

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



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, фармакогнозии

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических  
наук, профессор,  
Стрелова Ольга Юрьевна

Санкт-Петербург – 2026

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1 Общая характеристика грибов рода <i>Amanita</i> .....	13
1.1.1 Систематическое употребление малых доз мухоморов, «микродозинг» и рекреационное использование .....	15
1.2 Обзор нормативной базы, регламентирующей оборот сырья мухоморов .....	17
1.3 Грибы рода <i>Amanita</i> : мухомор красный ( <i>Amanita muscaria</i> ) и мухомор пантерный ( <i>Amanita pantherina</i> ) .....	20
1.3.1 Ботаническое описание мухомора красного и мухомора пантерного .....	20
А. Ботаническое описание мухомора красного .....	21
Б. Ботаническое описание мухомора пантерного .....	22
1.3.2 Химический состав мухомора красного и мухомора пантерного ....	22
1.4 Токсикологическая характеристика психоактивных компонентов мухомора .....	26
1.4.1 Характеристика мускарина .....	26
1.4.2 Характеристика мусцимола .....	28
1.4.3 Характеристика иботеновой кислоты .....	31
1.4.4 Токсикокинетика и токсичность биологически активных компонентов мухомора .....	34
1.4.5 Клиническая картина острого отравления мухоморами .....	36
1.5 Методики обнаружения токсикантов в биологических объектах .....	39
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 .....	46

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1 Оборудование, материалы, реактивы.....	47
А. Оборудование.....	47
Б. Материалы и реактивы.....	48
2.2 Объекты исследования.....	49
2.3 Методика приготовления фазы А для ВЭЖХ.....	50
2.4 Валидация биоаналитических методик.....	50
2.5 Методы математической статистики.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	55
3.1 Статистика отравлений <i>AP</i> и <i>AM</i> и актуальность разработки алгоритма лабораторной диагностики.....	55
3.1.1 Правовое регулирование оборота сырья и продукции (БАД), содержащего <i>AM</i> и <i>AP</i> .....	56
3.2 Разработка методик анализ капсул мухомора красного и пантерного методом ВЭЖХ-МС/МС.....	58
3.2.1 Ботаническая идентификация высушенных плодовых тел и капсул мухоморов красного и пантерного для целей лабораторной диагностики отравлений.....	58
3.2.2 Разработка методики определения мусцимола и мускарина методом ВЭЖХ МС/МС.....	62
3.2.3 Валидационная оценка методики определения мусцимола и мускарина методом ВЭЖХ МС/МС.....	69
3.2.4 Разработка методики определения мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС с дериватизацией дансилхлоридом.....	78
3.2.5 Валидационная оценка методики определения дериватов мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС в капсулах.....	80
3.2.5.1 Сравнение химического состава капсул различных производителей	

и высушенных шляпок мухоморов пантерного и красного.....	82
3.2.5.1 Оценка пригодности хроматографической системы .....	83
3.2.6 Апробация методики дериватизации 9-Флуоренилметоксикарбонил хлоридом (FMOC-Cl) для определения мусцимола и иботеновой кислоты в капсулах методом ВЭЖХ МС/МС .....	89
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3 .....	96
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА НАДИЧИЕ ТОКСИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ МУХОМОРА КРАСНОГО И МУХОМОРА ПАНТЕРНОГО.....	98
4.1 Анализ мочи методом ВЭЖХ-МС/МС .....	98
4.1.1 Определение значений параметров валидации методики определения дериватов мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС в моче .....	106
4.2 Изучение пригодности метода ГХ-МС для лабораторной диагностики интоксикаций <i>AM</i> и <i>AP</i> .....	113
4.3 Изучение возможности определения токсикантов в других биообъектах .....	116
4.3.1 Исследование крови на токсичные компоненты мухоморов.....	116
4.3.2 Исследование волос на токсичные компоненты мухоморов .....	117
4.4 Апробация методик и разработка алгоритма лабораторной диагностики отравлений мухоморами.....	118
ВЫВОДЫ ПО 4 ГЛАВЕ .....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	142

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВЭТТ	—	Высота, эквивалентная теоретической тарелке
MRM	—	режим регистрации нескольких ионов-продуктов столкновительной диссоциации (MultipleReactionMonitoring)
ГХ-МС	—	газовая хроматомасс-спектрометрия
ЖЖЭ	—	жидкостно-жидкостная экстракция
ЖХ	—	жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС/МС	—	высокоэффективная жидкостная тандемная хроматомасс-спектрометрия
ТФЭ	—	твёрдофазная экстракция
ХТЛ	—	химико-токсикологическая лаборатория
AM	—	<i>Amanita muscaria</i>
AP	—	<i>Amanita pantherina</i>
BC	—	Внутренний стандарт

## ВВЕДЕНИЕ

**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., Айгумов 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 отсутствии стандартного образца доказано, что разработанные методики пригодны для обнаружения токсических компонентов в капсулах (му斯卡рина, мусцимола, иботеновой кислоты) и в моче (иботеновой кислоты и мусцимола).

Впервые представлены результаты сравнения эффективности разрешения критических пар гидрофильных аналитов при использовании 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 му斯卡рина 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 *АР* и *АМ* в капсулах «микродозинга».

3. Результаты разработки и валидационной оценки методик обнаружения токсичных компонентов *АР* и *АМ* в биологических объектах (моча, кровь, волосы).

4. Апробация алгоритма лабораторной диагностики отравлений *АР* и *АМ*.

**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 фармацевтика – 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.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Общая характеристика грибов рода *Amanita*

Мухоморы широко распространены в умеренных и бореальных зонах нескольких континентов в Северном полушарии. Например, они встречаются в таких областях, как Гиндукуш, Средиземноморский бассейн и тихоокеанское побережье США и Канады. В Сибири использование мухоморов шаманами насчитывает более тысячи лет. В начале XIX века, Восточную часть Сибири начали исследовать путешественники, была обнаружена культура, которая экономически была связана с разведением оленей (добычи их шкур, мяса и молока). Их «знахари» были известны как шаманы, а религиозные обряды были основаны в значительной степени на использовании *AM*, который собирали в местных березовых лесах. Смерть от употребления в пищу мухомора практически неизвестна, в отличие от другого вида *Amanita* (*A. phalloides*, бледная поганка) [2, 3, 4].

В Северной Америке использование *AM* и *AP* прекратилось, когда шаманы Нового Света предпочли использовать грибы *Psilocybe spp.*, которые встречаются по всей Америке [5].

Благодаря своеобразной красной шляпке с белыми пятнами, *AM* является самым известным грибом в современной культуре. Во многих языках его народное название — мухомор. Хотя он и считается ядовитым, но в таких странах как Италия и Мексика употребляется в пищу. Существует множество традиционных рецептов, включающих кипячение гриба — вода, содержащая большую часть водорастворимых токсичных соединений, затем выливается. В Японии гриб сушат, замачивают в рассоле и промывают [6].

«Пионер» психоделической терапии и британский психиатр Бен Сесса писал: «*Amanita muscaria* обладает психоделическими свойствами из-за активных компонентов мусцимола и иботеновой кислоты, которые могут вызывать сонливость, галлюцинации, тошноту» [7].

Если рассматривать основные способы употребления грибов с такой богатой историей, то важен факт, что свежие образцы *AM* и *AP* токсичны, а

сушеные грибы в небольших количествах относительно безвредны с точки зрения токсикологии: ультрафиолет (например, сушка на солнце) преобразует иботеновую кислоту в мусказон и мусцимол, что значительно снижает токсичность сырья (Рисунок 1).

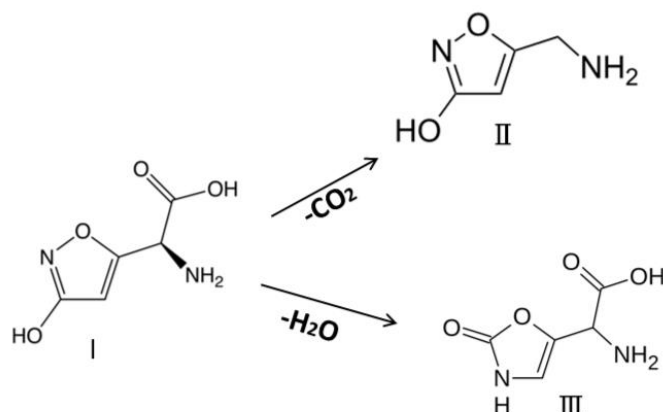


Рисунок 1 – Преобразование иботеновой кислоты (I) в мусцимол (II) и мусказон (III)

Было проведено ряд исследований по влиянию времени сушки, условий приготовления и хранения сырья на содержание иботеновой кислоты и мусцимола в АМ. На исследование взяли двенадцать сырых образцов с известным содержанием иботеновой кислоты и мусцимола. В результате было установлено, что:

- если образцы сушили при солнечном свете в течение трех дней, то они содержали 47% от исходного количества иботеновой кислоты и 1200% мусцимола;

- если образцы сушили при солнечном свете в течение одиннадцати дней, то они содержали 8% от исходного количества иботеновой кислоты и 413% мусцимола;

- если образцы сушили около масляного обогревателя в течение двух дней, то они содержали 13% от исходного количества иботеновой кислоты и 388% мусцимола [7, 8].

Можно сделать предположить, что производители используют менее токсичное высушенное сырье в капсулах грибов для «микродозинга».

Легальный статус мухоморов и его нынешняя популярность способствуют росту числа отравлений. Частота отравлений грибами варьируется в зависимости от климата, времени года, распространенности ядовитых грибов по зонам произрастания, образа жизни и местных традиций. Причины острого отравления мухоморами чаще всего связаны со следующими факторами:

- 1) ошибочным употреблением в пищу ввиду схожести со съедобными видами (чаще всего отравления пантерным мухомором носят случайный характер);
- 2) преднамеренным употреблением психотропных грибов с целью получения галлюциногенных эффектов (в основном это категория людей, ищущих альтернативы традиционным психоактивным веществам);
- 3) невнимательностью взрослых, приводящей к случайному употреблению в пищу детьми;
- 4) употреблением с целью самоубийства (редко);
- 5) употреблением, связанным с ритуальными практиками [9, 10, 11].

### **1.1.1 Систематическое употребление малых доз мухоморов, «микродозинг» и рекреационное использование**

Начиная с 2020 года стало набирать популярность употребление *AM* и *AP* среди молодых людей из-за их галлюциногенного потенциала. Хотя данные отравления и встречаются реже, чем, например, отравления при использовании в рекреационных целях таких наркотических средств и психотропных веществ как гашиш, метадон или амфетамин, предполагается, что будущем (учитывая легальный статус мухоморов), число пациентов с отравлением этими грибами, будет возрастать [12].

Под «микродозингом» мухоморов понимается употребление малых субгаллюциногенных доз (1/10 полноценной дозы) мухомора в виде капсул, содержащих высушенное измельченное сырье, высушенных шляпок гриба, порошка, настоек или шоколада, содержащего в своем составе высушенный

мухомор красный и/или пантерный. Понятие «микродозирование» можно применить к людям, регулярно принимающим небольшие дозы психоделических веществ с целью улучшения психического здоровья и когнитивных способностей, достижения состояния благополучия. Научные данные по этому вопросу в настоящее время ограничены [1]. Имеются только доклинические исследования, касающиеся возможного терапевтического потенциала мусцимола, например, как противосудорожного средства [13].

Есть исследование, предполагающее возможную эффективность микродозинга у пациентов с бессонницей и страдающих посттравматическим стрессовым расстройством или генерализованным тревожным расстройством [14, 15].

Не смотря на отрывочность и несистематичность научных данных, сырье мухомора часто реализуется с громкими заявлениями о положительном влиянии на здоровье человека, часто с неопределенными ссылками на клинические исследования, сообщающими о снижении тревожности, депрессии, эффективности при отказе от вредных привычек. Это значит, что существует значительный разрыв между научным отношением к использованию психоделических веществ в качестве потенциально законных методов лечения психических и иных расстройств и растущими тенденциями в сфере торговли и культуры, что несет огромные риски для потребителей, поскольку безопасность «микродозинга» не доказана, как и его эффективность в качестве замены анксиолитиков, антидепрессантов или иных медикаментов [5, 16].

Нужно учитывать также возможность эффекта плацебо при проведении любых фармакологических исследований, поскольку существует целый спектр предполагаемых преимуществ, приписываемых микродозированию. Люди, практикующие микродозинг, склонны считать любые улучшения здоровья проявлением данной практики [17].

Микродозинг имеет ряд отличительных особенностей от обычного

рекреационного использования психоактивных веществ:

1. Целью микродозинга является улучшение здоровья, лечение имеющихся заболеваний;
2. При микродозинге, в отличие от рекреационного употребления, принимаются только субгаллюциногенные дозы психоактивного вещества, то есть у практикующих нет цели использовать мухоморы как галлюциногенный наркотик;
3. Часто люди, практикующие микродозинг, не употребляют другие запрещенные вещества [17, 18].

Явление микродозинга вызывает интерес современной науки. Например, существует исследование, демонстрирующее корреляцию социально-демографических факторов, черт личности, психического здоровья, опыта употребления запрещенных веществ с практикой микродозинга среди молодежи Южной Калифорнии. В ходе исследования было выявлено, что 79% считают микродозированием прием небольших доз психоактивного вещества, тогда как, 15% считают «микродозинг» принятием стандартной галлюциногенной дозы. Среди тех, кто когда-либо практиковал микродозинг, около 18% сообщили об использовании психоактивных доз, намного превышающих общепринятые микродозы [19].

Микродозирование мухоморов заслуживает внимания со стороны научных работников и специалистов в области здравоохранения с целью предотвратить ошибочное восприятие понятие «микродозинг» среди общественности, сократить риски при употреблении малых доз психоактивных соединений, изучить терапевтический потенциал.

## **1.2 Обзор нормативной базы, регламентирующей оборот сырья мухоморов**

Клинические рекомендации Минздрава признают мухоморы и психоактивные вещества в их составе токсичными [20].

Употребление *AM* и *AP* с целью получения галлюциногенного эффекта

и их доступность становятся факторами, способствующими росту числа острых отравлений. Данная медико-социальная проблема требует решения в форме внесения мухомора в соответствующие реестры и запрет на свободное распространение, приобретение и употребление.

Согласно статье 11 п. 3 Лесного Кодекса РФ гражданам запрещается осуществлять заготовку и сбор грибов, виды которых занесены в Красную книгу, а также грибов, которые признаются наркотическими средствами в соответствии с Федеральным законом от 8 января 1998 года N 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах». Однако грибы *AM* и *AP* указанный закон к таковым не относит [21, 22].

Оборот психоактивных соединений (иботеновой кислоты, мусцимола) не регламентируется Постановлением Правительства РФ от 30 июня 1998 г. N 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» [23].

Мухоморы не подлежат контролю в Российской Федерации согласно Постановлению Правительства РФ от 27 ноября 2010 г. N 934 «Об утверждении перечня растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры и подлежащих контролю в Российской Федерации, крупного и особо крупного размеров культивирования растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры, для целей статьи 231 Уголовного кодекса Российской Федерации, а также об изменении и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации по вопросу оборота растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры» [24].

Оборот сырья мухомора не регламентируется Постановлением Правительства РФ от 31 декабря 2009 г. N 1186 «О внесении изменений в некоторые постановления Правительства Российской Федерации по вопросам, связанным с оборотом наркотических

средств» [25].

Данное сырье реализуют под таким типом продукции как «БАДы». В соответствии со статьей 8 п. 13 Технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) к использованию при производстве (изготовлении) биологически активных добавок к пище (БАД) не допускаются растения и продукты их переработки, объекты животного происхождения, микроорганизмы, грибы и биологически активные вещества, представляющие опасность для жизни и здоровья человека»; в соответствии с пунктом 1.8 Приложения 7 к ТР ТС 021/2011 - высшие грибы, относящиеся к ядовитым и не съедобным, в соответствии с национальным законодательством не подлежат включению в состав однокомпонентных БАД к пище. Мухомор употребляется исключительно целенаправленно как «микродозинг» и в рекреационных целях.

Правовой статус мухоморов различен, если рассматривать мировую практику. Так, в Таблица 1, приведены примеры некоторых стран и их политика в отношении регулирования оборота сырья мухомора и психоактивных соединений в его составе. Таким образом, в России, Франции и Японии сырье мухомора активно реализуют индивидуальные предприниматели, что является абсолютно законным. В ряде стран уже приняты меры по ограничению (запрету) оборота данного сырья и его токсических соединений.

Таблица 1 – Правовой статус мухомора в разных странах [26, 27]

<b>Страна</b>	<b>Правовой статус</b>
Франция	Нормативно не регулируется;
Россия	Нормативно не регулируется;
Япония	Нормативно не регулируется;
Таиланд	Приобретение, хранение и реализация незаконны;
США (штат Луизиана)	Приобретение, хранение и реализация незаконны;
Великобритания	Приобретение, хранение и реализация незаконны;

Румыния	Приобретение, хранение и реализация незаконны;
Нидерланды	Приобретение, хранение и реализация незаконны;

Основная проблема употребления *AM* и *AP* заключается в их высокой токсичности, сложном химическом составе и его вариабельности в зависимости от исходного сырья и способа заготовки. Часто рассчитать субгаллюциногенную дозу в целях «микродозинга» или галлюциногенную дозу для рекреационного применения (как для синтетических наркотиков) не представляется возможным, что и приводит к острому пероральному отравлению. Фактором, усугубляющим проблему, становится популярность микродозинга, обилие информации в интернет-источниках о безопасности и полезных свойствах мухомора, которая не является достоверной.

Актуальность проблемы в Российской Федерации ставит цель перед законодательными и исполнительными органами власти в ближайшее время на законодательном уровне принять меры для ограничения свободного оборота данных грибов, чтобы снизить число острых отравлений и разрешить вопрос рекреационного использования сырья, а также использования его в целях микродозинга.

### **1.3 Грибы рода *Amanita*: мухомор красный (*Amanita muscaria*) и мухомор пантерный (*Amanita pantherina*)**

#### **1.3.1 Ботаническое описание мухомора красного и мухомора пантерного**

Мухоморы принадлежат к отделу *Basidiomycota*, классу *Agaricomycetes*, семейству *Amanitaceae*. Число видов *Amanita* приблизительно составляет 900–1000, и новые виды обнаруживаются постоянно. Около 100 видов считаются ядовитыми, из них около 50 могут быть съедобными [28, 29].

Острые отравления чаще происходят по причине перорального употребления именно красного и пантерного мухомора.

*AM* и *AP* является микоризным несъедобным для человека грибом. Он произрастает в умеренных и бореальных регионах Северного полушария;

однако, он также был завезен во многие страны Южного полушария, и, похоже, стал космополитическим видом [8].

*А. Ботаническое описание мухомора красного*

Мухомор красный (*Amanita muscaria*). Ножка (60-210 × 8-22 мм) белая белого цвета, имеет юбкообразное кольцо и клубень (до 46 × 45 мм). Основание ножки покрыто белыми бородавками в несколько рядов. Кольцо белое, неподвижное, пленчатое, этим он отличается от съедобных красных сыроежек [29, 30]. Шляпка мухомора красного (ширина 90 – 145 мм) от оранжевой до красной окраски, чем моложе гриб, тем более светлая у него шляпка. Шляпка плоской формы, с выраженным блеском, сверху с бело-желтыми остатками вольвы (бородавки), в дождливую погоду они могут смываться, кожица клейкая на ощупь. Часть плодового тела (гименофор) пластинчатый, сами пластинки широкие, свободные и белого цвета. Споры овальной формы, размер спор 8.5 - 11.5 × 6.5 – 8.5 мкм. (Рисунок 2 А) [29, 30, 31, 32].

Молодые мухоморы имеют хлопья на шляпке, образует микоризу с породами семейств *Betulaceae*, *Cistaceae*, *Cupressaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae* и *Salicaceae* [29, 33, 34].

Широко распространен в Европе, Азии, Африке, Австралии, Новой Зеландии, а также Северной, Центральной и Южной Америке [35].



Мухомор красный  
(*Amanita muscaria*)

Мухомор пантерный  
(*Amanita pantherina*)

Рисунок 2 – Внешний вид мухомора красного (А) и мухомора пантерного (Б)

*Б. Ботаническое описание мухомора пантерного*

Мухомор пантерный (*Amanita pantherina*) (Рисунок 2Б) также является представляет интерес для токсикологии, поскольку его внешняя схожесть с условно съедобными грибами (например, мухомором серо-розовым) становятся причиной множества случайных отравлений. Шляпка мухомора пантерного (до 120 мм в диаметре) полусферической формы, как и мухомора красного, имеет бледно-желтые бородавки, расположенные радиально на коричневой шляпке, которая к краю становится светлее. Поверхность гладкая и блестящая. Часть плодового тела (гименофор) пластинчатый, с буроватыми пятнами. Основание ножки покрыто белыми бородавками в несколько рядов. Мякоть белая. Споры белого цвета, широкоэллипсоидные [30, 35, 36].

Этот вид распространен в Европе, Азии, Африке, Северной и Центральной Америке [35].

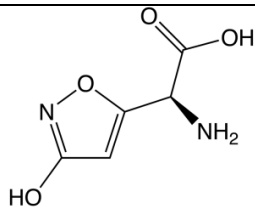
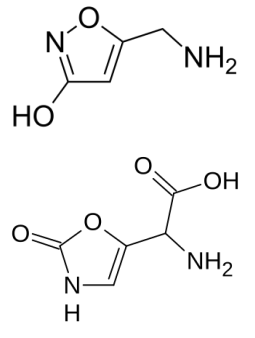
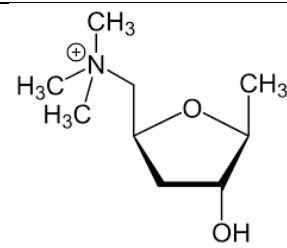
### **1.3.2 Химический состав мухомора красного и мухомора пантерного**

Представители царства грибов на 90-95% состоят из воды, оставшиеся 5-10% приходятся на сухое вещество. В химическом составе всех грибов присутствуют витамины, микроэлементы, макроэлементы, ферменты, другими словами, огромное разнообразие уникальных соединений,

продуктов метаболизма [37].

В соответствии с данными литературы, в *AM* и *AP* содержатся: мусцимол, иботеновая кислота, мусказон (изоксазолы) и мускарин (положительно заряженное соединение) (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика мусцимола, иботеновой кислоты, мусказона (изоксазолы) и мускарина

Название	Формула	Растворимость и др. характеристики	Температура плавления	LogP
<b>Иботеновая кислота</b> (амино-(3-оксо-2,3-дигидроизоксазол-5-ил)-уксусная кислота)		растворимо в воде, не имеет цвета и запаха, нестабильно в растворе	150–152 °С	≈ -3.5
<b>Мусцимол</b> (5-(аминометил)-3-гидроксиизоксазол). <b>Мусказон</b> (2-амино-2-(2-оксо-3Н-1,3-оксазол-5-ил)уксусная кислота)		Оба растворимы в воде	175°С  190 °С	≈ -2.0
<b>Мускарин</b> (2,5-ангидро-1,4,6-тридезокси-β-D-рибо-гекситол (триметиламмоний)-)		растворимо в воде	180 °С	≈ - 4.8

Другими биоактивными веществами являются стизолобовая и стизолобиновая кислоты и аминокдикарбоксиэтилтиопропановые кислоты [38, 39].

Содержание психоактивных соединений различается в зависимости от вида мухомора, например, иботеновая кислота и мусцимол обнаруживаются в определяемых концентрациях во всех образцах *AM* и во всех образцах *AP*, однако мухомор пантерный содержит больше мусцимола. Стизолобовая

кислота и стизолобиновая кислота обнаруживаются в определяемых концентрациях только в одном сорте *AM*, и во всех образцах *AP*. Однако важно отметить, что содержание мусцимола и иботеновой кислоты может варьировать в зависимости от условий произрастания, возраста гриба и способа его обработки [40].

Исходя из содержания психоактивных соединений в составе гриба, отмечаются явные различия в симптомах отравления данными видами мухоморов. В исследовании с 32 случаями отравления *AM* и 17 случаями отравления *AP* были отмечены существенные различия в клинической картине пациентов. При отравлении *AM* пациенты чаще были в возбужденном состоянии, что может быть связано со стимулирующим действием иботеновой кислоты на центральную нервную систему и ее сравнительно более высокой концентрацией по сравнению с мусцимолом. С другой стороны, более высокая частота комы при отравлениях *AP* может быть связана с седативным действием мусцимола на центральную нервную систему и его более высокой концентрацией [41].

Путь биосинтеза иботеновой кислоты грибами рода *Amanita* долгое время был неизвестен, однако с развитием биохимии и генетики грибов был обнаружен ген гидроксилазы, который окружен шестью другими биосинтетическими генами, связанными с синтезом иботеновой кислоты и мусцимола. Синтез иботеновой кислоты начинается с фермента стереоселективной глутаматгидроксилазы. Существует два способа биосинтеза: путь А включает N-гидроксилирование амида; путь Б включает N-гидроксилирование гипотетического внешнего соединения. Путь биосинтеза иботеновой кислоты и мусцимола включает превращения молекулы-предшественника —  $\beta$ -гидроксиглутаминовой кислоты (замыкание цикла и декарбоксилирование) (Рисунок 3) [42].

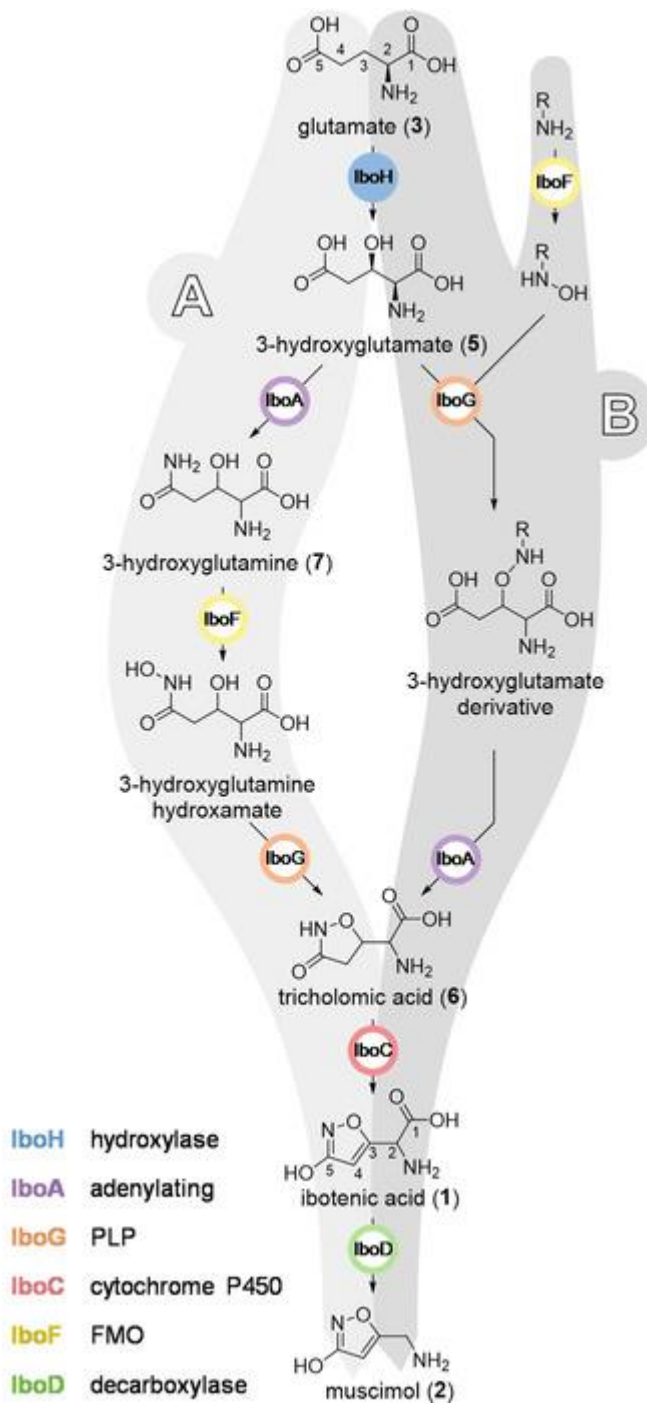


Рисунок 3 – Путь синтеза иботеновой кислоты и мусцимола [42]

Еще одно соединение — амавадин представляет собой голубой пигмент, комплекс ванадия, первоначально выделенный из *AM*. Концентрация ванадия в некоторых видах *Amanita* необычно высока, часто в несколько сотен раз больше, чем в растениях. Буфотенин также встречается в роде *Amanita*. Одним из пигментных соединений в химическом составе гриба является мускаурин, — альдиминное производное иботеновой и беталамовой кислот [28, 43, 44].

Наличие тропановых алкалоидов в мухоморах остается спорным вопросом, некоторые исследования допускают их содержание в незначительных количествах, в то время как этот факт отвергается другими. К этим соединениям относятся атропин, гиосциамин и скополамин, которые являются антагонистами ацетилхолина, связываются с мускариновыми рецепторами, блокируя действие нейротрансмиттера. На центральную нервную систему гиосциамин оказывает возбуждающее действие, тогда как скополамин оказывает угнетающее. Оба вещества классифицируются как делириогенные [6].

У эктомикоризных видов, таких как мухоморы, металлические и металлоидные элементы могут активно или пассивно поглощаться мицелием из окружающей почвы или субстрата. В литературе приводятся данные, что *A. muscaria* биоконцентрирует ртуть [45, 46, 47].

Нужно учитывать, что токсичные соединения распределены в мухоморе неоднородно, по мнению некоторых авторов, обычай у некоторых народов снимать кожицу под шляпкой перед употреблением гриба в пищу направлен именно на предотвращение попадания высокого содержания психоактивных веществ (максимальная концентрация в кожице и желтоватой мякоти под шляпкой) [48].

## **1.4 Токсикологическая характеристика психоактивных компонентов мухомора**

### **1.4.1 Характеристика мускарина**

Согласно клинической классификации, предложенной Джулианом Вайтом, мускаринсодержащие грибы относятся к группе 2В «Грибы с вегетативной токсичностью» [49].

Одним из компонентов, обуславливающих токсическое действие *AM* и *AP*, является мускарин. Он представляет собой тетрагидрофурансодержащий четвертичный аммониевый алкалоид и действует как одноименный метаботропным ацетилхолиновым рецепторам, стимулируя

парасимпатическую нервную систему, содержится в плодовом теле мухоморов [50, 51]. Структурная формула мускарина представлена в Таблице 2.

Мускарин не проходит через гематоэнцефалический барьер, поэтому не оказывает психотропное действие поскольку является четвертичным аммониевым основанием, а только активирует мускариновые рецепторы на периферии. М-холинорецепторы отвечают за разнообразные физиологические эффекты. В настоящее время выделяют пять подтипов рецепторов (M1 – M5). Рецепторы типов M1, M3 и M5 преимущественно связаны с гетеротримерными Gq/11-белками и активируют фосфолипазу C, которая инициирует фосфоинозитид-кальциевый сигнальный каскад.

Рецепторы M2 и M4 подтипа связаны с Gi/o белками и ингибируют активность аденилатциклазы.

Функциональные ответы при активации мускариновых рецепторов на периферии разнообразны (Таблица 3).

M4, M5-рецепторы экспрессируются в головном мозге. Они являются модуляторами высвобождения глутамата в гиппокампе.

Однако важно упомянуть, что и другие типы мускариновых рецепторов в той или иной степени экспрессируются в головном мозге [52, 53].

Таблица 3 – Функциональные ответы при активации периферических мускариновых рецепторов.

Подтип мускариновых рецепторов	Физиологический эффект	Литературный источник
M1	Локализуются в обкладочных клетках желудка и опосредуют секрецию соляной кислоты.	[54].
M2	Активация M2-рецепторов приводит к отрицательному инотропному, батмотропному, хронотропному и дромотропному эффектам в сердце, в гладкомышечных клетках рецептор	[53, 55, 56, 57, 58, 59].

