

灰花纹鹅膏中三个鹅膏毒肽的分离和结构研究^{* *}杨亚滨¹ 胡劲松² 陈作红^{2*} 谭宁华^{1*}

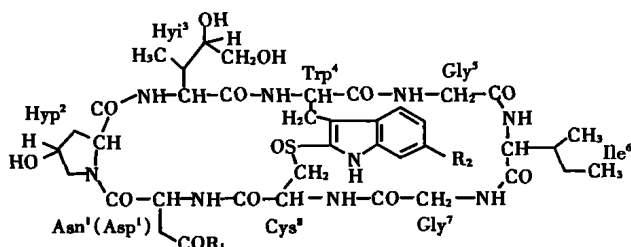
(1. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 昆明 650204;

2. 湖南师范大学生命科学学院真菌研究室 长沙 410081)

摘 要 从灰花纹鹅膏(*Amanita fuliginea*)中分离得到3个已知鹅膏毒肽类成分,利用波谱方法(¹H-NMR、¹³C-NMR、2D-NMR和FAB-MS等)对这些结构较为复杂的环肽类成分进行了鉴定,结构分别为 α -Amanitin、 β -Amanitin和Amanin。

关键词 灰花纹鹅膏;鹅膏毒肽;环肽

灰花纹鹅膏(*Amanita fuliginea* Hongo)属于担子菌亚门、伞菌目、鹅膏菌属真菌,是东亚特有种,目前仅日本和我国有分布。近年来在我国南方一些地区频频发生毒蘑菇中毒事件,我们调查发现导致中毒死亡的50%是由灰花纹鹅膏所引起^[1]。鹅膏菌中的毒素主要是环肽类毒素,根据其结构又分为鹅膏毒肽(amatoxins)、鬼笔毒肽(phallotoxins)和毒伞素(virotaxins)三类^[2]。我们发现灰花纹鹅膏中毒环肽的含量较高^[3],并从中分离鉴定了3个已知鹅膏毒肽类成分 α -Amanitin(1)、 β -Amanitin(2)和Amanin(3)。本文介绍其分离和结构研究。



1 $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{OH}$; 2 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$; 3 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

化合物1为白色粉末,环肽检测反应为阳性^[4]。FAB⁻-MS显示其分子量为918;高分辨FAB⁻-MS给出其分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_1$ 。碳谱显示在 δ 168.8~173.2处有8个氨基酸CO峰、 δ 42.6~63.4处有8个氨基酸 α -C峰;氢谱显示在 δ 10.40~8.38处有7个氨基酸NH峰、 δ 6.05~3.62处有8个氨基酸 α -H峰。通过各种2D-NMR技术包括

HMQC、COSY、TOCSY、HMBC鉴定化合物1中的氨基酸残基为 γ , δ -diOH Ile (Hyl)、2-SO-6-OH Trp (Trp)、Gly、Ile、Gly、SO Cys (Cys)、Asn和 γ -OH Pro (Hyp)。应用2D-NMR技术包括HMBC和ROESY找到化合物1中8个氨基酸残基的序列为-N-Hyl-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-CO-;同时Cys残基中 β -C和 β -H的化学位移值偏低场,加之分子中还剩余一个不饱和度,说明Cys残基的 β 位与Trp的2位通过SO相连。因此化合物1的结构鉴定为 α -Amanitin,与文献值^[5]一致。其碳谱和氢谱数据见表1。

化合物2为白色粉末,环肽检测反应为阳性^[4]。FAB⁻-MS显示其分子量为919;高分辨FAB⁻-MS给出其分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{S}_1$ 。质谱、碳谱和氢谱与化合物1比较少了一个N、多了一个O即化合物1中的残基Asn变成了Asp,其它一致。因此化合物2的结构鉴定为 β -Amanitin,与文献值^[5]一致。其碳谱和氢谱数据见表1。

化合物3为白色粉末,环肽检测反应为阳性^[4]。FAB⁺-MS显示其分子量为903;高分辨FAB⁺-MS给出其分子式为 $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_1$ 。质谱、碳谱和氢谱与化合物2比较少了一个O,除了Trp的6位没有O取代外,其它一致。因此化合物3的结构鉴定为Amanin。其碳和氢信号为首次全归属,具体结果见表1。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

高效液相色谱系统为Waters Delta 600型,Waters 2487紫外检测器,杭州英谱公司色谱工作站,分离柱为250 $\times$ 10 mm,YWG C18,10 μm 的半

