

我国鹅膏菌新发现种——致命鹅膏(*Amanita exitialis*) 的肽类毒素分析

胡劲松 陈作红* 张志光 张 平

(湖南师范大学生命科学学院真菌研究室 长沙 410081)

摘 要 采用高效液相色谱(HPLC)技术对在广州发现的鹅膏菌新种——致命鹅膏(*Amanita exitialis*)不同组织部位的肽类毒素(鹅膏毒肽和鬼笔毒肽)的含量进行了分析,结果表明,致命鹅膏是一种剧毒蘑菇,其毒素含量相当高,子实体中组织部位不同,毒素含量以及鹅膏毒肽和鬼笔毒肽在其中的分布也不一样,菌盖中的毒素含量最高,达 8152.6 $\mu\text{g/g}$ 干重,菌柄的毒素含量次之,为 3742.3 $\mu\text{g/g}$ 干重,菌托中的毒素含量最低,只有 1142.5 $\mu\text{g/g}$ 干重,在菌盖、菌柄和菌托中都以鹅膏毒肽为主,尤其以 α -amanitin 的相对含量最高,但从菌盖至菌柄到菌托,鬼笔毒肽尤其是 Phalloidin 的相对含量依次增加。

关键词 致命鹅膏, 鹅膏毒肽, 鬼笔毒肽, 高效液相色谱

中图分类号 :Q936 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2003)05-0642-05

2000 年 3 月 17 日,广州市白云区发生一起 9 名民工误食毒菌,8 人中毒死亡的事故^[1],2000~2001 年我们在事故现场采到了大量经确认是他们误食的鹅膏菌,经鉴定,该鹅膏菌是一新种,称为致命鹅膏(*Amanita exitialis* Z. L. Yang & T. H. Li, sp. nov.)^[2]。鹅膏菌中的致死毒素主要是由鹅膏毒肽(Amatoxins)和鬼笔毒肽(Phallotoxins)两类环肽化合物所引起^[3]。本文利用高效液相色谱技术检测分析了致命鹅膏中的肽类毒素及其含量以及子实体不同部位中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料

致命鹅膏(*Amanita exitialis* Z. L. Yang & T. H. Li, sp. nov.)由本实验室于 2000~2001 年 3 月在广州事故现场采集,采集后烘干保存。

1.2 毒素标样和试剂

α -鹅膏毒肽(α -amanitin), β -鹅膏毒肽(β -amanitin), 二羟鬼笔毒肽(Phalloidin, PHD)购自美国 Sigma 公司,羧基二羟鬼笔毒肽(Phalloidin, PCD), 三羟鬼笔毒肽(Phallisin, PHS)和一羟鬼笔毒肽(Phalloin, PHN)由德国 Max-Planck Institut für Medizinische Forschung 的 H. Faulstich 教授惠赠,毒素使用前用超纯水配成 1mg/mL; 甲醇、冰醋酸、醋酸铵为分析纯,乙腈为

基金项目 国家自然科学基金(30070005)

* 通讯作者。Tel 86-731-8872557, Fax 86-731-8883310, E-mail: chzh@mail.hunnu.edu.cn

作者简介 胡劲松(1973-)男,湖南娄底人,硕士,主要从事有毒蘑菇毒素成份的研究。

收稿日期 2002-12-26, 修回日期:2003-06-13

色谱纯。

1.3 样品制备

把鹅膏菌除去泥土,将其菌盖、菌柄、菌托小心分开,实验前在 70℃ 下烘干至恒重,磨碎,每份样品准确称取 0.05g,设置 3 个重复。向每份样品中加入 1mL 50% 的甲醇置于摇床上在室温下 120r/min 抽提 12h 4000r/min 离心 10min,取上清液于冰箱中保存,沉淀再重复抽提一次,取上清液与前一次的合并,用航空汽油去脂两次,然后在冻干机中抽干,用 1mL 超纯水溶解,0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,得毒素提取液。

1.4 HPLC 测定条件和参数

高效液相色谱系统为 Waters Delta 600,分离柱为 300mm \times 4.0mm, YWG C18, 10 μ m 的反相分析柱,紫外检测器为 Waters2487,检测波长 295nm,分析在杭州英谱公司色谱工作站进行。洗脱液由 A、B 两液混合,A 液:10% 乙腈,90% 0.02mol/L 醋酸铵;B 液:24% 乙腈,76% 0.02mol/L 醋酸铵。用冰醋酸调节至 pH5.0。洗脱梯度为 0 \rightarrow 15min, A 液 100% \rightarrow 95%, B 液 0 \rightarrow 5%;15 \rightarrow 35 min, A 液 95% \rightarrow 20%, B 液 5% \rightarrow 80%,并保持 5min;40 \rightarrow 45min, A 液 20% \rightarrow 0, B 液 80 \rightarrow 100%,并保持 5 min;50 \rightarrow 55min, A 液 0 \rightarrow 100%, B 液 100% \rightarrow 0,并保持 10min。流动相流速为 1.0mL/min,样品进样量 20 μ L。