	M2 ингибирует аденилатциклазу и уменьшает адренергическое влияние	
M3	Активация приводит к повышению внутриклеточного кальция в сосудистых гладкомышечных клетках, что вызывает сокращение, тогда как сигнал от того же рецептора в сосудистых эндотелиальных клетках способствует выделению монооксида азота NO и вызывает расслабление подлежащих сосудистых гладкомышечных клеток. В железистых клетках активация рецептора приводит к секреции. Активация рецепторов провоцирует спазм аккомодации, сокращение цилиарной мышцы глаза и миоз. M3-рецепторов опосредуют сокращения гладких мышц мочевого и желчного пузыря, бронхоспазм	

Мускарин, выделенный из европейского мухомора красного в 1869 году, в течение десятилетий считался основным действующим веществом гриба, от которого он и получил свое название. Это водорастворимый и термостабильный алкалоид, основные токсические эффекты которого, исходя из фармакологических свойств, включают: снижение частоты сердечных сокращений, снижение артериального давления, рвоту, диарею, бронхорею, слезотечение, бронхоспазм (астматическое дыхание), гиперсаливацию, миоз и нечеткость зрения [29].

#### 1.4.2 Характеристика мусцимола

Мусцимол (5-аминометилизоксазол-3-ол) (Рисунок 4), также известный как пантерин, и пиро-иботеновая кислота был выделен из *AM* в начале 1960-х годов. История мусцимола как энтеогена восходит еще к сибирским шаманским культурам, где его принимали перорально для оказания психоактивного седативного эффекта. Мусцимол использовался в качестве

радиолиганда в исследовании рецепторов ГАМК. С момента его открытия в начале 60-х годов многие исследовательские группы работали над синтезом этого соединения. Недавние исследования показывают возможности его применения для снятия нейропатической боли [60, 61, 62].

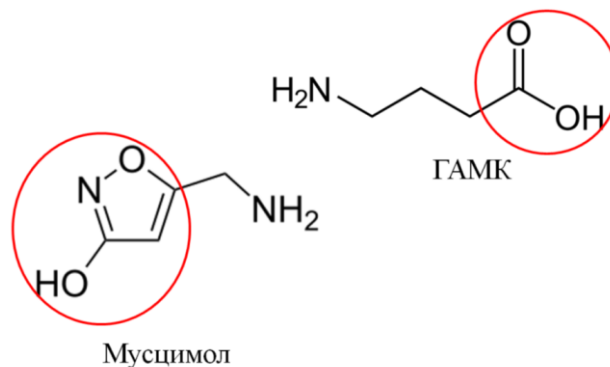


Рисунок 4 – Структурные формулы мусцимола и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК)

Муscимол (Рисунок 4) – психоактивный изоксазол, селективный агонист ионотропных ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, в дозе свыше 6 мг, способен оказывать действие на центральную нервную систему [48].

Муscимол, являясь конформационно-ограниченным аналогом  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, имеет гидроксизоксазольный фрагмент, аналогичный карбоксильной группе  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, способный связываться с ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>C</sub> рецепторами (Рисунок ). Значения рКа для ГАМК (4,0 и 10,7) сопоставимы таковым для мусцимола (4,8 и 8,4). Конформационное ограничение происходит как за счет включения двойной связи в ГАМК-каркас, так и за счет включения «каркаса» в изоксазольную структуру [61, 63].

Существует два типа ГАМК-рецепторов, обнаруженных в центральной нервной системе. В зависимости от механизма действия различают: ионотропные рецепторы (ГАМК-управляемые каналы хлорид-ионов), и метаботропные рецепторы, связанные с G-белком. Ионотропные рецепторы можно разделить на два подкласса: ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, которые блокируются бикикуллином, и ГАМК<sub>C</sub>-рецепторы, которые блокируются

ТРМРА ((1,2,5,6-тетрагидропиридин-4-ил) метилфосфиновой кислотой). Метаботропные ГАМК-рецепторы классифицируются как ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы, которые активируются баклофеном, и являются нечувствительными к бикикуллину и (1,2,5,6-Тетрагидропиридин-4-ил) метилфосфиновой кислоте. ГАМК<sub>C</sub>-рецепторы являются разновидностью ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, состоящих исключительно из комбинаций  $\rho$ -субъединиц и не образующих комплексы с другими субъединицами [61, 64].

Мусцимол является мощным агонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, парциальным агонистом ГАМК<sub>C</sub>-рецепторов и фармакологически неактивным в отношении ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов. Примечательно, что в отличие от бикикуллина и ТРМРА, мусцимол активен как в отношении ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, так и в отношении ГАМК<sub>C</sub>-рецепторов. Мусцимол не является субстратом для ГАМК-трансаминазы [61, 65, 66].

Таким образом, мусцимол оказывает преимущественно локальное воздействие на нервную систему, нежели ГАМК благодаря изоксазольной структуре [61].

Синаптическая передача через ионотропные рецепторы играет важную роль в функционировании центральной нервной системы, ГАМК<sub>C</sub> и ГАМК<sub>A</sub> рецепторы способны изменять концентрацию ионов в нейронах в течение миллисекунд. Именно благодаря тормозным системам нейроны способны формировать механизмы отрицательной обратной связи [67].

Подробнее рассмотрим рецепторы, с которыми связывается мусцимол. Рецепторы  $\gamma$ -аминомасляной кислоты типа А представляют собой пентамерные лиганд-управляемые хлорные каналы, которые опосредуют ингибирующую передачу в нейронных цепях [68, 69].

В структуре субъединиц ГАМК<sub>A</sub> рецептора можно выделить экстраклеточный домен (ЭКД) и трансмембранный домен (ТМД), пора рецептора состоит из пяти М2-сегментов всех пяти субъединиц. В центральной нервной системе наиболее часто встречаются ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы субъединичного состава  $(\alpha 1)_2(\beta 2)_2\gamma 2$ .  $\alpha 1$ -6:  $\alpha 1$ -содержащие

рецепторы отвечают за седативный и снотворный эффекты,  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -содержащие - за анксиолитический (противотревожный), активация  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ -содержащих рецепторов приводит к антероградной амнезии [70, 71, 72].

Рецепторы ГАМК<sub>C</sub> имеют более высокую чувствительность к  $\gamma$ -аминомасляной кислоте и не десенсибилизируются в отличие от ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Они нечувствительны к модуляторам ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, таким как барбитураты, бензодиазепины, а также к классическому антагонисту биккукулину [67].

После коммерческого выпуска цис-4-аминокротоновой кислоты в 1993 году было опубликовано 3 статьи, описывающие действие цис-4-аминокротоновой кислоты на рецепторы сетчатки, нечувствительные к биккукулину и баклофену, эти рецепторы стали известны как ГАМК<sub>C</sub> [73, 74, 75, 76].

Из-за психоактивных свойств и специфических механизмов действия, отличных от других соединений, воздействующих на ГАМК-ергическую систему, мусцимол продолжает оставаться объектом изучения в фармакологии, токсикологии и психофармакологии. Мусцимол может вызывать седацию, сонливость, обладает анальгетическим действием. В высоких дозировках могут проявляться такие эффекты как спутанность сознания, головокружение, тошнота, рвота, сопор [77, 78, 79].

### 1.4.3 Характеристика иботеновой кислоты

В качестве возбуждающего нейромедиатора в центральной нервной системе выступает глутаминовая кислота, которая активирует, по меньшей мере, три типа ионотропных рецепторов: NMDA (ионотропный рецептор глутамата, который селективно связывает N-метил-D-аспартат), AMPA (рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) и KAIN (рецепторы кайновой кислоты).

Эти рецепторы отвечают за нейротоксичность ряда природных аналогов глутаминовой кислоты. Иботеновая кислота, входящая в химический состав *AM* и *AP*, является ортостерическим агонистом NMDA-

рецепторов [80, 81].

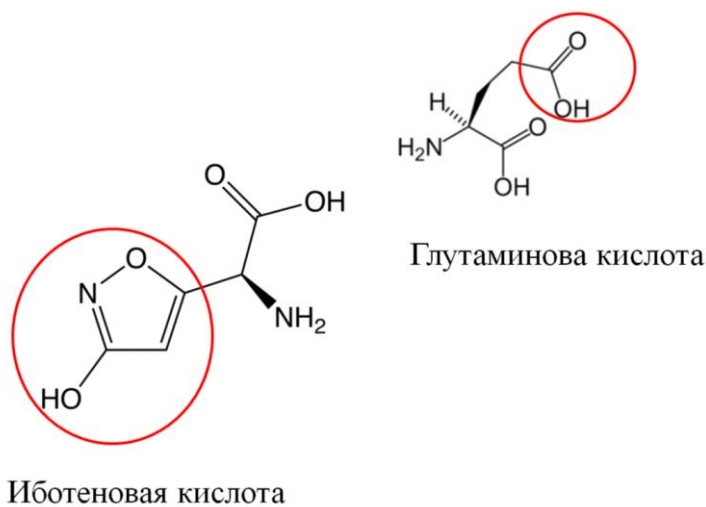


Рисунок 5 – Структурные формулы иботеновой кислоты и глутаминовой кислоты

Иботеновая кислота является аналогом глутамата, в котором концевая карбоксильная группа заменена 3-изоксазолонной группой (Рисунок 5). Иботеновая кислота является мощным агонистом ионотропных NMDA-рецепторов, активация которых инициирует открытие катион-неспецифичных каналов, а также взаимодействует и с другими подтипами возбуждающих аминокислотных рецепторов (ЕЕА), опосредуя такие эффекты как: увеличение психотической и двигательной активности, судороги [5].

Рецепторы ЕАА в настоящее время подразделяют на ионотропные и метаботропные. Ионотропные глутаматные рецепторы отвечают за быструю синаптическую передачу [82].

К ионотропным относятся NMDA-рецепторы, селективными агонистами которых являются N-метил-(R)-аспарагиновая и иботеновая кислота и AMPA-рецепторы, для которых (S)-квискуальная кислота является неселективным агонистом, а (RS)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-метил)изоксазаноевая кислота и (RS)-2-амино-3-(3-гидрокси-4-бромизоксазол-5-ил)пропановая кислота являются высокоселективными агонистами.

Каинатные рецепторы избирательно активируются каиновой кислотой.

Они состоят из пяти субъединиц, сгруппированных в тетрамерные комплексы, и проницаемы для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . AMPA-рецепторы — тетрамерные ионные каналы, ответственны за быструю передачу информации между нейронами, проницаемы для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . NMDA-рецепторы, как и предыдущие два типа ионотропных глутаматных рецепторов, являются тетрамерными комплексами, ионные каналы, ассоциированные с NMDA-рецепторами, являются одновременно лиганд-управляемыми, потенциал-зависимыми и механочувствительными ионными каналами. NMDA-рецепторы играют важную роль в синаптической пластичности и процессах, связанных с обучением [83, 84].

Метаботропные EEA рецепторы действуют через вторичные мессенджеры и представлены тремя группами, включающими восемь различных видов в зависимости от их структуры и фармакологических свойств. Они имеют различную чувствительность к иботеновой кислоте.

Иботеновая кислота взаимодействует с каинатными рецепторами (как низкоаффинный частичный агонист) с AMPA-рецепторами (частичный агонист), NMDA-рецепторами (полный агонист) и метаботропными рецепторами глутамата I и II групп [85, 86].

Несмотря на высокую химическую нестабильность иботеновой кислоты, ее следует рассматривать как высокотоксичное вещество, способное вызывать эксайтотоксичность с последующими нейродегенеративными процессами, а также как вещество, обладающее судорожной активностью. Нейротоксичность иботеновой кислоты обусловлена только активацией NMDA-рецепторов. Активация метаботропных рецепторов не участвует в эксайтотоксичности. Экспериментальные данные показывают, что возбуждающая активность иботеновой кислоты в 8 раз превышает активность глутамата [42, 48].

Действие высоких доз иботеновой кислоты вызывает следующие симптомы: головная боль, тошнота и рвота, судороги, галлюцинации, проблемы с координацией движений [87, 88].

Также текущие исследования *in vitro* показывают, что иботеновая кислота подвергается ферментативному разложению с образованием мусцимола в мозговой ткани и после системного введения животным. Эти аспекты необходимо учитывать при интерпретации фармакологических или нейротоксических эффектов [89].

#### **1.4.4 Токсикокинетика и токсичность биологически активных компонентов мухомора**

Путь попадания токсинов мухомора в организм человека пероральный (в результате приема капсул, настоек, порошка, высушенных шляпок).

Психотропные эффекты мухомора красного и мухомора пантерного связаны преимущественно с мусцимолем и иботеновой кислотой, которая частично метаболизируется в мусцимол *in vivo* при употреблении (Рисунок 1) [5, 8].

ЛД<sub>50</sub> для мускарина при внутривенном введении модельным животным (мышам) составляет 0,23 мг /кг. Мускарин хорошо всасывается в кишечнике после перорального приема. Развитие симптоматики наступает в течение 30 мин [10, 90, 91].

При отравлении мухомором терапия в отношении эффектов мускарина как угрожающего жизни токсиканта должна быть первоочередной [92].

Иботеновая кислота является нейротоксикантом, подвергается метаболизму в желудке, печени, головном мозге до равного количества мусцимола (Рисунок 1), пропорциональное увеличение мусцимола объясняет смену фаз в клинической картине отравления. Иботеновая кислота выводится почками.

В литературе есть данные о пути метаболизма иботеновой кислоты до мусказона, однако мусказон, хоть и имеет схожий механизм действия с мусцимолем, менее фармакологически активен, поэтому практически не вносит вклад в развитие отравления [84].

Мусцимол как психотропное соединение вызывает головокружение, усталость, зрительную и слуховую гиперчувствительность, искажение

пространства и времени, сонливость. Хотя некоторые из этих эффектов похожи на те, которые связаны с «классическими психоделиками», такими как псилоцибин, мусцимол не взаимодействует с рецепторами серотонина 5-HT<sub>2A</sub>, и выводится почками. Его можно обнаружить в моче пациентов уже через час после употребления в нативной форме Стизолобовая кислота, и в меньшей степени, стизолобиновая кислота (аминокислоты небелкового происхождения), проявляют возбуждающее действие в изолированном спинном мозге крысы (Ishida & Shinozaki 1988), обладают психоактивным действием, однако их содержание в плодовом теле мухомора низкое. Как гидрофильные соединения они, по всей видимости, обладают почечной экскрецией [93].

Метилтетрагидрокарболинкарбоновая (1-Метил-2,3,4,9-тетрагидро-1Н-бета-карболин-3-карбоновая кислота) оказывает галлюциногенные эффекты, по химической структуре она сходна с гармалиновыми алкалоидами, но в литературе нет данных о путях ее метаболизма и выведения [94].

В исследованиях на мышах была проведена оценка острой токсичности мусцимола и иботеновой кислоты с помощью показателя ЛД<sub>50</sub> (летальной дозы, необходимой для уничтожения 50% особей в тестовой популяции) в сравнении с соединениями из списка часто используемых психотропных соединений. Острая токсичность мусцимола и иботеновой кислоты при пероральном введении модельным животным выше, чем у большинства часто используемых психотропных препаратов и наркотиков, включая фентанил, кокаин и фенциклидин (обычно называемый РСР) (Таблица 4).

Таблица 2 – Сравнительная оценка токсичности мусцимола и иботеновой кислоты при пероральном введении модельным животным (мышам) [5].

Химическое соединение	ЛД <sub>50</sub> (мг/кг)
Амфетамин	21
Мусцимол	22
Иботеновая кислота	38
Диазепам	48

Метадон	70
Фенциклидин	75
Кокаин	99
Дельта-9-тетрагидроканнабинол	482
Морфин	524
Гамма-гидроксибутират (ГОМК)	4800

В литературе нет данных о ЛД<sub>50</sub> мусцимола и иботеновой кислоты для человека. Смертельная доза мускарина для взрослого человека составляет всего 3 мг [95].

#### **1.4.5 Клиническая картина острого отравления мухоморами**

Отравления мухоморами характеризуется быстрым началом (от 15 мин до 2 ч) и классической парасимпатической симптоматикой: триада увеличения потоотделения, слюноотечения и слезотечения. Другие симптомы включают: миоз, нечеткость зрения, болезненное мочеиспускание, заложенность носа, бронхokonстрикцию, гипотензию, брадикардию, покраснение кожи, водянистую диарею (холероподобную), рвоту и колики. Обычно, чем быстрее развивается симптоматика отравления, тем тяжелее степень интоксикации мухоморами [49, 96]. При легких отравлениях или отравлениях средней степени через сутки наступает выздоровление [97].

Синдромы при отравлении различают в зависимости от степени тяжести и времени от момента приема до появления первых симптомов («менее шести часов» / «более шести часов»).

Мускарин, сходный по структуре с ацетилхолином, связывается с теми же рецепторами, но не гидролизуется холинэстеразой, длительность его действие больше, чем ацетилхолина. Действие мускарина приводит к яркой парасимпатомиметической симптоматике (интенсивность и скорость возникновения симптомов пропорциональны количеству абсорбированного мускарина). Так называемый мускариновый синдром развивается уже через 30 мин после перорального употребления гриба и характеризуется

преимущественно гастроинтестинальными нарушениями (тошнота, рвота, диарея, колики) и холинергическими нарушениями. Обильное потоотделение (96% случаев в серии опубликовано САР Марселя), гиперсаливация, ринорея и бронхорея, синусовая брадикардия и гипотония с синкопальным состоянием, миоз, нарушения аккомодации, иногда боль в глазах, кожная вазодилатация, беспокойство, парестезии и тремор. Синдром проходит в течение двух часов, но опасен для больных при наличии факторов риска (цирроз печени, сердечно-сосудистые патологии, пожилой возраст) [98, 99].

Отравление мухоморами с картиной мускаринового синдрома встречаются редко, чаще пациенты поступают со смешанной картиной пантеринового и мускаринового синдромов.

Клинические признаки патеринового синдрома связаны с наличием психоактивных производных изоксазола: иботеновой кислоты (агониста глутамата, ответственного за раннюю фазу возбуждения центральной нервной системы) и мусцимола (агониста ГАМК<sub>A</sub>, метаболита иботеновой кислоты, ответственного за седативный эффект поздней фазы интоксикации). Синдром развивается спустя 3 ч (реже до 30 мин) после употребления мухомора и включает умеренные расстройства пищеварения (тошнота, рвота), тахикардию и неврологические расстройства, такие как возбуждение, опьянение, атаксия, нарушение зрения с диплопией, спутанность сознания, бред, галлюцинации, мидриаз, миоклонус. После фазы возбуждения наступает торможение ЦНС, которая характеризуется сонливостью, апатией, в тяжелых случаях комой. Вся клиническая картина наблюдается на протяжении 48 ч (Рисунок 6) [48, 99].

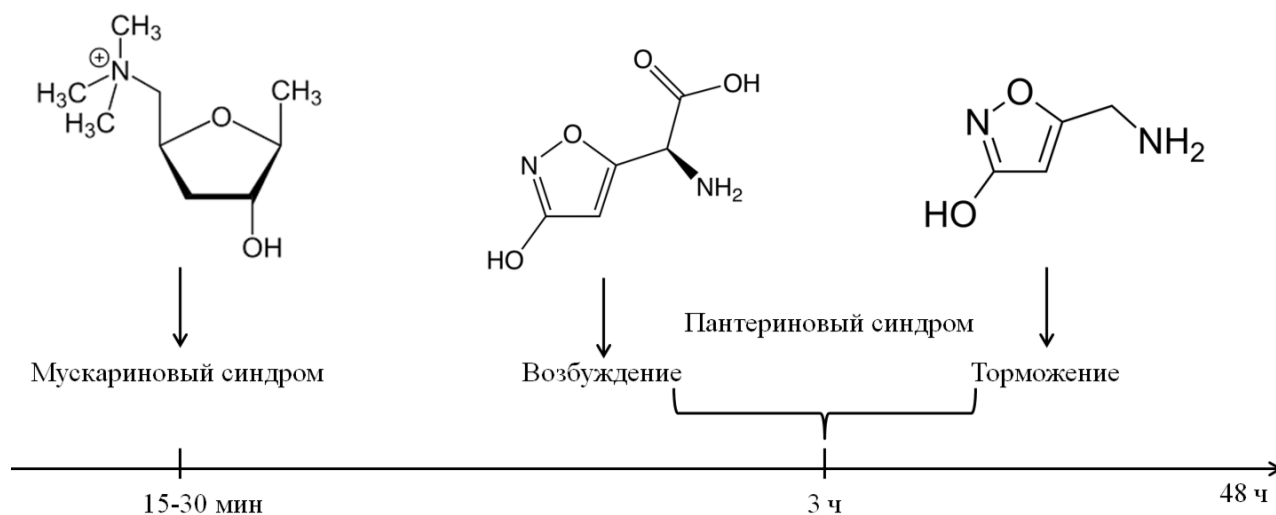


Рисунок 6 – Хроносимптоматика отравления мухомором [48, 99].

Отравление *AM* приводит к летальному исходу достаточно редко, в 2–5% случаев. Например, в отчете о клиническом случае фигурировали пять человек в возрасте от 18 лет до 21 года, которые употребляли сушеные образцы, чтобы вызвать галлюцинации. У четверых из них наблюдались зрительные и слуховые галлюцинации, а 18-летняя девушка потеряла сознание. Для исключения возможных осложнений, она обратилась в клинику, где наблюдалась несколько дней и проходила контрольные обследования. Через четыре дня ее выписали. Никаких осложнений со стороны систем органов не наблюдалось. У остальных четверых человек жалоб не было [100]. Дело в том, что мухоморы не содержат аматоксины или фаллотоксины, которые являются наиболее смертельными соединениями, обнаруженными у опасных видов, вместо этого он содержит непептидные грибные токсины (иботеновая кислота и мусцимол) [7].

Смертность зависит от количества принятого ядовитого гриба. Однако важно учитывать, что концентрация токсических соединений в мухоморе сильно варьируется в зависимости от сезона и места произрастания. Весенние и летние грибы, как сообщается, содержат в 10 раз больше иботеновой кислоты и мусцимола, чем осенние. Хотя смертность от отравлений данными видами гриба невелика, следует отметить, что если

пациент находится без сознания, то отсутствие данных анамнеза может значительно осложнить проведение основного лечения (промывания желудка) и продлить время всасывания токсиканта из ЖКТ, тем самым, увеличивая концентрацию всосавшегося яда в организме [96].

Отметим, что из-за противоположного действия иботеновой кислоты и мусцимола, содержащихся в мухоморе, симптомы отравления выражены слабее, чем, если бы каждое из этих веществ действовало по отдельности.

Мухоморы свободно растут в дикой природе и способны накапливать тяжелые металлы, что следует иметь в виду в случае длительного клинического течения отравления [101].

Современные концепции лечения отравлений грибами являются эволюционными и динамичными. Как и при других отравлениях, симптоматическая терапия имеет первостепенное значение [102].

Хотя лечение сосредоточено на общей симптоматической и поддерживающей терапии, существуют специфический антидот для мускарина (атропин) [10, 103].

### **1.5 Методики обнаружения токсикантов в биологических объектах**

Химико-токсикологический анализ является обязательным элементом клинико-лабораторной диагностики согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 апреля 2025 Г. N 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, а также критерии, при наличии которых имеются достаточные основания полагать, что лицо находится в состоянии опьянения и подлежит направлению на медицинское освидетельствование, учетной формы акта медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), а также формы и порядка ведения журнала регистрации медицинских освидетельствований на состояние опьянения

(алкогольного, наркотического или иного токсического)» [104].

Диагноз отравления *АМ* и *АР* должен быть поставлен на основании обнаружения в биологических средах основных токсичных компонентов (иботеновой кислоты и мусцимола). Получение объективных данных лабораторной диагностики является особенно актуальным в том случае, если пациент находится без сознания, отсутствие данных анамнеза может значительно задержать выполнение основного лечения (промывание желудка), продлить время абсорбции и увеличить количество всосавшегося яда, поэтому разработка метода лабораторной диагностики острых отравлений мухоморами крайне актуальна для современной аналитической и клинической токсикологии [105].

Нельзя упускать и иной аспект важности лабораторно подтвержденного наличия психоактивных веществ (иботеновой кислоты, мусцимола) в биологических жидкостях, поскольку в состоянии наркотического опьянения зачастую совершаются противоправные действия. Результаты лабораторной диагностики могут стать доказательной базой при проведении следственных мероприятий и быть принятыми во внимание на суде согласно «Уголовному кодексу Российской Федерации» от 13.06.1996 N 63-ФЗ (ред. от 28.12.2024) (с изм. и доп., вступ. в силу с 08.01.2025) ст. 63 п. 1.1 «Судья (суд), назначающий наказание, в зависимости от характера и степени общественной опасности преступления, обстоятельств его совершения и личности виновного может признать отягчающим обстоятельством совершение преступления в состоянии опьянения, вызванном употреблением алкоголя, наркотических средств, психотропных веществ или их аналогов, новых потенциально опасных психоактивных веществ либо других одурманивающих веществ» [106].

Изучением и разработкой методик определения психоактивных компонентов мухоморов занимались ряд авторов [107-112]. Наиболее значимые сведения представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Данные литературы методикам анализа биообъектов на иботеновую кислоту и мусцимол

Объект исследования	Метод	Методика пробоподготовки [107-112].	Результаты
Плазма	ВЭЖХ-МС/МС	ВС: (L-тирозин-13C9, 15N и тирамин-d4). Дериватизировали дансилхлоридом (30 мМ в ацетоне) в среде 5% NaHCO <sub>3</sub> , инкубировали, охлаждали, добавляли дихлорметан (центрифугировали, выпаривали досуха и перерастворяли в 1 мл 50% смеси ацетонитрила/воды) [107].	В ходе исследования произведено улучшение хроматографических характеристик и получены сведения о фрагментации дериватизированных производных.
Сыворотка	ВЭЖХ-МС/МС	ВС ацивицин: к сыворотке добавляли дистиллированную воду и 0,5% гидроксида аммония. Использовали картридж для экстракции Oasis MAX 3cc. Картридж промывали дистиллированной водой метанолом. Целевые соединения и стандарт элюировали 0,05% раствором трифторуксусной кислоты в метаноле [108].	Сделан вывод, что уровни токсинов в сыворотке крови человека были примерно на три порядка ниже, чем в грибах рода <i>Amanita</i> . Кроме того, было обнаружено, что показатели извлечения иботеновой кислоты и мусцимола из сыворотки крови человека были намного ниже по сравнению с извлечением из гриба.

			Получены сведения о возможности пробоподготовки биожидкости.
Моча	ГХ-МС	ВС циклосерин, проводили экстракцию на катионообменнике (Dowex® 50W X8), элюирование и дериватизацию алкалоидов проводили в одну стадию смесью водного раствора гидроксида натрия с добавлением этанола и пиридина, и раствора этилхлорформиата в дихлорметане [109].	Сведения о спектрограммах дериватов иботеновой кислоты и мусцимола, количественная оценка их содержания в моче пациентов, авторами описана валидация метода.
Моча	ВЭЖХ-МС/МС	ВС: ацетилмускарин. Проводили ТФЭ на колонке Strata X-CW. Мускарин элюировали 2 мл 5% муравьиной кислоты в метаноле [110].	Показана эффективность ТФЭ на колонке Strata X-CW.
Моча	Капиллярный электрофорез в сочетании с электрораспылительной тандемной масс-	В образец мочи добавляли иботеновую кислоту, мусцимол, мускарин с концентрацией 10 нг/мл, 10 нг/мл и 25 нг/мл соответственно. Затем образец мочи с добавками разбавлялся в пять раз фазой	Показана эффективность методики на модельных образцах мочи.

	спектрометрией	LC-MS и фильтровался через мембранный микрофильтр 0,22 мкм (Millipore) [111].	
Грибы		Гомогенизат грибов (вода/метанола (1:1)), очищали на картридже Oasis MAX 3cc, исследование методом ВЭЖХ МС/МС на колонке TSK-GEL Amide [112].	Методика обеспечить хорошую селективность для полярных соединений.

Приведенные методики хоть и имеют ряд преимуществ, но обладают ограничениями для применения в рутинном анализе: отсутствие доступных стандартных образцов мусцимола и иботеновой кислоты, отсутствие внутренних стандартов (меченых изотопов), ограниченность проведенной валидации, количественного определения, сложность проведения трансфера предлагаемых методик в рутинную практику.

Сложность химико-токсикологического анализа иботеновая кислота и мусцимол заключается в том, что они являются низкомолекулярными гидрофильными компонентами, следовательно будут плохо удерживаться на колонке C18. Иботеновая кислота термолабильное соединений, легко декарбоксилируется до мусцимола, следовательно, применение метода газовой хроматографии с масс-селективным детектированием не позволит получить сведения о присутствии и биообъекте этого токсичного компонента. В случае применения метода ВЭЖХ-МС/МС, только один переход (159 → 113 для иботеновой кислоты и 115 → 98 для мусцимола) может быть обнаружен при прямом измерении.

Существенное значение для разработки методик обнаружение мусцимола и иботеновой кислоты в биообъектах является низкое содержание данных аналитов, сложная биоматрица, что вызывает сильную интерференцию [107].

На возможность анализа методом ВЭЖХ МС/МС влияют такие показатели как площадь полярной поверхности (отвечает за параметры удерживания в колонке гидрофобного типа), водородные связи и логарифм коэффициента распределения.

В формуле иботеновой кислоты есть карбоксильная и аминокгруппы (донор и акцептор протонов соответственно), изоксазольное кольцо (акцептор протонов).

В формуле мусцимола гидроксильная группа (донор протонов), аминокгруппа (акцептор протонов) и изоксазольное кольцо (акцептор протонов), это высокополярные гидрофильные молекулы.

Мусцимол существует в виде цвиттер-иона (протонированная аминогруппа, депротонированная гидроксильная), в данном случае  $\text{NH}_3^+$  группа – сильный донор, а депротонированный гидроксил – акцептор (Рисунки 4 и 5) .

Исходя из химической структуры целевых соединений (Таблица 2), можно выделить очевидные проблемы для анализа, которые можно решить следующими способами:

1. Тщательная подготовка образца: очистка от примесей, концентрирование, использование подходящих растворителей для экстракции;
2. Выбор колонки: гидрофильные колонки, модифицированные обращено-фазовые, ионообменные;
3. Модификация подвижной фазы, выбор буфера;
4. Дериватизация;
5. Оптимизация параметров: режим элюирования, температура.

Для широкого внедрения в аналитическую практику, необходимо проведение валидационной оценки методик обнаружения целевых токсикантов в биологических объектах.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. По данным литературных источников было установлено, что основными токсическими веществами *AM* и *AP*, определяющими особенности острых отравлений, а также такого явления как «микродозинг», являются иботеновая кислота, мусцимол и мускарин. Содержание этих соединений в грибе крайне вариабельно и зависит от множества факторов, что существенно затрудняет или делает практически невозможным использование как самих грибов, так и капсул «БАД» в качестве реферсных образцом.

2. На данный момент в Российской Федерации реализация, приобретение и употребление сырья мухомора красного и пантерного, а также действующих веществ в их составе никак нормативно не регулируются, что является существенным упущением, приводящим ко все более широкому распространению микродозинга, рекреационного применения и острым отравлениям *AM* и *AP*.

3. При отсутствии данных анамнеза пациента при отравлении мухоморами постановка диагноза становится затруднительной, что доказывает необходимость создания селективных методик и алгоритма определения токсикантов в биологических жидкостях поскольку имеющиеся методики определения токсикантов в биологических жидкостях имеют недостатки, которые становятся проблемой для химико-токсикологического исследования.

