

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМАНИТИНОВЫХ И ФАЛЛОИДИНОВЫХ ТОКСИНОВ В ГРИБАХ РОДА *AMANITA* И В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

С. М. ЛЕЩЁВ<sup>1)</sup>, Ю. Г. ПОХОДНЯ<sup>2)</sup>, А. А. АГАБАЛАЕВ<sup>3)</sup>, П. Г. ШАГОЙКО<sup>2)</sup>, М. Ф. ЗАЯЦ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, 31, 223040, Минский район, Беларусь

<sup>3)</sup>Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, пер. Товарищеский, 2а, 220037, г. Минск, Беларусь

При температуре  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  изучена экстракция аманитиновых ( $\alpha$ -аманитина,  $\beta$ -аманитина) и фаллоидиновых (фаллоидина и фаллацидина) токсинов бутанолом из воды и бутанолом и изопропанолом из водных растворов сульфата аммония и гидрофосфата калия. На основании полученных экспериментальных данных рассчитаны константы распределения токсинов, которые были использованы для разработки методики экстракционной пробоподготовки в процессе определения токсинов в грибном материале и моче человека. Показано, что для извлечения аманитиновых и фаллоидиновых токсинов из различных объектов с большим содержанием воды целесообразно использовать экстракцию бутанолом с применением высаливания сульфатом аммония вплоть до насыщенных растворов. Разработаны экстракционные методики пробоподготовки грибного материала и мочи человека для последующего определения в них токсинов методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическими детекторами типа «тройной квадруполь» и «квадруполь – орбитальная ловушка». Предел определения токсинов в моче по разработанной методике составил 1 нг/мл мочи, предел определения токсинов в грибном материале – 600 нг в 1 г сухих грибов. Относительное стандартное отклонение определения токсинов составляло порядка 25 %.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -аманитин;  $\beta$ -аманитин; фаллоидин; фаллацидин; бледная поганка; токсины; жидкостная хроматография; масс-спектрометрия; экстракция; константы распределения.

### Образец цитирования:

Лещёв СМ, Походня ЮГ, Агабалаев АА, Шагойко ПГ, Заяц МФ. Разработка методики определения аманитиновых и фаллоидиновых токсинов в грибах рода *Amanita* и в моче человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2023;1:58–67.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2023-1-58-67>

### For citation:

Leschev SM, Pakhadnia YG, Ahabalaye AA, Shahoika PG, Zayats MF. Development of a method for the determination of amanitin and phalloidin toxins in *Amanita* fungi and in human urine. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2023;1:58–67. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2023-1-58-67>

### Авторы:

**Сергей Михайлович Лещёв** – доктор химических наук, профессор; профессор кафедры аналитической химии химического факультета.

**Юрий Георгиевич Походня** – кандидат биологических наук, доцент; директор.

**Александр Андреевич Агабалаев** – кандидат химических наук; заместитель заведующего лабораторией фармакопейного и фармацевтического анализа.

**Павел Георгиевич Шагойко** – химик отдела антидопинговых испытаний.

**Михаил Фёдорович Заяц** – доктор химических наук, доцент; заведующий кафедрой аналитической химии химического факультета.

### Authors:

**Sergey M. Leschev**, doctor of science (chemistry), full professor; professor at the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.

[leschev.sergey54@gmail.com](mailto:leschev.sergey54@gmail.com)

<http://orcid.org/0000-0001-5378-1718>

**Yury G. Pakhadnia**, PhD (biology), docent; director.

[pohodnia@list.ru](mailto:pohodnia@list.ru)

<http://orcid.org/0000-0002-7972-7784>

**Aliaksandr A. Ahabalaye**, PhD (chemistry); deputy head of the laboratory of pharmacopoeial and pharmaceutical analysis.

[alexandrmalbox@inbox.ru](mailto:alexandrmalbox@inbox.ru)

<http://orcid.org/0000-0003-3201-3511>

**Pavel G. Shahoika**, chemist at the anti-doping testing department.

[pavell1sg@gmail.com](mailto:pavell1sg@gmail.com)

<http://orcid.org/0000-0002-0087-4942>

**Mikhail F. Zayats**, doctor of science (chemistry), docent; head of the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.

[mikhail\\_zayats@tut.by](mailto:mikhail_zayats@tut.by)

<https://orcid.org/0000-0002-8400-6359>

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMANITIN AND PHALLOIDIN TOXINS IN AMANITA FUNGI AND IN HUMAN URINE

S. M. LESCHEV<sup>a</sup>, Y. G. PAKHADNIA<sup>b</sup>, A. A. AHABALAYEU<sup>c</sup>, P. G. SHAHOIKA<sup>b</sup>, M. F. ZAYATS<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

<sup>b</sup>National Anti-Doping Laboratory, 31 Liasny, Minsk Region 223040, Belarus

<sup>c</sup>Center for Examinations and Tests in Health Service, 2a Tavaryski Lane, Minsk 220037, Belarus

Corresponding author: M. F. Zayats (mikhail\_zayats@tut.by)

At the temperature ( $20 \pm 1$ ) °C, the extraction of amanitin ( $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin) and phalloidin (phalloidin and phalloctidin) toxins with butanol from water and with butanol and isopropanol from aqueous solutions of ammonium sulfate and potassium hydrogen phosphate was studied. On the basis of the obtained experimental data, the distribution constants of toxins were calculated, which were used to develop a technique for extraction sample preparation in the process of determining toxins in fungal material and human urine. It has been shown that for the extraction of amanitin and phalloidin toxins from various objects with a high water content, it is advisable to use extraction with butanol using salting out with ammonium sulfate up to saturated solutions. Extraction techniques have been developed for sample preparation of fungal material and human urine for the subsequent determination of toxins in them by liquid chromatography with mass spectrometric detectors such as «triple quadrupole» and «quadrupole – orbital trap». The technique for the determination of toxins in urine is characterised by a limit of quantification of about 1 ng/mL of urine, the technique for the determination of toxins in mushroom material – 600 ng in 1 g of dry mushrooms. The relative standard deviation of the determination of toxins is about 25 %.

