

玫瑰红鹅膏主要肽类毒素的 HPLC 测定及其对白色念珠菌的抑制活性

王玉玲¹, 包海鹰², 徐璐², 图力古尔^{1*}

吉林农业大学,¹ 食药菌教育部工程研究中心,² 中药材学院, 长春 130118

摘要:【目的】检测玫瑰红鹅膏中所含肽类毒素及其含量,并对其肽类毒素的抑制白色念珠菌活性进行研究。【方法】采用 HPLC 和 ESI-MS 法从玫瑰红鹅膏中分离并鉴定出所含肽类毒素,并采用 HPLC 法测定其子实体、菌盖及菌柄和菌托混合部分中肽类毒素的含量。同时,采用纸片法研究了玫瑰红鹅膏粗毒液和分离到的单品肽类毒素对白色念珠菌 JLC31680 和 JLC31681 的抑菌作用。【结果】分离并鉴定出 α -鹅膏毒肽(α -AMA)、 β -鹅膏毒肽(β -AMA)和二羟鬼笔毒肽(PHD)等 3 种肽类毒素。玫瑰红鹅膏子实体中 α -AMA、 β -AMA、PHD 的含量分别为 30.3168、6.9932 和 9.9459 mg/g; 菌盖中含量分别为 44.9573、11.0798 和 11.3025 mg/g; 菌柄和菌托混合部分中: α -AMA 11.6904 mg/g 和 PHD 7.9775 mg/g, β -AMA 未检出。粗毒液、 α -AMA、 β -AMA 和 PHD 对白色念珠菌 JLC31680 均具有很好的抑制作用,抑制率分别达到 11.96%、32.52%、23.29% ($p < 0.01$) 和 15.46% ($p < 0.05$); 粗毒液和 β -AMA 对白色念珠菌 JLC31681 的最高抑制率分别为 10.16% 和 11.10% ($p < 0.01$), α -AMA 对白色念珠菌 JLC31681 最高抑菌率为 6.89% ($p < 0.05$)。【结论】玫瑰红鹅膏中的三种肽类毒素的含量较高,是制备肽类毒素的新资源;其具有抑制白色念珠菌的活性,可开发利用。

关键词: 鹅膏菌, 肽类毒素, 抑菌活性

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1205-07

鹅膏菌是一个世界性分布的大属,是有毒蘑菇中最重要的一类,目前已定名的约有 500 多种。该属中有一些种类有剧毒,世界上蘑菇中毒死人事故,大多数是由鹅膏菌引起的。鹅膏菌中主要的毒素为肽类毒素,现已发现环肽毒素共有 3 大类 22 种^[1]。肽类毒素由于独特的生物学特性,目前广泛应用于生物学、医学、遗传学、生物化学、基因工程、病毒等研究领域^[2]。虽然在毒鹅膏的培养物中也获得了鹅膏肽类毒素^[3],但由于鹅膏属真菌大多数为外生

菌根菌,因此目前科学研究中需要的鹅膏肽类毒素主要从野外采集的子实体中提取得到。

玫瑰红鹅膏(*Amanita pallidorosea* P. Zhang & Zhu L. Yang)是近年在我国发现的一新种^[4],毒性较强,分布于吉林、湖南、重庆等省市。于 2007 年 8 月在吉林省辉南县发生的蘑菇中毒死亡事件就是因误食玫瑰红鹅膏引起的。本文应用高效液相色谱法对长白山产玫瑰红鹅膏的肽类毒素成分进行分离纯化并测定其含量^[5-13],同时探讨鹅膏肽类毒素对白

基金项目: 吉林省教育厅科技计划项目

* 通信作者。Tel: +86-431-84532917; E-mail: junwusuo@126.com

作者简介: 王玉玲(1987-),女,内蒙古兴安盟人,硕士研究生,主要从事鹅膏菌分类及化学方面的研究。

收稿日期: 2011-03-13; **修回日期:** 2011-03-24

色念珠菌的抑制活性^[14-16],旨在为鹅膏肽类毒素的获得提供新资源,也为其进一步开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:玫瑰红鹅膏 *Amanita pallidorozea* P. Zhang & Zhu L. Yang 采自吉林省辉南县样子哨镇;白色念珠菌 *Blastomyces albicans* JLC31680 和 LC31681 购自吉林大学药学院。