4. Для успешного внедрения в практику лабораторной диагностики отравлений данными дивами грибов необходимо провести валидационную оценку методик определения токсичных компонентов в отсутствии их стандартных образцов.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Оборудование, материалы, реактивы

#### А. Оборудование

В работе использовали аттестованное и/или поверенное оборудование:

- настольная центрифуга ELMi CM-6MT;
- термостат-инкубатор BINDER, Германия;
- мультиротатор MultiBioRS-24, Латвия;
- дозаторы механические Sartorius Proline BIOHIT 10-50 мкл, 50-200 мкл и 100-1000 мкл;
- система параллельного упаривания и концентрирования Smart Evaporator C10 (BioChromato, Япония);
- аналитические весы СТ124-С №33625068, Россия;
- вакуумная фильтрационная установка LabTech VP30, Италия;
- микроскоп Микромед-1, микроскоп цифровой Bresser Biolux Touch 5 Мпикс HDMI;
- вакуумные установки (Манифолды) для ТФЭ патронах марки Oasis HLB;
- патроны для твердофазной экстракции OASIS® HLB, Waters Corporation, Milford;
- CHROMAFIL® Xtra H-PTFE, маркированные шприцевые насадки с мембраной из политетрафторэтилена (PTFE);
- газовый хроматограф QP 2020, (Shimadzu, Япония), соединенный с моноквадрупольным масс-спектрометром, на колонке HP-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура колонки: начальная 70°C с выдержкой 0.5 мин, подъем до 150°C (27°C/мин), подъем до 290°C (12°C/мин) с выдержкой при конечной температуре 15 мин; температура испарителя и интерфейса связи с масс-спектрометром 260°C и 290°C, соответственно. Объем вводимой пробы-1 мкл. Скорость потока гелия- 1 мл/мин. программное обеспечение LabSolution (Shimadzu, Япония), библиотека NIST17. Масс-спектрометр использовали в условиях электронной ионизации (EI, 70 эВ) при регистрации полного ионного

тока (TIC, 40–550  $m/z$ ), использовали систему обработки хроматомасс-спектральной информации AMDIS;

- модульный жидкостный хроматограф Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu, Япония). Колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм), термостатированная при 40°C; Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl (4.6 мм × 150 мм, 2 мкм); Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм × 150 мм, 3 мкм), термостатированные 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. Масс-спектрометр конфигурировали для работы в режиме электрораспылительной ионизации (ESI) в следующих условиях: скорости потоков газа-распылителя и осушающего газа (азот) 1.5 и 10 л/мин, соответственно; температуры линии десольватации и нагревательного блока 250°C и 300°C, соответственно; напряжение на интерфейсе 4.5 кВ, давление газа для ячейки соударений (аргон) 230 кПа. Программное обеспечение LabSolution (Shimadzu, Япония);

- микроскоп Микромед-1 и Микроскоп цифровой Bresser Biolux Touch 5 Мпикс HDMI.

Исследование выполнялось с применением мерной посуды второго класса точности (ГОСТ 1770–74).

### **Б. Материалы и реактивы**

Исследование проводилось с использованием реактивов марки «ХЧ», «ОСЧ», «HPLC»:

- вода очищенная ФС.2.2.0020.15, ОСЧ;
- кислота хлористоводородная концентрированная ХЧ, ГОСТ 3118-87 Реактивы. Кислота соляная, АО «ВЕКТОН», Россия
- кислота серная концентрированная ХЧ ГОСТ 4204-77 (СТ СЭВ 3856-82) Реактивы. Кислота серная, АО «ВЕКТОН», Россия
- дихлорметан ХЧ, ТУ 2631-085-44493179-02; дихлорметан, АО «ВЕКТОН», Россия;

- этилацетат ХЧ ГОСТ 22300-76 Реактивы. Метанол, АО «ВЕКТОН», Россия;
- метанол ОСЧ ГОСТ 6995-77 Реактивы. Метанол, АО «ВЕКТОН», Россия;
- натрия гидрокарбонат ХЧ ГОСТ 4201-79 Реактивы. Натрия гидрокарбонат, АО «ВЕКТОН», Россия;
- натрия карбонат ХЧ ГОСТ 83-79 Реактивы. Натрия карбонат, АО «ВЕКТОН», Россия;
- натрия хлорид ХЧ ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрия хлорид, АО «ВЕКТОН», Россия;
- натрия гидроокись ХЧ ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись, АО «ВЕКТОН», Россия;
- дансилхлорид, ХЧ, LOT: SC230608, BomeiBio, Китай;
- ацетон ХЧ ГОСТ 2603-89 Реактивы. Ацетон, АО «ВЕКТОН», Россия;
- дихлорэтан ХЧ, ТУ 2631-085-44493179-02А, АО «ВЕКТОН», Россия;
- гептан ХЧ, ТУ 2631-17944493179-2014, АО «ВЕКТОН», Россия;
- изопропанол ХЧ, ТУ 2632-181-44493179-2014, Изопропиловый спирт АО «ВЕКТОН», Россия;
- смесь BSTFA, 1%TMS, 99:1; ХЧ, ООО «Хевел Технолоджи», Россия

## 2.2 Объекты исследования

Объектом исследования являлись капсулы мухомора красного и пантерного, приобретенные в интернет-магазине «Лесной лекарь» (Россия) и грибы, собранные в лесах Ленинградской области осенью 2025 года. В качестве объектов исследования также были использованы образцы высушенных шляпок плодовых тел мухомора красного (*A. muscaria*) и мухомора пантерного (*A. pantherina*), (грибная аптека FUNGITHERA, Россия) и порошок плодовых тел мухомора красного в капсулах (производитель Die Familie, Россия) и мухомора пантерного в капсулах (производитель ALTAI ECO, Россия).

Биообъект исследования: моча пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательского

института скорой помощи им. И. И. Джанелидзе» с диагнозом «Острое пероральное отравление мухоморами», собранная согласно п.10 (на основании анамнеза и клинической картины) Приказа Минздрава России от 15.11.2012 г. № 925н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с острыми химическими отравлениями». Биологические объекты хранились в холодильнике при температуре 2 - 4°C.

### **2.3 Методика приготовления фазы А для ВЭЖХ**

Приготовление фазы А. Очищенную воду помещали в плоскодонную колбу, объемом 1 л в количестве 500 мл, добавляли формиат аммония 0,63 г, муравьиную кислоту 1 мл и доводили водой до 1 л. Полученный раствор пропустили через фильтровальную бумагу с помощью вакуумного насоса VP-30 (Labtech).

### **2.4 Валидация биоаналитических методик**

В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик, FDA Guidance for Industry (Bioanalytical Method Validation, 2018), «Руководства по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» (ФГБУ «РЦСМЭ», 2014 г) была произведена валидация для методики качественного обнаружения [113] (Таблица 6).

Таблица 6 – Параметры валидации биоаналитической методики согласно ICH M10 (Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis, 2022)

Название параметра	Суть параметра
Селективность	Способность аналитического метода дифференцировать и детектировать анализируемое вещество в присутствии потенциально мешающих веществ в чистой биологической матрице.
Специфичность	Способность биоаналитического метода обнаруживать и различать анализируемый материал от других веществ, включая родственные ему соединения.
Эффект матрицы	<p>Матричный эффект определяется как изменение характеристик анализируемого вещества из-за наличия мешающих и часто неидентифицируемых компонентов в матрице образцов. Во время валидации методики необходимо оценить матричный эффект между различными независимыми источниками. Различают два типа:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Подавление ионизации: снижение сигнала аналита.</li> <li>2. Усиление ионизации: увеличение сигнала аналита</li> </ol>
Градуировочная кривая и диапазон	Калибровочная кривая демонстрирует зависимость между номинальной концентрацией анализируемого вещества и откликом системы. Строится по калибровочным стандартам. Диапазон калибровки определяется LLOQ, который является самым низким стандартом для калибровки, и ULOQ, который является самым высоким стандартом для калибровки

Точность и прецизионность	Близость результатов измеренного значения к истинному (точность) и близость друг к другу значений серии измерений, выражается как коэффициент вариации (прецизионность)
Эффект переноса	Изменение измеренной концентрации из-за остатков анализируемого вещества из предыдущей пробы, которые остаются в аналитическом приборе.
Разведение	Это оценка процедуры разбавления образца, проводимая при необходимости, для подтверждения того, что она не влияет на точность и достоверность измеренной концентрации аналита. Для разбавления следует использовать ту же матрицу, что и для приготовления контрольных образцов.
Стабильность	Оценка стабильности позволяет убедиться, что каждый этап подготовки, обработки и анализа образцов, а также используемые условия хранения не влияют на концентрацию анализируемого вещества.

В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик: ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (2022) валидация проводилась по параметрам специфичности и селективности, также оценивались параметры пригодности хроматографической системы согласно USP <621> (Хроматография); ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография; EP 2.2.46 (Хроматографические методы) 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), дополнительно определялась высота, эквивалентная теоретической тарелке [115, 116, 117, 118].

В соответствии с примененными нормативными документами и рекомендациями по валидации, оценка параметров (Таблица 6) возможна при наличии стандартного образца целевого аналита. В нашем исследовании стандартные образцы иботеновой кислоты, муцимола или «стандартный образец грибов *AM* и *AP*» недоступны для валидационной оценки методик, последующего их трансфера и рутинного анализа, поэтому требуется использование альтернативных методов оценки параметров валидации.

## 2.5 Методы математической статистики

Статистическую обработку результатов экспериментов выполняли согласно Государственной Фармакопее XV издания, «Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» (ФГБУ «РЦСМЭ», 2014 г) и лабораторного руководства по валидации аналитических методов с применением ЭВМ и пакета приложений MS Office, с вычислением рекомендуемых метрологических характеристик. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,1$  ( $n=6$ ,  $P=90\%$ ) (Методические рекомендации ФГБУ «РЦСМЭ», 2014 и Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. N 85) [113].

При проведении химико-токсикологических и судебно-химических исследований статистическую обработку данных допускается проводить с

вероятностью 90%. Увеличение ошибки до 10%, по сравнению с рекомендациями для обработки данным фармацевтического анализа, связано с тем, что при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях проводится анализ биологической матрицы (кровь, плазма крови, моча, внутренние органы, волосы), биологический объект может быть не свежим, в анализируемой пробе может содержаться компоненты биологической матрицы, что приводит к увеличению ошибки при определении токсического вещества. Допустимая ошибка метода при изолировании токсикантов биологической матрицы не должна превышать 10%, что допускается в судебно-химическом анализе.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Статистика отравлений *AP* и *AM* и актуальность разработки алгоритма лабораторной диагностики.

В настоящее время по статистическим данным Центра лечения острых отравлений Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» в период с 2022 по 2024 год зарегистрировано более 100 случаев отравлений грибами. Данные о пациентах с острым пероральным отравлением мухоморами за 2022 и 2023 годы отражены на Рисунке 5, в 2022 году поступило 25 пациентов с данным диагнозом, в 2023 году – 26 пациентов.

В 2024 году по данным Научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе из 58 случаев отравлений грибами, было выявлено 13 пациентов, поступивших на отделение острых отравлений с отравлением мухоморами [119]. Количество отравлений относительно невысокое, но пациенты стабильно поступают с данным диагнозом ежегодно.

По данным Самарской области госпитализировано за период с 2021 по 2025 год 19 пациентов с данным диагнозом.

На базе Научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе было проведено интервью ряда пациентов, практикующих микродозинг мухоморов (Приложение А).



Рисунок 7 – Динамика острых пероральных отравлений мухоморами в период с 2022 год по 2024 год по статистическим данным Центра лечения острых отравлений Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» [119].

Практика микродозинга или употребления в рекреационных целях приводит к отравлению (Рисунок 7). Из данных интервью видно, что все респонденты, практикующие микродозинг до начала применения мухоморов имели опыт употребления наркотических веществ. Около 30% пациентов регулярно употребляли галлюциногенные дозы мухомора (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, а не просто зафиксировать факт, но выявить скрытые или латентные аспекты: обнаружить мотивы, ценности, убеждения, установки.

### **3.1.1 Правовое регулирование оборота сырья и продукции (БАД), содержащего *AM* и *AP***

Как было показано ранее (Таблица 1) во многих странах мира оборт

(покупка, продажа, хранение и т.п.) самих грибов *AM* и *AP* и различной продукции с ними (капсулы, настойки и т.п) находится под запретом. В Российской Федерации, 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 [21-26].

За основу регулирования оборота мухоморов можно предложить вариант регулирования оборота грибов рода *Psilocibe*, содержащих такие психоактивные вещества как псилоцин и псилоцибин. В Список наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации (список I) Постановления Правительства № 681 (ред. от 11.06.2025), в качестве наркотических средств внесены 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), так и их психоактивные компоненты (псилоцин и псилоцибин).

Таким образом, считае целесообразным внесение и грибы *AM*, *AP* и их психоактивные компоненты в новые редакции списков Постановления Правительства № 681, в частности в список наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации (список I).

### 3.2 Разработка методик анализ капсул мухомора красного и пантерного методом ВЭЖХ-МС/МС

#### 3.2.1 Ботаническая идентификация высушенных плодовых тел и капсул мухоморов красного и пантерного для целей лабораторной диагностики отравлений

В качестве объектов исследования были использованы образцы высушенных шляпок плодовых тел мухомора красного (*A. muscaria*) и мухомора пантерного (*A. pantherina*), (грибная аптека FUNGITHERA, Россия) и порошок плодовых тел мухомора красного в капсулах (производитель Die Familie, Россия) и мухомора пантерного в капсулах (производитель ALTAI ECO, Россия).

Исследование проводилось на микроскопе Микромед-1, помещая образец на покровное стекло в каплю глицерина, закрывали покровным стеклом и рассматривали при увеличении в 100 и 400 раз и микроскопа Bresser Biolux Touch 5 Мпикс HDMI при увеличении в 500 и 1000 раз.

Проводили идентификацию образцов высушенных шляпок плодовых тел мухомора красного (*A. muscaria*) (Рисунок 8) и порошок плодовых тел мухомора красного в капсулах.



Рисунок 8 – Внешний вид высушенных шляпок мухомора красного  
Высушенные фрагменты плодовых тел мухомора красного представляют собой 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 (Рисунок 6).

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 [29, 30].

На микроскопическом препарате порошка плодовых тел заметны гифы мицелия, базидии и базидиоспоры. 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 (Рисунок 9).

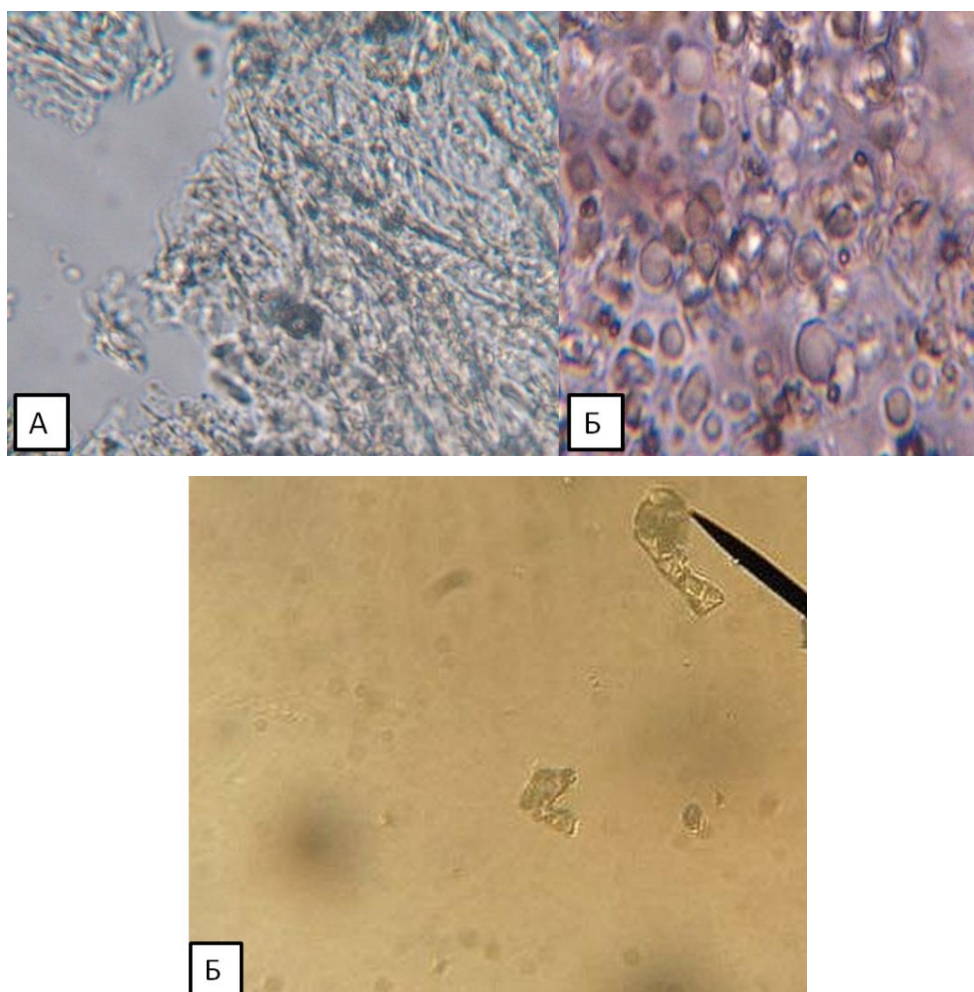


Рисунок 9 – Фрагменты мицелия мухомора красного (А); базидиоспоры мухомора красного при разном увеличении (Б)

Исследование образцов высушенных шляпок плодовых тел мухомора пантерного (*A. pantherina*) (Рисунок 10) и порошок плодовых тел мухомора пантерного в капсулах показало, что сушеные фрагменты плодовых тел мухомора красного представляют собой слегка выпуклые шляпки округлой формы диаметром 5-10 см с мелкорубчатым краем. Верхняя сторона шляпки покрыта кожицей светло-бурого цвета многочисленными белыми хлопьевидными пятнами до 3 мм в диаметре.



Рисунок 10 – Внешний вид высушенных шляпок мухомора красного  
Пластинки с нижней стороны шляпки многочисленные, шириной 2-4 мм, белые или сероватые. Мякоть шляпки плотная, хрупкая, белая со слабым характерным неприятным запахом.

На микроскопическом препарате порошка плодовых тел заметны гифы мицелия и базидиоспоры. Гифы мицелия представляют собой тонкие, сильно разветвленные структуры. Базидиоспоры многочисленные, эллиптические, с сетчатой поверхностью, до 9 мкм длиной (Рисунок 11). Порошок окрашивается в сине-фиолетовый цвет с раствором Люголя (положительная реакция на крахмал) (Рисунок 12).

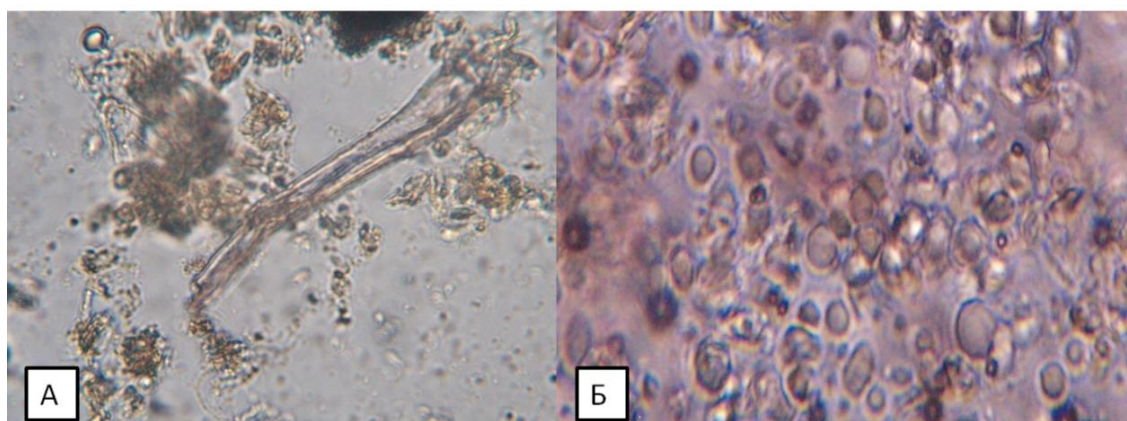


Рисунок 11— Фрагменты мицелия мухомора пантерного (А); базидиоспоры мухомора пантерного (Б)

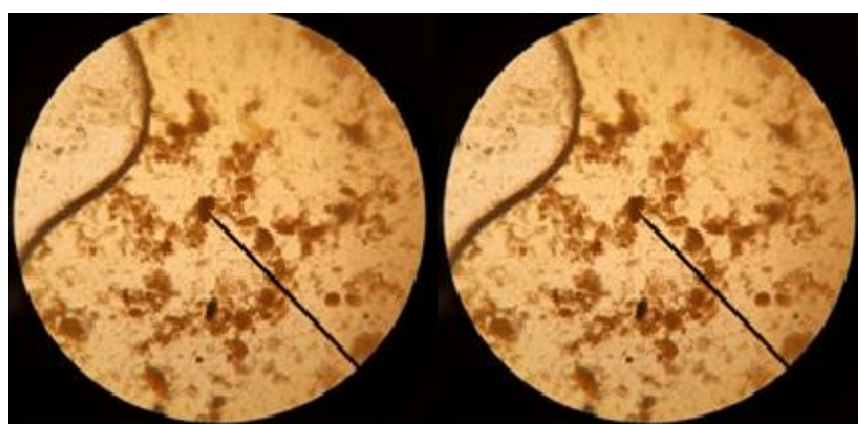


Рисунок 12 – Окрашивание раствором Люголя (положительная реакция на крахмал)

Ботаническое исследование грибов, проведенное совместно с Гончаровым М. Ю., доктором биологических наук, доцентом кафедры фармакогнозии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета. Микроскопия, проведенная совместно с Пovyдыш М. Н., доктором биологических наук, профессором кафедры фармакогнозии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета, сопоставимые результаты диагностических признаков исследуемых объектов и данных литературы (Фомина, Ю.С., 2022, Voynova, M., 2020) [29, 30], говорят о том, что возможно использовать извлечения из капсул в качестве референсных образцов для разработки методики определения целевых токсикантов в биологических объектах для лабораторной диагностики

отравлений этими грибами в отсутствии стандартных образцов.

### 3.2.2 Разработка методики определения мусцимола и мускарина методом ВЭЖХ МС/МС

#### *Методика 1*

Изолирование: навески по 300 мг порошка из капсул, содержащих, согласно заявлению производителя, высушенные части мухомора красного и мухомора пантерного в двух центрифужных пробирках, заливали 3 мл метанола и настаивали 24 ч при комнатной температуре при периодическом перемешивании, затем центрифугировали (3000 об/мин, 3 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.

Проводили сравнительный анализ пригодности колонок Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония), Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl (4.6 мм × 150 мм, 2 мкм) (Shimadzu, Япония), Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония) для анализа извлечения из капсул мухомора красного и пантерного, а также оценка оптимального режима элюирования (Таблица 7).

Таблица 7 – 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,	Мускарин 1,60 мин Мусцимол 1,23 мин	2 мин

Япония);		
Shim-pack GIST C18-Aqua HP (3 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония)	Му斯卡рин 3,48 мин Муцимол 2,35 мин	2 мин

Му斯卡рин и муцимол являются высоко полярными соединениями с малой молекулярной массой, поэтому обращенно-фазовые колонки C18, которые наиболее часто используются в рутинном токсикологическом анализе, не обладают достаточной сорбцией токсикантов.

Аналогичные результаты были получены и на колонке Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl, обладающей мертвым временем 2 мин, время удерживания аналитов лежит во временном интервале «мертвого времени» (Таблица 7). И только колонка Shim-pack GIST C18-Aqua HP с мертвым временем 2 мин позволила получить удовлетворительные результаты (RT муцимола=2,35 мин, му斯卡рина=3,48 мин).

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.

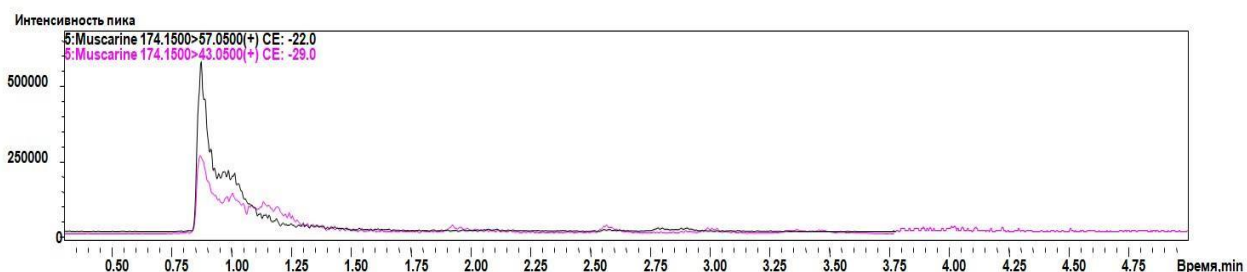


Рисунок 13 – Хроматограмма, содержащая пик му斯卡рина, колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония);

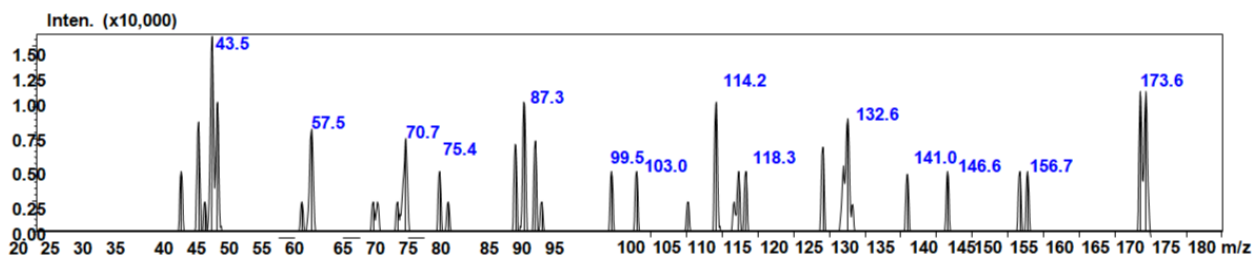


Рисунок 14 – Спектр ионов-продуктов мускарина.

Энергия соударения (CE) – 22

В ВЭЖХ МС/МС эксперименте с ионизацией ESI (электрораспылением) имеют дело с молекулярными ионами  $[M+H]^+$ . Чтобы получить информацию о структуре аналита, эти ионы нужно фрагментировать, подобрать энергию соударений, которая является универсальной и позволяет получить богатый спектр, что создает универсальный подход к эффективности фрагментации и сохранению иона-прекурсора.

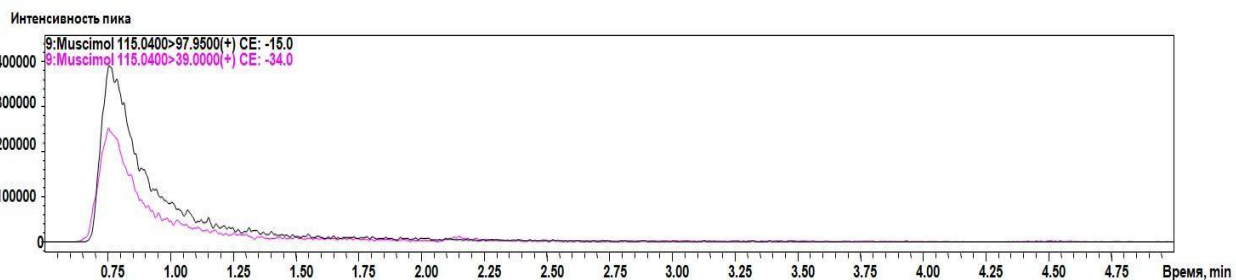


Рисунок 15 – Хроматограмма, содержащая пик мусцимола, колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм) (Shimadzu, Япония);

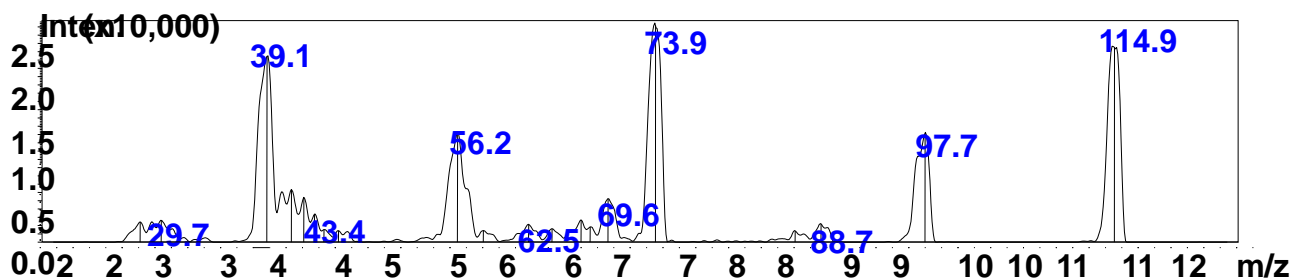


Рисунок 16 – Спектр ионов-продуктов мусцимола.

Энергия соударения (CE) – 15

Обнаружение мускарина и мусцимола проводили по совокупности параметров времени удерживания и MRM-переходам (Рисунок 14 и Рисунок

16). Хроматограммы, полученные при исследовании в данной хроматографической системе отвечали критериям пригодности.

Из полученных данных (Таблица 7 и Рисунок 13 и Рисунок 15) видно, что использование колонки Shim-pack FC-ODS не позволяет достоверно провести идентификацию веществ, поскольку эта колонка предназначена для удерживания неполярных и слабополярных соединений из-за гидрофобных свойств. По данной причине целевые токсиканты оказываются в «мертвом времени» колонки. Размытие хроматографической зоны и выход мускарина и муцимола в «мертвое время» свидетельствуют о непригодности данной колонки для анализа. Сходимость спектрограммы муцимола с библиотекой спектров Shimadzu составила более 80% (Рисунок ).

(MSn)Library Search Results

Report View Compound Information Spectrum Help

Hit#	Similarity	Report	Library	SP ID	CAS#	Compound Name
1	93	<input checked="" type="checkbox"/>	C:\LabSolutio	920	2763-96-4	Muscimol
2	93	<input type="checkbox"/>	C:\LabSolutio	920	2763-96-4	Muscimol

Рисунок 17 – Сходимость с библиотекой спектров

На приведенных Рисунок 14 и Рисунок 16, наблюдается пик молекулярного иона мускарина и муцимола, характеристические массы: мускарина 43 m/z и 57 m/z, муцимола 39 m/z, 97 m/z соответственно.

Использование колонки Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl (4.6 мм × 150 мм, 2 мкм) (Shimadzu, Япония) (Таблица ), которая обладает более гидрофильными свойствами, позволило повысить эффективность. Время удерживания мускарина было около 1,60 мин, для муцимола около 1,23 мин, следовательно целевые соединения вышли в «мертвое время» колонки, что свидетельствует о ее непригодности для анализа (Рисунок 18, Рисунок 19).

