http://doi.org/10.53587/25792865-2024.11-17

ВЫЯВЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ГРУППЫ АМАНИТИНОВ, ТОКСИНОВ БЛЕДНОЙ ПОГАНКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС

Айгумов М.Ш.[1], Кульбацкий В.С.[2], Бучель Д.Л.[2], Походня[2]Ю. Г.[2], Вишневский М. В.[3], Савчук С. А.[4]

[1]ГБУЗ ЯНАО «Ноябрьский наркологический деспансер», Ноябрьск, Россия

[2] Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория», Минск, Беларусь

[3]ЦИМИ (Центр инновационных микологических исследований), Москва, Россия

[4]Ассоциация специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу, Москва, Россия

Статья посвещена актуальной на сегодняшний день проблеме диагностики острых отравлений грибами и методам выявления в высших грибах и биообъектах людей веществ, вызывающих психоактивное и токсическое действие. Выделяются и описываются характерные особенности гепатотоксичных грибов в Российской Федерации, к числу которых традиционно относятся смертельно ядовитые лесные мухоморы рода Amanita (бледная поганка), различные лесные и полевые лепиоты (Lepiota) и растущая на древесине галерина окаймлённая (Galerina marginata).

Ключевое содержание исследования составляет анализ основных токсинов этой группы – аматоксинов (аманитинов). Отмечается, что, они обладают общим плазмотоксическим действием и способны повреждать любые органы и ткани. Обобщается практический опыт выполненных экспериментальных работ по исследованию и определению предела обнаружения α-аманитина в моче методами ВЭЖХ с тандемным трехквадрупольным детектором и масс-спектрпометрическим детектором высокого разрешения.

***Ключевые слова**: аманитины, гепатотоксины, бледная поганка, твердофазная экстракция, ВЭЖХ-МС/МС.*

Адрес для корреспонденции: Савчук Сергей Александрович, соучредитель Ассоциации специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу, Москва, Россия, e-mail: serg-savchuk@yandex.ru

Введение

Интоксикация в результате употребления грибов в пищу превратилась в перманентно нарастающую проблему здравоохранения не только в России, но и во многих странах мира, что подтверждается статистическими данными. Точный годовой уровень смертности неизвестен, но безо всяких сомнений он составляет от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч человек в мире (и от нескольких десятков до нескольких сотен в России). Общую тревожную картину дополняет тот факт, что пока удалось установить биохимическую природу не более половины существующих грибных токсикантов. Помимо этого, из-за расширения списка собираемых видов продолжают выявляться новые синдромы отравлений, а давно описанные синдромы регистрируются далеко за пределами ранее известных для них регионов.

Если до конца XX века медицинская классификация ядовитых грибов строилась на химической природе их токсикантов, то в настоящее время наибольшей популярностью пользуется система, в которой ядовитые грибы распределяются согласно вызываемым ими патологическим синдромам, причём не просто так, а в зависимости от длительности латентного (скрытого) периода, который проходит от момента употребления гриба в пищу до проявления первых симптомов отравления. Впервые такая синдромная классификация была сформулирована в 2005 году американским токсикологом Джеймсом Генри Диасом [1], а в 2018 году группа токсикологов из Австралии, США, Германии и Франции [2] довела её до более или менее завершённого вида.

Всего на территории России выявлено более 150 видов ядовитых грибов [3]. Большинство регистрируемых отравлений грибами относится к пятой группе (интоксикация с желудочно - кишечными инфекционными эффектами), за редчайшими исключениями не представляет угрозы для жизни человека и не вызывает необходимости проведения токсикологической экспертизы. Такая необходимость возникает при интоксикации наиболее распространенными грибами, содержащими смертельно опасные токсины (аматоксины, гиромитрин, мускарин) или грибами, содержащими вещества, вызывающие состояние измененного сознания.

К гепатотоксичным грибам в РФ принадлежат смертельно ядовитые лесные мухоморы рода Amanita (бледная поганка, вонючий, весенний), различные лесные и полевые лепиоты (Lepiota) и растущая на древесине галерина окаймлённая (Galerina marginata) [3].

Основные токсины этой группы – аматоксины (аманитины) [4]. Они обладают общим плазмотоксическим действием и способны повреждать любые органы и ткани непосредственно. Однако поскольку именно отказ печени в первую очередь является гибельным для организма, а многие прочие патологии на поздних стадиях возникают как его следствие, яды описываемой группы классифицируются как гепатотоксиные.

Одной из самых характерных черт отравления аматоксинами является задержка проявления симптомов, указывающих на начальную стадию поражения печени

(предгепатотоксических). Первые часы после отравления человек чувствует себя нормально и только через 6 (иногда 9-12) часов после употребления грибов появляются первые желудочно-кишечные эффекты (тошнота, рвота, диарея, боли в животе, вторичное обезвоживание). Эти симптомы продолжаются до 36 часов, после чего наступает улучшение самочувствия. Затем примерно на третий день появляются явные признаки развития гепатотоксичности, прогрессирующие в тяжёлых случаях до полной печёночной недостаточности. На этом этапе часто развивается и почечная недостаточность, что может привести к смерти отравившегося на 6–8-й день, если только меры по исправлению ситуации не окажутся успешными.

С биохимической точки зрения аматоксины относятся к циклоолигопептидам (около 35 разновидностей), характеризующимся наличием индольного «мостика». Большинство из них были выделены[5], а их химическая структура охарактеризована и подтверждена (рис.1.). Основным аматоксином Amanita phalloides и других грибов описываемой группы является аманитин-α.