收稿日期:2003-05-13 修回日期:2003-06-02

* 通讯联系人 (Corresponding author)。E-mail: chzh@mail.hunnu.edu.cn; nhtan@mail.kib.ac.cn。

** 本工作得到国家自然科学基金(30070005)、云南省自然科学基金(2001B055M)和中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室基金资助。

制备柱;核磁共振仪用 Bruker DRX-500 NMR 型测定。灰花纹鹅膏 2001 年 6~7 月采自湖南省长定, TMS 为内标;质谱用 VG Autospec-3000 型质谱沙县。

表 1 化合物 1~3 的碳谱和氢谱数据 (in C_5D_5N , 500 MHz for δ_H , 125 MHz for δ_C , TMS).

Table 1 1H and ^{13}C NMR spectral data of compounds 1~3 (in C_5D_5N , 500 MHz for δ_H , 125 MHz for δ_C , TMS).

氨基酸残基 (Amino acid residues)	碳或氢 (H or C)	化合物 1 (Compound 1)		化合物 2 (Compound 2)		化合物 3 (Compound 3)	
		氢谱 (1H)	碳谱 (^{13}C)	氢谱 (1H)	碳谱 (^{13}C)	氢谱 (1H)	碳谱 (^{13}C)
Asn ¹ or Asp ¹	NH	9.21(br.s)		9.18(br.s)		9.24(br.s)	
	α	5.13(br.s)	52.6	5.12(br.s)	53.3	5.14(br.s)	52.6
	β	4.27(m), 3.40(m)	34.4	4.13(m), 3.40(m)	37.5	4.30(m), 3.45(m)	34.3
	γ CO		174.7		175.9		174.6
	ω NH	10.16(br.s)					
Hyp ²	CO		172.4		173.4		172.2
	N						
	α	5.30(dd)	63.4	5.31(dd, 7.40, 10.88)	63.1	5.33(m)	63.4
	β	2.78(m), 2.30(t)	39.7	2.85(m), 2.28(m)	40.2	2.81(dd, 6.29, 12.39), 2.34(t)	39.8
	γ	4.85(m)	69.9	4.86(br.s)	69.7	4.89(br.s)	69.8
Hyr ³	δ	4.10(m), 4.10(m)	65.2	4.09(m), 3.82(m)	65.6	4.10(m), 4.10(m)	65.2
	CO		172.0		173.1		172.0
	NH	8.70(d)		9.12(d, 10.35)		8.70(d, 10.05)	
	α	5.65(dd, 4.99, 9.84)	56.6	5.43(d, 10.40)	57.3	5.70(m)	56.5
	β	3.12(m)	39.7	3.14(m)	39.5	3.15(m)	39.8
Hyp ³	γ CH	4.27(m)	74.2	3.99(m)	73.7	4.30(m)	74.2
	γ CH ₃	1.34(d, 6.84)	14.8	1.04(d, 6.67)	16.3	1.38(d, 6.96)	14.7
	δ	4.27(m), 4.10(m)	57.4	4.21(d, 10.48), 3.90(m)	57.5	4.30(m), 4.10(m)	57.3
	CO		172.3		172.7		172.2
	NH	8.38(d)		8.32(d, 10.05)		8.41(d, 8.65)	
Trp ⁴	α	6.05(m)	54.1	6.16(m)	53.8	6.08(m)	53.8
	β	3.55(m), 3.40(m)	31.0	3.70(m), 3.70(m)	30.6	3.56(t), 3.45(m)	31.0
	NH-1'	9.05(br.s)					
	C-2'		130.9		130.8		133.7
	C-3'		112.8		113.5		112.0
Gly ⁵	C-3'a		122.4		122.5		128.8
	C-4'	7.87(d, 8.60)	123.9	7.82(d, 8.65)	123.9	8.02(d, 8.10)	122.8
	C-5'	7.12(d, 8.70)	111.9	7.04(d, 8.30)	111.6	7.18(t, 7.55)	120.0
	C-6'		156.6		156.5	7.35(t, 7.63)	123.4
	C-7'	7.27(s)	97.9	7.28(s)	97.8	7.59(m)	112.7
Gly ⁶	C-7'a		140.4		140.3		138.7
	CO		171.1		171.0		170.9
	NH	8.58(d)		8.61(d, 8.50)		8.59(d, 8.80)	
	α	4.85(m), 3.62(m)	42.6	4.74(dd, 8.49, 18.25), 3.70(m)	42.7	4.85(m), 3.61(d, 18.12)	42.4
	CO		169.0		172.0		171.8
Ile ⁶	NH	9.83(br.s)		9.86(br.s)		9.86(m)	
	α	4.10(m)	61.0	4.13(m)	61.0	4.10(m)	61.0
	β	1.80(m)	35.6	1.81(m)	35.5	1.81(m)	35.5
	γ CH ₂	1.50(m), 1.05(m)	26.5	1.53(m), 1.07(m)	26.5	1.53(m), 1.06(m)	26.5
	γ CH ₃	0.92(d, 6.51)	15.5	0.93(d, 6.54)	15.5	0.94(d, 6.61)	15.5
Gly ⁷	δ	0.60(t, 7.23)	11.0	0.61(t, 7.23)	10.9	0.62(t, 7.31)	10.9
	CO		173.2		173.7		173.1
	NH	10.40(br.s)		10.48(br.s)		10.42(m)	
	α	4.85(m), 3.88(dd)	43.6	4.82(dd, 8.32, 17.09), 3.90(m)	43.6	4.85(m), 3.91(dd, 3.40, 17.07)	43.6
	CO		168.8		168.7		168.6
Cys ⁸	NH	9.25(d)		9.24(d, 10.15)		9.30(d, 10.40)	
	α	6.05(m)	51.8	6.16(m)	51.6	6.16(m)	51.7
	β	4.10(m), 3.75(dd)	60.8	3.99(m), 3.70(m)	60.6	4.10(m), 3.75(dd, 3.75, 13.33)	60.7
	CO		172.0		168.6		168.9

