短检测的时间,提高检测的灵敏度。研究表明不同的质谱和色谱的检测手段对灵敏度有很大的影响,许多鹅膏毒肽的检测方法是以 LS-MS 为基础发展来的。MS 应用于毒蘑菇检测时,离子源大多数使用的是电喷雾法(ESI),质量分析器的种类比较多,如四极杆、飞行时间、离子阱等。Xu 等^[62]采用双分子联用和内标校正技术,建立了一种高效液相色谱-三重四极杆质谱(LC-MS/MS)分析血浆中的异噁唑衍生物的方法,优化了双分子

丹宁缩合反应条件,研究了衍生物在 MS/MS 中的裂解途径,给出了不同中毒程度下患者血浆中毒素水平。

2.6.1 高效液相色谱-三重四极杆质谱技术 (Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 高效液相色谱-三重四极杆质谱法不仅具有灵敏度高、定性定量准确快速、重现性好等优点,还缩短了反应时间。魏佳会等^[63]利用高效液相色谱-三重四极杆质谱法 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 在正离子多反应监测模式 (MRM) 下测定了人血浆和尿液中的 5 种鹅膏菌肽毒素,包括 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽,鬼笔环肽 (phalloidin), 丙氨酸羟毒伞肽和二羟毒散肽。样品通过固相萃取柱进行富集和纯化再通过色谱柱分离,再利用质谱检测。这种检测方式适用于任何样品,包括蘑菇、人体体液。结果显示 5 种毒素都具有良好的线性关系,对 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽的检测限为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,线性范围是 5~500 $\mu\text{g/mL}$,鬼笔环肽,丙氨酸羟毒伞肽和二羟毒散肽的检测限更低,为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。加标血浆和尿液样品的平均回收率分别为 98.0%~114.6% 和 90.1%~99.4%。10 min 左右即可得到结果且检测限能够满足生物样品分析学方法的要求。他们建立的方法具有样品需求量少,操作方便,出结果速度快,灵敏度高等优点。

虽然 HPLC-MS/MS 技术在一定程度上降低了对样品前处理的要求,但是对于检测复杂混合物中的毒素时,大量基质依然容易使色谱柱堵塞。固相萃取技术 (solid-phase extraction, SPE) 是一种常用的前处理方法,用于分析复杂混合物中的目标物质,具有消耗溶剂少、回收率高、操作简单等优点^[64-66]。因此 Tomkova 等^[67]发表了一种使用 SPE-LC-HR-TOF MS 同时测定尿中 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽和毒蝇碱的方法。Martin 等^[68]开发了一种通过 SPE-LC-MS/MS 对人体血清、血浆和尿液中的光盖伞辛、蟾蜍色胺、麦角酸酰二乙胺 (一种麻醉物质) 进行定量分析的方法。Xu 等^[69]2020 年在 HPLC-MS/MS 法的基础上另外结合了固相萃取法,建立了一种固相萃取-高效液相色谱与三重四极杆质谱法 (SPE-LC-MS/MS) 检测患者

血浆中的 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽,最终得到的检出限为 0.02 ng/mL ,比魏佳会等^[63]建立的检测方法检测限更低,灵敏度更高。

超高效液相色谱 (UPLC) 的固定相比普通液相色谱的颗粒更小、性能更高。并且增加了色谱峰容量、分析通量和分离度,更灵敏快速。肖绍震等^[70]利用 UPLC 成功研发了一种超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的检测方法,能同时检测出人类血浆或尿液样品中的 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽。试验得到的人类血浆和尿液中鹅膏肽类毒素的检出限分别为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 和 0.3 $\mu\text{g/L}$ 。研究发现只能在给药后 2 h 内对血浆检测只能测到两种 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽,尿液中可测出全部 4 种 (α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、羧基二羟鬼笔毒肽 PHD 和二羟鬼笔毒肽 PCD) 蘑菇毒素。这种方法将样品稀释后提取、利用固相萃取技术降低基质反应,避免了有机溶剂造成的回收率低。

