



Р.М. Куліш, Ю.І. Бідниченко

## Експрес-діагностика гострих отруєнь грибами виду строчок звичайний (*Gyromitra esculenta*) за допомогою газо-рідинної хроматографії

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

**Ключові слова:** строчок, метилгідразин, кров, сеча, визначення.

**Ключевые слова:** строчок, метилгидразин, кровь, моча, определение.

**Key words:** false morel, methylhydrazine, blood, urine, determination.

Розроблено газо-хроматографічну методику визначення токсину отруйного гриба строчка звичайного гіромітрину за його основним метаболітом – метилгідрaziном у крові й сечі. Відносна похибка методу становить 3,41%. Межа виявлення метилгідразину у біологічних рідинах організму за допомогою запропонованої методики становить 0,5 мкг у крові й 0,2 мкг – у сечі.

Разработана газо-хроматографическая методика определения токсина ядовитого гриба строчка обыкновенного гиromитрина по его основному метаболиту – метилгидразину в крови и моче. Относительная ошибка метода составляет 3,41%. Предел обнаружения метилгидразина в биологических жидкостях организма с помощью предложенной методики составляет 0,5 мкг в крови и 0,2 мкг – в моче.

Gas chromatographic technique of false morel mushroom toxin determination on their main metabolite methyl hydrazine in blood and urine was elaborated. Relative error is 3,41%. Limit of methyl hydrazine determination in biological liquids using proposed technique is 0.5 μg in blood and 0.2 μg in urine.

Інтоксикації отруйними та неїстівними грибами трапляються в Україні щороку, проте в хіміко-токсикологічному плані такі отруєння не вивчено.

Строчок звичайний (*Gyromitra esculenta*) є одним з декількох різновидів грибів, відомих як несправжній сморчок і широко розповсюджених у Європі та Північній Америці. Строчок звичайний (*Gyromitra esculenta* (L.) Pers.) є смертельно отруйним грибом. Іноді його помилково збирають замість зморшка їстівного (*Morchella* spp.), від якого він чітко відрізняється будовою шапки та формою плодового тіла [1]. Вважається, що після відповідної кулінарної обробки їх можна вживати у їжу [6].

Основним активним компонентом несправжніх сморчків є гіромітрин (N-метил-N-форміл-N-ацетил-гідразон), який в організмі метаболізує до N-метил-N-форміл-гідразину, а потім – з відщепленням формільної групи і альдегіду – до N-метилгідразину (монометилгідразину), який і зумовлює їх токсичну дію [4]. Таке ж розщеплення гіромітрину відбувається при кулінарній обробці грибів. На *рис. 1* представлено схему біотрансформації гіромітрину в організмі людини.

Токсин уражає печінку, центральну нервову систему, іноді нирки. У важких випадках можливий розлад свідомості, кома і смерть через 5–7 днів [7].

За різними оцінками, смертельна доза гіромітрину становить 10–30 мг/кг для дітей і 20–50 мг/кг для дорослих. Ці дози відповідають близько 0,2–0,6 кг і 0,4–1 кг свіжого

гриба відповідно [5]. Проте, індивідуальні реакції людей, які спожили однакову кількість грибів, можуть змінюватись від ознак мінімального отруєння до розвитку важкої інтоксикації [3]. Отруєння у дітей протікає важче; ще не встановлено, відбувається це через більшу масу спожитих грибів відносно маси тіла чи через відмінності у ферментній і метаболічній діяльності [2]. Хоча кількість гіромітрину може бути значно зменшена при варінні грибів, є підозра, що повторне споживання може збільшити ризик виникнення токсичної реакції [3].

Метилгідразин не утворюється в організмі здорової людини в ході нормальних обмінних процесів. Тому наявність метилгідразину в організмі людини, яка споживала гриби, свідчить про можливе отруєння саме гіромітрином зі строчків.

Отже, хіміко-токсикологічне дослідження отруєння грибами виду строчок звичайний зводиться до підтвердження наявності в біологічних рідинах організму не гіромітрину, а саме метилгідразину.

### Мета роботи

Розробка методів виділення основного метаболіту гіромітрину – метилгідразину з біологічних рідин організму (крові й сечі) та розробка умов ідентифікації та кількісного визначення метилгідразину за допомогою газо-рідинної хроматографії у біологічних рідинах організму.

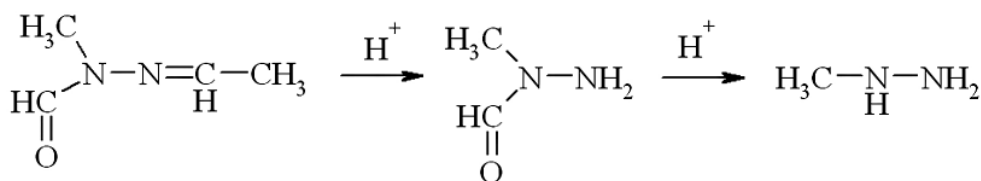


Рис. 1. Схема біотрансформації гіромітрину.

### Матеріали і методи дослідження

Для хроматографічного дослідження метилгідразину використано хроматограф серії «Цвет-110» з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення компонентів проводили на капілярній колонці довжиною 30 м з внутрішнім діаметром 0,52 мм з нанесеною на внутрішню стінку колонки рідкою фазою 100% диметилполісилоксаном з товщиною плівки 3 мкм.

Термостат колонок програмували наступним чином: початкова температура 80°C, підвищення температури до 270°C зі швидкістю 20°C/хв, ізотермічна ділянка – 10 хв.

Газ-носії – азот – подавався зі швидкістю 4 мл/хв.

