



**ЕВДОКИМОВА
ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ИНТОКСИКАЦИЙ ГРИБАМИ РОДА *AMANITA*:
МУХОМОРОМ КРАСНЫМ (*AMANITA MUSCARIA*) И
МУХОМОРОМ ПАНТЕРНЫМ (*AMANITA PANTHERINA*)**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Стрелова Ольга Юрьевна

доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич

доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований

Люст Елена Николаевна

кандидат фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры токсикологической химии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «29» июня 2026 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д. 14) и на сайте диссертационного совета (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Употребление мухомора красного (*Amanita muscaria*, *AM*) и мухомора пантерного (*Amanita pantherina*, *AP*) с целью получения галлюциногенного эффекта и их доступность становятся факторами, способствующими росту числа острых отравлений. Понятие «микродозинг» применяется производителями для обозначения факта употребления малых доз мухоморов с целью оказания так называемого «терапевтического эффекта без вреда для организма». Данная продукция представлена мухоморами в виде капсул, высушенных шляпок, экстрактов, настоек, которая до недавнего времени активно реализовывалась индивидуальными предпринимателями на российских платформах электронной коммерции, таких как «OZON», «Wildberries» и через интернет-магазины, такие как «Три мухомора», «Лесной лекарь», «Дух мухомора», «Micronization Lab.». Производители рекомендуют к употреблению данные грибы в целях повышения работоспособности, нормализации сна, улучшения когнитивных функций, однако представленная информация не несет никакого научного обоснования и не содержит ссылок на достоверные источники.

В Российской Федерации хранение, покупка и продажа *AP* и *AM* в различных видах (капсул, высушенных шляпок), экстрактов, настоек из них, а также психоактивных компонентов в их составе, таких как иботеновая кислота и мусцимол, нормативно не регулируются, что стало причиной их рекреационного использования (то есть использования в немедицинских целях для получения удовольствия) и, как следствие, большого количества отравлений.

До настоящего времени диагноз «Острое пероральное отравление мухоморами» (Токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных грибах Т62.0) устанавливался только на основании анамнеза и клинической картины. Однако нужно учитывать, что постановка диагноза становится затруднительной для пациентов, поступающих в медицинское учреждение в состоянии комы. Химико-токсикологический анализ является обязательным элементом клинико-лабораторной диагностики согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29.04.2025 г. №262н «Об утверждении порядка проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), включающего определение клинических признаков опьянения и правила химико-токсикологических исследований».

Отсутствие стандартов и методик определения токсичных компонентов *AM* и *AP*, удовлетворяющих требованиям по валидации биоаналитических методик, вызывает существенные затруднения при получении объективных данных для постановки диагноза. Поэтому разработка частных методик и алгоритма проведения лабораторной диагностики биообъектов в случае интоксикации грибами *AM* и *AP* является актуальной темой научного исследования.

Степень разработанности темы исследования. Проблемам разработки методик идентификации токсических компонентов мухомора посвящены работы отечественных и зарубежных ученых: Савчук С.А., Айгунов М.Ш., Вишневский М.В. и др. (2025), Темердашева А.З. (2021), Xu X.M., Zhang J. S., Huang B.F., Han J.L. & Chen Q. (2020), Stříbrný, J., Sokol M., Merová V. & Ondra P. (2012), Merova V., Ondra P. (2008).

Цель диссертационной работы. Разработка частных методик определения в биологических объектах токсичных компонентов и алгоритма проведения лабораторной диагностики острых отравлений мухоморами.

Задачи диссертационной работы:

1. Анализ нормативных актов, регулирующих оборот наркотических средств и психотропных веществ, с целью установления наличия государственного контроля за оборотом мухоморов, сырья, продуктов из них и основных психоактивных компонентов: мусцимола и иботеновой кислоты.

2. Разработка и валидационная оценка методик обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в капсулах «микродозинга».

3. Разработка и валидационная оценка методик обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в биообъектах (моча, кровь, волосы).

4. Разработка и апробация алгоритма лабораторной диагностики отравлений мухоморами *AP* и *AM*.

Научная новизна исследования. Впервые разработаны подходы к процедуре валидации биоаналитической методики для целей лабораторной диагностики при отсутствии стандартного образца целевого токсиканта. Установлено, что в соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик: ICH M10 (Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis), USP <621> (Хроматография); ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография; ЕР 2.2.46 (Хроматографические методы) валидация возможна, но требует использования альтернативных методов оценки параметров: определение пригодности хроматографической системы по показателям: разрешение ($RS \geq 1,5$), сигнал/шум (> 3), совпадение времени удерживания (отклонение $\pm 5\%$), эффективность (> 2000 для ВЭЖХ), симметрия (от 0,8 до 1,5), высота пика, эквивалентная теоретической тарелке, селективности / специфичности, интерференционный эффект матрицы и робастность.

Впервые проведено систематизированное исследование токсических компонентов капсул сырья *AM* и *AP*. Доказано, что содержание мусцимола выше в капсулах, содержащих сырье *AP*, что оказывает влияние на особенности клинической картины отравления именно данным видом мухомора, выражающееся в «пантериновом синдроме».

Впервые экспериментально доказано, что наиболее информативным объектом для лабораторной диагностики отравлений мухоморами является моча. Показано, что в крови возможно только достоверное обнаружение мусцимола. Волосы непригодны для постановки диагноза как острого, так и хронического употребления мухоморов из-за высокой гидрофильности мусцимола и иботеновой кислоты и отсутствия накопления в ткани волоса.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании предложенного подхода к валидации в отсутствие стандартного образца доказано, что разработанные методики пригодны для обнаружения токсических компонентов в капсулах (мускарин, мусцимола, иботеновой кислоты) и в моче (иботеновой кислоты и мусцимола).

Впервые представлены результаты сравнения эффективности разрешения критических пар гидрофильных аналитов при использовали различного режима элюирования (изменения состава подвижной фазы в хроматографии). Апробирован метод ступенчатого градиента для капсул, который показал достаточную эффективность.

Проведена сравнительная оценка эффективности разделения гидрофильных токсикантов мухомора на колонках Shim-pack FC-ODS, Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl и Shim-pack GIST C18-Aqua HP. Установлено, что колонка Shim-pack GIST C18-Aqua HP обеспечивает эффективное разделение мускарин и мусцимола, параметры определения удовлетворяют критериям приемлемости. Доказано, что при анализе извлечений из капсул и последующей дериватизации возможно обнаружение иботеновой кислоты.

На основании полученных результатов разработан методический подход к повышению эффективности хроматографического исследования высокополярных, низкомолекулярных токсикантов, обладающих слабой сорбцией на обращенно-фазовых колонках.

Впервые разработаны частные методики пробоподготовки и обнаружения токсических компонентов мухоморов в биообъектах (моча, кровь, волосы). Изучена возможность применения ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ мухомора из волос. Впервые апробирован метод бимолекулярного дансирования для анализа мочи.

Разработан и предложен алгоритм проведения лабораторной диагностики острых пероральных отравлений мухоморами, что способствует повышению качества медицинской помощи.

Результаты работы внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России на фармацевтическом факультете по программе специалитета 33.05.01 «Фармация» по учебной дисциплине «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» и в программу ординатуры по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» по учебной дисциплине «Организация проведения химико-токсикологической экспертизы» (акт внедрения от 01.09.2025).

Результаты диссертационного исследования внедрены в практику работы химико-токсикологических лабораторий ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» (акт внедрения от 01.10.2025) и СПбГБУЗ «Городская наркологическая больница» (акт внедрения от 01.10.2025).

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в период с 2023 г. по 2026 г. с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа. Теоретическую основу исследования составляли труды отечественных и зарубежных ученых по проблемам лабораторной диагностики интоксикаций компонентами *AP* и *AM*. Методология исследования заключалась в изучении возможности применением жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии при анализе токсичных компонентов мухомора в капсулах из грибов и из биологических объектов лиц, поступивших в медицинские учреждения в состоянии острой интоксикации.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения нормативной базы, регламентирующей оборот сырья продукции из мухоморов.
2. Результаты разработки и валидационной оценки методик обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в капсулах «микродозинга».
3. Результаты разработки и валидационной оценки методик обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в биологических объектах (моча, кровь, волосы).
4. Апробация алгоритма лабораторной диагностики отравлений *AP* и *AM*.

Степень достоверности и апробация работы. Результаты работы представлены и доложены на: Научно-практической конференции «Джанелидзеовские чтения – 2024» (Санкт-Петербург, 2024), на 24-м Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Скорая медицинская помощь – 2025» (Санкт-Петербург, 2025), на XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2024), на научном симпозиуме, посвященном памяти профессора Е.М. Саломатина, в ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (Москва, 2025).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 1 статья в издании, включенном в международные базы Scopus и PubMed.

Связь задач исследования с планом фармацевтических наук. Исследование выполнено в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках научного направления «Разработка, изучение и стандартизация потенциально активных фармацевтических субстанций и лекарственных средств для лечения различных патологических состояний, в том числе интоксикаций и радиационных поражений» (номер государственной регистрации И124031200097-9).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 4. Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований,

эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автором лично проведен поиск отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, разработаны и выполнены все стадии эксперимента на базе ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» (СПбНИИ СП), самостоятельно проанализированы результаты исследования. Основные публикации и доклады по работе подготовлены лично автором и проведены в период с 2023 г. по 2026 г., отражены в качестве результатов. Личный вклад автора не менее 90%.

Объекты исследования. Кровь, моча, волосы пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ СПбНИИ СП с диагнозом «Острое пероральное отравление мухоморами», капсулы мухомора красного и пантерного из интернет-магазина «Лесной лекарь» (Россия) и грибы, собранные в лесах Ленинградской области осенью 2025 г. В качестве объектов исследования также были использованы образцы высушенных шляпок плодовых тел *AM* и *AP* (грибная аптека FUNGITHERA, Россия) и порошок плодовых тел *AM* в капсулах (производитель Die Familie, Россия) и *AP* в капсулах (производитель ALTAI ECO, Россия).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 151 странице компьютерного набора, иллюстрирована 62 рисунками и 18 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (4 главы), заключения, списка литературы, включающего 123 наименования (в т.ч. 73 источника зарубежной литературы), и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дана общая характеристика токсикологически значимых компонентов мухомора, информация о ботаническом описании и химическом составе *AP* и *AM*. Приведены основные симптомы отравления данными видами грибов и рассмотрены принципы лечения. Проведен обзор нормативной базы, регламентирующей оборот сырья мухомора и психоактивных соединений в его составе.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Объекты исследования: моча пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ СПб НИИ СП с диагнозом «Острое пероральное отравление мухоморами», собранная на основании анамнеза и клинической картины; капсулы *AP* и *AM*, приобретенные в интернет-магазине «Лесной лекарь» (Россия); грибы, собранные в лесах Ленинградской области осенью 2025 года; высушенные шляпки плодовых тел *AP* и *AM*, (грибная аптека FUNGITHERA, Россия), порошок плодовых тел *AM* в капсулах (производитель Die Familie, Россия) и *AP* в капсулах (производитель ALTAI ECO, Россия).

