Федеральное медико-биологическое агентство

Современные представления о химико-токсикологическом анализе токсинов ядовитых грибов в клинической и судебно-медицинской токсикологии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

И.К.Журкович, Н.В.Столярова

Москва 2015

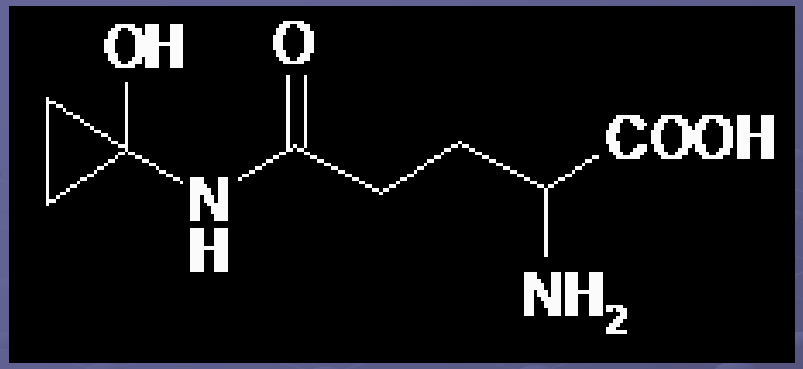
Распространённость отравлений грибами в РФ

Центрально-Черноземный, Центральный, Волго-Вятский районы, Поволжье и Северный Кавказ

Частота отравлений грибами

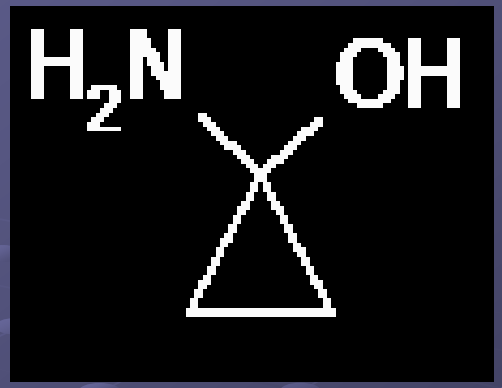
в Санкт-Петербурге по данным Центра острых отравлений и городского бюро судебно-медицинской экспертизы – от 1 до 33 случаев в год (10-летний период)

Коприн: C8H14N2O4



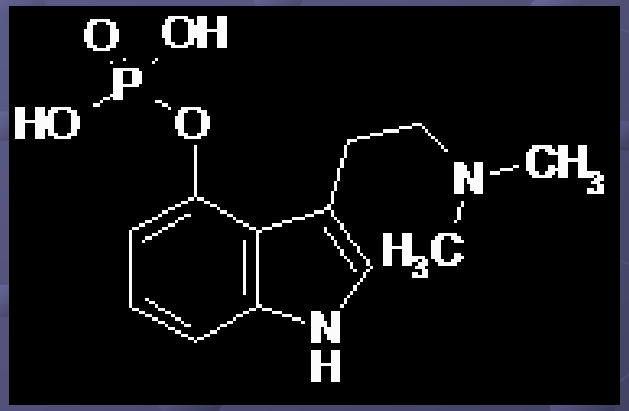
(N5-(1-гидроксициклопро-пил)-L-глутамин)