**Keywords:**  $\alpha$ -amanitine;  $\beta$ -amanitine; phalloidin; phalloctidin; death cap; toxins; liquid chromatography; mass spectrometry; extraction; distribution constants.

### Введение

Дикорастущие грибы широко используются в пищевом рационе населения. Однако существует много несъедобных грибов, которые являются чрезвычайно опасными и могут быть по ошибке приняты за съедобные. Употребление их в пищу приводит к серьезным пищевым отравлениям [1–4].

Наибольшую сложность представляют интоксикации, вызванные гепатотоксинами, содержащимися в грибах рода *Amanita*. Такие интоксикации могут приводить к необходимости трансплантации печени или даже к фатальным последствиям. Одним из самых известных и токсичных представителей грибов рода *Amanita* является *Amanita phalloides*, или бледная поганка [1–4].

Основные токсины в грибах *Amanita* представляют собой циклопептиды [4–8]. По меньшей мере восемь бициклических октапептидов аматоксинов и семь гептапептидов фаллотоксинов были идентифицированы в бледной поганке [4–8].

Ограниченные временные рамки при токсических состояниях, вызванных употреблением грибов, затрудняют диагностику пациентов, находящихся в зоне риска летальной токсичности. Идентификация отравлений аманитинами осложняется задержкой в проявлении симптомов и трудностями, связанными с идентификацией грибов [1; 2].

Таким образом, актуальным представляется быстрое и надежное выявление токсинов непосредственно в грибах и в биологических жидкостях человека при проведении клинико-лабораторной диагностики для возможности принятия своевременных решений по сохранению здоровья и назначению лечения.

Определение грибных токсинов в настоящее время осуществляется методами иммуноферментного анализа [4; 9; 10], тонкослойной хроматографии [4; 10], высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4; 11–17], в том числе с масс-спектрометрическим детектированием (МС) [4; 12–17], а также ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) с масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР) и др. [4].

Наибольшее распространение при определении грибных токсинов как в грибном сырье, так и в биологических жидкостях человека получил метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС) благодаря высокой селективности, чувствительности и экспрессности метода [4; 12–17].

Для диагностики отравлений бледной поганкой анализируют различные биологические жидкости человека, такие как моча, сыворотка и плазма [4].

Согласно токсикокинетическим исследованиям основная доля токсинов (60–80 %) фильтруется через гломерулы и, как следствие, концентрации аматоксинов в моче гораздо выше, чем в сыворотке. Мониторинг концентраций токсина в моче возможен в течение первых 8 ч и последующих 3–4 дней после употребления ядовитого гриба [8].

Моча человека и особенно грибы представляют собой довольно сложные объекты для исследования. Так, моча содержит множество солей органической и неорганической природы, мочевины, продукты метаболизма и др. Грибы содержат огромное количество веществ самой разной природы и разного строения: полисахариды, белки, алкалоиды, липиды, полифосфаты и другие органические соединения. Эти матричные соединения могут оказывать заметное мешающее влияние на регистрируемые сигналы аналитов, осаждаются в капиллярах, колонке, детекторе хроматографа, приводя к их загрязнению, а также к повышенному износу и сокращению срока службы дорогостоящих узлов оборудования [16].

С учетом актуальности описанных проблем целью данной работы являлась разработка методики экстракционной пробоподготовки, включающей очистку и концентрирование целевых соединений, для последующего определения аманитиновых и фаллоидиновых токсинов в грибах рода *Amanita*, а также в моче человека в сверхнизких концентрациях с использованием ЖХ-МС.

### Экспериментальная часть

**Реактивы.** Использовали следующие стандартные образцы веществ (рис. 1):  $\alpha$ -аманитин ( $\geq 95$  %; *AppliChem*, Германия);  $\beta$ -аманитин ( $\geq 95$  %; *Cayman Chemical*, США); фаллацидин ( $\geq 90$  %; *Cayman Chemical*); фаллоидин ( $\geq 95$  %; *AppliChem*); азитромицин (*EDQM*, Франция); эфир диэтиловый («х. ч.»; «ЛенРеактив», Россия); хлороформ («ч. д. а.»; «ЛенРеактив»); этилацетат для ВЭЖХ ( $\geq 99,9$  %; *Sigma-Aldrich*, США); бутанол для ВЭЖХ ( $\geq 99,9$  %; *Thermo Scientific*, США); метанол для ВЭЖХ ( $\geq 99,9$  %; *Sigma-Aldrich*); ацетонитрил для ВЭЖХ ( $\geq 99,9$  %; *Sigma-Aldrich*); ацетон («ч. д. а.»; «ЛенРеактив»); дигидрофосфат натрия ( $> 99,5$  %; *Fluka*, США); гидрофосфат динатрия ( $> 98$  %; *Sigma-Aldrich*); муравьиную кислоту ( $\geq 99,8$  %; *Fluka*); ацетат аммония ( $\geq 99,0$  %; *Sigma-Aldrich*); уксусную кислоту ( $\geq 99,0$  %; *Honeywell*, США).

Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды Milli-Q (*Millipore*, США). Источником газообразного азота с чистотой газа не менее 99,9 % служил генератор азота (*PEAK Scientific*, США).