Исследование проводили на приборах: газовый хроматограф QP 2020, (Shimadzu, Япония), соединенный с моноквадрупольным масс-спектрометром, библиотека NIST17. Модульный жидкостный хроматограф Nexera XR с тандемным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu, Япония), микроскоп Микромед-1 и Микроскоп цифровой Bresser Biolux Touch 5 Мпикс HDMI.

Глава 3. Результаты и обсуждения

3.1 Статистика отравлений *AP* и *AM* и актуальность разработки алгоритма лабораторной диагностики. Статистические данные Научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе по количеству отравлений мухоморами в период 2022-2024 года представлены на рисунке 1.

Динамика острых отравлений грибами за
2022-2024 г

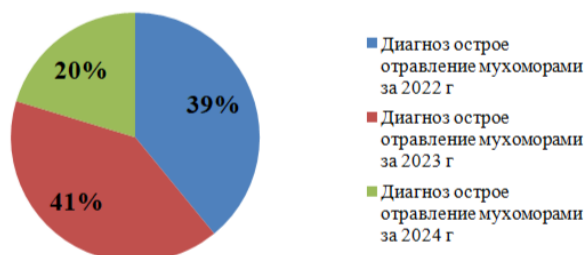


Рисунок 1 – Динамика острых пероральных отравлений мухоморами в период с 2022 год по 2024 год по статистическим данным Центра лечения острых отравлений ГБУ СПб НИИ СП И.И. Джанелидзе

Данные интервью пациентов с диагнозом отравления мухоморами указывают, что все респонденты, практикующие микродозинг, до начала применения мухоморов имели опыт употребления наркотических веществ. Около 30% пациентов регулярно употребляли галлюциногенные дозы (около 10 г). Около 60% пациента отметили физиологическую кумуляцию эффекта при употреблении. Все опрошенные отрицали возникновение толерантности. Все пациенты свободно приобретали сырье мухомора в интернет-магазине. Интервью позволило реконструировать процесс и выявить скрытые аспекты: мотивы, ценности, убеждения, установки.

3.1.1 Правовое регулирование оборота сырья и продукции (БАД), содержащего АМ и АР. В РФ, несмотря на данные научных исследований об опасности, прежде всего, бесконтрольного применения мухоморов и статистики отравлений, как сами грибы, так и их психоактивные химические вещества (прежде всего мусцимол и иботеновая кислота) не внесены ни в один из нормативных актов, регулирующих обращение наркотических средств и психотропных веществ.

За основу регулирования оборота мухоморов можно предложить вариант регулирования оборота грибов рода *Psilocybe*, содержащих психоактивные вещества псилоцин и псилоцибин. В I список Постановления Правительства № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в РФ» (ПП РФ № 681), в качестве наркотических средств внесены психоактивные вещества и сами грибы, т.е. их сбор, продажа, покупка и т.п. подпадают под действие Уголовного кодекса РФ: 231 УК РФ (незаконное культивирование), а также статьи, связанные с незаконным оборотом (приобретение, хранение, перевозка, сбыт) наркотических средств (статьи 228, 228.1 УК РФ, в зависимости от обстоятельств).

3.2 Разработка методики анализа капсул мухомора красного и пантерного методом ВЭЖХ-МС/МС

3.2.1 Ботаническая идентификация высушенных плодовых тел и капсул АР и АМ для целей лабораторной диагностики отравлений. Исследование образцов высушенных шляпок плодовых тел и порошка плодовых тел АР и АМ проводилось на микроскопе, помещая образец на покровное стекло в каплю глицерина, закрывали покровным стеклом и рассматривали при помощи микроскопа Микромед-1 при увеличении в 100 и 400 раз и Микроскопа Bresser Biolux Touch 5 Мпикс HDMI при увеличении в 500 и 1000 раз (рисунок 2).

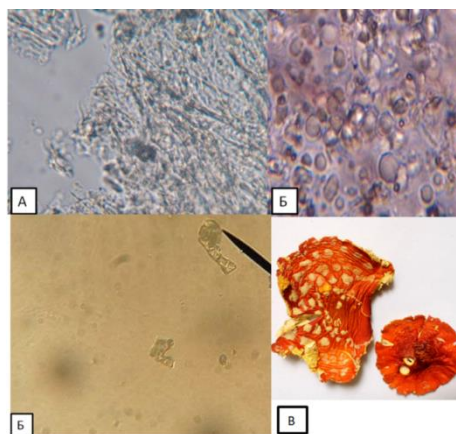


Рисунок 2 – Диагностические признаки высушенных шляпок *AM*, (А) фрагменты мицелия; (Б) – базидиоспоры, (В) внешний вид

Высушенные фрагменты плодовых тел и порошка плодовых тел в капсулах имеют все характерные макро и микро диагностические морфологические признаки данных видов грибов *AM* и *AP*, описанные в литературе (Ивойлов А. В., 2017, Фомина, Ю.С., 2022) (рисунок 2 и 3). Порошок плодового тела *AP* окрашивается в сине-фиолетовый цвет с раствором Люголя (положительная реакция на крахмал) (рисунок 3 Г).

Таким образом, была установлена идентичность ботанических признаков грибов и порошка капсул. Полученные данные позволяют использовать извлечения из капсул в качестве референсных образцов для разработки методики определения целевых токсикантов в биологических объектах для лабораторной диагностики в отсутствии стандартных образцов.

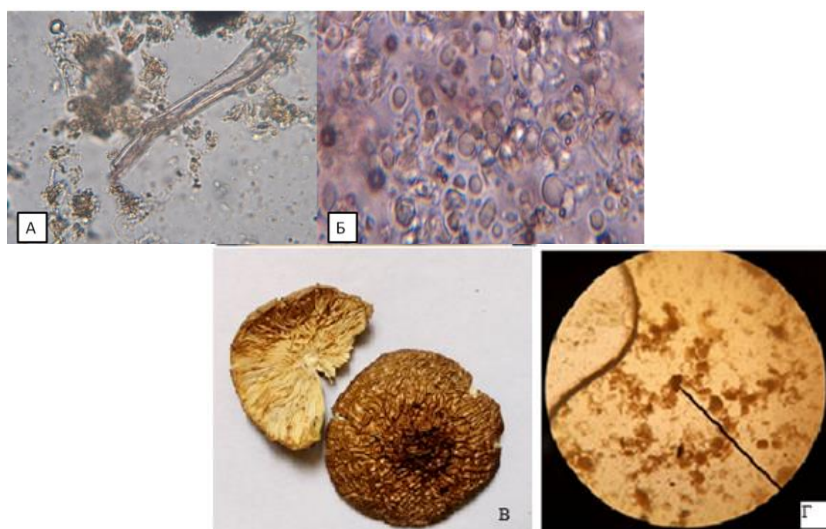


Рисунок 3 – Диагностические признаки высушенных шляпок *AP* (А) фрагменты мицелия; (Б) базидиоспоры; (В) внешний вид; (Г) окрашивание раствором Люголя

3.2.2 Разработка методики определения мусцимола и мускарина методом ВЭЖХ МС/МС. Изолирование: навески по 300 мг порошка из капсул в центрифужных пробирках, заливали 3 мл метанола и настаивали 24 ч при комнатной температуре при периодическом перемешивании, затем центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин, центрифугат отбирали и фильтровали через шприцевые насадки с мембраной из политетрафторэтилена (PTFE), выпаривали до сухого остатка, растворяли в 500 мкл подвижной фазы А, вводили в инжектор хроматографа.

Идентификацию целевых соединений проводили по масс-спектру и времени удерживания на каждой колонке (рисунок 4, таблица 1), наблюдаются пики молекулярного

иона мускарина (4 А) и мусцимола (4 Б) с характеристическими массами: мусцимола 39 m/z, 97 m/z; мускарина 43 m/z и 57 m/z.

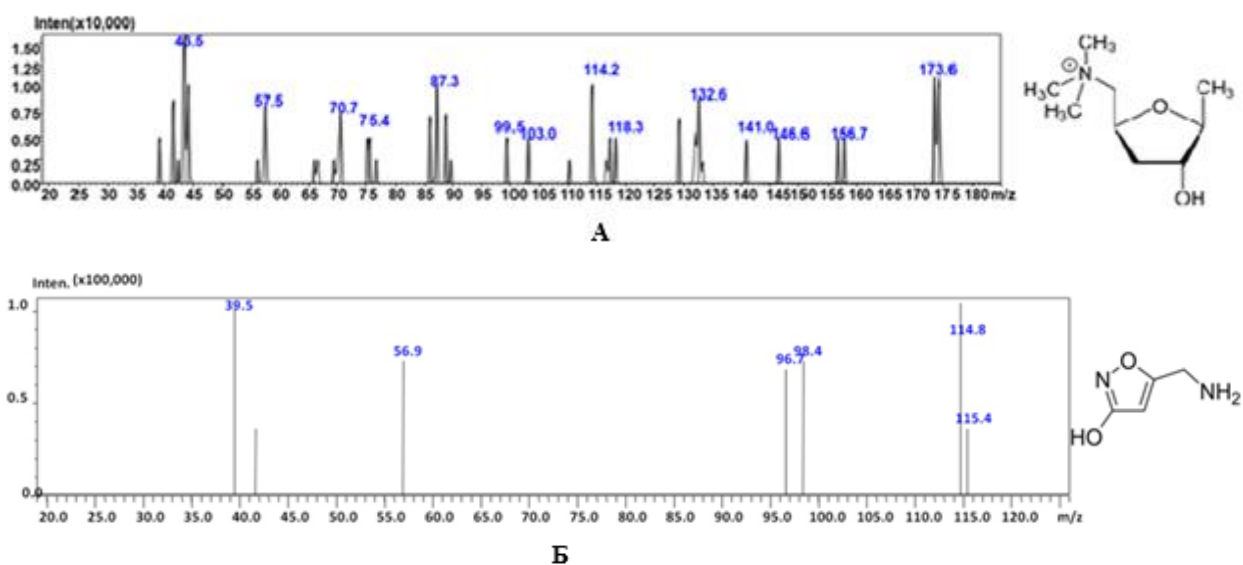


Рисунок 4 – Спектр ионов-продуктов и структурная формула мускарина (А) и мусцимола (Б). Энергия соударений (СЕ) -22

Проводили сравнительный анализ пригодности колонок для анализа извлечения из капсул *AP* и *AM* и оценку оптимального режима элюирования. (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования из капсул методом ВЭЖХ МС/МС на колонках различной полярности

Колонка	Время удерживания аналитов, мин	«Мертвое время» колонок
Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония);	Мускарин 0,90 мин Мусцимол 0,80 мин	3 мин
Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl (4.6 мм × 150 мм, 2 мкм) (Shimadzu, Япония);	Мускарин 1,60 мин Мусцимол 1,23 мин	2 мин
Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония)	Мускарин 3,48 мин Мусцимол 2,35 мин	2 мин

Мускарин и мусцимол являются высоко полярными соединениями с малой молекулярной массой, поэтому обращено-фазовые колонки C18, которые наиболее часто используются в рутинном токсикологическом анализе, не обладают достаточной сорбцией токсикантов. Еще одной проблемой становится высокая вариабельность содержания целевых соединений в высушенном сырье: условия и время сушки и хранения, время и место сбора могут значительно изменять химический состав конечного продукта, что не позволяет использовать содержимое капсул для градуировки приборов и исключает возможность количественного определения токсикантов.

