

УДК 543

## СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ МУСКАРИНА, МУСЦИМОЛА И ИБОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ГРИБАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИЦАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС

© 2025 г. М. Ш. Айгунов<sup>a, \*</sup>, А. П. Новиков<sup>b</sup>, М. В. Вишневецкий<sup>c</sup>,  
Н. А. Чернова<sup>b</sup>, И. В. Майданец<sup>b</sup>, М. А. Гофенберг<sup>d</sup>, Д. В. Кузнецов<sup>e</sup>,  
Н. В. Самышкина<sup>f</sup>, Л. Н. Ризванова<sup>g</sup>, А. З. Темердашев<sup>h</sup>, С. А. Савчук<sup>i, j</sup>

<sup>a</sup>Ноябрьский психоневрологический диспансер  
просп. Мира, 37Б, Ноябрьск, 629806 Россия

<sup>b</sup>Сургутская клиническая психоневрологическая больница  
просп. Набережный, 41, Сургут, 628415 Россия

<sup>c</sup>Центр инновационных микологических исследований  
Научный проезд, 19, Москва, 117246 Россия

<sup>d</sup>Свердловская областная клиническая психиатрическая больница  
Сибирский тракт, 8 км, Екатеринбург, 620030 Россия

<sup>e</sup>Волгоградский областной клинический наркологический диспансер  
ул. Дегтярева, 8, Волгоград, 400006 Россия

<sup>f</sup>Новоуренгойский психоневрологический диспансер  
ул. Ямальская, 38, Новый Уренгой, 629305 Россия

<sup>g</sup>Нижневартовский психоневрологический диспансер  
ул. Интернациональная, 39в, Нижневартовск, 628615 Россия

<sup>h</sup>Учебно-научно-производственный коллектив НПК "Аналит" Кубанского государственного университета  
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

<sup>i</sup>Ассоциация специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу  
просп. Науки, 17, к. 6, лит. А, пом. 95Н, Санкт-Петербург, 195220 Россия

<sup>j</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН  
Ленинский просп., 31, к. 4, Москва, 119071 Россия

\*E-mail: aygunov.m@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.06.2024 г.

После доработки 18.08.2024 г.

Принята к публикации 19.08.2024 г.

Описан алгоритм двухэтапного обнаружения мускарина, иботеновой кислоты и мусцимола в образцах мочи. Разработана двухэтапная методика обнаружения мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты в data-зависимом режиме МРМ-анализа с одновременной регистрацией полных масс-спектров целевых веществ. Обнаружение аналитов проводили методом ВЭЖХ с трехкварупольным масс-спектрометрическим детектором (LC-MS/MS Shimadzu 8050). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Phenomenex Kinetex C18. На первом этапе в разбавленной пробе мочи проводили обнаружение мускарина, на втором этапе с помощью метода бимолекулярного дансирования обнаруживали мусцимол и иботеновую кислоту. Методика успешно применена на практике для рутинных химико-токсикологических исследований проб мочи пациентов, доставленных с подозрением на отравление грибами.

**Ключевые слова:** мусцимол, иботеновая кислота, мускарин, масс-спектры, хромато-масс-спектрометрия, дансил хлорид.

DOI: 10.31857/S0044450225020056 EDN: adybim

Иботеновая кислота и мусцимол являются основными низкомолекулярными токсикантами, содержащимися в таких видах грибов, как

мухомор красный и мухомор пантерный. В грибах в незначительном количестве также содержится мускарин. Концентрация и распределение

токсикантов в мухоморах непостоянны и зависят от множества факторов, главным образом от их происхождения, состояния роста и условий хранения [1].

Иботеновая кислота, (S)-амино-(3-гидроксиизоксазол-5-ил)-уксусная кислота, — это аминокислота, содержащая гетероциклическое ядро изоксазола. Мусцимол, 5-(аминометил)-изоксазол-3-ол, является продуктом декарбоксилирования иботеновой кислоты. Психоактивные свойства этих соединений объясняются их структурным сходством с эндогенными нейромедиаторами глутаминовой кислотой и гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК). Психоактивная доза иботеновой кислоты составляет 30–60 мг, а мусцимола — ~6 мг [2]. Эгстер [3] оценил психоактивную дозу иботеновой кислоты в 50–90 мг и мусцимола в 7.5–10 мг. Помимо иботеновой кислоты и мусцимола, мухоморы содержат другие активные соединения, например мусказон, который обладает незначительной фармакологической активностью, а также высокотоксичный мускарин, присутствующий в небольшом количестве [4]. Мускарин является четвертичным аммониевым соединением. Согласно имеющимся данным смертельная доза мускарина в упомянутых выше грибах для человека составляет около 500 г сырого гриба. Однако 10–20 г сырых грибов достаточно, чтобы привести к отравлению.

Для идентификации и определения мусцимола, иботеновой кислоты и мускарина в грибах и различных биологических пробах человека (моча, сыворотка и плазма крови) используют целый ряд методов. Для обнаружения данных веществ применяли метод ВЭЖХ-МС/МС на колонке TSK-GEL Amide-80 с твердофазной экстракцией на картриджах Oasis MAX [5], метод капиллярного электрофореза в сочетании с тройным квадрупольным детектированием [6], метод жидкостной хроматографии-временипролетной масс-спектрометрии с пробоподготовкой на картриджах Oasis HLB [7], комбинированный подход (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-УФ) с дериватизацией дансил хлоридом [8], метод ВЭЖХ-МС/МС с дериватизацией дансил хлоридом и получением бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты [9].

В последние годы отмечается рост отравлений, связанных с употреблением различных видов грибов, в том числе и мухоморов. Число сообщений о случаях отравления, связанных с употреблением сушеных частей красного мухомора, растет с каждым годом, поэтому важно научиться определять основные токсиканты различных видов мухоморов. Стоит отметить, что ранее описанные методики непригодны для рутинной практики большинства судебно-химических и/или химико-токсикологических

лабораторий, так как требуют применения дорогостоящих масс-спектрометров высокого разрешения либо специфических хроматографических колонок (TSK-GEL Amide-80). Последние редко используются при широком токсикологическом скрининге и предполагают наличие специального оборудования. Методики получения бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты достаточно трудоемки и дорогостоящи, что также ограничивает их использование в скрининговом химико-токсикологическом анализе.