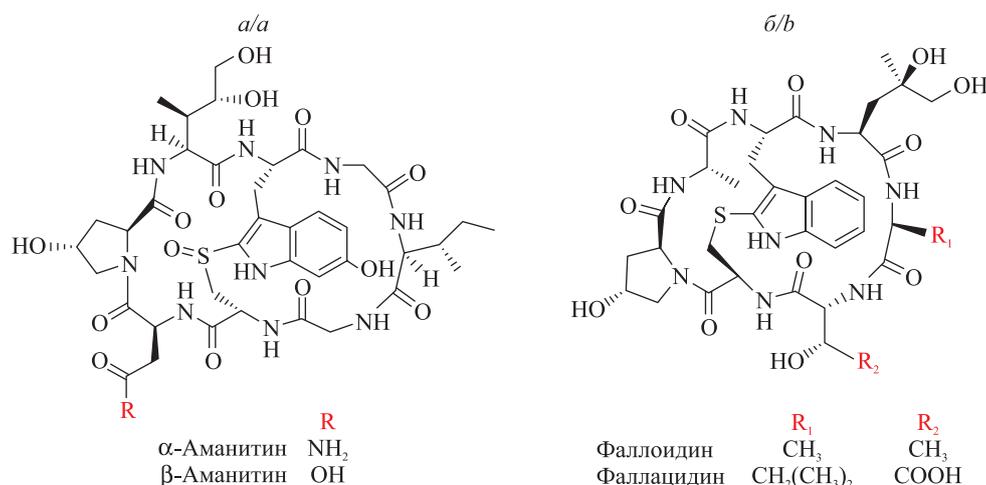


Рис. 1. Молекулярные структуры исследованных токсинов (а, б)

Fig. 1. Molecular structures of the studied toxins (a, b)

**Аппаратура.** ЖХ-МС-анализ проводили методом ВЭЖХ-МС на высокоэффективном жидкостном хроматографе Surveyor Plus (*Thermo Fisher Scientific*, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» TSQ Quantum Access (*Thermo Fisher Scientific*) и с устройством автоматического ввода жидких проб Surveyor Autosampler Plus (*Thermo Fisher Scientific*), а также методом УЭЖХ-МСВР на ультраэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 (*Thermo Fisher Scientific*) с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения типа «квадруполь – орбитальная ловушка» Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (*Thermo Fisher Scientific*) и с устройством автоматического ввода жидких проб Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler (*Thermo Fisher Scientific*).

Разделение веществ осуществляли на хроматографической колонке длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм с нанесенной неподвижной фазой Hypersyl BDS толщиной 3 мкм (*Thermo Fisher Scientific*) в случае с ВЭЖХ-МС и на хроматографической колонке длиной 30 мм, внутренним диаметром 2,1 мм с нанесенной неподвижной фазой Kinetex C18 толщиной 1,7 мкм (*Phenomenex*, США) в случае с УЭЖХ-МСВР.

**Условия хроматографического разделения и детектирования.** В качестве подвижной фазы А использовали 10 ммоль/л ацетат аммония с 0,1 % муравьиной кислотой, в качестве подвижной фазы В – 0,1 % муравьиную кислоту в ацетонитриле. Разделение выполняли в градиентном режиме.

В случае с ВЭЖХ поток подвижной фазы поддерживали постоянным при 0,25 мл/мин. Содержание компонента В в составе подвижной фазы изменяли следующим образом: 0 мин – 3 %, 10 мин – 10 %, 15 мин – 10 %, 16 мин – 13 %, 18 мин – 15 %, 28 мин – 100 %, 32 мин – 100 %, 33 мин – 3 %, 42 мин – 3 %.

В случае с УЭЖХ поток и содержание компонента В в составе подвижной фазы изменяли следующим образом: 0 мин – 0,35 мл/мин, 10 %; 1 мин – 0,35 мл/мин, 10 %; 1,01 мин – 0,40 мл/мин, 10 %; 4 мин – 0,40 мл/мин, 40 %; 4,5 мин – 0,40 мл/мин, 95 %; 5,8 мин – 0,40 мл/мин, 95 %; 5,9 мин – 0,40 мл/мин, 10 %; 7,5 мин – 0,35 мл/мин, 10 %.

Условия ионизации (ВЭЖХ-МС и УЭЖХ-МСВР) были следующие:

- режим ионизации – положительная ионизация в электроспрее;
- напряжение капилляра – 3,5 кВ для МС высокого разрешения и 4,5 кВ для МС низкого разрешения;
- температура капилляра – 300 °С;
- анализатор – орбитальная ловушка для МС высокого разрешения и тройной квадруполь для МС низкого разрешения;
- режим сканирования – полное сканирование (full scan) в диапазоне отношений массы к заряду ( $m/z$ ) ионов 700,000–900,000 для МС высокого разрешения и SRM-режим в случае использования МС низкого разрешения;
- разрешение – 70 000 для МС высокого разрешения.

При определении токсинов грибов дополнительные настройки масс-детекторов, в том числе времена удерживания аналитов, значения  $m/z$  ионов при различных режимах регистраций, величины коллизионной энергии (КЭ), приведены в табл. 1.

