

УДК 543

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВЫСШИХ ГРИБОВ

© 2025 г. М. Ш. Айгумов^{a,*}, М. В. Вишневский^b, А. П. Новиков^c, С. А. Савчук^{d,e}

^aНоябрьский психоневрологический диспансер
просп. Мира, 37Б, Ноябрьск, 629806 Россия

^bЦентр инновационных микологических исследований
Научный пр-д, 19, Москва, 117246 Россия

^cСургутская клиническая психоневрологическая больница
просп. Набережный, 41, Сургут, 628415 Россия

^dАссоциация специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу
просп. Науки, 17, к. 6, лит. А, пом. 95Н, Санкт-Петербург, 195220 Россия

^eИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН
Ленинский просп., 31, к. 4, Москва, 119071 Россия

*E-mail: aygumov.m@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.2024 г.

После доработки 21.08.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Токсичные грибы могут быть отнесены к различным группам в зависимости от входящих в их состав компонентов: циклопептидов, гиromитрина, мускарина, изоксазолов (мусцимол, иботеновая кислота), орелланина, псилоцибина и желудочно-кишечных раздражителей. Грибы, содержащие циклопептиды, являются наиболее токсичными видами во всем мире и в 90–95% приводят к человеческой смерти. Быстрая и точная идентификация токсинов в грибах и биологических образцах имеет решающее значение для диагностики и лечения отравления грибами. Методы определения токсинов необходимы для обеспечения своевременного лечения. В обзоре представлен анализ научной литературы по определению токсинов в грибных и биологических образцах. Особое внимание уделяется хроматографическим методам, в частности высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Ключевые слова: мусцимол, аматоксины, фаллотоксины, псилоцин, псилоцибин иботеновая кислота, мускарин, масс-спектры, хромато-масс-спектрометрия.

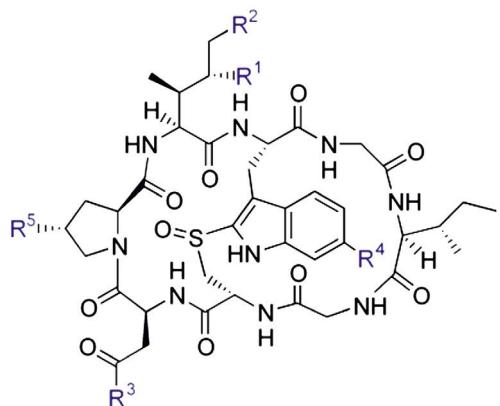
DOI: 10.31857/S0044450225020017 EDN: acwtvr

Аматоксины и фаллотоксины. Токсичные грибы могут быть отнесены к различным группам в зависимости от входящих в их состав компонентов: циклопептидов, гиromитрина, мускаринового коприна (мускарина), изоксазолов (мусцимол, иботеновая кислота), орелланина, псилоцибина и желудочно-кишечных раздражителей. Грибы, содержащие циклопептиды, являются наиболее токсичными видами, приводящими в 90–95% случаев к человеческой смерти [1].

Аматоксины идентифицированы как бициклические октапептиды с молекулярной массой около 900 г/моль и включают девять различных соединений: α -аманитин, β -аманитин, γ -аманитин, ε -аманитин, аманин, аманинамид,

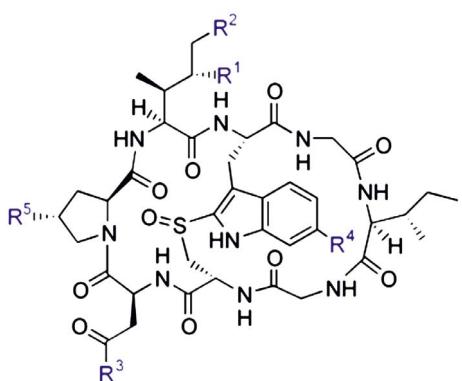
амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин (рис. 1). Из них α -аманитин, γ -аманитин, аманинамид, амануллин и проамануллин классифицируются как нейтральные аматоксины, тогда как β -аманитин, ε -аманитин, аманин и амануллиновая кислота являются кислыми аматоксинами [2, 3].

Фаллотоксины представляют собой бициклические гептапептиды, впервые выделенные из *A. phalloides* и включают по меньшей мере семь различных соединений: фаллоидин, фаллоин, профаллин, фаллизин, фаллацин, фаллацидин и фаллизин (рис. 2). Из них фаллоидин, фаллоин, профаллин и фаллизин классифицируются как нейтральные фаллотоксины, а фаллацин,



Название	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
α-Аманитин	OH	OH	NH ₂	OH	OH
β-Аманитин	OH	OH	OH	OH	OH
γ-Аманитин	OH	H	NH ₂	OH	OH
ε-Аманитин	OH	H	OH	OH	OH
Аманин	OH	OH	OH	H	OH
Аманинамид	OH	OH	NH ₂	H	OH
Амануллин	H	H	NH ₂	OH	OH
Амануллиновая кислота	H	H	OH	OH	OH
Проамануллин	H	H	NH ₂	OH	H

Рис. 1. Структурные формулы аматоксинов.



Название	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Фаллоидин	CH ₃	OH	CH ₃	CH ₃	OH
Фаллоин	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	OH
Профаллоин	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
Фаллизин	CH ₂ OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH
Фаллацин	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH
Фаллацидин	CH ₃	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH
Фаллизацин	CH ₂ OH	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH

Рис. 2. Структурные формулы фаллотоксинов.

фаллацидин и фаллизацин являются кислыми фаллотоксинами [4].

