

Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Фармацевтичний факультет

Кафедра токсикологічної та аналітичної хімії

На правах рукопису

УДК 615.2:615.8:615.9:616.099

Магістерська робота

ОСОБЛИВОСТІ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ ОТРУЄННІ ГРИБАМИ З РОДИНИ МУХОМОРОВИХ

Виконала студентка 5 курсу
очної форми навчання
спеціальності **226 «Фармація, промислова фармація»**

Мартиняк Вікторія Володимирівна

Науковий керівник: к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й.

Завідувач кафедри: к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й.

Зміст

ВСТУП	4
Розділ 1. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА ТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОТРУЙНИХ СПОЛУК ГРИБІВ РОДИНИ МУХОМОРОВИХ.ОСОБЛИВОСТІ ЇХ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ	7
1.1 Основні види отруйних грибів та їх токсини	7
1.2 Ботаніко-систематична характеристика деяких представників грибів роду Мухомор	9
1.3 Загальна характеристика нейротоксинів мухомору червоного та мухомору пантерного та їх токсичний вплив на організм людини	13
1.3.1 Токсичність мускарину	13
1.3.2 Токсичність іботенової кислоти та її похідних (мусцимолу та мусказону)	16
1.4 Клінічна картина та симптоми отруєння мухомором червоним та мухомором пантерним	20
1.5 Фармацевтичний ринок лікарських засобів та біологічно-активних добавок з грибами роду Мухомор в Україні	25
1.6 Методи хіміко-токсикологічного визначення токсинів мухомору червоного та мухомору пантерного	29
Розділ 2 МЕТОДИКИ ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ГРИБАМИ AMANITA MUSCARIA ТА AMANITA PANTHERINA (Експериментальна частина)	32
2.1 Опис об'єктів дослідження	32
2.2 Ідентифікація нейротоксинів у настоянках <i>Amanita muscaria</i> , <i>Amanita pantherina</i> та <i>Amanita phalloides</i> за допомогою хімічних реакцій	35
2.3 Ідентифікація мускарину, іботенової кислоти та мусцимолу у витяжках плодових тіл <i>Amanita muscaria</i> , <i>Amanita pantherina</i> та <i>Amanita phalloides</i> методом хроматографії у тонких шарах сорбенту39	
2.4. УФ-спектрофотометричне визначення іботенової кислоти у розчинах та настоянках	42
2.5 Ідентифікація мусцимолу у водних розчинах методом УФ-спектрофотометрії. Виявлення іботенової кислоти та мусцимолу у витяжках грибів та порошках капсул методом УФ-спектрофотометрії	44
2.6 Кількісне визначення іботенової кислоти у настоянках мухомору червоного, пробах крові та се	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50
SUMMARY	58
Додатки	Ошибка! Закладка не определена.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЦНС- центральна нервова система

NMDA-рецепторів - N-метил-D-аспартатний рецептор

ГАМК - гамма-аміномасляна кислота

GABA- gamma aminobutyric acid A-receptor

ЕЕГ - Електроенцефалограма

AMPA - α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота (іонотропний рецептор глутамату, який передає збуджуючі сигнали в хімічних синапсах нервової системи)

ТШХ- тонкошарова хроматографія

ДМФА-диметилформаїд

ВСТУП

Актуальність теми. Серед великого різноманіття дикорослих грибів лише деякі із них відносяться до їстівних та використовуються як один із видів продуктів харчування. Проте більшість видів грибів відносять до отруйних або умовно їстівних. Отруєння грибами реєструються не лише в Україні, але також у інших країнах Європи, США, Японії, Азії, де їх вживання є традиційним, і мають, як правило, сезонний характер [16; 36; 37; 73].

Більшість видів грибів в токсикологічному плані до теперішнього часу не досліджені. Зокрема у Європі токсичність встановлена орієнтовно для 100 видів грибів, із більш як 2000 відомих [19].

Отруйні гриби містять різноманітні токсичні речовини, потрапляння яких в організм може спричинити грибне отруєння (ГО), так званий *міцетизм*. Загалом, із загальної кількості отруєнь, спричинених грибами, летальність досягає до 6 % усіх випадків [56]. Важливо зазначити, що більшість грибних токсинів стійкі при будь-якому методі термічної обробки, тому єдиним надійним способом уникнення отруєння – це не вживання токсичних та незнайомих видів грибів [27].

В Україні вживання дикорослих грибів є традиційним. Незважаючи на популяризацію знань щодо небезпечності вживання дикорослих грибів в їжу, щороку спостерігаються випадки численних отруєнь серед населення України. За офіційними даними Центру громадського здоров'я МОЗ України станом на 12.11.2020 дикорослими грибами отруїлося 289 осіб, з яких 56 – діти, померло 11 осіб. У 2021 році в Україні зареєстрували **126 випадків отруєння дикорослими грибами, внаслідок яких постраждало 189 людей, з них 32 дітей, із них померло 21 дорослих осіб та 5 дітей. За 7 місяців 2022 року (травень-листопад) в Україні зареєстровано 12 випадків отруєння дикорослими грибами, унаслідок яких постраждало 19 людей, з них 1 дитина. У 2023 році в Україні зареєстровано 50 випадків отруєнь грибами з 72 постраждалими, у тому числі 15 дітей, померло 5 дорослих [12]. У 2024 році спостерігалось зростання випадків отруєння грибами, особливо восени. За даними Центру здоров'я від отруєнь постраждали 90 осіб, з них 19 – діти. Лише за перші два тижні жовтня 2024 року зафіксовано 55 нових випадків**

отруєнь, з яких 9 у дітей.

Стабільно висока питома вага грибних отруєнь пов'язана з ускладненням соціально-економічної ситуації і обумовлена відсутністю комплексної системи заходів профілактики, що повинна охоплювати всі основні критичні контрольні моменти на етапах виникнення і попередження даної групи отруєнь.

В останні роки на стихійних ринках України пропонується різноманіття лікарської рослинної сировини і продуктів їх переробки, в тому числі і представників грибів роду Мухомор (*Amanita*). Зокрема це мухомор червоний (*Amanita muscaria*) та мухомор пантерний (*Amanita pantherina*), які широко використовуються в народній медицині. В мережі інтернет пропонуються для продажу капсули, порошки, настоянки, мазі, креми, чаї, цукерки та шоколад, отримані із *Amanita muscaria* та *Amanita pantherina*. У соціальних мережах поширюють дані про цілющі властивості цих видів мухомору. Особливе зацікавлення виникає у осіб, які схильні до зловживань психоактивними речовинами, оскільки ці гриби викликають стан ейфорії.

У зв'язку з вище наведеним, опрацювання методик експрес-діагностики отруєнь різновидами роду *Amanita* є актуальним.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була розробка експресних методик ідентифікації токсичних біологічно активних речовин мухомору червоного та мухомору пантерного та опрацювання методів їх кількісного визначення у біологічних рідинах при отруєнні. Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- проаналізувати літературні дані, що стосуються основних груп токсинів видів роду *Amanita*, методів їх аналізу та діагностики отруєнь;
- опрацювати методики ідентифікації біологічно активних токсичних сполук *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides* хромогенними реакціями та методом хроматографії у тонкому шарі сорбенту, які можливо використовувати в токсикологічних лабораторіях для скринінг-аналізу;

- опрацювати умови ідентифікації іботенової кислоти та мусцимолу у екстрактах грибів, а також у крові та сечі методом УФ-спектрофотометрії;
- розробити методику УФ-спектрофотометричного кількісного визначення іботенової кислоти;
- опрацювати умови ізолювання токсинів *Amanita muscaria* та *Amanita pantherina* із крові та сечі.

Об'єкти дослідження: плодові тіла *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, *Amanita phalloides*, капсули з порошками мухомору червоного та мухомору пантерного.

Предмет дослідження: розробка умов ізолювання нейротоксинів *Amanita muscaria* та *Amanita pantherina* із крові та сечі та їх роздільної ідентифікації при судово-хімічному аналізі.

Методи дослідження: хімічні реакції, метод хроматографії в тонких шарах сорбенту, УФ-спектрофотометрія, екстракція.

Новизна роботи: запропоновано реакції та склад систем розчинників для ТШХ, які дозволяють розрізнити токсини мухомору червоного, мухомору пантерного та блідої поганки.

Практичне значення роботи: опрацьовано умови роздільної ідентифікації токсичних біологічно активних сполук *Amanita muscaria* та *Amanita pantherina*, методи їх визначення в крові і сечі, які можна використовувати для експрес-скринінгу грибних токсинів.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи доповідались на засіданні студентського наукового гуртка кафедри токсикологічної та аналітичної хімії, загальноуніверситетській студентській науковій конференції 85LYSICop ЛНМУ ім.Данила Галицького (2025 р). Опубліковано 1 тези доповіді.

Структура роботи. Магістерська робота викладена на 59 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду літератури, результатів експериментальних досліджень, загальних висновків і списку використаних джерел літератури. Список використаних джерел містить 74 найменувань, з них кирилицею 12 і латиницею 62.

Розділ 1

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА ТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОТРУЙНИХ СПОЛУК ГРИБІВ РОДИНИ МУХОМОРОВИХ.

ОСОБЛИВОСТІ ЇХ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ (Огляд літератури)

1.1 Основні види отруйних грибів та їх токсини

Впродовж тисячоліть гриби входять до складу раціону людей. Їх вважають низькокалорійною їжею, яка багата на різноманітні рослинні білки, мінерали та вітаміни. У деяких країнах гриби називають "м'ясом бідних".

Використання грибів у медицині розпочалося понад 5 тисяч років тому [63; 68]. В теперішній час деякі види грибів широко використовуються в сучасній медичній практиці [21; 49; 57; 68]. Екстракти грибів, в які входять біологічно-активні речовини, знайшли також застосування у практичній косметології [72].

Існує дуже мало їстівних і делікатесних родів і видів грибів, які придатні для споживання. В основній кількості більшість видів грибів є токсичними. Їх споживання призводить до отруєнь, часто з летальними наслідками. Отруйність – це поширене явище у живій природі. Серед тваринних та рослинних організмів отруйні форми зустрічаються практично в усіх таксонах. Токсичні речовини продукують бактерії, гриби, вищі рослини, безхребетні та хребетні організми.

Усім добре відома висока токсичність отруйних грибів, у тому числі із родини *Мухоморових (Amanitaceae)*. Мухомори поширені у північній півкулі, в Південній Америці, Південній Африці, Австралії та Новій Зеландії. Вони містять галюциногенні сполуки, такі як *мускарин, іботенову кислоту, мусцимол, мусказол* та інші. Отруєння мухоморами внаслідок навмисного вживання проявляється вже через 20-180 хвилин у вигляді психоактивних ефектів, які супроводжуються пригніченням ЦНС, сонливістю, головокружінням, тремором, збудженням та галюцинаціями.

У природі поширені наступні представники родини мухоморових (*Amanitaceae*), зокрема роду Мухомор (*Amanita*):

- мухомор зелений (бліда поганка або «ангел смерті») – *Amanita phalloides*;
- мухомор білий – *Amanita verna*;
- мухомор смердючий – *Amanita virosa*;
- мухомор цезарів – *Amanita caesarea*;
- мухомор партерний – *Amanita pantherina*;
- мухомор червоний – *Amanita muscaria*.

Псилоцибічний синдром, спостерігається при вживанні псилоцибів, в яких містяться індольні алкалоїди *псилоцин* та *псилобіцин*. Вони проявляють сильні галюциногенні властивості, причому псилоцин у 1,5 рази сильніший за псилобіцин. Дані сполуки містяться у грибах :

- Strophariaceae (строфарієві гриби) – *Psylocybe*, *Stropharia*;
- Coprinaceae (гнойовики) – *Copelandia*, *Panaeolus*;
- Cortinariaceae (павутинники) – *Inocybe*, *Pholiotay*;
- Pluteaceae (плютеєві гриби) – *Pluteus*;
- Bolditiaceae (болбітові гриби, або «бурі поганки») – *Agrocybe*, *Copocy*;
- Tricholomataceae (трихоломові або рядовкові гриби) *Geronea*, *Мусена*;
- Hydropogaceae (гідрофори або мокрухи) - *Hygrocybe*.

Токсичні циклічні поліпептиди *фалотоксини* (біциклічні гептапептиди), *віротоксини* (моноциклічні гептапептиди) та *аматотоксини* (біциклічні октапептиди) містяться у грибах роду *Amanita* та *Galerina*. Ці гриби є основною причиною смертельних отруєнь. Фалотоксини руйнують органели клітин за рахунок лізису мітохондрій, аматоксин – незворотно інгібує РНК-полімеразу, в результаті чого блокується функція печінки. Дані сполуки містяться у грибах:

- *Amanita bisporigera* (мухомор біспорігера);
- *Amanita phalloides* (бліда поганка);
- *Amanita verna* (мухомор весняний);
- *Amanita virosa* (мухомор білий смердючий);
- *Galerina autumnalis* (галерина осіння);

- *Galerina Marginata* (галерина оторочкувата);
- *Lepiota spp* (лепіота);
- *Conocybe filaris* (коноцибе філаріс).

Ще одними високоотруйними сполуками природнього походження є *гірометрин* і *монометилгідразин*, які містяться у більшості строчків (народна назва «сморжі»). Дані токсини в першу чергу уражають печінку, змінюється склад крові, спостерігаються симптоми властиві для перезбудження ЦНС, такі як зміна координації, кома, конвульсії. Летальні випадки отруєнь цими сполуками становлять від 2-4 % від усіх випадків отруєнь. Гірометрин і монометилгідразин містять гриби:

- *Gyromitra caroliniana* (строчок Кароліни або великий червоний строчок);
- *Gyromitra esculenta* (строчок звичайний);
- *Gyromitra fastigata* (строчок гостроверховий);
- *Helvella elastica* (гельвела еластична);
- *Sarcosphaera crassa* (саркосфера) .

1.2 Ботаніко-систематична характеристика деяких представників грибів роду Мухомор

Останнім часом в народній та нетрадиційній медицині все ширше пропонують лікувати певні захворювання, застосовуючи плодові тіла мухомору червоного та мухомору пантерного. В мережі Internet та роздрібних кіосках пропонуються висушені мухомори у різних формах (капсулах, порошках, настоянках водних та спиртових тощо), які відпускаються без жодних правових обмежень. За дією компоненти цієї продукції, виготовленні із використанням даних видів грибів проявляють стимулюючу, галюциногену або анальгезуючу дію. Однак, вживання мухоморів пов'язане з високим ризиком, оскільки дозування вмісту отруйних речовин важко контролювати, а наслідки їх вживання можуть бути непередбачуваними.

Мухомор червоний (*Amanita muscaria*) це мікоризний базидіальний гриб,

яскравий і загадковий, мабуть найчарівніший гриб на нашій планеті, що здавна привертав увагу людини (рис.1.1). Належить до родини мухоморових (*Amanitace*), (порядок *Agaricales*). Також має місцеві назви – моримуха, мухіір, жабурка.



Рис. 1.1. Мухомор червоний (*Amanita muscaria*)

Відомості про цей гриб зустрічаються в літературних джерелах, починаючи з 13 століття.

Його червона шапочка з білими цятками стала символом отрути і об'єктом шанобливого ставлення у багатьох культурах світу, тому його віднесено до групи культових грибів. Його галюциногенні властивості використовувались шаманами для спілкування з духами, вікінги вірили, що він надає божественної сили, а деякі народності застосовували його як болезаспокійливий засіб.

Це неїстівний, нейротропний гриб, що походить з помірних і бореальних регіонів Північної півкулі, проте він також був інтродукований до багатьох країн світу, зокрема до країн Південної півкулі, і, схоже, став космополітичним видом. Росте у хвойних і листяних лісах, часто групами. Плодові тіла утворює з липня по листопад. Поширений по всій Україні.