Таблица 1

Настройки масс-детекторов при определении токсинов грибов

Table 1

Mass detector settings for the determination of fungal toxins

Соединение	Оборудование	Время удерживания, мин	Режим регистрации	Квазимолекулярный ион [M + H] <sup>+</sup>	Дочерние ионы, $m/z$	КЭ, В
α-Аманитин	УЭЖХ-МСВР	1,15	Full scan	919,361	–	–
	ВЭЖХ-МС	19,05	SRM	919,0	901,0; 259,0	25
β-Аманитин	УЭЖХ-МСВР	0,99	Full scan	920,345	–	–
	ВЭЖХ-МС	17,83	SRM	920,0	902,0; 259,0	25
Фаллоидин	УЭЖХ-МСВР	3,14	Full scan	789,324	–	–
	ВЭЖХ-МС	26,73	SRM	789,0	771,0; 753,0	25
Фаллацидин	УЭЖХ-МСВР	3,18	Full scan	847,329	–	–
	ВЭЖХ-МС	26,74	SRM	847,0	829,0; 811,0; 783,0	25
Азитромицин (внутренний стандарт)	УЭЖХ-МСВР	3,64	Full scan	749,516	–	–
	ВЭЖХ-МС	29,32	SRM	749,0	434,0; 591,0	30

Одной из существенных проблем, связанных с масс-спектрометрическим детектированием, была взаимная интерференция α- и β-аманитина. Эти соединения имеют очень близкие структурные формулы, и, что имеет более важное значение, различие в значениях  $m/z$  составляет менее 1 Да. Масс-анализатор низкого разрешения типа «тройной квадруполь» не позволил достоверно распознать данные соединения между собой ввиду малого различия  $m/z$  родительских ионов (ионов-прекурсоров) и ввиду равного  $m/z$  (259,0) дочерних ионов.

Использование прибора высокого разрешения с масс-анализатором типа «орбитальная ловушка», благодаря детектированию  $m/z$  квазимолекулярных ионов  $[M + H]^+$  с высокой точностью (вплоть до второго-третьего знака после запятой), позволило отдельно определять  $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитины даже в случае их неполного разделения. В табл. 3 приведены значения  $m/z$  ионов, по которым и выполнялась регистрация.

**Выбор внутреннего стандарта.** Для контроля этапов пробоподготовки, работы хроматографической системы (точность ввода пробы, смешение элюентов и т. д.), а также для учета влияния матрицы на сигнал детектора использовали внутренний стандарт – азитромицин.

Азитромицин – антибиотик макролидной группы с молекулярной массой 749 г/моль, близкой к молекулярной массе исследуемых токсинов. Азитромицин имеет сходные с фаллоидинами параметры удерживания на применяемых хроматографических колонках и хорошо ионизируется в электроспрее.

Для управления хромато-масс-спектрометрами, а также для обработки данных использовали программное обеспечение *Xcalibur* версии 4.1.

**Объекты исследования.** В качестве объектов исследования для разработки методик пробоподготовки при определении токсинов грибов использовали мочу здоровых добровольцев и грибы. Образцы грибов были собраны в Березинском биосферном заповеднике, а также в Минской и Могилёвской областях Республики Беларусь. В анализируемых образцах моделировали содержание токсинов путем добавления рассчитанного количества метанольных растворов стандартных образцов, включая внутренний стандарт. После этого испытуемые образцы подвергались процедурам пробоподготовки.

**Метод «разбавь и введи» с предварительным осаждением белков.** В ходе исследований было обнаружено, что пробоподготовка образцов мочи путем разбавления в 3–6 раз подвижной фазой, при котором происходит осаждение белков, с последующим центрифугированием и фильтрованием позволяет определять  $\alpha$ -аманитин на уровне 100 нг/мл методом ВЭЖХ-МС и на уровне 10 нг/мл методом УЭЖХ-МСВР.

Для снижения нижнего предела определения токсинов требуется более эффективная пробоподготовка, включающая концентрирование аналитов и очистку образцов от матричных компонентов. В настоящей работе разрабатывались методики пробоподготовки, основанные на одном из наиболее простых, эффективных и недорогих методов – жидкостной экстракции. Для определения оптимальных условий проведения экстракционной пробоподготовки свою целесообразность продемонстрировал подход, заключающийся в первоначальном нахождении констант распределения аналитов и последующем их использовании при выборе наиболее эффективной экстракционной системы [18].

### Определение констант распределения

Аманитины и фаллоидины содержат в своей структуре множество полярных функциональных групп, что говорит об их чрезвычайной гидрофильности и возможности их извлечения из водных растворов только достаточно полярными органическими растворителями, такими как низшие спирты, способными сольватировать множество полярных функциональных групп, входящих в молекулы токсинов. Следовательно, целесообразно исследовать экстракцию данных токсинов спиртами, а также использовать сильные высаливатели для снижения растворимости токсинов в воде и повышения эффективности их извлечения.

Константы распределения  $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитина, фаллоидина и фаллацидина в экстракционных системах бутанол – вода, бутанол – водные растворы неорганических солей и изопропанол – водные растворы неорганических солей определяли при равновесной концентрации токсинов в спиртовых и водных растворах не более 500 нг/мл при температуре  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Экстракцию проводили путем перемешивания на ротационном миксере при скорости вращения 35 об/мин в течение 15 мин. После экстракции образцы центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин.

В случае с системой бутанол – вода отбирали в чистые пробирки по 1 мл водной и органической фазы. Собранные фазы выпаривали в токе азота досуха и растворяли сухой остаток в подходящем объеме подвижной фазы для последующего ввода в хромато-масс-спектрометр.

Для исследования влияния высаливателя на экстракционное равновесие готовили водные растворы смеси токсинов с концентрациями 500 нг/мл. Далее к 8 мл водного раствора добавляли точно взвешенное количество сульфата аммония и гидрофосфата калия так, чтобы получить 1 моль/л, 2 моль/л, 3 моль/л и 4 моль/л растворы сульфата аммония и 1 моль/л, 2 моль/л, 3 моль/л и 4 моль/л растворы гидрофосфата калия. После растворения соли к водному раствору добавляли 8 мл бутанола. После первой экстракции бутанольную фазу отделяли, выпаривали в токе азота досуха, сухой остаток растворяли в 5 мл подвижной фазы. К водной фазе добавляли 8 мл новой порции бутанола. После второй экстракции бутанольную фазу отделяли, выпаривали в токе азота досуха, сухой остаток растворяли в 0,5 мл подвижной фазы. Затем образцы анализировали на системе УЭЖХ-МСВР.