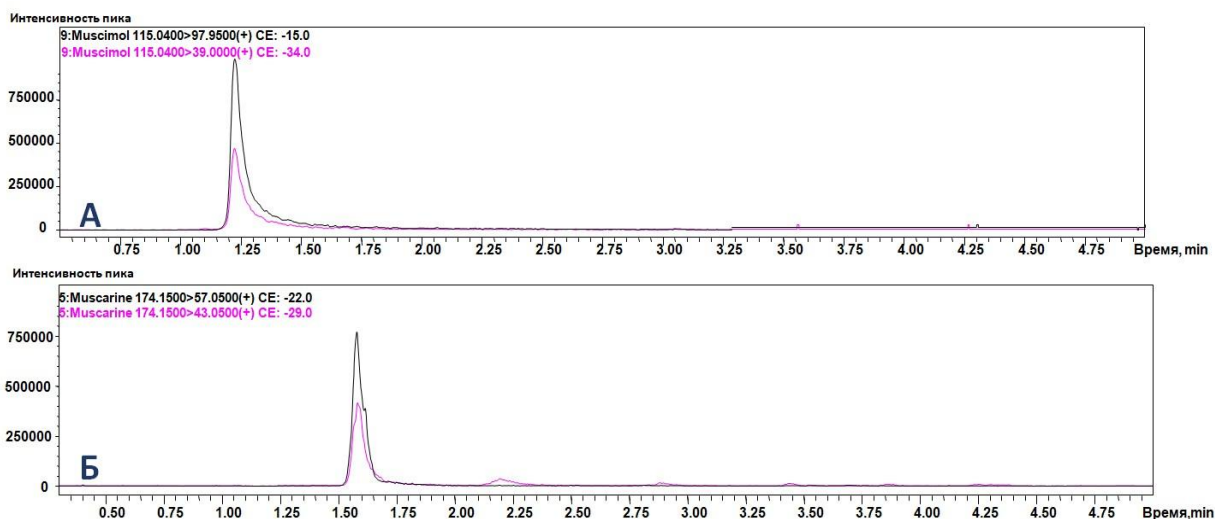


Рисунок 18 – Хроматограммы извлечений из капсул красного мухомора на колонке Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl: (А) мусцимол; (Б) мускарин

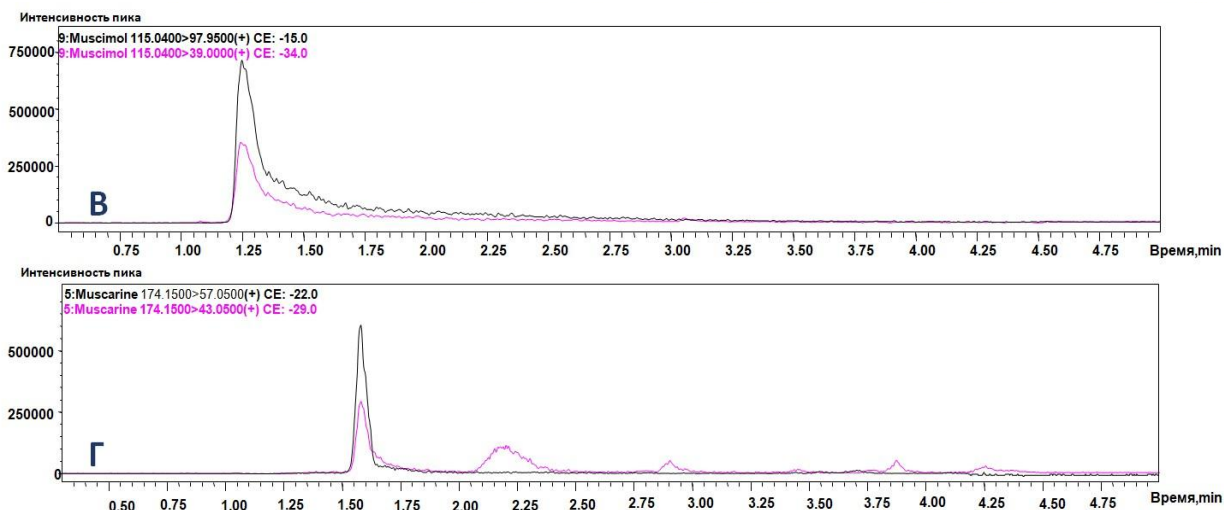


Рисунок 19 – Хроматограммы извлечений из капсул пантерного мухомора на колонке Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl: (В) мусцимол; (Г) мускарин

При использовании колонки Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 целевые аналиты имеют время удерживание (RT) для мускарина около 3,4 мин, для мусцимола около 2,3 мин, т.е. произошло значительное смещение времени удерживания в аналитически значимую область и избежание выхода аналитов в «мертвое время» и повысилась эффективность (Рисунок 20, Рисунок 21).

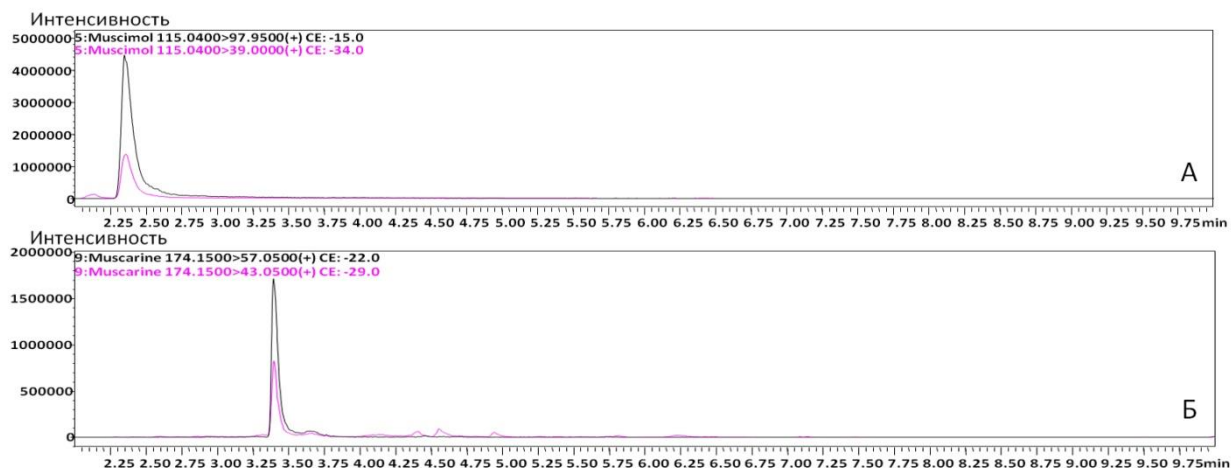


Рисунок 20 – Хроматограммы извлечения из капсул красного мухомора на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 (А) мусцимол; (Б) мускарин

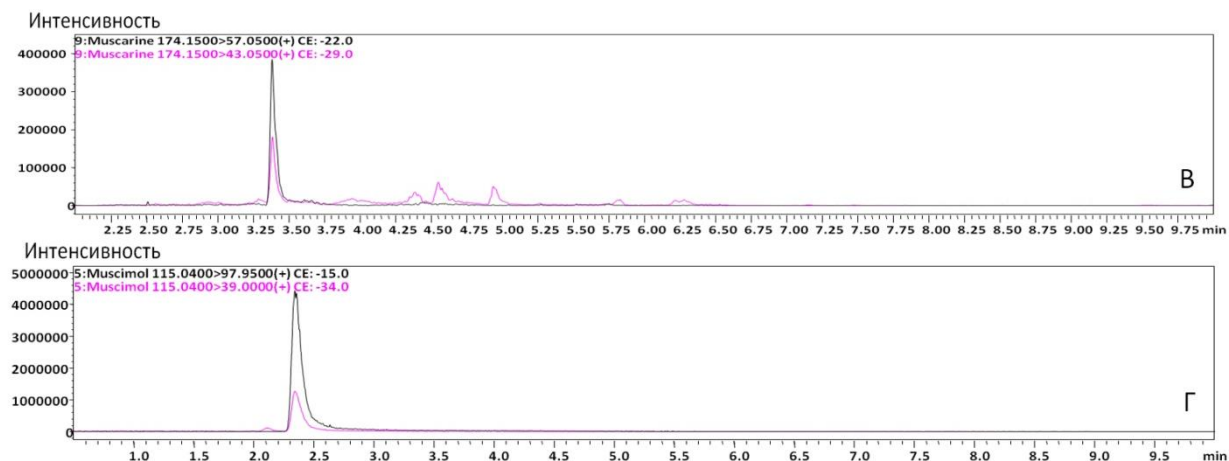


Рисунок 21 – Хроматограммы извлечения из капсул пантерного мухомора на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3, (В) мускарин; (Г) мусцимол

На следующем этапе была опробована пригодность ступенчатого профиля градиента для анализа целевых соединений на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 (Рисунок 22).

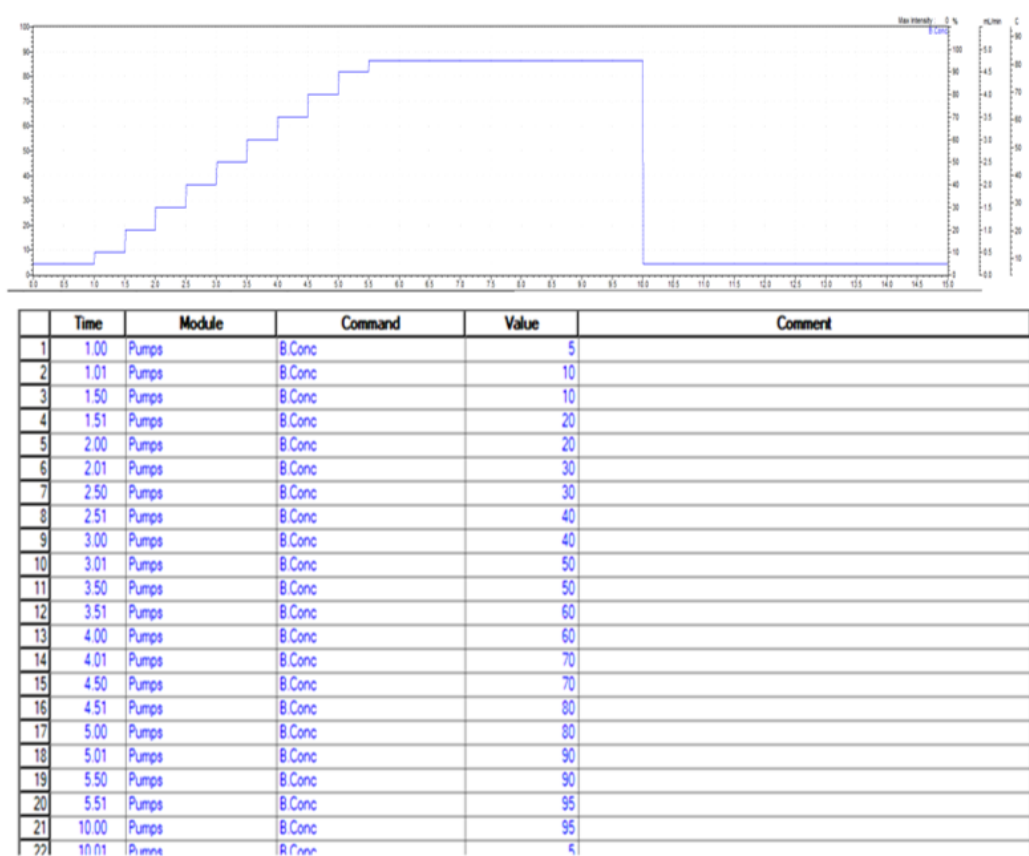


Рисунок 22 – Профиль ступенчатого градиента хроматографической системы

Изменение профиля градиента позволило незначительно повысить эффективность хроматографической системы (Рисунок 23 и Рисунок 24).

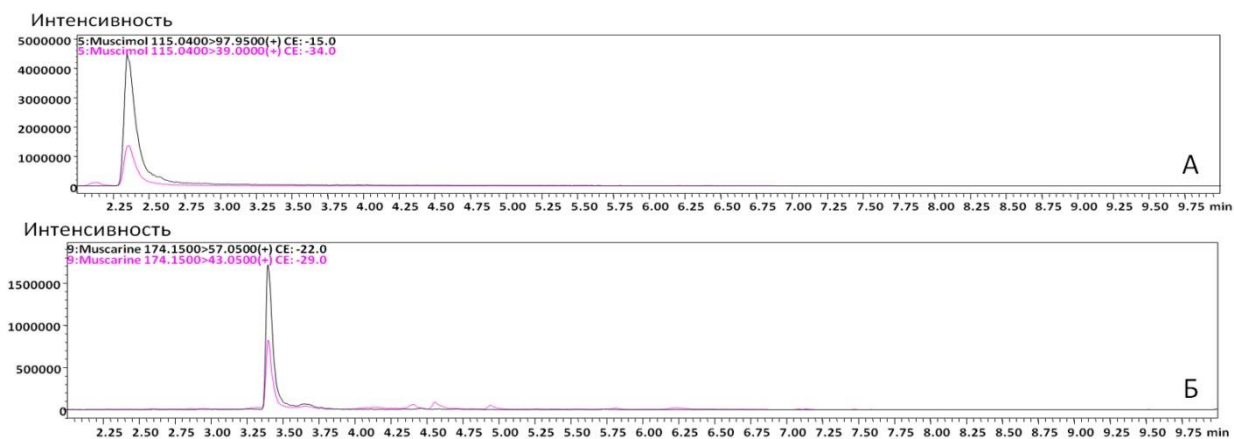


Рисунок 23 – Хроматограммы извлечения из капсул красного мухомора на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 со ступенчатым градиентом элюированием (А) мусцимол; (Б) мускарин

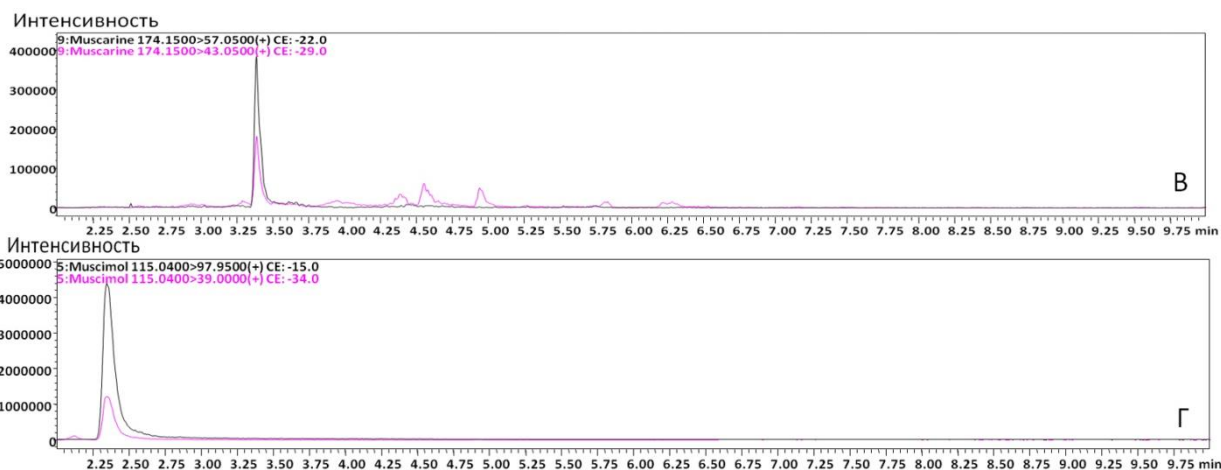


Рисунок 24 – Хроматограмма извлечения из капсул пантерного мухомора Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 со ступенчатым градиентом элюированием (В) мускарин; (Г) мусцимол

Таким образом, для дальнейших исследований биологических объектов были выбраны следующие условия хроматографирования: 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 (Рисунок 23 и Рисунок 24).

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

#### 3.2.3.1 Оценка пригодности хроматографической системы

В нашем исследовании из-за отсутствия доступных коммерческих стандартных образцов целевых аналитов возникает проблема невозможности точной градуировки прибора и выполнения количественного анализа.

В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик: ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (2022) проводилась оценка параметров специфичность и селективность, также оценивались параметры пригодности

хроматографической системы согласно USP <621> (Хроматография); ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография; ЕР 2.2.46 (Хроматографические методы) по критериям: разрешение ( $RS \geq 1,5$ ), сигнал/шум ( $> 3$ ), время удерживания (отклонение  $\pm 5\%$ ), эффективность ( $> 2000$  для ВЭЖХ), симметрия (от 0,8 до 1,5), дополнительно определялась высота, эквивалентная теоретической тарелке (параметр, характеризующий эффективность, чем меньше  $N$ , тем выше эффективность), робатность и интерференционный эффект матрицы [115, 116, 117, 118]. Результаты представлены в Таблица -Таблица , проводилась холостая проба чистого растворителя (Рисунок 25).

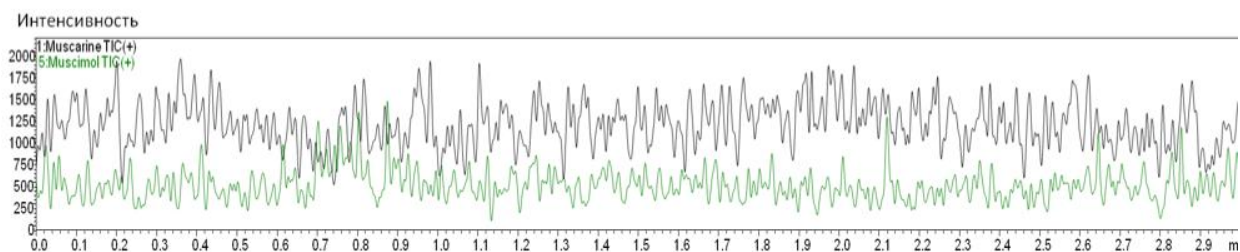


Рисунок 25 – Хроматограмма чистого растворителя

Таблица 8 – Результаты определения пригодности параметров хроматографической системы для определения мусцимола и мускарина в капсулах мухомора красного и мухомора пантерного на колонке Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl

Вещество	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	НЕТР	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
<b>Мухомор красный</b>								
Мусцимол	1,23	Переходы: 115.0400>39.0000: 1041375; 115.0400>97.9500: 2462699	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.903; 115.0400>97.9500: 2.063	Переходы: 115.0400>39.0000: 5100; 115.0400>97.9500: 4739	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.961; 115.0400>97.9500: 2.110	Переходы: 115.0400>39.0000: 6.07; 115.0400>97.9500: 11.21	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.045; 115.0400>97.9500: 0.047	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.115; 115.0400>97.9500: 0.135
Мускарин	1,60	Переходы 174.1500>43.0500: 972273 174.1500>57.0500: 2437727	Переходы 174.1500>43.0500: 1.243; 174.1500>57.0500: 1.389	Переходы: 174.1500>43.0500: 8219 174.1500>57.0500: 4303	Переходы: 174.1500>43.0500: 1.217 174.1500>57.0500: 2.324	Переходы: 174.1500>43.0500: 5.45; 174.1500>57.0500: 26.36	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.045; 174.1500>57.0500: 0.046	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.089; 174.1500>57.0500: 0.089
<b>Мухомор пантерный</b>								

Муscимол	1,23	Переходы: 115.0400>39.0000: 1173795; 115.0400>97.9500: 2573423	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.918; 115.0400>97.9500: 1.789	Переходы: 115.0400>39.0000: 1495; 115.0400>97.9500: 1393	Переходы: 115.0400>39.0000: 6.688; 115.0400>97.9500: 7.178	Переходы: 115.0400>39.0000: 3.22; 115.0400>97.9500: 5.18	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.071; 115.0400>97.9500: 0.073	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.128; 115.0400>97.9500: 0.130
Мускарин	1,60	Переходы 174.1500>43.0500: 668127; 174.1500>57.0500: 1686714	Переходы: 174.1500>43.0500: 1.183; 174.1500>57.0500: 1.173	Переходы 174.1500>43.0500: 8783 174.1500>57.0500: 5345	Переходы 174.1500>43.0500: 1.139 174.1500>57.0500: 1.871	Переходы 174.1500>43.0500: 3.29; 174.1500>57.0500: 15.95	Переходы 174.1500>43.0500: 0.046; 174.1500>57.0500: 0.048	Переходы 174.1500>43.0500: 0.093; 174.1500>57.0500: 0.094
			<b>Tailing F. средн.</b> <i>Мухомор красный:</i> муscимол (1,983) мускарин (1,316); <i>Мухомор пантерный:</i> муscимол (1,854); мускарин (1,178)	<b>NTP средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муscимол (4920) мускарин (6261); <i>Мухомор пантерный:</i> муscимол (1444); мускарин (7064)	<b>NETP средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муscимол (2,036) мускарин (1,771); <i>Мухомор пантерный:</i> муscимол (6,933); мускарин (1,505)	<b>S/N средн =</b> <i>Мухомор красный:</i> муscимол (8,64) мускарин (15,91); <i>Мухомор пантерный:</i> муscимол (4,2); мускарин (9,62)		

Таблица 9 – Результаты определения пригодности параметров хроматографической системы для определения мусцимола и мускарина в капсулах мухомора красного и мухомора пантерного на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua в стандартном режиме элюирования

Вещество	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	НЕТР	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
<b>Мухомор красный</b>								
Мусцимол	2,35	Переходы: 115.0400>39.00 00: 6724641 ; 115.0400>97.95 00: 13052440	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.771; 115.0400>97.9500: 1.768	Переходы: 115.0400>39.0000: 3355; 115.0400>97.9500: 4113	Переходы: 115.0400>39.0000: 2.981; 115.0400>97.9500: 2.431	Переходы: 115.0400>39.0000: 10.16; 115.0400>97.9500: 27.49	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.090; 115.0400>97.9500: 0.088	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.215; 115.0400>97.9500: 0.218
Мускарин	3,48	Переходы 174.1500>43.05 00: 1890345 174.1500>57.05 00: 3375205	Переходы 174.1500>43.0500: 1.836; 174.1500>57.0500: 1.660	Переходы: 174.1500>43.0500: 26429 174.1500>57.0500: 45623	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.378 174.1500>57.0500: 0.219	Переходы: 174.1500>43.0500: 14.23; 174.1500>57.0500: 17.31	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.047; 174.1500>57.0500: 0.038	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.111; 174.1500>57.0500: 0.096
<b>Мухомор пантерный</b>								

Муцимол	2,35	Переходы: 115.0400>39.00 00: 6981043; 115.0400>97.95 00: 15129935	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.645; 115.0400>97.9500: 1.558	Переходы: 115.0400>39.0000: 3570; 115.0400>97.9500: 3711	Переходы: 115.0400>39.0000: 2.801 ; 115.0400>97.9500: 2.694	Переходы: 115.0400>39.0000: 7.51 ; 115.0400>97.9500: 14.90	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.092; 115.0400>97.9500: 0.096	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.177; 115.0400>97.9500: 0.197
Мукарин	3,48	Переходы 174.1500>43.05 00: 1106272; 174.1500>57.05 00: 1983002	Переходы 174.1500>43.0500: 1.342; 174.1500>57.0500: 1.342	Переходы 174.1500>43.0500: 26976 174.1500>57.0500: 30980	Переходы 174.1500>43.0500: 0.371 174.1500>57.0500: 0.323	Переходы 174.1500>43.0500: 8.17; 174.1500>57.0500: 7.72	Переходы 174.1500>43.0500: 0.046 174.1500>57.0500: 0.043	Переходы 174.1500>43.0500: 0.094 174.1500>57.0500: 0.092
		<b>Tailing F. средн.</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (1,770) мукарин (1,748); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (1,602); мукарин (1,342)	<b>NTP средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (3734) мукарин (36026); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (3641); мукарин (28978)	<b>NETP средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (2,706) мукарин (0,299); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (2,748); мукарин (0,347)	<b>S/N средн =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (18,83) мукарин (15,77); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (11,21); мукарин (7,95)			

Таблица 10 – Результаты определения пригодности параметров хроматографической системы для определения мусцимола и мускарина в капсулах мухомора красного и мухомора пантерного на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua НР в градиентном ступенчатом режиме элюирования

Вещество	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	НЕТР	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
<b>Мухомор красный</b>								
Мусцимол	2,35	Переходы: 115.0400>39.0000: 6945729 ; 115.0400>97.9500: 21884481	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.484; 115.0400>97.9500: 1.880	Переходы: 115.0400>39.0000: 4155; 115.0400>97.9500: 4603	Переходы: 115.0400>39.0000: 2.407; 115.0400>97.9500: 2.172	Переходы: 115.0400>39.0000: 9.67; 115.0400>97.9500: 12.95	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.082; 115.0400>97.9500: 0.078	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.180; 115.0400>97.9500: 0.177
Мускарин	3,48	Переходы 174.1500>43.0500: 2132705 174.1500>57.0500: 5409486	Переходы 174.1500>43.0500: 1.541; 174.1500>57.0500: 2.016	Переходы: 174.1500>43.0500: 42664; 174.1500>57.0500: 29655	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.234 174.1500>57.0500: 0.337	Переходы: 174.1500>43.0500: 14.84; 174.1500>57.0500: 39.44	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.040; 174.1500>57.0500: 0.048	Переходы: 174.1500>43.0500: 0.095; 174.1500>57.0500: 0.119
<b>Мухомор пантерный</b>								
Мусцимол	2,35	Переходы: 115.0400>39.0000: 6456672; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.629; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 5702; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 1.754; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 16.88; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.082; 115.0400>97.9500:	Переходы: 115.0400>39.0000: 0.190; 115.0400>97.9500:

		23411108	1.769	5267	1.899	20.33	0.080	0.194
Мушкарин	3,48	Переходы 174.1500>43.0500: 385570; 174.1500>57.0500: 976205	Переходы 174.1500>43.0500: 1.692; 174.1500>57.0500: 1.657	Переходы 174.1500>43.0500: 55095; 174.1500>57.0500: 45877	Переходы 174.1500>43.0500: 0.182 174.1500>57.0500: 0.218	Переходы 174.1500>43.0500: 5.36; 174.1500>57.0500: 16.10	Переходы 174.1500>43.0500: 0.035; 174.1500>57.0500: 0.037	Переходы 174.1500>43.0500: 0.094; 174.1500>57.0500: 0.099
			<b>Tailing F. средн.</b> <i>Мушмор краснй:</i> мушцимол (1,682); мушкарин (1,779); <i>Мушмор пантерный:</i> мушцимол (1,699); мушкарин (1,675)	<b>NTP средн. =</b> <i>Мушмор краснй:</i> мушцимол (4379); мушкарин (36160); <i>Мушмор пантерный:</i> мушцимол (5485); мушкарин (50486)	<b>NETP средн. =</b> <i>Мушмор краснй:</i> мушцимол (2,290); мушкарин (0,286); <i>Мушмор пантерный:</i> мушцимол (1,827); мушкарин (0,200)	<b>S/N средн =</b> <i>Мушмор краснй:</i> мушцимол (11,31); мушкарин (27,14); <i>Мушмор пантерный:</i> мушцимол (18,61); мушкарин (10,73)		

Полученные данные показывают (Таблица 8), что для определения мусцимола и мускарина эти условия не пригодны, но использование колонки Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl позволило значительно повысить эффективность хроматографической системы (мухомор красный: NTP среднее для мусцимола = 4920; для мускарина = 6261; мухомор пантерный: NTP среднее мусцимола = 1444; мускарина = 7064) по сравнению с колонкой C18. (Рисунок 18 и Рисунок 19). Параметр отношения сигнал/шум  $> 3$ .

Полученные данные показывают (Таблица 9), что для определения мусцимола и мускарина условия пригодны, поскольку использование колонки Shim-pack GIST C18-Aqua HP 3 позволило избежать выхода аналитов в «мертвое время», значительно повысилась эффективность хроматографической системы для определения мускарина (мухомор красный: NTP среднее мускарина = 36026; мухомор пантерный: NTP среднее мускарина = 28978) (Рисунок 20 и Рисунок 21). Параметр отношения сигнал/шум  $> 3$ . Из данных Таблица 8 и Таблица 9 видно, что значение HETP уменьшилось по сравнению с результатами, полученными на колонке Shim-pack VP-ODS C8-Phenyl: чем меньше HETP, тем уже пики, лучше хроматографическое разделение. Изменение профиля градиента (Таблица 9) также позволило повысить эффективность хроматографической системы (мухомор красный: NTP среднее для мусцимола = 4379; мускарина = 36160; мухомор пантерный: NTP среднее для мусцимола = 5485; мускарина = 50486) по сравнению со стандартным режимом (Рисунок 20 и Рисунок 21) и снизить показатели ВЭТТ, которые находятся в пределах  $< 2.5$ . Однако пики несимметричны (Tailing F.  $> 1,5$ ) в обоих случаях, причиной этому может быть высокая концентрация целевых соединений в извлечении, взаимодействие аналитов с силанольными группами колонки. RS=10,9.

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

В соответствии с данными литературы, одним из возможных способов решения проблемы слабого удерживания мусцимола на колонке Shim-pack FC-ODS, и идентификации иботеновой кислоты в капсулах является дериватизация с использованием дансилхлорида, который легко реагирует в щелочной среде с нуклеофильными группами целевых соединений, тем самым улучшая их удерживание на колонке C18, это является распространенным приемом для стабилизации молекул и улучшения хроматографического разделения (Рисунок 26) [107].

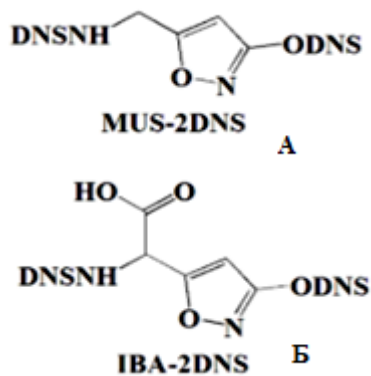


Рисунок 26 – Структурные формулы дансилпроизводных мусцимола (А) и иботеновой кислоты (Б)

#### Методика 2

Изолирование: навески по 300 мг порошка из капсул, содержащих высушенное сырье мухомора красного и мухомора пантерного в двух 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).

Отбирали 1 мл фильтрата, добавляли 500 мкл воды, 500 мкл 5% карбоната натрия и 300 мкл 30 mM дансилхлорида в ацетоне, тщательно

перемешивали и инкубировали 30 мин при 60°C, охлаждали и останавливали процесс дериватизации добавлением 10 мкл концентрированной серной кислоты. Прибавляли 2 мл дихлорметана, тщательно перемешивали и центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), отбирали нижний слой и выпаривали до сухого остатка, растворяли в 500 мкл фазы А, вводили в инжектор хроматографа [107].

Обнаружение дериватов иботеновой кислоты и мусцимола проводили по совокупности параметров времени удерживания и MRM-переходам (Рисунок 27).

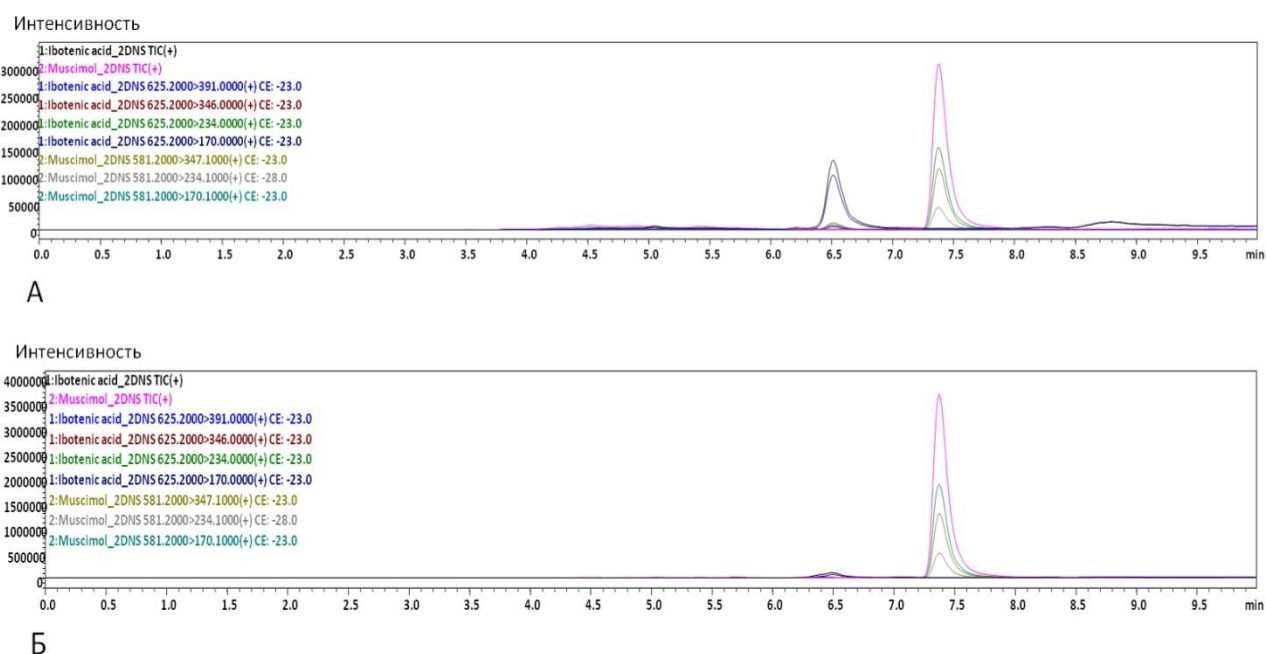


Рисунок 27 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты из капсул *AM* (А) и *AP* (Б)

В ходе дериватизации удалось идентифицировать дансилпроизводное иботеновой кислоты. Как видно из представленных хроматограмм, содержание иботеновой кислоты в капсулах ниже из-за быстрого декарбоксилирования до мусцимола.

На Рисунке 27 представлены хроматограммы, на которых отмечается значительное смещение времени удерживания: для дансилпроизводного мусцимола оно составило 7,4 мин, для производного иботеновой кислоты 6,5 мин. Сравнение площадей пиков иботеновой кислоты в извлечениях из

капсул обоих видов мухоморов позволяет предположить, что содержание иботеновой кислоты больше в высушенном сырье мухомора пантерного.

### **3.2.5 Валидационная оценка методики определения дериватов мусцимола и иботеновой кислоты методом ВЭЖХ МС/МС в капсулах**

В литературе [105] при данном методе пробоподготовки рекомендуется использовать в качестве ВС меченые изотопы. Однако ВС являются недоступными для большинства химико-токсикологических лабораторий, для рутинного анализа.

