

Ю. І. БІДНИЧЕНКО, Л. М. МИСАК,
О. Ю. АНДРЕЙКО

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЛЕТКИХ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН ПРИ ОТРУЄННІ ГРИБАМИ

Предложена методика исследования летучих альдегидов и кетонов в отварах плодовых тел условно-съедобных грибов, а также в крови и моче лиц, отравившихся ими. Идентификация токсинов проводилась методом газохроматографического анализа надповерхностного объема исследуемых проб на колонке Quadrex BTR-CW-30-0,25F в режиме программирования температуры от 75 до 225 °C. Для количественного определения исследуемых веществ методом абсолютной калибровки применялся изотермический режим при температуре 270 °C с использованием насадочной колонки (2 м x 3 мм), заполненной Chromosorb 101 (0,25–0,165 мм). В отварах грибов обнаружены уксусный, изомасляный, коричный и салициловый альдегиды и метиламилкетон. В моче отравившихся грибами лиц обнаружены и количественно определены уксусный и изомасляный альдегиды.

There was developed analysis of semivolatile aldehydes and ketones in broth made of conditionally eatable mushrooms as well as in blood and urine of poisoned persons. Toxins were identified by gas-chromatographic headspace analysis on Quadrex BTR-CW-30-0,25F column in temperature programming mode (75–225 °C). Quantitative determination of detected substances was performed by absolute calibration method on column (2 m x 3 mm ID) filled with Chromosorb 101 (0,25–0,165 mm) in isothermal mode (270 °C). The broth of mushrooms contained acetic, isobutylic, cinnamic, salicylic aldehydes and methylamylketon. Acetic and isoamylic aldehydes were discovered in urine of poisoned by mushrooms persons in detected quantities.

Щороку в Україні у сезон збору грибів виникають отруєння, які носять масовий характер. Найчастіше трапляються випадки гострих шлунково-кишкових розладів, які закінчуються досить швидким одужанням після проведення відповідної детоксикаційної терапії. Такі розлади діяльності шлунково-кишкового тракту не викликають серйозних наслідків і тому не стали предметом поглибленого вивчення токсикологами.

Подібного роду отруєння викликаються грибами, які у довідниках називаються умовно-їстівними [2, 4]. Кількість таких грибів є дуже велика. Для своїх досліджень ми відібрали такі види грибів, які найчастіше і є причиною отруєнь:

1) гриби-парасольки (рід *Lepiota*): парасолька гребінчаста (*L. cristata*), парасолька польова (*L. excoxiata*), парасолька плямиста (*L. praeceps*), парасолька волохата (*L. rhacodes*);

2) рядовки (рід *Tricholoma*): рядовка біла (*T. alba*), рядовка мильна (*T. saponeum*), зеленушка (рядовка жовта) (*T. sulphurum*);

3) несправжні опеньки (рід *Huophiloma*): несправжній опеньок жовтий (*H. fasciculare*), несправжній опеньок червоний (*H. sublateralitium*);

4) сиріжки (рід *Russula*): сиріжка гарна (*R. pulchella*), сиріжка їдка (*R. emetica*);

5) печериці (рід *Agaricus*): печериця жовта (*A. xanthodermus*), печериця псевдо-лугова (*A. pseudopratinensis*).

Хімічний склад та механізм дії токсинів перелічених вище грибів ще не вивчено. Ми зауважили, що клінічна картина отруєнь такого роду має певні особливості.

Споживання невеликої кількості грибів викликає сильне подразнення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, але симптоми системного отруєння зустрічаються дуже рідко. На нашу думку, токсини цих грибів є переважно речовинами із місцево-подразнюючою дією. Сильна місцево-подразнююча дія поєднується із низькою резорбцією цих речовин. Тобто ці отруйні речовини мають незначну розчинність у воді.

Слід також відзначити високу термічну і хімічну стійкість цих токсинів. Вони не руйнуються під час тривалої кулінарної (термічної) обробки їжі і не випаровуються під час кип'ятіння відварів (бульйонів). Ці факти свідчать про відсутність у складі молекул токсичних сполук функціональних угруповань, які легко гідролізують при нагріванні в кислому чи лужному середовищі.

У вивченій нами літературі щодо даного типу грибних отрут існує лише припущення, що за своєю хімічною природою ці токсини є кетонами чи альдегідами [1, 6].