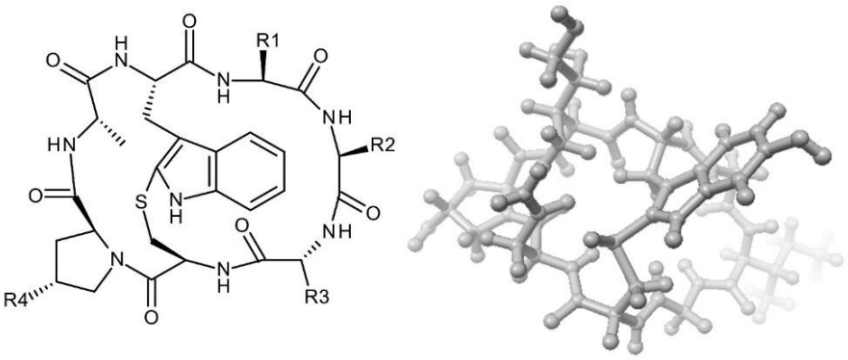

Рис. 1. Общая химическая структура аматоксинов с индольным «мостиком».

Благодаря своей циклической олигопептидной природе аматоксины слабо водорастворимы и практически не диффундируют из мякоти грибов в воду. Кроме того, они обладают высокой термостабильностью и не могут быть удалены при кипячении или разрушены при нагревании. Основной механизм действия аматоксинов состоит в блокировке биосинтеза клеточного белка путём избирательного ингибирования фермента РНК-полимеразы II, что приводит к невозможности осуществления клетками их жизненно важных функций. Помимо этого, согласно ряду данных, на уровне митохондрий под действием аматоксинов запускается генерация активных форм кислорода (АФК), которые резко ухудшают жизнеспособность клеток и приводят их к гибели.

Аматоксины были идентифицированы как бициклические октапептиды с молекулярной массой около 900 г/моль. Они состоят по меньшей мере из девяти различных соединений: α-аманитин, β-аманитин, γ-аманитин, ε-аманитин, аманин, аманинамид, амануллин, амануллиновая кислота и проамануллин. Из них α-аманитин, γ-аманитин, аманинамид, амануллин и проамануллин классифицируются как нейтральные

аматоксины, тогда как β-аманитин, ε-аманитин, аманин и аманулловая кислота являются кислотными аматоксинами [6].

Фаллотоксины представляют собой бициклические гептапептиды, впервые выделенные из A. phalloides [7] и образованы, по меньшей мере, семью различными соединениями: фаллоидином, фаллоином, профаллином, фаллизином, фаллацином, фаллацидином и фаллизацином. Из них фаллоидин, фаллоин, профаллин и фаллизин классифицируются как нейтральные фаллотоксины, тогда как фаллацин, фаллацидин и фаллизацин являются кислыми фаллотоксинами.

Для идентификации и количественного определения аматоксинов и фаллотоксинов в образцах A. phalloides можно использовать множество различных методов. Оценка этих токсинов в грибах была проведена с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ВЭЖХ-ОФХ) [8], капиллярного электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией (МС) [9], ВЭЖХ-МС/МС на гидрофильной амидной колонке (HILIC) [10] и времяпролетного ВЭЖХ-МС (LC/ESI-TOF-MS) [11], ВЭЖХ-МС/МС [11, 12] времяпролетного ВЭЖХ-МС в комбинации с матричным фотодиодным детектором (PDA) [13], орбитальной ионной ловушки (Thermo LTQ) [14]. При этом, в большинстве случаев при идентификации амо-и фаллотоксинов применялась пробоподготовка с использованием твердофазной экстракции (на различных типах картриджей), с последующим ВЭЖХ-МС/МС анализом.

Грибы семейства аманитовые включают в себя более 600 различных съедобных и несъедобных видов. Аманитовые объединяет наличие в них непосредственно аматоксинов. Между собой аматоксины различаются лишь количеством гидроксильных групп и положением амидной группы. Структуры некоторых из аматоксинов – α-аманитина, β-аманитина приведены на рисунке 2.

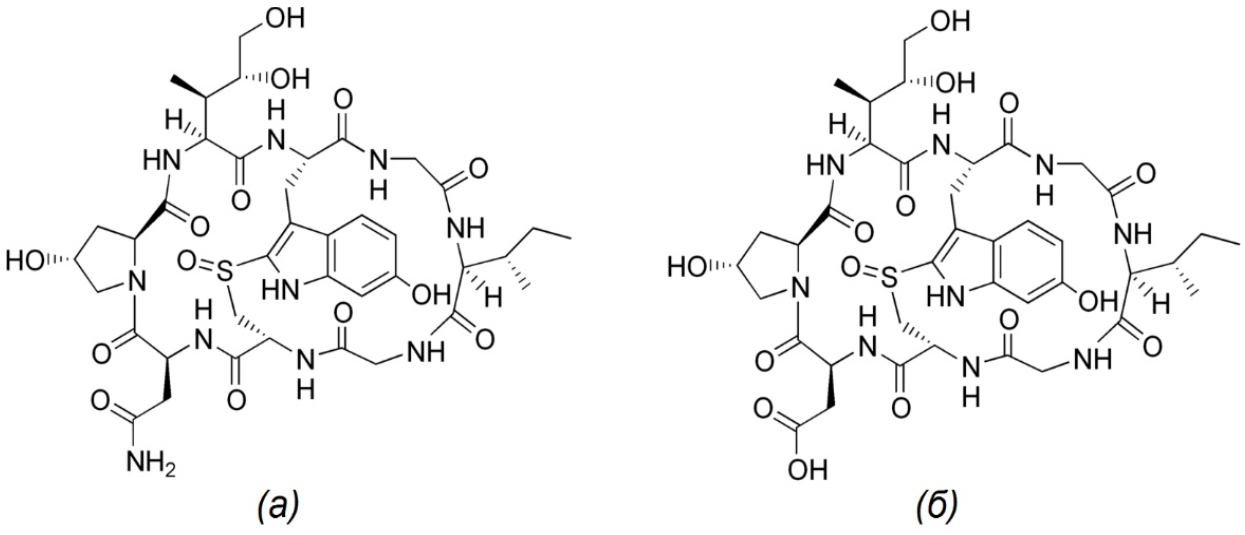

Рис. 2. Структурные формулы α-аманитина (а) и β-аманитина (б).

Летальная доза аматоксинов составляет порядка 0,1 мг/кг массы тела человека. В среднем один гриб содержит 3–5 мг аматоксинов, следовательно, употребление порции (40 – 50 г) грибов может вызывать смерть взрослого человека.