Подбор внутреннего стандарта был также затруднен в связи со сложным процессом пробоподготовки (дериватизации), длительного нагревания, в ходе которого происходят побочные реакции. Нужно учитывать, что неизвестно, с какой скоростью и при каких оптимальных условиях идет реакция дериватизации внутреннего стандарта, стандарт может дериватизироваться сложнее, образовывать меньшую концентрацию дансилпроизводных по сравнению с целевыми веществами при равных условиях.

Однако был проведен эксперимент, когда в качестве внутреннего стандарта использовался п-аминофенол, который также образует дансилпроизводное по двум положениям (поскольку в его структуре присутствуют фенольный гидроксил и амино-группа, являющиеся нуклеофильными центрами для атаки дансилхлоридом, само вещество является гидрофильным) и не является эндогенным соединением (Рисунок 28, 29, 30).

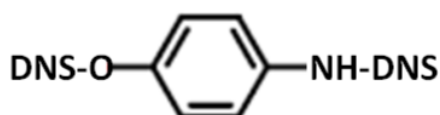


Рисунок 28 – Дансилпроизводное п-аминофенола

Полученные данные были неудовлетворительными, поскольку п-аминофенол не удовлетворяет требованиям к внутреннему стандарту, на

хроматограмме отмечалось наложение пиков деривата ВС и целевого аналита (Рисунок 29 и Рисунок 30).

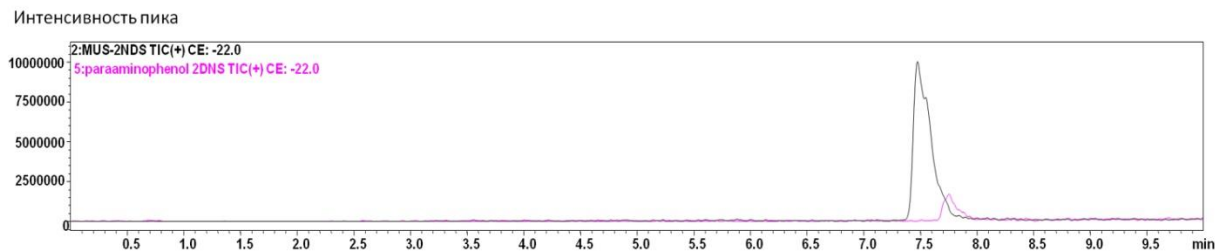


Рисунок 29 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и п-аминофенола

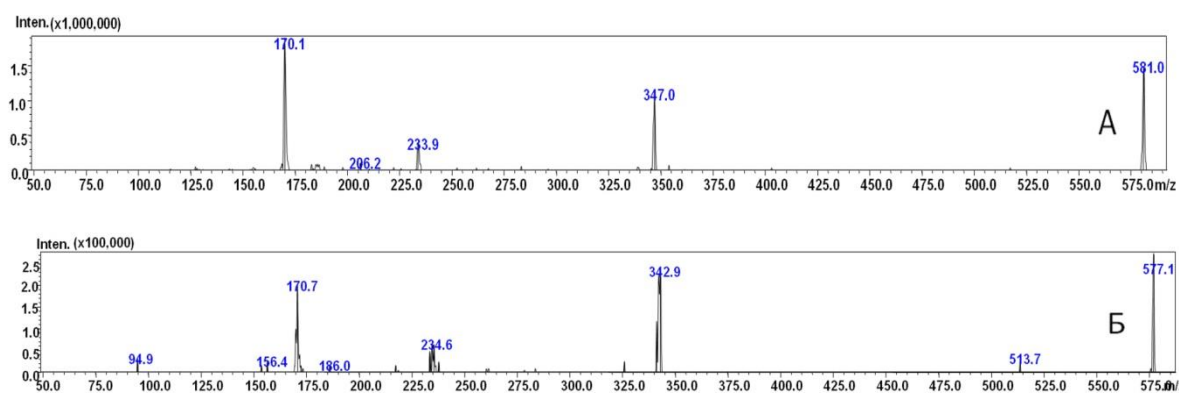


Рисунок 30 – Спектр ионов-продуктов деривата мусцимола (А) и п-аминофенола (Б) в методе Product Ion Scan. Энергия соударения (CE) – 22

Вторым кандидатом на ВС был фенилэфрин, который сопоставим с целевыми аналитами по физико-химическим свойствам. Его  $RT \sim 0,7$  мин, и он не образовал дансилпроизводного, поскольку в спектре ион-продуктов отсутствуют 170 и 234  $m/z$ , характерные для остатков дансилхлорида (Рисунок 31 и Рисунок 32).

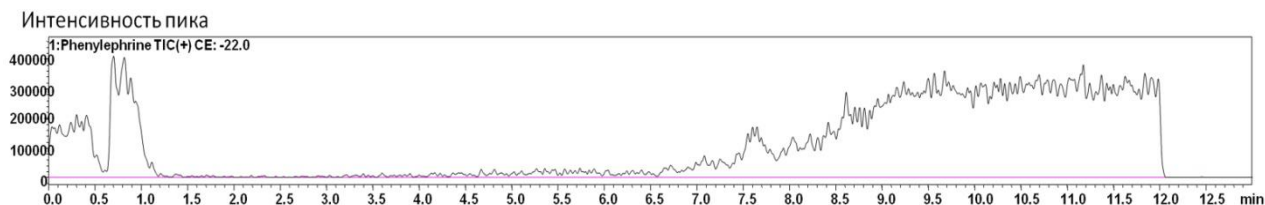


Рисунок 31 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата фенилэфрина

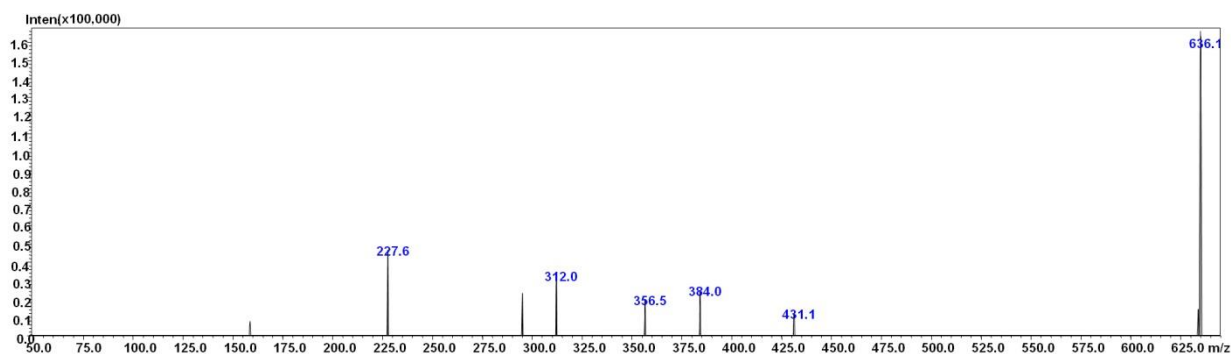


Рисунок 32 – Спектр ион-продуктов деривата фенилэфрина. Энергия соударения (CE) – 22

Таким образом, попытка выбрать из доступных ВС с целью последующей валидационной оценки разработанной методики определения мусцимола и иботеновой кислоты исходя из близких к ним физико-химических соединений и возможности получения дериватов с дансилхлоридом не принесла положительного результата.

### 3.2.5.1 Сравнение химического состава капсул различных производителей и высушенных шляпок мухоморов пантерного и красного

В качестве объектов исследования были использованы образцы высушенных шляпок плодовых тел мухомора красного (*A. muscaria*) и мухомора пантерного (*A. pantherina*) и порошок плодовых тел мухомора красного в капсулах различных производителей.

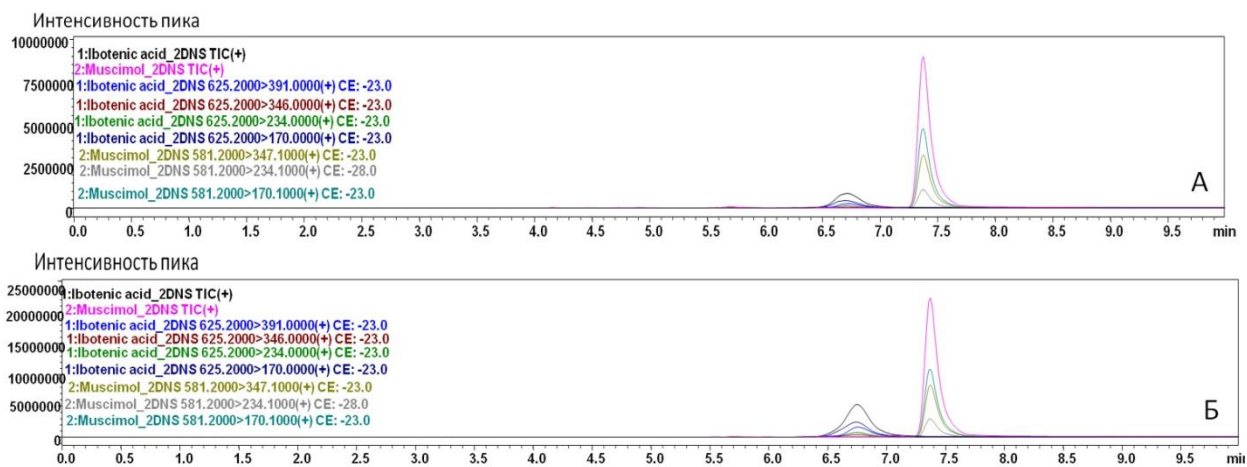


Рисунок 33 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты в извлечениях из (А) высушенных шляпок мухомора пантерного; (Б) высушенных шляпок мухомора красного.

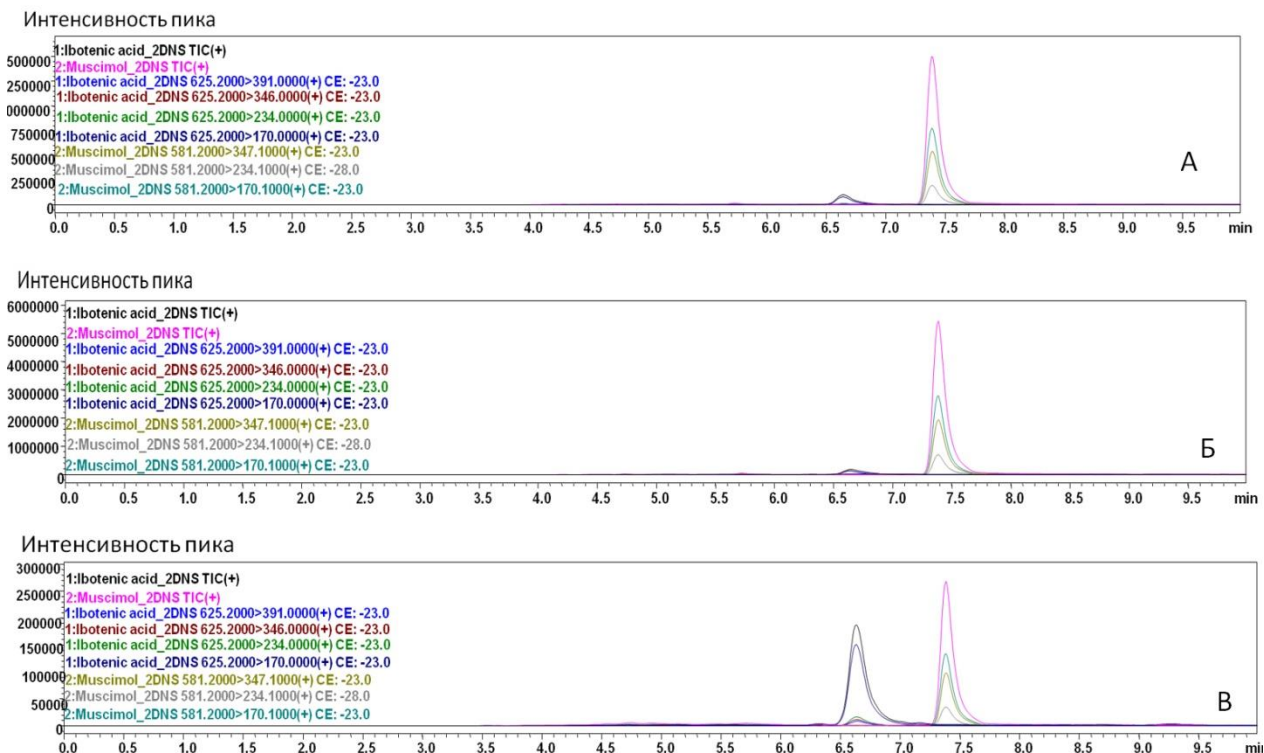


Рисунок 34 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) дериватов мусцимола и иботеновой кислоты в извлечениях из (А) содержимого капсул мухомора пантерного (производитель Fingiline, Россия); (Б) содержимого капсул мухомора пантерного (производитель ALTAI ECO, Россия); (В) содержимого капсул мухомора красного (производитель Die Familie, Россия).

Полученные данные (Рисунок 33, Рисунок 34) по сравнению химического состава капсул различных производителей и высушенных шляпок мухоморов пантерного и красного, показали наличие мусцимола и иботеновой кислоты во всех образцах, что позволяет использовать извлечения из капсул в качестве образцов сравнения для разработки методики определения целевых токсикантов в биологических объектах.

### 3.2.5.1 Оценка пригодности хроматографической системы

В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик проводили определение пригодности хроматографической системы [115, 116, 117, 118].

Полученные данные показывают (Таблица 11), что для определения дериватов иботеновой кислоты и мусцимола эти условия пригодны и могут

быть использованы при дальнейшем анализе, хроматографическая система эффективна, NTP средняя для мухомора красного: мусцимол (15703); иботеновая (10759); мухомора пантерного: мусцимол (15647; иботеновая (5476). Параметр отношения сигнал/шум  $> 3$ , время удерживания: мусцимол (7,4), иботеновая (6,5), показатели ВЭТТ находятся в пределах  $< 2.5$ . По соотношению площадей можно сделать вывод о более высоком содержании иботеновой кислоты и более высоком содержании мусцимола в пантерном мухоморе по сравнению с красным,  $RS=4,1$

Хроматограммы, полученные при исследовании в данной хроматографической системе отвечали всем критериям пригодности хроматографической системы за исключением симметрии пика.

Таблица 11 – Результаты определения пригодности параметров хроматографической системы для определения мусцимола и иботеновой в капсулах мухомора красного и мухомора пантерного после дериватизации в методе *MRM*

Вещество	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	НЕТР	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
<b>Мухомор красный</b>								
Мусцимол-2DNS	7.4	Переходы: 581,2000>170,1000: 00: 1208807; 581,2000>234,1000: 00: 312572; 581,2000>347,1000: 00: 867760	Переходы: Переходы: 581,2000>170,1000: 0: 1.658; 581,2000>234,1000: 0: 1.627; 581,2000>347,1000: 0: 1.627	Переходы: 581,2000>170,1000: 15017; 581,2000>234,1000: 16413; 581,2000>347,1000: 15679	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.666; 581,2000>234,1000: 0.609; 581,2000>347,1000: 0.638	Переходы: 581,2000>170,1000: 209.43; 581,2000>234,1000: 115.76; 581,2000>347,1000: 104.32	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.131; 581,2000>234,1000: 0.124; 581,2000>347,1000: 0.124	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.339; 581,2000>234,1000: 0.316; 581,2000>347,1000: 0.310
Иботеновая-2DNS	6,5	625,2000>391,0000: 00: 56960; 625,2000>346,0000: 00: 81029; 625,2000>234,0000: 00: 94904; 625,2000>170,0000	625,2000>391,0000: 0: 1.132; 625,2000>346,0000: 0: -; 625,2000>234,0000: 0: 1.483 625,2000>170,0000: 0: 1.611	625,2000>391,0000: 10704; 625,2000>346,0000: 9900; 625,2000>234,0000: 11057; 625,2000>170,0000: 11376	625,2000>391,0000: 2.135; 625,2000>346,0000: 1.478; 625,2000>234,0000: 1.179; 625,2000>170,0000: 0.879	625,2000>391,0000: 12.37; 625,2000>346,0000: 8.20; 625,2000>234,0000: 29.23; 625,2000>170,0000: 69.75	625,2000>391,0000: 0.126; 625,2000>346,0000: 0.140; 625,2000>234,0000: 0.132; 625,2000>170,0000: 0.128	625,2000>391,0000: 0.394; 625,2000>346,0000: Пик размыт; 625,2000>234,0000: 0.336; 625,2000>170,0000: 0.353

		00: 847662						
<b>Мухомор пантерный</b>								
Муцимол-2DNS	7.4	Переходы: 581,2000>170, 1000: 16668767; 581,2000>234, 1000: 4589348; 581,2000>347, 1000: 12202917	Переходы: 581,2000>170,1000: 1.782; 581,2000>234,1000: 1.797; 581,2000>347,1000: 1.789	Переходы: 581,2000>170,1000: 15722; 581,2000>234,1000: 15225; 581,2000>347,1000: 15995	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.636; 581,2000>234,1000: 0.657; 581,2000>347,1000: 0.625	Переходы: 581,2000>170,1000: 576.38; 581,2000>234,1000: 552.12; 581,2000>347,1000: 153.89	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.126; 581,2000>234,1000: 0.128; 581,2000>347,1000: 0.123	Переходы: 581,2000>170,1000: 0.350; 581,2000>234,1000: 0.351; 581,2000>347,1000: 0.335
Иботеновая-2DNS	6,5	625,2000>391, 0000: 247674; 625,2000>346, 0000: 105354; 625,2000>234, 0000: 170408; 625,2000>170, 0000: 897827	625,2000>391,0000: 1.197; 625,2000>346,0000: -; 625,2000>234,0000: 1.096; 625,2000>170,0000: 1.075	625,2000>391,0000: 6006; 625,2000>346,0000: 3960; 625,2000>234,0000: 4601; 625,2000>170,0000: 7337	625,2000>391,0000: 1.665; 625,2000>346,0000: 2.525; 625,2000>234,0000: 2.173; 625,2000>170,0000: 1.363	625,2000>391,0000: 12.93; 625,2000>346,0000: 7.64; 625,2000>234,0000: 30.18; 625,2000>170,0000: 61.34	625,2000>391,0000: 0.186; 625,2000>346,0000: 0.230; 625,2000>234,0000: 0.244; 625,2000>170,0000: 0.156	625,2000>391,0000: 0.413; 625,2000>346,0000: Пик размыт; 625,2000>234,0000: 0.523; 625,2000>170,0000: 0.486
			<b>Tailing F. средн.</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (1,637); иботеновая (1,409); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (1,789); иботеновая (1,123)	<b>NTP средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (15703); иботеновая(10759); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (15647); иботеновая (5476)	<b>НЕТР средн. =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (0,638); иботеновая (1,418); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (0,639); иботеновая (1,932)	<b>S/N средн =</b> <i>Мухомор красный:</i> муцимол (143,17); мускарин (29,89); <i>Мухомор пантерный:</i> муцимол (427,46); иботеновая (28,02)		

Таблица 12 – Результаты определения пригодности хроматографической системы при анализе капсул на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua HP в градиентном ступенчатом режиме элюирования с требованиями НД, оценка интерференционного эффекта матрицы и робастности

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД [115, 116, 117, 118].
RS	10,9	$\geq 1,5$
сигнал/шум	Мухомор красный: мусцимол (11,31); мускарин (27,14); мухомор пантерный: 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	Мухомор красный: мусцимол (4379); мускарин (36160); мухомор пантерный: мусцимол (5485); мускарин (50486)	$> 2000$
симметрия	Мухомор красный: мусцимол (1,682); мускарин (1,779); мухомор пантерный: 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.
--	---

Таблица 13 – Результаты определения пригодности хроматографической системы при анализе капсул с использованием метода дериватизации дансилхлоридом с требованиями НД, оценка интерференционного эффекта матрицы и робастности

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД [115, 116, 117, 118].
RS	4,1	$\geq 1,5$
сигнал/шум	Мухомор красный: мусцимол-2DNS (143,17); иботеновая-2DNS (29,89); Мухомор пантерный: 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	Мухомор красный: мусцимол-2DNS (15703); иботеновая-2DNS (10759); Мухомор пантерный: мусцимол-2DNS (15647); иботеновая-2DNS (5476)	$> 2000$
симметрия	Мухомор красный: мусцимол-2DNS (1,637); иботеновая-2DNS (1,409); Мухомор пантерный: мусцимол-2DNS	от 0,8 до 1,5

	(1,789); иботеновая-2DNS (1,123)	
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.	

\*Отклонение времени удерживания определяли по анализу нескольких образцов, колебаниям значений времени выхода.

### **3.2.6 Апробация методики дериватизации 9-Флуоренилметоксикарбонил хлоридом (FMOC-Cl) для определения мусцимола и иботеновой кислоты в капсулах методом ВЭЖХ МС/МС**

Согласно данным литературы одним из возможных решений проблемы слабого удерживания токсикантов является дериватизация с использованием 9-флуоренилметоксикарбонил хлорида (FMOC-Cl) (Рисунок 35 Г). Данный дериватирующий агент способен образовывать однозамещенные производные по аминогруппе в присутствии слабого основания, является более доступным и экономически целесообразным реагентом [120].

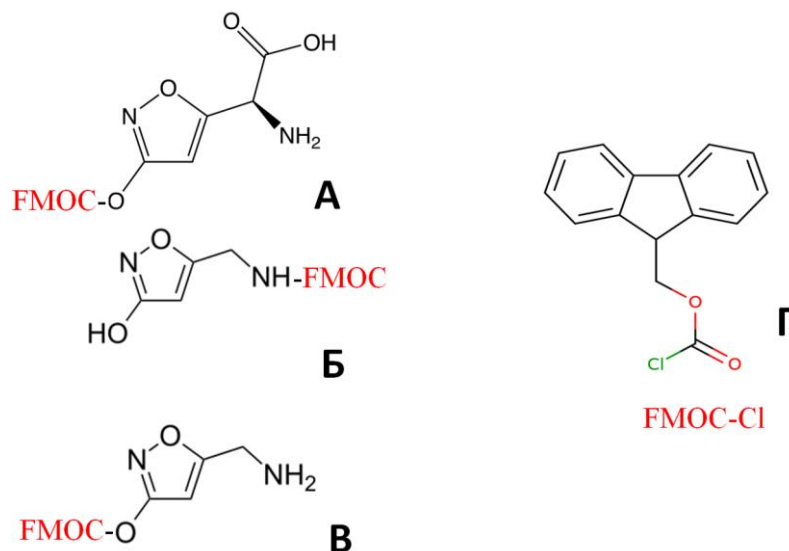


Рисунок 35 – Структурные формулы: А – FMOC-производного иботеновой кислоты по гидроксильной группе; Б – FMOC-производного мусцимола по экзоциклическому азоту; В – FMOC-производного мусцимола по гидроксильной группе; Г – FMOC-Cl.

*А. Методика пробоподготовки капсул:* навеску порошка из капсул около 0,1 г однократно экстрагировали 1.0 мл ацетона в центрифужной пробирке. 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 36 и Рисунок 38) наблюдается пик мусцимола с RT около 5,25 мин. Спектр ион-продуктов (Рисунок 37) 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.

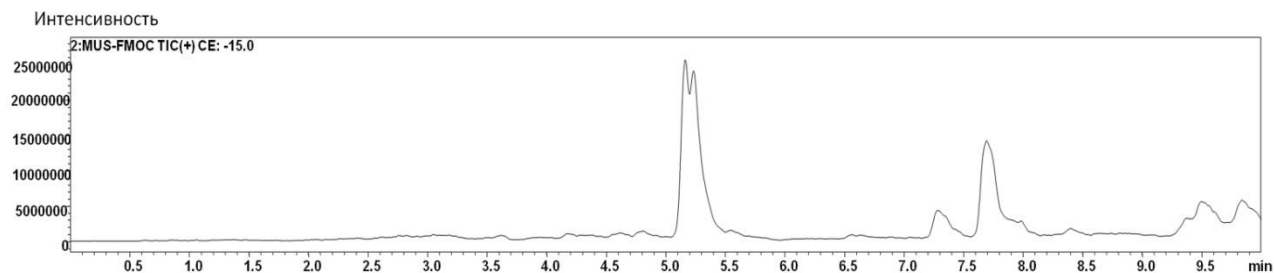


Рисунок 36 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата мусцимола в методе Product Ion Scan

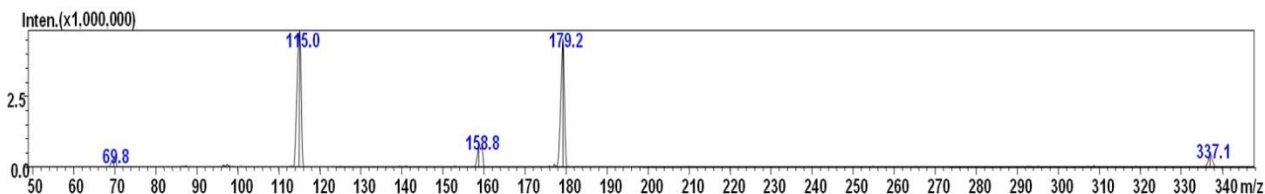


Рисунок 37 – Спектр ионов-продуктов деривата мусцимола. Энергия соударения (CE) – 15

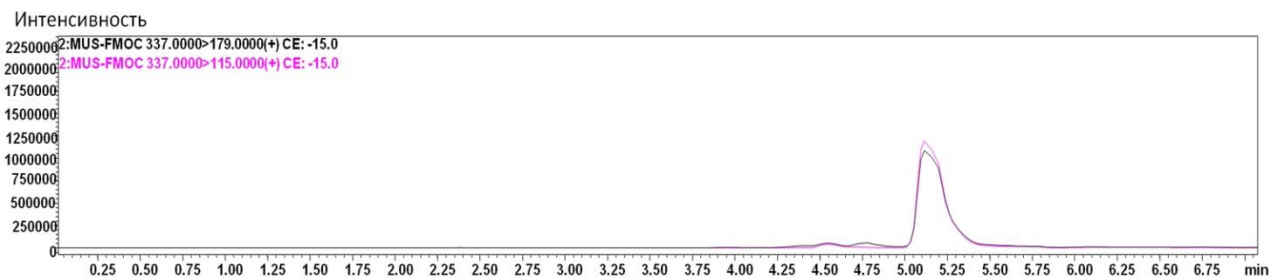


Рисунок 38 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата мусцимола в методе MRM

Пик (Рисунок 35А) дериватизированной иботеновой кислоты наблюдается с RT около 4,7 мин (Рисунок 39 и Рисунок 41). Спектр ион-продуктов (Рисунок 40) 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 38 наблюдается сигнал

$m/z$  363 низкой интенсивности, которая способна образовываться при отщеплении воды от FMOC-замещенной иботеновой кислоты.

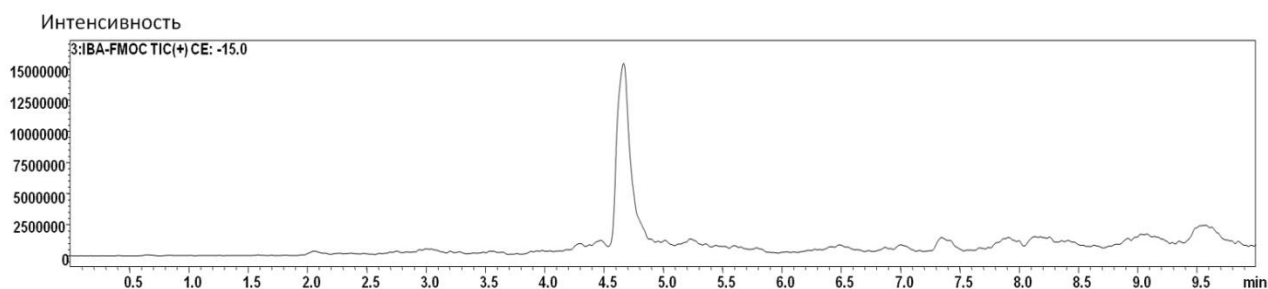


Рисунок 39 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата иботеновой кислоты в методе Product Ion Scan

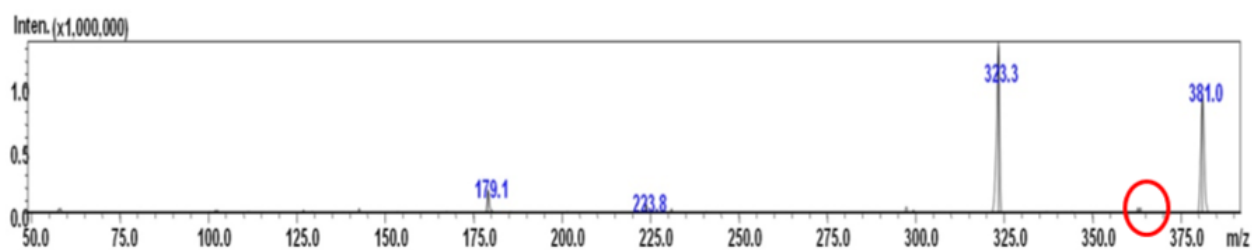


Рисунок 40 – Спектр ионов-продуктов деривата иботеновой кислоты. Энергия соударения (CE) – 15

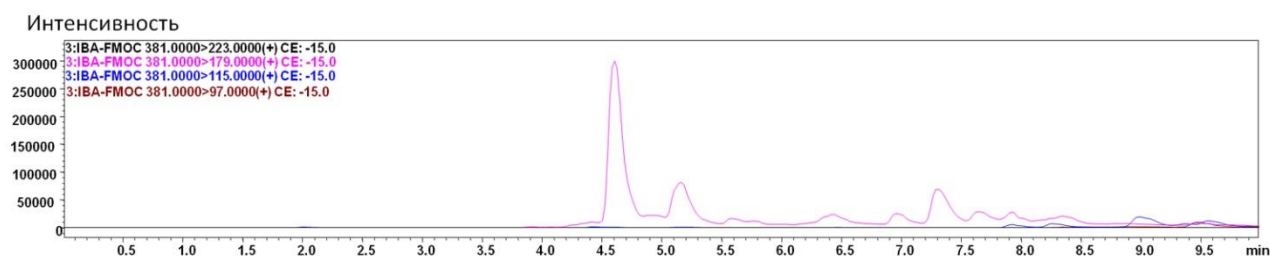
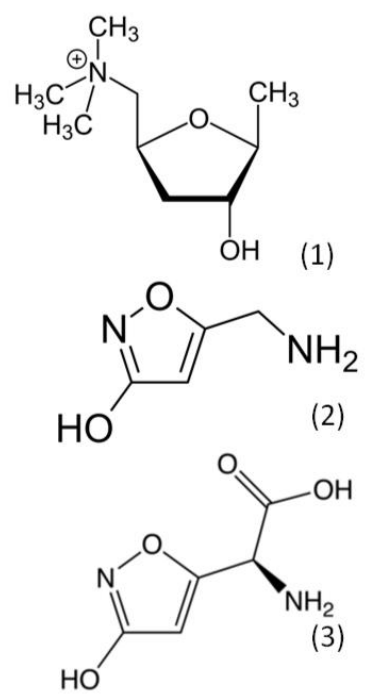


Рисунок 41 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) деривата иботеновой кислоты в методе MRM

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.

По итогам проведенного исследования в таблице 14 представлены требования к показателям референсного образца.

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

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>  <p>(1)</p> <p>(2)</p> <p>(3)</p>
Подлинность	
Ботаническое описание	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

	<p>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>
<p>Качественная реакция</p>	<p>Окрашивание раствором Люголя (положительная реакция на крахмал)</p>
<p>Идентификация</p>	<p>Метод ВЭЖХ-МС/МС</p> <p>1) Колонка Shim-pack GIST C18-Aqua NP (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.</p>

	<p>Градиентный ступенчатый режим элюирования. RT мускарина 3,48 мин; RT мусцимола 2,35 мин, m/z для мусцимола: 97, 39. m/z для мускарина: 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>
--	--

### ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

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. Ботаническое исследование высушенных шляпок *AM*, *AP* и содержимого капсул различных производителей показало идентичность основных ботанических признаков: гифы мицелия, базидии и базидиоспоры, положительная реакция на крахмал. Полученные данные по ботанической идентификации и сравнению химического состава и наличие мусцимола и иботеновой кислоты во всех образцах позволяют использовать извлечения из капсул в качестве образцов сравнения для разработки методики определения целевых токсикантов в биологических объектах.