1.5 回归线性方程的获得

取各标样毒素准确配制浓度为 1mg/mL 的溶液,每种按 3 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g、25 μ g 进样,以面积、外标法分别获得各标样毒素的梯度进样量的峰面积数据,用最小二乘法求得各标样毒素的进样量与峰面积的线性回归方程。

2 结果和分析

2.1 毒素标样的线性回归方程

通过计算获得各标样毒素进样量与峰面积的线性回归方程,分别如下:

$$\alpha\text{-amanitin} \quad y = 376245.4001x + 38781.0188 \quad r = 0.9995$$

$$\beta\text{-amanitin} \quad y = 678366.8742x - 29262.1586 \quad r = 0.9999$$

$$\text{Phalloidin} \quad y = 510888.7801x - 82815.7855 \quad r = 0.9999$$

$$\text{Phallisin} \quad y = 524168.9981x - 6248.3289 \quad r = 0.9999$$

$$\text{Phalloidin} \quad y = 676990.0061x + 135261.1792 \quad r = 0.9951$$

$$\text{Phalloin} \quad y = 1111452.7023x + 4371.0847 \quad r = 0.9999$$

其中 x : 进样量/ μ g; y : 峰面积; r : 相关系数

从相关系数可以看出,进样量与峰面积的相关性相当高。在测定样品时,即可根据 HPLC 图的洗脱峰面积通过上述线性回归方程进行各毒素的定量分析。

2.2 致命鹅膏的肽类毒素分析

6 种标样毒素的混合组份及致命鹅膏子实体毒素提取液的 HPLC 如图 1 和图 2 所示,通过致命鹅膏 HPLC 洗脱峰的保留时间与标样比较,以及洗脱峰面积与毒素含量之间的线性回归方程关系即可得出致命鹅膏中所含肽类毒素的种类和含量(表 1)。

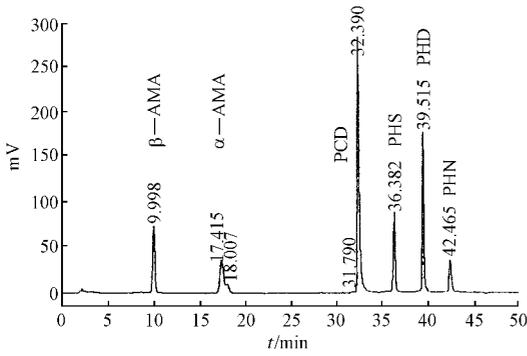


图 1 6 种鹅膏菌肽类毒素混合标样的 HPLC 图

Fig.1 HPLC of mixtures of six amatoxins and phallotoxins samples

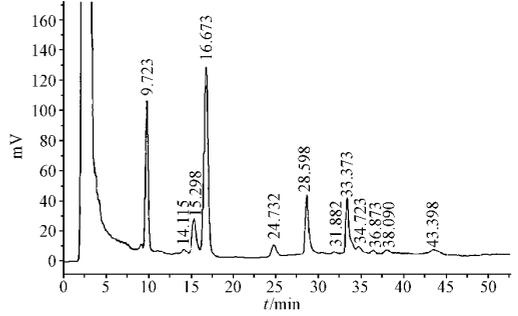


图 2 致命鹅膏子实体(菌盖)毒素提取液的 HPLC 图

Fig.2 HPLC of toxic extractions from cap of *Amanita exitialis*

表 1 致命鹅膏不同组织部位的肽类毒素含量(μg/g)

Table 1 Toxic peptides content in the various tissues of *Amanita exitialis* (μg/g)

Tissues	β-AMA	α-AMA	PCD	PHS	PHN	Total toxins
Cap	1758.2 ± 150.1	5163.7 ± 791.6	1107.4 ± 132.1	61.0 ± 33.7	62.3 ± 31.3	8152.6 ± 1004.3
Stipe	654.8 ± 127.6	2282.2 ± 35.9	732.5 ± 16.7	27.2 ± 23.6	45.6 ± 51.1	3742.3 ± 133.2
Volva	188.2 ± 19.2	636.5 ± 48.5	317.8 ± 34.0	0	0	1142.5 ± 70.1

β-AMA : β-amanitin ; α-AMA , α-amanitin ; PCD : Phalloidin ; PHS : Phallisin ; PHN : Phalloin.