Цель данной работы — разработка двухэтапной методики обнаружения мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты в data-зависимом режиме МРМ-анализа с одновременной регистрацией полных масс-спектров целевых веществ. Это первая работа, в которой описывается данный подход к обнаружению мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты в пробах мочи человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** Использовали ацетонитрил (HPLC-gradient grade, ≥99.9 %, Sigma-Aldrich, США), метанол (HPLC-gradient grade, J.T. Baker, США), воду, полученную с использованием системы Milli-Q (Milipore, Франция), формиат аммония (99 %, Acros Organics, США), муравьиную кислоту ч. д. а. (Компонент-реактив, Россия), дансил хлорид (97 %, Abcr, Германия), мусцимола гидробромид (≥98 %, Sigma-Aldrich, США), дихлорметан х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), соляную кислоту х. ч. (АО “Башкирская садовая компания”, Россия). Пробы мочи и крови от анонимных пациентов получали из различных психоневрологических диспансеров.

**Пробоподготовка** состояла из двух этапов. На первом этапе использовали методики пробоподготовки мочи и крови с целью определения мускарина. На втором этапе использовали методику пробоподготовки образцов мочи с целью получения бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты.

**Методика пробоподготовки мочи с целью обнаружения мускарина в нативной форме:** 1 мл пробы мочи переносили в микроцентрифужные пробирки, после чего центрифугировали 5 мин при 15 000 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали и переносили в вials.

**Методика пробоподготовки образцов крови с целью обнаружения мускарина в нативной форме:** в пробирку помещали 1 г хлорида натрия, 2 мл дистиллированной воды и 1 мл крови пациента. Далее добавляли 3 мл ацетонитрила и тщательно перемешивали на вортексе в течение 2 мин. Пробирку интенсивно встряхивали до образования однородной смеси и изменения

цвета вследствие гемолиза. После центрифугирования (3000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость переносили в колпачок для выпаривания и упаривали при 45 °С до 150 мкл, затем оставшуюся жидкость переносили в вials со вставкой.

**Методика получения бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты в образцах мочи:** в микроцентрифужную пробирку последовательно добавляли 200 мкл пробы мочи, 300 мкл ацетонитрила, 3 мкл муравьиной кислоты и ~50 мг хлорида натрия, перемешивали 1 мин на вортексе и центрифугировали 3 мин при 15 000 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали и переносили в новую пробирку, в которую также добавляли 500 мкл воды, 500 мкл 5%-ного раствора гидрокарбоната натрия и 600 мкл дансил хлорида (30 ммоль/л в ацетоне). Далее пробы термостатировали 30 мин при 60 °С, затем охлаждали до комнатной температуры и останавливали процесс дериватизации добавлением 50 мкл 5.5 М соляной кислоты. После этого добавляли 2 мл дихлорметана и экстрагировали на вортексе в течение 3 мин, затем центрифугировали 3 мин при 3000 об./мин. Нижний дихлорметановый слой отбирали и выпаривали, к сухому остатку добавляли 250 мкл смеси вода–ацетонитрил 1 : 1 (по объему).

**Аппаратура, условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.**

Использовали трехквadrupольный масс-спектрометрический детектор Shimadzu LCMS-8050 с жидкостным хроматографом Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Phenomenex Kinetex C18 (2.1 мм × 100 мм, 2.6 мкл) с предколонкой SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC. В качестве подвижной фазы А использовали 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы Б – 0.1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Разделение осуществляли в градиентном режиме элюирования. Время анализа составляло 15 мин, с 0 до 7.5 мин содержание фазы Б увеличивали с 5 до 95% и поддерживали постоянным 2.5 мин, далее с 10.01 мин в течение 5 мин колонку уравнивали 95%-ной подвижной фазой А. Температура термостата колонки при анализе составляла 40 °С, скорость потока 0.3 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл.

Использовали рекомендуемые производителем параметры настройки масс-спектрометра: поток через распылитель (nebulizing gas flow) – 3 л/мин, поток осушающего газа (drying gas flow) – 10 л/мин, поток нагреваемого газа (heating gas flow) – 10 л/мин, температура осушающего газа (DL temp) – 250 °С, температура интерфейса – 400 °С, параметры масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Параметры масс-спектрометрического детектирования в режиме MRM при положительной ионизации

| Вещество                | Ион-предшественник<br>(M + H) <sup>+</sup> , m/z | Ион-продукт,<br>m/z | Энергия соударения,<br>эВ<br>(Shimadzu) |
|-------------------------|--|---------------------|---|
| Мускарин                | 174.15   | 115.00              | –15.0                                   |
|                         |  | 57.05               | –22.0                                   |
|                         |  | 43.05               | –29.0                                   |
| Мусцимол                | 115.04   | 97.95               | –25.0                                   |
|                         |  | 39.00               | –23.0                                   |
| Иботеновая кислота      | 159.03   | 113.0               | –12.0                                   |
|                         |  | 42.1                | –25.0                                   |
| Иботеновая кислота_2DNS | 625.2  | 391.10              | –23.0                                   |
|                         |  | 346.10              | –23.0                                   |
|                         |  | 234.10              | –23.0                                   |
|                         |  | 170.10              | –23.0                                   |
| Мусцимол_2DNS           | 581.2  | 347.10              | –23.0                                   |
|                         |  | 234.10              | –28.0                                   |
|                         |  | 170.10              | –23.0                                   |

Хромато-масс-спектры регистрировали с использованием программного обеспечения LabSolutions.

Для подтверждения результатов опробования методики при анализе реальных образцов (случай 3) использовали масс-спектрометрию высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой. Хроматограф жидкостный (Dionex Ultimate 3000) с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения типа квадруполь-орбитальная ловушка Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Хроматографическая колонка: ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 150 мм, 5 мкл). Условия масс-спектрометрического детектирования: режим детектирования – FMS, PRM; тип ионизации – HESI; режим ионизации – положительная; температура ион-проводящего капилляра – 320 °С; напряжение на капилляре – 4.0 кВ; температура осушающего газа – 300 °С; диапазон сканирования – 70–180  $m/z$ ; диапазон сканирования точной массы – 1.0  $m/z$  ( $\pm 0.5 m/z$ ); разрешение: FMS – 70 000; PRM – 35 000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иботеновая кислота, мусцимол и мускарин являются полярными и низкомолекулярными веществами. Их химические структуры показаны на схеме 1.



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

Первоначально с целью создания и оптимизации метода определения грибных токсикантов в окрестностях города Ноябрьск Ямало-Ненецкого автономного округа собрали образцы грибов мухомора красного (*Amanita muscaria*). Сбор грибов проводили в конце июля и в середине октября. После сбора образцы сушили при 37 °С в течение 48 ч, затем измельчали путем перетирания. Из полученных образцов отмеряли навески по 50 мг и экстрагировали 1 мл метанола на вортексе в течение 3 мин, центрифугировали и разбавляли в соотношении 1 : 20 подвижной фазой А (вода, содержащая 0.1 % муравьиной кислоты),

5 мкл разбавленного экстракта вводили в хроматограф. В приготовленных грибных экстрактах удалось обнаружить мусцимол, иботеновую кислоту и мускарин (рис. 1, 2).