1.1.2 主要仪器和试剂:医用型洁净工作台(DL-CJ-1N):北京东联哈尔仪器制造有限公司,高效液相色谱仪:安捷伦 1100,色谱柱:分析柱 Amethyst-C18 柱(150×4.6 mm, 10 μm), Sepax Technologies, 半制备柱 Venus II MP-C18 柱(250×10 mm, 10 μm), Agela Technologies, 离心机:GL-21LM 高速冷冻离心机(湖南星科科学仪器有限公司), THZ-恒温振荡器:江苏太仓市实验设备厂, ESI-MS 质谱仪: Finnigan-MAT. LCQ 电喷雾质谱仪, 高压灭菌锅(YXQ-LS-50SII):上海博迅实业有限公司医疗设备厂, 二氧化碳细胞培养箱(HH·CP-01W):上海博迅实业有限公司医疗设备厂, 水浴恒温振荡器(SHA-CA):江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司, 电子数显卡尺:上海申韩量具有限公司, 冰醋酸(分析纯)、醋酸铵(Sigma 公司)、石油醚(天津化学试剂有限公司为分析纯), 甲醇(FISHER 公司)、乙腈(FISHER 公司)为色谱纯, 洗脱液 A 相:10% 乙腈 + 90% 0.02 mol/L 醋酸铵, 冰醋酸调节 pH 值至 5.0, 洗脱液 B 相:30% 乙腈 + 70% 0.02 mol/L 醋酸铵, 冰醋酸调节 pH 值至 5.0, 纯净水(杭州娃哈哈公司), 标准品:α-鹅膏毒肽, β-鹅膏毒肽, 二羟鬼笔毒肽(由吉林农业大学菌物研究所提供), 蛋白胨, 氯化钠, 琼脂, 葡萄糖, 磷酸氢二钾(分析纯), 磷酸二氢钾, 甘油, 吐温, 80, 氯霉素。

1.2 粗毒液和主要肽类毒素的制备及测定

1.2.1 粗毒液的制备:将子实体置烘箱内, 60℃ 干燥至恒重, 每 0.20 g 子实体中加入 50% 甲醇溶液 2 mL, 然后放置在振荡器中振荡(100 r/min) 12 h (颠倒振荡几次), 离心 5 min(5000 r/min) 取上清液置另一离心管中, 加入同样比例的甲醇于沉淀中, 重复 1 次, 将 2 次上清液合并, 之后用同体积的石油醚

抽提 2 次去除脂类, 置 50℃ 水浴中, 去除残留石油醚, 蒸干得到粗毒素。每 1 mg 粗毒素样品溶于 7 mL 的纯净水中, 再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 得到粗毒液。菌盖, 菌柄和菌托混合部分的粗毒液提取方法同上(实验材料的用量:子实体 3.8105 g, 菌盖 4.7410 g, 菌柄和菌托部分 3.5404 g; 得到的粗毒液:子实体 1.3358 g, 菌盖 1.8804 g, 菌柄和菌托部分 1.2526 g)。

1.2.2 HPLC 测定参数:使用安捷伦 1100 高效液相色谱仪分离梯度模式为:0→15 min, B 0→5%, A 100%→95%; 15→35 min, B 5→80%, A 95%→20%; 35→40 min, B 80%, A 20%; 40–45 min, B 80→100%, A 20→0%; 45–50 min, B 100%; 50→55 min, B 100→0%, A 0→100% 并保持 10 min; 纯化梯度模式:与分离梯度模式相同。检测波长:295 nm; 柱温:40℃; 流速:分析柱:1 mL/min; 半制备柱:2 mL/min。进样量:分析柱:20 μL, 半制备柱:1 mL。

1.2.3 HPLC 分析:在半制备柱上进行鹅膏毒素的分离和纯化, 得到 3 种化合物, 冷冻干燥后称重, 用 HPLC 进行检测。分离纯化结果用 Finnigan-MAT. LCQ 电喷雾质谱仪进行鉴定。在分析柱上采用外标法进行各毒素的含量测定。

1.3 粗毒液对白色念珠菌的抑制活性

1.3.1 供试液的制备:使用纯净水配制至以下浓度—玫瑰红鹅膏粗毒液:10 mg/mL, 2.50 mg/mL, 0.60 mg/mL; α-鹅膏毒肽:0.50 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.03 mg/mL; β-鹅膏毒肽:0.50 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.03 mg/mL; 二羟鬼笔毒肽:0.50 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.03 mg/mL。