Ранняя диагностика отравления зависит от правильности идентификации вида употребленных грибов или обнаружения аматоксинов

в клинических образцах. Зачастую достаточно сложно определить, какие именно виды грибов были съедены, поэтому важно подтвердить или исключить присутствие токсинов в клинических образцах, используя чувствительные и специфичные аналитические методы [5].

Опубликовано большое количество статей по определению аматоксинов и фаллотоксинов в различных типах проб, в первую очередь в грибах и различных биологических средах организма человека. Наиболее распространенными биологическими объектами, используемыми в судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях, являются образцы крови, плазмы, сыворотки и различных тканей организма человека. В моче концентрация аматоксинов и фаллотоксинов обычно выше в 10–100 раз, чем в других жидкостях и тканях организма [6, 7].

Наиболее распространенным способом предподготовки при определении аматоксинов и фаллотоксинов является твердофазная экстракция (ТФЭ) [8–15]. Перед проведением ТФЭ в большинстве случаев осаждают белки с использованием ацетонитрила, метанола и хлорной кислоты [4, 16–18]. После осаждения образцы центрифугируют, а надосадочную жидкость используют для последующего анализа.

Наиболее часто при исследовании проб на присутствие аматоксинов и фаллотоксинов используют следующие типы сорбентов для твердофазной экстракции: HLB [9, 11, 15, 19–22], WCX [21], WAX [11, 21], MAX [19, 20], Strata-X-CW [11], сорбенты с обращенной фазой (Sep-Pak C18, Bond Elut C18) [11–12]. Согласно литературным источникам [11, 19–21], картриджи для ТФЭ на основе сорбента HLB являются наиболее подходящими при определении аматоксинов и фаллотоксинов в различных типах биологических проб.

Методы определения аматоксинов и фаллотоксинов можно разделить на хроматографические, иммунологические и колориметрические.

К колориметрическим методам относится тест Мейкснера–Виланда, основанный на кислотном катализе с использованием концентрированной соляной кислоты. В ходе реакции аматоксинов с лигнином образуется продукт синего цвета, который указывает на положительный результат теста. Однако этот тест не является специфичным и имеется высокая вероятность ложноположительных результатов [23].

К иммунологическим методам относятся: радиоиммунологический анализ [24, 25], иммуноферментный анализ [26], иммуноферментный анализ бокового потока (ИФА) [27]. Несмотря на целый ряд преимуществ (низкая стоимость оборудования, простота в использовании), иммунологические и радиоиммунологические методы уступают хроматографическим по чувствительности и специфичности.

К хроматографическим методам относятся тонкослойная хроматография [28], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [29], ВЭЖХ в сочетании с различными типами детекторов: ультрафиолетовым (УФ) [8, 30–31], УФ-детектором с фотодиодной матрицей (PDA) [16], электрохимическим (ЭХД) [32] и масс-спектрометрическим детекторами (МС) [12, 15, 16, 18, 19, 21, 33–40].

Тонкослойную хроматографию широко применяли при анализе экстрактов грибов, но для анализа биологических жидкостей человека метод оказался непригодным из-за низкой чувствительности [28].

Высокоэффективная жидкостная хроматография характеризуется высокой точностью, специфичностью и чувствительностью. Метод ВЭЖХ-УФ позволяет определять аматоксины с удовлетворительной чувствительностью (2–20 нг/мл) в биологических жидкостях [8, 30]. Метод ВЭЖХ с электрохимическим детектированием позволяет определять аматоксины с высокой чувствительностью (2 нг/мл) [32], но он недоступен в большинстве лабораторий, кроме того, при работе требуется длительный период стабилизации детектора. ВЭЖХ с PDA-детектором также успешно использовали при обнаружении аматоксинов и фаллотоксинов в биологических пробах [16].

Наиболее широкое применение получили методы ВЭЖХ с различными типами МС-детекторов: МС/МС (ESI) [9, 10, 13, 15, 21, 22, 33–35, 40], МС/МС (ионная ловушка) [16], времяпролетный масс-спектрометр (qTOF) [11, 16, 19, 20, 34, 36–39], масс-спектрометр с орбитальной ионной ловушкой (Orbitrap) [7, 18, 12], времяпролетный масс-спектрометр с матричной лазерной ионизацией (MALDI-TOF) [14] (табл. 1).

Метод ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает высокую чувствительность и селективность. Методы ВЭЖХ-МС/МС имеют некоторые ограничения, связанные с возникающими матричными эффектами в сложных биологических матрицах. [7, 9, 11, 16, 20, 21]. Во многих случаях влияние матричных эффектов можно свести к минимуму путем

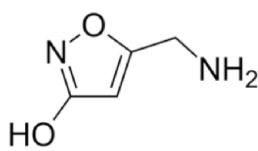
оптимизации пробоподготовки и условий ВЭЖХ-МС/МС-анализа [43].

В последние годы опубликованы работы, посвященные разработке высокочувствительных методов определения аматоксинов и фаллотоксинов в различных биологических пробах. Ху и соавт. [40] описывают валидированный метод определения α -аманитина с пределом обнаружения 0.03 нг/мл. Занг и соавт. [39] разработали высокочувствительный метод определения α -аманитина с пределом обнаружения 0.002 нг/мл.