Результаты разработки селективной методики обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в капсулах «микродозинга» показали: наиболее эффективное разделение токсичных компонентов проходит на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм х 150 мм, 3 мкм) в режиме: температура колонки 45°C; элюент - фаза А (0.3% об. муравьиной

кислоты в воде) и В (ацетонитрил); скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин; объем вводимой пробы - 10 мкл (рисунок 5, 6 и таблица 2).

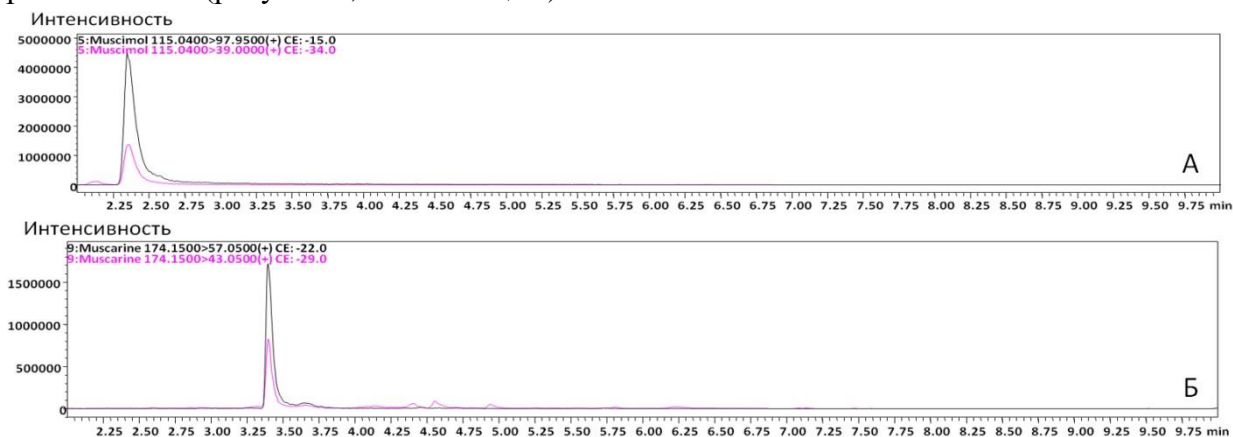


Рисунок 5 – Хроматограммы извлечения из капсул красного мухомора на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 со ступенчатым градиентным элюированием (А) мусцимол; (Б) мускарин

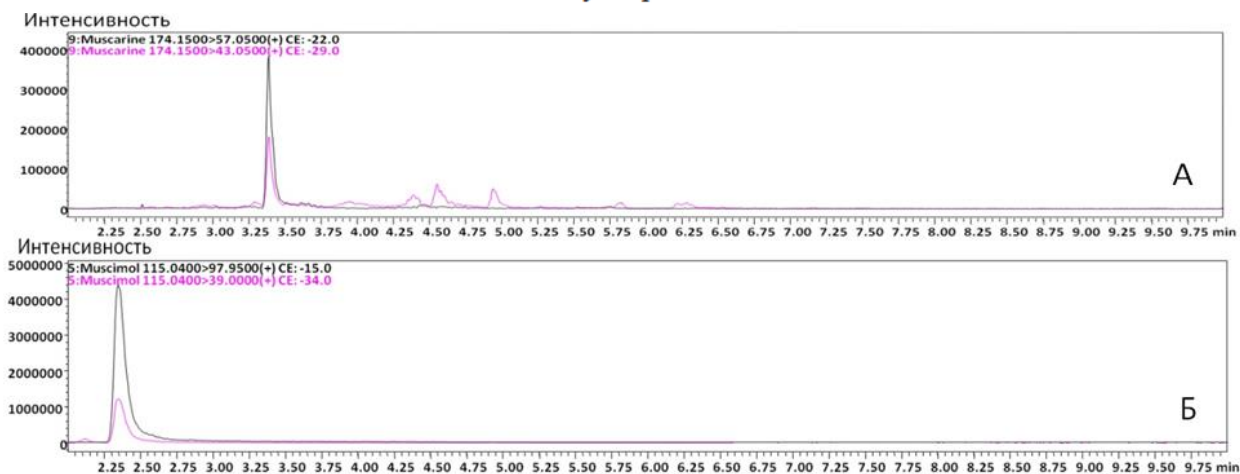


Рисунок 6 – Хроматограмма извлечения из капсул пантерного мухомора Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 со ступенчатым градиентным элюированием мускарин (А); мусцимол (Б).

Использование ступенчатого градиента элюирования позволило повысить эффективность разделения компонентов. Однако ограничением данной методики является то, что она не позволяет провести определение иботеновой кислоты, которая в немалой степени обуславливает характерные признаки и тяжесть клинической картины отравления.

3.2.3 Валидационная оценка методики определения мусцимола и мускарина методом ВЭЖХ МС/МС

3.2.3.1 Оценка пригодности хроматографической системы. В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик, указанными ранее, проводили определение пригодности хроматографической системы и установили, что система пригодна, однако пики несимметричны (Tailing $F > 1,5$), причиной этому может быть высокая концентрация целевых соединений в извлечении, взаимодействие аналитов с силанольными группами колонки (таблица 2).

Из-за отсутствия стандартных образцов является невозможным проведение градуировки прибора, выполнение количественного анализа и ограничена возможность процедуры валидации методики.

Таблица 2 – Результаты определения пригодности хроматографической системы при анализе капсул на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP в градиентном ступенчатом режиме элюирования с требованиями НД

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД
RS	10,9	$\geq 1,5$
сигнал/шум	AM: мусцимол (11,31); мускарин (27,14); AP: мусцимол (18,61); мускарин (10,73)	> 3
время удерживания, (мин)	мусцимол ($2,36 \pm 0,02$), мускарин ($3,48 \pm 0,02$)	отклонение $\pm 5 \%$
эффективность	AM: мусцимол (4379); мускарин (36160); AP: мусцимол (5485); мускарин (50486)	> 2000
симметрия	AM: мусцимол (1,682); мускарин (1,779); AP: мусцимол (1,699); мускарин (1,675)	от 0,8 до 1,5
Интерференционный эффект матрицы	На хроматограмме не наблюдаются пики эндогенных веществ в аналитически значимой области, и возможности детектирования позволяют не учитывать эти эффекты.	
Робастность	Методика устойчива при использовании следующих параметров: колонка Shim-pack GIST C18-Aqua HP, градиентный ступенчатый режим элюирования, состав подвижной фазы: Элюент - фаза А (0,3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин.	

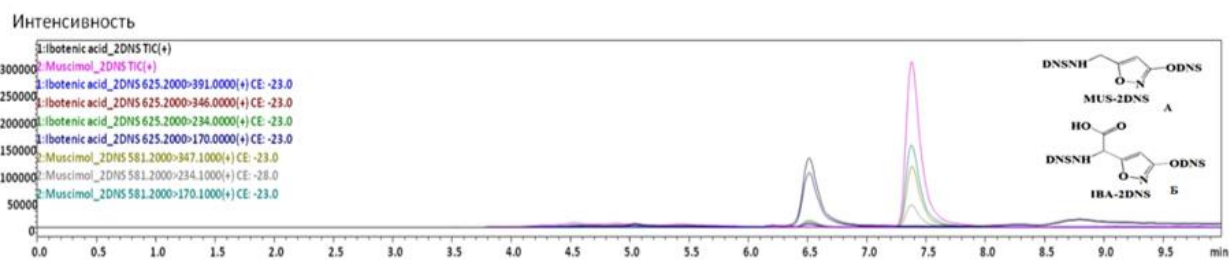
3.2.4 Разработка методики определения мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС с дериватизацией дансилхлоридом.

Изолирование: навески по 300 мг порошка из капсул, содержащих высушенное сырье AP и AM в центрифужных пробирках заливали 3 мл метанола и настаивали 24 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием, затем центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), центрифугат отбирали и фильтровали через шприцевые насадки с мембраной из политетрафторэтилена (PTFE).

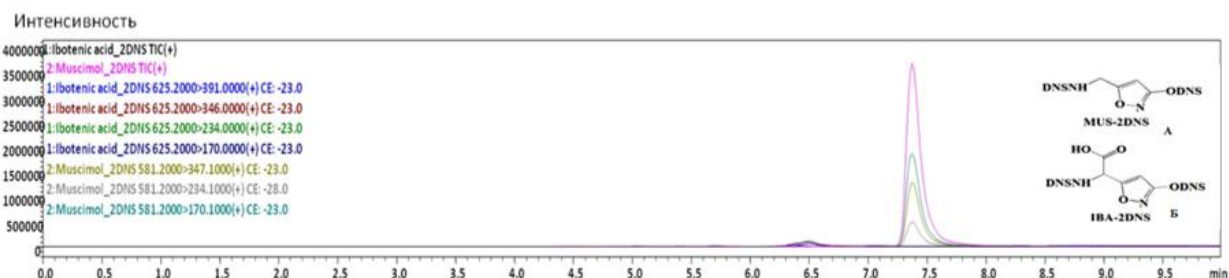


Рисунок 7 – Пробоподготовка методом дериватизации дансилхлоридом

Обнаружение дериватов иботеновой кислоты и мусцимола проводили по совокупности параметров времени удерживания и MRM-переходам (рисунок 8 и таблица 3).



А



Б

Рисунок 8 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты из капсул *AM* (А) и *AP* (Б)

В результате данного эксперимента на хроматограмме удалось идентифицировать дансилпроизводное иботеновой кислоты (пик со $RT \approx 6,5$ мин). Как видно из представленных хроматограмм, содержание иботеновой кислоты в капсулах ниже из-за быстрого её декарбоксилирования до мусцимола в процессе сушки грибов.

3.2.5 Валидационная оценка методики определения дериватов

мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС в капсулах

3.2.5.1 Сравнение химического состава капсул различных производителей и высушенных шляпок *AP* и *AM*. В качестве объектов исследования были использованы образцы высушенных шляпок плодовых тел и порошок капсул *AP* и *AM*.

Полученные данные (рисунки 9 и 10) при сравнении химического состава капсул различных производителей и высушенных шляпок, показали наличие мусцимола и иботеновой кислоты во всех образцах, что позволяет использовать извлечения из капсул в качестве референсных образцов для разработки методики определения целевых токсикантов в биологических объектах.