Виходячи із наведених вище міркувань, ми припустили, що ці токсини повинні бути ароматичними чи аліфатичними кетонами або альдегідами із досить довгим вуглецевим скелетом, які обмежено розчиняються у воді і добре розчиняються у жирах (органічних розчинниках). Наявність ненасиченого зв'язку у вуглецевому ланцюзі є дуже імовірною, оскільки кратний зв'язок посилює подразнюючу дію таких речовин.

Що ж до їхньої леткості, то, напевно, ці речовини належать до того типу хімічних сполук, які у зарубіжній літературі одержали назву "напівлеткі" (*semivolatiles*).

Речовини природного походження із переліченими вище хімічними та токсикологічними властивостями добре відомі фахівцям. Їх перелік та властивості наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Властивості речовин із місцево-подразнюючою дією,
що використані як стандарти

Речовина	Молекулярна маса, в.о. [5]	Температура кипіння, °C [5]	Розчинність у воді, % [5]	LD ₅₀ (щура), мг/кг [3]
Ацетальдегід	44,05	20,16	р.*	1232
Бензальдегід	106,12	179	0,3	1300
Метиламілкетон (гептанон-2)	114,18	151,5	сл. р.**	1400
Диметилгліоксаль (бутандіон-2,3)	86,09	88–89	25	3400
Ізовалеріановий альдегід (3-метилбутаналь)	86,13	92,5	сл. р.	5,66
Ізомасляний альдегід (2-метилпропаналь)	72,10	64,6	10	39,5
Капроновий альдегід (гексаналь)	100,16	90,6	0,5	3730
Карвон (п-мент-6,8(9)-дієн-2-он)	150,21	231	н. р.***	1640
Кетон малини [4-(п-гідроксифеніл)-2-бутанон]	164,21	140–155	сл. р.	1800
Коричний альдегід	132,16	252	н. р.	3350
Масляний альдегід (бутаналь)	72,11	75,7	7,1	2490
Анісовий альдегід (п-метоксибензальдегід)	136,15	248	0.3	1510
Саліциловий альдегід	122,12	197	1,6	Дані відсутні

* р. – розчинний;

** сл. р. – слабозрозчинний;

*** н. р. – нерозчинний.

Ми спробували виявити перелічені у таблиці 1 речовини у плодкових тілах грибів та біологічних рідинах (кров, сеча) осіб, які отруїлися, підтвердивши (чи спростувавши таким чином) наші припущення.

З метою виявлення та ідентифікації досліджуваних токсинів був застосований метод парофазного аналізу.

В одному із варіантів була використана капілярна хроматографія на колонці Quadrex BTR-CW-30-0,25F (Quadrex Corporation, USA) довжиною 30 м і внутрішнім діаметром 0,25 мм із нанесеною на внутрішню поверхню поліарною рідкою фазою – поліетиленгліколем (Carbowax 20M). Товщина шару плівки – 0,25 мкм. Хроматографування проводилося на приладі “Chrom-4”

(Laboratorní Pstroje, Czechoslovakia), обладнаному полум'яно-іонізаційним детектором, у режимі програмування температури від 75 до 225 °C (із швидкістю 5 °C/хв). Температура інжектора – 230 °C. Газом-носієм був гелій, який подавався із швидкістю 1 мл/хв. Прикладом такого розділення є хроматограма відвару несправжнього опенька, наведена на рисунку 1.

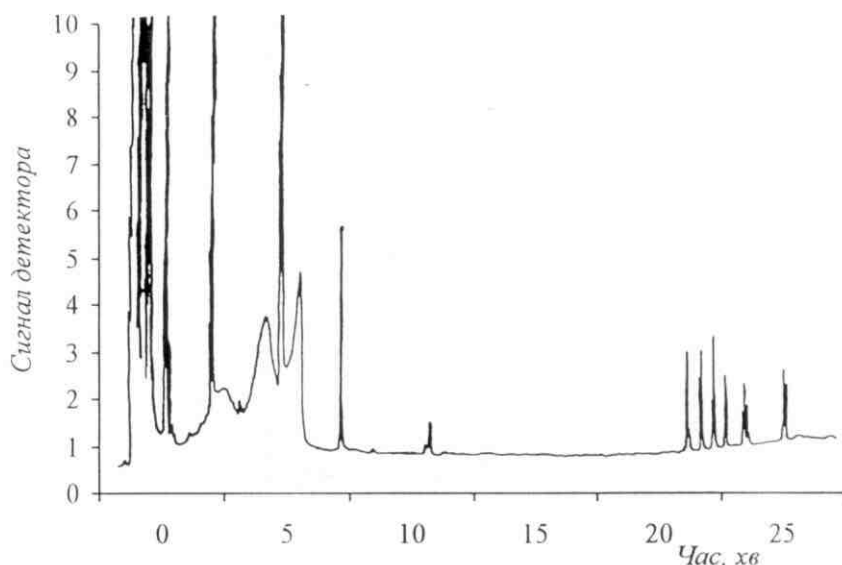


Рис. 1. Хроматограма водяного відвару несправжнього опенька (*Hypholoma fasciculare*):

- 1 – ацетальдегід;
- 2 – ізомасляний альдегід.