3. Исследование по разработке условий хроматографического разделения и идентификации компонентов капсул, содержащих высушенное сырье *AP* и *AM*, показало, что методика исследования на колонке Shim-pack GIST C18-Aqua NP 3 отвечает критериям приемлемости для анализа высокополярных низкомолекулярных соединений какими являются мусцимол и мускарин в соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик и параметрами пригодности хроматографической системы согласно USP <621> (Хроматография), ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография, ЕР 2.2.46 (Хроматографические методы). Использование ступенчатого градиента элюирования позволило незначительно повысить эффективность разделения компонентов (Таблица 12).

4. Исследования по применению приема дериватизации дансилхлоридом показало существенное улучшение показателей

удерживания токсических компонентов, высокую чувствительности и возможность идентификации иботеновой кислоты в капсулах (Таблица 13).

5. Было проведено сравнение дериватирующих агентов (дансилхлорида и FMOС-Cl). Сделан вывод, что метод дансирования для определения токсикантов в капсуле является более информативным поскольку позволяет идентифицировать как мусцимол, так и иботеновую кислоту (дериваты), дансилпроизводные имеют более богатый спектр, поэтому метод целесообразно использовать для дальнейшего анализа.

6. На основании результатов исследования и определения мусцимола и иботеновой кислоты в сырье мухомора красного и мухомора пантерного было выдвинуто предположение о более высоком содержании иботеновой кислоты и мусцимола в капсулах, содержащих высушенное сырье мухомора пантерного. Данные результаты согласуются с данными литературы по особенностям развития интоксикации изучаемых видов мухоморов: *A.M.* содержит больше иботеновой кислоты, и отравление этим видом чаще приводит к спутанности сознания и ажитации, в то время как *A.P.* содержит больше угнетающего мусцимола, и такое отравление наиболее часто сопровождается комой [41].

## **ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА НАДИЧИЕ ТОКСИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ МУХОМОРА КРАСНОГО И МУХОМОРА ПАНТЕРНОГО**

### **4.1 Анализ мочи методом ВЭЖХ-МС/МС**

Химико-токсикологический анализ является обязательным элементом клинико-лабораторной диагностики согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29.04.2025 № 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, а также критерии, при наличии которых имеются достаточные основания полагать, что лицо находится в состоянии опьянения и подлежит направлению на медицинское освидетельствование, учетной формы акта медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), а также формы и порядка ведения журнала регистрации медицинских освидетельствований на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)».

Целью медицинского освидетельствования является установление наличия или отсутствия состояния опьянения, фактов употребления алкоголя, наркотических средств, психотропных, новых потенциально опасных психоактивных, одурманивающих или иных вызывающих опьянение веществ в случаях, установленных законодательством Российской Федерации [103, 114]. Химико-токсикологические исследования пробы биологического объекта (мочи/крови) при медицинском освидетельствовании в обязательном порядке проводятся на наркотические вещества и их метаболиты, а также на иные вещества, которые могут повлечь неблагоприятные последствия при деятельности, связанной с источником повышенной опасности. Химико-токсикологические исследования пробы биологического объекта (мочи) проводятся в два этапа, крови в один этап

[114].

Анализа мочи пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе» с диагнозом «Острое пероральное отравление мухоморами» (на основании анамнеза и клинической картины).

*Методика 1* дериватизация FMOC-Cl была апробирована на моче.

*1А. Методика пробоподготовки 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).

На хроматограмме извлечения из холостого образца мочи отсутствовали пики в аналитически значимой области времен удерживания с  $RT \approx 4,70-5,25$  мин, а отмечались только пики эндогенных веществ биологической матрицы (Рисунок 42).

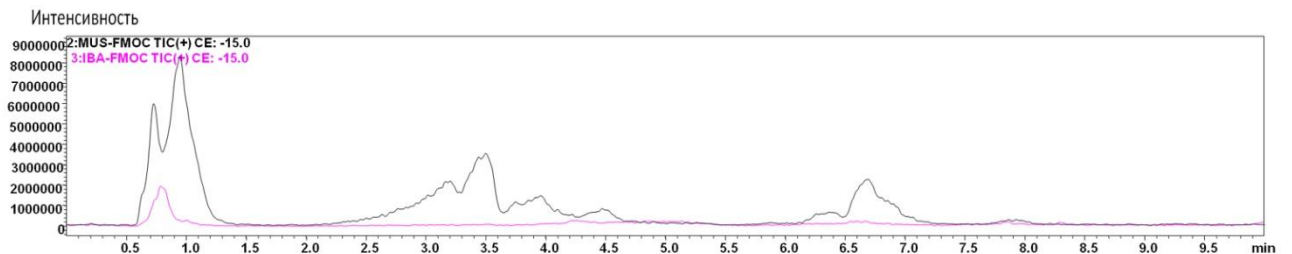


Рисунок 42 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) холостой пробы мочи в методе Product Ion Scan

*1Б. Методика пробоподготовки 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 мультиротаторе MultiBioRS-24 и центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), две капли надосадочной жидкости наносили на обеззоленный фильтр, далее выполняли пробоподготовку согласно методике для мочи.

Анализ обогащенной холостой пробы с добавлением порошка капсул

(Рисунок 43) и мочи пациента (Рисунок 44) позволили идентифицировать только FMOC-производное мусцимола, однако произошло смещение времени удерживания аналита (RT около 4,6 мин).

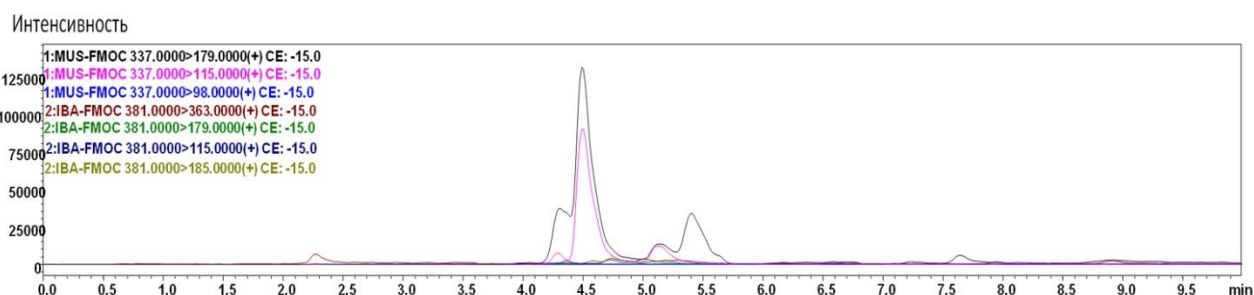


Рисунок 43 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) холостой пробы мочи с добавлением порошка капсул методом MRM

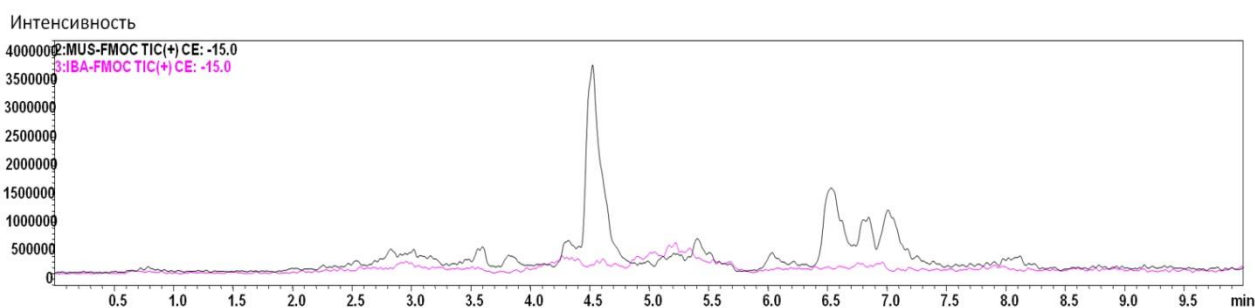


Рисунок 44 – Хроматограмма (колонка Shim-pack FC-ODS) пробы мочи пациента в методе Product Ion Scan

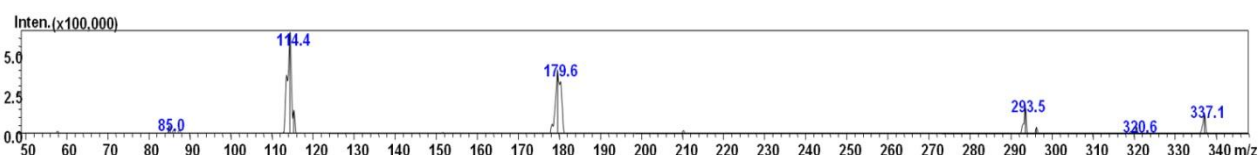


Рисунок 45 – Спектр ионов-продуктов деривата мусцимола. Энергия соударения (CE) – 15

Полученные результаты смещения времени удерживания мусцимола по сравнению с результатами эксперимента, полученного при анализе содержимого капсул, могут свидетельствовать об образовании двух разных изомеров, то есть дериватизации по двум разным центрам: предположительно дериватируется присутствующая в них исходная иботеновая кислота — по ОН-группе кольца (Рисунок 35А), а затем

декарбоксилируется до О-дериивата мусцимола (Рисунок 35В), 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 дериватизируется по экзоциклическому азоту (Рисунок 35Б), образуя, соответственно, другой изомер. Таким образом, результаты данной методики дериватизации зависят преимущественно от пробоподготовки образцов мочи и не могут дать однозначных результатов. Химическая стабильность мусцимола в образце мочи при хранении при температуре 2 - 4°C в холодильнике составила около 1 год.

Методика не позволяет провести валидацию с помощью «референсного образца» в виде содержимого капсул, поскольку в зависимости от исходного объекта (содержимое капсул или моча) реакция дериватизации идёт по разным реакционным центрам (Рисунок 35). Это является существенным недостатком данной методики, по сравнению с реакцией дериватизации с дансилхлоридом. Иботеновую кислоту не удалось идентифицировать в моче пациента.

Таким образом, можно сделать вывод, что методика дериватизации FMOC-Cl для идентификации в моче мусцимола и иботеновой кислоты является непригодной.

### *Методика 2*

Пробоподготовка, получение кислого извлечения: образец мочи (5 мл) помещали в пробирку, содержащую натрия хлорид (2 г), подкисляли хлористоводородной кислотой концентрированной до pH=2.0 и экстрагировали 1500 мкл этилацетатом в мультиротаторе 5 мин со скоростью 50 об/минуту. Затем центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, отбирали органическую фазу и выпаривали досуха при температуре 45°C в потоке воздуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл подвижной фазы А и вводили в

дозатор хроматографа (Рисунок 46).

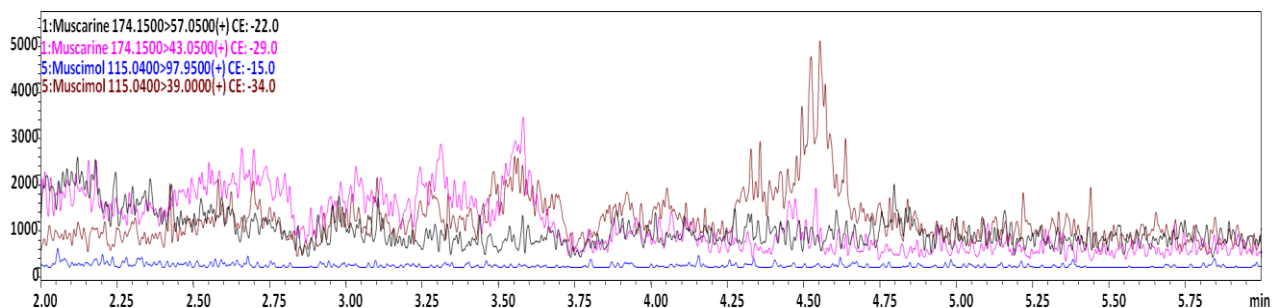


Рисунок 46 – Хроматограмма экстракта из образца мочи на колонке Shim-pack FC-ODS (кислое извлечение)

### Методика 3

Пробоподготовка, получение щелочного извлечения: образец мочи (5 мл) помещали в пробирку, содержащую натрия хлорид (2 г), добавляли кристаллический карбонат натрия до pH=9-10 и экстрагировали смесью дихлорметан: дихлорэтан; изопропанол: гептан (2:2:2:1) в мультиротаторе 5 мин со скоростью 50 об/минуту. Затем центрифугировали смесь 5 мин при 3000 об/мин, верхний органический слой отделяли и выпаривали при температуре 45°C в потоке воздуха, сухой остаток растворяли в 500 мкл подвижной фазы А и вводили в хроматограф. Обнаружение мусцимола проводили по совокупности параметров времени удерживания и MRM-переходам (Рисунок 47).

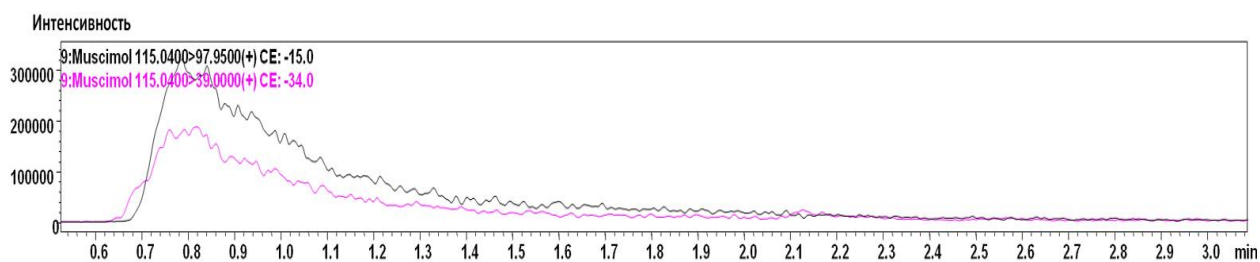


Рисунок 47 – Хроматограмма экстракта из образца мочи на колонке Shim-pack FC-ODS (щелочное извлечение)

Полученные результаты (Рисунок 46, Рисунок 47) позволяют сделать выводы, что пробоподготовка мочи методикой жидкостно-жидкостной экстракции только при щелочных значениях pH позволяет выделить

мусцимол так как в его структурной формуле присутствует основной центр.

Однако из-за слабого удерживания полярного соединения в данных условиях хроматографирования происходит размывание хроматографической зоны. Иботеновая кислота не была обнаружена данным методом в силу ее низких концентраций в биологической жидкости (декарбоксилирование до мусцимола) и высокой полярности.

Данную проблему размывание хроматографической зоны позволяет решить метод дериватизации дансилхлоридом.

#### *Методика 4*

Пробоподготовка с дериватизацией: к 1 мл пробы мочи добавляли 500 мкл воды, 500 мкл 5% карбоната натрия и 300 мкл 30 мМ дансилхлорида в ацетоне, тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин 60°C, охлаждали 10 мин при комнатной температуре и останавливали процесс дериватизации добавлением 10 мкл концентрированной серной кислоты. Прибавляли 2 мл дихлорметана, тщательно перемешивали 10 мин на мультиротаторе MultiBioRS-24 и центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), отбирали дозатором нижний слой и выпаривали до сухого остатка, растворяли в 500 мкл фазы А, и вводили в инжектор хроматографа.

Проводили детектирование в методах MRM (Multiple Reaction Monitoring) и Product Ion Scan. Хроматограммы дериватов иботеновой кислоты и мусцимола (Рисунок 48 и Рисунок 49), полученные при исследовании в данной хроматографической системе отвечали критериям пригодности хроматографической системы.

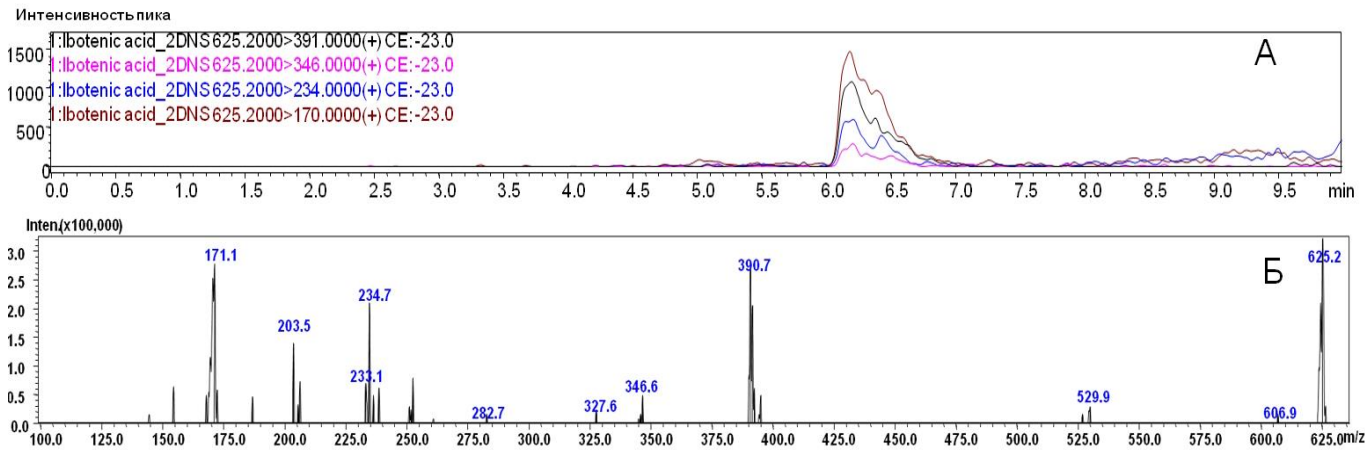


Рисунок 48 – Хроматограмма в методе MRM (А) и спектр ионов-продуктов деривата иботеновой кислоты (Б) в методе Product Ion Scan. Энергия соударения (CE) – 23

На хроматограмме из образца мочи (Рисунок 48) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с RT около 6,25 мин, полученный в методе MRM. В методе Product Ion Scan получен спектр ионов-продуктов деривата иботеновой кислоты с массами, образующимися при фрагментации аналита: 170, 234, 346, 391 m/z.

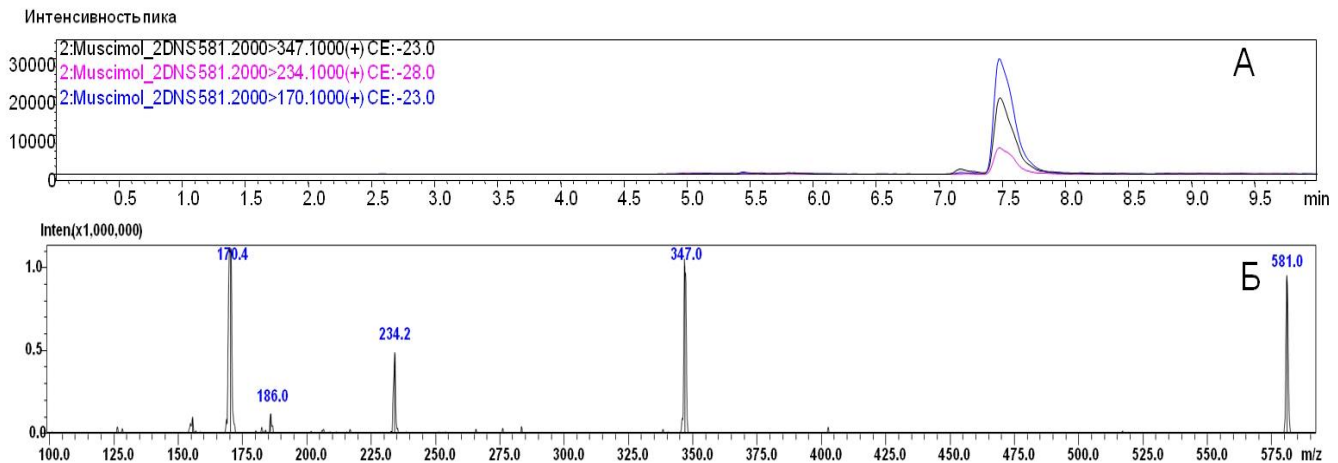


Рисунок 49 – Хроматограмма в методе MRM (А) и спектр ионов-продуктов деривата мусцимола в методе Product Ion Scan (Б). Энергия соударения (CE) – 23

На хроматограмме из образца мочи (Рисунок 50) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с RT около 7,5, полученный в методе MRM с массами, образующимися при фрагментации

аналита: 170, 234, 347 m/z (Product Ion Scan).

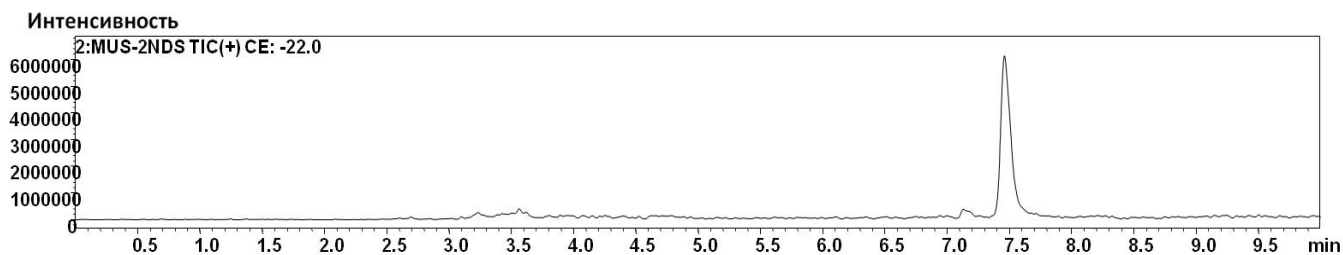


Рисунок 50 – Хроматограмма деривата мусцимола в методе Product Ion Scan

На хроматограмме из образца мочи (Рисунок 50) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с RT около 7,5 мин, полученный в методе Product Ion Scan со спектром ион-продуктов (Рисунок 47 Б).

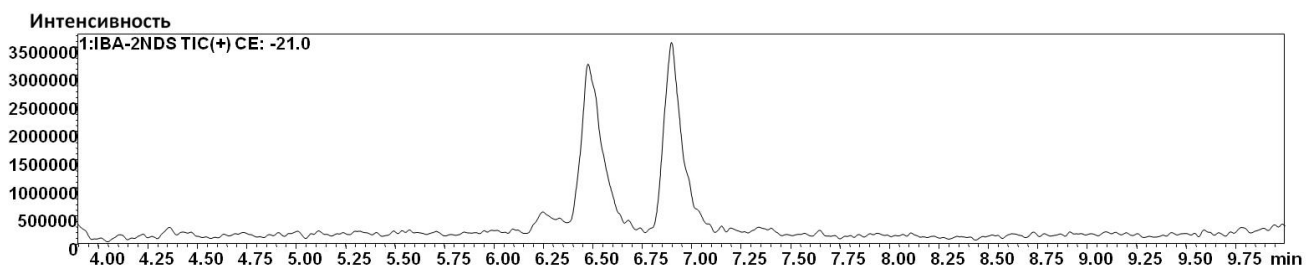


Рисунок 51 – Хроматограмма деривата иботеновой кислоты в методе Product Ion Scan

На хроматограмме из образца мочи (Рисунок 51) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с RT около 6,5 мин и предположительно присутствует изомер иботеновой кислоты с RT около 6,8, поскольку в ее структурной формуле имеется хиральный центр (Рисунок 52).

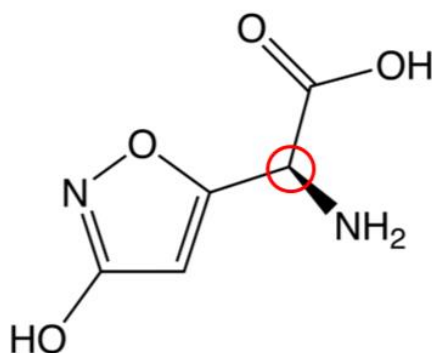


Рисунок 52 – Хиральный центр в структуре иботеновой кислоты

Химическая стабильность мусцимола в образце мочи при хранении при температуре 2 - 4°C составила около 1 года. Иботеновая кислота была обнаружена в моче не у всех пациентов, что объясняется ее быстрым декарбоксилированием до мусцимола в организме. Содержание иботеновой кислоты в образцах по параметру площади пика достоверно снижалось с течением времени. Наличие мусцимола и иботеновой кислоты подтверждалось в образцах мочи после пробоподготовки, хранившихся при температуре 2 - 4°C, в течение 24 ч.

#### 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 и капсул, оценивали по возможности определения токсиканта в присутствии других компонентов биологической матрицы, специфичность определяли по характерному времени удерживания при определенных условиях хроматографирования и характеристическим массам. Для оценки интерференционного матричного эффекта проводили холостую пробу («бланк») (Рисунок 53).

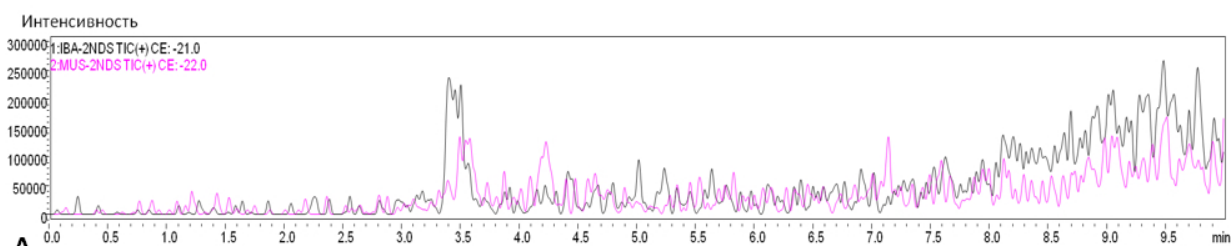


Рисунок 53 – Хроматограммы холостой пробы мочи после выполнения дериватизации

В соответствии с рекомендациями USP <621> (Хроматография), ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография, ЕР 2.2.46 (Хроматографические методы) проводили определение пригодности хроматографической системы по показателям: сигнал/шум, время удерживания, эффективность, асимметрия, высота, эквивалентная теоретической тарелке, специфичность,

селективность, интерференционный эффект матрицы, робастность.  
Результаты представлены в Таблицах 15-18.

Таблица 15 – Результаты определения пригодности хроматографической системы для обнаружения мусцимола и иботеновой кислоты в моче после дериватизации дансилхлоридом в методе MRM

Вещество, пациент	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	NETP	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
1 Мусцимол-2DNS	7.5	Переходы: 581,2000>170,100 0: 322734; 581,2000>234,100 0: 71004; 581,2000>347,100 0: 216455	Переходы: Переходы: 581,2000>170,100 0: 2.201; 581,2000>234,100 0: 2.238; 581,2000>347,100 0: 2.211	Переходы: 581,2000>170,100 0: 9991; 581,2000>234,100 0: 9994; 581,2000>347,100 0: 9335	Переходы: 581,2000>170,100 0: 1.001; 581,2000>234,100 0: 1.001; 581,2000>347,100 0: 1.071	Переходы: 581,2000>170,100 0: 90.39; 581,2000>234,100 0: 35.27; 581,2000>347,100 0: 23.51	Переходы: 581,2000>170,100 0: 0.169; 581,2000>234,100 0: 0.177; 581,2000>347,100 0: 0.166	Переходы: 581,2000>170,100 0: 0.372; 581,2000>234,100 0: 0.354; 581,2000>347,100 0: 0.396
Иботеновая- 2DNS	≈6,25	625,2000>391,000 0: 124993; 625,2000>346,000 0: 37722; 625,2000>234,000 0: 61746;	625,2000>391,000 0: 2.200; 625,2000>346,000 0: 2.238; 625,2000>234,000 0: Пик размыт; 625,2000>170,000 0: : Пик размыт	625,2000>391,000 0: 4685; 625,2000>346,000 0: 6768; 625,2000>234,000 0: 8481;	625,2000>391,000 0: 2.135; 625,2000>346,000 0: 1.478; 625,2000>234,000 0: 1.179;	625,2000>391,000 0: 8.59; 625,2000>346,000 0: 4.11; 625,2000>234,000 0: 5.27; 625,2000>170,000	625,2000>391,000 0: Пик размыт; 625,2000>346,000 0: 0.187; 625,2000>234,000 0: 0.157;	625,2000>391,000 0: Пик размыт; 625,2000>346,000 0: Пик размыт; 625,2000>234,000 0: Пик размыт;

		625,2000>170,000 0: 177662		625,2000>170,000 0: 6454	625,2000>170,000 0: 1.549	0: 7.65	625,2000>170,000 0: 0.184	625,2000>170,000 0: Пик размыт
			<b>Tailing F. средн. =</b> Муцимол2DNS (2,217); Иботеновая 2DNS (2,219)	<b>NTP средн. =</b> Муцимол2DNS (9773); Иботеновая 2DNS (6597)	<b>NETP средн. =</b> Муцимол2DNS (1,024); Иботеновая 2DNS (1,585)	<b>S/N средн =</b> Муцимол2DNS (49,72); Иботеновая 2DNS (6,41)		

Таблица 16 – Результаты определения пригодности хроматографической системы для обнаружения мусцимола и иботеновой кислоты в моче после дериватизации дансилхлоридом в методе Product ion scan

Вещество	RT, мин	Площадь пика (A)	Tailing F.	NTP	НЕТР	S/N	Width 50% (ширина пика на половине высоты)	Width 5% (ширина пика на 5% высоты)
Мусцимол-2DNS	7.5	32023661	1.478	40782	0.245	13.27	0.084	0.191
Иботеновая-2DNS	6.5	19131607	1.574	26480	0.378	3,01	0.100	0.240

Таблица 17 – Результаты определения пригодности хроматографической системы согласно требованиям НД для метода MRM, оценка интерференционного эффекта матрицы и робастности

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД [115, 116, 117, 118].
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 18 – Результаты определения пригодности хроматографической

системы согласно требованиям НД для метода Product Ion Scan, оценка  
интерференционного эффекта матрицы и робастности

Показатель	Полученные значения	Требования согласно НД [115, 116, 117, 118].
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.	

Полученные данные показывают (Таблица 15 и Таблица 16), что для определения дериватов иботеновой кислоты и мусцимола предложенные

условия пригодны, наблюдается показатель эффективности, удовлетворяющий критерию приемлемости (NTP средн. Мусцимола-2DNS (9773); Иботеновой кислоты-2DNS (6597)). Параметр отношения сигнал/шум > 3, время удерживания: мусцимол (7,5), иботеновая (6,25), показатели ВЭТТ находятся в пределах < 2.5.

Полученные данные показывают (Таблица 17), что для определения дериватов иботеновой кислоты и мусцимола эти условия пригодны, наблюдается показатель эффективности, удовлетворяющий критерию приемлемости (NTP Мусцимола-2DNS (40782); Иботеновой кислоты-2DNS (26480)). Параметр отношения сигнал/шум > 3, время удерживания: мусцимол (7,5), иботеновая (6,5), показатели ВЭТТ находятся в пределах < 2.5.

#### **4.2 Изучение пригодности метода ГХ-МС для лабораторной диагностики интоксикаций АМ и АР**

В отсутствие ВЭЖХ-МС/МС, метод ГХ-МС может быть альтернативным методом диагностики острых пероральных отравлений мухоморами. Метод ГХ-МС обладает рядом преимуществ: высокая чувствительность и низкие пределы обнаружения, селективность и достоверная идентификация, что определяется наличием библиотек спектров. В нашей работе была использована библиотека масс-спектров NIST17.

##### *Методика 1*

Пробоподготовка, образец мочи (5 мл) помещали в пробирку, содержащую натрия хлорид (2 г), добавляли кристаллический карбонат натрия до pH=9-10 и экстрагировали смесью дихлорметан: дихлорэтан; изопропанол: гептан (2:2:2:1) в мультиротаторе 5 мин со скоростью 50 об/минуту. Затем центрифугировали смесь 5 мин при 3000 об/мин, верхний органический слой отделяли и выпаривали при температуре 45°C в потоке воздуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл этилацетата и исследовали методом ГХ-МС. После исследования к пробе добавляли 30 мкл BSTFA, 1% TMS (смесь реагента для силилирования N,O-

бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA) и каталитического количества триметилхлорсилана (TMS) в соотношении 99:1). Помещали в термостат на 20 мин при температуре 60°C и повторно вводили в газовый хроматограф с масс-селективным детектором.