В неизменном виде аматоксины быстро поступают в печень и почки, связываются с РНК-полимеразой II, нарушая биосинтез белков в печени, что приводит к цитолизу, развитию тяжелого токсического состояния и вероятной смерти. Как следствие, аматоксины не метаболизируются в печени и выводятся с мочой в неизменном виде до 72 часов.

Рассмотрим более подробно метод определения основных аматоксинов и фаллотоксинов с использованием ВЭЖХ-МС/МС.

Пробоподготовка

Приготовление экстракта бледной поганки.

Для анализа высушенные образцы бледной поганки измельчали, отмеряли навеску в 50 мг и помещали в микроцентрифужные пробирки, затем экстрагировали 1 мл метанола на вортексе в течение 5 минут и центрифугировали 5 минут при 15 000 об/мин, надосадочную жидкость отбирали и переносили в виалы.

Приготовление раствора α-аманитина в концентрации 1нг/мл.

Полученный экстракт бледной поганки исследовали, определяя интенсивность пика α-аманитина. Расчет концентрации α-аманитина в экстракте проводили на основе площади пика резерпина в концентрации 1нг/мл. При сравнении интенсивностей пиков резерпина в концентрации 1нг/мл и α-аманитина из метанольного экстракта было показано 100 кратное различие в высоте пиков. Для получения образца мочи с приблизительной концентрацией α-аманитина в 1нг/мл к 10 мл бланковой мочи добавляли 100 мкл экстракта бледной поганки.

Твердофазная экстракция (ТФЭ).

Для проведения твердофазной экстракции использовали 3 типа картриджей (Bond Elut Certify, Bond Elut C8, Copure C8/SAX) и два варианта пробоподготовки.

Протокол ТФЭ №1. (Bond Elut Certify). Тип картриджа: Bond Elut Certify (130 мг, 3мл).

Перед экстракцией к 2 мл мочи добавляли 4 мл 0,6 М фосфатного буфера с pH 6.3, далее проводили кондиционирование патрона путем последовательного промывания 2 мл метанола и 2 мл воды очищенной, загружали патрон 6 мл предварительно разбавленной пробы. После, с целью удаления белков и других эндогенных компонентов мочи, патрон промывали последовательно 2 мл воды очищенной и 2 мл 0,1 N соляной кислоты. Далее патрон сушили 5 минут при полном вакууме. Элюирование сорбированных аналитов проводили 3 мл метанола. Собранный элюент упаривали досуха и добавляли 200 мкл воды с 0,1 % муравьиной кислотой (подвижная фаза А).

Протокол ТФЭ №2 (Bond Elut C8 и Copure C8/SAX). Тип картриджа: Bond Elut Certify (130 мг, 3мл).

Перед экстракцией к 2 мл мочи добавляли 4 мл 0,6 М фосфатного буфера с pH 6,3, далее проводили кондиционирование патрона путем последовательного промывания 2 мл метанола и 2 мл воды очищенной, загружали патрон 6 мл предварительно разбавленной пробы. После с целью удаления белков и других эндогенных компонентов мочи патрон промывали последовательно 2 мл воды очищенной. Далее патрон сушили 5 минут при полном вакууме. Элюирование сорбированных аналитов проводили 3 мл метанола. Собранный элюент упаривали досуха и добавляли 200 мкл воды с 0,1 % муравьиной кислотой (подвижная фаза А).

Аппаратура ВЭЖХ-МС/МС и условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.

Для анализа использовали трехквадрупольный масс-спектрометрический детектор Shimadzu LCMS-8050 с жидкостным хроматографом Nexera X2 Shimadzu (Япония). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращено-фазовым сорбентом Phenomenex Kinetex (2.1 мм х 100 мм; 2.6 мкл). В качестве подвижной фазы А использовали 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы Б – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Разделение осуществляли в градиентном режиме элюирования. Программа градиентного элюирования для всех методов была одинаковая. Время анализа занимало 15 минут, с 0 до 7.5 минут содержание фазы Б увеличивалось с 5 до 95% и держалось на этом значении 2.5 минуты, далее с 10.01 минуты в течение 5 минут колонку уравновешивали 95% подвижной фазой А. Температура термостата колонки при анализе составляла 40°С, скорость потока 0.3 $см^3$/мин. Объем инжекции 5 мкл.

Для настройки масс-спектрометра использовали параметры рекомендуемые производителем: поток через распылитель (Nebulizing Gas Flow)-3 л/мин, поток осушающего газа (Drying Gas Flow)-10 л/мин, поток нагреваемого газа (Heating Gas Flow)-10 л/мин, температура осушающего газа (DL Temp)-250°С, температура интерфейса-400°С. Параметры масс-спектрометрического детектирования приведены в таблице 1.

Для проверки метода были выбраны основные аматоксины (α-аманитин, β-аманитин) и основные фаллотоксины: фаллацин, фаллацидин, фаллизацин. Для каждого вещества из открытых источников были выбраны наиболее интенсивные MRM переходы (см. табл. 1).

Таблица 1.

Параметры масс-спектрометрического детектирования основных аматоксинов и фаллотоксинов в режиме MRM при положительной ионизации

Вещество	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударения
α-аманитин	919,48	901,53	-28,0
		259,13	-44,0
β-аманитин	902,44	902,44	-26,0
		259,13	-42,0
Фаллацин	849,30	831,29	-30,0
		603,18	-30,0
		548,20	-30,0
Фаллацидин	847,33	659,21	-30,0
		686,22	-30,0
		676,23	-30,0
Фаллизацин	863,32	444,01	-30,0
		773,33	-30,0
		363,92	-30,0

Результаты

При исследовании экстрактов грибов удалось обнаружить высокие уровни концентраций для α- и β-аманитинов. Фаллотоксины также были обнаружены, но в значительно меньших концентрациях. Наиболее высокие уровни концентраций из фаллотоксинов удалось получить для фаллацина.