另外 Zhang 等^[71]使用电喷雾法 (ESI) 建立了 UPLC-MS/MS 的方法用于同时检测血清和尿液中的鹅膏毒素和鬼笔毒素。研究人员用的所有样品都是中毒患者的血清和尿液。但是由于毒素在摄食后 30 h 内会从血液中迅速清除,能在尿液中保留 3 d,因此,只能在中毒患者进食 72 h 后的尿液样本中检出靶毒素,在血浆和血清中则均无法检出。这两种方法为临床中对患者血浆、血清及尿液的检测提供了可靠的技术支持。

2.6.2 液相色谱-高分辨率质谱技术 (Liquid chromatography-high-resolution-mass spectrometry, LC-HR-MS) 液相色谱-高分辨率质谱技术是由液相色谱和高分辨率质谱 (HR) 串联成的。高分辨率质谱能够借助同位素推断化合物的元素组成及分子质量。还具有可以应对色谱条件优化的困难,对样品前处理的要求更低,能区分混合背景物种的杂质等优点。这种方法不需要对待测物的分子质量进行预设,而是在检测结束后对结果进行分析,这样就无需用相关标准品对照,减少试验次数。Gicquel 等^[72]研发了一种液相色谱和超高分辨率和精确质谱仪器结合使用的技术。液相色谱-高分辨率质谱技术 (LC-HR-MS) 对有限容量尿液样本中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽和毒伞素进行分离,并对其进行定量分析,7 min 即可得到检测结

果。研究人员将氟胺安定作为内标,结果显示3种毒素的线性范围均为1~100 ng/mL。使用LC-HR-MS方法对43例疑似蘑菇中毒患者的尿液进行分析,并与ELISA竞争免疫分析的结果进行比较,其中ELISA产生了假阳性。LC-HR-MS具有特异性更好、更快和灵敏更高的优势,优于ELISA,适合用于应急毒理学分析。

Bambauer等^[73]采用亲水作用液相色谱-高分辨质谱联用技术(HILIC-HRMS/MS)对人尿液样本中的 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽、光盖伞辛、蟾蜍色胺、蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸和蓖麻碱进行定性分析。所建立的方法对各种毒素的检测限为1~2 000 ng/mL,使用了8个疑似食用有毒蘑菇中毒患者的尿样进行检测,在病人尿样中均发现了相应的毒素。

2.6.3 毛细管电泳-电喷雾电离质谱联用技术(Capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry-mass spectrometry, CE-ESI-MS) 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是一种分离技术,分离通道是毛细管,驱动力是高压电场。由于其只需要很小的样品体积,分离效率高,被广泛使用。Rittgen等^[74]在2008年首次将毛细管电泳和电喷雾电离质谱联用的方法用于有毒鹅膏肽的分离检测。开发了基于CE-ESI-MS技术检测 α -AMA、 β -AMA和 γ -AMA、鬼笔环肽、羧基二羟鬼笔毒肽的方法。首先利用毛细管电泳技术对样品中的毒素进行分离。并对白毒伞和毁灭天使蘑菇进行了检测,白毒伞分离出6种毒素,毁灭天使菌中分离出4种毒素。通过对检测方法的不断优化,选择了更具有选择性的负离子模式,在毛细管内径75 μ m,长84 cm时,可以在8 min内实现样品中靶标物质的分离,检测限(LOD)能够达到13 ng/mL。这种方法的灵敏度高,相对标准偏差在0.2%~0.3%之间,可用于新鲜或风干的蘑菇样品的检测,且1次能同时检测出多种毒素。这种方法的优势是具有高度选择性,所需样品量少以及能够对样品进行高通量检测,但需要精密仪器,无法被广泛推广。

Poliwoda等^[75]利用了单滴微萃取技术与毛细管电泳联用(SDME-CE),建立了针对两种致幻毒素(光盖伞辛和蝇蕈醇)的检测方法。可以直接对

患者尿样进行检测,最终光盖伞辛的检出限为0.004 ng/mL,蝇蕈醇的检出限为0.016 ng/mL,这种方法提供了一个有效的样品萃取的步骤,省略了实际检测中耗时耗力的样品制备的程序。

