

食源性疾病

云南楚雄3种环柄菇中鹅膏肽类毒素的检测与分析

许苹¹,余成敏²,姚群梅²,李吉品¹,唐燕²,吴兆华²,钟加菊²

(1. 大理大学药学院,云南大理 671000;2. 楚雄彝族自治州人民医院,云南楚雄 675000)

摘要:目的 对云南楚雄地区3种环柄菇中的6种鹅膏肽类毒素含量进行分析。方法 采集的蘑菇45℃烘干,采用形态学和分子生物学方法进行物种鉴定。将蘑菇分为3个不同生长时期(生长期、成熟期、衰老期)和不同组织部位(菌盖、菌柄、整体),用超纯水超声提取毒素,采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法、电喷雾(ESI)模式下多反应监测(MRM)方式检测,外标法定量。结果 细环柄菇(*Lepiota clypeolaria*)和冠状环柄菇(*Lepiota cristata*)未检出鹅膏肽类毒素,肉褐鳞环柄菇(*Lepiota brunneoincarnata*)中检测出 α -鹅膏毒肽(α -AMA)、 β -鹅膏毒肽(β -AMA),其中 α -AMA含量高于 β -AMA。 α -AMA总含量成熟期(1.67 mg/g)>生长期(1.56 mg/g)>衰老期(0.40 mg/g), β -AMA总含量成熟期(0.71 mg/g)>生长期(0.60 mg/g)>衰老期(0.14 mg/g)。两种毒素在生长期和成熟期的分布为:菌盖>菌柄,而衰老期为菌柄>菌盖。结论 楚雄地区的肉褐鳞环柄菇*L. brunneoincarnata*主要含有鹅膏毒肽,包括 α -AMA、 β -AMA、Amanin、Amaninamide,不含鬼笔毒肽及毒伞肽,并且在不同生长期、不同组织部位中的 α -AMA、 β -AMA含量具有差异,能够为该类蘑菇中毒的临床诊断及治疗提供参考。

关键词:环柄菇属;肉褐鳞环柄菇;超高效液相色谱-串联质谱法;毒蘑菇;鹅膏肽;云南省

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)06-0741-10

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.016

Detection and analysis of amatoxins in 3 species of *Lepiota* from Chuxiong, Yunnan Province

XU Ping¹, YU Chengmin², YAO Qunmei², LI Jipin¹, TANG Yan², WU Zhaohua², ZHONG Jiaju²

(1. College of Pharmacy, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. The People's Hospital of Chuxiong Yi Autonomous Prefecture, Yunnan Chuxiong 675000, China)

Abstract: Objective To analyze the content of 6 kinds of amatoxins in 3 species of *Lepiota* collected from Chuxiong of Yunnan Province. **Methods** The collected mushrooms were baked and dried at 45 °C, and species identification was carried out by morphological and molecular biology methods. The mushrooms were divided into three different growth periods (growth period, mature stage, aged stage) and different tissue parts (pileus, stipe, whole), and the toxins were extracted by ultrapure water ultrasound. The determination was performed by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray (ESI) in multiple-reaction monitoring (MRM) mode, and the content was quantitatively analyzed by external standard method. **Results** No amatoxins were detected in *Lepiota clypeolaria* and *Lepiota cristata*, while α -amanitin and β -amanitin were detected in *Lepiota brunneoincarnata*, and the content of α -amanitin was higher than β -amanitin. The total content of α -amanitin was highest in the mature stage (1.67 mg/g), followed by the grow stage (1.56 mg/g) and least in the aged stage (0.40 mg/g). And the total content of β -amanitin was also highest in the mature stage (0.71 mg/g), followed by the growth stage (0.60 mg/g) and lowest in the aged stage (0.14 mg/g). The cap part was richer in α -amanitin and β -amanitin than the stipe part in the growth and mature stages, while the content of α -amanitin and β -amanitin in the aged stage was higher in the stipe than in the pileus. **Conclusion** In Chuxiong Prefecture, Yunnan Province, the flesh-brown ring-stalk mushroom *L. brunneoincarnata* mainly contains Amatoxins, including α -AMA, β -AMA, Amanin, and Amaninamide, excluding phalloidin and virotoxin. The content of α -AMA and β -AMA varies in different growth periods and tissues, providing reference for the clinical diagnosis and treatment of poisoning by this type of mushroom.

收稿日期:2023-06-07

基金项目:云南省地方高校联合专项(202001BA070001-046);云南省重大科技专项(2018ZF009)

作者简介:许苹 女 硕士研究生 研究方向为野生蘑菇的毒素检测 E-mail:xupingree@163.com

通信作者:钟加菊 女 主管药师 研究方向为野生蘑菇中毒的临床诊断救治研究 E-mail:zhongjiaju1990@126.com

Key words: *Lepiota*; *Lepiota brunneoincarnata*; ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry; Poisonous mushrooms; Amatoxins; Yunnan Province

含鹅膏肽类毒素蘑菇是世界上毒性最强的蘑菇,70%~90%的蘑菇中毒死亡事件是由该类蘑菇引起^[1],成人死亡率为10%~20%,儿童为22%~50%^[2]。含鹅膏肽类毒素的蘑菇主要来自鹅膏菌属(*Amanita*)、环柄菇属(*Lepiota*)和盔孢伞属(*Galerina*)。环柄菇属(*Lepiota*)隶属担子菌门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)蘑菇科(Agaricaceae)^[3],目前世界上大约存在250~400种^[4]。在“中国生物志库·菌物”数据库中记录我国目前大约有150余种。含鹅膏肽类毒素的环柄菇属蘑菇中毒主要发生在我国的华北地区,中毒蘑菇主要以*L. brunneoincarnata*、褐鳞环柄菇(*Lepiota helveola*)、亚毒环柄菇(*Lepiota subvenenata*)、毒环柄菇(*Lepiota venenata*)、近肉红环柄菇(*Lepiota subincarnata*)为主^[5-8],在云南地区却鲜有报道。目前报道的环柄菇属蘑菇中毒事件中,云南地区环柄菇属中毒的主要物种为*L. brunneoincarnata*,而其他含鹅膏肽类毒素的环柄菇属物种的蘑菇在云南分布如何,以及毒素种类及含量未知。2021年云南昭通发生一起*L. brunneoincarnata*中毒事件^[9],2022年云南楚雄发生一起2人的*L. brunneoincarnata*中毒事件。