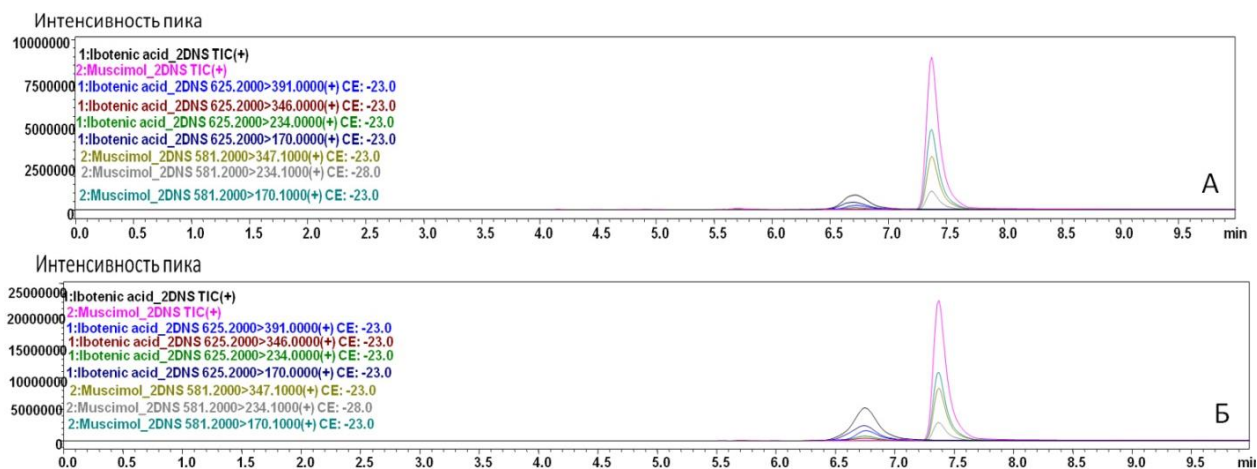


Рисунок 9 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты в извлечениях из (А) высушенных шляпок *AP*; (Б) высушенных шляпок *AM*.

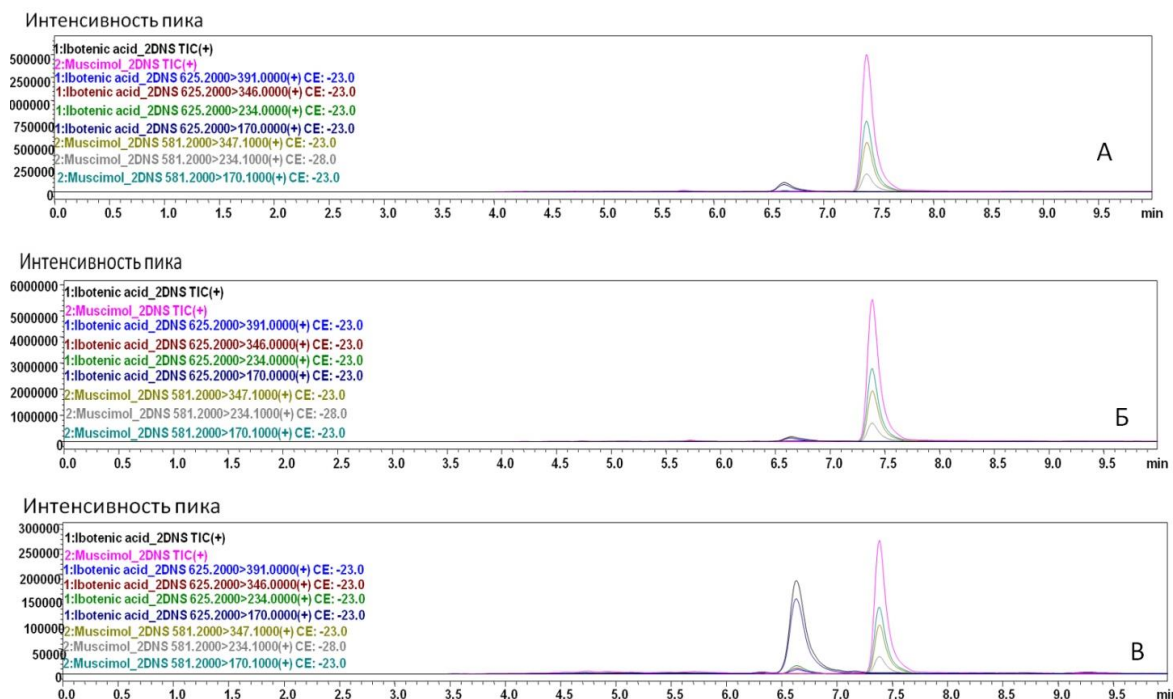


Рисунок 10 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты в извлечениях из (А) содержимого капсул *AP* (грибная аптека Fingiline, Россия); (Б) содержимого капсул *AP* (производитель ALTAI ECO, Россия); (В) содержимого капсул *AM* (производитель Die Familie, Россия).

3.2.5.2 Оценка пригодности хроматографической системы

Таблица 3 – Результаты определения пригодности хроматографической системы при анализе капсул с использованием метода дериватизации дансилхлоридом с требованиями НД

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД
RS	4,1	$\geq 1,5$
сигнал/шум	<i>AM</i> : мусцимол-2DNS (143,17); иботеновая-2DNS (29,89); <i>AP</i> : мусцимол-2DNS (427,46); иботеновая-2DNS (28,02)	> 3
время удерживания (мин)	Мусцимол-2DNS (7,45 \pm 0,047); иботеновая-2DNS (6,42 \pm 0,12)	отклонение $\pm 5\%$
эффективность	<i>AM</i> : мусцимол-2DNS (15703); иботеновая-2DNS (10759); <i>AP</i> : мусцимол-2DNS (15647); иботеновая-2DNS (5476)	> 2000
симметрия	<i>AM</i> : мусцимол-2DNS (1,637); иботеновая-2DNS (1,409); <i>AP</i> : мусцимол-2DNS (1,789); иботеновая-2DNS (1,123)	от 0,8 до 1,5
интерференционный эффект матрицы	На хроматограмме не наблюдаются пики эндогенных веществ в аналитически значимой области, и возможности детектирования позволяют не учитывать эти эффекты.	
робастность	Методика устойчива при использовании следующих параметров: колонка Shim-pack FC-ODS, градиентный режим элюирования с 5% В до 95% В за 15 мин, (состав подвижной фазы: Элюент - фаза А (0,3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин.	

3.2.6 Апробация методики дериватизации 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом (FMOC-Cl) для определения мусцимола и иботеновой кислоты в капсулах и в моче методом ВЭЖХ МС/МС. Одним из возможных решений проблемы слабого удерживания токсикантов является дериватизация с использованием 9-флуоренилметоксикарбонил хлорида (FMOC-Cl) (рисунок 11). Данный дериватирующий агент способен образовывать однозамещенные производные по аминогруппе в присутствии слабого основания, является более доступным и экономически целесообразным реагентом.

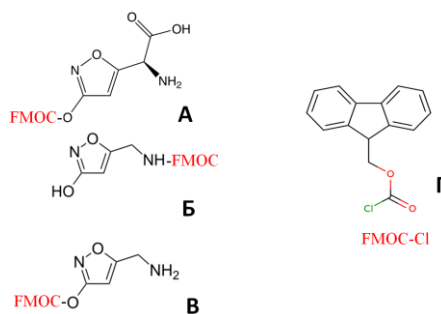
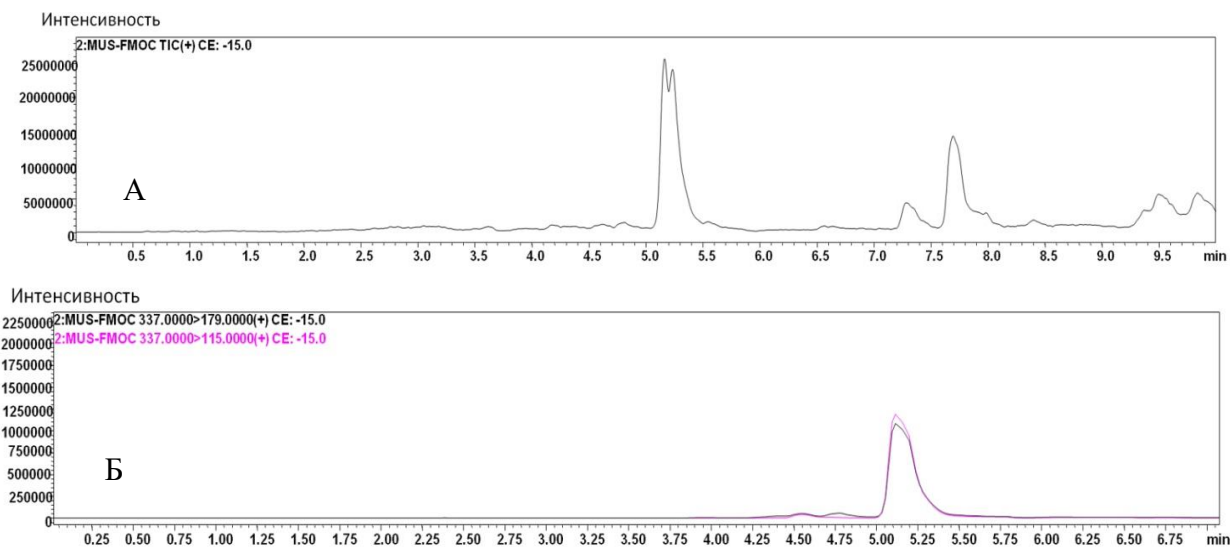


Рисунок 11 – Структурные формулы: А – FMOC-производного иботеновой кислоты по гидроксильной группе; Б – FMOC-производного мусцимола по экзоциклическому азоту; В – FMOC-производного мусцимола по гидроксильной группе; Г – FMOC-Cl.

А. Методика пробоподготовки капсул: навеску порошка из капсул около 0,1 г один раз экстрагировали 1,0 мл ацетона в центрифужной пробирке, настаивали 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали дозатором, раствор переносили в центрифужную пробирку, добавляли 10 мг безводного калия карбоната и 10 мг FMOC-Cl, герметично закрывали и термостатировали при 60°C 1 ч. Затем пробирку охлаждали, отделяли надосадочную жидкость, добавляли 10 мкл муравьиной кислоты, выпаривали до сухого остатка, растворяли в 300 мкл подвижной фазы, вводили в инжектор хроматографа.

На хроматограммах (рисунок 12) наблюдается пик мусцимола с $RT \approx 5,25$ мин. Спектр ион-продуктов (12 В) отражает характеристические массы молекулярного иона дериватизированного мусцимола (m/z 337), флуоренильного иона (m/z 179) и протонированного мусцимола (m/z 115). Наличие двух переходов позволяет идентифицировать FMOC-производное мусцимола.