3 总结与展望

普通消费者平时容易误食的毒蕈种类很多,含有的毒素也很复杂。同种毒素可能出现在不同种,甚至不同属的蘑菇中,1种毒蘑菇体内可能含多种毒素^[75]。仅环形多肽1类,目前分离纯化出来的就有22种毒素。但目前仅针对常见的几种蘑菇毒素建立了检测方法,随着分离纯化的蘑菇毒素种类的增加,许多蘑菇毒素缺乏检测方法。可以利用LC-MS/MS或高分辨质谱技术继续开发能够同时检测多种毒素的高通量筛查方法来满足蘑菇毒素检测的需要。

有毒蘑菇中毒素含量低、毒性较强,且降解速度极快。相对于蘑菇样品,在临床检测中更多的是对人体体液(尿液、血液)的检测,但蘑菇毒素在人体体液内代谢较快。有研究利用动物实验表明,在动物血浆内AMA含量很低,且在24 h内会被迅速代谢至无法检出^[76]。这为检测增加了难度,同时也表明现有的检测方法灵敏度不足。

蘑菇中毒具有发作紧急的特点,亟需现场快速检测方法,而现有的很多检测技术都具有需要复杂仪器,检测时间过长等不足,无法满足现场应用,开发基于胶体金试纸条的快速检测方法具有很好的应用前景,但灵敏度尚需提高。可以利用荧光量子点或纳米材料等代替胶体金做标记,能够进一步提高检测的灵敏度及特异性。

防止毒蘑菇中毒,对有毒蘑菇进行物种鉴别是一个全球性的问题,关系着全世界的食品安全。本文综述了现有的毒蘑菇的毒素检测技术(表2)。现有针对有毒蘑菇毒素的检测技术都存在一定的不足。为了让普通消费者能够快速获得毒蘑菇的物种信息,可以利用不断发展的人工智能技术,开发有毒蘑菇智能图像识别APP。民众能够直接利用手机拍照对有毒蘑菇进行智能识别,可以有效减少中毒事件的发生。

除了利用蘑菇毒素对有毒蘑菇进行鉴定外,还可以利用分子生物学的手段开发基于DNA的

表 2 现有毒素检测技术

Table 2 The current techniques for toxin detection

方法	技术	所检毒素	检测限	参考文献
化学显色法	浓盐酸显色技术	鹅膏毒肽	-	[37]
	点迹法	鹅膏毒肽	-	[38]
			0.1 mg	[39]
薄层层析法	FeCl ₃ ·6H ₂ O 显色	奥来毒素	-	[40]
	肉桂醛显色技术	光盖伞素、光盖伞辛 鹅膏毒肽、鬼笔毒肽	-	[41] [42],[43]
免疫分析法	免疫检测技术	β-鹅膏毒肽	0.5 ng/mL	[45]
	放射免疫检测技术	α-鹅膏毒肽	尿液中 1 mg/mL 血 液中 0.1 mg/mL	[48]
	酶联免疫吸附技术	鹅膏毒肽	1.91 ng/mL	[53]
	侧流免疫层析技术	α-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒肽	10 ng/mL	[54]
酶联寡核苷酸 检测法	富集配体系统进化技术	α-鹅膏毒肽	40 μg/mL	[57]
光谱分析法	紫外光谱技术	鬼笔毒肽、鹅膏毒肽	-	[59]
	荧光光谱技术	鹅膏毒肽	1 μmol/L	[59]
	傅里叶变换红外光谱技术	-	-	[60]
色谱-质谱联用 技术	高效液相色谱-三重四极杆质 谱技术	异噁唑衍生物 α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽、毒伞素, 丙 氨酸羟毒伞肽和二羟毒散肽	0.1~0.3 ng/mL 0.2~0.5 μg/mL	[62] [63]
	固相萃取-高效液相色谱与三 重四极杆质谱技术	α-鹅膏毒肽、β-鹅膏毒肽和毒蝇碱	1~10 ng/mL	[67]
		光盖伞辛、蟾蜍色胺等 α-鹅膏毒肽和 β-鹅膏毒肽	- 0.02 ng/mL	[68] [69]
	超高液相色谱串联质谱	α-鹅膏毒肽和 β-鹅膏毒肽、羧基二羟 鬼笔毒肽、二羟鬼笔毒肽 鹅膏毒肽、鬼笔毒肽	1.0~0.3 μg/L -	[70] [71]
液相色谱-高分辨率质谱技术		α-鹅膏毒肽和 β-鹅膏毒肽和毒伞素	1~100 ng/mL	[72]
		α-鹅膏毒肽和 β-鹅膏毒肽、光盖伞 辛、蟾蜍色胺、蝇蕈醇、鹅膏蕈氨酸和 蓖麻碱	1~2 000 ng/mL	[73]
毛细管电泳-电喷雾电离质谱 联用技术		α-鹅膏毒肽和 β-鹅膏毒肽、γ-鹅膏毒 肽、鬼笔毒环肽、羧基二羟鬼笔毒肽	13~79 ng/mL	[74]
单滴微萃取技术-毛细管电泳		光盖伞辛和蝇蕈醇	0.004~0.016 ng/mL	[75]