Гриб має шапку у середньому 5-12 см до 20 см у діаметрі, напівсферичну, згодом опукло- або плоскорозпростерту, з тонким рубчастим краєм, цеглясто-червона різних відтінків, жовто-червона, червоно-оранжева, з численними білими пластівцями («бородавками»), які після дощу часом зникають. Пластинки густі, тонкі, білі. Спорова маса біла. Спори 9-11 x 6-8 мкм, широкоовальні. Ніжка циліндрична, з великою бульбою, щільна, пізніше з порожниною, гола, з широким білим (по краю жовтим) кільцем, з приростою у вигляді концентричних,

бородавчасто-лускатих смуг піхвою. Висота ніжки в середньому 5-13 см (іноді сягає 18 см, діаметр 1-3 см, максимально до 4 см. М'якуш білий, у периферичному шарі тканини шапки жовтуватий без особливого запаху. Отруйний гриб.

Використовують у гомеопатії при атеросклерозі, невралгії та зниженні загального тону. Мухомор червоний містить *мускарин, іботенову кислоту, мусцимол, мікоатронін та інші сполуки*. Перераховані сполуки є психоактивними речовинами, які впливаючи на нейромедіатори мозку, викликають галюцинації, ейфорію та інші зміни свідомості.

Поряд із мухомором червоним, такі ж психоактивні сполуки містить і мухомор пантерний (*Amanita pantherina*).

Мухомор пантерний (леопардовий гриб) - *Amanita pantherina* з родини мухоморових (*Amanitace*) (рис.1.2). Місцева назва мухомор.

Шапка (4-10 см у діаметрі) напівсферична, згодом опукло- або плоскорозпростерта, з тонким рубчастим краєм, буро-коричнева, іноді з легким рудуватим відтінком, сірувато-коричнева або бура, з численними білими пластівцями. Пластинки густі білі. Спорова маса біла. Спори 8-12 x 6,5-7,5 мкм, еліпсоподібні, гладенькі. Ніжка 5-10 x 0,5-1,5 см, циліндрична, внизу з складчастою бульбою, порожня, біла, тонковолокниста, з білим вузьким кільцем та з прирослою з вільним краєм піхвою. М'якуш білий, з неприємним запахом.

Росте у листяних та хвойних лісах, з липня до пізньої осені спостерігається у надзвичайно великій кількості. Поширений по всій Україні. Отруйний гриб. *Мухомор пантерний* помилково приймають за *мухомор сірий їстівний* (*Amanita vaginata*) або за умовно їстівний гриб – *мухомор червоніючий* (*Amanita rubescens*). Отруєння цим грибом трапляються часто і бувають дуже тяжкими, іноді смертельними (рис.1.2).

<i>Amanita pantherina</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Amanitam vaginata</i>
		

Рис.1.2 Зовнішній вигляд мухомору пантерного, мухомору червоніючого та мухомору сірого їстівного

Мухомор зелений, бліда поганка - *Amanita phaloloides*. Місцеві назви – гадючка, блекітниця, мухомор гадючий. Родина мухоморових (*Amanitace*) (рис.1.3)



Рис.1.3 Зовнішній вигляд блідої поганки або мухомору зеленого (***Amanita phaloloides***)

Шапка від 4 до 10 см у діаметрі напівсферична, згодом опукло- розпростерта, зеленкувата, оливкувата, кольору бронзи, зрідка оливкувато-коричнувата, гола, з гладким плоским краєм, під впливом їдкого калію не змінюється. Пластинки білі. Спорова маса біла. Спори 8-10,5 x 7-8 мкм, безбарвні, гладенькі, широкоовальні, майже кулясті, з великою флуоресціюючою краплею. Ніжка (5-10 x 0,8-2 см) донизу поступово потовщується, біля основи з бульбою, біла або оливкувато-мережчата, з порожниною, з широким, зверху гладеньким, жовтуватим, з внутрішнього боку

рубчастим білим кільцем, внизу з вільною, мішкуватою, з нерівним, лопатевим краєм білою піхвою.

М'якуш білий, солодкий, спочатку без особливого запаху, пізніше з неприємним запахом. Смертельно отруйний гриб, який помилково збирають замість печериць, у яких відсутня піхва внизу ніжки, пластинки рожеві, з часом темно-коричневі, а спорова маса темно-коричнева.

Росте мухомор зелений у листяних і мішаних лісах, під дубами, буками, часто під кущами ліщини, в окремі роки у великій кількості, у серпні–вересні, іноді липень – жовтень. Поширений по всій Україні. Застосовують в гомеопатії при холері.

Бліда поганка нагадує різновиди сироїжок та печериць, проте у печериць пластинки не білі, а рожеві, коричневуваті чи темно-коричневі.

Містить отруйні речовини – аманітин, фалін, фалоїдин та ін.

Досліджено, що деякі інші види мухоморів цього роду також можуть подібним чином впливати на центральну нервову систему.

1.3 Загальна характеристика нейротоксинів мухомору червоного та мухомору пантерного та їх токсичний вплив на організм людини

Мухомор червоний та мухомор пантерний отруйні гриби, проте у деяких частинах Європи, Азії та Північної Америки їх вживають. Основними токсичними компонентами цих грибів є мускарин, іботенова кислота та продукт розкладу іботенової кислоти – мусцимол.

1.3.1 Токсичність мускарину

Мускарин – один із важливих токсинів нейротоксичної дії [18; 23]. За хімічною будовою це алкалоїд, який вперше було виділено із мухомору червоного (*Amanita muscaria*), також міститься в мухоморі пантерному (*Amanita pantherina*) (рис.1.4).

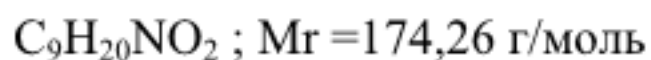
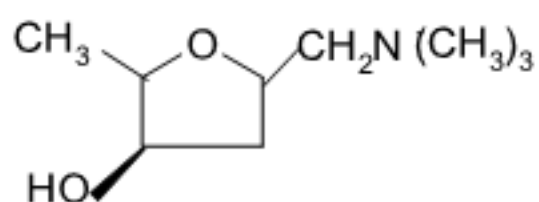


Рис.1.4 Структурна формула мускарину

Мухомор червоний містить незначну кількість цього токсину. В перерахунку на суху масу це приблизно становить 0,002-0,003 %. Для того, щоб проявився токсичний ефект у грибах повинно міститись щонайменше 0,01 % мускарину.

Мускарин також виявлено в грибах родів *Inocybe* і *Clitocybe*, в яких його вміст становить 3-4 %. На території України ростуть кілька видів цих отруйних грибів, зокрема *I.gimosa*, *I.erubescens*, *C. dalbata* (клітоцибе білувате, говорушка білувата), *C.givulosa* (клітоцибе червонувате отруйне). Споживання навіть незначної кількості цих грибів призводить до отруєння, зумовленому наявністю мускарину. В деяких видах грибів родів *Inocybe* (наприклад, *I. subdestricta*) та *Clitocybe* (наприклад, *C.dealbata*) вміст мускарину може досягати 0,43 % та 0,15 % відповідно.

Види грибів з родів *Clitocybe* та *Inocybe* є найпоширенішими причинами отруєння мускариновими грибами в Сполучених Штатах. *Clitocybe dealbata* (потогінний гриб) можна сплутати з їстівним шампіньйоном (*Marasmius oreadus*) або солодким грибом (*Clitopilus prunulus*). *Omphalotus olearius* можна сплутати з їстівною лисичкою (*Cantharellus cibarius*). Інші гриби, що містять мускарин, включають види з родів *Boletus*, *Muscena* та *Omphalotus* [54; 74].

Хоча *Amanita muscaria* отримав свою назву через слідові кількості мускарину, які містяться у ньому, він не викликає клінічної картини холінергічної токсичності. Таким чином, мухомори містять набагато меншу кількість мускарину, ніж деякі інші види грибів, відомі своєю мускариновою токсичністю.

В організмі людини і тварин мускарин діє подібно до ацетилхоліну, впливаючи через парасимпатичну нервову систему. Мускаринові ацетилхолінові рецептори (AChR) від M1 до M5, належать до G-білок-зв'язаних рецепторів ("G-білки"). Вони беруть участь у різних вегетативних фізіологічних функціях людського організму [18]. Мускарин зв'язується з постгангліонарними холінергічними рецепторами M-типу (M₁ та M₂ рецепторами), які називають

мускариновими рецепторами. Ця дія викликає стимуляцію парасимпатичної нервової системи, подібно до того, як це відбувається внаслідок виділення ендogenous ацетилхоліну. Дія на мускаринові рецептори викликає холінергічний синдром, який характеризується підвищеною пітливістю, бронхореєю із задишкою, слиновиділенням, слюзотечею, діареєю, міозом, абдомінальними спазмами та рідко брадикардією [55]. Мускарин не стимулює нікотинові рецептори, результатом чого є скорочення м'язів скорочень та параліч.

У більшості випадків мускарин діє активніше, ніж ацетилхолін. Мускарин не метаболізує за участю холінестерази (це частково пояснює його токсичність) і характеризується довгим періодом напіввиведення. З огляду на те, що мускарин є четвертинним аміном, він не проникає через гематоенцефалічний бар'єр і не впливає безпосередньо на ЦНС [25].

Летальна доза даного токсину для людини становить 1 мг/кг маси. Ознаками отруєння є рясне потіння (особливо при вживання Клітоцибе білуватого), слино- та слюзовиділення, що проявляється через 15-30 хв після надходження токсину в організм. За умов потрапляння більшої кількості токсину вслід за цими симптомами йдуть спазми шлунку, сильна нудота, діарея, погіршення чіткості зору, звуження зіниць, сповільнення пульсу, утруднене дихання, зниження тиску, зменшення частоти серцевих скорочень. Згодом через 2-4 години симптоми інтоксикації зменшуються, але можуть тривати до 24 годин [15; 33]. Проте важкі отруєння можуть призводити до смертельних випадків внаслідок серцевої або дихальної недостатності [28].

За впливом на організм мускарин відносять до парасимпатоміметиків. Глибока парасимпатична активація, може закінчитися конвульсіями та смертю. Токсичні ефекти мускарину зменшуються під впливом атропіну, який є конкурентним антагоністом мускаринових рецепторів і виступає в ролі антидоту [55].

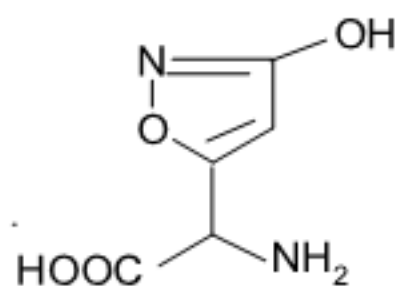
Крім мускарину мухомор червоний містить ще ряд інших токсинів, зокрема тих, що проявляють галюциногенну дію. Проте при прийомі цього гриба певною мірою проявляються також холінергічні симптоми (сильне слино- та потовиділення, тощо).

1.3.2 Токсичність іботенової кислоти та її похідних (мусцимолу та мусказону)

У клітинах деяких видів грибів роду *Amanita*, зокрема *A. muscaria* (мухомор червоний) і *A. pantherina* (мухомор пантерний) синтезуються близькі за структурою сполуки, що проявляють виразну психотропну дію, *похідні ізоксазолу* – іботенова кислота та продукти її перетворення – *мусцимол і мусказон*. Ці токсини діють, головним чином на ЦНС людини і тварин, проявляючи подібні ефекти. Однак вони характеризуються різною активністю, а саме: мусцимол у 5-8 разів активніший ніж іботенова кислота, а активність мусказону зовсім незначна.

Іботенова кислота. У дослідженнях, які проводились на експериментальних тваринах та *in vitro* було встановлено, що іботенова кислота є сильним нейротоксином, який навіть у низьких концентраціях пошкоджує структуру мозку і спричиняє загибель нервових клітин.

За хімічною будовою іботенова кислота це α -аміно-2,3-дигідро-3-оксо-5-ізоксазолацетатна кислота:



$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$; $M_r = 158,11$ г/моль; $t_{\text{топл.}} 150-152$ °C (з розкладом)

Рис. 1.5 Структурна формула іботенової кислоти

У чистому вигляді являє собою безбарвний кристалічний порошок, що добре розчиняється у воді.

Іботенова кислота вперше ізольована з мухомору *Amanita ibotengutake* 1960-х роках в Японії. Даний вид мухомору за зовнішнім виглядом схожий на мухомор пантерний [40]. Дана кислота є сильним нейротоксином, який пошкоджує мозкову тканину, викликаючи дегенерацію клітинних тіл нейронів гіпокампу, тому її відносять до групи α -токсинів. Високу нейротоксичність цієї кислоти було доведено шляхом безпосереднього введення її у мозок мишей та щурів.

За хімічною будовою іботенова кислота подібна до глутамінової кислоти.

Вона діє як агоніст рецепторів глутамінової кислоти (NMD_A-рецепторів) у ЦНС. Це може відігравати роль у механізмах біологічної активності токсину. Встановлено, що іботенова кислота активує монотропний рецептор для нейротрансмітера глутамінової кислоти–NMDA-рецептор. Цим пояснюється механізм біологічної активності токсину [34].

У дослідях *in vivo* було доказано, що іботенова кислота в живих організмах метаболізує. Її метаболізм полягає в утворенні декарбоксильованого продукту, який отримав назву *мусцимол*. Паралельно мусцимол утворюється в грибах роду мухомор при фотосинтезі.

Мусцимол – розглядають як продукт декарбоксилювання іботенової кислоти. Дана сполука кількісно утворюється при будь-якому способі дегідратації мухоморів (сушінні при нагріванні, термічній обробці грибів при готуванні, виготовленні витяжок водних чи спиртових шляхом термічної обробки). Тому при вживанні їжі з приготованих грибів, а також при її травленні в шлунково-кишковому тракті виявляють мусцимол, який викликатиме характерні симптоми отруєнь.

Мусцимол структурно подібний до γ-аміномасляної кислоти (ГАМК) і діє як агоніст ГАМК_A-рецепторів, активуючи при цьому рецептори головного гальмівного нейромедіатора мозку.

За хімічною будовою це 5-(аміно- етил)-3 (2H)-ізооксазолон (рис.1.6):

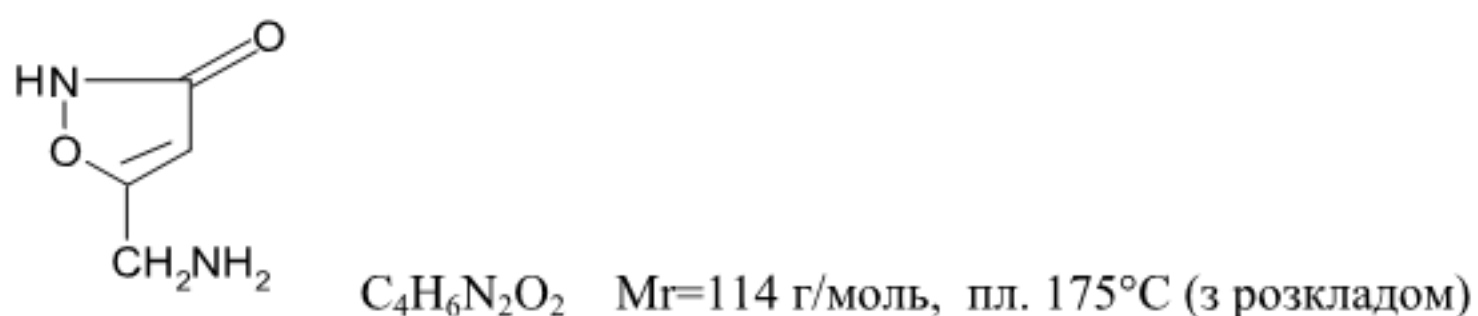


Рис.1.6 Структурна формула мусцимолу

Синоніми – *пантерин, агарин*.