目前毒蘑菇中鹅膏毒肽的测定方法主要有液相色谱法和液相色谱-质谱法,其中液相色谱-质谱法有高效液相色谱-飞行时间质谱法^[10]和高效液相色谱-串联质谱法^[11-13],基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(Ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)在毒蘑菇的鹅膏毒素检测中有着灵敏度高、准确度高、检测方法快速,定量重现性好等特点,每个样品可在短时间内完成分析^[14]。在楚雄地区采集到了3个环柄菇属的物种(包括1种中毒患者进食的蘑菇),对其进行形态学和DNA分子鉴定,确定蘑菇的物种后,采用UPLC-MS/MS对3种环柄菇中6种主要鹅膏肽类毒素,包括: α -AMA、 β -AMA、 γ -鹅膏毒肽(γ -amanitin, γ -AMA)、羧基二羟鬼笔毒肽(Phalloidin, PCD),羧基三羟鬼笔毒肽(Phalloidin, PHD)的种类及含量进行分析,并且进一步分析患者采食后导致中毒的*L. brunneoincarnata* 3个不同生长期(生长期、成熟期、衰老期)中不同部位(菌盖、菌柄、整体)的毒素含量差异,为临床中毒患者的诊断治疗提供科学依据^[15]。

1 材料与方法

1.1 子实体采集

三种环柄菇子实体, CX202143 采自云南省楚雄州人力资源和社会保障局的花坛雪松下、CX202253 采自楚雄州大姚县赵家店、CX202205 采集自楚雄州姚安县左门乡。采集的3种环柄菇子实体标本在拍摄生境照片、观察形态、测量数据、自然干燥、编写号码、烘干处理后存放于楚雄州人民医院蘑菇中毒临床研究室。

1.2 主要仪器与试剂

AB SCIEX Triple Quad™ 4500MD 液相色谱串联质谱仪、ExionLC™ AD 高效液相色谱仪(美国 SCIEX 公司), Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μ m, 美国 Waters 公司), 820 HTD 超声清洗仪(中国青岛维斯特电子净化设备有限公司), ATY220 型分析天平(日本岛津公司), 莱卡 DM750 型光学显微镜(德国莱卡公司), 体式显微镜(中国奥斯微公司), AGS4800 实时荧光定量 PCR 分析仪(中国安誉科技公司)。

4% KOH、1% 刚果红(Solarbio 公司), Phire Plant Deric PCR 基因组 DNA 提取试剂盒(Finnzymes Oy, Finland), 引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')由昆明擎科生物科技有限公司合成, α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、PCD 及 PHD 标准品(纯度 \geq 99%, ENZO Life Science 公司), PSC 标准品由湖南师范大学生命科学学院真菌研究室陈作红教授赠送, 甲醇(质谱级, Merck 公司), 超纯水(实验室自制), 乙酸铵(质谱级, 上海北诺生物科技有限公司)。

1.3 物种鉴定

观察蘑菇样本子实体的菌盖菌柄的形态特征及颜色;取烘干后的子实体菌盖,用尖镊取出菌褶,菌褶切片后用4% KOH 和1% 刚果红染色,在光学显微镜下观察并测量孢子、担子,用显微成像系统拍摄显微结构图片。查阅文献进行检索、比对、定种。

取干子实体菌盖的一小部分研磨,称量30.00 mg,使用基因组 DNA 提取试剂盒提取样本 DNA,保存于-20℃冰箱。用引物 ITS4 和 ITS5 进行25.00 μ L 体系的 PCR 扩增:金牌 Mix(Green)22.00 μ L, ITS4/ITS5 引物(20 μ mol/L)各0.50 μ L,模板 DNA 2.00 μ L。扩展程序为:95℃预变性3.00 min;94℃变性40.00 s,54℃复性45.00 s,72℃延伸1.00 min,35个循环;

72 °C延伸 10.00 min;4 °C保温 24.00 h。扩增产物送昆明擎科生物科技有限公司测序,对所获结果进行校对、拼接,拼接成功后在 NCBI 数据库中使用 Blast 对其进行检验比对,确定是环柄菇属的 ITS 序列以后,将所得序列上传至 NCBI,获得序列登录号。利用 MEGA11.0 软件构建系统发育树,发育树的每个分支的统计学显著性分析以最大似然法进行检验,重复次数为 1 000 次。

1.4 毒素检测

1.4.1 毒素提取

将采集的蘑菇分为 3 个不同生长时期(生长期:菌柄伸长,菌盖下包着部分菌柄,菌褶包被在里面;成熟期:菌盖平展,菌盖边缘与菌柄之间的菌膜开裂,菌褶舒展清晰可见;衰老期:菌盖外翻或裂开,菌褶颜色变深)、不同生长时期的不同部位(菌盖、菌柄、整体),各个样本烘干后研磨成粉末,按 25.00 mg:2.00 mL(m/V)的料液比提取毒素,分别称取 50.00 mg 蘑菇粉末,加入 2.00 mL 超纯水混匀,每个样本平行配置 3 份测定。粉末与水溶剂涡旋混匀后超声 15 min,再涡旋 1.00 min 充分混匀,在 12 000 r/min 条件下离心 10.00 min,取出第一次提取的上清液放入离心管中;再向样本中加入 2.00 mL 水溶剂重复以上操作,将上清液取出与第一次提取的混匀得到 4.00 mL 提取液,混匀后用超纯水稀释 10 倍,用 0.22 μm 水系滤膜过滤,待测。

1.4.2 配制标准品

精确称量 α-AMA、β-AMA、γ-AMA、PSC、PCD 及 PHD 标准品,用质谱级甲醇配制成浓度为 1.00 mg/mL 的混合标准溶液备用,再稀释配制成 4.00、3.00、2.00、1.00、0.50、0.10 μg/mL 的标准工作溶液。

1.4.3 色谱条件

选用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100.0 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 40 °C;进样量为 10.00 μL;样品温度 15 °C;A 相为 5.00 mmol/L 乙酸铵,B 相为甲醇;流速为 0.30 mL/min;梯度洗脱设置为:15% B 0.00 min→2.50 min,35% B→4.00 min,99% B→6.00 min,99% B→8.00 min,35% B→8.10 min,15% B→10.00 min。