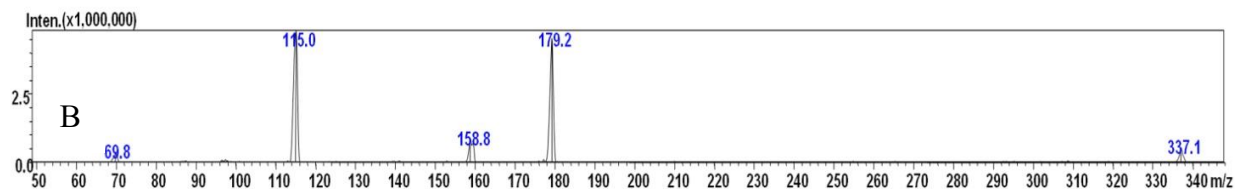


Рисунок 12 – (А) Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата мусцимола в методе Product Ion Scan; (Б) Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата мусцимола в методе MRM (В) Спектр ион-продуктов деривата мусцимола. Энергия соударений (CE) -15

Пик (рисунок 13 А) дериватизированной иботеновой кислоты наблюдается с $RT \approx 4,7$ мин. Спектр ион-продуктов (13 В) отражает характеристические массы молекулярного иона дериватизированной иботеновой кислоты (m/z 381), флуоренильного иона (m/z 179). На спектрограмме отсутствуют сигналы m/z 115 и m/z 159, характерные для протонированной иботеновой кислоты и мусцимола, и сигнал m/z 97, которая образуется при отщеплении молекулы воды от мусцимола. Наличие только одного перехода не позволяет идентифицировать FMOC-производное иботеновой кислоты. Однако на рисунке 13 В наблюдается сигнал m/z 363 низкой интенсивности, которая способна образовываться при отщеплении воды от FMOC-замещенной иботеновой кислоты.

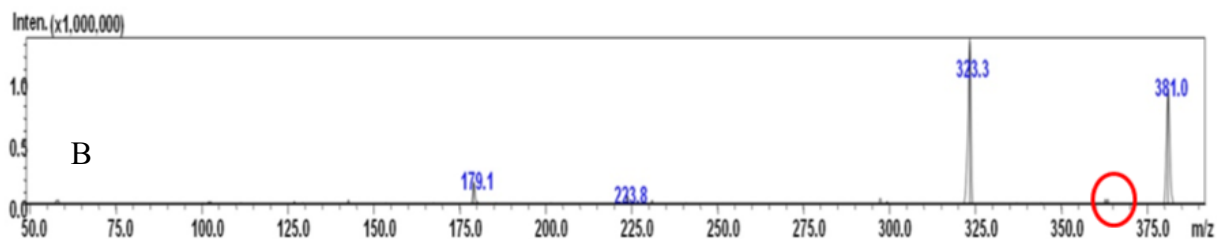
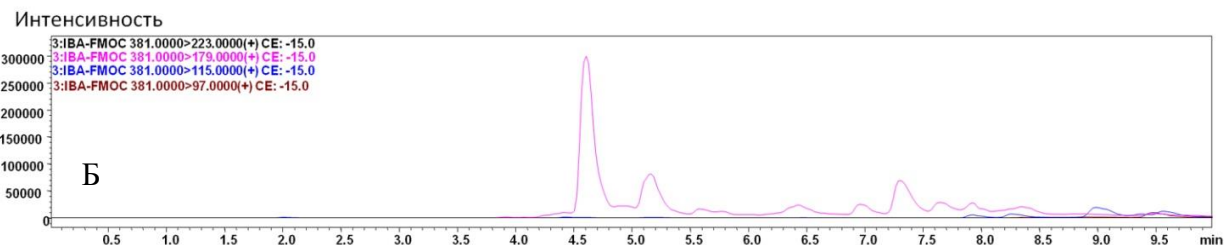
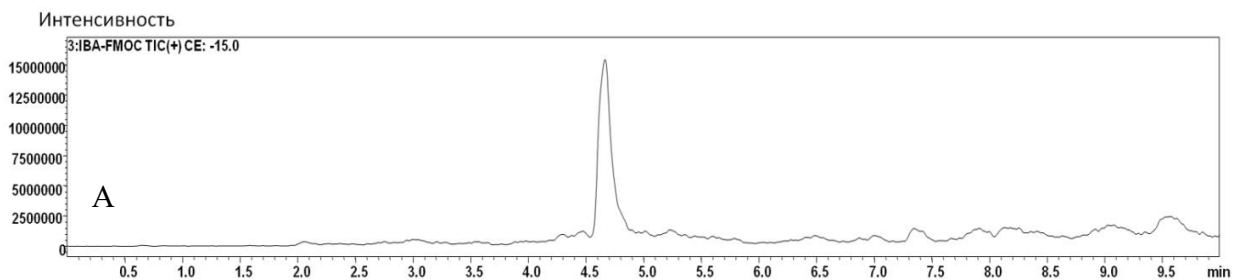


Рисунок 13 – (А) Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата иботеновой кислоты в методе Product Ion Scan; (Б) Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата иботеновой кислоты в методе MRM; (В) Спектр ион-продуктов деривата иботеновой кислоты. Энергия соударений (CE) - 15

Таким образом, в результате данного эксперимента было показано, что методика дериватизации 9-флуоренилметоксикарбонил хлоридом не позволяет получить достаточно информативные спектрограммы для четкой идентификации как мусцимола, так и иботеновой кислоты в содержимом капсул мухоморов. Методикой, удовлетворяющей критериям приемлемости для обнаружения целевых токсикантов является методика дериватизации дансилхлоридом.

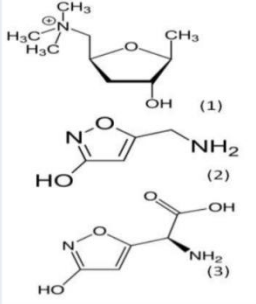
Наименование гриба	
Мухомор красный (<i>Amanita muscaria</i>), мухомор пантерный (<i>Amanita pantherina</i>)	
Сырье	1) Высушенные шляпки плодовых тел <i>AP</i> и <i>AM</i> ; 2) порошок капсул <i>AP</i> и <i>AM</i> .
Семейство	<i>Amanitaceae</i>
Химический состав, формулы	<p>Мускарин (1), мусцимол (2), иботеновая кислоты (3)</p> 
Подлинность	
Ботаническое описание	<p>1) Высушенные шляпки плодовых тел <i>AM</i>: плоские или слегка вогнутые шляпки округлой формы диаметром 9–13 см. Верхняя сторона шляпки покрыта кожицей от розово-красного до красного цвета с многочисленными белыми или сероватыми хлопьевидными пятнами до 5 мм в диаметре. Пластинки с нижней стороны шляпки многочисленные, свободные, с промежуточными пластиночками, шириной 3–7 мм, белые или сероватые. Мякоть шляпки плотная, светло-серого цвета со слабым характерным запахом</p> <p>2) Высушенные шляпки плодовых тел <i>AP</i>: слегка выпуклые шляпки округлой формы диаметром 5–10 см с мелкорубчатым краем. Верхняя сторона шляпки покрыта кожицей светло-бурого цвета с многочисленными белыми хлопьевидными пятнами до 3 мм в диаметре. Пластинки с нижней стороны шляпки многочисленные, шириной 2–4 мм, белые или сероватые. Мякоть шляпки плотная, хрупкая, белая со слабым характерным неприятным запахом</p> <p>3) Порошок капсул <i>AP</i> и <i>AM</i>: коричневого цвета (размер частиц от 0,2 до 0,5 мм). Микропрепарат: гифы мицелия представляют собой сильно разветвленные структуры с септами. Базидии булавовидные, четырехспоровые до 50 мкм длиной. Базидиоспоры многочисленные, цилиндрические с гладкой поверхностью, до 10 мкм</p>
Качественная реакция	
Окрашивание раствором Люголя (положительная реакция на крахмал)	
Идентификация	<p>Метод ВЭЖХ-МС/МС</p> <p>1) Колонка Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм × 150 мм, 3 мкм), термостатированная при 45°C. Элюент - фаза А (0,3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0,5 мл/ми. Объем вводимой пробы - 10 мкл. Градиентный ступенчатый режим элюирования. RT мускарин 3,48 мин; RT мусцимола 2,35 мин, m/z для мусцимола: 97, 39. m/z для мускарин: 57, 43.</p> <p>2) Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония), термостатированная при 45°C. Элюент - фаза А (0,3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0,5 мл/ми. Объем вводимой пробы - 10 мкл. Градиентный режим элюирования (с 5% В до 95% В за 15 мин); RT дансилпроизводного мусцимола 7,4 мин, RT производного иботеновой кислоты 6,5 мин; m/z для дансилпроизводного мусцимола: 170, 234, 347, для дансилпроизводного иботеновой кислоты: 170, 234, 346, 391</p>

Рисунок 14 – Спецификация на референсный образец мухомора красного и мухомора пантерного

Глава 4. Исследование биологических объектов, содержащих токсичные компоненты мухомора красного и мухомора пантерного

4.1 Анализ мочи пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика дериватизации FMOC-Cl апробирована на моче.

1. *Пробоподготовка мочи:* две капли «холостого» образца мочи наносили на обеззоленный фильтр, высушивали 1 ч при комнатной температуре. Пятно нарезали ножницами на мелкие кусочки, извлекали 1,0 мл теплого ацетона и обрабатывали ацетоновый экстракт в условиях общей процедуры (см. методику для капсул, раздел 3.2.6). На хроматограмме извлечения из холостого образца мочи отсутствовали пики в аналитически значимой области.

2. *Пробоподготовка обогащенной холостой пробы мочи с добавлением порошка капсул:* навеску порошка из капсул около 1 г добавляли к «холостой» пробе мочи (5 мл), перемешивали 10 мин на мультитротаторе MultiBioRS-24 и центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), далее выполняли пробоподготовку согласно методике для мочи.

Анализ обогащенной «холостой» пробы с добавлением порошка капсул (рисунок 16) и мочи пациента (рисунок 15) позволили идентифицировать только FMOC-производное мусцимола, однако произошло смещение времени удерживания аналита ($RT \approx 4,6$ мин),

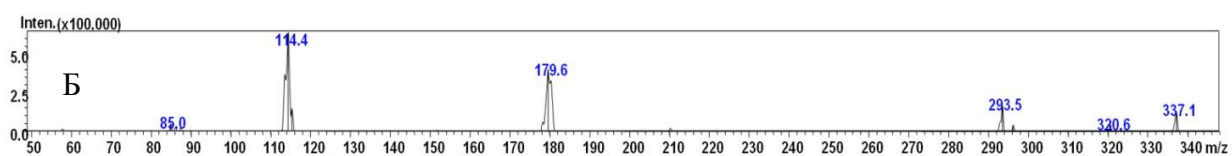
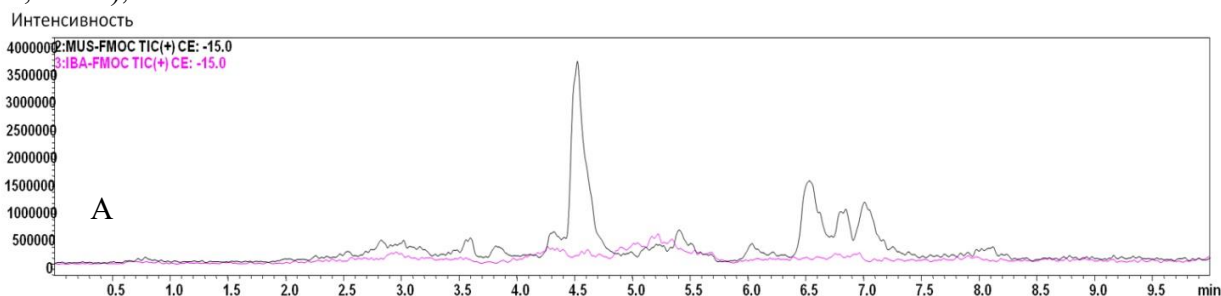