На рисунке 3 представлен хроматографический профиль и масс-спектр α-аманитина в концентрации 1 нг/мл в мочевой матрице (разбавление экстракта бледной поганки в моче в соотношении 1 к 100). В данном образце также удалось обнаружить β-аманитин в сравнимой с α-аманитином концентрации. Обнаружить фаллотоксины в данной пробе не удалось.

Проведение твердофазной экстракции позволило увеличить интенсивность хроматографического профиля α-аманитина в 15 раз (рисунок 4), также в пробе после ТФЭ удалось обнаружить фаллацин (рисунок 5). После проведения ТФЭ интенсивность пика β-аманитина также выросла примерно в 15 раз (рисунок 6).

При сравнении трех типов картриджей для ТФЭ и двух вариантов пробоподготовки, лучшие результаты были получены при использовании картриджей

Bond Elut Certify, при этом стоит отметить, что использование всех трех видов картриджей дает сравнимые результаты (рисунок 7), которые могут быть использованы при определении токсинов бледной поганки.

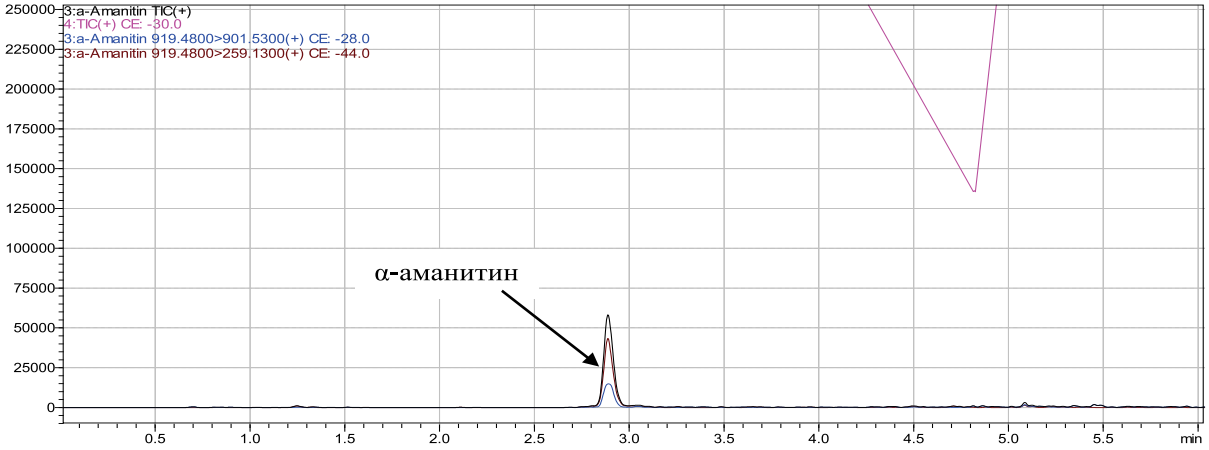

Рис. 3

Рис. 3 Хроматографический профиль по 919,48901,53,919,48259,13 α-аманитина в мочевой матрице в концентрации 1 нг/мл.