Константы распределения токсинов ( $P$ ) в экстракционной системе бутанол – вода рассчитывали в трехкратном повторении по равновесным концентрациям токсина в обеих фазах при соотношении объемов фаз бутанола и воды, равном 1 : 1, согласно уравнению

$$P = \frac{C_{\text{орг}}}{C_{\text{водн}}},$$

где  $C_{\text{орг}}$  и  $C_{\text{водн}}$  – равновесные концентрации распределяемого вещества в органической и водной фазах соответственно.

Расчет констант распределения токсинов в системах спирт – водно-солевые растворы проводили по уравнению

$$P = \frac{C_{\text{орг}}}{C_{\text{водн}}} = \frac{C_{\text{орг-1}} V_{\text{водн-1}} - C_{\text{орг-2}} V_{\text{водн-2}}}{C_{\text{орг-2}} V_{\text{орг-2}}},$$

где  $C_{\text{орг-1}}$  и  $C_{\text{орг-2}}$  – равновесные концентрации распределяемого вещества в спиртовой органической фазе при первой и второй экстракции спиртом соответственно;  $V_{\text{водн-1}}$ ,  $V_{\text{водн-2}}$  – объемы равновесных водных фаз при первой и второй экстракции соответственно;  $V_{\text{орг-2}}$  – объем равновесной органической фазы при второй экстракции спиртом.

Относительные стандартные отклонения (ОСКО) рассчитанных констант распределения не превышали 25 %.

### Результаты и их обсуждение

В табл. 2 и 3 приведены полученные значения констант распределения четырех исследованных токсинов грибов в экстракционных системах 1-бутанол – вода и 1-бутанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия, а также 2-пропанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия.

Таблица 2

Логарифмы констант распределения  $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитина, фаллоидина и фаллацидина в экстракционных системах 1-бутанол – вода и 1-бутанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия

Table 2

Logarithms of distribution constants of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitin, phalloidin, and phallacidin in extraction systems 1-butanol – water and 1-butanol – aqueous solutions of ammonium sulfate and potassium hydrophosphate

Полярная фаза	$\lg P$			
	$\alpha$ -Аманитин	$\beta$ -Аманитин	Фаллоидин	Фаллацидин
Вода	-0,3	-0,7	0,1	-0,9
$C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$				
1 моль/л	0,3	0,3	0,7	0,5
2 моль/л	1,4	1,5	1,6	1,4
3 моль/л	1,9	2,0	2,1	2,0
4 моль/л	2,4	2,5	2,4	2,4
$C_{\text{K}_2\text{HPO}_4}$				
1 моль/л	0,8	0,8	1,4	0,9
2 моль/л	2,0	1,9	1,6	1,5
3 моль/л	2,6	2,4	1,6	1,7
4 моль/л	2,3	2,3	1,8	1,8

Примечание.  $n = 3$ , ОСКО ( $P$ )  $\leq 25$  %.

Таблица 3

Логарифмы констант распределения  $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитина, фаллоидина и фаллацидина в экстракционных системах 2-пропанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия

Table 3

Logarithms of distribution constants of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitin, phalloidin and phalloidin in extraction systems 2-propanol – aqueous solutions of ammonium sulfate and potassium hydrophosphate

Полярная фаза	lgP			
	$\alpha$ -Аманитин	$\beta$ -Аманитин	Фаллоидин	Фаллацидин
$C_{(NH_4)_2SO_4}$				
1 моль/л	1,4	1,5	1,5	1,7
2 моль/л	2,0	2,0	1,8	2,4
3 моль/л	2,4	2,2	2,4	2,5
4 моль/л	2,7	2,7	2,6	2,6
$C_{K_2HPO_4}$				
1 моль/л	1,3	1,4	1,4	1,6
2 моль/л	2,3	2,2	1,8	2,4
3 моль/л	2,5	2,5	2,0	2,5
4 моль/л	2,7	2,6	2,3	2,6

Примечание.  $n = 3$ , ОСКО ( $P$ )  $\leq 25$  %.

Из данных, приведенных в табл. 4, видно, что изученные токсины являются гидрофильными веществами и величины логарифмов их констант распределения в системе 1-бутанол – вода меньше (аманитины, фаллацидин) или немного больше нуля (фаллоидин). Гидрофильность токсинов связана с наличием в структуре их молекул гидрофильных полярных групп: амидных, гидроксильных, карбоксильных и др. Это препятствует их эффективному извлечению из водных растворов даже экстракцией таким активным экстрагентом, как бутанол.

Добавка сульфата аммония и гидрофосфата калия к воде приводит к заметному росту констант распределения изученных токсинов – на 2–3 логарифмические единицы и более (см. табл. 2 и 3). При этом логарифмы констант распределения становятся существенно больше единицы, что позволяет их количественно (>95 %) извлекать путем однократной экстракции с возможностью одновременного концентрирования (при  $\lg P > 1,3$ ).

Из данных табл. 2 и 3 видно, что с ростом концентрации сульфата аммония в водной фазе константы распределения изученных токсинов увеличиваются в экстракционных системах как с участием 1-бутанола, так и с участием 2-пропанола. При этом скорость увеличения  $\lg P$  снижается с ростом концентрации сульфата аммония. Возможно, это связано с уменьшением содержания воды в спиртовой фазе и, как следствие, приводит к снижению сольватации большого количества полярных групп, содержащихся в молекулах токсинов, в спиртовой фазе. Данный эффект менее заметен в случае с 2-пропанолом из-за его большей гидрофильности и более сильной конкуренции за молекулы воды с солью. Важно отметить, что в случае использования 1-бутанола для экстракции объемы фаз экстракционных систем изменяются незначительно (не более 10 %), а в случае применения 2-пропанола и при низкой концентрации соли в водной фазе изменяются существенно (вплоть до 1,5–2,3 раза).