Метаболит коприна: C3H7NO



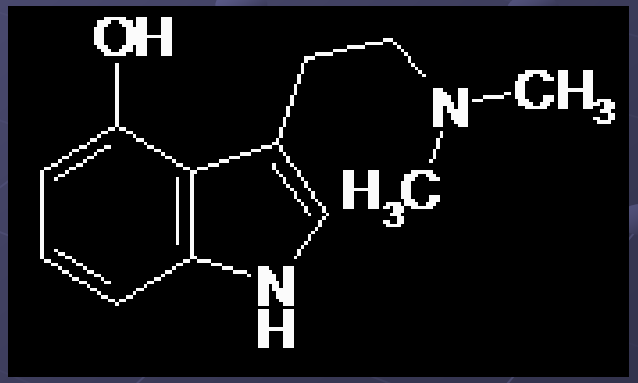
1-Аминоциклопропанол

Псилоцибин: C12H17N2O4P



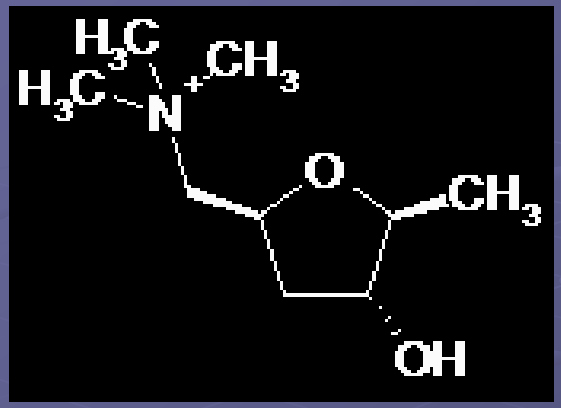
[3-(2-диметиламиноэтил)-1H-индол-4-ил] дигидрофосфат

Псилоцин: C12H16N2O



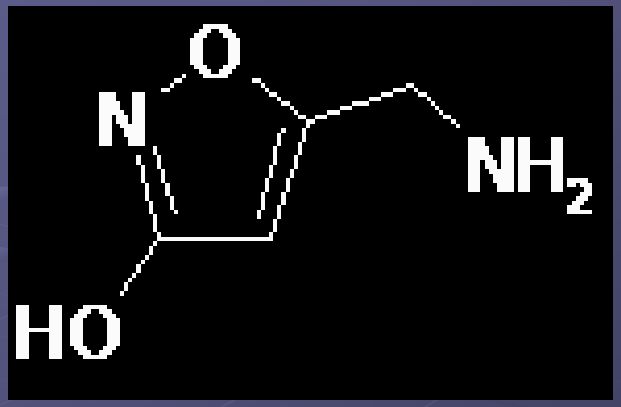
4-гидрокси-N,N-диметил-триптамин

Мускарин: C9H20NO2



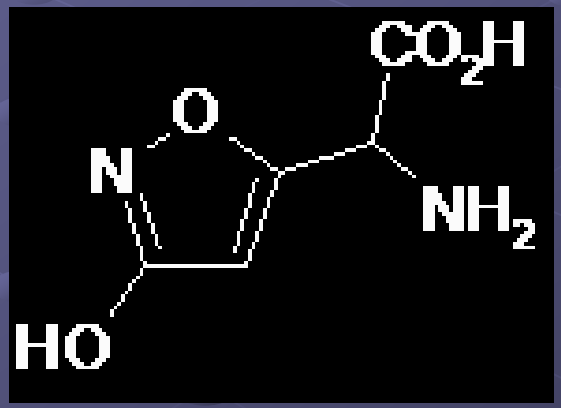
(2S,4R,5S)-(4-гидрокси-5-метил-тетрагидрофуран-2-метилил) триметил-аммоний