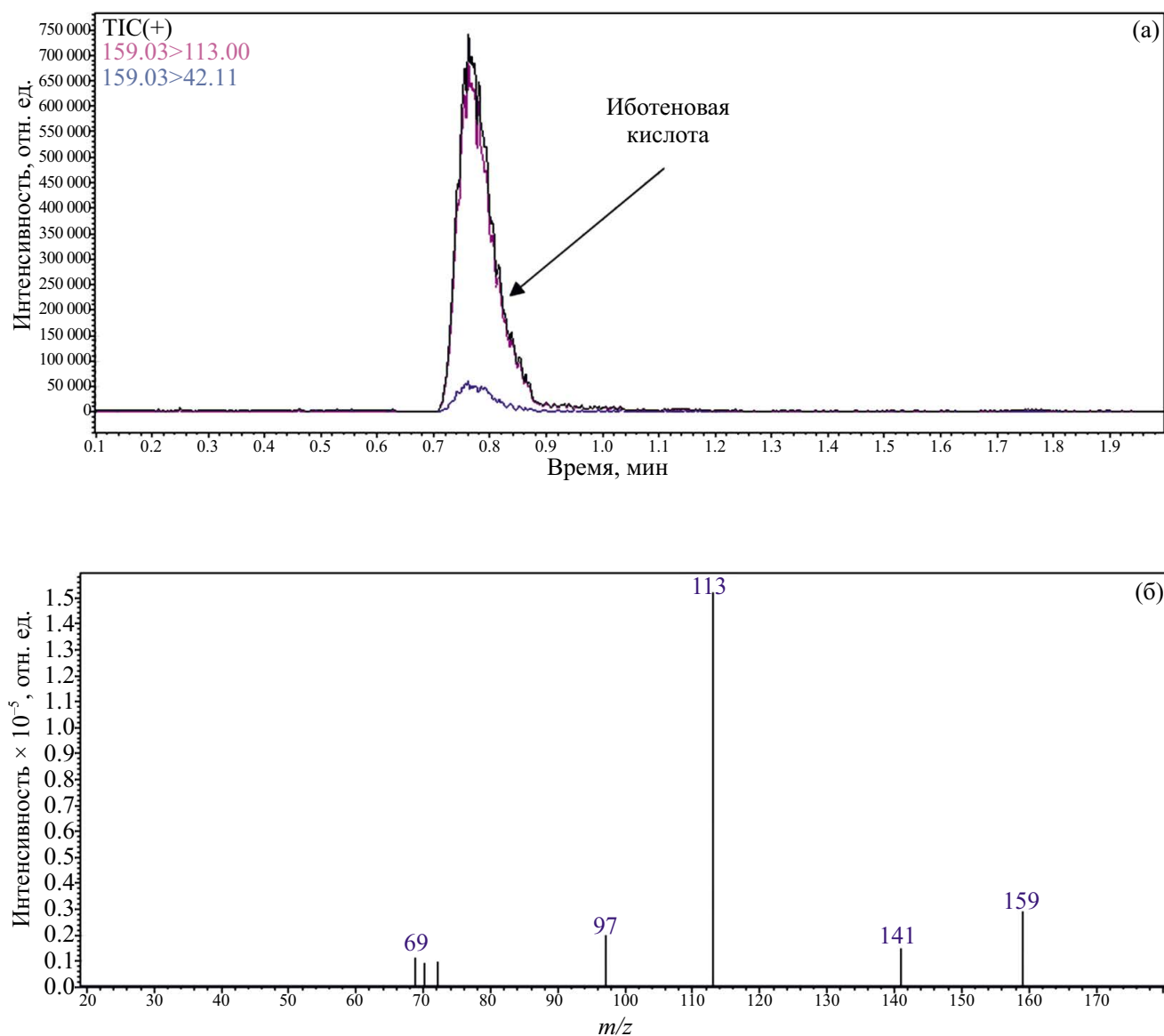
С целью проверки пригодности метода для обнаружения токсикантов красного мухомора в различных типах биологических матриц экстракт грибов разбавляли в соотношении 1 : 20 холостыми образцами мочи и крови. Мускарин удалось обнаружить как в образцах мочи, так и в образцах крови (рис. 3). Мусцимол и иботеновую кислоту обнаружить в биологических матрицах не удалось. По нашему мнению, это связано с тем, что иботеновая кислота и мусцимол (без образования производных) практически не удерживаются на хроматографической колонке и элюируются вместе с солями, присутствующими в моче, что приводит к подавлению ионизации.

Матричный эффект удалось уменьшить путем многократного разбавления пробы, но при этом чувствительность оказалась недостаточной для выявления указанных выше компонентов в моче. Попытка использовать обращено-фазовую колонку Restek Raptor Biphenyl (2.1 мм × 100 мм; 2.6 мкл) также не позволила обнаружить мусцимол и иботеновую кислоту в моче.