С увеличением концентрации гидрофосфата калия в водной фазе константы распределения изученных токсинов также в основном увеличиваются в экстракционных системах как с участием 1-бутанола, так и с участием 2-пропанола. Стоит отметить, что в слабощелочной среде водных растворов гидрофосфата калия может происходить диссоциация карбоксильных групп, входящих в структуры молекул  $\beta$ -аманитина и фаллацидина, что будет препятствовать их извлечению из водных растворов. В то же время при малых концентрациях соли в водном растворе растворимость 1-бутанола и особенно 2-пропанола достаточно высокая, что препятствует диссоциации карбоксильных групп.

Таким образом, для извлечения аманитиновых и фаллоидиновых токсинов из различных объектов с большим содержанием воды целесообразно использовать экстракцию бутанолом с применением выщелачивания сульфатом аммония вплоть до насыщенных растворов.

На основании полученных констант распределения были разработаны экстракционные методики пробоподготовки для определения токсинов в моче человека и в грибах.

**Схема пробоподготовки образцов мочи.** К 3 мл мочи добавить избыток сульфата аммония (>2,3 г, до насыщения) и перемешать до растворения основной массы соли. Затем добавить 4 мл бутанола и экстрагировать на ротационной мешалке в течение 10 мин при скорости 30 об/мин. Степени извлечения токсинов из водного раствора в соответствии с величинами констант распределения составляют более 99,5 %. После экстракции образцы отцентрифугировать при 5000 об/мин в течение 5 мин, органическую фазу перенести в чистые пробирки, выпарить при 50 °С в токе азота и затем перерастворить в 100 мкл раствора подвижной фазы. Полученный раствор перенести в пробирку типа «эппендорф» вместимостью 1,5 мл и дополнительно отцентрифугировать при 15 000 об/мин. Далее отобрать раствор над осадком и перенести в виалы для анализа методом УЭЖХ-МСВР.

Использование экстракционной пробоподготовки позволяет определять концентрации токсинов с ПКО, равным 1 нг/мл. Хроматограммы образца мочи с содержанием токсинов 1 нг/мл, подготовленного по описанной выше методике, приведены на рис. 2.

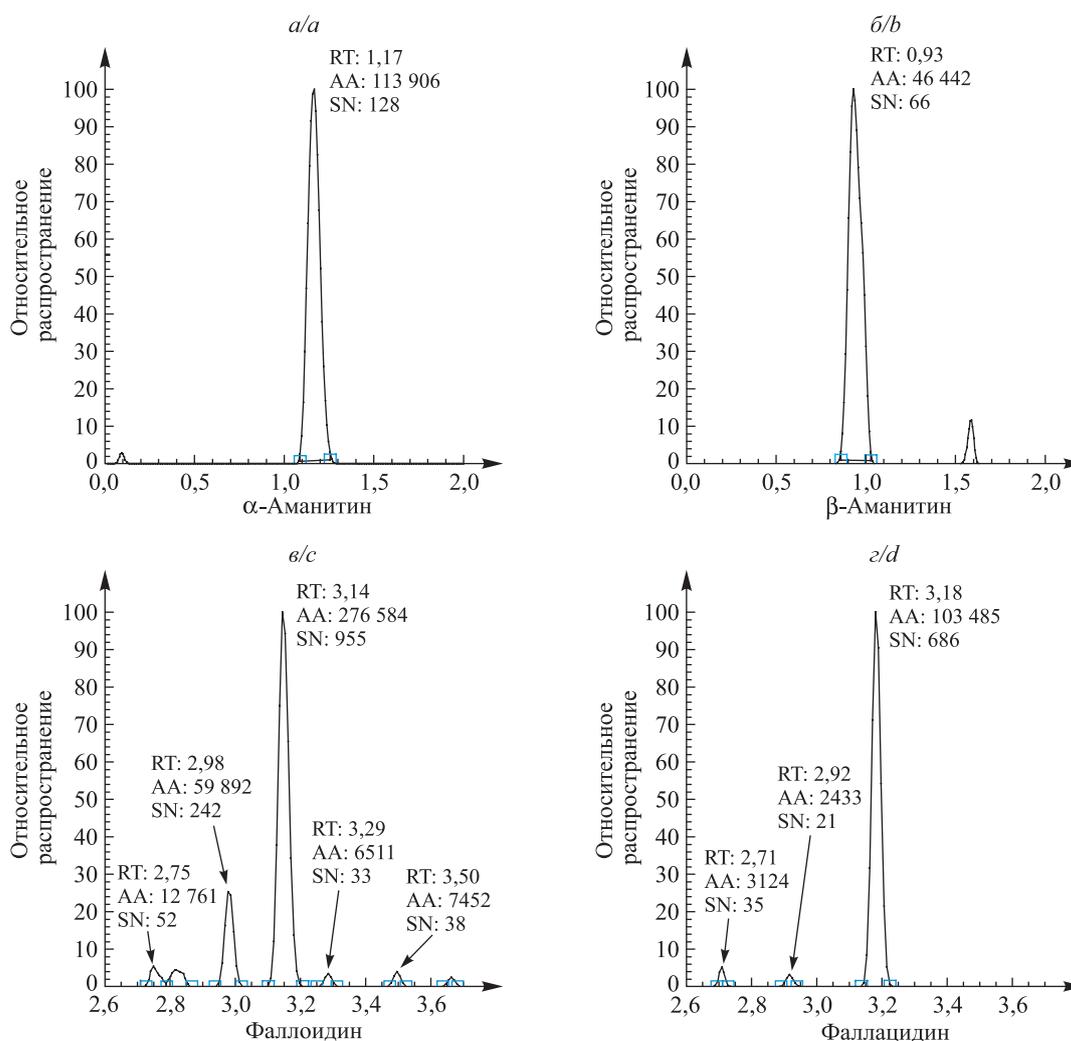


Рис. 2. Хроматограммы образца мочи с содержанием 1 нг/мл  $\alpha$ -аманитина (а),  $\beta$ -аманитина (б), фаллоидина (в) и фаллацидина (г), подготовленного по разработанной методике: RT – время удерживания; AA – абсолютная площадь; SN – отношение сигнала к шуму