有毒蘑菇鉴定技术。包括现场快速的等温扩增方法,实验室用的 PCR 技术和高通量测序筛查方法等。这些方法的不断发展为研发有毒蘑菇更快速、更简便的临床检测方法提供了技术支持。

参 考 文 献

- [1] FINESCHI V, Di PAOLO M, CENTINI F. Histological criteria for diagnosis of amanita phalloides poisoning[J]. Journal of Forensic Sciences, 1996, 41 (3): 429-432.

- [2] HSIEH H, JU Y. Medicinal components in *Termitomyces* mushrooms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(12): 4987–4994.
- [3] VANDERMOLEN K M, LITTLE J G, SICA V P, et al. Safety assessment of mushrooms in dietary supplements by combining analytical data with *in silico* toxicology evaluation[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 103(5): 133–147.
- [4] NEBUS J, COSTES F, WALLO W. Clinical improvements in skin renewal, firmness, and texture using topical treatments containing mushroom extracts[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2007, 56(2): AB91.
- [5] WU Y, CHOI M, LI J, et al. Mushroom Cosmetics: The present and future[J]. *Cosmetics*, 2016, 3(3): 22.
- [6] TAOFIQ O, RODRIGUES F, BARROS L, et al. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 127(5): 228–236.
- [7] BANDARA A, RAPIOR S, BHAT D J, et al. *Polyporus umbellatus*, a medicinal mushroom with multiple developed health-care products as food, medicine and cosmetics[J]. *Cryptogamie Mycologie*, 2015, 36(1): 3–42.
- [8] GOVORUSHKO S, REZAEI R, DUMANOV J, et al. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 128(6): 267–279.
- [9] WU F, ZHOU L, YANG Z, et al. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species[J]. *Fungal Diversity*, 2019, 98(1): 1–76.
- [10] WHITE J, WEINSTEIN S A, DE HARO L, et al. Mushroom poisoning: A proposed new clinical classification[J]. *Toxicon*, 2019, 157(1): 53–65.
- [11] 赵江, 汤钦岚, 闵向东, 等. 2010–2018年云南省毒蕈中毒事件分析[J]. *首都公共卫生*, 2019, 13(6): 280–282.
- ZHAO J, TANG Q L, MIN X D, et al. Analysis on poisonous mushroom poisoning from 2010 to 2018 in Yunnan province[J]. *Capital Journal of Public Health*, 2019, 13(6): 280–282.
- [12] 游兴勇, 周厚德, 刘洋, 等. 2012–2017年江西省毒蘑菇中毒事件流行病学分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(6): 588–591.
- YOU X Y, ZHOU H D, LIU Y, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of mushroom poisoning events in Jiangxi Province from 2012 to 2017[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(6): 588–591.
- [13] 宋阳, 李雪梅, 陈文, 等. 2015–2018年四川省毒蕈中毒病例流行病学分析[J]. *现代预防医学*, 2019, 46(24): 4440–4443.
- SONG Y, LI X M, CHEN W, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of mushroom poisoning events in Jiangxi Province from 2012 to 2017[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(24): 4440–4443.
- [14] 徐华, 张志祥, 曾龙剑, 等. 2010–2019年云南省文山州食物中毒死亡事件流行病学病因分析[J]. *上海预防医学*, 2020, 32(12): 1040–1043, 1048.
- XU H, ZHANG Z X, ZENG L J, et al. Epidemiological analysis of food poisoning deaths in Wenshan Prefecture, Yunnan Province, 2010–2019[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2020, 32(12): 1040–1043, 1048.
- [15] 罗海波, 何来英, 叶伟杰, 等. 2004–2013年中国大陆食物中毒情况分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(1): 45–49.
- LUO H B, HE L Y, YE W J, et al. Analysis of the food poisoning in China from 2004 to 2013[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2015, 27(1): 45–49.
- [16] LI H, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Mushroom poisoning outbreaks — China, 2021[J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(3): 35–40.
- [17] LI H, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Mushroom poisoning outbreaks — China, 2019[J]. *China CDC Weekly*, 2020, 2(2): 19–24.
- [18] XU X, SUN L, ZHANG Y, et al. Poisonings caused by wild mushroom containing amanitin toxins — Shaoxing City, Zhejiang Province, China, 2019[J]. *China CDC Weekly*, 2020, 2(29): 541–544.
- [19] 吕桃. 以精神行为异常为首发症状的蘑菇中毒2例[J]. *临床精神医学杂志*, 2020, 30(5): 367.
- LV T. 2 Cases of mushroom poisoning with mental behavior disorder as initial symptom[J]. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2020, 30(5): 367.
- [20] GOVORUSHKO S, REZAEI R, DUMANOV J, et