Інші пристрої хроматографу встановлювали на такі параметри: температура детектора – 300°C, температура інжектора – 200°C.

Обсяг введеної проби – 1 мкл розчину метилгідразину у 95% етанолі. За таких умов аналізу час утримування метилгідразину ( $R_t$ ) становив 2,5 хв.

Для порівняння параметрів утримування та для визначення умов розділення різних метилпохідних гідрозину за допомогою капілярної газової хроматографії досліджено гідрозин, метилгідразин та 1,1-диметилгідразин. Ці речовини хроматографували як окремо, так і в суміші за вказаних умов аналізу.

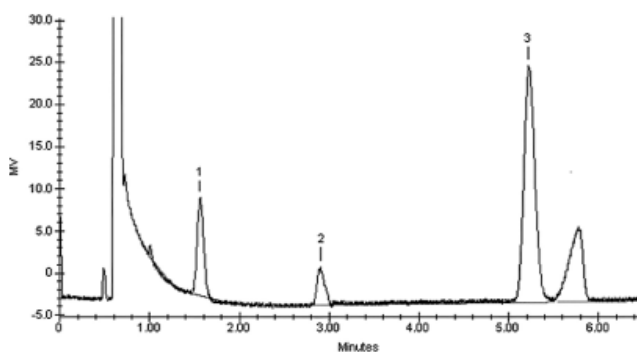


Рис. 2. Хроматограма суміші гідрозину, метилгідразину та 1,1-диметилгідразину: 1 – 1,1-диметилгідразин; 2 – метилгідразин; 3 – гідрозин.

На рис. 2 представлено хроматограму суміші гідрозину, метилгідразину та 1,1-диметилгідразину.

Кількісне визначення метилгідразину проводили способом абсолютної калібровки. Для побудови калібрувального графіка з розчину стандарту досліджу-

ваної речовини виготовляли розчини у 95% етанолі з концентраціями 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 50 і 100 мкг/мл. У дозатор хроматографа вводили по 1 мкл відповідного розчину. Після запису хроматограми вимірювали висоту відповідного хроматографічного піку. За отриманими результатами хроматографічного визначення розраховували параметри утримування та чутливість детектора, будували калібрувальний графік.

Визначення метилгідразину у витяжках з біологічних рідин організму (крові й сечі) проводили наступним чином. По 1 мл етанольного розчину, отриманого після розчинення сухого залишку з витяжок з крові й сечі, випаровували, вносили у патрон для твердофазної екстракції та проводили очистку й концентрування витяжки так, як описано вище. По 1 мкл цього розчину вводили в хроматограф. При цьому на хроматограмі виписували характерний для метилгідразину пік.

Для підтвердження ідентичності до досліджуваного розчину додавали розчин метилгідразину у 95% етанолі (50 мкг/мл), внаслідок чого спостерігалось збільшення висоти хроматографічного піку, абсолютні й відносні параметри якого збігались з параметрами чистої сполуки.

### Результати та їх обговорення

За допомогою розробленої методики з високою ефективністю та чутливістю вдалось досягти повного розділення метил-похідних гідрозину на одній хроматографічній колонці. Чутливість запропонованої методики становить 10 нг/мл, лінійний діапазон відповіді детектора – 10–150 нг/мл.

Відносна похибка визначення метилгідразину методом газо-рідинної хроматографії становить 3,41%.

За допомогою запропонованої методики визначено, що межа виявлення метилгідразину в біологічних рідинах організму становить 0,5 мкг у крові й 0,2 мкг – у сечі.

### Висновок

Дібрано умови газо-хроматографічного аналізу основного метаболіту гіромітрину – метилгідразину. Виявлення та ідентифікація метилгідразину проводиться за часом його утримування та методом добавок. Кількісне визначення проводиться методом абсолютної калібровки. Розроблену методику успішно застосовано для виявлення та кількісного визначення метилгідразину у штучно затруєних біологічних рідинах організму (крові й сечі).

### Література

1. Зерова М.Я. Гриби: їстівні, умовно їстівні, неїстівні, отруйні / Зерова М.Я., Єлін Ю.Я., Коз'яков С.М. – К.: Урожай, 1979. – 230 с.
2. Benjamin D.R. Mushrooms: poisons and panaceas – a handbook for naturalists, mycologists and physicians / Benjamin D.R. – NY: WH Freeman and Company, 1995. – P. 267.
3. Coulet M. Poisoning by Gyromitra: a possible mechanism / Coulet M., Guillot J. // Medical Hypotheses. – 1982 – Vol. 8. – №4. – P. 325–334.
4. Michelot D. Poisoning by Geromitra esculenta / Michelot D. // Journal de toxicologie clinique et expérimentale. – 1989. – Vol. 9, №2. – P. 83–99.
5. Michelot D. Poisoning by Gyromitra esculenta – a review / Michelot D., Toth B. // Journal of applied toxicology. – 1991. – Vol. 11, №4. – P. 235–243.
6. Pyysalo H. Tests for gyromitrin, a poisonous compound in false morel gyromitra esculenta / Pyysalo H. // Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. – 1976. – B. 160, №3. – S. 325–330.
7. Saviuc P. Acute higher fungus mushroom poisoning and its treatment / Saviuc P., Flesch F. // Presse médicale. – 2003. – T. 32., №30. – P. 1427–1435.

### Відомості про авторів:

Куліш Р.М., студентка каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ.  
Бідниченко Ю.І., ст. викладач каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ.

### Адреса для листування:

Бідниченко Юрій Іванович. 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69, ЛНМУ, каф. токсикологічної та аналітичної хімії.  
Тел. (032) 278 64 37; (032) 275 77 34. E-mail: bidnyuri@meduniv.lviv.ua