Мусцимол: C4H6N2O2



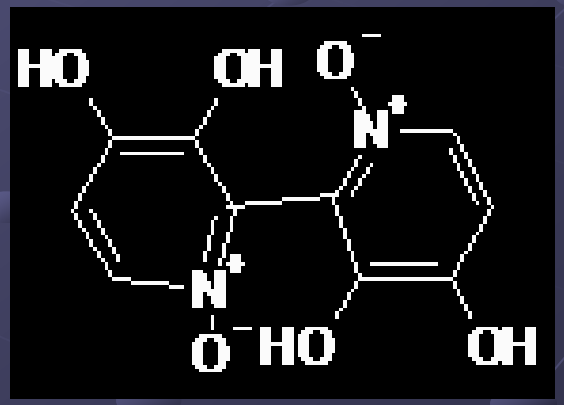
5-(аминометил)-изоксазол-3-ол

Иботеновая кислота: C5H6N2O4



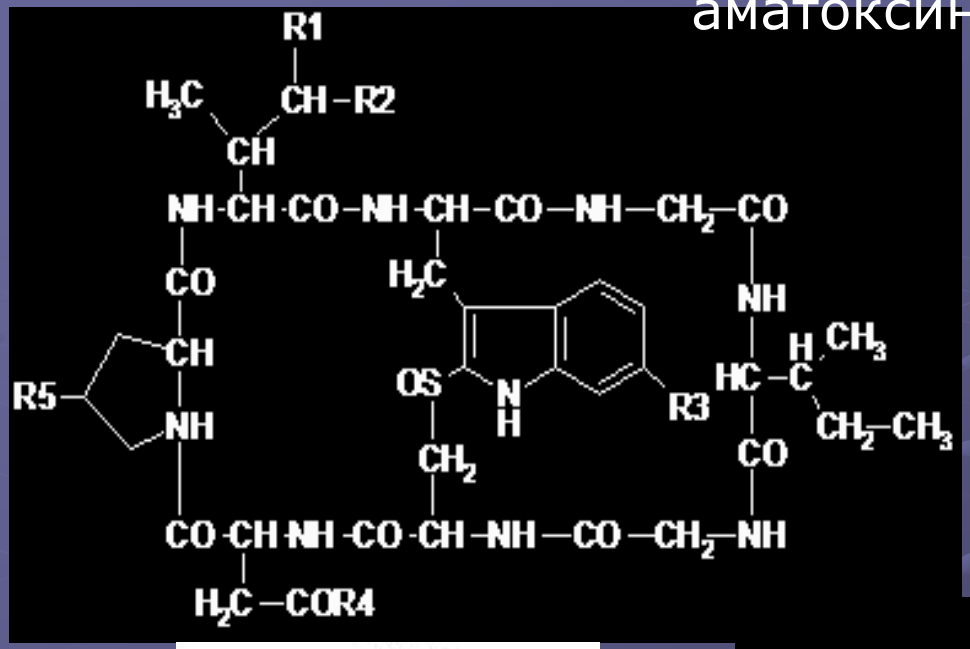
(S)-Амино-(3-гидроксиизоксазол-5-ил)-уксусная кислота