- al. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 128(6): 267-279.
- [21] KELLER S A, KLUKOWSKA -RÖTZLER J, SCHENK-JAEGER K M, et al. Mushroom Poisoning—A 17 year retrospective study at a level I university emergency department in Switzerland[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(12): 2855.
- [22] SOLTANINEJAD K. Outbreak of mushroom poisoning in Iran: April–May, 2018[J]. *Int J Occup Environ Med*, 2018, 9(3): 152-156.
- [23] KIM S Y, BAEK Y H, HAN S Y, et al. Mushroom poisoning by *Macrolepiota neomastoidea*[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2018, 71(2): 94-97.
- [24] BRANDENBURG W E, WARD K J. Mushroom poisoning epidemiology in the United States[J]. *Mycologia*, 2018, 110(4): 637-641.
- [25] 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): 622-629.
- CHEN X G, CHANG J, ZOU B, et al. Evolution in researches of toadstool poisoning and identification[J]. *Forensic Science and Technology*, 2020, 45(6): 622-629.
- [26] KARLE I L, KARLE J, WIELAND T, et al. Conformations of the Li-Antamanide Complex and Na-[Phe4, Val6]Antamanide Complex in the Crystalline State[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, 70(6): 1836-1840.
- [27] JO W, HOSSAIN M A, PARK S. Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms[J]. *Mycobiology*, 2018, 42(3): 215-220.
- [28] 张蕊, 杨树德, 程显好, 等. 鹅膏毒肽与RNA聚合酶II相互作用的分子机制研究[J]. *菌物学报*, 2012, 31(5): 727-735.
- ZHANG R, YANG S D, CHENG X H, et al. Molecular mechanism of the interaction between amanitin and RNA polymerase II[J]. *Mycosystema*, 2012, 31(5): 727-735.
- [29] 王晶, 史振霞, 乔洁, 等. 毒鹅膏菌和鹅膏肽类毒素研究进展[J]. *廊坊师范学院学报(自然科学版)*, 2018, 18(1): 46-53.
- WANG J, SHI Z X, QIAO J, et al. Research progress on lethal amanita species and amanita peptide toxins[J]. *Journal of Langfang Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, 18(1): 46-53.
- [30] JORGE, DINIS-OLIVEIRA, RICARDO, et al. Human and experimental toxicology of orellanine[J]. *Human and Experimental Toxicology*, 2016, 35(9): 1016-1029.
- [31] 徐晓华, 姜琦, 辛然. 溶血型鹿花菌类毒蕈中毒1例[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(7): 1240-1241.
- XU X H, JIANG Q, XIN R. One case of hemolytic type deer flower fungus mushroom poisoning[J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2017, 21(7): 1240-1241.
- [32] 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.
- DU X J, DU X Y. Mushroom toxins and present research of its utilization[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(13): 7172-7174.
- [33] ERGUVEN M, YILMAZ O, DEVECI M, et al. Mushroom poisoning[J]. *The Indian Journal of Pediatrics*, 2007, 74(9): 847-852.
- [34] GONMORI K, FUJITA H, YOKOYAMA K, et al. Mushroom toxins: A forensic toxicological review[J]. *Forensic Toxicology*, 2011, 29(2): 85-94.
- [35] 赵群远, 段宇珠, 陈安宝, 等. 亚稀褶黑菇中毒的临床表现研究[J]. *临床急诊杂志*, 2017, 18(10): 792-794.
- ZHAO Q Y, DUAN Y Z, CHEN A B, et al. Clinical manifestation of *Russula subnigricans* poisoning[J]. *Journal of Clinical Emergency*, 2017, 18(10): 792-794.
- [36] HALBERSTEIN R A. Biomedical ambiguity: Race, asthma, and the contested meaning of genetic research in the Caribbean by Ian Whitmarsh[J]. *Medical Anthropology Quarterly*, 2010, 24(4): 569-570.
- [37] WIELAND H, HALLERMAYER R. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblätterpilzes[J]. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, 1941, 548(1): 1-18.
- [38] WIELAND T. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VII. β -Amanitin, eine dritte Komponente des Knollenblätterpilzgiftes. Unter Mitarbeit von Liselotte Wirth und Edgar Fischer[J]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1949, 564(2): 152-160.
- [39] BLOCK S S, STEPHENS R L, BARRETO A, et al. Chemical identification of the amanita toxin in mushrooms[J]. *Science*, 1955, 121(3145): 505-506.