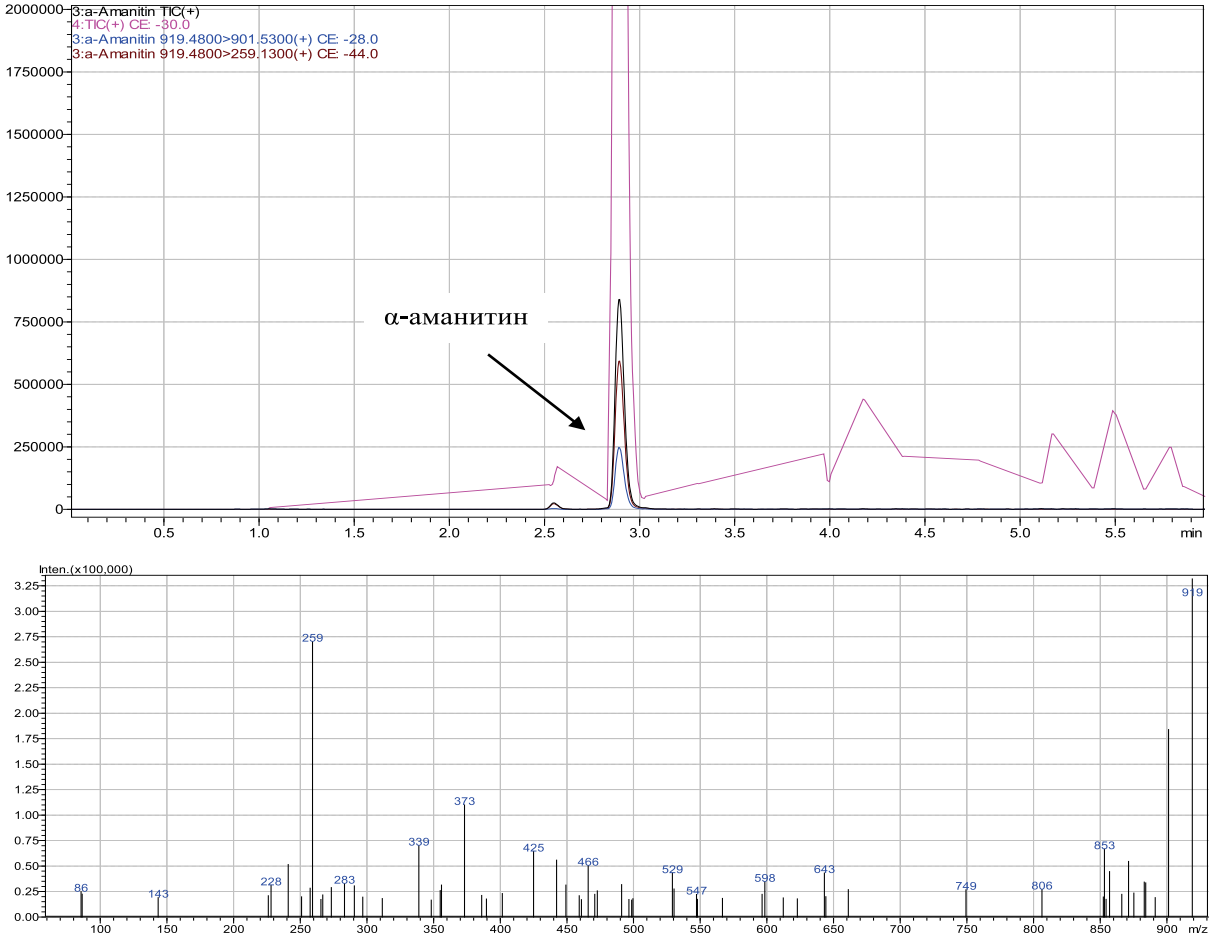

Рис. 4

Рис. 4. Хроматографический профиль по 919,48>901,53,919,48>259,13 и масс-спектр α-аманитина в мочевой матрице в концентрации 1 нг/мл после проведения ТФЭ на картриджах Bond Elut Certify. В сравнении с пробоподготовкой без ТФЭ интенсивность пика выросла в 15 раз.

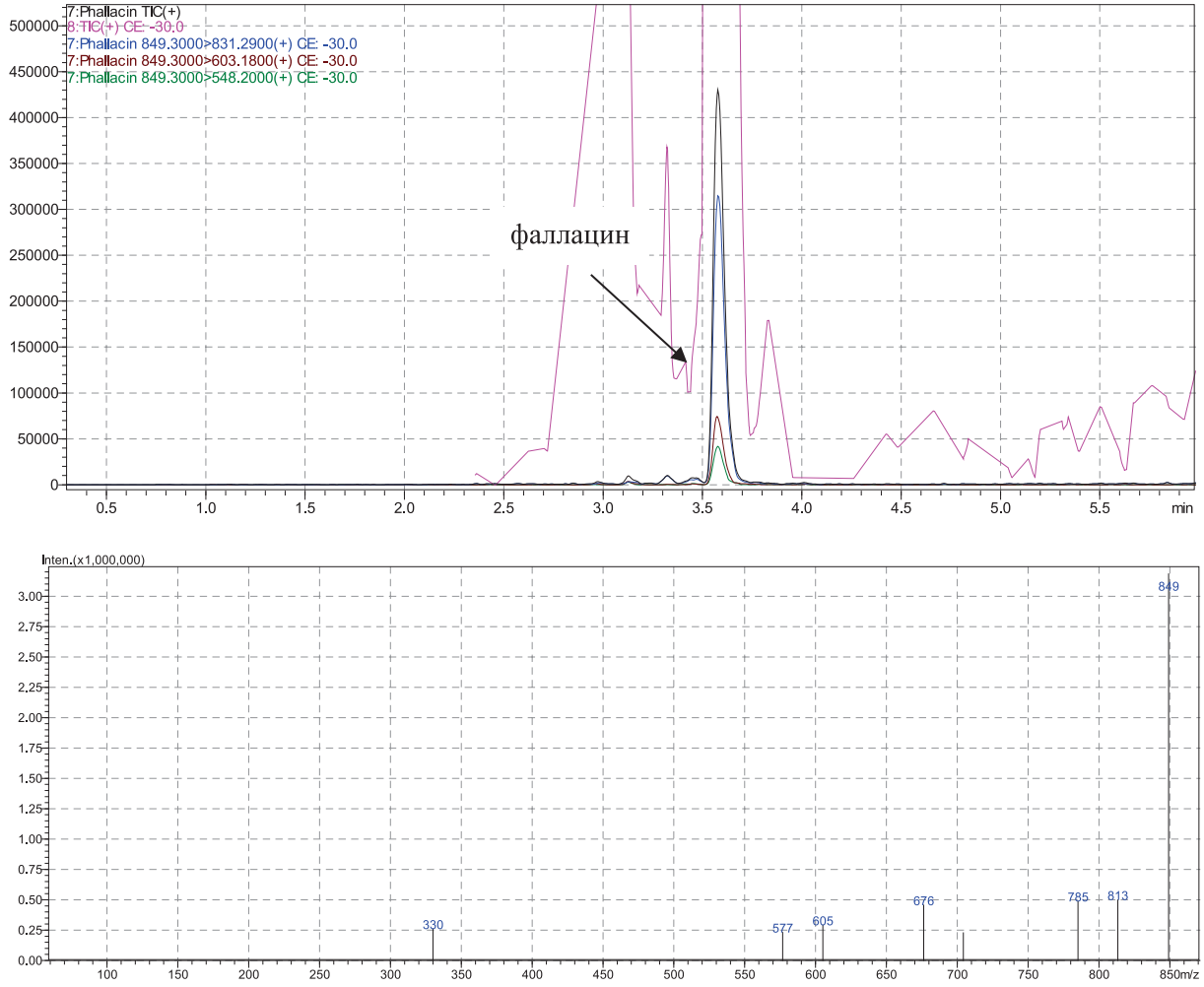

Рис. 5. Хроматографический профиль по 849,30>831,29, 849,30>603,18,849,30>548,20 и масс-спектр фаллацина в мочевой матрице после проведения ТФЭ на картриджах Bond Elut Certify. До проведения ТФЭ фаллацин не обнаруживался.