1.4.4 质谱条件

离子化模式:电喷雾离子源(Electrospray ionization,ESI),负离子模式;质谱扫描方式:多反应离子监测 MRM-IDA-EPI;气帘气压力 CUR:30 psi;喷雾电压:4 500 V(-);离子源温度:650 °C;雾化气压力:45 psi;辅助加热气压力:60 psi。每个离子对是根据优化的去簇电压(Declustering potential,DP)和碰撞能(Collision energy,CE)进行扫描检测,6 种

蘑菇毒素的质谱条件参数见表 1。

表 1 6 种鹅膏毒肽和鬼笔毒肽的质谱条件参数

Table 1 Mass spectrum condition parameters of 6 kinds of amanitins and phallotoxins

化合物	出峰时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	DP/V	CE/eV
α-AMA	3.30	917.40	899.40	-190	-44
		917.40	560.20	-190	-67
β-AMA	2.97	918.40	900.30	-190	-36
		918.40	205.10	-190	-53
γ-AMA	3.73	901.40	883.30	-190	-36
		901.40	849.40	-190	-45
PCD	4.25	845.40	771.30	-160	-51
		845.50	827.40	-160	-42
PHD	4.48	787.40	743.30	-210	-45
		787.40	582.20	-210	-51
PSC	3.94	861.40	787.30	-160	-50
		861.40	825.40	-160	-43

注:DP:去簇电压;CE:碰撞电压

2 结果

2.1 物种鉴定

CX202143 子实体小型菌盖生长向四周撕裂成同心环状的块状鳞片,菌柄无明显菌环,有像一个菌环似的膜质区,膜质区以下部分具有与盖表鳞片同色的鳞片,不规则环状排列(图 1A)。担孢子(6.00~9.00) μm×(4.00~5.00) μm,椭圆形,类糊精质,刚果红染色为砖红色(图 2A2);担子(18.00~28.00) μm×(5.00~9.00) μm,无色,棒状,观察到 1~4 个孢梗(图 2A1)。CX202253 的子实体小型至中形,菌盖表面茶褐色鳞片,菌柄上部具有白色菌环,易脱落(图 1B),担孢子(11.00~14.00) μm×(5.00~7.00) μm,纺锤形近杏仁形,类糊精质,刚果红染色为浅红色至红色(图 2B2),担子(21.00~45.00) μm×(7.00~18.00) μm,无色,棒状,1~2 个孢梗(图 2B1)。CX202205 的子实体小型至中形,菌盖被红褐色至褐色鳞片,菌柄表面光滑无鳞片(图 1C),担孢子(5.00~8.00) μm×(2.00~4.00) μm,麦角形或近三角形,非类糊精质,刚果红染色不着色或着浅色(图 2C2),担子(13.00~25.00) μm×(5.00~8.00) μm,无色,棒状,观察有 2 个孢梗(图 2C1)。

3 个蘑菇样品的 DNA 的 ITS 序列已上传 NCBI,样本 CX202143、CX202253、CX202205 的登录号分别为 OQ363286、OQ379920、OQ379910,序列长度分别为 702、640、736 bp,结果见表 2 和图 3。将测得的 3 个标本 ITS 序列在 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析,选择具有较高相似度的序列及一个外群(KX870849.1),共获得 13 个 DNA 序列,构建系统发育树。比对结果显示样本 CX202253 为细环柄菇 *L. clypeolaria*,CX202205 为冠状环柄菇 *L. cristata*,



注:A:肉褐鳞环柄菇;B:细环柄菇;C:冠状环柄菇
图1 三种蘑菇子实体

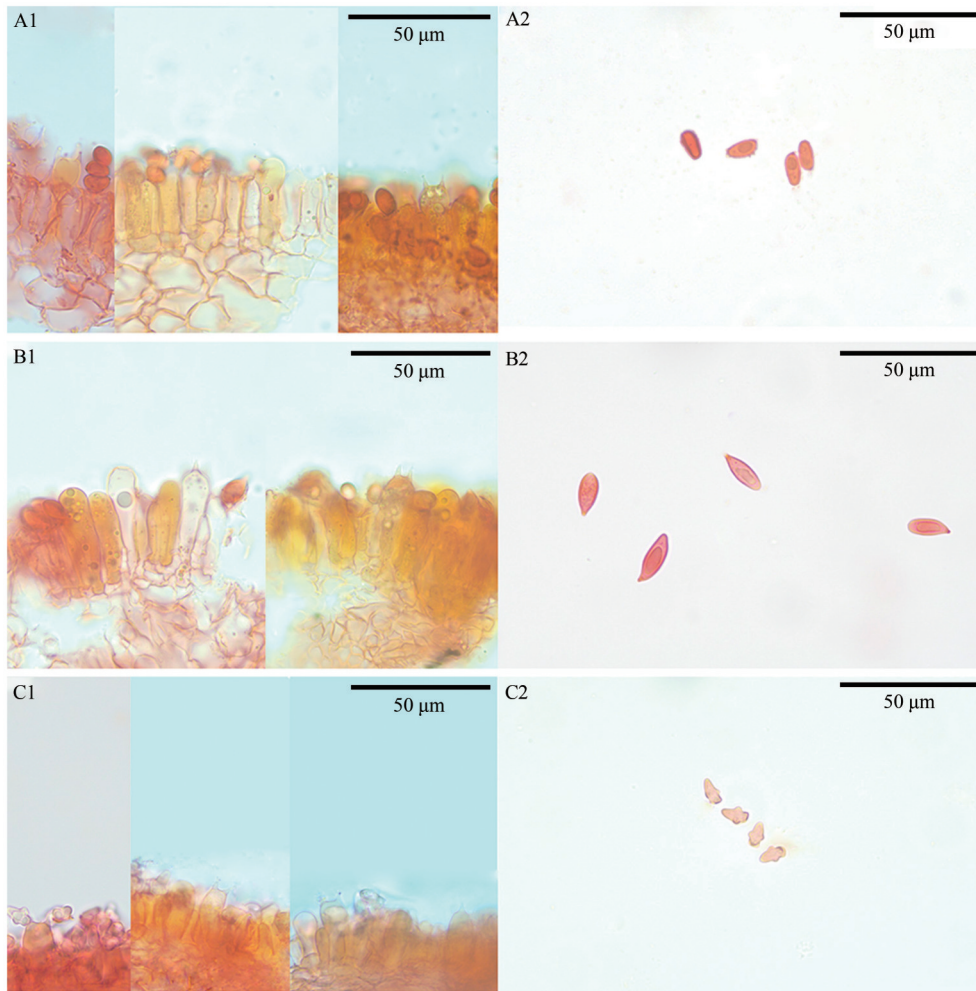
Figure 1 Basidiomata of the 3 kinds of mushrooms