- [40] SCHUMACHER T, HØILAND K. Mushroom poisoning caused by species of the genus *Cortinarius* Fries [J]. *Archives of Toxicology*, 1983, 53(2): 87.
- [41] 张黎光, 李峻志, 祁鹏, 等. 毒蕈鉴别及毒素检测研究进展[J]. *中国食用菌*, 2014, 33(2): 1-3.
ZHANG L G, LI J Z, QI P, et al. Research advances on identification of poisonous mushrooms and detection of toxins[J]. *Edible Fungi of China*, 2014, 33(2): 1-3.
- [42] WIELAND T, SCHMIDT G. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VIII[J]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1952, 577(3): 215-233.
- [43] SULLIVAN G, BRADY L R, TYLER V E. Identification of α - and β -Amanitin by thin-layer chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1965, 54(6): 921-922.
- [44] BOEHRINGER W. Einige Umsetzungen des β -Amanitin[M]. *Diss Univ Frankfurt a M*, 1959.
- [45] FIUME L, BUSI C, CAMPADELLI-FIUME G, et al. Production of antibodies to amanitins as the basis for their radioimmunoassay[J]. *Experientia*, 1975, 31(10): 1233-1234.
- [46] FAULSTICH H, TRISCHMANN H, ZOBELLEY S. A radioimmunoassay for amanitin[J]. *FEBS Letters*, 1975, 56(2): 312-315.
- [47] FAULSTICH H, KIRCHNER K, DERENZINI M. Strongly enhanced toxicity of the mushroom toxin α -amanitin by an amatoxin-specific Fab or monoclonal antibody[J]. *Toxicon*, 1988, 26(5): 491-499.
- [48] ANDRES R Y, FREI W, GAUTSCHI K, et al. Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid, ¹²⁵I-tracer-based system [J]. *Clinical Chemistry*, 1986, 32(9): 1751-1755.
- [49] 张健. 酶联免疫吸附法在食品检验中的应用进展[J]. *食品安全导刊*, 2020(9): 159.
ZHANG J. Application progress of enzyme linked immunosorbent assay in food inspection, ¹²⁵I-tracer-based system [J]. *China Food Safety Magazine*, 2020(9): 159.
- [50] 王丽羽, 井申荣. 鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的提取鉴定研究进展[J]. *预防医学*, 2017, 29(5): 468-471.
WANG L Y, JING S R. Research progress on extraction and identification of amatoxin and phalloidin [J]. *Preventive Medicine*, 2017, 29(5): 468-471.
- [51] ZHANG X, HE K, ZHAO R, et al. Development of a single chain variable fragment antibody and application as amatoxin recognition molecule in surface plasmon resonance sensors[J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(12): 3278-3286.
- [52] MORITA I, OYAMA H, KIGUCHI Y, et al. Immunochemical monitoring of psilocybin and psilocin to identify hallucinogenic mushrooms [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 190(20): 113485.
- [53] 李巧凤, 任舒悦, 吕全军, 等. 侧流层析试纸在生物及食品安全检测中的研究进展[J]. *国际生物工程杂志*, 2017, 40(5): 315-322.
LI Q F, REN S Y, LV Q J, et al. Research progress on lateral flow chromatography strips in biological and food safety detection [J]. *International Journal of Biomedical Engineering*, 2017, 40(5): 315-322.
- [54] BEVER C S, ADAMS C A, HNASKO R M, et al. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms[J]. *Plos One*, 2020, 15(4): e0231781.
- [55] 王琦, 颜春蕾, 高洪伟, 等. 基于核酸适配体传感器检测食品致病菌的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(11): 245-258.
WANG Q, YAN C L, GAO H W, et al. Research progress of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(11): 245-258.
- [56] RUCKMAN J, GREEN L S, BEESON J, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(32): 20556-20567.
- [57] MUSZYŃSKA K, OSTROWSKA D, BARTNICKI F, et al. Selection and analysis of a DNA aptamer binding α -amanitin from *Amanita phalloides*[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2017, 64(3): 401-406.
- [58] 汪颖, 乔璞, 宋玉竹, 等. α -鹅膏[蕈]毒环肽核酸适配体的筛选和结构分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(12): 1341-1346.
WANG Y, QIAO P, SONG Y Z, et al. Screening and structure analysis of the aptamers against α -amanitin[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 32(12): 1341-1346.
- [59] 冯苏敏, 孙淑敏, 谢岩黎. 核酸适体技术在食品危害因子检测中的研究进展[J]. *食品科技*, 2017, 42(5): 296-300.