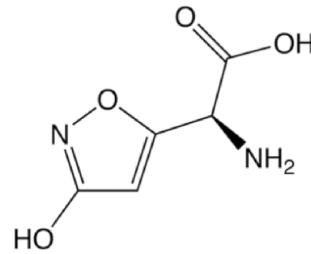
Капиллярный электрофорез (КЭ) – чувствительный и экспрессный метод, характеризующийся низким расходом реагентов, небольшим объемом вводимой пробы, высокой эффективностью разделения. Несмотря на это, КЭ уступает ВЭЖХ-МС/МС по чувствительности [41–42].

Мусцимол, мускарин, иботеновая кислота. Иботеновая кислота и мусцимол содержатся в таких грибах, как мухомор красный (*Amanita muscaria*), мухомор королевский (*Amanita regalis*) и мухомор пантерный (*Amanita patherina*). Психоактивные свойства этих соединений объясняются их структурным сходством с эндогенными нейромедиаторами глутаминовой кислотой и γ -аминомасляной кислотой. Психоактивная доза иботеновой кислоты составляет около 30–60 мг, а мусцимола – около 6 мг [44]. Автор работы [45] оценил психоактивную дозу в 50–90 мг иботеновой кислоты и 7.5–10 мг мусцимола. Помимо иботеновой кислоты и мусцимола в мухоморах содержатся другие активные соединения, например мусказон с незначительной фармакологической активностью, а также высокотоксичный мускарин (схема 1), который, однако, присутствует в незначительном количестве [46].

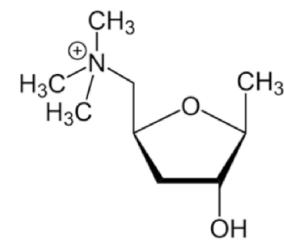
Мусцимол – продукт декарбоксилирования иботеновой кислоты. При этом иботеновая кислота нестабильна и быстро разлагается до мусцимола без участия ферментов [47]. Для экстракции иботеновой кислоты и мусцимола из грибов обычно используют растворы метанола (75 %) или этанола (50–70 %) в воде [48–50]. Иногда экстрагируют водой, подкисленной муравьиной кислотой [51].



Мусцимол



Иботеновая кислота



Мускарин

Схема 1. Структурные формулы мусцимола, мускарина и иботеновой кислоты.

Таблица 1. Методы определения амантоксинов и фаллотоксинов в образцах грибов и биологических образцах

Объект анализа	Определяемые вещества	Пробоподготовка	Метод	Предел обнаружения	Литература
Грибы	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, фаллоидин, фаллоин, фаллизин, фаллацидин, фаллизацин	Метанол–вода–0.01 М HCl (5 : 4 : 1)	ВЭЖХ-УФ, ОФ-колонка Ultrasphere ODS	–	[30]
Грибы	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, фаллоидин, фаллацидин	Метанол, обработка ультразвуком	Капиллярный электрофорезМС/МС (ESI)	α-Аманитин 27, β-аманитин 42, γ-аманитин 87, фаллоидин 17, фаллацидин 41 нмоль/л	[41]
Грибы	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, фаллоидин, фаллацидин, мускарин	Ацетонитрил с муравьиной кислотой, ТФЭ, картридж Oasis MAX	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), колонка HILIC (TSK-Gel Amide 80)	α-Аманитин 20, мускарин 5 мкг/кг	[33]
Грибы	α-Аманитин, β-аманитин, фаллоидин	Метанол (0.1 % ТФА) ТФЭ Картридж Oasis HLB	ВЭЖХ TOF-МС	α,β-Аманитин 30, фаллоидин 10 нг/г	[19]
Моча, печень	α-Аманитин, β-аманитин	ТФЭ, картридж Oasis HLB	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	В моче: α-аманитин 0.22, β-аманитина 0.20 нг/мл; в печени: α-аманитин 10.9, β-аманитин 9.7 нг/мл	[15]
Грибы, плазма крыс, моча крыс	α-Аманитин, β-аманитин, фаллацин, фаллацидин, фаллизацин	Ацетонитрил, обработка ультразвуком	ВЭЖХ: 1) PDA 2) МС/МС (ионная ловушка) 3) TOF-МС	–	[16]
Моча, сыворотка крови, плазма крови	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, фаллоидин, фаллацидин	ТФЭ, картридж PRiME HLB μElution	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), колонка CORTEX UPLC C18	α,β-Аманитин плазма 0.5, сыворотка 0.5; γ-аманитин: плазма 0.5, сыворотка 1; фаллоидин, фаллацидин: плазма 0.5, сыворотка 0.5 нг/г	[21]