CX202143 为肉褐鳞环柄菇 *L. brunneoincarnata*, 3 个物种各自聚为一枝,支持率都为 100(图 4)。

参考杨祝良^[3]《中国真菌志·环柄菇类》,经形态学和分子学鉴定,样本 CX202143 为肉褐鳞环柄菇 *L. brunneoincarnata*, CX202205 为冠状环柄菇 *L. cristata*, CX202253 为细环柄菇 *L. clypeolaria*。

2.2 毒素检测

本研究用 UPLC-MS/MS 对楚雄地区的 3 种环柄菇中的 6 种鹅膏肽类毒素进行检测,通过保留时间以及 1 个母离子和 2 个子离子进行定性分析。结果显示 *L. clypeolaria* 及 *L. cristata* 中未检测出鹅膏毒素。*L. brunneoincarnata* 中则检测出 α -AMA 和 β -AMA,未检出 γ -AMA 及 3 种鬼笔毒肽,在蘑菇提取物的色谱图中检测到另外两种与上述 6 种毒素保留时间不同的毒素组分 7 和组分 8(图 5B,图 6)。进一步对提取液进行离子扫描,其两个未知组分的质核比分别为 902.5/883.8 和 901.4/883.2(图 7),根据扫描结果以及 SARAWI、范凤霞等的研究成果综合分析^[4,16],组分 7 和组分 8 分别为三羟鹅膏毒肽(Amanin)和三羟鹅膏毒肽酰胺(Amaninamide)(图 5B 和图 6)。



注:A:肉褐鳞环柄菇(A1:担子;A2:孢子);B:细环柄菇(B1:担子;B2:孢子);C:冠状环柄菇(C1:担子;C2:孢子)

图2 三种蘑菇显微结构

Figure 2 Microstructure of three mushrooms

表2 物种的序列信息

Table 2 Sequence information for three species

物种编号	物种名	序列号	采集地
CX202143	<i>Lepiota brunneoincarnata</i>	OQ363286	楚雄州人力资源和社会保障局
CX202253	<i>Lepiota clypeolaria</i>	OQ379920	楚雄州大姚县赵家店
CX202205	<i>Lepiota cristata</i>	OQ379910	楚雄州姚安县左门乡

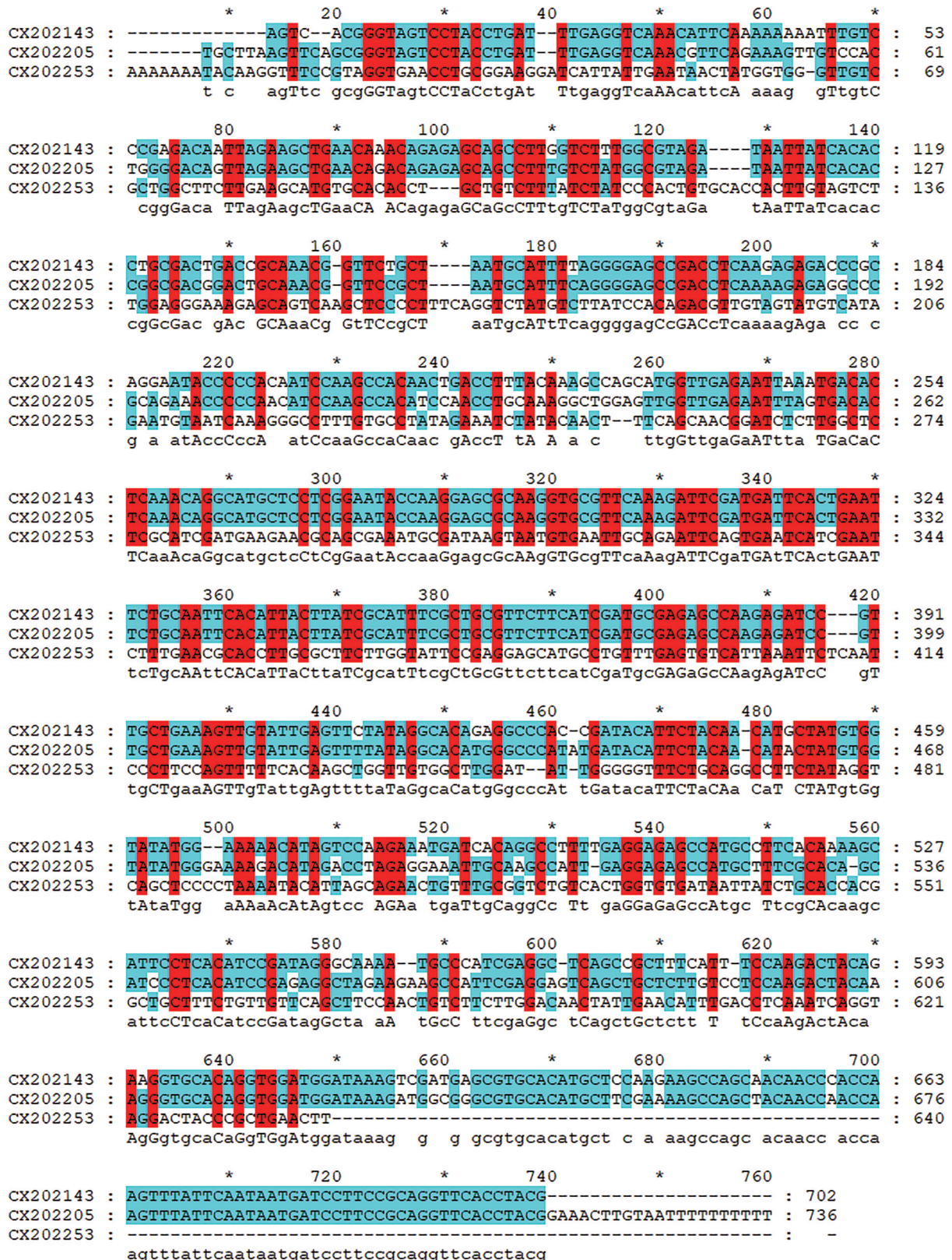
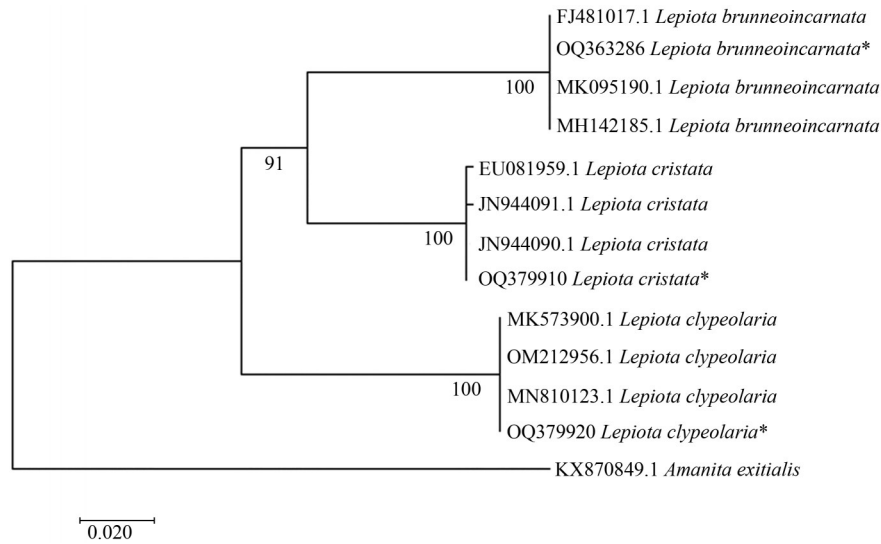