Мусцимол — психоактивна ізоксазолова сполука, що міститься в різних грибах роду *Amanita*, зокрема разом з іботеновою кислотою та мускарином. Його вважають основним нейротоксичним компонентом грибів роду *Amanita* (*A.muscaria*, *A. phalloides* та ін.), яка впливає на психіку людини в дозах 10-15 мг. Вміст

мусцимолу в плодовому тілі червоного мухомору становить 0,03-0,1 г на 100 г свіжих грибів.

Мусцимол хімічно сполучається з аналогічними фрагментами ділянок ГАМК_A-рецепторів, як і ГАМК. За зовнішньою формою ГАМК_A-рецептори являють собою пентамерні структури, з яких утворений центральний хлоридний іонний канал. Під впливом мусцимолу відбуваються конформаційні зміни в ГАМК_A-рецепторах, що стає першопричиною відкриття хлоридного каналу. Іони Cl⁻ потрапляють в нейрон, їх кількість збільшується, негативний заряд мембрани нейрону зростає і за рахунок цього зростає гіперполяризація мембрани нейрону. В результаті гіперполяризації зменшується збудливість нейронів та послаблюється загальна активність нейронних ланцюгів

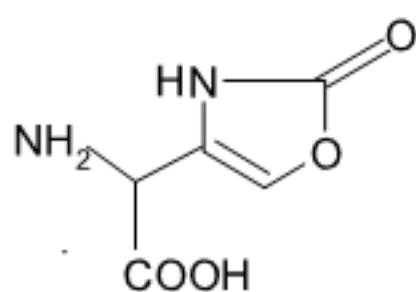
ГАМК_A- рецептори знаходяться в різних ділянках головного мозку. При потраплянні мусцимолу в мозок, він змінює активність нейронів у багатьох ділянках, включаючи кору головного мозку, гіпокамп і мозочок. Хоча мусцимол традиційно вважається селективним агоністом ГАМК_A- рецепторів, він також є агоністом рецептора ГАМК_C-рецепторів. Цим пояснюють характерний вплив мусцимолу на організм за рахунок комбінованої дії на обидві мішені [40; 67].

Сучасні дослідження вказують на потенційну можливість застосування мусцимолу для полегшення нейропатичного болю, також вивчаються інші потенційні сфери його використання [57].

Іботенова кислота та мусцимол відносять до основних психоактивних компонентів мухомора червоного (*Amanita muscaria*). Незважаючи на подібність ефектів цих двох амінокислот, дія гриба дещо відмінна від дії чистих речовин.

Іботенову кислоту та мусцимол відносять до класу збуджуючих амінокислот. При цьому збуджуючу дію проявляють також каїнова, домоева, трихомінова, квісгвальова кислоти, юнаїн та петалонін. Усі ці компоненти є природними амінокислотами, які відіграють важливу роль у нейрофармакології .

Продуктом перетворення іботенової кислоти є також *мусказон*. У хімічному відношенні це α -аміно-2,3-дигідро-2-оксо-5-оксазолацетатна кислота (рис.1.7):



$C_5H_6N_2O_4$, Mr 158.11, т.пл. 190 °C з розкладом

Рис. 1.7 Структурна формула мусказону.

У чистому вигляді це безбарвний кристалічний порошок, який можна отримати синтетичними способом. Мусказон виявляє незначну фармакологічну активність порівняно з іботеновою кислотою та мусцимолом, а психотропна його дія є незначною. У високих концентраціях викликає втрату пам'яті та орієнтації, викликає порушення зору. Проте посилює дію мусцимолу. При тривалому зберіганні грибів руйнується [8].

Підсумовуючи вище наведене, можна зробити висновок, що іботенова кислота діє на рецептори глутамінової кислоти, пов'язані з пам'яттю та навчанням. Мусцимол – на рецептори ГАМК, при цьому проявляється пригнічувальний ефект в результаті чого спостерігаються токсичні ефекти (зорові спотворення/галюцинації, втрата рівноваги, незначні м'язові скорочення та змінені сенсорні сприйняття [53]. Тобто обидві сполуки діють як нейромедіатори, що беруть участь у контролі нейронної активності в центральній нервовій системі та впливають на спінальні нейрони. Для іботенової кислоти типова збуджуюча дія, для мусцимолу – пригнічуюча дія, проявляється седативно-гіпнотична, депресивна та галюциногенна психоактивність.

На відміну від глутамінової кислоти та ГАМК, іботенова кислота та мусцимол проникають через гематоенцефалічний бар'єр, шляхом активного транспорту, впливаючи на ендogenous нейромедіатори та викликаючи порушення мозкової діяльності [52]. Іботенова кислота впливає на інгібіторні рецептори глутамату (IGluRs) [48].

Іботенова кислота та мусцимол виводяться із організму з сечею. Їх можна виявити в сечі через годину після вживання грибів [45]. Смертельне отруєння іботеновою кислотою та мусцимолом трапляється дуже рідко [53]. Антидоту немає;

єдине лікування симптоматичне. При появі симптомів неврологічного характеру рекомендується госпіталізація [14]. У деяких випадках необхідно заспокоїти пацієнта, щоб контролювати надмірне збудження. Антидоту при отруєнні цими сполуками немає. Слід уникати введення атропіну, оскільки він має подібну дію до іботенової кислоти та мусцимолу.

У високих дозах іботенова кислота та муцимол можуть викликати смертельні отруєння. Встановлено, що LD_{50} у щурів становить 129 мг/кг для іботенової кислоти та 45 мг/кг для муцимолу [53]. Стебельська із спіавт. [60] наводять результати впливу цих сполук на ссавців: для кроликів LD_{50} для муцимолу при пероральному введенні становить 10 мг/кг, а LD_{50} для іботенової кислоти – 38 мг/кг у мишей. Токсичні дози для людей в літературних джерелах не наводяться. Спорофор мухомора червоного може містити від 292 до 6570 мкг/г іботенової кислоти та від 73 до 2440 мкг/г муцимолу. Враховуючи, що середня вага мухомору червоного становить 60 г, а мінімальна доза для виникнення психотропного ефекту 30–60 мг іботенової кислоти та близько 6–10 мг муцимолу, одного гриба достатньо для появи галюциногенного ефекту [60].

У деяких літературних джерелах наводяться дані, що інтенсивність впливу та ефектів іботенової кислоти та муцимолу залежить від того яка частина гриба потрапила в організм людини. У шапочці грибів концентрація психоактивних сполук вища, ніж їх вміст у ніжці гриба [66].

1.4 Клінічна картина та симптоми отруєння мухомором червоним та мухомором пантерним

Отруєння грибами є досить поширеним явищем, особливо влітку та восени, коли недосвідчені особи збирають гриби і вживають їх у приготовленому вигляді.

Незважаючи на різноманітність дикорослих грибів і широкий спектр їх токсичних властивостей, багатьма науковими дослідженнями [6; 24; 65] доведено, що залежно від виду токсину, фази гострого отруєння та відповідно до клінічних проявів отруєння дикорослими грибами розподіляють на 3 групи.

Першу групу становлять отруєння грибами з *гастроентеротропною дією*, зумовленою вживанням у їжу різних видів ентоломи жовто-сизої (*Entoloma livide*), рядовки тигрової (*Tricholoma tigrinum*), сиріжки їдкої (*Russula emetica*), вовнянки рожевої (*Lactarius torminosus*) та деяких видів опеньок і печериць. При цьому розвивається гастроентероколіт.

Другу групу отруєнь викликають гриби з *нейротропною дією*: мухомором пантерним (*Amanita pantherina*) та мухомором червоним (*Amanita muscaria*), говорушкою білуватою та сіруватою (*Clitocybe dealbata*, *Clitocybe cerussata*), клітоцибе оранжево-червоним (*Omphalotus olearius*) та ін. Залежно від виду грибів у них містяться речовини, що зумовлюють клінічну картину отруєння: мускарин (*Clitocybe dealbata*, *Clitocybe cerusata*, *Omphalotus olearius*), іботенова кислота, мусцимол, мускаридин (*Inocybe Patujara*, *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*).

Третю групу отруєнь викликають гриби з *гепатонекротропною дією* (*Amanita phalloides*, *Amanita virosa*, *Amanita verna*, *Amanita ocreata*, *Galerina autumnalis*, *Galerina marginata*, *Lepiota subincarnata*). Вони містять повільно діючі *аматоксини* та надзвичайно отруйні *аманітини* (смертельна доза 100 мкг/кг), та швидкодіючі *фалотоксини* (*фалоїдин*, *фалоїн*, *профалін*, *фалідин*), які токсично впливають на організм чере 6 год.

Фалотоксини впливають на мембрану та органели гепатоцитів, епітелію та судин кишківника.

Аманітини порушують діяльність гепатоцитів, епітелію кишківника, судин ниркового епітелію тощо (клітин із високим ступенем білковосинтезуючої активності). Дія аматоксинів повільна, але викликає важкі ушкодження клітин, за рахунок порушення внутрішньоклітинного синтезу білка, зумовленого блокадою РНК-полімерази. Це призводить до загибелі гепатоцитів. Токсини блідої поганки є термостабільними і не розкладаються при кулінарній обробці, тому навіть довготривала термічна обробка грибів, до яких потрапила бліда поганка, не вберігають від розвитку отруєння.

До третьої групи також входять гриб-парасоля коричнево-сіро-червоний, гриб-парасоля коричнево-вишневий (гепатонекротоксична дія) та строчки. Строчки

(*Gyromytra esculenta*, *G.infula* й інші) здатні через 6–12 годин викликати гіромітровий синдром. Механізм виникнення синдрому полягає в тому, що монометилгідрозинові похідні пригнічують піридоксинфосфокіназу, порушуючи синтез ГАМК, що клінічно проявляється гастроентеритом, помірною гіпертермією та судомами. Павутинники (*Cortinarius orellanus*, *Cortinarius gentilis* та інші) більш як через добу після їх вживання формують орелановий синдром: помірні болі у епігастрії, правому підребер'ї, нудоту, блювоту, відчуття тяжкості в ділянці попереку, швидко розвиваються олігурія й анурія, що потребує проведення гемодіалізу [6; 11].

Як зазначає Курділь Н.В із співав. [6] за період 15 років отруєння грибами гепатонекротропної дії становили 15,2 % (242 випадки); отруєння грибами гастроентеротропної дії – 81,3 % (1314 випадків); з нейротропною дією – 1,9 % (31 випадок). Мухомор червоний (*Amanita muscaria*) та мухомор пантерний (*Amanita pantherina*), популяція яких достатньо поширена у природі, рідко стають причиною отруєнь, оскільки мають характерні зовнішні ознаки. У більшості мухомор червоний є причиною навмисного отруєння, тоді як отруєння шапочкою пантерного мухомора, відбувається випадково.

Іноді *A. muscaria* вживають для отримання галюциногенного ефекту. Ряд людей *A. muscaria* помилково ідентифікують як їстівний гриб; 75 % пацієнтів стверджували, що вжили *Amanita caesarea* (мухомор цезаря). У всіх випадках при отруєнні *A. pantherina* гриби помилково вважали їстівними. При цьому виді отруєння 41% пацієнтів токсикологічних відділень стверджували, що вживали *Amanita rubescens* (мухомор рожевіючий), 3 % пацієнтів помилково ідентифікували *A. pantherina* як *Macrolepiota procera*, а 1 % – як *Agaricus*. Усі випадки отруєння трапляються в період з липня по жовтень.

При вживанні цих грибів спостерігається чередування етапів сонливості та збудження з галюцинаціями, іноді виникають судоми. Це зумовлено тим, що іботенова кислота (син. пантерин чи агарин), мусцимол, мусказон і мускардин, які є основними токсинами цих двох видів мухомору, реагують з рецепторами нейромедіаторів центральної нервової системи. Вони швидко всмоктуються в

шлунково-кишковому тракті викликаючи психотропні ефекти [62]. Іботенова кислота діє як збуджуюча амінокислота на глутаматних рецепторах, а мусцимол діє як агоніст рецепторів гамма-аміномасляної кислоти [51].

Іншими біологічно активними речовинами є стизолобова та стизолобінова кислоти та амінодикарбоксіетилтіопропанова кислота. Всі ці сполуки відповідають за різноманітну картину інтоксикації.

Симптоми отруєнь виникають через 0,5 - 2 год. після вживання і проявляються блювотою, галюцинаціями, неспокоєм, посиленням психомоторним потягом та пригніченням центральної нервової системи. Інші антихолінергічні симптоми, такі як тахікардія та підвищення артеріального тиску, мідріаз, сухість і почервоніння шкіри, спостерігалися лише в кількох випадках. Найбільш небезпечним симптомом при отруєнні була гостра дихальна недостатність [40].

Клінічна картина отруєння *Amanita muscaria* (мухомор червоний) та *Amanita pantherina* (мухомор пантерний), характеризується ураженням центральної нервової системи та проявляється галюцинаціями, сплутаністю свідомості, збудженням, судомами та комою, ці симптоми носять назву іботеновий або пантерно-мухоморний синдром. Проте, опис цього синдрому є недосконалим, оскільки у дорослих осіб при отруєнні пантерним мухомором кома спостерігається у 80 % випадків, а при отруєнні *A. muscaria* – кома не спостерігається. Через обмежену кількість зареєстрованих випадків, диференціація клінічної картини після вживання цих двох видів грибів не була належним чином досліджена [69].

Діагностують отруєння грибами *Amanita pantherina* або *Amanita muscaria* за допомогою мікологічного дослідження промивних рідин вмісту шлунка (на основі макро- та/або мікроскопічного аналізу грибів). Лікування тільки симптоматичне, і прогноз зазвичай сприятливий, летальність зустрічається рідко [42; 51].

В таблиці 1.1 наведено основні симптоми, які властиві людям при отруєнні *A. pantherina* та *A. muscaria*

Таблиця 1.1

Симптоми та ознаки, що спостерігаються після прийому *A. muscaria* та *A. pantherina* за даними Люблянського токсикологічного центру [64]

№ п/п	Зовнішня ознака, симптому	Вид мухомору		Значення p*
		A. muscaria(n=32)	A. pantherina(n=17)	
1	Спантиченість	26	8	0.01
2	Збентеженість	20	5	0.03
3	Галюцинації	10	7	0.49
4	Міоклонія	6	6	0.20
5	Судоми	4	2	0.94
6	Сонливість	13	5	0.44
7	Кома	2	5	0.03
8	Блювання	18	11	0.57
9	Діарея	5	4	0.50

* Примітка: для порівняння категоріальних змінних та визначення статистичної значущості відмінностей між симптомами, спричиненими різними видами грибів, використано U-критерій Манна-Уїтні. Статистично значущим вважали рівень $p < 0,05$.

При цьому у пацієнтів частіше спостерігали збудження та сплутаність свідомості, що, ймовірно, пов'язано зі стимулюючим впливом іботенової кислоти на ЦНС та її вищою концентрацією порівняно з мусцимолом, який діє, як депресант. Натомість, вища частота коми при отруєнні A. pantherina може бути зумовлена пригнічувальним впливом мусцимолу на ЦНС та його вищою концентрацією відносно іботенової кислоти. Крім того, у багатьох пацієнтів, отруєних A. muscaria, сонливість розвивалася пізніше, що може бути пов'язано зі спонтанним декарбоксилюванням іботенової кислоти до мусцимолу в головному мозку. A.muscaria також містить мусказон – лактамний ізомер мусцимолу, дія якого характеризується довшим латентним періодом.