Таблица 1. Продолжение

Объект анализа	Определяемые вещества	Пробоподготовка	Метод	Предел обнаружения	Литература
Сыворотка крови, печень	α-Аманитин	Ацетонитрил/ метиленхлорид, ТФЭ, картридж C18, картридж XRDAHC18	MCBP (Orbitrap), RP-полярная колонка Synergi	сыворотка крови 0.26, печень 0.50 нг/г	[18]
Желчь	α-Аманитин, β-аманитин	Ацетонитрил/ метиленхлорид, ТФЭ, Картридж Oasis PriME HLB	1) ВЭЖХ-МС/МС (ESI) 2) ВЭЖХ-ТОФ-МС, колонка ACQUITY UPLC HSS T3	α-Аманитин: ВЭЖХ-МС/МС 3.46, ВЭЖХ-ТОФ-МС 2.71; β-аманитин: ВЭЖХ-МС/МС 0.32, ВЭЖХ-ТОФ-МС 1.60 нг/мл	[34]
Сыворотка крови, моча, Смывы желудка	α-Аманитин, β-аманитин	Ацетонитрил/ метиленхлорид, ТФЭ, Картридж с обращенной фазой	ВЭЖХ-УФ	10.0 нг/мл	[8]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин	—	Иммуноферментный анализ с боковым потоком (ИФА)	(нг/мл) α-аманитин-10 β-аманитин-100 γ-аманитин-10	[27]
Моча	α-аманитин β-аманитин фаллоидин	ТФЭ Картридж Bond Elut Agilent Certify	MCBP (Orbitrap) C18 Accucore	α-Аманитин 0.25, β-аманитин 0.5, фаллоидин 0.25 нг/мл	[12]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин	Иммуноаффинная экстракция	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	α-Аманитин 2.5, β-аманитин 2.5 нг/мл	[35]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин	Разведение мочи фоновым электролитом	Капиллярный электрофорез с PDA (214 нм)	α-Аманитин 1.5, β-аманитин 1.5 нг/мл	[42]
Плазма	α-Аманитин, фаллоидин	Разведение, осаждение белков, центрифугирование	ВЭЖХ-УФ (303 нм)	α-Аманитин 9.74, фаллоидин 10.11 нг/мл	[31]
Плазма	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин	ТФЭ C18, фильтрация	ВЭЖХ-ЭХД	2 нг/мл	[32]
Плазма	α-Аманитин, β-аманитин	Разбавление, ТФЭ C18	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	0.5 нг/мл	[10]
Плазма, сыворотка, моча	α-Аманитин, β-аманитин, фаллоидин	Разбавление, ТФЭ Oasis HLB	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	Моча 0.5, плазма 1, сыворотка 1.5 нг/мл	[13]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин	Онлайн экстракция TurboFlow	MCBP (Orbitrap)	1 нг/мл	[7]

Таблица 1. Окончание

Объект анализа	Определяемые вещества	Пробоподготовка	Метод	Предел обнаружения	Литература
Сыворотка	α-Аманитин	Разбавление, ТФЭ Oasis HLB	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	2.5 нг/мл	[22]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин	Разбавление, ТФЭ Oasis HLB	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	α-Аманитин 0.458, β-аманитин 0.930, γ-аманитин 0.169 нг/мл	[9]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин, фаллоидин	ТФЭ Oasis HLB	MALDI-TOF	5 нг/мл для всех токсинов	[14]
Грибы	Мусцимол, иботеновая кислота, мускарин, фаллоидин, фаллацидин, α-аманитин, β-аманитин	ТФЭ картридж Oasis HLB	ВЭЖХ-TOF-МС	Фаллоидин 0.22, фаллацидин 0.37, α-аманитин 0.23, β-аманитин 0.19 мкг/г	[20]
Моча	α-Аманитин, β-аманитин, мускарин	ТФЭ картридж Srata-X-CW	ВЭЖХ-TOF-МС	α,β-аманитин 1, мускарин 0.09 нг/мл	[11]
Грибы	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманулин, фаллоидин	Метанол, ультразвук, фильтрация	ВЭЖХ-TOF-МС	α-Аманитин 0.303, β-аманитин 0.238, фаллоидин 0.297 мкг/мл	[36]
Плазма	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, мускарин, фаллоидин, иботеновая кислота	Осаждение белков (метанол + ацетонитрил)	ВЭЖХ-TOF-МС	α-Аманитин 10, β-аманитин 10, γ-аманитин 10 нг/мл	[37]
Кровь, моча	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, мускарин	Разбавление, ТФЭ, картридж Oasis HLB	ВЭЖХ-TOF-МС	Кровь: α-аманитин 1.4, β-аманитин 0.3, γ-аманитин 1.2; моча: α,γ-аманитин 1.5, β-аманитин 2.1 нг/мл	[38]
Плазма, моча	α-Аманитин, β-аманитин, γ-аманитин	Разбавление, ТФЭ, иммуноаффинная экстракция	ВЭЖХ-TOF-МС	Моча 0.002, плазма 0.004 нг/мл	[39]
Моча	α-Аманитин	ТФЭ в режиме онлайн	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	0.03 нг/мл	[40]

Примечание: ТФА – трифторуксусная кислота, МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения.

Идентификация иботеновой кислоты в водных или водно-этанольных экстрактах измельченных плодовых тел *A. muscaria* затруднена из-за наличия мешающих аминокислотных примесей. Для определения токсинов с использованием тонкослойной хроматографии применяли флуоресцамин или нингидрин [29, 52]. Примеси аминокислот могут быть устраниены с помощью ионообменной хроматографии с использованием катионаобменных и анионообменных сорбентов [29, 50].

Для определения мусцимола, иботеновой кислоты и мускарина в грибах и различных биологических пробах человека (моча, сыворотка и плазма крови) используют различные методы. Так, описано применение метода ВЭЖХ-МС/МС на колонке TSK-GEL Amide-80 [53], метода ВЭЖХ-МС с использованием ТФЭ на картриджах Strata X-CW [54], метода КЭ с тройным квадрупольным детектором [55], ВЭЖХ с времяпролетным масс-спектрометром [20, 37], двух типов детекторов (ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-УФ) совместно с дериватизацией дансил хлоридом

[48], метода ВЭЖХ-МС/МС с дериватизацией дансил хлоридом и получением бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты [56], метода ГХ-МС с дериватизацией этилхлороформиатом [51] (табл. 2).

Псилоцин и псилоцибин. Псилоцибин является индолным алкалоидом и по структуре напоминает серотонин (схема 2). После приема внутрь псилоцибин быстро метаболизируется щелочными фосфатами кишечника и неспецифическими эстеразами до псилоцина, который отвечает за психоактивные эффекты псилоцибина [57].