图3 三个物种的DNA测序序列图

Figure 3 DNA sequence comparison of the three species



注:分支点上的数值为自展支持率,*为试验所测标本,*Amanita exitialis*为外群

图4 利用最大似然法基于ITS构建的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree based on combined ITS gene by maximum likelihood

进一步定量分析了肉褐鳞环柄菇不同生长期,不同部位的毒素 α -AMA和 β -AMA的含量。*L. brunneoincarnata*的 α -AMA在生长期的毒素总量为 (1.56 ± 0.24) mg/g,成熟期为 (1.67 ± 0.40) mg/g,衰老期为 (0.40 ± 0.07) mg/g, β -AMA在生长期的毒素总量为 (0.60 ± 0.24) mg/g,成熟期为 (0.71 ± 0.03) mg/g,衰老期为 (0.14 ± 0.03) mg/g。两种毒素的总含量均为成熟期>生长期>衰老期, α -AMA含量高于 β -AMA。结果与文献报道一致,即毒素含量在成熟期时达到最高,随着子实体的衰老,毒素含量逐渐降低^[8,17-18]。

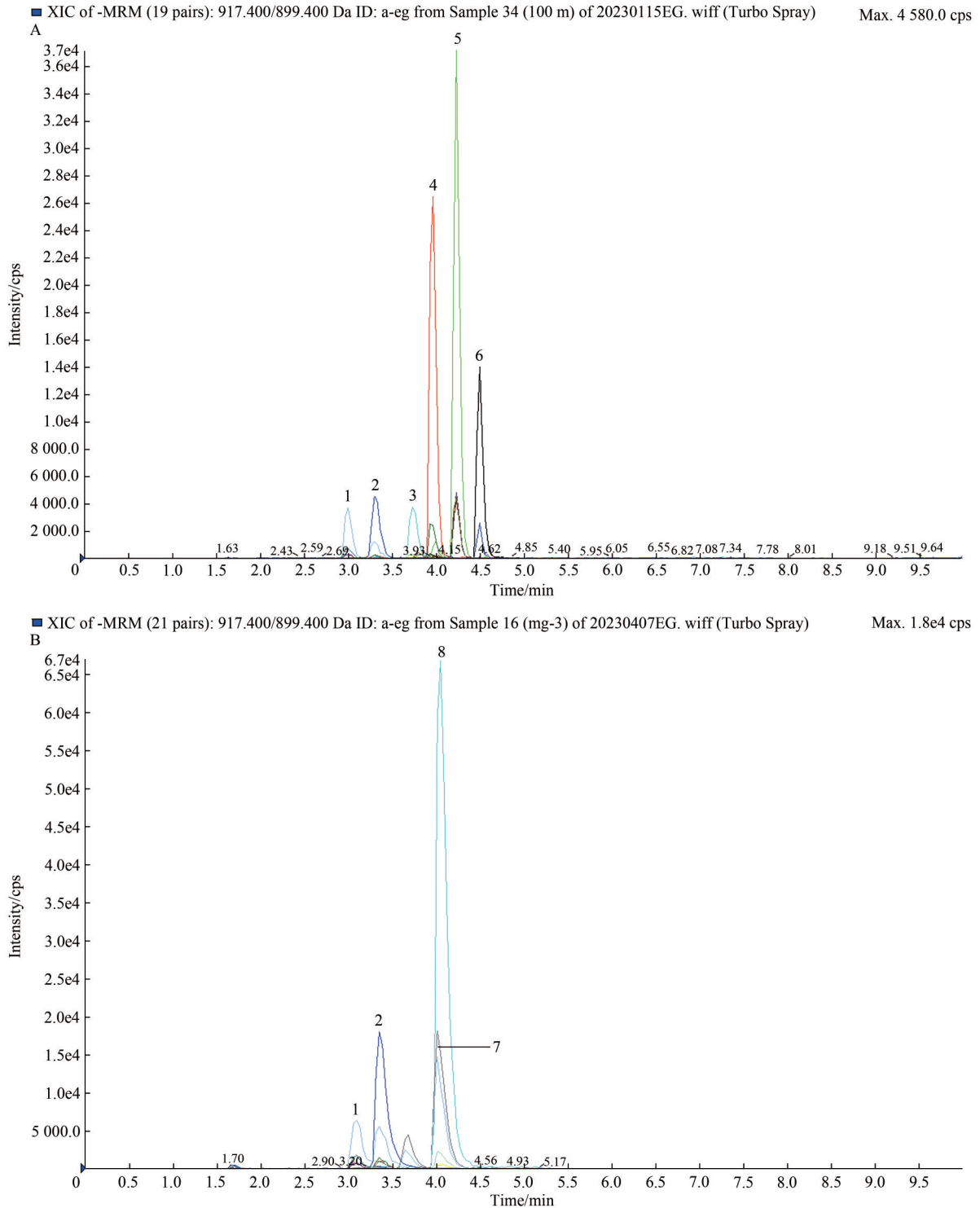
此外还检测了*L. brunneoincarnata*在不同生长期不同部位的毒素含量。生长期毒素含量分布菌盖高于菌柄,菌盖中的 α -AMA含量为 (2.72 ± 0.08) mg/g,菌柄中的为 (1.00 ± 0.01) mg/g;菌盖中的 β -AMA含量为 (0.84 ± 0.04) mg/g,菌柄中的为 (0.52 ± 0.02) mg/g。成熟期的毒素含量分布菌盖高于菌柄,菌盖中的 α -AMA含量为 (2.80 ± 0.24) mg/g,菌柄中的为 (0.87 ± 0.08) mg/g;菌盖中的 β -AMA含量为 (0.91 ± 0.13) mg/g,菌柄中的为 (0.51 ± 0.05) mg/g。衰老期的毒素含量分布菌柄高于菌盖,菌盖中的 α -AMA含量为 (0.21 ± 0.04) mg/g,菌柄中的为 (0.68 ± 0.06) mg/g,菌盖中的 β -AMA含量为 (0.10 ± 0.01) mg/g,菌柄中的为 (0.26 ± 0.02) mg/g,可能因为鹅膏毒肽为水溶性的环肽毒素,在成熟衰老过程中,雨水的冲刷可能导致毒素的流失,衰老期菌盖中毒素流失较菌柄快,导致了菌盖毒素含量低于菌柄。