- FENG S M, SUN S M, XIE Y L, et al. Application of aptamer in detecting the risk factors in food [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(5): 296–300.
- [60] 时有明, 刘刚. 傅里叶变换红外光谱结合系统聚类分析——对鹅膏菌的快速分类研究[C]// 2007年中国青年光学学术研讨会论文摘要集, 2007: 117.
- SHI Y M, LIU G. Fast classification of amanita by fourier transform infrared spectroscopy combined with hierarchical cluster analysis [C]// Abstract papers of 2007 Chinese youth optical academic seminar, 2007: 117.
- [61] 王圆圆, 李杰庆, 李涛, 等. 光谱分析技术在野生食用牛肝菌研究中的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 300–306.
- WANG Y Y, LI J Q, LI T, et al. A Review on the application of spectral analysis techniques in research on wild-grown bolete mushrooms [J]. *Food Science*, 2019, 40(15): 300–306.
- [62] XU X, ZHANG J, HUANG B, et al. Determination of ibotenic acid and muscimol in plasma by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with bimolecular dansylation [J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1146: 122128.
- [63] 魏佳会, 陈佳, 吴弼东, 等. 高效液相色谱/三重四极杆质谱联用法测定血浆和尿液中鹅膏肽类毒素[J]. *分析化学*, 2020, 48(3): 405–412.
- WEI J H, CHEN J, WU B D, et al. Determination of amanita peptide toxins in plasma and urine by high performance liquid chromatography / triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(3): 405–412.
- [64] 吴冬雪, 刘淑莹, 陈思键, 等. 固相萃取结合高效液相色谱-三重四极杆质谱快速分离检测益气养血口服液中人参皂苷的新方法[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(7): 867–873.
- WU D X, LIU S Y, CHEN S J, et al. Rapid separation and detection of ginsenosides in Yiqiyangxue oral liquid using high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry combined with solid-phase extraction [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2020, 39(7): 867–873.
- [65] CAI Y, JIANG G, LIU J, et al. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(10): 2517–2521.
- [66] PYRZYŃSKA K, TROJANOWICZ M. Functionalized cellulose sorbents for preconcentration of trace metals in environmental analysis [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1999, 29(4): 313–321.
- [67] TOMKOVA J, ONDRA P, VALKA I. Simultaneous determination of mushroom toxins alpha-amanitin, beta-amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry [J]. *Forensic Sci Int*, 2015, 251(6): 209–213.
- [68] MARTIN R, SCHÜRENKAMP J, GASSE A, et al. Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS [J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2013, 127(3): 593–601.
- [69] XU X, MENG Z, ZHANG J, et al. Analytical method development for α -amanitin and β -amanitin in plasma at ultra-trace level by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and its application in poisoning events [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 190(20): 113523.
- [70] 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): 312–318.
- XIAO S Z, LIN F, FU W S, et al. Determination of amatoxins and phallotoxins in plasma and urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2018, 39(22): 312–318.
- [71] ZHANG S, ZHAO Y, LI H, et al. A simple and high-throughput analysis of amatoxins and phallotoxins in human plasma, serum and urine using U-PLC-MS/MS combined with PRiME HLB μ Elution platform [J]. *Toxins*, 2016, 8(5): 128.
- [72] GICQUEL T, LEPAGE S, FRADIN M, et al. Amatoxins (α - and β -amanitin) and phallotoxin (phalloidin) analyses in urines using high-resolution accurate mass LC-MS technology [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2014, 38(6): 335–340.
- [73] BAMBAUER T P, WAGMANN L, MAURER H H, et al. Development and application of a strategy for analyzing eight biomarkers in human urine to verify toxic mushroom or ricinus communis ingestions by