Відповідно, так званий іботеновий чи пантерно-мухоморний синдром, що виникає після отруєння A. muscaria та A. pantherina, можна поділити на два підтипи, за рахунок того, що вміст та співвідношення концентрацій іботенової кислоти та мусцимолу в цих двох видах грибів є різним. A. muscaria містить більше психостимулюючої іботенової кислоти, A. pantherina – більше інгібуючого мусцимолу (див. таблицю 1.2)

Таблиця 1.2

Вміст іботенової кислоти та мусцимолу в A.muscaria та A.pantherina

№ п/п	Сировина	К-сть іботенової кислоти		К-сть мусцимолу	
		A. muscaria	A. pantherina	A. muscaria	A. pantherina
1	свіжий гриб	100	25-50	< 3	140-350
2	сухі шапки	10-2845	188 - 269	46 - 1052	1554 -1880

Однак, м'ясисті плодові тіла мухоморів можуть містити ще більше іботенової кислоти, оскільки сушіння на сонці або з використанням нагрівача підвищує рівень мусцимолу внаслідок декарбоксилювання іботенової кислоти, при цьому значна її частина втрачається. Крім того, вміст іботенової кислоти та мусцимолу в грибах одного й того ж виду може змінюватися залежно від регіону та сезону: навесні та влітку гриби можуть містити до 10 разів більше іботенової кислоти/мусцимолу порівняно з осінніми зразками.

Отже, поділ іботенового синдрому залишається гіпотетичним, оскільки доза токсичних речовин у більшості випадків невідома через нез'ясовану кількість з'їдених грибів та вміст іботенової кислоти/мусцимолу в їхніх залишках. Проте, запропонований поділ іботенового синдрому базується на різних співвідношеннях токсичних сполук у двох видах грибів, а не на їхніх абсолютних кількостях. У цьому дослідженні всі випадки отруєння мухоморами траплялися влітку або восени. Три чверті пацієнтів помилково ідентифікували *A. muscaria* як їстівний *A. caesarea* (мухомор цезарський), що охороняється законом. Майже половина пацієнтів, отруєних *A. pantherina*, зібрали гриби, помилково вважаючи їх *A. rubescens* (мухомор рожевіючий) [69].

При отруєнні цими грибами після госпіталізації пацієнта та встановлення діагнозу починається активне лікування, яке полягає у промиванні вмісту шлунку, внутрішньовенне вливання електролітів та симптоматичне лікування. При галюцинаціях та психомоторному збудженні призначають препарати із групи бензодіазепінів та/або нейролептиків. Якщо переважають мускаринові симптоми, призначають невеликі дози атропіну [41].

1.5 Фармацевтичний ринок лікарських засобів та біологічно-активних добавок з грибами роду Мухомор в Україні

У Державному реєстрі лікарських засобів України зареєстровано два гомеопатичні препарати, у які входить екстракт мухомору червоного, а саме – «ПСІ-стабіл спаг. Пека» (оральні каплі) та «Спаскупрель» [3].

Псі-стабіл – це комплексний гомеопатичний препарат, який призначають для терапії невротичних синдромів, тривожності, стресу та безсоння. Одним із його компонентів є екстракт мухомора червоного (*Amanita muscaria* (*Agaricus*) D6 – 0,060 г). Випускається у Німеччині. Виробник: ПЕКАНА НАТУРХАЙЛЬМІТТЕЛЬ ГмбХ, Райфайсенштрассе 15, 88353 Кісслег, Німеччина. За АТС класифікацією відносять до групи *N05C M50** Інші засоби, включаючи комбінації*.

Спаскупрель – це також комбінований гомеопатичний засіб, який випускається у формі розчину для ін'єкцій (по 1,1 мл № 5 та № 100) та таблеток. Застосовують даний препарат для зняття спазмів гладкої мускулатури шлунку, кишечника, жовчного міхура, матки та сечовидільних шляхів. Знімає спазми поперечно-смугастої мускулатури (ефективний при міогельозі та затвердінні м'язів). В ампульному розчині міститься *Amanita muscaria* D4 - 0,55 мг, в таблетованих формах - *Agaricus* D4 - 15 мг. АТС група - *A03A X20** Інші препарати*. Виробник – Біологіше Хайльміттель Хеель ГмбХ/*Biologische Heilmittel Heel GmbH* (Німеччина).

Разом з цим у мережі Internet доступні порошки, капсули, таблетки, мазі, екстракти, і витяжки із мухомором червоним та мухомором пантерним, які останнім часом широко рекламуються для використання з терапевтичною ціллю.

Одним із таких інтернет-магазинів є «Лавка Мольфара» [7], який пропонує різноманітні мікродозингові комплекси, що містять мухомор червоний, мухомор пантерний та інші гриби у формі капсул, порошків та висушених плодових тіл. Зокрема ними пропонується комбінована форма мухомора червоного та їжовика гребінчастого. В описі інструкції до цього засобу наводиться, що червоний мухомор допомагає боротися із залежностями на психологічному та фізіологічному рівні; покращує мозкову діяльність, покращує чіткість та якість розумової діяльності. Також при вживанні даного мікродозингу налагоджує сон, зникає безсоння і синдром втоми.

Мережа «Мудрий мухомор» пропонує висушені цілі капелюшки мухомору червоного та мухомору пантерного (розкриті та нерозкриті), капелюшки червоного та пантерного мухоморів мелені, капсули по 0,5 г з порошком розмелених капелюшків мухомору червоного та по 0,3 г мухомору пантерного, також мухоморний мармелад (у формі желейок, що містять по 0,3 г мухомору червоного), грибний шоколад мухомору червоного та енергетичні батончики з ним [10].

Мережа «Крамниця мухоморня» пропонує капсули з порошком мухоморів червоного та пантерного, висушені шапочки цих грибів (цілі та розмелені); настоянки цих мухоморів та мазі з ними [4].

Також доволі широкий асортимент продукції на основі мухомору червоного та мухомору пантерного пропонують інтернет-магазини Muhomor Shop (<https://muhomor-ua.shop>), Коло грибів (<https://kolo-grybiv.shop/kompleksy/>); Ecohuman (<https://ecohuman.com.ua/ua/muhomor-chervonij>) та багато інших представників.

Останнім часом екстракти мухомору червоного та мухомору пантерного вводять до складу кремів для тіла, які мають терапевтичну та відновлюючу дію. Їх застосовують для втирань при варикозних розширеннях та запаленнях вен, зменшення розтяжок шкіри, при тріщинах п'яток, а полісахариди мухомору червоного сприяють оновленню шкіри. Тому використання грибів при виготовленні косметичних засобів стало звичним явищем.

У народній медицині пропонують використовувати настоянки та мазі з даними видами мухоморів. Зокрема, настоянки мухомору червоного рекомендують для втирань при болях у суглобах, радикуліті, ревматичних захворюваннях.

Народні цілителі та фітотерапевти використовують настоянки цього гриба та готують мазі для лікування та профілактики:

- психічних розладів та захворювань нервової системи;
- серцево-судинних захворювань;
- хворобах шлунково-кишкового тракту;
- болях у м'язах та суглобах;
- захворюваннях шкіри, застуді.

Серед споживачів, які прагнуть використовувати альтернативні методи лікування, набуває все ширше використання мазей, виготовлених на основі червоного мухомора. Даним засобам приписують полегшення больових синдромів різної етіології, локалізованих у суглобах та м'язах, а також редукцію запальних процесів, що супроводжують ряд захворювань. Також її рекомендують використовувати для втирань при травматичних ушкодженнях та хронічних болях. Доведено, що мазі з мухомором червоним проявляють протизапальну дію при лікуванні артритів та артрозів, за рахунок зменшення набряку та запалення в уражених суглобах, зменшують ревматичні болі.

Вважається, що мазь із мухомором червоним сприяє регенерації пошкоджених тканин, відновлює кровообіг та зменшує набряк, що дозволяє скоротити період реабілітації після травм м'язів. За рахунок того, що компоненти мухомору червоного розслаблюють м'язи, зменшують біль та покращують рухливість, їх рекомендують використовувати при неврологічних захворюваннях для зниження гіпертонусу.

Витяжки червоного мухомора проявляють загальнозміцнюючу дію. Їм також притаманні антиоксидантні властивості, які зумовлені нейтралізацією вільних радикалів та захистом клітин від оксидативного стресу.

Рекомендують вживати витяжки мухомору червоного для детоксикації організму, оскільки її біологічно-активні компоненти виводять токсини та шлаки. За рахунок того, що їй властива регенеруюча та заспокійлива дія її вводять у косметичні засоби, пояснюючи це відновленням епідермісу шкіри та зменшенням її запальних процесів. Також витяжку рекомендують вживати для профілактики та зміцнення імунної системи, покращення загального самопочуття. На відміну від класичного мікродозингу, дія настоянки проявляється швидше, забезпечуючи терапевтичний ефект. Додатково, витяжка мухомору червоного сприяє покращенню настрою, нормалізації сну та підвищенню стійкості до стресу.

Мазь на основі пантерного мухомора готують на вазеліновій основі, у яку вводять його екстракт. Рекомендують для лікування дерматологічних захворювань. Пояснюється це зменшенням запальних процесів шкіри, стимуляцією регенерації

тканин та поліпшенням мікроциркуляції крові в поверхневих шарах дерми. При ранах, опіках та обмороженнях - проявляє знеболюючі властивості та активізує процеси відновлення. Показано її ефективність при лікуванні псоріазу, нейродермітів, дерматитів та грибкових ураженнях.

Капсули з мікродозингом мухомору червоного в основному містять по 0,5 г порошку розмелених шапочок. Їх пропонують приймати двічі на день при психоемоційному пригніченні, панічних атаках, безсонні, як загальнозміцнюючий засіб – при ослабленому імунітеті, психологічному напруженні, для стимуляції когнітивної діяльності, для лікування нікотинової залежності.

1.6 Методи хіміко-токсикологічного визначення токсинів мухомору червоного та мухомору пантерного

Отруєння *A. muscaria* чи *A. pantherina* можуть траплятися випадково, через плутанину з їстівним видом грибів або незнання царства грибів. Однак значна частина цих отруєнь відбувається внаслідок добровільного рекреаційного споживання особами, які прагнуть гострих відчуттів, викликаних психотропними ефектами [46; 59]. Повідомлялося лише про один випадок смерті 55-річного чоловіка, пов'язаний з отруєнням *Amanita muscaria* [43]. На жаль, у цьому випадку було кількісно визначено лише мускарин у сечі, а не іботенову кислоту та мусцимол.

Чутливі аналітичні методи ідентифікації та кількісного визначення основних мікотоксинів у грибах роду мухомор почали розроблятися з початку 1980-х років. Серед цих методів аналізу чільне місце займає рідинна хроматографія. В опублікованих роботах наводяться методики ВЕРХ із різними способами детектування [20; 30].

Публікації, в яких описані методики кількісного визначення іботенової кислоти та мусцимолу у біологічних матрицях (сеча, кров) публікуються з 2000 року [22; 43; 61].

Було описано декілька випадків отруєння, коли біологічні зразки пацієнтів досліджували на наявність іботенової кислоти та мусцимолу. Зокрема Stříbrný J. Із

спіавт. [61] описали результати визначень рівня концентрацій у сечі іботенової кислоти (від 32 до 55 мг/л) та мусцимолу (від 6 до 10 мг/л) через 3–8 годин після вживання грибів. Hasegawa K. із спіавт. [32] навели дані про концентрації в сироватці крові іботенової кислоти (96 мкг/л) та мусцимолу (101 мкг/л) при отруєнні *A. ibotengutake* (без уточнення періоду між потраплянням всередину та відбором проб). Більш детальний опис сучасних методів визначення іботенової кислоти та її похідних наводимо нижче.

Іботенова кислота та мусцимол є високо полярними сполуками. Тому при дослідженні біологічних рідин для виявлення застосовують високоефективну рідинну хроматографію з потрійною квадрупольною мас-спектрометрією (LC-MS/MS). Ідентифікують іботенову кислоту за переходом сигналу 159→113 m/z, а мусцимол за 115→98 m/z. Межі виявлення іботенової кислоти та мусцимолу у плазмі становили 0,3 нг/мл та 0,1 нг/мл відповідно. Лінійні діапазони в плазмі становили 1-500 нг/мл для іботенової кислоти і 1-200 нг/мл для мусцимолу. Осадження білкової фракції плазми автори здійснили ацетонітрилом[70].

Розроблено метод капілярного електрофорезу (CE-ESI-MS/MS) для ідентифікації, розділення та визначення грибних токсинів, а саме іботенової кислоти, мусцимолу та мускарину. Він виявився чутливішим і більш експресним, оскільки не потребує великих затрат часу на підготовку зразків шляхом попередньої обробки. Метод CE-ESI-MS/MS був застосований для аналізу сечі людини [29].

Роблено умови ідентифікації та кількісного визначення α -, β - та γ -amanitину, мускарину, мусцимолу та іботенової кислоти методом PX- MC/MC (LC-MS/MS) на хроматографі Waters ACQUITY UPLy комбінації з мас-спектрометром Waters Xevo TQ-XS (Waters Corp., Мілфорд, Массачусетс, США). Розділення проводили на колонці ACQUITY (Waters) моделі UPLC® HSS T3 (100 мм × 2,1 мм, 1,7 мкм). Рухома фаза складалася з води, що містила 1 мМ фториду амонію (розчин А) та метанолу (розчинник В). В модельні проби сечі та сироваток вводили відповідні сполуки. При аналізі сечі її розводили водою у співвідношенні 1:1 та піддавали центрифугуванню. До сироваток вносили ацетонітрил для осадження білкової фракції і проби центрифугували. У відібрані над осадом рідини вносили по 20 мг

сорбенту PSA SPE, і після збовтування та центрифугування відбирали верхній шар рідини для аналізу LC-MS/MS. Даною методикою можна паралельно ідентифікувати 12 грибних токсинів із різним механізмом дії [39].

Описано методику визначення дев'яти грибних токсинів, у тому числі іботенової кислоти, мусцимолу, мускарину, α - та β -аманітину у зразках грибів. Токсини екстрагували з плодових тіл грибів 0,5 % мурашиною кислотою в метанолі/воді, очищали за допомогою картриджів Oasis HLB та аналізували методом РХ/МС. Розділення проводили на пентафторфенілпропіловій колонці, а мас-спектрометр працював у режимі позитивних іонів з іонізацією електророзпилюванням. Калібрувальні криві були лінійними в діапазоні 0,01–1 мкг/мл ($R^2 = 0,999$). Межі виявлення токсинів у зразках грибів становили 0,0098–4,9 мкг/г, що було достатньо низьким для встановлення випадків харчового отруєння [71].

В.Мерова із співав. [44] описали методику визначення мускарину в сечі людини методом РХ/МС. Екстракцію мускарину із сечі проводили на колонці Strata X-CW. Розділення мускарину проведено на колонці з оберненою фазою Gemini C18 (150 мм $\times$ 2,0 мм внутрішній діаметр, 5 мкм). Рухома фаза складалася з водного розчину гептафтормасляної кислоти та ацетонітрилу, які подавались у градієнтному режимі. Мас-спектрометричне детектування проводилося при m/z 174 та m/z 216 для мускарину та ацетилмускарину (внутрішній стандарт) відповідно. Метод дозволяє швидко провести діагностику інтоксикації мускарином і має переваги перед мікроскопічним дослідженням спор у шлунковому вмісті в клінічній практиці.

Для визначення мусцимолу у водних екстрактах *A. muscaria* було розроблено метод обернено - фазної ВЕРХ. Аналіз розроблено на колонці C18, рухома фаза вода-метанол (98:2), детектування проведено при 256 нм. Дана методика рекомендована для кількісного визначення мусцимолу. При цьому встановлено, що вміст мусцимолу становив 3,57 % від ваги плодового тіла свіжого *Amanita muscaria*. Найвищий рівень концентрації мусцимолу був у молодих грибів [13].

Описано електрохімічні способи виявлення іботенової кислоти, мусцимолу та мусказону шляхом окиснення цих сполук на різноманітних анодах [35; 38; 50].