从图表中可以看出,致命鹅膏含有鹅膏毒肽(Amatoxins)和鬼笔毒肽(Phallotoxins),其中鹅膏毒肽中的 α-amanitin(α-AMA)、β-amanitin(β-AMA)和鬼笔毒肽中的 PCD 含量高,而 PHS 和 PHN 含量很低,PHD 未检测到。另外,在致命鹅膏子实体毒素提取液的 HPLC 图谱中,还有 3 个峰面积较大的洗脱峰,其保留时间分别为 15.298 min、24.732 min、28.598min,由于没有相应的标样毒素,尚不能确定它们是哪种毒素,有待进一步分离纯化,然后通过质谱和核磁共振来鉴定其结构。

从表 1 可以看出,致命鹅膏子实体不同部位的毒素含量不相同,每种毒素含量都是以菌盖最高、菌柄次之、菌托最低,菌盖部分的总毒素含量高达 8152.6μg/g 干子实体,菌柄中的总毒素含量(3742.3μg/g)只相当于菌盖中的 45.90%,而菌托中的毒素含量最低,总共只有 1142.5μg/g 干子实体,仅相当于菌盖中的 14.01%。

为了进一步分析各种毒素在不同组织部位的分布情况,将表 1 中各毒素含量转换成各毒素占该部位总毒素含量的百分比(表 2)。

从表 2 中可以更清楚地看出,在菌盖、菌柄和菌托中,鹅膏毒肽类(Amatoxins)毒素(β-AMA 和 α-AMA)所占的比例都比较高,分别为 84.91%、78.48%和 72.18%,而鬼笔毒肽类(Phallotoxins)毒素(PCD、PHS 和 PHN)在菌盖、菌柄和菌托中的相对含量分别为 15.09%、21.52%和 27.82%,因此在菌盖、菌柄和菌托中都以鹅膏毒肽为主,尤其以 α-amanitin 的相对含量最高,但从菌盖至菌柄到菌托,鬼笔毒肽尤其是 Phalloidin 的相对含量依次增加。

表 2 不同组织部位中各种毒素的分布及其变异系数

Table 2 The distribution of toxins in the tissues and coefficient of variation

Tissue	β -AMA		α -AMA		PCD		PHS		PHN	
	/%	CV/%	/%	CV/%	/%	CV/%	/%	CV/%	/%	CV/%
Cap	21.57	8.54	63.34	15.33	13.58	11.93	0.75	55.14	0.76	50.21
Stipe	17.50	19.49	60.98	1.56	19.57	2.28	0.73	86.97	1.22	112.12
Volva	16.47	10.21	55.71	7.62	27.82	10.71	0	0	0	0

CV: Coefficient of variation.

从该表中还可以看出 β -amanitin、 α -amanitin、Phalloidin 的变异系数变化不大,而 Phal-lisin 和 Phalloin 的变异系数无论是在菌盖还是菌柄中的变化都比较大。这是因为含量越高,测定相对误差越小,含量越低,测定相对误差越大所引起。

3 讨论

近年来在我国南方广大山区农村、乡镇频频发生因误食毒蘑菇而导致中毒死亡的事件。我们现场调查了湖南、广东、江西三省 1994~2002 年发生的 58 起毒蘑菇中毒事件,发现导致中毒死亡的除红菇属中的亚稀褶黑菇(*Russula subnigricans*)外,主要是由鹅膏菌属(*Amanita*)中的一些剧毒种类所引起,在湖南和江西省,主要由灰花纹鹅膏(*Amanita fuliginea*)引起^[4,5]。我们利用反相高效液相色谱和质谱分析鉴定了灰花纹鹅膏所含鹅膏毒肽(Amatoxins)和鬼笔毒肽(Phallotoxins)结果表明它所含毒素种类多,含量高,其菌盖部位的主要毒素总含量达 10732.6 μ g/g 干子实体^[6];在广东,导致死亡的主要由致命鹅膏(*A. exitialis*)所引起,并且到目前为止只发生了这一起事件。本文测定结果表明致命鹅膏是一种剧毒鹅膏菌,它的毒素含量相当高,其菌盖部位的主要毒素总含量达到 8152.8 μ g/g 干子实体,比灰花纹鹅膏低一些。在欧洲,大部分蘑菇中毒是由鹅膏菌引起,其中导致死亡主要是由毒鹅膏(*Amanita phalloides*)所致^[3]。Enjalbert 等^[7]1992 年利用 HPLC 测定了毒鹅膏(*A. phalloides*)子实体中的鹅膏毒肽(Amatoxins)和鬼笔毒肽(Phallotoxins),其毒素总含量(含 8 种毒素)为 703.3 μ g/g 鲜子实体(按含水量 92% 换算,其毒素总含量为 8791.25 μ g/g 干子实体)。由于以上 3 种剧毒鹅膏的毒素含量数据是独立的实验结果,没有可比性,为此,本文作者同时对我国的 28 种鹅膏菌与采集于德国的毒鹅膏(*Amanita phalloides*)的主要毒素种类和含量进行了测定分析(结果另文发表),结果表明灰花纹鹅膏(*A. fuliginea*)所含毒素最高,致命鹅膏(*A. exitialis*)与欧洲毒鹅膏(*A. phalloides*)毒素含量相当。这 3 种鹅膏菌是到目前为止已知的毒性最高的鹅膏菌种类。