Fig. 2. Chromatograms of a urine sample containing of 1 ng/mL  $\alpha$ -amanitin (a),  $\beta$ -amanitin (b), phalloidin (c) and phallacin (d), prepared according to the developed method: RT – retention time; AA – absolute area; SN – signal to noise ratio

**Схема пробоподготовки образцов грибов.** Свежесобранные грибы высушить до постоянной массы при 50 °С. Сразу после высушивания грибной материал тщательно гомогенизировать в ступке в присутствии жидкого азота. Для выполнения дальнейшей пробоподготовки взять навески по 0,5 г.

**Экстракция и очистка грибного материала.** В ходе выполнения предварительных испытаний было замечено, что метанольные и водно-метанольные экстракты грибных гомогенатов содержат значительные количества матричных компонентов, пики которых на хроматограмме интерферируют с пиками токсинов и препятствуют их определению методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии. Кроме этого, ввод неочищенных экстрактов образцов вызывает сильное загрязнение хроматографического оборудования.

Установлено, что токсины бледной поганки из гомогенатов грибов достаточно хорошо извлекаются (>75 %) путем экстракции этанолом, смесью MeOH – 0,002 моль/л водный раствор HCl в соотношении 1 : 1, а также 0,01 моль/л раствором HCl при настаивании в течение суток и встряхивании. Последующие стадии пробоподготовки были одинаковые и включали отстаивание, центрифугирование, отделение супернатанта и упаривание до объема ~0,2–0,5 мл. Затем к остатку добавляли по 4 мл воды, встряхивали в течение 1 мин, добавляли 2 мл гексана и снова встряхивали в течение 1 мин, после чего гексан отделяли. После этого к водному раствору добавляли 3,5 г сульфата аммония, встряхивали (получался насыщенный раствор сульфата аммония) и целевые токсины экстрагировали 4 мл бутанола в течение 10 мин. Бутанольный экстракт далее отделяли и выпаривали в токе азота при 50 °С. Сухой остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы и после центрифугирования при 15 000 об/мин и фильтрации через шприцевые фильтры (0,2 мкм) переносили в виалы для хроматографического анализа.

Стоит отметить, что при использовании смеси H<sub>2</sub>O – AcN в объемном соотношении 1 : 7 получались более чистые экстракты, чем при использовании этанола и смеси MeOH – 0,002 моль/л водный раствор HCl в соотношении 1 : 1. В случае применения водного раствора соляной кислоты стадию упаривания можно исключить, что позволяет значительно сократить общее время пробоподготовки.

Нижний предел количественного определения каждого токсина по описанным выше вариантам пробоподготовки с последующим анализом грибных экстрактов методом ВЭЖХ-МС равнялся не более 300 нг в 0,5 г сухих грибов. Относительное стандартное отклонение определения токсинов составляло порядка 25 %.

## Заключение

Таким образом, на основании экспериментально определенных констант распределения грибных токсинов в системах 1-бутанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия и 2-пропанол – водные растворы сульфата аммония и гидрофосфата калия были разработаны методики экстракционной пробоподготовки для последующего обнаружения аманитиновых ( $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитина) и фаллоидиновых (фаллоидина и фаллацидина) токсинов в грибном материале и моче человека. Методика позволяет определять токсины в моче с ПКО, равным 1 нг/мл.

Подготовленные по описанным в работе процедурам пробы являются достаточно чистыми и могут быть проанализированы как на ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь», так и на УЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения.

## Библиографические ссылки

1. Ward J, Kapadia K, Brush E, Salhanick SD. Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies. *Journal of Emergency Medicine*. 2013;44(1):116–121. DOI: 10.1016/j.jemermed.2012.02.020.
2. Мусселиус СГ, Рык АА. *Отравления грибами*. Москва: Миклош; 2002. 324 с.
3. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, Guedes de Pinho, de Lourdes Bastos M, et al. Amanita phalloides poisoning: mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;86:41–55. DOI: 10.1016/j.fct.2015.09.008.
4. Flament E, Guitton J, Gaulier J-M, Gaillard Y. Human poisoning from poisonous higher fungi: focus on analytical toxicology and case reports in forensic toxicology. *Pharmaceuticals*. 2020;13(12):454. DOI: 10.3390/ph13120454.
5. Wong JH. Fungal toxins. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2<sup>nd</sup> edition. [S. l.]: Elsevier; 2013. p. 166–168. DOI: 10.1016/B978-0-12-385095-9.00025-7.
6. Baumann K, Muentner H, Faulstich. Identification of structural features involved in binding of  $\alpha$ -amanitin to a monoclonal antibody. *Biochemistry*. 1993;32(15):4043–4050. DOI: 10.1021/bi00066a027.
7. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36(1):13–24. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00074-3.
8. Wong JH, Ng TB. Toxins from Basidiomycete fungi (mushroom): amatoxins, phallotoxins, and virotoxins. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. [S. l.]: Elsevier; 2006. p. 131–135. DOI: 10.1016/B978-012369442-3/50023-4.
9. Bever CS, Hnasko RM, Cheng LW, Stanker LH. A rapid extraction method combined with a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of amatoxins. *Toxins*. 2019;11(12):724. DOI: 10.3390/toxins11120724.