1.3.2 培养基的配制:(1) 液体沙氏培养基:于 1000 mL 水中加入葡萄糖 40.00 g、蛋白胨 10.00 g、氯霉素 0.10 g, 调整 pH 为 5.4–5.8, 三角瓶分装, 于 121℃ 高压灭菌 30 min 备用。(2) 固体沙氏培养基:于 1000 mL 水中加入葡萄糖 40.00 g、蛋白胨 10.00 g、氯霉素 0.10 g, 琼脂 15.00 g, 加热使琼脂完全溶化, 调整 pH 为 5.4–5.8, 三角瓶分装, 于 121℃ 高压灭菌 30 min 备用。

1.3.3 菌液的配制:取灭菌后的液体培养基 100 mL, 放入三角瓶中。用移液枪取菌种 20 μL, 注入液体培养基中。封好三角瓶, 将三角瓶放入摇床中 28℃ 摇床培养(转数 200–220), 培养约 48 h 后,

将三角瓶取出。吸取等量的菌液和稀甘油注入试管中,摇匀即可。

1.3.4 缓冲溶液的配制:(1) pH7.8 的磷酸盐缓冲溶液:磷酸氢二钾5.59 g、磷酸二氢钾0.41 g、蒸馏水1000 mL,溶解并过滤,121℃ 高压灭菌15 min后,室温冷却,备用。(2) pH6.0 的磷酸盐缓冲溶液:磷酸氢二钾2.00 g、磷酸二氢钾8.00 g、蒸馏水1000 mL,溶解并过滤,121℃ 高压灭菌15 min后,室温冷却,备用。

1.3.5 阳性药的配制及筛选:(1) 阳性药的配制:无菌条件下,分别将硝酸咪康唑软膏、盐酸特比萘芬乳膏、硝酸益康唑软膏用生理盐水配制成1.28 mg/mL的溶液(经预实验筛选有效浓度为1.28 mg/mL)。密封后冷藏保存。(2) 阳性药的筛选:在无菌条件下用移液枪吸取菌液100 μ L,滴在平板培养基上,用涂布器将菌液涂匀。用纸片蘸取阳性药,均匀放在涂有菌液的培养基上,每种阳性药做5个平行。将处理完的平板培养基用封口膜封好,放入恒温培养箱中(28℃)培养48 h。观察抑菌圈,并用卡尺测量其直径,记录数据。针对不同的致病菌株白色念珠菌 JLC31680 和 JLC31681,本实验的阳性对照药选择了抑菌圈直径约在19 mm的硝酸咪

康唑软膏的最佳(1.28 mg/mL)。

1.3.6 供试液抑菌作用的检验:在无菌条件下将菌液均匀涂在 MHA 培养基上,用纸片(直径7 mm)分别蘸取供试液和阳性药,间隔并均匀放在涂有菌液的培养基上,每组做5个平行,放入二氧化碳细胞培养箱中(28℃)培养48 h。观察并测量抑菌圈直径,记录数据,实验数据采用 SPSS 方差分析,列表统计。抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{\text{供试药抑菌圈直径} - \text{滤纸片直径}}{\text{阳性药抑菌圈直径} - \text{滤纸片直径}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 粗毒液主要肽类毒素的 HPLC 分析

2.1.1 玫瑰红鹅膏中肽类毒素的分离纯化和结构鉴定:玫瑰红鹅膏的粗毒液使用 RP-HPLC 半制备柱上分离纯化。玫瑰红鹅膏粗毒液的 HPLC 图如图1,根据标准品的保留时间(α -AMA: 35.025、 β -AMA:31.487、PHD:51.877,图略),分离纯化其3种化合物,保留时间分别为 31.761、35.698 和 51.959。