Определение псилоцина и псилоцибина в биологических жидкостях человека – достаточно сложная задача. Высокая скорость метаболизма и нестабильность под воздействием света и воздуха также усложняют определение токсикантов [58]. Для анализа биожидкостей на наличие псилоцина необходимо провести гидролиз конъюгата псилоцина с глюкуроновой кислотой. Обычно для этого применяют β -глюкуронидазу в слабокислой среде [59–62].

Таблица 2. Методы определения мусцимола, мускарина и иботеновой кислоты в образцах грибов и биологических образцах

Объект анализа	Определяемые вещества	Пробоподготовка	Метод	Предел обнаружения	Литература
Сыворотка крови	Мусцимол Иботеновая кислота	ТФЭ картридж Oasis MAX	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), TSK-GEL Amide-80	Иботеновая кислота 1, мусцимол 2.5 нг/мл	[53]
Моча	Мусцимол Иботеновая кислота Мускарин	Разбавление в пять раз водой и фильтрование через микрофильтр 0.22 мм	Капиллярный электрофорез, МС/МС (ESI)	Мусцимол 0.05, иботеновая кислота 0.15, мускарин 0.73 нг/мл	[55]
Грибы	Мусцимол Иботеновая кислота	Извлечение смесью метанол–вода (7 : 3, по объему), дансилирование DNSCl	ВЭЖХ–УФ, ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	При УФ-детекции мусцимол 1.4, иботеновая кислота 4.6 мкг/г	[48]
Плазма	Мусцимол Иботеновая кислота	Дансилирование DNSCl	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	Мусцимол 0.1, иботеновая кислота 0.3 нг/мл	[56]
Моча	Мусцимол Иботеновая кислота Мускарин	Strata X-CW	ВЭЖХ-МС, Gemini C18	Мусцимол 40, иботеновая кислота 50, мускарин 3 нг/мл	[54]
Моча	Мусцимол Иботеновая кислота	Дериватизация этилхлороформиатом в водном растворе гидроксида натрия с добавлением этанола и пиридина	ГХ-МС HP-5MS UI	1 мкг/мл	[51]

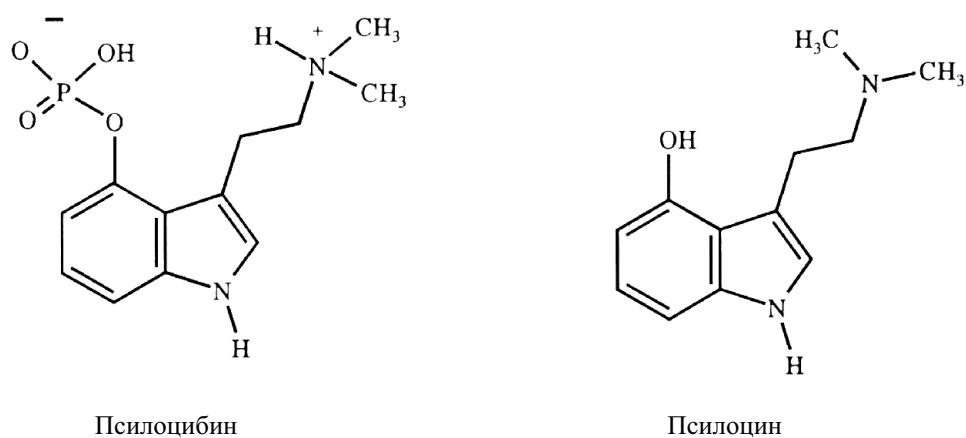


Схема 2. Структурные формулы псилоцина и псилоцибина.

При определении псилоцина и псилоцибина используются высокоэффективную жидкостную хроматографию с электрохимическим детектированием [63], газовую хромато-масс-спектрометрию [60, 62] и жидкостную хромато-масс-спектрометрию [59, 61],

64–67] (табл. 3). ВЭЖХ-МС/МС является наиболее подходящим методом исследования, поскольку обладает наибольшей чувствительностью и не требует использования длительных процедур пробоподготовки (дериатизации).

Таблица 3. Методы определения псилоцина и псилоцибина в образцах грибов и биологических образцах

Объект анализа	Определяемые вещества	Пробоподготовка	Метод	Предел обнаружения	Литература
Моча	Псилоцин	Ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой, разбавление 1 : 4 водой	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), Hypersil GOLD	4 нг/мл	[59]
Моча	Псилоцин	Ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой, дериватизация МСТФА	ГХ-МС	10 нг/мл	[60]
Моча	Псилоцин	Ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), колонка ODS	0.5 нг/мл	[61]
Моча, плазма	Псилоцин	Гидролиз, дериватизация МСТФА	ГХ-МС	–	[62]
Плазма	Псилоцин	Онлайн ТФЭ	ВЭЖХ-ЭХД	10 нг/мл	[63]
Плазма	Псилоцин, 4-гидроксииндол-3-уксусная кислота	Осаждение белков метанолом	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), Symmetry C18	Псилоцин 0.25, 4-гидроксииндол-3-уксусная кислота 2.5 нг/мл	[64]
Плазма, моча	Псилоцин	Осаждение белков метанолом–ацетонитрилом (1 : 1)	ВЭЖХ-МС/МС (ESI)	Плазма: псилоцин 0.5; моча: псилоцин 5 нг/мл	[65]
Моча	Псилоцин, псилоцибин	ТФЭ, картридж CSDAU206, Bristol	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), колонка US-C18 Imtakt	Псилоцин 5, псилоцибин 10 нг/мл	[66]
Плазма	Псилоцин	Картридж Oasis MCX	ВЭЖХ-МС/МС (ESI), колонка C18	0.1 нг/мл	[67]

Примечание: МСТФА – N-метил-N-(тритметилсилил)трифтормаслянид.