Орелланин: C10H8N2O6



3,3',4,4'-тетрагидрокси-2,2'-бипиридин-N,N'-диоксид

Структурная формула аматоксинов



Структурная формула фаллотоксинов

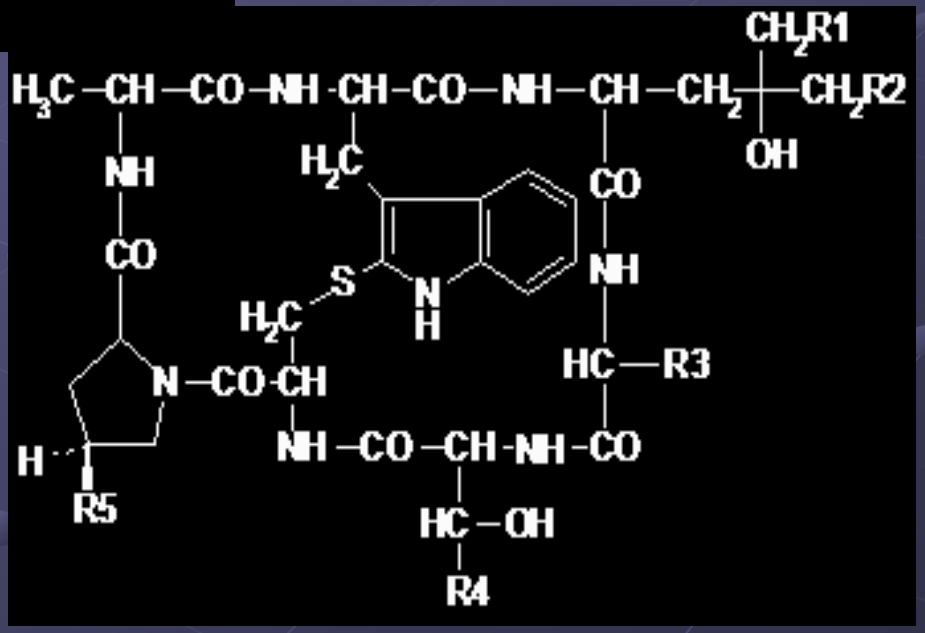
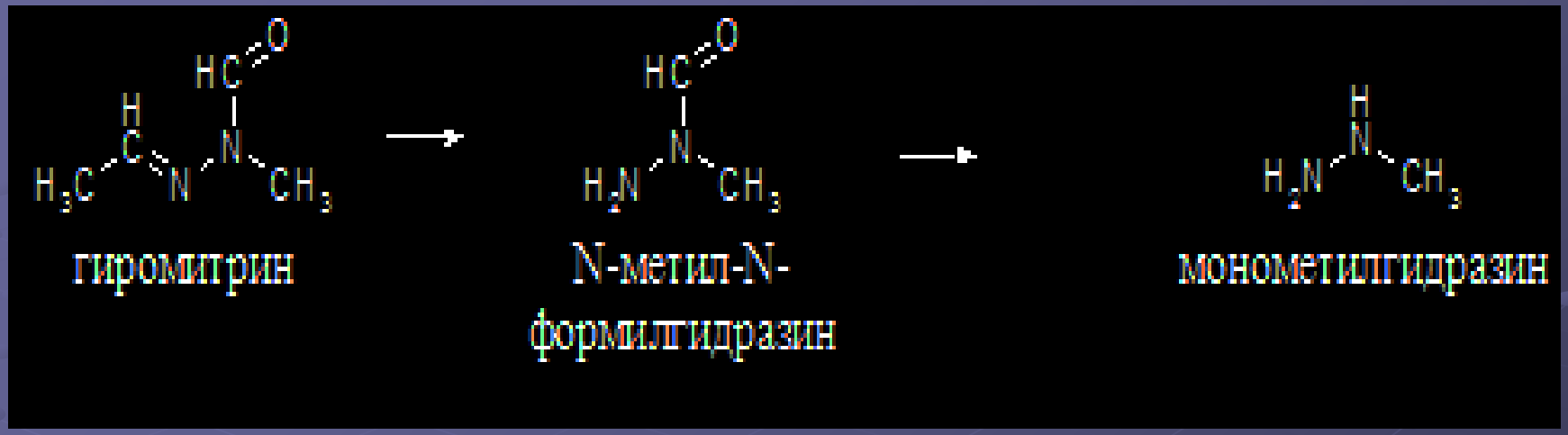


Схема биотрансформации гиромитрина



Гиромитрин-*ацетальдегид-N-метил-N-формилгидразон*

МЕТАБОЛИТЫ:

МФГ - N-метил-N-формилгидразин

ММГ - монометилгидразин

Клиническая классификация токсинов ядовитых грибов

Токсины, вызывающие разрушение клеток, с длинным латентным периодом

Циклопептиды (аманитины) - 6-24 ч
Мономеилгидразин (гиромитрин) - 6-12 ч

Токсины, поражающие вегетативную нервную систему, с коротким латентным периодом

Мускарин - 0,5- 2 ч
Коприн - 0,5 ч (после приема алкоголя), в течение 5 дней после употребления грибов

Токсины, поражающие центральную нервную систему, с коротким латентным периодом

Иботеновая кислота, мусцимол - 0,5-2 ч
Псилоцибин - 0,5-2 ч

Токсины, поражающие желудочно-кишечный тракт, с коротким латентным периодом

Токсины неизвестны - 0,5-2 ч

Токсины, поражающие почки, с длинным латентным периодом

Орелланин - 3-14 дней

Основные методы ТХА и соответствующие диапазоны минимальных уровней детектирования