3 讨论

本研究分析了云南楚雄3种环柄菇中的6种

鹅膏肽类毒素(α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、PSC、PCD及PHD)的种类及含量,*L. clypeolaria*和*L. cristata*中未检测出鹅膏肽类毒素,*L. brunneoincarnata*中检出 α -AMA、 β -AMA。环柄菇属(*Lepiota*)主要分为6个组^[4],目前发现含有鹅膏毒肽毒素的大部分都集中在卵孢环柄菇组(*Lepiota Sect. Ovisporae*),包括*L. brunneoincarnata*、*L. helveola*、紫褐鳞环柄菇(*Lepiota brunneolilacea*)、*L. subincarnata*、土黄环柄菇(*Lepiota spiculata*)、*L. venenata*、*L. subvenenata*、*L. josserrandii*、*L. elaiophylla*等物种^[4,16-19]。而其他一些组别中的物种目前尚未检测出鹅膏肽类毒素,包括*L. clypeolaria*和*L. cristata*^[20]。因此许多研究者认为鹅膏毒素在蘑菇中的分布可作为柄菇属的分类学特征来描述^[4]。

鹅膏肽类毒素包括鹅膏毒肽(Amanitins)、鬼笔毒肽(Phallotoxins)及毒伞肽(Virotoxins)。鹅膏毒肽是一种双环八肽,已分离纯化的有9种,分别为 α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、 ϵ -鹅膏毒肽(ϵ -Amanitin)、三羟鹅膏毒肽(Amanin)、三羟鹅膏毒肽酰胺(Amaninamide)、二羟鹅膏毒肽酰胺(Amanullin)、二羟鹅膏毒肽羧酸(Amanunic acid)、二羟鹅膏毒肽酰胺原(Proamanullin)。鬼笔毒肽是一种双环七肽,已分离鉴定出的鬼笔毒肽类毒素有7种,分别为一羟鬼笔毒肽(Phalloin, PHN)、二羟鬼笔毒肽(Phalloidin, PHD)、三羟鬼笔毒肽(Phallisins, PHS)、一羟鬼笔毒肽原(Prophalloin, PPN)、羧基一羟鬼笔毒肽(Phallacin, PCN)、羧基二羟鬼笔毒肽(Phallacidin, PCD)、羧基三羟鬼笔毒肽(Phallisacin, PSC)。毒伞肽为单环七肽,已经发现的有6种,分别为二羟毒伞素(Viroidin)、脱氧二羟毒伞素(Desoxoviroidin)、丙氨酸羟毒伞素



注:A:标准品;B:肉褐鳞环柄菇;1: β -AMA;2: α -AMA;3: γ -AMA;4:PSC;5:PCD;6:PHD;7:Amanin;8:Amaninamide

图5 8种鹅膏毒素分离的MRM图谱

Figure 5 Total ion chromatogram of the eight amanita peptide toxins

(Ala-viroidin)、丙氨酸脱氧二羟毒伞素(Ala-desoxoviroidin)、三羟毒伞素(Viroidin)、脱氧羟毒伞素(Desoxoviroidin)^[21-22]。本研究在 *L. brunneoincarnata* 中检测出 α -AMA、 β -AMA、amanin、amaninamide, 未检出 γ -AMA 及鬼笔毒肽。YILMAZ 等^[17]对土耳其地区的 *L. brunneoincarnata* 进行了毒素检测,检测出 α -AMA、 β -AMA 及微量的 γ -AMA,还有一个未知

毒素,可能是 Amaninamide;SUN 等^[2]检测了采集自山东地区的 *L. brunneoincarnata*,主要含有 α -AMA、 β -AMA 及 γ -AMA,不含鬼笔毒肽,但未对其他鹅膏肽类毒素进行检测;范凤霞^[16]和 SGAMBELLURI 等^[18]从采集自山东、辽宁、四川地区和意大利的 *L. brunneoincarnata* 都检测出了 α -AMA、 β -AMA、Amanin、Amaninamide,未检出 γ -AMA 及其他鹅膏肽类毒