- means of hydrophilic interaction LC coupled to HRMS/MS[J]. *Talanta*, 2020, 213(6): 120847.
- [74] RITTGEN J, PÜTZ M, PYELL U. Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry with positive and negative ion detection [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(10): 2094–2100.
- [75] POLIWODA A, ZIELIŃSKA K, WIECZOREK P P. Direct analysis of psilocin and muscimol in urine samples using single drop microextraction technique in–line with capillary electrophoresis [J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1566.
- [76] 卢中秋, 洪广亮, 孙承业, 等. 中国蘑菇中毒诊治临床专家共识 [J]. *中国急救医学*, 2019, 39(8): 717–725.
- LU Z Q, HONG G L, SUN C Y, et al. Chinese clinical guideline for the diagnosis and treatment of mushroom poisoning [J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2019, 39(8): 717–725.

Research Advances on Detection Method of Common Mushroom Toxins

Gao Jie^{1,2}, Wang Nan², Xie Ruibin², Chen Ailiang^{2*}, Tan Jianxin^{1*}

¹*College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei*

²*Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS, Beijing 100089*

Abstract Mushroom is part of the most popular large fungi with rich nutritional value. However, there are many kinds of mushrooms, some of which contain mushroom toxin, which can lead to food poisoning incidents after people eat them by mistake. Depending on statistics, nearly 100 people die each year from ingesting wild poisonous mushrooms worldwide, among which China and Europe account for at least 50% of the deaths. Mushroom poisoning has become one of the most serious food safety problems in China, accounting for half of all food poisoning death. It is very important to study the sensitive and rapid detection technology of mushroom toxin for the identification of the source of food poisoning and the subsequent symptomatic treatment of the patients. In this paper, the types and properties of common toxic mushroom toxins were reviewed, and the detection methods of mushroom toxins such as chemical colorimetry, immunoassay and mass spectroscopy–chromatography were introduced, providing ideas for the development of a more convenient and rapid detection method for toxic mushroom.

Keywords poisonous mushroom; detection; toxins; identification