Рисунок 15 – (А) Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) пробы мочи пациента в методе Product Ion Scan; (Б) спектр ионов-продуктов деривата мусцимола. Энергия соударения (CE) – 15

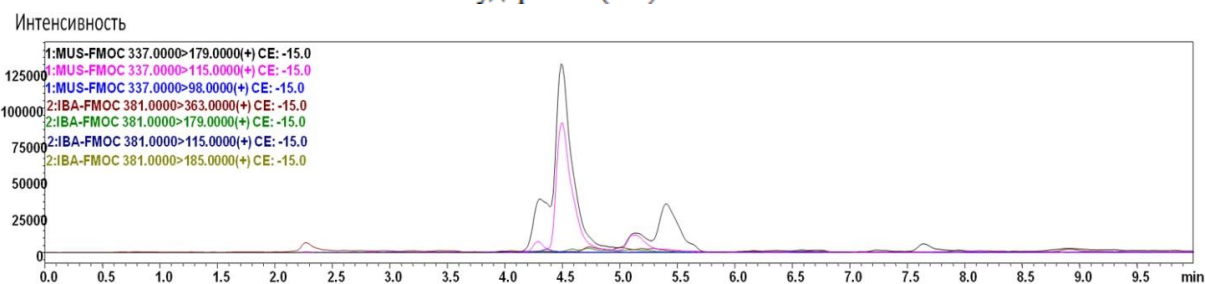


Рисунок 16– Хроматограмма (колонка Shimpack FC-ODS) холостой пробы мочи с добавлением порошка капсул методом MRM

что может свидетельствовать об образовании двух разных изомеров, т.е. дериватизации по двум разным центрам: предположительно в капсулах дериватируется исходная иботеновая кислота — по OH-группе кольца (рисунок 11 А), а затем декарбоксилируется до O-деривата мусцимола (рисунок 11 В), что объясняется химическим строением молекулы: аминогруппа иботеновой кислоты дезактивирована карбоксильной группой и слабо реакционноспособна.

При анализе мочи, вероятно, в ходе высушивания образца на фильтровальной бумаге, иботеновая кислота декарбоксилируется до мусцимола, который уже затем дериватируется по экзоциклическому азоту (рисунок 11 Б). Таким образом, результаты

данной методики дериватизации зависят преимущественно от пробоподготовки образцов мочи и не могут дать однозначных результатов.

Методика не позволяет провести валидацию с помощью референсного образца в виде содержимого капсул, поскольку в зависимости от исходного объекта (содержимое капсул/моча) дериватизация идёт по разным реакционным центрам (рисунок 11). Иботеновую кислоту не удалось идентифицировать в моче пациента.

Таким образом, методика дериватизации FMOС-С1 для идентификации в моче мусцимола и иботеновой кислоты является непригодной.

3. Пробоподготовка, получение щелочного извлечения (рисунок 17):

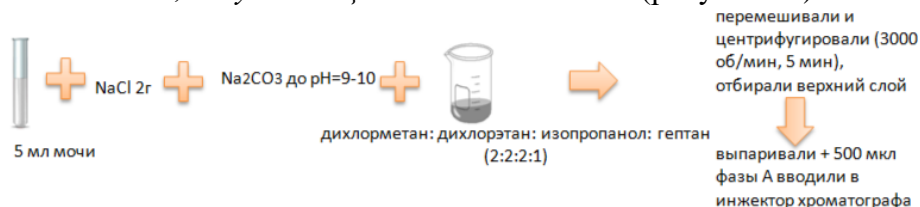


Рисунок 17 – Пробоподготовка, получение щелочного извлечения

Обнаружение мусцимола проводили по совокупности параметров времени удерживания и MRM-переходам (рисунок 18).

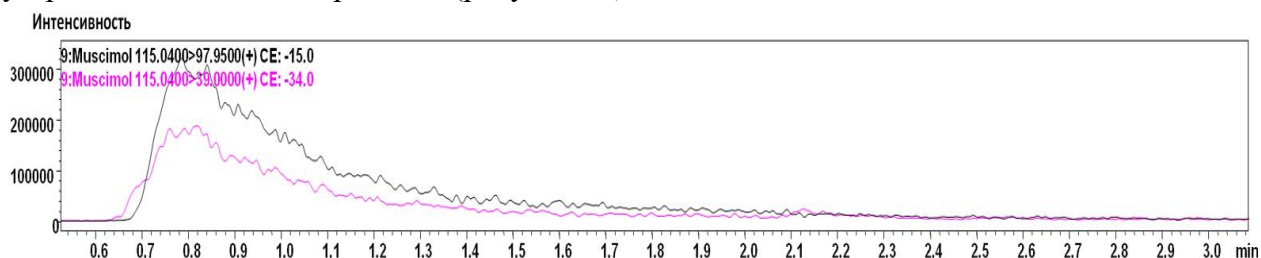


Рисунок 18 – Хроматограмма щелочное извлечение из образца мочи на колонке Shimpack FC-ODS

Полученные результаты (рисунок 18) позволяют сделать выводы, что пробоподготовка мочи методикой жидкостно-жидкостной экстракции только при щелочных значениях pH позволяет выделить мусцимол.

4. Проводили дериватизацию по методике (раздел 3.2.4). Полученные при исследовании в данной хроматографической системе отвечали критериям пригодности хроматографической системы.

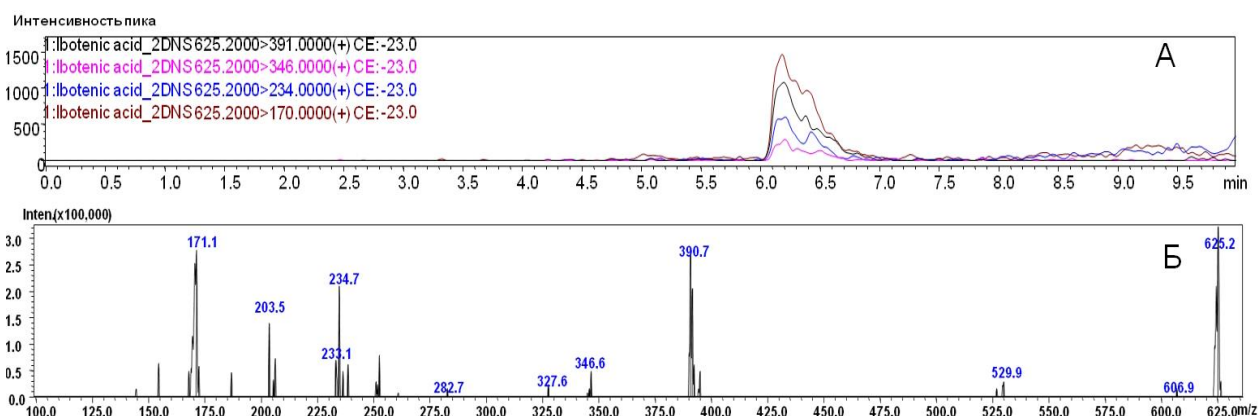


Рисунок 19 – (А) Хроматограмма в методе MRM и (Б) спектр ионов-продуктов деривата иботеновой кислоты в методе Product Ion Scan. Энергия соударения (CE) – 23

На хроматограмме из образца мочи (рисунок 19) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с $RT \approx 6,25$ мин, полученный в методе MRM. В методе Product Ion Scan снят спектр ионов-продуктов деривата иботеновой кислоты с массами, образующимися при фрагментации аналита: 170, 234, 346, 391 m/z.

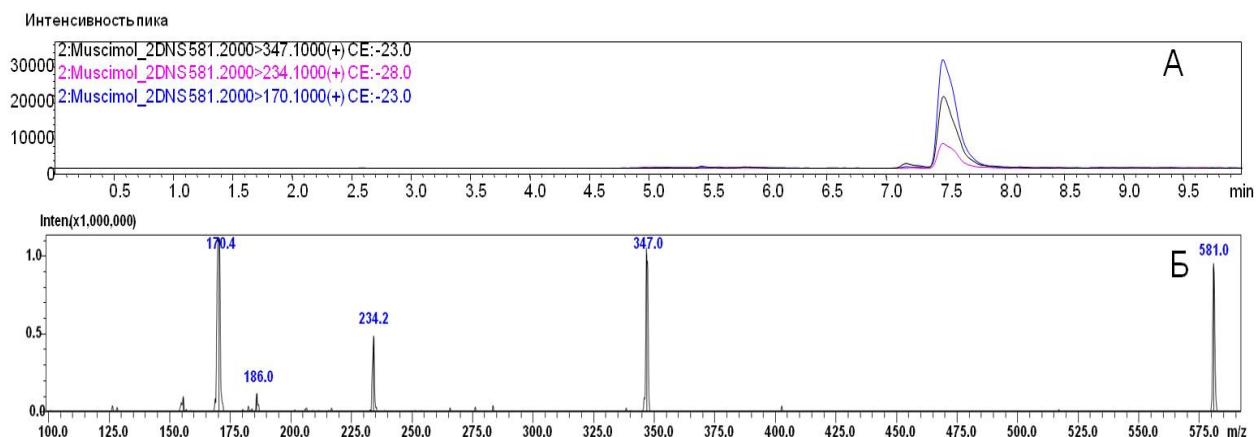


Рисунок 20 – (А) Хроматограмма в методе MRM и (Б) спектр ионов-продуктов деривата мусцимола в методе Product Ion Scan. Энергия соударения (CE) – 23

На хроматограмме из образца мочи (рисунок 20) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с $RT \approx 7,5$ мин, полученный с помощью метода MRM с массами, образующимися при фрагментации аналита: 170, 234, 347 m/z (Product Ion Scan).

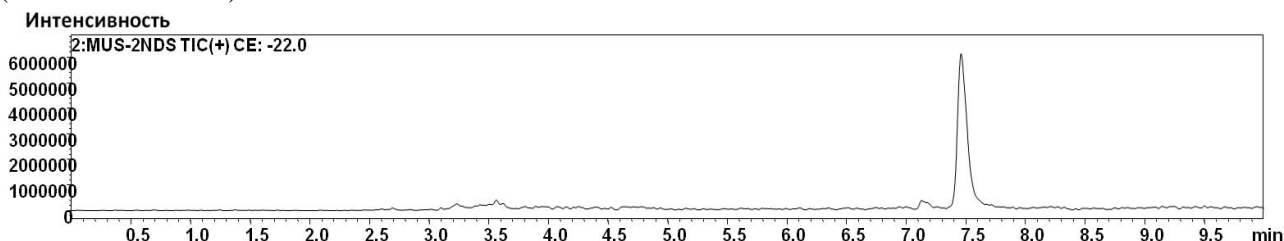


Рисунок 21 – Хроматограмма деривата мусцимола в методе Product Ion Scan

На хроматограмме из образца мочи (рисунок 21) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с $RT \approx 7,5$ мин, полученный в методе Product Ion Scan со спектром ион-продуктов.