№ п/п	Метод анализа	Период интенсивного применения, гг	Минимальное детектируемое количество вещества
1	Колориметрия	1950-1960	10^{-5} – 10^{-8} г (10 мкг-10 нг)
	Полярография	1950-1960	
	Бумажная хроматография	1950-1970	
	Тонкослойная хроматография (ТСХ)	1960-1980	
2	Газожидкостная хроматография (ГЖХ) с детектором электронного захвата	1980-н.в.	10^{-9} г (1 нг)
	Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектором (ВЭЖХ)	1990-н.в.	
3	ГЖХ и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) детектором	2000-н.в.	10^{-9} – 10^{-12} г (1 нг-10 пг)

Грибы, содержащие аманитины

Род	Вид
Amanita	A. phalloides, A. bisporigera, A. decipiens, A. hygroscopica, A. ocreata, A. suballiacea, A. tenuifolia, A. verna, A. virosa
Galerina	G. autumnalis , G. badipes , G. beinrothii, G. fasciculate, G. helvoliceps, G. marginata, G. sulciceps, G. unicolor, G. venenata
Lepiota	L. brunneoincarnata, L. brunneolilacea, L. castanea, L. citrophylla, L. clypeolaria. L. clypeolarioides, L. feline, L. fulvella, L. heimii, L. fuscovinacea, L. griseovirens, L. helveola, L. helveoloides, L. josserandii, L. kuehneri, L. langei, L. lilacea, L. locanensis, L. ochraceofulva, L. pseudohelveola, L. pseudolilacea, L. rufescens, L. subincarnata, L. xanthophylla

Современные сепарационные методы определения аманитинов с МС-детектированием

№ п/п	Объект исследования	Пробоподготовка	Метод Разделения Компонентов пробы	Способ МС-детектирования	Минимальное детектируемое количество аматоксинов
1	Плодовые тела грибов	Жидкостная экстракция (ЖЭ) метанолом	Капиллярный электрофорез (КЭ)	ECI-MS*, отрицательный режим ионизации	13 нг/мл (α-аманитин); 36 нг/мл (β-аманитин)
2	Моча	Иммуноафинная экстракция	ВЭЖХ	ECI-MS	2,5 нг/мл (α- и β-манитин)
3	Плодовые тела грибов	ЖЭ подкисленным метанолом с последующей твердофазной экстракцией (ТФЭ)	ВЭЖХ	ECI-TOF-MS** положительный режим ионизации	30 нг/г (α- и β-манитин)

Современные сепарационные методы определения аманитинов с МС-детектированием (продолжение)

4	Плазма крови	ТФЭ	ВЭЖХ	ECI-IT-MS***, положительный режим ионизации	0,5 нг/мл (α- и β-манитин)
5	Плазма крови, моча	ТФЭ	Ультра-эффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ)	Тандемная ECI-MS	Плазма:1,0 нг/мл (α- и β-манитин); Моча: 0,5 нг/мл (α- и β-манитин)

Примечания

1* – Ионизация электрораспылением

2** – Времяпролетный тип детектора

3*** – Детектор типа «ионная ловушка»

Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Порядок проведения химико-аналитической экспертизы объектов окружающей среды и биологических жидкостей на предмет выявления токсичных полипептидных веществ