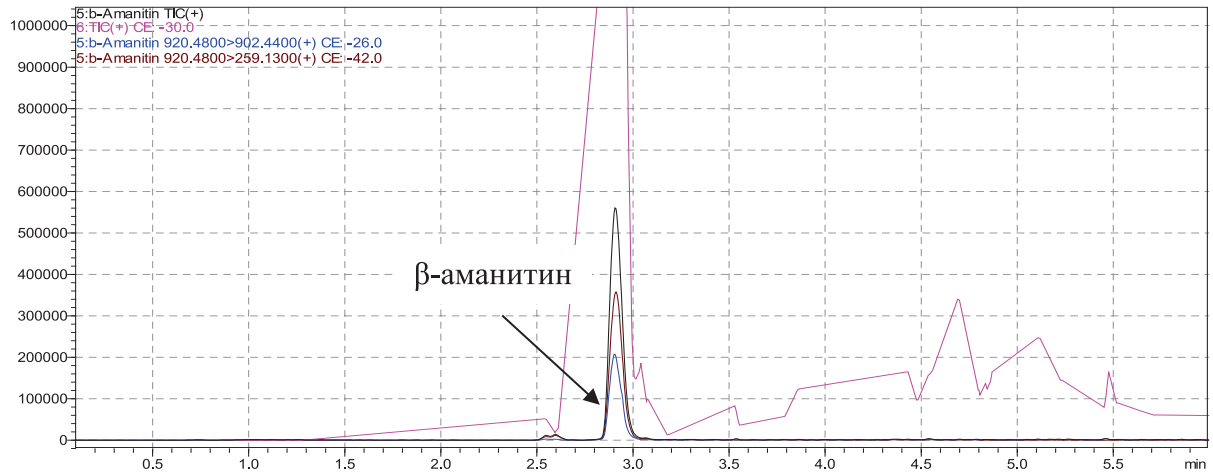

Рис. 6. Хроматографический профиль по 920,48>902,44,920,48>259,13 и масс-спектр β-аманитина в мочевой матрице после проведения ТФЭ на картриджах Bond Elut Certify. В сравнении с пробоподготовкой без ТФЭ интенсивность пика выросла в 15 раз.

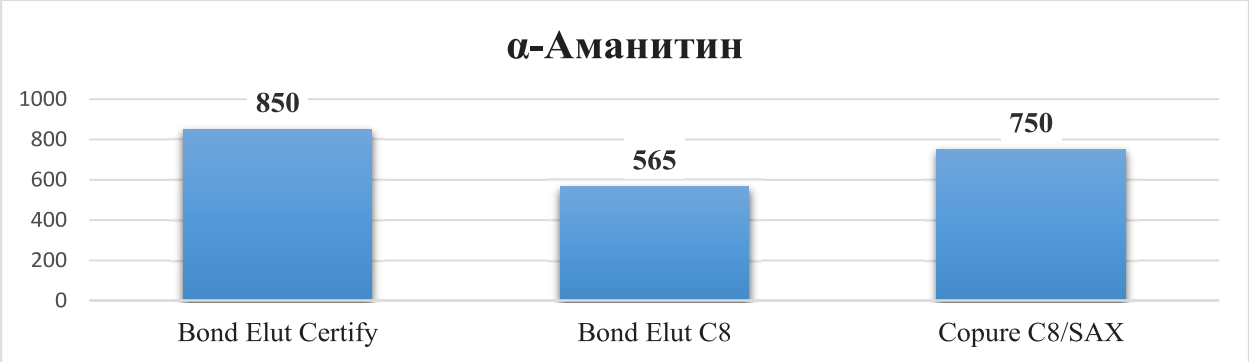

Рис. 7. Сравнения результатов использования трех типов картриджей для ТФЭ

В рамках данных экспериментальных работ также были проведены исследования по определению предела обнаружения α-аманитина в моче с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС.

С целью определения предела обнаружения α-аманитина в моче экстракт, полученный после ТФЭ, разбавляли и оценивали получаемый при этом отклик по α-аманитину. Путем нескольких разбавлений удалось установить, что минимальная определяемая концентрация α-аманитина в моче составляет 0,04 нг/мл. Данное значение удалось достичь путем разбавления экстракта в 50 раз и увеличения объема вводимой пробы до 10 мкл (в 2 раза) (рисунки 8 и 9).

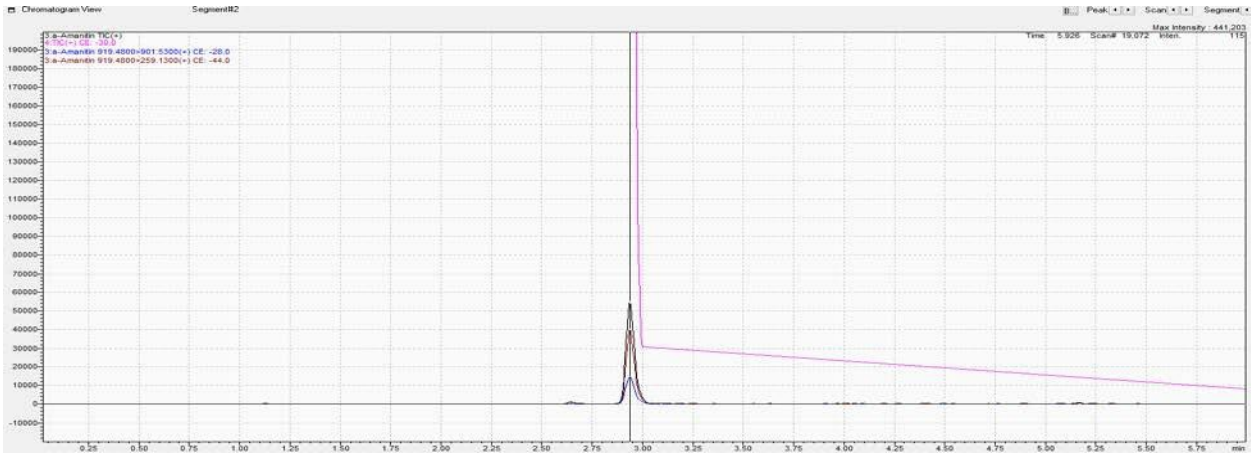

Рис. 8. Хроматографический профиль по 919.48>901.53, 919.48>259.13 α-аманитина в мочевой матрице в концентрации 0,04 нг/мл после проведения ТФЭ.