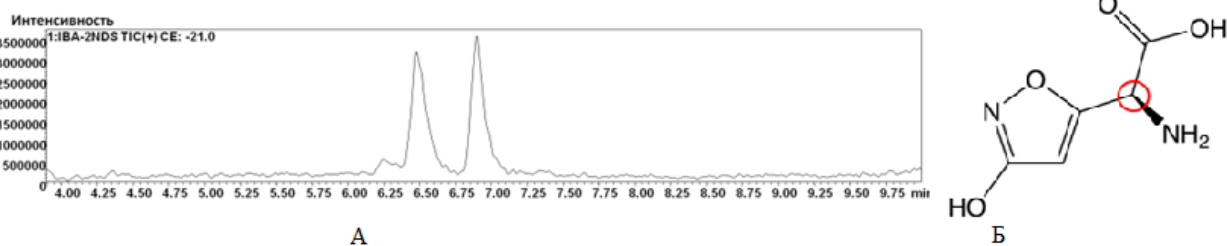


Рисунок 22 – (А) Хроматограмма деривата иботеновой кислоты в методе Product Ion Scan и (Б) структурная формула с хиральным центром иботеновой кислоты

На хроматограмме из образца мочи (рисунок 22 А) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с $RT \approx 6,5$ мин и предположительно присутствует изомер иботеновой кислоты с $RT \approx 6,8$, поскольку в ее структурной формуле имеется хиральный центр (рисунок 22 Б).

4.1.1 Определение значений параметров валидации методики определения дериватов мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС в моче. Селективность методики ВЭЖХ-МС/МС в извлечениях из мочи оценивали по возможности определения токсиканта в присутствии компонентов биологической матрицы, специфичность определяли по характерному RT при определенных условиях анализа и характеристическим массам. Для оценки интерференционного матричного эффекта проводили анализ «холостой» пробы.

Таблица 4 – Результаты определения пригодности хроматографической системы согласно требованиям НД для метода MRM

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД
RS	4,2	$\geq 1,5$
сигнал/шум	Мусцимол-2DNS (49,72); Иботеновая-2DNS (6,41)	> 3
время удерживания (мин)	Мусцимол-2DNS ($7,57 \pm 0,10$); Иботеновая-2DNS ($6,42 \pm 0,12$)	отклонение $\pm 5 \%$
эффективность	Мусцимол-2DNS (9773); Иботеновая-2DNS (6597)	> 2000
симметрия	Мусцимол-2DNS (2,217); Иботеновая-2DNS (2,219)	от 0,8 до 1,5
интерференционный эффект матрицы	На хроматограмме не наблюдаются пики эндогенных веществ в аналитически значимой области, и возможности детектирования позволяют не учитывать эти эффекты.	
робастность	Методика устойчива при использовании следующих параметров: колонка Shim-pack FC-ODS, градиентный режим элюирования с 5% В до 95% В за 15 мин, (состав подвижной фазы: Элюент - фаза А (0.3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин.	

Таблица 5 – Результаты определения пригодности хроматографической системы согласно требованиям НД для метода Product Ion Scan

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД
RS	4,2	$\geq 1,5$
сигнал/шум	Мусцимол-2DNS (13,27); Иботеновая-2DNS (3,10)	> 3
время удерживания (мин)	Мусцимол-2DNS ($7,57 \pm 0,10$); Иботеновая-2DNS ($6,49 \pm 0,025$)	отклонение $\pm 5 \%$
эффективность	Мусцимол-2DNS (40782); Иботеновая-2DNS (6597)	> 2000
симметрия	Мусцимол-2DNS (1,478); Иботеновая-2DNS (1,574)	от 0,8 до 1,5
интерференционный эффект матрицы	На хроматограмме не наблюдаются пики эндогенных веществ в аналитически значимой области, и возможности детектирования позволяют не учитывать эти эффекты.	
робастность	Методика устойчива при использовании следующих параметров: колонка Shim-pack FC-ODS, градиентный режим элюирования с 5% В до 95% В за 15 мин, (состав подвижной фазы: Элюент - фаза А (0.3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин.	

4.2 Изучение пригодности метода ГХ-МС для лабораторной диагностики интоксикаций АМ и АР. Пробоподготовку мочи методом ТФЭ проводили по общей методике к патрону (рисунок 23)

Пробоподготовка методом ТФЭ на патронах Oasis HLB: патрон промывали 1 мл метанола и 1 мл воды очищенной со скоростью 1 мл/мин (1). Пропускали 1 мл образца (2) Промывку от балластных веществ проводили 1 мл этилацетата (3). Вещества с сорбента патрона элюировали 1 мл метанола (4). Элюат выпаривали досуха + 500 мкл этилацетата + 30 мкл (BSTFA, 1%TMS). Помещали в термостат на 20 мин при температуре 60°C и вводили в газовый хроматограф с масс-селективным детектором.

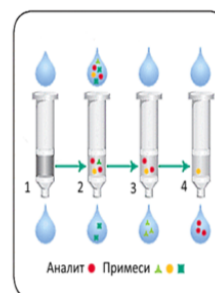


Рисунок 23 – Пробоподготовка методом ТФЭ

На рисунке отмечается пик мусцимола ($RT \approx 8,8$ мин), идентифицированный по масс-спектру, сходимость с библиотекой спектров более 80% библиотекой спектров NIST17 (рисунок 24).

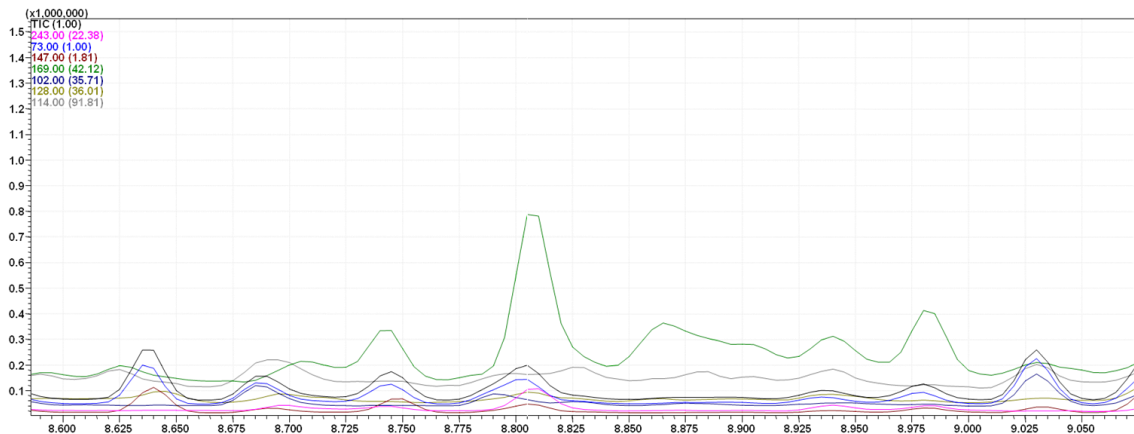


Рисунок 24 – Хроматограмма мусцимола, полученная методом ГХ-МС

Следовательно, с помощью метода ГХ-МС возможно проведение лабораторной диагностики острого перорального отравления *AM* и *AP*, но только на основании обнаружения мусцимола.

4.3 Изучение возможности определения токсикантов в других биообъектах

4.3.1 Исследование крови на токсичные компоненты мухоморов

Пробоподготовка крови: к 1 мл пробы крови добавляли 300 мкл ацетонитрила, 3 мкл муравьиной кислоты и 50 мг натрия хлорида, тщательно перемешивали 10 мин на мультиротаторе MultiBioRS-24 и центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин).

Дериватизация: отбирали 250 мкл надосадочной жидкости, проводили дериватизацию и исследование по методике, представленной выше (раздел 3.2.4). Детектировали в методе MRM (Multiple Reaction Monitoring) (рисунок 25).

На хроматограмме из образца крови (рисунок 25) отмечается пик с $RT \approx 7,5$ мин, соответствующий мусцимолу. Однако при анализе крови не удалось обнаружить иботеновую кислоту.

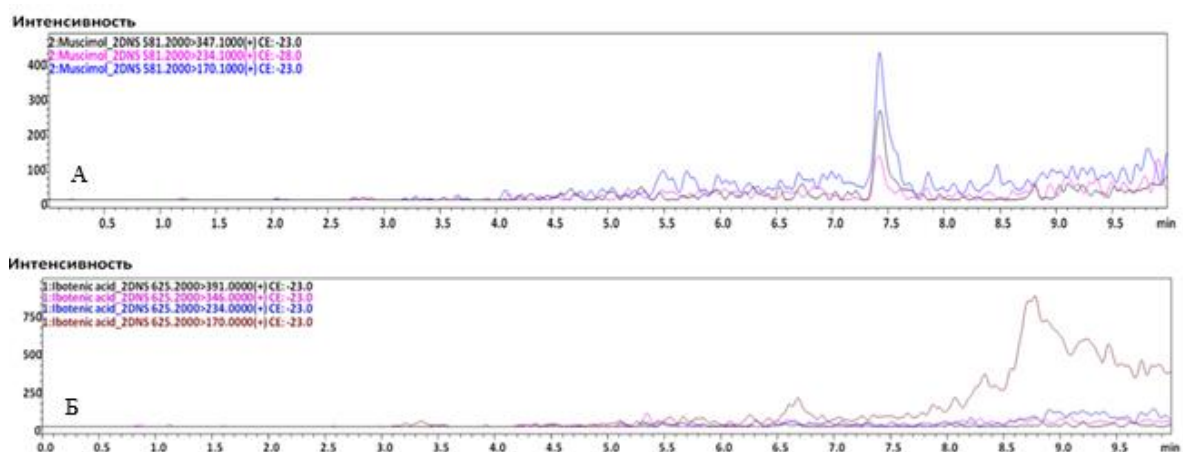


Рисунок 25 – (А) Хроматограмма в методе MRM мусцимола; (Б) иботеновой кислоты.
Энергия соударения (CE) – 23

4.3.2 Исследование волос на токсичные компоненты мухоморов

Пробоподготовка для волос: к навеске 0,35 г промытого и измельченного образца волос добавляли 4 мл химопсина в фосфатного буфере, $pH=7,4$, встряхивали, термостатировали 3 ч при $37^{\circ}C$, по истечении 3 ч центрифугировали при 2000 об./мин 10 мин, отбирали верхний слой. К волосам снова добавляли 3 мл раствора фермента в

фосфатном буфере, встряхивали и термостатировали 3 ч при 37°C (Стрелова О. Ю., Слустовская Ю.В.), центрифугировали при 2000 об./мин, отбирали верхний слой. Добавляли ацетонитрил в соотношении 1:0,5, перемешивали 15 мин на мультитротаторе, замораживали при -18°C 25 мин, затем отбирали верхний слой, извлечения объединяли, проводили дериватизацию дансилхлоридом.