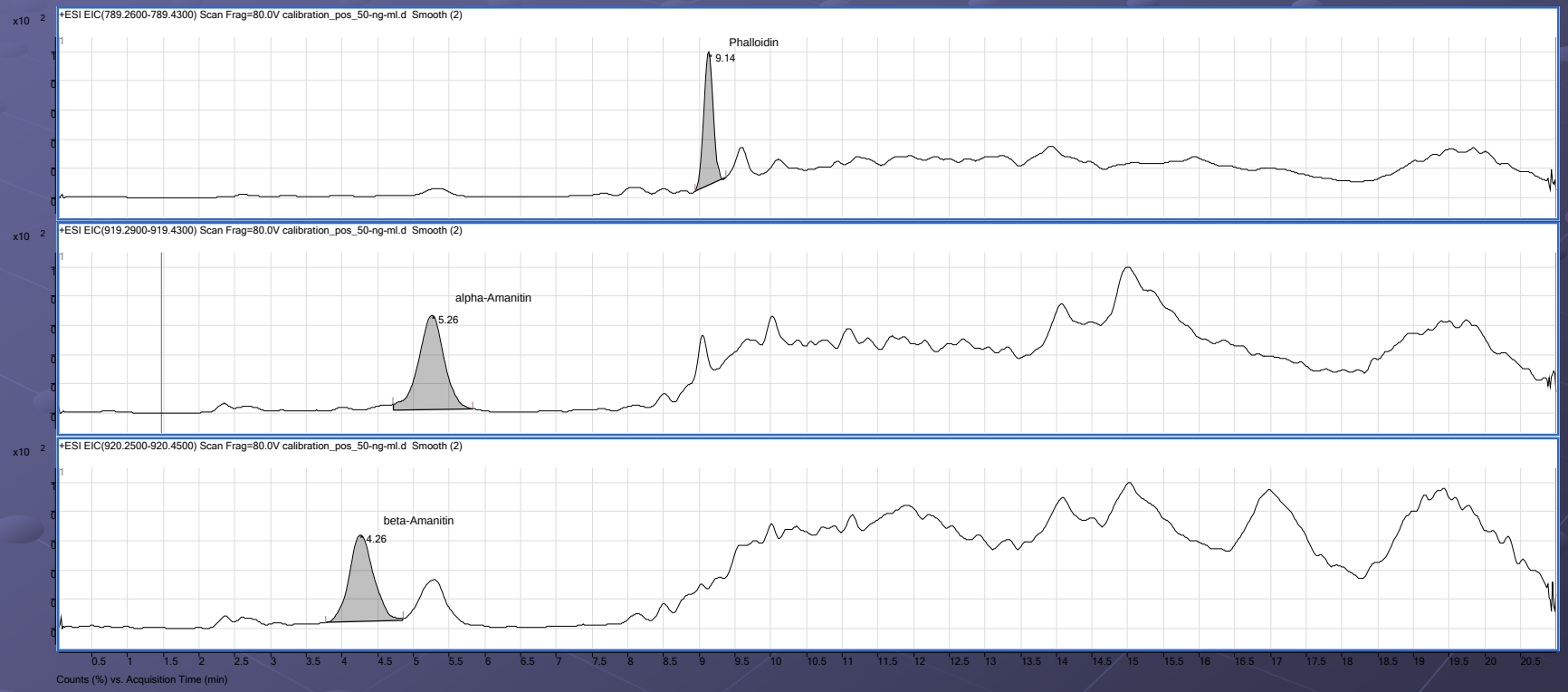
Методические рекомендации
МР ФМБА России

Москва 2013

Определение аматоксинов

- Определение α-аманитина и β-аманитина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения
- Определение α-аманитина и β-аманитина в моче методом высокоэффективной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения
- Внутренний стандарт - фаллоидин $C_{35}H_{48}N_8O_{11}S$

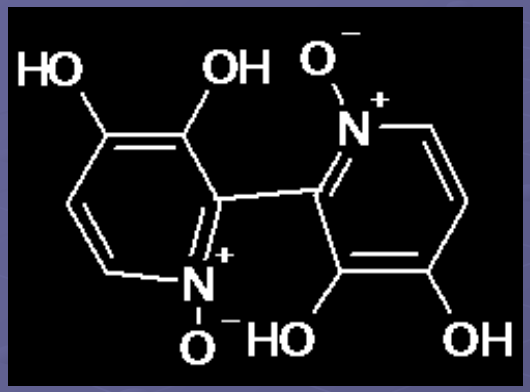
Пример хроматограммы градуировочного раствора аманитинов в плазме крови с массовой концентрацией 50 нг/мл