При дослідженні біологічних рідин організму нашим завданням було відділення досліджуваних токсинів від основної маси летких сполук, які завжди присутні у сечі як результат нормальних обмінних процесів. Ми не виключали і небажану у даному випадку можливість виявлення близьких за будовою (і за сорбційними властивостями) метаболітів тих лікарських засобів, які застосовувалися при проведенні реанімаційних та лікувальних заходів. Тому іншим варіантом аналізу досліджуваних об'єктів було використання адсорбційної хроматографії.

На той самий прилад встановлювалася стальна колонка довжиною 2 м із внутрішнім діаметром 3 мм, заповнена сорбентом Chromosorb 101 – сферичними гранулами полістиролу (Macherey-Nagel, Germany) із розміром частинок 60–80 mesh (0,25–0,165 мм). Хроматографування проводилося в ізотермічному режимі при температурі колонки 270 °C. Температура дозатора – 280 °C. Газом-носієм був азот, який подавався із швидкістю 20 мл/хв.

Цей варіант хроматографічного розділення дозволяв нам досліджувати не лише рівноважну пару над рідкими пробами, але й вводити безпосередньо у дозатор хроматографа самі досліджувані розчини. Крім того, при цих умовах аналізу ми могли ідентифікувати речовини (компоненти досліджуваних проб) із високою температурою кипіння. Прикладом такого дослідження є хроматограма, наведена на рисунку 2.

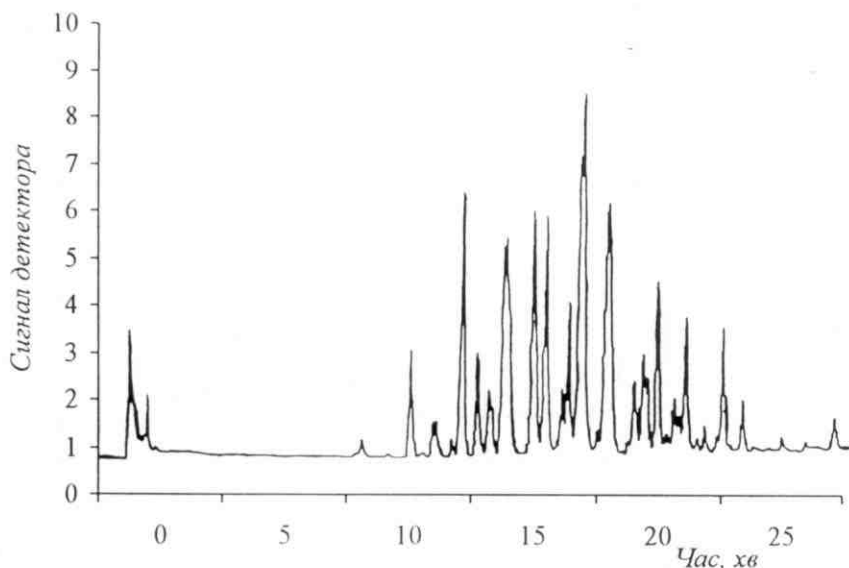


Рис. 2. Хроматограма водяного відвару гриба-парасольки (*Lepiota excoriata*):
1 – коричневий альдегід.

Цей же варіант адсорбційної хроматографії ми використали для побудови калібрувальних графіків та визначення кількісного вмісту токсичних речовин у тих пробах, де токсини були виявлені.

Об'єктами досліджень були витяжки (відвари) із плодових тіл перелічених вище грибів та біологічні рідини (кров, сеча) осіб, які отруїлися.

Гриби перелічених вище видів збиралися нами протягом вегетаційних сезонів 1998–2001 років у лісах Львівської, Волинської, Тернопільської та Івано-Франківської областей. Зібрані плодові тіла висушувалися на повітрі, у захищеному від сонця місці.

Біологічні проби відбиралися в осіб, які перебували на лікуванні у токсикологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні з приводу харчового отруєння – з підозрою на гриби.