Мусцимол окислюється при нижчих потенціалах, ніж іботенова кислота та мусказон. Для цієї мети можна використовувати хімічно модифіковані електроди, що містять сильні окиснювачі [35]. Авторами розроблено композитний матеріал електроду з наночастинок CuS з провідним полімером, в якому полімер є медіатором та стабілізатором, а CuS є вихідним матеріалом для *in situ* анодного синтезу тривалентної міді у вигляді сульфогідроксиду [64].

Розділ 2

МЕТОДИКИ ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ГРИБАМИ AMANITA MUSCARIA ТА AMANITA PANTHERINA

(Експериментальна частина)

2.1 Опис об'єктів дослідження

Збір мухомору червоного та блідої поганки проводився в Івано-Франківській області на території спеціалізованого лісомисливського науково-дослідного

природо-заповідного господарства «Чорний ліс» (Ріп'янецьке лісництво 2142 га). Сировину заготовляли у жовтні 2024 року.

Збір мухомору пантерного проведено у жовтні 2024 року у Лапаївському лісництві Львівської області.

Ідентифікацію зібраних грибів проводили за зовнішніми ознаками, а також застосовуючи безкоштовні версії трьох програм для ідентифікації грибів:

- 1.Ідентифікатор гриба - ідент. Розробник: [Annapurnapp Technologies GmbH](#) ;
- 2.Гриби - III ідентифікація. Розробник: [Gabotech Industries](#) ;
- 3.Грибок - Ідентифікація чес. Розробник: [Домінік Штайнгаузер](#)

При цьому вимірювали розмір плодового тіла та зважували кожен із грибів (рис.2.1).

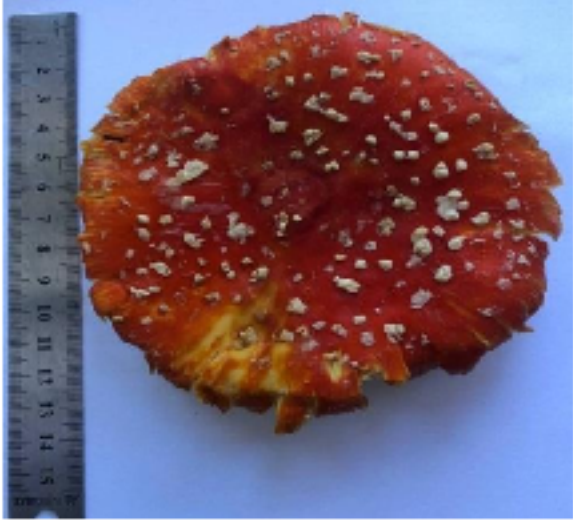
Мухомор червоний (<i>Amanita muscaria</i>)	Мухомор пантерний <i>Amanita pantherina</i>	Мухомор зелений (<i>Amanita phalloides</i> , бліда поганка)
		

Рис. 2.1 Зовнішній вигляд деяких відібраних зразків

Виготовлення настоянок із свіжозібраних та висушених зразків мухоморів.

Зібрані зразки грибів зважували і ділили на дві частини. Одну частину використовували для безпосереднього виготовлення водно-етанольних настоянок.

Для цього відібрані порції плодових тіл зважували, подрібнювали на куски розміром 1-1,5 см. Подрібнені порції вносили в хімічний стакан і заливали 40 % розчином етанолу до повного покриття частинок.

Проби настоювали при кімнатній температурі в темному місці протягом 10 днів, періодично перемішуючи зразки. Після цього водно-етанольні витяжки

зливали проціджуванням через марлю та фільтрували через паперовий фільтр.

Вимірювали об'єми фільтратів та зберігали їх у скляному посуді з темного скла в закритому вигляді.

Сушіння зібраних порцій грибів проводилось у притіненому місці на свіжому повітрі.

Висушені зразки зважували і подрібнювали у порошкоподібну масу шляхом розмелювання. Після цього у кожную пробу вносили по 25 мл 40 % розчину етанолу і настоювали при кімнатній температурі протягом 10 днів при збовтуванні. Проби фільтрували через паперовий фільтр, доводили їх об'єм до 25 мл і зберігали настоянки в посуді із темного скла.

У таблиці 2.1 наведено масу деяких із відібраних проб мухоморів та їх масу після сушіння.

Таблиця 2.1

Результати визначення втрат в масі при сушінні представників *Amanita*

Сировина	Номер зразка	Загальна маса гриба, г	Маса гриба до сушіння, г	Маса гриба після сушіння, г	Вміст сухого залишку, %	Втрата в масі, %
1	2	3	4	5	6	7
Шапочки <i>Amanita muscaria</i>	10	48	25	1,31	5,24	94,76
	11	53	26	1,38	5,31	94,69
	12	57	30	1,05	3,5	96,5
Продовження таблиці 2.1						
Плодове тіло <i>Amanita pantherina</i>	15	68	35	2,16	6,17	93,83
	16	43	20	1,50	7,5	92,5
Плодове тіло <i>Amanita phalloides</i>	17	17	6	0,43	7,16	92,84
	18	35	18	1,20	6,67	93,33

Отже, як видно із наведених у таблиці 2.1 даних, при висушуванні плодових тіл мухомору червоного маса сухого залишку становить 3,5-5,3 %.

При висушуванні мухомору пантерного сухий залишок становить 6,2-7,5 %, а при сушінні блідої поганки маса сухого залишку становить 6,7-7,2 % від початкової маси свіжих зразків.

Також об'єктами дослідження були капсули, які містили по 0,5 г розмеленого

порошку мухомору червоного (придбаного в мережі «Крамниця мухоморня») та капсули з мухомором пантерним по 0,3 г (придбані в мережі «Мудрий мухомор»).

При цьому вміст капсул кількісно переносили в мірні пробірки і в кожную із них додавали по 10 мл 40 % водного розчину етанолу. Проби настоювали 4 години при перемішування, після чого фільтрували через паперовий фільтр та доводили об'єм до 10 мл водою і використовували для досліджень.

2.2 Ідентифікація нейротоксинів у настоянках *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides* за допомогою хімічних реакцій

Для ідентифікації алкалоїдів у досліджуваних видах мухоморів було проведено ряд якісних реакцій. Ці реакції дозволяють виявити наявність певних функціональних груп в молекулах алкалоїдів і, таким чином, підтвердити або спростувати припущення про їх присутність у досліджуваних зразках.

На аналіз було взято декілька зразків: екстракти з плодових тіл пантерного мухомора (зразки 15 і 16), червоного мухомора (зразки 10-12) та блідої поганки (зразки 17-18).

Реакції проводили у пробірках. На одне дослідження відбирали по 0,5 мл відповідної настоянки.

Реакція з *n*-диметиламінобензальдегідом.

До настоянок у пробірках вносили по 0,5 мл 1% розчину *n*-диметиламонобензальдегіду в 96% етанолі та по 0,1 мл конц. хлоридної кислоти. Пробірки нагрівали 1-2 хв на киплячому водяному огрівнику. Після цього відмічали забарвлення.

У пробах 10-12 настоянок мухомору червоного розчин забарвлювався у яскраво-рожевий колір.

У пробах 15-16 (що відповідають настоянкам мухомору пантерного) розчини забарвлювались в інтенсивно оранжево-червоний колір.

У пробах 17-18, які містили настоянку блідої поганки розчин забарвлювався оранжево-рожевий колір.

Реакція з реактивом Неслера.

Ці реакції проводили в пробірках та на пластинках. Для цього у лунки фаянсових пластинок вносили по 0,1 мл настоянок грибів, розчинник випаровували досуха, а в сухі залишки вносили по 2-3 краплі реактиву Неслера.

У пробірки вносили по 0,5 мл водно-етанольних настоянок та прибавляли по 2-3 краплі реактиву Неслера.

При цьому у пробірках та на пластинках формувався осад, який характеризувався різним забарвленням.

У пробах 10-12 випадав оранжевий осад, який через 1-2 хв. ставав брудно-зеленим, пробах 15-16 випадав темно-оранжевий осад, а в пробах 17-18 формувався світло-жовтий осад.

Реакція з розчином нінгідрину на фільтрувальному папері.

Реакцію із розчином нінгідрину застосовують для виявлення амінокислот. При цьому утворюються сполуки, які мають синьо-фіолетове забарвлення різного відтінку.

Розчин нінгідрину готували наступним способом: до наважки нінгідрину масою 0,5 г вносили 10 мл концентрованої хлоридної кислоти та 90 мл ацетону.

Нами було встановлено, що іботенова кислота із розчином нінгідрину утворює сполуку, забарвлену у жовтий колір. Тому нами була апробована дана реакція для виявлення іботенової кислоти у неочищених досліджуваних витяжках. Для цього на фільтрувальний папір наносили по 3-4 краплі кожної із досліджуваних витяжок, папірець підсушували на повітрі і наносили по 3-4 краплі ацетонового розчину нінгідрину. Через 1-2 хв на папері спостерігалось фіолетове забарвлення плям, але паралельно із цим проявлялась іботенова кислота у формі жовтої плями у пробах, які містили витяжки мухоморів пантерного та червоного (рис. 2.1).

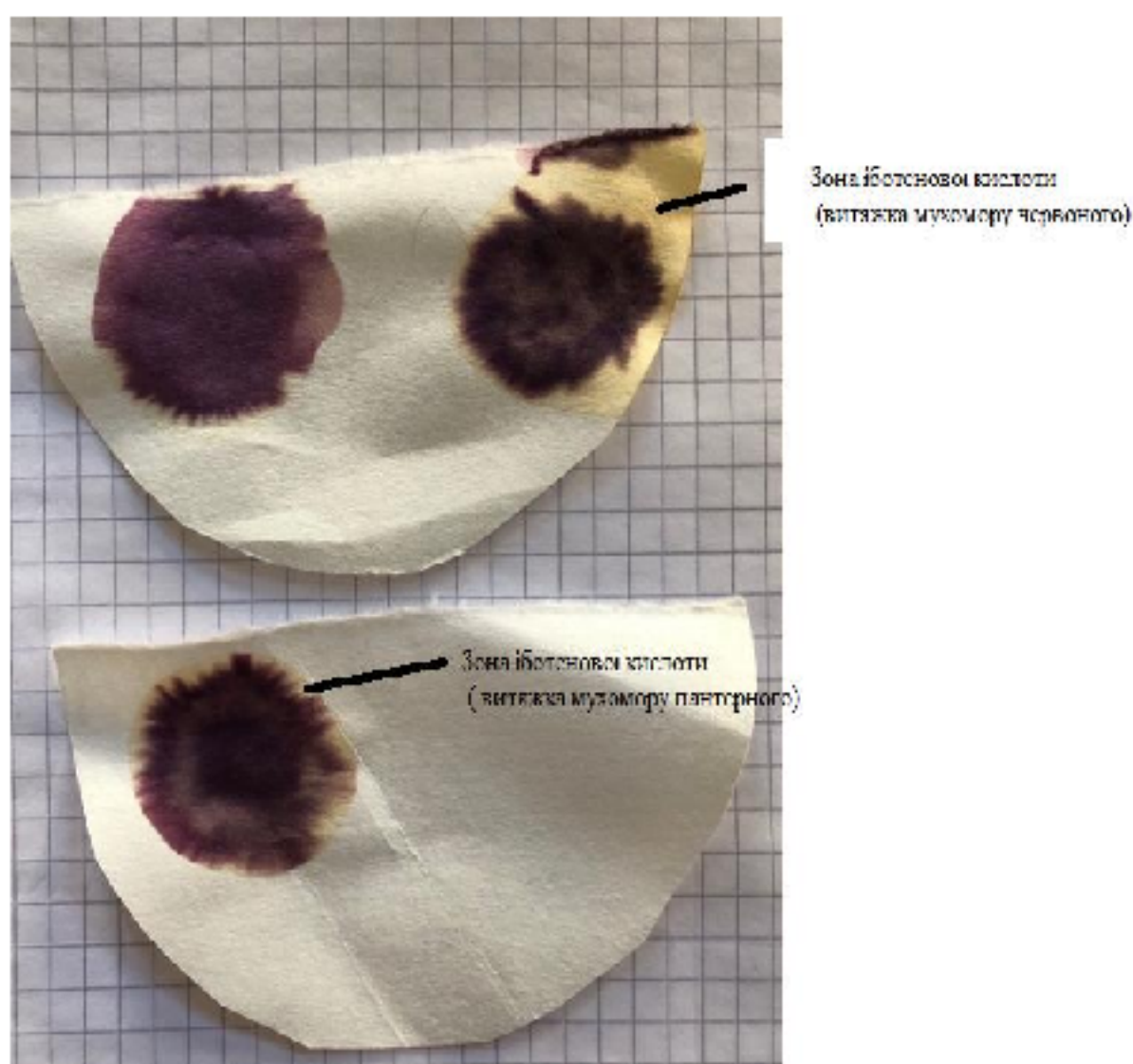


Рис.2.1 Результат виявлення іботенової кислоти у настоянках мухомору червоного та мухомору пантерного

Також нами вивчено характер продуктів реакції біологічно-активних сполук (алкалоїдів) із реактивами, які використовуються при хіміко-токсикологічному дослідженні для підтвердження наявності отрут різної природи. Реакції осадження проводили на фаянсових пластинках, в лунки яких вносили по 300 мкл водно-спиртових витяжок. Розчинник випаровували до сухого залишку, після чого вносили по 4-5 крапель відповідного реактиву.

Реакції утворення водорозчинних забарвлених сполук проводили у пробірках. Для цього також відбирали по 300 мкл досліджуваних витяжок і вносили по 200 мкл кожного із зазначених нижче реактивів.

Забарвлення продуктів реакцій наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2.

Результати реакцій виявлення алкалоїдів у водно-спиртових настоянках плодових тіл *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides*

Реактив	Досліджувана настоянка		
	<i>Amanita phalloides</i>	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Amanita pantherina</i>
1	2	3	4
Шейблера	Інтенсивний осад темно-бежевого кольору	Осад білого кольору	Світло-жовте помутніння розчину
Драгендорфа	Інтенсивний цеглястий осад	Оранжевий осад	Осад темно-бурого кольору
Міднопіридиновий реактив	Синьо-зелений розчин	Блакитний колір розчину	Зеленувато-блакитний розчин
Зонненшейна	Брудно-зелений колір розчину	Розчин смарагдового кольору	Сіро-зелене забарвлення розчину
Міллона	Оранжевий р-н	-	Блідо-оранжевий розчин
Майєра	-	-	-
Манделіна	-	-	-
Маркі	-	-	-
ClZnI	Осад бурого кольору	Осад бурого кольору	Осад темно бурого кольору
I ₂ в KI	Цеглястий осад	Цеглястий осад	Цеглястий осад
Мідноїодидний комплекс	-	-	-
Залізоїодид-ний комплекс	На поверхні розчину формується сіра плівка (схожа на плями бензину)	Бурий осад	На поверхні розчину формується сіра плівка (схожа на плями бензину)
K ₃ [Fe(CN) ₆]	-	-	Оранжево-коричневий осад
K ₄ [Fe(CN) ₆]	-	-	Коричнево бурий осад
FeCl ₃	Світло коричневе забарвлення розчину	-	Бурий осад
Продовження таблиці 2.2			
CuSO ₄	Зеленувато-смарагдовий р-н	Зеленувато-смарагдовий р-н	Зеленувато-смарагдовий р-н
Сіль Рейне	Оранжево-рожевий колір розчину	Розчин рожевого кольору	Розчин інтенсивного оранжево-червоного кольору
H ₂ SO ₄ (конц.)	-	-	-
Хромотропо-ва кислота	Коричнево-оранжевий розчин	Розчин блідо-оранжевого кольору	Вишневий колір розчину

За результатами реакцій, можна зробити висновок, що настоянки із мухомору червоного, мухомору пантерного та блідої поганки можна розрізнити реакціями з хромотроповою кислотою, сіллю Рейне, з розчином *n*-диметиламінобензальдегіду та реактивами Неслера і Зоненшейна. Для експрес-виявлення іботенової кислоти доцільно застосовувати реакцію з ацетоновим розчином нінгідрину на фільтрувальному папері, яку можна використовувати як швидкий тест для виявлення слідів іботенової кислоти у промивних водах шлунку.