После дериватизации на хроматограмме присутствовали фоновые пики матрицы мочи значительной интенсивности, что не позволяет провести достоверную идентификацию токсикантов (показатель сигнал/шум <3) (Рисунок 54).

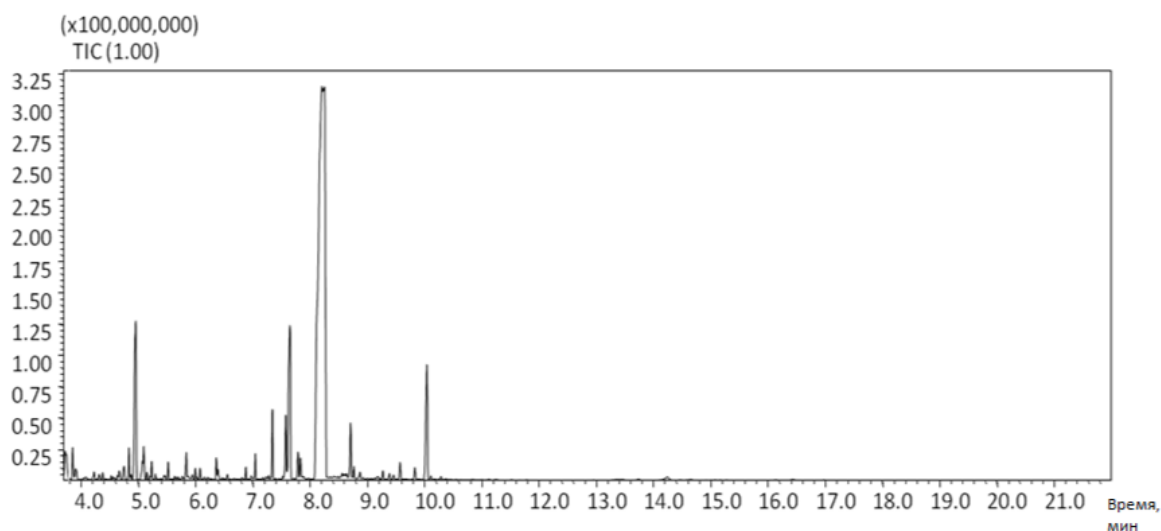


Рисунок 54 – Хроматограмма холостой пробы матрицы мочи

### *Методика 2*

Пробоподготовка методом ТФЭ на патронах Oasis HLB выполняли по следующей методике: патрон промывали 1 мл метанола и 1 мл воды очищенной со скоростью 1 м/мин. Через патрон пропускали 1 мл образца мочи со скоростью 0,5 мл/мин. Промывку патрона от балластных веществ проводили 1 мл этилацетата. Вещества с сорбента патрона элюировали 1 мл метанола, элюат выпаривали досуха, сухой остаток растворяли в 500 мкл этилацетата, к пробе добавляли 30 мкл (BSTFA, 1%TMS). Помещали в термостат на 20 мин при температуре 60°C и вводили в газовый хроматограф с масс-селективным детектором.

На рисунке отмечается пик мусцимола (время удерживания около 8,8 мин), идентифицированный по масс-спектру, сходимость с библиотекой

спектров более 80% (Рисунок 55 и Рисунок 56).

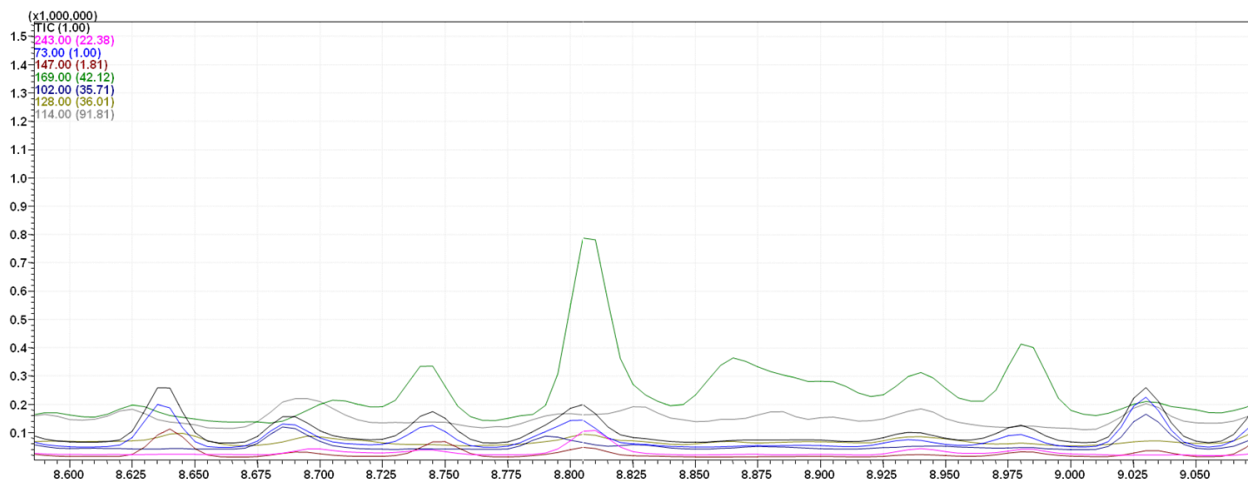


Рисунок 55 – Хроматограмма мусцимола, полученная методом ГХ-МС

Similarity Search Results

Report View Compound Info Process Help

Hit#	Simila	Regi	Ret.	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	83	<input type="checkbox"/>	960	1-(2-Methoxyethoxy)-2-methyl-2-propanol, m	162	C8H18O3	NIST17.lib
2	81	<input checked="" type="checkbox"/>	1361	Muscimol, 2TMS derivative	258	C10H22N2O2	NIST17.lib
3	80	<input type="checkbox"/>	1007	Acetamidoacetaldehyde	101	C4H7NO2	NIST17.lib
4	80	<input type="checkbox"/>	942	(SS)- or (RR)-2,3-hexanediol	118	C6H14O2	NIST17.lib
5	80	<input type="checkbox"/>	942	RS-2,3-hexanediol	118	C6H14O2	NIST17.lib
6	80	<input type="checkbox"/>	734	Isoxazolidine	73	C3H7NO	NIST17.lib
7	80	<input type="checkbox"/>	1141	DL-4,5-Octanediol	146	C8H18O2	NIST17.lib
8	80	<input type="checkbox"/>	0	Boronic acid, ethyl-, dimethyl ester	102	C4H11BO2	NIST17.lib
9	80	<input type="checkbox"/>	0	Boronic acid, ethyl-, dimethyl ester	102	C4H11BO2	NIST17.lib
10	80	<input type="checkbox"/>	729	Propanamide	73	C3H7NO	NIST17.lib
11	79	<input type="checkbox"/>	745	2-Butanone, 3-methoxy-3-methyl-	116	C6H12O2	NIST17.lib
12	79	<input type="checkbox"/>	0	Borane, dimethoxy-	74	C2H7BO2	NIST17.lib
13	79	<input type="checkbox"/>	706	N-Ethylformamide	73	C3H7NO	NIST17.lib

Рисунок 56 – Сходимость масс-спектрограммы мусцимола с библиотекой спектров

Таким образом, с помощью метода ГХ-МС в отсутствии ВЭЖХ-МС/МС возможно проведение лабораторной диагностики острого перорального отравления мухомором красным и мухомором пантерным, но только на основании пика мусцимола (со временем удерживания около 8,8 мин) со сходимость с библиотекой спектров NIST17 более 80%.

### 4.3 Изучение возможности определения токсикантов в других биообъектах

#### 4.3.1 Исследование крови на токсичные компоненты мухоморов

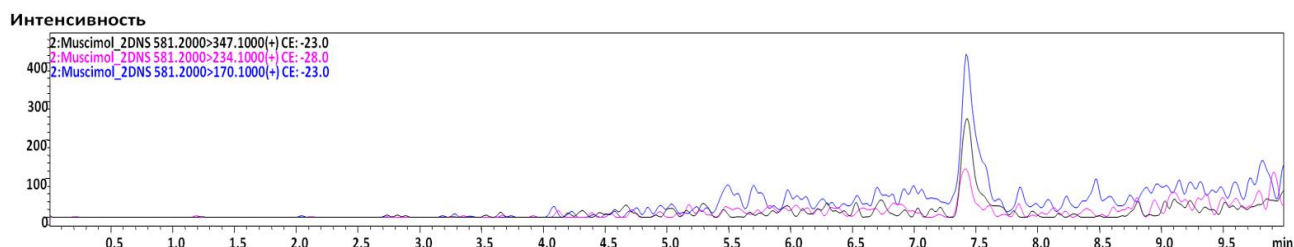
Разработанные методики пробоподготовки и анализа мочи были использованы для крови, поскольку Приказом Министерства здравоохранения российской федерации от 29 апреля 2025 Г. N 262н «Об утверждении порядка проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), включающего определение клинических признаков опьянения и правила химико-токсикологических исследований, а также критерии, при наличии которых имеются достаточные основания полагать, что лицо находится в состоянии опьянения и подлежит направлению на медицинское освидетельствование, учетной формы акта медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), а также формы и порядка ведения журнала регистрации медицинских освидетельствований на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» предписывается проводить лабораторную диагностику с использованием и данной биожидкости.

*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 в центрифужную пробирку, добавляли 500 мкл воды, 500 мкл 5% карбоната натрия и 300 мкл 30 mM дансилхлорида в ацетоне, тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин 60°C, охлаждали 10 мин при комнатной температуре и останавливали процесс дериватизации добавлением 10 мкл концентрированной серной кислоты. Прибавляли 2 мл дихлорметана, тщательно перемешивали 10 мин на мультиротаторе MultiBioRS-24 и

центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), отбирали дозатором нижний слой и выпаривали до сухого остатка, растворяли в 500 мкл фазы А, и вводили в инжектор хроматографа. Проводили детектирование в методах MRM (Multiple Reaction Monitoring).

А



Б

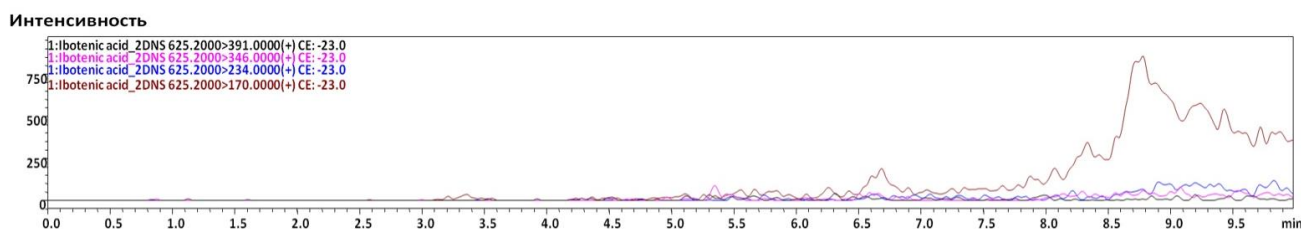


Рисунок 57 – Хроматограммы дериватизированных образцов крови (метод MRM): мусцимол (А); иботеновая кислота (Б). Энергия соударения (CE) – 23

На хроматограмме из образца крови (Рисунок 57) при использовании приема дериватизации дансилхлоридом отмечается пик с RT около 7,5 мин, полученный в методе MRM, однако при анализе крови не удалось обнаружить иботеновую кислоту.

#### 4.3.2 Исследование волос на токсичные компоненты мухоморов

Альтернативным объектом, который может быть использован для проведения лабораторной диагностики являются волосы.

Пробоподготовка для волос: к навеске 0,35 г промытого и измельченного образца волос добавляли 4 мл химопсина в фосфатного буфере, рН=7,4, встряхивали, термостатировали 3 ч при 37°C, по истечении 3-х часов 10 минут центрифугировали при 2000 об./мин, отбирали верхний слой. К волосам снова добавляли 3 мл раствора фермента в фосфатном буфере, встряхивали и термостатировали 3 ч при 37°C [121, 122, 123],

центрифугировали при 2000 об./мин, отбирали верхний слой. Добавляли ацетонитрил в соотношении 1:0,5, перемешивали 15 мин на мультиротаторе, замораживали при - 18°C 25 мин, затем отбирали верхний слой, извлечения объединяли, проводили дерватизацию дансилхлоридом по ранее описанной методике (*методика 1*).

Данный результат полностью согласуется с проведенными ранее исследованиями по особенностям и закономерностям накопления токсикантов с различными физико-химическими свойствами, в которых было показано, что высокополярные и высокогидрофильные вещества накапливаются в ткани волос в незначительных концентрациях или не накапливаются совсем [122, 123].

Экспериментально установлено, что исследование крови и волос не обеспечивает достоверной детекции токсинов из-за их быстрой элиминации и отсутствия накопления мусцимола и иботеновой кислоты в матрице волос. Наиболее информативным биологическим материалом для подтверждения интоксикации является моча, где мусцимол, иботеновая кислота сохраняются в определяемых концентрациях дольше. Как гидрофильные соединения они, по всей видимости, имеют высокие показатели почечной экскрецией и могут быть обнаружены в моче уже через час после употребления [93].

Исследование мочи методом ГХ-МС с предварительной ТФЭ на патронах Oasis HLB позволило идентифицировать только мусцимол (Рисунок ), сходимость с библиотекой спектров более 80% (Рисунок 56).

#### **4.4 Апробация методик и разработка алгоритма лабораторной диагностики отравлений мухоморами**

Диагноз отравления красным и пантерным мухомором может быть установлен на основании наличия иботеновой кислоты и мусцимола в моче уже через час после перорального приема, поэтому объектом исследования была моча пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе» с диагнозом «Острое пероральное отравление

мухоморами» (на основании анамнеза и клинической картины) [93].

В Таблице 6 приведены результаты анкетирования пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И. И. Джанелидзе». Далее приводится более подробная информация по некоторым случаям. Опрос проводился анонимно, добровольно с соблюдением требований биоэтики. Описаны следующие клинические случаи (Приложение):

Гр. М. 38, лет, диагноз токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных грибах. Острая респираторная недостаточность токсическая энцефалопатия. Поступил в ОРИТ, состояние тяжелое. Сознание кома 1. Со слов больного/родственников сообщает о том, что с подросткового возраста употребляет наркотические вещества и на протяжении нескольких лет периодически принимает высушенное сырье мухомора с целью повышения настроения, улучшения работоспособности, иногда для появления галлюцинаций. Сообщает о том, что через интернет приобретает ингредиенты и дозу рассчитывает с учетом своего личного опыта. В настоящее время отравление связывает с тем, что «мухоморы были низкого качества». В беседе фиксирован на употреблении мухоморов: «мне их очень нравится принимать, я опытный человек, получаю после употребления удовольствие, у меня лучше получается принимать решения, улучшается работа мозг». Критика к состоянию уступчивая. Планы на будущее: сообщает о том, что «будет соблюдать трезвый образ жизни». При химико-токсикологическом исследовании в биосредах обнаружен(ы): в моче обнаружен метаболит псилоцибина: псилоцин, мусцимол (Рисунок 58).

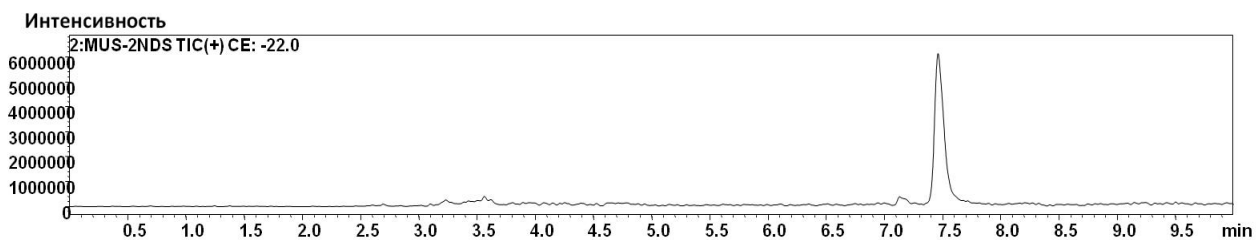


Рисунок 58 – Хроматограмма деривата мусцимола (из образца мочи) в методе

## Product Ion Scan

Пациент М., 46 лет, поступил в ОРИТ, Т62.0 диагноз: токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных грибах, токсическая энцефалопатия. Из анамнеза: лечится самостоятельно мухоморами (в качестве обезболивающего). В день отравления около 7 утра принял сухие мухоморы, жена не смогла разбудить, вызвала СМП. Состояние тяжелое. Уровень сознания (баллы) кома 1 7-8 баллов по ШКГ. При химико-токсикологическом исследовании в биосредах обнаружен(ы): в моче обнаружен мусцимол (Рисунок 59).

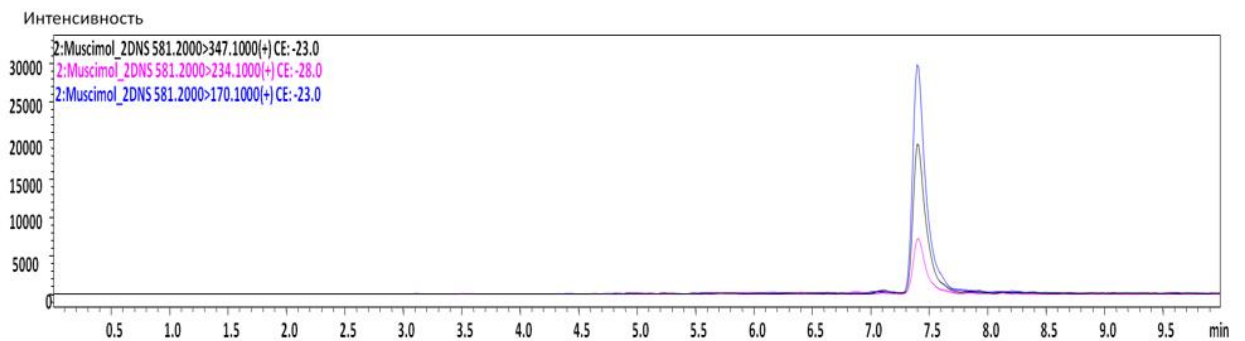


Рисунок 59 – Хроматограмма в методе MRM мусцимола (из образца мочи). Энергия соударения (CE) – 23

На основании полученных результатов по разработке частных методик обнаружения токсикантов мухомора красного и мухомора пантерного в биологических объектах предложен алгоритм проведения лабораторной диагностики на факт употребления данных грибов (Рисунок 60).

Основные этапы проведение лабораторной диагностики мочи при отравлении мухоморами:

1. Предварительный иммунохроматографический анализ на психоактивные вещества, их метаболиты;
  - 1.1 При отрицательном результате предварительного этапа исследования мочи делается заключение об отсутствии в пробе иных веществ, вызывающих опьянение помимо токсинов мухомора.
  - 1.2 На основании анамнеза и клинической картины биологический объект

(моча) направляются для проведения исследований методами ГХ-МС (ВЭЖХ-МС/МС).

2. Преаналитический этап: проведение пробоподготовки мочи методом дериватизации дансилхлоридом (при исследовании методом ВЭЖХ-МС/МС) или ТФЭ на патронах Oasis HLB с последующей дериватизацией BSTFA, 1% TMS (исследование на ГХ-МС)

3. Аналитический этап.

3.1. Исследование методом ГХ-МС – обнаружение в пробе биологического объекта (мочи) только мусцимола.

3.2. Исследование методом ВЭЖХ-МС/МС – обнаружение в пробе биологического объекта (мочи) иботеновой кислоты и мусцимола (Рисунок 60).

4. Оформление результатов.

4.1. Обнаружение токсикантов мухомора, в т.ч. совместно с наркотическими средствами или психотропными веществами, указывает на острое пероральное отравление мухоморами.

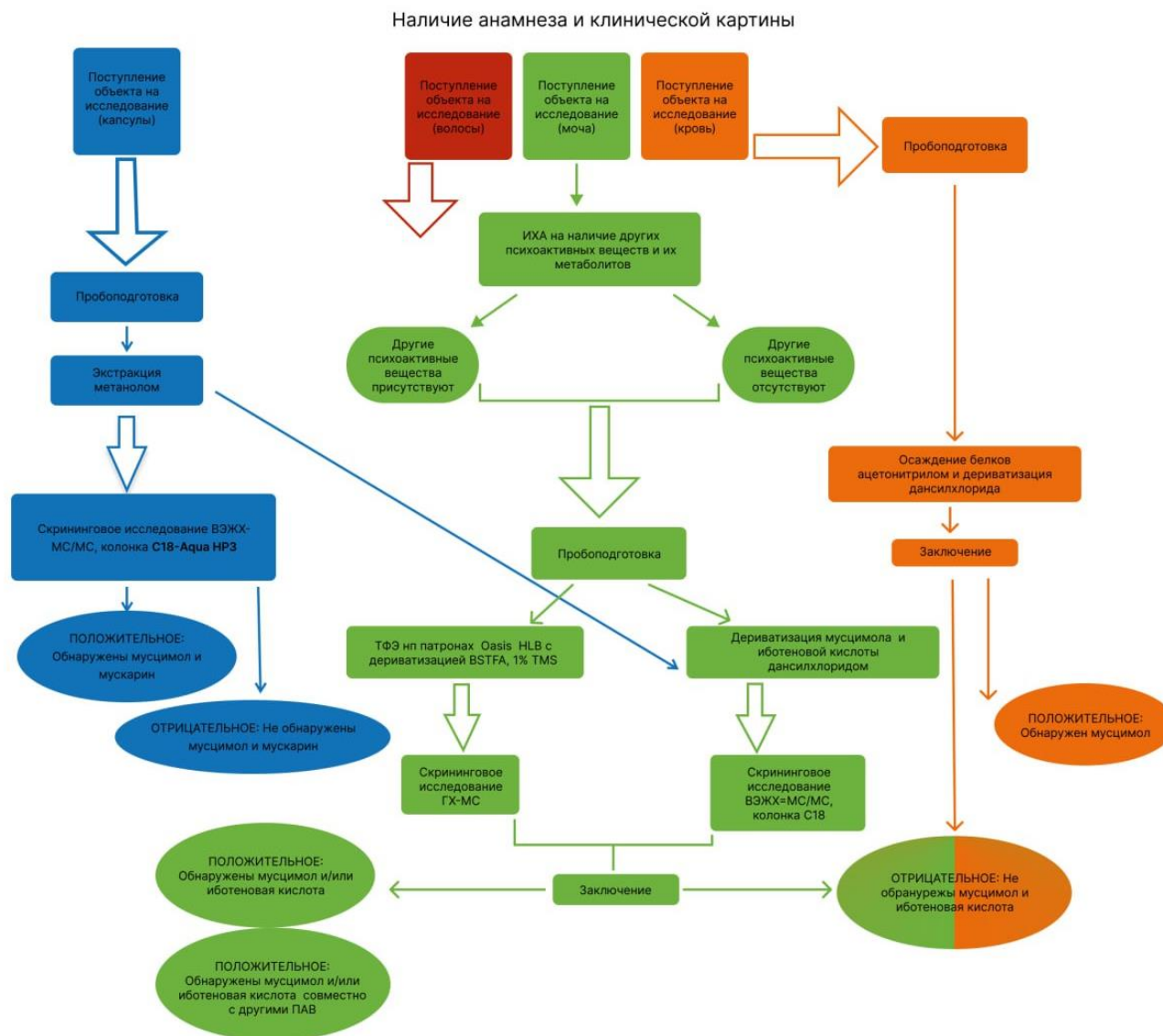


Рисунок 60 – Алгоритм лабораторной диагностики острых отравлений мухоморами

## ВЫВОДЫ ПО 4 ГЛАВЕ

1. Исследования мочи с методикой дериватизации дансилхлоридом показали существенное улучшение параметров удерживания токсических компонентов, высокую чувствительности и возможность идентификации дериватов мусцимола и иботеновой кислоты (Таблица 16 и Таблица 17). По показателям сигнал/шум, время удерживания, эффективность методика удовлетворяет критериям приемлемости.

2. С помощью метода ГХ-МС с пробоподготовкой ТФЭ на патронах Oasis HLB в отсутствие ВЭЖХ-МС/МС возможно проведение лабораторной диагностики острого перорального отравления мухомором красным и мухомором пантерным, но только на основании пика мусцимола и сходимости с библиотекой спектров более 80%.

3. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что анализ мочи методом жидкостно-жидкостной экстракции только при щелочных значениях рН позволяет определить мусцимол (время удерживания 0,8 мин), так как в его структурной формуле присутствует основной центр, однако мусцимол выходит в «мертвое время» колонки C18, данный метод не может использоваться для дальнейшего определения токсиканта. Поэтому для получения удовлетворительных хроматографических параметров анализа целевых токсикантов необходимым является применение дериватизации.

4. Экспериментально установлено, что исследование крови обеспечивает обнаружение только мусцимола после выполнения дериватизации. Волосы как объект исследования не обеспечивают достоверной детекции токсинов из-за их быстрой элиминации и низкого накопления в матрице. Наиболее информативным биологическим объектом для подтверждения интоксикации является моча.

5. Предложен алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики острых отравлений мухоморами, который был внедрен в практику работы химико-токсикологических лабораторий НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе и химико-токсикологических лабораторий

Городского бюджетного учреждения здравоохранения Санкт-Петербурга  
Городская наркологическая больница.

## 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 × 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feeney, K. On microdosing with the Mario mushroom / K. Feeney // *Journal of Psychedelic Studies*. – 2023. № 7(2). – P. 151-154.
2. Lee, M.R. Amanita muscaria (fly agaric): From a shamanistic hallucinogen to the search for acetylcholine / M.R. Lee, E. Dukan, I. Milne // *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. – 2018. – № 48(1). – P. 85-91.
3. Батьянова, Е.П. Мухомор в быту, верованиях, обрядах, искусстве народов Севера / Е.П. Батьянова, М.М. Бронштейн // *Сибирские исторические исследования*. – 2016. – № 1. – С. 46-58.
4. Верещака, Е.А. Традиция использования красного мухомора (По этнографическим материалам чукчей, коряков, ительменов) / Е. А. Верещака // *Сибирский сборник*. – 2014. – № 4. – С. 326-339.
5. Leas, E.C. Need for a Public Health Response to the Unregulated Sales of Amanita muscaria Mushrooms / E.C. Leas, N. Satybaldiyeva, W. Kepner, K.H. Yang, R.M. Harati, J. Corroon, M. Rouffet // *American journal of preventive medicine*. – № 67(3). – 2024. – P. 458–463.
6. Carboué, Q. Amanita muscaria: ecology, chemistry, myths / Q. Carboué, M. Lopez // *Encyclopedia*. – 2021. – Т. 1. – № 3. – P. 905-914.
7. Turkia, M. Psycholytic Dosing or «microdosing» of Amanita Muscaria (red Fly Agaric) Mushrooms — a Retrospective Case Study / M. Turkia // *PsyArXiv*. – November 7. – 2023.
8. Patocka, J. Pharmacologically and toxicologically relevant components of Amanita muscaria / J. Patocka, B. Kocandrlova // *Mil. Med. Sci. Lett*. – 2017. – № 86. – P. 122-134.
9. Yin, X. Mushroom toxins: chemistry and toxicology / X. Yin, A.A. Yang, J.M. Gao // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2019. – № 67(18) – P. 5053-5071.
10. Persson, H. Mushrooms / H. Persson // *Medicine*. – 2016. – № 44(2) – P. 116-119.
11. Козырь, А.Ю. Вред или польза микродозинга мухомора красного

- (*Amanita muscaria*) / А.Ю. Козырь, М.В. Баранов // Интеллектуальный потенциал России 2024: сборник статей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (28 ноября 2024 г., г. Новосибирск). В 2 ч. Ч. 2/-Уфа. – 2024. – С. 16.
12. Rampolli, F.I. The deceptive mushroom: accidental *Amanita muscaria* poisoning / F.I. Rampolli, P. Kamler, C.C. Carlino, F. Bedussi // *European journal of case reports in internal medicine*. – 2021. – № 8(2) – P. 116-119
  13. Кичигина, В.Ф. Воздействия на гамкергическую систему медиальной септальной области модулируют судорожные разряды в гиппокампе / В.Ф. Кичигина, В.В. Судницын, А.Г. Брагин // *Фундаментальные исследования*. – 2005. – № 2. – С. 21-24.
  14. Кураликов, Д.В. Влияние микродозинга мухомора красного на пациентов, страдающих посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР) / Д.В. Кураликов, В.В. Гарбузов // *Студенческий научный форум 2022*. – 2022. – С. 238-241.
  15. Гарбузов, В.В. Влияние микродозинга мухомора красного на пациентов, страдающих генерализованным тревожным расстройством (ГТР) / В.В. Гарбузов, Д.В. Кураликов // *Студенческий научный форум 2022*. – 2022. – С. 242-245.
  16. Вишняков, М.В., Ядовитые грибы России / М.В. Вишняков // М.: Проспект, 2024. – 448 с.
  17. Hughes, J. Towards a dynamic processual model of psychedelic microdosing / J. Hughes, J. Stuart-Bennett, M. Dunning, H. Farrimond // *International Journal of Drug Policy*. – 2025. – № 136. – P. 104-691.
  18. Каурак, А.С. Macro dosing to micro dosing with psychedelics: Clinical, social, and cultural perspectives / А.С. Каурак, А. Raz // *Transcultural psychiatry*. – 2022. – № 59(5). – P. 665-674.
  19. Harlow, A.F. Psychedelic Microdosing among Young Adults from Southern California / A.F. Harlow, P.S. Hendricks, A.M. Leventhal, J.L. Barrington-Trimis // *Journal of psychoactive drugs*. – 2024. – № 57(2). – P. 181-192.

20. Ронжина, Н.А. Правовые проблемы регулирования оборота отдельных таксонов психоактивных грибов (на примере рода мухоморовых) / Н.А. Ронжина, В.М. Головкин, Я.И. Заварзин // Актуальные проблемы науки и техники. Инноватика. – 2022. – С. 30-34.
21. «Лесной кодекс Российской Федерации от 04.12.2006 N 200-ФЗ (ред. от 26.12.2024) (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2025).
22. Федеральный закон «О наркотических средствах и психотропных веществах» от 08.01.1998 N 3-ФЗ (последняя редакция).
23. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. N 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».
24. Постановлению Правительства РФ от 27 ноября 2010 г. N 934 «Об утверждении перечня растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры и подлежащих контролю в Российской Федерации, крупного и особо крупного размеров культивирования растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры, для целей статьи 231 Уголовного кодекса Российской Федерации, а также об изменении и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации по вопросу оборота растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры»
25. Постановлением Правительства РФ от 31 декабря 2009 г. N 1186 «О внесении изменений в некоторые постановления Правительства Российской Федерации по вопросам, связанным с оборотом наркотических средств».
26. Amanita Muscaria—Legal Status. ICEERS. Available [Электронный ресурс]. URL: <https://www.psychplants.org/index.php/home-2/amanita-muscaria-2/>
27. Shapovalova, V. Pharmacognostic, forensic and pharmaceutical,

- organizational and legal, clinical and pharmacological multidisciplinary study with an assessment of peculiarities of circulation (use) of smoking mixtures of spices and entheogens of *amanita muscaria* mushroom / V. Shapovalova, A. Osyntseva., V. Shapovalov [et al.] // SSP Modern Pharmacy and Medicine. – 2023. – Т. 3. – №. 3. – P. 1-13.
28. Li, C. The most widely recognized mushroom: chemistry of the genus *Amanita* / C. Li, N. H. Oberlies // Life sciences. – 2005. – № 78(5). – P. 532–538.
29. Voynova, M. Toxicological and pharmacological profile of *Amanita muscaria* (L.) Lam.–a new rising opportunity for biomedicine / M. Voynova, A. Shkondrov, M. Kondeva-Burdina & I. Krasteva // Pharmacia – 2020 – № 67 – P. 3573–3581.
30. Фоминова, Ю.С. Ядовитые грибы рода *Amanita* на территории ЛНР / Ю.С. Фоминова // ВЕСТНИК. – 2022. – № 1. – С. 17.
31. Большаков, С.Ю. О ядовитых грибах Мордовии / С.Ю. Большаков // Мордовский заповедник. – 2012. – № 3(3). – С. 6-8.
32. 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.
33. Серебрякова, Н.В. Биология и экология *Amanita muscaria* (L.) Lam. 1783 (мухомор красный) В республике Башкортостан / Н.В. Серебрякова, М.В. Петрова // Научные исследования и инновации. – 2021. – № 5 – С.18-21.
34. Oda, T. *Amanita ibotengutake* sp. nov., a poisonous fungus from Japan / T. Oda, T. Yamazaki, C. Tanaka, T. Terashita, N. Taniguchi, M. Tsuda // Mycological Progress. – 2002. – №1 – P. 355-365.
35. Oda, T. Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pant henna* / T. Oda, C. Tanaka, M. Tsuda // Mycological Research. – 2004. – Т. 108. – №. 8. – P. 885-896.