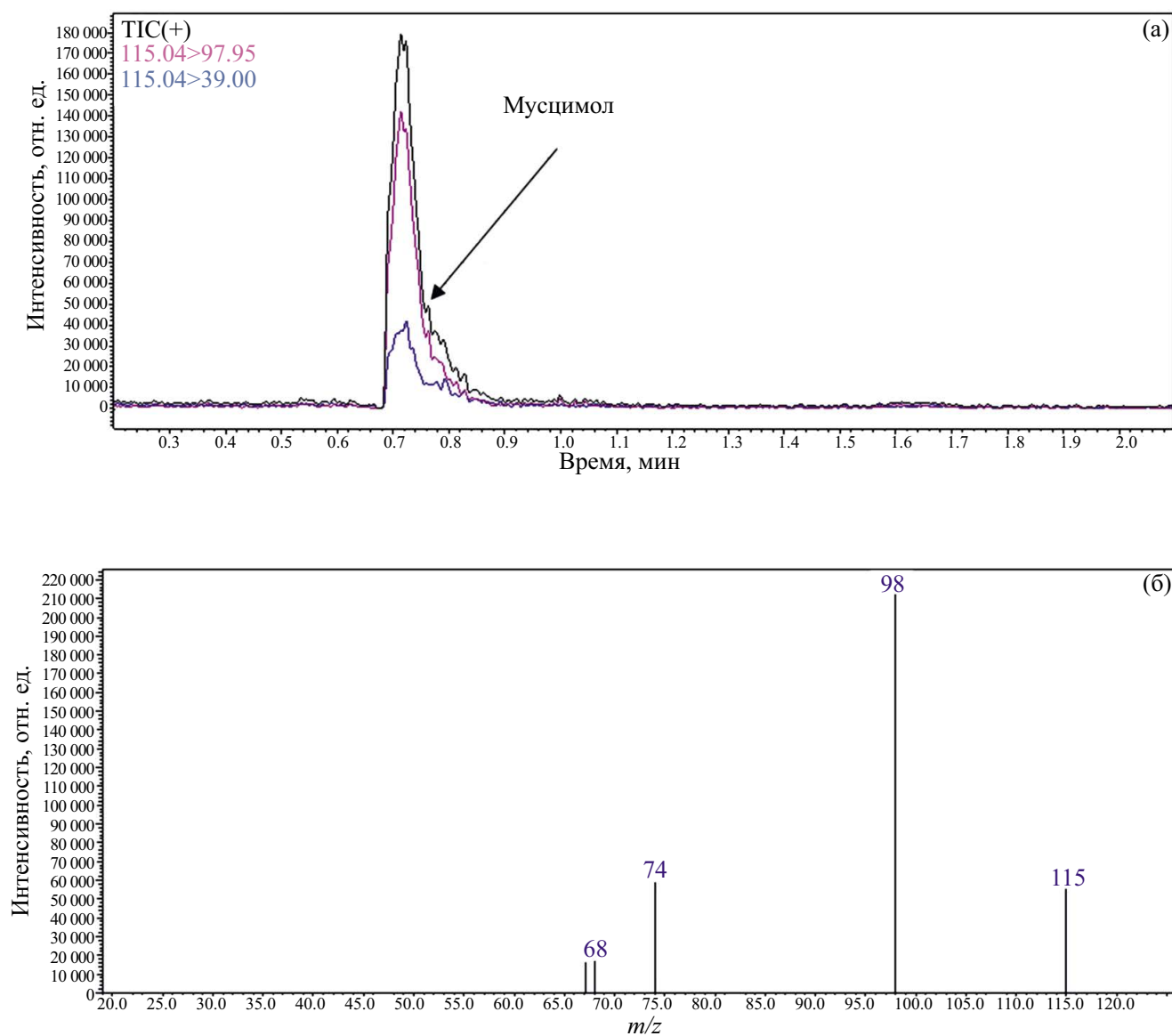
С целью обнаружения мусцимола и иботеновой кислоты использовали методику получения их бидансильных производных, предложенную

Ху и соавт. [9]. В методику [9] внесли изменения в части добавления хлорида натрия в качестве высаливающего агента, что позволило получить видимую границу разделения фаз и тем самым упростить методику для использования ее в рутинной практике. Для анализа использовали экстракты грибов в разбавлении 1 : 20 образцами мочи, не содержащими аналитов. В образцах мочи удалось обнаружить бидансильные производные мусцимола и иботеновой кислоты (рис. 4–6).

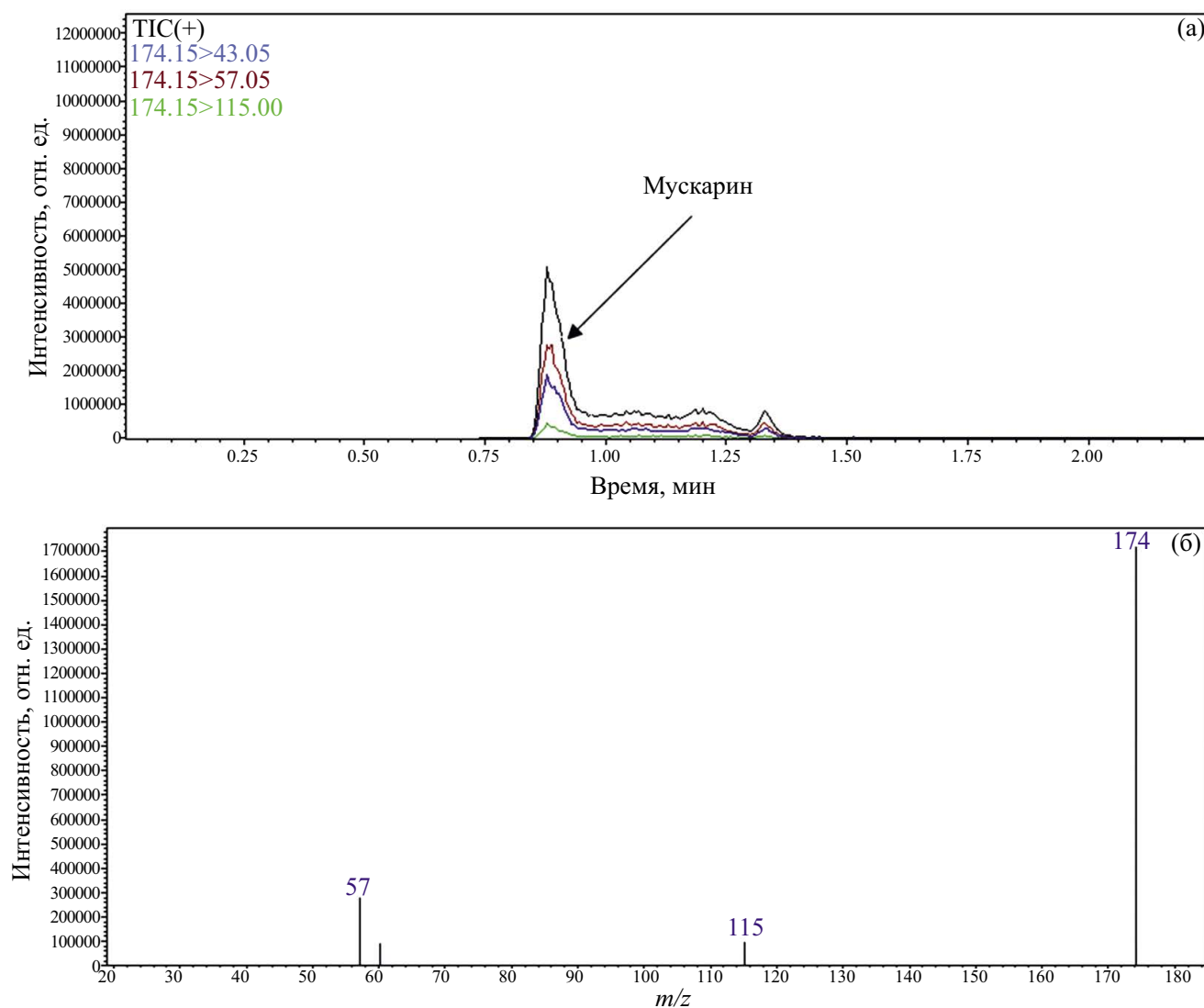
Разработанная методика показала свою эффективность при проведении рутинных химико-токсикологических исследований проб мочи