Витяжки із плодових тіл готувалися наступним чином: по 1 г повітряно-сухих грибів, подрібнених у міксері, заливали 50 мл дистильованої води та кип'ятили протягом 20 хв. Відвар охолоджували та центрифугували при

5000 об./хв протягом 10 хв. Відбирали 1 мл надосадової рідини за допомогою піпетки та переносили у медичний флакон місткістю 10 мл. У флакон вносили 1 мл насиченого розчину сульфату амонію. Флакон герметично закривали гумовим корком і витримували у сушильній шафі при температурі 125 °С протягом 10 хв. Медичним шприцом відбирали 1 мл газової фази і вводили цю суміш у дозатор хроматографа.

Проби крові готувалися наступним чином: 5 мл крові, взятої у осіб, які отруїлися, вносили у центрифужну пробірку, додавали 5 ОД гепарину і центрифугували при 8000 об./хв протягом 15 хв. Переносили 1 мл сироватки у медичний флакон місткістю 10 мл. У флакон вносили 1 мл насиченого розчину сульфату амонію. Флакон герметично закривали і далі чинили так само, як описано вище.

Проби сечі готувалися наступним чином: 1 мл сечі, відібраної у осіб, які отруїлися грибами, вносили у медичний флакон місткістю 10 мл. У флакон вносили 1 мл насиченого розчину сульфату амонію. Флакон герметично закривали і далі чинили так само, як описано вище.

Стандартні розчини виготовлялися шляхом розчинення у дистильованій воді речовин, перелік яких наведено у таблиці 1. Із речовин-стандартів виготовлялися серії розведень із концентраціями речовин 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 та 50,0 мкг/мл. Введення калібрувальних розчинів у хроматограф проводилося так само, як і введення досліджуваних проб: 1 мл відповідного розчину стандарту вносили у медичний флакон місткістю 10 мл. У флакон вносили 1 мл насиченого розчину сульфату амонію. Флакон герметично закривали гумовим корком і витримували 10 хв у сушильній шафі при температурі 125 °С. У дозатор хроматографа вводили 1 мл газової фази.

Ідентифікація токсинів проводилася за параметрами утримування. Параметри утримування (виправлений та абсолютний час утримування) компонентів досліджуваних проб порівнювалися із аналогічними параметрами стандартних зразків. Якщо вказані хроматографічні параметри одної із досліджуваних проб збігалися із аналогічними параметрами стандартів, проводили додаткове підтвердження ідентичності виявленого компонента методом добавок. У цьому випадку до 1 мл свіжої проби зразка, в складі якого підозрювалася наявність якоїсь із токсичних речовин, додавали 1 мл розчину речовини-стандарту із концентрацією 5,0 мкг/мл і 1 мл насиченого розчину сульфату амонію. Цю суміш поміщали у медичний флакон місткістю 10 мл. Флакон герметично закривали і далі чинили так само, як описано вище.

Кількісне визначення вмісту токсичних речовин (альдегідів та кетонів) у плодових тілах грибів проводилося методом абсолютного калібрування. 1 мкл проби (сечі, сироватки крові чи витяжки із плодових тіл) вводили у дозатор хроматографа із колонкою, заповненою сорбентом Chromosorb 101. Крім визначення висоти хроматографічного піка (кількісних показників), було додатково підтверджено ідентичність виявленої токсичної напівлеткої сполуки за параметрами утримування при інших умовах аналізу.

Для кожної із виявлених у біологічних пробах речовини будувався калібрувальний графік по шістьох точках. З цією метою у дозатор хроматографа із насадковою колонкою вводили по 1 мкл відповідного розчину стандарту. Концентрації стандартних речовин були від 1,0 до 50,0 мкг/мл. Виготовлення стандартних розчинів проводилося так само, як описано вище. Абсолютна похибка методу становить 8,6 %.

У результаті проведених досліджень було виявлено оцтовий та ізомасляний альдегіди у водяних відварах несправжніх опеньок (рисунок 1). У відварі парасольки польової виявлено коричний альдегід (рисунок 2). Вміст вказаних альдегідів знаходиться у межах 1–20 мкг в 1 мл відвару.

У грибах інших видів, які досліджувалися, виявлено коричний альдегід, саліциловий альдегід та метиламілкетон. Вміст цих альдегідів є незначний – на межі визначення. Взаємозв'язок між наявністю вказаних речовин та певною видовою приналежністю досліджених грибів не спостерігався.