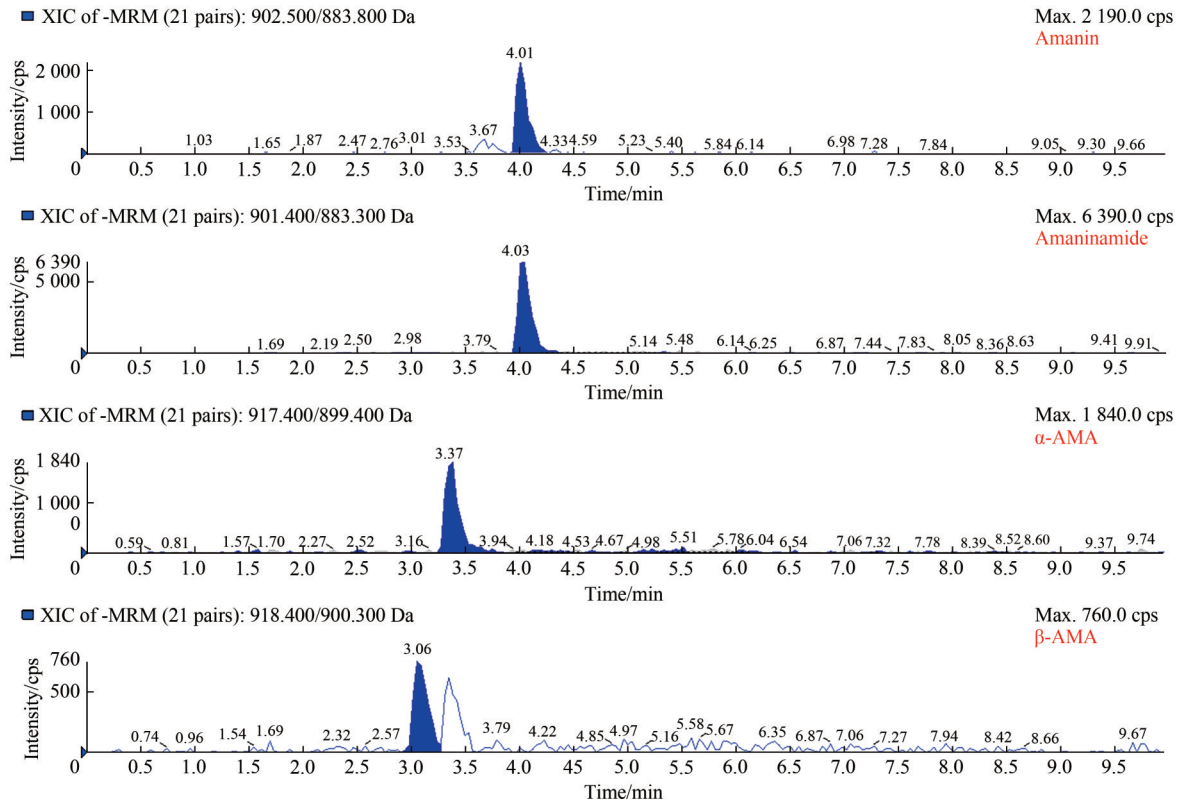


图6 肉褐鳞环柄菇中毒素分离的MRM图谱

Figure 6 Total ion chromatogram of the *Lepiota brunneoincarnata*.

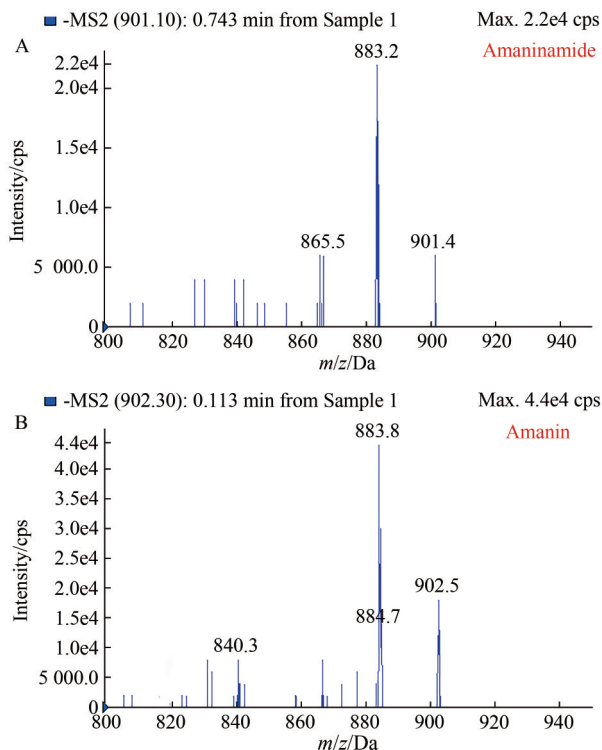


图7 肉褐鳞环柄菇中 amaninamide 和 amanin 的二级质谱图

Figure 7 The MS/MS spectra of amaninamide and amanin in *Lepiota brunneoincarnata*

素; SARAWI 等^[4]从采集自德国法兰克福地区的 *L. brunneoincarnata* 中检出 α -AMA 和 Amaninamide, 未检出 β -AMA、 γ -AMA。由此可见, *L. brunneoincarnata*

表3 肉褐鳞环柄菇不同生长时期不同组织部位毒素的含量 (n=3)

Table 3 Contents of toxins in different tissues at different development stages of *Lepiota brunneoincarnata* (n=3)

生长时期	部位	α -amanitin/(mg/g)	β -amanitin/(mg/g)
生长期	菌盖	2.72±0.08	0.84±0.04
	菌柄	1.00±0.01	0.52±0.02
	整体	1.56±0.24	0.60±0.24
成熟期	菌盖	2.80±0.24	0.91±0.13
	菌柄	0.87±0.08	0.51±0.05
	整体	1.67±0.40	0.71±0.03
衰老期	菌盖	0.21±0.04	0.10±0.01
	菌柄	0.68±0.06	0.26±0.02
	整体	0.40±0.07	0.14±0.03

主要含有鹅膏毒肽, 包括 α -AMA、 β -AMA、 γ -AMA、Amanin、Amaninamide, 不含鬼笔毒肽及毒伞肽, 而不同地区的 *L. brunneoincarnata* 毒素种类有差异。

L. brunneoincarnata 中毒素的含量也存在明显的地区差异。文献报道的 α -AMA 含量约在 0.69~2.38 mg/g 间, β -AMA 约在 0.56~1.97 mg/g 间, 其中土耳其的毒素含量约为山东地区的 5~10 倍。本研究的 *L. brunneoincarnata* 中的 α -AMA 约为 1.61 mg/g, β -AMA 为 0.61 mg/g, 其含量低于土耳其的检出量, 同时也低于山东地区和辽宁地区的检出量, 与四川地区的检出量接近^[16-18]。文献报道^[2, 15-17]的 *L. brunneoincarnata* 毒素的分布为菌盖>菌柄, 成熟期>生长期>衰老期, 与之不同的是在本文研究中显示,