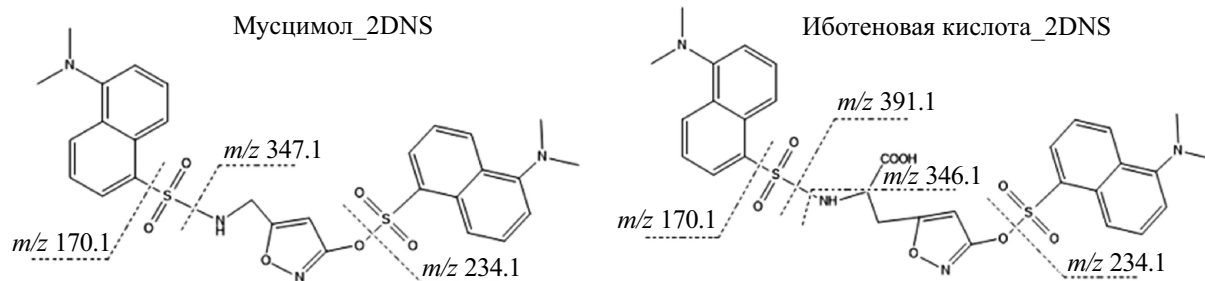
**Рис. 1.** (а) Хроматографический профиль грибного экстракта. Разбавление 1 : 20 подвижной фазой А. MRM-хроматограммы: 159.03 > 113.00, 159.03 > 42.10. (б) Масс-спектр иботеновой кислоты при энергии соударения CE-15 (positive).



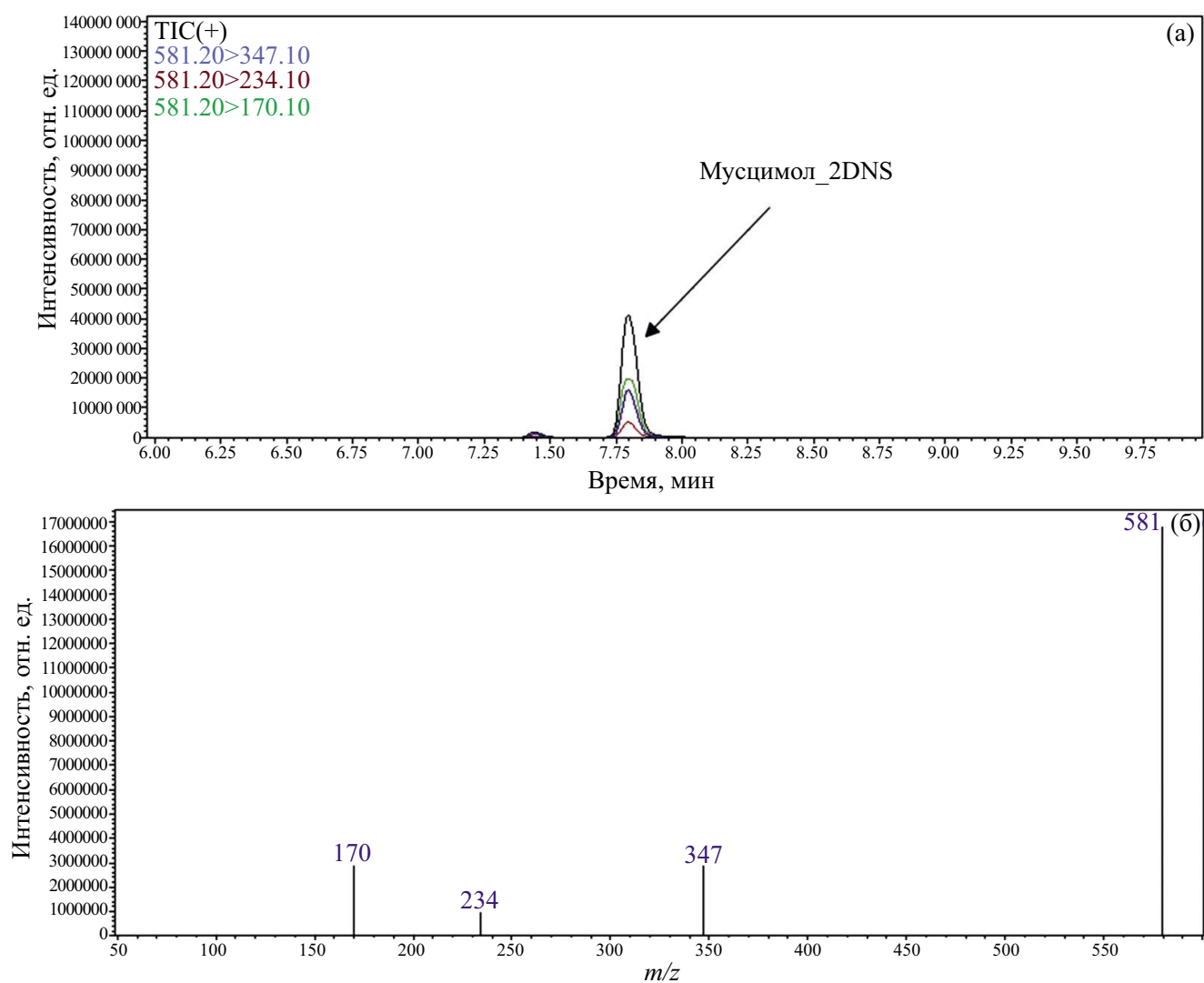
**Рис. 2.** (а) Хроматографический профиль грибного экстракта. Разбавление 1 : 20 подвижной фазой А. MRM-хроматограммы: 115.40 > 97.95, 115.40 > 39.00. (б) Масс-спектр мусцимола при энергии соударения CE-15 (positive).



**Рис. 3.** (а) Хроматографический профиль грибного экстракта. Разбавление 1 : 20 мочевой матрицей. MRM-хроматограммы: 174.15 > 43.05, 174.15 > 57.05, 174.15 > 115.00. (б) Масс-спектр мускарина при энергии соударения CE-15 (positive).