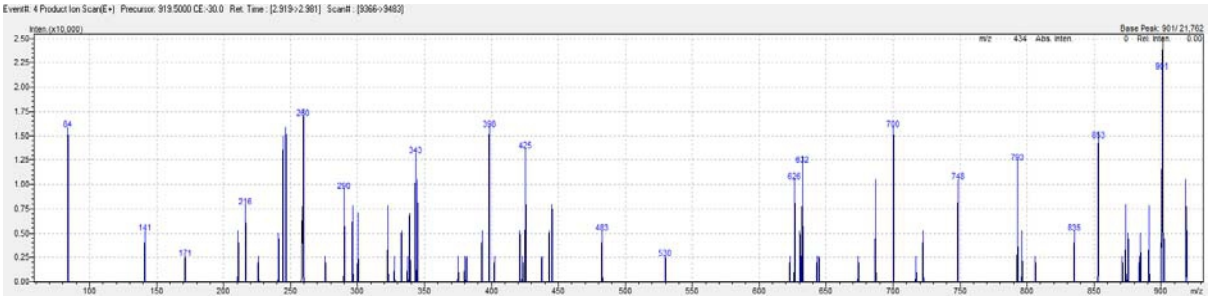

Рис. 9. Масс-спектр α-аманитина (0,04 нг/мл) при энергии соударения CE-20

В связи с опасностью, которую представляют отравления ядовитыми грибами и диагностической сложностью, как правило, лечение неспецифично и направлено на скорейшее удаление токсичного вещества из организма, коррекцию нарушенных витальных функций, лечение осложнений, таких как поражение печени, почек, геморрагический синдром. Общая схема лечения изначально одинакова во всех случаях, однако в дальнейшем оценка течения заболевания в динамике позволит определиться с необходимостью проведения того или иного метода лечения, при этом в терапии отравления грибами целесообразно выделять лечение в токсикогенной и соматогенной стадиях. При оказании медицинской помощи в условиях стационара необходимо соблюдать основные принципы лечения острых отравлений химической этиологии. После подтверждения диагноза и определения тяжести отравления, необходимо поддерживать интенсивность лечебных мероприятий. Достаточный объем интенсивной и реанимационной терапии на ранних этапах лечения способствует снижению тяжести осложнений со стороны печени и почек. В токсикогенной стадии отравлений необходимо осуществить ускоренное выведение токсикантов из организма, провести специфическую антидотную терапию, при показаниях, осуществить симптоматическое лечение, направленное на защиту тех органов и систем, которые преимущественно поражаются данным токсикантом в результате специфического и неспецифического действия.

Учитывая, что именно токсический гастроэнтерит является ведущим синдромом, определяющим тяжесть и во многом прогноз отравления грибами, интенсивная симптоматическая терапия состоит в коррекции водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния. Обязательно применение витаминов группы В (В1, В6, В12) и гепатопротекторных препаратов. Согласно рекомендации ВОЗ, при отравлении аманитином необходимо применение препаратов расторопши пятнистой. Применение препаратов янтарной кислоты показано в связи с прооксидантным действием грибных токсинов и повреждением метаболических процессов, сопряженных с энергетическим обменом. Эффективным средством гепатопротекторного действия является препарат ремаксол.

При наличии симптомов гастроэнтерита необходимо провести зондовое промывание желудка, затем – фармакологическую стимуляцию пропульсивной функции кишечника (слабительные средства). В качестве энтеросорбента показан активированный уголь. С целью деконтаминации ЖКТ целесообразно тотальное промывание кишечника. В зависимости от тяжести состояния больных, при отравлении грибами рекомендовано проведение кишечного лаважа.

Лечение в соматогенной стадии предполагает проведение детоксикационных мероприятий, профилактику полиорганных нарушений (стимуляцию естественной детоксикации), проведение медикаментозной коррекции гипераммониемии и гиперазотемии), проведение симптоматической терапии.

При выборе методов детоксикации в соматогенной стадии необходимо учитывать не только тяжесть течения отравления, но и присоединившиеся осложнения, наиболее опасным из которых является печеночная энцефалопатия. Для детоксикации соматогенной стадии могут возникнуть показания к диализным методам.

Лечение пантериннового синдрома также включает зондовое промывание желудка, кишечный лаваж в сочетании с энтеросорбцией по общим принципам лечения отравлений грибами. Имеются также рекомендации при тяжелых и угрожающих жизни состояниях проводить активные методы детоксикации: гемосорбцию, плазмаферез; для купирования возбуждения и галлюцинаторного синдрома показано введение хлорпромазина, препаратов бензодиазепинового ряда, галоперидола.

При отравлениях грибами, вызывающими судариновый/мускариновый синдром применяют методы энтеральной детоксикации и форсированный диурез. Применение гепатопротекторной терапии нецелесообразно. При развитии чрезмерной бронхиальной секреции или других холинергических симптомов, применяют атропин.

Выводы

Разработаны методы выявления токсчичных компонентов гепатотоксичных грибов рода Amanita (бледная поганка, мухоморы вонючий и весенний), включающие методы пробоподготовки биологических проб (мочи) различными методами твердофазной экстракции. Проведена оптимизация условий метода ВЭЖХ и масс-спектрометрического детектирования с использованием тандемного трехквадрупольного детектора и масс-спектрпометрического детектора высокого разрешения. Показано, что основными трудностями при выявлении отравлений аманитинами являются затрудненная идентификация случаев отравлений из-за длительного латентного периода.

Установлено, что при скрининге минимальная определяемая концентрация α-аманитина в моче при использовании метода ВЭЖХ с тандемным трехквадрупольным детектором при MRM составляет 0,04 нг/мл, но результаты скрининга должны быть подтверждены методом масс-спектрометрии высокого разрешения, при этом чувствительность определения может варьироваться.