* * *

Существует большое число методов определения токсинов высших грибов, включая хроматографические, иммунологические и калориметрические. ВЭЖХ-МС/МС – наиболее эффективный метод при определении токсинов высших грибов. По сравнению с другими методами он обладает более высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью. Несмотря на преимущества, метод ВЭЖХ-МС/МС имеет недостатки. Так, возможно проявление матричных эффектов, которые могут влиять на эффективность ионизации, тем самым снижая воспроизводимость результатов.

Выбор подходящего аналитического метода и процедуры подготовки образцов для определения токсинов грибов зависит от множества факторов, включая состав пробы, требуемый уровень чувствительности и специфичности, а также наличие необходимого оборудования и квалификацию персонала лаборатории. В целом для эффективной профилактики отравлений грибами и борьбы с ними важное значение имеет разработка конкретных чувствительных методов определения токсинов грибов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Ноябрьского психоневрологического диспансера. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karlson-Stiber C., Persson H. Cytotoxic fungi – An overview// Toxicon. 2003. V. 42. № 4. P. 339.
2. Vetter J. Toxins of Amanita phalloides // Toxicon. 1998. V. 36. № 1. P. 13.
3. Baumann K., Münter K., Faulstich H. Identification of structural features involved in binding of alpha-amanitin to a monoclonal antibody // Biochemistry. 1993. V. 32. № 15. P. 4043.
4. Garcia J., Costa V.M., Carvalho A., Baptista P., de Pinho P.G., de Lourdes Bastos M., Carvalho F. Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment // Food Chem. Toxicol. 2015. V. 86. P. 41.
5. Barbosa I., Domingues C., Ramos F., Barbosa R.M. Analytical methods for amatoxins: A comprehensive review // J. Pharm. Biomed. Anal. 2023. V. 232. 115421.
6. Jaeger A., Jehl F., Flesch F., Sauder P., Kopferschmitt J. Kinetics of amatoxins in human poisoning – therapeutic implications // J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1993. V. 31. P. 63.
7. Helfer A.G., Meyer M.R., Michely J.A., Maurer H.H. Direct analysis of the mushroom poisons α - and β -amanitin in human urine using a novel on-line turbulent flow chromatography mode coupled to liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry/mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1325. P. 92.
8. Jehl F., Gallion C., Birckel P., Jaeger A., Flesch F., Minck R. Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography // Anal. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 35.
9. Abbott N.L., Hill K.L., Garrett A., Carter M.D., Hamelin E.I., Johnson R.C. Detection of α -, β -, and γ -amanitin in urine by LC-MS/MS using $^{15}\text{N}^{10}\text{-}\alpha$ -amanitin as the internal standard // Toxicon. 2018. V. 152. P. 71.
10. Tanahashi M., Kaneko R., Hirata Y., Hamajima M. Simple analysis of α -amanitin and β -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry // Forensic Toxicol. 2010. V. 28. № 2. P. 110.
11. Tomková J., Ondra P., Válka I. Simultaneous determination of mushroom toxins α -amanitin, β -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry // Forensic Sci. Int. 2015. V. 251. P. 209.
12. Gicquel T., Lepage S., Fradin M., Tribut O., Duretz B., Morel I. Amatoxins (α - and β -Amanitin) and phallotoxin (Phalloidin) analyses in urines using high-resolution accurate mass LC-MS technology // J. Anal. Toxicol. 2014. V. 38. № 6. P. 335.
13. Nomura M., Suzuki Y., Kaneko R., Ogawa T., Hattori H., Seno H., Ishii A. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS // Forensic Toxicol. 2012. V. 30. P. 185.
14. Gomori K., Minakata K., Suzuki M., Yamagishi I., Nozawa H., Hasegawa K. et al. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in urine // Forensic Toxicol. 2012. V. 30. P. 179.
15. Leite M., Freitas A., Azul A.M., Barbosa J., Costa S., Ramos F. Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of amatoxins in urine and liver samples // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 799. P. 77.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.044>
16. Li C., Qian H., Bao T., Yang G., Wang S., Liu X. Simultaneous identification and characterization of amanita toxins using liquid chromatography-photodiode array detection-ion trap and time-of-flight