致命鹅膏中各组织部位的毒素含量变化情况与欧洲 *A. phalloides* 一样,都是菌盖含量最高,菌柄次之,菌托最低^[8,9],但在致命鹅膏中,无论是菌盖、菌柄和菌托,都以鹅膏毒肽为主,尤其以 α -amanitin 的相对含量最高,同时从菌盖至菌柄到菌托,鬼笔毒肽尤其是 Phalloidin 的相对含量依次增加。而在 *A. phalloides* 中,无论是子实体的哪个部位,其鬼笔毒肽类毒素的含量都要高于鹅膏毒肽类毒素,并且这种变化趋势从菌盖到菌柄到菌托更加明显^[8,9]。

致谢 感谢广东微生物研究所李泰辉教授协助采集标本,中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员帮助鉴定标本。

参 考 文 献

- [1] 谭铭雄,李宽银,马林,等.一起误食毒蕈导致8人死亡的食物中毒调查.华南预防医学,2002,28(2):51~52.
- [2] Yang Z L, Li T H. Notes on three white amanitae of section phalloidea(amanitaceae) from China. *Mycotaxon* 2001, 78: 439 ~ 448.
- [3] Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*, 1998, 36(1): 13 ~ 24.
- [4] 张志光,刘建强,陈作红,等.某市36起毒蕈中毒事件调查.现代预防医学,2002,29(3):301~304.
- [5] 黄亮,雷兆文,曹春水.江西地区灰花纹鹅膏菌中毒首发报告.江西医学院学报,2002,42(1):123~124.
- [6] 陈作红,张志光,梁宋平,等.四种剧毒鹅膏菌肽类毒素的HPLC分离与鉴定.菌物系统,1999,18(4):415~419.
- [7] Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, et al. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1992, 598: 227 ~ 236.
- [8] Enjalbert F, Cassanas G, Guincharde C, et al. Toxin composition of *Amanita phalloides* tissues in relation to the collection site. *Mycologia*, 1996, 88(6): 909 ~ 921.
- [9] Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, et al. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon*, 1993, 31(6): 803 ~ 807.

Analysis of the Main Amatoxins and Phallotoxins in *Amanita exitialis*—a New Species in China

Hu Jingsong Chen Zuohong* Zhang Zhiguang Zhang Ping

(*Mycological Laboratory, Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China*)

Abstract :The content and distribution of the main Amatoxins(α -amanitin, β -amanitin)and Phallotoxins(Phallacidin, Phallisin, Phalloin, Phalloidin)in the three tissues (cap, stipe and volva) of *Amanita exitialis* were evaluated by means of high-performance liquid chromatography. The results showed that *Amanita exitialis* was a lethal mushrooms, the cap had the highest content of total toxins, it reached 8152.6 μ g/g dry weight, the toxins content in stipe reached 3742.3 μ g/g dry weight, whereas the volva had the lowest content of total toxins, it had only 1142.5 μ g/g dry weight. The distribution of Amatoxins and Phallotoxins in the tissues were revealed and it displayed that the content of Amatoxins(α -amanitin and β -amanitins especially α -amanitin) in the cap, stipe or volva of *A. exitialis* was higher than that of Phallotoxins(Phallacidin, Phallisin, Phalloidin and Phalloin). But the content of Phallotoxins especially Phallacidin was gradationally higher from cap to stipe and to volva.

Key words :*Amanita exitialis*, Amatoxins, Phallotoxins, HPLC

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation(30070005)

* Corresponding author. Tel : 86-731-8872557 ; Fax : 86-731-8883310 ; E-mail : chzh@ mail. hunnu. edu. cn

Received date : 12-16-2002