Результат полностью согласуется с проведенными ранее исследованиями по особенностям и закономерностям накопления токсикантов с различными физико-химическими свойствами. Экспериментально установлено, что исследование волос не обеспечивает достоверной детекции токсинов из-за их быстрой элиминации и отсутствия накопления мусцимола и иботеновой кислоты в матрице волос.

4.4 Апробация методик и разработка алгоритма лабораторной диагностики отравлений мухоморами. Исходя из представленных выше результатов исследований, предложен алгоритм проведения химико-токсикологического исследования биообъектов на факт употребления мухоморов (рисунок 26).

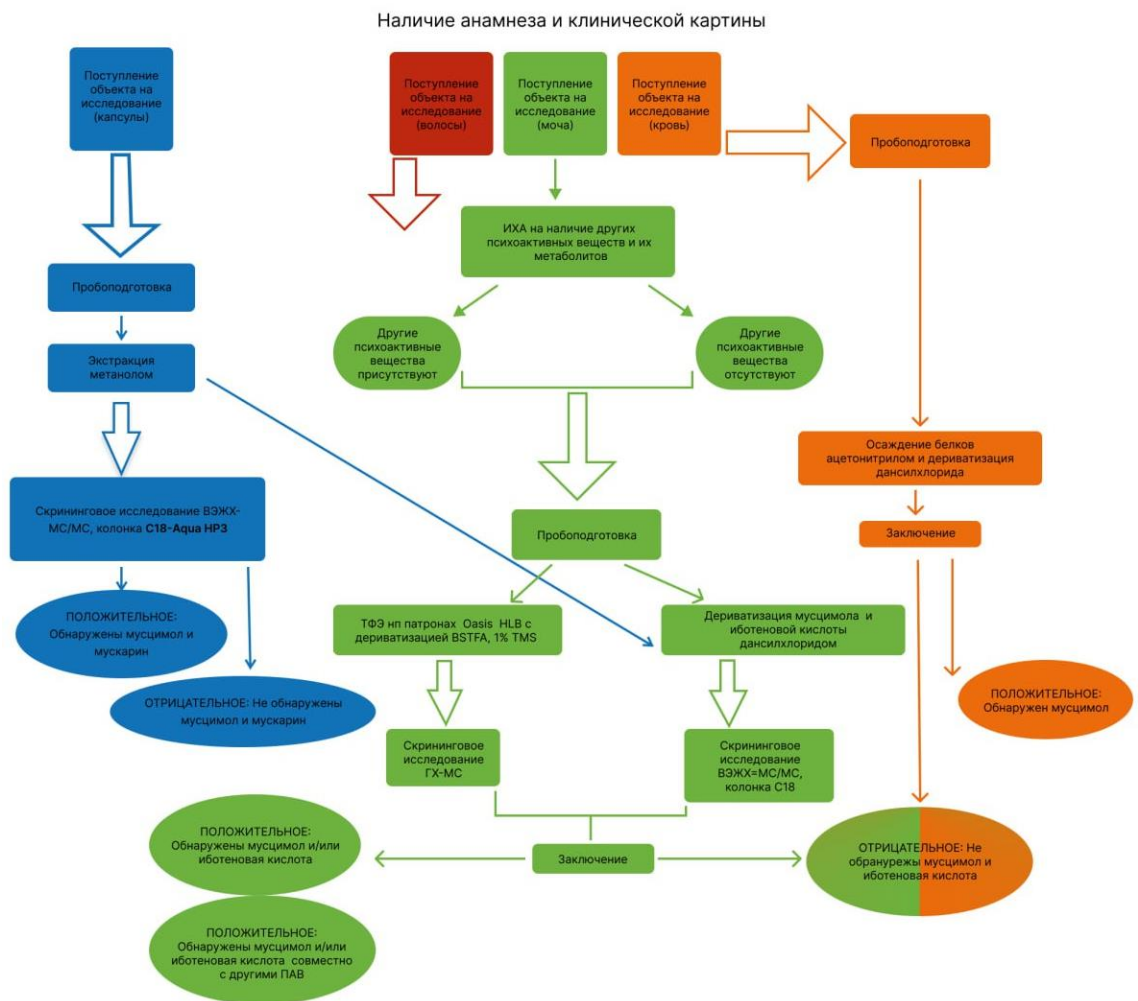


Рисунок 26 – Алгоритм проведения лабораторной диагностики

Диагноз отравления *AM* и *AP* может быть установлен на основании наличия как иботеновой кислоты, так и мусцимола в моче. Метод был апробирован на клинических случаях, получены акты внедрения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ нормативных актов, регулирующих оборот наркотических средств и психотропных веществ, показал отсутствие в РФ государственного контроля оборота:

мухоморов, сырья или продуктов из них и основных психоактивных компонентов, мусцимола и иботеновой кислоты. Поэтому является целесообразным включить указанные объекты в список психотропных веществ 1 списка Постановления Правительства РФ № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».

2. Разработана селективная методика обнаружения токсичных компонентов *AP* и *AM* в капсулах грибов. Показано, что условиями для обнаружения мусцимола и иботеновой кислоты являются: колонка Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм x 150 мм, 3 мкм), термостатированная при 45°C. Элюент – фаза А (0.3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Градиентный ступенчатый режим элюирования.

Разработана методика определения целевых токсикантов методикой дериватизации дансилхлоридом при условиях хроматографирования: колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм x 150 мм, 3 мкм), термостатированная при 40°C. Элюент – фаза А (0.3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Градиентный режим элюирования (с 5% В до 95% В за 15 мин).

Валидационная оценка показала, что разрешение ($RS \geq 1,5$), сигнал/шум (> 3), время удерживания (отклонение $\pm 5\%$), эффективность (> 2000 для ВЭЖХ), по параметрам селективности / специфичности, робастности, интерференционного эффекта матрицы, методика соответствует критериям приемлемости согласно НД по валидации.

3. Разработана селективная методика обнаружения целевых токсикантов *AM* и *AP* в биожидкостях. Показано, что дериватизация дансилхлоридом в щелочной среде является методикой, удовлетворяющей требованиям по валидации биоаналитических методик. Валидационная оценка показала, что разрешение ($RS \geq 1,5$), сигнал/шум (> 3), время удерживания (отклонение $\pm 5\%$), эффективность (> 2000 для ВЭЖХ), по параметрам селективности / специфичности, робастности, интерференционного эффекта матрицы, методика соответствует критериям приемлемости согласно НД по валидации.

4. Разработан и апробирован алгоритм лабораторной диагностики отравлений *AP* и *AM*. Показано, что основным объектом для лабораторной диагностики токсичных компонентов мухомора является моча. В крови возможно обнаружение только мусцимола. Волосы как альтернативный объект не позволяют провести лабораторную диагностику на факт систематического или эпизодического употребления мухоморов, что связано с особенностями физико-химических свойств мусцимола и иботеновой кислоты.

С помощью метода ГХ-МС возможно проведение лабораторной диагностики острого перорального отравления мухомором *AP* и *AM*, но только на основании обнаружения мусцимола.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованные ВАК Минобрнауки России

1. **Евдокимова, Е. А.** Проблема легализованного употребления мухоморов и постановки диагноза по результатам клинической лабораторной диагностики (обзор литературы) / **Е.А. Евдокимова, О.Л. Балабанова, Д.А. Пшенникова, Е.А. Кузнецова, О.Ю. Стрелова** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 6. – С. 46-52. – DOI: 10.29296/25877313-2025-06-06.

2. **Евдокимова, Е. А.** Разработка методики качественного обнаружения мусцимола и мускарина в капсулах, содержащих мухомор красный и пантерный, методом ВЭЖХ-МС/МС / **Е. А. Евдокимова, О. Л. Балабанова, Д. А. Пшенникова, Е. А. Кузнецова, О. Ю. Стрелова** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 9. – С. 21-29. – DOI: 10.29296/25877313-2025-09-03.

3. **Евдокимова, Е. А.** Идентификация мухомора красного и пантерного с целью лабораторной диагностики отравлений / **Е. А. Евдокимова**, М. Ю. Гончаров, О. Л. Балабанова, О. Ю. Стрелова // Фармация. – 2025. – Т. 74, № 8. – С. 14-20. – DOI: 10.29296/25419218-2025-08-02.

Статья в журнале, включенном в международные базы Scopus и PubMed

4. **Евдокимова, Е. А.** Разработка методики анализа мочи с использованием ВЭЖХ-МС/МС при лабораторной диагностике острых пероральных отравлений мухоморами / **Е. А. Евдокимова**, О. Л. Балабанова, Е. А. Кузнецова, О. Ю. Стрелова, А. Н. Турсунов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2026. – Т. 68, № 1. – С. 22-25. – DOI: 10.17116/sudmed20266901122

Другие публикации

5. Пшенникова, Д. А. Практические аспекты диагностики приема красного мухомора. Краткий обзор фармакологии, токсических свойств и психоактивных эффектов / Д. А. Пшенникова, **Е. А. Евдокимова**, О. Л. Балабанова, А. Н. Лодягин, Р. А. Нарзикулов // Сборник научных трудов научно-практической конференции «Джанелидзевские чтения – 2024», Санкт-Петербург, 05.03.24 – 07.03.24 / Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. – Санкт-Петербург: СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, 2024. – С. 72-74.

6. **Евдокимова, Е. А.** Фармакокинетика токсинов мухомора красного и пантерного / **Е. А. Евдокимова**, Д. А. Пшенникова // Сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 28.03.24 – 02.04.24 / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 580-584.

7. **Евдокимова Е. А.** Алгоритм лабораторной диагностики биообъектов при подозрении интоксикации мухоморами / **Е. А. Евдокимова**, О. Ю. Стрелова, О. Л. Балабанова // Сборник материалов 24-го Всероссийского научно-практического конгресса с международным участием «Скорая медицинская помощь – 2025», Санкт-Петербург, 10.06.25 – 11.06.25 / Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 2025. – С. 37.

8. **Евдокимова Е. А.** Применение твердофазной экстракции для идентификации силильных производных мусцимола и иботеновой кислоты в моче пациента с острым отравлением мухоморами / **Е. А. Евдокимова**, Д. А. Пшенникова, О. Л. Балабанова // Сборник научных трудов научно-практической конференции «Джанелидзевские чтения – 2025», Санкт-Петербург, 12.03.25 – 14.03.25 / Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. – Санкт-Петербург: СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, 2025. – С. 118-121.

9. **Евдокимова, Е. А.** Разработка алгоритма клинико-лабораторной диагностики при подозрении на интоксикацию мухоморами / **Е. А. Евдокимова**, О. Ю. Стрелова, О. Л. Балабанова // Сборник трудов Симпозиума, посвященного памяти профессора Евгения Михайловича Саломатина «Актуальные вопросы науки и практики при выполнении судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз», Москва, 21.10.25 / Российский центр судебно-медицинской экспертизы. – Москва: Российский центр судебно-медицинской экспертизы, 2025. – С. 57-62.