- mass spectrometry and its applications // *Toxicol. Lett.* 2018. V. 296. P. 95.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.08.005>
17. *Bambauer T.P., Wagmann L., Weber A.A., Meyer M.R.* Analysis of α - and β -amanitin in human plasma at subnanogram per milliliter levels by reversed phase ultra-high performance liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry // *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12. № 11. P. 671.
18. *Filigenzi M.S., Poppenga R.H., Tiwary A.K., Puschner B.* Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 8. P. 2784.
<https://doi.org/10.1021/jf063194w>
19. *Ahmed W.H.A., Gonmori K., Suzuki M., Watanabe K., Suzuki O.* Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry // *Forensic Toxicol.* 2010. V. 28. P. 69.
20. *Yoshioka N., Akamatsu S., Mitsuhashi T., Todo C., Asano M., Ueno Y.* A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry // *Forensic Toxicol.* 2014. V. 32. P. 89.
21. *Zhang S., Zhao Y., Li H., Zhou S., Chen D., Zhang Y., Yao Q., Sun C.* A simple and high-throughput analysis of amatoxins and phallotoxins in human plasma, serum and urine using UPLC-MS/MS combined with PRiME HLB μ elution platform // *Toxins (Basel)*. 2016. V. 8. № 5. P. 128.
<https://doi.org/10.3390/toxins8050128>
22. *Vujovic M., Ilic I., Kilibarda V.* Determination of mushroom toxin alpha-amanitin in serum by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction// *Acta Med. Mediana*. 2015. V. 54. № 1. P. 12.
23. *Meixner A.* Amatoxin detection in fungi // *Zeitschrift fur Mykologie*. 1979. V. 45. № 1. P. 137.
24. *Butera R., Locatelli C., Coccini T., Manzo L.* Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: A pilot study// *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004. V. 42. № 6. P. 901.
25. *Briiggemann O., Meder M., Freitag R.* Analysis of amatoxins alpha-amanitin and beta-amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 744. № 1-2. P. 167.
26. *Staack R., Maurer H.* New Buhlmann ELISA for determination of amanitins in urine-are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites // *Toxicem Krimtech*. 2000. V. 68. P. 68.
27. *Bever C.S., Swanson K.D., Hamelin E.I., Filigenzi M., Poppenga R.H., Kaae J. et al.* Rapid, sensitive, and accurate point-of-care detection of lethal amatoxins in urine // *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12. № 2. P. 123.
28. *Dorizzi R., Michelot D., Tagliaro F., Ghielmi S.* Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples // *J. Chromatogr.* 1992. V. 580. P. 279.
29. *Beutler J., Marderosian A.H.D.* Chemical variation in *Amanita* // *J. Nat. Prod.* 1981. V. 44. P. 422.
30. *Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., Monteil H., Faulstich H.* Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1992. V. 598. № 2. P. 227.
31. *Rieck W., Platt D.* High-performance liquid chromatographic method for the determination of alpha-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*) // *J. Chromatogr.* 1988. V. 425. № 1. P. 121.
32. *Tagliaro F., Schiavon G., Bontempelli G., Carli G., Marigo M.* Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study // *J. Chromatogr.* 1991. V. 563. № 2. P. 299.
33. *Chung W.C., Tso S.C., Sze S.T.* Separation of polar mushroom toxins by mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2007. V. 45. № 2. P. 104.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/45.2.104>
34. *Leite M., Freitas A., Mitchell T., Barbosa J., Ramos F.* Amanitin determination in bile samples by UHPLC-MS: LR-MS and HR-MS analytical performance // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024. V. 247. 116253.
35. *Maurer H.H., Schmitt C.J., Weber A.A., Kraemer T.* Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 2000. V. 748. № 1. P. 125.
36. *Cevik Y.N.* The effect of a high-resolution accurate mass spectrometer on simultaneous multiple mushroom toxin detection // *GÜFBED/GUSTIJ*. 2020. V. 10. № 4. P. 878.
<https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.680816>
37. *Ogawa T., Zaitsu K., Kokaji T., Suga K., Kondo F., Iwai M. et al.* Development and application of a forensic toxicological library for identification of 56 natural toxic substances by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Forensic Toxicol.* 2020. V. 38. P. 232.
38. *Feigel B., Zuba A., Lechowicz W.* Screening method for the analysis of blood and urine for the presence of naturally occurring toxic compounds from mushrooms (fungi) using the LC-MS method // *Probl. Forensic Sci.* 2022. V. 126, 127. P. 137.
39. *Zhang X., Cai X., Zhang X., Li R., Zhao Y.* Highly sensitive determination of three kinds of amanitins in