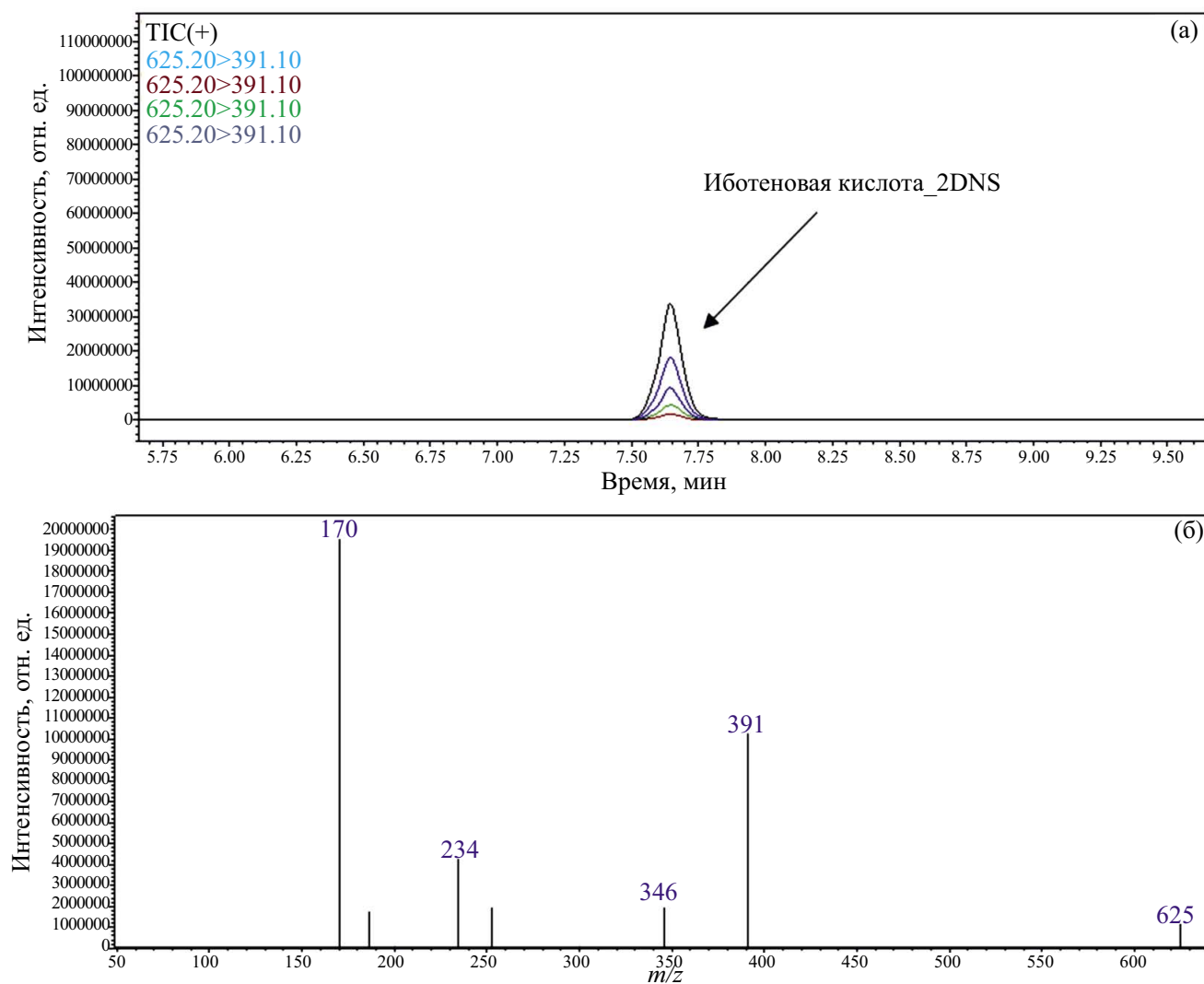


**Рис. 4.** Схема фрагментации бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты.

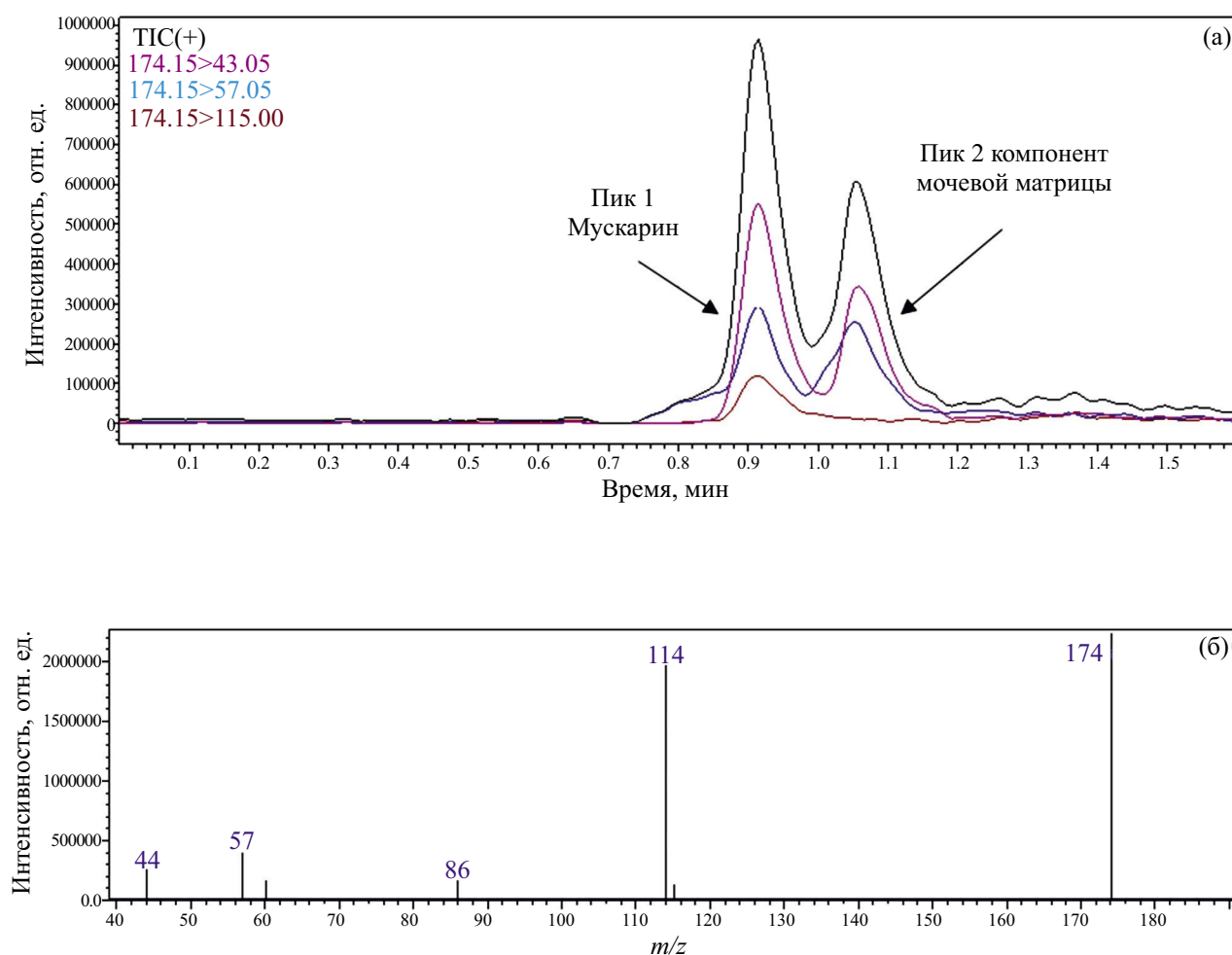


**Рис. 5.** (а) Хроматографический профиль грибного экстракта. Разбавление 1 : 20 мочевой матрицей. MRM-хроматограммы: 581.20 > 347.10, 581.20 > 234.10, 581.20 > 170.10. (б) Масс-спектр бидансильного производного мусцимола при энергии соударения CE-15 (positive).

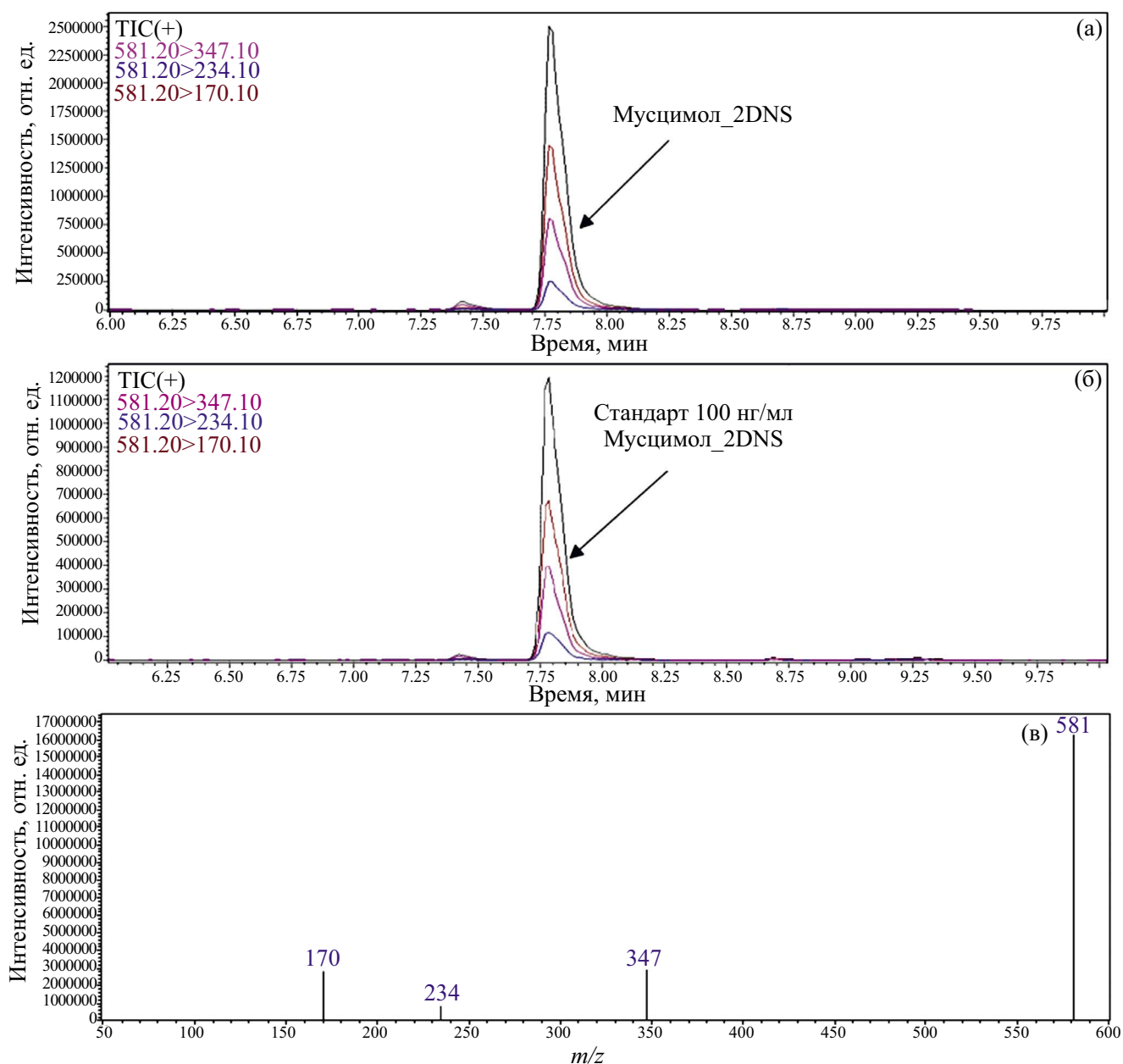




**Рис. 6.** (а) Хроматографический профиль грибного экстракта. Разбавление 1 : 20 мочевой матрицей. MRM-хроматограммы: 625.20 > 391.10, 625.20 > 346.10, 625.20 > 234.10, 625.20 > 170.10. (б) Масс-спектр бидансильного производного иботеновой кислоты при энергии соударения CE-25 (positive).



**Рис. 7.** (а) Хроматографический профиль пробы мочи пациента. MRM-хроматограммы: 174.15 > 43.05, 174.15 > 115.05, 174.15 > 57.05. Пик 1 соответствует мускарину, пик 2 – неизвестному компоненту мочевой матрицы. (б) Масс-спектр мускарина при энергии соударения CE-15 (positive).



**Рис. 8.** (а) Хроматографический профиль образца мочи. MRM-хроматограммы: 581.20 > 347.10, 581.20 > 234.10, 581.20 > 170.10. (б) Хроматографический профиль стандарта мусцимола в концентрации 100 нг/мл. MRM-хроматограммы: 581.20 > 347.10, 581.20 > 234.10, 581.20 > 170.10. (в) Масс-спектр бидансильного производного мусцимола при энергии соударения CE-15 (positive) в пробе мочи.