2.3 Ідентифікація мускарину, іботенової кислоти та мусцимолу у витяжках плодових тіл *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides* методом хроматографії у тонких шарах сорбенту

Метод хроматографії в тонких шарах сорбенту дозволяє проводити скринінг наявності отруйних сполук у пробах із біологічного матеріалу при хіміко-токсикологічних дослідженнях. Висновок про подальші дослідження інструментальними методами аналізу проводиться на основі позитивних результатів методу ТШХ.

Нами були проведені дослідження із вибору систем розчинників для розділення алкалоїдів та амінокислот у витяжках *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides* на пластинках Sorbfil.

При цьому на лінію старту хроматографічних пластинок наносили по 10 мкл водно-етанольних настоянок досліджуваних мухоморів, а також по 5 мкл метанольних розчинів іботенової кислоти, мусцимолу та мускарину із концентрацією кожної із досліджуваних речовин 100 мкг/мл. Після підсушування зон нанесених речовин пластинки піддавали хроматографічному розділенню у системах розчинників, склад яких наведено у таблиці 2.3. Фронт систем розчинників на пластинках становив 10 см.

Проявлення плям зон розділених речовин проводилось реактивами:

- Драгендорфа – плями забарвлювались в темно-жовтий, оранжевий та бурий та фіолетово-бурий колір;
- 1 % розчином ваніліну в етанолі з наступною обробкою пластинок 1 М розчином хлоридної кислоти та нагріванням при $t = 120^{\circ}\text{C}$ протягом 10-15 хв – плями мали жовтувато-коричнєве забарвлення;
- 0,5 % розчином нінгідрину в ацетоні, підкисленим хлоридною кислотою – зони речовин проявлялись при кімнатній температурі (іботенова кислота – жовта пляма, мускарин – темно-фіолетова пляма, мусцимол – рожево-фіолетова пляма. Плями інших не ідентифікованих нами амінокислот та алкалоїдів мали синьо-фіолетове забарвлення різної інтенсивності;

- деякі сполуки при опроміненні пластинок УФ-світлом ($\lambda = 264$ нм) давали характерну флуоресценцію (жовту, блакитну, синю).

Значення величин R_f розділених сполук у різних за складом системах розчинників наведене в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Величини R_f компонентів водно-етанольних настоянок плодових тіл

Amanita muscaria, *Amanita pantherina* та *Amanita phalloides*

(візуалізацію плям проведено розчином нінгідрину та УФ-світлом)

Система розчинників	Величини R_f розділених компонентів при дослідженні настоянок			Значення R_f стандартів
	Настоянка <i>Amanita muscaria</i>	Настоянка <i>Amanita pantherina</i>	Настоянка <i>Amanita phalloides</i>	1) Іботенова кислота; 2) Мусцимол; 3) Мускарин
1	2	3	4	5
Етанол-метанол-аміак (50:50:2)	0,1 (рожева)	-	-	
	-	0,14±0,01 (фіолетово-рожева)	0,14±0,01 (фіолетово-рожева)	
	0,45± 0,02 (жовта)	0,45± 0,02 (жовта)	0,45± 0,02 (жовта)	1)0,45- 0,46 (жовта)
	0,55± 0,02 (тілесно-оранжеве)	0,55± 0,02 (тілесно-оранжеве)	0,56 ±0,01 (тілесно-оранжеве)	2)0,55-0,56 (оранжева)
	-	-	0,59 (рожева)	
	0,63±0,01 (малинова)	0,63±0,01 (малинова)	0,62 ± 0,01 (малинова)	

	0,75±0,01 (бордова)	0,75±0,01 (бордова)	0,78 (малинова)	3) 0,75-0,75 (бордова)
	-	-	0,87 (бордова)	
	<u>Флуоресціюючі зони:</u>	<u>Флуоресціюючі зони</u>	<u>Флуоресціюючі зони</u>	
		0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	
			0,40	
			0,52-0,53	
	0,80	0,80	0,80	
	0,92	0,92	0,92	
Етилацетат-пропанол-вода (20:10:6)	0,08 (блідо-фіолетова)	0,07-0,08 (фіолетова)	0,08 (темно-бордова)	
	0,12 (жовта)	0,11-0,12 (жовта)	0,12 (жовта)	1) 0,12 (жовта)
	0,15-0,16 (оранжево-червона)	0,17-0,19 (оранжево-червона)	0,16 (оранжево-червона)	2) 0,17 (оранжево-червона)
	0,21-0,23 (фіолетово-бордова)	0,22-0,23 (фіолетова)	0,23(фіолетова)	
	<i>Продовження таблиці 2.3</i>			
	0,27 (бордова)	0,27 (бордова)	0,27 (бордова)	3) 0,27 (бордова)
	<u>Флуоресціюючі зони:</u>	<u>Флуоресціюючі зони:</u>	<u>Флуоресціюючі зони:</u>	
	<u>0,26</u>	<u>0,26</u>	<u>0,26</u> <u>0,45</u> <u>0,72</u>	
хлороформ-ацетон-ДМФА (21:20:1)	старт	старт	старт	старт
Етилацетат-метанол-аміак (40:10:1)	Плями не розділились, йдуть одним фронтом від лінії старту до 0, 15	Плями не розділились, йдуть одним фронтом до 0,15	Плями не розділились, йдуть одним фронтом, до 0,15	0
Хлороформ-ацетон (9:1)	На старті	На старті	На старті	На старті
Метанол-ацетон-аміак (20:25:1)	0,08(фіолетова)	0,08 (фіолетова)	0,08 (фіолетова)	
	0,20 (блідо-фіолетова)	0,20 (фіолетова)	0,20 (фіолетова)	
	0,3 (темно-фіолетова)	0,3 (темно-фіолетова)	0,3 (темно-фіолетова)	
	0,35 (малиново-червона)	0,35 (малиново-червона)	0,36-0,37 (малиново-червона)	1); 2) жовто-оранжева
	0,42 блідо-рожева	0,42 (малиново-червона)	0,43 (малиново-червона)	3) 0,42-0,43 (бордова)
		0,90 (фіолетова)		
Метанол-25 % аміак (50:2)	0,15 червоно-фіолетова	0,15 червоно-фіолетова	0,15 червоно-фіолетова	
		0,26 синій хвіст		
			0,35 синя	
	0,46 жовта	0,45-0,47 жовта	0,45 жовта	1) 0,45-0,46 жовта
			0,50 фіолетова	
	0,57 оранжево-червона	0,55- 0,56 оранжево-червона	0,55-0,57 оранжево-червона	2) 0,56 оранжево-червона
	-	-	0,60 рожево-фіолетова	
	0,66 рожево-фіолетова	0,65 рожево-фіолетова	0, 66-0,67 рожево-фіолетова	
	0,68 (рожево-			

	фіолетова)			
	<i>Продовження таблиці 2.3</i>			
	0,75-0,77 (фіолетово-бордова)	0,75 (фіолетово-бордова)	0,75 -0,77 (фіолетово-бордова)	3) 0,76 (фіолетово-бордова)

Дані, наведені у таблиці 2,3 свідчать, що іботенову кислоту, мусцимол та мускарин методом ТШХ можна ідентифікувати у системах розчинників етанол-метанол-аміак (50:50:2); етилацетат-пропанол-вода (20:10:6); метанол-аміак (50:2); метанол-ацетон-аміак (20:25:1). Потрібно зазначити, що у системі розчинників метанол-ацетон-аміак (20:25:1) іботенова кислота та мусцимол не розділяються. Розрізнити настоянки трьох видів мухоморів можна у системах розчинників етанол-метанол-аміак (50:50:2) та метанол-25 % аміак (50:2).

2.4. УФ-спектрофотометричне визначення іботенової кислоти у розчинах та настоянках

Для кількісного визначення іботенової кислоти нами було знято УФ-спектр світлопоглинання водного розчину даної сполуки, шляхом розведення водою стандартного водного розчину іботенової кислоти з концентрацією 100 мкг/мл. Розчини готували в мірних колбах місткістю 5 мл.

Для виготовлення серії робочих розчинів в мірні колби вносили по 50, 100, 150, 250 та 400 мкл стандартного розчину іботенової кислоти з концентрацією 100 мкг/мл. Об'єми розчинів у колбах доводили водою до позначки. При цьому концентрація іботенової кислоти у робочих розчинах становила 1 мкг/мл; 2 мкг/мл; 5 мкг/мл 8 мкг/мл та 10 мкг/мл. Готували три серії робочих розчинів.

Спершу було знято УФ-спектр водного розчину іботенової кислоти з концентрацією 2 мкг/мл. Усі вимірювання проводили на спектрофотометрі Specord 50 plus (кювета 1 см). Характер спектральної кривої представлено на рис. 2.2.

Нами встановлено, що УФ-спектр іботенової кислоти характеризується однією інтенсивною смугою поглинання з максимумом при 212 нм.

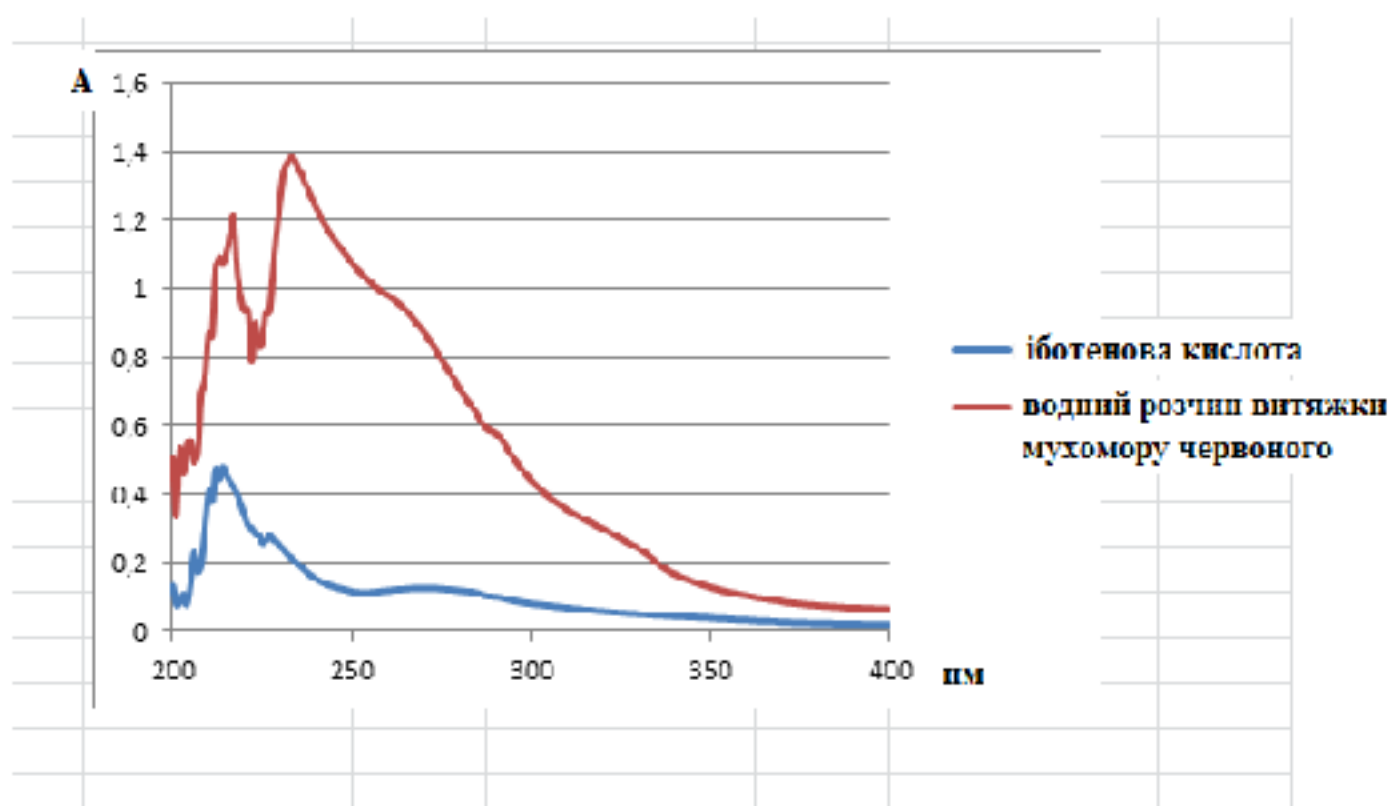


Рис.2.3 УФ-спектр водного розчину іботенової кислоти (2 мкг/мл) та розведеного розчину витяжки мухомору червоного.

При даній довжині хвилі вимірювали оптичну густину серії робочих розчинів. За результатами трьох паралельних визначень оптичної густини розраховували питомий показник поглинання іботенової кислоти.

Результати представлені в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

**Розрахунок питомого показника поглинання іботенової кислоти
у водних розчинах**

К-ція іботенової кислоти, мкг/мл	Оптична густина				Питомий показник поглинання ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$)	Метрологічні характеристики
	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{сер.}}$		
1,0	0,235	0,232	0,236	0,234	2340	$\bar{X} = 2368$
2,0	0,475	0,480	0,470	0,475	2375	$S = 17,39$
3,0	0,712	0,720	0,715	0,716	2387	$S_{\bar{x}} = 7,77$
5,0	1,188	1,180	1,184	1,184	2368	$\Delta x = 21,62$
8,0	1,902	1,896	1,895	1,898	2372	$\varepsilon = 0,91\%$

Наведені дані свідчать, що для іботенової кислоти питомий показник поглинання при 212 нм становить 2368. При цьому відносна похибка кількісного визначення показника поглинання не перевищує 0.91 %.

2.5 Ідентифікація мусцимолу у водних розчинах методом УФ-спектрофотометрії. Виявлення іботенової кислоти та мусцимолу у витяжках грибів та порошках капсул методом УФ-спектрофотометрії.

Нами проведено серію попередніх досліджень, які базувались на виявленні мусцимолу у витяжках мухомору пантерного та мухомору червоного, які можна було б використати для експрес діагностики отруєнь цими грибами.

Для цього було знято УФ-спектри поглинання водного стандартного розчину мусцимолу (з концентрацією 10 мкг/мл) та розведених водних розчинах витяжок із мухомору пантерного і мухомору червоного. Використовували витяжки, які готували із свіжих грибів, так і з висушених зразків. Паралельно були зняті УФ-спектри водних розчинів, шляхом розведення водно-етанольних витяжок із капсул з порошками мухомору червоного та мухомору пантерного, виготовлення яких описано у розділі 2.1.

УФ- спектр мусцимолу у суміші із іботеновою кислотою, які виділено із мухомору пантерного наведено на рис. 2.4 .