- urine and plasma by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry coupled with immunoaffinity column clean-up // Chin. J. Chromatogr. 2022. V. 40. № 5. P. 443.
40. Xu X., Zhang J., Cai Z., Meng Z., Huang B., Chen Q. Determination of trace α -amanitin in urine of mushroom poisoning patient by online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Chin. J. Chromatogr. 2020. V. 38. № 11. P. 1281.
41. 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 // Electrophoresis. 2008. V. 29. P. 2094.
42. Robinson-Fuentes V.A., Jaime-Sánchez J.L., García-Aguilar L., Gómez-Peralta M., Vázquez-Garcidueñas M.S., Vázquez-Marrufo G. Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by capillary zone electrophoresis // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 47. № 4-5. P. 913.
43. Cortese M., Gigliobianco M.R., Magnoni F., Censi R., Di Martino P.D. Compensate for or minimize matrix effects, strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: A tutorial review // Molecules. 2020. V. 25. № 13. P. 3047.
44. Waser P.G., The pharmacology of Amanita muscaria // Psychopharmacol. Bull. 1967. V. 4. № 3. P. 19.
45. Eugster CH., Isolation, structure, and syntheses of central-active compounds from Amanita muscaria (L. ex Fr.) hooker. // Psychopharmacol. Bull. 1967. V. 4. № 3. P. 18.
46. Michelot D., Melendez-Howell L.M., Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnopharmacology // Mycol. Res. 2003. V. 107. № 2. P. 131.
47. Filer C.N., Lacy J.M., Peng C.T. Ibotenic acid decarboxylation to muscimol: Dramatic solvent and radiolytic rate acceleration // Synth. Commun. 2005. V. 35. P. 967.
48. Tsujikawa K., Kuwayama K., Miyaguchi H., Kanamori T., Iwata Y., Inoue H. et al. Determination of muscimol and ibotenic acid in Amanita mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2007. V. 852. № 2. P. 430.
49. Tsujikawa K., Mohri H., Kuwayama K., Miyaguchi H., Iwata Y., Gohda A. et al. Analysis of hallucinogenic constituents in Amanita mushrooms circulated in Japan // Forensic Sci. Int. 2006. V. 164. P. 172.
50. Tsunoda K., Inoue N., Aoyagi Y., Sugahara T. Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, amanita muscaria, and analytical survey on edible mushrooms // Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 1993. V. 34. № 1. P. 12.
51. Stříbrný J., Sokol M., Merová B., Ondra P. GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with Amanita pantherina // Int. J. Legal. Med. 2012. V. 126. № 4. P. 519.
52. Benedict R.G., Tyler V.E., Brady L.R. Chematoinonomic significance of isoxazole derivatives in Amanita species // Lloydia. 1966. V. 29. P. 333.
53. Hasegawa K., Gonmori K., Fujita H., Kamijo Y., Nozawa H., Yamagishi I. et al. Determination of ibotenic acid and muscimol, the Amanita mushroom toxins, in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Forensic Toxicol. 2013. V. 31. P. 322.
54. Merová B., Ondra P., Stanková M., Valka I. Isolation and identification of the Amanita muscaria and Amanita pantherina toxins in human urine // Neuroendocrinol. Lett. 2008. V. 29. № 5. P. 744.
55. Ginterová P., Sokolová B., Ondra P., Znaleziona J., Petr J., Ševčík J., Maier V. Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry // Talanta. 2014. V. 125. P. 242.
56. Xu X.M., Zhang J.S., Huang B.F., Han J.L., Chen Q. Determination of ibotenic acid and muscimol in plasma by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with bimolecular dansylation // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2020. V. 1146. P. 122. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122128>
57. Rickli A., Moning O.D., Hoener M.C., Liechti M.E. Receptor interaction profiles of novel psychoactive tryptamines compared with classic hallucinogens // Eur. Neuropsychopharmacol. 2016. V. 26. № 8. P. 1327.
58. Hasler F., Bourquin D., Brenneisen R., Bär T., Vollenweider F.X. Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man // Pharm. Acta Helv. 1997. V. 72. № 3. P. 175. [https://doi.org/10.1016/s0031-6865\(97\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s0031-6865(97)00014-9)
59. Björnstad K., Beck O., Helander A. A multi-component LC-MS/MS method for detection of ten plant-derived psychoactive substances in urine // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. P. 1162.
60. Grieshaber A.F., Moore K.A., Levine B. The detection of psilocin in human urine // J. Forensic Sci. 2001. V. 46. № 3. P. 627.
61. Kamata T., Nishikawa M., Katagi M., Tsuchihashi H. Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples // J. Chromatogr. B. 2003. V. 796. P. 421.
62. Sticht G., Käferstein H. Detection of psilocin in body fluids // Forensic Sci. Int. 2000. V. 113. P. 403.
63. Lindenblatt H., Krämer E., Holzmann-Erens P., Gouzoulis-Mayfrank E., Kovar K.A. Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction //

- J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1998. V. 709. P. 255.
64. *Kolaczynska K.E., Liechti M.E., Duthaler U.* Development and validation of an LC-MS/MS method for the bioanalysis of psilocybin's main metabolites, psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid, in human plasma // J. Chromatogr. B. 2021. V. 1164. 122486.
65. *Brown R.T., Nicholas C.R., Cozzi N.V., Gassman M.C., Cooper K.M., Muller D. et al.* Pharmacokinetics of escalating doses of oral psilocybin in healthy adults // Clin. Pharmacokinet. 2017. V. 56. № 12. P. 1543.
66. *Elian A.A., Hackett J., Telepchak M.J.* Analysis of psilocybin and psilocin in urine using SPE and LC-tandem mass spectrometry // LCGC North Am. 2011. V. 29. № 9. P. 854.
67. *Martin R., Schürenkamp J., Pfeiffer H., Köhler H.* A validated method for quantitation of psilocin in plasma by LC-MS/MS and study of stability // J. Leg. Med. 2012. V. 126. № 6. P. 845. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0652-8>

METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOXINS AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF HIGHER FUNGI

M. Sh. Aigumov^{a, *}, M. V. Vishnevskii^b, A. P. Novikov^c, S. A. Savchuk^{d, e}

^a*Noyabrsk Psychoneurological Dispensary
Noyabrsk, Russia*

^b*Center for Innovative Mycological Research
Moscow, Russia*

^c*Surgut Clinical Psychoneurological Hospital
Surgut, Russia*

^d*Association of Specialists in Chemical-Toxicological and Forensic Chemical Analysis
St. Petersburg, Russia*

^e*The Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS (IPCE RAS)
Moscow, Russia*

*E-mail: aygumov.m@yandex.ru

Abstract. Toxic mushrooms can be categorized into different groups depending on their constituents: cyclopeptides, hyromitrin, muscarine, isoxazoles (muscimol, ibotenic acid), orellanin, psilocybin and gastrointestinal irritants. Mushrooms containing cyclopeptides are the most toxic species worldwide and are responsible for 90–95% of human deaths. Rapid and accurate identification of toxins in mushrooms and biological samples is critical for the diagnosis and treatment of mushroom poisoning. Methods for toxin identification are essential to ensure timely treatment. This review presents an analysis of the scientific literature on the determination of mushroom toxins in mushroom and biological samples. Particular attention is paid to chromatographic methods, in particular high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

Keywords: muscimol, amatoxins, phallotoxins, psilocin, psilocybin ibotenic acid, muscarinic acid, mass spectra, chromatography-mass spectrometry.