36. Гаврюченков, Д.В. Массовые отравления грибами / Д.В. Гаврюченков, Е.Ю. Лемещенко // Медицинская сестра. – 2015. – №. 2. – С. 48-49.
37. Лузько, О.Н. Биологически активные вещества грибов / О.Н. Лузько // Б 63 Биологически активные соединения в жизни человека–2017: сб. материалов университетской студенческой науч.-практ. конф., Брест, 14 декабря 2017 г. / Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина; под общ. ред. НЮ Колбас.–Брест: БрГУ, 2018.–127 с. – С. 47.
38. Wieczorek, P.P. Bioactive alkaloids of hallucinogenic mushrooms / P.P. Wieczorek, D. Witkowska I. Jasicka-Misiak [et al.] // Studies in natural products chemistry. – 2015. – № 46. – С. 133-168
39. Медведева, К.А. Токсикология в действии: химические механизмы ядов / К.А. Медведева, А.А. Кузнецов // научные исследования и разработки 2024: сборник статей. – 2024. – С. 7.
40. Chilton, W.S. Toxic metabolites of *Amanita pantherina*, *A. cothurnata*, *A. muscaria* and other *Amanita* species / W.S. Chilton, J. Ott // *Lloydia*. – 1976. – № 39(2-3). – P. 150-157.
41. Vendramin, A. *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* poisoning: two syndromes / A. Vendramin, M. Brvar // *Toxicon*. – 2014. – № 90. – P. 269-272.
42. Obermaier, S. Ibotenic Acid Biosynthesis in the Fly Agaric Is Initiated by Glutamate Hydroxylation / S. Obermaier, M. Müller // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2020. – № 59(30). – P. 12432-12435.
43. Колотушкина, Е.В. Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности / Е.В. Колотушкина, М.Л. Ломберг, М.Г. Молдаван // Под ред. проф. С. П. Вассера.К., 2012. – 285 с. – С. 46.
44. Braeuer, S. Determination of the naturally occurring vanadium-complex amavadin in *Amanita muscaria* with HPLC-ICPMS./ S. Braeuer, M. Walenta, L. Steiner [et al.] // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2021. – № 36(5). – P. 954-967.
45. Hanć, A. Mercury and selenium in developing and mature fruiting bodies of

- Amanita muscaria* / A. Hanć, A. R. Fernandes, J. Falandysz [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – №. 28(42). – P. 60145-60153.
46. Хомченко, О.С. О содержании ртути в дикорастущих грибах (город Хабаровск И Хабаровский район) / О.С. Хомченко // *Региональные проблемы*. – 2023. – Т. 26. – №. 1. – С. 28-35.
47. Пчелкина, М.А. Визуальный экспресс-тест как способ полуколичественной оценки содержания тяжелых металлов в грибах / М.А. Пчелкина, А.В. Жевнеров // *Аграрная Наука-2022*. – 2022. – С. 574-577.
48. Stebelska, K. Fungal hallucinogens psilocin, ibotenic acid, and muscimol: analytical methods and biologic activities / K. Stebelska // *Ther Drug Monit*. – 2013. – №35 (4). – P. 420-442.
49. White, J. (2019). Mushroom poisoning: A proposed new clinical classification / J. White, S.A. Weinstein, L. De Haro, R. Bédry, A. Schaper, B.H. Rumack & T. Zilker // *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* – 2019. – № 157 – P. 53-65.
50. Jin, Z. Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids / Z. Jin // *Natural product reports*. - 2016. – № 33(11) – P. 1268-1317.
51. Kosentka, P. Evolution of the toxins muscarine and psilocybin in a family of mushroom-forming fungi // P. Kosentka, S.L. Sprague, M. Ryberg, J. Gartz, A.L. May, S.R. Campagna & P.B. Matheny // *PloS one*. – 2013. – № 8(5) – P. 1268-e6464.
52. Falk, S. Muscarinic receptors in energy homeostasis: Physiology and pharmacology / S. Falk, C. Lund & C. Clemmensen // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* – 2020. – №126 – P. 66–67.
53. Ishii, M. Muscarinic acetylcholine receptors / M. Ishii & Y. Kurachi, // *Current pharmaceutical design*. – 2006. – № 12(28) – P. 3573–3581.
54. Лопина, О.Д. Молекулярные механизмы регуляции секреции соляной кислоты слизистой оболочкой желудка / О.Д. Лопина, А.А. Котлобай,

- А.М. Рубцов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1997. – Т. 7. – №. 6. – С. 15-19.
55. Бабаджанова, Ф. Парасимпатическая нервная система и ее влияние на пищеварительную систему / Ф. Бабаджанова, Х. Камилова, С. Эркаева, & С. Равшанова, // in Library. – 2021. – №21(4) – P. 151–157.
56. Сафронова, Е.С. Холинергические лекарственные средства. М-холиномиметики (часть 1) / Е.С. Сафронова, С.А. Волков // Медицинские науки: вопросы теории и практики, сборник статей Международной научно-практической конференции. Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение» – 2020. – С. 44.
57. Шатохина, Ю.П. Влияние на человека и лабораторных животных токсинов мухоморов красного и пантерного (*Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*) / Ю.П. Шатохина, Н.В. Юдина // Роль аграрной науки в устойчивом развитии сельских территорий. – 2021. – С. 751-755.
58. Ковязина, И.В. Мускариновые холинорецепторы в скелетной мышце: локализация и функциональная роль/ И.В. Ковязина, А.А. Хамидуллина // Acta Naturae. – 2023. – Т. 15. – №. 4. – С. 44-55.
59. Hosey, M.M. Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors/ M.M. Hosey // The FASEB journal. – 1992. – Т. 6. – №. 3. – С. 845-852.
60. Rivera-Illanes, D. Classics in Chemical Neuroscience: Muscimol / D. Rivera-Illanes, G. Recabarren-Gajardo // ACS Chemical Neuroscience. – 2024. – № 15(18) – P. 3257-3269.
61. Johnston, G.A. Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist / G.A. Johnston // Neurochemical research– 2014 – № 39 – P. 1942–1947.
62. DeFeudis, F.V. Physiological and behavioral studies with muscimol / F.V. DeFeudis // Neurochemical research. – 1980. – № 5 – P. 1047-1068.
63. De Sena, M. The Use of Conformational Restriction in Medicinal Chemistry / M. de Sena, P. Pinheiro, D.A. Rodrigues, R. do Couto Maia, S. Thota & C.A.

- M. Fraga // *Current topics in medicinal chemistry* – 2019– №19(19) – P. 1712–1733.
64. Sallard, E. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors / E. Sallard, D. Letourneur & P. Legendre // *Cellular and molecular life sciences: CMLS* – 2021– № 78(13) – P. 5341–5370.
65. Krogsgaard-Larsen, P. Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds / P. Krogsgaard-Larsen, G. A. Johnston // *J. Neurochem* – 1978– № 30 – P. 1377–1382.
66. Okhovat, A. Psychoactive Isoxazoles, Muscimol, and Isoxazole Derivatives from the Amanita (Agaricomycetes) Species: Review of New Trends in Synthesis, Dosage, and Biological Properties / A. Okhovat, W. Cruces, M. L. Docampo-Palacios, K. P. Ray & G. A. Ramirez // *International journal of medicinal mushroom* – 2023– № 25(9) – P. 1–10.
67. Enz, R. GABA(C) receptors: a molecular view / R. Enz // *Biological chemistry* – 2001– № 328(8) – P. 1111–1122.
68. Sente, A. Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signaling / A. Sente, R. Desai, K. Naydenova, T. Malinauskas, Y. Jounaidi, J. Miehl, X. Zhou, S. Masiulis, S. W. Hardwick, D. Y. Chirgadze K. W. Miller, A. R. Aricescu // *Nature*. – 2022 – № 604 (7904) – P. 190–194.
69. Ghit, A. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders / A. Ghit, D. Assal, A. S. Al-Shami & D. E. E. Hussein // *Journal, genetic engineering & biotechnology* – 2021 – №19(1) – P. 123.
70. Россохин А.В. Структурная фармакология гамкарцепторов / А.В. Россохин, И.Н. Шаронова // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*– 2021 – №15(4) – С. 44-53.
71. Jembrek, M. J. GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls / M.J. Jembrek, & J. Vlajnic // *Current pharmaceutical design*, – 2015 – № 21(34) – P. 4943–4959.
72. Goldschen-Ohm, M.P. Benzodiazepine Modulation of GABAA Receptors: A

- Mechanistic Perspective / M.P. Goldschen-Ohm // *Biomolecules* – 2022 – №12(12) – P. 1784.
73. Семьянов, А.В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия / А.В. Семьянов // *Нейрофизиология*. – 2002. – Т. 34. – №. 1. – С. 82-92.
74. Bormann, J. The ‘ABC’ of GABA receptors/ J. Bormann // *Trends in pharmacological sciences*. – 2000. – Т. 21. – №. 1. – P. 16-19.
75. Johnston, G.A. R. Milestone review: GABA, from chemistry, conformations, ionotropic receptors, modulators, epilepsy, flavonoids, and stress to neuro-nutraceuticals/ G.A.R. Johnston., P.M. Beart // *Journal of Neurochemistry*. – 2024.
76. Issahaku, A.R. Elucidating the binding mechanisms of GABA and Muscimol as an avenue to discover novel GABA-mimetic small molecules / A.R. Issahaku, A. Wilhelm, M. Schutte-Smith, E. Erasmus & H. Visser // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* – 2024 – P. 1–16.
77. Walker, S.R. Corrigendum to: Introduction to the chemistry and pharmacology of psychedelic drugs / S.R. Walker, G.A. Pullella, M.J. Piggott, & P.J. Duggan // *Australian Journal of Chemistry* – 2024. – № 76( 5). – P. 236–257.
78. Johnston, G.A.R. Herbal Products and GABA Receptors / G.A.R. Johnston, M. Chebib, R.K. Duke, S.P. Fernandez, J.R. Hanrahan, T. Hinton, K.N. Mewett // *Encyclopedia of Neuroscience* – 2009. – P. 1095-1101.
79. Ramawad, H.A. Muscimol as a treatment for nerve injury-related neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies/ H.A. Ramawad, P. Paridari, S. Jabermoradi, P. Gharin, A. Toloui, S. Safari & M. Yousefifard // *The Korean journal of pain*, № 36(4). – 2023. – P. 425–440.
80. Watkins, J.C. The glutamate story / J.C. Watkins, D.E. Jane // *British journal of pharmacology*. – № 147(1). – 2006. – P. 100–108.
81. Bowie, D. The many faces of the AMPA-type ionotropic glutamate receptor /

- D. Bowie // *Neuropharmacology*. – № 208. – 2022. – P. 108975.
82. Давыдова, О.Н. Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем / О.Н. Давыдова, А.А. Болдырев // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – № 1(4). – 2007. – P. 28–34.
83. Попов, А.В. Каинатные рецепторы - ключ к пониманию синаптической пластичности, обучения и памяти (обзор) / А.В. Попов, Л.А. Кушнирёва, М.С. Доронин, J.M. Henley // *Соврем. технол. мед.* – № 4. – 2017. – С. 228–238.
84. Krogsgaard-Larsen, P. Naturally-occurring excitatory amino acids as neurotoxins and leads in drug design / P. Krogsgaard-Larsen, J.J. Hansen // *Toxicology letters*. – Vol. 64-65. – 1992. – P. 409–416.
85. Niswender, C.M. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease / C.M. Niswender, P.J. Conn // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – Vol. 50. – 2010. – P. 295–322.
86. Jørgensen, C.G. Synthesis and pharmacology of glutamate receptor ligands: new isothiazole analogues of ibotenic acid / C.G. Jørgensen, R.P. Clausen, K.B. Hansen, H. Bräuner-Osborne, B. Nielsen, B. Metzler, J. Kehler, P. Krogsgaard-Larsen, U. Madsen // *Organic & biomolecular chemistry*. – Vol. 5(3). – 2007. – P. 463–471.
87. Puil, E. Ibotenic acid: its excitatory and possibly sedative actions in cerebral cortex / E. Puil // *Can J Physiol Pharmacol*. – 1981. – № 59(9). – P. 1025-1030.
88. Гордеева, О.В. Психологические эффекты мухомора красного (*Amanita muscaria*) / О.В. Гордеева // *Сибирские исторические исследования*. – 2017. – № 2. – С. 152-183.
89. Nielsen, E.O. Excitatory amino acids: studies on the biochemical and chemical stability of ibotenic acid and related compounds. / E.O. Nielsen, A. Schousboe, S.H. Hansen, P. Krogsgaard-Larsen // *J Neurochem*. – 1985. – № 45(3). – P. 725-731.
90. Merova, B. Isolation and identification of the *Amanita muscaria* and *Amanita*

- pantherina toxins in human urine / В. Merova, P. Ondra, M. Stankova, I. Valka // *Neuro endocrinology letters*. – 2008. – № 29(5). – P. 744-748.
91. Майский, В.В. Фармакология с общей рецептурой / В.В. Майский, Р.Н. Аляутдин // учебное пособие.-3-е изд., доп. и перераб. – М. – 2012.
92. Митрохин, К.В. Классификация и краткое описание лекарственных препаратов—аналогов производных гамма-аминомасляной кислоты и токсических веществ, влияющих на ГАМК-ергическую связь / К.В. Митрохин, А.А. Баранишин // *Анестезиология и реаниматология*. – 2018. – Т. 63. – №. 6. – С. 22-30.
93. Michelot, D. Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology / D. Michelot, L.M. Melendez-Howell // *Mycological research*, . – 2003. – № 107(2) – P. 131-146.
94. Петров, А.Н. Судебно-медицинская диагностика отравлений ядовитыми грибами: Учебное пособие / А.Н. Петров, Р.В. Бабаханян, И.К. Журкович, М.К. Шевчук, Е.С. Бушуев // под общей ред. // СПб.: Издательство СПХФА. 2002. – С. 51.
95. Стоцкая, Д.Р. Яды растительного происхождения / Д.Р. Стоцкая, К.С. Стоцкий, И.З. Фазылов // *Наука через призму времени*. – 2019. – С. 6.
96. Mikaszewska-Sokolewicz, M.A., Coma in the course of severe poisoning after consumption of red fly agaric (*Amanita muscaria*) / M.A. Mikaszewska-Sokolewicz, S. Pankowska, M. Janiak, P. Pruszczyk, T. Łazowski, K.. Jankowski // *Acta Biochimica Polonica*. – 2016. – № 63(1). – P. 181-182.
97. Ткачева, О. Отравление грибами / О. Ткачева, В. Москвичев // *Медицинская газета*. – 2004. – №. 45.
98. Гаврюченков, Д.В., Массовые отравления грибами / Д.В. Гаврюченков, Е.Ю. Лемещенко // *Медицинская сестра*. – 2015. – №. 2. – С. 48-49.
99. Bédry, R. Intoxications graves par les champignons à l'exception du syndrome phalloïdien R. Bédry, P. Saviuc / // *Réanimation*. – 2002. – № 7(11). – P. 524-532.

100. Satora, L. Fly agaric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review / L. Satora, D. Pach, B. Butryn, P. Hydzik, B. Balicka-Slusarczyk // *Toxicol.* – № 45(7). – 2005. – P. 941–943.
101. Ивашов, П.В. Тяжелые металлы в макромицетах юга Дальнего Востока России / П.В. Ивашов // *Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН.* – 2012. – №. 2. – С. 96-99.
102. Jeffrey, B. Mushrooms / B. Jeffrey, B. Robert, Palmer // *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose.* – № 207. – P. 455-472.
103. Клинические рекомендации – Токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных грибах (не включены грибы психодислептики [галлюциногены]) – 2025-2026-2027 (10.07.2025) – Утверждены Минздравом РФ.
104. Приказ Министерства здравоохранения российской федерации от 29 Апреля 2025 Г. N 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, а также критерии, при наличии которых имеются достаточные основания полагать, что лицо находится в состоянии опьянения и подлежит направлению на медицинское освидетельствование, учетной формы акта медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), а также формы и порядка ведения журнала регистрации медицинских освидетельствований на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)».
105. Moss, M.J. Toxicity of muscimol and ibotenic acid containing mushrooms reported to a regional poison control center from 2002-2016 / M.J. Moss,

- R.G. Hendrickson // *Clinical toxicology* (Philadelphia, Pa.). – 2019. – № 57(2). – P. 99–103.
106. «Уголовный кодекс Российской Федерации» от 13.06.1996 N 63-ФЗ (ред. от 28.12.2024) (с изм. и доп., вступ. в силу с 08.01.2025)
107. Xu, X. Determination of ibotenic acid and muscimol in plasma by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with bimolecular dansylation / X.M. Xu, J.S. Zhang, B.F. Huang [et al.] // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2020. – №1146. – P. 122-128.
108. Hasegawa, K. Determination of ibotenic acid and muscimol, the Amanita mushroom toxins, in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / K. Hasegawa, K. Gonmori, H. Fujita [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2013. – № 31. – P. 322–327.
109. Stříbrný, J. GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with Amanita pantherina / J. Stříbrný, M. Sokol, B. Merová, P. Ondra // *International journal of legal medicine*. – 2012. – № 126(4). – P. 519–524.
110. Merová, B. Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric / B. Merová, P. Ondra, M. Staňková [et al.] // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2011. – № 879(25). – P. 2549–2553.
111. Ginterová, P. Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry / P. Ginterová, B. Sokolová, P. Ondra [et al.] // *Talanta*. – 2014. – №125. – P. 242–247.
112. Gonmori, K. Analysis of ibotenic acid and muscimol in Amanita mushrooms by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry / K. Gonmori, K. Hasegawa, H. Fujita [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2012. – №30. – P. 168–172.
113. Барсегян, С.С. Методические рекомендации по валидации

- аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала / С.С. Барсегян, Е.М. Саломатин, Т.В. Плетнева, Т.В. Максимова, А.О. Долинкин // М.: ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России. – 2014. – С. 74.
114. Приказ Минздрава России от 18.12.2015 N 933н (ред. от 25.03.2019) «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)».
115. United States Pharmacopeial Convention. (2023). General Chapter <621> Chromatography. In United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 46–NF 41). Rockville, MD: USP.
116. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. — М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023. — Т. 1. — С. 156–165. (ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»).
117. European Pharmacopoeia. 11th Edition. – Strasbourg: EDQM, 2023. – Vol. 1. – P. 150–165. (Chapter 2.2.46 «Chromatographic separation techniques»).
118. ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (2022)
119. 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. – 2026. – №28(6). – P. 46–52.
120. Ziegler, J. Analysis of amino acids by HPLC/electrospray negative ion tandem mass spectrometry using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl) derivatization / J. Ziegler, S. Abel // Amino Acids. – 2014 – Т. 46. – №. 12. – С. 2799-2808.
121. Константинова, П.С. Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ: дис. канд. фарм. наук / П.С. Константинова //

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. – СПб., 2025.

122. Стрелова О.Ю. Методологические подходы к пробоподготовке биологических объектов (кровь и волосы) ферментативным гидролизом для целей аналитической токсикологии: дис. доктора фарм. наук / О.Ю. Стрелова // Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. – СПб., 2020.
123. Слустовская, Ю.В. Изолирование лекарственных средств из волос с применением протеолитических ферментов для химико-токсикологических исследований: дис. канд. фарм. наук: 14.04.02 / Ю.В. Слустовская. СПб., 2018. – С. 185.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1**  
(результаты анкетирования)

Таблица 1 – Анкета для опроса пациентов, практикующих микродозинг

Вопросы пациенту	Ответы пациента, муж.	Ответы пациента, муж.	Ответы пациента, жен.
1.Как долго употребляете мухоморы, в какой дозировке, в каком виде?	2 года, капсулы с 300 мг сушеных измельченных мухоморов красных, по 0.9-1.2 г или 5-9 г.	Около 5-ти лет. Если капсулы (в капсулах принимал пантерный), 3 капсулы – это примерно 1 грамм, примерно 3 раза в день. Если красный, то принимал сушеные шляпки, на глаз, примерно по 1/2 средней шляпки. Примерно по 5-6 грамм в день.	Употребляла две недели, по 1-2 капсулы утром и вечером.
2.Для каких целей Вы начали принимать мухоморы?	Микродозинг (0.9-1,2 мг) потреблял с целью	Для достижения стимуляции и спокойствие ума, для	Нормализовать сон и активность в течение дня.

	восстановления архитектуры сна и продления NREM-фазы, для нормализации парасимпатического тонуса вегетативной нервной системы (и, как следствие, метаболизма и гомеостаза), высокие дозировки принимал в качестве психоактивного вещества - диссоциативного галлюциногена.	творчества.	
3. Покупаете ли вы мухоморы в интернет-магазине или самостоятельно собираете и высушиваете? В каком магазине Вы приобретаете капсулы?	Приобретал на сайте магазина.	Приобретал в интернет-магазине, и у товарища, который самостоятельно их собирает и сушит.	Приобретала в интернет-магазине.
4. Со временем употребления повышается ли доза	Нет, возрастающая толерантность не ощущается.	Толерантность имеется, но незначительная.	Нет, возрастающая толерантность не ощущается.

(чувствуете ли Вы возрастание толерантности)?			
5. Какие эффекты наблюдаете при употреблении и через сколько примерно начинается действие, как долго длится эффект?	<p>Бронхоконстрикция (<i>пациент не отрицает, что это может быть ноцебо или когнитивное искажение</i>), усиление перистальтики желудка и кишечника, спокойствие, сонливость, просоциальный эффект. Разные эффекты начинаются в разное время, первыми начинают ощущаться вегетосоматические эффекты (парасимпатика), далее уже психонейротропные эффекты. В среднем осознание опьянения приходит через 50-90 минут после приема.</p>	<p>Спокойствие ума, расслабление тела, т.е. седативный эффект, стимулирующий эффект при занятии физической активностью, некая диссоциация. «Растворение эго».</p>	<p>Легче заснуть, седация после приема капсул на ночь. Эффект через час после приема, напоминает эффект от употребления марихуаны.</p>

6. При употреблении красного или пантерного мухомора чувствуете ли Вы разницу в эффектах между ними?	Не пробовал пантерный мухомор в целях безопасности.	Да, разница имеется. Красный менее галлюциногенный. Пантерный «сильнее действует».	Употребляла только пантерный мухомор.
7. Были ли у Вас галлюцинации и если да, то приблизительно при какой дозировке?	Галлюцинаций не было даже при потреблении 7-9 г в виде капсул по 300 мг.	Да, были примерно при такой же дозировке – но если «раньше времени употребил» (по слов: «когда предыдущая дозировка окончательно не вывелась из организма»). Так же эффект от мухомора усиливает марихуана, даже при значительных дозировках.	Да ( <i>дозу не помнит</i> ).
8. Чувствуете ли нарастание эффекта при длительном употреблении? ( <i>то есть раньше, например, 2 капсулы</i> )	Эффект скорее стабилизируется, нежели нарастает, так что нет, не чувствую.	Есть некоторый накопительный эффект.	Да, есть накопительный эффект. Утверждает, что не повышала дозу и с течением времени эффект значительно

оказывали слабое действие, а через какое-то количество дней эффект стал сильнее при той же дозе)			усилился.
9.Откуда Вы узнали о микродозинге? (интернет/советы друзей)	Я являюсь элементом экосистемы биохакинга и БАДов более 5 лет. Вероятнее всего, это были тематические посты или ветки на форумах.	Интернет, самообразование, тяга к веществам.	-
10.Помогли ли мухоморы в решении Вашей проблемы (пункт 2)?	Нет, не помогли. Данный ответ справедлив для всех дозировок: и для низких, и для высоких.	Отчасти. Помогли понять, что «все это не имеет никакого значения – и весь наш потенциал у нас внутри. И все что дает мухомор – и так в нас есть».	Да.
11.Употребляли ли Вы когда-либо наркотики?	Да.	Да.	Да, марихуану.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

(клинические случаи)

Пациент Ж. 38 лет, поступила в Центр лечения острых отравлений с диагнозом: острое пероральное отравление веществом нейротропного действия (мухомор) средней степени тяжести. Осложнения основного диагноза: токсическая энцефалопатия, из анамнеза: вместе с супругом употребила 10 шляпок мухомора, после чего вела себя неадекватно, кричала, бегала. На момент осмотра галлюцинаторно загружена, непроизвольный акт дефекации.

При химико-токсикологическом исследовании в биосредах обнаружен(ы): в моче обнаружены мусцимол и иботеновая кислота (Рисунок 60).

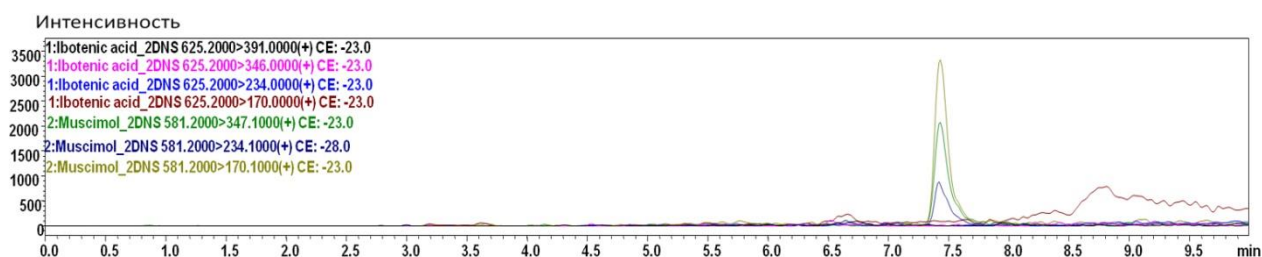


Рисунок 1 – Хроматограмма в методе MRM мусцимола и иботеновой кислоты (из образца мочи). Энергия соударения (CE) – 23

Пациент М. 46 лет, диагноз отравление другими и неуточненными психодислептиками (галлюциногенами), токсическая энцефалопатия, поступил на отделение острых отравлений. Состояние: средней степени тяжести. Сознание: сохранено. По словам больного, периодически беспокоит бессонница. По совету знакомых попробовал отвар мухомора с седативной целью и отметил хороший эффект, стал периодически прибегать к этому средству. Перед поступлением употребил отвар мухомора, но седация не наступила, появился сильный страх, сам вызвал СМП. При химико-токсикологическом исследовании в биосредах обнаружен(ы): в моче обнаружены мусцимол и иботеновая кислота (Рисунок 61).

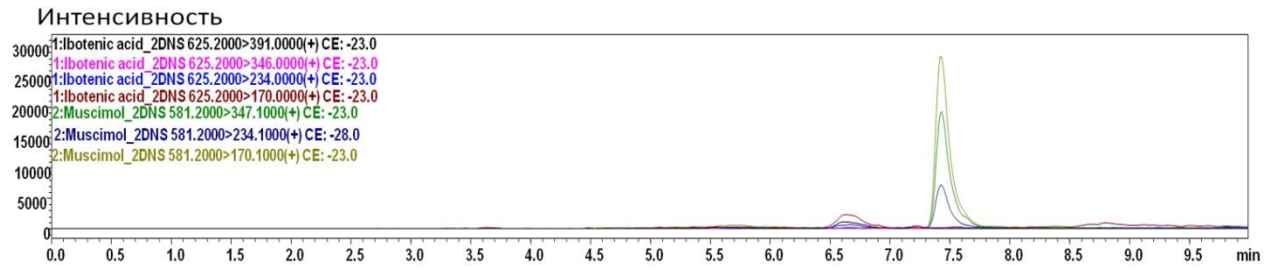


Рисунок 2 – Хроматограмма в методе MRM мусцимола и иботеновой кислоты (из образца мочи). Энергия соударения (CE) – 23

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

(акты внедрения)

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель главного врача по мед.  
части СПб ГБУЗ «ГНБ»

Масалов Д.В.

«01» октября 2025 г.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** «Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*)»

Результаты представлены в следующих публикациях:

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 [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 6. – С. 46-52. doi:10.29296/25877313-2025-06-06.

**Авторы разработки:** Евдокимова Екатерина Алексеевна, соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории СПб ГБУЗ «ГНБ» при проведении исследования крови на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ РФ 29.04.2025 № 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, а также критерии, при наличии которых имеются достаточные основания полагать, что лицо находится в состоянии опьянения и подлежит направлению на медицинское освидетельствование, учетной формы Акта медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), а также формы и порядок ведения журнала регистрации медицинских освидетельствований на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)».

**Результаты внедрения:** Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*) на основе сравнительного анализа биологических жидкостей (кровь, моча) и волос позволила достоверно диагностировать отравления грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*) при анализе мочи как наиболее информативного объекта исследования.

Химик-эксперт МО

Чувина Н.А.



## АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** «Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*)»

Результаты представлены в следующих публикациях:

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 [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 6. – С. 46-52. doi:10.29296/25877313-2025-06-06.
2. Евдокимова Е.А., Балабанова О.Л., Пшенникова Д.А., Кузнецова Е.А., Стрелова О.Ю. Разработка методики качественного обнаружения мусцимола и мускарина в капсулах, содержащих мухомор красный и пантерный, методом ВЭЖХ-МС/МС. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025; – Т. 28, № 9. – С. 21–29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2025-09-03>

**Авторы разработки:** Евдокимова Екатерина Алексеевна, соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории Центра лечения острых отравлений ГБУ НИИ СП им. И.И. Джанелидзе при проведении исследования крови и мочи на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ от 18.05.2021 №464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» и МЗ РФ от 15 ноября 2012 г. №925н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с острыми химическими отравлениями».

**Результаты внедрения:** Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*) на основе сравнительного анализа биологических жидкостей (кровь, моча) и волос позволила достоверно диагностировать отравления грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*) при анализе мочи как наиболее информативного объекта исследования.

Заведующий ХТЛ

Балабанова О.Л.

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России,  
д.фарм.н., профессор



И.А. Наркевич

«06» сентября 2025 г.

**Акт внедрения  
результатов научно-практической работы в образовательный процесс**

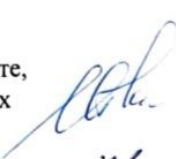


Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, кандидата фармацевтических наук, доцента	Ю.Г. Ильиновой
и членов комиссии	заведующего аспирантурой, кандидата технических наук	Н.Е. Шашкиной
	директора департамента управления образовательной деятельностью	Т.С. Рябовой

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «06» марта 2025 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Евдокимовой Екатерины Алексеевны на тему «Разработка методики лабораторной диагностики интоксикаций грибами рода *Amanita*: мухомором красным (*Amanita muscaria*) и мухомором пантерным (*Amanita pantherina*)», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: теоретический материал для самостоятельной работы «Обнаружения токсикантов мухомора красного (*Amanita muscaria*) и мухомора пантерного (*Amanita pantherina*) в биологических объектах» внедрена в образовательный процесс на фармацевтическом факультете по учебной дисциплине по выбору: «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» (<https://rutube.ru/video/private/be00395ada9912ab16c3295df493e660/?p=VSxR6003f3G53RPljnz7lQ>) в рамках программы высшего образования – программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация очной формы обучения и учебную дисциплину «Организация проведения химико-токсикологической экспертизы» в рамках программы ординатуры по специальности 33.08.03 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Факт внедрения подтверждается следующими документами: выписки из протоколов заседания кафедры фармацевтической химии (протокол № 12 от 19.03.2025) и методической комиссии по УГСН 33.00.00 (протокол № 6 от 03.06.2025) прилагаются.

Председатель	проректор по учебной работе, кандидат фармацевтических наук, доцент		Ю.Г. Ильинова
члены комиссии	заведующий аспирантурой, кандидат технических наук		Н.Е. Шашкина
	директор департамента управления образовательной деятельностью		Т.С. Рябова