衰老期两种毒素分布为菌柄>菌盖,但整体趋势与之相似。本研究首次揭示了云南楚雄地区的 *L. brunneoincarnata* 不同生长阶段的不同部位的毒素含量差异,为云南省菌物资源的开发及中毒的诊断及治疗提供参考。云南省其他地区是否有 *L. brunneoincarnata*,或者其他含鹅膏肽类毒素的环柄菇,以及环柄菇中的毒素种类及含量如何还未知,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] GIANNINI L, VANNACCI A, MISSANELLI A, et al. Amatoxin poisoning: A 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients [J]. *Clinical Toxicology*, 2007, 45(5): 539-542.
- [2] SUN J, ZHANG H S, LI H J, et al. A case study of *Lepiota brunneoincarnata* poisoning with endoscopic nasobiliary drainage in Shandong, China [J]. *Toxicon*, 2019, 161: 12-16.
- [3] 杨祝良. 中国真菌志[M]. 第52卷. 北京: 科学出版社, 2019: 69-96.
YANG Z L. *Flora Fungorum sinicorum* [M]. Volume 52. Beijing: Science Press, 2019: 69-96.
- [4] SARAWI S, SHI Y N, LOTZ-WINTER H, et al. Occurrence and chemotaxonomical analysis of amatoxins in *Lepiota* spp. (agaricales) [J]. *Phytochemistry*, 2022, 195: 113069.
- [5] 陈作红, 杨祝良, 图力古尔. 毒蘑菇识别与中毒防治[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 98-101.
CHEN Z H, YANG Z L, TULI G E. *Poisonous mushrooms recognition and poisoning treatment* [M]. Beijing: Science Press, 2016: 98-101.
- [6] 图力古尔, 包海鹰, 李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. *菌物学报*, 2014, 33(3): 517-548.
TULI G E, BAO H Y, LI Y. A revised checklist of poisonous mushrooms in China [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(3): 517-548.
- [7] 蔡箐, 陈作红, 何正蜜, 等. 毒环柄菇——在中国引起蘑菇中毒事件的新物种[J]. *菌物研究*, 2018, 16(2): 63-69.
CAI Q, CHEN Z H, HE Z M, et al. *Lepiota venenata*, a new species related to toxic mushroom in China [J]. *Journal of Fungal Research*, 2018, 16(2): 63-69.
- [8] ZHANG Y Z, ZHANG K P, ZHANG H S, et al. *Lepiota subvenenata* (Agaricaceae, Basidiomycota), a new poisonous species from southwestern China [J]. *Phytotaxa*, 2019, 400(5): 265.
- [9] 李海蛟, 章轶哲, 刘志涛, 等. 云南蘑菇中毒事件中的毒蘑菇物种多样性[J]. *菌物学报*, 2022, 41(9): 1416-1429.
LI H J, ZHANG Y Z, LIU Z T, et al. Species diversity of poisonous mushrooms causing poisoning incidents in Yunnan province, Southwest China [J]. *Mycosystema*, 2022, 41(9): 1416-1429.
- [10] 柳洁, 丁文婕, 何碧英, 等. 超高效液相色谱-电喷雾离子化-四级杆飞行时间串联质谱指纹图谱检测毒蕈中4种鹅膏肽类毒素[J]. *分析化学*, 2013, 41(4): 500-508.
LIU J, DING W J, HE B Y, et al. Identification of four toxin peptides from *Amanita* in poisonous mushroom by mass spectrum fingerprint based on ultra performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time of flight-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(4): 500-508.
- [11] 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): 39-44.
WEI J H, CHEN J, WU B D, et al. Determination of *Amanita* peptides in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(3): 39-44.
- [12] 郎乐, 王庆峰, 刘斌. 超高效液相色谱-串联质谱法测定野生蘑菇中的6种鹅膏肽类毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(6): 1506-1510.
LANG L, WANG Q F, LIU B. Determination of 6 kinds of amatoxins and phallotoxins in wild mushrooms by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(6): 1506-1510.
- [13] 刘阳, 栾杰, 林倩. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定云南野生致命鹅膏菌中的毒伞肽和毒肽毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3756-3761.
LIU Y, LUAN J, LIN J. Rapid determination of amanitins and phallotoxins in Yunnan *Amanita exitialis* by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(10): 3756-3761.
- [14] 谭建林, 曾明梅, 赵秀琳, 等. 野生菌中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽检验方法及样品处理技术研究进展[J]. *化学分析计量*, 2023, 32(8): 115-120.
TAN J L, ZENG M M, ZHAO X L, et al. Research progress in the detection method of amanita and phallotoxins and pretreatment technology for wild mushroom sample [J]. *Chemical Analysis And Meterage*, 2023, 32(8): 115-120.
- [15] 钟加菊, 姚群梅, 李海蛟, 等. 云南楚雄致命鹅膏中环肽毒素的检测与分析[J]. *菌物学报*, 2020, 39(9): 1766-1773.
ZHONG J J, YAO Q M, LI H J, et al. Detection and analysis of cyclopeptides in *Amanita exitialis* from Chuxiong Prefecture, Yunnan province [J]. *Mycosystema*, 2020, 39(9): 1766-1773.
- [16] 范凤霞. 环柄菇属蘑菇中肽类毒素的检测与鉴定[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
FAN F X. *Detection and identification of peptide toxins in Agaricus campyloides* [D]. Changsha: Hu'nan Normal University, 2019.
- [17] YILMAZ I, BAKIRCI S, AKATA I, et al. Toxin content and toxicological significance in different tissues and development stages of *Lepiota brunneoincarnata* mushroom [J]. *Toxin Reviews*, 2015, 34(3): 109-114.
- [18] SGAMBELLURI R M, EPIS S, SASSERA D, et al. Profiling of amatoxins and phallotoxins in the genus *Lepiota* by liquid chromatography combined with UV absorbance and mass spectrometry [J]. *Toxins*, 2014, 6(8): 2336-2347.
- [19] ANGELINI C, VIZZINI A, JUSTO A, et al. First report of a neotropical agaric (*Lepiota spiculata*, agaricales, basidiomycota) containing lethal α -amanitin at toxicologically relevant levels [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1833.
- [20] YILMAZ I, AKATA I, BAKIRCI S, et al. *Lepiota cristatadoes*

- not contain amatoxins or phallotoxins[J]. *Toxin Reviews*, 2018, 37(2): 149-153.
- [21] 秦琪, 田恩静, 包海鹰. 蘑菇毒素分类及其结构式[J]. 菌物研究, 2022, 20(2): 128-140.
- QIN Q, TIAN E J, BAO H Y. The classification and structures of mushroom toxins[J]. *Journal of Fungal Research*, 2022, 20(2): 128-140.
- [22] 李林静, 李高阳, 谢秋涛. 毒蘑菇毒素的分类与识别研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 383-387.
- LI L J, LI G Y, XIE Q T. Research progress on poisonous mushroom toxins classification and recognition[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2013, 25(4): 383-387.