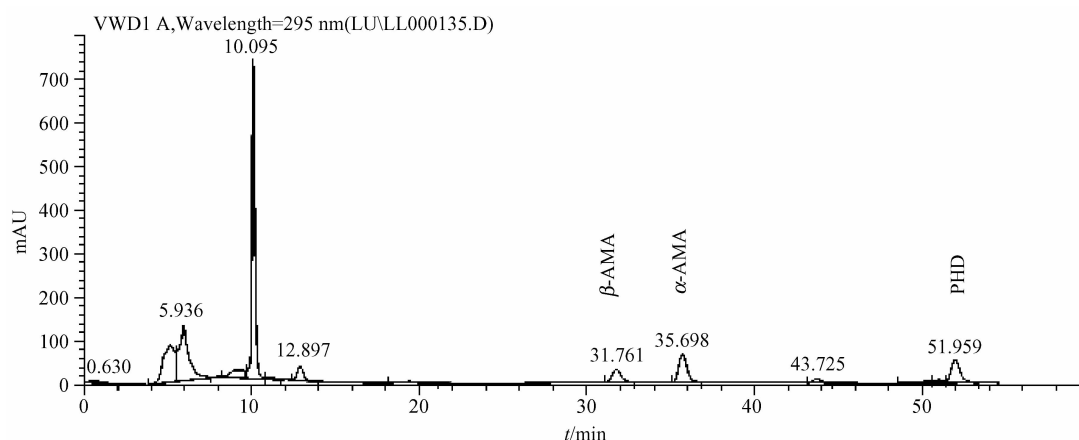


图1 玫瑰红鹅膏粗毒液的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC spectrum of crude toxin extraction from *Amanita pallidorosea*.

化合物鉴定结果:HPLC 保留时间,因不同的分离条件和不同的色谱柱,保留时间有一定的差异,但是各个化合物在 HPLC 上的出峰顺序保持不变。同时根据电喷雾质谱确定化合物。

化合物1在 RP-HPLC 半制备柱上分离纯化结果检测到的保留时间是31.346 min。HPLC 保留时间

与标准品 β -AMA 基本一致。电喷雾质谱[M-H]⁺峰是918,MW 是919,见图2-A。根据色谱保留时间和分子量,鉴定该化合物为 β -AMA。

化合物2在 RP-HPLC 半制备柱上分离纯化结果检测到的保留时间是35.758 min,纯度较高。HPLC 保留时间与标准品 α -AMA 基本一致。电喷

雾质谱 $[M + Na]$ 峰是 941, MW 是 918, 见图 2-B。根据 HPLC 保留时间和分子量, 鉴定该化合物为 α -AMA。

化合物 3 在 RP-HPLC 半制备柱上分离纯化结

果检测到的保留时间是 51. 725 min。HPLC 保留时间与标准品 PHD 本一致。电喷雾质谱仪测定分子量 $[M + H]$ 峰是 789, 分子量为 788, 见图 2-C。通过高效液相保留时间及分子量, 鉴定该化合物为 PHD。