10. Wieland T, Faulstich H, Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. 1978;5(3):185–260. DOI: 10.3109/10409237809149870.
11. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992;598(2):227–236.
12. Tanahashi M, Kaneko R, Hirata Y, Hamajima M, Arinobu T, Ogawa T, et al. Simple analysis of  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2010;28(2):110–114.
13. Nomura M, Suzuki Y, Kaneko R, Ogawa T, Hattori H, Seno H, et al. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS. *Forensic Toxicology*. 2012;30(2):185–192.
14. Ali Ahmed WH, Gonmori K, Suzuki M, Watanabe K, Suzuki O. Simultaneous analysis of  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2010;28(2):69–76.
15. Yoshioka N, Akamatsu S, Mitsuhashi T, Todo C, Asano M, Ueno Y. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2014;32(1):89–96.
16. Zhang S, Zhao Y, Li H, Zhou S, Chen D, Zhan Y, et al. A simple and high-throughput analysis of amatoxins and phallotoxins in human plasma, serum and urine using UPLC-MS/MS combined with PRiME HLB  $\mu$ -elution platform. *Toxins*. 2016 May 4;8(5):128. DOI: 10.3390/toxins8050128.
17. Vujović M, Ilić I, Kilibarda V. Determination of Mushroom toxin alpha-amanitin in serum by liquid chromatography – mass spectrometry after solid-phase extraction. *Acta Medica Medianae*. 2015;54(1):12–19. DOI: 10.5633/amm.2015.0102.
18. Заяц МФ. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами. Минск: БГУ; 2019. 355 с.

## References

1. Ward J, Kapadia K, Brush E, Salhanick SD. Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies. *Journal of Emergency Medicine*. 2013;44(1):116–121. DOI: 10.1016/j.jemermed.2012.02.020.
2. Musselius SG, Ryk AA. *Otravleniya gribami* [Mushroom poisoning]. Moscow: Miklosh; 2002. 324 p. Russian.
3. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, Guedes de Pinho, de Lourdes Bastos M, et al. Amanita phalloides poisoning: mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;86:41–55. DOI: 10.1016/j.fct.2015.09.008.
4. Flament E, Guitton J, Gaulier J-M, Gaillard Y. Human poisoning from poisonous higher fungi: focus on analytical toxicology and case reports in forensic toxicology. *Pharmaceuticals*. 2020;13(12):454. DOI: 10.3390/ph13120454.
5. Wong JH. Fungal toxins. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2<sup>nd</sup> edition. [S. l.]: Elsevier; 2013. p. 166–168. DOI: 10.1016/B978-0-12-385095-9.00025-7.
6. Baumann K, Muentner H, Faulstich. Identification of structural features involved in binding of  $\alpha$ -amanitin to a monoclonal antibody. *Biochemistry*. 1993;32(15):4043–4050. DOI: 10.1021/bi00066a027.
7. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36(1):13–24. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00074-3.
8. Wong JH, Ng TB. Toxins from Basidiomycete fungi (mushroom): amatoxins, phallotoxins, and virotoxins. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. [S. l.]: Elsevier; 2006. p. 131–135. DOI: 10.1016/B978-012369442-3/50023-4.
9. Bever CS, Hnasko RM, Cheng LW, Stanker LH. A rapid extraction method combined with a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of amatoxins. *Toxins*. 2019;11(12):724. DOI: 10.3390/toxins11120724.
10. Wieland T, Faulstich H, Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. 1978;5(3):185–260. DOI: 10.3109/10409237809149870.
11. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992;598(2):227–236.
12. Tanahashi M, Kaneko R, Hirata Y, Hamajima M, Arinobu T, Ogawa T, et al. Simple analysis of  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2010;28(2):110–114.
13. Nomura M, Suzuki Y, Kaneko R, Ogawa T, Hattori H, Seno H, et al. Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC-MS-MS. *Forensic Toxicology*. 2012;30(2):185–192.
14. Ali Ahmed WH, Gonmori K, Suzuki M, Watanabe K, Suzuki O. Simultaneous analysis of  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2010;28(2):69–76.
15. Yoshioka N, Akamatsu S, Mitsuhashi T, Todo C, Asano M, Ueno Y. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2014;32(1):89–96.
16. Zhang S, Zhao Y, Li H, Zhou S, Chen D, Zhan Y, et al. A simple and high-throughput analysis of amatoxins and phallotoxins in human plasma, serum and urine using UPLC-MS/MS combined with PRiME HLB  $\mu$ -elution platform. *Toxins*. 2016 May 4;8(5):128. DOI: 10.3390/toxins8050128.
17. Vujović M, Ilić I, Kilibarda V. Determination of Mushroom toxin alpha-amanitin in serum by liquid chromatography – mass spectrometry after solid-phase extraction. *Acta Medica Medianae*. 2015;54(1):12–19. DOI: 10.5633/amm.2015.0102.
18. Zayats MF. *Novye podkhody v primenenii ekstraktsii pri opredelenii mikrokolichestv pestitsidov v sel'skokhozyaystvennoi produkcii i ob'ektakh okruzhayushchei sredy khromatograficheskimi metodami* [New approaches in the application of extraction in the determination of microquantities of pesticides in agricultural products and environmental objects by chromatographic methods]. Minsk: Belarusian State University; 2019. 355 p. Russian.

Получена 12.10.2022 / принята 22.12.2022.  
Received 12.10.2022 / accepted 22.12.2022.