У двох випадках у сечі осіб, які отруїлися грибами, було виявлено леткі токсини. В одному випадку було виявлено оцтовий альдегід у кількості 18 мкг. На нашу думку, виявлення оцтового альдегіду не може бути доказом отруєння грибами, оскільки оцтовий альдегід і етиловий спирт у невеликих кількостях завжди присутні у біологічних рідини організму як їх нормальна складова частина.

В іншому випадку був ідентифікований коричний альдегід. Хроматограма представлена на рисунку 3. Кількість коричневого альдегіду становила близько 30 мкг, що дозволяє зробити висновок про достовірне підтвердження отруєння цією речовиною. Через відсутність невикористаних у їжу грибів не вдалося встановити їх видову приналежність.

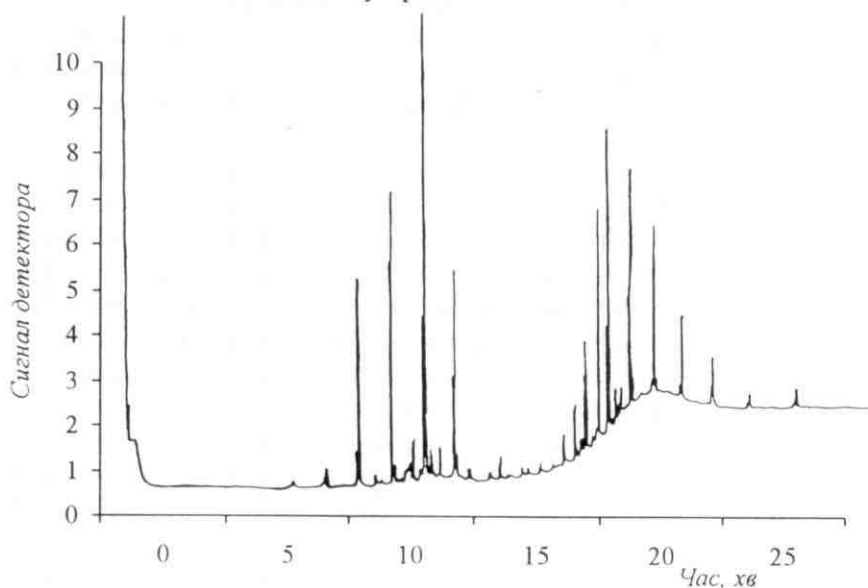


Рис. 3. Хроматограма сечі особи, яка отруїлася грибами:
1 – коричний альдегід.

Нам не вдалося визначити величини коефіцієнта розподілу між водяною та газовою фазами для досліджуваних речовин, тому результати кількісного аналізу можуть бути лише орієнтовними.

Висновки

1. Розроблено методику газо-хроматографічного виявлення летких альдегідів у відварах із плодових тіл грибів різних видів та в біологічних рідинах організму.
2. Ідентифікація та кількісне визначення досліджуваних альдегідів проводиться як із використанням капілярної хроматографії на колонці Quadrex BTR-CW-30-0,25F, так і адсорбційної – на сорбенті Chromosorb 101.
3. Запропонована методика дозволяє з великою імовірністю підтвердити факт отруєння неїстівними грибами.

Список літератури

1. *Беккер З. Э.* Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Мос. ун-та, 1988. – 230 с.
2. *Вассер С. П.* Съедобные и ядовитые грибы Карпат. – Ужгород: Карпати, 1990. – 204 с.
3. Вредные вещества в промышленности. Справочник в 3-х тт. / Под ред. *Н. В. Лазарева и И. Д. Гадаскиной*. – Л.: Химия, 1976–1977.
4. *Зерова М. Я., Слін Ю. Я., Коз'яков С. М.* Гриби: їстівні, умовно їстівні, неїстівні, отруйні. – К.: Урожай, 1984. – 204 с.
5. *Химическая энциклопедия*. 4 т. – М.: Российская энциклопедия, 1995.
6. *Шиврина А. Н. и др.* Биосинтетическая деятельность высших грибов. – Л.: Наука, 1969. – 242 с.

Львівський медичний університет.
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69,
тел. (0322) 786 437, факс (0322) 75 77 34,
e-mail: bidnyuri@meduniv.lviv.ua;

Отримано
22.11.2002

Львівський науково-дослідний інститут
епідеміології та гігієни
79005, м. Львів, вул. Зелена, 12,
тел.: (0322) 76 23 80, факс: (0322) 76-30-67,
e-mail: epidem@mail.lviv.ua;