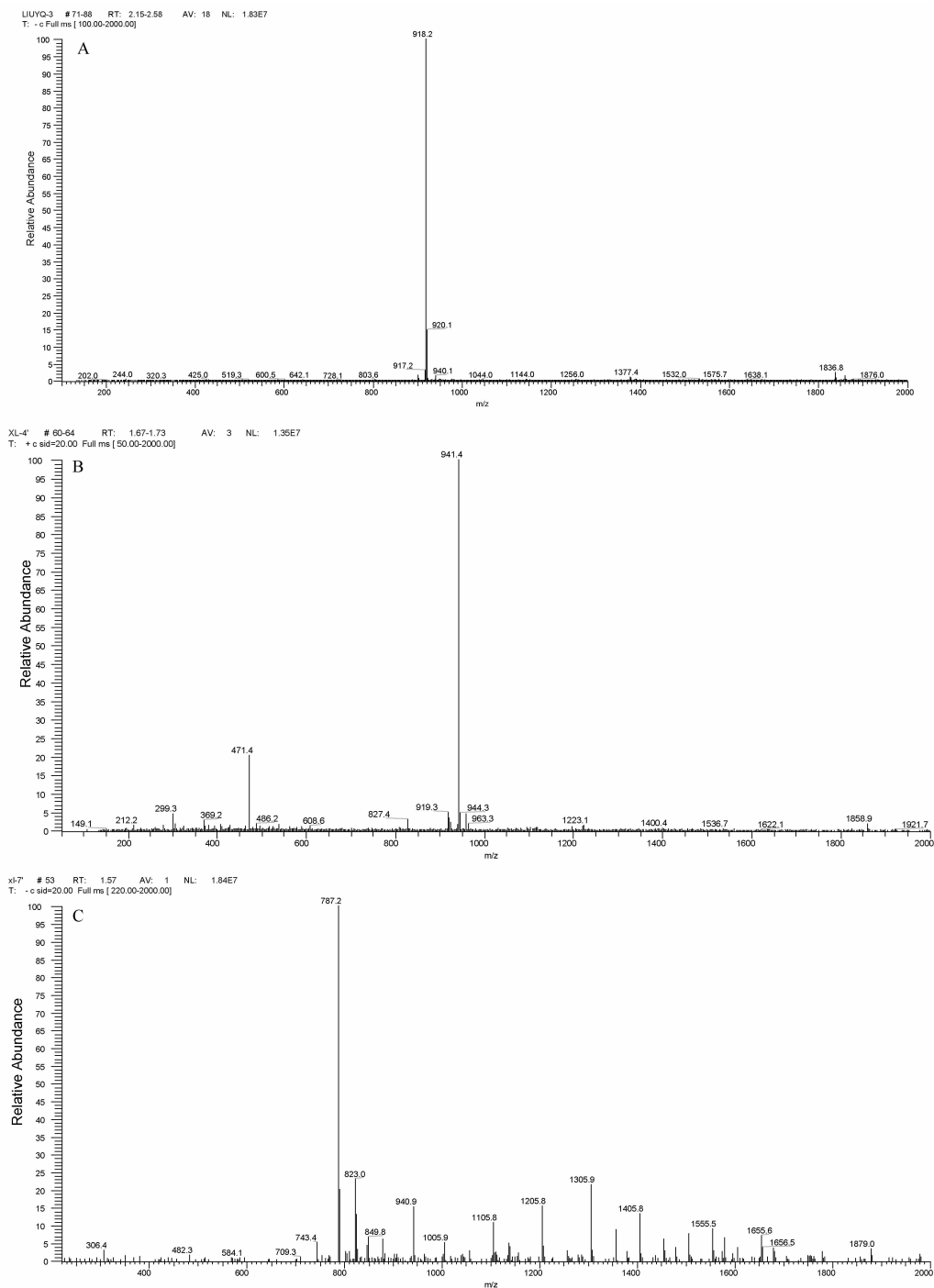


图 2 三种化合物的电喷雾质谱图

Fig. 2 ESI spectrum of three kinds of component. A: ESI spectrum of compound 1; B: ESI spectrum of compound 2; C: ESI spectrum of compound 3.

2.1.2 玫瑰红鹅膏肽类毒素的定量分析:3 种毒素标样以不同进样量(0.06 μg/mL, 0.10 μg/mL, 0.20 μg/mL, 0.30 μg/mL, 0.40 μg/mL, 0.50 μg/mL)得到各自不同浓度时的 HPLC 峰面积,即建立了每种毒素峰面积与进样量之间的回归方程 $Y = KX + b$, 其中 Y :峰面积, X :进样量(μg)。计算得 3 种毒素的回归方程如下:

α -AMA $Y = 113.19X - 0.6643 \quad R^2 = 0.9999$
 β -AMA $Y = 228.85X - 0.9356 \quad R^2 = 0.9997$
PHD $Y = 317.42X - 3.0393 \quad R^2 = 0.9997$
(R^2 为相关系数)

在测定样品时,即根据毒素的峰面积通过以上关系式进行毒素的定量分析。经玫瑰红鹅膏完整子实体、菌盖、菌柄和菌托粗提物的 HPLC 分析,结果如下:完整子实体内 α -AMA、 β -AMA、PHD 的含量分别为 20.9587、4.9269、9.3762 mg/g 干重;菌盖中 α -AMA、 β -AMA、PHD 的含量分别为 31.5301、7.5974、10.6519 mg/g 干重;菌柄菌托部分中 α -AMA、PHD 的含量分别为 7.3401、7.5984 mg/g, β -AMA 含量过少未能定量。结果显示,玫瑰红鹅膏不同部位各毒素的含量不同, α -AMA 在菌盖中的含量是菌柄中含量的 4.43 倍, β -AMA 主要存在于菌盖部分, PHD 在菌盖中的含量仍高于菌柄菌托部分中的含量。

2.2 玫瑰红鹅膏肽类毒素对白色念珠菌的抑制活性

2.2.1 粗毒液、 α -AMA、 β -AMA、PHD 对白色念珠菌 JLC31680 的抑制作用(表 1):鹅膏粗毒液对白色念珠菌 JLC31680 有明显的抑制作用,且浓度增加时抑制率有增强的趋势。当粗毒液浓度为 10.00 mg/mL 时,抑制作用最强,抑制率为 11.96%, 且与对照组相比呈极显著差异 ($P < 0.01$);浓度为 2.50 mg/mL 时,抑制作用次之,抑制率为 10.93%, 与对照组相比呈显著差异 ($P < 0.05$);浓度为 0.60 mg/mL 时,抑制率为 5.96%, 但与对照组相比无显著差异。

α -AMA 对白色念珠菌 JLC31680 的抑菌作用十分明显,且浓度增加时抑制率有增强的趋势。当 α -AMA 浓度为 0.50 mg/mL 时,抑菌率高达 32.52%, 且与对照组相比呈极显著差异 ($P < 0.01$);浓度为 0.12 mg/mL 时,抑菌率为 18.06%, 与对照组相比呈显著差异 ($P < 0.05$);浓度为 0.03 mg/mL 时,抑制率