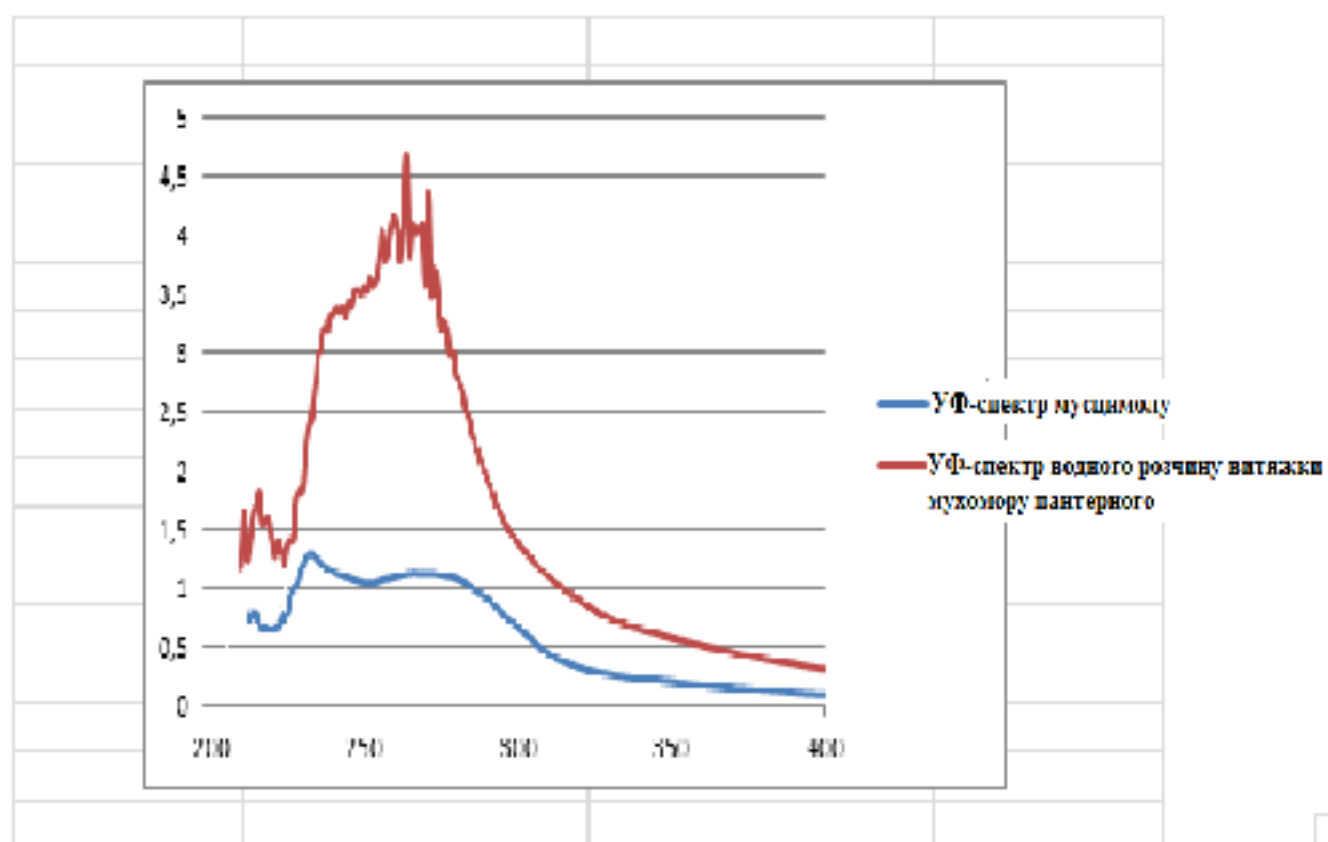


Рис.2.4 УФ-спектр мусцимолу та суміші іботенової кислоти з мусцимолем, виділених із *Amanita pantherina*

УФ-спектр водного розчину мусцимолу характеризується двома смугами

поглинання з максимумами 231-233 нм та 264-268 нм.

Як зображено на спектральній кривій, представленій на рис. 2.3 із мухомору червоного ізолюється також мусцимол, перша смуга поглинання якого також має максимум при довжинах хвиль 232-234 нм, а друга смуга поглинання на спектральній кривій виписується у вигляді плеча, за рахунок накладання спектрів, а плече спостерігається при 264-268 нм.

Відповідно, за характером спектральних кривих можна провести ідентифікацію іботенової кислоти та мусцимолу у настоянках мухомору червоного та мухомору пантерного.

2.6 Кількісне визначення іботенової кислоти у настоянках мухомору червоного, пробах крові та сечі

Кількісне визначення іботенової кислоти у настоянках мухомору червоного

Для визначення кількісного вмісту іботенової кислоти у настоянках 1 мл настоянки мухомору червоного випаровували досуха, сухий залишок кількісно розчиняли у 200 мкл 96 % етанолу та наносили на лінію старту хроматографічних пластинок, покритих тонким шаром силікагелю. Пластини хроматографували у системі розчинників етанол-метанол-25% аміак. Фронт системи розчинників становив 15 см. Після хроматографування та висихання шару сорбенту, із зони, яка відповідала іботеновій кислоті знімали сорбент і елюювали досліджувану сполуку порціями води (загальний об'єм 10 мл). Розчин фільтрували та при необхідності доводили водою до об'єму 10 мл.

Проводили вимірювання значень оптичної густини при 212 нм, за значенням якої розраховували загальний вміст іботенової кислоти у настоянці.

Кількісне визначення іботенової кислоти у біологічних рідинах.

Для проведення цього дослідження готували модельні проби біологічних рідин. Для виготовлення кожної із них використовували по 5 мл крові та по 10 мл сечі.

Готували по 5 проб кожної із біологічних рідин, в які вносили по 1 мл водно-етанольних витяжок із *Amanita muscaria*. При цьому вносили настоянки, отримані

із свіжих та висушених зразків сировини. Проби перемішували і проводили ізолювання.

Паралельно досліджували контрольні проби.

Методика ізолювання компонентів витяжок із крові. У зразки крові вносили по 1,5 мл ацетонітрилу до повного осадження еритроцитарної маси. Суміші збовтували і піддавали центрифугуванню (20 хв при 15000 об/хв).

Надосадову рідину кількісно переносили в екстракційні пробірки, у які попередньо внесли по 5 мл ацетатного буферного розчину (рН=4,2) та 5 мл хлороформу. Пробірки закривали і збовтували протягом 20 хв (у механічному струшувачі). Після цього кількісно відбирали 2500 мкл хлороформної витяжки. Відібраний хлороформовий екстракт випаровували досуха, а сухий залишок кількісно розчиняли у 200 мкл 96 % етанолу.

Етанольний розчин кількісно наносили на хроматографічну пластинку, покриту шаром силікагелю та хроматографували у системі розчинників етанол-метанол-аміак (50:50:2). Після хроматографування з пластинок знімали шар сорбенту, який відповідав зоні іботенової кислоти та проводили елюювання, шляхом обробки сорбенту водою (загальним об'ємом 10 мл). Розчин фільтрували, та доводили загальний об'єм до 10 мл.

Після цього вимірювали значення оптичної густини при 212 нм. і проводили розрахунки.

Методика ізолювання компонентів витяжок із сечі. Для цього зразки сечі переносили у центрифужні пробірки, в які краплями додавали 0,1 М розчин хлоридної кислоти до рН 4 та вносили 5 мл хлороформу. Проби помішали у механічний екстрактор. Процес екстракції тривав 20 хв. (60 коливань /хв.). Після цього для пришвидшення розділення фаз проби піддавали центрифугуванню (20 хв при 15000 об/хв). Кількісно відбирали 2500 мкл хлороформового екстракту, органічний розчинник випаровували досуха, а сухий залишок розчиняли в 200 мкл 96 % етанолу.

Далі проводили розділення іботенової кислоти методом ТШХ, у системі розчинників етанол-метанол-25 % аміак (50:50:2). Із сорбенту, в якому знаходилась

зона іботенової кислоти елюювали дану речовину водою. Водний елюат фільтрували та доводили водою до позначки 10 мл.

Знімали спектри поглинання в УФ-ділянці, відносно контрольного розчину відповідної біологічної проби. За значенням оптичної густини при 212 нм розраховували кількісний вміст іботенової кислоти.

Результати кількісного визначення іботенової кислоти у настоянці мухомору червоного та пробах біологічних рідин наведено у таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Результати кількісного визначення іботенової кислоти у витяжці Мухомору червоного та біологічних рідинах методом УФ-спектрофотометрії

Взято настоянки мухомору червоного на 1 дослідження, мл	Вміст іботенової кислоти				
	в 1 мл настоянки, мкг	Виділено із крові 5 мл крові		Виділено із сечі	
		мкг	%	мкг	%
1,0	25,0	19,63	78,6	23,58	94,5
1,0	24,8	18,85	75,5	23,45	93,9
1,0	24,6	19,83	79,4	23,80	95,3
1,0	25,3	19,35	77,5	23,47	94,0
1,0	25,1	20,05	80,3	23,63	94,7
Метрологічні характеристики	$\bar{X} = 24,96$	$\bar{X} = 19,54$		$\bar{X} = 23,59$	
	$S = 0,27$	$S = 0,46$		$S = 0,14$	
	$S_{\bar{x}} = 0,12$	$S_{\bar{x}} = 0,21$		$S_{\bar{x}} = 0,06$	
	$\Delta x = 0,34$	$\Delta x = 0,58$		$\Delta x = 0,17$	
	$e = 1,34 \%$	$e = 2,96 \%$		$e = 0,75 \%$	

Представлені у таблиці 2,5 результати свідчать, що метод УФ-спектрофотометрії можна розглядати як альтернативний метод для кількісного визначення іботенової кислоти, як в настоянках мухоморів, так і при дослідженні біологічних рідин. Проте потрібна тривала підготовка проб, оскільки очищення від

супутніх біологічно-активних сполук необхідно проводити методом ТШХ. Із застосуванням даної методики відносна похибка кількісного визначення іботенової кислоти у настоянках не перевищує 1,34 %, у крові 2,96% , а у сечі – 0,75 %.

ВИСНОВКИ

1. Гриби роду Мухомор містять галюциногенні сполуки, такі як *мускарин*, *іботенову кислоту*, *мусцимол*, *мусказол* та інші алкалоїди, які проявляють нейротоксичну дію. Окрім того, *Amanita phalloides* (бліда поганка) містить смертельно отруйні біциклічні октапептиди – *аматотоксини*.
2. Настоянки мухомору червоного, мухомору пантерного та блідої поганки можна розрізнити реакціями з хромотроповою кислотою, сіллю Рейне, з розчином *n*-диметиламінобензальдегіду та реактивами Неслера і Зоненшейна. Для експрес-виявлення іботенової кислоти доцільно проводити реакцію з розчином нінгідрину на фільтрувальному папері, яку можна використовувати для виявлення її слідів у промивних водах шлунку. Для ідентифікації іботенової кислоти, мусцимолу та мускарину методом ТШХ запропоновано склад 4-х систем розчинників. Встановлено, що настоянки трьох видів мухоморів можна розрізнити у системах розчинників етанол-метанол-аміак (50:50:2) та метанол-25 % аміак (50:2).
3. Розроблено умови ідентифікації іботенової кислоти та мусцимолу у складі настоянок плодових тіл мухомору червоного та мухомору пантерного. УФ-спектр іботенової кислоти характеризується однією інтенсивною смугою поглинання з максимумом при 212 нм, а водного розчину мусцимолу – двома смугами поглинання з максимумами 231-233 нм та 264-268 нм. Ця особливість дозволяє одночасно виявляти два токсини у настоянках.
4. Для кількісного визначення іботенової кислоти розраховано питомий показник поглинання при 212 нм. При цьому відносна похибка визначення не перевищує 0.91 %. Встановлено, що при УФ-спектрофотометричному визначенні відносна похибка кількісного визначення іботенової кислоти у настоянках не перевищує 1,34 %, у крові – 2,96% , а у сечі – 0,75 %.
5. Опрацьовано методики ізолювання іботенової кислоти із крові та сечі, які ґрунтуються на процесах осадження, рідинної екстракції та розділенні від

супутніх речовин методом ТШХ. При цьому із крові виділено 75-80 % , а з сечі 93-95 % іботенової кислоти.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авад А.А.Дж.А., Король В.В., Рибак В.А., Козловський А.П. Особливості лікувальних властивостей мухомора червоного / А.А.Дж.А. Авад, В.В. Король, В.А. Рибак, А.П. Козловський // Сучасні досягнення фармацевтичної технології : матеріали конференції (10-11 травня 2023 р., м. Харків). — Харків, 2023. — С. 162–166.
2. Антоняк Г.Л., Калинець-Мамчур З.І., Дудка І.О., Бабич Н.О., Панас Н.Є. Екологія грибів: монографія.- Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2013.- 628 с.
3. Державний реєстр лікарських засобів України. *Amanita muscaria*. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=Amanita%20muscaria>.
4. Крамниця мухоморня. Режим доступу: <https://muhomornya.com/collections/all>
5. Крамниця мухоморня. Яка користь від червоного мухомора? Режим доступу: <https://muhomornya.com/blogs/news/yaka-korist-vid-chervonogo-muhomora>.
6. Курділь Н.В. Токсичні синдроми при гострих отруєннях умовно їстівними та отруйними грибами / Н.В.Курділь, В.М.Падалка, О.В.Іващенко [та ін.] // Медицина невідкладних станів.- 2016.- № 2.- С.111-116.
7. Лавка мольфара. Режим доступу: <https://lavka-molfara.com.ua/?srsltid=AfmBOop4p7AoE7MxybEMG75zvRlNsphLKMMKUMSYdpIga-xQgiAf7mUR#rec706229358>
8. Макроміцети: лікарські властивості і біологічні особливості / Під ред. проф. С.П. Вассера. — К., 2012. — 285 с.
9. Мартиняк В. Особливості експрес-виявлення токсинів мухомора червоного (*Amanita muscaria*) та мухомора пантерного (*Amanita pantherina*) // Матеріали 85-ої Загальноуніверситетської наукової конференції студентів та

- молодих вчених з міжнародною участю. – Львів: ЛНМУ ім. Данила Галицького, 2025. – С. 85.
- 10.Мудрий мухомор. Режим доступу: <https://muhomor.com/shop>.
- 11.Недашківський С.М. Отруєння грибами: діагностика, патофізіологія, клінічні прояви та невідкладна допомога. Сучасні підходи /С.М. Недашківський //Медицина невідкладних станів.- 2014.-№2.-С.95-101.
- 12.Центр громадського здоров'я в Україні. Режим доступу <https://www.phc.org.ua/news/189-lyudey-postrazhdali-vnaslidok-otruennya-gribami-u-2021-roci> <https://phc.org.ua/news/popri-zaboronu-vidviduvati-lisi-v-ukraini-reestruyutsya-vipadki-otruen-dikoroslimi-gribami>; <https://dpss.gov.ua/news/v-ukrayini-u-2020-roci-zbilshilas-kilkist-otruyen-dikoroslimi-gribami-v-porivnyanni-z-minulimi-rokami> <https://zhmerinka-adm.gov.ua/news/kilkist-otrujen-dikoroslimi-gribami-schodenno-zbilshujetsja>
- 13.Ávila E.L. Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus Amanita muscaria / E.L.Ávila, J. Guevara-Pulido//Journal of Chemistry.- 2020.- Article ID 885999.
- 14.Bédry R. Intoxications Graves Par Les Champignons à l'exception Du Syndrome Phalloïdien [Severe Mushroom Poisoning Excluding Amanita Phalloides Syndrome] /R. Bédry, P. Saviuc //Réanimation.- 2002.- V.11.- P. 524–532.
- 15.Benjamin DR. Muscarinic poisoning. In: Mushrooms: Poisons and Panaceas. New York, NY: WH Freeman; 1995:340-50.
- 16.Brandenburg W.E. Mushroom poisoning epidemiology in the United States /W. E. Brandenburg, K. J. Ward // Mycologia.-2018.-V. 110.- N4.- P.637-641.
- 17.Carboué Q. Amanita muscaria: Ecology, Chemistry,Myths / Q.Carboué, M.Lopez // Encyclopedia.- 2021.-N 1.- P. 905–914.
- 18.Caulfield M.P.International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors/ M.P.Caulfield, N.J.Birdsall//Pharmacol Rev. - 1998.- V.50.-P.279–290.