1.2 提取与分离

灰花纹鹅膏子实体 60℃ 烤干至恒重后粉碎。加入甲醇置于摇床室温下 120 r/min 抽提 12 小时, 悬浊液 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于冰箱中。沉淀同样再抽提一次, 两次上清液合并, 用航空汽油去脂二次, 然后冷冻干燥, 用超纯水溶解, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 得粗毒抽提液。

粗毒抽提液用反相 HPLC 分离纯化, 洗脱液由 A、B 两液混合, A 液为 10% 的乙腈 + 90% 0.02 M 的醋酸铵; B 液为 24% 的乙腈 + 76% 0.02 M 的醋酸铵, 用冰醋酸调节 pH 值至 5.0。洗脱梯度为: 0→15 min, B 液 0→5%; 15→35 min, B 液 5→80%, 并保持 5 min; 40→45 min, B 液 80→100%, 并保持 5 min; 50→55 min, B 液 100→0%, 并保持 10 min。流速为 2.0 ml/min, 每次进样约 2 ml。

1.3 波谱数据

α-Amanitin (1): 白色粉末, C₃₉H₅₄N₁₀O₁₄S₁。FAB⁻-MS *m/z*: 918 [M⁺], 902, 844, 787, 724, 593, 445, 419, 335, 226, 188, 113。HR FAB⁻-MS *m/z*: 917.343853 (计算值 917.346344)。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

β-Amanitin (2): 白色粉末, C₃₉H₅₃N₉O₁₅S₁。FAB⁻-MS *m/z*: 919 [M⁺], 903, 858, 628, 300, 205,

176, 99。HR FAB⁻-MS *m/z*: 919.331680 (计算值 919.338185)。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

Amanin (3): 白色粉末, C₃₉H₅₃N₉O₁₄S₁。FAB⁺-MS *m/z*: 903 [M⁺], 887, 471, 110, 86。HR FAB⁺-MS *m/z*: 903.345323 (计算值 903.343270)。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

致谢: 感谢中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室仪器组的全体工作人员在波谱测定方面所给予的帮助。

参考文献

- 1 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
- 2 Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*, 1998, 36 (1): 13~24
- 3 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
- 4 Zhou J, Tan NH. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(20): 1825~1831
- 5 Pehk T, Haga M, Vija H, et al. High-field 2D NMR spectroscopy of amanitin isomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1989, 27: 173~183

AMATOXINS FROM AMANITA FULIGINEA

YANG Ya-bin¹, HU Jin-song², CHEN Zuo-hong^{2*}, TAN Ning-hua^{1*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2. Mycological Laboratory, Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract Three known amatoxins were isolated from *Amanita fuliginea* and their structures were determined as α-amanitin, β-amanitin and amanin based on the spectral methods including 2D-NMR and FAB-MS.

Key words *Amanita fuliginea*; amatoxins; cyclopeptides