为 12.65%, 但与对照组相比无显著差异。

β -AMA 对白色念珠菌 JLC31680 的抑菌作用十分明显,且浓度增加时抑制率有增强的趋势。当 β -AMA 浓度为 0.50 mg/mL 时,抑菌率达 23.29%, 且与对照组相比呈极显著差异 ($P < 0.01$);浓度为 0.12 mg/mL 时,抑菌率为 12.77%, 与对照组相比呈显著差异 ($P < 0.05$);浓度为 0.03 mg/mL 时,抑制率为 10.52%, 但与对照组相比无显著差异。

PHD 对白色念珠菌 JLC31680 有一定的抑制作用。当浓度为 0.12 mg/mL 和 0.03 mg/mL 时,抑菌率分别为 15.46% 和 14.81%, 且均与对照组呈显著性差异 ($P < 0.05$);浓度为 0.50 mg/mL 时,抑菌率为 12.34%, 但与对照组相比无显著差异。

表 1 玫瑰红鹅膏各毒素对白色念珠菌 JLC31680 的抑菌率 ($n = 5$)

Table 1 Inhibition ratio of each toxin of *Amanita pallidorosea* to *Blastomyces albicans* JLC31680 ($n = 5$)

Group	Concentration/ (mg/mL)	Antifungal effect diameter/mm	Inhibition ratio/%
Control group		7.12 ± 0.18	0
Positive control group	1.28	18.07 ± 1.55**	100.00
crude toxin extraction	10.00	8.20 ± 0.76**	11.96
	2.50	8.10 ± 0.42*	10.93
	0.60	7.60 ± 0.55	5.96
α -AMA	0.50	10.60 ± 1.71**	32.52
	0.12	9.00 ± 1.58*	18.06
	0.03	8.40 ± 0.89	12.65
β -AMA	0.50	10.10 ± 1.08**	23.29
	0.12	8.70 ± 1.60*	12.77
	0.03	8.40 ± 0.89	10.52
PHD	0.50	8.50 ± 1.32	12.34
	0.12	8.90 ± 1.52*	15.64
	0.03	8.80 ± 1.25*	14.81

Compared with control group. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

2.2.2 粗毒液、 α -AMA、 β -AMA、PHD 对白色念珠菌 JLC31681 的抑制作用(表 2):

鹅膏粗毒液对白色念珠菌 JLC31681 对白色念珠菌 JLC31681 的抑制作用显著,在 3 个浓度下,抑菌作用均与对照组呈极显著差异 ($P < 0.01$)。浓度为 10.00 mg/mL 时,抑制作用最强,抑制率为 10.16%; 0.60 mg/mL 时次之,抑制率为 7.42%; 2.50 mg/mL 时最弱,抑制率为 6.45%。

α -AMA 对白色念珠菌 JLC31681 有一定的抑制作用,当浓度为 0.50 mg/mL 和 0.12 mg/mL 时,抑菌率均为 6.89%, 且均与对照组成显著性差异 ($P < 0.05$);浓度为 0.03 mg/mL 时,抑制率为 4.59%, 但

与对照组相比无显著差异。

β -AMA 对白色念珠菌 JLC31681 的抑菌作用较为明显。当浓度为0.50 mg/mL和0.03 mg/mL时,抑菌率分别为 11.1% 和 9.62%,且均与对照组呈极显著差异($P < 0.01$);浓度为0.12 mg/mL时,抑菌率为 4.44%,与对照组相比无显著差异。

PHD 对白色念珠菌 JLC31681 的抑制作用不明显。当浓度为 0.50、0.12 和0.03 mg/mL时,抑菌率为分别为 8.37%、7.6% 和 6.84%,但与对照组均无显著性差异。

表 2 玫瑰红鹅膏各毒素对白色念珠菌 JLC31681 的抑菌率($n = 5$)

Table 2 Inhibition ratio of each toxin of *Amanita pallidorosea* to *Blastomyces albicans* JLC31680($n = 5$)