с подозрением на отравление грибами. Ниже приведены три случая отравлений грибными токсикантами.

**Случай 1.** Случай совместного употребления  $\alpha$ -пирролидиновалерофенона, мефедрона и грибов красного мухомора. Пациент выпал с четвертого этажа, был доставлен в приемное отделение городской больницы, где ему была оказана медицинская помощь и взяты образцы для химико-токсикологического анализа.

В образце мочи общим скрининговым методом был обнаружен мускарин (рис. 7). После обнаружения мускарина выполнили все необходимые операции для получения дансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты (см. выше), при этом удалось получить бидансильные производные мусцимола (рис. 8). Обнаружить иботеновую кислоту в образцах мочи не удалось. По нашему мнению, иботеновая кислота подверглась полной декарбоксилизации в мусцимол.

**Случай 2.** Молодой человек, 17 лет, на протяжении “всего лета” регулярно употреблял сухую смесь грибов мухомора в количестве 1 г. Осенью доза была увеличена до 5 г, после чего пациент был доставлен в отделение городской больницы с отравлением. Мочу отобрали в первые сутки после поступления и отправили в химико-токсикологическую лабораторию. В образце мочи общим скрининговым методом был обнаружен мускарин. После обнаружения мускарина выполнили все необходимые операции для получения бидансильных производных мусцимола и иботеновой кислоты (см. выше), при этом удалось получить бидансильные производные мусцимола. Интенсивность отклика пика бидансильного производного мусцимола в образце мочи соответствовала интенсивности отклика стандарта мусцимола в концентрации 100 нг/мл. Иботеновая кислота обнаружена не была.

**Случай 3.** В химико-токсикологическую лабораторию поступили биологические пробы от пациента (кровь, моча). Предварительный клинический диагноз “Острая интоксикация, вызванная неизвестным веществом”. Клинические признаки включали в себя психомоторное возбуждение, дезориентацию во времени и пространстве, галлюцинации. Со слов пациента, он употребил неизвестное вещество, которое позднее называл “авторским наркотиком”. При ВЭЖХ-МС/МС-анализе в образцах крови и мочи обнаружили мускарин. Интенсивность отклика в образцах мочи была более чем в 50 раз больше, чем в образцах крови. При этом были зарегистрированы полные спектры ионов-продуктов мускарина как в образцах экстрактов красного мухомора, так и в исследуемых образцах мочи. Библиотечный поиск проводили с использованием библиотек масс-спектров, включенных в пакет

методов Forensic Toxicology DB (Shimadzu). Для подтверждения результатов использовали масс-спектрометрию высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой.

\*\*\*

Разработана двухэтапная методика обнаружения мускарина, мусцимола и иботеновой кислоты в data-зависимом режиме МРМ-анализа с одновременной регистрацией полных масс-спектров целевых веществ. Методика успешно опробована на реальных образцах мочи (крови) пациентов с клиническими признаками отравления.

## 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.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все биологические материалы, используемые в работе, являются обезличенными биологическими пробами. Пробы были изъяты из морозильной камеры химико-токсикологической лаборатории перед их утилизацией и для своего использования не требуют разрешения этического комитета.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kyan J.B., David A.G. Mycotoxins revisited: Part I // J. Emerg. Med. 2005. V. 28. № 1. P. 53. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2004.08.013>
2. Waser P.G. The pharmacology of Amanita muscaria // Psychopharmacol. Bull. 1967. V. 4. № 3. P. 19.
3. 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.
4. Michelot D., Melendez-Howell L.M. Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology // Mycol. Res. 2003. V. 107. № 2. P. 131.
5. 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.
6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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>

## METHODS FOR THE DETECTION OF MUSCARINIC, MUSCIMOL AND IBOTENIC ACID IN FUNGI AND BIOLOGICAL MATRICES USING THE HPLC-MS/MS METHOD

M. Sh. Aigumov<sup>a,\*</sup>, A. P. Novikov<sup>b</sup>, M. V. Vishnevskii<sup>c</sup>, N. A. Chernova<sup>b</sup>, I. V. Maidanec<sup>b</sup>,  
M. A. Gofenberg<sup>d</sup>, D. V. Kuznecov<sup>e</sup>, N. V. Samyshkina<sup>f</sup>, L. N. Rizvanova<sup>g</sup>,  
A. Z. Temerdashev<sup>h</sup>, S. A. Savchuk<sup>i,j</sup>

<sup>a</sup>*Noyabrsk Psychoneurological Dispensary  
Noyabrsk, Russia*

<sup>b</sup>*Surgut Clinical Psychoneurological Hospital  
Surgut, Russia*

<sup>c</sup>*Center for Innovative Mycological Research  
Moscow, Russia*

<sup>d</sup>*Sverdlovsk Regional Clinical Psychiatric Hospital  
Ekaterinburg, Russia*

<sup>e</sup>*Volgograd Regional Clinical Narcological Dispensary  
Volgograd, Russia*

<sup>f</sup>*Novourengoy Psychoneurological Dispensary  
Novy Urengoy, Russia*

<sup>g</sup>*Nizhnevartovsk Psychoneurological Dispensary  
Nizhnevartovsk, Russia*

<sup>h</sup>*Research and Production Team of “Analyt” Research and Development Center of Kuban State University  
Krasnodar, Russia*

<sup>i</sup>*Association of Specialists in Chemical-Toxicological and Forensic Chemical Analysis  
St. Petersburg, Russia*

<sup>j</sup>*The Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS (IPCE RAS)  
Moscow, Russia*

\*E-mail: [aygumov.m@yandex.ru](mailto:aygumov.m@yandex.ru)

**Abstract.** An algorithm for two-step detection of muscarinic, ibotenic acid and muscimol in urine samples is described. A two-step method for the detection of muscarinic, muscimol and ibotenic acid in data-dependent MRM analysis mode with simultaneous registration of complete mass spectra of the target substances was developed. Detection of analytes was carried out by HPLC with a three-quadrupole mass spectrometric detector (LC-MS/MS Shimadzu 8050). Chromatographic separation was performed on a column with reversed-phase sorbent Phenomenex Kinetex C18. At the first stage, muscarine was detected in a diluted urine sample; at the second stage, muscimol and ibotenic acid were detected using the bimolecular dansylation method. The method was successfully applied in practice for routine chemical-toxicological studies of urine samples of patients delivered with suspected mushroom poisoning.

**Keywords:** muscimol, ibotenic acid, muscarine, mass spectra, chromatography-mass spectrometry, dansyl chloride.