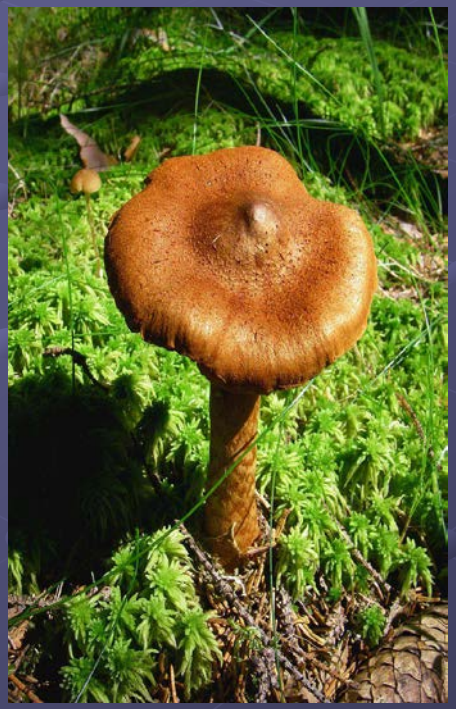


Параметры хроматографирования и детектирования

Определяемый компонент	Время удерживания, мин	Молекулярная масса иона $[M+H]^+$, Да
α-аманитин	5,3	919,3611
β-аманитин	4,3	920,3458
Фаллоидин (внутренний стандарт)	8,1	789,3241

Определение орелланина

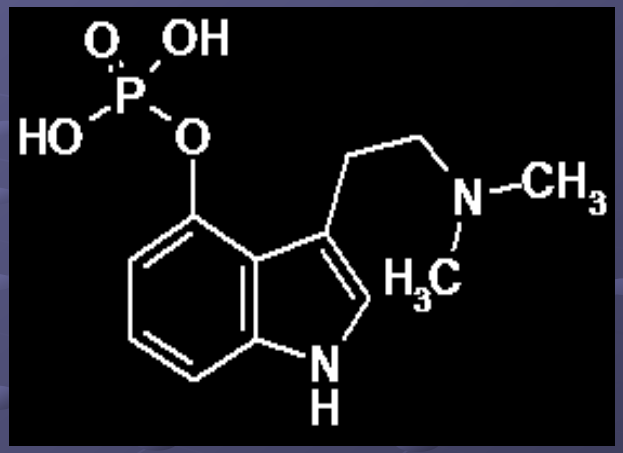




- Определение орелланина методом ГЖХ-МС
- Определение орелланина методом ВЭЖХ-МС
- Определение орелланина методом тонкослойной хроматографии

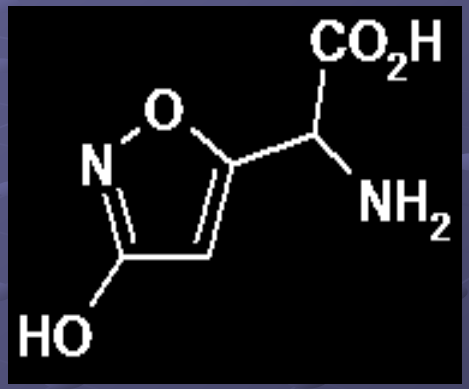
Определение псилоцибина и псилоцина

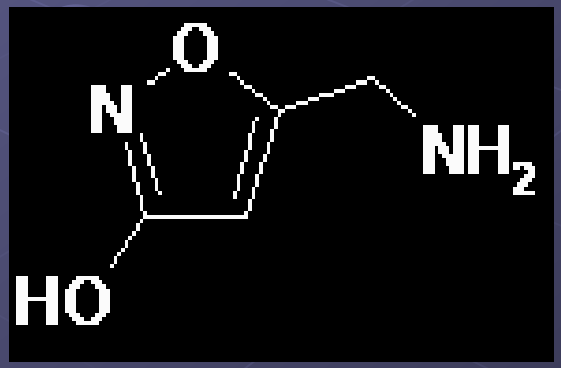
- Определение псилоцибина и псилоцина в плодовых телах грибов
- Определение псилоцибина и псилоцина в моче и в плазме крови