Group	Concentration/ (mg/mL)	Antifungal effect diameter/mm	Inhibition ratio/%
Control group		7.10 \pm 0.14	0
Positive control group	1.28	20.07 \pm 1.55**	100.00
crude toxin extraction	10.00	8.37 \pm 0.25**	10.16
	2.50	7.87 \pm 0.48**	6.45
	0.60	8.00 \pm 0.41**	7.42
	0.50	7.90 \pm 0.42*	6.89
α -AMA	0.12	7.90 \pm 1.03*	6.89
	0.03	7.60 \pm 0.42	4.59
	0.50	8.50 \pm 0.35**	11.10
β -AMA	0.12	7.60 \pm 0.65	4.44
	0.03	8.30 \pm 0.57**	9.62
	0.50	8.10 \pm 0.22	8.37
PHD	0.12	8.00 \pm 0.71*	7.60
	0.03	7.90 \pm 0.55	6.84

compared with control group: * : $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

3 讨论

通过 HPLC 色谱法研究发现玫瑰红鹅膏毒素含量很高,据陈作红等^[17]报导,目前发现的最毒的鹅膏 *Amanita fuliginea* Hongo 含 α -AMA 9.3110 mg/g、 β -AMA 1.0397 mg/g、PHD 1.4643 mg/g,而本研究结果表明,玫瑰红鹅膏所含各毒素均明显比 *Amanita fuliginea* Hongo 的含量高,可作为制备毒素的原料。还发现玫瑰红鹅膏不同部位的各毒素的含量有所差异, α -AMA 在菌盖中的含量是菌柄中含量的 4.43 倍, β -AMA 主要存在于菌盖部分,PHD 在菌盖中的含量仍高于菌柄菌托部分中的含量。

玫瑰红鹅膏粗毒液对白色念珠菌 JLC31680 和 JLC31681 均有明显的抑制作用。作用物质可能是

肽类毒素。 α -AMA、 β -AMA 单品均对白色念珠菌有明显的抑制作用。作用机制可能是因为 α -AMA 为 RNA 聚合酶 II 的专一性抑制剂, α -AMA 抑制了真菌细胞的 RNA 聚合酶 II,扰乱了真菌细胞的 DNA 和 RNA 的合成,继而抑制蛋白合成,最终导致真菌细胞死亡^[2]。 β -AMA 与其作用机理类似。PHD 对白色念珠菌也有一定的抑制作用,作用机理可能与其能专一性地与 F-actin 结合有关。PHD 专一性地与 F-actin 结合,可稳定其分子结构,阻止 F-actin 向 G-actin 方向转化,破坏 F-actin 和 G-actin 之间的解离-装配平衡,从而干扰了真菌细胞的细胞质运动、细胞内运输,并对真菌细胞的骨架造成破坏,使真菌细胞受到抑制^[18]。

玫瑰红鹅膏肽类粗毒液与 3 种毒素单体对白色念珠菌均有抑制作用,但对不同菌株其抑制效果有差异。总体上,对白色念珠菌 JLC31680 的抑制作用强于对白色念珠菌 JLC31681 的抑制作用。粗毒液、 α -AMA、 β -AMA 和 PHD 对白色念珠菌 JLC31680 均具有明显的抑制作用,但是粗毒液和 β -AMA 对白色念珠菌 JLC31681 的抑制作用较好。

致谢 感谢中国科学院昆明植物研究所的杨祝良博士、张平博士在标本鉴定方面的帮助。同时对吉林省辉南县样子哨镇的农民高振阳在我们进行采集样品时给予的热情帮助深表谢意。

参考文献

- [1] 杨祝良. 中国真菌志. 科学出版社: 2005: 192-196.
- [2] 张志光, 张晓元, 李东屏. 鹅膏菌多肽毒素在生命科学中的应用. 卫生研究 (Journal of Hygiene Research), 1999, 28(1): 60-63.
- [3] 张平, 陈松, 陈作红. 致命鹅膏菌的菌种分离及人工培养研究. 中国食用菌 (Edible Fungi of China), 2005, 24(2): 10-12.
- [4] Zhang P, Chen ZH, Xiao B, Bau T, Bao HY, Yang ZL. Lethal Amanitas of East Asia Characterized by Morphological and Molecular Data. Fungal Diversity, 2010, 42: 119-113
- [5] 包海鹰. 毒蘑菇化学成分与药理活性的研究. 呼和浩特: 内蒙古教育出版社, 2006. 1-34.
- [6] 包海鹰, 李玉, 图力古尔. 长白山鹅膏属真菌肽类毒素的 HPLC 分析. 菌物系统 (Mycosystema), 2002, 21(2): 234-238.
- [7] 包海鹰, 图力古尔, 李玉. 7 种鹅膏属真菌肽类毒素的 HPLC 分析. 菌物研究 (Journal of Fungal Research), 2003, 3(1): 13-16.