Список литературы:

1. Diaz J. H. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings. Crit. Care Med. 2005; 33 (2): 427–436.
2. White J., et al. Mushroom poisoning: a proposed new clinical classification. Toxicon. 2019; 57: 53–65.
3. Вишневский М. В. Ядовитые грибы России. М.: Проспект, 2018.
4. Diaz J. H. (2018). Amatoxin-Containing Mushroom Poisonings: Species, Toxidromes, Treatments, and Outcomes. Wilderness Environ. Med. 2018; 29 (1): 111–118

5. Heather E. H., et al. PNAS. 2007; 104 (48):19097–19101. doi: 10.1073/pnas.0707340104.
6. János Vetter, Toxins of Amanita phalloides, Toxicon, Volume 36, Issue 1, 1998, Pages 13-24.
7. Lynen, F. and Wieland, U. (1938), Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. Justus Liebigs Ann. Chem., 533: 93-117.
8. F. Enjalbert, C. Gallion, F. Jehl, H. Monteil, H. Faulstich, Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in Amanita phalloides Fr. by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, Volume 598, Issue 2,1992, Pages 227-236, ISSN 0021-9673
9. Rittgen, J., Pütz, M. and Pyell, U. (2008), Identification of toxic oligopeptides in Amanita fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. ELECTROPHORESIS, 29: 2094-2100.
10. Wai-cheung Chung, Sau-ching Tso, Sai-tim Sze, Separation of Polar Mushroom Toxins by Mixed-Mode Hydrophilic and Ionic Interaction Liquid Chromatography—Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, Journal of Chromatographic Science, Volume 45, Issue 2, February 2007, Pages 104–111.
11. Ahmed, W.H.A., Gonmori, K., Suzuki, M. et al. Simultaneous analysis of α-amanitin, β-amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. Forensic Toxicol 28, 69-76 (2010).
12. Leite M, Freitas A, Azul AM, Barbosa J, Costa S, Ramos F. Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples. Anal Chim Acta. 2013 Oct 17;799:77-87. doi: 10.1016/j.aca.2013.08.044. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24091377.
13. Zhang S, Zhao Y, Li H, Zhou S, Chen D, Zhang Y, Yao Q, Sun C. A Simple and High-Throughput Analysis of Amatoxins and Phallotoxins in Human Plasma, Serum and Urine Using UPLC-MS/MS Combined with PRiME HLB μElution Platform. Toxins (Basel). 2016 May 4;8(5):128. doi: 10.3390/toxins8050128. PMID: 27153089; PMCID: PMC4885043.
14. Li C, Qian H, Bao T, Yang G, Wang S, Liu X. Simultaneous identification and characterization of amanita toxins using liquid chromatography-photodiode array detection-ion trap and time-of-flight mass spectrometry and its applications. Toxicol Lett. 2018 Oct 15;296:95-104. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.08.005. Epub 2018 Aug 11. PMID: 30107194.
15. PMID: 30107194.

ԱՄԱՆԻՏԻՆԻ ԽՄԲԻ ՆՅՈՒԹԵՐԻ՝ ԴԺԳՈՒՅՆ ԳԱՐՇԱՍՆԿԻ ՏՈԿՍԻՆՆԵՐԻ, ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՈՒՄԸ ՄԱՐԴՈՒ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԵՂՈՒԿՆԵՐՈՒՄ ԲԱՀՔ ՄՍ/ՄՍ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԲ

Այգումով Մ.Շ., Կուլբացկի Վ.Ս., Բուչել Դ.Լ., Պոխոդնյա Յ.Գ., Վիշնեվսկիյ Մ.Շ., Սավչուկ Ս.Ա.

Հոդվածը նվիրված է սնկային սուր թունավորման ախտորոշման արդի խնդրին և բարձրագույն սնկերի և մարդու կենսաբանական օբյեկտներում հոգեակտիվ և թունավոր ազդեցություններ առաջացնող նյութերի հայտնաբերման մեթոդին: Բացահայտված և նկարագրված են Ռուսաստանի Դաշնությունում հեպատոտոքսիկ սնկերի բնորոշ գծերը,

որոնք ավանդաբար ներառում են Amanita (դժգույն գարշաունկ) ընտանիքի մահացու թունավոր անտառային ճանճի ագարիկները, անտառային և դաշտային տարբեր լեպիոտաներ (Lepiota) և փայտի վրա աճող ծայրամասային գալերինա (Galerina marginata).

Հոդվածում ներկայացված են այս խմբի հիմնական տոքսինների՝ ամաթոքսինների (ամանիտինների) վերլուծությունը: Նշվում է, որ դրանք ունեն ընդհանուր պլազմատոքսիկ ազդեցություն և կարող են վնասել ցանկացած օրգան և հյուսվածք: Ամփոփված է փորձարարական աշխատանքների պրակտիկ փորձը, որը կատարվել է մեզի մեջ α-amanitin-ի հայտնաբերման սահմանը ուսումնասիրելու և որոշելու նպատակով՝ կիրառելով ԲԱՀՔ մեթոդները փանդեմային եռակի քառաբևեռ դետեկտորով և բարձր լուծաչափով զանգվածային սպեկտրոմետրիկ դետեկտորով:

Բանալի բառեր. *ամանիտիններ, հեպատոտոքսիններ, դժգույն գարշաունկ, պինդ փուլի արդյունահանում, ԲԱՀՔ ՄՍ/ՄՍ:*

DETECTION OF SUBSTANCES OF THE AMANITIN GROUP, TOXINS OF AMANITA PHALLOIDES, IN BILOGICAL FLUIDS OF THE HUMAN BODY USING THE HPLC- MS/MS METHOD

Aigumov M.Sh., Kulbackiy V.S., Buchel D.L., Pokhodnya Y.G., Vishnevskiy M.V., Savchuk S.A.

The article is devoted to the current problem of diagnosing acute mushroom poisoning and methods for identifying substances in Dikarya and human biological objects that cause psychoactive and toxic effects. The characteristic features of hepatotoxic mushrooms in the Russian Federation are identified and described, which traditionally include the deadly poisonous forest fly agarics of the genus Amanita, various forest and field Lepiota and Galerina marginata growing on wood.

The key content of the study is the analysis of the main toxins of the group of amatoxins (amanitins). It is noted that they have a general plasmatoxic effect and can damage any organs and tissues. The practical experience of experimental work performed in order to study and determine the detection limit of α-amanitin in urine using HPLC methods with a tandem three-quadrupole detector and a high-resolution mass spectrometric detector is presented.

Keywords: *amanitins, hepatotoxins, Dikarya, solid phase extraction, HPLC-MS/MS.*

Статья поступила: 20.11.2023
Принята к печати:15.04.2024