Определение иботеновой кислоты и мусцимола

- Определение иботеновой кислоты и мусцимола в плодовых телах грибов
- Определение иботеновой кислоты и мусцимола в плазме крови

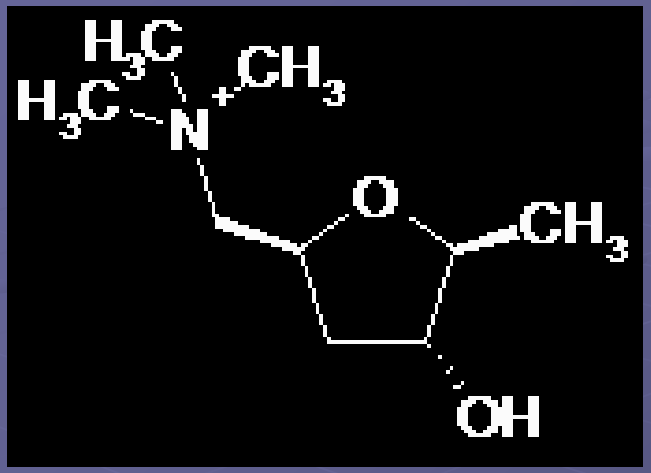




Современные методы определения иботеновой кислоты и мусцимола

№ п/п	Объект исследования	Пробоподготовка	Метод разделения компонентов пробы	Способ детектирования	Минимальное детектируемое количество токсинов
1	Плодовые тела грибов	Ультразвуковая экстракция (ЖЭ) водой	Ион-парная ВЭЖХ	Спектрофото-метрический (230 и 254 нм)	18 нг/мл (иботеновая ислота); 30 нг/мл (мусцимол)
2	Плодовые тела грибов	ЖЭ метанолом	ГЖХ, в виде продуктов силилирования	MS	10 мкг/г (иботеновая ислота); 25 мкг/г (мусцимол)
3	Плодовые тела грибов	Анионообменная ТФЭ	ВЭЖХ (HILIC)	Тандемная ECI-MS	10 мкг/г (иботеновая ислота и мусцимол)
4	Моча	Катионообменная ТФЭ	ГЖХ, в виде дериватов с этилхлор-формиатом	MS	1 мкг/мл (иботеновая ислота и мусцимол)
5	Плазма крови	Анионообменная ТФЭ	ВЭЖХ (HILIC)	Тандемная ECI-MS	1 нг/мл (иботеновая ислота); 2,5 нг/мл (мусцимол)

Определение мускарина



- Определение мускарина в плодовых телах грибов методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии

Судебно-медицинская экспертиза острых отравлений грибами

- Судебно-медицинская экспертиза смертельных отравлений
- Судебно-медицинская экспертиза несмертельных отравлений
- Судебно-медицинская экспертиза сочетанных отравлений грибами и алкоголем и/или другими веществами

Пособие «Клиника, диагностика, лечение, судебно-медицинская экспертиза отравлений грибами»

- Введение
- Общая характеристика острых отравлений грибами
- Частные вопросы отравлений грибами
- Дифференциальная диагностика отравлений грибами
- Методы лечения, используемые при отравлении грибами
- Химико-токсикологическая диагностика отравлений грибами
- Судебно-медицинская экспертиза отравлений грибами
- Заключение
- Список литературы
- Приложения

Спасибо за внимание

ФГБУН ИТ ФМБА России

И.К.Журкович, Н.В.Столярова

+7-812-365-06-80
e-mail:
institute@toxicology.ru

zhurkovich@toxicology.ru