- [8] 曹福祥. 灰花纹鹅膏菌肽类毒素的分离纯化及化学结构分析. 湖南农业大学硕士学位论文, 2001.
- [9] 陈作红, 胡劲松, 张志光, 张平, 李东屏. 我国 28 种鹅膏菌主要肽类毒素的检测分析. 菌物系统 (*Mycosystema*), 2003, 22(4): 565-573.
- [10] 李东屏, 张志光. 黑鹅膏菌 (*Amanita fuliginea*) 毒素的 HPLC 初步分离鉴定. 生命科学研究 (*Life Science Research*), 1997, 1(1): 41-46.
- [11] Rieck W, Plantt D. High-performance Liquid Chromatographic Method for The Determination of α -Amanitin and Phalloidin in Human Plasma Using the Column-switching Technique and Its Application in Suspected Cases of Poisoning by The Green Species of *Amanita* mushroom (*Amanita phalloides*). *Journal of Chromatography*, 1988, 425: 121-134.
- [12] Wieland T. The toxic peptides from *Amanita* mushrooms. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1983, 22(3): 257-76.
- [13] Wieland T, Hollosi M, Assal M. Components of The Green Ceathcap Mushroom (*Amanita phalloides*). LXI. δ -Aminophalloin, a 7-analog of phalloidin, and some biochemically useful derivatives, including fluorescent ones. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1983, (9): 1533-1540.
- [14] 刘迎秋, 熊红霞, 包海鹰, Irina A. Gorbunova, 李 玉. 桦褐孔菌菌核提取物对细菌抑菌活性研究. 中国食用菌 (*Edible Fungi of China*), 2009, 28(2): 31-35.
- [15] 佟春兰, 包海鹰, 图力古尔. 蒙古口蘑子实体石油醚提取物的化学成分及抑菌活性. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2010, 29(4): 619-624.
- [16] 比慧敏. 三种含笑叶片提取物的抑菌作用研究. 南京林业大学硕士学位论文, 2008.
- [17] 陈作红, 胡劲松, 张志光, 张平, 李东屏. 我国 28 种鹅膏菌主要肽类毒素的检测分析. 菌物系统 (*Mycosystema*), 2003, 22(4): 565-573.
- [18] Wieland T. Interaction of Phallotoxins with actin. *Advance in Enzyme regulation*, 1977, 15: 285-300.

Determination of main peptide toxins from *Amanita pallidorosea* with HPLC and their antifungal action on *Blastomyces albicans*

Yuling Wang¹, Haiying Bao^{1, 2}, Lu Xu^{1, 2}, Tolgor Bau^{1*}

¹ Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, ² College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: [**Objective**] To detect peptide toxins in *Amanita pallidorosea* and to study the antifungal activities of peptide toxins against *Blastomyces albicans*. [**Methods**] We separated and identified peptide toxins and determined its contents in the fruiting body, pileus and the mixture of stipe and volva from *A. pallidorosea* by HPLC and ESI-MS methods. Meanwhile, we detected antifungal activities of the crude toxin and the separated peptide toxins against *Blastomyces albicans* JLC31680 and JLC31681 by the paper disk method. [**Results**] We totally got three peptide toxins: α -amanitin (α -AMA), β -amanitin (β -AMA) and phalloidin (PHD). The contents of α -AMA, β -AMA and PHD were 30.3 mg/g, 6.99 mg/g and 9.95 mg/g in fruiting body, and 45.0 mg/g, 11.1 mg/g and 11.3 mg/g in pileus. The contents of α -AMA and PHD were 11.7 mg/g and 7.98 mg/g in the mixture of stipe and volva, but the β -AMA was not detected in this part. The inhibition ratio of the crude toxin and α -AMA, β -AMA and PHD to *B. albicans* JLC31680 were 11.96%, 32.52%, 23.29% ($P < 0.01$) and 15.46% ($P < 0.05$). The inhibition ratio of the crude toxin and β -AMA to *B. albicans* JLC31681 was 10.16% and 11.10% ($P < 0.01$), while that of α -AMA's was 6.89% ($P < 0.05$). [**Conclusions**] *A. pallidorosea* is a new resource of peptide toxins with antifungal activity.

Keywords: *Amanita*, peptide toxin, antifungal action

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Science and Technology Project of Education Department, Jilin Province.

* Corresponding author. Tel: +86-431-84532917; E-mail: junwusuo@126.com

Received: 13 March 2011/Revised: 24 March 2011