- 19.Cervellin G. Epidemiology and clinics of mushroom poisoning in northern Italy: A 21-year retrospective analysis / G.Cervellin, I.Comelli, G. Rastelli [et al] // Human & Experimental Toxicology.- 2018 .- V. 37.- P. 697–703.
- 20.Chèze M. Identification et dosage de toxiques végétaux par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS). Revue de la littérature et expérience du laboratoire Toxlab [Identification and quantification of plant poisons by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Bibliographic overview, and Toxlab laboratory's experience] /M.Chèze, M. Deveaux, G.Pépin // Ann. Toxicol. Anal.- 2005.- V.17.- P.43–53.
- 21.De Silva D. D. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry/ D.D.De Silva, S.Raprior, E.Sudarman [et al] // Fungal Diversity.- 2013.- V. 62.- P.1–40.
- 22.Deja S. Rapid Determination of Ibotenic Acid and Muscimol in Human Urine / S.Deja, E. Jawień, I.Jasicka-Misiak // Magn. Reson. Chem. -2014.- V.52.- P. 711–714.
- 23.Deshmukh S.K.Poisonous and hallucinogenic mushrooms of India / S.K.Deshmukh, K.Natarajan, S.A.Verekar// Int J Med Mushr.- 2006.- N8.- P.251–262.
- 24.Dinis-Oliveira R.J. Human and experimental toxicology of orellanine /R.J.Dinis-Oliveira, M.Soares, C.Rocha-Pereira, F.Carvalho // Hum Exp Toxicol.-2016.- V.35.-N 9.- P.1016-1029.
- 25.Dörner S. The Fatal Mushroom Neurotoxin Muscarine is Released from a Harmless Phosphorylated Precursor upon Cellular Injury / S.Dörner ., F.Trottmann ., P.M. Jordan//Angew Chem Int Ed Engl .- 2024.- V.63.-N52.-e202417220.
- 26.El-Ramady H. Edible Mushrooms for Sustainable and Healthy Human Food: Nutritional and Medicinal Attributes /H.El-Ramady, N.Abdalla, K.Badgar / Sustainability.-2022.- V. 14.-N 9.- P. 4941.
- 27.Gawlikowski T. Edible mushroom-related poisoning: A study on circumstances of mushroom collection, transport, and storage / Human & Experimental Toxicology / T.Gawlikowski, M.Romek, L. Satora // Human & Experimental Toxicology. – 2015.- V. 34.- P. 718–726.

28. George P. Muscarinic Toxicity Among Family Members After Consumption of Mushrooms / P.George, N.Hegde // Toxicol Int.-. 2013.- V.20.- N1.- P.113–115.
29. 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 .- V. 125.- P.242-247.
30. 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 // Forensic Toxicol. -2012.- V.30.- P.168–172.
31. Govorushko S. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics / S.Govorushko, R.Rezaee, J.Dumanov, A.Tsatsakis // Food and Chemical Toxicology.- 2019.-V. 128.- P.267-279.
32. 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 // Forensic Toxicol. -2013.- V. 31.- P. 322–327.
33. Horowitz B. Zane. Mushroom toxicity updated: Apr 26, 2023 / B. Zane Horowitz, MD, FACMT, Professor, Department of Emergency Medicine, Oregon Health and Sciences University School of Medicine; Medical Director, Oregon Poison Center; Medical Director, Alaska Poison Control System. — Режим доступа: <https://emedicine.medscape.com/article/167398-overview#a1>.
34. Jorgensen C.G.[et al] Novel-5-substituted 1- pyrazolol analogues of ibotenic acid: synthesis and pharmacology at glutamate receptors /C.G.Jorgensen, H.Brauner-Osborne, D.Nielsen B. [et al] // Bioorganic & Medicinal Chemistry.- 2007.- V.15.- N10.-P.3524-3528.
35. Joshi N.C. Utilization of Polypyrrole/ZnO Nanocomposite in the Adsorptive Removal of Cu²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ Ions from Wastewater /N/C.Joshi, S.Malik, P. Gururani // Letters in Applied NanoBioScience- 2021.- V.10.- P.2339–2351.
36. Kenkyūkai C. Recent trends of mushroom poisoning in Japan / C.Kenkyūkai // the Japanese journal of toxicology.- 2013.-V. 26.- N 1.- P.39-43.

- 37.La Rosa L. Epidemiology and clinical aspect of mushroom poisonings in South Sardinia: A 10-year retrospective analysis (2011–2021) / L.La Rosa, S.Corrias, I.Pintor, S.Cosentino//Food Sci Nutr.- 2024.- V.12.-P.430–438 .
- 38.Lee S. Non-peptide secondary metabolites from poisonous mushrooms:overview of chemistry, bioactivity, and biosynthesis / S.Lee, Y.S.Yu, S.R. Lee, K.H.Kim // Nat. Prod. Rep.- 2022.- V.39.- P. 512–559.
- 39.Lu J. Simultaneous Determination of Multi-Class Mushroom Toxins in Mushroom and Biological Liquid Samples Using LC-MS/MS / J.Lu, J.Zhang, H.Li, C.Sun// Separation.- 2024.- V.11.- N6.- P.183-192.
- 40.Łukasik-Głębocka M. Clinical symptoms and circumstances of acute poisonings with fly agaric (*Amanita muscaria*) and panther cap (*Amanita pantherina*) / M.Łukasik-Głębocka, A.Druzdz, M.Naskret //Przegl Lek . 2011.- V.68.- N8.- P.449-452.
- 41.Marciniak B.Poisoning with selected mushrooms with neurotropic and hallucinogenic effect / B.Marciniak , T.Ferenc, J.Kusawska, J.Ciecwierz, E.Kowalczyk //Med Pr. -2010.- V.61.- N 5.- P.583-595.
- 42.Marinov P., Bonchev G., Ivanov D. Mushrooms intoxications / P. Marinov, G. Bonchev, D. Ivanov [et al.] // Journal of IMAB. — 2018. — T. 24, Вип. 1. — С. 1887–1890.
- 43.Merová B. Determination of Muscarine in Human Urine by Electrospray Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric / B.Merová, P. Ondra, M. Staňková //J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. -2011.-V.879.- P.2549–2553.
- 44.Merová B.Determination of muscarine in human urine by electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric / B.Merová, P. Ondra, M. Staňková [et al] // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci .- 2011.- V.879.- N 25.- P.2549-2553.
- 45.Michelot D. *Amanita muscaria*: Chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology / D.Michelot, L.M. Melendez-Howell//Mycol. Res.- 2003.- V.107.- N.2.- P. 131–146.

46. 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 // *Acta Biochim. Pol.* -2016.- V.63.- P.181–182.
47. 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*. -2018.- V.57.- N2.- P.1-5.
48. 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*. -2019.- V.57.- N2.- P.99-103.
49. Niego A.G. Macrofungi as a Nutraceutical Source: Promising Bioactive Compounds and Market Value/ A.G. Niego, S. Rapior, N. Thongklang [et al] // *J. Fungi*. - 2021.- V.7.- N5.- P.397.
50. Obermaier, S; Müller, M. Ibotenic Acid Biosynthesis in the Fly Agaric is Initiated by Glutamate Hydroxylation/ S. Obermaier, M. Müller / *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2020.- V.59.- P. 12432–12435. <https://doi.org/10.1002/anie.202001870>.
51. Ogawa Y, Sato H, Yamamoto M, Tada H, Hashimoto T. Burst suppression electroencephalogram with mushroom poisoning, *Amanita pantherina*. *Epilepsy Behav Case Rep.* 2015 Sep;4:82-83.
52. Olpe H.R. The Muscimol on Neurones of the Substantia Nigra of the Rat/ H.R. Olpe, W.P. Koella // *Experientia*. - 1978.- V. 34.- P.135-142.
53. Patočka J. Pharmacologically and toxicologically relevant components of *Amanita muscaria* / J. Patočka, B. Kocandřlová // *Mil. Med. Sci. Lett.* -2017.- V. 86.- P. 122–134.
54. Patočka J. Chemistry and Toxicology of Major Bioactive Substances in *Inocybe* Mushrooms/ J. Patočka, E. Ran Wu, M. Nepovimova // *IJMS*. -2021.- V22.- N4: 2218.
55. Pauli J.L. Fatal muscarinic syndrome after eating wild mushrooms / J.L. Pauli, C.L. Foot // *Med J Aust.* -2005.- V.182.- P.294–305.
56. Pennisi L. A report on mushrooms poisonings in 2018 at the Apulian regional poison center: mushrooms poisonings in 2018 / L. Pennisi, A. Lepore, R. Gagliano-

- Candela, L.Santacroce, A. Charitos // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.- 2020.-V.8(E).- P. 616–622.
- 57.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 // Korean J Pain.-. 2023.- V.36.- N 4.- P. 425-440.
- 58.Roupas P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence/P.Roupas,J. Keogh, M.Noakes, C.Margetts, P.Taylor // J Funct Foods.- 2012.-V. 4.-N4.- P.687–709.
- 59.Satora L. Panther Cap Amanita Pantherina Poisoning Case Report and Review/
L.Satora, D.Pach, K.Ciszowski// Toxicon.- 2006.- V.47.- P. 605–607.
- 60.Stebelska K. Fungal Hallucinogens Psilocin, Ibotenic Acid, and Muscimol: Analytical Methods and Biologic Activities /K. Stebelska// Ther. Drug Monit. - 2013.- V. 35.- P. 420–442.
- 61.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 //Int. J. Legal Med.- 2012.- V.126.- P.519–524.
- 62.Stribrny J. GS/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with Amanita pantherina/ J.Stribrny, M.Sokol, B.Merova, P.Ondra // Int J Legal Med.-2012.- V.126.- N4.- P.519-524
- 63.Tangen J.M.Immunomodulatory effects of the Agaricus blazei Murrill-based mushroom extract AndoSan in patients with multiple myeloma undergoing high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: a randomize, double blinded clinical study/ J.M.Tangen, A.Tierens, J.Caers [et al] // Biomed Res Int .- 2015.- P.1–11.
- 64.Tkach V.V. Theoretical Description for Ibotenic Acid and Muscazone. Determination in Mushroom Pulp and Biological Liquids over Conducting Polymer-Modified Electrode / V.V.Tkach, M.V.Kushnir, V.V. Kapiika [et al]// 2023.-.V.13,- N3.- P. 275-279.

65. Tran H. H. Mushroom Toxicity /H.H.Tran, A.L. Juergens // StatPearls Publishing.- 2023.-Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537111/>
66. Tsujikawa K. Analysis of Hallucinogenic Constituents in Amanita Mushrooms Circulated in Japan / K.Tsujikawa, H. Mohri, K.Kuwayama //Forensic Sci. Int. - 2006.- V.164.- P.172–178.
67. Tupalska-Wilczyńska K. Zatrucia muchomorami plamistym i czerwonym — patogeneza, objawy leczenie [Amanita pantherina and Amanita muscaria poisonings — pathogenesis, symptoms and treatment] / K. Tupalska-Wilczyńska, R. Ignatowicz, A. Poziemski, H. Wójcik, G. Wilczyński // Pol Merkur Lekarski. — 1997. — V.3. — N13. — P.30–32.
68. Varghese R. Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: an overview//R.Varghese, Y.B.Dalvi, P.Y.Lamrood, B.P.Shinde, C.K.K.Nair// 3 Biotech.-2019.- V.9.- P.362.
69. Vendramin A. Amanita muscaria and Amanita pantherina poisoning: two syndromes / A.Vendramin, M.Brvar// Toxicon.- 2014 .- V.90.- P.269-272.
70. Xiao-Min Xu Determination of ibotenic acid and muscimol in plasma by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with bimolecular dansylation / Xiao-Min Xu, Jing-Shun Zhang, Bai-Fen Huang, Jian-Long Han, Qing Chen // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci .- 2020.- V.1146: 122128
71. Yoshioka N. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry/ N.Yoshioka, S.Akamatsu, T.Mitsubishi [et al] // Forensic Toxicol. -2014.-V. 32.- P. 89–96.
72. Yuanzheng Wu Mushroom Cosmetics: The Present and Future /Yuanzheng Wu, Moon-Hee Choi, Jishun Li, Hyun-Jae Shin //Cosmetics.-2016. -V 3.-N3 :22
73. Zhang L. Mushroom poisoning outbreaks in Guizhou Province, China: a prediction study using SARIMA and Prophet models / L.Zhang, Qing-yuan Chen, Su-fang Xiong [et a] // Scientific Reports.- 2023.- V.13.- Article number 22517
74. Zosel A. Death Following Ingestion of Clitocybe Species Mushroom /A.Zosel, M.Stanton //J Clin Toxicol 2016.- V.6.-N3:1000308.

SUMMARY

Martyniak Viktoriia

FEATURES OF CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL RESEARCH IN POISONING WITH MUSHROOMS OF AMANITA FAMILY

Department of Toxicological and Analytical Chemistry

Scientific Supervisor: Assoc. Prof. I.Y. Halkevych

Keywords: Amanita muscaria, Amanita pantherina, Amanita phalloides, muscarine, ibotenic acid, muscimol, blood, urine.

Introduction. Recently, biologically active supplements containing powders of the fruiting bodies of Amanita muscaria and Amanita pantherina have been promoted on the Internet. There have been reported cases of poisoning, sometimes fatal, after consuming powders of dried fruiting bodies of these mushrooms. Therefore, developing rapid methods for detecting toxic components in these mushrooms is highly relevant.

Materials and methods. Ethanol (40%) extracts of fruiting bodies of A. muscaria and A. pantherina, as well as capsules containing their powders, were used. Analysis methods included precipitation and staining reactions, thin-layer chromatography (TLC) on Sorbfil plates (20×15 cm), UV spectrophotometry, liquid extraction.

Results. Based on the results of color reactions, it can be concluded that tinctures of Amanita pantherina, Amanita muscaria and Amanita phalloides can be distinguished by reactions with chromotropic acid, Reineck's salt, p-dimethylaminobenzaldehyde solution and Nessler's reagents. For rapid detection of ibotenic acid, it is advisable to use the reaction with acetone solution of ninhydrin on filter paper, which can be used as a rapid test for detecting traces of ibotenic acid in gastric lavage fluids. Ibotenic acid, muscimol and muscarine can be identified by TLC in the following solvent systems: ethanol-methanol-ammonia (50:50:2); ethyl acetate-propanol-water (20:10:6); methanol-ammonia (50:2); methanol-acetone-ammonia (20:25:1). It should be noted that in the methanol-acetone-ammonia (20:25:1) solvent system, ibotenic acid and muscimol are not separated. Tinctures of the three types of fly agarics can be distinguished in the ethanol-methanol-ammonia (50:50:2) and methanol-25% ammonia (50:2) solvent systems. We have established that the UV spectrum of ibotenic acid is characterized by one intense absorption band with a maximum at 212 nm. For ibotenic acid, the specific absorbance at 212 nm was determined, which corresponds to a value of 2368. At the same time, the relative error of quantitative determination of the absorbance does not exceed 0.91%. The UV spectrum of an aqueous solution of muscimol is characterized by two absorption bands with maxima at 231-233 nm and 264-268 nm. Accordingly, the nature of the spectral curves allows identification of ibotenic acid and muscimol in tinctures of red fly agaric and panther fly agaric. Conditions for the isolation of ibotenic acid from tinctures, blood and urine were developed. Blood proteins were precipitated with acetonitrile. Extraction of ibotenic acid was carried out at pH 4 with chloroform and purified by the CTS method. Using this method, the relative error of quantitative determination of ibotenic acid in tinctures does not exceed 1.34%, in blood 2.96%, and in urine – 0.75%. Developed methods for isolating ibotenic acid from blood and urine, based on precipitation, liquid extraction, and thin-layer chromatography, allow recovery of 75–80% of the substance from blood and 93–95% from urine.

Conclusions: The proposed methods for identification, qualitative and quantitative determination of toxic Amanita components are highly effective and of significant importance for toxicological diagnostics and poisoning control, emphasizing their value for practical medicine and scientific research.

Додаток 1